

La lunghezza dei telomeri e la patologia cardiovascolare

R. Testa^a, L. La Sala^b, F. Olivieri^b

^aCentro Ricerche Metaboliche sul Diabete e gli Alimenti, INRCA, Ancona

^bDipartimento di Patologia Molecolare e Terapie Innovative, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Riassunto

L'interesse scientifico verso i telomeri e la loro lunghezza è notevolmente accresciuto negli ultimi tempi, in particolare per quanto riguarda la loro importanza nella patogenesi della patologia cardiovascolare e diabetica. I telomeri rappresentano le estremità terminali dei cromosomi. Essi sono formati da una ripetizione della sequenza TTAGGG e una delle loro funzioni principali è quella di essere "stabilizzatori" del cromosoma. In particolare il progressivo accorciamento dei telomeri, che avviene ad ogni replicazione cellulare, porta al fenomeno della senescenza cellulare. La telomerasi, un enzima in grado di impedire l'accorciamento dei telomeri, allunga di fatto la vita di una cellula. Recenti pubblicazioni, tra le quali anche lavori del nostro gruppo, hanno analizzato la lunghezza dei telomeri di cellule circolanti, evidenziando come pazienti con malattia coronarica hanno telomeri di lunghezza più corta rispetto ai soggetti con coronarie normali. Si è inoltre evidenziato come l'associazione fra telomeri più corti e malattia coronarica sia indipendente dai fattori di rischio classici o nuovi, inclusi i marcatori dell'infiammazione. È stato ipotizzato che la senescenza dei linfociti circolanti rispecchi la funzionalità delle cellule progenitrici. La diminuzione della lunghezza dei telomeri dei precursori staminali potrebbe limitare la capacità di riparazione dell'endotelio e quindi peggiorare l'andamento del processo aterosclerotico. Interessanti sono inoltre i dati recentissimi che associano la lunghezza dei telomeri alle complicanze micro e macroangiopatiche nella malattia diabetica.

Summary

Telomeres and Cardiovascular Disease

In recent years, the role of telomere length in the pathogenesis of cardiovascular and diabetic diseases has attracted a continuously growing research interest. Telomeres, the tandem repeats of TTAGGG DNA sequence extending at the end of the eukaryotic chromosomes, undergo attrition during every cell division and their length is the best indicator of the replication potential of somatic cells. Cells are able to prevent this shortening by the activity of the ribonucleoprotein enzyme telomerase. Several lines of evidence support the hypothesis that gradual telomere attrition, which appears to be a normal part of aging, is accelerated in cells that are exposed to internal or external stressors, known to provoke increased cellular proliferation and high oxidative stress. Many epidemiological and clinical studies have found that a large host of human age-related diseases and related risk factors are associated with telomere attrition such as cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus.

Key-words: telomere length, cardiovascular disease, cellular senescence.

Cenni storici

La struttura telomerica è conosciuta da oltre sessanta anni, anche se gli studi genetici pionieristici di Hermann Muller nel 1938 e di Barbara McClintock nel 1941 avevano già dimostrato che le estremità dei cromosomi dovevano essere incapsulate da una struttura speciale chiamata "telo-

mero", avente la funzione di proteggere le estremità dei cromosomi, prevenendone la fusione. Circa mezzo secolo fa, in particolare 47 anni fa, nel 1961, Leonard Hayflick pubblicò un lavoro nel quale riportava le basi molecolari del cosiddetto 'replicometro', una sorta di orologio biologico. In questa pubblicazione si poneva all'attenzione scien-

tifica la limitata capacità delle cellule umane normali poste in coltura di replicarsi. Queste perdevano infatti la loro attività proliferativa dopo un fissato numero di duplicazioni: tale fenomeno fu definito “Hayflick limit” (limite di Hayflick). Per i fibroblasti primari umani, in coltura, tale limite corrisponde a circa 50 divisioni cellulari, determinando un arresto del ciclo cellulare nella fase G1. Questa pubblicazione mise le basi sulla conoscenza attuale del fatto che ogni tipo di cellula presenta un limite del potenziale replicativo intrinsecamente fissato. In particolare ogni replicazione cellulare lascia, a causa di “end replication program” un tratto di sequenza non duplicata che porta al progressivo accorciamento dei telomeri, e perciò dei cromosomi, a ogni ciclo di replicazione. Alexy Olovnikov suggerì che l'accorciamento dei telomeri poteva essere alla base del limite di Hayflick. Quest'idea languì per almeno due decenni fino all'identificazione, da parte di Elizabeth Blackburn, nel 1978, delle sequenze ripetute (TTGGGG)_n peculiari dei telomeri del protozoo ciliato *Tetrahymena thermophila* e successivamente si scoprì l'attività enzimatica responsabile della sintesi di tali sequenze: la telomerasi, un enzima ribonucleoproteico che usa la sua componente a RNA come template per sintetizzare DNA all'estremità dei telomeri, allungandoli, e contrastandone quindi l'accorciamento.

