



Regione Lombardia

Nuovi ruoli dei telomeri e della telomerasi

Marco Santagostino

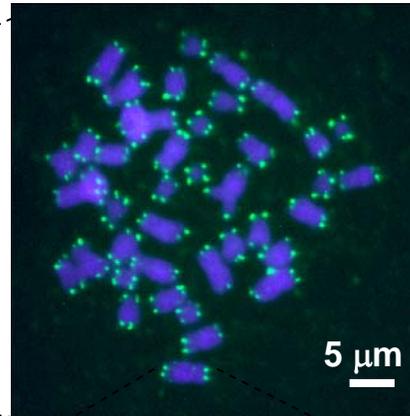
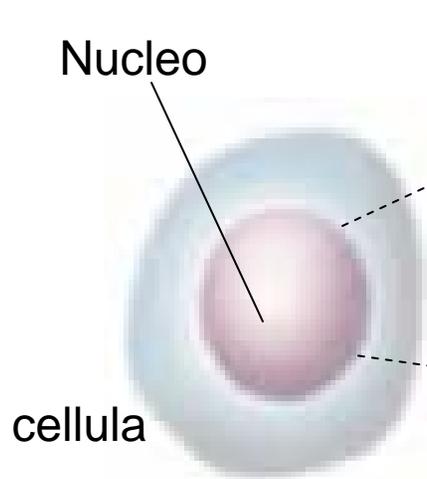
Tutor: Elena Giulotto

Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Pavia

Argomenti trattati

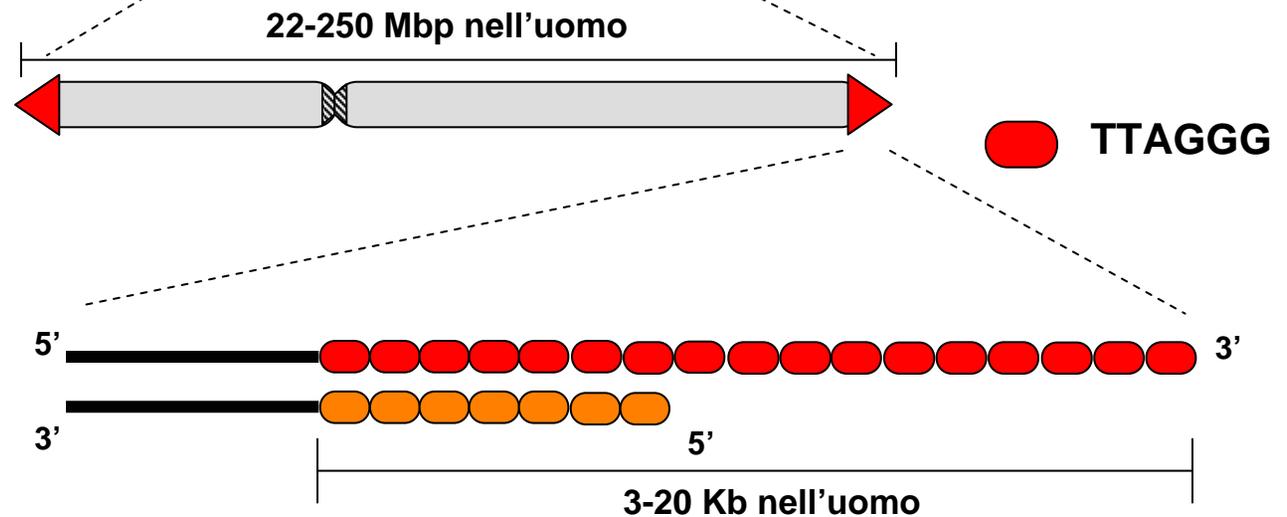
- 1. I telomeri e la telomerasi**
- 2. TERRA (Telomeric Repeat-containing RNA)**
- 3. I telomeri interstiziali**

