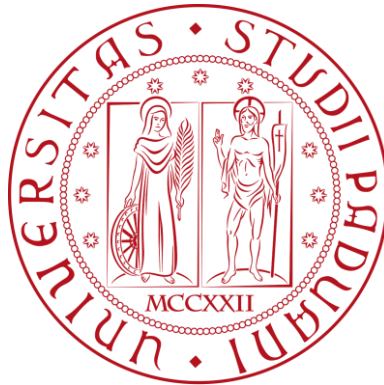


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia molecolare



ELABORATO DI LAUREA

**Ruolo del metabolismo dei nucleotidi nel
mantenimento della lunghezza dei telomeri
umani**

Tutor: Prof.ssa Chiara Rampazzo

Dipartimento di Biologia

Laureando: Manuel Depalma

Anno accademico 2025/2026

Introduzione

La ricerca sui telomeri degli ultimi decenni ha portato allo sviluppo di basi teoriche e sperimentali che hanno permesso di comprenderne la biologia, le patologie correlate e il loro coinvolgimento nei processi di invecchiamento e di oncogenesi.

Nell'articolo "*Metabolic Constraint of Human Telomere Length by Nucleotide Salvage Efficiency*" di Mannherz et al. (2025) oggetto di analisi in questo elaborato vengono analizzate le dinamiche con cui il metabolismo dei deossinucleotidi influenza il mantenimento dei telomeri nelle cellule umane. In particolare, lo studio approfondisce gli effetti delle alterazioni dell'efficienza della via metabolica di recupero delle nucleobasi e dei deossinucleosidi sull'attività della telomerasi. Gli autori hanno adottato un approccio basato sull'uso di tecnologie di editing genomico accoppiate a una metodica di studio dei telomeri da loro appositamente sviluppata, denominata *Telomerase Rapid Assessment in the Cellular Environment* (TRACE). Tale impostazione differisce da quella adottata dalla maggior parte degli studi sui telomeri degli ultimi anni, concentrati principalmente sulla regolazione dell'espressione dei componenti della telomerasi e sui complessi proteici associati ai telomeri. Il lavoro di Mannherz et al. (2025) e altri studi che verranno qui citati segnano una svolta in questo senso, sviluppando un modello di regolazione dell'attività telomerasica strettamente legato al metabolismo dei deossinucleotidi.

Indice

1. Stato dell'arte: basi teoriche	1
1.1 Struttura e funzione dei telomeri e della telomerasi	1
1.2 Il metabolismo deossinucleotidico	2
1.2.1 La via <i>de novo</i>	2
1.2.2 La via di recupero	3
1.2.3 Le vie di degradazione	4
1.3 Ruolo di RNR e SAMHD1 nella regolazione del pool di dNTP intracellulare	6
1.4 Influenza delle alterazioni del pool deossinucleotidico sui telomeri	7
2. Materiali e metodi	8
2.1 Telomerase Rapid Assessment in the Cellular Environment (TRACE)	8
2.2 Terminal Restriction Fragment (TRF) length analysis	10
2.3 <i>Knockout</i> di TERC e di geni metabolici attraverso CRISPR/Cas9	11
2.4 Sovraespressione genica mediata da trasduzione lentivirale	11
2.5 Clonaggio dei vettori di espressione	12
2.6 RT-qPCR e Western blot per il controllo dell'espressione genica	13
2.7 Analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria	14
3. Risultati	15
3.1 Effetto inibitorio dei nucleosidi purinici sulla sintesi telomerica	15
3.2 Il recupero della guanosina e della deossiguanosina mediato da PNP e HGPRT guida l'accorciamento dei telomeri	16
3.3 L'efficienza del recupero della dG mediato dalla dCK e l'attività di SAMHD1 regolano la sintesi telomerica	18
3.4 Incrementare l'efficienza del recupero dei deossinucleosidi favorisce l'allungamento dei telomeri	20
4. Discussione finale	22
Bibliografia	27

1. Stato dell'arte: basi teoriche

1.1 Struttura e funzione dei telomeri e della telomerasi

I telomeri sono regioni di DNA non codificante poste alle estremità dei cromosomi di quasi tutte le specie eucariotiche; nel caso dell'uomo e del topo sono caratterizzati da una lunga sequenza a doppio filamento composta da ripetizioni 5'-TTAGGG-3' e da una corta regione 3'-terminale a singolo filamento (3' *overhang*). Queste sequenze svolgono un ruolo fondamentale proteggendo le estremità dei cromosomi e preservando l'integrità del genoma. Durante la replicazione del DNA, le estremità dei cromosomi vanno incontro ad un progressivo accorciamento causato dall'impossibilità della DNA polimerasi di replicare interamente le porzioni terminali del DNA. I telomeri consentono di limitare le conseguenze di questo fenomeno, preservando le sequenze genomiche funzionali e prevenendo la perdita di informazione genetica essenziale per la cellula. I telomeri non si trovano mai sotto forma di DNA libero, ma sono associati a una serie di proteine che formano uno specifico complesso proteico, chiamato shelterin, la cui funzione è quella di regolarne l'accessibilità alla telomerasi e preservarne l'integrità mascherandoli dalla risposta al danno al DNA (*DNA Damage Response*, DDR).

La telomerasi è un enzima ribonucleoproteico deputato all'allungamento dei telomeri tramite la sintesi di nuove ripetizioni 5'-TTAGGG-3'. Nell'uomo, così come nella maggior parte degli altri metazoi, la telomerasi è espressa prevalentemente nelle cellule della linea germinale e nelle cellule progenitrici, mentre la sua espressione nelle cellule somatiche differenziate è molto limitata o nulla. Questo enzima è costituito da due componenti principali: la trascrittasi inversa TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) e la componente a RNA TERC (*Telomerase RNA Component*). TERC funge da stampo per l'allungamento e nell'uomo prende il nome di hTR (*human Telomerase RNA*). La regolazione dell'attività della telomerasi è un processo complesso e ancora non del tutto chiarito: i modelli attuali prevedono il controllo dell'espressione di *TERT*, il processamento dell'RNA TERC all'estremità 3', l'assemblaggio delle subunità in diversi compartimenti cellulari e il reclutamento ai telomeri attraverso numerose interazioni con le componenti del telosoma [1].

L'accorciamento dei telomeri fino al raggiungimento di una lunghezza critica causa l'attivazione di una risposta al danno al DNA che può portare alla senescenza cellulare. La perdita della funzione della telomerasi accelera questo processo ed è pertanto associata a una ridotta aspettativa di vita e a malattie genetiche degenerative fatali, denominate disturbi della biologia dei telomeri (Telomere Biology Disorders, TBDs) o telomeropatie [2].

1.2 Il metabolismo deossinucleotidico

Il metabolismo dei deossinucleotidi (dNTP) comprende un complesso insieme di vie metaboliche finemente regolate volte alla sintesi, al recupero e alla degradazione dei nucleotidi e dei deossinucleotidi purinici e pirimidinici. Queste molecole sono essenziali per la sopravvivenza cellulare in quanto precursori degli acidi nucleici, mentre i nucleotidi trifosfato (NTP) partecipano ai processi di trasferimento e conservazione dell'energia cellulare. La sintesi dei dNTP può avvenire attraverso due vie anaboliche distinte: la via *de novo* o la via di recupero. La loro degradazione è invece mediata da vie metaboliche più semplici che coinvolgono un numero più limitato di enzimi. Il pool dei dNTP è determinato dall'equilibrio tra le vie di sintesi e le vie cataboliche e raggiunge la massima concentrazione durante la fase S del ciclo cellulare. Durante questa fase la produzione di dNTP raggiunge il suo massimo grazie alla sovraregolazione dell'espressione di diversi geni codificanti per enzimi di sintesi. Al contrario, l'espressione degli enzimi catabolici è indipendente dal ciclo cellulare, sebbene vi siano differenze quantitative tra diversi tipi cellulari. La stabilità genomica delle cellule dei mammiferi è influenzata dal pool di dNTP, affinché venga mantenuta la fedeltà replicativa è infatti richiesta la presenza di quantità adeguate e bilanciate di deossinucleosidi trifosfato [3].

1.2.1 La via *de novo*

La via *de novo* consiste in una serie di reazioni anaboliche che portano alla sintesi dei nucleotidi a partire da precursori metabolici semplici, quali amminoacidi (aspartato e glutammina), anidride carbonica e ribosio-5-fosfato, con un importante consumo di ATP.

La biosintesi delle purine avviene interamente nel citosol e porta inizialmente alla produzione di inosina monofosfato (IMP) tramite la costruzione dell'anello purinico dell'ipoxantina sullo scheletro del fosforibosil pirofosfato (PRPP), ovvero una forma attivata del ribosio che funge da precursore. IMP viene in seguito convertito negli altri nucleotidi purinici: la guanosina monofosfato (GMP) e l'adenosina monofosfato (AMP). La biosintesi delle pirimidine prevede invece la produzione di orotato, un precursore dell'uracile, attraverso un processo mediato sia da enzimi citoplasmatici, sia da enzimi associati alla membrana mitocondriale interna e affacciati nello spazio intermembrana. Una volta prodotto, l'orotato viene trasportato nel citosol e convertito in uridina monofosfato (UMP) tramite reazioni dipendenti dal PRPP. Dall'UMP derivano successivamente gli altri nucleotidi pirimidinici.

La formazione dei nucleosidi monofosfato (NMP) è seguita dalla loro fosforilazione in nucleosidi difosfato (NDP) da parte delle nucleoside monofosfato chinasi (NMPK), che vengono successivamente ridotti a

deossinucleosidi difosfato (dNDP) grazie ad una reazione catalizzata dalla ribonucleotide reduttasi. Segue poi un'ulteriore reazione di fosforilazione mediata dalle nucleoside difosfato chinasi (NDPK), portando alla produzione finale dei dNTP (figura 1.1).

La via *de novo* viene impiegata durante tutte le fasi del ciclo cellulare ma è attiva maggiormente durante la fase S, garantendo così la produzione dei dNTP necessari alla replicazione del DNA. La regolazione della disponibilità dei dNTP è strettamente associata all'attività della RNR (vedi paragrafo 1.3) [3, 4].

1.2.2 La via di recupero

La via di recupero si basa sul riciclo delle nucleobasi e dei nucleosidi derivati dal turnover endogeno degli acidi nucleici e provenienti da fonti extracellulari. Il recupero di queste molecole rende la via molto meno dispendiosa rispetto alla via *de novo*, sia dal punto di vista energetico, sia dal punto di vista del consumo di precursori carboniosi. La fase iniziale della via di recupero prevede che le nucleobasi e i deossinucleosidi vadano incontro, rispettivamente, a singole reazioni fosforibosiltransferasiche o fosforilative, portando alla formazione di NMP e dNMP. Seguono poi processi di fosforilazione e di riduzione dei NDP analoghi a quelli che avvengono a valle della via *de novo* (figura 1.1) [3, 5].

Le fosforibosiltransferasi APRT e HGPRT utilizzano il fosforibosilpirofosfato (PRPP) come donatore del fosforibosio, mentre le chinasi consumano ATP.

Nelle cellule di mammifero, i ribonucleosidi purinici guanosina e inosina non vengono convertiti direttamente nei corrispondenti NMP attraverso una singola reazione fosforilativa ATP-dipendente, ma necessitano di essere prima catabolizzati nelle loro rispettive nucleobasi (guanina, ipoxantina) attraverso una reazione mediata dalla purina nucleoside fosforilasi (PNP). Le nucleobasi pirimidiniche libere (uracile, citosina, timina), inoltre, non possono essere recuperate mediante reazioni catalizzate da fosforibosiltransferasi, rendendo il loro recupero molto meno efficiente rispetto a quello delle nucleobasi puriniche [4].

Nella via di recupero citosolica, la velocità di produzione dei deossinucleotidi è regolata a livello delle reazioni catalizzate dagli enzimi timidina chinasi (TK) e deossicitidina chinasi (dCK). Questi due enzimi sono infatti in grado di fosforilare complessivamente tutti e quattro i deossinucleosidi (dA, dT, dC, dG) a dNMP. La TK1 è quella sottoposta a maggiore controllo: la sua espressione è bassa in fase G1 mentre aumenta significativamente in fase S. Le altre chinasi sono espresse in modo costitutivo, sebbene vi siano prove che la loro attività sia in qualche modo influenzata dallo stato della proliferazione cellulare; esse sono inoltre

sottoposte a un controllo a feedback negativo mediato dai dNTP [3]. La via di recupero mitocondriale è molto simile a quella citosolica ed è mediata da enzimi chinasi differenti ma con funzione analoga a quelli coinvolti nel recupero citosolico: la timidina chinasi 2 (TK2) fosforila i nucleosidi pirimidinici mentre la deossiguanosina chinasi (dGUOK o dGK) recupera i nucleosidi purinici [5].

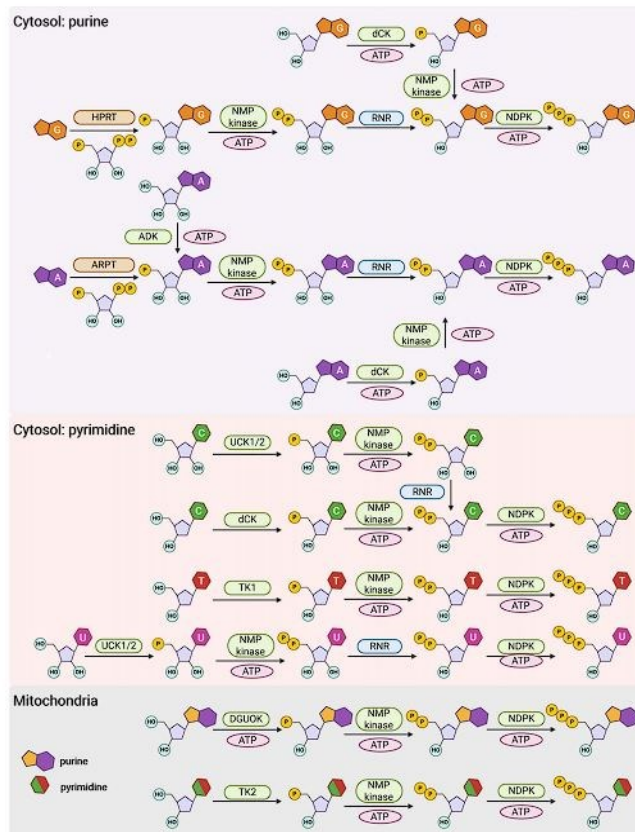


Fig. 1.1 La via di recupero del metabolismo deossinucleotidico (Wang, Pengcheng, et al., 2026). Il recupero citosolico delle purine avviene tramite la reazione di fosforibosilazione delle nucleobasi nei loro corrispettivi NMP mediata dagli enzimi ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi (HGPRT) e adenina fosforibosiltransferasi (APRT), mentre nei mitocondri avviene per fosforilazione dei deossinucleosidi purinici grazie alla deossiguanosina chinasi (dGUOK). Il recupero citosolico delle pirimidine viene eseguito tramite fosforilazione dei nucleosidi e dei deossinucleosidi pirimidinici da parte dei seguenti enzimi chinasi: deossicitidina chinasi (dCK), uridina-citidina chinasi (UCK), timidina chinasi 1 (TK1). Nei mitocondri è presente una forma mitocondriale della timidina chinasi 1 con funzione analoga, denominata TK2. La dCK è particolarmente importante data la sua capacità di fosforilare, oltre alla deossicitidina, anche i deossinucleosidi purinici deossiguanosina (dG) e deossiadenosina (dA), producendo dGMP e dAMP; l'efficienza della reazione di fosforilazione di dG è però notevolmente inferiore nell'uomo. A valle della via vi sono le reazioni di fosforilazione mediate dalle NMPK e dalle NDPK; il recupero dei ribonucleosidi e delle basi necessita inoltre dello step di riduzione mediato dalla RNR.

1.2.3 Le vie di degradazione

La sintesi dei dNMP mediata dalle chinasi viene continuamente bilanciata dalla loro riconversione in deossinucleosidi (dN) da parte di una classe di enzimi catabolici appartenenti alla famiglia delle 5'-deossinucleosidasi (5'dN o 5'NT) (figura 1.2). L'equilibrio dinamico tra le vie anaboliche e cataboliche contribuisce al mantenimento dell'omeostasi del pool dei dNTP. Un aumento delle attività delle vie cataboliche favorisce la conversione dei dNMP a deossinucleosidi che possono essere esportati dalla cellula, con

conseguente diminuzione del pool di dNTP intracellulare; al contrario la prevalenza dei processi anabolici porta a un incremento della loro concentrazione. L'attività delle 5'-deossinucleosidasi è determinata dalla disponibilità dei loro substrati e contribuisce al controllo dei dNTP. A questo sistema di regolazione si aggiunge l'azione di SAMHD1.

Sterile Alpha Motif and HD domain-containing protein 1 (SAMHD1) viene considerato il principale enzima degradativo nel metabolismo dei deossinucleotidi. Si tratta di una dNTP trifosfoidrolasi che degrada i dNTP a deossinucleosidi (dN) e trifosfato inorganico, limitandone così la concentrazione e controllandone le proporzioni (figura 1.2). SAMHD1 è espresso sia in cellule differenziate che in cellule proliferanti, è localizzato nel nucleo ed è sottoposto a regolazione allosterica. In particolare, il legame di specifici dNTP o NTP promuove l'attivazione di SAMHD1, aumentando la capacità dell'enzima di idrolizzare i dNTP [6].

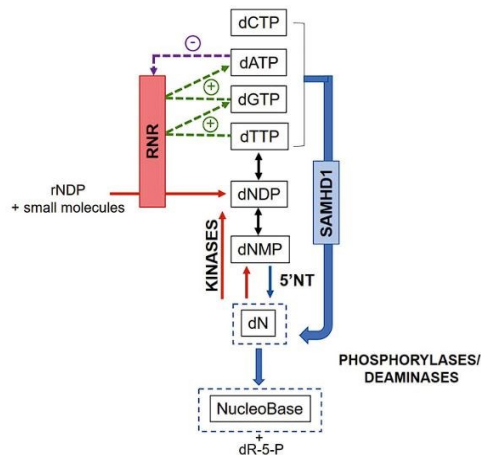


Fig. 1.2 Sintesi e degradazione dei dNTP mediate dagli enzimi RNR e SAMHD1 (Franzolin, Elisa, et al., 2020): i dNTP vengono prodotti nella via *de novo* grazie alla riduzione mediata da RNR e tramite diverse chinasi della via di recupero. RNR è sottoposta ad un doppio controllo allosterico: controllo della specificità e controllo dell'attività. dTTP favorisce la produzione di dGTP, che a sua volta favorisce la produzione di dATP. Il dATP inattiva la RNR in modo generalizzato, rallentando la produzione di ulteriori dNTP. SAMHD1 e le 5'-deossinucleosidasi (5'NT) invece ne contrastano la sintesi, limitando il pool intracellulare.

Un'ulteriore classe di enzimi coinvolti nel catabolismo dei nucleotidi che competono con le vie di sintesi sono le nucleoside fosforilasi. Questi enzimi catalizzano la degradazione dei nucleosidi e dei deossinucleosidi nelle nucleobasi corrispondenti. Due importanti enzimi appartenenti a questa classe sono la purina nucleoside fosforilasi (PNP) e la timidina fosforilasi (TP) [3]. La PNP facilita il turnover dei nucleosidi purinici grazie alla liberazione delle nucleobasi puriniche, le quali possono poi essere

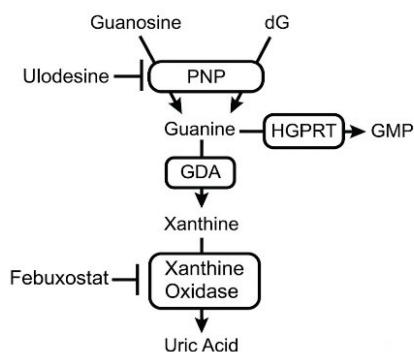


Fig. 1.3 Schema del recupero e del catabolismo dei nucleosidi della guanina (Mannherz, William, et al., 2025): la guanosina e la deossiguanosina vengono degradate dalla PNP, portando alla produzione di guanina, la quale può poi andare incontro a due differenti destini. Il primo consiste nel recupero a GMP tramite l'attività della HGPRT. Il secondo prevede la conversione in xantina mediata dalla guanina deaminasi (GDA), che viene successivamente degradata ad acido urico dalla xantina ossidasi. L'ulodesina e il febuxostat sono due molecole che sono state utilizzate negli esperimenti di Mannherz et al. (2025): la prima è un inibitore della PNP, la seconda inibisce la xantina ossidasi.

recuperate dagli enzimi della via di recupero o degradate ulteriormente, come nel caso della guanina (figura 1.3) [2].

1.3 Ruolo di RNR e SAMHD1 nella regolazione del pool di dNTP intracellulare

Il pool intracellulare dei dNTP è sottoposto a un complesso sistema di regolazione che agisce a diversi livelli delle vie metaboliche di sintesi, recupero e degradazione. Tra gli enzimi che svolgono un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi dei dNTP troviamo la ribonucleotide reduttasi RNR e SAMHD1 (figura 1.2).

RNR catalizza la riduzione dei NDP nei corrispondenti dNDP, che vengono poi ulteriormente fosforilati a dNTP. La forma attiva della RNR umana è un eterotetramero costituito da una coppia di grandi subunità identiche R1 e da una seconda coppia di subunità più piccole che possono essere di due tipi: R2 o p53R2. L'isoforma R1/R2 viene espressa esclusivamente in fase S per garantire la produzione dei dNTP necessari alla replicazione del DNA, mentre viene inattivata alla fine della mitosi tramite la degradazione di R2. L'isoforma R1/p53R2 ha invece espressione costitutiva ed è attiva in tutte le fasi del ciclo cellulare, mantenendo un livello di dNTP basale sufficiente per la riparazione del DNA e per la sintesi del DNA mitocondriale [3]. RNR è un enzima essenziale per la sintesi *de novo* ed è sottoposto a un complesso controllo allosterico da parte dei dNTP grazie alla presenza di due siti distinti: un sito allosterico di specificità e un sito allosterico di attività. Il sito di specificità determina quale substrato viene preferenzialmente ridotto dall'enzima ed è fondamentale per garantire l'equilibrio tra i diversi dNTP:

- L'ATP (e il dATP a basse concentrazioni) favorisce la riduzione dei nucleotidi pirimidinici (CDP e UDP);
- Il dTTP (prodotto a valle del recupero o della sintesi di UDP) stimola la riduzione del GDP, inibendo al contempo quella di CDP e UDP;
- Il dGTP promuove la riduzione dell'ADP, riducendo contemporaneamente la disponibilità dell'enzima per gli altri substrati.

