



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea triennale in Scienze Biologiche

Titolo della tesi:

**“NUOVE PROSPETTIVE SULLA STRUTTURA E SULLA FUNZIONE DELL’RNA
DELLA TELOMERASI”**

“NEW PERSPECTIVES ON TELOMERASE RNA STRUCTURE AND FUNCTION”

Tesi di Laurea di:

EMANUELE DE LUCA

Docente Referente:

Prof.ssa ANNA LA TEANA

Sessione ESTIVA

Anno Accademico 2019/2020

RIASSUNTO

I telomeri sono complessi di DNA e proteine a protezione dell'estremità dei cromosomi. Queste regioni subiscono un graduale accorciamento ad ogni divisione cellulare, fino al raggiungimento di una lunghezza critica; tale lunghezza segnala la fine della proliferazione, l'inizio della senescenza e la successiva morte per apoptosi.

Esiste, però, una struttura in grado di arginare tale delezione grazie ad un accurato meccanismo di sintesi, compensando con l'aggiunta di nuovo DNA, la Telomerasi.

Questo complesso ribonucleoproteico, responsabile del mantenimento della lunghezza dei telomeri stessi, è sottoposta ad una fine regolazione, essendo repressa nella maggior parte delle cellule somatiche adulte, ma ripresentandosi nel momento della cancerogenesi.

E' possibile, studiando i meccanismi e la struttura dell'enzima in questione, usarlo come indicatore precoce o possibile strumento contro l'attività cancerosa.

Obiettivo

Illustrare la struttura della Telomerasi, al fine di dimostrare il suo potenziale impiego, quale, utile marcatore diagnostico e possibile strumento di lotte a varie forme tumorali.

Telomeri: Struttura e funzione

I telomeri sono strutture specializzate di eterocromatina, che fungono da cappuccio protettivo per le estremità dei cromosomi. Nella maggior parte degli organismi, i telomeri sono costituiti da ripetizioni di corte sequenze ricche di guanina (Blackburn, 1991), complessate con proteine.

Nell'uomo ed in altri vertebrati la sequenza telomerica ripetuta è 5' TTAGGG 3'.

Ogni terminazione di ciascun cromosoma umano conta tra le 1000 e le 2000 ripetizioni, per un totale approssimativo di 6-12 kb. Il numero di ripetizioni e la composizione in basi variano a seconda della specie, ma le funzioni dei telomeri sono conservate e si possono riassumere nei seguenti tre punti:

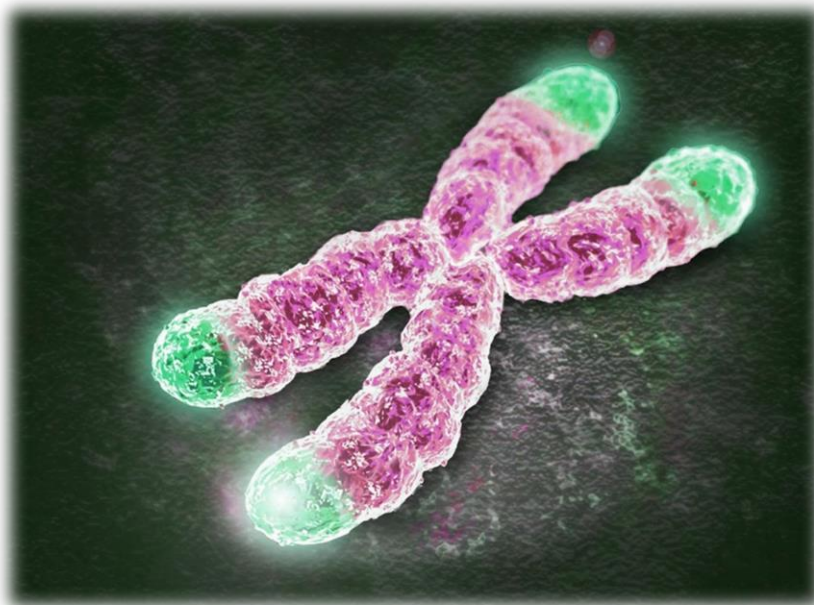


Figura 1: Ultrastruttura di un cromosoma metacentrico e regione telomerica evidenziata in verde.