I telomeri



Cromosomi

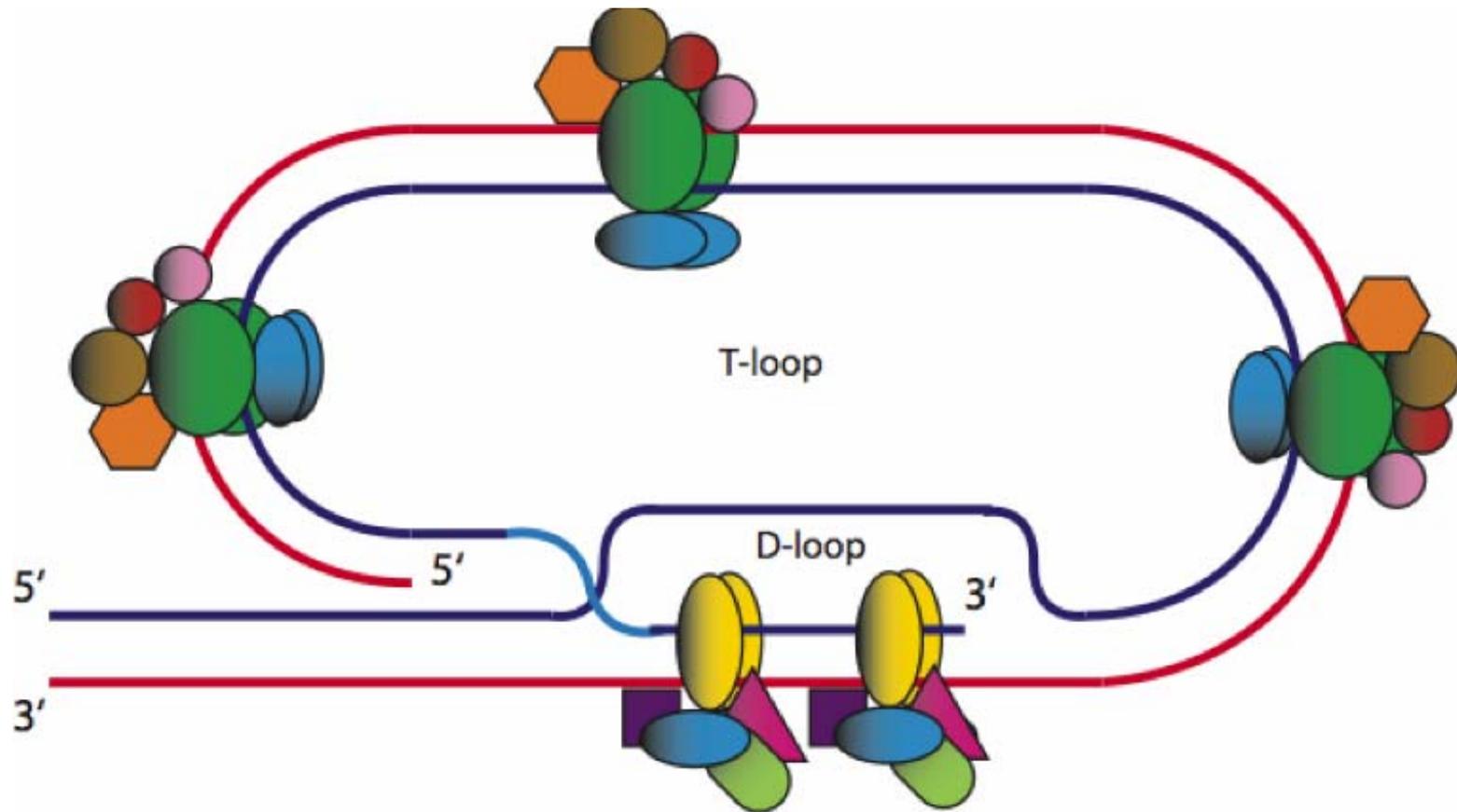
Telomeri:
estremità
dei
cromosomi
lineari



* **Funzione essenziale** nella **replicazione** e **stabilità** cromosomi

2009: Premio Nobel in Fisiologia e Medicina a E. Blackburn, C. Greider e J. Szostak per la ricerca sui telomeri

