



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Scienze

Corso di laurea in Scienze Biologiche

Danni al doppio filamento del DNA a livello telomerico
portano alla formazione di tratti a singolo filamento
ricchi in citosina al 5' in cellule umane in G1

Tesi di laurea di:
Tecla Simone

Docente referente:
Dott.sa Maria Assunta Biscotti

A.A. 2020/2021

I Telomeri

I Telomeri sono strutture ribonucleoproteiche situate alle estremità naturali dei cromosomi.

Le ripetizioni in tandem 5'-TTAGGG-3' che caratterizzano i telomeri sono state a lungo considerate componenti silenziate del genoma .

L'identificazione di TERRA : lungo RNA non codificante, accumulato a livello dei telomeri, che garantisce stabilità al genoma mantenendone lunghezza, struttura e funzione ; ha smentito le precedenti ipotesi rivoluzionando così il mondo della ricerca.

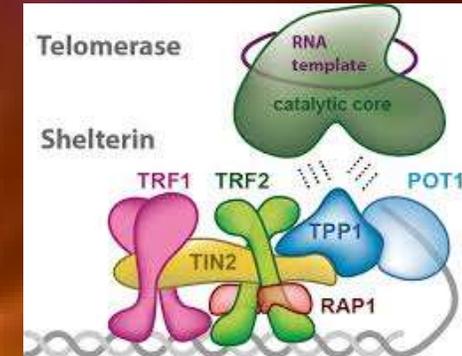
Tre funzioni principali svolte dai telomeri:

- Proteggono le estremità → impedendo di essere riconosciute come «rotte» da parte dei meccanismi DDR;
- Proteggono le estremità dalla degradazione enzimatica;
- Prevengono fusioni cromosomiche end-to-end.



• La telomerasi

- È la proteina responsabile del mantenimento e sintesi dei telomeri.
- Costituita da due componenti, una molecola di RNA (Terc) e la sua controparte proteica (Tert). Queste collaborano sovvertendo al problema della replicazione in cellule altamente proliferative (germinali, tumorali, staminali).

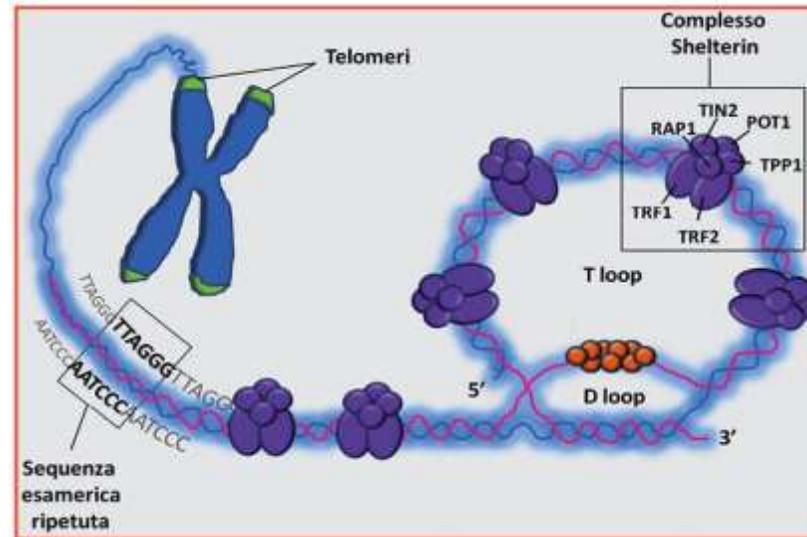


La struttura proteica shelterin formata da sei diverse subunità contribuisce alla regolazione dell'attività della telomerasi, formazione del T-loop e protezione delle estremità cromosomiche.

ALT: MECCANISMO DI ALLUNGAMENTO ALTERNATIVO

Tale meccanismo è indipendente dalla telomerasi, bensì si basa sulla ricombinazione omologa (HR) tra le ripetizioni telomeriche.

È stato osservato in circa il 10-15% dei tumori umani aggressivi come (sarcoma, carcinoma). Non a caso, le cellule tumorali mirano alla proliferazione indefinita sviluppando tali meccanismi per contrastare senescenza e accorciamento; i quali si possono verificare qualora proteine HR vengano inattivate.