Il sito di attività, invece, regola l'attività complessiva della RNR. Il legame con l'ATP favorisce l'attivazione, mentre il legame con il dATP ne determina l'inibizione.

Nelle cellule di mammifero SAMHD1 ha numerose funzioni biologiche: mantiene l'equilibrio del pool di dNTP durante il ciclo cellulare, agisce come fattore di restrizione nei confronti di HIV1 e di altri lentivirus, è coinvolto nella riparazione del DNA e partecipa alla risoluzione delle forcelle replicative. La

perdita di funzione di SAMHD1 determina l'espansione di tutti e quattro i dNTP, ma in particolare del dATP e del dGTP. L'incremento di dGTP può stimolare ulteriormente la riduzione dell'ADP in dADP da parte di RNR, favorendo di conseguenza l'aumento dei livelli di dATP. L'accumulo di dATP causa l'inibizione della RNR, portando alla deplezione degli altri dNTP e all'arresto della proliferazione cellulare. Lo sbilanciamento del pool di dNTP può inoltre compromettere la fedeltà della replicazione del DNA aumentando la probabilità di incorporazione errata dei nucleotidi, favorendo così l'instabilità genomica. Alterazioni del gene *SAMHD1* sono associate ad alcuni tipi di tumori e alla sindrome di Aicardi-Goutières (AGS): una rara malattia genetica autoinfiammatoria caratterizzata dalla produzione cronica di interferoni di tipo I e da un coinvolgimento prevalentemente neurologico. La perdita di funzione di SAMHD1 altera l'omeostasi dei dNTP causandone un'espansione sbilanciata. Il conseguente stress replicativo favorisce l'accumulo di ssDNA (single-stranded DNA) che attiva la via di segnalazione cGAS-STING inducendo la produzione massiccia di interferoni di tipo I [6].

1.4 Influenza delle alterazioni del pool deossinucleotidico sui telomeri

SAMHD1 può influenzare indirettamente la processività della telomerasi attraverso la regolazione del pool intracellulare dei dNTP. In condizioni fisiologiche, la processività è limitata dall'incorporazione del primo deossinucleotide dGTP di ogni ripetizione 5'-GGTTAG-3'. Un aumento della concentrazione intracellulare di dGTP causato dalla perdita di funzione di SAMHD1 favorisce questo step, provocando uno spiccato aumento della processività della telomerasi e il conseguente aumento dell'allungamento dei telomeri; basse concentrazioni di dGTP hanno invece l'effetto opposto. L'assenza di SAMHD1 causa però, oltre a un aumento della lunghezza dei telomeri, anche un aumento della loro fragilità, favorendo la formazione di strutture aberranti R-loop (Figura 1.4) [7].

L'allungamento dei telomeri umani è sensibile anche alle variazioni del metabolismo della timidina. La perdita di funzione dei geni implicati nella sintesi di dTTP, come *TK1* e *TYMS* (che catalizza la conversione del dUMP in dTMP), può determinare una riduzione della lunghezza dei telomeri, mentre la supplementazione esogena di deossitimidina (dT) ai terreni di coltura delle cellule può favorirne l'allungamento. Il meccanismo alla

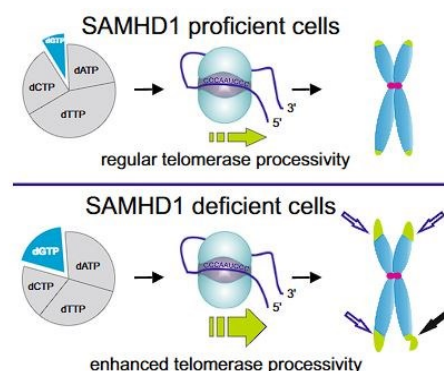


Fig. 1.4 Effetto del deficit e del surplus di SAMHD1 sul pool di dNTP, sulla processività della telomerasi e sulla fragilità dei telomeri (D'Aronco, Giulia, et al., 2023): le frecce blu indicano i telomeri allungati, quelle nere indicano i telomeri fragili.

base di questo fenomeno è fondamentalmente diverso da quello osservato per il dGTP. Il dTTP non sembra aumentare direttamente la processività della telomerasi, ma legandosi al sito di specificità della RNR favorisce la riduzione del GDP e quindi l'aumento del dGTP. È stato inoltre ipotizzato che il dTTP possa modulare direttamente l'attività della telomerasi, anche se questo meccanismo non è ancora stato dimostrato in modo conclusivo [8].

2. Materiali e metodi

La misurazione della lunghezza dei telomeri permette di ricavare una serie di informazioni relative a molti fenomeni biologici, come l'invecchiamento, lo stress ossidativo, la mutagenesi e la suscettibilità a malattie. Le tecniche che possono essere impiegate in tale ambito sono molteplici: dalla PCR quantitativa alla *Terminal Restriction Fragment length analysis* (TRF), fino a quelle più recentemente sviluppate che sfruttano il sequenziamento di nuova generazione (ad esempio *PacBio HiFi* e *Nanopore*), l'utilizzo di sonde fluorescenti e la citometria a flusso (come nella *Flow-FISH*) [9].

Nei paragrafi seguenti di questo capitolo verranno descritte in dettaglio le metodologie utilizzate da Mannherz et al. (2025) per manipolare il metabolismo dei dNTP e per misurare la lunghezza dei telomeri.

2.1 Telomerase Rapid Assessment in the Cellular Environment (TRACE)

Uno dei principali fattori che hanno finora costituito un ostacolo per lo studio degli effetti delle perturbazioni metaboliche sull'attività della telomerasi è stata l'assenza di tecniche di analisi rapide e ad alto rendimento applicabili mantenendo l'ambiente cellulare nativo. I metodi utilizzati fino ad oggi si basano infatti sulla misurazione dei cambiamenti della lunghezza dei telomeri in linee cellulari mantenute in coltura per settimane, oppure sull'analisi *in vitro* di lisati cellulari utilizzando dNTP esogeni e primer, con il conseguente rischio di trascurare importanti meccanismi fisiologici di regolazione della telomerasi. Uno dei punti fondamentali dello studio di Mannherz et al. (2025) risiede nello sviluppo e nell'impiego di un nuovo saggio in grado di superare queste barriere, chiamato *Telomerase Rapid Assessment in the Cellular Environment* (TRACE) (figura 2.1).

La tecnica TRACE permette di studiare la biologia dei telomeri in cellule vive e in tempi rapidi, combinando le tecnologie di editing genomico con la trasfezione di vettori plasmidici di espressione. Per il saggio è stata utilizzata una linea cellulare continua umana HEK-293T *knockout* per il gene *TERC* (vedi paragrafo 2.3), caratterizzata da un'alta efficienza di trasfezione, telomeri corti e assenza dell'attività telomerasica endogena. Nella metodica TRACE queste cellule vengono trasfettate con vettori di

TRACE Assay

(Telomerase Rapid Assessment in the Cellular Environment Assay)

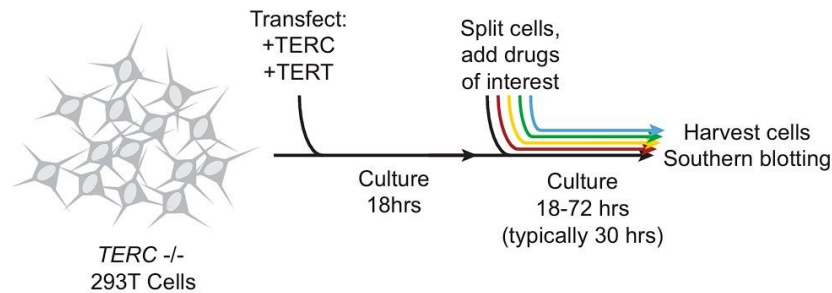


Fig. 2.1. Diagramma del saggio TRACE. Le cellule HEK-293T *TERC*^{-/-} vengono trasfettate con i vettori contenenti i geni *TERC* e *TERT*, portando a sovraespressione della telomerasi, poi vengono coltivate per 18 ore, al termine delle quali vengono suddivise in gruppi sperimentali. Ogni gruppo di cellule viene trattato con molecole specifiche e coltivato per un tempo compreso tra le 18 e le 72 ore (mediamente 30 ore). Si procede infine con l'estrazione del DNA e l'analisi TRF *Southern blot*.

espressione contenenti i geni *TERC* e *TERT*, portando a sovraespressione della telomerasi. Si esegue poi un trattamento con precursori dei deossinucleotidi o con inibitori enzimatici specifici, con lo scopo di determinare l'effetto fisiologico delle perturbazioni del metabolismo dei dNTP sulla sintesi telomerica. Uno dei principali vantaggi della TRACE è la velocità con cui può essere eseguita, dopo sole 48 ore dalla trasfezione è infatti possibile proseguire con l'analisi TRF *Southern blot*.

Il giorno prima della trasfezione le cellule sono state piastrate in una piastra a sei pozzetti a una concentrazione di $0,75 \times 10^6$ cellule per mL di terreno di coltura. Una prima soluzione è stata preparata diluendo 8 μ L di Lipofectamine 2000 in 150 μ L di terreno Opti-MEM privo di siero (Gibco), incubandola poi per 5 minuti. La soluzione plasmidica è stata preparata miscelando 416 ng di vettore pcDNA-3xHA-*TERT* e 2083 ng di vettore pBS-U3-*TERC* in 150 μ L di Opti-MEM. La soluzione contenente i plasmidi è stata combinata con quella contenente la lipofectamina, incubata per 5 minuti e aggiunta infine alle cellule molto delicatamente. Per il controllo negativo si è sostituito il vettore pBS-U3-*TERC* con pMAX-eGFP, che permette l'espressione della proteina fluorescente verde eGFP. Le cellule sono state successivamente mantenute in coltura per 18 ore, poi sono stati eseguiti i trattamenti chimici, aggiungendo al terreno i precursori dei deossinucleotidi o inibitori di specifici enzimi. Dopo un tempo medio di 30 ore, le cellule sono state raccolte in un pellet e conservate a -80 °C fino all'isolamento del DNA e all'analisi TRF.

Per valutare la sensibilità della TRACE alle piccole molecole, gli autori hanno eseguito il saggio dopo aver incubato le cellule con l'inibitore della telomerasi BIBR1532, osservando una diminuzione dose-dipendente della sintesi telomerica. La capacità del saggio di rilevare alterazioni genetiche a carico dei componenti della telomerasi è stata invece confermata mediante trasfezione con vettori di espressione contenenti versioni mutate dei geni

TERT e *TERC*. In questo caso, l'introduzione delle varianti mutate ha determinato una riduzione della sintesi telomerica, confermando la capacità della TRACE di rilevare alterazioni della funzionalità della telomerasi.

2.2 Terminal Restriction Fragment (TRF) length analysis

La *Terminal Restriction Fragment length analysis* (TRF) è la tecnica considerata il *gold standard method* per la misurazione della lunghezza assoluta dei telomeri, per la quale sono disponibili diversi kit commerciali [9].

Il DNA è stato estratto dal pellet cellulare utilizzando il "PureLink Genomic DNA Mini Kit" di Invitrogen, poi una quantità compresa tra 0,5 µg e 3 µg è stata digerita con gli enzimi di restrizione *RsaI* e *Hinfl* per due ore a 37 °C. I frammenti sono stati separati mediante elettroforesi in gel di agarosio allo 0,6% con successivo *Southern blotting* su membrana di nylon Hybond-N+ (Amersham). Per la rilevazione sono state utilizzate le sonde oligonucleotidiche complementari alle ripetizioni telomeriche e marcate con digossigenina (DIG) fornite dal "TeloTAGGG Telomere Length assay Kit" (Roche/Sigma-Aldrich). Il saggio di rilevazione impiegato è basato sulla chemiluminescenza: si utilizza un anticorpo per la digossigenina coniugato all'enzima fosfatasi alcalina che, una volta applicato sulla membrana, defosforila il substrato CDP-Star. La reazione emette luce con un'intensità proporzionale alla quantità totale di DNA telomerico e misurabile attraverso la piattaforma *ChemiDoc Imaging system* (Bio-Rad).

L'analisi dei dati TRF è stata eseguita combinando l'uso dei software WALTER e ImageJ. Il primo consente di stimare la lunghezza mediana assoluta dei telomeri in chilobasi (kb) a partire dall'entità della migrazione delle bande sul gel elettroforetico, mediante confronto con il marcatore di peso molecolare. Il secondo è stato utilizzato per quantificare la sintesi telomerica relativa di ogni campione misurando l'intensità della chemiluminescenza. La quantificazione inizia con il calcolo del rapporto (R) tra il segnale luminoso ottenuto dal DNA con dimensione superiore a 5 Kb (attribuito prevalentemente ai telomeri di nuova sintesi) e quello del DNA di dimensione minore (attribuito al corto DNA telomerico preesistente).

$$R = \frac{\text{Segnale} > 5\text{Kb}}{\text{Segnale} < 5\text{Kb}}$$

Si procede poi all'eliminazione del segnale aspecifico sottraendo dal valore R di ogni campione il valore R ottenuto dalle cellule che esprimono eGFP analizzate sullo stesso blot, ottenendo il valore normalizzato R_b :

$$R_b = R_{\text{campione}} - R_{\text{eGFP}}$$

La sintesi telomerica relativa di ogni campione trattato è stata infine ottenuta dal rapporto tra il suo valore R_b e il valore R_b del campione di controllo non trattato presente sullo stesso blot:

$$\text{Sintesi Relativa} = \frac{R_b (\text{trattato})}{R_b (\text{non trattato})}$$

2.3 Knockout di TERC e di geni metabolici attraverso CRISPR/Cas9

Le procedure di editing genomico sono state svolte con l'impiego del kit *Neon Electroporation* (Thermo Fisher Scientific): 37 pmol di nucleasi Alt-R *S. pyogenes* Cas9 V3 sono stati complessati con 50 pmol di sgRNA specifici per il gene bersaglio, incubandoli a temperatura ambiente per 20 minuti. Alla soluzione sono state aggiunte 200.000 cellule sospese in 20 μ l di *buffer R* (Thermo Fisher Scientific) contenente un potenziatore dell'elettroporazione. L'elettroporazione è stata eseguita tramite il sistema *Neon Transfection* impostando tensione e numero di impulsi differenti per ogni linea cellulare: 1 impulso di 30 ms a 1200 V per HEK-293T, 3 impulsi di 10 ms a 1150 V per K562. L'efficienza dell'editing è stata valutata isolando il DNA genomico dalle cellule almeno 3 giorni dopo l'elettroporazione, amplificando poi il locus target tramite PCR. I prodotti della PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Un'ulteriore verifica è stata effettuata tramite l'analisi dell'espressione genica con RT-qPCR e *Western blot* (vedi paragrafo 2.6). Il locus *AAVS1* è stato scelto come sito bersaglio per il controllo negativo.

2.4 Sovraespressione genica mediata da trasduzione lentivirale

Alcuni degli esperimenti hanno previsto il mantenimento in coltura delle cellule geneticamente modificate per diverse settimane, al fine di valutare nel tempo gli effetti della sovraespressione di specifici geni e della somministrazione di alcune sostanze sulla lunghezza dei telomeri. A tal scopo è stata impiegata la trasduzione mediata da agenti lentivirali.

La produzione dei lentivirus è stata ottenuta mediante trasfezione delle cellule HEK-293T con i vettori psPAX2, pMD2.G e l'appropriato vettore di trasferimento, utilizzando il reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) secondo le istruzioni del produttore. Il terreno di coltura contenente i lentivirus è stato raccolto a due intervalli di tempo differenti: a 48 ore e a 72 ore dalla trasfezione. È stato poi filtrato mediante filtri 0.45 μ M della VWR International e conservato a -80°C fino all'utilizzo.

Le cellule geneticamente modificate appartengono a tre linee cellulari diverse: HEK-293T, K562 e fibroblasti derivanti sia da donatori sani che da pazienti affetti da differenti telomeropatie. I fibroblasti derivanti da pazienti presentano delezioni *TERC*+/- o altre mutazioni patogeniche a carico dei geni *DKC1* e *TINF2*. La trasduzione è stata eseguita per spinfezione a 931

g per 2 ore in un terreno addizionato con solfato di protamina alla concentrazione di 10 µg/mL. Dopo 24 ore dalla rimozione del surnatante contenente i virus, le cellule sono state sottoposte a selezione antibiotica. La selezione è stata eseguita utilizzando blasticidina alla concentrazione di 10 µg/mL per 5-10 giorni o 1 µg/mL di puomicina per 4-7 giorni a seconda del costrutto utilizzato, sfruttando i geni della resistenza integrati nei vettori.

Le cellule HEK-293T e i fibroblasti sono stati trasdotti con il vettore pLX304 per ottenere una sovraespressione costitutiva della deossinucleotide chinasi di *Drosophila melanogaster* (Dm-dNK) sotto il controllo del promotore CMV. Nelle cellule K562, a causa della scarsa tolleranza verso l'espressione costitutiva dell'enzima, è stato integrato un costrutto pCW57.1 modificato e accoppiato a un promotore inducibile dal sistema della doxyciclina. I fibroblasti sono inoltre stati trasdotti con un vettore contenente il gene *TERT*, sempre regolato da un promotore inducibile dalla doxyciclina. L'espressione genica dei sistemi inducibili è stata mantenuta coltivando le cellule in un mezzo contenente doxyciclina alla concentrazione di 1 µg/mL.

2.5 Clonaggio dei vettori di espressione

I costrutti plasmidici destinati all'espressione di varianti di *TERT* mutate e associate a telomeropatie sono stati generati a partire dal vettore pcDNA-3xHA-hTERT; le mutazioni sono state introdotte utilizzando il kit "Q5 Site-Directed Mutagenesis" (New England Biolabs, NEB).

Il costrutto destinato alla sovraespressione della dCK è stato prodotto tramite il clonaggio del cDNA codificante proveniente dalle cellule HEK-293T nel *backbone* pLX304 mediante la metodica di ricombinazione "Gibson assembly", impiegando la miscela enzimatica "NEB HiFi DNA Assembly Mix". L'RNA è stato estratto utilizzando il reagente TRIzol e trattato poi con il "TURBO DNA-free Kit" di Invitrogen; il cDNA è stato sintetizzato utilizzando la trascrittasi inversa SuperScript III (Invitrogen) con inneschi oligo-dT. Il costrutto finale permette l'espressione costitutiva dell'enzima dCK, al quale è fuso al C-terminale un epitopo tag V5 codificato nativamente dal *backbone* pLX304.

La costruzione del vettore per l'espressione costitutiva della deossinucleoside chinasi di *Drosophila melanogaster* (Dm-dNK) guidata dal promotore CMV è stata ottenuta mediante "Gibson assembly", integrando la sequenza codificante dell'enzima isolata a partire dal plasmide stampo pOpen-dromedNK all'interno del *backbone* pLX304. Anche in questo caso, la proteina viene espressa con un tag V5 all'estremità C-terminale.

Il costrutto per la sovraespressione inducibile dalla doxyciclina di Dm-dNK è stato costruito tramite l'escissione dell'inserto comprendente la sequenza Dm-dNK-V5 presente nel costrutto pLX304-Dm-dNK-V5 mediante

digestione con gli enzimi di restrizione *SacI* (NEB) e *Sall* (NEB). Il frammento purificato è stato successivamente inserito in un vettore lentivirale inducibile dalla doxibicilina pCW57.1 precedentemente digerito con le endonucleasi *NheI* (NEB) e *Sall*, sfruttando l'enzima "Quick Ligase" (NEB). La versione di questo vettore resistente alla blasticidina è stata costruita digerendo pCW57.1-Dm-dNK-V5 con le endonucleasi *NotI* e *SpeI*, eseguendo poi la ligazione tra il frammento contenente la cassetta d'espressione di Dm-dNK e il *backbone* pCW57-MCS1-P2A-MCS2 (Blast), anch'esso precedentemente digerito con i due enzimi; la reazione è stata condotta impiegando la medesima ligasi.

I costrutti pLX304-eGFP (utilizzati come controlli negativi di trasfezione e trasduzione) sono stati generati amplificando la sequenza *eGFP* a partire dal vettore pXPR_011 utilizzando primer *attB-flanked*, sfruttando poi la tecnologia di ricombinazione sito-specifica del *Gateway cloning* (Invitrogen) secondo il manuale del produttore. Il costrutto finale permette l'espressione costitutiva della proteina eGFP con un epitopo tag V5 fuso al C-terminale. La corrispettiva variante resistente alla blasticidina è stata prodotta mediante digestione di pLX304-eGFP con *NotI* e *SpeI* e successivo inserimento del frammento codificante nel *backbone* pCW57-MCS1-P2A-MCS2.

La costruzione del vettore di espressione per *eGFP* inducibile dalla doxibicilina ha visto l'inserimento della sequenza codificante la proteina nel vettore pCW57.1, sempre tramite *Gateway cloning*. Infine, la versione resistente alla blasticidina è stata creata digerendo il plasmide pCW57.1-eGFP con gli enzimi *NotI* e *SpeI*, isolando il frammento codificante così ottenuto ed eseguendo la ligazione all'interno del *backbone* pCW57-MCS1-P2A-MCS2, anch'esso preventivamente digerito con le medesime endonucleasi.

Tutte le reazioni di amplificazione tramite PCR necessarie ai processi di clonaggio sono state condotte impiegando la DNA polimerasi Q5 (NEB). La correttezza delle sequenze nucleotidiche inserite è stata verificata mediante sequenziamento Sanger.

2.6 RT-qPCR e Western blot per il controllo dell'espressione genica

L'efficacia delle procedure di *knockout*, trasfezione e trasduzione dei geni di interesse è stata verificata tramite RT-qPCR e *Western blot*.

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule HEK-293T *wild-type* e da quelle *TERC*-/- utilizzando il reagente TRIzol della Thermo Fisher Scientific ed è stato poi trattato con il *Turbo DNase Kit*, così da eliminare eventuali residui di DNA. La sintesi del cDNA è stata eseguita impiegando l'enzima Superscript III Reverse Transcriptase con la tecnica del *random hexamer*

priming (Thermo Fisher). La PCR quantitativa è stata condotta con il kit “SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix” su piattaforma Bio-Rad CFX96 e l'espressione genica relativa è stata calcolata con il metodo standard del $\Delta\Delta Ct$.

