

Mecanismos de mantenimiento de telómeros

Hidalgo Bravo Alberto

¹Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío. Hospital Regional ISSSTE León. León, Guanajuato México. dr_genetica@yahoo.com

Los telómeros son estructuras formadas por ADN y proteínas que ayudan a proteger los extremos de los cromosomas lineales de ser reconocidos y procesados como rupturas de doble cadena y de esa manera mantener la integridad y estabilidad cromosómica. En mamíferos, los telómeros consisten en trectos del hexanucleótido TTAGGG, y su longitud varía desde 5 hasta 20 kilobases (kb) en células somáticas y células germinales respectivamente. Es importante mencionar que al inicio del telómero se encuentran algunos repetidos que se denominan degenerados por ser variantes del hexanucleótido TTAGGG, por ejemplo TCAGGG, TGAGGG, etc. La naturaleza del repetido canónico hace que una de las cadenas de ADN del telómero que corre en dirección 5'→3' sea rica en guaninas (cadena G), y por lo tanto la cadena complementaria que corre en dirección 3'→5' sea rica en citosinas (cadena C). Una de las principales características de los telómeros es que el extremo de la molécula de ADN no es romo, la cadena G forma una saliente de cadena sencilla, al cual se le ha nombrado el 3'overhang. El telómero es capaz de doblarse sobre sí mismo para formar un bucle, y de esta manera facilita que el 3'overhang invada la cadena C desplazando a la cadena G. Esta estructura que adquiere el telómero permite “ocultar” el fragmento de cadena sencilla evitando que sea reconocido como una ruptura de cadena del ADN.

Los telómeros se encuentran asociados a lo largo de todo el ciclo celular a un grupo de seis proteínas conocidas como el complejo de la shelterina, el cual consiste en TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y RAP1. Las proteínas TRF1 y TRF2 se unen a la región de doble cadena de repetidos teloméricos. Por otro lado POT1 es una proteína de unión a cadena sencilla que se encarga de proteger a la cadena rica en G que fue desplazada como consecuencia de la invasión del 3'overhang sobre la cadena C. Las proteínas TIN2 Y TPP1 se encargan de formar la conexión entre las proteínas de unión a doble cadena y las proteínas de unión a cadena sencilla, en tanto que RAP1 se encuentra asociada a TRF2. Además del complejo de la shelterina, existen proteínas

que se asocian con el telómero de manera transitoria de acuerdo al ciclo celular tales como las proteínas que intervienen en la reparación/replicación del ADN.

Bajo condiciones normales, en células somáticas los telómeros se acortan con cada división celular como consecuencia del llamado “problema de replicación”. Cuando los telómeros alcanzan cierta longitud crítica, la célula entra en un periodo llamado senescencia o M1, en el cual, la célula permanece metabólicamente activa pero detiene su replicación. Sin embargo, algunas células logran escapar de la senescencia mediante la inactivación de las vías dirigidas por p53 o retinoblastoma y continúan dividiéndose. Los telómeros de las células que escapan a la senescencia se siguen acortando hasta que alcanzan una longitud en la cual la célula entra a una etapa llamada crisis o M2. Las células en crisis empiezan a presentar telómeros disfuncionales e inestabilidad cromosómica, lo cual puede llevar a muerte celular. Sin embargo, algunas células logran activar un mecanismo para restablecer la longitud de los telómeros y continuar proliferando, sin embargo esto representa un riesgo latente de transformación neoplásica.

La activación de un método de mantenimiento de telómeros es una característica primordial de las células tumorales para lograr la inmortalidad. Existen por lo menos dos mecanismos conocidos para el mantenimiento de los telómeros, uno es la reactivación de la enzima telomerasa, el cual es usado por 85% de los cánceres humanos y el segundo es la activación de la vía alternativa de mantenimiento del largo de los telómeros (Alternative Lengthening of Telomeres, ALT), presente en el 15% de tumores malignos, en su mayoría sarcomas. La reactivación de la enzima telomerasa es el mecanismo mejor estudiado, en tanto que los mecanismos moleculares subyacentes de la vía ALT no han sido completamente aclarados. Hasta la fecha no se tiene claro de que depende que una célula active uno u otro mecanismo, llama la atención que en los tumores originados en tejidos derivados del mesodermo activen con mayor frecuencia el mecanismo ALT. En base a estos hallazgos, algunos autores han propuesto que en estos tejidos se tienen un mecanismo más estricto para controlar la expresión de la enzima telomerasa.

