



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**TELÓMEROS, TELOMERASA E INTEGRIDAD
CROMOSÓMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACEÚTICO
BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

OMAR MARTÍNEZ RAMÍREZ

ASESORA: DRA. GILDA FLORES ROSALES

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Por fin la tesis se ha finalizado. Han sido unos años muy marcados por los cambios a nivel personal, unos geniales y maravillosos, otros, desgraciadamente todo lo contrario. En este tiempo han sido muchas las personas a las que he tenido a mi lado animándome, ayudándome y ofreciéndome su tiempo, apoyo, cariño, confianza y.... paciencia.

Mama y Papa, por prepararme desde mi infancia no para una vida futura sino presente fulgurante original e irrepetible. Por que en sus enseñanzas conjugaron la pureza moral y la riqueza espiritual.

Román, Jennifer, Ivan, e Irina por el intercambio de valores espirituales, incrementando con ello el deseo de culminar mi formación académica.

A ti madrina por ayudarme a conocer el maravilloso mundo de la ciencia, por abrir la llama de la curiosidad, del afán del saber, de la sed de conocimiento.

Valeria, Cecia, Key, Keren y los que vengan por recordarme que en la infancia surge: el descubrimiento del mundo, la curiosidad por la incomparable sabiduría de la naturaleza, el conocimiento del hombre auténtico, y su grandeza.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por abrirme las puertas al mundo del saber

A la Dra. Gilda Flores Rosales por contribuir en mi desarrollo profesional, por compartir sus conocimientos y por sus enseñanzas.

Si tuviera que enumerar todo lo que tengo que agradecer a papá y mamá, necesitaría un tomo mucho más grande que esta tesis. Muchas gracias por comprenderme, quererme, confiar en mí y por estar siempre a mi lado.

Papa y mama gracias por su apoyo y consejos pues las palabras enseñan pero los ejemplos cautivan

A mis profesores gracias por sus enseñanzas y por transmitirme sus conocimientos y experiencias.

El proceso del conocimiento y aprendizaje comienza en la familia

V. Sujomlinski

La vida no es ningún pasillo recto y fácil que recorreremos libres y sin obstáculos, sino un laberinto de pasadizos, en el que tenemos que buscar nuestro camino, perdidos y confusos, detenidos, de vez en cuando, por un callejón sin salida. Pero, si tenemos fe, siempre se abre una puerta ante nosotros; quizás no sea la que imaginamos, pero si será, finalmente, la que demuestre ser buena para nosotros.

A.J Cronin

(1896-1981)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	II
OBJETIVO	IV
Capítulo 1.- CROMOSOMA	
Antecedentes	1
Cromatina	3
Histonas	7
Proteínas no histonas	12
Nucleosoma	13
Centrómeros	21
Telómeros	21
Capítulo 2.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL TELÓMERO	
Antecedentes	23
DNA telomérico	26
DNA subtelomérico	30
Características de las secuencias de DNA únicas adyacentes al telómero más sobresalientes	33

Proteínas teloméricas	34
Proteínas que interactúan con TRF1 en la estructura telomérica	39
Proteínas que interactúan con TRF2 en la estructura telomérica	44
Regulación de la longitud telomérica	46
Telómero y enfermedad	49
Función de los telómeros	51
Homeostasis del telómero	54

Capítulo 3.- **TELOMERASA**

Antecedentes	55
Subunidad hTERT	58
Subunidad hTER	61
Proteínas asociadas a hTERT	65
Proteínas asociadas a hTER	67
Estructura 3'-terminal de snoRNA de H/ACA en el dominio de hTER	68
Seudouridilación de hTER EN 5' y 3'	69
Elementos específicos para el RNA de la telomerasa en las horquillas 5' y 3' de hTER	71
Interacción de la subunidad catalítica y la subunidad RNA	72
Multimerización de la telomerasa funcional	72

Capítulo 4.- **REPLICACIÓN TELOMÉRICA**

Propagación de los telómeros por la telomerasa	74
Síntesis de la cadena retrasa (cadena-C) del telómero	81
Formación de la pinza de desplazamiento en la cadena-C del telómero	83
Ensamble de los fragmentos de Okazaki adyacentes a la cadena-C	86
Empaquetamiento del extremo telomérico	88
Incorporación del extremo extendido y procesamiento del extremo telomérico en un super enrollamiento (bucle- T) y la estructura asociada a proteínas	89

Capítulo 5.- **INTEGRIDAD CROMOSÓMICA**

Integridad cromosómica	91
Mecanismos de reparación del DNA	93
Proteínas de reparación telomérica	95
ATM	96
Proteína Ku	97
PARP	97
Complejo MRN	98
BLM	99
WRN	101

CONCLUSIONES	104
ABREVIATURAS	106
GLOSARIO	109
BIBLIOGRAFÍA	120

INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 40 se sabía que el DNA estaba formado por nucleótidos, que estaban compuestos por un grupo fosfato, un azúcar y bases nitrogenadas adenina, guanina, citocina y timina. En 1953, James Dewey Watson en conjunto con Francis Harry Compton Crik dilucidaron la estructura molecular del DNA, encontrando que está formada por dos hebras o cadenas alargadas que se enrollan formando una doble hélice en forma de escalera de caracol (llamada doble hélice), en donde cada peldaño esta representado por la unión de las bases nitrogenadas (Watson, 1972).

El conocimiento de la estructura molecular del DNA permitió la elucidación del código genético, la determinación del mecanismo y control de la síntesis de las proteínas, así como el mecanismo de transmisión de la información genética de la célula progenitora a las células hijas. El DNA contiene la información genética, es decir, la información que define a una especie y, dentro de ésta, incluso las características de cada individuo en particular (Gilchrist y Elgin, 2006).

Debido a que la longitud total del DNA celular es superior a cientos de miles de veces la longitud de una célula, el empaquetamiento del DNA es crucial para la arquitectura de la célula, así durante la interfase, cuando las células no se están dividiendo, el material genético existe como un complejo de nucleoproteínas llamado cromatina, disperso en la mayor parte del núcleo (Eissenberg y Elgin, 2005; Nye y col, 2006).

El DNA se encuentra dentro del núcleo celular, organizado en unas estructuras denominadas cromosomas (del griego, cuerpos coloreados). Un cromosoma es una estructura simétrica constituida por dos elementos idénticos, llamados cromátidas, cada una de las cuales está formada por una molécula de DNA de doble cadena asociada a proteínas. Aunque los cromosomas difieren en longitud y número entre las especies, los estudios citogenéticos demostraron que todos se comportan de manera similar en el momento de la división celular (Gilchrist, 2006).

Cualquier cromosoma eucarionte debe contener tres elementos funcionales para que se replique y se segregue correctamente: orígenes de replicación en los cuales las DNA polimerasas y otras proteínas inician la síntesis de DNA, el centrómero y los dos extremos o telómeros (Gilchrist, 2006).

El DNA en humanos está organizado en 22 pares de autosomas homólogos y dos cromosomas sexuales. Los cromosomas los podemos clasificar según la posición del centrómero en: metacéntricos, submetacéntricos, acrocéntricos y telocéntricos (Nye y col, 2006).

Los cromosomas se estudian durante la división celular, en la mitosis durante la metafase, ya que es cuando presentan un grado de condensación adecuado que permite su identificación y diferenciación de acuerdo a los patrones de bandas y la coloración. Ciertos colorantes tiñen selectivamente algunas regiones de los cromosomas en metafase más intensamente que otras y producen patrones característicos específicos de cromosomas individuales (Nye y col, 2006).

Las primeras observaciones acerca del número y el tamaño de los cromosomas y sus patrones de tinción condujeron al descubrimiento de muchas características generales importantes de la estructura de los cromosomas, de modo tal que dentro de la estructura cromosómica se pueden identificar regiones específicas (bandas) mediante tinciones como lo es el centrómero y los telómeros (Gilchrist, 2006).

Los telómeros son elementos estructurales de todos los cromosomas, se localizan en los extremos de todos los cromosomas de eucariontes, se encargan de asegurar la integridad cromosómica y la estabilidad total del genoma, los telómeros se asocian con proteínas para formar una estructura especializada que protege a los cromosomas de la fusión, de la degradación por nucleasas, de la

recombinación inadecuada, así mismo participan en el anclaje de los cromosomas a la matriz nuclear, juegan un papel muy importante durante la mitosis y la meiosis, así mismo en el apareamiento y recombinación homóloga (Martin y Ledbetter, 2006).

En los seres humanos, los telómeros se mantienen en las células germinales, pero se acortan al envejecer en la mayoría de las células somáticas, debido a la disminución en la actividad de la enzima telomerasa, ésta es un complejo ribonucleoproteico que tiene un peso molecular aproximadamente de un megadalton, formado por una subunidad de estructura proteínica que contiene un dominio de transcriptasa reversa (transcriptasa reversa de la telomerasa, TERT) y una plantilla que contienen RNA (componente del RNA de la telomerasa, TERC, TR, TER), esta plantilla se utiliza para dirigir la adición de repeticiones teloméricas en la cadena sencilla de DNA, además de otras funciones importante como la extensión del extremo cromosómico mediado por la telomerasa y el mantenimiento del DNA telomérico que implica actividades adicionales, como por ejemplo la síntesis, procesamiento y regeneración adecuada del extremo cromosómico (Ju y Rudolph, 2006).

De tal forma que el acortamiento del telómero en células somáticas conduce eventualmente al decremento en la adecuada replicación del material genético de la célula, debido a que la telomerasa es incapaz de reestablecer la estructura del telómero, en consecuencia se origina una inestabilidad o fragilidad en el cromosoma y como resultado la célula entrará en un proceso de crisis seguida de la muerte celular. La inestabilidad cromosómica (CIN, Chromosomal Instability) tendría su origen en la alteración de genes que afectan a la segregación de los cromosomas durante la mitosis y meiosis (Blasco, 2005).

Es importante señalar que un acortamiento de manera natural en la longitud de los telómeros ocurre en el curso del envejecimiento, cuyas disminuciones son

generalmente del orden de 10 a 200 pares de bases por año según los diferentes tipos de tejidos. El envejecimiento es el proceso por el cual la mayoría de las células humanas normales experimentan una disminución en la proliferación celular llamándole senescencia. Éste proceso es dependiente del acortamiento de los telómeros, de la actividad de la telomerasa y de la integridad cromosómica (Admire y col, 2006).

OBJETIVO

La finalidad de este trabajo es realizar una investigación documental de fuentes bibliográficas, hemerográficas y de sitios WEB mediante la utilización de bases de datos para conocer la relación que guarda el telómero, la telomerasa y la integridad del cromosoma con algunas enfermedades poco conocidas, las cuales en la actualidad son temas novedosos, amplios e interesantes que no se encuentran profundamente revisados en los libros de texto y de consulta en español, a los que solamente se puede tener acceso mediante revistas y artículos especializados.

En base a esto se podrá conocer la importancia de la función de la telomerasa en la estructura y empaquetamiento de los telómeros, los cuales son sensores de la fidelidad del genoma y son necesarios para la integridad y estabilidad cromosómica, además de ser importantes en la correcta transmisión de la información genética, en el apareamiento cromosómico, en la división celular, y son esencialmente importantes para mantener la homeostasis cromosómica y celular, necesarias para la viabilidad y proliferación celular.

CROMOSOMA

ANTECEDENTES

El núcleo de una célula contiene la información genética. Esta información reside en los cromosomas, en forma de genes. Los cromosomas se descubrieron en el siglo XIX, una de las primeras imágenes conocidas de los cromosomas humanos fueron realizadas por el patólogo alemán J. Arnold en 1879; Arnold examinó las células de carcinoma y sarcoma porque el volumen de sus núcleos facilitó el análisis. En 1888 Heinrich Wilhel Gottfried Waldeyer describió unas estructuras en el núcleo en forma de filamentos a las que llamó cromosomas, esta palabra se deriva del griego chroma que significa color y soma que significa cuerpo, es decir cuerpo coloreado (Speicher, 2006).

En 1924 Theophilus Painter realizó finos cortes de testículo, fijando las células con sustancias químicas y examinándolas al microscopio, tratando de realizar un conteo de la masa enredada de cromosomas y llegando a contar 24 pares de cromosoma. Sorprendentemente, este hecho se quedó indisputable durante 30 años. No fue hasta 1955, cuándo Joe-Hin Tjio y Albert Levan, utilizando mejores técnicas, informaron que el número de cromosomas humanos no era de 48 sino de 46; este trabajo fue confirmado por los estudios de Ford y Hamerton en 1956 (Speicher, 2006; Nye y col, 2006).

El número de cromosomas presentes en el núcleo proporciona las características de cada especie. Por ejemplo, *Drosófila melanogaster* tiene ocho cromosomas, *Mus musculus* tiene 40 cromosomas y *Gallus domesticus* tiene 78 cromosomas (Speicher, 2006).

Los cromosomas humanos se encuentran en células somáticas por pares. Un miembro de cada par cromosómico proviene de la madre y el otro del padre, cada par recibe el nombre de cromosomas homólogos. Las células que contienen los

pares de cromosomas homólogos se conocen como células diploides (Speicher, 2006). Ciertas células, como los óvulos y espermatozoides (gametos), contienen una sola copia de cada cromosoma y se les llama células haploides. Los cromosomas están estructurados por varios componentes diferentes, tales como heterocromatina y eucromatina, centrómeros y telómeros (Higgins, 2007; Speicher, 2006; Eissenberg y Elgin, 2005).

En los organismos eucariontes el DNA es almacenado en el núcleo celular en forma de cromatina, este DNA se encuentra organizado en la estructura cromosómica, mediante la asociación de DNA y proteínas básicas llamadas histonas, que son las encargadas de la organización y empaquetamiento del DNA en la estructura del cromosoma (Higgins, 2007).

El papel principal de la molécula de DNA es el de ser portador de la información genética de cada individuo y ser el transmisor de dicha información de una generación a otra (Higgins, 2007).

El DNA es una macromolécula compleja, compuesta por dos cadenas que se entrelazan entre sí formando una doble hélice. Cada cadena está formada por varios nucleótidos o bases nitrogenadas (A, G, C y T), ambas cadenas están unidas entre sí, mediante el apareamiento de bases (A-T y G-C) por puentes de hidrógeno (Higgins, 2007).

Debido a que la longitud total del DNA celular es superior a cientos de miles de veces la longitud de una célula, el empaquetamiento del DNA es crucial para la arquitectura de la célula (Doenecke y Albig, 2006). Durante la interfase, cuando las células no se están dividiendo, el material genético existe como un complejo de nucleoproteínas llamado cromatina, disperso en la mayor parte del núcleo. El posterior plegamiento y compactación de la cromatina durante la mitosis produce los cromosomas metafásicos visibles (Speicher, 2006; Gilchrist, 2006).

Una célula humana promedio contiene casi 6000 millones de pares de bases de DNA divididas entre 46 cromosomas, cada cromosoma contiene una sola molécula continua de DNA; cuanto mayor sea el cromosoma más largo el DNA que contiene. Puesto que cada par de bases ocupa casi 0.34 nm de longitud de una molécula de DNA, 6000 millones de pares de bases equivalen a una molécula de DNA de dos metros de largo. Además, el DNA del interior de una célula se enlaza a una gran cantidad de agua (casi seis moléculas de agua por par de bases), que expande su volumen aún más (Doenecke y Albig, 2006).

CROMATINA

La cromatina es una estructura fibrilar constituida químicamente por DNA e histonas, la cromatina se encuentra en el interior del núcleo y se asocia con el nucléolo y con la envoltura nuclear (Larizza y Doneda, 2006).

Cada cromosoma consiste de una única molécula de DNA lineal muy larga asociada a proteínas que pliegan la fina hebra de DNA en una estructura más compacta, las proteínas que se unen al DNA de los cromosomas eucariotas se clasifican en dos grupos: las proteínas histonas y las proteínas cromosómicas no histonas, al complejo formado por el DNA cromosómico y las dos clases de proteínas se le llama cromatina (Doenecke y Albig, 2006).

Además de las proteínas involucradas en la condensación del DNA, los cromosomas también se asocian con otras proteínas que intervienen en la expresión génica, la replicación y reparación del DNA (Higgins, 2007).

Las histonas son responsables del primer nivel de organización de la cromatina que es una fibra de cromatina con un diámetro de 10 nm y es una forma de cromatina menos compacta que se parece a una serie regular en forma de collar de perlas, que es básica para la estructuración del nucleosoma el cual constituye el primer nivel de empaquetamiento de DNA en el cromosoma (Eissenberg y Elgin, 2005).

Los nucleosomas están formados por un centro o "core" de histonas, dicho centro posee dos copias de cada una de las siguientes histonas: H2A; H2B; H3 y H4, dicha estructura se organiza, a su vez, en fibras de 30nm llamada solenoide, esta estructura se forma por 6 nucleosomas por vuelta de solenoide de manera helicoidal, girando a manera de resorte alrededor de un eje virtual, los solenoides también siguen un proceso de enrollamiento y forman los bucles de cromatina (Doenecke y Albig, 2006).

En el siguiente nivel de empaquetamiento, las fibras de 30 nm se organizan en una serie de bucles o asas superenrolladas, estos bucles se estabilizan gracias a la interacción con las proteínas de la matriz nuclear o andamiaje nuclear ("scaffold"). Consecuentemente el andamiaje o matriz nuclear se convierte en el centro de la estructura del cromosoma, y como la compactación continúa, éste se pliega modo de acordeón (Nye y col, 2006).

La unión entre la cromatina y la matriz se da a nivel de zonas altamente conservadas, denominadas secuencias SAR o MAR (scaffold associated regions/matrix attachment regions). Las SAR son regiones de varios cientos de pares de bases ricas en residuos de adenina y timina, abundantes en la heterocromatina (Larizza y Doneda, 2006).

Los estudios realizados en los años 30 con microscopía óptica permitieron distinguir dos tipos de cromatina en el núcleo interfásico de los organismos eucariotas: una forma condensada, llamada heterocromatina la que se encuentra metilada, teniendo como resultado un andamiaje muy plegado en su estructura y otra que se encuentra menos condensada llamada eucromatina, en donde el andamiaje es más lineal, formando bucles más amplios porque está fuertemente acetilada haciendo que el grado de empaquetamiento de la eucromatina sea menor y más accesible para la transcripción de sus genes (Tabla 1.1) (Eissenberg y Elgin, 2005).

Tabla 1.1 DIFERENCIAS ENTRE LA EUCROMATINA Y LA HETEROCROMATINA

Rasgo	Euromatina	Heterocromatina
Apariencia en interfase	Descondensada (ligeramente teñida)	Condensada (densamente teñida; picnótico)
Localización cromosómica	Brazo distal	Región pericentromérica, telomérica
Fase de replicación	Durante la fase S	Después de la fase S
Composición de la secuencia de DNA	DNA único con secuencias intermedias repetidas	DNA repetitivo: satélite, bloque de secuencias intermedias repetidas
Densidad genética	Variable	Baja
Localización nuclear	Dispersa	Compacta, en la periferia nuclear o entorno al nucléolo
Recombinación meiotica	Significante	Insignificante
Metilación de DNA (vertebrados y plantas)	Hipometilación cerca de los genes transcritos	Hipermetiladas
Acetilación de histonas	Alta	Baja
Espacio en el nucleosoma	Irregular	Regular
Accesibilidad por nucleasas	Variable	Bajo

Tomado de Eissenberg, 2005

Euromatina

La euromatina se encontraría al menos en dos estados, la euromatina accesible, que representa alrededor del 10%, donde se encuentran los genes que se están transcribiendo y la euromatina poco accesible, más condensada (pero menos que la heterocromatina), donde están los genes que la célula no está transcribiendo (Larizza y Doneda, 2006).

La euromatina constituye la mayor parte de los cromosomas interfásicos y corresponde a los dominios de las fibras de cromatina de 30 nm que están organizados en bucles, sin embargo la euromatina se encuentra interrumpida por

regiones de heterocromatina, en donde las fibras de cromatina de 30 nm están sometidas a plegamientos adicionales de empaquetamiento que generalmente hacen que estas regiones sean resistentes a la expresión de genes (Eissenberg y Elgin, 2005) .

Cuando las células salen de la mitosis algunas regiones del cromosoma permanecen desespirilizadas desvaneciéndose y dispersándose en el núcleo de las células hijas, a esta región de la cromatina se le llama eucromatina y contiene la mayor parte de genes transcripcionalmente activos (Eissenberg y Elgin, 2005; Speicher, 2006).

Heterocromatina

Luego de concluir la mitosis, la mayor parte de la cromatina que compone a los cromosomas mitóticos altamente empaquetados se dispersa, y regresa a su condición difusa de la interfase, en la mayor parte de las células casi 10% del material cromosómico permanece en forma condensada compacta durante la interfase, a la cromatina que permanece condensada durante la interfase se le denomina heterocromatina y se cree que contiene elementos cuya influencia puede propagarse hacia afuera a cierta distancia, afectando el estado fisiológico de los genes cercanos (Larizza y Doneda, 2006).

La heterocromatina se divide en dos categorías, heterocromatina constitutiva y heterocromatina facultativa, según su permanencia en estado compacto (Eissenberg y Elgin, 2005).

La heterocromatina constitutiva permanece en estado condensado en todas las células y en todo momento, y por lo tanto representa al DNA permanentemente silencioso (Larizza y Doneda, 2006). En células de mamíferos, la masa de la heterocromatina constitutiva se sitúa dentro del centrómero de cada cromosoma y

alrededor del mismo, y en unos pocos sitios seleccionados como el corpúsculo de Barr y el brazo distal del cromosoma Y en mamíferos (Eissenberg y Elgin, 2005)

El DNA de heterocromatina constitutiva consta principalmente de secuencias altamente repetidas como por ejemplo el DNA satélite el cual es altamente repetitivo encontrándose en los cromosomas acrocéntricos, en las regiones centroméricas y teloméricas de todos los cromosomas, las constricciones secundarias de 1q, 9q, 16q y el brazo largo del cromosoma Y; mientras que los minisatélites de DNA se observan en las regiones subteloiméricas de los cromosomas humanos y por último los microsatélites los cuales son mononucleótidos que se encuentran dispersos a través de los cromosomas (Larizza y Doneda, 2006).

En muchas plantas, los extremos de los cromosomas (telómeros) también contienen bloques de heterocromatina constitutiva (Speicher, 2006). En realidad, cuando los genes normalmente activos se desplazan a una posición adyacente a la heterocromatina, tienden a inactivarse por sí mismos, fenómeno conocido como efecto de posición (Eissenberg y Elgin, 2005)

La heterocromatina facultativa se llama así porque tiene la facultad de inactivarse en un determinado momento, ésta heterocromatina toma la forma de un cromosoma completo que es inactivo en una línea celular, pero que puede expresarse en otras circunstancias. El ejemplo por excelencia es la inactivación de uno de los cromosomas X en mujeres XX normales, lo que permite mantener el equilibrio génico entre ambos sexos (Higgins, 2007; Larizza y Doneda, 2006).

HISTONAS

Las histonas son los componentes proteicos más importantes de los cromosomas de eucariontes, de tal forma que estas proteínas son parte elemental de la arquitectura en la organización del genoma eucaríotico (Doenecke y Albig, 2006).

Las histonas son, con mucho, las proteínas más abundantes asociadas con el DNA eucarionte. En condiciones normales las células eucariontes contienen cinco histonas abundantes: H1, H2A, H2B, H3 y H4 (Higgins, 2007).

Las histonas H2A, H2B, H3 y H4, tienen un dominio N-terminal sumamente básico, una parte globular central, y especialmente en H2A, H2B, H3 un dominio C-terminal más corto (Doenecke y Albig, 2006).

Los dominios globulares de las cuatro histonas centrales varían en la estructura primaria, pero en la estructura terciaria los dominios son semejantes produciendo un empaquetamiento mayor (Doenecke y Albig, 2006).

Las interacciones entre los dominios centrales de histonas tienen como resultado la formación de dímeros de H2A / H2B y tetrámeros que consisten en dos moléculas de H3 y dos moléculas de H4 (Figura, 1.1), juntas forman una estructura octamérica la cual es un núcleo de proteínas al cual se le enrolla el DNA nucleosómico (Doenecke y Albig, 2006).

La histona H1 no es parte de la partícula nucleosómica central, sino que se une al DNA ligador y, por lo tanto, se le denomina histona ligadura. Las cuatro histonas centrales están en cantidades iguales en las células, mientras que la H1 exhibe la mitad de la abundancia que las otras histonas (Luger, 2001). La H1 tiene una estructura de tres dominios, el dominio N-terminal se encuentra libre de aminoácidos básicos, mientras que el segundo dominio es rico en residuos de lisina, el dominio central es menos básico y tiene una estructura globular, en esta estructura se encuentran varios factores de transcripción (Doenecke y Albig, 2006). Por otro lado el C-terminal de la histona H1 es rico en residuos básicos, esta parte se encuentra implicada en la formación de estructuras del más alto orden de empaquetamiento de la cromatina, mientras que el dominio globular es esencial para el empaquetamiento del DNA a nivel del nucleosoma (Doenecke y Albig, 2006).

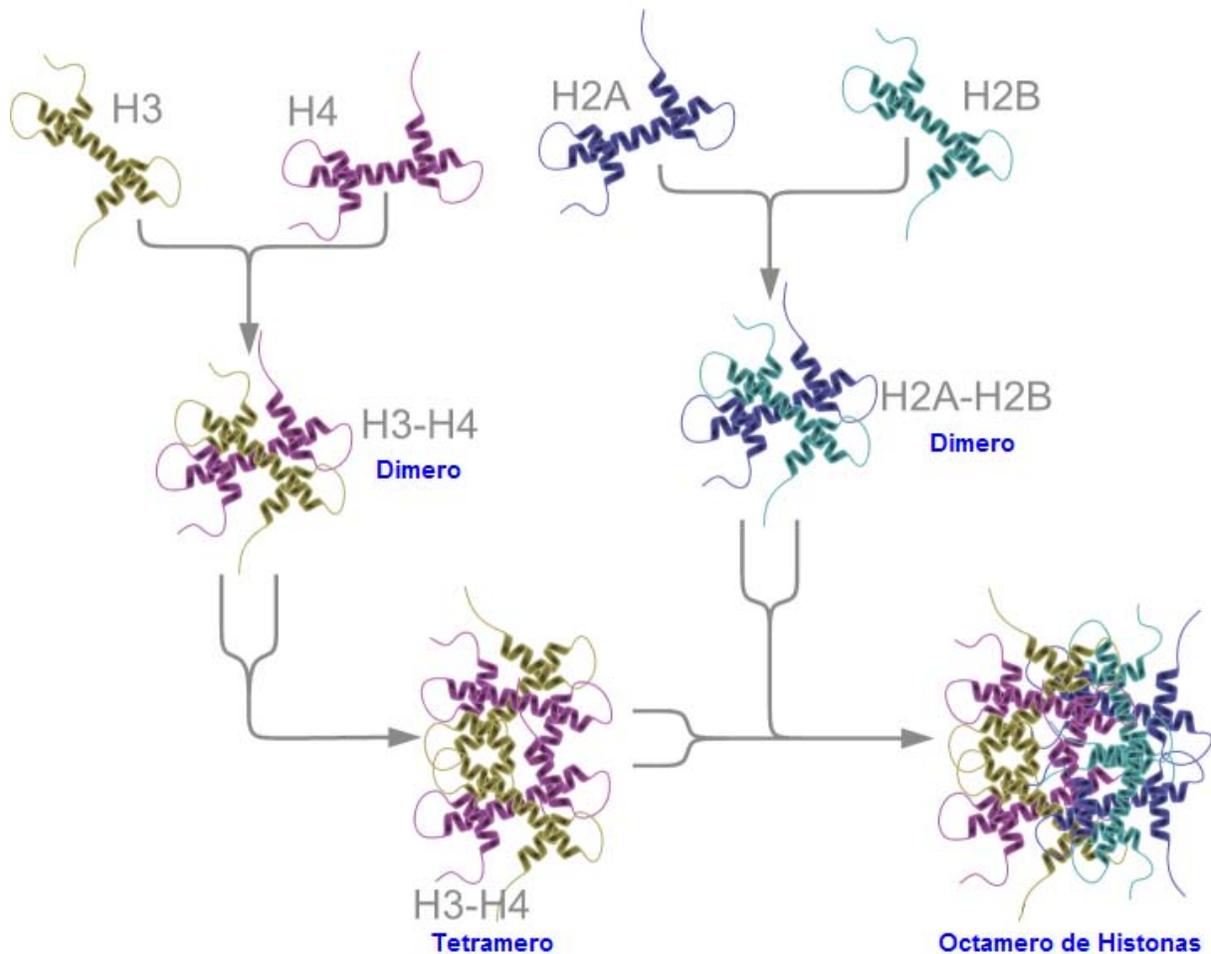


Figura 1.1 Estructura y organización de histonas. Tomada de Alberts, 2002.

Los cinco tipos principales de histonas denominadas *H1*, *H2A*, *H2B*, *H3* y *H4*, son ricos en aminoácidos básicos cargados positivamente, que interactúan con los grupos fosfato cargados negativamente del DNA (Nye y col, 2006).

Las secuencias de aminoácidos de cuatro histonas (*H2A*, *H2B*, *H3* y *H4*) presentan notable similitud entre especies remotamente relacionadas. Por ejemplo, las secuencias de la histona *H3* del tejido del erizo de mar y del timo de ternero difieren sólo por un aminoácido, y la *H3* del poroto (*Phaseolus vulgaris*) y el timo de ternero difieren sólo en cuatro aminoácidos (Doenecke y Albig, 2006).

La secuencia de aminoácidos de la H1 varía más de un organismo a otro que las secuencias de las otras histonas en ciertos tejidos, la H1 es reemplazada por histonas especiales, por ejemplo en los eritrocitos nucleados de las aves aparece una histona denominada H5 en lugar de la H1, la similitud en las secuencias entre las histonas de todos los eucariontes sugiere que se pliegan en conformaciones tridimensionales muy similares que alcanzaron niveles óptimos para la función de las histonas en un punto temprano de la evolución en un ancestro común de todos los eucariontes modernos (Doenecke y Albig, 2006).

Los residuos básicos de aminoácidos del núcleo central de las histonas se agrupan sobre uno o ambos extremos de la molécula, y por lo tanto el resto de la molécula permanece con carácter relativamente hidrofóbico. Esta separación es ideal para la organización del nucleosoma. Las partes más hidrofóbicas, partes no cargadas de las histonas, ocupan el centro de la partícula del nucleosoma y por lo tanto promueven su agregación en un núcleo apretado. Por lo contrario, las partes básicas polares del núcleo de las histonas forman apéndices flexibles dirigidos hacia el exterior de la partícula, donde los residuos con carga positiva se encuentran disponibles para generar interacciones iónicas con grupos fosfato cargados negativamente del esqueleto de DNA. Aún cuando el DNA se encuentra íntimamente asociado con el núcleo de la histona sobre la superficie interna de la fibra helicoidal, la superficie externa del DNA todavía está expuesta y accesible para interactuar con moléculas reguladoras (Luger, 2001).

Cada una de las histonas que conforman el núcleo del nucleosoma contiene un extremo amino flexible de 11 a 37 residuos que se extienden desde la estructura fija del nucleosoma, estos extremos se llaman *colas de las histonas*. Cada una de las H2A también contiene una cola C-terminal flexible. Las colas de las histonas se requieren para que la cromatina se condense desde la conformación de perlas de un collar a la fibra de 30 nm. Varias cadenas laterales de lisinas cargadas positivamente en las colas de las histonas pueden interactuar con el DNA espaciador y las colas de un nucleosoma. Las lisinas de la cola de histona, sobre

todo aquellas en H3 y H4, sufren acetilación y desacetilación reversibles mediante enzimas que actúan sobre lisinas específicas en el N-terminal (Higgins, 2007). En la forma acetilada, la carga positiva del grupo ϵ -amino de la lisina se neutraliza y elimina su interacción con un grupo fosfato del DNA. Por ende, mientras más grande es la acetilación del N-terminal de la histona, menor será la probabilidad de que la cromatina forme fibras condensadas de 30 nm y posiblemente estructuras plegadas de orden superior (Eissenberg y Elgin, 2005).

Las colas de las histonas también pueden unirse a otras proteínas asociadas con la cromatina que influyen en la estructura de la cromatina, en procesos como la transcripción y la replicación del DNA. La interacción de las colas de las histonas con estas proteínas es regulada mediante diversas modificaciones covalentes de cadenas laterales de aminoácidos de la cola de histona (Higgins, 2007). Éstas incluyen la acetilación de los grupos ϵ -amino de la lisina, al igual que la metilación de estos grupos, el cual es un proceso que evita la acetilación, manteniendo así su carga positiva; las cadenas laterales de arginina también pueden ser metiladas, mientras que las cadenas laterales de serina y treonina pueden ser fosforiladas introduciendo una carga negativa (Holland, 2003). También una única molécula de ubiquitina de 76 aminoácidos puede añadirse a algunas lisinas. Hay que recordar que la adición de múltiples moléculas de ubiquitina conectadas a una proteína puede marcarla para ser degradada por el proteosoma. En este caso, la adición de una única ubiquitina no afecta la estabilidad de una histona, pero influye en la estructura de la cromatina; los múltiples tipos de modificaciones covalentes de las colas de histona pueden influir en la estructura de la cromatina alterando las interacciones del DNA con la histona y las interacciones entre los nucleosomas con la consiguiente interacción con proteínas adicionales que participan en la regulación de la transcripción (Holland, 2003).

