

Telomeri e Telomerasi:

I cromosomi *eucariotici* sono molecole lineari, a doppio filamento, che terminano generalmente con un segmento di 10000 coppie di basi, costituito da piccole sequenze nucleotidiche ripetute in tandem denominate telomeri (5'-TTAGGG-3' nell'uomo). I telomeri variano in lunghezza da poche decine di coppie di basi, a decine di migliaia di coppie di basi e rappresentano delle regioni di DNA non codificanti. La loro importanza risiede nella capacità di dare stabilità al DNA, evitando che i cromosomi si avvolgano su se stessi o si ricombinino in corrispondenza delle estremità. In quest'ultimo caso, si verrebbero a creare lunghi cromosomi con due centromeri, che tenderebbero ad impacchettarsi e, non potendo più andare incontro ad eventi mitotici, condurrebbero alla morte cellulare.

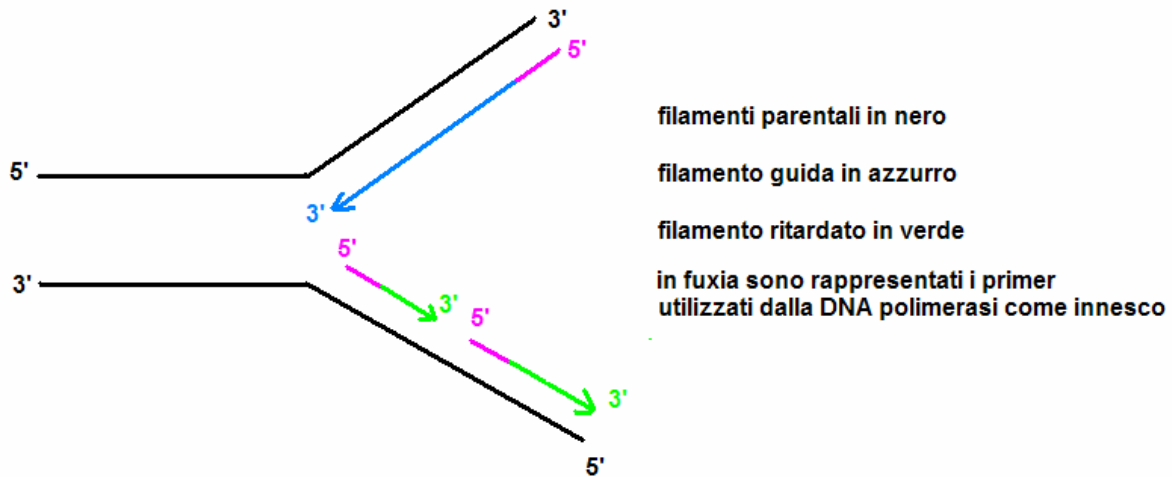
Durante la duplicazione del DNA, la doppia elica di cui è composta la molecola è denaturata parzialmente in un punto che prende il nome di forcella di replicazione.

La DNA polimerasi, enzima preposto alla sintesi dei nuovi filamenti, catalizzando la formazione di legami fosfodiesteri 5'→3' tra un nucleotide ed il successivo, utilizza come stampo il filamento parentale che dovrà necessariamente essere orientato in direzione 3'→5'.

- il filamento che viene sintetizzato usando come stampo il parentale 3'→5' viene esteso in modo continuativo, e prende il nome di **filamento guida**.

- il filamento che viene sintetizzato usando come stampo il parentale 5'→3' viene esteso invece, in modo discontinuo, mediante la formazione di piccoli frammenti detti di Okazaky, stratagemma attuato affinché lo stampo da copiare sia sempre orientato all'interno del sito catalitico dell'enzima in direzione 3'→5'. Il filamento sintetizzato in modo discontinuo viene pertanto indicato come:

filamento ritardato.



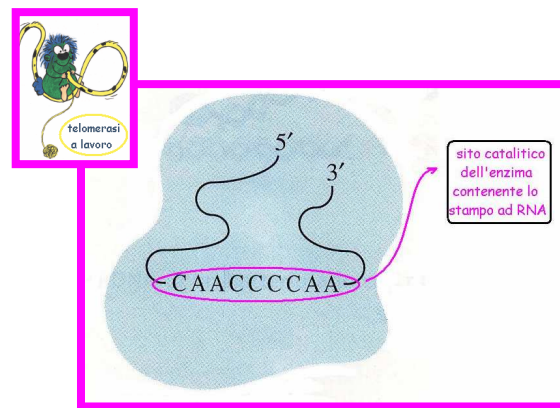
Nei procarioti la fine della replicazione coincide con l'incontro delle due forcelle nel sito di terminazione *ter*.