L'estrazione delle proteine è stata eseguita lisando le cellule in buffer RIPA (Thermo Fisher) addizionato con una soluzione di diversi inibitori delle proteasi (Roche). Il contenuto proteico dei campioni è stato quantificato utilizzando il saggio DC (detergent compatible) della Bio-Rad. Gli immunoblot volti alla valutazione dei marcatori di danno al DNA sono stati effettuati miscelando 15 µg di proteina con il buffer 2X Laemmli (Bio-Rad), facendola poi migrare su gel SDS tris-glicina al 4-20% (Bio-Rad) e trasferendola infine su una membrana di PVDF (polivinilidene difluoruro). In tutti gli altri casi sono stati utilizzati 20 µg di lisato proteico. Le proteine sono state incubate con anticorpi primari di coniglio (a eccezione della Dm-dNK, per cui è stato utilizzato un anticorpo primario di topo), diluiti di un fattore compreso tra 1:500 e 1:1000. Gli anticorpi primari di coniglio sono stati rilevati utilizzando l'anticorpo secondario di capra coniugato con la perossidasi di rafano prodotto da Abcam (ab6721) a una diluizione di 1:5000. Gli anticorpi primari di topo sono stati rilevati utilizzando l'anticorpo secondario di capra coniugato con perossidasi di rafano prodotto da Invitrogen (31430) a una diluizione di 1:5000. Le membrane sono state visualizzate mediante chemiluminescenza sul sistema di *imaging* ChemiDoc (Bio-Rad).

2.7 Analisi del ciclo cellulare tramite citofluorimetria

La citofluorimetria (o citometria a flusso) è stata utilizzata per accertare che non vi fossero alterazioni del ciclo cellulare delle cellule HEK-293T *TERC*^{-/-} e dei fibroblasti a seguito dei trattamenti chimici. Per ogni condizione di trattamento circa 1×10^6 cellule sono state fissate in etanolo al 70% e colorate con DAPI per quantificare il contenuto di DNA nucleare. Si è poi proseguito con l'analisi citofluorometrica utilizzando l'analizzatore *LSR II* (BD Biosciences), con l'impiego del software FACSDiva. Sono state analizzate 20.000 cellule HEK-293T *TERC*^{-/-} e 10.000 fibroblasti per ogni campione. La popolazione cellulare è stata selezionata mediante *gating* morfologico impostando il *forward scatter* (FSC) rispetto al *side scatter* (SSC). Le regioni di analisi (*gate*) relative alle diverse fasi del ciclo cellulare sono state inizialmente definite su un campione di controllo per ciascun set di dati e successivamente applicate a tutti i campioni utilizzando il software *FlowJo*.

3. Risultati

3.1 Effetto inibitorio dei nucleosidi purinici sulla sintesi telomerica

Le cellule HEK-293T *TERC*^{-/-} sono state suddivise in diversi gruppi sperimentali e trattate per 30 ore con differenti nucleosidi e deossinucleosidi. Nel caso di dG, la concentrazione utilizzata è stata 100 μ M, mentre gli altri composti sono stati aggiunti a una dose di 500 μ M. L'analisi dei dati ottenuti mediante TRF ha evidenziato importanti differenze nella sintesi telomerica indotta dai vari trattamenti. I nucleosidi pirimidinici, in particolare la timidina (dT), hanno incrementato la sintesi telomerica in modo dose-dipendente; al contrario, la supplementazione di nucleosidi purinici ne ha provocato una riduzione, con l'effetto più marcato nelle cellule trattate con riboguanosina (rG) e dG (figura 3.1). Quest'ultimo risultato è stato inaspettato considerato l'effetto attivante del dGTP nei confronti della telomerasi osservato in studi precedenti (vedi paragrafo 1.4). È interessante notare come la dG mostri un effetto inibitorio crescente fino a una dose pari a 100 μ M e come alla dose di 500 μ M questo effetto sia meno marcato (figura 3.2), indicando la presenza di una relazione dose-dipendente e non lineare tra la sintesi telomerica e la supplementazione di dG

Le cellule sono state poi sottoposte a un trattamento con 2,5-dideossiguanosina (2,5ddG), un analogo della dG non fosforilabile dalla deossicitidina chinasi (dCK), allo scopo di verificare se l'inibizione fosse dovuta alla produzione di dGMP. Analogamente a quanto riscontrato a basse dosi di guanosina, è stato osservato un chiaro effetto inibitorio dose-dipendente da parte del 2,5ddG. Gli stessi esiti sono stati ottenuti esponendo le linee cellulari HEK-293T e K562 a guanosina e 2,5ddG per

A

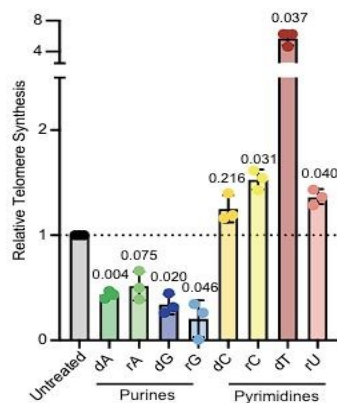


Fig. 3.1 Sintesi telomerica relativa media nelle cellule trattate con differenti nucleosidi e deossinucleosidi. I numeri posizionati sopra le singole barre dell'istogramma rappresentano il *p-value* calcolato rispetto alle cellule non trattate di controllo (*Untreated*). Le barre di errore indicano la deviazione standard.

B

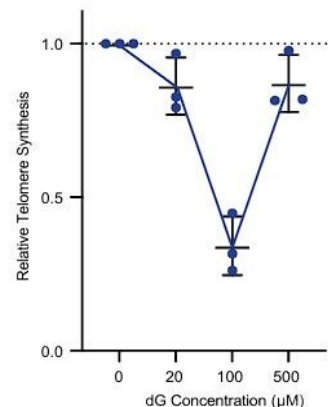


Fig. 3.2 Sintesi telomerica relativa a seguito dei trattamenti a diverse concentrazioni di dG esogena.

21 giorni in presenza di espressione endogena della telomerasi. Questi risultati suggeriscono che la fosforilazione della dG mediata dalla dCK non è responsabile dell'inibizione osservata in seguito al trattamento con dG.

3.2 Il recupero della guanosina e della deossiguanosina mediato da PNP e HGPRT guida l'accorciamento dei telomeri

Dopo aver osservato l'inatteso effetto inibitorio della dG sulla sintesi telomerica, gli autori hanno ripetuto i trattamenti con la dG, con la guanosina e con la guanina in presenza di ulodesina, un inibitore della PNP. Lo scopo era verificare se tale effetto potesse essere abolito inibendo la degradazione della guanosina e della dG ad opera della PNP. La co-somministrazione con ulodesina 1 μM ha ripristinato con successo la sintesi telomerica nei trattamenti con guanosina e dG, mentre la guanina ha mantenuto il suo effetto inibitorio. Il trattamento di controllo con la sola ulodesina non ha provocato alcun effetto (figura 3.3A). Questi esperimenti suggeriscono che la guanina sia la molecola responsabile dell'inibizione della sintesi telomerica e che tale effetto sia dipendente dalla sua concentrazione.

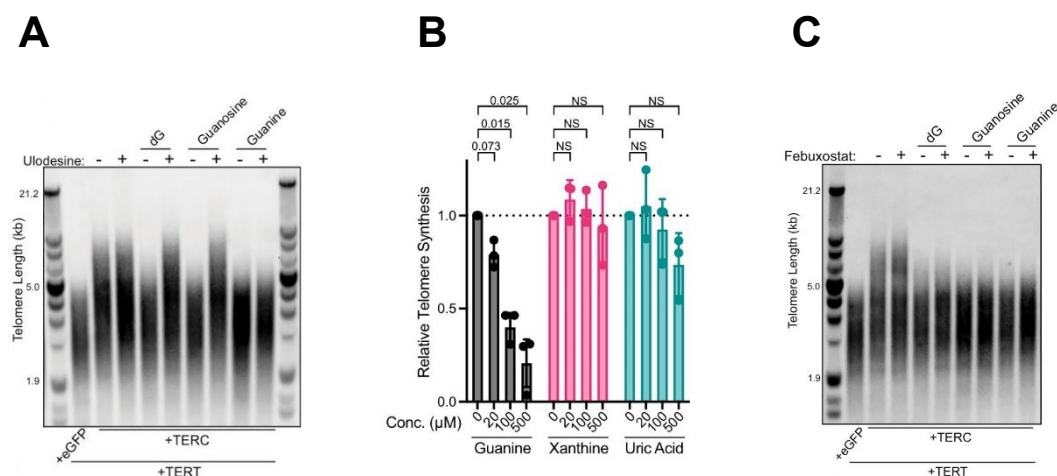


Fig. 3.3 Misurazioni della sintesi telomerica relativa dopo saggio TRACE con i relativi trattamenti. (A) Rimozione dell'effetto inibitorio della dG, della guanosina e della guanina mediante l'applicazione di ulodesina 1 μM . **(B)** Quantificazione del TRF a seguito dei trattamenti con guanina, xantina e acido urico alle dosi indicate. **(C)** Effetto dell'applicazione del febuxostat a una dose pari a 100 μM in presenza di dG, guanosina e guanina. Nelle figure 3.3A e 3.3C i composti sono stati aggiunti alle seguenti dosi: dG 100 μM , guanosina 500 μM , guanina 500 μM .

Gli autori si sono successivamente chiesti se l'effetto inibitorio della guanina fosse dovuto all'accumulo di xantina e acido urico, due composti che vengono prodotti dal suo catabolismo (figura 1.3). A tal fine, sono stati confrontati gli effetti del trattamento diretto con queste tre molecole. La guanina è risultata l'unico composto in grado di inibire fortemente la sintesi telomerica, mentre xantina e acido urico hanno esercitato effetti trascurabili anche a concentrazioni elevate (figura 3.3B). Lo stesso esito è stato raggiunto testando il febuxostat, un inibitore della xantina ossidasi, alla concentrazione 100 μM . Il trattamento non è infatti risultato in grado di

ripristinare la sintesi telomerica nelle cellule trattate con dG, guanosina o guanina (figura 3.3C).

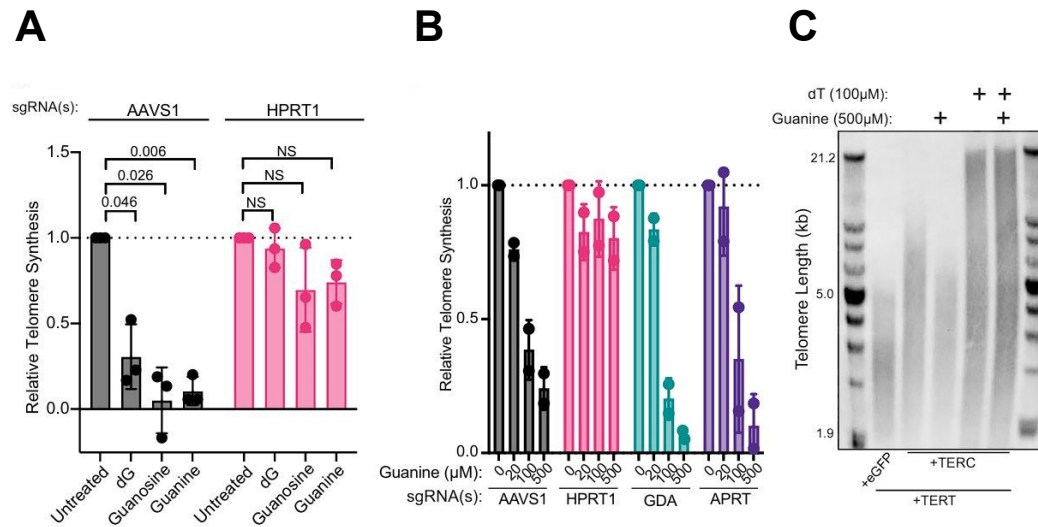


Fig. 3.4 Ripristino dell'attività telomerica a seguito del rallentamento causato dalla guanina. (A) Effetti del silenziamento di *HPRT1* in presenza di dG 100 µM, guanosina 500 µM e guanina 500 µM. **(B)** Confronto degli effetti dei knockout di *HPRT1*, *AAVS1*, *GDA* e *APRT*. **(C)** Ripristino telomerico in presenza di guanina 500 µM tramite somministrazione di dT 100 µM.

L'esperimento successivo è servito a verificare se la guanina dovesse essere recuperata dall'enzima HGPRT per esercitare il suo effetto inibitorio sulla sintesi telomerica. A tal scopo sono state generate cellule HEK-293T *TERC*^{-/-} con il gene *HPRT1* (codificante per HGPRT) inattivato, eseguendo il knockout tramite la tecnologia CRISPR/Cas9; come controllo è stato eseguito il knockout del locus *AAVS1* e dei geni *GDA* (codificante la guanina deaminasi) e *APRT* (codificante l'adenina fosforibosiltransferasi). Il saggio TRACE ha permesso di verificare che l'inattivazione di *HPRT1* abolisce l'inibizione della sintesi telomerica causata dalla guanina, ripristinando così i normali livelli di attività dei controlli (figura 3.4A), mentre il knockout di *GDA* e *APRT* non ha provocato alcun cambiamento rilevante (figura 3.4B). Un analogo recupero della sintesi telomerica è stato osservato aumentando i livelli intracellulari di dTTP tramite la supplementazione di timidina (dT) durante il saggio (figura 3.4C), suggerendo che anche il dTTP è in grado di contrastare l'inibizione mediata dalla guanina. Complessivamente, questi risultati supportano un modello secondo cui la supplementazione di guanina, guanosina o dG porta a un accumulo di GMP intracellulare attraverso l'attività dell'enzima HGPRT. Questo riesce a provocare uno sbilanciamento degli altri dNTP necessari per la sintesi telomerica, con conseguente riduzione dell'allungamento dei telomeri. Il fatto

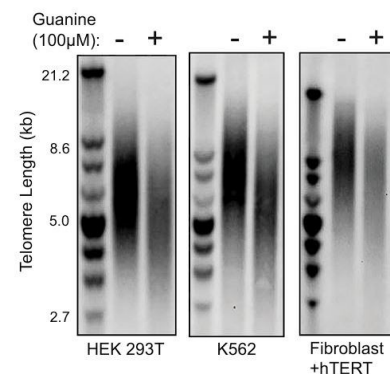


Fig. 3.5 Effetti del trattamento con guanina 100 µM per 21 giorni su cellule esprimenti la telomerasi al normale livello fisiologico

che la guanina eserciti il medesimo effetto in un contesto di espressione endogena della telomerasi (figura 3.5) suggerisce che, nelle cellule umane, l'attività telomerasica sia strettamente dipendente dalla disponibilità e dall'equilibrio dei dNTP.

3.3 L'efficienza del recupero della dG mediato dalla dCK e l'attività di SAMHD1 regolano la sintesi telomerica

I dati riportati in figura 3.2 mostrano come la deossiguanosina eserciti il suo massimo effetto inibitorio quando applicata a una dose di 100 μ M e come tale effetto si attenua a concentrazioni più elevate. Eseguendo il saggio TRACE su un intervallo di concentrazioni superiori gli autori hanno osservato la medesima dinamica; sorprendentemente, è stato rilevato che dosi superiori a 500 μ M possono addirittura potenziare la sintesi dei telomeri rispetto al controllo (figura 3.6A). Ci si è quindi chiesti se questo meccanismo fosse dovuto all'attività di recupero della dG in eccesso a dGTP da parte della dCK, una via che andrebbe a competere con la degradazione svolta dalla PNP. Per rispondere a questa domanda sono stati eseguiti degli esperimenti adottando due diversi approcci volti alla repressione della dCK: inattivazione del gene *DCK* tramite CRISPR/Cas9 e trattamento con l'inibitore enzimatico DI-87 (figura 3.6B). In entrambi i casi l'inattivazione della dCK ha abolito l'effetto stimolante esercitato dalle alte concentrazioni di dG sulla sintesi telomerica. Lo stesso effetto è stato osservato co-trattando le cellule con dC esogena (figura 3.6C). Poiché la dCK presenta un'affinità maggiore per la dC rispetto al dG, la presenza di alte concentrazioni di dC compete con la fosforilazione della dG, riducendo quindi la produzione di dGTP. Il trattamento con solo dC ha causato effetti minimi sulla lunghezza dei telomeri. Complessivamente questi risultati suggeriscono che alte concentrazioni di dG portano alla saturazione della PNP e a una maggiore produzione di dGTP da parte della dCK, portando ad un incremento della sintesi telomerica. Al contrario, a basse concentrazioni la dG viene catabolizzata in guanina dalla PNP e successivamente convertita in GMP dall'HGPRT, provocando la deplezione degli altri dNTP e l'inibizione della sintesi telomerica. Nell'esperimento successivo è stato adottato l'approccio opposto, ovvero sono state generate cellule HEK-293T *TERC*^{-/-} che sovraesprimono il gene *DCK* per verificare se l'incremento dell'attività della dCK potesse essere in grado di potenziare l'attivazione dG-dipendente della telomerasi anche a basse concentrazioni di deossiguanosina. Il saggio TRACE ha mostrato che la sovraespressione di DCK determina un incremento della sintesi telomerica dipendente dalla concentrazione di dG aggiunta, permettendo di evidenziare un effetto marcato anche a basse concentrazioni (figura 3.6D).

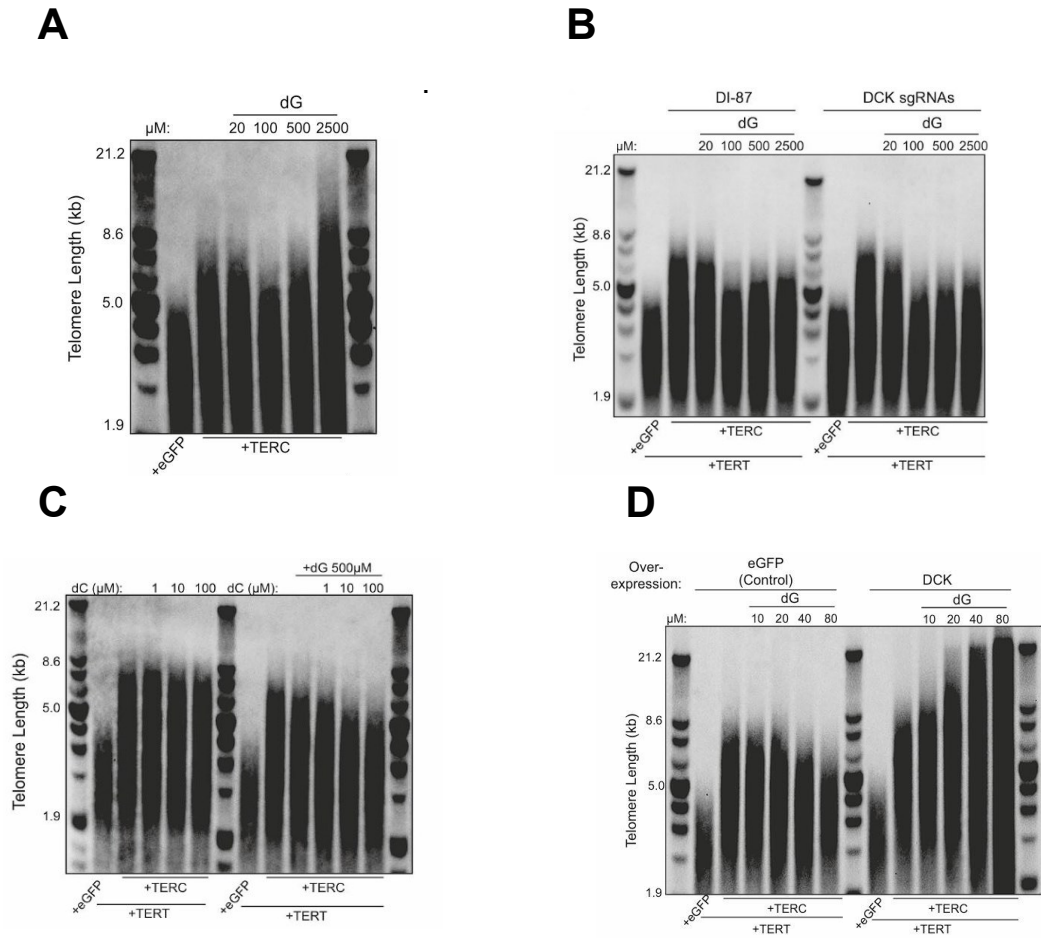


Fig. 3.6 TRF Southern blot dei saggi TRACE nelle condizioni indicate. (A) Trattamento con deossiguanosina a concentrazioni elevate. **(B)** Inibizione della dCK mediante l'applicazione di DI-87 e tramite il knockout di *DCK* (a destra) e successivo trattamento con dG. **(C)** Supplementazione di dC e dG. **(D)** Sovraespressione di *DCK* e somministrazione di dG

Al contrario, le cellule di controllo sovraesprimenti la proteina eGFP hanno mostrato lo stesso effetto inibitorio osservato negli esperimenti precedenti. Nell'insieme, questi risultati suggeriscono che l'efficienza e la modalità di recupero della dG possono essere dei fattori determinanti per la regolazione della sintesi telomerica.

SAMHD1 limita la disponibilità di deossinucleotidi trifosfato, tra cui il dGTP, attraverso la sua attività degradativa, influenzando indirettamente la lunghezza dei telomeri. Gli autori si sono quindi chiesti quali potessero essere gli effetti dell'inattivazione di questo enzima sull'attività telomerica. Utilizzando la tecnologia CRISPR/Cas9, sono state generate cellule HEK-293T TERC^{-/-} prive di SAMHD1 che sono state sottoposte al saggio TRACE. Il trattamento con dG ha causato uno spiccato aumento della sintesi telomerica, in contrasto con l'effetto inibitorio nelle cellule che esprimono SAMHD1 (figura 3.7A), mentre guanina e guanosina hanno indotto un'inibizione simile a quella osservata negli esperimenti precedenti.

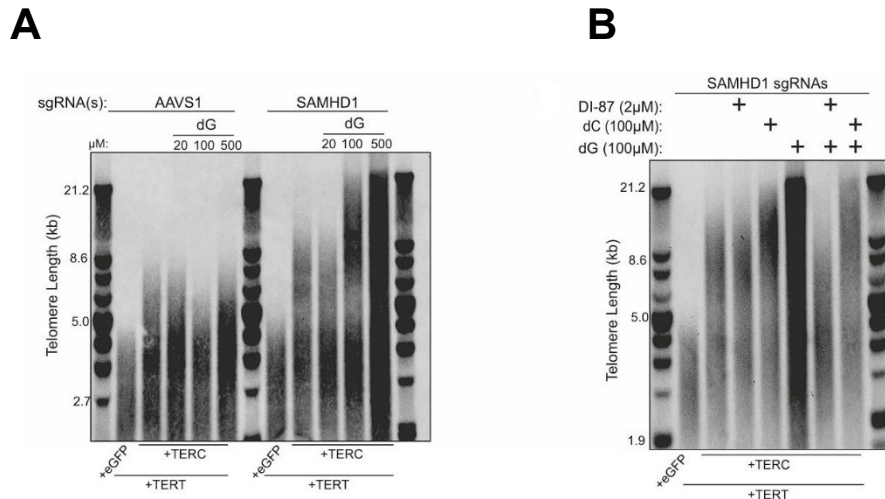


Fig. 3.7 Effetti dell'inattivazione di SAMHD1 sui telomeri di cellule HEK-293T TERC^{-/-}. (A) Trattamento con dG (B) Trattamento con dC, dG e con l'inibitore della dCK DI-87

Questi risultati supportano l'ipotesi che SAMHD1 limiti l'allungamento telomerico attraverso il controllo dell'accumulo netto di dGTP derivante dal recupero della dG, supportando ancora una volta il ruolo dei dNTP nella regolazione della sintesi telomerica. Anche la linea cellulare HEK-293T TERC^{-/-} è stata trattata con DI-87 e dC (figura 3.7B), confermando che l'attivazione della telomerasi dG-dipendente in assenza di SAMHD1 richiede specificamente il recupero di dG mediato dalla dCK.

