

TELOMEROS Y REPARACION DE DAÑO GENOMICO SU IMPLICANCIA EN PATOLOGIA HUMANA

MARIA DEL ROSARIO PEREZ¹, DIANA DUBNER¹, SEVERINO MICHELIN¹, PABLO GISONE¹,
EDGARDO CAROSELLA²

¹Autoridad Regulatoria Nuclear, Gerencia de Apoyo Científico, Laboratorio de Radiopatología, Buenos Aires; ²CEA, Service de Recherches en Hémato-Immunologie, DSV/DRM, Hôpital Saint-Louis, Institut d'Hématologie

Resumen Los telómeros, complejos funcionales que protegen los extremos de los cromosomas eucariotes, participan en la regulación de la proliferación celular y pueden jugar un rol en la estabilización de ciertas regiones del genoma en respuesta a estrés genotóxico. Su relevancia en patología humana se ha puesto de manifiesto en numerosas enfermedades que comparten como rasgo común la inestabilidad genómica, en las que se comprobaron alteraciones del metabolismo telomérico. Muchas de ellas se encuentran asociadas a hipersensibilidad a radiaciones ionizantes y susceptibilidad al cáncer. Además de las proteínas específicas que forman parte del complejo telomérico otras proteínas implicadas en la maquinaria de reparación del ADN tales como ATM, BRCA1, BRCA2, sistema PARP/ tankirasa, complejo DNA-PK, y complejo RAD50- MRE11-NBS1, se encuentran en estrecha asociación con el mismo. Esto sugiere que el telómero secuestra proteínas de reparación para el mantenimiento de su propia estructura, las que podrían asimismo ser liberadas hacia sitios de daño en el ADN genómico. Esta comunicación describe los aspectos más relevantes de la estructura y función de los telómeros y su vinculación con los procesos de recombinación homóloga, recombinación no homóloga (NHEJ), sistema V(D)J y sistemas de reparación de apareamientos erróneos (MMR), considerando ciertas condiciones patológicas que exhiben alteraciones en algunos estos mecanismos. Se aborda en forma particular la respuesta celular a las radiaciones ionizantes y su relación con el metabolismo telomérico como un modelo de estudio de genotoxicidad.

Palabras clave: telómeros, telomerasa, reparación del ADN, enfermedades genéticas, radiaciones ionizantes

Abstract *Telomeres and genomic damage repair. Their implication in human pathology.* Telomeres, functional complexes that protect eukaryotic chromosome ends, participate in the regulation of cell proliferation and could play a role in the stabilization of genomic regions in response to genotoxic stress. Their significance in human pathology becomes evident in several diseases sharing genomic instability as a common trait, in which alterations of the telomere metabolism have been demonstrated. Many of them are also associated with hypersensitivity to ionizing radiation and cancer susceptibility. Besides the specific proteins belonging to the telomeric complex, other proteins involved in the DNA repair machinery, such as ATM, BRCA1, BRCA2, PARP/ tankyrase system, DNA-PK and RAD50-MRE11-NBS1 complexes, are closely related with the telomere. This suggests that the telomere sequesters DNA repair proteins for its own structure maintenance, which could also be released toward damaged sites in the genomic DNA. This communication describes essential aspects of telomere structure and function and their links with homologous recombination, non-homologous end-joining (NHEJ), V(D)J system and mismatch-repair (MMR). Several pathological conditions exhibiting alterations in some of these mechanisms are also considered. The cell response to ionizing radiation and its relationship with the telomeric metabolism is particularly taken into account as a model for studying genotoxicity.

Key words: telomeres, telomerase, DNA repair, human genetic diseases, ionizing radiation

Los procesos de reparación del ADN constituyen mecanismos esenciales para el mantenimiento de la integridad genómica. En patologías con fenotipos variados, asociados particularmente con inestabilidad genómica,

se han identificado alteraciones en genes vinculados directa o indirectamente con alguno de los mecanismos de reparación.

Por otra parte, los telómeros son complejos funcionales especializados que protegen los extremos de los cromosomas eucariotes, los que sufren un acortamiento progresivo en cada división hasta alcanzar un tamaño crítico en el que el ciclo celular se detiene y se inicia el proceso de senescencia replicativa. En condiciones normales la longitud de los telómeros es mantenida dentro

Recibido: 20-III-2002

Aceptado: 21-V-2002

Dirección postal: Dr. Pablo Gisone, Autoridad Regulatoria Nuclear, Laboratorio de Radiopatología, Avenida del Libertador 8250, 1429 Buenos Aires, Argentina.