PROTEÍNAS NO HISTONAS

La masa total de las histonas asociadas con el DNA en la cromatina es aproximadamente igual a la del DNA. La cromatina de la interfase y los cromosomas en metafase también contienen pequeñas cantidades de un complejo grupo de otras proteínas de unión al DNA asociados con la cromatina en interfase. La estructura y la función de estas proteínas no histonas, es ayudar a regular la transcripción, otras proteínas no histonas menos abundantes asociadas con la cromatina regulan la replicación del DNA durante el ciclo celular eucarionte (Holland, 2003).

Aunque las histonas son las proteínas predominantes en los cromosomas, las proteínas no histona también están involucradas en la organización de la estructura del cromosoma. Junto a las proteínas histonas que forman el nucleosoma, el cual es la unidad estructural básica para el empaquetamiento de la cromatina en eucariontes, también se encuentran las proteínas no histonas como lo son las proteínas encargadas del mantenimiento de la estructura del cromosoma (SMC) y las proteínas de alta movilidad (HMG) las cuales son esenciales para el subsiguiente nivel de organización cromosómico (Holland, 2003)

Proteínas no histonas proporcionan un armazón estructural para los bucles largos de cromatina y desempeñan papeles esenciales en el ciclo celular, incluyendo el alto orden de organización del cromosoma, el empaquetamiento y la arquitectura local de la cromatina (Holland, 2003).

Las proteínas SMC pertenecen a una familia de genes que codifican proteínas asociadas al cromosoma, involucrándose en la cohesión y condensación cromosómica, de tal forma que la transmisión exacta del material hereditario durante la división celular depende de tres procesos fundamentales e interrelacionados, llamados cohesión del cromosoma, condensación y segregación (Holland, 2003).

Las proteínas de SMC forman dímeros en una orientación antiparalela permitiendo que ambos brazos interactúen recíprocamente y potencialmente con ATP y DNA, también están involucradas en la organización de las cromátides y son clasificadas en cuatro subtipos. SMC1 y SMC3 son subtipos en el complejo de multiproteínas de cohesina, mientras SMC2 y SMC4 son componentes del complejo de multiproteínas de condensita (Holland, 2003).

Las proteínas del Grupo de alta-movilidad (HMG) son abundantes proteínas no histónicas, identificadas en los extractos de la cromatina en los años setenta, y se llaman así por su alta movilidad electroforética cuando son separadas en gel de dodecil sulfato de sodio (Holland, 2003).

Las proteínas de HMG funcionan como los componentes arquitectónicos de la cromatina debido a que pueden modificar directamente el DNA o vía nucleosómica al abrir la cromatina, haciéndola accesible a los factores de transcripción y estabilizar los complejos multiproteína que regulan la transcripción de un gen vecino (Holland, 2003).

NUCLEOSOMA

En 1974, Roger Kornberg, de la Universidad de Harvard, propuso la estructura de la cromatina, sugiriendo que el DNA y las histonas se encuentran organizados en subunidades repetitivas denominadas nucleosomas.

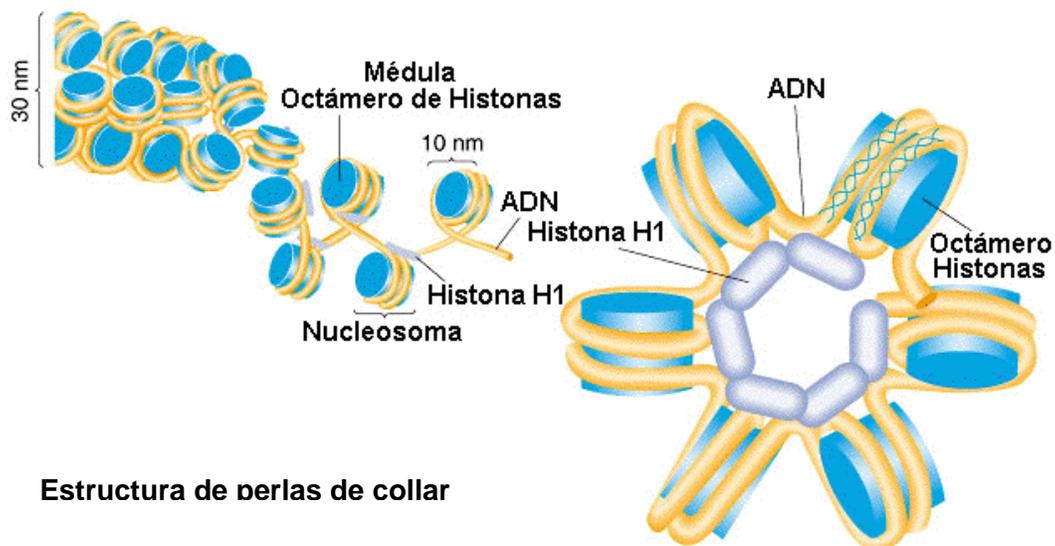
La mayoría del DNA en las células eucariotas está condensado en nucleosomas, estos se componen de un centro o núcleo de ocho proteínas histonas y DNA enroscado a su alrededor. El DNA entre cada nucleosoma (el "hilo" que sostiene las "perlas del collar") se conoce como DNA ligador o DNA separador. Por armarse en nucleosomas, el DNA se compacta unas seis veces (Figura 1.2). Esto es muy poco comparado con la compactación del DNA de 1000 a 10 000 veces que se observa en las células eucariotas. Sin embargo, esta primera etapa de condensación del

DNA es indispensable para que se produzca el resto de los niveles de compactación del DNA (Holland, 2003).

El DNA asociado en forma más estrecha con el nucleosoma, llamado DNA central, rodea más o menos 1,65 veces el exterior del octámero de histonas, como hilo alrededor de una bobina (Doenecke y Albig, 2006).

La longitud de 147 pares de bases de este DNA es una característica invariable de los nucleosomas en todas las células eucariotas (Holland, 2003), de tal forma que la formación de los nucleosomas representa el primer paso importante en el proceso de empaquetamiento (Nye y col, 2006).

El núcleo proteico del nucleosoma es una estructura con forma de disco que se arma de una manera ordenada solo en presencia de DNA (Figura 1.2). Sin DNA, las histonas centrales forman aglomeraciones intermedias en solución. Una región conservada que está en toda histona central, llamada dominio de pliegue histónico, media el armado de estos intermediarios, compuestos nada más que de histonas (Holland, 2003; Doenecke y Albig, 2006).



Estructura de perlas de collar

Figura 1.2 Compactación de DNA seis veces con ayuda del octámero de histonas. Tomado de Griffith, 2002.

El pliegue histónico está formado por tres regiones helicoidales α separadas por dos asas cortas no estructuradas. En cada caso, el pliegue histónico media la formación de heterodímeros cabeza-con-cola de pares de histonas específicas. Las histonas H3 y H4 primero forman heterodímeros que luego se reúnen para formar un tetrámero con dos moléculas de cada una de las histonas H3 y H4 (Figura 1.2) En cambio, H2A y H2B forman heterodímeros en solución, pero no tetrámeros (Nye y col, y col 2006).

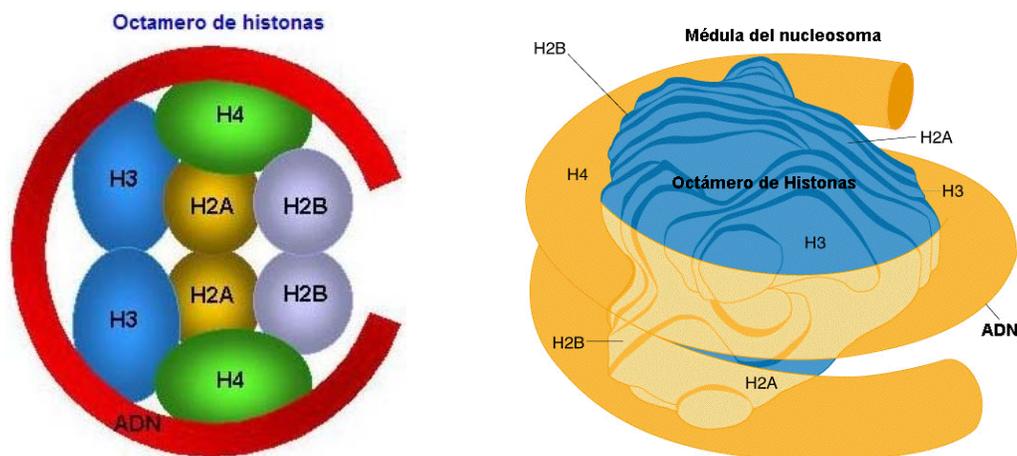


Figura 1.3 Orden de formación del nucleosoma en presencia de DNA. Tomado de Griffith, 2002.

El armado de un nucleosoma comprende la asociación ordenada de estas subunidades proteicas con el DNA. Primero, el tetrámero de las moléculas H3-H4 se une al DNA, luego dos dímeros H2A-H2B se unen al complejo H3-H4-DNA para formar el nucleosoma definitivo (Doenecke y Albig, 2006).

Las regiones de pliegue histónico del tetrámero H3-H4 interactúan con los 60 pares de bases centrales. La región N-terminal de la H3 más proximal con respecto a la región de pliegue histónico forma una cuarta hélice que interactúa con las 13 pb finales en cada extremo del DNA unido, el tetrámero H3-H4 forma la mitad superior del octámero de histonas. Cada uno de los dos dímeros H2A -H2B se asocia con alrededor de 30 pb de DNA a cada lado de los 60 pb centrales del DNA unido a H3 y H4, en conjunto, los dos dímeros H2A -H2B forman la parte inferior del octámero

histónico que atraviesa el disco desde los extremos del DNA (Speicher, 2006; Doenecke y Albig, 2006).

La asociación del DNA con el resto del nucleosoma está mediada por una gran cantidad de enlaces de hidrógeno entre las histonas y el DNA. La mayor parte de estos enlaces de hidrógeno se establece entre las proteínas y los átomos de oxígeno en los enlaces fosfodiéster cerca del surco menor del DNA. Solo siete enlaces de hidrógeno se forman entre cadenas laterales de las proteínas y las bases en el surco menor del DNA (Eissenberg y Elgin, 2005; Nye y col, y col 2006).

La gran cantidad de estos enlaces de hidrógeno provee la fuerza impulsora para curvar el DNA. La naturaleza muy básica de las histonas también sirve para enmascarar la carga negativa de los fosfatos que se resistirían a la curvatura del DNA. Asimismo, facilita la aproximación precisa de las dos hélices de DNA contiguas necesaria para que éste gire más de una vez alrededor del octámero de histonas (Higgins, 2007).

La estructura del nucleosoma también indica algo sobre las colas N-terminales de las histonas. Las cuatro colas de H2B y H3 emergen entre las dos hélices de DNA. Su trayecto de salida está formado por dos surcos menores contiguos, lo que genera una "brecha" entre las dos hélices de DNA del tamaño suficiente solo para una cadena polipeptídica (Holland, 2003).

Las colas de H4 y H2A emergen de las superficies superior o inferior del octámero, al emerger entre las hélices de DNA y a cada lado de éstas, las colas de las histonas sirven como los surcos de un tornillo y dirigen el enroscamiento del DNA alrededor del disco octamérico de histonas de un modo levógiro, en consecuencia la naturaleza levógira del enroscamiento del DNA le introduce superenrollamiento negativo (Doenecke y Albig, 2006).

Una vez que se forman los nucleosomas, el paso siguiente en la condensación del DNA es la unión de la histona H1. Al igual que las histonas centrales, la H1 es una proteína pequeña de carga positiva. La H1 interactúa con el DNA ligador entre los nucleosomas, además de afirmar la asociación del DNA con los otros componentes del nucleosoma (Doenecke y Albig, 2006).

La histona H1 tiene la propiedad inusual de unirse a dos regiones distintas del dúplex de DNA. Es típico que estas dos regiones pertenezcan a la misma molécula de DNA asociada con un nucleosoma. Los sitios de unión de la H1 se ubican de manera asimétrica en relación con el nucleosoma. Una de las dos regiones que se unen a la H1 es el DNA ligador en un extremo del nucleosoma. El segundo sitio de unión al DNA se encuentra en la parte media de los 147 pb asociados. La unión de la H1 produce un ángulo de entrada del DNA al nucleosoma y un ángulo de salida de éste que son más definidos. Este efecto, hace que el DNA nucleosómico adopte un aspecto en zigzag distintivo (Doenecke y Albig, 2006).

La unión de H1 estabiliza las estructuras cromatínicas de orden superior. Esta estructura, corresponde al nivel siguiente de condensación del DNA, lo más importante es que la incorporación del DNA en esta fibra lo torna menos accesible a muchas enzimas dependientes de DNA (Speicher, 2006).

El cromosoma eucarionte es una estructura lineal compuesta de una molécula de DNA inmensamente larga que está enrollada alrededor de los octámeros de histona aproximadamente cada 200 pb, formando cordones de nucleosomas estrechamente empaquetados. Los nucleosomas se pliegan para formar una fibra de cromatina de 30 nm, la cual está adherida a un armazón de proteína flexible a intervalos de millones de pares de bases, lo que produce largos bucles de cromatina que se extienden desde el armazón (Figura 1.4). Además de esta estructura general, un conjunto complejo de miles de proteínas reguladoras poco abundantes se asocian con secuencias específicas en el DNA cromosómico (Higgins, 2007).

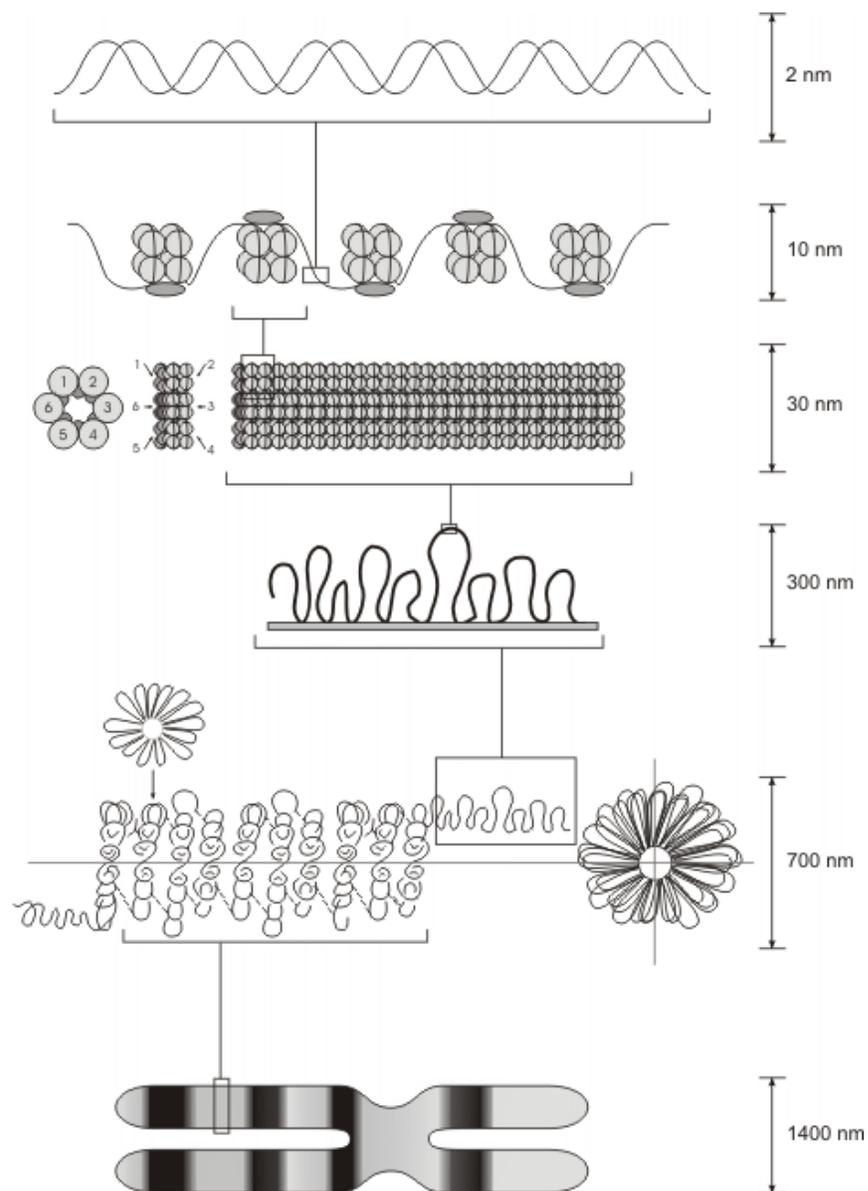


Figura 1.4 Modelo de empaquetamiento de la cromatina. Modificado de Alberts, 2002

La organización estructural detallada de los cromosomas se ve ahora desde una perspectiva más global. Las primeras observaciones acerca del número y el tamaño de los cromosomas y sus patrones de tinción condujeron al descubrimiento de muchas características generales importantes de la estructura de los cromosomas (Nye y col, 2006).

El número, el tamaño y la forma de los cromosomas en metafase son específicos de especie, en las células que no están en proceso de división, los cromosomas individuales no son visibles, aun con la ayuda de colorantes histológicos para el DNA o microscopia electrónica, durante la mitosis y la meiosis los cromosomas se condensan y se vuelven visibles con el microscopio óptico (Gilchrist, 2006). Por ende, casi todo el trabajo citogenético se realizó con cromosomas condensados en metafase obtenidos de células en división, ya sean células somáticas en mitosis o gametos en división durante la meiosis (Higgins, 2007; Eissenberg y Elgin, 2005).

Los cromosomas mitóticos representan la etapa última del empaquetamiento de la cromatina, un cromosoma mitótico de $1\mu\text{m}$ de longitud típicamente contiene casi 1 cm de DNA. Este empaquetamiento tiene lugar mediante un proceso que se acompaña de la fosforilación de casi todas las moléculas de histona H1 en cada uno de los cinco residuos serina distintos dentro de la molécula (Doenecke y Albig, 2006).

Cada cromosoma en metafase consiste de dos cromátidas hermanas, que están adheridas al centrómero. El número, los tamaños y las formas de los cromosomas metafásicos constituyen el cariotipo, que es distintivo para cada especie. De tal forma que el DNA humano está organizado en 22 pares de autosomas homólogos y dos cromosomas sexuales físicamente separados (Figura 1.5) (Speicher, 2006).

En los cromosomas eucariontes hay varios elementos de DNA importantes que no son genes y no participan en la regulación de la expresión de éstos. Entre estos elementos están los orígenes de replicación, que dirigen la duplicación del DNA cromosómico, los centrómeros, los cuales intervienen en el movimiento de los cromosomas hacia las células hijas, y los telómeros, que protegen y duplican los extremos de los cromosomas lineales (Figura 1.6) (Gilchrist, 2006).

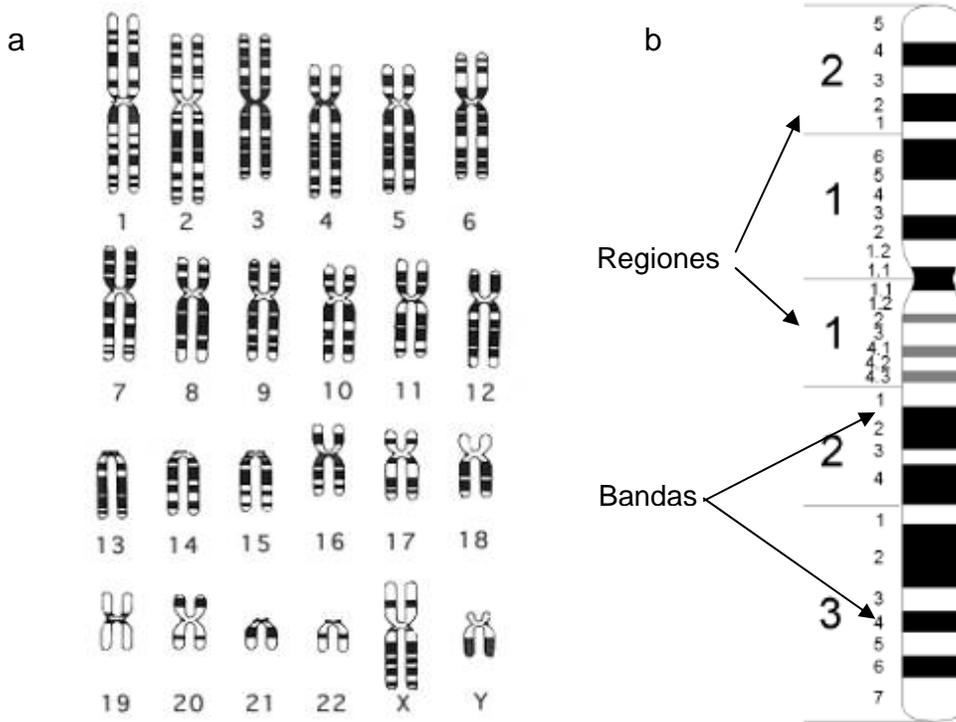


Figura 1.5 a) Idiograma de patrones de bandeo del cromosoma humano. b) Cromosoma en el que se observan regiones y bandas.

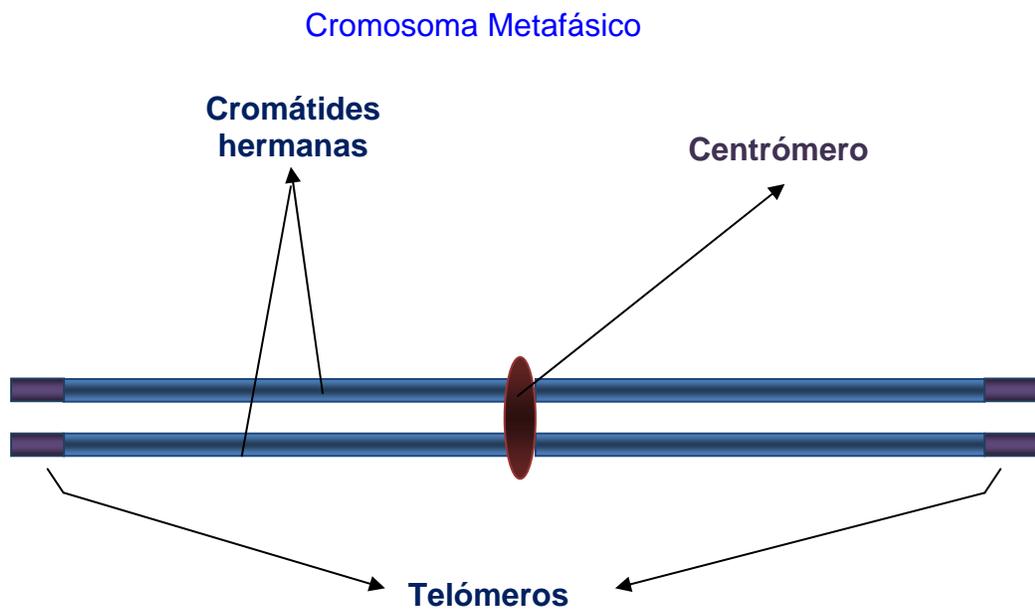


Figura 1.6 Estructura cromosómica.

CENTRÓMEROS

Cada cromosoma tiene una región especializada llamada centrómero, la posición del centrómero divide al cromosoma en brazos cortos (p) y brazos largos (q) respectivamente y la ubicación del centrómero en cada cromosoma es distintivo para cada cromosoma (Nye y col, 2006).

Los centrómeros son necesarios para la segregación correcta de los cromosomas después de la duplicación del DNA. Las dos copias de cada cromosoma duplicado reciben el nombre de cromosomas hijos, y éstos tienen que separarse, de modo que una copia llegue a cada una de las células hijas. Lo mismo que los orígenes de replicación, los centrómeros dirigen la formación de un complejo proteico llamado cinetocoro el cual interactúa con la maquinaria que tira de los cromosomas hijos para separarlos y llevarlos hacia las células hijas (Choo, 2001).

TELÓMEROS

Los telómeros están situados en los dos extremos de un cromosoma lineal. Al igual que los orígenes de replicación y los centrómeros, los telómeros están unidos a varias proteínas. En este caso, las proteínas cumplen dos funciones importantes (Speicher, 2006), una de estas funciones es que las proteínas teloméricas diferencian a los extremos naturales del cromosoma de los sitios de rotura cromosómica y otras roturas del DNA en la célula, otra función es que las proteínas son necesarias para que lleve acabo el alargamiento de la región telomérica, además de que permite que la célula duplique los extremos de los cromosomas (Martin y Ledbetter, 2006).

Los telómeros desempeñan papeles importantes para la duplicación completa del cromosoma, sirven como sitios de enlace para varias proteínas específicas, protegen a los cromosomas contra las nucleasas y otras influencias

desestabilizadoras, evitan que los extremos de los cromosomas se fusionen entre sí, y facilitan la interacción entre los extremos del cromosoma y la envoltura nuclear en ciertos tipos de células (Blackburn, 2002).

ESTRUCTURA

Y

FUNCIÓN DEL TELÓMERO

ANTECEDENTES

Los telómeros fueron descubiertos durante la década de los años 30 por el genetista Hermann Joseph Muller a través de estudios en *Drosophila melanogaster*, en donde observó que en los extremos de los cromosomas irradiados con rayos X, a diferencia del resto del genoma, no había cambios como deleciones o inversiones, gracias a la presencia de un casquete protector que él mismo inicialmente llamó «gen terminal» y después telómero (Figura 2.1), del griego «*telos*» fin y «*meros*» parte (Müller, 1938).



Figura 2.1 Micrografía electrónica de barrido del bucle telomérico. Tomado de McKnight, 2004

Dos años mas tarde Barbara Mc Clintock a través de estudio de la genética del maíz (*Zea mays*), describió cómo la ruptura de los cromosomas resultaba en adhesión y fusión de sus extremos, con la consecuente formación de cromosomas dicéntricos. Demostró que a pesar del daño, los extremos se podían restaurar gracias a la adquisición de un nuevo telómero. Según sus conclusiones, los telómeros jugaban un papel crucial en la integridad de los cromosomas, pues prevenían la aparición de ciclos de «ruptura-fusión-puente», catastróficos para la supervivencia celular (McClintock, 1941).

Los telómeros son elementos estructurales de cada cromosoma, se localizan en los extremos de todos los cromosomas de eucariontes, se encargan de asegurar la integridad cromosómica y la estabilidad total del genoma, los telómeros se asocian con proteínas para formar una estructura especializada que protege a los cromosomas de la fusión, de la degradación por nucleasas, de la recombinación inadecuada, juegan un papel muy importante durante la mitosis y la meiosis, el apareamiento y recombinación homóloga y así mismo participa en el anclaje de los cromosomas a la matriz nuclear, es importante señalar que tanto el DNA como las proteínas que los constituyen presentan características singulares que los diferencian del resto del cromosoma (Blackburn, 2004).

Los telómeros de los cromosomas humanos tienen muchos rasgos únicos, lo que los hace una parte esencial para comprender la biología, estructura, organización y la función de los cromosomas, actuando como complejos especializados de - proteínas de DNA que encapsulan las terminaciones de los cromosomas en eucariontes, por lo que son fundamentalmente importantes en enfermedades y patologías humanas (Martin y Ledbetter, 2006).

Los telómeros están situados en los dos extremos de un cromosoma, y al igual que los orígenes de replicación y los centrómeros, los telómeros están unidos a

varias proteínas. En este caso, las proteínas cumplen dos funciones importantes (Blackburn, 2004).

Primero, las regiones teloméricas diferencian los extremos naturales del cromosoma de los sitios de ruptura cromosómica y otras rupturas del DNA en la célula, también son sitios de recombinación y degradación frecuentes del DNA, además de que las proteínas que se congregan en los telómeros forman una estructura resistente a estos dos fenómenos (Bailey y col, 2006).

Segundo, los telómeros actúan como un origen de replicación especializado que permite a la célula duplicar sus extremos cromosómicos, debido a que la maquinaria replicativa estándar del DNA no puede duplicar por completo los extremos de un cromosoma lineal (Chai y col, 2006).

En el telómero pueden identificarse tres regiones importantes que se asocian a proteínas específicas, las que a su vez interactúan con otras proteínas implicadas en la maquinaria de reparación celular: una región distal, formada por los extremos o cápsulas de los cromosomas los cuales se encuentran formados por una serie de repeticiones en tándem de secuencias de DNA de seis pares base (pb), TTAGGG. Generalmente esta secuencia telomérica es más rica en G en una de las hebras que forma el extremo 3' de DNA, que sobresale unos 12-16 nucleótidos sobre la hebra que aporta el extremo 5'. Ese extremo saliente es reconocido por proteínas ligantes del telómero (TBP, telomere binding proteins), que actúan a modo de caperuza protectora de dicho DNA terminal (Martin y Ledbetter, 2006).

Enseguida se localiza la región sub-telomérica, contigua al telómero, está constituida por heterocromatina con secuencias repetitivas que exhiben una gran variabilidad interindividual. Ésta también es una zona intermedia de cadena doble no nucleosomal inmediatamente adyacente a la anterior, la cual es un complejo

mosaico de repeticiones y homologías compartidas de la secuencia de la región subteloamérica, por último se encuentra una región proximal con nucleosomas de disposición irregular (Martin y Ledbetter, 2006).

DNA TELOMÉRICO

En los humanos, el DNA del telómero está constituido por repeticiones hexaméricas del tipo TTAGGG / AATCCC, las cuales están repetidas entre 150 y 2000 veces, encontrándose mayor número de repeticiones en el extremo terminal 3', el cual finaliza en repeticiones hexaméricas de cadena simple, haciendo a esta porción más larga que la hebra complementaria en el extremo 5' (Bailey y Murnane, 2006).

Las repeticiones hexaméricas que se encuentran en la cadena sencilla permiten al DNA telomérico adoptar estructuras secundarias muy particulares, debido a la interacción de la secuencia de guaninas a través de enlaces por puentes de hidrógeno. Estas estructuras se denominaron cuartetos G, porque se encuentran involucradas cuatro guaninas, las cuales pueden interaccionar intra o inter cadena (Rudd, 2007).

La cadena rica en G corre en dirección 5' a 3' hacia cada extremo del cromosoma y se extiende 12 a 15 nucleótidos más allá del extremo de la cadena rica en C. Como resultado del "desnivelamiento", la cadena rica en G forma un apéndice de DNA de una sola cadena en cada extremo del cromosoma (Sfeir y col, 2005).

Esta secuencia se ha encontrado también en regiones pericentroméricas de cromosomas de algunos mamíferos así como dispersa en sitios intersticiales del genoma (Court y col, 2005).

Esta disposición se mantiene de una generación de células a la siguiente por medio de una enzima especial denominada telomerasa, que tiene la peculiar función de añadir nuevas unidades repetidas al extremo 3' de la cadena rica en G (Blasco, 2005).

El extremo distal del complejo telomérico adopta una conformación particular en forma de bucle en t, cuya estabilización está dada por los factores de unión a las repeticiones teloméricas (telomeric repeat binding factors: TRF1 y TRF2). Esta estructura en forma de bucle impide el acople de la telomerasa y debe por tanto ser desplegada durante la replicación del DNA telomérico (Figura 2.2). El mantenimiento de la compleja organización tridimensional del DNA telomérico con plegamiento de las cadenas ricas en guanina, denominada cuádruples G, involucra la participación de proteínas específicas (Figura 2.3) (Court y col, 2005).

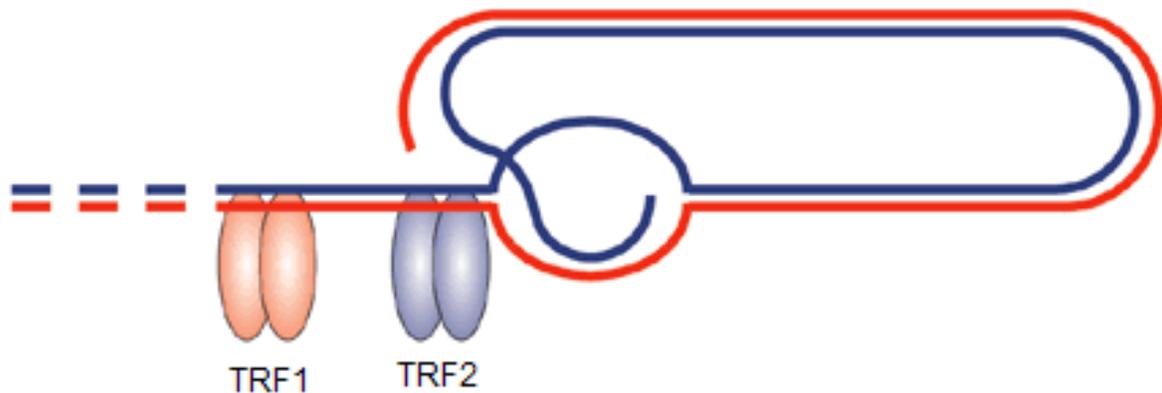


Figura 2.2 Estructura protegida en bucle-T y factores TRF1 y TRF2 para su estabilización. Tomada de Hodes, 2002.