1) *Organizzazione*

Organizzazione spaziale del nucleo cellulare ed ancoraggio dei cromosomi stessi durante la replicazione del DNA.

2) *Attività trascrizionale*

Influenza sulla trascrizione di geni posti nelle vicinanze delle estremità cromosomiche.

3) Stabilità al Cromosomica.

Protezione dai fenomeni di degradazione per opera di esonucleasi, di fusione con estremità di altri cromosomi per opera di DNA ligasi, di riarrangiamento e di ricombinazione.

Il problema di fine replicazione

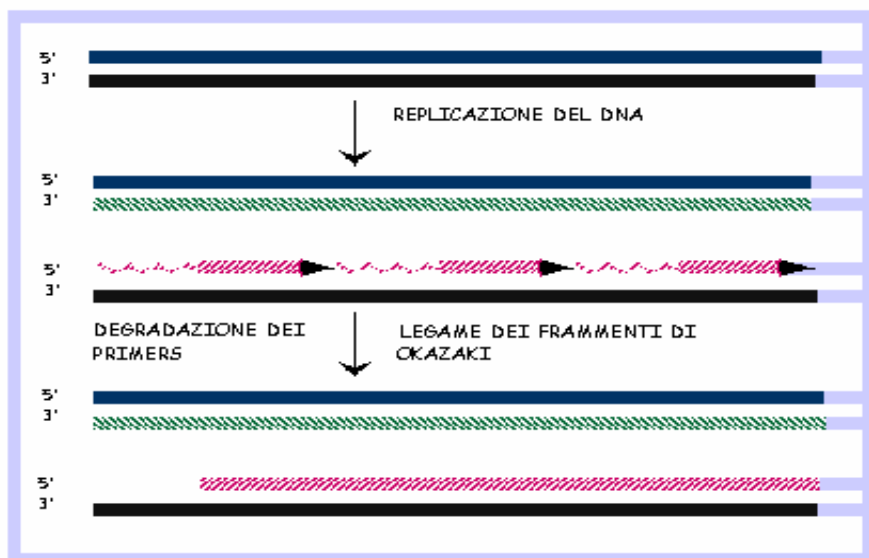
I cromosomi lineari pongono due problemi alla cellula:

- *La protezione delle terminazioni del DNA da degradazione e fusione.*

Le terminazioni 3' e 5' del DNA sono estremamente suscettibili alla degradazione nucleasica ed altamente soggette a ricombinazione genica.

- *La replicazione delle estremità del DNA.*

l'insorgenza del noto problema della replicazione terminale è stato descritto per la prima volta da Watson nel 1972. La DNA polimerasi, può sintetizzare in modo continuo solo il filamento stampo (leading) in direzione 3' → 5'. La sintesi del filamento lento (lagging) risulta discontinua e dipende dall'utilizzo di piccoli primers di RNA, che fungono da innesco per la replicazione e che generano corte sequenze di DNA (frammenti di Okazaki).



La successiva degradazione dei primers e l'intervento della DNA ligasi provvederanno all'unione dei neosintetizzati frammenti di Okazaki. La terminazione 5' del filamento lento risulta più corta rispetto alla terminazione 3' dell'altro filamento, determinando così la perdita di 50 - 100 paia basi di DNA ad ogni ciclo replicativo, questa perdita di DNA porterebbe portare alla morte cellulare. Gli organismi eucariotici hanno evoluto delle strutture specifiche, dette telomerasi, atte al contenimento di tale problema.

Telomerasi

Scoperta per la prima volta nel ciliato *Tetrahymena* (Greider and Blackburn, 1985), la Telomerasi è una ribonucleoproteina appartenente alla grande famiglia delle trascrittasi inverse, ovvero una polimerasi che sintetizza il DNA a partire da uno stampo di RNA.