3.4 Incrementare l'efficienza del recupero dei deossinucleosidi favorisce l'allungamento dei telomeri

La dCK umana recupera la dG in modo inefficiente rispetto a dC, dT e dA; gli autori si sono allora chiesti se una riprogrammazione del metabolismo cellulare volta a potenziare questo processo potesse favorire l'allungamento dei telomeri. Per verificare tale ipotesi sono state generate cellule HEK-293T TERC^{-/-} esprimenti la deossinucleoside chinasi di *Drosophila melanogaster* (Dm-dNK): un enzima caratterizzato da un'ampia specificità di substrato che è in grado di fosforilare dG a una velocità circa otto volte superiore a quella della dCK umana. Quando sottoposte al saggio TRACE in assenza di nucleotidi esogeni, queste cellule hanno mostrato un'attività telomerasica basale superiore rispetto alle cellule di controllo esprimenti eGFP. La supplementazione con dG ha provocato un notevole incremento della sintesi telomerica fino alla concentrazione di 500 μM, mentre i trattamenti con guanosina e guanina hanno continuato a esercitare un effetto inibitorio, coerentemente con la specificità dell'enzima (figura 3.8A). Lo stesso esito è stato ottenuto con cellule HEK-293T e K562 normali (con telomerasi endogene) trasdotte con costrutti contenenti il gene della Dm-dNK e coltivate per 25 giorni (figura 3.8B). Complessivamente, questi risultati suggeriscono che, nelle cellule umane, l'efficienza della via di recupero dei nucleotidi, e in particolare la disponibilità della dG, contribuisca

a regolare la sintesi telomerica e possa essere modulata per favorire l'allungamento dei telomeri.

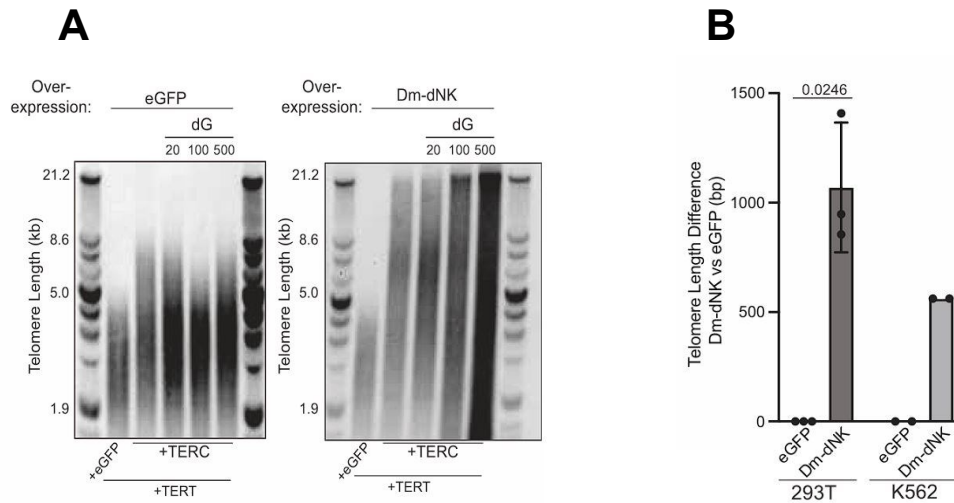


Fig. 3.8 Effetti dell'espressione di Dm-dNK sulla lunghezza telomerica. (A) Confronto tra le cellule HEK-293T *TERC*^{-/-} di controllo esprimenti eGFP e quelle esprimenti la deossinucleoside chinasi di *D. melanogaster* (Dm-dNK). **(B)** Quantificazione della sintesi telomerica nelle cellule HEK-293T e K562 trasdotte con costrutti contenenti il gene della Dm-dNK e coltivate per 25 giorni.

Gli autori hanno allora deciso di indagare se la riprogrammazione metabolica fosse in grado di favorire il recupero della lunghezza dei telomeri in pazienti affetti da telomeropatie. Sono stati impiegati fibroblasti portatori di mutazioni patogeniche a carico dei geni *TERC*, *DKC1* e *TINF2*. Dopo aver confermato la capacità della Dm-dNK di aumentare la lunghezza dei telomeri in colture a lungo termine di fibroblasti umani sani esprimenti stabilmente TERT (figura 3.9A), il gene *Dm-dNK* è stato sovraespresso nelle cellule dei pazienti. Dopo tre settimane in coltura, queste cellule hanno mostrato un aumento della lunghezza dei telomeri nell'ordine delle migliaia di paia di basi rispetto al controllo (figura 3.9B). La PNP converte la dG in

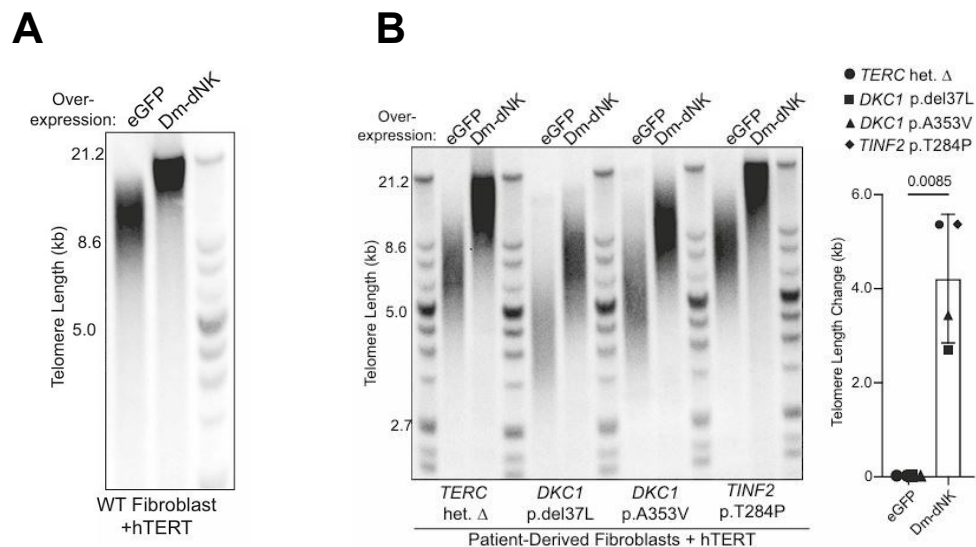


Fig. 3.9 Effetti a lungo termine della sovraespressione di Dm-dNK sui telomeri di fibroblasti sani esprimenti TERT in modo stabile (A) e sui telomeri di fibroblasti derivanti da pazienti affetti da telomeropatie con quattro diversi genotipi patogenici (indicati in figura) (B).

guanina, competendo quindi con il recupero mediato dalla dCK, per cui nell'esperimento successivo i fibroblasti umani sani sono stati mantenuti in coltura per 21 giorni in presenza di ulodesina, così da inibire il catabolismo della dG e favorirne il recupero. Il trattamento con dG e ulodesina ha determinato un marcato allungamento dei telomeri, mentre il trattamento con sola ulodesina non ha provocato alcuna alterazione rilevabile (figura 3.10A). Un effetto analogo è stato rilevato nei fibroblasti derivanti da pazienti affetti da TBD (figura 3.10B): in due dei quattro genotipi analizzati il trattamento ha causato un prolungamento della fase S e una riduzione della loro proliferazione. Nessuna delle colture ha mostrato aumenti dei livelli di pCHK1-S345, suggerendo che l'allungamento dei telomeri osservato nell'esperimento non sia riconducibile all'attivazione di una risposta al danno al DNA. Complessivamente, questi risultati supportano l'ipotesi secondo cui il potenziamento dell'efficienza della via di recupero dei dNTP possa compensare, in parte, gli effetti delle mutazioni a carico di geni coinvolti nel mantenimento dei telomeri, favorendo il recupero della lunghezza telomerica nelle cellule derivate da pazienti affetti da telomeropatie.

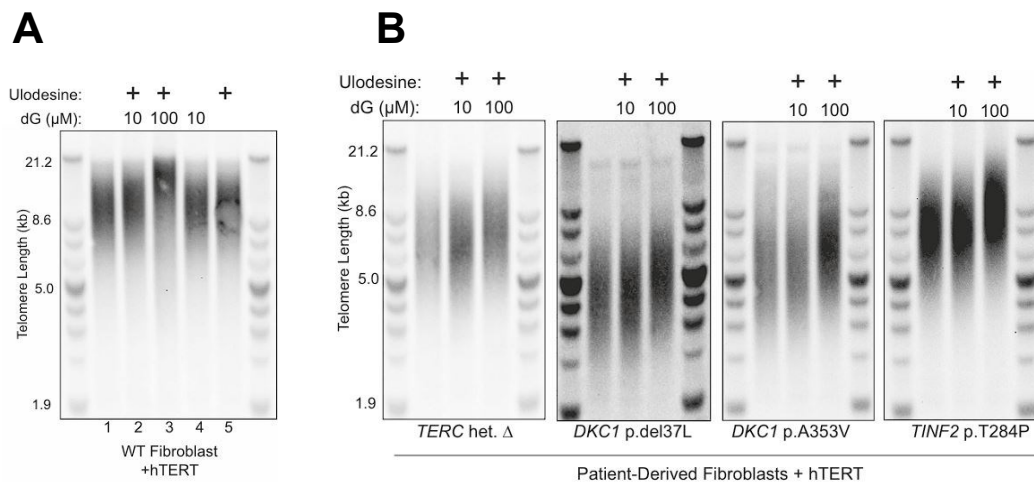


Fig. 3.10 TRF Southern blot dei fibroblasti mantenuti in coltura per 21 giorni in presenza di ulodesina 1 μM e deossiguanosina alle concentrazioni indicate. (A) Fibroblasti derivati da pazienti sani. (B) Fibroblasti derivanti dai pazienti affetti da telomeropatie.

4. Discussione finale

L'articolo preso in esame in questo elaborato analizza il rapporto che intercorre tra il metabolismo dei dNTP e la lunghezza dei telomeri nelle cellule umane, rivelando come la sintesi telomerica sia particolarmente dipendente dai livelli di dGTP, dTTP e dATP. Gli autori si sono concentrati principalmente sullo studio della dipendenza dell'allungamento dei telomeri dall'efficienza del recupero dei dNTP, adottando un approccio basato sull'impiego del saggio TRACE da loro sviluppato affiancato all'analisi TRF

Southern blot. Gli esperimenti hanno evidenziato come l'accumulo dei dNTP svolga un ruolo critico nell'omeostasi della lunghezza dei telomeri, svelando inoltre come le loro concentrazioni siano limitate dall'efficienza del recupero della deossiguanosina (dG) da parte della deossicitidina chinasi (dCK) e dall'efficienza del recupero della timidina (dT) in dTTP catalizzata dalla timidina chinasi 1 (TK1). La sintesi di GMP catalizzata dall'HGPRT sembra invece contribuire allo sbilanciamento del pool intracellulare dei dNTP, con conseguente riduzione della sintesi telomerica. Infine, l'articolo rivela come la dNTP trifosfoidrolasi SAMHD1 limiti l'accumulo dei dNTP e, conseguentemente, l'allungamento dei telomeri. Queste osservazioni hanno portato gli autori a proporre un nuovo modello secondo il quale la lunghezza dei telomeri umani è regolata a tre livelli (figura 4.1):

- Abbondanza della telomerasi: controllata al livello trascrizionale, traduzionale e dell'assemblaggio dell'oloenzima;
- Accessibilità della telomerasi ai telomeri: determinata dalle sue interazioni con le proteine del telosoma;
- Disponibilità e abbondanza relativa dei dNTP: determinata dalla loro sintesi e dall'efficienza del loro recupero.

L'articolo ha messo poi in luce come l'efficienza del recupero mediato dalla dCK possa essere incrementata artificialmente nelle cellule umane tramite la supplementazione di dG o di molecole ad azione farmacologica, come l'ulodesina, oppure tramite la sovraespressione della deossinucleotide chinasi di *Drosophila melanogaster* (Dm-dNK), portando a un robusto aumento nella lunghezza dei telomeri anche in cellule di pazienti affetti da telomeropatie. Questi risultati suggeriscono come le tecniche volte a favorire l'accumulo di dNTP possano potenzialmente rappresentare una strategia terapeutica efficace per aumentare la sintesi telomerica negli individui colpiti da TBD.

Nonostante gli esperimenti evidenzino variazioni significative della sintesi telomerica in risposta ai vari trattamenti, la validità e la rilevanza dei dati ottenuti in questo studio per la caratterizzazione del metabolismo telomerico nelle cellule umane in condizioni fisiologiche devono essere considerate alla luce di alcuni aspetti critici dell'approccio sperimentale. Le concentrazioni di composti impiegate nei trattamenti sono elevate rispetto ai normali livelli intracellulari e altri studi suggeriscono che l'esposizione a livelli eccessivamente alti di deossinucleosidi possa causare uno sbilanciamento del pool di dNTP. Tale alterazione può favorire la misincorporazione dei nucleotidi e compromettere la progressione delle forcelle replicative, fino a

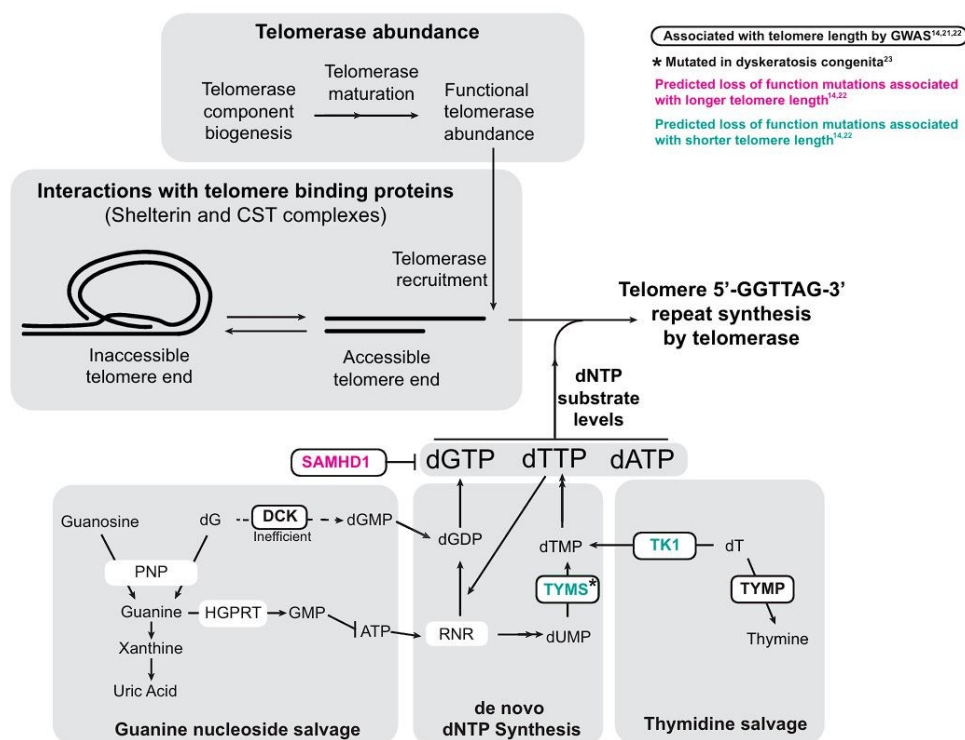


Fig. 4.1 Modello aggiornato della regolazione dell'allungamento dei telomeri. Gli enzimi che presentano l'asterisco si trovano in forma mutata negli individui affetti da discheratosi congenita; la perdita di funzione degli enzimi indicati in rosa è associata a una maggiore lunghezza dei telomeri, mentre quella degli enzimi indicati in verde è associata alla presenza di telomeri di lunghezza inferiore (*Genome-wide association studies*).

determinarne il rallentamento o il blocco durante la replicazione del DNA. Quando lo stress replicativo è troppo elevato possono verificarsi danni cromosomici importanti e, nei casi più gravi, morte cellulare [10]. Lo squilibrio del pool di dNTP può anche portare all'interruzione della replicazione e della riparazione del DNA mitocondriale, con conseguente stress mitocondriale e successiva apoptosi [11]. La deossiguanosina, utilizzata frequentemente nei trattamenti, risulta essere il deossinucleoside con il maggiore potenziale citotossico a causa della sua capacità di determinare un aumento del dGTP intracellulare; l'eccesso di dGTP può infatti alterare l'equilibrio del pool dei dNTP attraverso la regolazione allosterica della RNR [11]. Il *knockout* di *SAMHD1* potrebbe avere ulteriormente alterato l'equilibrio dei dNTP considerando il coinvolgimento dell'enzima nella regolazione dei loro livelli intracellulari. A tal proposito, gli autori non hanno mai effettuato delle misurazioni dei reali livelli dei diversi dNTP e si sono invece basati su alcune deduzioni logiche indirette osservando i risultati dei trattamenti nei vari esperimenti. Inoltre, le elevate concentrazioni dei composti potrebbero aver indotto uno stress metabolico generale, con effetti indiretti sulla lunghezza dei telomeri. Questa complessità sperimentale potrebbe contribuire a spiegare l'elevata eterogeneità delle lunghezze telomeriche misurate con il TRF *Southern blot*, che si manifesta sul gel di agarosio come dei lunghi *smear*. Tale

distribuzione rende complessa l'analisi e ha richiesto agli autori l'impiego di una procedura di analisi piuttosto laboriosa per ricavarne la lunghezza media.

Il secondo fattore che allontana il sistema sperimentale dalle condizioni cellulari fisiologiche è rappresentato dalla trasfezione di vettori di espressione contenenti i geni TERT e TERC. Questa procedura porta a un'elevata espressione della telomerasi, rendendola artificialmente molto abbondante. La maggior parte degli esperimenti è stata condotta utilizzando cellule TERC^{-/-} HEK-293T, che non rappresentano la fisiologia di una normale cellula umana. Tale linea cellulare è infatti immortalizzata, trasformata ed è stata geneticamente modificata per perdere *TERC*. Analogamente questa considerazione vale anche per la linea K562, costituita da cellule neoplastiche con numerose alterazioni genetiche e metaboliche. In questo contesto, un impiego maggiore dei fibroblasti nei diversi esperimenti avrebbe potuto aumentare la rappresentatività dei risultati rispetto alle condizioni fisiologiche delle cellule umane.

La modalità con cui le misurazioni e la quantificazione della lunghezza telomerica sono state effettuate rappresenta un ulteriore punto critico dell'articolo. Gli autori si sono limitati a utilizzare un solo metodo che, nonostante rappresenti il gold standard per la misurazione della lunghezza assoluta dei telomeri, avrebbe fornito risultati più affidabili se affiancato ad almeno una delle tecniche di misurazione alternative disponibili. La verifica dei dati TRF poteva essere eseguita, per esempio, mediante PCR quantitativa (qPCR), la quale fornisce una stima della lunghezza media dei telomeri della popolazione cellulare analizzata, oppure attraverso l'impiego della Q-FISH, che è in grado di fornire informazioni riguardanti i telomeri al livello di ogni singolo cromosoma [9]. L'articolo manca anche di una caratterizzazione approfondita delle sequenze telomeriche di nuova sintesi volta a verificare la fedeltà replicativa della telomerasi, per esempio attraverso sequenziamento di nuova generazione (come *PacBio HiFi*).

Nell'articolo viene utilizzato il termine "attività telomerica", sebbene l'analisi TRF utilizzata negli esperimenti consenta di misurare esclusivamente la distribuzione delle lunghezze dei telomeri e, nel contesto del saggio TRACE, di ricavare un indice di sintesi telomerica. La capacità delle cellule di sintetizzare DNA telomerico è influenzata da diversi fattori: quantità di telomerasi disponibile, accessibilità dei telomeri, disponibilità intracellulare di dNTP, stato metabolico della cellula, velocità catalitica e processività della telomerasi. In particolare, la velocità catalitica e la processività sono due proprietà intrinseche e ben distinte dell'enzima: la prima rappresenta la rapidità con cui la telomerasi catalizza l'incorporazione dei nucleotidi durante la sintesi del DNA telomerico, mentre la seconda è la

capacità di aggiungere consecutivamente più ripetizioni telomeriche a una stessa estremità di DNA senza dissociarsi dal substrato [12]. Gli autori non eseguono una netta distinzione tra questi due parametri, né effettuano dei saggi specifici per il loro monitoraggio nei vari esperimenti, limitandosi invece ad osservare i cambiamenti nella lunghezza dei telomeri a seguito dei trattamenti. Pertanto, le variazioni osservate mediante TRF non consentono di stabilire se l'effetto sulla sintesi telomerica dipenda da un'alterazione della velocità catalitica, della processività o di altri fattori che influenzano l'attività complessiva della telomerasi.

L'utilizzo di farmaci e della Dm-dNK per il ripristino telomerico può rappresentare una prospettiva interessante per il trattamento delle TBD, ma va considerato che tale enzima è estraneo alla fisiologia delle cellule umane e che la sua introduzione potrebbe non avere un effetto terapeutico specifico sui telomeri. Gli stessi autori sottolineano inoltre che la presenza di telomeri lunghi non significa necessariamente che la cellula si trovi in uno stato di salute: una lunghezza telomerica eccessiva è associata a un aumento della predisposizione a determinate neoplasie quali melanoma, leucemia linfatica cronica e altri tumori.