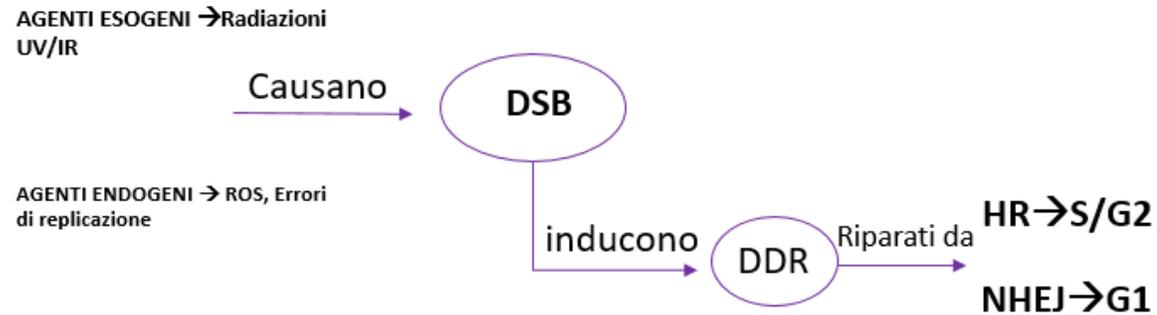
I telomeri ALT possiedono tratti peculiari:

- lunghezza eterogenea
- corpi PML associati all'ALT (APB)
- ripetizioni extracromosomiche (G- e C circles).

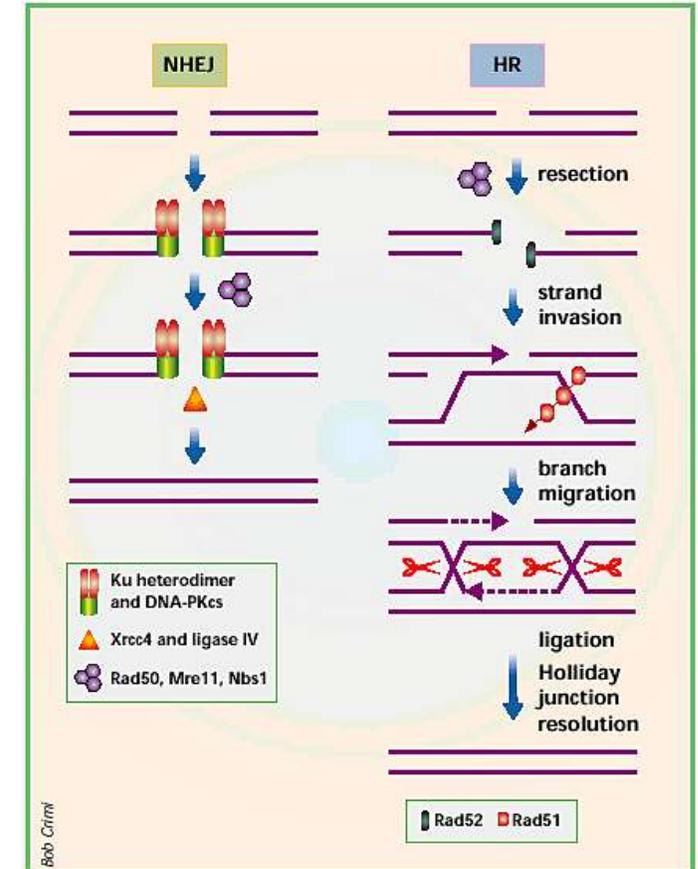
Inoltre, è stato osservato che le cellule ALT sono caratterizzate da elevati livelli di TERRA.

DSB: DOUBLE STRAND BREAKS

Le rotture del doppio filamento del DNA (DSB) sono il tipo di danno più pericoloso al DNA, perché possono provocare la perdita di grandi regioni cromosomiche, arrangiamenti del genoma e morte cellulare.

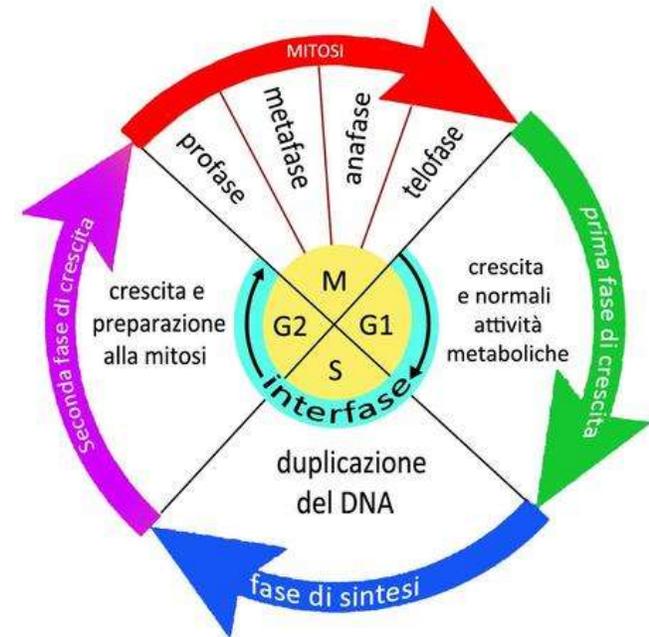


NHEJ (Non-Homologous end Joining) in tutte le cellule di mammifero risulta la principale via di riparazione delle DSB in G1.