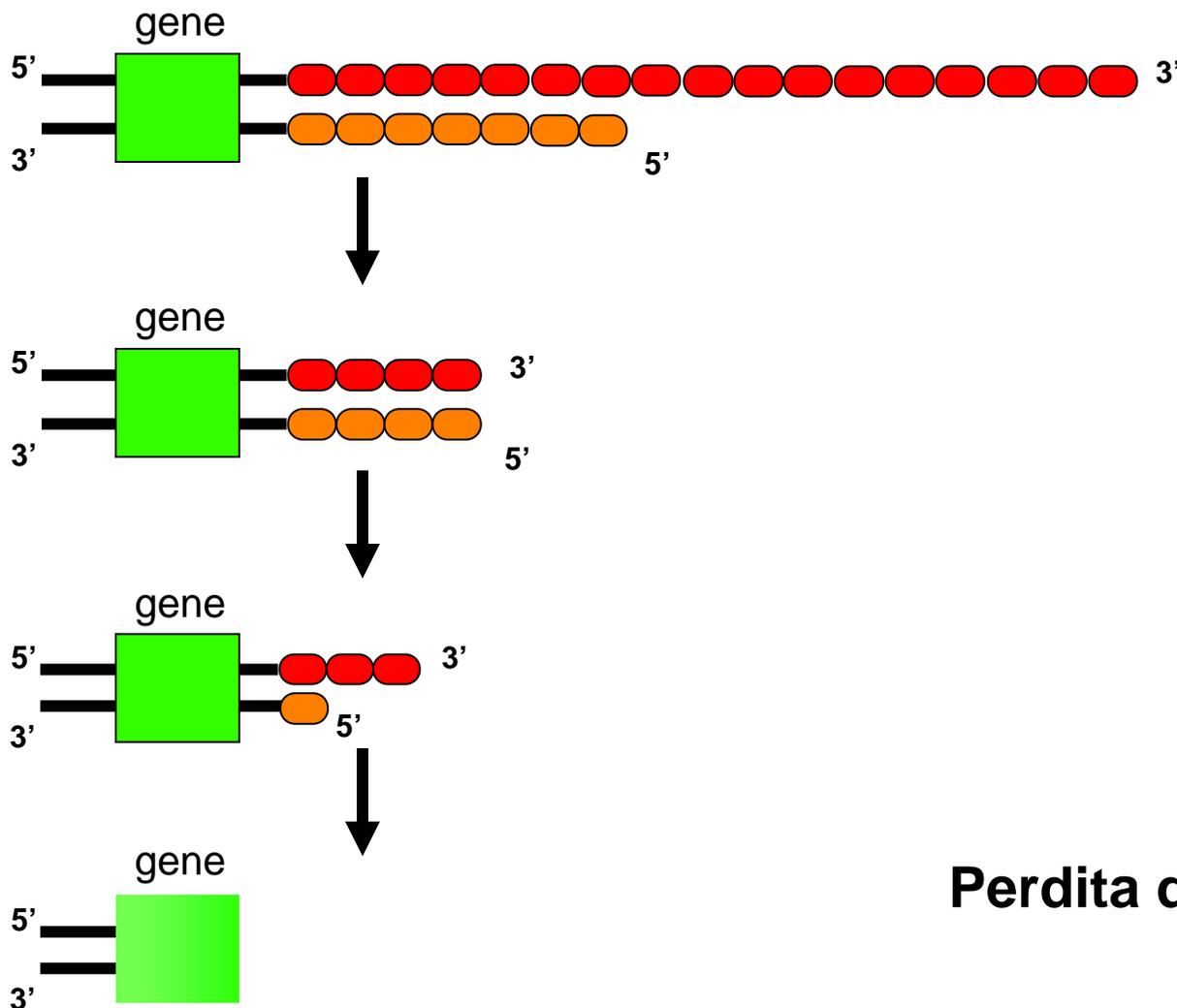
La struttura dei telomeri è diversa da quella delle estremità delle rotture accidentali del DNA



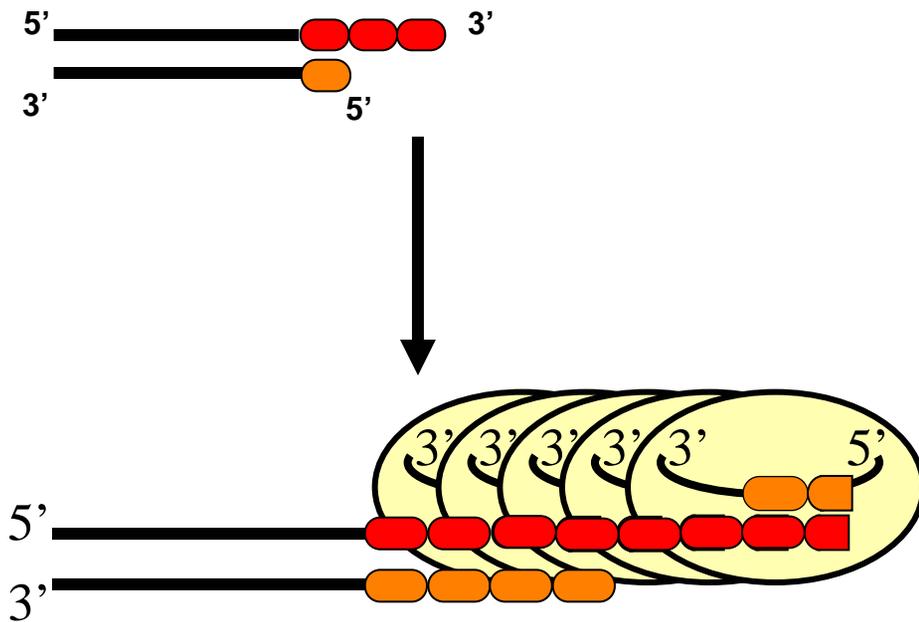
La struttura dei telomeri consente alla cellula di distinguere le estremità dei cromosomi dalle estremità delle rotture del DNA

Problema della replicazione delle estremità

Senza un **apparato specializzato** nella replicazione delle estremità, i telomeri delle cellule somatiche **si accorciano** gradualmente ad ogni divisione cellulare



Perdita di materiale genetico



Telomeri troppo corti sono indistinguibili da rotture accidentali del DNA, **i cromosomi diventano instabili e vanno incontro a mutazione**

