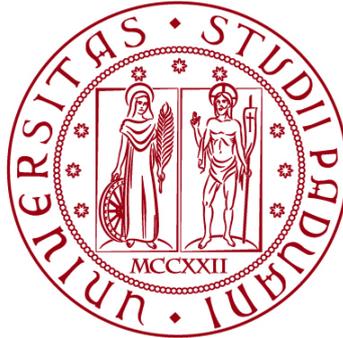


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**MECCANISMI DI MANTENIMENTO DEI TELOMERI NELLE
CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI UMANE**

**Tutor: Prof.ssa Chiara Rampazzo
Dipartimento di Biologia**

Laureando: Luca Sinigaglia

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

CAPITOLO 0: ABSTRACT	2
CAPITOLO 1: STATO DELL'ARTE	3
1.1 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI E TELOMERI	3
1.2 STRUTTURA E FUNZIONE DEI TELOMERI	3
1.3 LA TELOMERASI E LA REGOLAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI	5
1.4 RUOLO DEI TELOMERI NELLE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (ESCs).....	6
1.5 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (iPSCs) E LA RIPROGRAMMAZIONE TELOMERICA.....	7
1.6 ALLUNGAMENTO ALTERNATIVO DEI TELOMERI	8
CAPITOLO 2: APPROCCIO SPERIMENTALE	11
2.1 CRISPR/Cas9 PER KNOCKOUT DI TERT e TERC.....	11
2.2 RIPROGRAMMAZIONE CELLULARE	12
2.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA.....	13
2.4 ATTIVITÀ DELLA TELOMERASI	14
2.5 ALLUNGAMENTO DEI TELOMERI BASATO SUL MECCANISMO "ALT" ..	16
2.6 ANALISI DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI	17
2.7 ANALISI DELL'EPIGENETICA DEI TELOMERI.....	20
2.8 ANALISI DELLA STABILITÀ GENOMICA E DELLA RISPOSTA AL DANNO AL DNA	21
2.9 ANALISI DELLA FORMAZIONE DI TERATOMA	22
CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE	24
3.1 ACQUISIZIONE DELLA PLURIPOTENZA INDOTTA E RUOLO DELLA TELOMERASI	24
3.2 ALLUNGAMENTO DEI TELOMERI DURANTE L'ESPANSIONE IN VITRO DELLE iPSCs E CONFRONTO CON LE ESCs.....	25
3.3 LA TELOMERASI È RIATTIVATA E MANTENUTA NELL'ESPANSIONE IN VITRO DELLE iPSCs	27
3.4 RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA TELOMERICA NELLE iPSCs.	28
3.5 I TELOMERI SONO PROTETTI E LA STABILITÀ GENOMICA È MANTENUTA	29
3.6 LUNGHEZZA TELOMERICA E FORMAZIONE DI TERATOMA.....	31
3.7 CONFRONTO TRA CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI UMANE E MURINE	32
BIBLIOGRAFIA	34

CAPITOLO 0: ABSTRACT

Le cellule staminali pluripotenti (PSCs) sono una promettente risorsa nel campo delle terapie rigenerative per merito delle loro capacità proliferative e di mantenimento della stabilità genomica, le quali dipendono direttamente dalla capacità di mantenimento dei telomeri. L'elaborato analizza la regolazione della lunghezza telomerica nelle cellule staminali pluripotenti umane, sia embrionali (hESCs) che indotte (hiPSCs). Vengono inoltre discussi i meccanismi molecolari che coordinano il mantenimento della lunghezza dei telomeri, con enfasi particolare sulla telomerasi e sul rimodellamento epigenetico durante la riprogrammazione cellulare e la coltura in vitro prolungata. Gli autori dello studio hanno adottato CRISPR/Cas9 come tecnica di editing genomico per generare linee cellulari knock-out per TERT e TERTC, seguite dalla riprogrammazione dei fibroblasti. È stata poi monitorata la lunghezza dei telomeri per mezzo di TRF e Q-FISH, l'attività telomerasica, tramite saggio TRAP, e i cambiamenti epigenetici, tramite analisi ChIP e dei trascritti telomerici (TERRAs), osservando nelle hiPSCs una propensione nel tendere ad uno stato tipicamente embrionale. Infine, è stata analizzata la stabilità genomica e, con un test in vivo, il potenziale differenziativo delle hiPSCs. Questo elaborato si propone di discutere l'approccio sperimentale, descrivendo le metodologie applicate e analizzando i risultati sulle PSCs umane, con un confronto finale per valutare se le evidenze ottenute nei modelli murini trovano riscontro anche nelle cellule umane.

CAPITOLO 1: STATO DELL'ARTE

1.1 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI E TELOMERI

Si definiscono cellule staminali le cellule indifferenziate aventi la capacità di divenire uno o più tipi cellulari e, contemporaneamente, di autorinnovarsi producendo copie a loro identiche. Ciò significa che una cellula staminale può dare luogo ad una divisione asimmetrica generando due cellule identiche ugualmente indifferenziate, oppure creare una cellula figlia che mantiene le caratteristiche di staminalità della cellula madre ed un'altra che intraprende un percorso differenziativo specifico in quella che viene definita una divisione asimmetrica.

Le cellule staminali pluripotenti (PSCs), in particolare, comprendono sia le cellule staminali embrionali (ESCs) che le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) e sono definite tali nel momento in cui possono dare origine a tutti i tipi cellulari dell'embrione e ciò che poi ne deriva ma non sono in grado di formare cellule dei tessuti extraembrionali. Ciò significa che il repertorio di tipi cellulari che deriva dalle PSCs è molto vasto e questa caratteristica risulta estremamente utile nel campo della medicina rigenerativa dove queste cellule possono essere impiegate per sviluppare terapie cellulari personalizzate, riducendo il rischio di rigetto immunitario.

Tuttavia, è di fondamentale importanza per le PSCs mantenere il genoma stabile durante le continue divisioni cellulari per la loro capacità di produrre cellule differenziate funzionali e, di conseguenza, anche per la loro applicazione terapeutica. In questo contesto, i telomeri rivestono un ruolo chiave nel preservare la stabilità genomica, rendendo altrettanto cruciali i meccanismi che mantengono e regolano queste strutture. [1, 2]

1.2 STRUTTURA E FUNZIONE DEI TELOMERI

I telomeri sono sequenze ripetute di DNA non codificante situate alle estremità dei cromosomi lineari delle cellule eucariotiche. Nei mammiferi, in particolare, sono presenti molte kilobasi (kb) in doppio filamento con ripetizioni in tandem della sequenza TTAGGG che terminano con una sporgenza all'estremità 3' di 50-400 nt a singolo filamento (3' overhang). La lunghezza totale dei telomeri può variare notevolmente a seconda del tipo di cellula, dello stato fisiologico e dell'età dell'individuo e mediamente nelle cellule umane si possono trovare telomeri di lunghezza compresa tra le 5 e le 15 kb. [3]

Oltre al DNA telomerico, i telomeri includono un complesso proteico noto come Shelterin, che protegge l'estremità del cromosoma e ne regola la lunghezza. Shelterin è costituito da sei subunità principali: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1, e RAP1, che coordinano la struttura tridimensionale dei telomeri formando un loop telomerico (T-loop): una configurazione cruciale per impedire il riconoscimento delle estremità cromosomiche come danni al DNA. La necessità di avere questo complesso sta nel fatto che le terminazioni telomeriche di fatto sono strutturalmente molto simili alle rotture a doppio filamento (DSB) di conseguenza possono attivare segnali di danno del DNA e conseguentemente pathways di riparazione indesiderati. In questo il complesso Shelterin gioca un ruolo fondamentale in quanto maschera le terminazioni in strutture a loop e previene l'attivazione di enzimi di risposta al danno (in particolare ATM, ATR e RARP1) oltre a bloccare i pathways di riparazione c-NHEJ, (alt)-NHEJ e HDR. Sono molteplici i complessi shelterin che interagiscono con il DNA della porzione telomerica per coordinare la formazione del T-loop; a svolgere un ruolo particolarmente importante sono i domini Myb/SANT di TRF1 e TRF2 che riescono ad interagire specificamente con il DNA a doppio filamento (dsDNA) mediando l'interazione tra il complesso proteico e l'acido nucleico. Nella formazione di questa struttura il filamento 3' sporgente si ripiega ad ansa, guidato dalla subunità TRF2, per insinuarsi nella doppia elica; quest'ultima a sua volta viene avvolta attorno ai domini TRFH determinando un conseguente svolgimento locale nella regione di invasione del filamento. Qui il 3' overhang, ricco in G, trova complementarità con il filamento ricco il C del ds DNA telomerico che si apre di conseguenza formando il cosiddetto displacement loop (D-loop). L'anello maggiore generato dal ripiegamento dell'estremità protrudente è invece definito T-loop. [4]

Per quanto riguarda le funzioni dei telomeri si ha principalmente:

1. **Protezione cromosomica:** poiché impediscono che le estremità cromosomiche vengano erroneamente interpretate come rotture del DNA
2. **Mantenimento della stabilità genomica:** la perdita di telomeri porta alla fusione e all'instabilità cromosomica, con potenziali conseguenze tumorigeniche.
3. **Regolazione del ciclo cellulare:** quando i telomeri diventano troppo corti, attivano checkpoint cellulari che inibiscono la proliferazione o inducono l'apoptosi. È ben noto infatti che i telomeri non protetti o accorciati in modo critico inducono una risposta persistente al danno del DNA (contrassegnati dall'istone γ H2AX fosforilato) che porta alla senescenza cellulare mediata da p53 o all'apoptosi. [5]

Durante il processo di replicazione alle porzioni telomeriche si assiste ad un problema in corrispondenza del “*lagging strand*” dove l’ultimo primer utile per sintetizzare il frammento di Okazaki terminale non riesce ad essere incorporato all’esatta estremità del filamento stampo determinando così una perdita di informazione per ogni ciclo di divisione cellulare. Si stima che ad ogni ciclo di replicazione i telomeri si accorcino di 50-200 nucleotidi arrivando al punto in cui sono troppo corti per inibire completamente le risposte al danno del DNA (DDR) con conseguente senescenza o morte cellulare. Tale accorciamento telomerico può essere considerato un testimone dell’invecchiamento cellulare e ha lo scopo di impedire la proliferazione cellulare illimitata che può essere causa di sviluppo di cellula cancerose. [6]

1.3 LA TELOMERASI E LA REGOLAZIONE DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

La telomerasi è un enzima ribonucleoproteico responsabile dell’allungamento e mantenimento dei telomeri. È composta da due subunità principali: la “telomerase reverse transcriptase” (TERT), che complessivamente è la componente proteica con attività di trascrittasi inversa a sua volta composta da:

- TEN (telomerase essential N-terminal), coinvolta nel reclutamento del DNA telomerico e nella regolazione della attività enzimatica
- RBD (RNA binding domain) il quale permette l’interazione con la componente ad RNA della telomerasi
- RT (Reverse Transcriptase domain) che esegue la vera e propria sintesi delle ripetizioni telomeriche

e “telomerase RNA component” (TERC), un RNA che funge da stampo per la sintesi delle sequenze telomeriche la cui sequenza AAUCCC è codificata da hTERC e viene espressa costitutivamente. [7]

La telomerasi è attiva principalmente nelle cellule staminali, in particolare ha una spiccata attività nel contesto delle PSCs, consentendo loro di sostenere divisioni continue senza subire un accorciamento telomerico significativo e trasmettere l’informazione inalterata alle cellule differenziate eventualmente derivanti. Anche lievi squilibri nei livelli di telomerasi possono portare a malattie debilitanti negli esseri umani e la sua carenza è associata a invecchiamento precoce e disturbi del rinnovamento delle cellule staminali, tra cui discheratosi congenita, anemia aplastica e fibrosi polmonare. Nelle cellule somatiche l’attività telomerasica è invece pressoché nulla sebbene possa essere riattivata e sovraregolata in più dell’80% dei tumori umani,

rendendo le cellule tumorali immortali e determinando una proliferazione cellulare incontrollata. [8]

La regolazione dell'attività della telomerasi è strettamente controllata a livello trascrizionale e post-trascrizionale. Diversi fattori di trascrizione sono noti per regolare positivamente l'espressione della telomerasi nelle PSCs e svolgono un ruolo chiave nel contesto delle iPSCs dove le cellule somatiche devono riattivare il gene hTERT e allungare i propri telomeri affinché sia garantita la pluripotenza e la capacità di auto-rinnovamento.

1.4 RUOLO DEI TELOMERI NELLE CELLULE STAMINALI EMBRIONALI (ESCs)

Le cellule della massa cellulare interna (ICM) della blastocisti rappresentano una delle fonti principali di cellule staminali pluripotenti dalla quale possono essere derivate le cellule staminali embrionali (ESCs), caratterizzate anch'esse dalla capacità di differenziarsi in tutti i tipi cellulari dell'organismo adulto ad eccezione dei tessuti extra-embryonali. Nelle fasi iniziali dello sviluppo embrionale, dalle primissime divisioni zigotiche fino al raggiungimento dello stadio di blastocisti, i telomeri delle cellule staminali subiscono un considerevole allungamento per mezzo di meccanismi alternativi basati sulla ricombinazione omologa. Tale meccanismo viene poi soppiantato dall'attività della telomerasi che una volta divenuta pienamente attiva procede con il mantenimento della lunghezza dei telomeri garantendo la stabilità genomica per il resto dello sviluppo embrionale.

Ulteriori studi hanno confermato l'importanza della telomerasi nel mantenimento in quanto la riduzione della sua attività nelle ESCs ha portato ad un rapido accorciamento dei telomeri riducendo così la capacità di queste cellule di auto-rinnovarsi e differenziarsi. [9, 10]

Inoltre, le ESCs hanno caratteristiche particolari per quanto riguarda la struttura della cromatina, inclusa la regione telomerica, che risulta essere più "aperta" rispetto alle cellule somatiche differenziate. Questo lo si può notare anche dalla presenza di trascritti telomerici (TERRAs): dei lncRNA coinvolti nel mantenimento e nella regolazione della lunghezza dei telomeri. Molti fattori di trascrizione che controllano la determinazione del destino cellulare sono contrassegnati da segni epigenetici come le metilazioni a carico degli istoni H3K4 e H3K27 che rispettivamente attivano e reprimono l'espressione di geni legati alla pluripotenza.

Studi pregressi hanno dimostrato come nel caso delle cellule staminali murine la derivazione delle cellule della ICM nella formazione di ESCs è accompagnata da un'importante estensione dei telomeri. Dall'espansione in

in vitro delle mESCs si è potuto osservare infatti che la lunghezza media dei telomeri è aumentata fino al passaggio 24 e poi è stata mantenuta fino al passaggio 60, suggerendo che pochi passaggi sono sufficienti per raggiungere la lunghezza massima dei telomeri nelle cellule ES. In conclusione, nel processo di derivazione in vitro di queste cellule i telomeri possono aumentare di dimensione fino a raddoppiare la normale lunghezza del telomero dell'ICM della blastocisti grazie all'attività della telomerasi e, come precedentemente anticipato, questi cambiamenti sono accompagnati dalla diminuzione di segni eterocromatici, tra cui H3K9me3 e H4K20me3 e dall'aumento dell'espressione di TRF1 (che facilita il capping dei telomeri appena sintetizzati). Similmente anche lo studio delle ESC umane ha dimostrato che i telomeri sono allungati durante l'espansione precoce in vitro raggiungendo un livello relativamente stabile in modo dipendente dalla telomerasi. [11, 12]

1.5 CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE (iPSCs) E LA RIPROGRAMMAZIONE TELOMERICA

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) sono derivate dalla riprogrammazione di cellule somatiche adulte mediante l'introduzione di quattro fattori di trascrizione (Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc), noti con il nome di "Yamanaka factors", che riportano le cellule a uno stato pluripotente simile a quello delle ESCs.

Questo processo di riprogrammazione è accompagnato da una serie di cambiamenti. A livello epigenetico e trascrizionale si assiste ad una modificazione dello stato di metilazione del DNA in quanto i promotori dei geni associati alla pluripotenza (come OCT4, SOX2, NANOG) vengono demetilati portando alla riattivazione di quest'ultimi mentre i promotori dei geni associati al differenziamento subiscono generalmente un processo di metilazione. In questo modo si assiste ovviamente ad un rimodellamento della struttura della cromatina che a livello dei promotori riattivati si converte da una forma eterocromatica (trascrizionalmente inattiva) ad una eucromatica (più "aperta") mentre nel processo di silenziamento avviene il contrario. In questo rimodellamento giocano un ruolo chiave le modificazioni degli istoni come, ad esempio, quelle a carico di H3K4 e H3K27 le cui metilazioni sono associate nel primo caso all'attivazione genica e nell'altro alla repressione.

Per quanto riguarda i cambiamenti epigenetici a carico dei telomeri si osserva come nelle cellule somatiche siano presenti alte concentrazioni di istoni trimetilati H3K9me3 e H4K20me3; tipici marcatori eterocromatici che durante la riprogrammazione diminuiscono rendendo i telomeri più accessibili alla telomerasi. In questo processo si può dire quindi che le cellule acquisiscano

segni tipici delle ESCs con la riattivazione dei geni della telomerasi (TERT e TERC) e la riduzione dei segni associati all'eterocromatina. [13]

Durante il processo di riprogrammazione si può notare anche un importante cambiamento a livello del metabolismo cellulare: le cellule somatiche generalmente dipendono in larga misura dalla fosforilazione ossidativa per la produzione di energia; le cellule staminali pluripotenti (e similmente alcune cellule cancerose) tendono invece ad affidarsi maggiormente alla glicolisi anaerobica anche in presenza di ossigeno (fenomeno conosciuto come "effetto Warburg"). Questa variazione metabolica, sebbene sia meno efficiente, risulta essere più flessibile e ottimale per supportare la rapida proliferazione e i cambiamenti dinamici nelle esigenze metaboliche delle cellule non differenziate. [14]

Per quanto riguarda la lunghezza dei telomeri, durante la riprogrammazione, questi vengono progressivamente allungati raggiungendo dimensioni simili a quelli delle ESCs. Questo fenomeno è stato osservato sia in iPSCs derivate da cellule di donatori giovani che anziani, suggerendo che l'allungamento telomerico avviene a prescindere dall'età delle cellule somatiche di partenza. [2,15]

1.6 ALLUNGAMENTO ALTERNATIVO DEI TELOMERI

L'allungamento alternativo dei telomeri (ALT) basato sulla ricombinazione omologa (HR) viene scoperto per la prima volta nelle cellule di *Saccharomyces cerevisiae* con telomerasi mutata e successivamente questo fenomeno è stato riscontrato anche in linee cellulari tumorali umane. Per acquisire un'immortalità replicativa infatti le cellule tumorali devono superare il problema dell'accorciamento dei telomeri e se la maggior parte delle volte riescono per attivazione della telomerasi il restante 4-11% dei tumori è in grado di allungare e mantenere i telomeri tramite ALT.

Nonostante ci sia un consenso generale riguardante il fatto che il meccanismo ALT dipenda dalla ricombinazione è tuttora incerto il processo attraverso il quale avviene l'allungamento del telomero. Le prove ad oggi disponibili sembrano supportare un modello secondo cui le estremità dei telomeri a singolo filamento invadono una porzione dsDNA contenente una regione di omologia (ovvero delle ripetizioni dell'esamero telomerico) e usando il filamento complementare come stampo allungano l'estremità lineare del cromosoma. In questo modo lo stampo può derivare dallo stesso telomero (per mezzo della formazione di un T-loop), dal telomero di un cromatide fratello o di un altro cromosoma, oppure da una forma di DNA telomerico extra-cromosomico tipicamente presente nelle cellule ALT⁺. Il DNA telomerico

(sia esso cromosomico o extra-cromosomico) si può trovare compreso all'interno di particolari corpi nucleari. Comprese in queste strutture si trovano numerose proteine che possono essere coinvolte in funzioni come la riparazione del DNA, l'apoptosi o la risposta allo stress ma ad essere particolarmente importante è la proteina della leucemia promielocitica (PML) che caratterizza questi complessi dando loro il nome di "corpi PML". La presenza di questi complessi contenenti cromatina telomerica è altamente caratteristica delle cellule ALT-positive pertanto sono indicati in questo caso come corpi PML associati ad ALT (o semplicemente APBs).