INDUZIONE DSB IN CELLULE UMANE IN FASE G1

- L'utilizzo di una nuova endonucleasi TRAS1-EN-TRF1 nelle cellule Umane U2OS(ALT) ha permesso di studiare le "risposte" alle rotture del doppio filamento mirate specificamente in fase G1. Essendo altamente specifica, l'endonucleasi taglia le ripetizioni telomeriche umane (TTAGGG) in vitro e in vivo, provocando l'accorciamento dei telomeri sopprimendo la proliferazione cellulare in cellule tumorali.

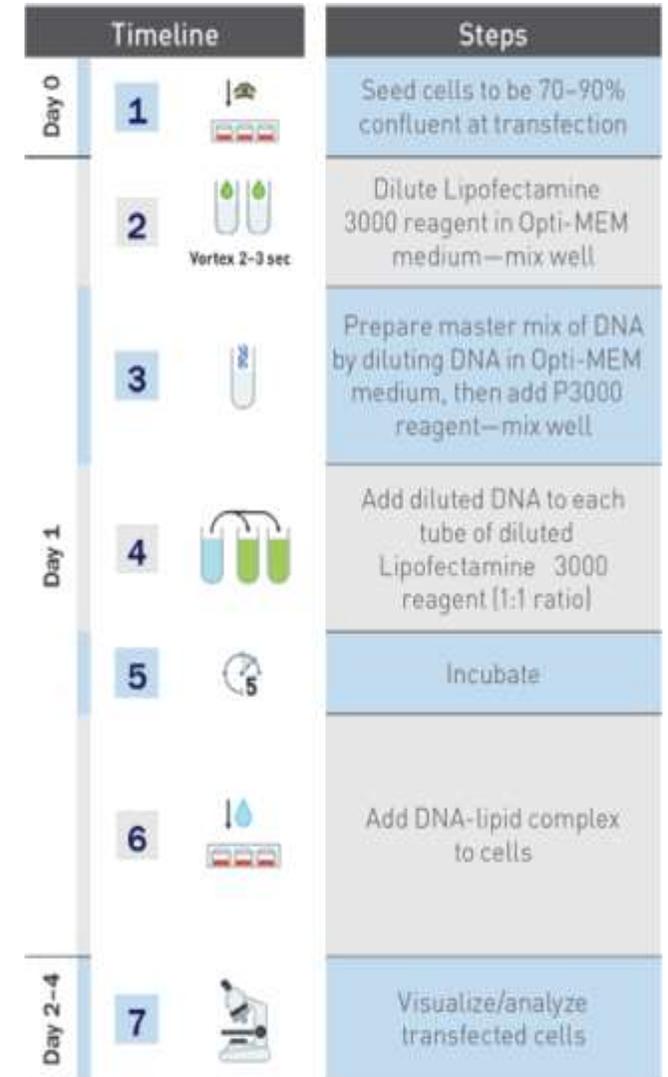


Materiali

Per comprendere le risposte cellulari umane alle DSB telomeriche sono stati effettuati esperimenti di "Trasfezione transitoria". Tale processo è coinvolto nel Trasferimento genico mediante metodi fisici/chimici o tramite Virus(Adenovirus).

Materiali utilizzati:

- Tre diverse linee cellulari: U2OS (cellule di osteosarcoma ALT) , BJ1-hTERT(fibroblasti), Ej-30(carcinoma).
- Plasmide → codifica per una endonucleasi specifica (TRAS1-EN-TRF1)
- Terreni di coltura cellulare modificati (DMEM,OPTI-MEM)
- Reagente Lipofectamine 3000→ per la trasfezione transitoria
- Piastrine da 96,24,12 pozzetti
- Pallone da T-25 e T-75



TECNICHE UTILIZZATE

WESTERN BLOT

Tecnica che permette l'identificazione di una proteina di interesse mediante il riconoscimento di anticorpi specifici.

- Trattamento del pellet cellulare con due tamponi diversi (PBS e tampone di lisi per estrarre le proteine);
- Elettroforesi (SDS-PAGE);
- Trasferimento delle proteine su membrana (PVDF);
- Trattamento con anticorpi specifici.