El telómero puede encontrarse en dos formas o estructuras: una protegida (capped) y otra desprotegida (uncapped). La forma protegida constituye un complejo de proteína-DNA con estructura bucle-T, el cual es altamente cooperativo y protege el extremo de los cromosomas de la degradación de las nucleasas y de la fusión (Figura 2.4) (Gomez y col, 2006).

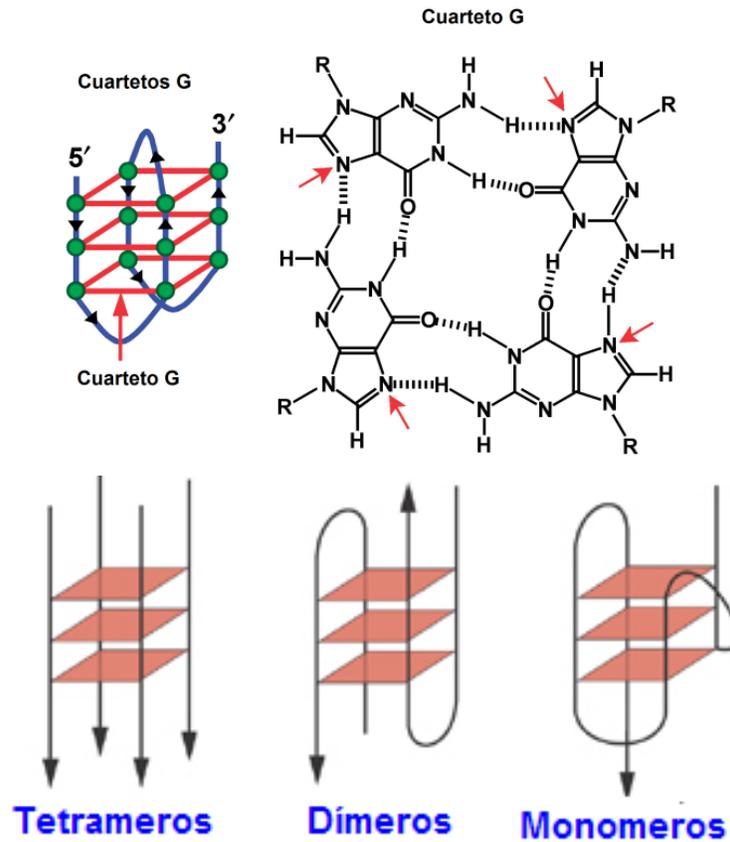


Figura 2.3 Estructura de los cuádruples G. Tomado de Tang, 2007; tetrameros dímeros y monomeros. Tomado de Bates, 2007.

El modelo desprotegido supone un telómero sin estructura bucle-T, el cual se encuentra linearizado y susceptible a la degradación por nucleasas y con tendencia a la fusión (de Lange, 2005).

El estado protegido tiene lugar en telómeros largos, ya que éstos pueden unir mayor cantidad de proteínas y tienen la tendencia a formar la estructura en bucle-T, mientras que los cortos estarían en estado desprotegido debido a que no pueden unir suficientes cantidades de proteínas para formar la estructura en bucle-T (Figura 2.5) (Churikov, 2007).

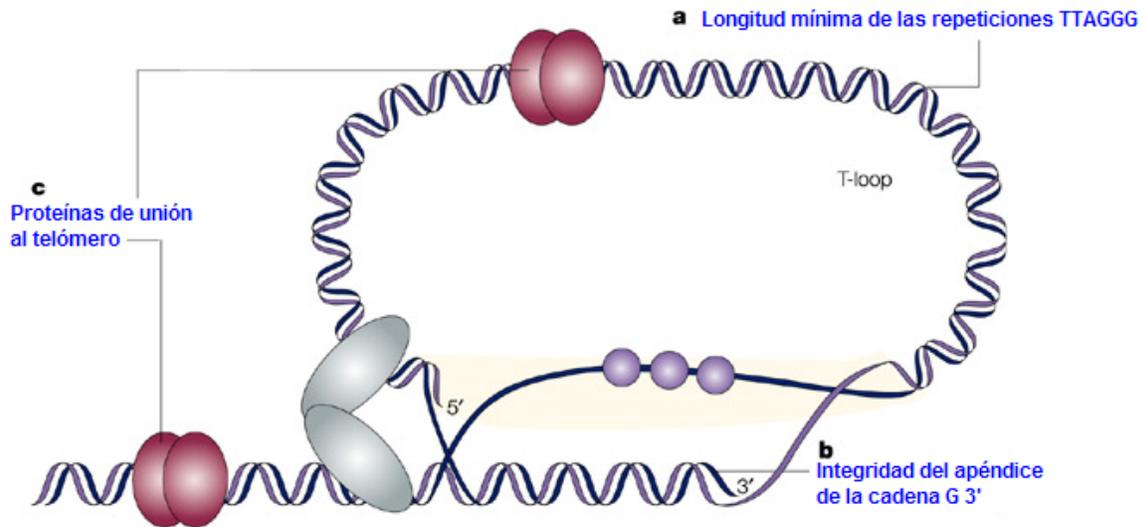


Figura 2.4 Estructura protegida en bucle-T. Tomada de Blasco. 2002

Por otra parte, el telómero puede pasar del estado protegido a desprotegido y viceversa. Un telómero corto en estado desprotegido puede atraer actividad telomerasa y alargarse para formar entonces la estructura de protegido, pero por el contrario, si un telómero largo con estructura protegida no mantiene su longitud, éste puede acortarse a tal punto de no tener suficientes sitios de unión para proteínas teloméricas y no formar la estructura de protección (Xu y col, 2006).

Esto traería como consecuencia la susceptibilidad del telómero por las nucleasas y a la fusión de sus extremos, lo que daría lugar a estado de senescencia o inestabilidad cromosómica que a su vez dispararía la señal para iniciar el proceso de la apoptosis (Masutomi y col, 2005).

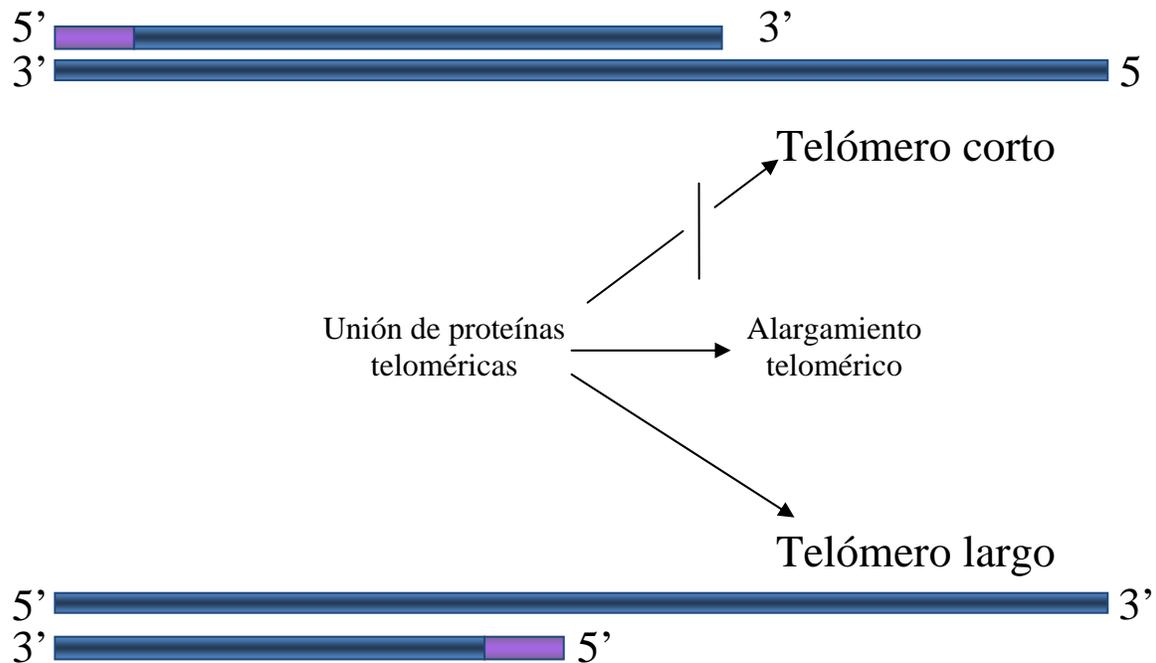


Figura 2.5 Modelo esquemático de un telómero corto y un telómero largo

DNA SUBTELOMÉRICO

Acompañando a las secuencias repetitivas tándem (T_2AG_3) del DNA telomérico, en sentido 5' hacia el centrómero, se encuentran secuencias ricas en GC llamadas secuencias subteloméricas, las cuales poseen bajo número de repeticiones hexaméricas, estas secuencias de DNA usualmente muestran segmentos de homología compartida entre diferentes cromosomas, aunque una minoría de secuencias subteloméricas son específicas para una sola región del telómero (de Lange, 2005).

Aunque éstas no participan directamente en la homeostasis del telómero, su estructura juega un papel importante en la formación de la estructura del telosoma. Es importante destacar que aunque la secuencia telomérica se encuentra conservada en muchos organismos, el tamaño del extremo terminal en el extremo

3' apéndice es específico para cada especie, así como también muchas de las proteínas encargadas de la elongación (Court y col, 2005).

Como resultado del mapeo genómico y análisis inicial de las secuencias subteloméricas de casi todos los cromosomas humanos, se ha determinado que la región subtelomérica está enriquecida 25 veces en secuencias teloméricas las cuales forman islas de (TTAGGG) $_n$ con un tamaño promedio de 151-200 pb, pudiendo estar agrupadas o dispersas, tanto en el DNA repetido como en el de secuencia única (Churikov, 2007).

Debe destacarse que la región subtelomérica posee una concentración de genes más elevada que el resto del genoma donde, además, se encuentra el mayor número de oncogenes mapeados hasta el presente (Rudd, 2007).

Los segmentos subteloméricos son regiones extraordinariamente dinámicas, variables y de rápida evolución en el genoma humano determinando que sea una fuente potencial de diversidad fenotípica pero, al mismo tiempo, representando un lugar de reordenamientos cromosómicos que puede derivar en enfermedades congénitas (Churikov, 2007).

Varias secuencias subteloméricas han sido identificadas y caracterizadas por hibridación cruzada en diferentes pruebas en telómeros humanos (Churikov, 2007). Un número de estas secuencias de DNA subtelomérico tienen una distribución polimórfica en humanos y están presentes en diferentes cromosomas, en diferentes individuos y también se crean polimorfismos para cromosomas homólogos (Rudd, 2007).

Por ejemplo en estas regiones subteloméricas se han identificado la longitud y secuencia de polimorfismos de DNA, primeramente se identificaron 3 alelos distintos en el brazo largo del cromosoma 16 con un polimorfismo de longitud de

hasta 260 kb, estos tres alelos no sólo diferían en longitud, sino que uno de los tres alelos también tenía una secuencia subtelomérica totalmente diferente (Rudd, 2007).

En consecuencia, estos tres alelos eran no homólogos entre sí, pero homólogos al brazo largo (p) del cromosoma X y a los extremos de otros cromosomas. Esto aumenta la interesante posibilidad de que un individuo heterocigoto con respecto a 2 alelos contenidos en la región subtelomérica del cromosoma 16 podría estar en riesgo de aumentar la posibilidad de una no disyunción en el cromosoma 16, o para traslocaciones no balanceadas involucrando este fin de cromosoma (Rudd, 2007).

Las regiones de repeticiones subteloméricas de cromosomas humanos son básicamente mosaicos de DNA compartido, repetitivo y otras secuencias homólogas. Estas regiones son aún relativamente pobres en cuanto a su caracterización debiéndose a la naturaleza compleja de las secuencias homólogas compartidas de DNA entre los extremos de múltiples cromosomas. Sin embargo, existe evidencia que indica una compleja organización e historia evolutiva (Rudd, 2007).

Estudios hechos por Flint (1997) indican la presencia de dos subdominios estructuralmente distintos en los telómeros humanos. El subdominio distal más cercano a las repeticiones (T₂AG₃), contiene un mosaico de secuencias muy cortas compartidas por varios cromosomas diferentes, donde el subdominio más próximo comprende secuencias mucho más largas de homólogas compartidas por menos cromosomas (Churikov, 2007).

Las homólogas compartidas dentro del subdominio distal son de una longitud menor a 2kb, sugiriendo la posibilidad de intercambios frecuentes entre todos los telómeros. En contraste, el subdominio próximo es comprendido por segmentos mucho más largos (10-40 kb) de secuencias homólogas compartidas que vienen

de pocos cromosomas, indicando la duplicación reciente de este dominio. Estas duplicaciones recientes podrían ser el resultado de traslocaciones desbalanceadas ocurridas entre telómeros durante la evolución de los primates (Churikov, 2007).

Los subdominios proximales y distales están separados por un bloque de repeticiones (T₂AG₃) y secuencias con homología a orígenes putativos de replicación. Sorprendentemente, esta misma organización de dos subdominios separados por (T₂AG₃) y orígenes de replicación es también observado en levaduras. Ésta conservación de secuencias sugiere un rol funcional importante para la organización de los telómeros (Churikov, 2007).

CARACTERÍSTICAS DE LAS SECUENCIAS DE DNA ÚNICAS ADYACENTES AL TELÓMERO MAS SOBRESALIENTES

Las secuencias únicas de DNA se encuentran localizadas en la proximidad a las secuencias subtelo méricas, aproximadamente a 100-300 kb en cada cromosoma. Esta región de los cromosomas humanos contiene la más alta densidad de genes en el genoma, como fue descrito inicialmente por Saccone (1992), basado en la identificación de isocoros ricos en GC con una elevada frecuencia de islas CpG en bandas T en telómeros humanos (Rudd, 2007).

Otros rasgos importantes en regiones teloméricas en humanos, es que los valores de recombinación genética se incrementan en las regiones teloméricas para ambos sexos, pero más dramáticamente en el sexo masculino. Ahora sabemos de manera general, que los valores de recombinación son más altos en el sexo femenino que en el sexo masculino para la mayoría de las regiones en el genoma; sin embargo, este patrón se invierte en la mayoría de los telómeros, donde la recombinación es mayor en el sexo masculino que en el femenino (Rudd, 2007).

Los telómeros también son sensores del apareamiento de cromosomas en la meiosis. Son las primeras regiones del cromosoma en aparearse y hacer sinapsis, de tal forma que median el apareamiento de cromosomas homólogos (Rudd, 2007).

PROTEÍNAS TELOMÉRICAS

Para mantener la compleja estructura telomérica y su ineludible organización; es necesario que el telómero tenga asociada varias proteínas dispuestas a lo largo de sus cadenas, en donde ésta asociación de proteínas al telómero constituye una estructura única de cromatina no nucleosomal llamada "Telosoma" (Liu y col, 2004).

La estructura del telómero se ha conservado evolutivamente entre las especies de vertebrados, estas secuencias teloméricas TTAGGG interactúan directamente con dos proteínas teloméricas TRF1 y TRF2. La identificación y caracterización de TRF1 y TRF2 fueron dilucidadas por De Lange; básicamente, la expresión de éstas dos proteínas regula la longitud del telómero ya sea por interacciones directas con el DNA telomérico o con interacciones con otras proteínas relacionadas al telómero (de Lange, 2005).

Tanto TRF1 como TRF2 se asocian con el DNA telomérico a lo largo del ciclo celular, y su RNA mensajero se encuentra en las diferentes células humanas, ambas son proteínas que se unen a las secuencias teloméricas TTAGGG (de Lange, 2005).

La TRF1 se encuentra en la región de doble cadena del telómero, mientras que TRF2 está asociada a la región de cadena simple, conservando ambas proteínas un dominio tipo Myb hélice-bucle-hélice en su región carboxiterminal y un dominio substancialmente diferente en su N-terminal, comportándose TRF1 como ácido y

TRF2 como base, consecuentemente estas dos proteínas no forman heterodímeros (Ye y col, 2004).

Las proteínas TRF1 y TRF2 también comparten un segundo dominio conservado, el dominio homólogo TRF (TRFH) el cual es responsable de las interacciones homotípicas que permiten que las proteínas formen homodímeros y homooligómeros de orden superior, este dominio (TRFH) también puede mediar la asociación de otras proteínas (Iwano, 2004). Es necesario señalar que TRF1 y TRF2 no forman heterodímeros y tienen una gran diferencia en su N-terminal (Ye y col, 2004).

Se sugiere que TRF1 actuaría en cis sobre la regulación de la longitud del telómero en células que expresan telomerasa, bloqueando así el acceso de la telomerasa al extremo 3'-terminal de la cadena sencilla del cromosoma, mientras que TRF2 juega un papel clave en la homeostasis del telómero, ya que modificaciones en su patrón de expresión producen una marcada consecuencia en la regulación y síntesis del telómero (Ye y col, 2004).

La proteína TRF2 es una de las proteínas más importantes en la formación del bucle-*t* y, al igual que TRF1, interviene en la estabilización de dicha estructura (de Lange, 2005). Por otra parte, se señala a TRF2 como una de las proteínas responsables en la activación de la senescencia, ya que se ha encontrado que la sobre expresión de TRF2 en fibroblastos induce el acortamiento progresivo de los telómeros (Liu, 2004). Se piensa que TRF2 se comporta como una proteína sensora de la longitud del telómero y que esto se realiza a través de la unión de secuencias teloméricas en la región de doble cadena (Chen y col, 2007).

En contraste la pérdida de función de TRF2 originaría anomalías cromosómicas, detención del ciclo celular y activación de la respuesta del ATM-p53, que responde a daños en el DNA (de Lange, 2005).

Por otra parte se ha podido establecer la responsabilidad de TRF1 y TRF2 en la formación de la estructura telomérica llamada ("T-Loop"/bucle -T), la cual es esencial para la protección de los extremos de los cromosomas de la degradación por nucleasas y fusión. Además, de que esta estructura juega un papel determinante en la organización de la cromatina en las regiones teloméricas y subteloméricas (Ye y col, 2004).

Existe otro importante grupo de proteínas que participan con TRF1 y TRF2, las cuales se encuentran involucradas en la formación del complejo telomérico, para mantener la estructura y la longitud del telómero (Liu y col, 2004). Estas proteínas RAP1, TIN2, POT1, y PTP, participan mutuamente en la regulación de la longitud del telómero y por ende en la formación del telosoma, las cuatro proteínas, interactúan y se asocian directa o indirectamente a TRF1 o a TRF2, formando subcomplejos proteicos entre ellas (Chen y col, 2007).

Estas seis proteínas, TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, POT1, y PTP, asociadas al telómero son las responsables de mantener la homeostasis del telosoma el cual tiene como función proteger a los telómeros contra el reconocimiento como extraño, además de controlar la longitud del telómero dependiente de la telomerasa (Wu y col, 2007).

La identificación del telosoma unió dos caminos esenciales en el mantenimiento del telómero, la longitud del telómero y la protección del extremo cromosómico, sugiriendo varias acciones funcionalmente coordinadas entre los subcomplejos teloméricos (Liu y col, 2004).

El telosoma en los mamíferos representa el mantenimiento del complejo telomérico, en el cual se encuentran involucradas las seis proteínas teloméricas antes mencionadas, interactuando unas con otras de manera directa o indirecta, para proteger el extremo terminal 3' de la cadena sencilla de DNA y favorecer la

estabilidad de la estructura telomérica, además de evitar la recombinación inadecuada, la formación de puentes en anafase, la degradación del extremo terminal 3' que conduciría a la senectud seguido de la activación del mecanismo de apoptosis (Wu y col, 2007).

También en el telosoma se encuentran otras proteínas no teloméricas asociadas a los telómeros que son cruciales para mantener estabilidad genómica, como por ejemplo los complejo de reparación MRN (MRE11 / RAD50 / NBS1), KU (Ku70/Ku80), (ERCC1 / XPF). Incluyendo ATM kinasa, proteinquinasa de DNA (DNA-PK), tanquirasas (TANK 1, 2) y las RecQ helicasas (WRN, BLM), entre otras. Todas ellas tienen un papel fundamental en metabolismo telomérico (Tabla 1.2) (Wu y col, 2007).

Tabla 1.2 **PRINCIPALES PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO TELOMÉRICO**

Proteína	Características	Funciones principales
TERT	Sub-unidad catalítica de la telomerasa.	Elongación del telómero y cicatrización cromosómica.
TER	Fragmento de ARN de secuencia complementaria al telómero teloméricas.	Templado interno para la síntesis de secuencias.
POT1	Proteína localizada en el extremo telomérico 3' de cadena simple.	Mantenimiento del complejo TERT/TER, inhibición de la actividad de telomerasa.
TRF1	Proteína localizada en la región telomérica de cadena doble.	Regulación negativa del acceso de la telomerasa al extremo 3'.
TRF2	Proteína localizada en la estructura en bucle t.	Estabilización del bucle t, regulación negativa de la actividad de telomerasa.

Continuación tabla1.2

Proteína	Características	Funciones principales
TANK	Poli (ADP-ribosa) polimerasa que co-localiza con TRF1.	Ribosilación del TRF1: impide su fijación al telómero y facilita el acceso de la telomeras
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa que colocaliza con TRF1.	Detección y reparación de rupturas simples por con TRF1 mecanismo REB, regulación post-translacional de la actividad de telomerasa.
ATM	Proteína alterada en la ataxia-telangiectasia.	Sensor de rupturas dobles, estabilización de p53 (control del ciclo celular y apoptosis), anclaje nuclear de los telómeros, inhibición de TRF1 por fosforilación.
DNA-PKcs	Subunidad catalítica (quinasa) del complejo DNK-PK.	Reparación de rupturas dobles por la vía NHEJ y recombinación V(D)J
Ku	Heterodímero Ku70/Ku80 que forma parte del complejo DNA-PK y co-localiza con TRF1.	NHEJ: unión a los extremos del ADN, reclutamiento de DNA-PKcs. Mantenimiento de la estructura telomérica.
RAD50/MRE11/NBS1	Complejo proteico que colocaliza con TRF2.	Recombinación homóloga, mantenimiento del bucle t, mecanismo ALT.
WRN y BLM	Relacionadas con la familia de helicasas RecQ, alteradas en los síndromes de Werner (WRN) y Bloom (BLM).	Apertura de la doble hélice del ADN durante reparación de rupturas dobles y disrupción cuadrúplex-G del telómero (permitiendo el acceso de la

Continuación tabla1.2

Proteína	Característica	Función Principal
MSH/MLH1/PMS1	Proteínas del sistema de reconocimiento y reparación de apareamientos erróneos (MMR).	telomerasa). Corrección de errores de replicación, inhibic de la elongación telomérica no dependiente de telomerasa (ALT).
Diskarina	Proteína mutada en la disqueratosis congénita.	Modulación del acople del TR al complejo telomérico.

Modificado de Blasco2002.

PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN CON TRF1 EN LA ESTRUCTURA TELOMÉRICA

La proteína TRF1 forma un multicomplejo proteico, en el que están implicadas diversas proteínas, como lo son TIN2, (Blasco, 2004) las tanquirasas (TANK1 y TANK2), POT1 (Kellerher y col, 2005), TPP1 (PTOP ó PIP1 ó TINT1) (Liu y col, 2004; Ye y col, 2004), y PINX1 (de Lange, 2004), todas están implicadas en la longitud y homeostasis del telómero, en el proceso de regulación en el mantenimiento del DNA telomérico por telomerasa (Figura 2.6) (Ye y col, 2004; de Lange, 2005).

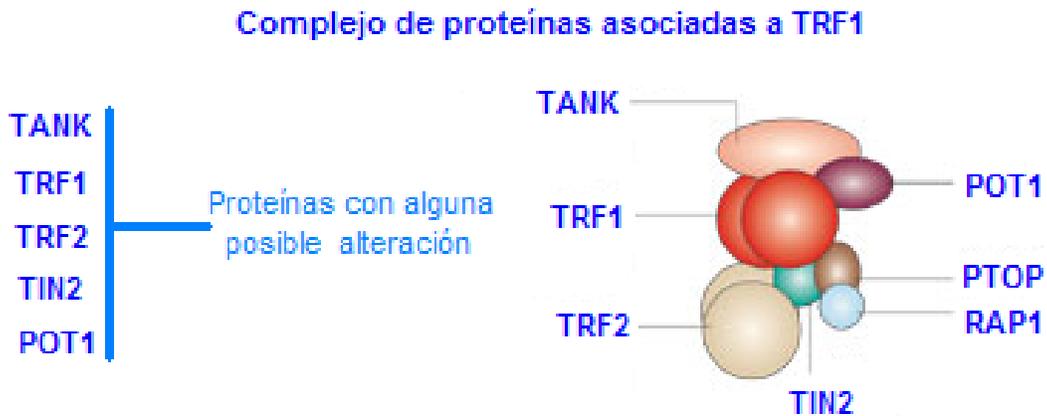


Figura 2.6 Complejo de proteínas asociadas a TRF1. Modificado de Blasco, 2005

La proteína TRF1 actúa como un regulador negativo de la longitud del telómero, de tal modo que la sobre expresión de TRF1 conduce al acortamiento del telómero (Court, 2005). TRF1 desempeña un papel primario en control de la longitud del telómero y ciclo celular a través de múltiples mecanismos. Por ejemplo, TRF1 media el acceso de la telomerasa al interaccionar con proteínas como PINX1, TIN2, PTPN13, y una proteína telomérica indispensable de DNA de cadena sencilla, como lo es la proteína POT1 (Kellerher y col, 2005).

Las tanquirasas son enzimas teloméricas que se asocian específicamente con el N-terminal ácido de TRF1, de tal forma que estas enzimas actúan como reguladores negativos corriente arriba en el control TRF1 dependiente de la longitud del telómero (Hsiao y Smith, 2008).

Además de su papel en los telómeros, TANK1 también es esencial en los telómeros para la separación de las cromátidas hermanas durante mitosis, sugiriendo la existencia de una nueva cohesión telómero específica que es regulada por la poli(ADP-ribosa) (Donigian y de Lange, 2007). Estas plimerasas TANK1 y TANK2, además de ubicarse en el telómero, también tienen otras localizaciones subcelulares las cuales incluyen complejos del poro nuclear, centrosomas y el complejo de Golgi (Chiang y col, 2006).

La función TRF1 es regulada por TIN2, y por las polimerasas poly(ADP-ribosa) TANK1 y TANK2. En detalle, TIN2 es un modulador de TANK1 y controla longitud del telómero vía el complejo de la proteína TRF1, además, TIN2 puede también unir al complejo TRF2 (Blasco, 2005).

Finalmente, TRF1 interacciona recíprocamente con POT1, y esta interacción se ha propuesto para transportar la información de la región de doble cadena del telómero a la proyección de cadena sencilla 3' apéndice (Dyrek y Smith, 2004).

Una segunda molécula que interactúa con TRF1, es TIN2, una proteína telomérica de 40 kDa que actúa recíprocamente con el dominio de TRFH de TRF1 y TRF2 la cual esta asociada con el telómero a lo largo del ciclo celular, este complejo telomérico, TRF/TIN2 es importante en la regulación de la longitud del telómero y la protección del extremo telomérico, en consecuencia la sobre expresión de la proteína TIN2 tiene como resultado el alargamiento dramático del telómero en células que expresan la telomerasa (de Lange 2005).

El extremo N-terminal de TIN2, tiene un alto contenido helicoidal y se ha conservado a través de la evolución. Esta región interactúa recíprocamente con TPP1 y TRF2, mientras que la región del C-terminal de TIN2 es un dominio de unión a TRF1 (O'Connor y col, 2006).

La proteína TIN2 es ahora un elemento crítico en el complejo telomérico, aunque es pequeña, esta proteína tiene tres dominios separados, consecuentemente puede interactuar con varias proteínas en el mismo momento uniéndose a TRF1 y TRF2 independiente y simultáneamente, TIN2 también se une a la proteína PIP1, que sirve para reclutar a la proteína POT1 al complejo telomérico (Ye y col, 2004).

Debido a sus interacciones, TIN2 acopla tres funciones principales y obligatorias del DNA telomérico; la unión de dos proteínas obligatorias en el DNA de doble cadena (TRF1 y TRF2) y la unión de una sola proteína obligatoria en el DNA de cadena sencilla (POT1). Además, TIN2 une a POT1 con TRF2 independientemente de su interacción con TRF1 creando dos caminos separados para interactuar con la proteína POT1 para acoplarse a los telómeros (Ye y col, 2004).

Una de las funciones de TIN2 es mediar la interacción entre los complejos teloméricos de TRF1 y TRF2. Las uniones de TIN2 a TRF1 y TRF2 colaboran

simultáneamente y de manera recíproca con ambos factores, de tal forma que el retiro de TIN2 o de TRF1 de la estructura telomérica conduce consecuentemente a la pérdida de TRF2 / hRap1. Así, el acoplamiento de TRF1-TIN2-TRF2 es importante para un acoplamiento estable de TRF2 a los extremos teloméricos en la estructura telomérica (Ye y col, 2004).

TIN2 juega un papel importante al estabilizar el complejo TRF2 al unirlo al complejo TRF1. Interacciones entre estas dos proteínas promueven la unión a la estructura telomérica (Ye y col, 2004). Igualmente la eliminación de TIN2, conduce a la eliminación del puente entre los subcomplejos de TRF1 y el TRF2 (Chen y col, 2007).

Del mismo modo, el acoplamiento de TIN2 entre TRF1 y TRF2 aumenta la especificidad de ambas proteínas por la estructura telomérica, este efecto puede ser particularmente importante con respecto a TRF2, el cual interactúa con un número abundante de proteínas no teloméricas, tales como ATM kinasa, el complejo MRN, y ERCC1/XPF, entre otras. Estas interacciones podrían conducir a una localización inadecuada de TRF2 en sitios no teloméricos, por ejemplo, cuando estos factores se acumulan en los sitios de daño al DNA (O'Connor y col, 2006).

La unión de TIN2 a TPP1 promueve la localización nuclear de TPP1 y de POT1, también estabiliza las interacciones entre TIN2-TRF2 y TRF1-TIN2-TRF2, además estimula la conexión entre los subcomplejos TRF1 y TRF2, y promueve el ensamblaje del telosoma (Chen y col, 2007).

Asimismo la proteína TPP1 se encuentra presente en este complejo telomérico, mediando la interacción de TIN2-POT1. POT1 se encuentra asociado al complejo de TRF1, además de tener un papel importante en el control de la longitud del telómero mediado por TRF1 (Hockemeyer y col, 2005). TPP1 es necesario para

regular la localización de POT1 en el telómero y su unión en el telosoma a través de su acoplamiento a TIN2, estas tres proteínas (TIN2, TPP1, y POT1) se localizan e interactúan recíprocamente en el citoplasma y en núcleo (Wang y col, 2007).

Una de las funciones de TPP1 es regular la señalización nucleolar para controlar directamente las concentraciones de TPP1 y POT1 en el núcleo, contrario a esto, la desorganización de TPP1 en la exportación nuclear tiene como resultado una desregulación en la longitud del telómero y en la respuesta a daños al DNA telomérico (Chen y col, 2007).

De esta forma las interacciones coordinadas entre TIN2, TPP1, y POT1 en el citoplasma regulan la arquitectura y la función del telosoma en el núcleo e indican por primera vez la importancia en la exportación nuclear y el control espacial de proteínas teloméricas en el mantenimiento del telómero (O'Connor y col, 2006). La localización y las interacciones entre las proteínas teloméricas en los organelos celulares es de vital importancia para la estabilidad y el mantenimiento de la estructura telomérica (Chen y col, 2007).

La proteína POT1 actúa como cubierta protectora del telómero y se encuentra en el extremo de la cadena sencilla, contrario a lo anterior, POT1 también actúa como regulador negativo de la longitud del telómero y también se asocia con TRF2, y de igual forma la asociación de POT1 a TRF1 o TRF2 afectan la longitud del telómero (Hockemeyer y col, 2005).

La pérdida en la función de POT1 conduce a la pérdida del extremo terminal 3' de la cadena sencilla de DNA telomérico, induciendo la senectud, seguido del mecanismo de apoptosis, y consecuentemente inestabilidad cromosómica en las células humanas (Ye y col, 2004). POT1 y PIN X1, además de estar involucradas en los mecanismos de reparación intervienen en la modulación de la actividad de

la telomerasa, la formación de la heterocromatina y señalización celular (Banik y Counter, 2004).