Fax: (54-11) 4379-8460

e-mail: pgisone@cae.arn.gov.ar

de un rango determinado, como resultado de un equilibrio dinámico entre acortamiento y elongación en el que la telomerasa, enzima capaz de adicionar secuencias teloméricas en los extremos cromosómicos, juega un rol determinante. Además de constituir la vía principal de mantenimiento de la longitud de los telómeros, la telomerasa puede estabilizar rupturas dobles del ADN mediante la adición de secuencias teloméricas en los extremos de cromosomas rotos.

Los telómeros están protegidos por cromatina densamente compacta y son sitios particularmente apropiados para actuar como reservorio de proteínas de detección y reparación del ADN¹, tanto destinadas a mantener su propia integridad como para ser liberadas hacia sitios de daño en el ADN genómico en respuesta a estrés genotóxico². Esta revisión está focalizada sobre los aspectos del metabolismo telomérico vinculados con los sistemas celulares de reparación del ADN y sus implicancias en la patología humana asociada a inestabilidad genómica. Asimismo se considerará en particular la respuesta a radiaciones ionizantes (RI) como modelo de estudio de noxas genotóxicas.

Daño en el ADN y mecanismos de reparación

Los agentes genotóxicos de naturaleza diversa, tanto exógenos como endógenos, operan de distintos modos sobre la molécula de ADN. 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 ADN.

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 ADN o muerte celular. La severidad de la injuria en el ADN y el momento del ciclo celular en el cual ésta tiene lugar puede inducir una estrategia de reparación que priorice la supervivencia aun a expensas de incurrir en un cambio genético, por lo que la ocurrencia de mutaciones y rearreglos cromosómicos no debe ser interpretada como una simple respuesta pasiva frente al daño.

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 ADN, pueden ser corregidas mediante el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (REN). En ambos casos la indemnidad de la cadena complementaria permite que la ADN polimerasa restituya con

fidelidad la secuencia original. Los individuos portadores de xeroderma pigmentoso y síndrome de Cockayne exhiben fallas en el sistema REN³. Estos pacientes son sensibles a la luz solar, que induce la formación de dímeros, y a los agentes químicos capaces de inducir grandes aductos en el ADN, presentan gran predisposición al cáncer de piel y su sensibilidad a las radiaciones ionizantes (RI) puede estar discretamente aumentada.

Ha sido postulado que una sola ruptura doble no reparada puede ser suficiente para inducir muerte celular⁴. La reparación de rupturas dobles involucra dos tipos de procesos: recombinación homóloga y recombinación no-homóloga o ilegítima. La recombinación homóloga, mecanismo principal de reparación de rupturas dobles en organismos inferiores y existente asimismo en células de mamíferos⁵, se sustenta en la identidad de secuencias entre ciertas regiones del genoma. La secuencia de ADN 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 ADN invade una región homóloga sana y, a partir de este templado, se restituye la cadena dañada.

La recombinación no-homóloga de los extremos rotos del ADN (NHEJ: *non-homologous end-joining*), 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 ADN.

Existe un mecanismo de recombinación sitio-específica que se observa en el sistema inmune durante la diferenciación linfocítica, 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.

Las mutaciones no siempre ocurren como consecuencia de la acción de un agente genotóxico. Pese a que el proceso de replicación del ADN es de muy 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 ADN polimerasa, enzima que sintetiza la cadena de ADN 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 ADN polimerasa ponen en marcha el sistema de reparación de apareamientos erróneos (*mismatch-repair*: MMR) que detecta la distorsión de la

hélice de ADN resultante del apareamiento de bases no complementarias. Un grupo de tres proteínas de reconocimiento y reparación (MSH2, MLH1 y PMS1) permiten al sistema MMR diferenciar la cadena nueva de la original e introducir el cambio corrector sobre la primera, ya que de lo contrario se correría el riesgo de modificar la secuencia original generando así una mutación.

Estructura y función de los telómeros

El telómero es una estructura altamente conservada a través de la evolución, cuyas funciones más relevantes son proteger el extremo cromosómico confiriéndole estabilidad y protagonizar interacciones con el núcleo celular. Si las células no pudieran distinguir entre una ruptura doble inducida por un agente genotóxico y un extremo cromosómico normal, la ocurrencia de fusiones y recombinaciones conduciría a un gran número de aberraciones cromosómicas. La interacción con la envoltura y la matriz nuclear, por otra parte, contribuye a la organización tridimensional del núcleo, implicada en procesos tales como replicación, transcripción y segregación^{6, 7}.

Los telómeros humanos están formados por secuencias repetitivas de 6 nucleótidos del tipo (TTAGGG)_n.