Altre caratteristiche tipiche delle cellule ALT⁺ sono: la lunghezza estremamente eterogenea dei telomeri cromosomici, rapidi cambiamenti nella lunghezza telomerica e un elevato livello di ricombinazione nei telomeri; questo però non significa che possano essere tutte sfruttate per identificare la presenza del meccanismo ALT attivo. Differentemente la presenza di DNA extra-cromosomico contenente ripetizioni telomeriche è un importante segno caratteristico sulla quale si basano sistemi di monitoraggio dell'attività di ALT; questo può assumere diverse forme, tra cui cerchi telomerici prevalentemente a doppio filamento, cerchi parzialmente a singolo filamento (detti C-circles o G-circles in base alla predominanza di C o G all'interno del filamento continuo) o DNA lineare a doppio filamento.

Un'altra caratteristica interessante delle cellule ALT⁺ riguarda gli scambi di DNA tra cromatidi fratelli limitati al telomero (T-SCE). Si è scoperto che questi eventi si verificano con una frequenza di diversi ordini di grandezza superiore nelle cellule ALT-positive rispetto alle linee cellulari telomerasi-positive o alle cellule normali, senza un aumento della frequenza di scambi nel resto del genoma; pertanto, la loro presenza può essere sfruttata per verificare la presenza del meccanismo ALT attivo in cellule di una determinata linea cellulare. [16]

Il metodo principalmente utilizzato dalle cellule auto-rinnovabili (sia staminali che tumorali) per mantenere ed allungare i propri telomeri resta quello che fa affidamento sulla trascrittasi inversa della telomerasi ma dagli studi effettuati sulle cellule tumorali ALT⁺ sembra che questo allungamento tramite ricombinazione porti ad aumentare più velocemente la lunghezza dei telomeri rispetto a quanto ottenuto per mezzo della telomerasi. Un altro contesto in cui troviamo l'allungamento dei telomeri mediante ALT è infatti durante lo sviluppo embrionale preimpianto (unico contesto fisiologico in cui ALT è attivo), quando c'è la necessità che la lunghezza dei telomeri aumenti rapidamente entro pochi cicli cellulari. Il motivo di questo necessario allungamento dei telomeri sta nel fatto che le specie reattive dell'ossigeno

(ROS) nei follicoli primordiali accorciano i telomeri dell'ocita rendendo i telomeri materni pericolosamente corti dopo la fecondazione.

Si suppone inoltre che lo stress di replicazione del DNA nei telomeri possa essere un importante fattore scatenante l'attivazione di ALT. Nel caso delle hESCs infatti qualora si trovino in condizioni di stress che riducono l'efficacia della telomerasi potrebbero vedere un attivazione transitoria del meccanismo ALT. [17, 18]

CAPITOLO 2: APPROCCIO SPERIMENTALE

Il confronto tra le cellule staminali embrionali umane (hESCs) e le cellule staminali pluripotenti indotte (hiPSCs) è importante per comprendere come queste mantengono la pluripotenza e la stabilità genomica. Da un lato le hESCs rappresentano un modello naturale di pluripotenza, con telomeri già stabiliti e mantenuti principalmente dall'attività della telomerasi. Le hiPSCs, al contrario, devono riattivare i meccanismi di allungamento telomerico, tra cui la telomerasi, per raggiungere una lunghezza dei telomeri simile a quella delle hESCs. Gli autori dello studio, pertanto, si sono posti l'obiettivo di esaminare queste tipologie cellulari allo scopo di osservare le modalità e i meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento dei loro telomeri per poterne valutare le eventuali somiglianze o differenze. In questo articolo verrà discusso l'approccio utilizzato per analizzare tali aspetti.

2.1 CRISPR/Cas9 PER KNOCKOUT DI TERT e TERC

Nella prima parte dell'esperimento si vuole indagare come avviene l'allungamento dei telomeri durante la generazione di cellule hiPSCs e dei processi molecolari coinvolti nel regolamento dello stesso. Per fare ciò vengono prese delle cellule umane differenziate, i fibroblasti BJ (cellule del tessuto connettivo derivate dal prepuzio maschile neonatale), nella quale si valuta il ruolo della telomerasi durante il processo di riprogrammazione. L'obiettivo è dunque quello di creare due linee cellulari, oltre a quella *wild type*, dove grazie al knock-out di TERT in un caso e TERC nell'altro si possa valutare come la rimozione delle componenti fondamentali della telomerasi possa influenzare la riprogrammazione. Questo processo è stato effettuato per mezzo della tecnica CRISPR/Cas9 che consente un'editing mirato del genoma.

Progettazione degli sgRNA. In primo luogo, devono essere disegnati degli sgRNA (small guide RNA) in grado di trovare una complementarità precisa in punti specifici dei geni da manipolare e la progettazione di questi prevede l'utilizzo di strumenti bioinformatici (quali per esempio CHOPCHOP di Harvard) al fine di analizzare la sequenza target e minimizzare il rischio di generare tagli indesiderati. Nel disegnare l'sgRNA va scelta una sequenza di 17-24 bp con un contenuto di GC del 40-80% che sia complementare al gene target in modo da avere stabilità necessaria ed un'adeguata certezza di evitare l'appaiamento a sequenze off-target. Lo scopo di questi frammenti di RNA è quello di guidare la proteina Cas9, ancorata per mezzo di una sequenza scaffold, in un punto preciso del genoma, riconosciuto dalla stessa per mezzo

della sequenza *Protospacer Adjacent Motif* (PAM), dove compie un taglio mirato in grado di causare la mutazione desiderata. Nel caso della generazione di fibroblasti TERT^{-/-} è stato progettato uno sgRNA avente l'esone 2 del gene TERT come target in modo da causare una mutazione frameshift la quale porta come conseguenza alla disfunzionalità del gene. Per la creazione di cellule TERC^{-/-} invece sono stati disegnati due sgRNA in modo tale da causare una delezione totale del gene.

Generazione e verifica delle linee cellulari knock-out. Una volta progettati gli sgRNA, i fibroblasti BJ sono stati transfettati con il plasmide pspCas9 (BB)-2A-GFP (PX458) contenente gli sgRNA specifici per *TERT* e *TERC*. Dopo un periodo di incubazione che ha permesso l'espressione del gene GFP contenuto nel plasmide (che codifica una proteina fluorescente), le cellule vengono fatte fluire attraverso in citofluorimetro: qui un laser illumina le cellule che passano singolarmente un sistema di microcanali e dei rilevatori ottici misurano l'intensità della radiazione emessa. Sulla base dell'intervallo di fluorescenza impostato in partenza il citofluorimetro è in grado di rilevare se una cellula emette o meno la fluorescenza desiderata e attribuisce di conseguenza una carica alla cellula in uscita dall'ugello per poter attrarre o respingere le cellule idonee al parametro impostato, selezionando le cellule correttamente transfettate mediante il processo che prende il nome di Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS). Si procede dunque con l'espansione monoclonale delle cellule selezionate.

Per verificare il successo del knock-out, infine, è stato estratto il DNA genomico delle cellule modificate usando un kit commerciale e amplificato attraverso una DNA polimerasi ad alta fedeltà. In ultima battuta è stato eseguito un sequenziamento Sanger per indentificare i cloni correttamente editati.

2.2 RIPROGRAMMAZIONE CELLULARE

I fibroblasti BJ wild-type e knockout per TERT e TERC vengono quindi sottoposti a riprogrammazione per generare cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC). Innanzitutto, vengono usate delle cellule HEK-293T per la produzione delle particelle virali che verranno usate per l'infezione dei fibroblasti BJ (sia di tipo selvatico che con knock-out di TERT e TERC). Queste cellule, derivanti da cellule embrionali di rene 293 con un plasmide che codifica l'antigene SV40 large T, vengono transfettate ciascuna con un plasmide contenente i geni necessari per la produzione delle componenti virali, l'origine di replicazione SV40 e uno dei 4 costrutti retrovirali contenenti ciascuno uno dei geni per i fattori di Yamanaka (Klf4, Sox2, Oct4, e c-Myc). Le particelle così ottenute

sono state usate per infettare i fibroblasti, preventivamente seminati in piastre a 6 pozzetti, aggiungendo 0,5mL di ciascun retrovirus ogni 12 ore per 2 giorni allo scopo di garantire che le quantità sufficienti di virus entrino nelle cellule per attivare la riprogrammazione. Sono stati poi eseguiti diversi cambi del mezzo di coltura fino all'apparizione delle colonie delle cellule riprogrammate con successo.

L'ottenimento di cellule correttamente riprogrammate si ha quando queste riescono a mantenere la loro pluripotenza in modo autonomo esprimendo i propri geni associati alla pluripotenza senza dipendere dall'espressione dei geni esogeni contenuti nel vettore. Per verificare che si trattasse di vere e proprie hiPSCs è stato necessario ricercare marcatori endogeni di pluripotenza, come OCT4, SOX2 e NANOG, verificandone la presenza a livello di RNA per mezzo di una PCR quantitativa oltre che a livello proteico grazie ad un western blot.

2.3 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'analisi dell'espressione genica è un passaggio fondamentale che permette di comprendere quali geni sono attivi in una cellula in un determinato momento e in che misura. Risulta essere cruciale in questo studio in diversi contesti come il monitoraggio della riprogrammazione cellulare e lo studio delle cellule staminali pluripotenti. Queste osservazioni infatti consentono di determinare se una cellula ha acquisito o mantenuto specifiche caratteristiche legate allo stato di pluripotenza o ai meccanismi coinvolti nel modellamento dei telomeri. L'analisi dell'espressione genica può essere fatta su diversi livelli andando ad indagare per esempio la presenza di trascritti specifici che derivano da un gene oppure le proteine prodotte. Vediamo quindi le tecniche utilizzate in questo studio e i contesti in cui vengono applicate.

qRT-PCR: si tratta della PCR quantitativa in tempo reale il cui scopo è quello di misurare l'espressione genica a livello dell'RNA messaggero, è una tecnica che permette di quantificare l'abbondanza dei trascritti genici ed eventualmente confrontarne l'espressione in diversi campioni. La tecnica in questo caso specifico prevede l'estrazione dell'RNA totale tramite RNeasy Mini kit per poi sintetizzare il filamento complementare grazie ad una trascrittasi inversa e la formazione in ultima battuta del cDNA. Si procede poi con l'amplificazione monitorata in tempo reale dal momento in cui compare un segnale relativo alla rilevazione della fluorescenza: è proprio il ciclo soglia alla quale si vede la comparsa della fluorescenza che permette di stimare la quantità di trascritto inizialmente presente nel campione. Questo approccio è stato usato all'interno dello studio in due diverse occasioni:

- Per analizzare l'espressione dei geni associati alla pluripotenza OCT4, NANOG e SOX2: questo è stato fatto sia nel caso delle hESCs ottenute dalla "*National Cellular Biobank of Spain*" allo scopo di verificare che si trattasse di cellule effettivamente pluripotenti stabilite mentre nel contesto delle hiPSCs è stato verificato il successo della riprogrammazione dei fibroblasti cercando la conferma di un'espressione endogena di tali geni. In entrambi i casi la quantificazione dei livelli di trascritti sono stati normalizzati rispetto al gene di riferimento GAPDH che codifica un enzima coinvolto nel processo di glicolisi
- Per valutare l'espressione dei geni TERT e TERC mediante quantificazione dei trascritti allo scopo di verificare se i fibroblasti riprogrammati sono in grado di esprimere le componenti fondamentali della telomerasi ai diversi passaggi e verificare se sono presenti dei cambiamenti rispetto alle cellule somatiche d'origine.

Western blot: questa tecnica permette di visualizzare l'espressione genica a livello proteico dei geni chiave. Il protocollo prevede la disaggregazione cellulare tramite buffer di lisi seguita dalla bollitura del lisato per 5-10 minuti allo scopo di denaturare il contenuto proteico; viene quindi allestita una elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide al 4-12% (SDS-PAGE). Il tutto viene poi trasferito su membrana di nitrocellulosa nella quale viene effettuata una prima incubazione con anticorpo primario (preceduta dal bloccaggio per impedire il legame aspecifico degli anticorpi sulla membrana) seguita da una incubazione con anticorpo secondario associato ad un fluoroforo (IRDye®). In questo caso è l'anticorpo primario a determinare il prodotto proteico che si vuole analizzare mentre l'anticorpo secondario ha semplicemente il compito di amplificare il segnale per essere più facilmente rilevabile. Nello studio discusso in questo elaborato la tecnica del western blot viene adottata per un'ulteriore conferma della riattivazione dei geni della pluripotenza nelle hiPSCs ottenute dai fibroblasti BJ normalizzando i livelli di proteine estratte rispetto alla β -actina.

2.4 ATTIVITÀ DELLA TELOMERASI

L'attività della telomerasi è un elemento cruciale per il mantenimento della lunghezza dei telomeri e la stabilità genomica nelle cellule staminali pluripotenti. È risaputo che durante la riprogrammazione delle cellule differenziate a staminali pluripotenti si assiste ad un allungamento dei

telomeri dipendente dalla telomerasi, pertanto, nello studio analizzato si vuole indagare il ruolo nella telomerasi nel successo della riprogrammazione e se ne vuole monitorare l'attività durante la coltura prolungata delle cellule ottenute. Come detto in precedenza sono state sottoposte a riprogrammazione linee di fibroblasti BJ sia *wt* che *TERT^{-/-}* e *TERC^{-/-}*. La riprogrammazione delle cellule difettive per i geni di TERT e TERC non è andata a buon fine, perciò, non è rimasto che da monitorare l'attività della telomerasi nei 6 cloni rimanenti di hiPSCs a diversi passaggi confrontando l'attività rilevata con quella delle cellule ES7 (una linea cellulare di hESC) e con quella dei fibroblasti BJ parentali

TRAP assay: Il saggio di attività della telomerasi TRAP (telomeric repeat amplification protocol) è un metodo basato sull'amplificazione tramite PCR dei prodotti della telomerasi. Questa tecnica sfrutta la capacità della telomerasi di aggiungere ripetizioni TTAGGG ad un substrato che verrà appunto amplificato al fine di quantificare l'attività telomerasica. Questo protocollo prevede prima di tutto la disaggregazione delle cellule con un buffer di lisi. Viene poi determinata la concentrazione proteica dell'estratto, all'interno della quale si trova anche la telomerasi, tramite il metodo Bradford (un metodo colorimetrico che determina la quantità del prodotto tramite spettrofotometro grazie alla correlazione con un campione a quantità nota), questo passaggio è fondamentale per normalizzare la quantità di proteine estratte permettendo di confrontare l'attività telomerasica tra campioni diversi. A questo punto si aggiunge al lisato un primer a singolo filamento telomeric (TS primer) progettato per essere il substrato ideale per la telomerasi che, se presente, lo estende aggiungendo ripetizioni telomeriche. Si effettua l'incubazione con TS primer a 30°C per 60 minuti dove la sua estensione genera una serie di prodotti di lunghezza proporzionale all'attività enzimatica della telomerasi presente nel campione. Successivamente viene allestita una reazione di PCR: in questa fase i prodotti estesi vengono amplificati usando dei primer marcati con fosforo 32 per un totale di 25 cicli al termine dei quali si ottengono una serie di frammenti di lunghezza progressiva che vengono separati tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide all'8%. All'interno della reazione di amplificazione viene aggiunto anche un controllo interno: si tratta di un frammento di DNA sintetico (TSNT) che verrà amplificato senza interferire con i prodotti di estensione della telomerasi, questo viene aggiunto alla mix di reazione in specifiche concentrazioni in modo da generare un prodotto di amplificazione di lunghezza nota con lo scopo di verificare che la reazione di PCR sia avvenuta correttamente. Al termine della corsa elettroforetica, il gel viene scannerizzato per rilevare la radioattività del P³²

legato ai prodotti di amplificazione per produrre un'immagine digitale delle bande corrispondenti.

2.5 ALLUNGAMENTO DEI TELOMERI BASATO SUL MECCANISMO “ALT”

Come anticipato nelle cellule hESCs è noto esserci una fase iniziale di allungamento dei telomeri basato sul meccanismo ALT. Gli autori di questo articolo hanno cercato di verificare questo comportamento su tre linee cellulari di hESCs indipendenti ottenute dalla “*National Cellular Biobank of Spain*” ai minori passaggi disponibili (tra p8 e p10). L'approccio è stato quello di ricercare segni identificativi della presenza del meccanismo ALT attivo quali APB e T-SCE. Come controllo positivo è stata scelta la linea cellulare U2OS che notoriamente presenta un meccanismo ALT attivo e vengono paragonati i livelli di APB e T-SCE presenti in essa. Va specificato però che gli APBs sono strutture dinamiche che si formano generalmente durante la fase G2 del ciclo cellulare oltre al fatto che la loro presenza non è necessaria per l'attivazione del meccanismo ALT e possono formarsi anche all'interno di cellule ALT-negative generando così il rischio di rilevare rispettivamente falsi negativi o falsi positivi. Il vantaggio associato all'analisi della presenza di APBs sta nel fatto che la rilevazione è semplice e basata sull'immunofluorescenza implementata in questo caso utilizzando anticorpi anti-PML e un anticorpo secondario marcato con fluoroforo. La scelta condotta dagli autori di questo studio pertanto è stata quella di associare questa analisi alla ricerca di scambi telomerici tra cromatidi fratelli.

Chromosome orientation-FISH assay (CO-FISH): Si tratta del saggio di orientamento cromosomico basato sulla tecnica FISH (Fluorescence in situ hybridization) che permette di indentificare, tramite immagini ottenute per emissioni di fluorofori, la presenza di scambi di cromatidi fratelli a livello dei telomeri (T-SCE). La tecnica prevede l'iniziale incubazione delle hESCs con 5'-bromo-2'-deossiridina (BrdU), un analogo della timidina usato per marcare il DNA di nuova sintesi, alla concentrazione di 10mM per 12-14 ore. Nelle ultime 3-4 ore viene aggiunta colcemide alla concentrazione di 0,1 µg/mL al fine di arrestare il ciclo cellulare alla metafase, si procede dunque con la digestione dell'RNA e la fissazione delle cellule con formaldeide al 4%. Segue la colorazione con un intercalante fluorescente, successivamente l'esposizione alla luce UV (365nm) per 40 minuti danneggia selettivamente il filamento di DNA sostituito con BrdU rendendolo suscettibile alla digestione con Esonucleasi III. Dopo la digestione selettiva rimane un solo filamento di DNA

per cromatide e se non hanno subito scambi è presente il filamento C-rich su un cromatide e il filamento G-rich sull'altro. Si procede quindi con l'ibridazione di sonde telomeriche marcate per l'appunto C-rich e G-rich che verranno visualizzate per microscopia a fluorescenza. I cromatidi fratelli appaiono con colori differenti a seconda del fluoroforo associato alla sonda, di conseguenza, gli scambi sono identificati come aree in cui i segnali di colore attesi per ciascun cromatide si mescolano.

Come segno distintivo delle cellule ALT⁺, alternativamente agli APBs, si sarebbe potuta prendere in considerazione la ricerca di C-cycles i quali sono più specifici per le cellule ALT-positive; di contro i metodi di analisi per l'identificazione di queste strutture sono più dispendiosi.

In questo studio non è mai stata rilevata la presenza di segni che possano indicare un meccanismo ALT attivo nelle cellule in esame.

2.6 ANALISI DELLA LUNGHEZZA DEI TELOMERI

Uno degli scopi principali di questo studio è quello di studiare la variazione della lunghezza e della struttura dei telomeri nelle cellule staminali pluripotenti umane indotte ed embrionali, studiarne i cambiamenti nella derivazione *in vitro* in primis e nella coltura prolungata poi monitorando i vari passaggi. Sono quindi fondamentali le tecniche utilizzate in questo studio per stimare la lunghezza dei telomeri dal momento che si tratta di un parametro molto importante essendo un indicatore della stabilità genomica e della capacità replicativa della cellula. All'interno di questo studio è stata misurata la lunghezza dei telomeri a livello delle linee cellulari BJ wild-type, nelle linee cellulari di hiPSCs riprogrammate con successo e a livello di hESCs per poter fare un paragone completo e verificare se realmente con la riprogrammazione cellulare le hiPSCs acquisiscono tratti tipici delle cellule embrionali. Al fine di riuscire a dare una migliore interpretazione ai risultati vengono usate due tecniche diverse per misurare la lunghezza dei telomeri.