PROTEÍNAS QUE INTERACTÚAN CON TRF2 EN LA ESTRUCTURA TELOMÉRICA

La proteína TRF2 además de unirse a TIN2 también se asocia a varias proteínas que interactúan de manera indirecta o directamente. Primeramente se encuentra asociada a la proteína (h)Rap1; este complejo (TRF2 / hRap1) a su vez colabora con el complejo de reparación recombinacional MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), con el complejo (ERCC1/XPF), con PARP-2, con ATM kinasa, la helicasa WRN, la helicasa BLM y el complejo Ku (Figura 2.7) (Court y col, 2004).

TRF2 tiene un papel esencial en la protección y la formación de la caperuza (t-loop/bucle-t) en el extremo telomérico para evitar el reconocimiento como DNA fracturado (Gómez y col, 2006).



Figura 2.7 Complejo de proteínas asociadas a TRF2. Modificado de Blasco, 2005

hRap1 se une al telómero mediante la interacción con TRF2, dando como resultado una mayor organización en la estructura del complejo telomérico a través de la evolución (Sfeir y col 2005). hRap1 es una proteína telomérica que se ha encontrado tanto en humanos como levaduras y ciliados, controlando en los

primeros la longitud del telómero a través de su interacción con TRF2 (Wu y col, 2007).

Como se menciona con anterioridad TRF2 también se liga al complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1), dicha unión es mediante el acoplamiento al complejo TRF2/hRap1, esta interacción entre ambos complejos en la región telomérica se da a lo largo de la interfase (Zhong y col, 2007).

El complejo de MRN también se encuentra en los telómeros en interfase en asociación con TRF1 y TRF2, ayudando a estabilizar la formación de la estructura t-loop/bucle-t del telómero (Chai y col, 2005), desempeñado un papel crucial en mantenimiento de la estabilidad genoma (Blasco, 2005).

MRN es un complejo multifuncional evolutivamente conservado del complejo de reparación de daños al DNA, en la recombinación, en puntos de control en la comprobación del ciclo celular y el mantenimiento del telómero (Lerrivee y col, 2004).

En seres humanos, MRN y ATM se asocian a los telómeros en la regulación del ciclo celular (Celli y de Lange, 2005). MRN y ATMkinasa están implicados en la formación de la estructura T-loop así como en el mantenimiento del telómero (Blasco, 2005).

La proteína NBS1 es un regulador dominante de las funciones enzimáticas de MRN e inicia la respuesta y la localización del complejo MRN después del daño al DNA, y está implicado en el control de los puntos de comprobación del ciclo celular (Zhong y col, 2007).

La interacción de NBS1 con el telómero mediada por MRE11 y RAD50 se observa predominantemente en la fase de S durante la meiosis e influye también en la regulación de la longitud del telómero (Wu y col, 2007).

El heterodímero Ku70/Ku86 es un complejo unido al DNA con una preferencia de unión fuerte al DNA telomérico. La proteína Ku se liga a los extremos del DNA telomérico in vitro, y estudios de ligase cruzado han indicado que el heterodímero Ku está perceptible en el telómero in vivo (Fisher y col, 2004).

Las RECQ helicasas BLM y WRN se han observado en la asociación con el DNA telomérico, estas helicasas tienen como función regular la apertura de la estructura telomérica para regular el acceso de la telomerasa al momento de la replicación del telómero (Cobb y col, 2006). También se ha encontrado que las proteínas WRN, BLM ATM, ERCC1 y complejo MRN se encuentran involucradas en el desarrollo de algunas enfermedades (Figura 2.8) (Blasco, 2005).

ERCC1	Xeroderma pigmentoso
WRN	Síndrome de Werner
BLM	Síndrome de Bloom
ATM	Ataxia telangiectasia
MRE11/NBS1/RAD50	Síndrome de Nijmegen Desorden Ataxia telangiectasia-like

Figura 2.8 Proteínas implicadas en algunas enfermedades. Modificado de Blasco, 2005.

REGULACIÓN DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

Un aspecto importante en la función del telómero es la regulación de la longitud del telómero en las células que expresan la telomerasa. En la línea germinal y en

las líneas celulares inmortales (tumor), el mantenimiento del DNA telomérico humano parece ser un proceso favorablemente regulado (Blackburn, 2004).

Los telómeros en las líneas celulares con telomerasa positiva son generalmente estables, sugiriendo un mecanismo homeostático que equilibra el acortamiento del telómero tras cada ronda de replicación y la elongación mediada por la telomerasa. En general la regulación del telómero se da en cis y se ha demostrado que un telómero corto en una célula puede sufrir crecimiento rápido, permitiéndole alcanzar la longitud de los otros telómeros. Al mismo tiempo, la longitud del telómero en la célula permanece estable. Así, las células pueden supervisar y modular la longitud de un solo telómero, indicando un mecanismo regulador cis-suplente (Keppler y col, 2006).

Las proteínas TRF1, TRF2 y sus factores interactores TIN2, tankirasa 1, el hRap1 y el complejo MRN entre otros, todos contribuyen a la longitud y la homeostasis del telómero. TRF1 y TIN2 tienen una influencia negativa en el mantenimiento de longitud del telómero. Estos reguladores negativos parecen suprimir la habilidad de la telomerasa de alargar el telómero. La tankirasa 1 tiene el efecto opuesto, comportándose como un regulador positivo de longitud del telómero. La tankirasa 1 actúa para disociar el complejo TRF1/TIN2 del telómero, disminuyendo la presencia de estos reguladores negativos y promoviendo el alargamiento del telómero por la telomerasa (Figura 2.9) (Ye y col, .2004)

El complejo TRF2/Rap1 también influye en el mantenimiento de la longitud del telómero, La regulación de la longitud del telómero se influye por muchos otros factores., como por ejemplo la deficiencia de la ATM kinasa resulta en un acortamiento del telómero. TRF1, TRF2, TIN2, Rap1 y la tankirasa no afectan a la expresión de componentes de la telomerasa o la actividad de telomerasa, pero todas las proteínas que se enlazan al telómero regulan la accesibilidad de la

telomerasa al extremo telomérico y modulan la actividad de la enzima telomerasa en el extremo telomérico (Figura 2.9) (Ye y col, 2004).

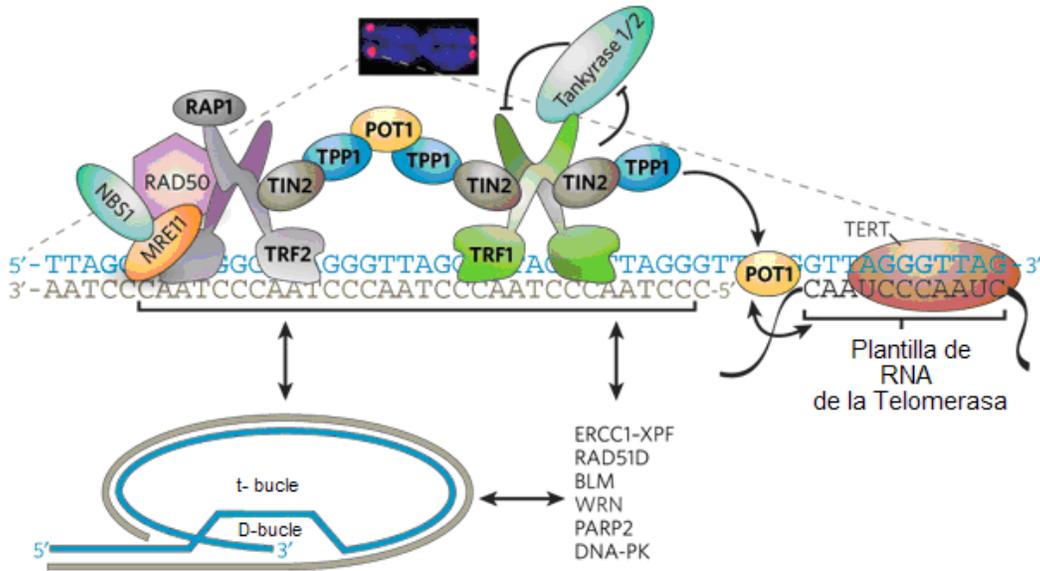


Figura 2.9 Proteínas implicadas en el mantenimiento de la longitud telomérica y encargadas de regular el acceso de la telomerasa. Tomado de Verdun, 2005.

Telómeros más largos se han propuestos para atraer más proteínas teloméricas, considerando que los telómeros más cortos atraen menos proteínas teloméricas. Se sugiere que la longitud del telómero se encuentra gobernada por la proteína TRF1, la cual tiene como función bloquear el acceso de la telomerasa al término del telómero (Iwano y col, 2004).

Si la telomerasa es bloquea, los telómeros se acortarán durante la proliferación hasta que TRF1 es insuficiente para inhibir la actividad de la telomerasa. Por consiguiente, los telómeros entrarán en una fase de alargamiento. De esta manera, los telómeros se alargaran y se acortaran, dependiendo de su longitud y de TRF1 asociado a su vez con TIN1 en las células. Además, el establecimiento de la longitud del telómero dependerá de la actividad de la telomerasa. La tankirasa puede actuar como un regulador negativo de TRF1 inhibiendo el complejo proteico de TRF1 en los telómeros (Ye y col, 2004).

TELÓMERO Y ENFERMEDAD

Estudios de la longitud del telómero en células de individuos con síndromes de edad acelerada también han añadido evidencia de una correlación entre la longitud del telómero y la senectud celular. Por ejemplo, células de individuos con síndrome Werner, síndrome Bloom, progeria Hutchinson-Giford, entre otras, han mostraron un acortamiento acelerado de los telómero comparado con controles de la misma edad (Bailey y col, 2007).

Un mecanismo que induce inestabilidad en el cromosoma es la pérdida de los telómeros, ya que la función de estos es la de proteger la secuencia de un complejo de DNA-proteína que se encuentra en los extremos de los cromosomas y el cual es regulado mediante la enzima telomerasa. La pérdida del telómero puede ocurrir como resultado de un daño exógeno o endógeno en el DNA, o espontáneamente en las células de cancerosas, las cuales tienen comúnmente un alto índice en la actividad de la telomerasa por lo que no pierden los telómeros (Baird y col, 2006).

La fragilidad cromosómica puede ocurrir mediante una gran variedad de mecanismos, como lo es un defecto en la replicación del DNA, o un defecto en la segregación del cromosoma, incluyéndose una respuesta defectuosa en la reparación del DNA, la importancia de algunos de estos mecanismos se pueden observar mediante el estudio de enfermedades de origen genético en humanos, en las que se demuestra una inestabilidad creciente del cromosoma, dicha inestabilidad cromosómica juega un papel importante en enfermedades como la Anemia de Fanconi, Síndromes de Bloom, Werner y Nijmegen, Distrofia muscular de Duchenne, Progeria de Hutchinson-Gilford, Ataxia-telangiectasia entre otras (Bailey y col, 2007).

El tiempo de vida de las células humanas varía considerablemente de un tipo celular a otro. La mayoría de las células de humanos tienen un tiempo de vida relativamente corto (aproximadamente 100 divisiones), mientras que otras están dotadas de una longevidad excepcional, como es el caso de las células hematopoyéticas, piel, intestinales o endometriales, estas últimas se dividen un gran número de veces durante el ciclo menstrual (Baird y col, 2006).

En contraste, existe una correlación con la represión de la actividad de la telomerasa en células en maduración terminal o en estado de diferenciación. Un número de señales extra o intracelulares tales como la radiación ultravioleta, interferón α , estrógenos y citocinas, afecta la actividad de la telomerasa (Keppler y col, 2006).

En cuanto a las células de las líneas germinales responsables de la producción de los gametos, el tiempo de vida es prácticamente ilimitado, ya que se propagan de una generación a otra. Estos tipos celulares tienen en común que compensan el acortamiento de los telómeros a través de la síntesis de DNA telomérico por la enzima telomerasa (Fu y Collins, 2006).

La enzima puede actuar varias veces sobre el mismo sustrato y a cada ciclo de síntesis agrega 6 nucleótidos. Durante la embriogénesis, la actividad de la telomerasa está presente inicialmente en todos los tejidos, la cual va decreciendo gradualmente en el transcurso del desarrollo (Chai y col, 2005).

Esto sugiere que la estructura del telómero juega un papel importante en el ciclo celular y en las vías de señalización que se activan por daños en el metabolismo celular, donde el hecho de que él mismo deba conservar la longitud mínima, indispensable para mantener a la población celular en constante división, también sugiere que esta mínima longitud es la estructura necesaria de cromatina para

mantener el correcto funcionamiento de esta región en los cromosomas (Cristofari y Lingner, 2006).

Es importante señalar que un acortamiento de manera natural en la longitud de los telómeros ocurre en el curso del envejecimiento, cuyas disminuciones son generalmente del orden de 10 a 200 pares de bases por año según los diferentes tipos de tejidos. El envejecimiento es el proceso por el cual la mayoría de las células humanas normales experimentan una disminución en la proliferación celular llamándole senescencia. Este proceso es dependiente del acortamiento de los telómeros, la pérdida de secuencias telomérica en cada división celular induce alteración en la integridad del genoma, con la consecuente alteración de la homeostasis celular (Bailey y col, 2007).

FUNCIÓN DE LOS TELÓMEROS

Los telómeros son esenciales para la estabilidad genómica y su disfunción está implicada en algunas enfermedades y el envejecimiento. La función más relevante de los telómeros es proteger la estructura terminal del cromosoma, contra la degradación y la fusión, lo que, a su vez, requiere del mantenimiento del DNA telomérico en una longitud crítica que permita el acople de proteínas teloméricas para la formación de la caperuza (Siderakis Tarsounas, 2007).

Los telómeros desempeñan papeles importantes para la duplicación completa del cromosoma, protegen a los cromosomas contra las nucleasas y otras influencias desestabilizadoras, evitan que los extremos de los cromosomas se fusionen entre sí, y facilitan la interacción entre los extremos del cromosoma y la envoltura nuclear en ciertos tipos de células (Artandi, 2006).

En el ámbito estructural, el telómero ayuda a mantener la integridad del cromosoma evitando la fusión de sus extremos y la degradación por nucleasas,

así mismo participa en el anclaje de los cromosomas a la matriz nuclear y juega un papel muy importante durante la meiosis, el apareamiento y recombinación homóloga. Estas características asociadas al telómero hacen que adquiera una importancia especial en algunas enfermedades (Wang y col, 2004).

Los telómeros resguardan los extremos cromosómicos para evitar el reconocimiento por los sistemas de reparación de daño al DNA en la célula, cubren los extremos de los cromosomas, impidiendo el reconocimiento o la degradación por nucleasas o la fusión con otros cromosomas, de igual manera los telómeros evitan la fusión de los cromosomas en la mis-segregación tanto en mitosis como en meiosis, es necesario mencionar que cualquier fragmento cromosómico de DNA, de igual forma es reconocido y degradado, e induce señales para promover la detención del ciclo celular. Los telómeros se localizan bajo la envoltura nuclear y su asociación es específica con el cuerpo polar del huso para la separación que se requiere para la recombinación meiótica normal (de Lange, 2005).

Los telómeros evitan que los extremos del cromosoma sean confundidos por DNA dañado o roto, de tal forma que un extremo dañado de DNA o la pérdida de la estructura telomérica en un cromosoma en la célula, tiene como consecuencia la generación de señales necesarias para la detención del ciclo celular (Wei y Price, 2004). Así mismo, cuando un telómero llega a ser demasiado corto también se induce la detención del ciclo celular y este a su vez induce una respuesta a daños en el DNA (Choudhury y col, 2006).

También la supresión o la mutación en el gen del RNA de la telomerasa o en la proteína de la telomerasa, causa la pérdida progresiva de las secuencias teloméricas y, cuando incluso una sola región de DNA telomérico en un cromosoma cae por debajo de la longitud crítica conduce a la detención del ciclo celular, con la consecuente declinación de la capacidad de crecimiento y

proliferación celular (senectud del crecimiento) es importante señalar que la detección sobreviene antes de la pérdida completa de repeticiones teloméricas (Blackburn, 2005).

Los extremos lineales de DNA cromosómico en eucariontes que están dañados o tienen estructuras teloméricas incompletas, se encuentran expuestos a la fusión, por la recombinación no homologa con otros extremos pegajosos de DNA pero no a los extremos teloméricos funcionales, teniendo como resultado cromosomas dicéntricos o aberrantes que son letales debido a que no pueden segregarse correctamente (Maser y DePinho, 2004).

Por otro lado, en células carentes de la función de la telomerasa, la recombinación homóloga entre las repeticiones teloméricas de diferentes telómeros, regenera la longitud de los telómeros y puede mantener la longitud de los telómeros indefinidamente en una población celular (Argilla y col, 2004).

El telómero CPR (telomere cap-prevented recombination) es inducido por la pérdida en la arquitectura del telómero y consecuentemente por la pérdida de función del telómero, la reparación recombinacional ocurre vía el cruce de homólogos desiguales entre las repeticiones de las regiones teloméricas expuestas, las cuales son a menudo mucho más largas que el tipo salvaje, pero que todavía están sujetos al acortamiento gradual (Groff-Vindman y col, 2005).

El telómero CPR es de manera general una vía alterna para el mantenimiento del telómero en eucariontes, incluyendo células de mamífero inmortalizadas carentes de la actividad de la telomerasa (Iyer y col, 2005).

Durante la profase temprana de meiosis I, los telómeros juegan una función importante, al anclar los cromosomas a la membrana nuclear interna cerca del cuerpo del huso acromático. Posteriormente, como consecuencia de la

polarización nuclear de la membrana, los telómeros se arraciman en una configuración de ramillete, que facilita el apareamiento y recombinación de los cromosomas homólogos. De esta forma se tienen dos aspectos fundamentales en el mantenimiento de la estructura telomérica, en donde, el alargamiento y la protección del telómero, contribuyen a las funciones esenciales realizadas por los telómeros durante meiosis (Siderakis y Tarsounas, 2007).

HOMEOSTASIS DEL TELÓMERO

El número de repeticiones en tándem de la secuencia telomérica en el extremo de cada cromosoma se encuentra regulado de muchas formas diferentes, evitando que los telómeros lleguen a ser demasiado cortos o demasiado largos. La homeostasis normal en la longitud del telómero se mantiene a través de un equilibrio dinámico entre la adición por la telomerasa y la pérdida del DNA telomérico terminal, requiere la acción de la telomerasa así como de un complejo telomérico DNA-proteína, cabe señalar que sin la telomerasa, cada generación de células y cada extremo cromosómico perdería progresivamente un promedio de 5 pares de bases de su DNA terminal en levaduras, y entre 50-100 pares de bases en células de mamíferos (Hug y col, 2006).

La longitud de todos los telómeros en las célula disminuyen dependiendo del sistema, del tejido y de la etapa de crecimiento en que se encuentre el organismo, además la longitud de los telómeros es característica de cada especie, la longitud de los telómeros varia al cambiar los índices relativos en la adición y la perdida de DNA, en contraste con el comportamiento relativamente estático de las regiones internas del cromosoma. La longitud del telómero es controlada por las concentraciones celulares de la telomerasa así como de múltiples factores genéticos y el estado metabólico de la célula (Hathcock y col, 2005).

TELOMERASA

ANTECEDENTES

En uno de sus primeros trabajos James Watson describió la estructura doble helicoidal del DNA y también identificó el problema de la replicación terminal, consistente en la incapacidad de las células para copiar por completo los extremos del DNA lineal (Watson, 1972).

Alexsei Matveevich Olovnikov, un desconocido científico ruso, halló el eslabón entre el problema de la replicación terminal (enunciado por Watson) y la senescencia celular, a su vez previamente descrita por Leonard Hayflick (Olovnikov, 1971).

Según Hayflick y Moorhead 1961, la senescencia correspondía a un estado de detención de la proliferación, al que ingresaban las células somáticas humanas con signos de alteraciones bioquímicas y morfológicas como producto de haber sobrepasado su capacidad límite de división (Autexier y Lue, 2006).

Para Olovnikov, el problema de la replicación terminal era la causa del acortamiento progresivo de los telómeros, que a su vez, actuaba como un reloj interno para determinar el número de divisiones que la célula podía experimentar a lo largo de su existencia y, por ende, para controlar el proceso de envejecimiento (Olovnikov, 1971).

Mientras que el DNA no telomérico utiliza para su replicación la enzima DNA polimerasa, el DNA de los telómeros se vale de una transcriptasa reversa formada por una plantilla de RNA (hTER) de 450 nucleótidos y una subunidad catalítica (hTERT) para solucionar el problema de la replicación telomérica (Takakura y col, 2005).

En la actualidad se sabe que la telomerasa es la encargada de mantener la longitud de los telómeros y que su expresión varía considerablemente con la edad y con el tipo celular, como por ejemplo en las células embrionarias, células germinales (ovogonias y espermatogonias), donde contrarresta el problema de la ausencia de replicación en los extremos teloméricos (Jagadeesh y col, 2006).

En las células normales, el acortamiento que sufren los telómeros durante la división celular constituye un mecanismo supresor tumoral que obliga a que las células salgan del ciclo celular y entren en un estado irreversible de senescencia, donde cesan de dividirse y finalmente mueren (Shay y Wright, 2005).

La holoenzima de la telomerasa es un complejo ribonucleoproteico con dos componentes base: una proteína (llamada TERT) con actividad catalítica RNA dependiente de polimerasa de DNA es decir, una transcriptasa reversa y un RNA asociado llamado TER (Figura 3.1) (Shcherbakova y col, 2006).

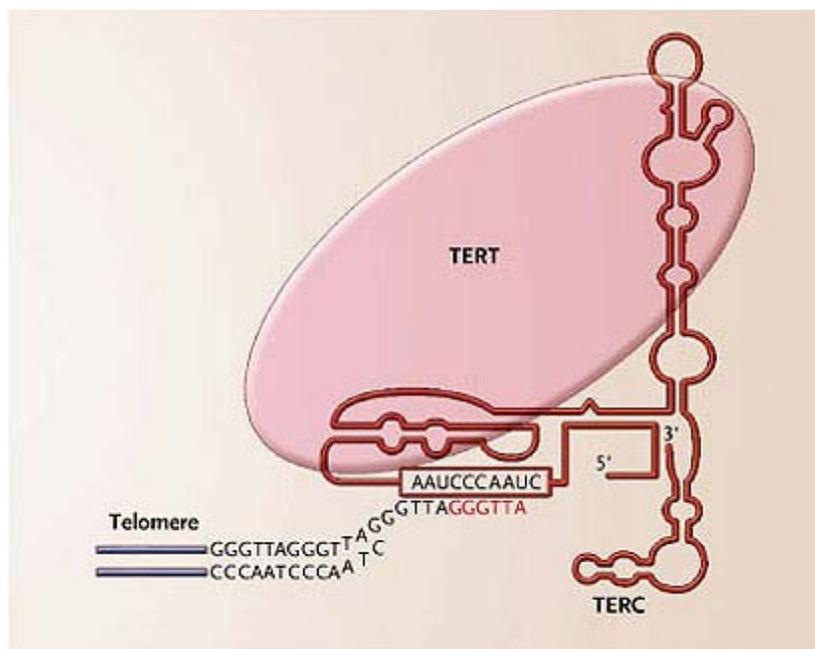


Figura 3.1 Subunidad catalítica de la telomerasa telomerasa (hTERT) y subunidad de RNA de la telomerasa (hTERC). Tomado de Artandi, 2006

La telomerasa humana es un complejo de ribonucleoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente un megadalton, variando este valor según el método de purificación, lo cual puede reflejar una heterogeneidad fisiológica, pudiendo ser inherente a la vía de activación, ensamblaje o regulación de esta enzima. Existen por lo menos tres pasos para el correcto ensamblaje de la holoenzima, los cuales son: a) acumulación de RNA, b) activación catalítica y c) secuestro en los telómeros (Theimer y Feigon, 2006).

La telomerasa es una enzima ribonucleoproteíca que cataliza la adición de repeticiones teloméricas (TTAGGG)_n a los telómeros para recuperar la pérdida de secuencias terminales resultado de la repetición semiconservativa del DNA (Takakura y col, 2005).

En promedio, en cada división celular se agrega una secuencia TTAGGG al final de la cadena de DNA de cada cromosoma, de ahí que una función primaria de la telomerasa *in vivo* es contrarrestar la reducción progresiva del telómero en los cromosomas tras cada ciclo de división celular (Shay y Wright, 2005).

El RNA de la telomerasa tiene por lo menos dos funciones, una de ellas es proporciona el andamio para la unión de proteínas a la ribonucleoproteína y la otra es acarrear la secuencia molde que es copiada del DNA telomérico por la hTERT (Theimer y Feigon, 2006).

La enzima telomerasa es activa en células de la línea germinal y en una gran variedad de tumores malignos. En contraste, su actividad está normalmente reprimida en células somáticas normales, excepto en algunos tejidos con alto potencial regenerativo, como células hematopoyéticas y epidérmicas (Wai, 2004).

Recientemente han sido identificadas las dos subunidades mayores que componen al complejo de la telomerasa en humanos: el componente RNA que es conocido como hTER RNA de la telomerasa humana, y la subunidad catalítica, denominada hTERT transcriptasa reversa de la telomerasa humana (Autexier y Lue, 2006).

SUBUNIDAD hTERT

Varias características distinguen la subunidad catalítica del telomerasa: (i) todos los motivos de la transcriptasa reversa están situados en el C-terminal a la mitad de la proteína;(ii) una región conservada y específica de la telomerasa, llamado motivo T, se encuentra localizado en el N-terminal de la transcriptasa reversa y (iii) una región N-terminal que constituye gran parte del total de la proteína la cual contiene dominios conservados funcionalmente importantes, además de ser mucho mas grande que la región C-terminal (Theimer y Feigon, 2006).

En los humanos el gen hTERT presenta una sola copia localizada en la parte distal del cromosoma 5p15.33, contiene 16 exones, 15 intrones y se extiende aproximadamente 40kb (Cong y col, 1999). El gene que codifica para la subunidad de hTERT de la telomerasa demuestra una variación de inter-especies en su secuencia del nucleótidos, pero la estructura y los motivos a los que se le asocia la actividad de la transcriptasa reversa se han conservado evolutivamente (Chen y Greider, 2004).

En los humanos el gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa (hTERT) es una proteína rígida de 125 kDa con siete motivos con actividad de transcriptasa reversa y que son similares en estructura a los motivos de la familia de las transcriptasas reversa y de intrones terminales del grupo II. La hTERT también contiene un octavo motivo específico para la telomerasa (Hansen, 2006).

La familia de las transcriptasas reversa (TERT) contiene un grupo amino (N)-terminal y un grupo carboxilo (C)-terminal con un sitio catalítico interno que se asemeja a la transcriptasa reversa del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (Jacobs y col, 2006). Este motivo compartido de la transcriptasa reversa tiene una forma tridimensional similar a una mano derecha, con el sitio activo situado en la palma, cuya función catalítica es dependiente en tres residuos totalmente conservados de ácido aspártico; la asociación estereo específica con un hTER específico, sintetiza repeticiones de DNA de una porción pequeña de su plantilla de ribonucleótidos, lo cual la diferencia de las transcriptasas reversas con que esta relacionada (Hansen, 2006).

Además del sitio activo de la transcriptasa reversa, la subunidad hTERT contiene otros dominios interactivos implicados en la función de la telomerasa, la asociación estable con la subunidad hTER se media con la interacción de uno o ambos dominios de RNA que se unen su región N-terminal, la inhibición de otras secuencias en la región N-terminal de hTERT tiene como consecuencia neutralizar la función enzimática total (Campbell y col, 2006).

Por otra parte, el N-terminal y los dominios adicionales del carboxilo C- terminal han estado implicados en la oligomerización independiente de la subunidad hTERT y la subunidad hTER (Campbell y col, 2006).

De tal forma que el alargamiento de los telómeros por la telomerasa requiere de un complejo proceso altamente regulado, en el que se incluye la maduración, el procesamiento, la acumulación de hTER, el transporte nuclear, modificaciones postraduccionales de hTERT, montaje de la ribonucleoproteína, reconocimiento del sustrato, y síntesis coordinada de la cadena C-filamento, asimismo las proteínas asociadas a la telomerasa implicadas en cada uno de estos procesos son requeridas para la actividad completa y la función biológica de la enzima (Smogorzewska y de Lange, 2004).

Se han realizado numerosos estudios en la regulación del promotor hTERT, el cual es blanco de numerosas vías de señalización celular, sin embargo no se conoce con certeza el mecanismo diferencial de transcripción hTERT entre células normales y tumorales (Autexier y Lue, 2006).

Existe una variedad de factores transcripcionales que participan en la expresión génica de hTERT, entre los que se incluyen el gen Myc que induce actividad de telomerasa por incremento en los niveles de expresión de hTERT, así como el Sp1, el receptor de estrógeno y NF-KB145, la sobreexpresión de c-Myc conduce a un incremento significativo en la actividad transcripcional del promotor, habiéndose observado que el gen c-Myc se encuentra frecuentemente desregulado en los tumores humanos, donde la sobreexpresión de myc puede causar reactivación de la telomerasa. También la ceramida tanto endógena como exógena modula la actividad promotora hTERT, vía actividad proteolítica de la ubiquitina conjugada al factor de transcripción c-Myc (Campbell y col, 2006).

Por otra parte, hay factores post-transcripcionales que participan en el control de la función de la enzima, se han identificado al menos seis variantes de mRNA- hTERT por RT -PCR, incluyendo la variante hTERT α que presenta una delección en los residuos que participan en la actividad catalítica de la proteína, por lo que inhiben dicha actividad endógena con el consecuente acortamiento del telómero (Chen y Greider, 2004).

Solamente los tejidos que expresan hTERT y que contienen los motivos completos de la transcriptasa reversa demuestran actividad catalítica, existiendo una gran variedad de líneas celulares y tejidos tumorales que presentan diferencias considerables en su patrón de procesamiento, lo que sugiere el posible papel de variantes en la regulación de la telomerasa (Hansen, 2006).

Además, el proceso de ensamblaje de la holoenzima está relacionado con la regulación de hsp-90, proteína que se encuentra muy elevada durante el proceso de la transformación celular (Hansen, 2006).

La subunidad hTERT de la telomerasa parece ser fosforilada, y este proceso es modulado por una compleja red de proteínas quinasa que a su vez establecen enlaces entre la actividad de la telomerasa y la vía de señalización de la traducción. La proteína quinasa C (PKC) es una quinasa serina/treonina responsable de las vías de señalización de traducción que dirige varios procesos fisiológicos tales como la diferenciación, proliferación y expresión génica (Stanek y Neugebauer, 2006).

Las proteínas quinasas aumentan la actividad de la telomerasa mediante la fosforilación de hTERT e inversamente la proteína fosfatasa 2A (PP2A) inhibe la actividad de la telomerasa. Es posible que PKC y PP2A estén relacionados recíprocamente en el control de la actividad de la telomerasa, hecho consistente con la noción de pensar que un balance entre PKC y PP2A juegan un papel importante en la expresión de hTERT (Ly y col, 2005).

SUBUNIDAD hTER

Los hTERs son altamente divergentes entre diversas especies, variando en el tamaño y la secuencia nucleotídica, en ciliados la variación es aproximadamente 150 nucleótidos, en vertebrados 450 nucleótidos y en levaduras de 930 -1309 nucleótidos (Figura 3.2), la estructura secundaria de hTER ha sido determinada mediante análisis filogenéticos, encontrándose que se ha conservado evolutivamente en diversas especies (Theimer y Feigon, 2006).

En los humanos el gen hTER se encuentra ubicado en el cromosoma 3q26.13 y tanto en ellos, como en las levaduras, la subunidad RNA es transcrita por una RNA polimerasa tipo II (Parkinson y col, 1997).

La subunidad de hTER de los telómeros muestra homología de ínter-especies y tiene un papel vital en la función total de la enzima. Aunque actúa sobre todo como plantilla de nucleótidos para agregar las repeticiones teloméricas, la evidencia sugiere que la subunidad hTER puede también tener un papel estructural al funcionar como una espina dorsal para unir otras proteínas que se unen a la telomerasa y de manera similar a hTERT, también tiene otras funciones además de ser la plantilla de la telomerasa (Hansen, 2006).

Las comparaciones filogenéticas revelaron la presencia de una estructura conservada de la pseudo unión en el RNA de telomerasa en ciliados y vertebrados (Theimer y Feigon, 2006).

El RNA de la telomerasa se ha identificado en muchas especies filogenéticamente distantes, los cuales se pueden diferenciar por su tamaño, y por su estructura primaria, cada RNA de la telomerasa tiene una estructura parecida a una pseudo ligadura que esta situada cerca de la secuencia molde, también en la cadena 3' del RNA de la telomerasa en vertebrados se encuentra la caja H/ACA, la cual es un dominio nucleolar (snoRNA) (Theimer, 2007).

La comparación filogenética del RNA de la telomerasa de 35 vertebrados reveló ocho regiones conservadas (CR1-CR8) de las cuales, cuatro regiones de estructura secundaria se han conservado evolutivamente: el dominio 5'-terminal de la pseudo ligadura, el dominio CR4-CR5, el dominio CR7 y el dominio de la caja H/ACA (similar a snoRNA) (Chen y Greider, 2005).