La sua peculiarità risiede nel fatto che presenta il proprio stampo di RNA come parte integrante dell'enzima. La telomerasi si lega all'estremità 3' dei cromosomi eucariotici ed aggiunge unità ripetute in tandem.

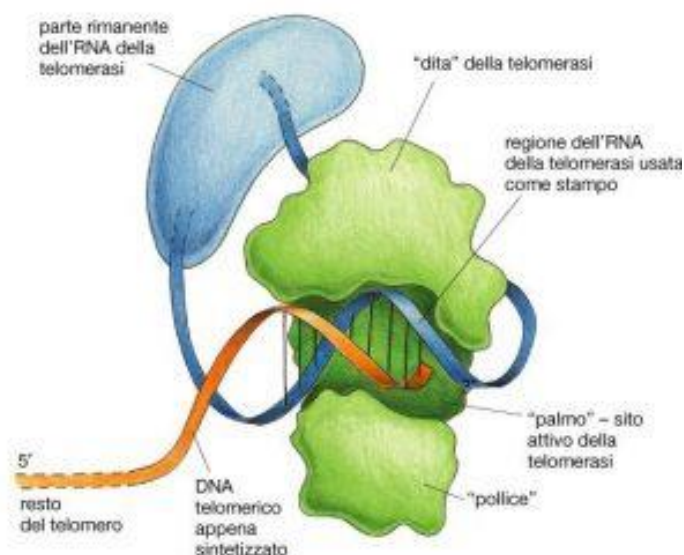


Figura 2: Struttura semplificata della Telomerasi.

Telomerasi: Struttura e funzioni

La funzione principale della Telomerasi è quella di aggiungere sequenze ripetute ai telomeri per contrastare l'accorciamento dei cromosomi ed impedire il raggiungimento della lunghezza critica, che determina il blocco delle mitosi e quindi l'inizio della senescenza cellulare.

La telomerasi attiva necessita di due componenti essenziali:

- TER (Telomerase RNA) - Subunità di RNA, contenente una sequenza nucleotidica che agisce direttamente da stampo per l'aggiunta delle ripetizioni telomeriche.
- TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) - Una subunità proteica, a cui è invece affidata la funzione di catalizzare la sintesi del telomero.

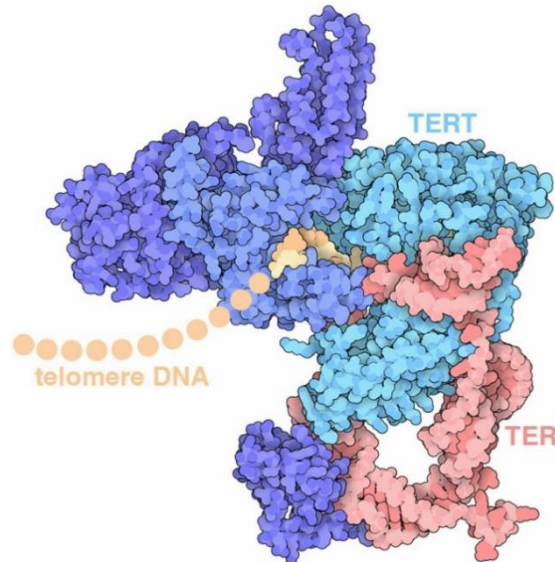


Figura 3: Ultrastruttura rappresentativa delle subunità principali della Telomerasi

Telomerasi: Subunità TER e TERT

La subunità TER (Telomerase RNA)

La subunità di RNA, denominata TER in generale (TR nei mammiferi; hTR

Nell'uomo; TLC1 nei lieviti), presenta una struttura secondaria altamente conservata ritrovata in ciliati e vertebrati. La subunità di RNA umana, hTR (human Telomerase RNA) è costituita da 451 nucleotidi, dei quali 11 rappresentano la sequenza stampo 'CUAACCCUAAC' che codifica per le ripetizioni telomeriche (TTAGGG).