Telomere restriction fragment (TRF) analysis

Nonostante si tratti di una delle prime tecniche sviluppate per questo scopo è considerata il "gold standard" per le misurazioni della lunghezza assoluta dei telomeri. La procedura prevede l'estrazione del DNA da una popolazione cellulare seguita dalla digestione per mezzo di un enzima di restrizione, questo viene scelto in modo tale da riconoscere un sito che sia assente a livello delle regioni telomeriche lasciando così integre quest'ultime e frammentando il

resto del genoma. L'enzima utilizzato in questo caso specifico è Mbol che riconosce e taglia la sequenza GATC, di conseguenza i telomeri rimangono intatti ma presentano ad un'estremità una porzione sub-telomerica (detta regione X) di lunghezza variabile. Un limite di questo approccio sperimentale sta proprio nel fatto che l'endonucleasi usata per la digestione del DNA non è standard e la porzione sub-telomerica mantenuta è di dimensione ignota ed incostante. Sebbene l'enzima di restrizione abbia una frequenza di taglio elevata e presumibilmente la regione X non è eccessivamente lunga la sua presenza porta inevitabilmente a sovrastimare la dimensione dei telomeri e ad avere risultati non comparabili tra esperimenti diversi.

I frammenti telomerici così ottenuti vengono sottoposti ad una elettroforesi in gel di agarosio performata con l'applicazione di un campo elettrico pulsato per 12 ore ad un voltaggio costante di 5 V/cm con un tempo di pulsazione costante di 5 secondi. Al termine della separazione i frammenti vengono trasferiti su una membrana di nylon e ibridati con una sonda, complementare alla sequenza telomerica, marcata con P³². La membrana viene poi esposta ad una lastra autoradiografica che imprime le bande corrispondenti alle sequenze telomeriche marcate. In questo modo si può osservare la migrazione dei telomeri presenti nel campione iniziale e ne verrà determinata la lunghezza media per confronto con un uno standard di dimensione nota oppure un marker di peso molecolare incluso nella migrazione (non esplicitamente mostrato nello studio).

Il vantaggio di questa tecnica è quello di avere come risultato una lunghezza assoluta espressa in Kilobasi sebbene si tratti di una media che non rappresenta adeguatamente la distribuzione dei telomeri. Inoltre, a vincolare l'uso di questa tecnica, ci sono anche la necessità di utilizzare un campione di DNA sufficientemente grande (circa 3µg) e l'incapacità di rilevare telomeri di dimensione inferiori a circa 2 kb. L'applicazione del saggio TRF è quindi utile ad avere un quadro generale delle cellule in esame ma limitata, in quanto può presentare delle differenze interindividuali che non rispecchiano la vera disuguaglianza in termini delle ripetizioni dell'esamero telomerico. Questa può infatti essere riscontrata anche nel caso di esame svolto con lo stesso enzima di restrizione ma causata dalla presenza di polimorfismi nel sito di restrizione presente a livello sub-telomerico. [19, 20]

Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) analysis

La tecnica Q-FISH è un metodo citogenetico che permette di visualizzare e determinare in maniera diretta la lunghezza dei telomeri sui singoli cromosomi grazie alla quantificazione della fluorescenza emessa. Questa analisi prevede l'ibridazione di sonde fluorescenti specifiche per le sequenze telomeriche su

nuclei metafasici. Le cellule sono state trattate con 0,1 µg/mL di colcemide per 3-4 ore, dopodiché vengono sottoposte ad una soluzione ipotonica di citrato di sodio 0,3M per 20-30 minuti a 37°C per causare il rigonfiamento dei cromosomi. A questo punto i preparati vengono fissati e poi incubati con la sonda telomerica marcata ricca in C, segue il lavaggio per rimuovere le interazioni aspecifiche della sonda e la visualizzazione tramite microscopia confocale.

Per mezzo di questa analisi è possibile ottenere la lunghezza relativa dei telomeri a livello di singolo cromosoma e di singola cellula ma non sono rilevabili i telomeri di dimensione inferiore alla lunghezza della sonda (CCCTAA)³. Un altro inconveniente di questa tecnica è la possibilità di evidenziare sequenze telomeriche interstiziali, ovvero quelle sequenze di origine telomerica che si possono trovare all'interno del cromosoma originate per eventi di duplicazione o ricombinazione.

In conclusione, l'analisi TRF offre una rappresentazione globale dei telomeri con il limite di non essere in grado di fornire informazioni riguardo la lunghezza dei telomeri a livello dei singoli cromosomi o delle singole cellule. Fornisce una panoramica complessiva della lunghezza dei telomeri in una popolazione di cellule ma ha il vantaggio di presentare dei dati di lunghezza assoluta espressa in kb. L'analisi Q-FISH invece permette di rilevare variazioni di lunghezza tra cromosomi diversi all'interno di una singola cellula permettendo di vedere la variazione della lunghezza dei telomeri all'interno di una popolazione eterogenea. Per contro però fornisce informazioni in unità arbitrarie di fluorescenza [19]

Metodi di misurazione alternativi: La determinazione della lunghezza telomerica in questo studio riveste un ruolo importante poiché uno degli obiettivi principali è proprio quello di studiarne i cambiamenti. Per questo motivo ha senso chiedersi se esistono metodi di misurazione alternativi e che vantaggi possono eventualmente portare. La **PCR quantitativa (Q-PCR)** ad esempio è una tecnica semplice da attuare che richiede piccole quantità di DNA per funzionare (50ng) e permette di determinare la lunghezza media dei telomeri di un campione in termini relativi o assoluti a seconda della modalità in cui viene implementata. La tecnica si basa sull'amplificazione della porzione telomerica per mezzo di primer che si appaiano su entrambi i filamenti, G-rich e C-rich, del telomero (presentano dei mismatch all'interno della loro sequenza scoraggiando l'appaiamento dei primer). Attraverso l'amplificazione in real-time è possibile individuare il numero di cicli di amplificazione necessari al rilevamento del prodotto di amplificazione telomerico ("T") e per normalizzare il valore ottenuto, e fare una

quantificazione relativa del DNA telomerico di partenza, viene amplificato contemporaneamente un gene presente in copia singola il cui prodotto di amplificazione viene indicato con "S". Con i risultati ottenuti è possibile determinare un rapporto T/S il quale è proporzionale alla lunghezza media dei telomeri nel campione. Questa tecnica permette in alternativa la possibilità di usare un DNA di riferimento la cui lunghezza delle ripetizioni telomeriche è nota per determinare una curva di riferimento standard che permette una determinazione della lunghezza media dei telomeri del campione sperimentale espressa in termini assoluti come kilo-basi. Tale tecnica è generalmente utilizzata per determinare la lunghezza relativa poiché il processo è semplice da implementare e di facile interpretazione, questo metodo di misurazione però è caratterizzato dall'importante svantaggio della eccessiva variabilità tra risultati ottenuti da diversi laboratori a causa di diversi geni a copia singola presi per la normalizzazione del risultato. Un altro metodo di analisi interessante potrebbe essere la tecnica **TeSLA (Telomere Shortest Length Assay)** che permette la determinazione della lunghezza del più corto telomero presente all'interno di un pool di cellule. Questa tecnica necessita di quantità molto limitate di DNA (<1µg) e offre il grande vantaggio di individuare con precisione i telomeri più corti senza rilevare erroneamente le sequenze interstiziali telomeriche. L'utilità nell'ottenere questo tipo di risultati è data dal fatto che è proprio il telomero più corto ad innescare i processi che portano alla senescenza cellulare. Questo metodo sfrutta degli adattatori specifici per le regioni telomeriche che ne permettono l'amplificazione riducendo al minimo la porzione sub-telomerica, i frammenti così selezionati e amplificati vengono separati per mezzo di una corsa elettroforetica in gel e vengono marcati con sonde specifiche per le sequenze telomeriche. La distribuzione dei frammenti ottenuti è ovviamente correlata alla presenza di un marker di peso molecolare e si riescono a misurare telomeri della lunghezza compresa tra le 18kb fino a telomeri inferiori a 1kb. Si tratta di una tecnica molto sensibile e aggira il problema dell'identificazione indesiderata delle sequenze telomeriche interstiziali che avviene invece nel caso dell'analisi Q-FISH fornendo inoltre una misura assoluta della lunghezza telomerica in kb e non in unità arbitrarie rendendola utile per generare dati paragonabili con quelli ottenuti da altri studi. [19]

2.7 ANALISI DELL'EPIGENETICA DEI TELOMERI

Da studi precedenti è noto che nel caso delle iPSCs murine (miPSCs) durante la riprogrammazione le cellule acquisiscono caratteristiche tipiche delle mESCs come la perdita di modifiche istoniche associate ad uno stato di

cromatina compatta e inattiva. Gli autori di questo studio, di conseguenza, vogliono verificare se la situazione nel caso delle cellule umane è paragonabile: vengono quindi fatte delle analisi per valutare la presenza di modifiche istoniche e fattori in grado di legarsi ai telomeri che siano associati alla regolazione della struttura della cromatina telomerica. Lo studio propone un'analisi di immunoprecipitazione della cromatina indagando le interazioni tra specifiche proteine e il DNA; per rendere l'analisi completa viene fatto un confronto dei segni di eterocromatina (H3K9me3, H4K20me3 e HP1) e dell'abbondanza della proteina TRF2 tra fibroblasti BJ, hESCs e hiPSCs (a passaggi 4, 15 e 30 in subcoltura) in modo da verificare se anche nel caso delle cellule umane le cellule staminali pluripotenti indotte tendono ad acquisire tratti caratteristici delle cellule embrionali.

Chromatin immune precipitation (ChIP) assay

Si tratta di un metodo usato per studiare le interazioni tra acidi nucleici e proteine. Questa tecnica permette di indagare le interazioni in vivo facendo avvenire dei cross-link tra queste strutture grazie all'utilizzo di formaldeide. In questo modo si crea una sorta di ferma immagine di tutte le interazioni (anche transienti) che si verificano in un determinato momento. Dopo l'aggiunta di formaldeide all'1% per 10 minuti la reazione viene bloccata con l'inserimento di glicina 0,125M; le cellule sono state poi lavate con una soluzione salina. Viene quindi indotta la lisi cellulare, il blocco delle proteasi e la frammentazione della cromatina tramite sonicazione. Si passa poi all'incubazione con gli anticorpi specifici (anti-H3K9me3, anti-H4K20me3, anti-TRF2, anti-HP-1 γ) e IgG come controllo negativo per poi procedere con l'immunoprecipitazione. I prodotti ottenuti presentano le proteine di interesse con una porzione di DNA legata ad esse; viene quindi aggiunta la sonda telomerica marcata, usata anche nel caso del TRF assay, per verificare se queste proteine stavano effettivamente interagendo con la porzione del DNA telomerico. In seguito all'ibridazione della sonda la rilevazione viene fatta utilizzando un software e il segnale prodotto dai telomeri immunoprecipitati (legati alle proteine target) viene quantificato e confrontato con il segnale del DNA telomerico totale presente nel campione. Questo permette di valutare la quantità di DNA telomerico associato a specifiche proteine o modifiche istoniche. [21]

2.8 ANALISI DELLA STABILITÀ GENOMICA E DELLA RISPOSTA AL DANNO AL DNA

Il mantenimento della stabilità genomica è essenziale per preservare la funzionalità e la vitalità delle cellule, in particolare quelle con un'alta capacità proliferativa come le cellule staminali pluripotenti. L'instabilità genomica, come le rotture cromosomiche o le fusioni telomeriche, può compromettere l'attività cellulare e promuovere l'insorgenza di condizioni patologiche. Inoltre, in letteratura sono presenti studi che attestano come nella coltura prolungata delle cellule staminali si possono riscontrare anomalie cromosomiche. Pertanto, ci si pone l'obiettivo di analizzare il cariotipo delle diverse linee cellulari di hiPSCs ai passaggi 4 e 30 per verificare eventuali cambiamenti e indagare se i telomeri di hiPSCs e hESC sono protetti dai danni al DNA durante la coltura in vitro.

L'analisi del cariotipo di hiPSCs ai passaggi in subcoltura 4 e 30 vengono fatti attraverso "Chromosomal G-band analysis" bloccando le cellule allo stadio metafasico del ciclo cellulare e i cromosomi vengono colorati con coloranti come, per esempio, il Giemsa che crea pattern di bande chiare e bande scure sui cromosomi. Questa colorazione permette di osservare i cromosomi al microscopio ottico e verificare se avvengono cambiamenti strutturali come la perdita di cromosomi, duplicazioni o traslocazioni.

Nello studio si procede poi con la ricerca di marcatori del danno a livello del DNA telomerico in hESC e hiPSCs rispettivamente fino al passaggio 40 e 30 in subcoltura. L'analisi viene fatta ricercando il marker di danno 53BP1 (p53-binding protein 1) tramite immunofluorescenza e parallelamente attraverso un'analisi Q-FISH. Nel caso di 53BP1 si tratta di una proteina che viene velocemente reclutata nel caso di rotture a doppio filamento di DNA grazie all'interazione con altri fattori di danno, pertanto, la sua co-localizzazione con i telomeri indica la presenza di foci di danno al DNA (TIFs). Con l'analisi Q-FISH in vece si vuole verificare la presenza di eventuali segnali multimerici (MTS) a livello dei telomeri che riflettono una fragilità telomerica.

Alla rilevazione di danni effettuata con la ricerca del marker 53BP1 viene associato anche un controllo positivo: questo è dato da una linea cellulare sottoposta ad un trattamento con 6-thio-dG, un analogo nucleotidico che una volta incorporato genera danni rilevabili per associazione della proteina 53BP1. La tecnica dell'immunofluorescenza è stata messa in atto usando un anticorpo anti-53BP1 e anticorpi secondari coniugati ad un fluoroforo per amplificare il segnale.

2.9 ANALISI DELLA FORMAZIONE DI TERATOMA

I teratomi sono tumori benigni derivati da cellule staminali pluripotenti e per questo motivo al loro interno si possono trovare cellule differenziate in diversi tipi di tessuti di origine potenzialmente sia endodermica che mesodermica o ectodermica.

L'analisi di formazione del teratoma viene effettuata per verificare il potenziale differenziativo delle cellule hiPSCs prodotte e se la lunghezza dei loro telomeri può avere una correlazione con questa potenzialità. Si decide quindi di effettuare un test di differenziamento in vivo su modelli murini analizzando i teratomi formati in seguito allo xenotrapianto di hiPSCs a diversi passaggi (p4 e p30). L'iniezione delle cellule deve essere condotta su topi immunodeficienti in modo tale le cellule umane non possano essere rigettate dall'organismo ospite e si possano sviluppare i teratomi. I topi vengono poi sacrificati in camere a CO₂ nel momento in cui si considera possa corrispondere all'end-point umano. I teratomi sono stati monitorati a giorni alterni dal momento della loro formazione e se ne è determinato il volume fino all'end-point, questi vengono successivamente estratti, pesati e fissati con PBS contenente il 4% di paraformaldeide. Il tessuto incluso in paraffina è stato sezionato al microtomo e colorato con ematossilina ed eosina per l'analisi microscopica.

CAPITOLO 3: RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 ACQUISIZIONE DELLA PLURIPOTENZA INDOTTA E RUOLO DELLA TELOMERASI

Dalla letteratura è noto che la riprogrammazione delle cellule umane determina un allungamento dei telomeri. Per capirne meglio le dinamiche e i meccanismi coinvolti gli autori di questo studio allestiscono un progetto di riprogrammazione di cellule somatiche differenziate umane (fibroblasti BJ) per osservare nella generazione e coltura prolungata delle hiPSCs come vengono modificati i telomeri e da quali modifiche sono accompagnati. La riprogrammazione viene allestita usando 6 linee cellulari di fibroblasti BJ wild-type e tre linee modificate, due $TERT^{-/-}$ e una $TERC^{-/-}$, allo scopo di verificare se la riattivazione di una o entrambe le componenti della telomerasi fosse necessaria per la corretta generazione di cellule pluripotenti indotte.

Le linee cellulari modificate falliscono nel tentativo di riprogrammazione dimostrando che sono necessarie entrambe le componenti per avere una telomerasi funzionante e generare delle hiPSCs correttamente riprogrammate. I fibroblasti BJ wild type (wt) invece hanno sicuramente dato origine a delle cellule che appaiono simili alle ESCs con colonie compatte, alto rapporto di citoplasma nucleare e positive alla fosfatasi alcalina come si vede dalla colorazione in figura (figura 1); tutti segni che supportano l'ipotesi che possa trattarsi di cellule pluripotenti.

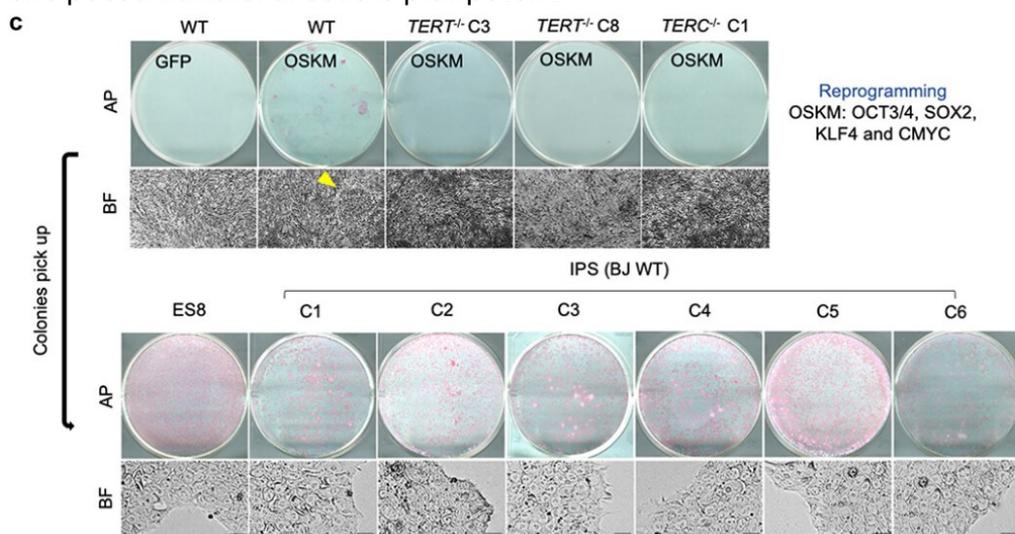


Figura 1. Riprogrammazione dei fibroblasti BJ wt e con le due varianti di knock-out per i geni della telomerasi. La colorazione rosa delle colonie è data dal saggio con fosfatasi alcalina (AP), considerato un marker di pluripotenza cellulare.

La conferma della pluripotenza deriva dall'analisi dell'espressione dei geni OCT4, NANOG e SOX endogeni confermati come si vede sia a livello di trascritti (figura 2) che a livello proteico (figura 3). In particolare, dall'analisi

fatta sulle proteine prodotte si può notare come questi geni, oltre a quelli di TRF1 e TERT, non solo vengono riattivati ma mostrano livelli di espressione costanti tra i diversi passaggi di subcoltura dimostrando una stabilità delle linee hiPSCs ottenute.

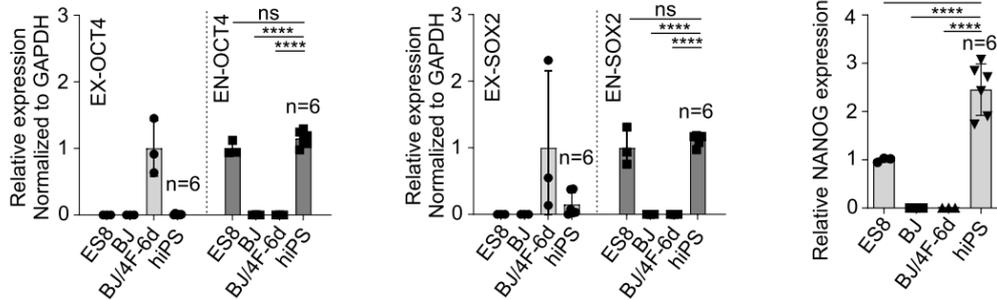


Figura 2. Livello di espressione dei geni della pluripotenza ottenuti a livello dei trascritti quantificati tramite RT-PCR quantitativa e normalizzati rispetto il gene GAPDH.