Negli **eucarioti** invece, vista la struttura lineare dei cromosomi, il sito *ter* non esiste. Alla fine della duplicazione, infatti, il filamento ritardato viene sempre duplicato in maniera incompleta, presentando una lacuna di DNA all'estremità 5' dovuta alla rimozione del primer ad RNA che aveva funto da innesco per la polimerasi. A questo punto, intervengono le telomerasi il cui compito è proprio quello di creare le condizioni necessarie per colmare la lacuna di DNA, venutasi a creare all'estremità cromosomica, in modo da mantenere costante la lunghezza delle estremità telomeriche.

La telomerasi è una ribonucleoproteina composta di due parti essenziali:

Una rappresentata da una molecola di RNA denominata TERC (telomerase RNA component), la cui sequenza nucleotidica, costituita prevalentemente da C e A è perfettamente complementare alle sequenze ripetute ricche in T + G, dell'estremità telomeriche del DNA.

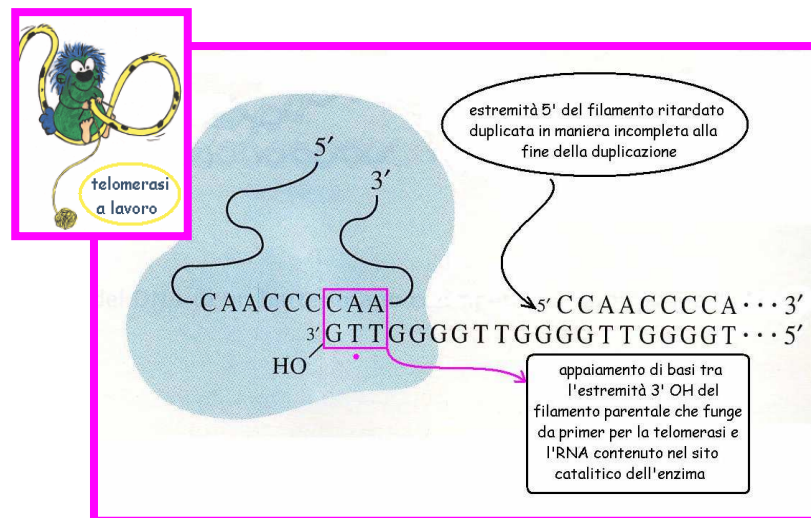
L'altra, invece, costituisce la componente catalitica della proteina stessa, ed è indicata come TERT (telomerase reverse transcriptase). Essa assolve il ruolo di trascrittasi inversa, catalizzando la sintesi di porzioni di DNA complementari alla molecola di RNA contenuta all'interno del suo sito catalitico, che pertanto funge da stampo.



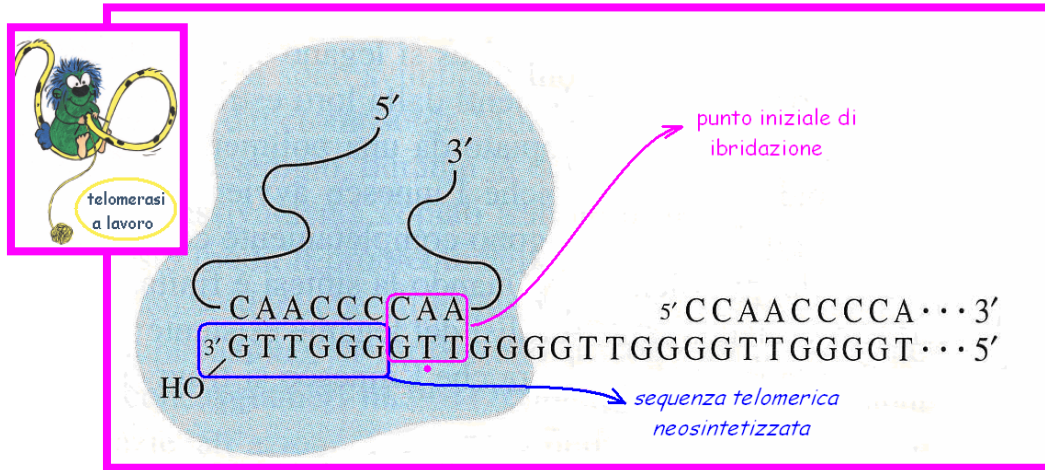
Il meccanismo d'allungamento dei telomeri, prevede una fase di sintesi e una di traslocazione.

Durante la fase di sintesi, la telomerasi necessita solo della presenza dei nucleotidi dGTP e dTTP.