Il gene codificante è localizzato nella parte distale del braccio lungo del cromosoma 3.

Nonostante la variabilità nella sequenza e nelle dimensioni dei TER, esiste un'organizzazione conservata di diversi elementi RNA: una regione di modello, una piega di pseudoknot (PK), un elemento di confine di modello (TBE) e un elemento terminale dello stelo (STE).

Il modello PK è una regione a singolo filamento che la trascrittasi inversa utilizza durante l'aggiunta delle ripetizioni dei telomeri alle estremità cromosomiche. La piega pseudoknot è una parte vitale dell'enzima telomerasi e mutazioni geneticamente ereditate all'interno dello pseudoknot del TER umano, destabilizzano il ripiegamento dell'RNA, dando origine a diverse sindromi da invecchiamento prematuro.

La subunità TERT (Telomerase Reverse Transcriptase)

La proteina TERT è un polipeptide di 127 kDa appartenente alla famiglia delle trascrittasi inverse. Tra i motivi caratteristici conservati, importante è una triade di aspartati, che contribuisce alla formazione di particolari siti di legame nel sito attivo

delle polimerasi; una qualsiasi mutazione in uno degli aspartati determina infatti un'alterazione della funzionalità catalitica.

La subunità TERT è altamente conservata tra le specie e contiene diversi domini: il dominio N-terminale (TEN), il dominio di legame RNA della telomerasi (TRBD), il dominio della trascrittasi inversa (RT) e l'estensione del terminale C (CTE).

Telomerasi: Ulteriori componenti proteiche

Le proteine associate alla telomerasi sembrano giocare un ruolo chiave nel permettere all'enzima di agire in vivo. Nei lieviti sono almeno due le proteine associate al complesso enzimatico, Est1p ed Est3p.

Estratti di lievito, sottoposti a delezione di Est1 o Est3, tuttavia, sono in grado di supportare l'aggiunta di ripetizioni telomeriche in vitro ma non in vivo.

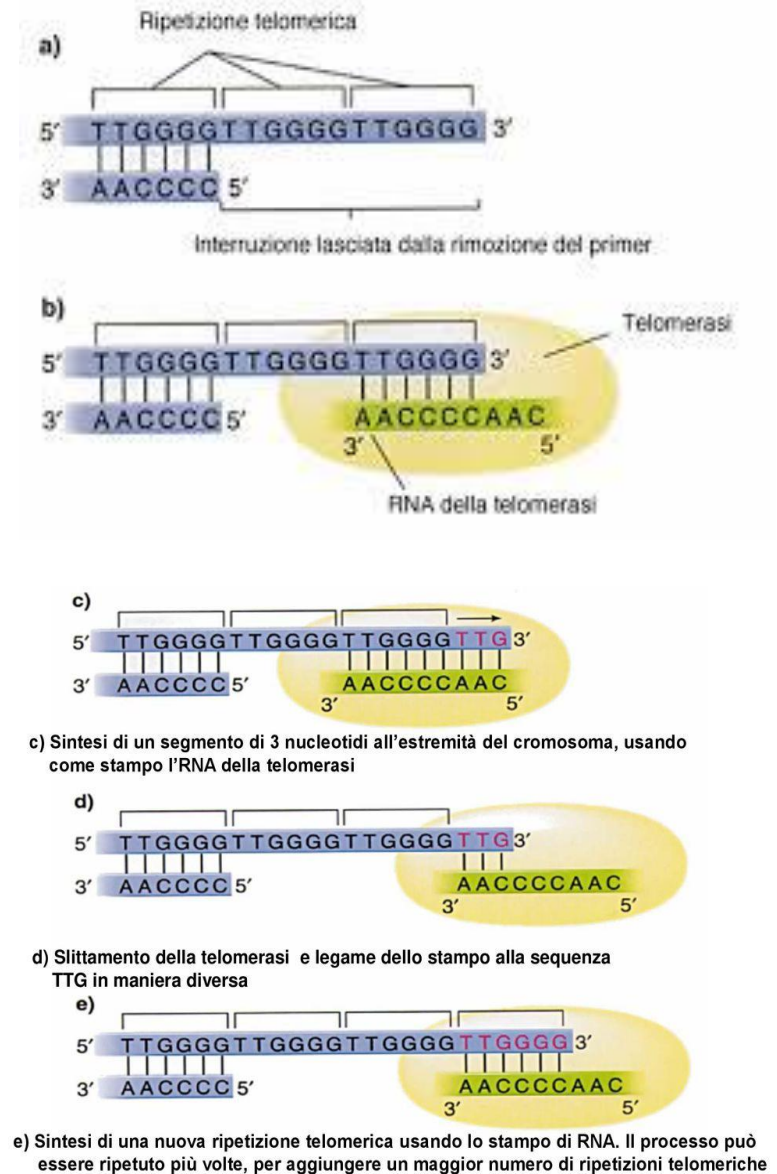
La proteina p53 sembra svolgere un ruolo fondamentale come regolatore del programma di senescenza cellulare. L'assenza di questa proteina funzionale conduce la cellula verso un cammino di immortalizzazione, mentre la sua presenza sembra agisca da blocco dell'attività telomerasica.