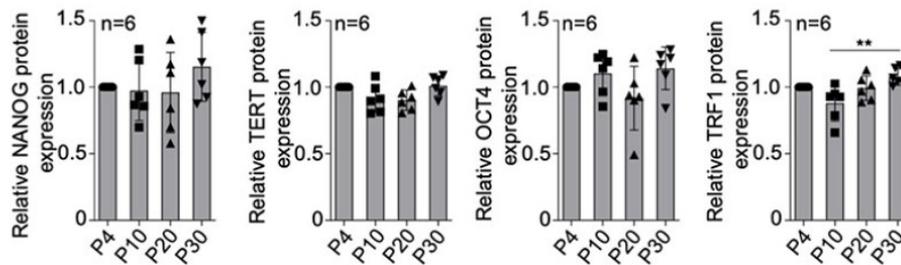


Figura 3. Verifica dell'espressione genica a livello proteico dei geni NANOG, TERT, OCT4 e TRF1 in cellule hiPSCs. Le barre rappresentano la media dell'espressione relativa dei geni normalizzati rispetto al gene delle β -actina (non raffigurato) ottenute da analisi di western blot

3.2 ALLUNGAMENTO DEI TELOMERI DURANTE L'ESPANSIONE IN VITRO DELLE iPSCs E CONFRONTO CON LE ESCs

Riguardo la dimensione dei telomeri delle hiPSCs questa viene monitorata dal passaggio 4 fino al passaggio 30 tramite TRF (figura 4) e Q-FISH (figura 5). Da queste analisi risulta che già dal passaggio 4 le hiPSCs presentano dei telomeri nettamente più estesi dei fibroblasti BJ d'origine. L'incremento della lunghezza telomerica continua ad essere osservato per tutti i passaggi analizzati sebbene l'entità dell'allungamento vada progressivamente a calare. In particolare, dal grafico della lunghezza media dei telomeri si osserva che tra il passaggio 20 e il passaggio 30 (l'intervallo più ampio osservato) la lunghezza è conservata e pressoché costante. Da queste analisi risulta che le hiPSCs raggiungono una lunghezza telomerica mediamente compresa tra 8-9 kb. Analogamente sono state monitorate anche le hESC con le stesse tipologie di analisi dal più basso passaggio possibile (alla quale vengono fornite) fino al passaggio 40 (figura 6, mostra i risultati esclusivamente relativi al saggio TRF). Da quest'ultima immagine è possibile stabilire che la lunghezza media dei telomeri in queste cellule è rimasta piuttosto costante con una dimensione

attorno alle 8kb nel caso della linea cellulare ES9, 11kb per la linea ES8 e 9kb nella linea ES7.

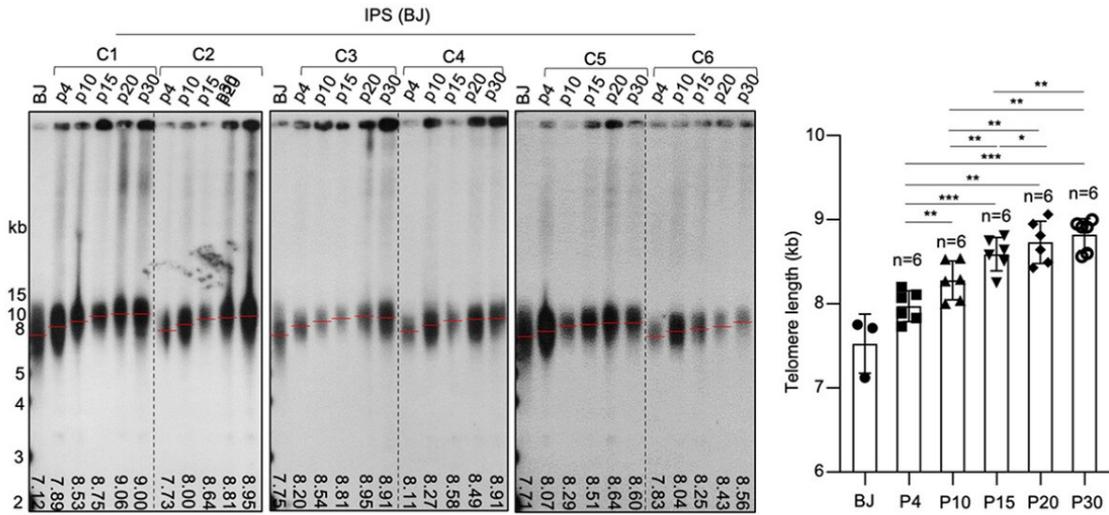


Figura 4. Separazione dei frammenti di restrizione telomerici per cellule hiPSCs a diversi passaggi e cellule BJ parentali. Le linee rosse rappresentano il centro della banda che viene preso in considerazione per la determinazione della lunghezza media del telomero riportata in basso e rappresentata dalle colonne nel grafico a destra.

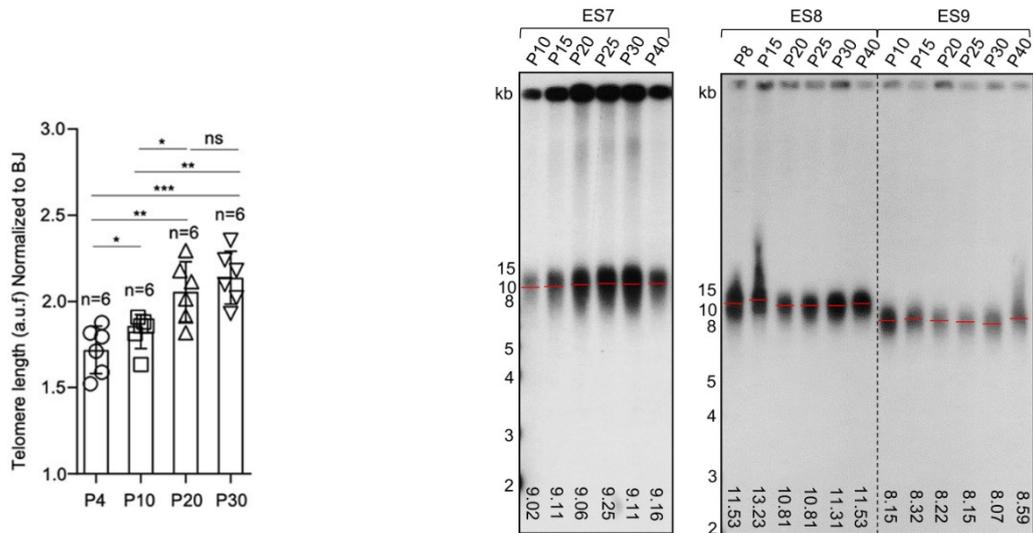


Figura 6. Rappresentazione grafica della fluorescenza ottenuta dall'esperimento di Q-FISH in hiPSCs espressa in unità arbitrarie di fluorescenza.

Figura 5. Separazione dei frammenti TRF di cellule hESCs. La lunghezza media dei telomeri viene riportata in basso espressa in kb.

Particolarmente utile in queste analisi, a mio avviso, sono le immagini relative al saggio TRF che permettono di fare un confronto tra telomeri hiPSCs ed hESCs stabilendo che la lunghezza telomerica raggiunta dalle cellule staminali riprogrammate somiglia a quella delle cellule staminali embrionali.

3.3 LA TELOMERASI È RIATTIVATA E MANTENUTA NELL'ESPANSIONE IN VITRO DELLE iPSCs

Alla luce del fatto che entrambe le componenti (TERT e TERC) sono necessarie per il corretto funzionamento dell'enzima si vuole anche approfondire quali sono i livelli di espressione delle due subunità ai diversi passaggi e fare un paragone con le cellule differenziate. Nello studio vengono indagati i livelli di espressione tramite PCR quantitativa (*figura 7*) mostrando che nei fibroblasti BJ differenziati è mantenuto un certo livello di espressione del gene TERC mentre la componente TERT viene riattivata da zero durante la riprogrammazione.

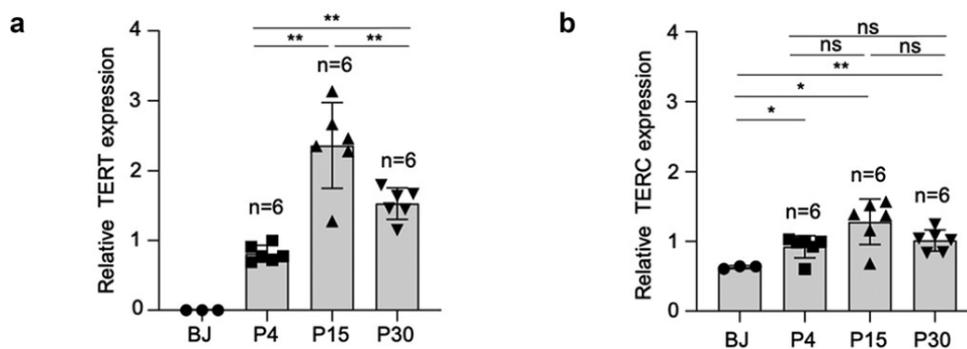


Figura 7. Livelli di espressione dei geni TERT e TERC riportati in termini di abbondanza relativa nelle cellule dei fibroblasti BJ e nelle hiPSCs ai passaggi 4, 15 e 30.

Questi risultati da un lato confermano le aspettative relative all'incremento di espressione dei geni della telomerasi ma dall'altro dimostrano anche come la componente limitate che pregiudica il funzionamento dell'enzima sia quella contenente il dominio catalitico (TERT), lo si evince dal fatto che l'espressione del gene TERC non è nulla nel contesto delle cellule somatiche.

I risultati relativi all'espressione vengono accompagnati dal monitoraggio dell'attività della telomerasi ottenuta tramite saggio TRAP. Da queste analisi è chiaro come nelle cellule differenziate non ci sia alcun tipo di attività telomerasica mentre si ha una riattivazione nelle hiPSCs individuabile fin dal passaggio 4 (*figura 8*). È interessante notare come l'attività sia nettamente maggiore rispetto a quella individuata a livello delle cellule embrionali della linea ES7 e che questa resti pressoché stabile con il progredire dei passaggi nonostante si possa notare un calo nei livelli di espressione di TERT e TERC tra il passaggio 15 e 30.

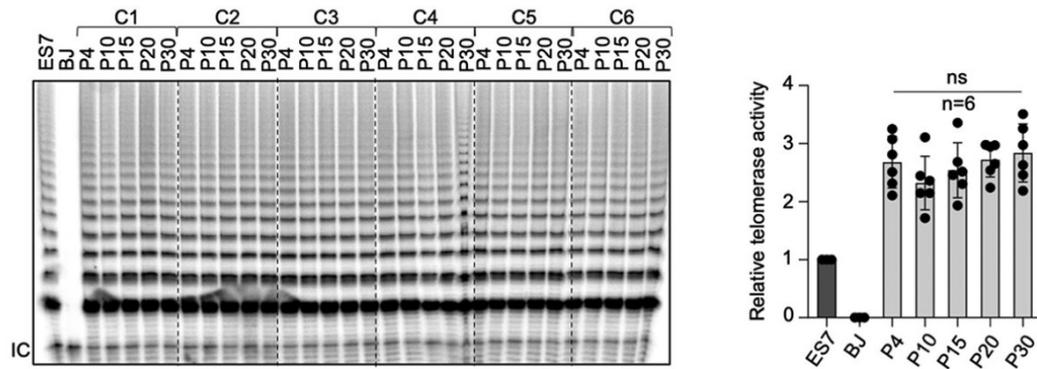


Figura 8. Immagine rappresentativa del test TRAP nella quale si possono osservare i frammenti di lunghezza variabile proporzionale all'attività della telomerasi. Sulla destra il grafico esplicativo delle differenze tra linee cellulari diverse e tra hiPSCs a diversi passaggi.

3.4 RIMODELLAMENTO DELLA CROMATINA TELOMERICA NELLE iPSCs

Durante la riprogrammazione le aspettative sono quelle di avere una maggiore trascrizione a livello dei telomeri: di conseguenza si ricercano evidenze che dimostrino uno stato della cromatina più “aperto” accompagnate dalla diminuzione di segni eterocromatici e una maggiore quantità di trascritti telomerici (TERRAs) avvicinandosi ad una condizione tipica delle ESCs. Come si vede dalla *figura 9* anche in questa analisi sono state confrontate le hiPSCs a diversi passaggi con le cellule pluripotenti embrionali ES7 e i fibroblasti BJ. Dai risultati dell'immunoprecipitazione effettuata si osserva una riduzione delle modifiche istoniche H3K9me3 e H4K20me3 (associate ad uno stato di cromatina trascrizionalmente inattiva), una riduzione dei livelli di HP1 (heterochromatin protein 1, che interagendo con la DNA metil-transferasi guida le modifiche istoniche) e una riduzione dei livelli della componente TRF2 di shelterin. Dai grafici riportati (*figura 9*) si nota come i livelli di TRF2 e degli istoni H4K20 trimetilati siano molto simili tra le hiPSCs ai vari passaggi e le hESCs, mentre H3K9me3 e HP1 risultano leggermente discostati dai livelli rilevati nelle hESCs ma comunque nettamente minori rispetto a quelli delle cellule differenziate di origine denotando un generale avvicinamento delle cellule pluripotenti riprogrammate alle classiche caratteristiche delle ESCs.

Anche i livelli di trascritti telomerici (TERRAs) nei vari passaggi delle hiPSCs si avvicinano di molto a quelli della linea cellulare ES7 definendo un aumento dell'espressione rispetto ai fibroblasti parentali.

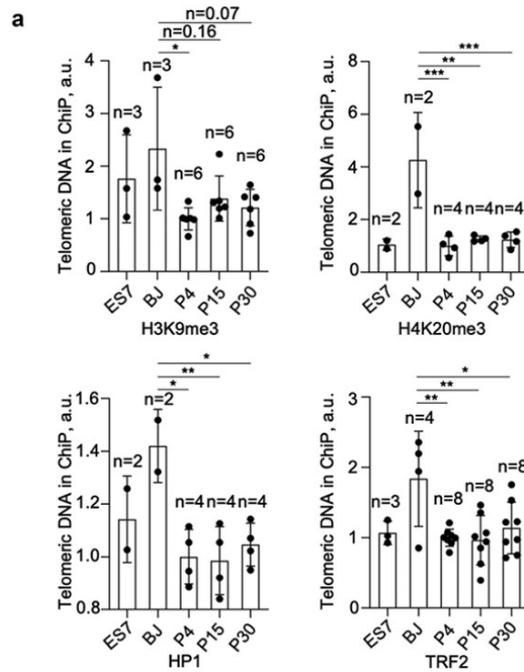


Figura 9. Quantificazione del DNA telomerico immuno precipitato tramite tecnica ChIP

3.5 I TELOMERI SONO PROTETTI E LA STABILITÀ GENOMICA È MANTENUTA

Un altro obiettivo interessante posto da questo studio è quello di valutare la stabilità del genoma e la protezione dei telomeri nelle cellule pluripotenti umane in condizioni di coltura in vitro prolungata. Da un lato è stato analizzato il cariotipo delle 6 linee cellulari hiPSCs ottenute, ai passaggi 4 e 30, osservando che il normale cariotipo viene mantenuto nei passaggi a riprova del fatto che i loro telomeri sono ben mantenuti. Successivamente ci si concentra sull'analisi comparativa di hESCs e hiPSCs cercando il marcatore di danno 53BP1 tramite immunofluorescenza accompagnando l'analisi telomerica mediante saggio FISH. Nell'immagine (*figura 10*) si vedono i risultati di queste analisi in riferimento al controllo positivo dato dal trattamento delle cellule con 6-thio-dG. Nonostante la coltura prolungata si osserva un livello di danno generale al DNA molto basso rispetto al controllo, costante con il progredire dei passaggi in subcoltura e comparabile tra hESCs e hiPSCs. La stessa cosa può essere detta in merito all'insorgenza di danni a livello dei telomeri.

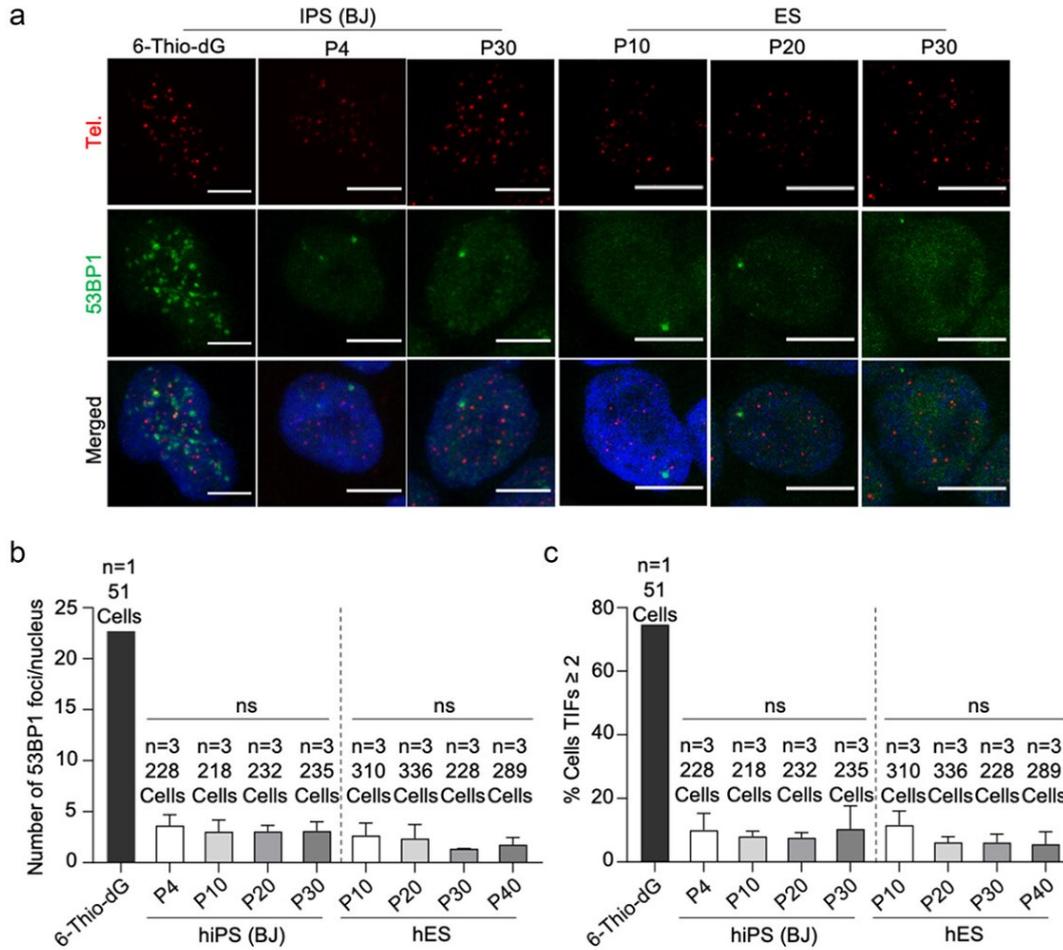


Figura 10. Rappresentazioni delle cellule in microscopia confocale con foci di danno al DNA telomerico evidenziati dalla presenza della proteina 53BP1. Segue la quantificazione del numero di foci per nucleo e un grafico che mostra la percentuale di cellule con TIFs maggiore o uguale a 2.

Analogamente gli autori riportano che non sono state osservate neanche aberrazioni cromosomiche negli spread metafasici (i cui risultati si possono osservare nella figura 11). Questa conclusione deriva dall'analisi di immagini come quella riportata sotto in cui l'osservazione di MTS (multimeric signals) nonostante siano indicatori di instabilità telomerica e riflettano una disfunzione del telomero non risultano essere statisticamente rilevanti.

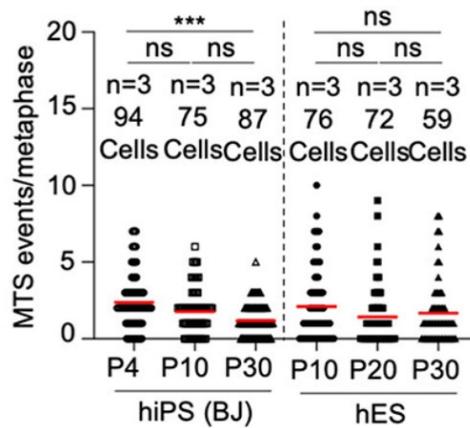
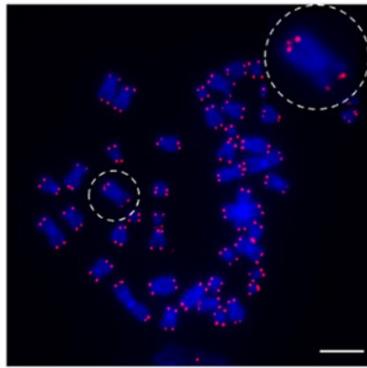


Figura 11. Rappresentazione dei risultati relativi alla quantificazione dei segnali multimerici presenti nei telomeri. È evidenziato un cromosoma che presenta un segnale di questo tipo sebbene si tratti di un risultato significativamente irrilevante.