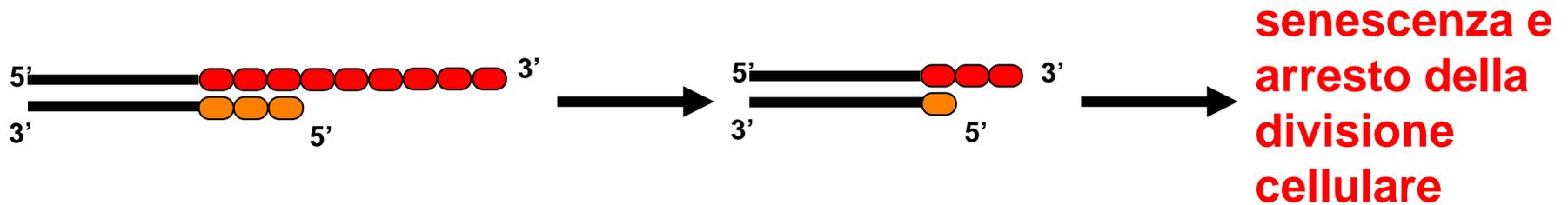
Telomerasi: enzima CHIAVE nella sintesi dei telomeri, **ripristina la lunghezza dei telomeri sintetizzando ripetizioni telomeriche**

I tumori

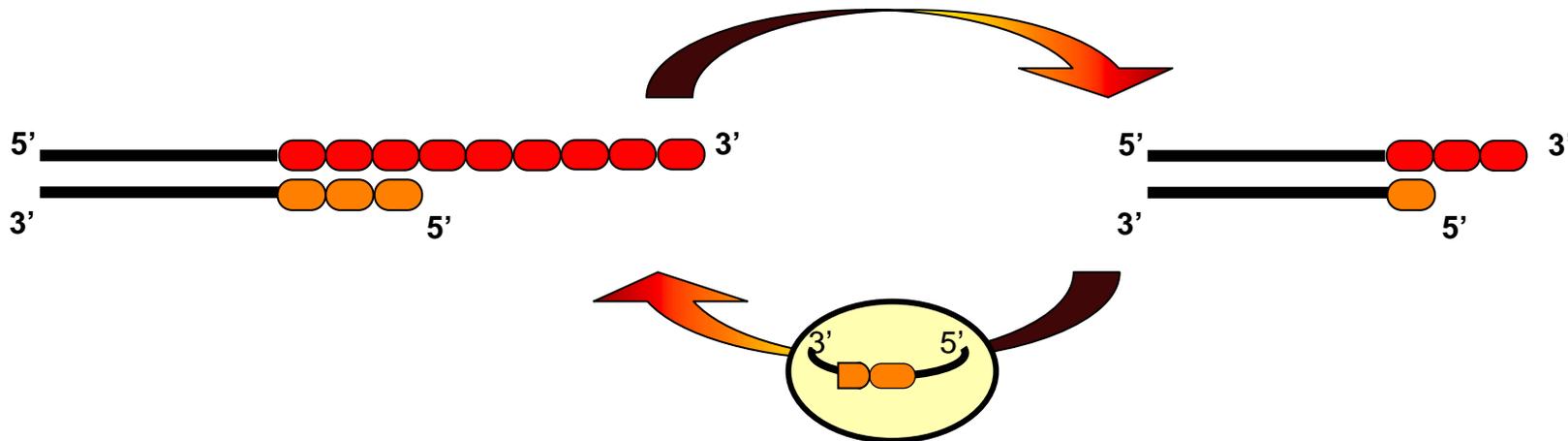
- * La trasformazione tumorale è dovuta ad **alterazioni genomiche (mutazioni)** a carico delle cellule somatiche. I riarrangiamenti cromosomici sono uno dei principali tipi di mutazione che causano la trasformazione tumorale

- * **Telomeri troppo corti o malfunzionanti causano instabilità genomica e mutazioni**

Nelle cellule somatiche la telomerasi è inattiva, esse si dividono in modo controllato e per un numero definito di generazioni



Le cellule tumorali si dividono in modo incontrollato. La riattivazione della telomerasi nelle cellule tumorali consente la loro immortalizzazione



Equilibrio dinamico fra perdita di ripetizioni (problema della replicazione delle estremità) e aggiunta di ripetizioni (telomerasi)

Tipo cellulare	Telomerasi	Telomeri
Adulte somatiche (normali)	-	Progressivo accorciamento
Staminali e germinali	+	Mantenimento
Tumoriali	+*	Mantenimento

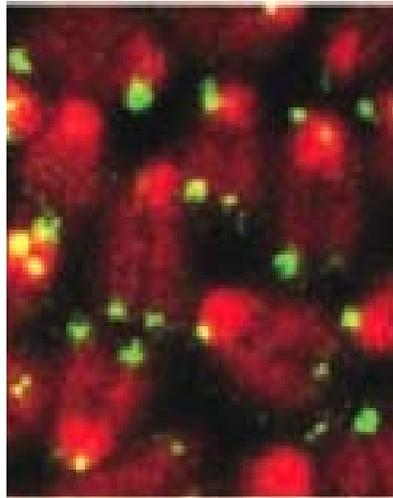
* **Marker tumorale: riattivazione in oltre il 90% dei tumori**