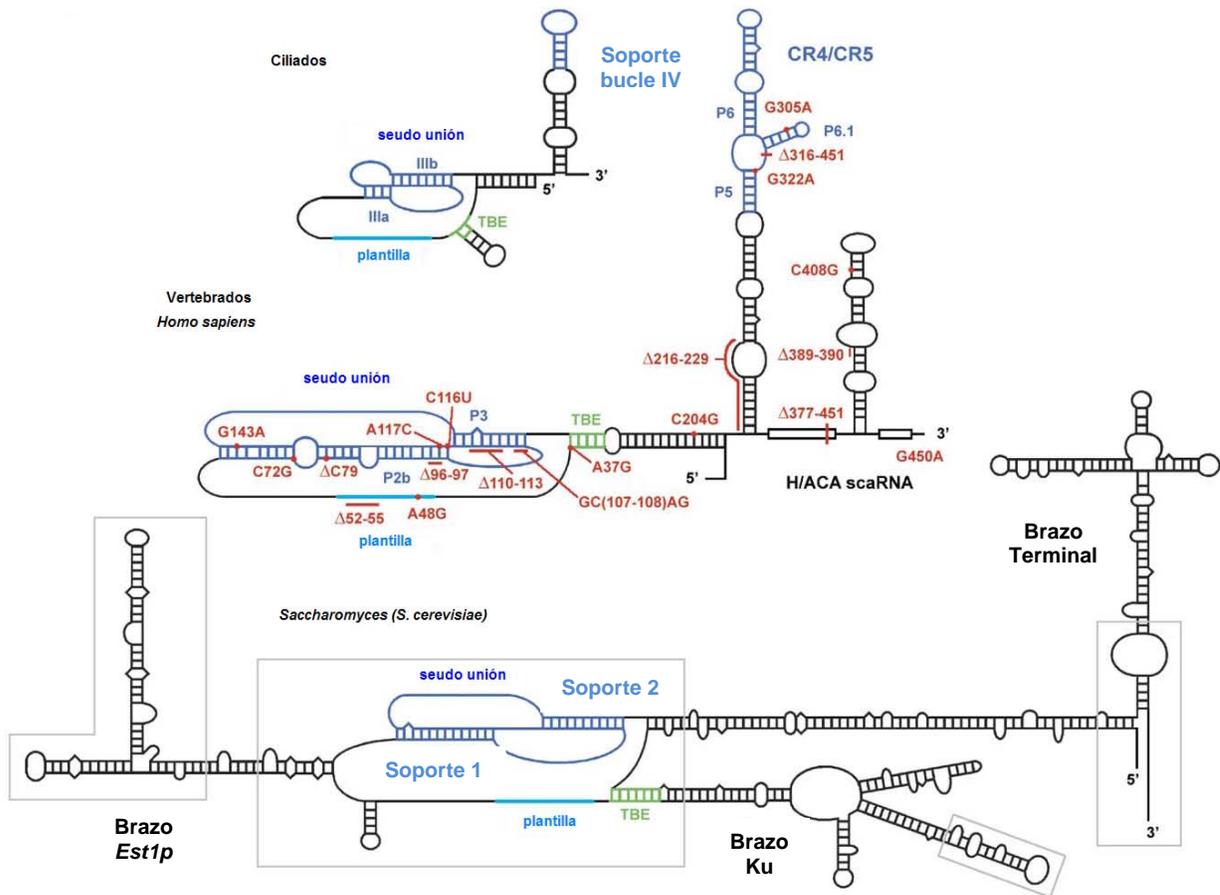


Figura 3.2 Subunidad de RNA de la telomerasa (hTERC), para ciliados, vertebrados y levaduras respectivamente. Modificado de Theimer, 2006.

Los últimos tres dominios desempeñan papeles importantes en la función, la estabilidad, el proceso y la comunicación intracelular del RNA de la telomerasa en vertebrados, asimismo los dominios estructurales conservados también tienen la función de mediar el acoplamiento de otras proteínas a la holoenzima de la telomerasa (Ly y col, 2005).

De las 8 regiones (CR1-CR8), tres de estas regiones (CR1-CR3) están situados en el dominio 5'-terminal de la pseudo unión del RNA. La región CR1 del hTER abarca la

secuencia de la plantilla (${}_{46}\text{CUAACCCUAA}_{55}$) que dirige la síntesis fiel del DNA telomérico en humanos (Schattner y col, 2006).

En el dominio 5'-terminal del hTR, las regiones CR2 (de A172 a C183) y CR3 (de C92 a G120) en conjunto, son las encargadas de controlar la arquitectura de la pseudo unión. Por otro lado en el hTER desnudo, la región CR2 forma una estructura de unión en la hélice-terminal, mientras que la región CR3 se encuentra libre para interactuar de manera débil con otras regiones del RNA (Fu y Collins, 2006).

Entre las regiones analizadas de hTER, se ha observado una pseudo unión helicoidal, la cual tiene una función catalítica y un dominio conservado conocido como regiones (CR4-CR5) el cual tiene una estructura en forma de apéndice y ha sido propuesto como un sitio putativo para el hTERT (Khanna y col, 2006).

También el hTER presenta un su región 3'-terminal de la caja (H/ACA) una hélice-bucle/5'-ACA-3' que es similar al dominio conservado de un pequeño grupo de ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs) (Khanna y col, 2006).

Estos RNAs participan en el acoplamiento nucleolar de los RNAs ribosomales, la existencia de una caja de H/ACA en hTER es constante con el proceso nucleolar del RNA de la telomerasa. La región de la caja H/ACA, aunque evolutivamente se encuentra conservada, no parece participar activamente en las interacciones de las proteínas de RNA o en la reconstitución de la actividad catalítica de la telomerasa *in vitro*. Notablemente, diversas proteínas accesorias descritas como parte del complejo del telomerasa han estado implicadas en el proceso y la estabilización de snoRNPs, sugiriendo que el proceso nucleolar mediado por factores de la maduración de H/ACA puede ser esencial para la activación de la telomerasa *in vivo* (Stanek y Neugebauer, 2006).

PROTEÍNAS ASOCIADAS A hTERT

Las primeras proteínas asociadas a la actividad de la telomerasa fueron identificadas por fraccionamiento bioquímico en *Tetrahymena thermophila*, fueron encontradas e identificadas dos proteínas, p80 y p95 (Shcherbakova y col, 2006).

La proteína homologa en mamíferos de p80, es la proteína TEP1 (proteína asociada a la telomerasa 1), que se asocia a actividad de la telomerasa, fue también identificada en seres humanos, ratones, y ratas (Poderycki y col, 2005).

La proteína TEP1 consiste en 2.629 aminoácidos y es mucho más grande que p80. Los 900 aminoácidos en el amino terminal de TEP1, tiene una región que colabora recíprocamente con el RNA de la telomerasa (Autexier y Lue, 2006). El carboxilo terminal de TEP1 contiene 12 WD40 repeticiones, una región que se encuentra implicada en interacciones proteína-proteína (Jagadeesh y col, 2006). La expresión de la proteína TEP1 se detecta en la mayoría de los tejidos finos sin importar actividad del telomerasa (Poderycki y col, 2005).

A pesar de su asociación con el RNA y los componentes catalíticos de la telomerasa, la inhibición en el función de la proteína TEP1 no afecta la actividad de la telomerasa o la longitud del telómero (Liu y col, 2004).

Recientemente, TEP1 también se ha identificado como componente de grandes partículas citoplásmicas vRNA (MPV), que son complejos de ribonucleoproteínas. Las funciones de TEP1 en ambas ribonucleoproteínas (telomerasa y las vRNA) siguen siendo desconocidas (Steiner y col, 2006).

A hTERT también se asocian proteínas chaperonas (p23 y Hsp90), encontrándose inicialmente en levaduras, e *in vitro* posteriormente en células de mamíferos (Hansen, 2006). Dentro de las proteína chaperonas asociadas a hTERT en humanos,

se encuentra hsp90 y p23, hsp90 interactúa con la telomerasa asistiendo al acoplamiento adecuado de la ribonucleoproteína y a la actividad de la telomerasa como enzima, es necesario mencionar que estas chaperonas también se pueden enlazar otras transcriptasas reversa de origen viral de manera transitoria (Keppler y col, 2006).

La telomerasa en humanos se diferencia de muchas otras transcriptasas reversa debido a su asociación constante con la plantilla de la subunidad del RNA (Poderycki y col, 2005).

La telomerasa reconoce y alarga telómeros, mediante la asociación con la región de la plantilla de hTER para después translocarse a la posición siguiente para el acoplamiento de hTER (Jady y col, 2006). Para que ocurra esta translocación y sea estable, es necesario un cambio conformacional en la estructura de la telomerasa activa, el cual se encuentra regulado por las chaperonas hsp90 y el p23 (Toogun y col, 2007).

La proteína 14-3-3 también se asocia a hTERT y tiene como función regular la localización nuclear de la telomerasa (Lin y col, 2006). La familia de la proteína 14-3-3 desempeña un papel regulador en la transducción de señales, en los puntos de comprobación del ciclo celular, en la apoptosis ligándose a los sitios de fosfoserina y con lo cual regula la unión y localización subcelular de otras proteínas (Jagadeesh y col, 2006).

La proteína 14-3-3 interactúa específicamente con la región del C-terminal de hTERT *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, esta interacción no se requiere para la actividad de la telomerasa *in vitro* (Bridges y col, 2005).

La región del C-terminal de hTERT interactúa con la región del C-terminal de la proteína 14-3-3 teniendo como característica la estructuración de racimos de

serina/treonina, formándose una hélice anfipática, de tal forma que la mutación en los residuos de serina/treonina (1030Thr, 1037Ser, y 1041Ser) suprimen la interacción y la localización citoplásmica del hTERT, esta mutación también inhibe la acumulación y localización nuclear del hTERT (Dunaway y col, 2004).

La estructura y la secuencia primaria de hTERT tienen una señal nuclear para su exportación, situada en el N-terminal de la región de unión a 14-3-3. Asimismo la unión de 14-3-3 a hTERT enmascara la señal nuclear de exportación y por lo tanto bloquea la exportación nuclear de hTERT (Jagadeesh y col, 2006).

La deficiencia de la proteína 14-3-3 induce la pérdida de la secuencia telomérica, así como la función de extremos cromosómicos. Esto sugiere funciones adicionales de la proteína 14-3-3 en el control del punto de comprobación de G2/M y la integridad genética, siendo independiente de su colaboración en la localización nuclear del hTERT (Hermeking y col, 2006).

PROTEÍNAS ASOCIADAS A hTER

Los dominios conservados dentro de la molécula de hTER son sitios de reconocimiento para las proteínas de unión hTER. De acuerdo con los análisis estructurales, varias proteínas de son necesarias para la funcionalidad de hTER (Theimer y Feigon, 2006). Estas proteínas son componentes de pequeños complejos de ribonucleoproteínas y proteínas heterogéneas de complejo nuclear involucradas en la estabilidad de RNAs, la maduración, el proceso de pre-RNA y la localización de hTER (Watkins y col, 2004).

El RNA de la telomerasa en mamíferos contiene una ramificación 3'-terminal semejante a la estructura de los snoRNAs de H/ACA (Khanna y col, 2006). La presencia del dominio H/ACA en el RNA de la telomerasa en mamíferos indica una

diferencia fundamental en la biogénesis del RNA de la telomerasa y el acoplamiento de la telomerasa en mamíferos y otras células eucariontas (Wang, y Meier 2004).

Las cuatro proteínas de unión (snoRNA) de H/ACA:hGAR1, disquerina/NAP57, hNOP10, y hNHP2 se asocian al hTER y a la telomerasa humana, también hTER se asocia con las ribonucleoproteínas de los complejos nucleolares (snoRNPs), teniendo como función la estabilidad, la acumulación, la maduración y la localización de hTER (Tanaka y col, 2007). Además de las proteínas (snoRNA) de unión, las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs) C1, C2 A1 y UP1 se encuentran asociadas ha hTER y al DNA telomérico (Zhang y col, 2006).

Los hnRNPS C1, y C2 interactúan específicamente, con el uridilato del hTER y éste a su vez se encuentra asociado con el complejo de la telomerasa humana, esta unión C1/C2-hTER/telomerasa, correlaciona con la capacidad de la telomerasa para tener acceso a los telómeros. La interacción simultánea de A1/ UP1 con el DNA telomérico y el hTER, también regula el acceso de la telomerasa a los telómeros (Zhang y col, 2006).

También se han encontrado otras proteínas como por ejemplo el antígeno “La”, el cual interactúa de manera específica con hTER, la telomerasa y también influye en la longitud del telómero, finalmente otras proteínas como hStua y L22 interactúan con hTER e intervienen en el procesamiento de hTER y en la localización y el acoplamiento de la telomerasa (Zielinski y col, 2006).

ESTRUCTURA 3'-TERMINAL DE snoRNA DE H/ACA EN EL DOMINIO DE hTER

El RNA de la telomerasa en vertebrados contiene una caja grande H/ACA (snoRNA) en su estructura 3'- terminal. Como los snoRNAs canónicos de la caja H/ACA, el dominio de H/ACA de hTER se encuentra formado por dos estructuras en horquilla

las cuales se encuentran unidas y seguidas por una región conservada de la caja H (ANANNA) y de la caja ACA (Tycowski y col, 2004).

Por otra parte la caja H/ACA como dominio de hTER, une a proteínas snoRNP de H/ACA, y dirigen el procesamiento del extremo 3' del RNA de la telomerasa, proporciona estabilidad metabólica para el RNA maduro y dirige el tráfico intracelular de la ribonucleoproteína telomerasa (Stanek y Neugebauer, 2006).

La estructura mínima requerida para la acumulación de los snoRNAs de la caja H/ACA incluye las hélices básicas de las horquillas 5' y 3' y de las cajas conservadas de H y ACA. Las cajas de H y ACA del RNA de la telomerasa en vertebrado se encuentran situadas en las regiones CR6 y CR8 respectivamente (Richard, 2006). Las cajas intactas de H y de ACA son absolutamente esenciales para la acumulación de los snoRNAs de H/ACA y los RNAs de la telomerasa. La caja de ACA se encuentra localizada en el nucleótido 3 del extremo 3' de la caja H/ACA (snoRNAs) y RNAs de la telomerasa (Khanna y col, 2006).

Las cajas H y ACA funcionan de manera conjunta con las hélices básicas de las horquillas 5' y 3' de los snoRNAs de la caja H/ACA. La formación de la hélice en el extremo 3' es crucial para la acumulación de los snoRNAs de la caja H/ACA y del RNA de la telomerasa (Richard y col, 2006).

SEUDOURIDILACIÓN DE hTER EN 5' Y 3'

Los snoRNAs de la caja H/ACA funcionan como una guía para RNAs en el sitio específico en la pseudouridilación de rRNAs y RNA nucleolar. Las estructuras internas en el bucle de la orquilla 5' y/o 3' de los snoRNA, también conocidas como hendiduras para la pseudouridilación, se asocian con la secuencia blanco mediante el apareamiento con algunas bases. El sustrato de uridina destinado para la conversión en pseudouridina se coloca en la base superior del apéndice, cerrando el

bucle de pseudouridilación. De tal forma que la distancia entre la uridina y la caja de H o ACA de snoRNA es de aproximadamente de 14 nucleótidos (Schattner y col, 2006).

Las horquillas en 5' y 3' del hTER, funcionan como hendiduras para la pseudouridilación, además de unirse a proteínas como hGAR1, hNHP2, hStua, LL22, hnRNP C1/C1, "autoantígeno La", hNOP10, caja H/ACA de proteínas snoRNP, y hTERT, las cuales interactúan con el hTER y están implicadas en la estabilidad de hTER, la maduración, la acumulación y el acoplamiento funcional del complejo de la ribonucleoproteína de la telomerasa, el hTER de mamíferos, también se asocia con la proteína disquerina que es necesaria para la actividad sintasa de la pseudouridina para la caja H/ACA y snoRNPs (Khanna y col, 2006).

Numerosas observaciones experimentales sugieren que estas proteínas poseen un rol importante en la biología del telómero, como lo señalan los siguientes hechos: 1) a través de experimentos de inmunoprecipitación se ha observado que hnRNP A1, hnRNP D y hnRNP C1/C2 interactúan con la holoenzima telomerasa; 2) hnRNPs A1, A2-B1 y D pueden asociarse a las secuencias repetitivas de cadena simple del DNA telomérico *in vivo* y 3) todas las hnRNPs que se asocian al telómero y a la telomerasa son componentes integrales de la matriz nuclear, sitio putativo de unión de los telómeros, lo que sugiere que ellos puedan estar próximos al complejo de hnRNPs o unidos directamente a éstos (Tanaka y col, 2007).

Por otra parte, la expresión deficiente de hnRNP A1 produce telómeros cortos, sin embargo, la longitud de los mismos aumenta cuando se restituye hnRNP A1, lo que indica que estas ribonucleoproteínas están estrechamente involucradas en la regulación de la longitud del telómero (Zielinski y col, 2006).

El "autoantígeno La" es importante para el acoplamiento de otras moléculas de RNA y para la maduración de tRNAs, también interactúa directamente con la

ribonucleoproteína de la telomerasa humana, los niveles de expresión del “autoantígeno La”, también influyen la longitud del telómero de una manera dependiente de la ribonucleoproteína de la telomerasa (Park y col, 2006).

Sobre la base de estas observaciones se han propuesto dos modelos para explicar como la holoenzima telomerasa se une al telómero. Uno de los modelos plantea una estructura telomérica en lazo o T-loop, la cual se une a hnRNP A1 y a otras hnRNPs accesorias que al interactuar con la holoenzima telomerasa producen un cambio conformacional que expone la hebra 3' terminal de cadena sencilla para permitir entonces la elongación por parte de la telomerasa. El otro modelo supone un telómero sin estructuras en lazo, que al ser reconocido por la hnRNP A1 induce el secuestro de la holoenzima telomerasa hacia el extremo 3' terminal y por consiguiente produce la elongación del telómero (Tang y col, 2007).

ELEMENTOS ESPECÍFICOS PARA EL RNA DE LA TELOMERASA EN LAS HORQUILLAS 5' Y 3' DE hTER

La región distal de las horquillas 5' y 3' del dominio H/ACA de hTER acomodan los dominios específicos de la telomerasa funcionalmente esenciales que no se encuentran en los snoRNAs canónicos de la caja H/ACA. El dominio CR7 se requiere para la acumulación *in vivo* de hTER este dominio se localiza en la horquilla terminal 3', adquiriendo una configuración terminal típica en apéndice/bucle, que consiste en una hélice de 4 pares de bases y una vuelta de 8 nucleótidos (Theimer y Feigon, 2006).

Comparando los snoRNAs canónicos de la caja H/ACA, la horquilla 5' del dominio H/ACA del RNA de la telomerasa en vertebrados, es larga y extendida, la parte superior de esta horquilla tiene regiones estructurales esenciales para el acoplamiento de hTERT, asimismo para la función de la telomerasa (Jady y col, 2004).

INTERACCIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA Y LA SUBUNIDAD RNA

Actualmente se piensa que la hTER posee dos dominios funcionales: la región molde y la región de doble orquilla y que existe un tercer dominio que permite que éstas dos regiones puedan plegarse concretamente para interactuar cada una con un dominio distinto de hTERT. En algunos tejidos la ausencia de actividad telomerasa es debida a la represión del gen, mientras que en otros tejidos se debe a que sólo se expresa el RNAm inactivo de la hTERT, el cual consiste en una proteína truncada que no posee la función catalítica (Teixeira y col, 2004).

Interesantemente esta proteína sólo pierde el motivo catalítico, por lo que puede unirse a la hTER. Esto hace, suponer un modelo de competencia en el cual ambas proteínas, la inactiva y la activa compiten por los sitios de unión a la hTER, lo que sugiere a su vez que uno de los puntos de regulación de la actividad telomerasa pueda estar en el ámbito de la expresión de ambos transcritos. Este modelo hace suponer que existen distintos tipos de regulación de esta actividad en los humanos y probablemente obedece a la diferencia en la regulación del ciclo celular de las células de los diferentes tejidos en los humanos (Ju y Rudolph, 2006).

MULTIMERIZACIÓN DE LA TELOMERASA FUNCIONAL

Mediante la purificación del complejo humano de la telomerasa, se aisló una ribonucleoproteína que es varias veces más grande que un solo par de las subunidades de hTERT-hTER (Hansen, 2006). Por lo tanto, hay especulación de que el holoenzima del telomerasa pudo consistir en un oligomero de varias subunidades catalíticas y/o de la plantilla *in vivo*, más bien que la composición mínima de un TERT y de un TER (Hansen, 2006).

La región de la plantilla del hTER y un elemento de la horquilla del dominio de la caja de H/ACA se han identificado como sitios de la interacción directa con la proteína del

hTERT, tales sitios proporcionan el potencial para atar entre varios pares de los monómeros o del homodímeros del hTERT -TER. Las evidencias encontradas tanto en levadura como en los sistemas humanos apoya la existencia de más de un dímero de la subunidad en la telomerasa endógena (Hansen, 2006).

REPLICACIÓN TELOMÉRICA

PROPAGACIÓN DE LOS TELÓMEROS POR LA TELOMERASA

La terminación de la replicación de los cromosomas de las células eucariotas está estrechamente relacionada con el problema de la duplicación del DNA lineal al final del proceso, el nuevo DNA queda con un extremo 5' y un extremo 3' protuberante que no puede ser replicado por las DNA polimerasas celulares, como consecuencia de esta incapacidad de las DNA polimerasas para replicar el extremo cromosómico, se conduciría irremediamente a un acortamiento progresivo de los extremos cromosómicos tras cada ciclo de replicación (Mattern y col, 2004).

Para evitar que se acorte el telómero, las células eucariotas han desarrollado una estrategia que consiste en elongar el extremo 3' de la cadena de DNA de manera que no queden secuencias de cromosoma sin replicar (Figura 6.1) (Kelland y col, 2007). De tal forma que la síntesis del telómero y la incorporación de la telomerasa a los telómeros, está restringida a la fase S del ciclo celular, en donde se produce la sincronización necesaria para el alargamiento del telómero en células humanas, y de que en ese momento celular, múltiples estructuras nucleares juegan un papel importante en la regulación, el transporte y la biogénesis de la telomerasa (Campbell y col, 2006).

En células eucariotas de mamífero la telomerasa alarga preferencial los telómeros más cortos de una población. Alternativamente, todos los telómeros pueden ser extendidos durante cada ciclo celular, pero no simultáneamente, de tal forma que la telomerasa es activa solamente en un subconjunto de telómeros durante la fase S. Se sabe que los cromosomas se replican en momentos diferentes durante la fase de S, y de igual forma la sincronización en la síntesis del telómero podría variar, por ejemplo, la sincronización en la réplica induce cambios en la estructura

de la cromatina y la accesibilidad a los telómeros en los cromosomas individuales (Kelland y col, 2007).

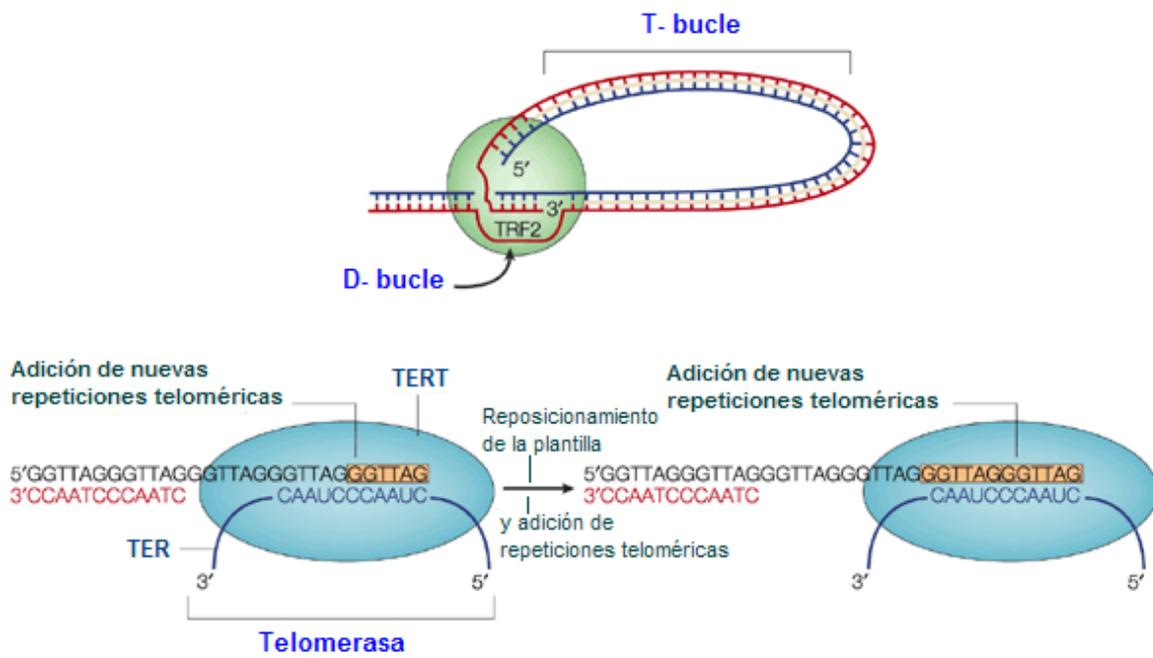


Figura 6.1 Adición de repeticiones teloméricas por la telomerasa. Tomado de Mathon, 2001.

Así mismo la telomerasa puede realizar múltiples rondas de replicación para la síntesis de las repeticiones teloméricas, en donde se ha observado en diferentes estudios *in vitro* que la telomerasa en diversos organismos tiene cuatro eventos (Figura 6.2) fundamentales que son: (I) reconocimiento del marco de lectura de DNA, (II) alineación con la plantilla de RNA, (III) elongación, y (IV) translocación (Autexier y Lue, 2006).

El DNA telomérico es reconocido en parte, por un probable sitio de anclaje en hTERT, que se une preferentemente al apéndice de DNA rico en guaninas, siendo indispensable esta interacción para el proceso de elongación y translocación (Lue Ly, 2007). Esta interacción se produce en el extremo 5' mediante la alineación de la plantilla de RNA con los nucleótidos del extremo del cromosoma, esta

alineación es en la posición adyacente al extremo del cromosoma (Lue y Li, 2007).

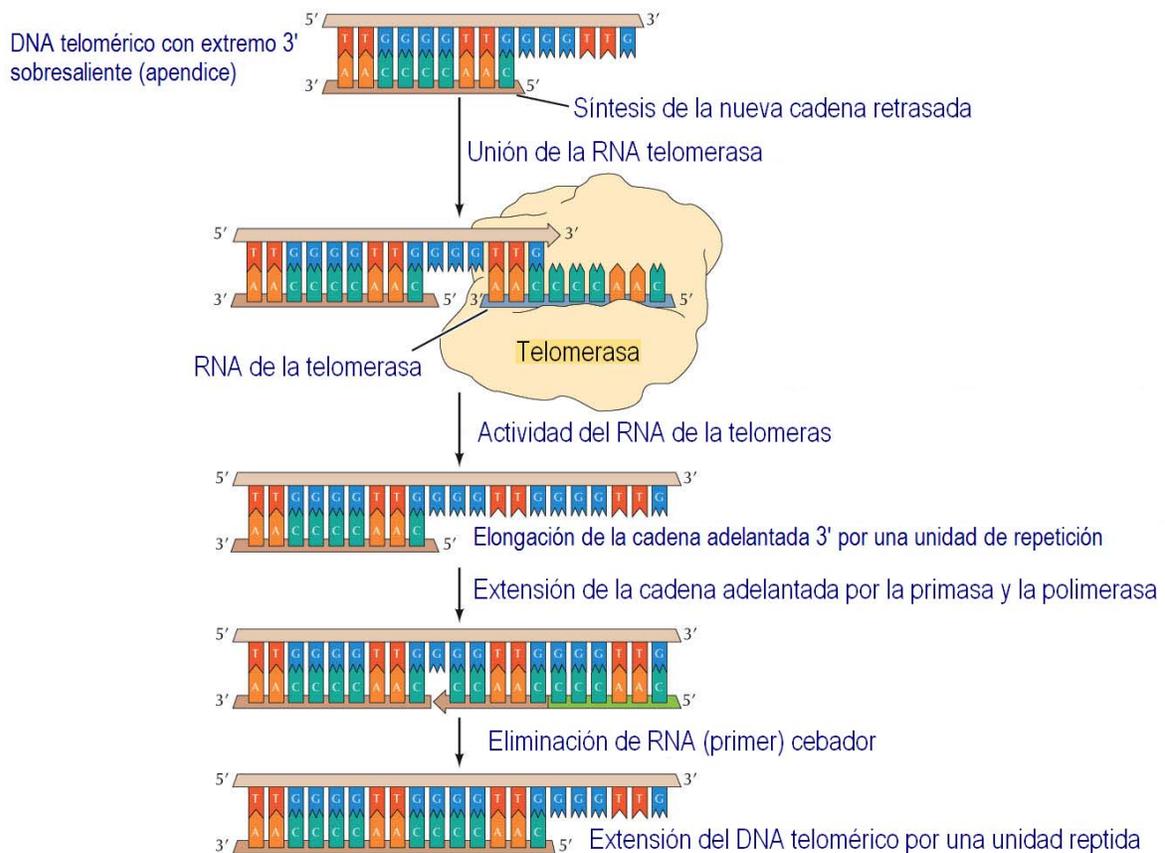


Figura 6.2 Extensión del telómero por la telomerasa. Tomada de Cooper, 2006.

Durante la elongación, la plantilla dirige la adición secuencial de los nucleótidos al extremo telomérico, después de que la síntesis de las nuevas repeticiones teloméricas ha terminado, la plantilla de la telomerasa es translocada al extremo cromosómico para permitir el inicio de una nueva ronda que adicione repeticiones teloméricas (Wyatt y col, 2007).

Biogénesis y ensamble de la ribonucleoproteína telomerasa

El hTERC se transcribe como precursor y se procesa en el extremo terminal 3' de la cadena de DNA y se produce un RNA de 451 nucleótidos. La acumulación de hTERC que ha experimentado este evento requiere de un procesamiento activo de la región conservada de la secuencia denominada caja H/ACA (Hoareau-Aveilla, 2006). Este motivo es regulado por un complejo proteico que contiene en su estructura a disquerina, así en consecuencia si existe alguna mutación en la disquerina se verá afectado el procesamiento y la acumulación de hTERC (Collins y col, 2002).

El hTERC y el hTERT experimentan diversos movimientos en la célula, los cuales son importante para el funcionamiento de la telomerasa, hTERC se encuentra localizado en múltiples estructuras nucleares, incluyendo los órganos de Cajal, nucleolos y en los telómeros (Jady y col, 2006).

De igual forma hTERT también se ha localizado en los órganos de Cajal, nucleolos, y asociado a los telómeros. Algunos de los factores que regulan el tráfico celular de estos dos componentes se han identificado en sitios como los nucleolos, complejo proteico SMN, y proteína 14-3-3 (Tomlinson y col, 2006).

Los estudios citológicos en células HeLa sugieren que la localización de los componentes de la telomerasa pueden cambiar a través del ciclo celular. A pesar de estos estudios, no está claro aún, en qué compartimiento celular se lleva acabo el ensamble de hTERT y hTERC para que la ribonucleoproteína de la telomerasa sea funcional (Jady y col, 2006).

Para que se lleve a cabo el ensamble de la telomerasa es necesario la intervención de algunas proteínas chaperonas como las proteínas p23 y Hsp90,

las cuales se unen de manera estable a la telomerasa. Interesantemente en humanos el ensamble de la ribonucleoproteína telomerasa puede formar múltiples dímeros, aunque la función de multimerización sigue siendo incierta (Keppler y col, 2006).

Reclutamiento de la ribonucleoproteína telomerasa al extremo telomérico del cromosoma

Los estudios en levadura y seres humanos indican que el acoplamiento de la telomerasa a los telómeros se encuentra influenciado por múltiples factores, como las proteínas reguladoras o factores reguladores TRF1 y TRF2, los dominios de hTERT, el acortamiento de los telómeros, y el ciclo celular. En primer lugar, la telomerasa se asocia a proteínas como Est1A, Est1B, Est1C, y POT1 las cuales juegan un papel de unión al DNA de cadena sencilla, sin embargo todavía no está claro si juegan algún papel en el mecanismo de reclutamiento de la telomerasa al telómero (Bianchi y col, 2004). En segundo lugar, los residuos del N-terminal del hTERT dentro del dominio de DAT (disociador de las actividades de la telomerasa) pueden tener un papel de unión al DNA telomérico de cadena sencilla como sitio de anclaje (Moriarty y col, 2005).

En tercer lugar, un mecanismo en cis que actúa en células humanas y en levadura que regula el mantenimiento de la longitud del telómero y tiene la facultad de modular el acceso de la telomerasa a los telómeros (de Lange, 2005).