3.6 LUNGHEZZA TELOMERICA E FORMAZIONE DI TERATOMA

Per studiare il potenziale differenziativo delle cellule riprogrammate e come questo sia correlato alla lunghezza dei telomeri viene eseguito un test di differenziamento in vivo. Le hiPSCs derivanti dai passaggi 4 e 30 con diversa lunghezza telomerica vengono iniettate nei topi per valutare la formazione dei teratomi derivanti e le tipologie di cellule differenziate in grado di generare. Dai risultati mostrati in figura (figura 12) si nota che i teratomi originati dalle cellule al passaggio 4 hanno un volume leggermente maggiore a parità dei giorni post-inoculazione. Nonostante questo, i teratomi originati da iPSC al passaggio 4 e da iPSC al passaggio 30 hanno una lunghezza dei telomeri simile dimostrando che durante il differenziamento in vivo la lunghezza dei telomeri è mantenuta. Inoltre, si sono potuti osservare diversi tipi cellulari originati dalle hiPSCs in esame mostrando lo stesso potenziale differenziativo, in più non è stata osservata alcuna differenza nella percentuale di cellule positive a ki67, p21 e γ -H2AX che indicano rispettivamente una proliferazione cellulare, un arresto del ciclo cellulare e un carico di danno al DNA simili tra hiPSCs al passaggio 4 e 30.

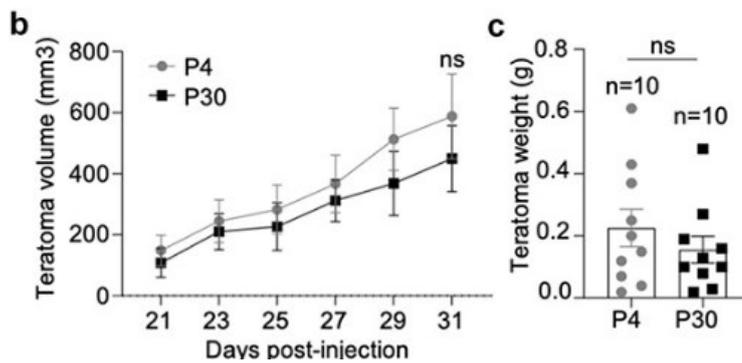


Figura 12. Volume dei teratomi sviluppati ai vari giorni post-iniezione da parte di cellule al P4 e P30 e peso del teratoma (espresso in grammi) misurato all'end point umano.

3.7 CONFRONTO TRA CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI UMANE E MURINE

Dagli studi presenti in letteratura è noto che durante la formazione delle miPSCs queste allungano i propri telomeri tramite meccanismi dipendenti dalla telomerasi, parallelamente nella formazione di queste cellule si assiste alla diminuzione di modifiche istoniche associate allo stato della cromatina trascrizionalmente inattiva. In maniera analoga altri studi hanno osservato un comportamento simile da parte delle cellule della ICM di topo nel processo di derivazione in vitro che porta alla determinazione di mESCs: anche qui infatti sono stati osservati allungamenti telomerici e riduzione di segni distintivi dell'eterocromatina. Queste evidenze suggeriscono che l'allungamento dei telomeri e la riconfigurazione epigenetica a livello della cromatina telomerica sono processi necessari per stabilire e mantenere uno stato di pluripotenza a prescindere dalla natura delle cellule di partenza. Gli autori di questo studio si sono posti quindi l'obiettivo di studiare la dinamica dei telomeri nelle cellule staminali pluripotenti umane per confrontarla con quanto già noto nel contesto delle cellule murine; questo può essere importante per capire quanto ciò che è stato scoperto finora per mezzo delle cellule di topo possa essere traslato eventualmente alle cellule umane e cosa necessita di ulteriori approfondimenti.

In questo studio non è stato possibile studiare il processo di derivazione in vitro delle ESCs umane a partire dalle cellule della ICM poiché sono disponibili in commercio solamente cellule hESCs stabilite a passaggi di subcoltura minimi di 8-10. Nonostante questo, è comunque possibile fare un paragone con le mESCs dal momento che quest'ultime allungano i propri telomeri fino al passaggio 24 per poi mantenerne la lunghezza fino al passaggio 60 mentre le hESCs studiate qui mostrano una dimensione dei telomeri che viene mantenuta durante tutta la coltura in vitro analizzata.

Per quanto riguarda le hiPSCs osservate in questo studio è emerso che queste allungano i propri telomeri con un meccanismo dipendente dalla telomerasi, subiscono modifiche a carico di proteine istoniche che rendono la cromatina telomerica più “aperta” aumentando di conseguenza anche la produzione di trascritti telomerici. Tutte caratteristiche riscontrate a livello delle cellule hESCs e si conferma la comparsa dei cambiamenti alla quale si assiste anche nel contesto delle pluripotenti indotte di topo. La differenza principale tra miPSCs e hiPSCs non sta nelle caratteristiche acquisite quanto più sulla dinamica con cui queste vengono ottenute. Nelle cellule pluripotenti umane infatti l’allungamento dei telomeri dipendente dalla telomerasi avviene principalmente durante la riprogrammazione e come si è visto dai risultati al passaggio 4 in sub-coltura già si osservano telomeri nettamente più lunghi di quelli presenti nelle cellule differenziate di partenza e relativamente vicini alla lunghezza massima che raggiungono nella coltura a lungo termine analizzata in questo studio. Le miPSCs d’altro canto sono caratterizzate da un allungamento dei telomeri che avviene principalmente durante le fasi di post-riprogrammazione. Questi risultati, di conseguenza, suggeriscono che l’allungamento dei telomeri può essere più efficiente nel caso delle cellule umane. Oltre a questo, differiscono anche nella correlazione tra lunghezza dei telomeri e potenziale differenziativo in quanto le cellule hiPSCs in questo studio mostrano efficienza simile nella formazione di teratomi mentre le miPSCs con telomeri di diverse dimensioni mostrano una maggiore efficienza nella formazione di chimere in corrispondenza di un maggior numero di ripetizioni telomeriche. (non è possibile verificare l’efficienza nella formazione di chimere nel caso di cellule umane per ovvi motivi etici e per insormontabili limiti nella generazione di chimere interspecifiche).

Una differenza riscontrata invece tra cellule staminali embrionali di uomo e di topo riguarda la stabilità del genoma. Il monitoraggio della formazione di foci di danno al DNA infatti ha mostrato in questo studio che le hESCs (così come le hiPSCs) presentano genomi stabili senza danni al DNA degni di nota fino ai passaggi 30/40. Le mESCs, al contrario, hanno dimostrato in altri studi un rilevante aumento di TIFs dal passaggio 24 in poi, suggerendo che il genoma delle cellule embrionali umane sia più stabile. [11]

BIBLIOGRAFIA

1. Mengola, E., Bonfanti, P., Colombo, A., E., Del Giacco, L., Manuale di Biologia dello Sviluppo Animale processi, fasi, modelli e nuove frontiere, Napoli, EdiSES S.r.l., 2019
2. Suhr ST, Chang EA, Rodriguez RM, Wang K, Ross PJ, Beyhan Z, Murthy S, Cibelli JB. Telomere dynamics in human cells reprogrammed to pluripotency. *PLoS One*. 2009 Dec 2;4(12):e8124. doi: 10.1371/journal.pone.0008124. Erratum in: *PLoS One*. 2010;5(3) doi: 10.1371/annotation/c786d141-fd0f-45fd-80ec-96d80be620dc. PMID: 19956585; PMCID: PMC2780312.
3. . Lansdorp PM. Telomeres, aging, and cancer: the big picture. *Blood*. 2022 Feb 10;139(6):813-821. doi: 10.1182/blood.2021014299. PMID: 35142846; PMCID: PMC8832478.
4. de Lange T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu Rev Genet*. 2018 Nov 23;52:223-247. doi: 10.1146/annurev-genet-032918-021921. Epub 2018 Sep 12. PMID: 30208292.
5. Kalmykova A. Telomere Checkpoint in Development and Aging. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 5;24(21):15979. doi: 10.3390/ijms242115979. PMID: 37958962; PMCID: PMC10647821.
6. Brenner KA, Nandakumar J. Consequences of telomere replication failure: the other end-replication problem. *Trends Biochem Sci*. 2022 Jun;47(6):506-517. doi: 10.1016/j.tibs.2022.03.013. Epub 2022 Apr 16. PMID: 35440402; PMCID: PMC9106919.
7. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <https://atlasgeneticsoncology.org/teaching/209020/telomeri>
8. Wang Y, Sušac L, Feigon J. Structural Biology of Telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019 Dec 2;11(12):a032383. doi: 10.1101/cshperspect.a032383. PMID: 31451513; PMCID: PMC6886448.
9. Lupatov AY, Yarygin KN. Telomeres and Telomerase in the Control of Stem Cells. *Biomedicines*. 2022 Sep 20;10(10):2335. doi: 10.3390/biomedicines10102335. PMID: 36289597; PMCID: PMC9598777.
10. Kalmykova, A.I. When and How Telomeres Lengthen in Development and Cell Lines: Evolution of Olovnikov's Telomere Theory. *Russ J Dev Biol* **55**, 39–56 (2024).
11. Varela E, Muñoz-Lorente MA, Tejera AM, Ortega S, Blasco MA. Generation of mice with longer and better preserved telomeres in the absence of genetic manipulations. *Nat Commun*. 2016 Jun 2;7:11739. doi: 10.1038/ncomms11739. PMID: 27252083; PMCID: PMC4895768.

12. Huang Y, Liang P, Liu D, Huang J, Songyang Z. Telomere regulation in pluripotent stem cells. *Protein Cell*. 2014 Mar;5(3):194-202. doi: 10.1007/s13238-014-0028-1. Epub 2014 Feb 22. PMID: 24563217; PMCID: PMC3967062.
13. Piskacek M, Otasevic T, Repko M, Knight A. The 9aaTAD Activation Domains in the Yamanaka Transcription Factors Oct4, Sox2, Myc, and Klf4. *Stem Cell Rev Rep*. 2021 Oct;17(5):1934-1936. doi: 10.1007/s12015-021-10225-8. Epub 2021 Aug 3. PMID: 34342803.
14. Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab*. 2011 Aug 3;14(2):264-71. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.011. PMID: 21803296; PMCID: PMC3156138.
15. Marión RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1149-53. doi: 10.1038/nature08287. Epub 2009 Aug 9. PMID: 19668189; PMCID: PMC3624089.
16. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010 May;11(5):319-30. doi: 10.1038/nrg2763. Epub 2010 Mar 30. PMID: 20351727.
17. Zhang JM, Zou L. Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell Biosci*. 2020 Mar 10;10:30. doi: 10.1186/s13578-020-00391-6. PMID: 32175073; PMCID: PMC7063710.
18. Jeon HJ, Levine MT, Lampson MA. Telomere Elongation During Pre-Implantation Embryo Development. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2024;238:121-129. doi: 10.1007/978-3-031-55163-5_6. PMID: 39030357.
19. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018 Mar 5;373(1741):20160451. doi: 10.1098/rstb.2016.0451. PMID: 29335378; PMCID: PMC5784071.
20. Yu HJ, Byun YH, Park CK. Techniques for assessing telomere length: A methodological review. *Comput Struct Biotechnol J*. 2024 Apr 10;23:1489-1498. doi: 10.1016/j.csbj.2024.04.011. PMID: 38633384; PMCID: PMC11021795.
21. García-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet*. 2004 Jan;36(1):94-9. doi: 10.1038/ng1278. Epub 2003 Dec 14. PMID: 14702045.



Telomere dynamics in human pluripotent stem cells

Buyun Ma, Paula Martínez, Raúl Sánchez-Vázquez & Maria A. Blasco

To cite this article: Buyun Ma, Paula Martínez, Raúl Sánchez-Vázquez & Maria A. Blasco (14 Jan 2024): Telomere dynamics in human pluripotent stem cells, Cell Cycle, DOI: [10.1080/15384101.2023.2285551](https://doi.org/10.1080/15384101.2023.2285551)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15384101.2023.2285551>



© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



View supplementary material [↗](#)



Published online: 14 Jan 2024.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 874



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Telomere dynamics in human pluripotent stem cells

Buyun Ma, Paula Martínez, Raúl Sánchez-Vázquez, and Maria A. Blasco

Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain

ABSTRACT

Pluripotent stem cells (PSCs) are a promising source of stem cells for regenerative therapies. Stem cell function depends on telomere maintenance mechanisms that provide them with the proliferative capacity and genome stability necessary to multiply and regenerate tissues. We show here that established human embryonic stem cells (hESCs) have stable telomere length that is dependent on telomerase but not on alternative mechanisms based on homologous recombination pathways. Here, we show that human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) reprogrammed from somatic cells show progressive telomere lengthening until reaching a length similar to ESCs. hiPSCs also acquire telomeric chromatin marks of ESCs including decreased abundance of trimethylated histone H3K9 and H4K20 and HP1 heterochromatic marks, as well as of the shelterin component TRF2. These chromatin features are accompanied with increased abundance of telomere transcripts or TERRAs. We also found that telomeres of both hESCs and hiPSCs are well protected from DNA damage during telomere elongation and once full telomere length is achieved, and exhibit stable genomes. Collectively, this study highlights that hiPSCs acquire ESC features during reprogramming and reveals the telomere biology in human pluripotent stem cells (hPSCs).

AUTHOR SUMMARY

We show that established human embryonic stem cells (hESCs) have a maximum and stable telomere length that is dependent on telomerase but not on the alternative homologous recombination pathway or ALT. Human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) reprogrammed from somatic cells show progressive telomere lengthening until reaching a length similar maximum telomere length than ESCs, suggesting that telomere length is regulated by epigenetic mechanisms in human cells. In this regard, hiPSCs acquire telomeric chromatin marks characteristic of an “open chromatin” including increased abundance of telomere transcripts or TERRAs. Telomeres of both hESCs and hiPSCs are well protected during telomere elongation and exhibit stable genomes. Collectively, this study highlights that hiPSCs acquire ESC features during reprogramming and reveals the telomere biology in human pluripotent stem cells (hiPSCs).

ARTICLE HISTORY

Received 25 September 2023
Revised 6 November 2023
Accepted 13 November 2023

KEYWORDS

Telomeres; Telomerase; hESCs; hiPSCs

Introduction

Telomeres consist of tandem repeats of the (TTAGGG)_n sequence at the ends of linear chromosomes, which are essential for genome integrity [1]. A protein complex known as shelterin binds and protects telomeres, preventing chromosome ends from being recognized as DNA breaks by the DNA repair machinery [2]. Telomeres shorten gradually with increasing cell division cycles due to the end replication problem [3]. Telomerase, a eukaryotic ribonucleoprotein (RNP) complex [4], as well as recombination-based alternative lengthening of

telomeres (ALT) are responsible for *de novo* telomere synthesis [5]. These telomere lengthening mechanisms however are only active in certain cell types, such as cancer and pluripotent stem cells [6,7]. In the adult organism, telomerase is absent in most somatic cells with the exception of some activity in the adult stem cell compartments, although this is insufficient to prevent progressive telomere shortening with age [8]. Critically short telomeres eventually trigger a persistent DNA damage response at chromosome ends that leads to cellular senescence or cell death, and impairs stem cell function [6,9].

CONTACT Maria A. Blasco  mblasco@cnio.es  Telomeres and Telomerase Group, Molecular Oncology Program, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, Madrid 28029, Spain

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/15384101.2023.2285551>.

© 2023 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way. The terms on which this article has been published allow the posting of the Accepted Manuscript in a repository by the author(s) or with their consent.

Indeed, mutations in telomere maintenance related genes have been associated with different human diseases known as telomeropathies that include dyskeratosis congenita, aplastic anemia, and idiopathic pulmonary fibrosis [10–12]. In turn, we have shown that longer telomeres owing to telomerase activation in the adult organism result in delayed aging and improved health span [13,14].

Telomeres are enriched in epigenetic marks that are characteristic of heterochromatin. In particular, the telomeric chromatin is enriched in H3K9me3, H4K20me3 and HP1 heterochromatic marks, in agreement with a repressed heterochromatic structure [15–17]. In addition, the DNA of subtelomeric is heavily methylated [18]. These epigenetic marks contribute to a higher order of telomere length regulation, and loss of any of these heterochromatic marks leads to telomere elongation and activation of telomere DNA recombination [15,16,18]. Telomeres can be transcribed into the so-called telomeric RNAs or TERRAs [19,20]. TERRAs bind to telomeres and have an important role in telomere maintenance and protection, as well as facilitate the assembly of the telomeric heterochromatin by recruiting the Polycomb complex [21]. In turn, TERRA transcription is regulated by the status of the telomeric chromatin and a more “open” chromatin results in increased TERRA levels [19].

Telomere length regulation starts as early as during the formation of the oocytes. Telomeres are short in oocytes but are rebuilt during early embryo development until the blastocyst stage by activation of either telomerase or a recombination-based ALT mechanisms. In particular, activation of DNA recombination-based ALT pathway has been described at the cleavage stage and gradually substituted by telomerase-based telomere elongation at the blastocyst stage [22,23]. Thereafter, telomere length is partially maintained at post-implantation stages but telomeres start to gradually shorten after birth [24,25].

We have previously shown that cell derivation and *in vitro* expansion of Embryonic Stem Cells (ESCs) derived from the Inner Cell Mass (ICM) of the blastocyst results in *de novo* telomere elongation reaching a telomere length which is beyond the normal length of the ICM of the species [24].

We reported a similar phenomenon in the establishment of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) [26]. In particular, iPSCs can be derived from somatic cells by the expression of Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc, the so-called Yamanaka factors [27]. IPS cells have been shown to acquire ESC properties, and are able to contribute to mouse embryonic development and the mouse germline [27,28]. We have shown that in the mouse, telomeres are elongated *de novo* in the iPSC in a telomerase-dependent manner, and that this is essential for the genomic stability and pluripotency potential of these cells [26,29]. In particular, mouse ESCs (mESCs) and iPSCs (miPSCs) with longer telomeres show higher efficiency in generating chimeras than those with short telomeres [26,30]. Interestingly, chimeric mice derived from ESCs with hyper-long telomeres, have longer telomeres and less DNA damage in the adult organism, delayed aging and increased longevity, as well as less metabolic aging and less cancer [25,31].

During reprogramming, miPSCs also acquire similar epigenetic marks of ESCs, characterized by a lower density of H3K9me3 and H4K20me3 at telomeres as compared to the parental somatic cells and results in TERRA upregulation [26]. Similar to miPSCs, TERRA level is upregulated in hiPSCs, while the levels of epigenetic marks at telomeres remain unknown [32].

The development of iPSCs has provided a new source of stem cells for the customized transplantation therapies. In the case of humans, hiPSCs have been shown to have longer telomere length compared to parental somatic cells. However, there is a significant variability in telomere length among various hiPSC lines originated from the same tissue or parental cell type [33]. The dynamics of telomere length in hESCs and hiPSCs during long-term *in vitro* expansion has not been well documented. It remains unknown if telomere lengthening of hiPSCs remain stable once reached the length of hESCs or continue to elongate further.

Here, we studied the telomere length in both established hESCs and reprogrammed hiPSCs *in vitro* throughout early and prolonged culture. Our results show that established hESCs have stable telomere length and do not show

progressive telomere elongation, while the hiPSCs progressively lengthen the telomeres to a similar length of ESCs at late passage and then remain stable. Telomeres of hESCs and hiPSCs are well protected during *in vitro* expansion. In addition, the telomeric chromatin of iPSCs reset into a more “open” state with decreased levels of H3K9me3, H4K20me3 and HP1 deposition on telomeres and show increased TERRA transcription. These findings deepen our knowledge on telomere biology in hPSCs and provide evidences for their potential use in regenerative medicine.