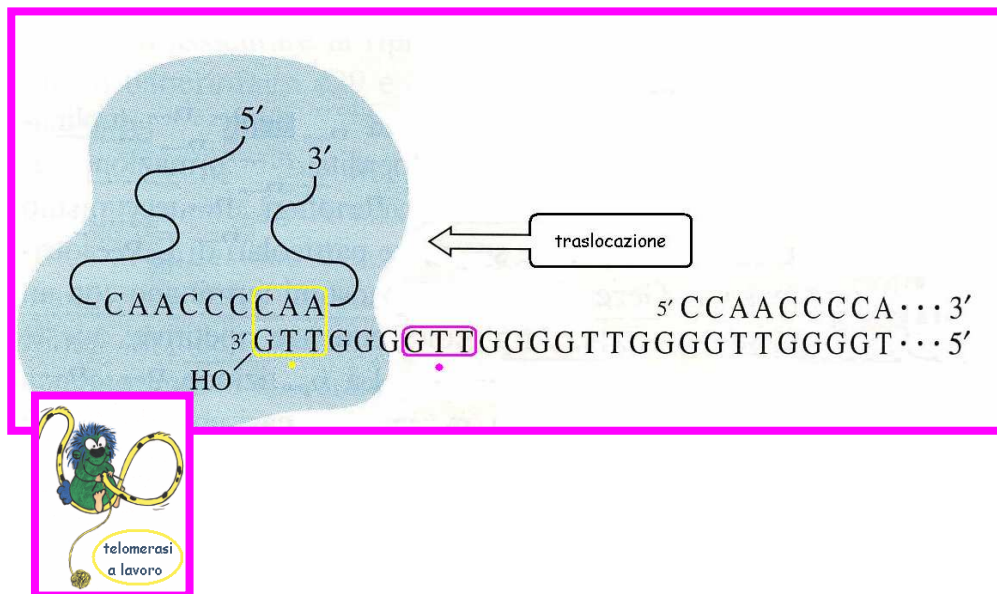
Non necessita né di stampo perché questo è contenuto al suo interno, né di primer in quanto quest'ultimo è rappresentato proprio dall'estremità 3'-OH telomerica del filamento parentale, che la telomerasi deve allungare.



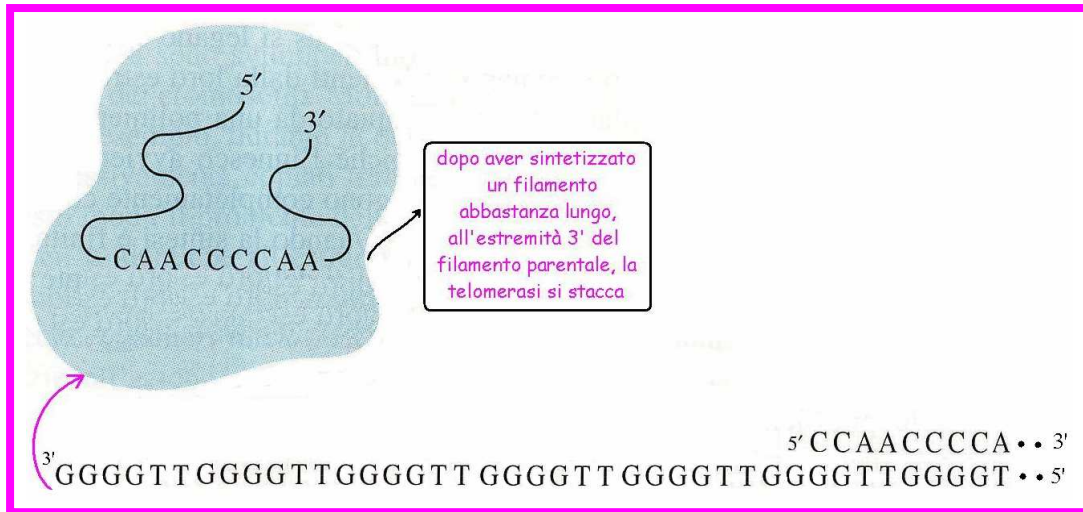
La telomerasi polimerizza, inizialmente, un primo modulo di DNA telomerico complementare al suo RNA stampo, e al termine di quest'operazione, inizierà la prima fase di traslocazione.



Durante la fase di traslocazione, l'ibrido RNA-DNA neosintetizzato si denatura e il DNA retrocede; la telomerasi si riaggancia all'estremità beante, e avvia una nuova fase di sintesi e traslocazione, fino a che sia stato sintetizzato un filamento abbastanza lungo all'estremità 3' del filamento parentale.