Nel complesso, gli esperimenti condotti dagli autori supportano l'esistenza di un forte legame tra il metabolismo dei dNTP e la sintesi telomerica, offrendo una panoramica più ampia rispetto ai normali saggi in vitro utili a misurare l'attività della telomerasi. Il saggio TRACE sviluppato dagli autori rappresenta uno strumento utile per studiare i cambiamenti della lunghezza dei telomeri in determinati contesti e per testare molecole ad azione farmacologica; va però considerato che le condizioni sperimentali e i trattamenti a cui le cellule sono sottoposte allontanano il sistema dalle reali condizioni fisiologiche. Infine, gli autori propongono che le pressioni selettive sui livelli intracellulari dei dNTP, rappresentate dalla necessità di mantenere la fedeltà replicativa e allo stesso tempo garantire la restrizione del DNA virale, possano aver plasmato l'omeostasi della lunghezza dei telomeri nel corso dell'evoluzione. Al contrario, la necessità di mantenere l'attività retrotrascrizionale potrebbe aver contribuito a determinare i limiti inferiori dei livelli di dNTP compatibili con la funzionalità telomerica.

Bibliografia

- [1] Maciejowski, John, e Titia de Lange. «Telomeres in Cancer: Tumour Suppression and Genome Instability». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 18, fasc. 3, marzo 2017, pp. 175–86. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.171>.
- [2] Mannherz, William, et al. «Metabolic Constraint of Human Telomere Length by Nucleotide Salvage Efficiency». *Nature Communications*, vol. 16, fasc. 1, marzo 2025, p. 3000. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58221-7>.
- [3] Rampazzo, Chiara, et al. «Regulation by Degradation, a Cellular Defense against Deoxyribonucleotide Pool Imbalances». *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 703, fasc. 1, novembre 2010, pp. 2–10. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.002>.
- [4] Mullen, Nicholas J., e Pankaj K. Singh. «Nucleotide Metabolism: A Pan-Cancer Metabolic Dependency». *Nature Reviews Cancer*, vol. 23, fasc. 5, maggio 2023, pp. 275–94. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00557-7>.
- [5] Wang, Pengcheng, et al. «Nucleotide Salvage, Genome Instability, and Potential Therapeutic Applications». *Nucleic Acids Research*, vol. 54, fasc. 4, febbraio 2026, p. gkag099. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1093/nar/gkag099>.
- [6] Franzolin, Elisa, et al. «SAMHD1-deficient Fibroblasts from Aicardi-Goutières Syndrome Patients Can Escape Senescence and Accumulate Mutations». *The FASEB Journal*, vol. 34, fasc. 1, gennaio 2020, pp. 631–47. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1096/fj.201902508R>.
- [7] D'Aronco, Giulia, et al. «SAMHD1 Restricts the Deoxyguanosine Triphosphate Pool Contributing to Telomere Stability in Telomerase-positive Cells». *The FASEB Journal*, vol. 37, fasc. 4, aprile 2023, p. e22883. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1096/fj.202300122R>.
- [8] Mannherz, William, e Suneet Agarwal. «Thymidine Nucleotide Metabolism Controls Human Telomere Length». *Nature Genetics*, vol. 55, fasc. 4, aprile 2023, pp. 568–80. www.nature.com, <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01339-5>.
- [9] Yu, Hyeon Jong, et al. «Techniques for assessing telomere length: A methodological review». *Computational and Structural Biotechnology Journal*, vol. 23, dicembre 2024, pp. 1489–98. ScienceDirect, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.04.011>.

[10] Mathews, Christopher K. «Deoxyribonucleotide Metabolism, Mutagenesis and Cancer». *Nature Reviews Cancer*, vol. 15, fasc. 9, settembre 2015, pp. 528–39. *www.nature.com*, <https://doi.org/10.1038/nrc3981>.

[11] Davenne, Tamara, et al. «SAMHD1 Limits the Efficacy of Forodesine in Leukemia by Protecting Cells against the Cytotoxicity of dGTP». *Cell Reports*, vol. 31, fasc. 6, maggio 2020, p. 107640. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107640>.

[12] Chen, Yinnan, et al. «A Single Nucleotide Incorporation Step Limits Human Telomerase Repeat Addition Activity». *The EMBO Journal*, vol. 37, fasc. 6, febbraio 2018, p. EMBJ201797953. *Springer Link*, <https://doi.org/10.15252/emj.201797953>.

Metabolic constraint of human telomere length by nucleotide salvage efficiency

Received: 29 April 2024

Accepted: 14 March 2025

Published online: 27 March 2025

 Check for updatesWilliam Mannherz^{1,2,3,4,5}, Andrew Crompton^{1,2,3,4}, Noah Lampl^{1,2,3} & Suneet Agarwal^{1,2,3,4,5}✉

Human telomere length is tightly regulated and associated with diseases at either extreme, but how these bounds are established remains incompletely understood. Here, we developed a rapid cell-based telomere synthesis assay and found that nucleoside salvage bidirectionally constrains human telomere length. Metabolism of deoxyguanosine (dG) or guanosine via purine nucleoside phosphorylase (PNP) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase to form guanine ribonucleotides strongly inhibited telomerase and shortened telomeres. Conversely, salvage of dG to its nucleotide forms via deoxycytidine kinase drove potent telomerase activation, the extent of which was controlled by the dNTPase SAMHD1. Circumventing limits on salvage by expressing *Drosophila melanogaster* deoxynucleoside kinase or augmenting dG metabolism using the PNP inhibitor ulodesine robustly lengthened telomeres in human cells, including those from patients with lethal telomere diseases. Our results provide an updated paradigm for telomere length control, wherein telomerase reverse transcriptase activity is actively and bidirectionally constrained by the availability of its dNTP substrates, in a manner that may be therapeutically actionable.

The ends of linear chromosomes are capped by hexameric repeat sequences termed telomeres, which are required for genomic integrity^{1,2}. During genome replication, a terminal portion of telomeres is lost due to the inability of DNA polymerases to completely replicate linear chromosomes^{3,4}. Loss of telomere sequence to a critically short length causes DNA damage signaling leading to cellular senescence and exit from the cell cycle⁵. In self-renewing cells, the telomerase reverse transcriptase (TERT) compensates for telomere shortening by synthesizing new 5'-GGTTAG-3' repeats using the telomerase RNA template (TERC) and dNTP substrates^{6–9}. In prevailing models of human telomere length regulation, the expression, abundance, and recruitment of telomerase are regarded as the critical factors counter-acting telomere attrition and thus determining cellular self-renewal capacity in health and disease¹⁰.

In the human population, telomere length normally declines throughout life and has well-defined upper and lower boundaries^{11–13}, deviation from which at either extreme is linked to lethal diseases. Shorter telomere length is associated with reduced lifespan by mendelian randomization¹⁴, and germline mutations in the telomerase components and related genes which result in short telomeres lead to a spectrum of fatal degenerative diseases termed telomere biology disorders (TBDs)¹⁵ characterized by premature stem cell exhaustion. Conversely, long telomeres are associated with increased risks of various malignancies in the general population by mendelian randomization^{14,16}, and rare germline mutations that lead to long telomeres predispose patients to melanoma, chronic lymphoblastic leukemia and other cancers^{17–20}. Despite these associations, the cellular mechanisms constraining human telomere length remain incompletely defined.

¹Division of Hematology/Oncology and Stem Cell Program, Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA. ²Pediatric Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA. ³Harvard Stem Cell Institute, Harvard Initiative for RNA Medicine, and Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. ⁴Biological and Biomedical Sciences PhD Program, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. ⁵Harvard/MIT MD-PhD Program, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. ✉e-mail: suneet.agarwal@childrens.harvard.edu

Nuclear dNTP pools serve as common substrates for genome replication by DNA polymerases and reverse transcription by telomerase, and as such have generally been assumed to be sufficient for telomere lengthening capacity in cells. However, an emerging body of genetic and functional data suggests that dNTP metabolism impacts human telomere biology. Genetic variation in dNTP metabolism genes has been linked with telomere length by GWAS^{14,21,22}, and germline mutations at the thymidylate synthase (*TYMS*) locus have been found to cause dyskeratosis congenita, the prototypical TBD²³. Despite these and other^{24,25} clear genetic associations, the mechanisms and extent to which nucleotide metabolism controls telomerase activity in human cells are not well understood, in large part due to barriers in eliciting measurable changes in telomere length after acute perturbations in the native cellular context.

Here, we developed a rapid and robust human cell-based assay to dissect the metabolic regulation of telomerase reverse transcription. We reveal that nucleotide salvage efficiency bidirectionally controls telomerase activity and telomere length in human cells, to a degree as strong as that observed from manipulating core telomerase components. Overcoming limits on nucleotide salvage by deoxynucleoside kinase over-expression rapidly increased telomere length in human cell lines, and was effective in primary cells as well as cells derived from patients with TBDs. Our findings revise the current model of human telomere length regulation by demonstrating significant constraints on telomerase reverse transcriptase activity due to nucleotide salvage efficiency and dNTP levels, in a manner that may be modifiable for therapeutic benefit.

TRACE – a rapid human cell-based telomerase assay

The absence of rapid, high-throughput assays to study telomerase reverse transcription in its native cellular setting has been a major barrier to assessing the impact of metabolic perturbations and identifying therapeutically useful targets. Current telomerase assays either rely on measuring telomere length changes in cells after continuous culture requiring several weeks, or measuring enzymatic telomeric repeat addition in cell lysates using exogenous dNTPs and primers, potentially obscuring critical aspects of telomerase regulation. To overcome these barriers, we established a method to acutely interrogate the effects of cellular perturbations on telomerase activity within the nucleus at the native chromosome end, called Telomerase Rapid Assessment in the Cellular Environment, or TRACE (Fig. 1a). In TRACE, telomerase-null 293 T cells with short telomeres²⁵ are transfected with vectors encoding the core telomerase components, TERC and TERT (Supplementary Fig. 1a, b)²⁶, leading to telomerase over-expression. In this setting of supra-physiologic telomerase activity, telomerase-mediated telomere lengthening is detectable by terminal restriction fragment (TRF) Southern blot in less than 48 h (Fig. 1b, Supplementary Fig. 1c, d), yielding a quantifiable signal that can be used to measure the effects of small molecule or genetic manipulations of telomerase. To evaluate how TRACE responds to small molecules, we applied the telomerase inhibitor BIBR1532²⁷ for 30 h in the assay and found dose dependent decreases in telomere synthesis (Supplementary Fig. 1e, f). To study the capability of TRACE to read out genetic defects in telomerase components, we performed the assay using expression vectors encoding TBD-associated mutations in TERT^{28,29} or TERC³⁰ and found that these pathogenic variants impaired telomere synthesis (Supplementary Fig. 1g–j). Collectively, these data demonstrate that the TRACE assay can rapidly read out small molecule and genetic modulation of telomerase activity in human cells.

Purine nucleosides inhibit telomerase

We utilized the TRACE assay to evaluate how the manipulation of nucleotide metabolism impacts telomerase reverse transcriptase activity. We supplemented cells with individual deoxynucleosides (dNs) and ribonucleosides (rNs) at a range of concentrations and

found that pyrimidines drove telomerase activation in a dose dependent manner (Fig. 1c, Supplementary Fig. 1k–m), most robustly thymidine (dT) consistent with prior results²⁵. In contrast, purine nucleoside supplementation caused telomerase inhibition, with the guanine nucleosides guanosine and deoxyguanosine (dG) inhibiting telomerase activity more potently than adenosine and deoxyadenosine (dA) (Fig. 1d–j). The inhibitory effect from dG supplementation was unanticipated given prior studies demonstrating that increased levels of dGTP lead to strong activation of purified telomerase enzymatic activity^{9,31–33}. Interestingly, dG inhibited telomerase activity to a greater degree at 100 μ M than at 500 μ M (Fig. 1j), showing a dose dependent, non-linear relationship between telomerase activity and dG supplementation. Collectively, these results demonstrate that purine nucleoside supplementation can acutely inhibit telomerase reverse transcription in human cells.

PNP is required for telomerase inhibition by guanosine and deoxyguanosine

We next used the TRACE assay to ask whether metabolites of guanosine and dG mediate the observed telomerase inhibition. First, because dG might undergo 5'-phosphorylation by deoxycytidine kinase (DCK), we tested if supplementation of 2',5'-dideoxyguanosine (2,5ddG), a dG analog which cannot be directly phosphorylated by DCK (Fig. 2a), could also inhibit telomerase activity. Similar to the effects of guanosine and dG, we saw a dose dependent inhibitory effect of 2,5ddG supplementation in the TRACE assay (Fig. 2b). These results suggest that phosphorylation of dG by DCK to form dG nucleotides is not responsible for dG's inhibitory effects on telomerase.

To evaluate the effects of nucleoside supplementation on telomere length in cells without telomerase overexpression, we treated 293 T cells and K562 cells with either 2,5ddG or guanosine. In both cases we observed dose dependent telomere shortening after 21 days in culture (Fig. 2c, d, Supplementary Fig. 2a). These results validate the TRACE assay's ability to identify non-natural compounds that cause telomere shortening when applied to cells with endogenous levels of telomerase expression.

Both guanosine and dG nucleosides are catabolized by purine nucleoside phosphorylase (PNP) to yield guanine and the associated sugar. We thus asked whether treatment with PNP inhibitors would rescue telomerase inhibition from guanine nucleoside supplementation in the TRACE assay. When we applied the PNP inhibitor ulodessine³⁴, we found that telomerase reverse transcriptase activity was no longer inhibited by guanosine or dG (Fig. 2e). Ulodessine alone had no effect (Fig. 2e). These results pointed to guanine, the common downstream catabolite of guanosine and dG. Surprisingly and consistent with this, we found that supplementation with guanine itself strongly inhibited telomerase activity in the TRACE assay, in a manner that could not be reversed by ulodessine (Fig. 2e). Similar results were obtained using the structurally distinct PNP inhibitor forodesine³⁵ (Supplementary Fig. 2b). These data reveal an inhibitory effect of guanine, whether by direct supplementation or catabolism of dG or guanosine nucleosides by PNP, on telomerase activity in human cells.

Guanine ribonucleotides inhibit telomere lengthening in human cells

We next asked whether metabolites of guanine caused the strong telomerase inhibition we observed in the TRACE assay. Guanine can either be salvaged as guanosine monophosphate (GMP) by hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), or further catabolized into xanthine and uric acid by guanine deaminase (GDA) and xanthine oxidase, respectively (Fig. 2f). To test whether guanine breakdown products caused telomerase inhibition, we compared the effects of directly supplementing cells with guanine, xanthine, or uric acid in the TRACE assay. Whereas guanine supplementation potently

inhibited telomerase reverse transcriptase activity, xanthine and uric acid had minimal effects at doses up to 500 μM (Fig. 2g, Supplementary Fig. 2c–e). As a complementary approach to evaluate whether the accumulation of guanine catabolic products drives telomerase inhibition, we tested the xanthine oxidase inhibitor febuxostat³⁶ in the

TRACE assay, and found it was unable to rescue telomerase activity from treatment with either dG, guanosine, or guanine (Fig. 2h). Together, these findings indicated that guanine rather than its downstream degradation products is responsible for telomerase inhibition in cells.

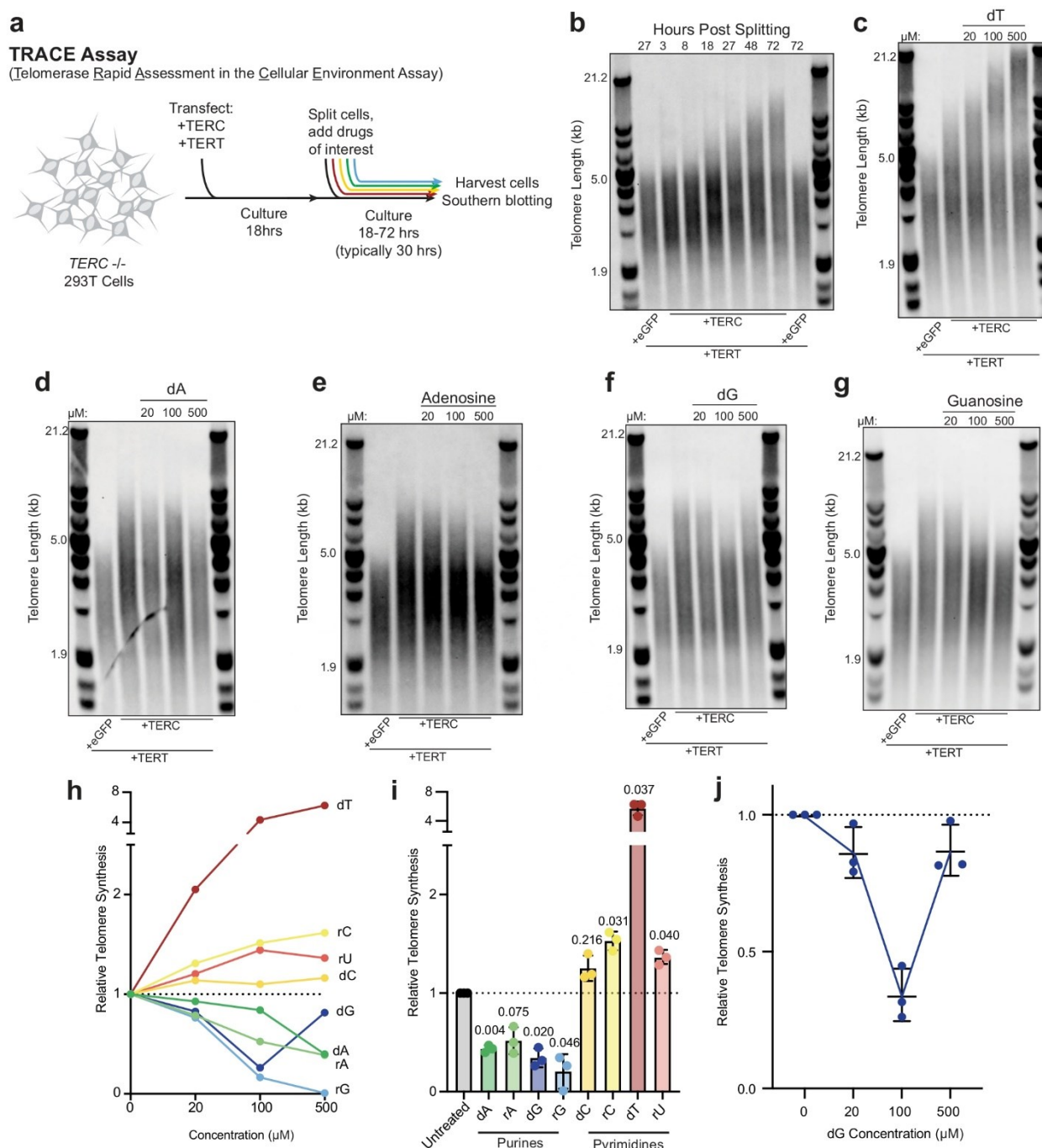


Fig. 1 | Metabolite screening by TRACE assay reveals purine nucleoside supplementation inhibits telomerase reverse transcriptase activity in human cells. **a** Diagram of TRACE assay. **b** Terminal restriction fragment Southern blot (TRF) from TRACE assay performed as follows: *TERC*^{-/-} 293T cells were transfected with the indicated expression vectors, cultured for 18 h, then split and harvested at the indicated timepoints after splitting. The results represent a single experiment. **c–g** TRFs from TRACE assay where cells were transfected as in **b**. 18 h after transfection, cells were split and supplemented as indicated for 30 h prior to harvesting. **h** Quantification of TRACE assays from **c–g**, and Supplementary Fig. 1i–k, displayed as the

relative telomere synthesis compared to untreated cells. **i** Quantification of TRACE assay. Cells were treated with the indicated compounds at the following doses: dG, 100 μM ; all other compounds, 500 μM . Experiment performed in biological triplicate. *P* values compared with untreated cells were calculated using RM one-way ANOVA with Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparison test. Includes data from **c–h** and Supplementary Fig. 1i–k. **j** Quantification of data from **f**, performed in biological triplicate. In **i–j**, data are presented as means; error bars indicate s.d. rC, cytidine; rU, uridine; dC, deoxycytidine; dA, deoxyadenosine; rA, adenosine; rG, guanosine. Source data are provided as a Source Data file.