En el telómero pueden identificarse tres regiones que se asocian a proteínas específicas, las que a su vez interactúan con otras proteínas implicadas en la maquinaria de reparación: una porción distal, formada por un extremo 3' de ADN de cadena simple rico en guanina, una región intermedia de cadena doble no nucleosomal inmediatamente adyacente a la anterior, y una región proximal con nucleosomas de disposición irregular (Figura 1). El extremo distal del complejo telomérico adopta una conformación particular en forma de bucle en cuya estabilización está dada por los denominados 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 ADN telomérico (Figura 2). El mantenimiento de la compleja organización tridimensional del ADN telomérico con plegamiento de las cadenas ricas en guanina, denominada cuadrúplex G, involucra la participación de proteínas específicas⁸. El síndrome de Bloom y el síndrome de Werner son desórdenes autosómicos recesivos con fenotipos diferentes pero que comparten como rasgo común la mutación en genes que codifican proteínas relacionadas con la familia de helicasas RecQ, indispensables para la apertura de la doble hélice del ADN

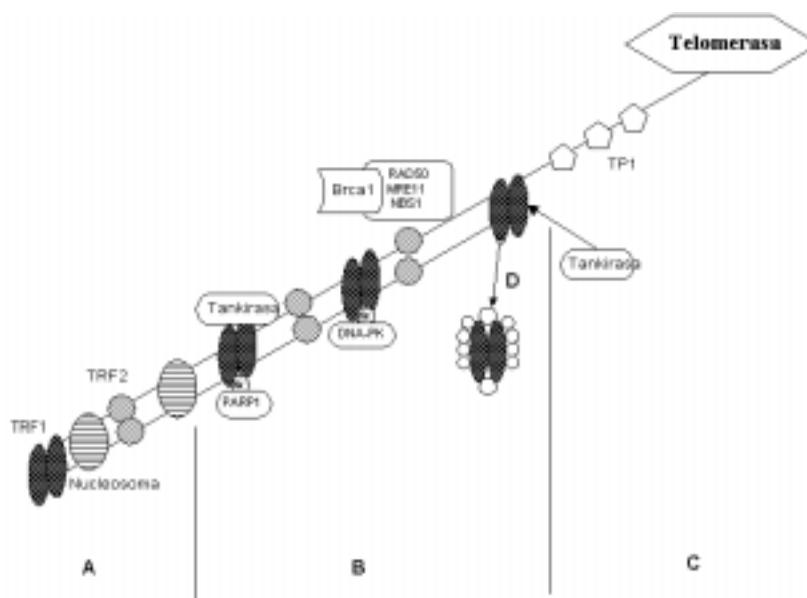


Fig. 1.— Estructura desplegada del telómero. Representación desplegada de la estructura del telómero durante la replicación del ADN. Se observan los factores TRF1, TRF2, y proteínas asociadas con sus sitios de unión. Algunas de estas proteínas participan en procesos de reparación genómica (ver texto). La zona A representa la región que interactúa con las histonas formando los nucleosomas. La zona B es una región de doble cadena sin enrollamiento sobre las histonas. La zona C representa el extremo 3' terminal donde se acopla la telomerasa en el momento de síntesis de las secuencias teloméricas. El punto D representa la ribosilación y desplazamiento de TRF1 por acción de la tankirasa, evento que permite el acceso de la telomerasa al telómero a fin de agregar secuencias nucleotídicas.

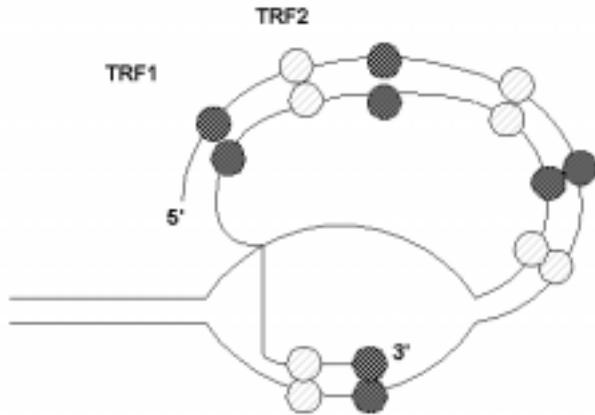


Fig. 2.— Estructura en bucle del extremo distal del telómero. Representación esquemática del modelo propuesto del extremo distal del telómero. Se postula la formación de un bucle en t estabilizado por TRF1 y TRF2. Esta estructura se desplegaría durante la duplicación del ADN.

durante la reparación de rupturas dobles y capaces de inducir disrupción del cuadrúplex-G del ADN^{9,10}. Esta última propiedad las hace relevantes en la regulación de la dinámica del telómero y sugiere que alteraciones en la estructura telomérica podrían constituir un sustrato fisiopatológico en ambos síndromes.

La región sub-telomérica, contigua al telómero, está constituida por heterocromatina con secuencias repetitivas que exhiben una gran variabilidad interindividual^{11,12}. Teniendo en cuenta que la región telomérica está sujeta a procesos dinámicos de erosión y elongación, la región subteloamérica podría estar operando como zona intermedia entre el telómero y el ADN genómico para la protección y aislamiento de los genes funcionales adyacentes⁷.