* **Bersaglio di farmaci antitumorali**

TERRA (Telomeric Repeat-containing RNA)

I telomeri sono “**ATTIVI**”, “trascrivono” (producono) un RNA chiamato **TERRA**

Le molecole di TERRA hanno lunghezza eterogenea (100 bp - 9 Kb)



DNA

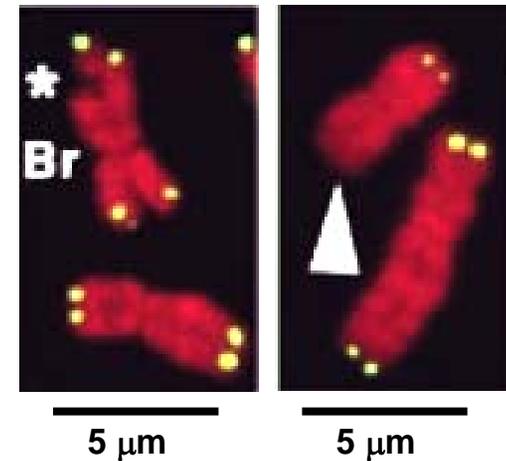
TERRA

TERRA localizza ai telomeri

5 μ m

Cromosomi di cellule tumorali coltivate in vitro, visualizzazione dell'RNA con microscopia confocale

L'aumento della quantità di
TERRA causa **accorciamento
dei telomeri e instabilità
cromosomica**



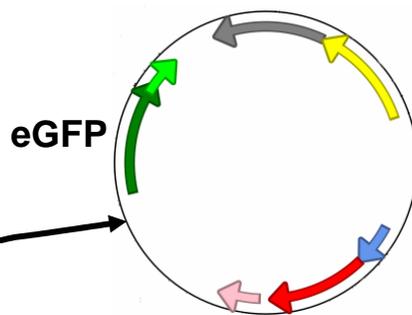
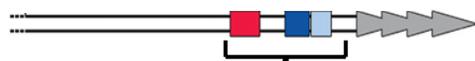
Cellule tumorali umane coltivate in vitro,
RNA-interference, tecniche citogenetico-
molecolari, microscopia a fluorescenza

