

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 27

Invecchiamento

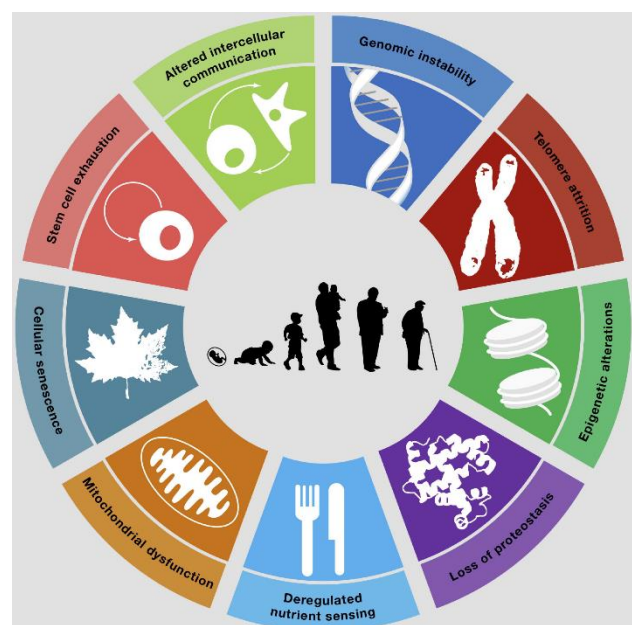
L'invecchiamento è definito come un declino funzionale tempo dipendente, che è caratterizzato dalla perdita progressiva di integrità fisiologica, che comporta l'insorgenza di patologie.

Sono stati definiti 9 hallmarks dell'invecchiamento:

- La **senescenza cellulare** è definita come arresto stabile del ciclo cellulare, con cambiamenti fenotipici descritti originariamente da Hayflick, che ha lavorato su fibroblasti umani in coltura. I suoi esperimenti furono contestati da Alexis Carrel, premio Nobel, che riteneva che i fibroblasti umani potevano dividersi indefinitamente.
- **Accorciamento dei telomeri**, si è visto che nelle cellule somatiche umane la telomerasi è down-regolata, per cui i telomeri si accorciano ad ogni ciclo cellulare. Si è visto che l'accorciamento del telomero causa la senescenza replicativa. Il motivo per cui il telomero corto induce l'arresto del ciclo cellulare è che nel telomero corto si attiva la risposta da danno al DNA, perché perde le sequenze che legano il complesso shelterin. L'attivazione del checkpoint da danno al DNA è quindi responsabile della senescenza cellulare.
Il lievito non down-regola la telomerasi, ma si è visto che rimuovendo una delle subunità della telomerasi il lievito mostra segni di invecchiamento fino alla senescenza ed alla morte cellulare. Si è visto che basta un solo telomero corto nel lievito per indurre la senescenza. Nell'uomo servono almeno 5 telomeri corti per dare senescenza.
- **Instabilità genomica**. Le cellule più vecchie hanno un genoma instabile, perché la riparazione del danno al DNA non è efficiente. Questo causa un aumento di acquisizione di mutazioni da parte delle cellule più vecchie.
- **Perdita della proteostasi**. Le proteine possono perdere il folding; questo causa l'attivazione di meccanismi che cercano di rifoldare le proteine, oppure di degradarle. Nelle cellule più vecchie l'omeostasi del proteoma è alterata.
- **Alterazioni metaboliche**. Si è visto che l'invecchiamento causa una alterazione metabolica, che influenza molto l'invecchiamento. La restrizione dietetica aumenta la vita media degli organismi.

Insorgenza di tumore ed invecchiamento sembrano eventi non correlati, in quanto nel tumore si ha una aumentata fitness, mentre nell'invecchiamento la fitness diminuisce. Si è dimostrato invece che i due processi condividono una origine comune: l'accumulo tempo dipendente di danni cellulari.