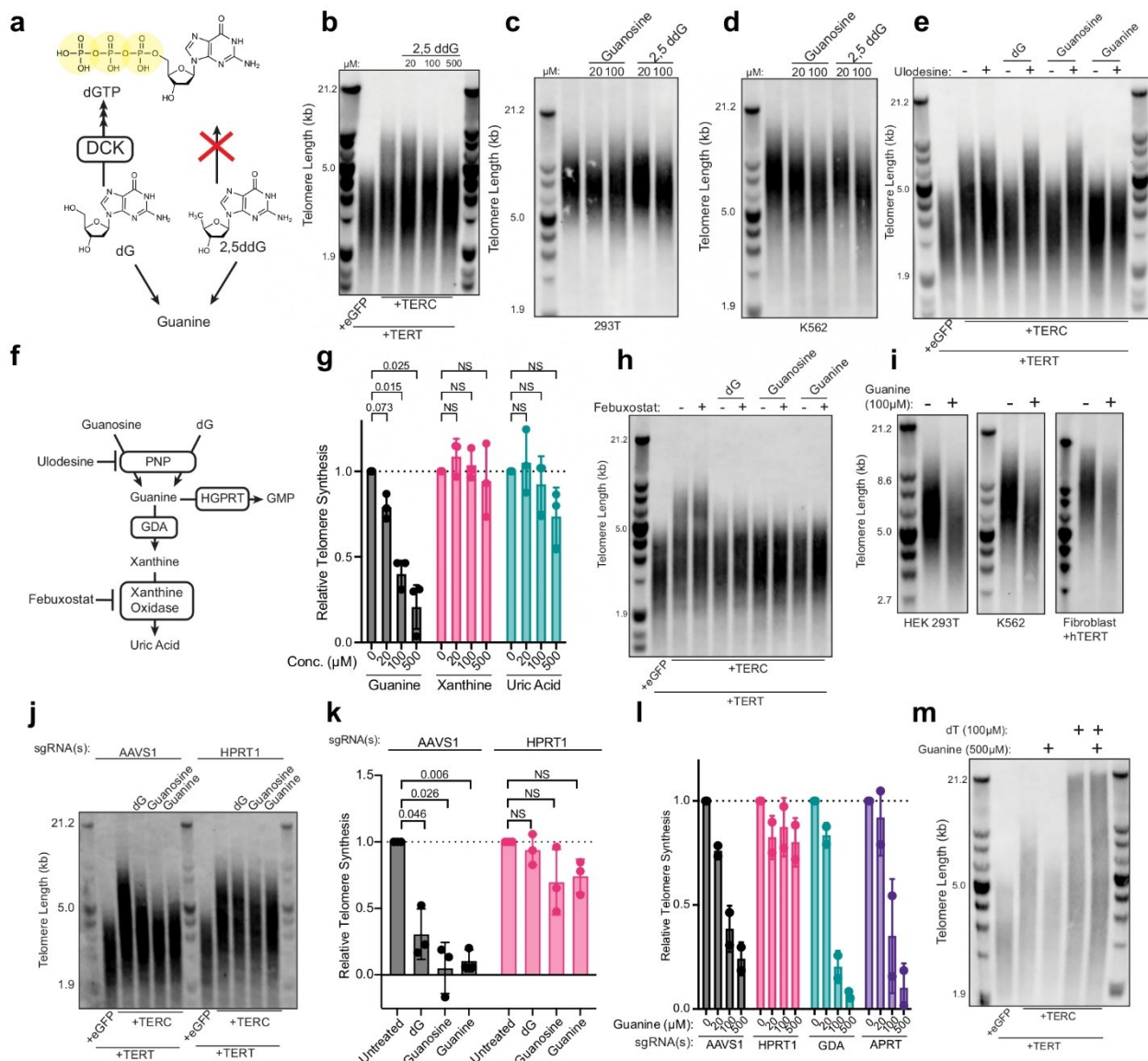


Fig. 2 | Metabolism of guanosine nucleosides by PNP and HGPRT to form guanine ribonucleotides inhibits telomerase reverse transcriptase activity and shortens telomeres. **a** Schematic of metabolic pathways for dG and 2,5ddG. **b** TRF from TRACE assay performed as follows: *TERC*^{-/-} 293 T cells were transfected with the indicated expression vectors, cultured for 18 h, then split and cultured in the indicated doses of 2,5ddG for 30 h. **c**, **d** TRF Southern blot of 293 T cells or K562 cells cultured in the presence of the indicated compounds and doses for 21 days. **e** TRF from TRACE assay performed as in **b**. Doses of compounds: ulodesine, 1 μM; dG, 100 μM; guanosine, 500 μM; guanine, 500 μM. **f** Schematic of guanine nucleoside salvage and catabolism. **g** Quantification of TRF from TRACE assay performed as in **b** with the indicated doses of guanine, uric acid, and xanthine. See Supplementary Fig. 2b–d for corresponding representative TRFs. Experiment performed in biological triplicate. *P*-values calculated for each compound using an RM one-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test. **h** TRF from TRACE assay performed as in **b**. Doses of compounds: februxostat, 100 μM; dG, 100 μM; guanosine, 500 μM; guanine, 500 μM. **i** TRF of indicated cells cultured with or without 100 μM supplemented guanine for three weeks. Representative TRF shown from three biological replicates. **j** TRF from TRACE assay performed on *TERC*^{-/-} 293 T targeted with the indicated sgRNA(s). Assay performed as in **b**. dG, 100 μM; guanosine, 500 μM; guanine, 500 μM. Representative TRF shown from three biological replicates. **k** Quantification of **j**. dG, 100 μM; guanosine, 500 μM; guanine, 500 μM. *P*-values calculated for each genotype using an RM one-way ANOVA with the Geisser-Greenhouse correction and Dunnett's multiple comparisons test. **l** Quantification of TRF from TRACE assay performed using *TERC*^{-/-} 293 T targeted with the indicated sgRNA(s). Assay performed as in **b**. See Supplementary Fig. 2h, i for corresponding representative TRFs. Experiment performed in biological duplicate. *P*-values calculated with a one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. **m** TRF from TRACE assay performed as in **b**. Representative TRF shown from three biological replicates. Data in **g**, **k**, and **l** are presented as means and error bars indicate s.d. The results from c–e represent single experiments. Source data are provided as a Source Data file.

To study these effects under conditions with physiologic telomerase expression, we treated unmanipulated 293 T or K562 cells with 100 μM guanine for 21 days and found reproducible telomere shortening (Fig. 2i, Supplementary Fig. 2f). To test this in diploid primary cells, we treated normal human fibroblasts in which TERT was stably expressed with guanine for 21 days, and similarly observed

inhibition of telomere lengthening (Fig. 2i, Supplementary Fig. 2f). Collectively, these results demonstrate that conversion of guanosine and dG into guanine causes inhibition of telomerase reverse transcription, and show that guanine supplementation itself can shorten telomeres in human cancer cell lines with endogenous telomerase levels.

We next asked if guanine supplementation requires its salvage into cellular ribonucleotide pools via HGPRT to cause telomerase inhibition. Using CRISPR/Cas9, we generated *HPRT1* deficient *TERC*^{-/-} 293 T cells and verified efficient on-target gene inactivation (Supplementary Fig. 2g, h). We similarly used CRISPR/Cas9 to generate *TERC*^{-/-} 293 T cells deficient for *APRT*, encoding adenine phosphoribosyl-transferase which converts adenine to AMP, and *GDA* encoding guanine deaminase which catabolizes guanine to xanthine (Supplementary Fig. 2i). The *AAVSI* safe harbor locus was targeted as a control. Using the TRACE assay we found that, relative to control cells, the inhibitory effects of guanosine, dG and guanine on telomerase activity were abrogated after *HPRT1* inactivation (Fig. 2j, k). In comparison, telomerase inhibition by guanine in *GDA*- or *APRT*-targeted cells was similar to controls (Fig. 2l, Supplementary Fig. 2j, k). Collectively, these data support a model where treatment with guanosine, dG, or guanine leads to inhibition of telomerase reverse transcriptase activity via the salvage of guanine by HGPRT to form guanine ribonucleotides.

Guanine salvage into ribonucleotide pools has been shown to reduce dNTP levels including dTTP in human cells³⁷. dTTP levels are important for telomere length control²⁵, and can be increased by supplementing cells with dT. Therefore, we asked if the inhibitory effects of guanine treatment on telomerase could be overcome by dT supplementation. Using the TRACE assay, we found that dT supplementation fully rescued guanine-mediated telomerase inhibition (Fig. 2m). Taken together, our results support a model wherein guanine supplementation results in GMP accumulation via HGPRT salvage, which in turn depletes dNTPs needed for telomerase reverse transcription, thus shortening telomere length. Furthermore, combined with our observations of guanine-mediated telomere attrition in the setting of endogenous telomerase expression (Fig. 2i, Supplementary Fig. 2f), these data indicate that telomerase activity is constrained in human cells by dNTP substrate availability.

DCK inefficiently salvages dG to promote telomerase activation

Our data unexpectedly demonstrates that dG nucleoside supplementation inhibits telomerase via formation of guanosine ribonucleotides. However, in our original TRACE metabolite screen (Fig. 1h), we observed that at high doses dG supplementation had a diminished inhibitory effect on telomerase, with 100 μ M dG inhibiting telomerase activity to a greater degree compared to 500 μ M dG. We repeated this analysis using a broader dG dose range, and again found that while 100 μ M dG strongly inhibited telomerase activity, 500 μ M had a smaller inhibitory effect (Fig. 3a). Remarkably, 2.5 mM dG increased telomere synthesis above baseline (Fig. 3a), an observation that would not be possible without TRACE due to the cytotoxicity of dG at this dose after a few days in culture. Given that dGTP is a telomerase substrate, we wondered if salvage of excess supplemented dG by DCK into dG nucleotides could underlie the increased telomerase activity observed with high dose dG, potentially counteracting the inhibitory effects on telomerase from the “default” pathway of dG breakdown into guanine (Fig. 3b). To address this question, we used a series of small molecule and genetic approaches to alter DCK function. We first inactivated *DCK* in *TERC*^{-/-} 293 T cells using CRISPR/Cas9 (Supplementary Fig. 3a, b) and asked if inactivation of *DCK* could block a potential telomerase activating effect of high dose dG. Using the TRACE assay, we found that dG at high doses no longer stimulated telomerase reverse transcriptase activity in the absence of *DCK* (Fig. 3c). Next, we applied the *DCK* inhibitor DI-87³⁸ to cells treated with increasing doses of dG in the TRACE assay. In comparison to the effects of dG alone, we found reduced telomerase reverse transcriptase activity at 500 μ M and 2.5 mM dG in the presence of DI-87 (Fig. 3c). Finally we asked if dC supplementation could prevent telomerase activation from high dose dG, because *DCK* is known to prefer dC as a substrate compared with dG³⁹, and dC supplementation has

been shown to inhibit dG salvage by *DCK*⁴⁰ (Fig. 3b). Using the TRACE assay, we found that while dC itself had a minimal effect on telomerase activity, the addition of dC to 500 μ M dG led to shorter telomeres than 500 μ M dG alone (Fig. 3d). These findings rigorously demonstrate that dG at high levels can be salvaged by *DCK* to form deoxyguanosine nucleotides that result in net telomerase activation, on a backdrop where dG is otherwise metabolized via guanine into guanosine ribonucleotides that cause telomerase inhibition.

Given that *DCK* is inefficient at phosphorylating dG, we next asked if increasing cellular *DCK* activity would enable dG-dependent telomerase activation at lower doses. We generated *DCK* overexpressing *TERC*^{-/-} 293 T cells (Supplementary Fig. 3c) for use in the TRACE assay and found that remarkably dG could now promote telomerase activation at doses as low as 20 μ M, with strong activation at 80 μ M. In contrast, telomerase activity in eGFP-expressing control cells remained inhibited by dG at 40 and 80 μ M doses (Fig. 3e). To test whether these telomere length increases could be explained by altered cell cycle progression, we performed cell cycle analysis but found no significant differences in cells treated with 20 μ M dG irrespective of *DCK* overexpression (Supplementary Fig. 3d–j). Furthermore, given concerns that high doses of dG might cause a DNA damage response³⁷, we assessed phosphorylation of CHK1 at residue serine 345 (pCHK1 S345) but found its levels to be undetectable after exposure to 20 μ M dG in the presence or absence of *DCK* overexpression (Supplementary Fig. 3k). Collectively, these results reveal that dG nucleotide salvage capacity is limiting for telomere elongation in a manner amenable to manipulation, and that dG metabolic pathway choice dictates its net effect on telomerase activity in human cells.

SAMHD1 restricts telomerase activation from salvaged dG nucleotides

Salvage of dG into nucleotides by *DCK* could be promoting telomerase activity at the mono-, di-, or triphosphate levels. The dNTPase SAMHD1 restricts cellular deoxyribonucleotide triphosphate levels including dGTP and is a negative regulator of telomere length^{24,25} (Fig. 3b). To determine if dG salvage acts at the nucleotide triphosphate level, we asked what impact SAMHD1 disruption would have on telomerase activation after dG supplementation in the TRACE assay. In contrast to the strong telomerase inhibition from 100 μ M dG seen in control cells, we found that SAMHD1 deficient *TERC*^{-/-} 293 T cells (Supplementary Fig. 3l)²⁵ showed robust telomerase activation at the same dose, an effect that increased further using 500 μ M dG (Fig. 3f). In contrast, when we applied guanosine or guanine to SAMHD1 deficient cells, we found that telomerase activity was inhibited to a similar degree compared to cells in which SAMHD1 was intact (Supplementary Fig. 3m). These results suggest that the telomerase activation seen after dG salvage by *DCK* is not only mediated by dGTP, but potentially restricted by SAMHD1. To verify that the dG dependent telomerase activation in the absence of SAMHD1 was occurring via *DCK* salvage, we tested the effect of inhibiting *DCK* and found that DI-87 strongly inhibited telomerase activation in SAMHD1 deficient cells after dG treatment (Fig. 3g). Similarly, we found that dC, which competes with dG as a *DCK* substrate, also restricted the telomerase activation from dG in SAMHD1 deficient cells (Fig. 3g). These results indicate that the dNTPase SAMHD1 restricts telomerase activation from dG nucleotide salvage downstream of *DCK* and provide further support for a model where net dGTP accumulation promotes telomerase activity.

Nucleoside salvage efficiency limits telomerase activity and telomere length

Given the strong activation of telomerase from dG when we overexpressed *DCK*, which is inefficient at phosphorylating dG, we wondered if reprogramming cellular metabolism to drive more efficient deoxynucleoside salvage could further promote telomerase activity. The *Drosophila melanogaster* deoxynucleoside kinase (Dm-dNK) has

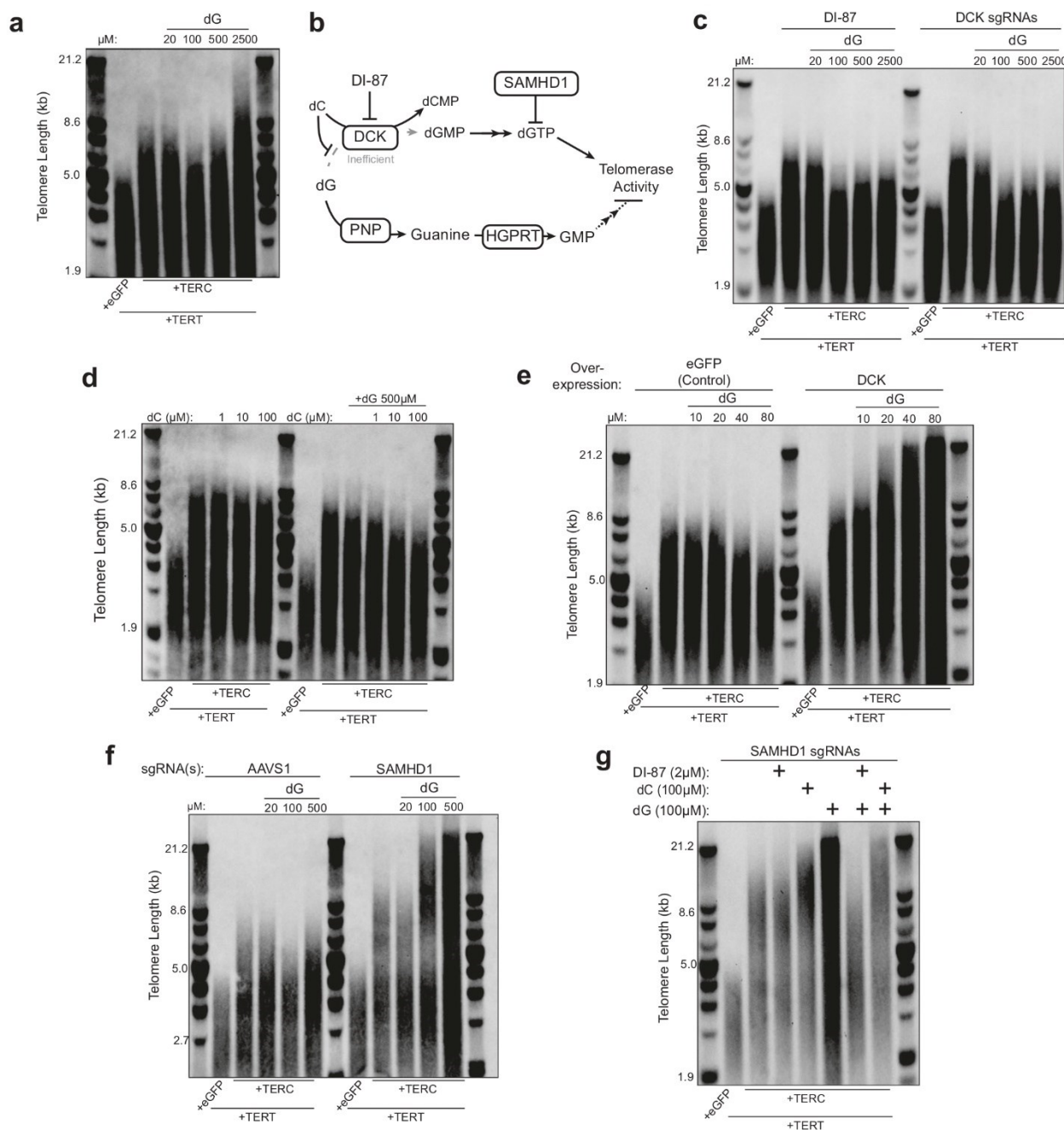


Fig. 3 | Salvage of dG nucleotides via DCK activates telomerase reverse transcription in a manner modulated by the dNTPase SAMHD1. **a** TRF Southern blot of TRACE assay from *TERC*^{-/-} 293 T cells transfected with the indicated expression vectors, cultured for 18 h, then split and cultured in the indicated doses of dG for 30 h. A representative blot is shown from three biological replicates. **b** Schematic of dG salvage pathways. **c** TRF Southern blot of TRACE assay performed as in **a** using either *TERC*^{-/-} 293 T cells (left), or *TERC*^{-/-} 293 T cells which had been targeted with sgRNAs targeting *DCK* (right). Cells were treated with DI-87 at 2 μM and with dG as indicated. **d** TRF Southern blot of TRACE assay performed as in **a** where cells

were treated with dG and dC as indicated. **e** TRF Southern blot of TRACE assay performed as in **a** using *TERC*^{-/-} 293 T cells overexpressing eGFP or DCK. Cells were treated with dG as indicated. **f** TRF Southern blot of TRACE assay performed as in **a** using *TERC*^{-/-} 293 T cells targeted with sgRNA(s) against *AAVS1* or *SAMHD1*. Cells were treated with dG as indicated. **g** TRF Southern blot of TRACE assay performed as in **a** using *TERC*^{-/-} 293 T cells targeted with sgRNAs against *SAMHD1*. Cells were treated with DI-87, dC, and dG as indicated. For **c–g** a representative blot is shown from two biological replicates.

broad substrate specificity and eight-fold more activity on dG than DCK^{41,42} (Fig. 4a). Thus we generated Dm-dNK expressing *TERC*^{-/-} 293 T cells (Fig. 4b) and applied the TRACE assay in the setting of dG supplementation. Surprisingly, we found Dm-dNK expressing cells showed higher baseline telomerase activity compared to control eGFP expressing cells without added dG. These results indicate that

overexpressing Dm-dNK to reprogram cellular nucleoside salvage capacity is sufficient to promote telomerase activation even in the absence of exogenous nucleoside supplementation (Fig. 4c, d). When we applied dG to Dm-dNK expressing cells we found a further dose dependent enhancement of telomerase activity up to 500 μM dG (Fig. 4d). In contrast to the striking telomerase activation from dG

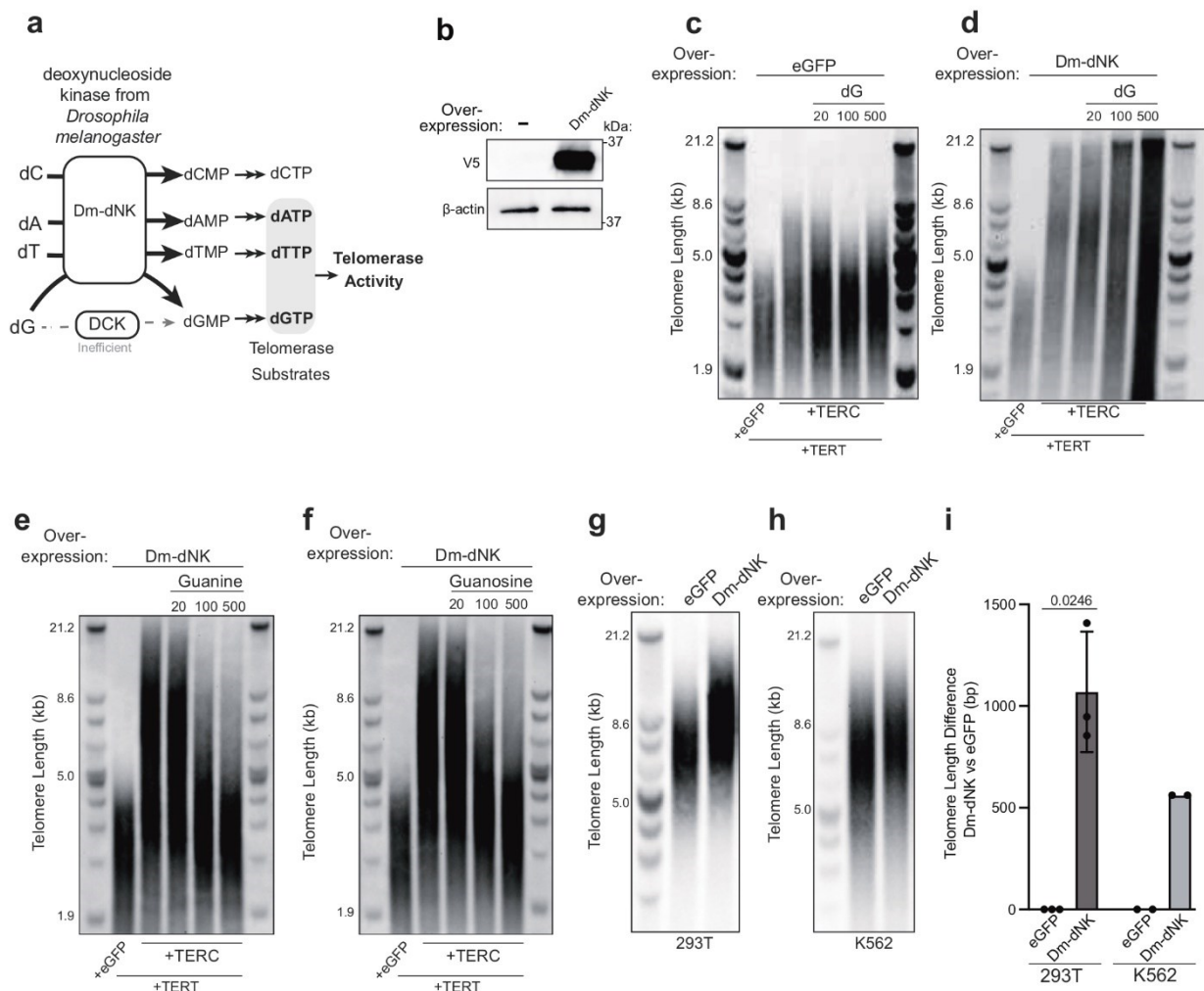


Fig. 4 | Expression of an efficient deoxynucleoside kinase from *Drosophila melanogaster* promotes telomerase activity from dG treatment and lengthens telomeres. a Schematic of Dm-dNK activity. **b** Immunoblot for V5-tagged Dm-dNK in *TERC*^{-/-} 293 T cells stably expressing Dm-dNK. The results represent a single experiment. **c–f** TRF Southern blot of TRF assay from *TERC*^{-/-} 293 T cells overexpressing either eGFP or Dm-dNK which were transfected with the indicated doses of dG, guanine, or guanosine for 30 h. Experiments performed in biological duplicate (**c–e**) or biological triplicate (**f**). **g** TRF Southern blot of 293 T cells which

were transduced with lentivirus for constitutive overexpression of eGFP or Dm-dNK and cultured for one month. A representative blot is shown from three biological replicates. **h** TRF Southern blot of K562 cells which were transduced with lentivirus for doxycycline inducible overexpression of eGFP or Dm-dNK and cultured for one month in the presence of 1 µg/mL of doxycycline. A representative blot is shown from two biological replicates. **i** Quantification of **g** and **h**. Data are presented as means and error bars indicate s.d. *P*-values were calculated using a paired two-sided *t* test. Source data are provided as a Source Data file.

supplementation, treatment with guanosine or guanine continued to show inhibitory effects telomere synthesis, consistent with the specificity of Dm-dNK for dNs (Fig. 4e, f). These results confirm that dG salvage into deoxyribonucleotides is limiting and stimulates telomerase activity in human cells.