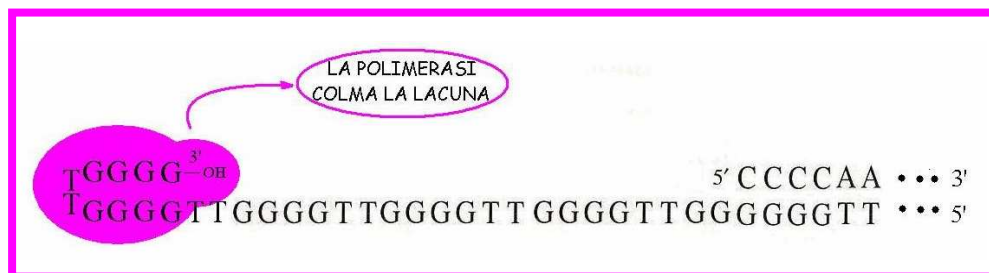
A quel punto, la telomerasi si stacca,



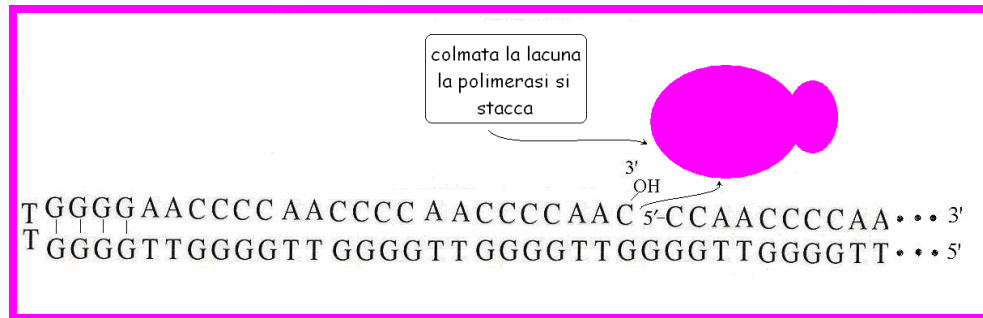
e l'estremità telomerica appena allungata si ripiega formando una struttura a forcina, stabilizzata da appaiamenti non secondo Watson e Crick tra residui di G appartenenti a due sequenze telomeriche adiacenti.



In questo modo, sul DNA, si verrà a creare un innesco per la DNA polimerasi (α o δ). Essa, infatti, catalizza l'attacco nucleofilo dell'OH in 3', rimasto beante, sul fosfato in α del nucleotide che dovrà essere inserito nella catena, usando come stampo il filamento di DNA precedentemente allungato dalla telomerasi.



A questo punto, la lacuna esistente, all'estremità cromosomica viene colmata e la DNA polimerasi si allontana.



A questo punto interviene la ligasi che salda l'interruzione al fine di ristabilire la lunghezza telomerica originale e mantenere integra la stabilità strutturale dei cromosomi, necessaria alle cellule per sopravvivere e replicarsi.



Nonostante tale meccanismo di protezione, tuttavia, ogni cellula normale perde da 50 a 100 paia di basi del DNA telomerico ad ogni divisione cellulare. In particolare è stato osservato, che le sequenze telomeriche si accorciano fino a raggiungere una lunghezza critica, oltre la quale, la mitosi si arresta e le cellule entrano in una fase conosciuta come stato di “senescenza”. Le cellule senescenti, rimangono attive metabolicamente, ma la loro espressione genica è alterata e di conseguenza anche i loro cicli di divisione rallentano.

In condizioni fisiologiche, le cellule somatiche dell'organismo umano, presentano un'attività telomerasica molto bassa, o addirittura assente. Al contrario, in linee cellulari a proliferazione continua, come ad esempio quelle delle gonadi maschili e quelle embrionali, la telomerasi risulta essere particolarmente attiva.

In determinate condizioni patologiche, nelle quali aumenta l'attività proliferativa, come nelle neoplasie, aumenta enormemente anche l'attività telomerasica. E' stato osservato, ad esempio, che in più dell'80 % dei tumori umani l'attività della telomerasi, risulta essere molto alta, soprattutto in quelli cerebrali, nei quali si pensa avvenga un'eccessiva attivazione del gene EST2 (codificante la subunità catalitica hTERT, dove h significa "human"). Infatti, recenti studi hanno dimostrato che nonostante il gene EST2, sia presente, sia nel DNA delle cellule somatiche sane che in quello delle cellule a proliferazione illimitata, la subunità catalitica hTERT è presente solo in queste ultime. Ciò significa che il gene è in qualche modo inibito nelle cellule somatiche fisiologicamente "mortalì", e invece attivo nelle cellule a proliferazione illimitata, come le cellule embrionali e quelle tumorali, dove la telomerasi viene espressa ad alti livelli.