Mantenimiento de los telómeros

Debido a la incapacidad de las ADN polimerasas para replicar en forma completa el extremo 5' de la cadena de ADN, los telómeros sufren un acortamiento de entre 50 y 200 pares de bases en cada división¹³. Este 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 genéticos¹⁴.

Ciertas células con alto potencial replicativo disponen de vías compensatorias de elongación telomérica que básicamente consisten en: 1- síntesis *de novo* de secuencias teloméricas, y 2- mecanismos alternativos de intercambios homólogos no recíprocos.

La síntesis *de novo* de secuencias teloméricas como resultado de la acción de la telomerasa es el mecanismo prevalente de mantenimiento de la longitud de los

telómeros⁷. La telomerasa humana posee una subunidad catalítica con acción de transcriptasa reversa (TERT) y una proteína asociada (TP1) que interactúa con TERT y modula la actividad de la enzima. Un fragmento de ARN de secuencia complementaria al telómero (TR) opera como templado interno para iniciar la transcripción reversa (Figura 3). Mientras que TR y TP1 se expresan en todas las células, la expresión de TERT está limitada a las células en las que la telomerasa está activa, por lo que se la considera un factor limitante para el control de la actividad de esta enzima^{15,16}. La disquerina es una proteína que facilita el ensamblaje del TR dentro del complejo telomerasico. Su mutación en la disqueratosis congénita induce acortamiento telomérico acentuado e inestabilidad genómica¹⁷.

Las líneas celulares inmortalizadas y la mayor parte de los cánceres humanos exhiben actividad de telomerasa^{11, 18, 19}. Esta enzima, presente en los tejidos en desarrollo²⁰ y en las células germinales¹⁸, está ausente o muy débilmente activa en la mayor parte de las células somáticas adultas. Se ha detectado su actividad en células endometriales²¹, capa basal de la epidermis²² y sistema hematopoyético^{23, 24}.

Se ha visto que algunos tumores y líneas celulares inmortalizadas mantienen la longitud de sus telómeros en ausencia de actividad de telomerasa por un mecanismo denominado alargamiento alternativo de los telómeros (*alternative lengthening of telomeres: ALT*)²⁵, que posibilita la proliferación celular a largo plazo. Las células ALT carecen de actividad de telomerasa y presentan estructuras características denominadas cuerpos nucleares que contienen TRF1, TRF2 y proteínas relacionadas con la recombinación y replicación del ADN²⁶. Sus telómeros son de longitud heterogénea debido a la ocurrencia de intercambios homólogos no recíprocos entre ellos²⁷, eventos raros en células normales por lo que se infiere que las células ALT han sufrido algún tipo de activación cuyo mecanismo es aún desconocido. Las células normales poseen sistemas represores de la actividad ALT y se ha sugerido recientemente que el sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR) podría jugar un rol inhibitorio de ALT²⁸. En el cáncer colorrectal no-polipoide hereditario, así como en ciertos casos esporádicos de cáncer de colon y mama, se han observado deficiencias del sistema de reparación MMR que aumentan la tasa de mutaciones espontáneas no reparadas, lo que puede conducir a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores. Los conocimientos actuales sugieren fuertemente que la inactivación del sistema MMR provoca además aumento de la supervivencia celular por activación del mecanismo ALT, induciendo inmortalización y transformación maligna²⁸.

La presencia de telómeros anormalmente cortos se correlaciona con una mayor sensibilidad del organismo a las radiaciones ionizantes (RI)²⁹ y se ha sugerido re-