TERRA ha un ruolo fondamentale nella stabilità dei telomeri

Identificazione di un promotore di TERRA



Analisi bioinformatica



Ligazione al gene
eGFP

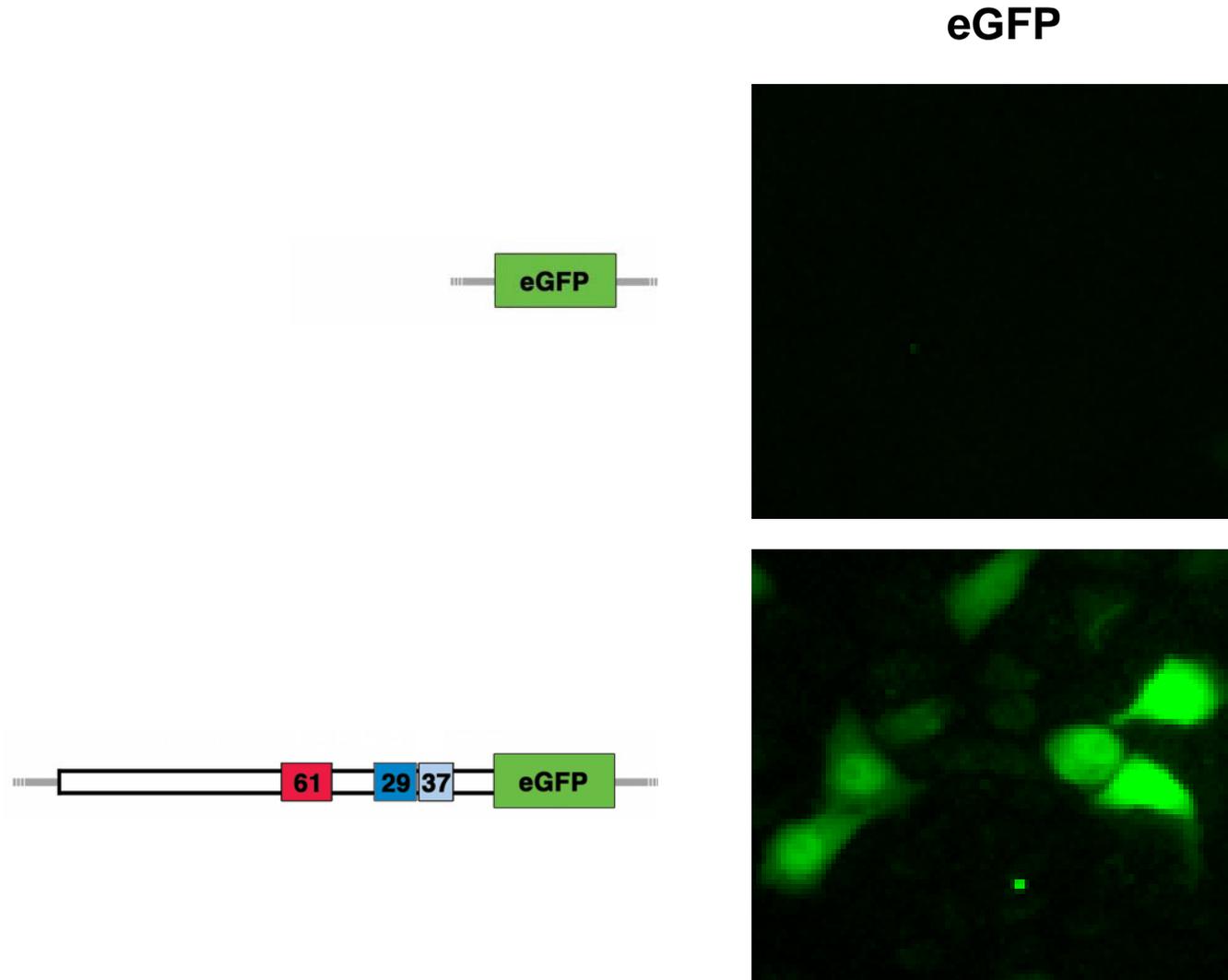


Coltura cellulare



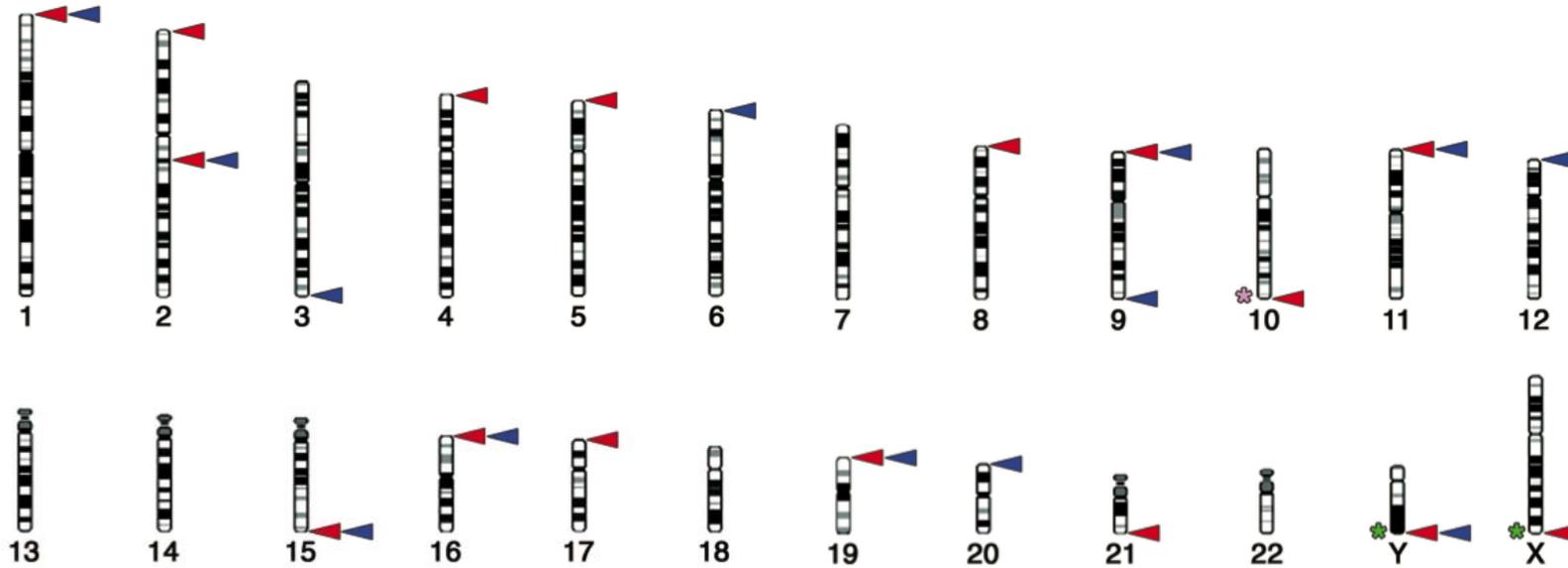
Microscopia a
fluorescenza

Identificazione di un promotore di TERRA



Cellule tumorali coltivate in vitro, visualizzazione con microscopia a fluorescenza