Los telómeros largos, que tienen más factores proteínicos asociados, se encuentran en una fase en la que la telomerasa actúa con menor frecuencia que en los telómeros cortos, que tienen menor número de factores proteínicos asociados; el cómo los telómeros cortos reclutan activamente la telomerasa aún no se ha dilucidado completamente. Por último, el anclaje de la telomerasa a los telómeros se encuentra regulado por el ciclo celular (Tomlinson y col, 2006).

Alineación de la plantilla de RNA en el extremo telomérico del cromosoma

Los estudios *in vitro* del complejo de la telomerasa derivados de múltiples organismos indican que, al menos, dos tipos de interacciones son importantes para la alineación del sitio catalítico de la ribonucleoproteína telomerasa en el extremo 3' de cadena sencilla rica en guaninas de los telómeros (Li y col, 2007).

En una primera interacción, una región de algunos pares de base de hTERC se alinean con el DNA telomérico de cadena sencilla en el extremo 3', para formar un híbrido de RNA-DNA, adyacente a la posición de la plantilla del extremo 3' del telómero (Moriarty y col, 2005).

En una segunda interacción, una parte de hTERT interactúa con el DNA en el extremo 5' de la telomerasa del cebador híbrido de RNA-DNA, el cual es catalíticamente importante, además de permitir que la telomerasa mantenga el contacto con el cromosoma durante la translocación (Moriarty y col, 2005).

Elongación del extremo telomérico del cromosoma

La plantilla de hTERC dirige la adición secuencial de nucleótidos al extremo 3' del DNA telomérico. Después de la adición de un nucleótido, la plantilla y el sitio catalítico deben moverse entre sí a otro lugar dentro de la ribonucleoproteína telomerasa para colocar el residuo apropiado de la plantilla en el sitio activo, ya que el apareamiento de bases y la adición de nucleótidos ocurre en un extremo de la plantilla, mientras que el desapareamiento de bases se lleva a cabo en otro lugar (Förstemann Lingner, 2005).

Este desapareamiento se piensa que reduce la energía utilizada para mediar el paso de la subsecuente translocación. La adición de nucleótidos ocurre hasta el

límite de la plantilla en que hTERC se define por una hélice llamada “P1b” (Garcia y col, 2007).

Translocación de la ribonucleoproteína telomerasa, alineación de la plantilla de RNA (TERC) y alargamiento del extremo de DNA telomérico de cadena sencilla.

La ribonucleoproteína telomerasa humana tiene la capacidad de catalizar múltiples rondas en la adición de repeticiones teloméricas, en el mismo substrato telomérico (Escoffier y col, 2005). Antes de iniciar la síntesis de otra repetición telomérica, la telomerasa experimenta un desplazamiento llamado translocación para colocarse de nuevo en el telómero (Lue y col, 2005).

Los pares de bases en el híbrido de DNA/RNA no son reconocidos, la plantilla de RNA se coloca nuevamente en el sitio activo, y la plantilla de pares de bases en el extremo 3' del DNA es nuevamente sintetizada. El sitio de anclaje interacciona con el DNA en 5' del híbrido RNA-DNA y se piensa que ayuda a mantener la interacción de la telomerasa con el DNA durante el desplazamiento de translocación (Jagadeesh y col, 2006).

Alargamiento de la prolongación telomérica del extremo cromosómico

La reacción de elongación procede de la siguiente forma: la plantilla de hTERC dirige la adición secuencial de nucleótidos al extremo 3' del DNA telomérico. Tras la adición de un nucleótido, la plantilla y el sitio catalítico debe moverse entre sí dentro de la ribonucleoproteína telomerasa para colocar el residuo apropiado de la plantilla en el sitio activo (Garcia y col, 2007).

El apareamiento de bases y la adición de nucleótidos ocurre en un extremo de la plantilla, mientras que la separación entre pares de bases ocurre en otro lugar de

la plantilla (Förstemann y Lingner, 2005). Este desapareamiento se cree que reduce la energía utilizada para mediar el paso subsecuente de translocación. La adición de nucleótidos es en sentido ascendente hasta el límite de la plantilla en que hTERC es definido por una hélice llamada P1b (Garcia y col, 2007).

Disociación de la telomerasa del extremo cromosómico

En una disociación *in vitro*, la telomerasa puede separarse de la plantilla "primer" después de cada adición de nucleótidos o durante el paso de la translocación. La regulación en la disociación de la telomerasa de los telómeros *in vivo* aún no está dilucidado completamente. Un factor que está involucrado es una helicasa denominada hPIF1 la cual tienen un papel fundamental en casi todos los procesos metabólicos de DNA, incluyendo la replicación nuclear, mitocondrial, la recombinación y reparación del DNA (Snow y col, 2007), esta helicasa se une preferentemente al DNA telomérico, tanto *in vitro* como *in vivo*, la helicasa hPIF1 *in vitro* inhibe la actividad de la telomerasa reduciendo su procesividad, desenrolla el complejo DNA/RNA formado por el RNA de la telomerasa y el DNA telomérico (Zhang y col, 2006).

SÍNTESIS DE LA CADENA RETRASADA (CADENA-C) DEL TELÓMERO

Debido a la naturaleza antiparalela del DNA, la polimerización del DNA es unidireccional, y la síntesis de la cadena es discontinua, esta cadena es llamada cadena retrasada (Wai, 2004). No obstante que la función de la polimerasa en la cadena retrasada es muy similar a la cadena líder, el procesamiento de síntesis de las dos cadenas procede completamente en forma diferente (Smogorzewska y de Lange, 2004).

Inicio de la síntesis de la cadena-C del telómero

Las DNA polimerasas no son capaces de sintetizar DNA de *novo* y requieren de la síntesis de un cebador, por lo general por un DNA dependiente de una RNA polimerasa (primasa) para iniciar la síntesis del DNA. En las células eucariotas, el cebador (primer) es sintetizado por el complejo de la DNA polimerasa alfa/primasa. Primeramente la porción de la DNA primasa del complejo (pol- α /primasa) sintetiza aproximadamente de 6–10 nucleótidos del RNA cebador en la cadena G del telómero, mientras que su cadena complementaria es sintetizada por el complejo pol- α /primasa usando un RNA cebador convencional; posteriormente la DNA polimerasa (pol- α) del complejo (pol- α /primasa) sintetiza una porción adicional de 20 nucleótidos de DNA en la cadena G del telómero, mientras que su cadena complementaria es sintetizada por el complejo pol- α /primasa usando un RNA cebador convencional. Ha habido informes que sugieren que TRF1 inhibe esta actividad en los telómeros, aunque el mecanismo y la importancia fisiológica de esta inhibición aún no es claro (Houben y col, 2007).

Función de la polimerasa en la cadena-C del telómero

Después de que los cebadores (primers) son sintetizados en la cadena rica en G, el factor C de la replicación se une al extremo 3' del DNA iniciador para promover la función de la polimerasa. La naturaleza no procesiva de la actividad catalítica de la polimerasa alfa (pol α) y la formación de un enlace fuerte al factor C de la replicación probablemente dirigen la unión del complejo cebador-plantilla para la renovación del complejo de la primasa-polimerasa alfa. Después de que el complejo de la primasa, polimerasa alfa-primasa se desplaza al cebador, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) se une para formar una estructura de abrazadera deslizante. Entonces el factor C de la replicación se disocia, y la DNA polimerasa delta (pol δ) se une y cataliza de manera procesiva la síntesis de DNA (Moldovan y col, 2007).

Desplazamiento de la polimerasa alfa (pol α) de la cadena-C del telómero por la unión del factor C de la replicación

Una vez que el cebador de RNA-DNA se sintetiza, el factor C de la replicación (RFC) inicia una reacción, denominada cambio ó conmutación de la polimerasa; la polimerasa delta (pol δ) que es una enzima procesiva sustituye a la polimerasa alfa (pol α) que es una enzima cebadora. El factor C de la replicación (RFC) se une al extremo terminal 3' del RNA-DNA cebador del primosoma, para desplazar el complejo de la primasa-polimerasa alfa, así el acoplamiento de RFC promueve la unión del complejo cebador (primer) de reconocimiento para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Masuda y col, 2007).

FORMACIÓN DE LA PINZA DE DESLIZAMIENTO EN LA CADENA-C DEL TELÓMERO

La unión del complejo cebador (primer) implica el reconocimiento del motivo del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El factor C de la replicación abre transitoriamente el PCNA en una reacción dependiente de ATP y, a continuación el PCNA nuevamente se cerrara alrededor de la doble hélice junto al cebador (primer) terminal. Esto conduce a la formación de la pinza de deslizamiento, así el factor C de la replicación (RFC) se disocia después de la formación de la pinza de desplazamiento en la cadena-C del telómero (Moldovan y col, 2007), en seguida el factor C de replicación se prepara para disociarse de PCNA después de la formación de la abrazadera deslizante y consecuentemente el DNA sólomente queda unido a la DNA polimerasa delta (pol δ) (Rossi y Bambara, 2006).

Formación del complejo de la enzima procesiva en la cadena-C del telómero

Así la conmutación de la polimerasa es un acontecimiento clave que permite la síntesis procesiva de DNA mediada por el complejo de la DNA polimerasa delta y

el antígeno nuclear de proliferación celular (pol- δ /PCNA) (Rossi y Bambara, 2006). Posteriormente la carga de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) conduce el reclutamiento de la polimerasa delta (pol δ). El PCNA en humanos es un homotrímero de subunidades de 36 kDa que forman una estructura en anillo alrededor de la hélice de DNA llamada abrazadera deslizante. La estructura de PCNA mediada por RFC es un acontecimiento clave en la transición del modelo de cebador al modelo de síntesis del DNA. El complejo de la enzima procesiva se forma por la holoenzima DNA polimerasa delta (pol δ) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (Rossi y Bambara, 2006).

Síntesis procesiva de la cadena-C del telómero

Una vez que la conmutación de la polimerasa alfa (pol α) por la polimerasa delta (pol δ) se completa, se inicia la síntesis de un pequeño fragmento de DNA llamado fragmento de Okazaki, debido a que la síntesis de la cadena es discontinua y como el fragmento de Okazaki que se extiende llega hasta el RNA cebador (Fortune y col, 2006), en la síntesis de la cadena se produce un desplazamiento por lo que el cebador contenido en el extremo terminal 5' adyacente al fragmento de Okazaki es doblado en una singular cadena de estructura plegadiza. Esta estructura plegadiza es removida por endonucleasas y próximo a los fragmentos de Okazaki se encuentra una DNA ligasa para ensamblar los fragmentos de Okazaki, de esta forma el proceso de extensión se completa con la unión de los fragmentos de Okazaki adyacentes (Mizuno y col, 2007).

Después de que el factor C de replicación (RFC) inicia el ensamble del complejo de reconocimiento del cebador, el complejo formado por la DNA polimerasa delta y el antígeno nuclear de proliferación celular (pol- δ /PCNA) es responsable de incorporar los nucleótidos adicionales antes de la posición del siguiente RNA cebador de inicio en sentido descendiente, así en la cadena retrasada los pequeños y discontinuos segmentos de un promedio de 100 nucleótidos de DNA,

llamados fragmentos de Okazaki, los cuales son unidos por una DNA ligasa (Mizuno y col, 2007).

Formación del pliegue intermedio en la cadena C

Cuando el complejo de la pol- δ /PCNA alcanza un fragmento de Okazaki en sentido descendiente, se produce un desplazamiento en la síntesis de la cadena. El cebador (primer) que se encuentra en el extremo terminal 5' del fragmento de Okazaki en sentido descendiente se pliega en una cadena sencilla plegadiza (Chilkova y col, 2007).

Eliminación del pliegue intermedio en la cadena-C

Dos endonucleasas, hDna2 y la endonucleasa de plegamiento 1 (FEN-1), son responsables de la formación de la estructura plegadiza naciente. La hDna2 además de interactuar con FEN-1 también interactúa de manera recíproca con hPIF1 para asegurar el correcto procesamiento de los fragmentos de Okazaki durante la réplica de la DNA, en humanos la hDna2 (endonucleasa/helicasa) es un monómero de aproximadamente 120 kDa mientras que por otro lado FEN-1 en humanos es un solo polipéptido de aproximadamente 42 kDa. La proteína de replicación A (RPA) regula la conmutación de endonucleasas durante la eliminación y desplazamiento del plegamiento de la cadena (Stewart y col, 2006).

La proteína de replicación A se une al plegamiento de la cadena C, en donde el primer paso en la eliminación del plegamiento intermedio es la unión de la proteína de replicación A (RPA) a lo largo de la estructura plegada. RPA en eucariontes es una proteína de unión al DNA de cadena sencilla (Fortune y col, 2006). Después de que RPA se une a lo largo de la estructura plegada, promueve la unión de la endonucleasa hDna2, ésta elimina la mayor parte de la estructura plegada, pero

el desplegamiento de la estructura es realizado posteriormente por FEN1 (Stewart y col, 2006).

Eliminación del RNA cebador y disociación de RPA y Dna2 en la cadena-C

La endonucleasa hDna2 elimina el RNA iniciador junto con varios desoxirribonucleótidos en sentido descendiente. La escisión del sustrato de RNA de cadena sencilla da lugar al desacople de RPA y Dna2. Los datos actuales de la función de la endonucleasa hDna2 se han obtenido a través de estudios con levaduras (Stewart y col, 2006).

Retraimiento de la estructura plegada remanente en la cadena-C

El residuo del pliegue, que es demasiado corto para promover el acople de RPA, es entonces procesado por FEN1. Hay evidencia de que la unión de RPA al extremo desplazado de RNA contiene fragmentos de Okazaki que evitan que FEN1 tenga acceso al sustrato. FEN1 es una endonucleasa de estructura específica que se une preferentemente a un sustrato cerca de la base del pliegue, el cual está formado por un solo nucleótido en el extremo 3' en sentido ascendente al cebador (primer) además del pliegue en 5' en sentido descendente al cebador (primer) (Stewart y col, 2006).

ENSAMBLE DE LOS FRAGMENTOS DE OKAZAKI ADYACENTES A LA CADENA-C

La eliminación del pliegue por FEN-1 conduce a la generación de un corte entre el extremo 3' del fragmento de Okazaki en sentido ascendente y el extremo 5' del fragmento de Okazaki en sentido descendente. Posteriormente la DNA ligasa I sella los cortes adyacentes entre los fragmentos de Okazaki procesados para generar de novo el DNA de doble cadena en el telómero (Stewart y col, 2006).

Disociación de la complejo procesivo (enzima procesiva) y término del extremo telomérico

En algún punto en el proceso de extensión un gran número de factores de regulación que reprimen la extensión del telómero quedan vinculados a la ampliación de telómero (Figura 6.3). Estos factores incluyen complejos entre TRF1, TRF2, la telomerasa, otros factores, y el mismo telómero (Rossi y Bambara, 2006).



Figura 6.3 Complejos de proteínas para TRF1 y TRF2 que se encuentran asociados al bucle -T. Modificado de Blasco, 2005.

A medida que las repeticiones son adicionadas a la cadena rica en guaninas (G), y una vez que se completa la síntesis de la cadena retrasada, nuevos sitios de unión quedan disponibles para la unión de factores represivos (Figura 6.4), consecuentemente en este estado de equilibrio la maquinaria telomérica se disocia, abandonando la estructura del telómero, que se doblara en una conformación estable llamada bucle (Stewart y col, 2006).

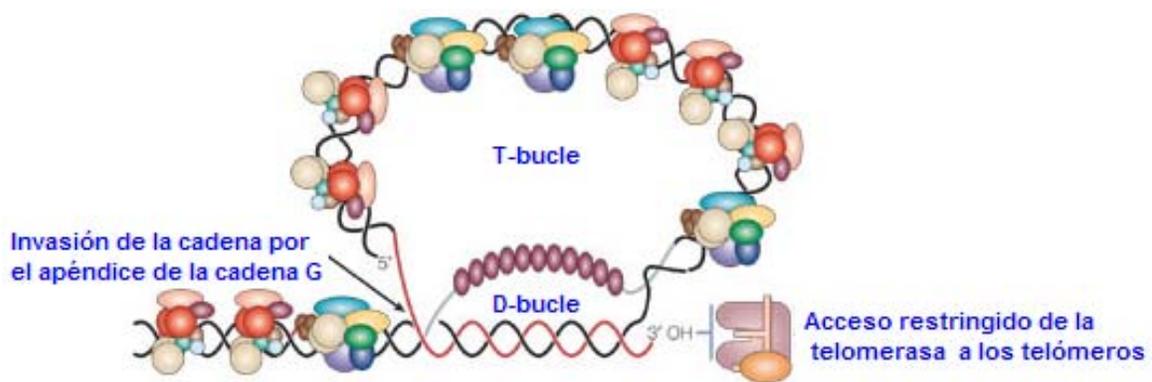


Figura 6.4 Formación del bulce-T, al término de la síntesis de DNA telomérico. Modificado de Blasco, 2005.

EMPAQUETAMIENTO DEL EXTREMO TELOMÉRICO

En este proceso de empaquetamiento existen varios pasos, incluyendo el corte en la cadena C, elongación de la cadena telomérica mediada por telomerasa, y la síntesis de la cadena C donde se encuentra involucrado el procesamiento y el mantenimiento telomérico; si bien aunque pareciera un mecanismo lineal, en los seres humanos aun no se entiende bien cómo se coordinan todos los pasos y qué otras actividades podrían estar implicadas (Tomlinson y col, 2006).

El DNA telomérico puede formar estructuras de orden superior, así mediante microscopía electrónica se encontró que en el DNA telomérico aislado de células humanas (Figura 6.5), se forma una cadena con una estructura peculiar llamado bucle telomérico (bucle t) (Tomlinson y col, 2006).

Actualmente sabemos que la función de la estructura bucle-t tiene como finalidad el super empaquetamiento del extremo cromosómico, el cual se encuentra formado por el extremo telomérico 3', de igual forma múltiples factores proteicos se unen al DNA telomérico y contribuyen en la estructura, formación y homeostasis telomérica (Hug y Lingner, 2006).

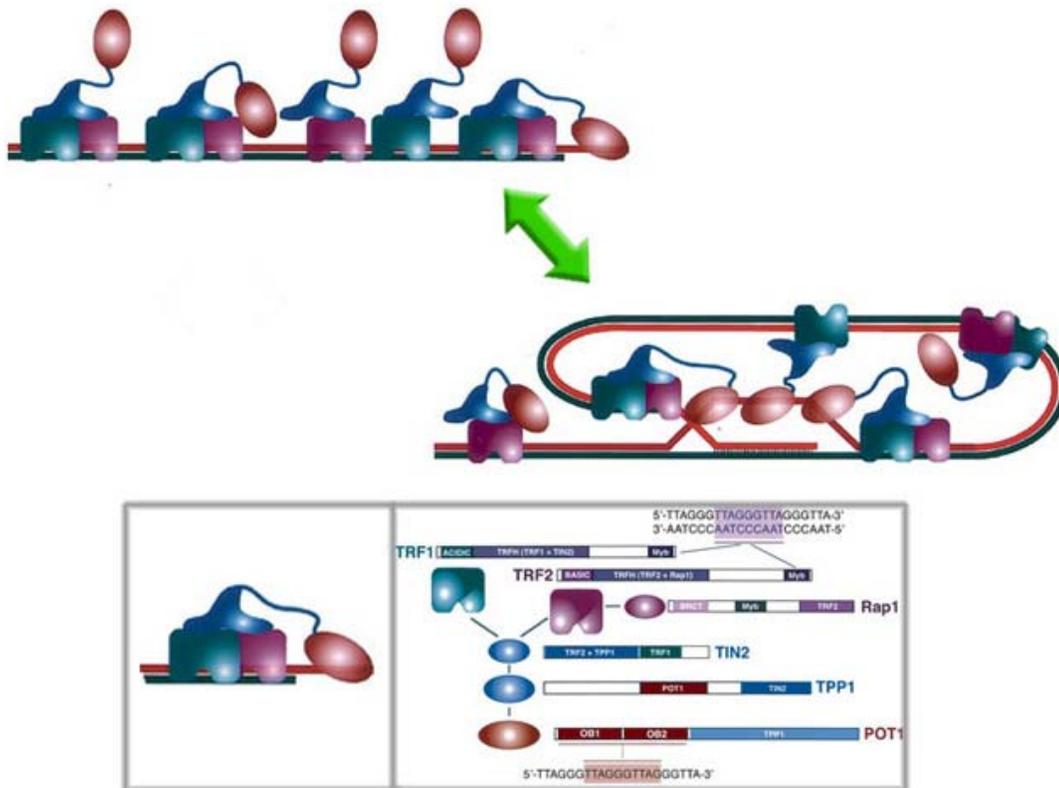


Figura 6.5 Empaquetamiento telomérico mediado por las seis proteínas básicas para la estabilidad y formación del telosoma. Tomado de deLange, 2005.

INCORPORACIÓN DEL EXTREMO EXTENDIDO Y PROCESAMIENTO DEL EXTREMO TELOMÉRICO EN UN SUPER ENROLLAMIENTO (BUCLE-T) Y LA ESTRUCTURA ASOCIADA A PROTEÍNAS.

Además del alargamiento telomérico mediado por la telomerasa y la síntesis de la cadena C, existen otros mecanismos en el procesamiento del DNA para la conservación de la estructura telomérica. En los seres humanos, la función principal es la generación del apéndice G de cadena sencilla en 3'. Además, de las diferencias en la estructura del apéndice telomérico, el cual se replica de manera

normal respecto de la cadena retrasada en la que el proceso de replicación de DNA es diferente en los telómeros (Chai y col, 2006).

Mediante estudios con microscopía electrónica en el DNA telomérico se ha obtenido evidencia sobre la estructura telomérica, en la que el bucle-t , invade el apéndice de cadena sencilla en 3' rica en guaninas(G), en una porción de doble cadena formada por repeticiones teloméricas TTAGGG. La cadena desplazada por la invasión del apéndice-G forma una estructura llamada bucle-D. La función del bucle-t consiste en la protección del extremo telomérico 3'. *In vitro*, el DNA telomérico de doble cadena se une a TRF2 para promover la formación del bucle-t (Cristofari y Lingner, 2006).

INTEGRIDAD CROMOSÓMICA

INTEGRIDAD CROMOSÓMICA

La integridad cromosómica mantiene la homeostasis celular, además de garantizar la continuidad genética durante la proliferación celular y la reproducción de los organismos multicelulares, así su mantenimiento es muy importante para la estabilidad del genoma que a su vez depende de una correcta regulación de los sistemas de vigilancia y reparación de daños al DNA, los mecanismos de reparación del DNA engloban varios procesos complejos altamente conservados durante la evolución, cuya principal función consiste en permitir que la información genética se transcriba eficientemente y se replique fielmente (Michor y col, 2005).

El DNA es una molécula que tiene una estructura dinámica sujeta a cambios constantes que pueden originar alteraciones (mutaciones), una gran parte de las alteraciones que ocurren en el DNA se producen por causas endógenas: hidrólisis de nucleótidos de DNA, problemas en la replicación de DNA, acumulación de especies reactivas de oxígeno, entre otras, modificando la información genética de los organismos, estos cambios pueden surgir de manera espontánea durante los procesos básicos del metabolismo celular, también las alteraciones al DNA pueden ser inducidas por agentes exógenos físicos, químicos o biológicos presentes en nuestro entorno (Admire y col, 2006).

La inestabilidad cromosómica, hace referencia a una elevada tasa de mutación espontánea en las células, actualmente se piensa que ésta es una característica importante de algunas enfermedades además del envejecimiento celular, sin embargo en células normales, a pesar de la gran cantidad de daño que se da en el DNA, la tasa de mutación espontánea es baja, debido a que los procesos celulares básicos como la replicación, la reparación y el control del ciclo celular funcionan correctamente (Trautmann y col, 2006); en contraste la inestabilidad cromosómica se asocia a la presencia de una elevada tasa de alteraciones en el

genoma indicando que se ha roto el equilibrio entre el daño espontáneo y la capacidad de reparación del mismo por la célula, debido a factores genéticos esto es genes implicados en la estabilidad del genoma, en la fidelidad en la síntesis y mecanismos de reparación de DNA (Carter y col, 2006).

Como resultado podemos observar que en la inestabilidad cromosómica, se encuentran involucrados alteraciones en el telosoma, en la estructura telomérica, errores en la replicación de DNA y alteraciones en el control de la segregación cromosómica que conllevan a una tasa espontánea elevada de mutación (Admire y col, 2006).

El proceso de formación de una alteración genética, consiste en la acumulación de múltiples alteraciones en el genoma de las células. Existen dos posibles conjuntos de alteraciones genéticas: cambios en la secuencia del DNA y cambios epigenéticos que afectan a la expresión de genes (Pearson y col, 2005).

Las alteraciones a nivel de secuencia pueden ser deleciones de regiones cromosómicas, que implican pérdida de genes que pueden estar relacionados con la regulación negativa del ciclo celular, como es el caso de los genes supresores de tumores, mutaciones génicas que pueden activar o inactivar distintas proteínas, amplificaciones génicas que conllevan a la sobreexpresión de genes específicos, e incluso, pérdidas y ganancias de cromosomas enteros. En cuanto a alteraciones epigenéticas nos encontramos con el silenciamiento de genes causado por hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores (Yuen y col, 2007).

Los distintos procesos moleculares que se asocian con la formación y progresión de una alteración genética son:

- Activación de oncogenes
- Inactivación de genes supresores

- Alteración en los genes de reparación del DNA
- Alteración de genes relacionados con la apoptosis
- Disociación del telosoma, alteración en la estructura telomérica, acortamiento en la longitud del telómero
- Inactivación de telomerasa
- Activación de genes interruptores, reparación de la oxidación mediada por radicales libres procedentes del metabolismo celular, reacciones de depurinación, de desaminación, entre otras
- Inestabilidad genética: microsatélites y cromosómica

Las formas mutadas de los proto-oncogenes, que son genes que intervienen en las rutas de proliferación celular y originan proteínas con funciones anómalas que estimulan el crecimiento y alteran la morfología, produciendo la transformación celular. Se pueden clasificar según su mecanismo de acción y en función de la ruta bioquímica en la que se encuentran. Así, tenemos oncogenes que codifican factores de crecimiento, receptores tirosina-quinasa, receptores sin actividad tirosina-quinasa, proteínas que intervienen en las vías de señalización de determinadas señales mitógenas y proteínas nucleares que regulan los procesos de transcripción (Pearson y col, 2005).

MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DNA.

Los agentes genotóxicos de naturaleza diversa, tanto exógenos como endógenos, operan de distintos modos sobre la molécula de DNA. La ruptura de cadenas constituye el tipo de lesión más frecuente. La alteración de las bases o de los azúcares, los puentes intra o intercatenarios, los dímeros y los aductos constituyen otras formas de daño en el DNA (Digweed y Sperling, 2004).

La conducta de la célula frente al daño genómico comprende una etapa inicial de reconocimiento del sitio afectado, seguida de la puesta en marcha de una

respuesta apropiada: reparación del DNA o muerte celular. La severidad del daño en el DNA y la fase del ciclo celular en el cual ésta tiene lugar puede inducir una estrategia de reparación que priorice la sobrevivencia celular o la apoptosis aún a expensas de incurrir en un cambio genético, por lo que la ocurrencia de mutaciones y rearrreglos cromosómicos no debe ser interpretada como una simple respuesta pasiva frente al daño (Andreassen y col, 2006).

La alteración de bases individuales puede ser corregida mediante el mecanismo de reparación por escisión de bases (REB). Las rupturas simples con frecuencia se asocian a la pérdida de una base en el sitio de corte y no pueden ser reparadas por la sola acción de ligasas sino que ponen en marcha el mecanismo REB. Cuando las lesiones de una sola cadena causan distorsión de la hélice del DNA, pueden ser corregidas mediante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (REN) (Chen y col, 2007).

Ha sido postulado que una sola ruptura doble no reparada puede ser suficiente para inducir muerte celular. La reparación de rupturas dobles involucra dos tipos de procesos: recombinación homóloga y recombinación no homóloga o ilegítima. La recombinación homóloga es el principal mecanismo de reparación de rupturas dobles en organismos eucariontes y se sustenta en la identidad de secuencias entre ciertas regiones del genoma. La secuencia de DNA de la cual se toma la información para la reparación debe tener una identidad de más de 200 bases respecto del sitio dañado. Mediante este mecanismo, el extremo roto de una de las cadenas del DNA invade una región homóloga sana y, a partir de esta plantilla, se restituye la cadena dañada (Cousineau y col, 2005).

La recombinación no-homóloga de los extremos rotos del DNA (NHEJ: non-homologous end-joining), es el mecanismo más frecuente de reparación de rupturas dobles en células de mamíferos, no requiere la compleja maquinaria enzimática implicada en la recombinación homóloga pero, mientras que esta

última permite reparar rupturas dobles con una alta tasa de fidelidad, las recombinaciones ilegítimas causan con frecuencia alteración o pérdida de la secuencia del DNA (Bailey y Murnane, 2006).

Existe un mecanismo de recombinación sitio-específica que se observa en el sistema inmune durante la diferenciación linfoide, denominado V(D)J (variation diversity joining), mediante el cual los genes de la inmunoglobulina funcional y del receptor de linfocitos T son reunidos a partir de regiones separadas del genoma. La falla en el mecanismo V(D)J conduce a inmunodeficiencias, hipersensibilidad a genotóxicos y predisposición al desarrollo de linfomas (Casper y col, 2004).

Las mutaciones no siempre ocurren como consecuencia de la acción de un agente genotóxico. Pese a que el proceso de replicación del DNA es de alta fidelidad debido a la existencia de mecanismos de control que operan en forma secuencial para detectar y remover posibles errores, ciertas mutaciones pueden resultar de errores incurridos durante dicho proceso. La DNA polimerasa, enzima que sintetiza la cadena de DNA en dirección 5'-3', es capaz de corregir sus propios errores de polimerización operando como una exonucleasa en la dirección 3'-5'. Aquellos errores que hubieran escapado al control de la DNA polimerasa ponen en marcha el sistema de reparación de apareamientos erróneos (mismatch-repair: MMR) que detecta la distorsión de la hélice de DNA resultante del apareamiento de bases no complementarias (Bailey y col, 2007).

PROTEÍNAS DE REPARACIÓN TELOMÉRICA

El acortamiento telomérico opera como un reloj mitótico que regula el potencial proliferativo celular y, alcanzado un cierto nivel crítico de longitud, predispone a asociaciones teloméricas (TAS) e inestabilidad cromosómica verificables en células transformadas y en desórdenes genéticos (de Lange, 2005).

La presencia de telómeros anormalmente cortos se correlaciona con una mayor sensibilidad del organismo a las radiaciones ionizantes (RI) y se ha sugerido recientemente que del mismo modo la integridad de la función telomérica es capaz de condicionar la radiosensibilidad. Alteraciones del metabolismo telomérico han sido descritas en enfermedades genéticas que se asocian a hipersensibilidad a RI, tales como los síndromes de Bloom (BLM), Werner (WRN) y Nijmegen (NBS1). Se ha observado disminución del tamaño telomérico con una tasa de acortamiento más alta respecto de la media en diversas patologías, algunas de las cuales presentan severa alteración del metabolismo oxidativo tales como distrofia muscular de Duchenne, progeria de Hutchinson-Glifford . Asimismo los pacientes portadores de anemia de Fanconi y ataxia-telangiectasia, además del acortamiento acelerado de los telómeros exhiben elevada frecuencia de asociaciones teloméricas (Surrallés y col, 2004).

Numerosas proteínas vinculadas directa o indirectamente a la detección y reparación de daño al DNA se encuentran en estrecha asociación con el complejo telomérico, tales como ATM, sistema PARP/ tankirasa, complejo DNA-PK2, BRCA1, BRCA2 y complejo RAD50-MRE11-NBS1. Ciertos cambios conformacionales de la cromatina tienen lugar precozmente en el reconocimiento de lesiones en el DNA. Tres sistemas juegan un rol esencial en esta etapa de reconocimiento del daño, como verdaderos sensores disparadores de señales de alarma: proteína ATM, complejo DNA-PK y enzima PARP (Wu y col, 2007).

ATM

La proteína ATM presenta gran homología respecto de una familia de proteínas con función de fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI 3-quinasa), involucradas en la regulación de la longitud de los telómeros, el control del ciclo celular, y la reparación del DNA, incluyendo la recombinación V(D)J (Irrarrazabal y col, 2006).

La proteína ATM, localizada en el núcleo celular como parte del sistema de detección de rupturas dobles, juega un rol esencial en el anclaje de los telómeros a la matriz nuclear y participa en la regulación del metabolismo telomérico. La proteinquinasa dependiente de DNA (DNA-PK) juega un rol activo en la reparación de rupturas dobles por la vía NHEJ y en la recombinación V(D)J. El complejo DNA-PK está compuesto por el antígeno Ku y una sub-unidad catalítica con actividad de quinasa (DNAPKcs). Este complejo, al igual que la proteína ATM, posee un dominio PI 3-quinasa que le confiere un rol importante en la regulación de la longitud de los telómeros, en el control del ciclo celular, y la reparación de DNA (Waterworth y col, 2007).