Per studiare la correlazione esistente tra attività telomerasica e cancro, si sono ormai attivati numerosi laboratori di ricerca in tutto il mondo. Un esempio fra tanti è offerto da un'equipe dell'università di Harvard che ha studiato il modo di introdurre un gene, che codifica una forma mutante di telomerasi, in tre differenti linee cellulari cancerose umane. L'enzima mutante, prevaricando quello normale, causa un accorciamento sempre maggiore delle estremità telomeriche, man mano che i cromosomi si dividono, dando come esito la morte delle cellule tumorali. È stato inoltre osservato che trasferendo le cellule con il gene mutante in topi da laboratorio, questi non sviluppavano tumori nelle aree inoculate, e li sviluppavano al contrario, nelle aree non trattate.

Parallelamente agli studi volti a stabilire una possibile correlazione tra cancro ed attività telomerasica, sono state fatte diverse ricerche per evidenziare la correlazione tra attività telomerasica ed invecchiamento. A tal fine è stata modificata in laboratorio la lunghezza dei telomeri, di cromosomi appartenenti a cellule di individui d'età compresa tra 0 – 93 anni (attraverso l'utilizzo di nucleasi). I risultati di tali esperimenti mostrarono come ovvio, una relazione tra attività proliferativa ed età, infatti, la proliferazione è normalmente maggiore nelle cellule d'individui giovani; ma la cosa sorprendente, è stata sicuramente la dimostrazione della correlazione tra capacità replicativa e lunghezza telomerica, valida per l'intero intervallo d'età dei soggetti. Ciò stava ad indicare che le

cellule con telomeri accorciati, sperimentalmente, si replicavano meno rispetto a quelle coi telomeri più lunghi.

Queste osservazioni si schierano a supporto dell'ipotesi che la lunghezza telomerica sia un biomarker per l'invecchiamento delle cellule somatiche umane. Infatti, accorciandosi ad ogni divisione cellulare, i telomeri si comportano come veri e propri “*orologi molecolari*“, indicando il numero di volte che la cellula si è divisa.

Un'altra prova a favore dell'ipotesi della correlazione esistente tra invecchiamento e riduzione dell'attività telomerasica, è stata offerta dal clamoroso caso della pecora Dolly. Analizzando, infatti, il DNA della famosa pecora, i ricercatori scozzesi scoprirono che la lunghezza dei telomeri corrispondeva a quell'attesa per l'età della cellula donatrice. Dolly sarebbe dunque nata geneticamente "vecchia" di sei anni.

Molti laboratori di ricerca, stanno cercando il modo di resettare l'orologio biologico al fine di ottenere l'allungamento delle estremità cromosomiche nelle cellule eucariotiche e rallentare quindi i processi di invecchiamento. Le vie proposte fin'ora sono state:

- 1) Utilizzazione di un analogo molecolare della telomerasi
- 2) Inserimento di un gene che esprima la telomerasi
- 3) Somministrazione di un induttore che sblocchi il gene per la telomerasi.

Nel primo metodo, l'analogo della telomerasi prodotta in laboratorio, più resistente e attiva, rispetto alla fisiologica, è una molecola di sintesi ottenuta da antibiotici, steroidi e altre molecole. In vitro, è stato osservato che: inserendo questi analoghi di sintesi, all'interno delle cellule, essi manifestavano la capacità d'allungare le estremità telomeriche dei loro cromosomi; di conseguenza, anche la vita delle cellule stesse si allungava.

Il secondo è un approccio più difficile perché ancora non si conosce la sequenza completa della telomerasi umana, ma solo alcuni frammenti, e quindi non si può ricostruire l'intera sequenza genica.

Il terzo metodo proposto, vale a dire quello di riattivare il gene telomerasico, è forse il migliore, poiché ogni cellula somatica ha il suo gene, quindi riattivare quello fisiologico piuttosto che inserirne un altro potrebbe essere l'approccio molecolare più idoneo. **Alla luce di quanto detto, si può pertanto**

asserire che l'invecchiamento è sicuramente influenzato da fattori ambientali, ma è anche un processo di natura genetica. Pertanto, se con lo studio approfondito delle telomerasi, si riuscisse a capire il funzionamento esatto dell'orologio biologico che scandisce il tempo in ognuno di noi, potremo controllare sia l'invecchiamento sia il cancro.

La strada, pur essendo ancora lunga, fa intravedere ugualmente una possibilità concreta di lotta al cancro.

In fondo la cellula tumorale è solo una cellula tornata bambina e immatura come fosse ancora allo stato embrionale.