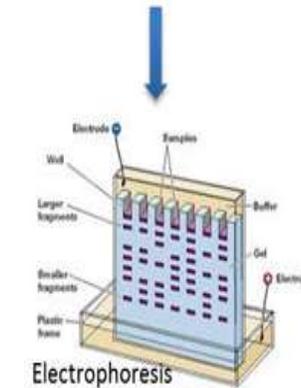
IMMUNOFLORESCENZA

Le cellule coltivate su vetrini da camera e sono state

- -lavate con PBS
- -fissate in PFA
- -permeabilizzate in PBS
- -incubate con anticorpi primari e secondari di capra
- lavate e colorate con DAPI

Workflow

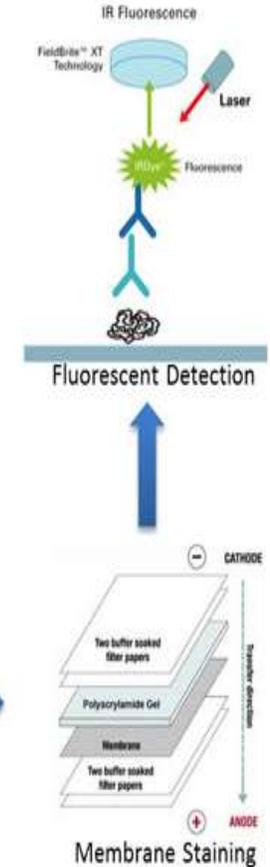
Sample Preparation



Electrophoresis

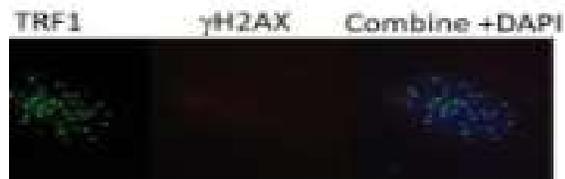


Transfer



Visualizzazione dei marcatori

Per studiare le risposte ai danni ai DSB all'interno dei singoli telomeri, si è valutata la co-localizzazione dei marcatori γ -H2AX e 53BP1 nei DSB telomerici indotti da EN-T.



La trasfezione con EN-T ha portato alla co-localizzazione di γ -H2AX con BJ1-hTERT G1e nelle cellule EJ-30 G1 e S/G2

I segnali 53BP1 si sono localizzati significativamente solo nei DSB telomerici indotti da EN-T nelle cellule S/G2

CONCLUSIONI

Nelle normali cellule umane in fase G1 riscontriamo livelli molto bassi dell'enzima Telomerasi così come per gli obiettivi terapeuticamente rilevanti per interrompere la funzione telomerica e migliorare il trattamento dei tumori ALT-Positivi.

La scoperta di TERRA legato alle sporgenze(5'C-ricco) generate a seguito del taglio da parte dell'endonucleasi specifica nelle cellule umane telomeriche ALT ha dimostrato la presenza di ibridi telomerici RNA/DNA che giocano un ruolo fondamentale nella protezione di queste sporgenze esposte, in modo tale che tali persistano in fase S/G2.

Inoltre non è stata osservata la localizzazione di 53BP1 e nessuna prova della riparazione HR (ricombinazione omologa) dei DSB telomerici in G1.

BIBLIOGRAFIA

-Arora, R., Lee, Y., Wischnewski, H., Brun, C. M., Schwarz, T., and Azzalin, C. M. (2014). RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. *Nat. Commun.* 5:5220.

-Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., and Lieber, M. R. (2017). Nonhomologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 495–506.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

RIASSUNTO

- I telomeri, inizialmente considerati come componenti non essenziali dei cromosomi , attualmente rivestono un ruolo di notevole interesse per lo studio , l'adattabilità e l'importanza che queste ripetizioni adoperano per il mantenimento e stabilità del genoma.
- Ed è stata proprio la scoperta del lungo Rna non codificante TERRA ad aprire nuove strade nel mondo della ricerca ,permettendo di approfondire il funzionamento di cellule ALT ,ma soprattutto la motivazione per cui tali cellule tumorali che sfruttano il meccanismo di allungamento alternativo per mantenere la lunghezza a livello dei telomeri , siano caratterizzati da elevati livelli di TERRA .
- A tal proposito si è ipotizzato che l'alta presenza di TERRA in cellule ALT potrebbe derivare dall'aumento della trascrizione ad opera dell'enzima RNA-Polimerasi II , confermando l'alterazione della cromatina a livello dei telomeri.
- Infine, si prevede che questi studi porteranno allo sviluppo di trattamenti anti -ALT in combinazione con farmaci anti-telomerasi.