La telomerasa es una ribonucleoproteína con múltiples subunidades. La subunidad catalítica de la enzima, TERT (telomerase reverse transcriptase), posee una actividad de retrotranscriptasa y tiene homología con retrotranscriptasas virales. A diferencia de otras retrotranscriptasas, la telomerasa posee su propio templado de ARN, el cual se conoce como el componente de ARN de

la telomerasa (TERC). La secuencia de nucleótidos de TERC permite que la enzima extienda el extremo 3' del telómero mediante la adición de repetidos TTAGGG, la cadena complementaria es sintetizada mediante un mecanismo similar al mecanismo de reparación del ADN. Las subunidades TERT y TERC forman el núcleo de la enzima, ya que son suficientes para detectar la actividad de retrotranscriptasa *in vitro*. Además de estos dos componentes, existen otras subunidades que regulan la actividad enzimática y facilitan la unión de la enzima al telómero en una manera dependiente del ciclo celular. En humanos la expresión de TERC se encuentra en diversos tejidos, pero, la expresión de TERT está estrictamente controlada en células somáticas, por lo tanto el control de la actividad de telomerasa está dado por la regulación de la expresión de TERT. La actividad de telomerasa puede ser detectada en células madre embrionarias, células madre de médula ósea, espermatogonias entre otros tipos celulares. El conocimiento de la telomerasa ha sido utilizado para diseñar algunas estrategias antineoplásicas. Se ha intentado introducir inhibidores de la acción de telomerasa en las células neoplásicas, inmunoterapia dirigida hacia las células que expresan la telomerasa, transfección con genes bajo el control del promotor de la telomerasa cuyo producto genera un metabolito tóxico a partir de un sustrato específico. También se ha tratado de establecer si la presencia de actividad de telomerasa tiene alguna relación con el curso clínico y el pronóstico de la enfermedad, sin embargo aún no se ha logrado establecer una correlación constante.

Por otro lado, la evidencia existente sugiere que la vía ALT se basa en un mecanismo similar a la recombinación homóloga (RH). Estudios previos han mostrado que una secuencia que se inserta en un telómero específico puede ser copiada a otro telómero en células ALT+ más no en células telomerasa+. Otra observación es que los telómeros presentan mutaciones en la secuencia de repetidos que sólo pueden explicarse mediante la recombinación con una molécula no homóloga, a este tipo de mutaciones se le han llamado mutaciones complejas y no ocurren en células telomerasa+. Además el complejo MRN, que es clave para la RH, es indispensable para el progreso de la vía ALT. Las células ALT+ presentan ciertas características que las distinguen de las células telomerasa positivas:

- 1) Poseen ADN extracromosómico con repetidos teloméricos el cual puede estar en forma lineal o circular.

- 2) Cuerpos PML asociados a ALT (APBs). Los APBs contienen los elementos que se observan comúnmente en los cuerpos PML más ADN telomérico y proteínas involucradas en la reparación/replicación del ADN. Aún existe el debate si los APBs son los sitios donde se lleva a cabo la extensión del telómero.
- 3) Los telómeros presentan una gran heterogeneidad en su longitud con un rango que puede ir desde los 2 hasta los 50kb.
- 4) Se ha observado inestabilidad del microsatélite MS32 localizado en el cromosoma 1. Resulta interesante que es el único microsatélite que ha mostrado inestabilidad.
- 5) Tienen una alta tasa de intercambio de cromátides hermanas a nivel de telómero exclusivamente.

Se han propuesto diferentes modelos para explicar el mecanismo de recombinación homóloga que pudiera ocurrir en células ALT+. a) Uno de los modelos propone que una molécula de ADN telomérico extracromosómico (lineal o circular) puede servir como templado para la extensión de un telómero con un acortamiento crítico, b) otro modelo propone que la extensión puede iniciar con el 3'overhang actuando como cebador para iniciar la síntesis de la cadena rica en G y que posteriormente se extendería la cadena complementaria, c) el modelo mejor aceptado propone que una vez que un telómero se acorta de manera crítica utiliza la cromátide hermana o un cromosoma no homólogo como templado y se lleva un evento similar a la RH, que al resolverse podría resultar en un telómero muy largo y otro muy corto.