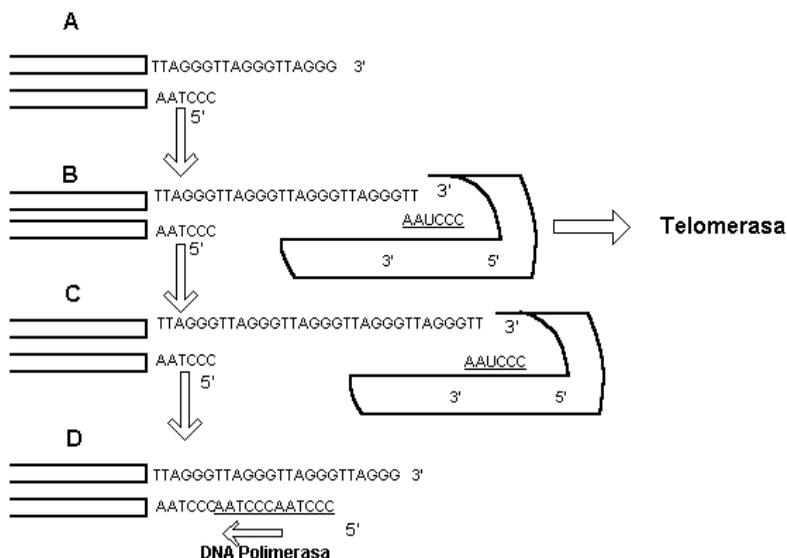


Fig. 3.— Síntesis de secuencias teloméricas. En el proceso replicativo del ADN los extremos 5' de las cadenas recientemente sintetizadas quedan incompletas. En células con actividad proliferativa la síntesis *de novo* de secuencias teloméricas se realiza por acción de la telomerasa, que agrega secuencias repetitivas en el extremo 3'. Luego, una ADN polimerasa sintetiza las nuevas secuencias complementarias impidiendo el acortamiento telomérico generado en cada división (ver texto). A) Porción distal telomérica formada por el extremo 3' del ADN de cadena simple. B) Reconocimiento y unión de la telomerasa al extremo 3'. C) Síntesis de secuencias teloméricas por acción de la telomerasa utilizando su propio ARN como templado. D) Desacople de la telomerasa y síntesis del extremo 5' a través de la ADN polimerasa.

cientemente que del mismo modo la integridad de la función telomérica es capaz de condicionar la radiosensibilidad³⁰.

Alteraciones del metabolismo telomérico han sido descritas en enfermedades genéticas que se asocian a hipersensibilidad a RI, tales como los síndromes de Bloom, Werner y Nijmegen^{31,32}. 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 Duchenne³³, progeria de Hutchinson-Gilford³⁴ y síndrome de Down³⁵. Asimismo los pacientes portadores de anemia de Fanconi^{36,37} y ataxia-telangiectasia³⁸, además del acortamiento acelerado de los telómeros exhiben elevada frecuencia de asociaciones teloméricas.

Metabolismo telomérico y proteínas de reparación

Una significativa fracción del genoma está destinada a velar por su propia integridad. Numerosas proteínas vinculadas directa o indirectamente a la detección y reparación del daño al ADN se encuentran en estrecha asociación con el complejo telomérico, tales como ATM³⁸, sis-

tema PARP/ tankirasa³⁹, complejo DNA-PK², BRCA1, BRCA2 y complejo RAD50- MRE11-NBS1^{13,40}.

Ciertos cambios conformacionales de la cromatina tienen lugar precozmente en el reconocimiento de lesiones en el ADN. Tres sistemas juegan un rol esencial en esta etapa de reconocimiento del daño, como verdaderos sensores disparadores de señales de alarma: 1-proteína ATM, 2-complejo DNA-PK y 3-enzima PARP.

La ataxia-telangiectasia (AT) es una enfermedad autosómica recesiva que presenta un fenotipo complejo en el que se asocian hipersensibilidad a las RI y aumento de incidencia de neoplasias. Los portadores de AT presentan una mutación en el gen identificado como ATM (*ataxia telangiectasia mutated*). La proteína ATM presenta gran homología respecto de una familia de proteínas con función de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI-3K), involucradas en el control del ciclo celular, la regulación de la longitud de los telómeros y la reparación del ADN, incluyendo la recombinación V(D)J. 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 telomérico³⁸.

La proteínquinasa dependiente de ADN (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 (DNA-PKcs). Este complejo, al igual que la proteína ATM, posee un dominio PI3-K que le confiere un rol en el control del ciclo celular, la regulación de la longitud de los telómeros y la reparación del ADN. La proteína Ku consiste en dos sub-unidades (Ku70 y Ku80) que interactúan para formar un heterodímero. Al unirse a los extremos rotos del ADN Ku recluta a la sub-unidad catalítica DNA-PKcs, la que adquiere actividad de quinasa y fosforila un conjunto de sustratos tales como p53, RNA polimerasa II y XRCC4. 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 mecanismos de reparación del ADN y metabolismo telomérico.

La poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP) es una enzima que opera como sensor molecular de rupturas simples en el ADN, 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 ADN dañado y facilitar que se sinteticen enzimas de reparación⁴¹. 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

TABLA 1.– Principales proteínas relacionadas con el metabolismo telomérico

Proteína	Características	Funciones principales
TERT	Sub-unidad catalítica de la telomerasa	Elongación del telómero y cicatrización cromosómica
TR	Fragmento de ARN de secuencia complementaria al telómero	Templado interno para la síntesis de secuencias teloméricas
TP1	Proteína localizada en el extremo telomérico 3' de cadena simple	Mantenimiento del complejo TERT/TR, 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
TANK	Poli (ADP-ribosa) polimerasa que co-localiza con TRF1	Ribosilación del TRF1: impide su fijación al telómero y facilita el acceso de la telomerasa
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa que colocaliza con TRF1	Detección y reparación de rupturas simples por 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 DNA-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 la reparación de rupturas dobles y disrupción del cuadrúplex-G del telómero (permitiendo el acceso de la telomerasa)
MSH2/ MLH1/ PMS1	Proteínas del sistema de reconocimiento y reparación de apareamientos erróneos (MMR)	Corrección de errores de replicación, inhibición de la elongación telomérica no dependiente de telomerasa (ALT)
Disquerina	Proteína mutada en la disqueratosis congénita	Modulación del acople del TR al complejo telomérico

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, DNA-polimerasas, 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. 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 ADN telomérico, permitiendo que se despliegue la estructura terminal y posibilitando así el acceso de la telomerasa para iniciar la elongación³⁰. 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.