La risoluzione del problema della End-Replication era ormai avviato. Nel 1986 apparvero le prime evidenze che i telomeri umani potevano accorciarsi, poiché venne dimostrato che la loro lunghezza non era identica in tutti i tessuti. Successivamente, nel 1988 fu pubblicata la sequenza telomerica umana, (TTAGGG)_n, e divenne molto più facile misurarne la lunghezza nell'uomo. Infine, nel 1989 venne dimostrata l'attività telomerasica anche in cellule umane tramite esperimenti del tutto simili a quelli usati dalla Blackburn. Questi studi culminarono nel lavoro di Calvin Harley, il quale dimostrò l'accorciamento dei telomeri nei fibroblasti primari normali, che si dividevano in coltura, come fenomeno direttamente conseguente alla mancanza della telomerasi, confermando la forte limitazione nella proliferazione delle cellule normali in coltura. Sicuramente il progressivo accorciamento dei telomeri durante la replicazione di cellule che non esprimono la telomerasi è alla base della ‘senescenza replicativa’.

Telomeri: struttura e funzioni

I telomeri sono strutture specializzate di DNA associate a proteine, localizzati alle estremità dei cromosomi eucariotici. Il DNA telomerico è composto da sequenze esameriche ripetute in tandem (5'-TTAGGG) presenti in 5-25 Kb di DNA, non codificanti, a doppio filamento, e molto ricche in G, specifiche per l'azione della telomerasi¹. Tali ripetizioni G formano uno scaffold (impalcatura) molecolare contenente numerosi siti di legame per le proteine telomeriche che si associano fra loro formando un ‘complesso di protezione’, legandosi in maniera sequenza-specifica al DNA dei telomeri, e che determina la stabilizzazione genomica mediante la formazione di un capsula protettiva. In tal modo si esplica un'azione preventiva riguardo al riconoscimento erroneo delle estremità cromosomiche come ‘interruzioni’ (break) sul doppio filamento di DNA (DSBs), evitando tutti quegli eventi che causano

instabilità genomica². Per far sì che tale protezione resti attiva sul telomero si rende necessaria un'elevata precisione nell'omeostasi telomerica caratterizzata da una estrema accuratezza nella composizione delle proteine associate al telomero, e che il livello di attività della telomerasi e la stessa lunghezza del telomero (quale indice di attività della telomerasi stessa) sia espressa in maniera ottimale. Nelle cellule la lunghezza dei telomeri viene progressivamente ridotta ad ogni divisione cellulare a causa del problema della duplicazione terminale, cioè dell'incapacità del sistema replicativo di copiare le ultime basi del filamento all'estremità 3' durante la sintesi del DNA³. Durante la duplicazione dello stesso, infatti, la DNA polimerasi allunga un primer RNA in direzione 5'→3' copiando il filamento a singola elica parentale. La rimozione del primer RNA lascia un vuoto che non può essere riempito, perciò la replicazione può arrivare fino all'estremità 5' del filamento parentale ma non può iniziare dalla sua estremità 3' esatta. In questo modo, ad ogni ciclo replicativo si perdono da 50 a 200 bp al filamento 5' neosintetizzato, portando ad una progressiva riduzione della molecola di DNA. Quando è raggiunta la lunghezza telomerica minima critica (circa qualche Kb), si attivano una serie di segnali cellulari che inducono le cellule ad entrare in senescenza replicativa, ovvero in fase di arresto permanente della crescita cellulare, un checkpoint controllato dalle proteine oncosoppressori p53 e Rb. La sintesi del DNA telomerico richiede l'attività di proteine specializzate associate ai telomeri, le quali includono TRF1, TRF2 (telomeric repeat binding factor), Ku86 ed altre, e naturalmente la telomerasi^{4,5}. È stato verificato, in vivo e in vitro, che i telomeri assumono una conformazione altamente ordinata, detta t-loop, che stabilizza e protegge le estremità del cromosoma. La Telomerasi è un ribozima (enzima ribonucleoproteico multimerico) avente un peso molecolare approssimativamente di circa un Mega Dalton, costituito da tre componenti: la subunità catalitica chiamata hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptasi); la subunità strutturale a RNA detta hTERC (human Telomerase RNA Component), diverse proteine accessorie associate (es. TP1) essenziali per l'assemblaggio di un complesso attivo a cui partecipa la chaperon heat shock protein ‘Hsp 90’ e la proteina p23. Tale enzima è in grado di mantenerne costante la lunghezza, allungando di fatto la vita di una cellula^{6,7}.

Senescenza Cellulare

Una delle conseguenze più importanti dell'accorciamento dei telomeri è la cosiddetta senescenza cellulare. Essa è stata osservata in vitro la prima volta da Hayflick nel 1961 e si presentava caratterizzata da cellule in coltura che, dopo un periodo di proliferazione rapida, riducevano gradualmente il tasso di divisione, per poi arrestarsi completamente. Le cellule rimanevano comunque vitali ma incapaci di rispondere a qualsiasi stimolo mitogenico ed erano caratterizzate da un cambiamento drammatico delle caratteristiche morfologiche e funzionali. Molti studi hanno rilevato che la senescenza può essere anche indotta, indipendentemente dal numero di divisioni cellulari, in risposta ai vari stress fisiologici (radiazioni, stress ossidativo, mancanza di nutrienti, danno al DNA, e così via) e definita senescenza prematura “indotta da stress”⁸⁻¹⁰.