Es por esto que los genes que participan en la RH han sido estudiados para determinar si tienen una participación en la vía ALT. Existe un modelo en *S. cerevisiae* en el cual se generan levaduras telomerasa- y se obtienen dos tipos de sobrevivientes llamados tipo I y tipo II de acuerdo al mecanismo de regeneración de telómeros. Los sobrevivientes tipo II logran recuperar la longitud de los telómeros mediante un mecanismo similar RH, algo muy parecido a lo que se observa en las células de humanos ALT+. Los datos experimentales en levadura muestran que al menos existen dos vías para que ocurra la regeneración del telómero. Una de las vías es gobernada por Sgs1, que es el homólogo de la helicasa BLM y WRN, (asociadas al Síndrome de Bloom y Síndrome de Werner respectivamente), en cooperación con la exonucleasa exo1 o dna2. La otra vía es comandada por el complejo MRX y Sae2, cuyos homólogos en humanos son el complejo MRN y CtIP respectivamente, en esta vía también es necesaria la participación de exo1.

Aunque sólo un 15% de los tumores utilizan el mecanismo ALT, la identificación de los genes clave para su progresión podría establecer las bases para nuevas estrategias de tratamiento a fin de disminuir la sobrevivencia de las células neoplásicas.

En este trabajo investigó, mediante el uso de ARN de interferencia, el papel de las RecQ helicasas, BLM y WRN en la vía ALT, en una línea celular ALT+, esta línea celular se derivó de un paciente con Síndrome de Werner, es decir que no expresa la helicasa WRN. Adicionalmente, se investigó, mediante inmunofluorescencia y ARN de interferencia, el papel de la proteína CtIP, que ha sido descrita como un factor importante para la función del complejo MRN, en líneas celulares que usan la vía ALT.

La reducción en la expresión de BLM y WRN redujo la proliferación celular y aumentó la tasa de mutaciones en el telómero y en el microsatélite MS32. Resultó de especial interés que en la línea celular no se encontraron mutaciones complejas, ya que estas representan el 70% de las mutaciones que se han identificado en otras líneas celulares ALT+. Los resultados sugieren que en presencia de WRN se favorece el uso de moléculas no homólogas como templado para la extensión de telómeros en células ALT+, y que en presencia de BLM la extensión de los telómeros ocurre mediante la síntesis dependiente de alineación de cadena (SDSA).

Además, por primera vez se demostró que CtIP colocaliza con ADN telomérico en células ALT+ y no en telomerasa+. Se observó que la reducción al 50% de la expresión de CtIP retarda la velocidad de crecimiento en células ALT+. Sin embargo la reducción en la expresión de CtIP al 50% no parece tener efecto en la longitud del telómero, ni en la tasa de mutaciones teloméricas ni de MS32.

Los datos obtenidos sugieren que WRN y BLM juegan un papel importante en la vía ALT. Y que CtIP está presente en de manera preferencial en las células ALT+ posiblemente reclutado por el complejo MRN. Sin embargo existen otros genes que puedan estar participando en la vía ALT. Debe tratar de estudiarse como afecta la disminución de la expresión de EXO1 en líneas celulares ALT+. Es posible que la vía ALT en humanos existan por lo menos dos vías para el mantenimiento de los telómeros tal y como ocurre en los sobrevivientes tipo II de *S. cerevisiae*. Bajo este escenario resultaría interesante observar que ocurre en células ALT+ dobles mutantes para BLM y CtIP o triples mutantes para BLM, WRN y CtIP.

Bibliografía

Baird DM, Jeffreys AJ, and Royle NJ, 1995. Mechanisms underlying telomere repeat turnover, revealed by hypervariable variant repeat distribution patterns in the human Xp/Yp telomere. - EMBO J.1995 Nov 1;14(21):5433-43.,

Bonetti D, Martina M, Clerici M, Lucchini G, and Longhese MP, 2009. Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres. - Mol Cell.2009 Jul 10;35(1):70-81.

Chen, Q., Ijpma, A. and Greider, C.W., 2001. Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. Mol.Cell.Biol., 211819-1827.

De Boeck G, Forsyth RG, Praet M, and Hogendoorn PC, 2009. Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. - J Pathol.2009 Feb;217(3):327-44.,

Reddel RR, 2003. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. - Cancer Lett.2003 May 15;194(2):155-62.

Riethman H, 2008. Human telomere structure and biology. - Annu Rev Genomics Hum Genet.2008;9:1-19.,