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.

El complejo RAD50-MRE11-NBS1, que participa en la reparación de rupturas dobles mediante la alineación de los extremos del ADN previa a la acción de las ligasas⁴², colocaliza con TRF1 y TRF2 a nivel de los telómeros, permitiendo la apertura de la estructura en bucle en t de su extremo terminal⁴⁰. El síndrome de Nijmegen, asociado a la mutación de la proteína NBS1, presenta un fenotipo similar al de la AT con hipersensibilidad a las RI y predisposición al desarrollo de tumores linforreticulares, y sus portadores exhiben telómeros anormalmente cortos³². Se ha sugerido que la proteína NBS1 está involucrada en el mecanismo ALT de elongación telomérica en células telomerasa-negativas⁴³.

Estabilización de rupturas del ADN

Se ha postulado que las secuencias teloméricas pueden intervenir en el proceso de estabilización de rupturas de ADN a través de mecanismos telomerasa dependientes y no dependientes.

La telomerasa puede adicionar secuencias teloméricas en sitios de ruptura doble del ADN en otras regiones del genoma, esto es, fuera de los telómeros, estabilizando los extremos rotos mediante un proceso denominado cicatrización cromosómica⁴⁴. Una vez estabilizados estos extremos ya no son reparables mediante el mecanismo NHEJ y persisten como tales⁴⁵ pero, a diferencia de los extremos rotos no estabilizados, ya no plantean el riesgo de fusiones que podrían conducir a la producción de aberraciones cromosómicas tales como anillos o dicéntricos.

¿Cómo puede la telomerasa inducir cicatrización cromosómica en regiones alejadas del telómero? Uno de los requerimientos para la intervención de la telomerasa en sitios no teloméricos es la existencia de complementariedad a nivel de por lo menos 2 a 4 pares de bases entre el TR y el ADN no telomérico, condición que se puede observar cada 10 nucleótidos a nivel de genoma humano⁴⁶. Se ha propuesto que la adición de secuencias por acción de la telomerasa puede comenzar en una región localizada a una distancia de más de 10 nucleótidos del sitio de ruptura⁴⁷. Esto permitiría suponer que cualquier ruptura doble podría ser reparada por cicatrización mediada por telomerasa, pero otro de los requerimientos para que la telomerasa pueda operar es la presencia de un extremo 3' de ADN de simple cadena, tal como poseen los telómeros y las rupturas con extremos cohesivos. Esto implica que las rupturas que presentan extremos romos no pueden ser estabilizadas por el mecanismo telomerasa-dependiente, indicando que la cicatrización cromosómica mediada por telomerasa es un proceso selectivo de baja frecuencia⁴⁵.

Se ha descrito un mecanismo de estabilización de rupturas en el ADN no dependiente de la telomerasa denominado captura telomérica. Este mecanismo implica la transferencia hacia el sitio de ruptura de un telómero proveniente de un cromosoma sano⁴⁵. Se trata de un proceso de translocación no recíproca que deja al cromosoma "donante" carente de telómero en uno de sus extremos, con el riesgo consecuente de recombinaciones ilegítimas⁴⁸.

La susceptibilidad a genotóxicos varía a través del ciclo celular siendo generalmente menor durante la fase S y más elevada al final de G1 y en la fase G2/M. La fluctuación de esta respuesta tiene que ver con la habilidad de las células para detectar y reparar el daño en los distintos momentos del ciclo celular. Hay puntos de control del ciclo celular en la transición G1/S y G2/M en los que se evalúa el estado de la célula y la integridad del genoma previo a la transición hacia una nueva fase. Múltiples proteínas participan en estos puntos de control donde se detecta el daño en el ADN y se induce a la célula a bloquear el ciclo celular a fin de dar tiempo a la reparación.