Results

Stable telomere length in established ESCs maintained by telomerase

Telomeres are elongated *de novo* in mouse ESCs (mESCs) during their *in vitro* derivation and expansion. Once a maximum telomere length is established, it is maintained throughout later passages [24,25]. To address telomere length dynamics in human ESCs (hESCs), here, we used three independent hES cell lines from the *National Cellular Biobank of Spain* of the lowest possible passages (p8-p10) to study telomere length changes from early to late passages. To this end, we cultured the different hES cells up to passage 40 and measured telomere length every 5 passages by using Southern blot-based telomere restriction analysis (TRF) (Figure S1A) up to passage 40 and every 10 passages by quantitative telomere FISH (Q-FISH) up to passage 30 (Figures S1B, C). None of the three established hES cell lines under study underwent telomere length changes up to passage 40. We confirmed that these hESCs maintained the expression of different pluripotent markers throughout all passages, including NANOG, OCT4, SOX2, and also TRF1, the later previously shown by us to be overexpressed in pluripotent stem cells [34,35] (Figures S2A-B). We also observed expression of the catalytic subunit of telomerase (TERT) at the protein level, as well as presence of telomerase activity (Figures S2A-D). None of the human pluripotent cell lines showed differential expression of different pluripotent markers and activity of telomerase throughout the passages, indicating

that the pluripotency of the hESCs was well maintained during the culture. These results suggest that the maximum telomere length of these hESCs had been achieved before passages 8–10 and then stably maintained by telomerase during the following passages. This notion is in agreement with previous reports showing that telomere elongation only takes place during early expansion [36].

Next, we set to address the mechanisms responsible for telomere length maintenance in the hESCs studied here. First, we assessed the role of telomerase by *knocking down* telomerase expression using lentiviral vectors harboring two independent shRNAs targeting TERT mRNA. Successful *knockdown* of TERT mRNA was confirmed by using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), which was concomitant with decreased telomerase activity as detected by using the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay (Figures S3A, B). A progressive telomere shortening was observed from passage 3 to 8 in hESCs with TERT knockdown (Figure S3C), demonstrating that telomerase is required for telomere length maintenance in established hESCs.

Telomere recombination is another mechanism of telomere elongation, the so-called ALT, which has been shown to be important for telomere lengthening during early embryonic development [5,22]. To address this possibility in hESCs, we studied the presence of a hallmark of ALT, the so-called ALT-associated promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (APB) as well as the frequency of telomere sister chromatid exchanges (T-SCE) by using the chromosome orientation-FISH assay. As a positive control for ALT activation, we used the U2OS cell line, known to maintain telomeres by ALT. hESCs showed significantly fewer APBs compared to U2OS and only few of them were co-localized with telomeres (Figure S3D). In addition, T-SCE events were rare in hESCs compared to U2OS (Figure S3E). Together, these results indicate that telomere maintenance in hESCs is mainly dependent on telomerase, as features of ALT were rare.

Telomere elongation in iPSCs during *in vitro* expansion

iPSCs share similar features with ESCs [27,28]. We showed in the past that telomeres are elongated in

both mouse ESCs and iPSCs with increasing passages [26]. Reprogramming of human somatic cells also results in telomere lengthening [33]. As we did not observe telomere elongation in the four hESCs studied here, we set to address telomere dynamics during *in vitro* expansion of hiPSCs. To this end, we used human BJ fibroblasts for the generation of human iPSCs. To investigate the role of telomerase, we generated BJ fibroblasts that were *knock-out* by CRISPR/cas9 technology for *TERT* and *TERC*, *TERT*^{-/-} and *TERC*^{-/-} respectively (see Material and Methods). Two independent *TERT*^{-/-} clones and one *TERC*^{-/-} clone were obtained. The introduction of frameshift mutations of *TERT* and deletion of the *TERC* were confirmed by DNA sequence analysis (Figures 1a, b). Next, we generated iPSCs by introducing the four Yamanaka factors into wild-type (WT) and telomerase *knock-out* BJ fibroblasts. BJ WT fibroblasts were successfully reprogrammed with the establishment of six independent hiPS clones, while the BJ *TERT*^{-/-} and *TERC*^{-/-} fibroblasts failed to be reprogrammed (Figure 1c).

Next, we addressed whether the established cells were *bona fide* iPSCs. The six established iPSC cell clones formed ES cell-like compacted colonies with high nuclear cytoplasm ratio and were positive for alkaline phosphatase (AP) (Figure 1c). The Yamanaka transgenes were silenced while the endogenous pluripotent markers, OCT4, SOX2 and NANOG were reactivated at RNA (Figure S4A) and protein levels (Figures 1d,e). In addition, *TERT* and *TRF1* were also reactivated and no differences in protein levels were observed among passages (Figures 1d,e).

Finally, we addressed whether telomeres were elongated during *in vitro* expansion of the different hiPSCs. Telomere lengthening was observed in all iPSC clones compared to the parental BJ fibroblasts (Figures 2a,b). Of note, iPSCs at passage 4 had much longer telomeres than BJ fibroblasts, suggesting telomere length was mainly rebuilt during reprogramming. Subsequently, progressive telomere elongation was observed at successive passages until passage 20 from which further expansion did not result in telomere lengthening, suggesting that a maximum telomere length was achieved by that passage. This fully established telomere length of hiPSCs between 8–9 Kb was

comparable to that of the established hESCs studied here (Figure S1A).

Telomerase is reactivated in iPSCs and maintained during *in vitro* expansion

The transcriptional expression of both components of telomerase, the catalytic subunit and the RNA component, *TERT* and *TERC* respectively, was analyzed at different passages in all hiPS clones generated here (Figures 3a,b). *TERC* but not *TERT* expression was detected in BJ fibroblasts (Figures 3a,b). hiPSCs reactivated *TERT* and up-regulated *TERC* expression compared to parental BJ fibroblasts (Figures 3a,b). Of note, *TERT* mRNA expression levels increased with passages with highest mRNA expression level at passage 15, while no differences in *TERC* expression levels were observed at different passages (Figures 3a, b). These results indicate that *TERT* but not *TERC* is the limiting component of telomerase activation during reprogramming. Next, we analyzed telomerase activity in all hiPS clones at different passages. As expected, telomerase was reactivated in all hiPS clones compared to the parental BJ fibroblasts and its activity maintained across different passages (Figure 3c). The six hiPS cell clones showed similar levels of telomerase activity (Figure 3c).

Telomeres are protected and genome stability is maintained in iPSCs

It has been previously described that hPSCs frequently acquire chromosomal abnormalities, including gains or losses of whole chromosomes [37,38]. Thus, we next performed karyotype analysis at both early (p4) and late (p30) passages in the six hiPS cell clones under study. We did not observe chromosomal abnormalities in any of the hiPS cell clones indicating that these clones do not present genomic instability and preserve normal karyotype with passages (Figure S4B), in agreement with the fact that they have a proper telomere maintenance. Next, we asked whether telomeres of hESCs and hiPSCs were well protected during *in vitro* culture as increased DNA damage and dysfunctional telomeres have been reported in mESCs at later passages [25]. To

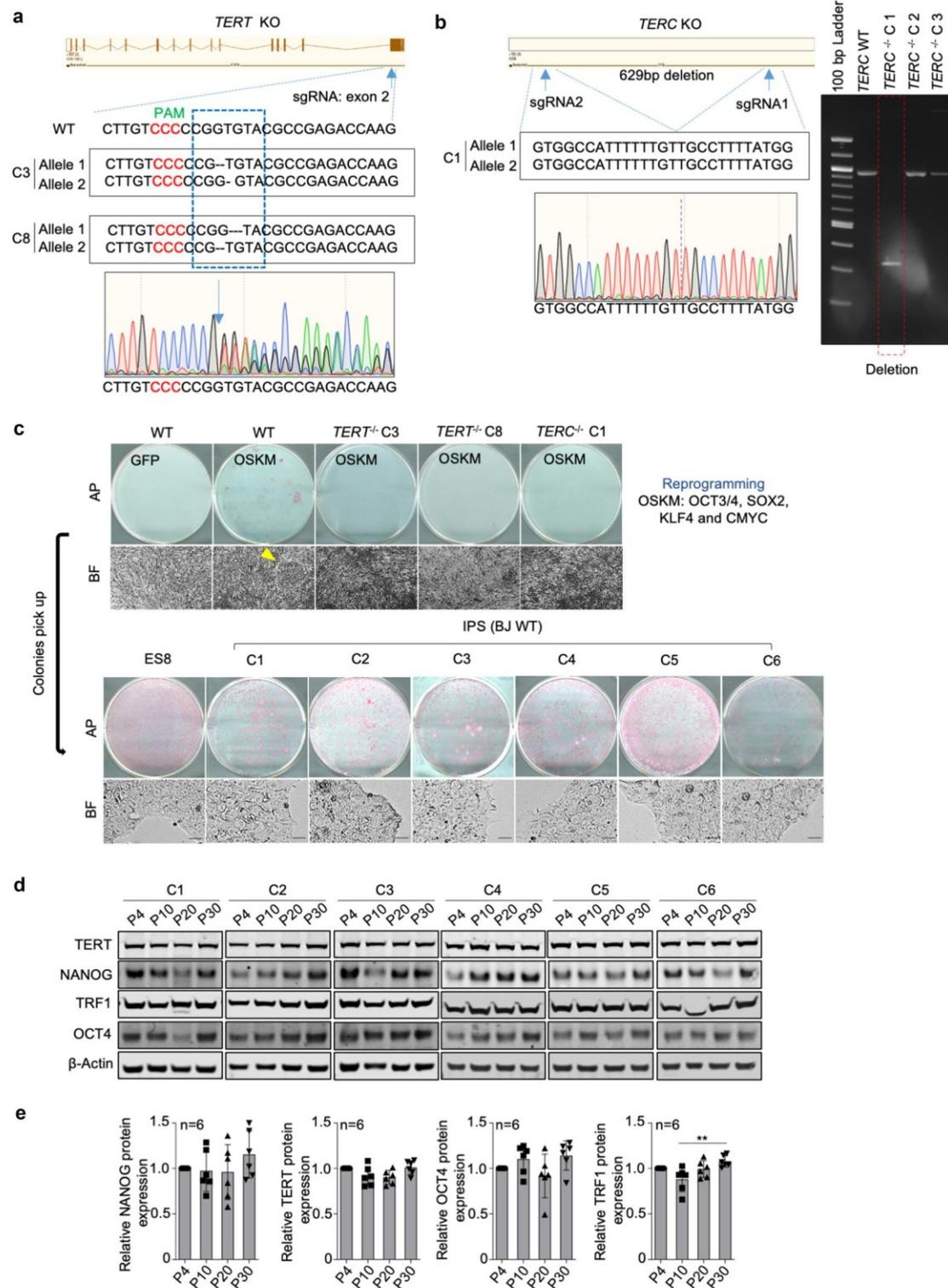


Figure 1. BJ deficient for telomerase fail to be reprogrammed into iPSCs.

a. Generation of *TERT* knock-out BJ fibroblasts by targeting the exon2 of *TERT* using the CRISPR/Cas9 technology. The sequences of BJ clones with successful *TERT* knockout are indicated. b. Generation of *TERC* knock-out BJ fibroblasts. Two sgRNAs flanking *TERC* were designed to delete *TERC*. Sequence of BJ clone with successful *TERC* deletion is indicated. Image of DNA electrophoresis gel showing the successful deletion of *TERC* is shown. c. Reprogramming of BJ fibroblasts with (WT) or without telomerase genes (*TERT*^{-/-}&*TERC*^{-/-}). Representative images of alkaline phosphatase (AP) staining showing iPS colonies are shown. Bright field images showing iPS colonies (yellow arrow) on feeders (top) and iPSCs established on feeder-free culture (bottom). d. Representative images of western blot analyzing NANOG, OCT4, TERT and TRF1 in different iPS clones at indicated passages by western blot. e. Protein level quantification. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. One-way ANOVA was used for statistical analysis. n=number of independent clones.

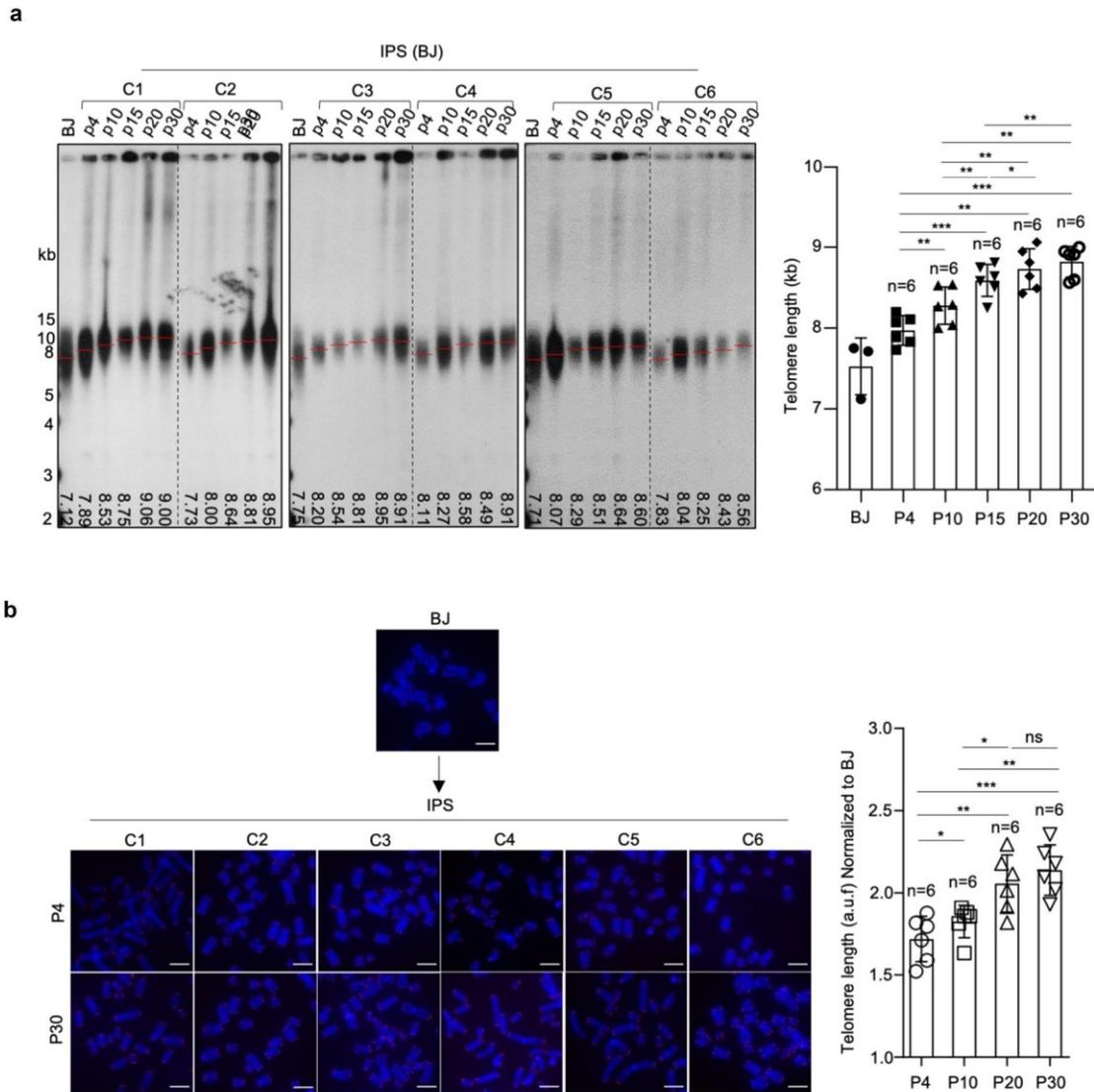


Figure 2. Progressive telomere elongation in reprogrammed hiPSCs.

a. Representative images of telomeric restriction fragment (TRF) blots of parental BJ fibroblasts and hiPS cell clones at different passages. Mean telomere length (Kb) is indicated at the bottom of each lane. Quantification of mean telomere length by TRF analysis of BJ and different iPS clones (C1-C6) at successive passages as indicated. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. Paired t test was used for statistical analysis. n=number of independent clones. b. Representative microscopy Q-FISH images of metaphase spreads of different iPS clones (C1-C6) at passage 4 and 30. Quantification of mean telomere length by Q-FISH analysis of different iPS clones (C1-C6) in arbitrary units of fluorescence (a.u.f.) at successive passages as indicated. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. Paired t test was used for statistical analysis. n=number of independent clones.

check telomeric DNA damage, we performed immunofluorescence for the DNA damage marker 53BP1 together with a quantitative telomeric FISH assay to detect telomeres. Treatment with 6-thio-dG was used as a positive control for telomeric DNA damage as this nucleotide analogue is selectively incorporated into the telomeres generating dysfunctional telomeres [39]. We did not observe increased global DNA damage foci or telomere

induced foci (TIFs) in hESCs and hiPSCs up to passage 40 and passage 30, respectively (Figures 4a-c). In contrast, cells treated with 6-thio-dG showed increased DNA damage foci that colocalized with telomeres (Figures 4a-c). Finally, we checked the presence of chromosome aberrations on metaphase spreads. We did not observe end-to-end telomere fusions or the presence of telomere-signal free ends, aberrations

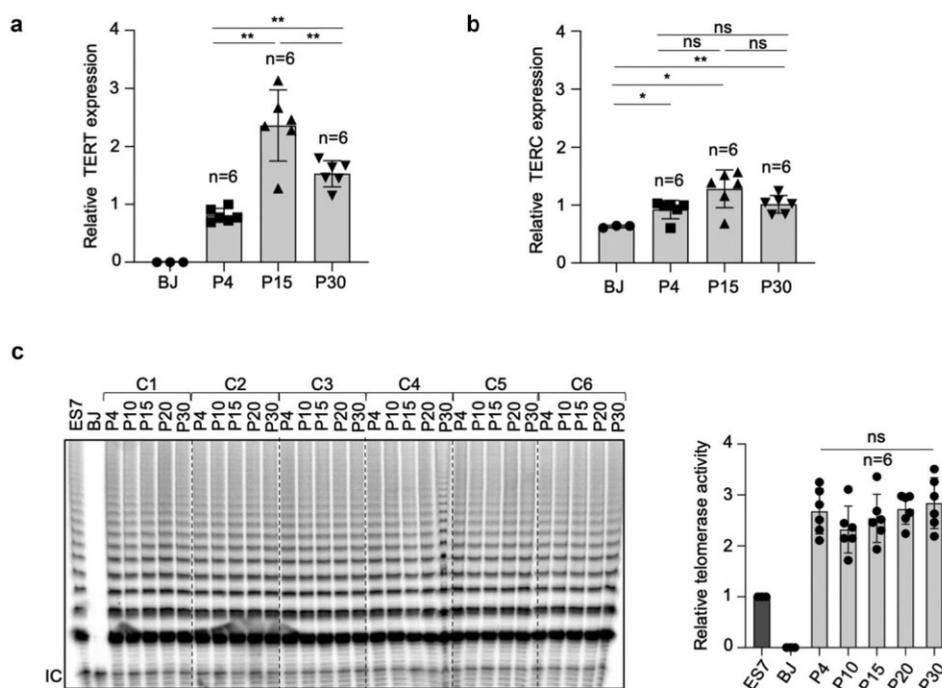


Figure 3. Telomerase is reactivated and maintained in hiPSCs.

a-b. Quantification *TERT* (a) and *TERC* (b) transcription levels by quantitative qPCR in BJ fibroblasts and in reprogrammed iPS clones at different passages. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. Paired t test was used for statistical analysis. n=number of independent clones. c. Representative image of telomeric repeat amplification protocol (TRAP) for telomerase activity in ES, BJ and in iPSCs at different passages. The internal control (IC) was indicated and used for normalization. Quantification of the telomerase activity from the TRAP analysis. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. Paired t test was used for statistical analysis. n=number of independent clones.

commonly observed when telomeres are short or dysfunctional (Figure 4d). Similarly, we did not observe an increase in multitelomeric signals (MTS), indicative of telomere fragility, with accumulative passages (Figure 4d). These results demonstrate that telomeres are well protected during telomere elongation in hiPSCs and that genome stability is well maintained up to passage 30, when maximum telomere length is already reached.