We next asked whether overexpressing Dm-dNK could promote telomere lengthening in long term culture of human cells without telomerase overexpression. When we infected cells with Dm-dNK constructs and compared them with eGFP expressing control cells, we found Dm-dNK overexpression led to robust telomere lengthening in 293 T cells over 25 days of culture (Fig. 4g, i). Whereas a similar level of Dm-dNK expression (driven by a CMV promoter) was not well tolerated in K562 cells, use of a doxycycline-inducible Dm-dNK expression construct also showed telomere lengthening compared to controls (Fig. 4h, i). Taken together, these findings indicate that deoxynucleoside salvage capacity actively constrains telomere synthesis in human cells, and can be metabolically reprogrammed to increase telomerase activity and telomere length.

Manipulating deoxynucleoside salvage drives telomere lengthening in cells from TBD patients

Telomere biology disorders (TBDs) are caused by hypomorphic mutations in the core telomerase components and other telomere maintenance genes. Based on our findings showing overexpression of Dm-dNK could promote telomere lengthening, we asked if the expression of Dm-dNK could overcome genetic defects in telomere synthesis and yield telomere lengthening in cells from TBD patients. To address this question, we utilized a panel of fibroblasts from TBD patients carrying pathogenic mutations in *TERC*, *DKC1* which encodes a member of the telomerase holoenzyme, or *TINF2* which encodes a component of the telomere shelterin complex. We first determined that ectopic expression of Dm-dNK robustly increased telomere length in normal human skin fibroblasts stably expressing TERT (Fig. 5a, Supplementary Fig. 4a). Next, we overexpressed Dm-dNK in TBD patient fibroblasts expressing TERT and found striking increases in telomere length by thousands of base pairs after three weeks in culture (Fig. 5b, c). These data indicate that deoxynucleoside salvage

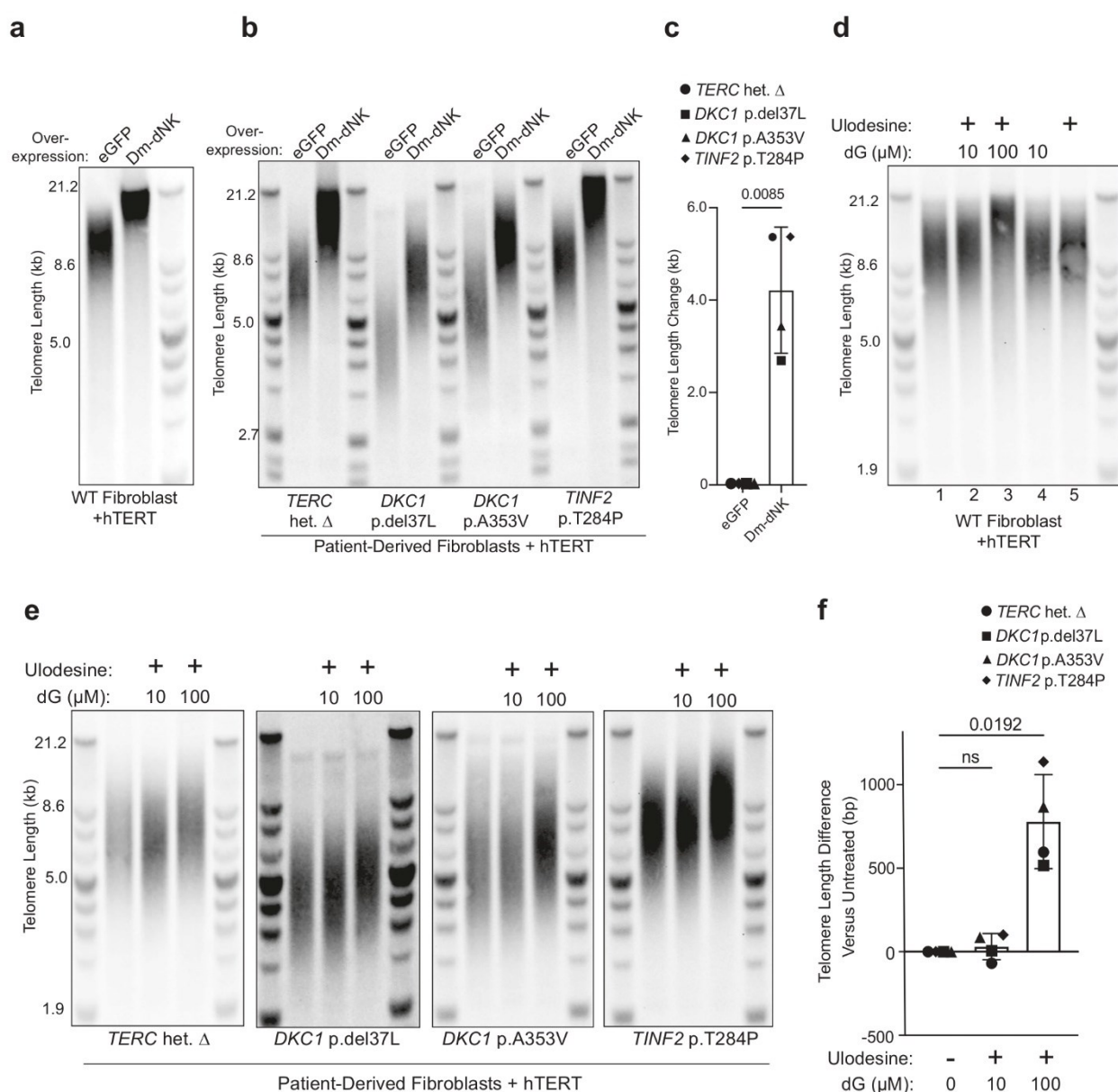


Fig. 5 | Manipulation of deoxynucleotide salvage by expressing Dm-dNK or treatment with dG plus ulodesine drives telomere lengthening in fibroblasts from patients with TBDs. **a** TRF Southern blot from TERT expressing fibroblasts from a healthy donor overexpressing eGFP or Dm-dNK as indicated and cultured for five weeks. **b** TRF Southern blot from TERT expressing fibroblasts from TBD patients harboring mutations in the indicated genes overexpressing eGFP or Dm-dNK as indicated and cultured for one month. **c** Quantification of median telomere length from **b**. Error bars represent s.d. P value was calculated using a paired two-

sided t -test. **d** TRF Southern blot from TERT transformed fibroblasts from a healthy donor which were treated with 1 μ M ulodesine and dG as indicated for three weeks. **e** TRF Southern blot from TERT transformed fibroblasts from TBD patients harboring mutations in the indicated genes which were treated with 1 μ M ulodesine and dG as indicated for three weeks. **f** Quantification of median telomere length from **e**. Statistical significance determined using paired two-sided t -test. Error bars indicate standard deviation. The results from **a** and **d** represent single experiments. Source data are provided as a Source Data file.

capacity actively limits telomere length in human diploid cells, and that augmenting dNTP salvage overcomes disease-causing deficiencies in telomere maintenance genes and restores telomere length in cells from patients with TBDs.

Next, based on our findings showing that the pathway by which dG is metabolized influences telomerase activity, we hypothesized that shifting the balance towards deoxynucleoside salvage rather than catabolism using small molecules would drive telomere elongation in long term culture. To test this hypothesis in primary human cells, we treated normal fibroblasts stably expressing TERT with the PNP inhibitor ulodesine either alone or in combination with supplemented dG. We found

that while treatment with ulodesine alone did not lead to detectable changes in telomere length, the combination of ulodesine with 100 μ M dG led to robust telomere lengthening after 21 days in culture (Fig. 5d). We next asked if the combination of ulodesine and dG treatment could promote telomere lengthening in cells derived from patients with TBDs. Remarkably, we found that treatment with ulodesine and 100 μ M dG for 21 days drove telomere lengthening across all mutant genotypes tested (Fig. 5e, f). Under these conditions, we found no difference in cell growth (measured as population doublings) or cell-cycle progression in two of the four patient fibroblasts, but a reduction in growth and prolongation of S-phase for the other two fibroblasts (Supplementary

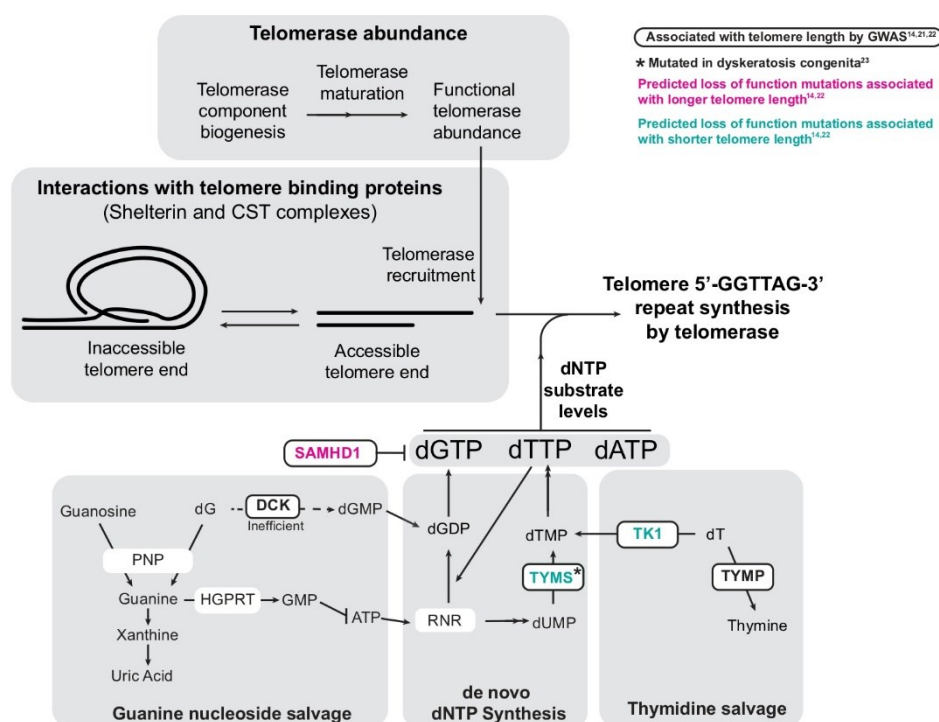


Fig. 6 | An updated model of human telomere length regulation. To date, most data indicate that human telomere length is regulated by (1) the abundance of telomerase holoenzyme and (2) its interplay with telomere binding proteins. Based on the current findings and emerging human genetic data, we propose a revised model encompassing a third critical dimension of telomere length regulation in human cells: control of dNTP substrate levels available for telomere 5'-GGTTAG-3' repeat synthesis by telomerase. dNTP substrate accumulation is limited by salvage efficiency including (a) deoxyguanosine (dG) metabolism by DCK, and (b) thymidine (dT) conversion to dTTP via TK1²⁵. dTTP can enhance dGTP production by allosteric binding to ribonucleotide reductase (RNR). Overcoming salvage constraints through

dG or dT supplementation or by augmenting kinase activity robustly increases telomerase activity and telomere length. Conversely, guanine nucleoside metabolism via PNP and HGPRT to form guanosine ribonucleotides decreases telomere length, potentially by inhibiting RNR and depletion of dNTPs. Mutations that impair dTTP de novo synthesis lead to reduced telomerase substrate levels and impaired telomerase activity, as observed in patients with TYMS locus mutations who develop dyskeratosis congenita²³. The dNTPase SAMHD1 prevents the accumulation of telomerase dNTP substrates and restricts telomerase activity. Our model provides a mechanistic framework for the recent association between genetic variation in dNTP metabolism genes and telomere length in states of health and disease.

Fig. 4b–m). None of the cultures showed increases in pCHK1 (S345) after dG plus ulodesine, indicating a lack of DNA damage response induction (Supplementary Fig. 4n, o). Together, these data indicate that the observed telomere length increases after dG and ulodesine treatment cannot be explained by changes in cell growth or S-phase progression, and do not trigger DNA damage responses. Collectively, these findings indicate that deoxynucleotide salvage limits telomere lengthening in human cells, and that genetic or small molecule-based reprogramming of deoxynucleotide salvage can promote telomere restoration in the setting of TBD-causing genetic defects.

Discussion

Telomere length must be kept within a tight window to maintain human health. Genetic dysregulation of telomere length homeostasis leading to either aberrantly short or long telomeres predisposes to lethal diseases. Telomere length is generally considered to be governed by the expression and abundance of telomerase, and the recruitment of telomerase to the chromosome end by shelterin proteins¹⁰. Here, we reveal that reverse transcription by telomerase in human cells is constrained by the availability of dNTP substrates for 5'-GGTTAG-3' repeat synthesis. Based on our findings, we propose an updated model for the regulation of telomerase reverse transcription, wherein modulation of nucleotide synthesis and salvage plays an active, critical role in human telomere length homeostasis in normal and disease states (Fig. 6). While strategies to therapeutically target canonical regulators of telomerase – expression, abundance, recruitment – have met with limited success to date, our findings suggest that

well-trodden paths of pharmacologically manipulating nucleotide synthesis or salvage could lead to new treatments for genetic telomere diseases and other degenerative disorders.

This work was stimulated by several emerging lines of human genetic evidence implicating nucleotide metabolism in telomere length control^{14,21,23}, hitherto lacking mechanistic explanations consistent with prevailing models of telomerase regulation. Independent genetic and functional studies have converged on thymidine metabolism as the central player in the regulation of human telomerase activity and telomere length^{23,25}. These findings appear to contrast prior studies using purified telomerase showing that dGTP rather than dTTP plays a dominant role in the control of enzymatic activity^{9,31–33}. Here, we sought to comprehensively determine the relationship between nucleotide metabolism and telomerase reverse transcriptase activity in intact human cells and developed the TRACE assay. TRACE enables detection of telomere length changes in human cells within 48 h and can be applied to study the impact of metabolic perturbations on telomerase reverse transcriptase activity. We were thus able to screen nucleoside metabolites for their effects on telomere synthesis and identified a bidirectional and limiting role of guanine nucleoside salvage in telomerase regulation. Our findings indicate that the low efficiency of dG phosphorylation by DCK restricts dG nucleotide accumulation and limits telomerase activation from dG supplementation. In the TRACE assay, very high doses of dG were able to overcome this inefficiency and promote telomerase activation. Furthermore, increasing the efficiency of dG salvage by DCK overexpression yielded potent telomerase activation. These data indicate

that dGTP accumulation drives strong telomerase activation in human cells, in line with the effects of dGTP levels on purified human telomerase^{31–33} and in yeast cells⁴³. These results are also consistent with recent observations of negative regulation of telomere length by the dNTPase SAMHD1, which preferentially degrades dGTP^{24,25}. Along these lines, the sensitivity of telomerase to dGTP may contribute to the telomerase activation seen after dT supplementation²⁵. dTTP has been shown to allosterically act on ribonucleotide reductase (RNR) to increase dGTP production⁴⁴. The upregulation of dGTP after dT treatment may offer an explanation for the surprising finding that telomere repeat synthesis is stimulated by dT supplementation even when telomerase is modified to no longer use dTTP as a substrate²⁵. Of note, the efficiency of dT salvage by TK1 is orders of magnitude higher than the efficiency of dG salvage by DCK^{41,45,46}, potentially explaining the more robust effect of dT than dG supplementation on telomere elongation in cells. Together, under this model, our findings provide a mechanism for human GWAS data linking the cytosolic deoxynucleoside kinases TK1 and DCK with telomere length^{44,21,22}, acting at the level of nucleoside salvage efficiency. Overcoming normal human physiologic limits on salvage capacity by overexpressing a highly efficient deoxynucleoside kinase from *Drosophila melanogaster* drove robust telomere lengthening, including cells derived from TBD patients. In sum, these findings reveal that deoxynucleoside salvage efficiency actively constrains telomere synthesis by telomerase under physiological conditions, and can be manipulated to overcome impaired telomere maintenance in the setting of TBD-causing genetic defects.

In addition to revealing the importance of deoxynucleoside salvage capacity for telomerase regulation, we also surprisingly found that guanine or guanine nucleoside supplementation led to telomerase inhibition, and guanine treatment drove telomere shortening across multiple cell types including cancer cell lines. Guanine supplementation has been found to deplete dNTPs including dTTP and dGTP^{37,47}. While the mechanism underlying dNTP depletion from guanine supplementation has not been established, guanine salvage into ribonucleotides pools has been shown to reduce ATP levels in human cells^{37,47}. ATP is an allosteric activator of RNR⁴⁴ which is the rate-limiting enzyme in the de novo dNTP synthesis pathway, including the telomerase substrates dGTP and dTTP. Based on this model, we hypothesized that guanine could be inhibiting telomerase by reducing dNTP levels, and asked if upregulating dNTP synthesis could rescue telomerase inhibition in guanine treated cells. We found that augmenting dNTP production by supplementing with dT could fully rescue cells from guanine-mediated telomerase inhibition. These results support a model whereby guanine salvage inhibits telomerase by limiting dNTP availability for telomere synthesis. More broadly, our data showing that dG nucleoside supplementation bidirectionally controls telomerase activity can be unified under a model wherein the dNTP substrates required by telomerase are either increased or decreased, depending on net dG metabolism into guanosine deoxyribonucleotides versus ribonucleotides. (Fig. 6).

Telomerase activation is a critical step in tumorigenesis in many cancers, and effective anti-neoplastic telomerase inhibitors have been long-sought after but remain largely elusive. dNTP levels are elevated in most cancers⁴⁸ by means including the upregulation of the rate limiting thymidine salvage enzyme TK1. Similarly, deoxynucleoside kinases are expressed in many viruses which cause human disease including the oncogenic viruses Epstein-Barr virus and Human Herpesvirus-8⁴⁹ which also upregulate telomerase activity as part of their progression⁵⁰. It has been proposed that the increased dNTP levels in cancer cells enables efficient genome replication and frequent cell divisions. Based on our data, it is also possible that elevated dNTP levels provide a selective advantage to tumor cells by lifting a metabolic constraint on telomere synthesis by telomerase. Several nucleotide analog chemotherapy drugs are known to inhibit dNTP synthesis such as gemcitabine, clofarabine,

and 5-fluorouracil, and we therefore speculate that telomerase inhibition may contribute to their anti-tumor activity. The intersection between nucleotide metabolism and telomerase activity offers a new avenue to examine how cellular self-renewal limits are bypassed in chronic viral infections and tumorigenesis, and how this may be interrupted therapeutically.

Manipulation of dNTP metabolism also plays an essential role in the treatment of a variety of disorders beyond cancer, such as purine synthesis inhibitors azathioprine and mycophenolate mofetil in autoimmune disorders, uridine monophosphate in patients with CAD deficiency, and deoxypyrimidines in patients with TK2 deficiency. Based on the robust telomere lengthening we observed from overexpressing Dm-dNK as well as from using uladesine plus dG in primary human cells from patients with genetically-diverse TBDs, our data suggest that strategies to shift deoxynucleoside metabolism towards dNTP accumulation could be a promising therapeutic strategy to augment telomerase activity in TBDs. PNP inhibitors have been shown to be well-tolerated, and to increase serum dG levels and cellular dGTP levels^{51,52}, and thus based on our data, may be able to promote telomere lengthening as a single agent. However, dNTPs are broadly utilized substrates for diverse cellular functions including nuclear and mitochondrial DNA replication and repair, and their manipulation is known to impact cell growth and proliferation in a dose-dependent manner³⁷. Translational efforts to manipulate deoxynucleotide metabolism and define a therapeutic window in TBDs will therefore require scrutiny of potential impacts on the activity and fidelity of the myriad cellular factors regulating these functions. Finally, attention will need to be paid to the composition of telomere repeat sequences themselves after dG or dT supplementation, exploiting emerging sequencing technologies^{53–55}.

Nuclear dNTP pools serve as common substrates for genome replication by DNA polymerases and for telomere synthesis by telomerase, yet these DNA synthesis machines must perform fundamentally different tasks. While replicative DNA polymerases copy billions of base pairs of sequence with high fidelity within hours during S phase of the cell cycle, telomerase activity is tightly tied to the rate of telomere attrition which is estimated to be ~50–100 base pairs per cell division at each chromosome end^{5,56}. Additionally, unlike replicative DNA polymerases, telomerase has no defined endpoint for telomere repeat synthesis once it has begun. Tight regulation of TERC and TERT expression and control of telomere end accessibility by the shelterin and CST complexes have long been proposed to explain the homeostatic limit of human telomere length⁵⁷. However, in our recent²⁵ and present work collectively, we have overcome this limit through manipulation of dNTP levels using four different approaches: thymidine supplementation, dG supplementation plus PNP inhibition, SAMHD1 inactivation, and deoxynucleoside kinase overexpression. Nuclear dNTP pool homeostasis is under competing selective pressures including the need to maintain genome fidelity and to restrict the proliferation of DNA viruses, retroviruses, and selfish genetic elements. Given the sensitivity of cellular telomerase activity to changes in dNTP metabolism that we observed in this study, we propose that selective pressures on cellular dNTP levels may have shaped telomere length homeostasis throughout evolution. Conversely, the need to maintain reverse transcription by telomerase may contribute to the lower bound of tolerable dNTP levels: further reductions of dNTPs can cause diseases of telomerase insufficiency, as seen in patients with inherited *TYMS* locus mutations who develop dyskeratosis congenita²³. We expect that this telomerase-inclusive perspective will offer new insights on how competing constraints on nucleotide flux have impacted cellular metabolism and genome integrity throughout evolution.

Methods

Materials and correspondence

Correspondence and material requests should be addressed to the corresponding author.

Patient material

Biological samples were procured under Boston Children's Hospital Institutional Review Board-approved protocols, after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The patient with mutation of the *TINF2* gene presented with dyskeratosis congenita and bone marrow failure in early childhood, consistent with the mutation leading to the p.T284P amino acid change in the 'hot spot' region of *TINF2*, a site where mutations are frequently associated with the TBD dyskeratosis congenita.