Precisa localizzazione dei promotori di TERRA

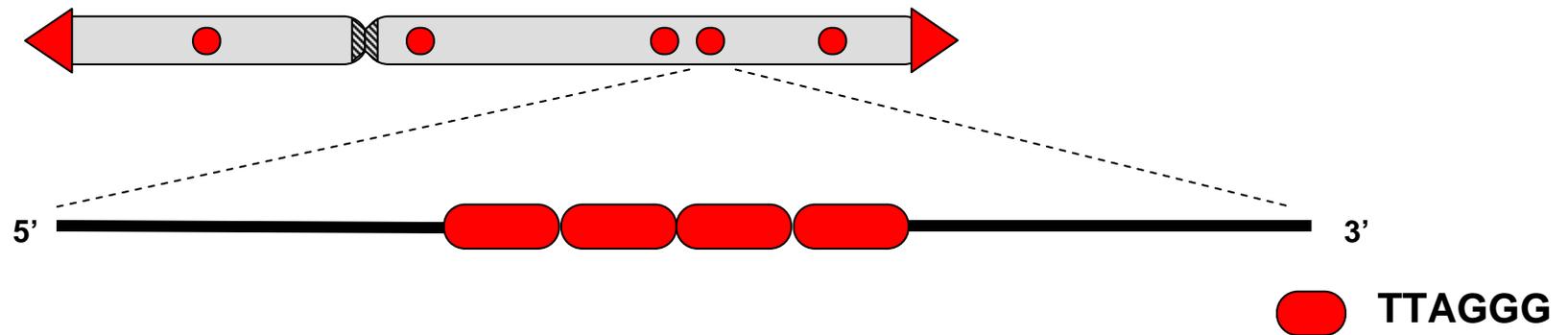


TERRA ricopre un ruolo essenziale nella biologia dei telomeri

La deregolazione di TERRA è correlata allo sviluppo dei tumori?

I telomeri interstiziali

Telomeri interstiziali: ripetizioni telomeriche posizionate in siti **non terminali** dei cromosomi (83 nell'uomo; Azzalin et al., Chromosoma 2001)



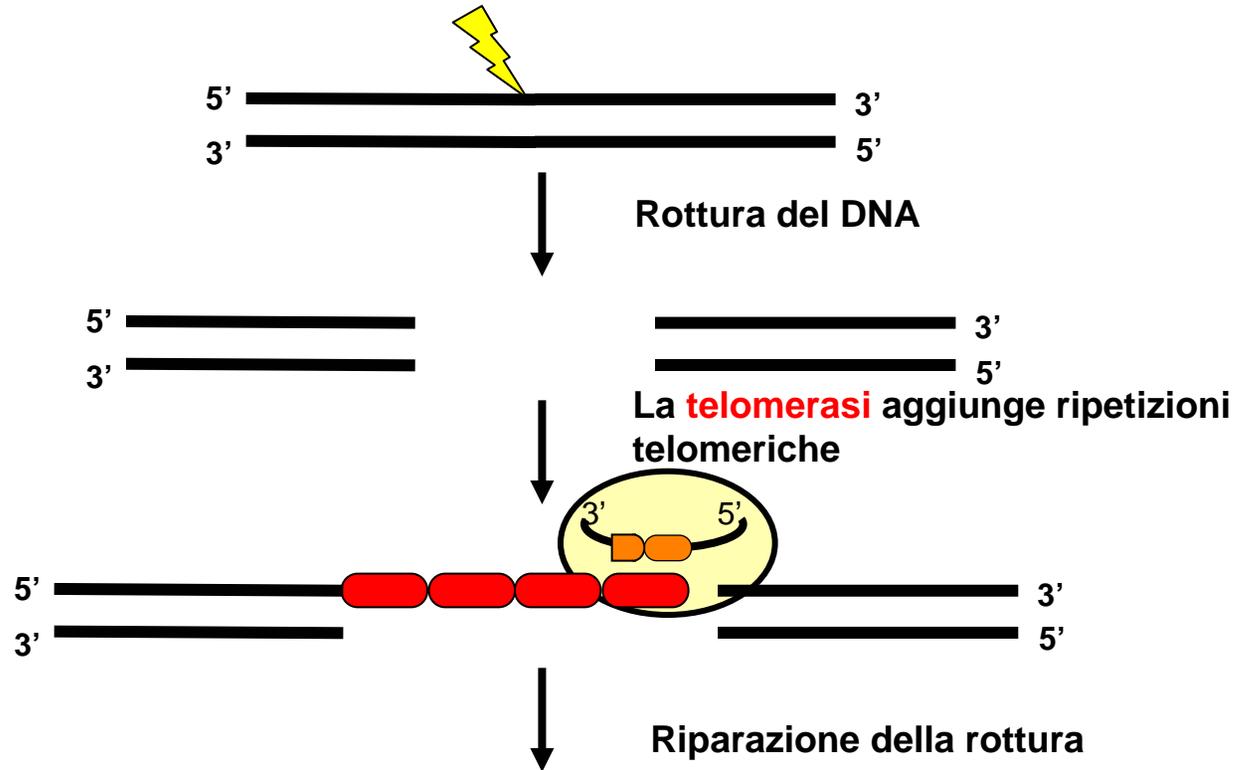
- * Perché DNA “**terminale**” è posizionato in siti interni?
- * Come è stato inserito?