In generale, il complesso della telomerasi può essere costituito da un largo numero di componenti, ciascuno dei quali è un potenziale target di regolazione dell'enzima.



Meccanismi d'azione della Telomerasi

- a) Osserviamo, sul filamento leading, una serie di ripetizioni TTGGGG, tipiche sequenze telomeriche presenti in Tetrahymena, Glaucoma (Protozoi). Osserviamo, sul filamento lagging, l'interruzione causata dalla rimozione del primer.
- b) L'estremità 3' della regione stampo nella subunità di RNA si lega alla terminazione 3' sporgente del DNA telomeric.
- c) Inizio dell'attività di sintesi grazie alla subunità catalitica promuove l'aggiunta dei deossinucleotidi in direzione 5' → 3'.
- d) Slittamento dell'enzima in direzione 5' → 3'
- e) Sintesi di una nuova unità ripetuta. Il processo può essere ripetuto diverse volte.



Il modello di azione della telomerasi, illustrato in figura, evidenzia come l'enzima operi la sintesi alternando due passaggi:

- allungamento;
- traslocazione.

Presenza della Telomerasi nei tessuti

La maggior parte delle cellule somatiche umane, eccetto le cellule germinali non possiede attività telomerasica e mostra un progressivo accorciamento dei telomeri, con conseguente senescenza. L'attività telomerasica è strettamente regolata durante la normale crescita e lo sviluppo, al fine di evitare una proliferazione illimitata, diretta verso la malignità.

Attività telomerasica è stata osservata in numerosi tessuti fetali umani, (muscolo, polmone e cute) l'enzima è attivo durante lo sviluppo e viene represso nei tessuti adulti.

Le prime cellule umane normali risultate essere telomerasi-positive furono linfociti sottoposti a stimolazione della proliferazione, altri tipi cellulari con attività telomerasica sono: l'epitelio intestinale, i cheratinociti basali, le cellule staminali del sistema ematopoietico.

In realtà, ogni tessuto presenta una piccola sottopopolazione con bassi livelli di attività telomerasica insufficiente a prevenire l'erosione telomerica.