PROTEÍNA Ku

La proteína Ku consiste en dos subunidades (Ku70 y Ku80) que interactúan para formar un heterodímero. Al unirse a los extremos rotos del DNA Ku recluta a la subunidad catalítica DNAPKcs, la que adquiere actividad de quinasa y fosforila un conjunto de sustratos tales como p53, RNA polimerasa II y XRCC4 (Waterworth y col, 2007).

La proteína Ku estimula la acción de las ligasas y facilita particularmente la unión de extremos rotos de baja cohesividad. Además de su participación en NHEJ, la proteína Ku se localiza en los telómeros, donde en estrecha asociación con TRF1 juega un rol esencial en el mantenimiento de la estructura de los mismos, lo que podría estar señalando un punto clave en la encrucijada entre el metabolismo telomérico y los mecanismos de reparación del DNA (Gorodestky y col, 2007).

PARP

La poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) es una enzima que opera como sensor molecular de rupturas simples en el DNA, jugando un rol decisivo en la reparación

por el mecanismo REB. A través de un rápido y dinámico sistema de síntesis y degradación de polímeros, PARP resulta un regulador clave de los eventos nucleares que suceden al estrés genotóxico. Una vez reconocido el daño, modifica factores de transcripción con dos objetivos: impedir que se transcriba el DNA dañado y facilitar que se sinteticen enzimas de reparación. PARP es clivada e inactivada por acción de la caspasa-3 durante los estadios iniciales del programa de ejecución de apoptosis. Se ha demostrado la presencia de sitios de unión para la PARP en las siguientes proteínas: p53, p21, DNA ligasa III, XRCC1, proteínas de la matriz nuclear, complejo DNA-PK, XRCC1, DNA-ligasas, DNAPolimerasas, numerosos factores de transcripción y la sub-unidad catalítica de la telomerasa, TERT. Esto último sugiere un mecanismo de control post-transcripcional de la actividad de telomerasa mediado por PARP (Donigian y de Lange, 2007).

Asimismo se han identificado dos variantes de PARP denominadas tankirasas (TANK1 y TANK2) que participan en la elongación de los telómeros a través de su interacción con la proteína telomérica TRF. La TANK impide la unión del TRF1 al DNA telomérico, permitiendo que se despliegue la estructura terminal y posibilitando así el acceso de la telomerasa para iniciar la elongación. Una vez elongado el telómero, los polímeros son degradados y la unión del TRF1 al telómero vuelve a conferirle su estructura original en bucle, por lo cual la actividad de telomerasa es inhibida (Gorodetsky y col, 2007; Donigian y de Lange, 2007).

Transcurrida la etapa de rápida respuesta de los sensores de daño, comienza una compleja secuencia de interacciones entre proteínas asociadas a la reparación genómica y proteínas teloméricas (Cheng y col, 2007).

COMPLEJO MRN

El complejo RAD50-MRE11-NBS1 (MRN), esta involucrado en el mantenimiento de la estructura telomérica, en el procesamiento de rupturas de doble cadena

(DSB, Double-Strand Break), en la recombinación meiótica y las reorganizaciones de los segmentos V(D)J y (Waterworth y col, 2007).

El complejo MRN colocaliza con TRF1 y TRF2 a nivel de los telómeros, permitiendo la apertura de la estructura en bucle-t en su extremo terminal, de manera mas específica éste complejo se une a TRF2 durante la fase S del ciclo celular, indicando un papel funcional importante en la replicación telomérica y en la formación del telómero (bucle-t o t-loop). También se sabe que NBS1 interacciona con los telómeros originando un respuesta celular, en donde la célula activa un punto de comprobación en la fase-S del ciclo celular mediado por NBS1, activándose p53 vía ATM y consecuentemente si existe algún daño se induce apoptosis (Gorodetsky y col, 2007).

BLM

La proteína de BLM es miembro de un complejo asociado con BRCA1 llamado super complejo de vigilancia (BASC) (BRCA1-associated genome surveillance complex), en el que se incluyen otras proteínas involucradas en la maquinaria de replicación, en la recombinación y la reparación, como por ejemplo PCNA, RAD51, BRCA1, el complejo MRN, ATM, MSH2, MSH6, entre otras (Andreassen y col, 2006).

Las funciones celulares de BLM son muy abundantes y diversas. Por una parte, BLM colocaliza con los telómeros para su estabilización y se acumula durante la fase S del ciclo celular para el mantenimiento del telómero, puede también catalizar la migración de los cruces Holliday (Figura 5.1 y 5.2) para prevenir el colapso de las horquillas de replicación, (Wu y col, 2007).

La proteína BLM es fosforilada por ATM y ATR, teniendo como función estabilizar el telosoma y la preservación de la integridad del genoma, en donde BLM codifica

para una RecQ-helicasa, que de resultar defectuosa en su función induciría inestabilidad cromosómica. Así mismo BLM suprime las rupturas de doble cadena (DSB, Double-Strand Break) durante la réplica para evitar la recombinación inadecuada, interviniendo así en la maquinaria de la reparación del DNA (Chester y col, 2006)

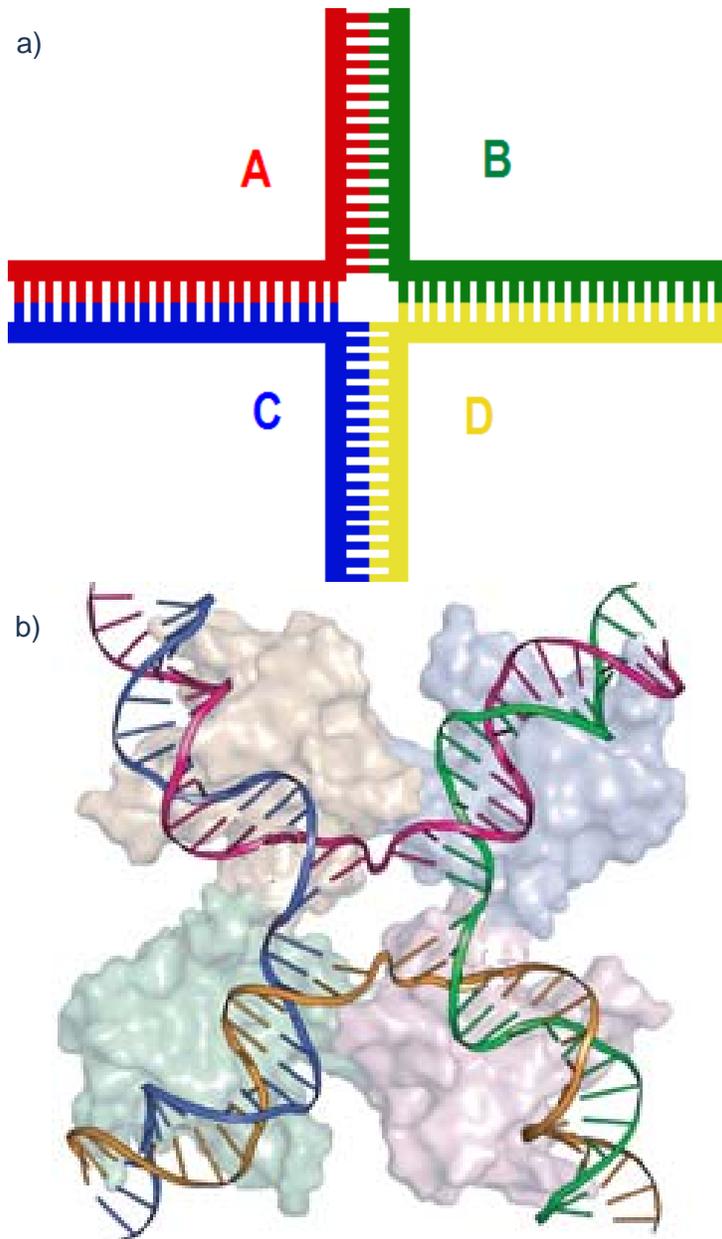


Figura 5.1 a) Esquema del cruce holliday. Modificada de Watson, 2004. b) Estructura del cruce Holliday. Modificado de Biertümpfel, 2007.

Además, se requiere para la localización nuclear del complejo MRN tras la detención de la horquilla de replicación y, junto con p53 y RAD51, colocaliza en las horquillas de replicación estancadas. Así pues, podría decirse que BLM actúa en la respuesta temprana al daño celular y promueve el posterior reclutamiento de proteínas de reparación a las horquillas de replicación (Cusineau y col, 2005).

WRN

La proteína WRN pertenece a una subfamilia de RecQ helicasas y es homóloga con otras helicasas con actividad helicasa 3'-5' y también tiene actividad exonucleasa 3'-5', que la hacen diferente de otras proteínas de la familia RecQ (Vaitiekunaite y col, 2007).

La actividad de la helicasa WRN también tiene un papel en la estabilización del telosoma y en la formación de la estructura telomérica y la acción coordinada con RPA es también de importancia para entender la biología del telómero (Sharma y col, 2007).

La proteína WRN suprime la recombinación ilegítima, sugiriendo una función evolutivamente conservada. Usando su actividad de helicasa, la proteína WRN se une a la proteína de replicación A (RPA) para desplegar el DNA bicatenario durante la réplica de la estructura telomérica (Opresko y col, 2005).

Esta proteína se localiza predominantemente en el nucleolo, aunque durante la fase S del ciclo celular se reubica en puntos de replicación y sitios de daño al DNA. De acuerdo con esto, WRN participa en los procesos de replicación, reparación, recombinación y transcripción (Cheng y col, 2007).

En los enfermos por alteración en la proteína WRN se ha demostrado inestabilidad cromosómica e hipersensibilidad a agentes que inducen la interrupción de la replicación o la aparición de rupturas de doble cadena (DSB, Double-Strand Break) en la horquilla de replicación y un metabolismo defectuoso del DNA con una tasa elevada de mutaciones (Lee y Mc Kinnon, 2007).

Consecuentemente la alteración en la estructura y función de las proteínas ATM, Ku, PARP, BLM WRN y complejo MRN es el punto de partida para que se desarrollen algunas enfermedades de origen genético que se caracterizan por ser precursoras de inestabilidad cromosómica y/o sensibilidad citotóxica a ciertos mutágenos (Andreassen y col, 2006).

La inestabilidad cromosómica es debido a: *i*) deficiencias en los complejos proteicos encargados de la protección de la integridad genómica durante la reparación, este es el caso de alteraciones en proteínas del complejo MRE11 (formado por MRE11, RAD50 y NBS1), que dan lugar al síndrome de Nijmegen (NBS, Nijmegen Breakage Syndrome) o de mutaciones en los genes NBS1 y MRE11, que dan lugar a un síndrome similar a la ataxia telangiectasia (ATLD, Ataxia Telangiectasia Like Disorder), ambos síndromes se caracterizan por la alta incidencia de cáncer; *ii*) alteraciones en los procesos de la reparación por recombinación homóloga (HRR, Homologous Recombination Repair), en donde, se han identificado mutaciones en dos genes que codifican para helicasas implicadas en este proceso, asociadas al síndrome de Bloom (SB, Bloom Síndrome) y al síndrome de Werner (WS, Werner Síndrome) (Andreassen y col, 2006).

Además existen otros síndromes en humanos en donde los genes implicados en la función celular participan en la respuesta celular al daño en DNA y cuya alteración genera inestabilidad cromosómica y distintas anomalías congénitas en los individuos afectados, como son la anemia de Falconi (FA, Falconi Anemia) y la

ataxia telangiectasia (AT, Ataxia Telangiectasia); también se ha establecido una relación importante con otras proteínas implicadas en la integridad genómica, como son BRCA1 y BRCA2, las cuales están implicadas en cáncer de mama (Surrallés y col, 2004).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La estructura telomérica de los extremos cromosómicos en mamíferos, se encuentra formado por una secuencia de DNA de cadena doble y una secuencia de DNA de cadena sencilla, ambas cadenas de DNA se unen de manera específica a diversas proteínas indispensables para la formación óptima del telómero y consecuentemente del telosoma.
- De manera global el complejo telomérico está compuesto por 6 proteínas indispensables, dos proteínas (TRF1 y TRF2) las cuales tienen especificidad de unión a los telómeros, las otras 4 proteínas: TIN2, RAP1, POT1 y PTP, son importantes para darle estabilidad a la estructura telomérica, estas a su vez interactúan con gran número de proteínas como ATM, BLM, WNR, MRE11, RAD50, NBS1, entre otras.
- De manera colectiva todas estas proteínas son responsables de la protección del extremo cromosómico y de la regulación del metabolismo del telosoma.
- La estructura telomérica es importante en procesos como mitosis, meiosis y apoptosis, desarrollando diversas funciones entre ellas: mecanismos de reparación de DNA, recombinación de DNA, segregación cromosómica y la fusión de extremos cromosómicos.
- El telómero como estructura funcional del cromosoma se encuentra vinculado de manera directa e indispensable con la enzima telomerasa la cual tiene como función la elongación del extremo telomérico necesario para mantener la estructura del telosoma y la integridad cromosómica necesarias para la viabilidad y proliferación celular.

- El telómero cuenta con su propia maquinaria de replicación, siendo la encargada la telomerasa, la cual dirige la maquinaria de replicación telomérica, en el caso de que sea necesario la elongación del extremo cromosómico.
- El telosoma, la estructura telomérica, la actividad de la telomerasa y la replicación telomérica se encuentran altamente regulados por un gran número de proteínas, que también son importantes en el mantenimiento de la integridad cromosómica, homeóstasis celular y envejecimiento celular.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

14-3-3	Proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa
A1	Ribonucleoproteína nuclear heterogenea A1
ATM	Proteína mutada para ataxia telangiectasia
BLM	Proteína síndrome de Bloom
C1/C2	Ribonucleoproteína nuclear heterogenea C (C1/C2)
c-Myc	Proteína Myc protooncogen
Dna2	DNA helicasa 2 homóloga (levadura)
E2F	Factor de transcripción 1
ERCC1	La proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1
Est1A	SMG-6 homólogo, mediada por una tontería mRNA factor de decaimiento (C. elegans)
Est1B	SMG-5 homólogo, mediada por una tontería mRNA factor de decaimiento (C. elegans)
Est1C	SMG-7 homólogo, mediada por una tontería mRNA factor de decaimiento (C. elegans)
FEN1	Endonucleasa específica de plegamiento 1
H/ACA	Familia de ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (RNPs nucleolar pequeño H/ACA)
hGAR1	Miembro 1 de la familia A de las proteínas nucleolares (RNPs nucleolar pequeño H/ACA)
hNHP2	Miembro 2 de la familia A de las proteínas nucleolares (RNPs nucleolar pequeño H/ACA)
hNOP10	Miembro 3 de la familia A de las proteínas nucleolares (RNPs nucleolar pequeño H/ACA)
hnRNP	Ribonucleoproteína nuclear heterogenea

hnRNPA1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1
hnRNPA1-B2	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A2/B1
hnRNPD	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea D
hRAP1	Proteína 1 de interacción a TRF2
Hsp90	Proteína de choque térmico 90kDa alfa (citósólica)
hTERT	Transcriptasa inversa de la telomerasa
L22	Inmunoglobulina kappa variable 1D-42
La	Proteína para el síndrome de Sjogren, antígeno B (autoantígeno "La")
MVP	Proteína super empacada (major vault protein)
NAP57	Proteína para disquetosis congénita 1 (subunidad 4 del complejo de ribonucleoproteína H/ACA)
NBS1	Proteína para el síndrome de Nijmegen
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PINX1	TRF1- PIN2-interacting protein 1
PKC	Proteína cinasa 2
POT1	Proteína de protección de los telómeros 1 homóloga a <i>S. pombe</i>
PP2A	Proteína fosfatasa 2
PTOP, PIP1, TINT1, TPP1	Tripeptidil peptidasa 1
RFC1	Factor C de la replicación 1
RPA	Proteína de replicación A1
snoRNA	RNA nucleolar pequeño
snoRNPs	Ribonucleoproteínas nucleolares pequeñas (small nucleolar RNPs)
TEP1	Proteína asociada a la telomerasa 1
TERC	RNA telomerasa

TIN2	Factor nuclear 2 de interacción a TRF1
TRF1	Factor de unión a las repeticiones (DNA) teloméricas
TRF2	Factor de unión a las repeticiones (DNA) teloméricas 2
UP1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea similar a A1
vRNA	Componente RNA superempacado 1 (vault RNA component 1)
XPF	Grupo de complementación F para Xeroderma Pigmentoso

GLOSARIO

Glosario de Términos

Abrazadera deslizante de la DNA-polimerasa- complejo proteico de los organismos eucariotas constituido por diversas subunidades polipeptídicas que al unirse adoptan la forma de una rosquilla. Su función es amarrar la subunidad catalítica de la DNA-polimerasa al DNA conforme se lleva a cabo la replicación del DNA a gran velocidad y aumentar de este modo la procesividad de la DNA-polimerasa. En los organismos eucariotas también recibe el nombre de PCNA (proliferating cell nuclear antigen).

Apoptosis- también conocida como muerte celular programada, caracterizada por una serie de acontecimientos celulares regulados cuyo resultado es la muerte celular para eliminar una célula dañada o una normal que deja de ser necesaria.

AP-PCR (arbitrarily primed PCR) PCR con cebador aleatorio- método sencillo y reproducible que permite obtener huellas de genomas complejos (fingerprints) utilizando cebadores de secuencia no especificada.

ATM- gen localizado en el cromosoma 11q22 y cuya mutación produce la Ataxia Telangiectasa, enfermedad neurológica progresiva autosómica recesiva.

Brazo p- brazo corto de un cromosoma.

Brazo q- brazo largo de un cromosoma.

Caja- secuencia de nucleótidos que desempeñan una función reguladora reciben el nombre de caja (box) acompañado de un nombre generalmente derivado de la secuencia consenso en cuestión, a saber, CAAT box (pronunciada «cat»: 5'GGCCAATCT3'), TATA box (5'TATAAT3'), GC box (5'GGGCGG3'), destruction

box, homeobox, etc. Por lo general, se trata de una secuencia conservada entre distintas especies (consenso).

Caja de Hogness- secuencia de siete nucleótidos (TATAAAA) extremadamente conservada en los promotores de los genes transcritos por la RNA-polimerasa II de los organismos eucariontes. Sirve de señal de reconocimiento para el factor de transcripción TFIID. Se sitúa a unas 30-150 bases de distancia del nucleótido que marca el inicio de la transcripción (en dirección 5').

Caja homeótica- segmento de 180 pares de bases localizado cerca del extremo 3' de ciertos genes homeóticos, que codifica una secuencia extremadamente conservada de 60 aminoácidos conocida como «homeodominio».

Caja TATA- secuencia conservada de DNA no codificante de unos 25 pb en la región 5' de la mayoría de los genes eucariontes. Consiste principalmente en secuencias del motivo TATAAAA. También conocida como caja hogness en organismos procariontes o caja pribnow.

Cariotipo- es el ordenamiento en base al número y morfología de la constitución cromosómica de un individuo. En el caso de los humanos es 46XX en el sexo femenino y 46XY en el sexo masculino.

Cebador (Primer)- oligonucleótido de DNA o RNA que luego de la hibridación con un DNA complementario invertido, tiene un extremo 3'-OH al cual la DNA polimerasa puede agregar nucleótidos para sintetizar una cadena nueva.

Centrómero- región cromosómica a la cual se anclan las fibras del huso acromático durante la mitosis o meiosis, aparece como una constricción durante la metafase.

Chaperona- es una proteína necesaria para el plegamiento correcto de otra proteína.

Ciclina- proteína que participa en la regulación del ciclo celular.

Ciclo celular- ciclo de vida de una célula individual. En células que se dividen se pueden distinguir las cuatro fases siguientes: G1 (interfase), S (síntesis de DNA), G2 y mitosis. Las células que no se dividen se encuentran en fase G0.

Cromatina- es el material genético disperso en el núcleo celular, está compuesto por DNA, proteínas básicas histonas, proteínas no histónicas y pequeñas cantidades de RNA.

Dedos de Zinc- estructura con forma de dedos hallada en muchas proteínas reguladoras que se unen al DNA. Los dedos se sujetan juntos a través de un átomo de zinc estratégicamente ubicado.

DNA- (ácido desoxirribonucleico)- es la molécula que contiene la información genética en forma de una secuencia lineal de nucleótidos.

DNA polimerasa- enzima que sintetiza DNA.

DNasa (desoxirribonucleasa)- enzima que cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster en el DNA.

Dominio- 1- secuencia continua de aminoácidos de una proteína, que se dobla o pliega varias veces sobre sí misma hasta formar una unidad globular o compacta. Se estima que cada dominio puede funcionar como una unidad o un módulo estable en solución si se llega a escindir la cadena polipeptídica que los separa.

Cualquier región de una proteína asociada a una función específica, con independencia de su organización estructural.

Empalme (splicing)- uno de los pasos del procesamiento del transcrito primario de RNA, en el cual los intrones son removidos y los exones se unen.

Endonucleasa- enzima que hidroliza los enlaces fosfodiéster internos de un ácido nucleico y lo fragmenta en oligonucleótidos.

Enzima no procesiva, enzima disociativa- enzima o complejo enzimático que sintetiza o degrada de forma progresiva un biopolímero y realiza varios ciclos de la misma reacción catalítica disociándose del sustrato o de la plantilla o de ambos a la vez tras cada reacción catalítica.

Enzima procesiva, enzima asociativa- enzima o complejo enzimático que sintetiza o degrada de forma progresiva un biopolímero y realiza varios ciclos de la misma reacción catalítica sin disociarse del sustrato o de la plantilla o de ambos a la vez tras cada reacción catalítica.

Eucarionte- plantas y animales formados por células poseedoras de un núcleo en el que están contenidos los cromosomas.

Factor de elongación- es una proteína que se asocia a los ribosomas durante la adición de aminoácidos; FE para procariontes y FEe para eucariotas.

Factor de transcripción- proteína necesaria para el inicio de la transcripción de un gen, distinta de la RNA-polimerasa. Reconoce secuencias específicas ubicadas en el interior de promotores y potenciadores.

Fase S- fase de síntesis del DNA (replicación del DNA) entre las fases G1 y G2 del ciclo celular eucarionte.

Fragmentos de Okazaki- pequeños fragmentos de DNA sintetizados sobre la hebra retrasada del DNA. Tienen una longitud variable entre 1000 y 2000 nucleótidos (en bacterias) y entre 100 y 400 nucleótidos (en los organismos eucariontes).

Girasa- es una topoisomerasa que desenrolla el DNA.

Hebra adelantada, cadena adelantada- se trata de la hebra que, debido a la naturaleza antiparalela de la doble hélice, se sintetiza de forma continua y, por consiguiente, más rápido que la otra, en la misma dirección en que avanza la horquilla de replicación.

Hebra retrasada, cadena retrasada- en la replicación del DNA, es la hebra que, debido a la naturaleza antiparalela de la doble hélice, se sintetiza de forma discontinua, en pequeños fragmentos (denominados «fragmentos de Okazaki»), en dirección opuesta al avance de la horquilla de replicación y, por lo tanto, con retraso con respecto a la otra.

Helicasa- enzima que cataliza la separación de la doble hélice durante la replicación, la transcripción o la reparación del DNA (DNA-helicasa) o la separación de dos hebras de RNA en los RNA bicatenarios o RNA monocatenarios con apareamientos internos (RNA-helicasa). Requiere energía procedente de la hidrólisis de un nucleósido trifosfato por lo general, ATP.

Hélice-bucle-hélice (hélix-loop-helix)- motivo estructural de algunas proteínas que se unen al DNA, como los factores de transcripción.

Hélice-giro-hélice, hélice-bucle-hélice- motivo estructural compuesto de dos hélices a separadas por un giro b corto y característico de diversas proteínas con función reguladora que se unen al DNA, como los factores de transcripción. Son muy abundantes en los organismos procariontes; en los eucariontes existe un motivo equivalente que se denomina «homeodominio».

Histona- cualquiera de las proteínas básicas de peso molecular variable entre 11 y 21 kDa que constituyen la mitad de la masa de los cromosomas de las células eucariotas (salvo los espermatozoides). Se clasifican en cinco tipos: H1, H2A, H2B, H3, H4, de los cuales la H1 se asocia con el DNA conector y el resto con el DNA nucleosómico. Las histonas H3 y H4 son de las proteínas más conservadas que se conocen, señal de que cumplen funciones idénticas en todos los organismos eucariontes.

Holoenzima- **1.** enzima con actividad catalítica formada por una porción proteica (la apoenzima) y el cofactor necesario para el desempeño de su función (ión metálico, grupo prostético o coenzima). **2.** Complejo enzimático constituido por todas las subunidades y cofactores necesarios para el desempeño de su función.

Homeodominio- Motivo proteico de 60 aminoácidos de unión al DNA codificado por la «caja homeótica» (homeobox) de los genes homeóticos. Es un motivo de tipo hélice-giro-hélice. Desempeña un papel regulador fundamental en la diferenciación celular que tiene lugar durante el desarrollo de especies muy diversas, como los helmintos, la mosca de la fruta y los seres humanos.

Horquilla de replicación- estructura en forma de Y que se forma en el lugar donde se separa la doble hélice durante la replicación del DNA y donde comienza la síntesis de las hebras nuevas.

Interfase- es el período del ciclo celular entre dos divisiones celulares.

Megabase (Mb)- un millón de pares de bases.

Molde, templado o plantilla- molécula que determina la secuencia de nucleótidos para la formación de otra molécula similar (complementaria) de DNA y RNA.

Motivo-1 - en los ácidos nucleicos, es una secuencia breve de nucleótidos que suele servir de sitio de reconocimiento para ciertas proteínas (p. ej.: en los genes eucariotas existen motivos nucleotídicos que cumplen una función reguladora o moduladora de la transcripción). El mismo motivo puede estar presente en una gran variedad de organismos. En esta acepción significa prácticamente lo mismo que secuencia consenso de nucleótidos; de hecho, a veces se habla de «motivo TATA» (TATA-box motif, TATA motif) en lugar de «caja TATA» (TATA box), una de las secuencias consenso características de los promotores eucariotas reconocidos por la RNA-polimerasa II. **2.** En las proteínas, es una pauta característica de plegamiento muy conservada en la naturaleza (se habla así de los motivos homeobox, dedo de zinc, hélice-giro-hélice, cremallera de leucinas, etc.). En esta acepción puede equivaler conceptualmente al dominio estructural de las proteínas globulares, aunque un mismo dominio puede contener más de un motivo; por ejemplo, los dominios de unión a ATP (ATP-binding domains) de las proteínas de la familia ABC contienen dos motivos característicos denominados Walker A y Walker B, más un tercer motivo distintivo (signature) denominado C.

mRNA precursor (pre-mRNA)- molécula de RNA procedente de la transcripción inmediata de un gen y cuyo producto funcional será una proteína. Con este nombre se designa a veces el RNA nuclear heterogéneo (nhRNA) y otras veces, sobre todo en los organismos eucariotas, cualquiera de las formas intermedias de un RNA primario en vías de convertirse en un RNA mensajero maduro (mRNA).

MSH2- gen implicado en los cánceres colorrectal, endometriales, y ováricos. Se localiza en el cromosoma 2p22-p21.

Nucleosoma- subunidad estructural de la cromatina. Consta de un octámero de histonas y de un segmento de DNA de aproximadamente 200 pares de bases que se enrolla sobre el octámero dando casi dos vueltas alrededor de él, como un hilo a su carrete. El octámero está compuesto a su vez de dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4.

Oncogén- gen implicado en el desarrollo tumoral cuando sufre alteraciones que conducen a su activación o incremento de expresión.

PCR con transcripción inversa (RT-PCR)- reacción en cadena de la polimerasa sobre un cDNA obtenido por transcripción inversa a partir de un mRNA.

Procesividad, capacidad de procesamiento- capacidad de una enzima o de un complejo enzimático de llevar a cabo múltiples ciclos catalíticos de forma progresiva sin disociarse de su sustrato polimérico (en vez de disociarse tras cada reacción catalítica). Es una medida de la eficacia de la enzima, es una de las propiedades de las enzimas cuyos sustratos son de naturaleza polimérica. En el caso de la DNA-polimerasa, la procesividad de la enzima (alta, media, baja) se define como el número de nucleótidos añadidos en promedio cada vez que la enzima se asocia con el cebador y la hebra plantilla varía desde unos pocos nucleótidos hasta más de 50 000 nucleótidos añadidos por complejo de asociación.

Proteína de unión a DNA monocatenario- cada una de las proteínas que se unen a las hebras de DNA recientemente separadas por la helicasa durante la replicación del DNA. Se colocan una detrás de otra a lo largo de la hebra separada y forman una cubierta proteica que mantiene el DNA en el estado de elongación necesario para que pueda servir de plantilla durante la síntesis de DNA y de los RNA cebadores.

Protooncogén Un gen que funciona para promover la división celular. Cuando estos genes están mutados producen varios productos que promueven la división celular de una manera anormal.

Punto de control (checkpoint)- elemento regulador de las transiciones de cada fase del ciclo celular.

Reacción en cadena de la polimerasa- método para sintetizar grandes cantidades de un segmento específico de DNA a partir de cantidades inferiores a 1 µg del DNA de muestra (y en teoría a partir de una sola molécula de DNA). La PCR multiplica («amplifica») exponencialmente una secuencia específica de DNA bicatenario. Comprende varios ciclos divididos en tres etapas desnaturalización, hibridación y extensión del cebador.

Ribonucleoproteína nuclear heterogénea (nhRNP)- complejo ribonucleoproteico que resulta de la asociación del RNA_{nh} con unos 20 tipos de proteínas en distinta proporción. Su estructura y función exactas aún no se conocen, pero en las purificaciones *in vitro* se asemeja a un collar formado por cuentas de unos 20 nm de diámetro, separadas entre sí por pequeñas regiones de nhRNA desnudo.

Ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP, snurp)- complejo formado por unas 10 proteínas y una pequeña molécula de RNA (npRNA) que es la que da nombre al conjunto, presente en los núcleos de las células eucariotas.

RNA nuclear heterogéneo (nhRNA)- mezcla de moléculas de RNA de longitud variada –de allí el nombre de «heterogéneo»–, fruto de la transcripción del DNA por la RNA-polimerasa II en las células eucariotas. Es el transcrito primario o precursor de un RNA mensajero eucariota (premRNA), pero puede incluir asimismo otros transcritos que no llegan a transformarse en un RNA mensajero (RNAm). Se localiza en el núcleo asociado a proteínas y forma las denominadas

ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas o nhRNP su vida media es muy breve, ya que sufre rápidamente una serie de modificaciones covalentes que lo convierten en un RNAm antes de salir al citoplasma.

RNA nuclear pequeño (snRNA)- cualquier molécula pequeña de RNA (de 100 a 300 nucleótidos en los organismos eucariotas superiores y hasta 1000 nucleótidos en las levaduras) que se localiza en el núcleo de las células eucariotas. Son indispensables para los procesos de maduración del RNA, principalmente para el empalme o ajuste (splicing) y la poliadenilación.

Secuencia canónica- Secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que representa el arquetipo de las variantes con las cuales se compara. Con suma frecuencia se utiliza como sinónimo de «secuencia consenso» (consensus sequence).

SNPs (Single Nucleotide Polimorphism). Polimorfismos de un solo nucleótido. Son variaciones comunes de una sola base que ocurren en el DNA humano y que se pueden emplear para rastrear patrones de herencia familiar.

snRNP (small nuclear ribonucleoprotein particles)- partículas pequeñas de ribonucleoproteínas nucleares. Complejos de pequeñas moléculas nucleares de RNA y proteínas

Spliceosoma- agragación de diferentes moléculas que pueden empalmar (splice) RNA.

Topoisomerasa- clase de enzimas que pueden controlar la estructura tridimensional del DNA cortando una de sus cadenas, rotándola sobre la otra y ensamblándola de nuevo (clase I), o cortando y reensamblando ambos extremos (clase II). Se utiliza para desenrollar la doble hélice de DNA durante la transcripción.

Transcripción inversa, retrotranscripción- síntesis de una molécula de DNA catalizada por la enzima retrotranscriptasa a partir de una hebra de mRNA.

Transcriptasa inversa, retrotranscriptasa (RT)- enzima característica aunque no exclusiva de los retrovirus que cataliza la síntesis de una hebra de DNA, dirigida por un mRNA que sirve de plantilla, mediante la adición de desoxirribonucleótidos de uno en uno en el extremo 3' de la cadena de DNA naciente. Necesita de un cebador (primer) de RNA o DNA, y puede asimismo sintetizar DNA a partir de una plantilla de DNA.

Transcripto- copia de RNA de un segmento del DNA de un gen activo.

Transcripto primario- RNA original transcripto de un gen eucarionte antes de ser procesado (empalme, adición del CAP y poliadenilación).