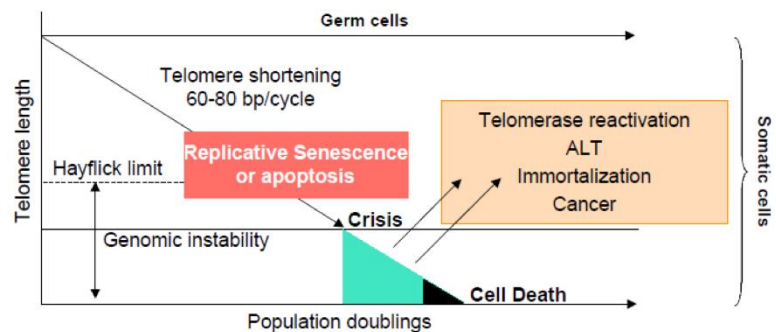
Si è visto che l'accorciamento dei telomeri arriva ad un livello critico in cui si ha la senescenza, e successivamente sopravviene la morte cellulare. Se



nel periodo dopo il superamento del livello critico si ha riattivazione della telomerasi, si assiste all'allungamento dei telomeri ed alla ripresa della capacità replicativa della cellula.

I telomeri si possono allungare grazie alla riattivazione della telomerasi, ma anche grazie a meccanismi alternativi di allungamento dei telomeri (ALT) che sfruttano la ricombinazione.

Le cellule che riacquiscono capacità replicativa hanno comunque un genoma instabile, proteoma alterato e processi metabolici alterati. In queste condizioni il riallungamento dei telomeri può dare immortalizzazione ed insorgenza di tumore. Il periodo tra il raggiungimento del livello critico di lunghezza dei telomeri e la morte cellulare è un intervallo di fondamentale importanza nell'insorgenza della patologia tumorale.



Nella maggior parte dei tumori umani si ha una ripresa della capacità di allungamento dei telomeri, per cui questa fase è un importante target per il trattamento dei tumori. Non basta inibire la telomerasi, è necessario inibire anche i processi ALT, che sono più difficili da bloccare perché sfruttano la ricombinazione omologa.

Si sa poco dei meccanismi ALT, quindi è necessario trovare delle proteine target nei processi ALT che però lascino intatta la possibilità di eseguire ricombinazione omologa nelle cellule sane.

L'alterazione del checkpoint da accorciamento dei telomeri è un altro punto importante nell'oncogenesi. Il fallimento del checkpoint causa una aumentata divisione cellulare ed instabilità genomica, che se presenti insieme alla capacità di allungare i telomeri causano un aumento del rischio di insorgenza di cancro.

La predisposizione all'insorgenza di tumori aumenta con l'età del paziente.

Invecchiamento cellulare e stabilità genetica

Si è visto che le cellule tumorali sono caratterizzate da riarrangiamenti molto estesi del genoma, con perdita di eterozigosi o di interi cromosomi. Si è quindi deciso di misurare il livello di instabilità genetica, come perdita di eterozigosi, durante l'invecchiamento delle cellule di lievito.

Le cellule di lievito che hanno la telomerasi comunque invecchiano, e si è visto che la cellula madre dopo circa 20 generazioni circa invecchia ed entra in senescenza, per poi morire.

Si è realizzato un ceppo di lievito diploide col seguente genotipo:

- MATa/MATa
- Ade2Δ/Ade2Δ
- Met15Δ::ADE2/met15Δ::URA3
- Sam2Δ::MET15/SAM2

La presenza di '::' ad esempio in Met15Δ::ADE2 indica che il gene Met15Δ è stato sostituito con il gene ADE2.

È noto che la perdita del gene Ade2 comporta una colorazione rossa delle colonie.

La perdita del gene Met15 comporta una colorazione marrone delle colonie.

Sono state quindi prese 40 cellule madri e ne è stato seguito il ciclo cellulare, rimuovendo ad ogni ciclo cellulare la cellula figlia e coltivandola singolarmente. Le cellule figlie vengono separate singolarmente fino a quando la cellula madre non va in senescenza, smettendo di replicare e morendo.

Seminando ogni cellula figlia singolarmente si sono studiate le colonie formate da queste cellule; si è rilevato che cellule figlie generate più tardi mostravano la comparsa di settori colorati, perché avevano perso o mutato il gene Ade2 o il gene Met15.

L'esperimento ha dimostrato che effettivamente c'è instabilità genomica, per perdita di eterozigosi.

Le cellule figlie di una cellula madre vecchia hanno maggiore instabilità genomica delle cellule figlie di una cellula madre giovane.