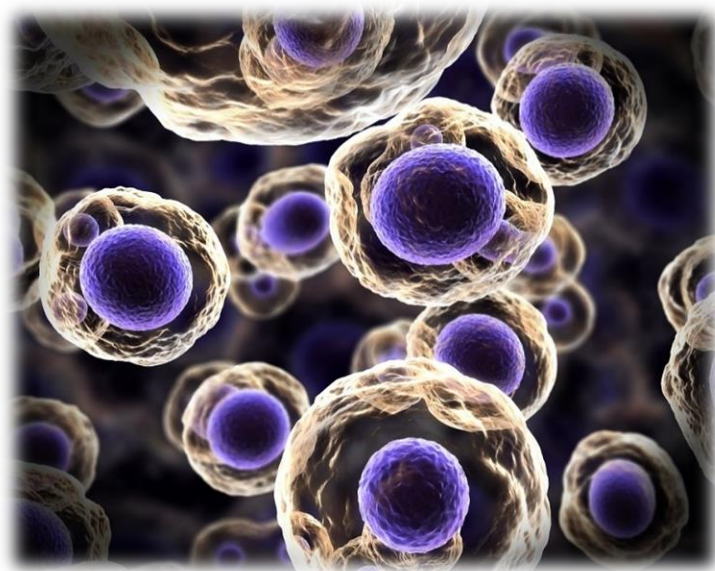


Figura 4: Cellule staminali del sistema ematopoietico.

Telomerasi ed oncogenesi

Dal momento che l'attività telomerasica è risultata presente nella maggior parte dei tumori maligni e assente nelle cellule somatiche normali, è stato possibile ipotizzare un suo ruolo centrale nel processo di cancerogenesi.

Rari cloni di cellule immortali evitano la crisi e sopravvivono grazie all'attivazione della telomerasi.

Questa ipotesi è stata convalidata da studi sulla lunghezza del telomero e dalla valutazione dell'attività telomerasica di cellule umane in coltura.

L'analisi della lunghezza telomerica in cellule embrionali di rene trasformate con l'antigene del virus 40T di scimmia, ed in linfociti B umani trasformati con il virus di Epstein-Barr, ha evidenziato un costante accorciamento dei telomeri fino al momento di ingresso delle cellule in crisi; nelle cellule sopravvissute, invece, viene attuato un meccanismo di mantenimento della lunghezza. L'enzima telomerasi risulta infatti inattivo nelle cellule mortali prima della fase di crisi, ma è attivato nei cloni cellulari immortalizzati.

E' sensato ipotizzare che l'elevata attività telomerasica nel tumore sia dovuta a uno o più di questi fattori:

- riattivazione della telomerasi, nel corso dell'oncogenesi;
- fallimento del suo spegnimento, per esempio a causa della mutazione di un gene coinvolto nel pathway di repressione della telomerasi;
- pressione selettiva di una cellula telomerasi-positiva.

Telomerasi ed oncogenesi: cenni di regolazione

Il meccanismo attraverso il quale la telomerasi viene repressa nelle cellule somatiche normali e viene invece attivata nelle cellule tumorali sembra coinvolgere proprio la regolazione dell'espressione di hTERT.

Nella maggior parte delle cellule normali non è possibile nemmeno rilevare l'espressione di hTERT, mentre sono comunque individuabili hTER ed alcune delle proteine associate.

Queste osservazioni fanno ipotizzare che hTERT sia un fattore essenziale per l'attività telomerasica e che la sua regolazione giochi un ruolo chiave nel processo di immortalizzazione.

Meccanismi di regolazione dell'attività telomerasica:

- 1) il controllo trascrizionale del gene hTERT;
- 2) lo splicing alternativo dei trascritti di hTERT