* **Qual è la sua funzione?**

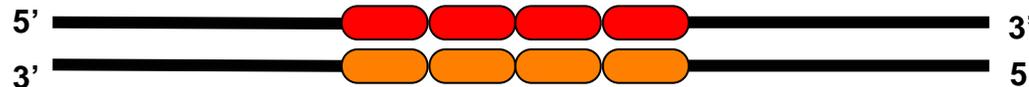
Origine dei telomeri interstiziali

I telomeri interstiziali sono inseriti dalla **telomerasi** a siti di rotture del DNA avvenuti nella linea germinale durante l'evoluzione

Sito ancestrale integro
(- telomero interstiziale)



Sito "riparato"
(+ telomero interstiziale)



Qual è la funzione dei telomeri interstiziali?

Estesa analisi bioinformatica di 83 telomeri interstiziali umani



Il 60% dei telomeri interstiziali è inserito in sequenze geniche (introni)

I telomeri interstiziali potrebbero influenzare l'attività dei geni

- * **4** geni contenenti telomeri interstiziali sono associati a malattie
- * **2** geni sono associati a **tumori**

In banca dati sono presenti molte sequenze di **RNA** contenenti **ripetizioni telomeriche** e trascritte da **telomeri interstiziali** umani

Coltura cellulare



RNA



Reazione di RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

cDNA

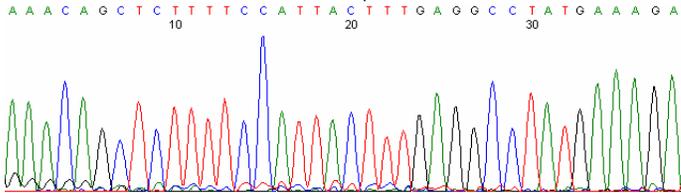


RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Estremità

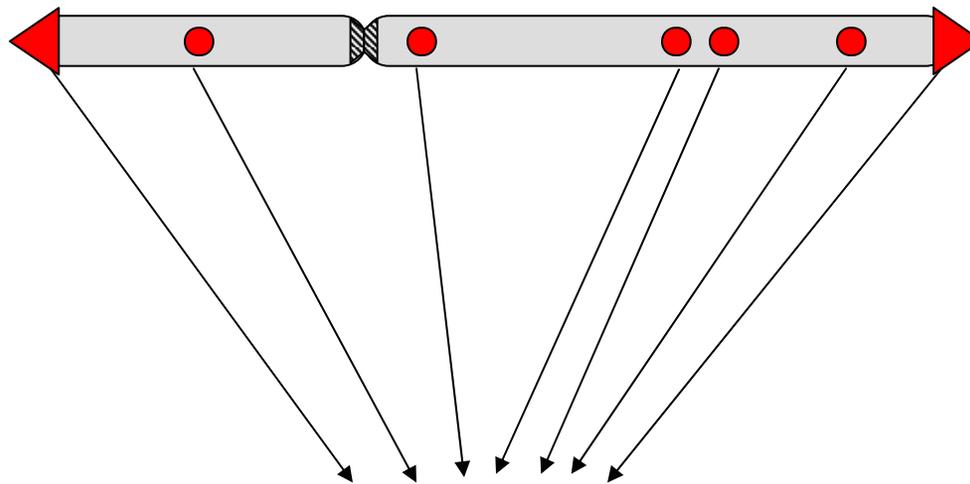


Sequenziamento



Telomeri interstiziali umani trascrivono molecole di **TERRA** indipendentemente dai geni

Una parte rilevante di TERRA è prodotta dai telomeri interstiziali



TERRA

Riassumendo

- * I **telomeri** sono trascritti in molecole di lunghezza variabile chiamate **TERRA**, che svolgono un ruolo nella stabilità del genoma
- * La telomerasi nella linea germinale, partecipa anche alla riparazione delle rotture accidentali del DNA
- * Possibili funzioni dei telomeri interstiziali:
 - 1-** regolazione genica
 - 2-** mantenimento della stabilità dei genomi contribuendo alla produzione di TERRA

Dipartimento di Genetica e
Microbiologia, Pavia

Elena Giulotto

Solomon Nergadze (Georgia)

Lela Khoriauli (Georgia)

Alexandra Smirnova (Russia)

Pamela Vidale

Valerio Vitelli

Manuel Lupotto

Giulia Biffi

ETH, Zurich

Claus Azzalin

2009: Premio Nobel in Fisiologia e Medicina

Ricerca sui telomeri



E. Blackburn



C. Greider



J. Szostak

Riassumendo

- * TERRA trascritta dai telomeri e dai telomeri interstiziali è parte dell'RNA non codificante presente nelle cellule