Cell culture

293 T cells (American Type Culture Collection, ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum, MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco), L-glutamate (Corning), and penicillin/streptomycin (Corning) and subcultured using trypsin (Gibco). K562 cells (American Type Culture Collection, ATCC) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco), L-glutamate (Corning), and penicillin/streptomycin (Corning). Fibroblasts cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 15% fetal bovine serum, MEM Non-Essential Amino Acids (Gibco), L-glutamate (Corning), and penicillin/streptomycin (Corning) and subcultured using trypsin (Gibco). The normal human fibroblast line NHSF2 was a gift from A. Klingelhutz, University of Iowa. The TBD patient fibroblasts (GM01774⁵⁸) carrying the DKC1 del37L mutation were obtained from the Coriell Cell Repository. The TBD patient fibroblasts with the DKC1 A353V mutation have been described⁵⁹. The TBD patient fibroblasts with the *TERC*^{+/−} 821 base pair deletion have been described⁶⁰. The TBD patient fibroblasts with the *TINF2* p.T284P mutation were generated by culturing punch biopsies under glass coverslips until fibroblast outgrowths were apparent. All fibroblast lines were infected with pCW57.1 TERT lentivirus, selected in puromycin, and cultured in the presence of 1 µg/ml doxycycline (Sigma-Aldrich) during experimental perturbations. Lentiviral transduction was performed via spinfection at 931 G for 2 h in media supplemented with protamine sulfate (Sigma-Aldrich) at 10 µg/ml. 24 h after removal of virus containing media, cells were selected using blasticidin (InvivoGen) at 10 µg/ml for 5–10 days or puromycin (Sigma-Aldrich) at 1 µg/ml for 4–7 days. A description of the small molecules used in this study is available in Supplementary Table 1.

Lentivirus production

293 T cells were transfected with psPAX2 and pMD2.G in addition to the appropriate transfer vector using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) per the manufacturer's instructions. Lentivirus containing media was harvested 48 and 72 h after transfection, filtered using 0.45 µm filters (VWR International), and stored at −80 °C until use.

TRACE assay

On the evening prior to transfection, *TERC*^{+/−} 293 T cells were plated at 0.75×10^6 cells per ml of media into a six well plate. The following day, cell media was replaced approximately one hour prior to transfection. Transfection was performed as follows. For each well of a six well plate, 8 µl of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was mixed with 150 µl of Opti-MEM serum free media (Gibco) and incubated for 5 min. In a separate tube, 416 ng pcDNA-3xHA-TERT and 2083 ng of either pBS-U3-*TERC* or pMAX-eGFP as indicated were mixed into 150 µl of Opti-MEM. These two solutions were then combined, mixed gently, and incubated for 5 min followed by dropwise addition to cells. 18 h after transfection, cells were split into treatment conditions and cultured for 30 h unless otherwise indicated. Cells were then harvested and pellets were stored at −80 °C until DNA isolation and terminal restriction fragment length analysis (described below).

Terminal restriction fragment length analysis

DNA was isolated from cell pellets using the Pure Link Genomic DNA Miniprep kit (Invitrogen). 0.5–3 µg of DNA was digested with *RsaI* (NEB) and *HinfI* (NEB) for 2 h at 37 °C. DNA was then separated by electrophoresis on a 0.6% agarose gel followed by Southern blotting onto Hybond-N+ membrane (Amersham). Detection was performed using the TeloTAGGG Telomere Length assay Kit (Roche) using the provided probe at the recommended concentration or a probe complementary to the C-rich strand of the telomere synthesized by annealing the CCCTAA-rich strand probe template to the universal priming oligonucleotide (see Supplementary Table 2), filling in with Exo- Klenow Fragment (NEB) and a dNTP mix containing DIG-11-dUTP (Roche), blunting with T4 DNA Polymerase (NEB), and degrading the template using Lambda Exonuclease (NEB)⁶¹. Where indicated, Southern blots were stripped using two washes with 0.2 M NaOH and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) at 37 °C for 15 min with shaking followed by detection as described above. Telomere length quantification was performed with the WALTER webtool (v2.0)⁶². TRACE assay experiments were quantified using ImageJ (Version 2.9.0/1.54 f) as follows: First, calculate the ratio (R) of signal above 5 kb (largely newly synthesized telomere) to below 5 kb (largely pre-existing telomere signal for *TERC*^{+/−} 293 T cells) for each sample. Then, to calculate background normalized ratios (Rb), for each sample expressing *TERC*, subtract R for eGFP expressing cells on the same blot (removing background signal contribution) from sample R. Then, to calculate the relative telomere synthesis for a given sample, divide the Rb of experimental samples by the untreated control sample on the same blot (normalizing relative to untreated). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (version 10.0.0).

RT-qPCR

Total cellular RNA was harvested from 293 T and *TERC*^{+/−} 293 T cells using Trizol (Thermo Fisher) according to the manufacturer's protocol. RNA was then DNase treated to remove genomic DNA with the Turbo DNase Kit according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher). cDNA synthesis was achieved using Superscript III Reverse Transcriptase with random hexamer priming (Thermo Fisher). RT-qPCR was then conducted on cDNA using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions on a Bio-Rad CFX96 real-time PCR machine. Relative gene expression was quantified using standard $\Delta\Delta C_t$ methodology.

Cell cycle analysis by DAPI staining and flow cytometry

Approximately 1×10^6 cells per treatment condition were fixed in 70% (v/v) ethanol then stained for DNA content with DAPI followed by flow cytometry analysis on an LSR II analyzer (BD Biosciences) using BD FACSDiva version (8.0.2). Twenty thousand *TERC*^{+/−} 293 T cells and 10,000 patient fibroblast cells were analyzed per sample. Cells were gated on forward versus side scatter and cell cycle phases were first gated in a control sample for each comparison and applied to all samples as described in Supplementary Fig. 3d–f using FlowJo version 10.9.0.

Immunoblotting

Cells were lysed in RIPA buffer (Thermo Fisher) supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Roche) and lysates were quantified using the Bio-Rad DC protein quantification assay according to the manufacturer's protocol. For immunoblots assessing DNA damage markers (Supplementary Fig. 3k, Supplementary Fig. 4n, o), 15 µg protein was mixed with 2X Laemmli buffer (Bio-Rad) and run on 4–20% tris-glycine SDS gel (Bio-Rad), followed by transfer to a polyvinylidene difluoride membrane. For all other immunoblots, 20 µg protein lysate was used. HGPRT was detected using a rabbit primary antibody from Protein Tech (17758-I-AP) at a 1:1000 dilution. TERT was detected using a rabbit primary antibody from Rockland (600-401-252) at a 1:1000

dilution. DCK was detected using a rabbit primary antibody from GeneTex (GTX102800) at a 1:1000 dilution. SAMHD1 was detected using a rabbit primary antibody from Abcam (ab67820) at a 1:500 dilution. V5-tagged Dm-dNK was detected using an anti-V5 mouse primary antibody from Invitrogen (SV5-Pk1) at a 1:1000 dilution. pCHK1 (S345) was detected using a rabbit primary antibody from Cell Signaling Technology at a 1:1000 dilution. Rabbit primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody from Abcam (ab6721) at a 1:5000 dilution. Mouse primary antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody from Invitrogen (31430) at a 1:5000 dilution. Blots were imaged by chemiluminescence on a ChemiDoc Imaging system (Bio-Rad).

CRISPR/Cas9 gene editing

Gene editing was performed using the Neon Electroporation Kit (Invitrogen) by complexing 37 pmol Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 (IDT) and 50 pmol chemically modified sgRNA(s) (Synthego) at room temperature for 20 min followed by addition of 200,000 cells suspended in 20 μ l buffer R (Thermo Fisher Scientific) with Electroporation Enhancer (IDT). The cell mixture was electroporated using a Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) using the following settings: HEK 293 T, 1200 V, 30 ms, 1 pulse; K562 1150 V, 10 ms, 3 pulses. After electroporation, cells were plated into normal media. Editing efficiency was evaluated by isolating genomic DNA from cells at least 3 days after electroporation followed by PCR amplifying the target locus. PCR products were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel.

Expression construct cloning

Constructs to express variants in TERT associated with TBDs were generated from the pCDNA-3xHA-hTERT vector using the Q5 site directed mutagenesis kit (NEB) and were verified by Sanger sequencing.

The DCK expression construct was cloned from 293 T cell cDNA into the pLX304 backbone by Gibson assembly using the NEB HiFi DNA assembly mix. The final construct expresses DCK with a C-terminal fusion to a V5 epitope tag which is present in the pLX304 backbone and the sequence was verified by Sanger sequencing. The cDNA was synthesized by isolating RNA from cells using TRIzol Reagent (Invitrogen), then treating RNA with TURBO DNA-free Kit (Invitrogen). Complementary DNA was synthesized using SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with oligo-dT priming (Invitrogen).

The pLX304-eGFP construct was generated by PCR amplifying the eGFP sequence from the pXPR_011 vector using attB-flanked primers followed by Gateway cloning (Invitrogen) according to the manufacturers protocol into the pLX304 backbone. The final construct expresses eGFP with a C-terminal fusion to the V5 epitope tag which is present in the pLX304 backbone. The sequence was verified by Sanger sequencing.

The CMV driven Dm-dNK expression construct pLX304 Dm-dNK V5 was cloned from the pOpen-dromedNK plasmid into the pLX304 backbone by Gibson assembly using the NEB HiFi DNA assembly mix. The final construct expresses Dm-dNK with a C-terminal fusion to a V5 epitope tag which is present in the pLX304 backbone. The sequence was verified by Sanger sequencing.

The doxycycline inducible Dm-dNK expression construct was generated by isolating the insert from the pLX304 Dm-dNK V5 using SacI (NEB) and SalI (NEB), and ligating it into the pCW57.1 backbone which had been digested with NheI (NEB) and SalI (NEB) using Quick Ligase (NEB) generating pCW57.1 Dm-dNK V5. The sequence was verified by Sanger sequencing. The blasticidin resistant version of this vector used in Fig. 4 was generated by digesting pCW57.1 Dm-dNK V5 with NotI and SpeI and ligating the Dm-dNK containing fragment into

the pCW57-MCS1-P2A-MCS2 (Blast) vector which had also been digested with NotI and SpeI using Quick Ligase (NEB).

The doxycycline inducible eGFP expression construct was generated by PCR amplifying the eGFP sequence from the pXPR_011 vector using attB-flanked primers followed by Gateway cloning (Invitrogen) according to the manufacturers protocol into the pCW57.1 backbone. The sequence was verified by Sanger sequencing. The blasticidin resistant version of this vector used in Fig. 4 was generated by digesting pCW57.1 eGFP with NotI (NEB) and SpeI (NEB) and ligating the Dm-dNK containing fragment into the pCW57-MCS1-P2A-MCS2 (Blast) vector which had also been digested with NotI (NEB) and SpeI (NEB) using Quick ligase (NEB).

All PCR reactions required for molecular cloning were performed using the Q5 polymerase (NEB).

Plasmid sources

pXPR_011 was a gift from J. Doench and D. Root (plasmid 59702; Addgene)

pLX304 was a gift from D. Root (plasmid 25890; Addgene)

psPAX2 was a gift from D. Trono (plasmid 12260; Addgene)

pMD2.G was a gift from D. Trono (plasmid 12259; Addgene)

pBS U3-hTR-500 was a gift from K. Collins (plasmid 28170; Addgene).

pCDNA-3xHA-hTERT was a gift from S. Artandi (plasmid 51637; Addgene).

pmaxGFP was purchased from Lonza

pHIV7/SF-U3-TER-500 was previously described in ref. 60

pHIV7/SF-U3-TER-500 G319A was previously described in ref. 30

pcw57.1 TERT Puro was a gift from C. Reilly⁶³

popen-dromedNK was a gift from Drew Endy & Jennifer Molloy & FreeGenes Project (plasmid 165579; Addgene)

pCW57.1 was a gift from David Root (plasmid 41393; Addgene)

pCW57-MCS1-P2A-MCS2 (Blast) was a gift from Adam Karpf (plasmid 80921; Addgene).

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

All data supporting the findings of this study are available within the paper and its Supplementary Information. Source data are provided with this paper.

References

1. Fagagna, Fd'Adda et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194–198 (2003).
2. Takai, H., Smogorzewska, A. & Lange, T. de. DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Curr. Biol.* **13**, 1549–1556 (2003).
3. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**, 181–190 (1973).
4. Watson, J. D. Origin of Concatemeric T7DNA. *Nat. N. Biol.* **239**, 197–201 (1972).
5. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
6. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**, 331–337 (1989).
7. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405–413 (1985).
8. Feng, J. et al. The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236–1241 (1995).

9. Morin, G. B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**, 521–529 (1989).
10. Hockemeyer, D. & Collins, K. Control of telomerase action at human telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 848–852 (2015).
11. Alder, J. K. et al. Diagnostic utility of telomere length testing in a hospital-based setting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**, E2358–E2365 (2018).
12. Aubert, G., Baerlocher, G. M., Vulto, I., Poon, S. S. & Lansdorp, P. M. Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS Genet* **8**, e1002696 (2012).
13. Baerlocher, G. M., Vulto, I., de Jong, G. & Lansdorp, P. M. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat. Protoc.* **1**, 2365–2376 (2006).
14. Codd, V. et al. Polygenic basis and biomedical consequences of telomere length variation. *Nat. Genet* **53**, 1425–1433 (2021).
15. Armanios, M. & Blackburn, E. H. The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 693–704 (2012).
16. Telomeres Mendelian Randomization Collaboration et al. Association Between Telomere Length and Risk of Cancer and Non-Neoplastic Diseases: A Mendelian Randomization Study. *JAMA Oncol.* **3**, 636 (2017).
17. DeBoy, E. A. et al. Familial Clonal Hematopoiesis in a Long Telomere Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **388**, 2422–2433 (2023).
18. Schmutz, I. et al. TINF2 is a haploinsufficient tumor suppressor that limits telomere length. *eLife* **9**, e61235 (2020).
19. Kim, W. et al. Cancer-associated POT1 mutations lead to telomere elongation without induction of a DNA damage response. *EMBO J.* **40**, e107346 (2021).
20. Henry, M.-L., Osborne, J. & Else, T. POT1 Tumor Predisposition. In *GeneReviews®* (eds. 656 Adam, M. P. et al.) (University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993).
21. Li, C. et al. Genome-wide Association Analysis in Humans Links Nucleotide Metabolism to Leukocyte Telomere Length. *Am. J. Hum. Genet.* **106**, 389–404 (2020).
22. Burren, O. S. et al. Genetic architecture of telomere length in 462,666 UK Biobank whole-genome sequences. *Nat. Genet* **56**, 1832–1840 (2024).
23. Tummala, H. et al. Germline thymidylate synthase deficiency impacts nucleotide metabolism and causes dyskeratosis congenita. *Am. J. Hum. Genet.* **109**, 1472–1483 (2022).
24. D’Aronco, G. et al. SAMHD1 restricts the deoxyguanosine triphosphate pool contributing to telomere stability in telomerase-positive cells. *FASEB J.* **37**, e22883 (2023).
25. Mannherz, W. & Agarwal, S. Thymidine nucleotide metabolism controls human telomere length. *Nat. Genet* **55**, 568–580 (2023).
26. Cristofari, G. & Lingner, J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. *EMBO J.* **25**, 565–574 (2006).
27. Damm, K. et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J.* **20**, 6958–6968 (2001).
28. Snetelaar, R. et al. Short telomere length in IPF lung associates with fibrotic lesions and predicts survival. *PLoS One* **12**, e0189467 (2017).
29. Xin, Z.-T. et al. Functional characterization of natural telomerase mutations found in patients with hematologic disorders. *Blood* **109**, 524–532 (2007).
30. Boyraz, B., Bellomo, C. M., Fleming, M. D., Cutler, C. S. & Agarwal, S. A novel TERC CR4/CR5 domain mutation causes telomere disease via decreased TERT binding. *Blood* **128**, 2089–2092 (2016).
31. Maine, I. P., Chen, S. F. & Windle, B. Effect of dGTP concentration on human and CHO telomerase. *Biochemistry* **38**, 15325–15332 (1999).
32. Sun, D., Lopez-Guajardo, C. C., Quada, J., Hurlley, L. H. & Von Hoff, D. D. Regulation of Catalytic Activity and Processivity of Human Telomerase. *Biochemistry* **38**, 4037–4044 (1999).
33. Chen, Y., Podlevsky, J. D., Logeswaran, D. & Chen, J. J.-L. A single nucleotide incorporation step limits human telomerase repeat addition activity. *EMBO J.* **37**, e97953 (2018).
34. Lewandowicz, A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H. & Schramm, V. L. Achieving the Ultimate Physiological Goal in Transition State Analogue Inhibitors for Purine Nucleoside Phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **278**, 31465–31468 (2003).
35. Kicska, G. A. et al. Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4593–4598 (2001).
36. Osada, Y. et al. Hypouricemic effect of the novel xanthine oxidase inhibitor, TEI-6720, in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* **241**, 183–188 (1993).
37. Diehl, F. F. et al. Nucleotide imbalance decouples cell growth from cell proliferation. *Nat. Cell Biol.* **24**, 1252–1264 (2022).
38. Poddar, S. et al. Development and preclinical pharmacology of a novel dCK inhibitor, DI-87. *Biochem. Pharm.* **172**, 113742 (2020).
39. Sarup, J. C. & Fridland, A. Identification of purine deoxyribonucleoside kinases from human leukemia cells: substrate activation by purine and pyrimidine deoxyribonucleosides. *Biochemistry* **26**, 590–597 (1987).
40. Abt, E. R. et al. Purine nucleoside phosphorylase enables dual metabolic checkpoints that prevent T cell immunodeficiency and TLR7-associated autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **132**, e160852 (2022).
41. Bohman, C. & Eriksson, S. Deoxycytidine kinase from human leukemic spleen: preparation and characteristics of homogeneous enzyme. *Biochemistry* **27**, 4258–4265 (1988).
42. Munch-Petersen, B., Piskur, J. & Søndergaard, L. Four Deoxynucleoside Kinase Activities from *Drosophila melanogaster* Are Contained within a Single Monomeric Enzyme, a New Multifunctional Deoxynucleoside Kinase *. *J. Biol. Chem.* **273**, 3926–3931 (1998).
43. Gupta, A. et al. Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools. *Genetics* **193**, 1095–1105 (2013).
44. Nordlund, P. & Reichard, P. Ribonucleotide Reductases. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 681–706 (2006).
45. Knecht, W. et al. A few amino acid substitutions can convert deoxyribonucleoside kinase specificity from pyrimidines to purines. *EMBO J.* **21**, 1873–1880 (2002).
46. Munch-Petersen, B., Cloos, L., Tyrsted, G. & Eriksson, S. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *J. Biol. Chem.* **266**, 9032–9038 (1991).
47. Batiuk, T. D., Schnizlein-Bick, C., Plotkin, Z. & Dagher, P. C. Guanine nucleosides and Jurkat cell death: roles of ATP depletion and accumulation of deoxyribonucleotides. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1776–C1784 (2001).
48. Traut, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Mol. Cell Biochem* **140**, 1–22 (1994).
49. Gustafson, E. A., Schinazi, R. F. & Fingerhuth, J. D. Human Herpesvirus 8 Open Reading Frame 21 Is a Thymidine and Thymidylate Kinase of Narrow Substrate Specificity That Efficiently Phosphorylates Zidovudine but Not Ganciclovir. *J. Virol.* **74**, 684–692 (2000).
50. Bellon, M. & Nicot, C. Regulation of Telomerase and Telomeres: Human Tumor Viruses Take Control. *JNCI: J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 98–108 (2008).
51. Gandhi, V. et al. A proof-of-principle pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical study with purine nucleoside phosphorylase inhibitor immucillin-H (BCX-1777, forodesine). *Blood* **106**, 4253–4260 (2005).
52. Al-Kali, A., Gandhi, V., Ayoubi, M., Keating, M. & Ravandi, F. Forodesine: review of preclinical and clinical data. *Future Oncol.* **6**, 1211–1217 (2010).

53. Schmidt, T. T. et al. High resolution long-read telomere sequencing reveals dynamic mechanisms in aging and cancer. *Nat. Commun.* **15**, 5149 (2024).
54. Tham, C.-Y. et al. High-throughput telomere length measurement at nucleotide resolution using the PacBio high fidelity sequencing platform. *Nat. Commun.* **14**, 281 (2023).
55. Sholes, S. L. et al. Chromosome-specific telomere lengths and the minimal functional telomere revealed by nanopore sequencing. *Genome Res.* gr.275868.121. <https://doi.org/10.1101/gr.275868.121> (2021).
56. Huffman, K. E., Levene, S. D., Tesmer, V. M., Shay, J. W. & Wright, W. E. Telomere Shortening Is Proportional to the Size of the G-rich Telomeric 3'-Overhang*. *J. Biol. Chem.* **275**, 19719–19722 (2000).
57. Roake, C. M. & Artandi, S. E. Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 384–397 (2020).
58. Wong, J. M. Y. & Collins, K. Telomerase RNA level limits telomere maintenance in X-linked dyskeratosis congenita. *Genes Dev.* **20**, 2848–2858 (2006).
59. Paulsen, B. S. et al. Ectopic expression of RAD52 and dn53BP1 improves homology-directed repair during CRISPR–Cas9 genome editing. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 878–888 (2017).
60. Agarwal, S. et al. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* **464**, 292–296 (2010).
61. Lai, T.-P., Wright, W. E. & Shay, J. W. Generation of digoxigenin-incorporated probes to enhance DNA detection sensitivity. *Bio-techniques* **60**, 306–309 (2016).
62. Lyčka, M. et al. WALTER: an easy way to online evaluate telomere lengths from terminal restriction fragment analysis. *BMC Bioinforma.* **22**, 145 (2021).
63. Reilly, C. R. et al. The clinical and functional effects of TERT variants in myelodysplastic syndrome. *Blood* **138**, 898–911 (2021).

Acknowledgements

We thank the patients and families for research participation. We thank L. Homfeldt and J. Seo for technical assistance. We thank A. Gutierrez for suggesting the TRACE acronym. We thank A. Shimamura, M. Fleming and the BCH Bone Marrow Failure/ Myelodysplastic Syndrome Registry (National Institutes of Health (NIH) grant R21DK099808). This study was supported by: National Institutes of Health grants: F30DK135340 (W.M.), T32GM007753 (W.M.), T32GM144273 (W.M.), T32GM145407 (A.C.), R01DK107716 (S.A.), R33HL154133 (S.A.); Boston Children's Hospital Translational Research Program (S.A.); Harvard Stem Cell Institute (S.A.); Team Telomere (S.A.); Million Dollar Bike Ride/Penn Medicine Orphan Disease Center (S.A.); Philanthropic gifts (S.A.). This content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Author contributions

S.A. and W.M. conceived of the study and designed experiments. W.M., A.C., and N.L. performed experiments. W.M. and A.C. analyzed the data and generated the figures. S.A. and W.M. wrote the paper with input and revisions from A.C. and N.L.

Competing interests

S.A. and W.M. are names as inventors on provisional patent applications relating to the data shown. The remaining authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58221-7>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Suneet Agarwal.

Peer review information *Nature Communications* thanks Tracy Bryan, Jayakrishnan Nandakumar and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. A peer review file is available.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2025