Telomeric chromatin is more “open” and telomere transcription is upregulated in iPSCs

During cells reprogrammed to achieve pluripotency, the telomeres of miPSCs acquire ESC features with decrease abundance of H3K9me3 and H4K20me3 heterochromatic histone marks at telomeres [26]. Thus, we next addressed the abundance of heterochromatin marks and of the TRF2 shelterin protein in hESCs and hiPSCs at different passages during *in vitro* cell expansion. We

observed a decrease of H3K9me3, H4K20me3 and HP1 heterochromatic histone marks at the telomeres of iPSCs compared to the parental BJ fibroblasts by using Chromatin Immune Precipitation (ChIP) analysis (Figures 5a). We also observed a decrease of the TRF2 shelterin protein at telomeres, suggesting a lower density of the shelterin complex in iPSCs compared to BJ fibroblasts (Figures 5a). Of note, the abundance of these heterochromatin marks and of TRF2 in hiPSCs were similar to those detected in hESCs, confirming that hiPSCs acquire ESC features during reprogramming. Of interest, no differences in the density of these marks were found in hiPSCs at the different passages studied here (Figures 5a), again suggesting that these events occurred at earlier passages.

TERRA abundance has been previously shown to correlate with telomere length and to be regulated by the status of telomeric heterochromatin [19]. It has also been shown that TERRA levels are upregulated during reprogramming both in

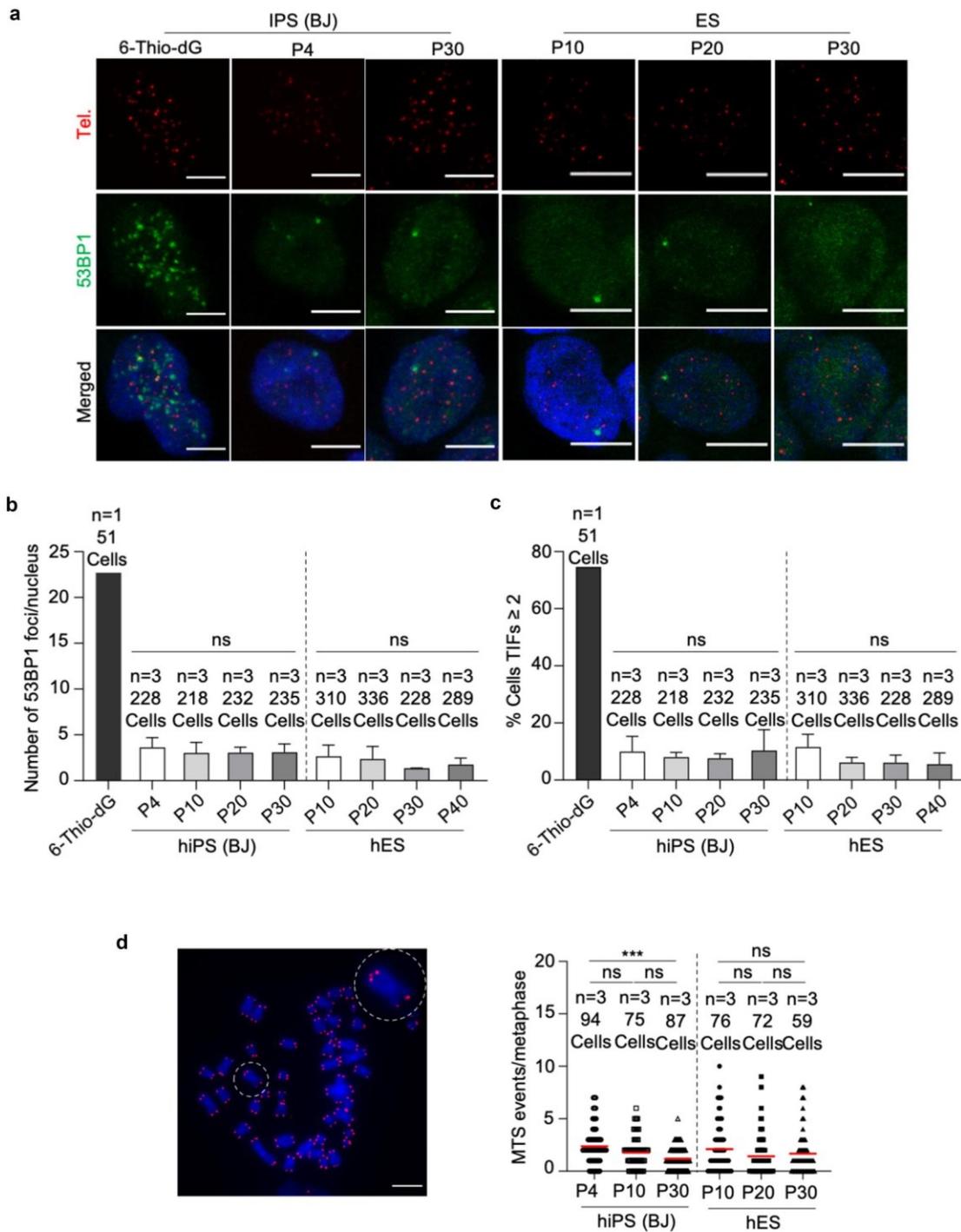


Figure 4. Telomeres of hiPSCs and hESCs are protected and genomically stable throughout successive passages. a. Representative confocal microscopy images of telomere dysfunction induced foci (TIFs) in hiPSCs and hESCs at different passages. Co-localization of 53BP1 with telomere is recognized as a TIF. 6-thio-dG treated cells were used as a positive control. b-c. Quantification of the number of 53BP1 foci per nucleus (b) and percentage of cells with TIFs ≥ 2 (c). d. Representative microscopy images and quantification of multitelomeric signals (MTS) in hESCs and hiPSCs at different passages. Inset represents high magnification image. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. One-way ANOVA was used for statistical analysis. n=number of independent clones.

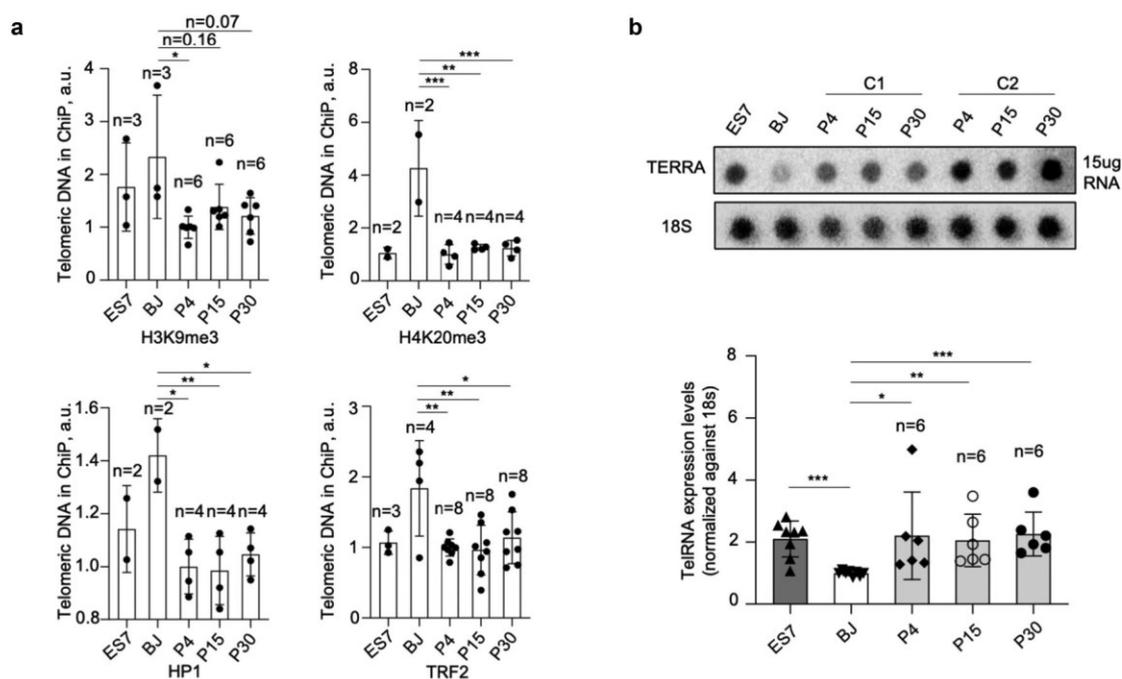


Figure 5. Telomeric chromatin is more “open” and telomeric RNA is upregulated in hiPSCs.

a. Quantification of telomeric DNA pulled down with anti-H3K9me3, H4K20me3, HP1 and TRF2. ChIP values were normalized by the input of each individual sample. One-way ANOVA was used for statistical analysis. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. n=number of independent experiments. Data from two different iPS clones were pooled together. b. Representative image of northern dot blot for TERRA in hES, BJ and hiPS clones 1 and 2 at different passages. Values were normalized against the signal for the 18S ribosomal subunit. One-way ANOVA was used for statistical analysis. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. n=number of independent clones.

mouse and human cells compared to the parental differentiated cells [26,32]. TERRA levels of hiPSCs in comparison to hESCs have not been documented. Here, we studied TERRA levels in six independent hiPS clones at different passages and found that TERRA levels were upregulated in all six hiPS clones compared to the parental BJ fibroblasts. Furthermore, TERRA levels of hiPSCs were similar to that of the hESCs, and TERRA expression did not show differential expression across passages (Figure 5b).

IPSCs with different telomere length show equal efficiency in teratoma formation

In order to address whether telomere length in hiPSCs correlates with differential developmental pluripotency, we performed *in vivo* differentiation assay by checking the teratoma formation. We used iPSCs at passage 4 and at passage 30. iPSCs with different telomere length showed similar teratoma growth rate and tumor weight (Figures 6a–

c). They were also able to differentiate into different cell types including neural epithelium, muscle, adipose and cartilage/bone tissues (Figure 6d). Furthermore, we did not observe any difference in the percentage of ki67, p21 and γ -H2AX positive cells indicating similar cell proliferation, cell cycle arrest and DNA damage burden, respectively (Figures 6e–g). Finally, we checked telomere length in the teratomas, specifically in the neural epithelium cells within the rosette structure (Figure 6h). We found similar telomere length in teratomas originated from iPSCs at passage 4 and from iPSCs at passage 30, indicating that during *in vivo* differentiation telomere length is stabilized.

Discussion

We previously showed that mouse-induced pluripotent stem cells (miPSC) undergo a *de novo* progressive telomerase-dependent telomere elongation which is concomitant with a more “open” telomeric chromatin structure with decreased

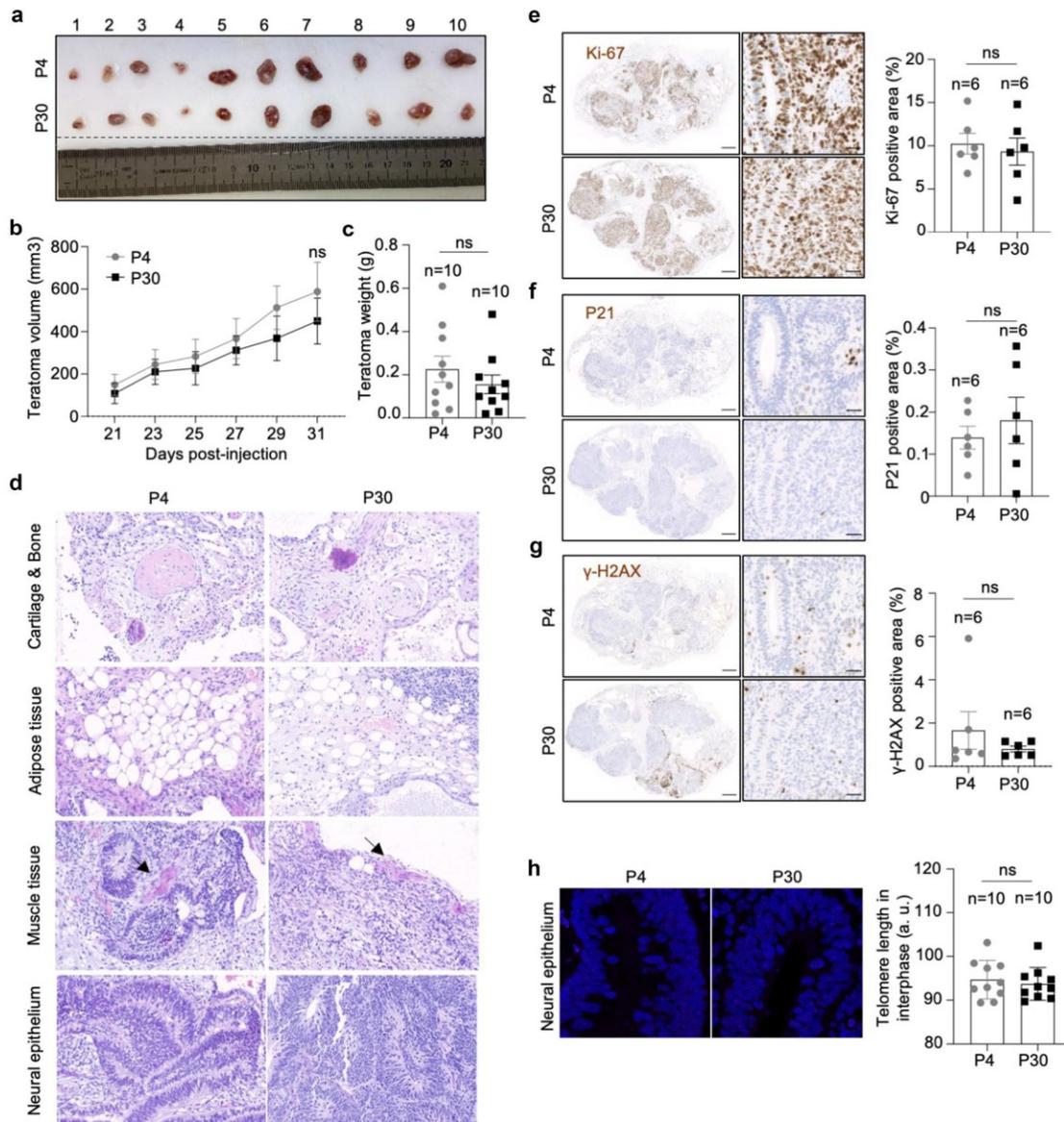


Figure 6. hiPSCs with different telomere length show equal teratoma formation efficiency.

a-b. Representative images of subcutaneous teratomas generated from hiPSCs with different telomere length at passage 4 (P4) and 30 (P30). Numbers indicate different mice. b-c. Teratoma volume follow-up (b) and teratoma weight measured at the human end point (c) in mice injected with hiPSCs at P4 and p30. Bars represent mean values and error bars the standard deviation. Paired t test was used for statistical analysis. n=number of mice. d. Representative images of hematoxylin & eosin staining of teratoma resulting from *in vivo* differentiation assay using hiPSCs at passage 4 and 30. Arrows mark the smooth muscle tissues. e-g. Representative immunohistochemistry images of Ki67 (e), P21 (f) and γ -H2Ax (g) expression in teratoma derived from hiPSCs at passages 4 and 30. Quantification plots are shown to the right. Paired t test was used for statistical analysis. Bars represent mean values and error bars the standard error. n=number of mice. h Representative image of telomeric Q-FISH in the neural epithelium cells of teratoma. Quantification of mean telomere length is shown to the right. a.u.f, arbitrary units of fluorescence. Bars represent mean values and error bars the standard error. Paired t test was used for statistical analysis. n=number of mice.

heterochromatic histone marks and increased telomere transcription [26]. A similar observation was made by us in the case of mouse embryonic stem cells (mESCs) derived from the blastocyst *Inner Cell Mass* (ICM), which also show a progressive

telomere lengthening concomitant with a decrease in telomere heterochromatic marks [24].

Here, we study the dynamics of telomere length and telomere chromatin in human embryonic stem cells (hESC) as well as in human induced

pluripotent stem cells (hiPSC). In particular, we show loss of histone heterochromatic marks (H3K9me3, H4K20me3 and HP1) at telomeres in hiPSCs compared to those of the parental BJ fibroblasts, reaching similar levels as those observed in independent hESCs clones. Furthermore, we show that telomeres are progressively elongated with increasing passages of hiPSCs until reaching a maximum length comparable to that of the previously established hESCs studied here. Importantly, we also show that telomere transcripts or TERRAs are upregulated in hiPSCs to similar levels to those of hESCs.

We failed to observe telomere elongation in hESCs during *in vitro* culture starting from passage 8–10, suggesting that full telomere length had been already established during early passages before passage 8–10. In contrast, in mESCs, telomere length increases until passage 24 and then is maintained until passage 60 [25]. Both human and mouse iPSCs also lengthen their telomeres during and post-reprogramming [26,40,41]. However, while the greatest telomere lengthening in hiPSCs is achieved during reprogramming, in miPSCs the greatest telomere lengthening is observed during post-reprogramming [26], suggesting a more efficient telomere elongation in human cells. In line with this, telomeres of hES/iPSCs are better protected than in mouse as few telomeric DNA damage foci are observed up to passage 40 and 30, respectively. In contrast, a dramatic increase in telomeric DNA damage foci can be observed in mESCs at passage 24 [25]. Finally, we observed that not only telomeric histone heterochromatic marks in hiPSCs can be reprogrammed to acquire similar features as the hESCs, but also the TRF2 shelterin protein is upregulated in hiPSC, something which has not been observed in miPSCs reprogrammed from mouse embryonic fibroblasts [26], and which could explain better telomere protection in the hiPSC compared to the miPSC.

A telomerase-mediated *de novo* telomere elongation has been associated with pluripotency in both iPSCs and ESCs. Furthermore, we have shown that telomerase is essential for the generation of fully functional pluripotent stem cells, as both telomerase-deficient mESCs and miPSCs failed to contribute to chimeras owing to the presence of short telomeres and telomeric DNA

damage [26]. miPSCs with different telomere length acquired during *in vitro* expansion showed differential developmental pluripotency, i.e. the longer the telomere the higher efficiency to generate chimeras [30]. In hESCs, telomere length has been reported to correlate with the expression of pluripotent markers [42]. Here, we did not observe an association between telomere length and the pluripotency of hiPSCs. hiPSCs at different passages with different telomere length show similar levels of pluripotent markers, including NANOG, OCT4, SOX2, and also TRF1. Furthermore, hiPSCs with different telomere length show similar teratoma formation. These results suggest that pluripotency impairment might only be detected when telomeres are either critically short or dysfunctional.

We show here that hESCs use telomerase to elongate and maintain telomeres, and *TERT*-knockout hESCs show progressive telomere shortening [36,43]. Telomere elongation in miPSCs is also mediated by telomerase since miPSCs derived from *TERC*^{-/-} MEF have similar telomere length as the parental wild-type MEF [26]. Here, we successfully generated BJ *TERT*^{-/-} and *TERC*^{-/-}, however we failed to reprogram these cells into iPSCs. In contrast, reprogramming of G1 *TERC*^{-/-} MEFs rendered miPSCs at similar efficiency as the WT MEF, although these miPSCs were not fully functional (Marion et al., 2009a). DNA damage response and activation of *Ink4/Arf* locus in aged parental cells restrict the iPSC cell generation [29,44]. Thus, the failure of reprogramming BJ *TERT*^{-/-} and *TERC*^{-/-} is probably not directly caused by telomerase deficiency itself but rather to BJ *TERT*^{-/-} and *TERC*^{-/-} becoming senescent during the gene editing procedure, limiting the derivation to iPSCs.

Development of iPSCs has provided unprecedented opportunities for regenerative medicine, and telomere status is closely linked to stem cell pluripotency and function. In this work, we have revealed for the first-time telomere dynamics during hiPSCs generation and long-term *in vitro* expansion. We found that hiPSCs lengthened their telomeres at early stages during reprogramming, and progressive acquired similar telomere length as hESCs. Telomere lengthening was concomitant with a decrease in heterochromatic markers at telomeres, and an

increase of telomere transcription. This study expands the knowledge of telomere biology in hiPSCs and expedite the development of cell therapies using hiPSCs.

Experimental procedures

Ethical statement

The hESCs were obtained from the *National Cellular Biobank of Spain*, and the use of the hESCs and hiPSCs were approved by the RESEARCH ETHICS COMMITTEE (CEI PI 48_2021-v2). All three ES cell lines were established from different blastocysts that from different couples. Animal experiments were performed in accordance with the guidelines stated in the International Guiding Principles of Biomedical Research Involving Animals, developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS), and were approved by Ethical Committee (CEIyBA) (PROEX 106.7/20).

Cell culture

hESCs and hiPSCs were maintained on matrigel (Corning)-coated (1:100) plates with mTeSR1 (STEMCELL Technologies). Cells were generally passaged by EDTA (0.5 mM) every 4 days at a ratio of 1:6. BJ human foreskin fibroblasts were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) (population doubling times 23) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplied with 10% of fetal bovine serum (FBS) and 1% (vol/vol) penicillin-streptomycin (Gibco). Cells were grown at 37°C with 5% CO₂ and regularly tested for mycoplasma using the Myco Alert Mycoplasma Detection Kit (Lonza).