Telomeri e la patologia cardiovascolare

Le cellule senescenti, caratterizzate da telomeri accorciati, si caratterizzano per un fenotipo “pro-infiammatorio” con un’elevata attività dell’enzima lisosomiale β -galattosidasi, e una sovrapproduzione di EGF e di citochine pro-infiammatorie, quali IL-6, IL-1 e TNF-alfa. Quindi, le cellule senescenti possono contribuire all’invecchiamento dell’organismo e alle patologie correlate all’età¹¹, prime fra tutte la patologie cardiovascolari. Il fenomeno della senescenza, sia replicativa che indotta, interessa anche le cellule staminali o comunque precursori cellulari. L’accumulo di staminali senescenti dà importanti limitazioni funzionali delle capacità rigenerative dei tessuti, che possono essere rilevanti anche per l’invecchiamento dell’organismo¹². Alcuni studi hanno mostrato che le cellule normali di anziani perdono la capacità di dividersi a un tasso più veloce rispetto alle cellule di un giovane, e che le cellule senescenti aumentano con l’età. Recenti pubblicazioni, tra le quali anche lavori del nostro gruppo, hanno evidenziato come pazienti con malattia coronarica hanno telomeri di lunghezza più corta rispetto ai pazienti con coronarie normali¹³. Si è inoltre evidenziato come l’associazione fra telomeri più corti e malattia coronarica sia indipendente dai fattori di rischio classici o nuovi, inclusi i marcatori dell’infiammazione. In questo contesto il ruolo della senescenza cellulare potrebbe essere determinante: si può infatti teorizzare che telomeri più corti rispecchino una modificazione funzionale delle cellule¹⁴⁻¹⁶. La diminuzione della lunghezza dei telomeri potrebbe limitare la capacità di riparazione dell’endotelio e quindi peggiorare l’andamento del processo aterosclerotico. Interessanti sono inoltre i dati recentissimi che associano la lunghezza dei telomeri alle complicanze micro e macroangiopatiche nella malattia diabetica¹⁷⁻¹⁹. Se queste ed altre ipotesi sulla fisiopatogenesi indotta da “telomere shortening” verranno confermate, potrebbero crearsi, in un immediato futuro, le condizioni per una loro determinazione su specifiche indicazioni cliniche. Le metodiche oggi impiegate non sono più di esclusiva appartenenza di centri ad elevata specializzazione: esistono infatti tecniche semplici, di costo non elevato e di buona affidabilità che potrebbero essere in tempi brevi disponibili nella pratica laboratoristica routinaria.

Bibliografia

- Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 2001; 106:661-73.
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet* 2000; 34:331-58.
- Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 41:29-40.
- Ludérus ME, van Steensel B, Chong L, Sibon OC, Cremers FF, de Lange TMEE, et al. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* 1996; 135:867-83.
- Smogorzewska A, De Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:177-208.
- Schnapp G, Rodi HP, Rettig WJ, Shnapp A, Damm K. One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res* 1998; 26:3311-3.
- Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN. Mapping of the gene for human telomerase reverse transcriptase hTERT to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2000; 2:197-201.
- Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 2000; 14:183-8.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* 2004; 113:8-13.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalmisky JD. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci* 2004; 117:2417-26.
- Gilley D, Herbert BS, Huda N, Tanaka H, Reed T. Factors impacting human telomere homeostasis and age-related disease. *Mech Ageing Dev* 2008; 129:27-34.
- Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, Nakamura M. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2008; 198:347-53.
- Olivieri F, Lorenzi M, Antonicelli R, Testa R, Sirolla C, Cardelli M, et al. Leukocyte telomere shortening in elderly Type 2DM patients with previous myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2009; 206:588-93.
- Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol* 2007; 165:14-21.
- Salpea KD, Nicaud V, Tiret L, Talmud PJ, Humphries SE; EARS II group. The association of telomere length with paternal history of premature myocardial infarction in the European Atherosclerosis Research Study II. *J Mol Med* 2008; 86:815-24.
- Salpea KD, Talmud PJ, Cooper JA, Maubaret CG, Stephens JW, Abelak K, et al. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis* 2010; 209:42-50.
- Testa R, Ceriello A. Pathogenetic loop between diabetes and cell senescence. *Diabetes Care* 2007; 30:2974-5.
- Tentolouris N, Nzietchueng R, Cattan V, Poitevin G, Lacolley P, Papazafropoulou A, et al. White blood cells telomere length is shorter in males with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Diabetes Care* 2007; 30:2909-15.
- Astrup AS, Tarnow L, Jorsal A, Lajer M, Nzietchueng R, Benetos A, et al. Telomere length predicts all-cause mortality in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53:45-8.