Aunque la actividad de telomerasa no varía a través del ciclo celular⁴⁹, la elongación de los telómeros tiene lugar sólo en la fase S⁵⁰. Los telómeros cambian su configuración a lo largo del ciclo celular, ya que para que la telomerasa pueda elongar el telómero su extremo terminal debe estar desplegado. Esto implica que también ocurren modificaciones dependientes del ciclo celular en las proteínas relacionadas con el mantenimiento de la estructura en bucle tales como TRF1, TRF2, Ku, TANK y complejo RAD50-MRE11-NBS1⁴⁰. El hecho de que los cambios de configuración que posibilitan el acceso de la telomerasa tengan lugar durante la fase S sugiere

que la elongación de los telómeros es un proceso dependiente de la maquinaria general de replicación⁵⁰.

Telomerasa versus apoptosis: ¿una cuestión de vida o muerte?

Numerosos hallazgos recientes señalan que p53 y telomerasa operan en forma antagónica en la regulación de la muerte celular apoptótica. Uno de los eventos involucrados en la apoptosis via p53 es la activación de la proteína pro-apoptótica Bax y la inhibición de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Se ha demostrado que la proteína Bcl-2 induce aumento de actividad de telomerasa⁵¹. Por otra parte p53 tiene un efecto inhibitor sobre la actividad de telomerasa por un mecanismo de represión del promotor de TERT^{52, 53}. Al propio tiempo se ha visto un efecto inhibidor de TP1, proteína asociada a la telomerasa que regularía la actividad de esta enzima a través de una interacción con p53⁵⁴. La proteína p53 es degradada por la enzima MDM2. La fosforilación de la proteína p53 por acción de ATM impide la acción de MDM2, incrementa su vida media e induce su acumulación en los minutos siguientes a una exposición a RI o drogas radiomiméticas. Asimismo ATM activa c-Abl, una protein-quinasa que, en presencia de genotóxicos, interactúa con las proteínas de reparación DNA-PK, RAD51, Rb, p53 y ARN polimerasa II. Recientemente se demostró que la proteína c-Abl fosforila TERT e inhibe así la actividad de telomerasa⁵⁵. A la luz de estas observaciones puede inferirse que la telomerasa debe estar inhibida para que la proteína p53 pueda ejecutar el programa de muerte celular y de hecho se ha visto que las células tumorales que exhiben alta actividad de telomerasa son resistentes a la apoptosis.

La activación de esfingomielinasa en respuesta a ciertos tipos de estrés induce una rápida liberación de ceramida como consecuencia de la hidrólisis de esfingolípidos presentes en la membrana celular. La acumulación de ceramida activa protein kinasas iniciadoras de la apoptosis. Las etapas iniciales de la apoptosis dependiente de ceramida difieren de las de la apoptosis mediada por p53, aunque a partir de un punto ambas convergen en una vía final común. Mientras que la telomerasa es activada por la proteína c-Myc, factor de transcripción que aumenta la expresión de TERT, un efecto opuesto es inducido por ceramida, que inhibe la actividad de telomerasa por alteración de la unión de c-Myc al promotor del gen TERT⁵⁶, señalando una vez más el antagonismo entre apoptosis y activación de telomerasa. Por otra parte se ha sugerido que la acción antiapoptótica de esta enzima es independiente de su actividad de transcriptasa reversa y que habría un mecanismo por el cual TERT previene la disfunción mitocondrial y la activación de caspasas que tienen lugar en una etapa muy precoz del proceso apoptótico⁵¹.

La decisión final acerca del bloqueo del ciclo celular y reparación o el disparo de apoptosis está condicionada por la magnitud y la duración del estímulo genotóxico.

Al estabilizar los extremos cromosómicos la telomerasa puede promover la proliferación celular y suprimir las señales que conducen al bloqueo del ciclo celular y a la apoptosis. La apoptosis puede verse como un mecanismo supresor de tumores que, además de permitir la remoción de células que no han sido adecuadamente reparadas, opera como una vía de control de la proliferación celular cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica que pone en peligro la integridad del ADN genómico. El bloqueo del ciclo celular en G1/S que tiene lugar cuando la célula entra en senescencia replicativa es irreversible, pero los procesos de transformación celular pueden revertirlo. Cuando una célula ha sufrido una transformación capaz de iniciarla en el camino de la carcinogénesis, puede ignorar estas señales de senescencia y continuar dividiéndose aun a expensas de que la pérdida adicional de secuencias teloméricas la conduzca a un estado de alta inestabilidad genómica. Estas células adquieren una sobrevida prolongada pero aún finita, ya que si continúan proliferando, la erosión casi completa de los telómeros induce un estado de crisis, con producción de múltiples aberraciones cromosómicas que comprometen severamente la sobrevida celular y la mayor parte de las células muere por apoptosis p53-dependiente. Como consecuencia de nuevos cambios genéticos, algunas células pueden llegar a escapar de esta crisis proliferativa mediante la reactivación de la telomerasa, que intenta compensar la erosión telomérica de tal modo que las células adquieren la condición de inmortalidad característica del cáncer.