Generation of *TERT* and *TERC* knock-out BJ fibroblasts

To knockout *TERT* and *TERC* in BJ fibroblasts, cells were transiently transfected with plasmid pSpCas9 (BB)-2A-GFP (PX458) with different sgRNAs. For *TERT*, one sgRNA was designed to target exon 2 to induce frameshift mutations, while for *TERC*, two sgRNAs were designed to delete the whole gene.

Single cell was sorted by FACS and plated into 96-well plates for monoclonal cell expansion. Once the cells grow out, genomic DNA was isolated using a DNeasy kit (69504, QIAGEN) and different locus fragments were amplified using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (F530L, Thermo Fisher). Sanger sequencing was used to identify the correct clones. Sequence of sgRNAs are listed in Supplementary Table 1.

Generation of hiPSCs

Reprogramming of BJ fibroblasts was done as previously described [28]. In brief, retroviral supernatants were produced by transfecting HEK-293T cells (5×10^6 cells per 100-mm-diameter dish) with the ecotropic packaging plasmid pCL-Ampho (4 µg) together with one of the following retroviral constructs (4 µg): pMXs-hKlf4, pMXs-hSox2, pMXs-hOct4 and pMXs-hc-Myc (Addgene #13370, 13367, 17217, 17220, respectively). BJ fibroblasts (WT, *TERT*^{-/-} and *TERC*^{-/-}) had been seeded the previous day (1×10^5 cells per well of 6-well plate) and received 0.5 ml of each of the corresponding retroviral supernatants. This procedure was repeated every 12 h for 2 days (a total of four rounds of infections). The day after infection was completed, media was replaced by human fibroblast media, and kept for a further 2 days. At day 8, cells were trypsinized and reseeded on feeder plate (CF-1 MEF, 1×10^6 cells per 100-mm-diameter dish). At day 9, medium was changed to hES cell medium. At day 20, colonies with ES-like morphology became visible under the microscope. Colonies were picked after 3 weeks and expanded on feeder fibroblasts using standard procedures or adapted to matrigel-coated plates with mTeSR1.

Generation of *TERT* knockdown hESCs

Lentivirus armed with short hairpin RNA for *TERT* (shTERT, SHCLNG-NM_003219, SIGMA ALDRICH) were packaged and transduced into hESCs. Cells were selected by puromycin (0.5 µg/ml) for 2 days after transduction.

Telomerase activity by TRAP assay

To perform the TRAP analysis, cell lysates were prepared with S-100 lysis buffer as previously described [45]. Protein concentration of the lysates was determined by Bradford assay (Bio-Rad). Cell extracts (50 µg) were incubated with telomeric TS primers for a 60 min initial extension step at 30°C *in vitro*. The extended reaction was subjected to PCR amplification (25 cycle of 30 s at 94°C, 30 s at 59°C, 30 s at 72°C) with the TS primer labeled with 32 P γ -ATP, the 36-bp internal standard control (TSNT) and reverse primers (NT and ACX) for amplification of internal standard control (IC) and telomerase products. The PCR reactions were resolved by 8% polyacrylamide, 7 M urea gel electrophoresis, and the gel was exposed to a phosphor-imager and scanned by a Typhoon scanner. Primer sequences are listed in Supplementary Table 1.

Telomere restriction fragment (TRF) analysis

Cells were harvested and embedded in agarose plugs following digestion with MboI (R0147, New England Biolabs). Telomeres were separated by gel electrophoresis in 0.5 X TBE buffer at 14°C using a CHEF DR-II pulsed-field apparatus (Bio-Rad) for 12 h at a 5 V/cm constant voltage and 5 s constant pulse time. The gel was transferred to nylon membrane (Hybond-XL, GE Healthcare) and probed with a 32P-labeled telomeric probe (TTAGGG)_n (a kind gift from T. de Lange).

Quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) analysis

Paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and fixed with 4% formaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 2 h. To perform Q-FISH on metaphase, ESCs or iPSCs were incubated with 0.1 µg/ml colcemide for 3–4 h. After hypotonic swelling in 0.03 M sodium citrate for 20–30 min at 37°C, cells were fixed in methanol:acetic acid (3:1) and spread onto clean slides. Both tissue sections and metaphase spreads were digested with pepsin/HCl and a second fixation with 4% formaldehyde. Slides were dehydrated with increasing concentrations of EtOH (70%, 90%, 100%) and incubated with

the telomeric C-rich probe (CCCTAA)₃-Cy3 (Panagene, F1002) at 85°C for 3 min followed by 2 h at room temperature in a wet chamber. The slides were extensively washed with 50% formamide and 0.08% TBS-Tween 20. Images of tissue sections were captured by confocal microscopy with a laser-scanning microscope (Leica TSC SP5) using a Plan Apo 63Å-1.40 NA oil immersion objective (HCX). Images of metaphase spreads were captured using microscope Leica DM6B using a 100× oil objective. Telomere length was analyzed using Leica Application Suite X Software.

Immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) analysis

Immunohistochemistry (IHC) was performed on de-paraffined tissue sections with antigen retrieval by 10 mM sodium citrate (pH 6.5) cooked under pressure for 2 min. The staining was performed with primary antibodies against phosphor-Histone H2AX (Ser139) (05–636, Millipore), p21-WAF1/Cip1 (SX118) (M7202, DAKO) and Ki67 (IR626, Dako). Images were analyzed by ZEISS ZEN Microscope Software v2.3 and quantified by ImageJ.

For Immunofluorescence (IF), ESCs and iPSCs were plated in Poly-L-lysine-coated coverslips, fixed 10 min in 4% buffered formaldehyde, following permeabilization with 0.2% PBS-Triton for 10 min and blocked with 5% fetal bovine serum in PBS for 1 h. The staining was performed with primary antibodies, anti-53BP1 (1:500; Novus Biologicals, NB100–304), anti-PML (1:500; Santa Cruz, 966). Secondary antibodies conjugated with 488-Alexa or 555-Alexa were used to detect the binding of the primary antibodies. When indicated, a Q-FISH was performed on IF stained slides fixed with 4% formaldehyde for 20 minutes.

Chromosome orientation fluorescence in situ hybridization (CO-FISH)

Sub-confluent ESCs were incubated with 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma) at the concentration of 10 mM for 12–14 h. Colcemide was added at a concentration of 0.1 µg/ml during the last 3–4 hours, and metaphase spreads were prepared for

telomere Q-FISH. Chromosome slides were treated with RNaseA, fixed with 4% formaldehyde, then stained with Hoechst 33,258 (0.5 mg/ml) for 15 min and exposed to 365 nm UV light for 40 min. The BrdU-substituted DNA was digested with Exonuclease III (Takara). PNA-FISH was performed with telomeric C-rich probe (CCCTAA)₃-Cy3 (Panagene, F1002) and G-rich probe (TTAGGG)₃-Alexa488 (Panagene, F1008). Images were captured using microscope Leica DM6B using a 100× oil objective.

Chromatin immune precipitation (ChIP) assay and telomere dot-blot

ChIP assay was performed as previously described [15] with the following antibodies: 3 µg of anti-H3K9me3 (ab8898, abcam), 3 µg of anti-H4K20me3 (ab9053, abcam), 2 µg of anti-TRF2 (NB110-57130, Novus Biologicals), 5 µg of anti-HP-1γ (05-690, Sigma) and IgG (sc-2025, Santa Cruz Biotechnology). Samples were transferred to a Hybond-N⁺ membrane (Amersham) on a dot blot, and hybridized with the same telomeric probe (TTAGGG)_n used for TRF. The signal was quantified with the ImageJ software. The amount of telomeric DNA in each ChIP was normalized to total telomeric DNA signal.

Western blot analysis

Cells were lysed by Laemmli Sample Buffer. Lysates were boiled at 100°C for 5–10 min and separated in 4–12% SDS-PAGE gels (NuPAGE Invitrogen). After transferring to nitrocellulose membranes (Amersham Protan), blots were blocked and incubated with the indicated primary antibodies. Antibody bindings were detected by incubating with IRDye[®]-Conjugated secondary antibody (LI-COR). The primary antibodies used were anti-TRF1 (1:1000; BED5, Bio-Rad), anti-TERT (1:1000; ab320320, abcam), anti-NANOG (1:1000; Cell Signaling, 4903), anti-OCT4 (1:1000; Cell Signaling, 2750), anti-SOX2 (1:1000; Cell Signaling, 3579), and anti-β-Action (1:500; Santa Cruz 47,778).

Real-time qPCR

Total RNA from cells was extracted with the RNeasy Mini kit (74106, QIAGEN) and reverse transcribed using the iSCRIPT cDNA synthesis kit (1708891, BIO-RAD). Quantitative real-time PCR was performed with the QuantStudio 6 Flex (Applied Biosystems, Life Technologies) using Go-Taq Green Master Mix (M7123, Promega) according to the manufacturer's protocol. Primer sequences can be found in Supplementary Table 1.

Teratoma formation assay

For xenograft experiments, 6-week athymic nude females were purchased from Harlan (Foxn1nu/nu). Mice were maintained at the Spanish National Cancer Centre (CNIO) in accordance with the recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) under specific pathogen-free conditions. Along with those guidelines, mice were monitored in a daily or weekly basis and they sacrificed in CO₂ chambers when the human end-point was considered.

hiPSCs were harvested by EDTA (0.5 mM) and centrifuged. Cell pellets were re-suspended in the mixture of mTeSR1 and Matrigel in a 1:1 ratio. Foxn1nu/nu mice were subcutaneously injected with 2×10^6 cells to dorsal flank of the mice. Tumors were measured every other days. Tumor volume was determined by the following equation: $V = a \cdot b^2$, a and b are length and width respectively. At the human end-point, tumors were dissected, weighted, and fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde. Paraffin-embedded tissue was sliced and stained with hematoxylin and eosin.

Karyotype analysis

Metaphase spreads were prepared for the hiPSCs. Chromosomal G-band analyses were performed at Cytogenetics Unit in Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Spain.

RNA dot-blot

Fifteen ug of total RNA (in 1 mM EDTA, 7% formaldehyde, 6 × SSC – Volume 100 µl) was denatured in a thermocycler at 60°C for 30 min. Denatured RNA was dot-blotted onto 6 × SSC-soaked Hybond-N⁺ membrane (Amersham) and then UV cross-linked. Hybridization was performed with the telomeric probe (TTAGGG)_n. Dot-blot was normalized using 18S probes and quantified using ImageJ software.

Acknowledgements

We thank to Histopathology and Cytogenetics units at CNIO for histology and karyotype analysis, respectively.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

Research in the Blasco lab is funded by Spanish Estate Research Agency, Spanish Ministry of Science and Innovation, cofunded by the European Regional Development Fund (ERDF) (SAF/Retos – MCIN/AEI/10.13039/501100011033, SAF2017-82623-R) (MAB and PM) and the European Research Council (ERC-AdG 2019 Shelterins) (MAB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author contributions

B.Y.M. designed experiments, performed most of the experiments, data analysis and wrote the manuscript. P.M. designed experiments, data curation, methodology and wrote the manuscript. R.S.V. designed experiments and methodology. M.A.B. secured funding, conceived the project, designed experiments, and wrote the manuscript.

Data availability statement

All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

References

- [1] Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*. 2002;21(4):553–563. PubMed PMID: 11850780. doi: 10.1038/sj.onc.1205082
- [2] de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005;19(18):2100–2110. PubMed PMID: 16166375. doi: 10.1101/gad.1346005
- [3] Lingner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science*. 1995;269(5230):1533–1534. PubMed PMID: 7545310. doi: 10.1126/science.7545310
- [4] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405–413. PubMed PMID: 3907856. doi: 10.1016/0092-8674(85)90170-9
- [5] Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, et al. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*. 2000;26(4):447–450. PubMed PMID: 11101843. doi: 10.1038/82586
- [6] Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*. 2007;3(10):640–649. PubMed PMID: 17876321. doi: 10.1038/nchembio.2007.38
- [7] Armanios M, Greider CW. Telomerase and cancer stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:205–208. PubMed PMID: 16869755. doi: 10.1101/sqb.2005.70.030
- [8] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458–460. PubMed PMID: 2342578. doi: 10.1038/345458a0
- [9] Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, et al. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol*. 2012;14(4):355–365. PubMed PMID: 22426077; PubMed Central PMCID: PMC3717580. doi: 10.1038/ncb2466
- [10] Martinez P, Blasco MA. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies. *J Cell Bio*. 2017;216(4):875–887. PubMed PMID: 28254828; PubMed Central PMCID: PMC5379954. doi: 10.1083/jcb.201610111
- [11] Armanios M, Blackburn EH. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet*. 2012;13(10):693–704. PubMed PMID: 22965356; PubMed Central PMCID: PMC3548426. doi: 10.1038/nrg3246
- [12] Wong JM, Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet*. 2003;362(9388):983–988. PubMed PMID: 14511933. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14369-3
- [13] Tomas-Loba A, Flores I, Fernandez-Marcos PJ, et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*. 2008;135(4):609–622. PubMed PMID: 19013273. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.034
- [14] Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med*. 2012;4(8):691–704. PubMed PMID: 22585399; PubMed Central PMCID: PMC3494070. doi: 10.1002/emmm.201200245
- [15] Garcia-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, et al. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian

- cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet.* 2004;36(1):94–99. PubMed PMID: 14702045. doi: 10.1038/ng1278
- [16] Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, et al. Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Bio.* 2007;178(6):925–936. PubMed PMID: 17846168; PubMed Central PMCID: PMCPMC2064618. doi: 10.1083/jcb.200703081
- [17] Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):299–309. PubMed PMID: 17363977. doi: 10.1038/nrg2047
- [18] Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 2006;8(4):416–424. PubMed PMID: 16565708. doi: 10.1038/ncb1386
- [19] Schoeftner S, Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol.* 2008;10(2):228–236. PubMed PMID: 18157120. doi: 10.1038/ncb1685
- [20] Azzalin CM, Reichenbach P, Khoraiuli L, et al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science.* 2007;318(5851):798–801. PubMed PMID: 17916692. doi: 10.1126/science.1147182
- [21] Montero JJ, Lopez-Silanes I, Megias D, et al. TERRA recruitment of polycomb to telomeres is essential for histone trimethylation marks at telomeric heterochromatin. *Nat Commun.* 2018;9(1):1548. PubMed PMID: 29670078; PubMed Central PMCID: PMCPMC5906467. doi: 10.1038/s41467-018-03916-3
- [22] Liu L, Bailey SM, Okuka M, et al. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol.* 2007;9(12):1436–1441. PubMed PMID: 17982445. doi: 10.1038/ncb1664
- [23] Schaezlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, et al. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(21):8034–8038. PubMed PMID: 15148368; PubMed Central PMCID: PMCPMC419552. doi: 10.1073/pnas.0402400101
- [24] Varela E, Schneider RP, Ortega S, et al. Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(37):15207–15212. PubMed PMID: 21873233; PubMed Central PMCID: PMCPMC3174656. doi: 10.1073/pnas.1105414108
- [25] Varela E, Munoz-Lorente MA, Tejera AM, et al. Generation of mice with longer and better preserved telomeres in the absence of genetic manipulations. *Nat Commun.* 2016;7:11739. PubMed PMID: 27252083; PubMed Central PMCID: PMCPMC4895768. doi: 10.1038/ncomms11739
- [26] Marion RM, Strati K, Li H, et al. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2009;4(2):141–154. PubMed PMID: 19200803. doi: 10.1016/j.stem.2008.12.010
- [27] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–676. PubMed PMID: 16904174. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- [28] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861–872. PubMed PMID: 18035408. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
- [29] Marion RM, Strati K, Li H, et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature.* 2009;460(7259):1149–1153. PubMed PMID: 19668189; PubMed Central PMCID: PMCPMC3624089. doi: 10.1038/nature08287
- [30] Huang J, Wang F, Okuka M, et al. Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells. *Cell Res.* 2011;21(5):779–792. PubMed PMID: 21283131; PubMed Central PMCID: PMCPMC3203670. doi: 10.1038/cr.2011.16
- [31] Munoz-Lorente MA, Cano-Martin AC, Blasco MA. Mice with hyper-long telomeres show less metabolic aging and longer lifespans. *Nat Commun.* 2019;10(1):4723. PubMed PMID: 31624261; PubMed Central PMCID: PMCPMC6797762. doi: 10.1038/s41467-019-12664-x
- [32] Yehezkel S, Rebibo-Sabbah A, Segev Y, et al. Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives. *Epigenetics.* 2011;6(1):63–75. PubMed PMID: 20861676; PubMed Central PMCID: PMCPMC3052915. doi: 10.4161/epi.6.1.13390
- [33] Liu L. Linking Telomere Regulation to Stem Cell Pluripotency. *Trends Genet.* 2017;33(1):16–33. PubMed PMID: 27889084. doi: 10.1016/j.tig.2016.10.007
- [34] Schneider RP, Garrobo I, Foronda M, et al. TRF1 is a stem cell marker and is essential for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2013;4:1946. doi: 10.1038/ncomms2946. PubMed PMID: 23735977.
- [35] Marion RM, Montero JJ, Lopez de Silanes I, et al. TERRA regulate the transcriptional landscape of pluripotent cells through TRF1-dependent recruitment of PRC2. *Elife.* 2019;8. PubMed PMID: 31426913; PubMed Central PMCID: PMCPMC6701927. doi: 10.7554/eLife.44656
- [36] Zeng S, Liu L, Sun Y, et al. Telomerase-mediated telomere elongation from human blastocysts to embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2014;127(Pt 4):752–762. PubMed PMID: 24338368. doi: 10.1242/jcs.131433
- [37] Draper JS, Smith K, Gokhale P, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2004;22(1):53–54. PubMed PMID: 14661028. doi: 10.1038/nbt922
- [38] I AK, Andrews PW, Anyfantis G, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol.* 2011;29(12):1132–1144. PubMed PMID: 22119741; PubMed Central PMCID: PMCPMC3454460. doi:10.1038/nbt.2051

- [39] Mender I, Gryaznov S, Dikmen ZG, et al. Induction of telomere dysfunction mediated by the telomerase substrate precursor 6-thio-2'-deoxyguanosine. *Cancer Discov.* 2015;5(1):82–95. PubMed PMID: 25516420; PubMed Central PMCID: PMC4293221. doi: [10.1158/2159-8290.CD-14-0609](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0609)
- [40] Winkler T, Hong SG, Decker JE, et al. Defective telomere elongation and hematopoiesis from telomerase-mutant aplastic anemia iPSCs. *J Clin Invest.* 2013;123(5):1952–1963. PubMed PMID: 23585473; PubMed Central PMCID: PMC3635755. doi: [10.1172/JCI67146](https://doi.org/10.1172/JCI67146)
- [41] Batista LF, Pech MF, Zhong FL, et al. Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;474(7351):399–402. PubMed PMID: 21602826; PubMed Central PMCID: PMC3155806. doi: [10.1038/nature10084](https://doi.org/10.1038/nature10084)
- [42] Wang H, Zhang K, Liu Y, et al. Telomere heterogeneity linked to metabolism and pluripotency state revealed by simultaneous analysis of telomere length and RNA-seq in the same human embryonic stem cell. *BMC Biol.* 2017;15(1):114. PubMed PMID: 29216888; PubMed Central PMCID: PMC5721592. doi: [10.1186/s12915-017-0453-8](https://doi.org/10.1186/s12915-017-0453-8)
- [43] Liu CC, Ma DL, Yan TD, et al. Distinct responses of stem cells to telomere uncapping-A potential strategy to improve the safety of cell therapy. *Stem Cells.* 2016;34(10):2471–2484. PubMed PMID: 27299710. doi: [10.1002/stem.2431](https://doi.org/10.1002/stem.2431)
- [44] Li H, Collado M, Villasante A, et al. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPSC cell reprogramming. *Nature.* 2009;460(7259):1136–1139. PubMed PMID: 19668188; PubMed Central PMCID: PMC3578184. doi: [10.1038/nature08290](https://doi.org/10.1038/nature08290)
- [45] Blasco MA, Lee HW, Hande MP, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 1997;91(1):25–34. PubMed PMID: 9335332. doi: [10.1016/s0092-8674\(01\)80006-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)80006-4)