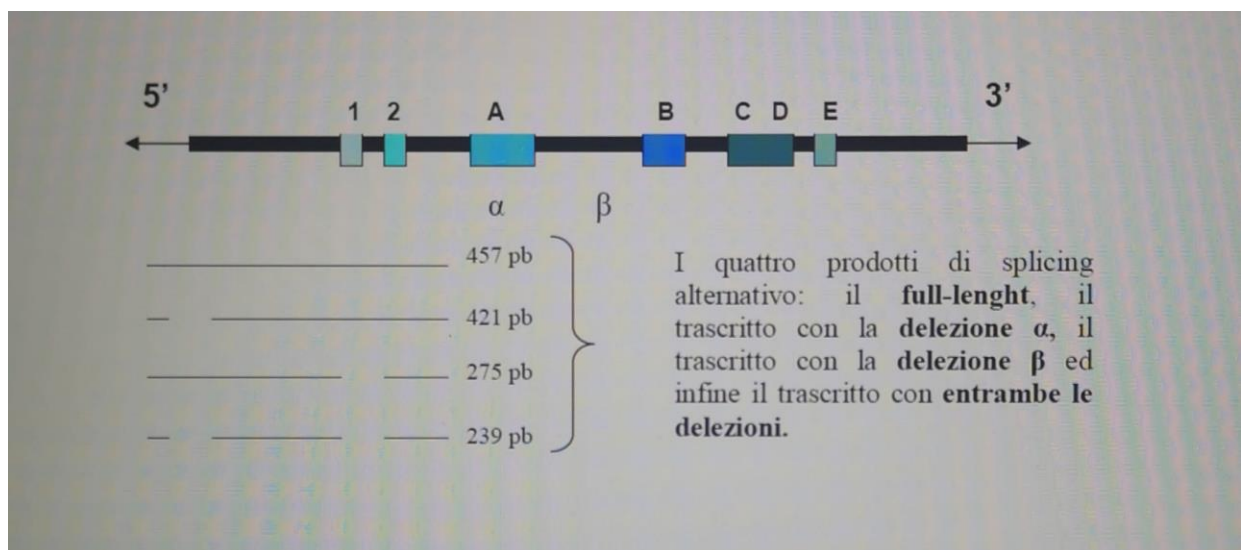


Figura 5: Diagramma della molecola dell'mRNA di hTERT. Sotto, i rispettivi quattro prodotti derivati dallo splicing alternativo.

Solo il primo trascritto è in grado di codificare per una trascrittasi inversa funzionale.

Prospettive future: Una Speranza nella lotta ai tumori

Telomerasi come Marcatore

La telomerasi, dal momento che è attiva nella maggior parte dei tumori maligni e soltanto in una bassa percentuale di tessuti normali, potrebbe essere utilizzata come marcatore tumorale precoce.

Telomerasi come tallone d'Achille dei tumori

La scoperta di una stretta correlazione tra attivazione della telomerasi, immortalizzazione cellulare ed oncogenesi ha fatto supporre che gli inibitori della telomerasi potrebbero essere potenti agenti terapeutici, in grado di uccidere selettivamente le cellule tumorali.

L'inibizione della telomerasi dovrebbe portare verso un accorciamento dei telomeri fino ad una lunghezza critica, tale da determinare senescenza replicativa e morte cellulare dovuta a danni cromosomici irreparabili.

E' possibile inibire direttamente la telomerasi a livello di attività enzimatica oppure modulare la sua espressione genica. Sia lo stampo di RNA (hTR), che la subunità catalitica hTERT sono stati utilizzati sperimentalmente come bersaglio.

Conclusioni

La telomerasi è una parte cruciale e complicata della biologia delle cellule eucariotiche. È stato studiato per molti anni ed è stato implicato in processi che vanno dall'invecchiamento cellulare, alla riparazione del DNA e alla genesi tumorale.

Gli sforzi incessanti continuano sulla ricerca riguardo tutte le interazioni e la struttura di questa affascinante molecola, ciò potrebbe portare ad enormi cambiamenti con un impatto sul mondo scientifico e sull'intera umanità.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

New Perspectives on Telomerase RNA Structure and Function

Cherie Musgrove, University of California Santa Cruz, Department of Microbiology and Environmental Toxicology, csmusgro@ucsc.edu Linnea I. Jansson, and

University of California Santa Cruz, Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology, ljansson@ucsc.edu Michael D. Stone

University of California Santa Cruz and the Center for Molecular Biology of RNA, mds@ucsc.edu

Peter J. Russell - Genetica un approccio Molecolare 4° edizione 2010

Blackburn E.H. (1991)

Structure and function of telomeres.

Nature, 350 : 569-573

Blackburn E.H. (1992)

Telomerases.

Ann. Rev. Biochemistry, 61 : 113-129

Silvia Gisfredi - Telomerase activity in tumor development and progression UNIPi, Dipartimento di chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia (PI)