Translocación- Ruptura y reunión de un segmento de DNA de un cromosoma a otro. un complejo de iniciación transcripcional únicamente en presencia de otras proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. 2002. "Molecular Biology of The Cell" Cuarta edición, Editorial Garland Science. New York, USA.

Admire, A., Shanks, L., Danzl, N., Wang, M., Weier, U., Stevens, W., Hunt, E. y Weinert, T. 2006. Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast. *Genes & Development* **20**:159-173.

Andreassen, P., Ho, G. y D'Andrea, A. 2006. DNA damage responses and their many interactions with the replication fork. *Carcinogenesis* **27(5)**:883–892.

Argilla, D., Chin, K., Singh, M., Hodgson, J., Bosenberg, M., de Solórzano, C., Lockett, S., DePinho, R., Gray, J. y Hanahan D. 2004. Absence of telomerase and shortened telomeres have minimal effects on skin and pancreatic carcinogenesis elicited by viral oncogenes. *Cancer Cell* **6(4)**:373-385.

Artandi, S. 2006. Telomeres, Telomerase, and Human Disease. *The New England Journal of Medicine* **356(12)**:1195-1197.

Autexier, C., y Lue, N. 2006. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. *Annual Review of Biochemistry* **75**:493-517.

Bae, N. y Baumann, P. 2007. A RAP1/TRF2 Complex Inhibits Nonhomologous End-Joining at Human Telomeric DNA Ends. *Molecular Cell* **26(3)**:323-334.

Bailey, S. y Murnane, J. 2006. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Research* **34(8)**:2408–2417.

Bailey, S., Williams, E. y Ullrich, R. 2007. The role of telomere dysfunction in driving genomic instability. *International Congress Series* **1299**:146-149.

Baird, D., Britt-Compton, B., Rowson, J., Amso, N. N., Gregory, L. y Kipling, K. 2006. Telomere instability in the male germline. *Human Molecular Genetics* **15(1)**:45–51.

Banik, S. y Counter, S. 2004. Characterization of Interactions between PinX1 and Human Telomerase Subunits hTERT and hTR. *The Journal Of Biological Chemistry* **279(50)**:51745–51748.

Bates, P., Mergny, J. y Yang, D. 2007. Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. *The EMBO Journal* **8(11)**:1003–1010.

Bianchi, A., Negrini, S. y Shore, D. 2004. Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Molecular Cell* **16(1)**:139-146.

Biertümpfel, C., Yang, W y Suck, D. 2007. Crystal structure of T4 endonuclease VII resolving a Holliday junction. *Nature* **449**:616-620.

Blackburn, E. 2002. Telomeres. University of California, San Francisco, California, USA. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, [Recurso en línea <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0001167/current/html?hd=All,telomeres>].

Blackburn, E. 2004. Telomeres and telomerase. *Scholarship Repository, University of California* **359**:109-121.

Blackburn, E. 2005. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters* **579(4)**:85862.

Blasco, M. 2002. Telomerase beyond telomeres. *Nature Reviews Cancer* **2**:627-633.

Blasco, M. 2005. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics* **6**:611-622.

Blasco, M. 2005. Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *The EMBO Journal* **24**:1095–1103.

Bridges, D. y Moorhead, G. 2005. 14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein. *Science Signaling* **296**:10.

Campbell, L., Fidler, C., Eagleton, H., Penike, A., Kusec, R., Gal, S., Littlewood, T., Wainscoat, J. y Boulton, J. 2006. hTERT, the catalytic component of telomerase, is downregulated in the haematopoietic stem cells of patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**:671-679.

Carter, S., Eklund, A., Kohane, I., Harris, L. y Szallasi, Z. 2006. A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers. *Nature Genetics* **38**:1043-1048.

Casper, A., Durkin, S., Arlt, M., y Glover, T. 2004. Chromosomal Instability at Common Fragile Sites in Seckel Syndrome. *Am. J. Hum. Genet* **75**:654–660.

Celli, G. y de Lange, T. 2005. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nature Cell Biol* **7**:712–718.

Chai, W., Shay, J. y Wright, W. 2005. Human Telomeres Maintain Their Overhang Length at Senescence. *Molecular and Cellular Biology* **25(6)**:2158–2168.

Chai, W., Sfeir, A., Hoshiyama, H., Shay, J. y Wright, W. 2006. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *European Molecular Biology Organization* **7(2)**:225–230.

Chai, W., Du, D., Shay, J. y Wright, W. 2006. Human Telomeres Have Different Overhang Sizes at Leading versus Lagging Strands. *Molecular Cell* **21**:427–435.

Chen, B., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Löbrich, M., Shiloh, J. y Chen, D. 2007. Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Is Essential for DNA-PKcs Phosphorylations at the Thr-2609 Cluster upon DNA Double Strand Break. *J. Biol. Chem* **282(9)**:6582-6587.

Chen, J. y Greider, C. 2004b. Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem Sci* **29**:183-192.

Chen, J. y Greider, C. 2005. Functional analysis of the pseudoknot Structure in human telomerase RNA. *PNAS* **102(23)**:8080–8085.

Chen, J., Hales, C. y Ozanne, S. 2007. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* **35(22)**:7417-7428.

Cheng, W., Muftuoglu, M. y Bohr, V. 2007. Werner syndrome protein: Functions in the response to DNA damage and replication stress in S-phase. *Experimental Gerontology* **42(9)**:871-878.

Chester, N., Babbe, H., Pinkas, J., Manning, C., y Leder, P. 2006. Mutation Of The Murine Bloom's Syndrome Gene Produces Global Genome Destabilization. *Molecular and Cellular Biology* **26(17)**:6713-6726.

Chiang, Y., Nguyen, M., Gurunathan, S., Kaminker, P., Tessarollo, L., Campisi, J., y Hodes, R. 2006. Generation and Characterization of Telomere Length Maintenance in Tankyrase 2-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology* **26(6)**:2037–2043.

Chilkova, O., Stenlund, P., Isoz, I., Sith, C., Grabowski, P., Lundström, E., Burgers, P. y Johansson, E. 2007. The eukaryotic leading and lagging strand DNA polymerases are loaded onto primer-ends via separate mechanisms but have comparable processivity in the presence of PCNA. *Nucleic Acids Research* **35(19)**:6588-6597.

Choo, K. 2001. Centromeres. The Murdoch Institute, Melbourne, Australia. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley y Sons, [Recurso en línea <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0001166/current/html?hd=All,centromeres>].

Choudhury, A., Ju, Z., Djojsubroto, M., Schienke, A., Leche, A., Schaetzlein, S., Jiang, H., Stepczynska, A., Wang, C., Buer, J., Lee, H., Zglinick, T., Ganser, A., Schirmacher, P., Nakauchi, N. y Rudolph, K. 2006. Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nature Genetics* **39**:99-105.

Churikov, D. 2007. Telomeric and subtelomeric Repeat Sequences. University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, USA Carolyn M Price, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, Encyclopedia of Life Science, John Wiley y Sons, [Recurso en línea <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005065/current/html?hd=All,telomeres>].

Cobb, J. y Bjergbaek, L. 2006. RecQ helicases: lessons from model organisms. *Nucleic Acids Research* **34(15)**:4106-4114.

Collins, K., y Mitchell, J. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene* **21**:564-579.

Cong, Y., Wen, J. y Bacchetti, S. 1999. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular* **8**:137-142.

Cooper, G. y Hausman, R. 2006. "The Cell: A Molecular Approach" Cuarta edición. Ed. ASM Press and Sinauer Associates, Washington, DC. USA.

Court, R., Chapman, L., Fairall, L., y Rhodes, D. 2005. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *European Molecular Biology Organization* **6(1)**:39-45.

Cousineau, I., Abaji, C., y Belmaaza, A. 2005. BRCA1 Regulates RAD51 Function in Response to DNA Damage and Suppresses Spontaneous Sister Chromatid Replication Slippage: Implications for Sister Chromatid Cohesion, Genome Stability and Carcinogenesis. *Cancer Res* **65**:24.

Cristofari, G. y Lingner, J. 2006. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. *The EMBO Journal* **25**:565-574.

De Lange, T. 2005. Telomeres: Protection and Maintenance. The Rockefeller University, New York, USA. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, [Recurso en línea, <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005281/current/html?hd=All,telomere>].

De Lange, T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* **19(18)**:2100-2110.

Digweed, M. y Sperling, K. 2004. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair* **3(8)**:1207-1217.

Doenecke, D. y Albig, W. 2006. Histones. Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen, Germany. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, [Recurso en línea, <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005908/current/html?hd=All,histones>].

Donigian J. y de Lange T. 2007. The role of the poly(ADP-ribose) polymerase tankyrase1 in telomere length control by the TRF1 component of the shelterin complex. *The Journal of Biological Chemistry* **282(31)**:22662-22667.

Dunaway, S., Liu, H. y Walworth, N. 2004. Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *Journal of Cell Science* **118 (1)**:39-50.

Dynek, J. y Smith, S. 2004. Resolution of Sister Telomere Association is Required for Progression Through Mitosis. *Science* **304(5667)**:97-100.

Eissenberg, J. y Elgin, S. 2005. Heterochromatin and Euchromatin. Saint Louis University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA. Washington University, St. Louis, Missouri, USA. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, [Recurso en línea <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0001164/current/html?hd=All,chromosome&hd=All,structure>].

Escoffier, E., Rezza A., Roborel de Climent, A., Belleville, A., Gazzolo, L., Gilson, E. y Duc, M. 2005. A balanced transcription between telomerase and the telomeric DNA-binding proteins TRF1, TRF2 and Pot1 in resting, activated, HTLV-1-transformed and Tax-expressing human T lymphocytes. *Retrovirology* **2(77)**:1-10. [Recurso en línea <http://www.retrovirology.com/content/pdf/1742-4690-2-77.pdf>].

Fisher, T., Taggart, A. y Zakian, V. 2004. Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nature Structural & Molecular Biology* **11(12)**:1198-1205.

Förstemann, K. y Lingner, J. 2005. Telomerase limits the extent of base pairing between template RNA and telomeric DNA. *European Molecular Biology Organization reports* **6(4)**:361-366.

Fortune, J. Stith, C., Kissling, G., Burgers, P. y Kunkel, T. 2006. RPA and PCNA suppress formation of large deletion errors by yeast DNA polymerase δ . *Nucleic Acids Research* **34(16)**:4335–4341.

Fu, D., y Collins, K. 2006. Human telomerase and Cajal body ribonucleoproteins share a unique specificity of Sm protein association. *Genes Dev* **20**:531-536.

Garcia, C., Wright, W. y Shay, J. 2007. Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging. *Nucleic Acids Research* **2007**:1-11.

Gilchrist, S. 2006. Chromosome Structures: Visualization. Medical Research Council Human Genetics Unit, Edinburgh, UK. Medical Research Council Human Genetics Unit, Edinburgh, UK, *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, [Recurso en línea, <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005784/current/html?hd=All,Chromosome&hd=All,structures>].

Gomez, D., Wenner, T., Brassart, B., Douarre, C., O'Donohue, M-F., El Khoury, V., Shin-ya, K., Morjani, H., Trentesaux, C. y Riou, J. 2006. Telomestatin-induced Telomere Uncapping Is Modulated by POT1 through G-overhang Extension in HT1080 Human Tumor Cells. *The Journal Of Biological Chemistry* **281(50)**:38721–38729.

Gorodetsky, E., Calkins, S., Ahn, J. y Brooks, P. 2007. ATM, the Mre11/Rad50/Nbs1 complex, and topoisomerase I are concentrated in the nucleus of Purkinje neurons in the juvenile human brain. *DNA Repair* **6(1)**:1698-1707.

Griffith, A., Miller, S., Suzuki, D., Lewontin, R. y Gelbart, W. 2002. "Genética". Séptima edición, Editorial McGraw-Hill-Interamericana, México, DF.

Groff-Vindman, C., Cesare, A., Natarajan, S., Griffith, J., y McEachern, M. 2005. Recombination at Long Mutant Telomeres Produces Tiny Single- and Double-Stranded Telomeric Circles. *Molecular and Cellular Biology* **25(11)**:4406–4412.

Hathcock, K. Chaing, Y. y Holdes, R. 2005. *In vivo* regulation of telomerase activity and telomere length. *Immunological Reviews* **205(1)**:104-113.

Hayflick, L. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**:585-621.

Hermeking, H. y Benzinger, A. 2006. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Seminars in Cancer Biology* **16(3)**:183-192.

Higgins, N. 2007. Chromosome Structure. University of Alabama, Birmingham, Alabama, USA. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley y Sons, [Recurso en línea,
<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0001486/current/html?hd=All,chromosome&hd=All,structure>].

Hoareau-Aveilla, C., Bonoli, M., Caizergues-Ferrer, M. y Henry, Y. 2006. hNaf1 is required for accumulation of human box H/ACA snoRNPs, scaRNPs, and telomerase. *RNA* **12**:832-840.

Hockemeyer, D., Sfeir, A., Shay, J., Wright, W. y De Lange, T. 2005. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *The EMBO Journal* **24(14)**:2667–2678.

Hodes, R. Hathcock, K. y Weng, N. 2002. Telomeres in T and B cells. *Nature Reviews Immunology* **2**:699-706

Holland, K. 2003. Chromosomes: Nonhistone Proteins. University of London, London, UK. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, [Recurso en línea
<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0001158/current/html?hd=All,nucleosomes>].

Houben, J., Moonen, H., van Schooten, F. y Hageman, G. 2007. Telomere length assessment: Biomarker of chronic oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **44(3)**:235-246.

Hsiao, S. y Smith, S. 2008. Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* **90(1)**:83-92.

Hug, N. y Lingner, J. 2006. Telomere length homeostasis. *Cromosoma* **115(6)**:413-425.

Irrarrazabal, C., Burg, M., Ward, S. y Ferraris, J. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates activation of ATM by high NaCl and by ionizing radiation: Role in osmoprotective transcriptional regulation. *PNAS* **103(23)**:8882-8887.

Iyer, S., Chadha, A., y McEachern, M. 2005. A Mutation in the STN1 Gene Triggers an Alternative Lengthening of Telomere-Like Runaway Recombinational Telomere Elongation and Rapid Deletion in Yeast. *Molecular and Cellular Biology* **25(18)**:8064–8073.

Iwano, T., Tachibana, M., Reth, M., Shinkai. 2004. Importance of TRF1 for Functional Telomere Structure. *The Journal Of Biological Chemistry* **279(2)**:1442–1448.

Jacobs, S., Podell, E. y Cech, T. 2006. Cristal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nature structural and Molecular Biology* **3(3)**:218-225.

Jady, B., Bertrand, E. y Kiss, T. 2004. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body–specific localization signal. *The Journal of Cell Biology* **164(5)**:647-652.

Jady, B., Richard, P., Bertrand, E. y Kiss, T. 2006. Cell Cycle-dependent Recruitment of Telomerase RNA and Cajal Bodies to Human Telomeres. *Molecular Biology of the Cell* **17(2)**:944-954.

Jagadeesh, S., Kyo, S., y Banerjee, P. 2006. Genistein Represses Telomerase Activity via Both Transcriptional and Posttranslational Mechanisms in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res* **66(4)**:2107-2115.

Ju, Z., y Rudolph, K. 2006. Telomeres and telomerase in cancer stem cells. *European Journal of Cancer* **42(9)**:1197-1203.

Kelland, L. 2007. Targeting the Limitless Replicative Potential of Cancer: The Telomerase/Telomere Pathway. *Clinical Cancer Research* **13**:4960-4963.

Kelleher, C., Kurth, I. y Lingner, J. 2005. Human Protection of Telomeres 1 (POT1) Is a Negative Regulator of Telomerase Activity *In Vitro*. *Molecular And Cellular Biology* **25(2)**:808–818.

Keppler, B., Grady, A., y Jarstfer, M. 2006. The Biochemical Role of the Heat Shock Protein 90 Chaperone Complex in Establishing Human Telomerase Activity. *Journal Of Biological Chemistry* **281(29)**:19840-19848.

Khanna, M., Wu, H., Johansson, C., Caizergues-Ferrer, M., y Feigon, J. 2006. Structural study of the H/ACA snoRNP components Nop10p and the 3' hairpin of U65 snoRNA. *RNA* **12**:40-52.

Larizza, L. y Doneda, L. 2006. Heterochromatin: Constitutive. Milan University, Milan, Italy. Milan University, Milan, Italy. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, [Recurso en línea <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005786/current/html?hd=All,heterochromatin:&hd=All,constitutive>].

Lechel, L., Satyanarayana, A., Ju, Z., Plentz, R., Schaetzlein, S., Rudolph, C., Wilkens, L., Wiemann, S., Saretzki, G., Malek, N., Manns, M., Buer, J., y Rudolph, K. 2005. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis *in vivo*. *European Molecular Biology Organization* **6(3)**:275-281.

Lee, Y. y McKinnon, P. 2007. Responding to DNA double strand breaks in the nervous system. *Neuroscience* **145(4)**:1365-1374.

Li, X., Nishizuka, H., Tsutsumi, K., Imai, Y., Kurihara, Y. y Uesugi S. 2007. Structure, interactions and effects on activity of the 5'-terminal region of human telomerase RNA. *J Biochem* **141(5)**:755-765.

Lin, J., Jin, R., Zhang, B., Yang, P., Chen, H., Bai, Y., Xie, Y., Huang, C. y Huang, J. 2006. Characterization of a novel effect of hPinX1 on hTERT nucleolar localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **353(4)**:946-952.

Liu, D., O'Connor, M. S., Qin, J. y Songyang, Z. 2004. Telosome, a Mammalian Telomere-associated Complex Formed by Multiple Telomeric Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **279(49)**:51338–51342.

Liu, Y., Snow, B., Kickhoefer, V., Erdmann, N. y Zhou, W. 2004. Vault Poly(ADP-Ribose) Polymerase Is Associated with Mammalian Telomerase and Is Dispensable for Telomerase Function and Vault Structure *In Vivo*. *Molecular and Cellular Biology* **24(12)**:5314-5323.

Lue, N., Bosoy, D., Moriarty, T. J., Autexier, C., Altman, B. y Leng, S. 2005. Telomerase can act as a template- and RNA-independent terminal transferase *PNAS* **102(28)**:9778–9783.

Lue, N. y Li, Z. 2007. Modeling and structure function analysis of the putative anchor site of yeast telomerase. *Nucleic Acids Research* **35(15)**:5213-5222.

Luger, K. 2001. Nucleosomes: Structure and Function. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, Ltd.

Ly, H., Calado, R., Allard, P., Baerlocher, G., Lansdorp, P., Young, N., y Parslow, T. 2005. Functional characterization of telomerase RNA variants found in patients with hematologic disorders. *Blood* **105(6)**:2332 – 2339.

Martin, C. y Ledbetter, D. 2006. Telomere. University of Chicago, Chicago, Illinois, USA Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, [Recurso en línea

<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005787/current/html?hd=All,telomeres>].

Mathon, N. y Lloyd, A. 2001. Milestones in cell division: Cell senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer* **1**:203-213

Maser, R. y DePinho, R. 2004. Telomeres and the DNA damage response: why the fox is guarding the henhouse. *DNA Repair* **3(8-9)**:979-988.

Masuda, Y., Suzuki, M., Piao, J., Gu, Y., Tsurimoto, T. y Kamiya, K. 2007. Dynamics of human replication factors in the elongation phase of DNA replication. *Nucleic Acids Research* **35(20)**: 6904 – 6916.

Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J., Currier, J., Tothova, Z., Manola, J., Ganesan, S., Lansdorp, P., Collins, K. y Hahn, W. 2005. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *PNAS*. **102(23)**:8222–8227.

Mattern, K., Swiggers, S., Nigg, A., Löwenberg, B., Houtsmuller, A., y Zijlmans, J. 2004. Dynamics of Protein Binding to Telomeres in Living Cells: Implications for Telomere Structure and Function. *Molecular and Cellular Biology* **24(12)**: 5587–5594.

McClintock, B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**:234-282.

McKeown, S. y Jones, B. 2006. DNA repair: therapeutic implications. *Br J Radiol* **79**:91-93.

McKnight, T. 2004. Plant Telomere Biology. *The Plant Cell* 16:794-803

Michor, F., Iwasa, Y., Vogelstein, B., Lengauer, C. y Nowak, M. 2005. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? *Seminars in Cancer Biology* **15(1)**:43-49

Mizuno, H., Khurts, S., Seki, T., Hirota, Y., Kaneko, S. y Murakami, S. 2007. Human Telomerase Exists in Two Distinct Active Complexes *In Vivo*. *Journal of Biochemistry* **141(5)**:641-652.

Moldovan, G., Pfander, B., y Jentsch, S. 2007. PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* 129**(4)**:665-679.

Moriarty, T., Marie-Egyptienne, D. y Autexier, C. 2005. Regulation of 5' template usage and incorporation of noncognate nucleotides by human telomerase. *RNA* **11(9)**:1448-1460.

Müller, H. 1938. The remaking of chromosomes. *Collecting Net* **13**:181-198.

Nye, A., Rajendran, R. y Belmont, A. 2006. *Chromosomes and Chromatin*. University of Illinois, Urbana, Illinois, USA University of Illinois, Urbana, Illinois, USA. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, Ltd. [Recurso en línea <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005766/current/html>].

O'Connor, M., Safari, A., Xin, H., Liu, D. y Songyang, Z. 2006. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. *PNAS* **103(32)**:11874–11879.

Olovnikov, A. 1971. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. Dokl Akad Nauk SSSR **201**:1496-1499.

Olovnikov, A. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. Journal of theoretical biology **41(1)**:181–190.

Opresko, P. L., Mason, P. A., Podell, E. R., Lei, M., Hickson, I. D., Cech, T. R., Bohr, V. A. 2005. POT1 Stimulates RecQ Helicases WRN and BLM to Unwind Telomeric DNA Substrates. The Journal Of Biological Chemistry **280(37)**:32069–32080.

Opresko, P., Calvo, P. y von Kobbe, K. 2007. Role for the Werner syndrome protein in the promotion of tumor cell growth. Mechanisms of Ageing and Development **128(7-8)**:423-436.

Paeschke, K., Simonsson, T., Postberg, J., Rhodes, D. y Lipps, H. 2005. Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. Nature Struct. Mol. Biol **12**:847–854.

Park, J., Kohn, M., Bruinsma, M., Vech, C., Intine, R., Fuhrmann, S., Grinberg, A., Mukherjee, I, Love, P., Ko, M., DePamphilis, M., y Maraia, R. 2006. The Multifunctional RNA-Binding Protein La Is Required for Mouse Development and for the Establishment of Embryonic Stem Cells. Molecular And Cellular Biology **26(4)**:1445–1451.

Parkinson, E., Newbold, R. y Keith, W. 1997. The genetic basis of human keratinocyte immortalisation in squamous cell carcinoma development: The role of telomerase reactivation. European Journal of Cancer **33(5)**:727-734.

Pearson, C., Edamura, K. y Cleary, J. 2005. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics* **6(10)**:729-742.

Poderycki, M., Rome, R., Harrington, L. y Kickhoefer, V. 2005. The p80 homology region of TEP1 is sufficient for its association with the telomerase and vault RNAs. *Nucleic Acids Research* **33(3)**:893-902.

Rajaraman, S., Choi, J., Cheung, P., Beaudry, V., Moore, H., y Artandi, S. 2007. Telomere uncapping in progenitor cells with critical telomere shortening is coupled to S-phase progression *in vivo*. *PNAS* **104(45)**:17747-17752.

Richard, P., Kiss, A., Darzacq, X., y Kiss, T. 2006. Cotranscriptional recognition of human intronic box H/ACA snoRNAs occurs in a splicing-independent manner. *Mol Cell Biol* **26**:2540-2549.

Rossi, M. y Bambara, R. 2006. Reconstituted Okazaki Fragment Processing Indicates Two Pathways of Primer Removal. *The Journal of Biological Chemistry* **281(36)**:26051-26061.

Rudd, K. 2007. Subtelomeres: Evolution in the human Genome. Emory University, Atlanta, Georgia, USA. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, [Recurso en línea <http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0020840/current/html?hd=All,telomerese>].

Schattner, P., Barberan-Soler, S., y Lowe, T. M. 2006. A computational screen for mammalian pseudouridylation guide H/ACA RNAs. *RNA* **12**:15-25.

Sfeir, A., Chai, W., Shay, J. y Wright, W. 2005. Telomere-End Processing: the Terminal Nucleotides of Human Chromosomes. *Molecular Cell* **18**:131–138.

Sharma, S., Stumpo, D., Balajee, A., Bock, C., Lansdorp, P., Brosh, R. y Blackshear, P. 2007. RECQL, a Member of the RecQ Family of DNA Helicases, Suppresses Chromosomal Instability. *Molecular and Cellular Biology* **27(5)**:1784-1794.

Shay, J. y Wright, W. 2005. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26(5)**:867-874.

Shcherbakova, M., Zvereva, O., Shpanchenko, O. y Dontsova, O. 2006. Telomerase: Structure and properties of the enzyme, and peculiarities of yeast telomerase. *Molecular Biology* **40(4)**:580–594.

Siderakis, M. y Tarsounas, M. 2007. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Research* **15(5)**:667-669.

Smogorzewska, A. y de Lange, T. 2004. Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **73**:177-208.

Snow, B., Mateyak, M., Paderova, J., Wakeham, A., Iorio, C., Zakian, V., Squire, J. y Harrington, L. 2007. Murine Pif1 Interacts with Telomerase and Is Dispensable for Telomere Function *In Vivo*. *Molecular and Cellular Biology* **27(3)**:1017–1026.

Speicher, M. 2006. Chromosome. TU München, Munich, Germany. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley y Sons, Ltd. [<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0005783/current/html>]

Stanek, D., y Neugebauer, K. M. 2006. The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* **115(5)**:343-354.

Steiner, E., Holzmann, K., Elbling, L., Micksche, M. y Berger, W. 2006. Cellular Functions of Vaults and their Involvement in Multidrug Resistance. *Current Drug Targets* **7(8)**:923-934.

Stewart, J., Campbell, J. y Bambara, R. 2006. Flap Endonuclease Disengages Dna2 Helicase/Nuclease from Okazaki Fragment Flaps. *The Journal of Biological Chemistry* **281(50)**:38565-38572.

Surrallés, J., Jackson, S. P., Jasin, M., Kastan, M. B., West, S. C. y Joenje, H. 2004. Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes. *Genes & Dev* **18**:1359-1370.

Takakura, M., Kyo, S., Inoue, M., Wright, W. y Shay, J. 2005. Function of AP-1 in Transcription of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene (*TERT*) in Human and Mouse Cells. *Molecular And Cellular Biology* **25(18)**:8037–8043.

Tanaka, E., Fukuda, H., Nakashima, K., Tsuchiya, N., Seimiya, H. y Nakagama, H. 2007. HnRNP A3 binds to and protects mammalian telomeric repeats *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **358(2)**:608-614.

Tang, J., Kan, Z., Yao, Y., Wang, Q., Hao, Y. y Tan, Z. 2007. G-quadruplex preferentially forms at the very 3' end of vertebrate telomeric DNA. *Nucleic Acids Research* **556**:1-9.

Teixeira, M., Arneric, M., Sperisen, P., y Lingner, J. 2004. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and nonextendible states. *Cell* **117**:323-335.

Theimer, C. y Feigon, J. 2006. Structure and function of telomerase RNA. *Current Opinion in Structural Biology* **16**:307–318.

Theimer, C., Jady, B., Chim, N., Richard, P., Breece, K., Kiss, T., y Feigon, J. 2007. Structural and Functional Characterization of Human Telomerase RNA Processing and Cajal Body Localization Signals. *Molecular Cell* **27(6)**:869-881.

Tomlinson, R., Ziegler, T., Supakorndej, T., Terns, R. y Terns, M. 2006. Cell Cycle-regulated Trafficking of Human Telomerase to Telomeres. *Molecular Biology Cell* **17**:955-965.

Toogun, O., Zeiger, W., y Freeman, B. 2007. The p23 molecular chaperone promotes functional telomerase complexes through DNA dissociation. *PNAS* **104(14)**:5765-5770.

Tycowski, K., Aab, A., y Steitz, J. 2004. Guide RNAs with 5' caps and novel box C/D snoRNA-like domains for modification of snRNAs in metazoa. *Curr Biol* **14**:1985-1995.

Vaitiekunaite, R., Butkiewicz, D., Krześniak, M., Przybyłek, M., Gryc, A., Śnietura, M., Benedyk, M., Harris, C. y Rusia, M. 2007. Expression and localization of Werner syndrome protein is modulated by SIRT1 and PML. *Mechanisms of Ageing and Development* **128(11-12)**:650-661.

Verdun, R., Crabbe L, Haggblom, C. y Karlseder, J. 2005. Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle. *Molecular Cell* **20(4)**:551-561.

Wai, L. 2004. Telomeres, Telomerase, and Tumorigenesis. *Medscape General Medicine* **6(3)**:19.

Wang, C. y Meier, U. 2004. Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins. *The EMBO Journal* **23(8)**:1857-1867.

Wang, R. Smogorzewska, A., y De Lange, T. 2004. Homologous Recombination Generates T-Loop-Sized Deletions at Human Telomeres. *Cell* **119(3)**:355-368.

Wang, S., Hu, Ch. y Zhu, J. 2007. Transcriptional Silencing of a Novel *hTERT* Reporter Locus during *in vitro* Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* **18(2)**:669-677

Waterworth, W., Altun, C., Armstrong, S., Roberts, N., Dean, P., Young, K., Weil, C., Bray, C. y West, C. 2007. NBS1 is involved in DNA repair and plays a synergistic role with ATM in mediating meiotic homologous recombination in plants. *The Plant Journal* **52**:41-52.

Watkins, N., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H., y Luhrmann, R. 2004. Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Molecular Cell* **16(5)**:789-798.

Watson, J. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New Biology* **239(94)**:197–201.

Watson, J., Hays, F y Ho P. 2004. Definitions and analysis of DNA Holliday junction geometry. *Nucleic Acids Res.* **32**:3017-3027.

Wei, C. y Price, C. 2004. Cell Cycle Localization, Dimerization, and Binding Domain Architecture of the Telomere Protein cPot1. *Molecular and Cellular Biology* **24(5)**:2091–2102.

Wu, X., Spitz, M., Amos, C., Lin, J., Shao, L., Gu, J., Andrade, M., Benowitz, N., Shields, P. y Swan, G. 2007. Mutagen Sensitivity Has High Heritability: Evidence from a Twin Study. *Cancer Research* **66(12)**:5993-5996.

Wu, X., Gu, J. y Spitz, M. 2007. Mutagen Sensitivity: A Genetic Predisposition Factor for Cancer. *Cancer Research* **67(8)**:3493-3495.

Wu, Y., Xiao, S. y Zhu, X. 2007. MRE11–RAD50–NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**:832-840

Wyatt, H., Lobb, D. y Beattie, T. 2007. Characterization of Physical and Functional Anchor Site Interactions in Human Telomerase. *Molecular and Cellular Biology* **27(8)**:3226-3240.

Xu, Y., Noguchi, Y. y Sugiyama, H. 2006. The new models of the human telomere d [AGGG(TTAGGG)₃] in K⁺ solution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14(16)**: 5584-5591.

Ye, J., Donigian, J., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A., Chait, B. y De Lange, T. 2004. TIN2 Binds TRF1 and TRF2 Simultaneously and Stabilizes the TRF2 Complex on Telomeres. *The Journal Of Biological Chemistry* **279(45)**:47264–47271.

Yuen, K., Warren, C., Chen, O., Kwok, T., Hieter, P. y Spencer, F. 2007. Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer. *PNAS* **104(10)**:3925-3930.

Zhang, D., Zhou, B., Huang, Y., Xu, L., y Zhou, J. 2006. The human Pif1 helicase, a potential *Escherichia coli* RecD homologue, inhibits telomerase activity. *Nucleic Acids Research* **34(5)**:1393-1404.

Zhang, Q., Manche, L., Xu, R., y Krainer, A. 2006. hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. *RNA* **12**:1116–1128.

Zhong, Z., Jiang, W., Cesare, A., Neumann, A., Wadhwa, R. y Reddel, R. 2007. Disruption Of Telomere Maintenance By Depletion Of The Mre11/Rad50/Nbs1 Complex In Cells That Use Alternative Lengthening Of Telomeres. *The Journal of Biological Chemistry* **(1-20)**.

Zhu, W. y Dutta, A. 2006. An ATR- and BRCA1-Mediated Fanconi Anemia Pathway Is Required for Activating the G2/M Checkpoint and DNA Damage Repair upon Replication. *Molecular and Cellular Biology* **26(12)**:601–4611.

Zielinski, J., Kilk, K., Peritz, T., Kannanayakal, T., Miyashiro, K., Eiríksdó, E., Jochems, J., Langel, U. y Eberwine, J. 2006. *In vivo* identification of ribonucleoprotein–RNA interactions. *PNAS* **103(5)**:1557–1562.