Este antagonismo entre telomerasa y apoptosis debe ser visto como parte del sistema de equilibrio entre proliferación celular y muerte, un balance delicado y sin duda relevante en los sistemas en desarrollo y en la patogenia de ciertas enfermedades.

Telómeros y radiaciones ionizantes como modelo de respuesta al estrés genotóxico

La exposición a RI constituye un modelo característico de estrés genotóxico ya que, aun cuando todas las estructuras celulares pueden resultar afectadas, la molécula de ADN se considera un blanco preferencial de su acción. En efecto, las rupturas de cadenas son las lesiones radioinducidas más frecuentes, tanto como consecuencia directa del depósito de energía a nivel de la molécula de ADN como a través de mecanismos indirectos de daño, mediados por especies reactivas del oxígeno (ERO)⁵⁷.

Hallazgos recientes señalan que existe una relación estrecha entre el metabolismo telomérico y la respuesta celular a las RI. En efecto, tal como ya ha sido descrito,

las enfermedades genéticas que involucran alteración en alguna de las proteínas de reparación asociadas al telómero exhiben un fenotipo con radiosensibilidad aumentada.

El aumento de actividad de telomerasa inducido por exposición a RI ha sido descrito por numerosos autores^{44, 49, 58-64}. Trabajos recientes en nuestro laboratorio⁶⁵ han puesto en evidencia en líneas celulares hematopoyéticas irradiadas *in vitro* que esta respuesta es dependiente de la dosis, la tasa de dosis y el tipo de radiación, con una cinética particular que permite formular algunas hipótesis interesantes. La activación de telomerasa parece ser un efecto relativamente tardío luego de dosis bajas, alcanzando un valor máximo 24 hs post-irradiación (p.i.), cuando ya se ha completado el proceso de reparación de rupturas dobles a través del sistema NHEJ.

Teniendo en cuenta que los telómeros son particularmente vulnerables al estrés oxidativo⁶⁶, esta activación tardía sugeriría que la telomerasa podría estar elongando telómeros acortados como consecuencia de las ERO radioinducidas. Esto podría estar reflejando una estrategia de reparación que prioriza el mecanismo NHEJ frente a la cicatrización cromosómica mediada por telomerasa, que puede conducir a la pérdida de material genético⁴⁵. Dosis más altas, que implican la producción de un gran número de rupturas dobles, inducen una activación más precoz de la enzima. Este aumento precoz de actividad de telomerasa observado luego de altas dosis de RI estaría más bien relacionado con un rol estabilizador de rupturas cuando el sistema NHEJ es saturado. Ha sido propuesto que la presencia del complejo Ku/DNA-PKcs, decisivo para la reparación vía NHEJ, impediría el acceso de la telomerasa al extremo cromosómico⁴⁵ sugiriendo la posibilidad de competición entre NHEJ y cicatrización cromosómica mediada por telomerasa. ¿Por qué resultaría conveniente la competición entre ambos mecanismos a dosis más altas y no a dosis bajas? A bajas dosis y bajas tasas de dosis, cuando las rupturas se producen en forma aislada, es más probable que en el momento de la reparación los extremos sean unidos adecuadamente vía NHEJ. En cambio, cuando un gran número de rupturas se producen al mismo tiempo y en estrecha proximidad, la reparación por NHEJ puede conducir a rearrreglos cromosómicos potencialmente peligrosos para la integridad del genoma⁶⁷.

Es necesario tener en cuenta que no todos los genotóxicos operan de la misma forma, en particular en relación a la distribución de daño y el tipo de mecanismo involucrado, y que la mayor parte de los modelos experimentales que vinculan telómero con RI se han realizado en sistemas celulares transformados. El hecho de que a diversas dosis y tasas de dosis se hayan verificado fenómenos que aluden a la intervención de sistemas de reparación genómica en relación con elongación

telomérica y proteínas asociadas al telómero, parece señalar que el modelo puede ser útil para el estudio del comportamiento de estos sistemas.

En suma, inductibilidad relacionada con el número de rupturas, cicatrización cromosómica, competencia con sistemas de recombinación no homóloga y relación indirecta con la sobrevida temprana y tardía, podrían plantear las claves entre telómeros, reparación y el destino de una célula alcanzada por una noxa genotóxica, que los modelos radiobiológicos contribuirán a dilucidar.

Bibliografía

1. Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature* 2000; 407: 777-82.
2. Gasser SM. A sense of the end. *Science* 2000. 107: 1377-78.
3. Cooper PK, Nospikel T, Clarkson SG, Leadon SA. Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne Syndrome patients from XP group G. *Science* 1997; 275: 990-3.
4. Boulton SJ, Jackson SP. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* 1998; 17: 1819-28.
5. Pierce A, Johnson R, Thompson L, Jasin M, XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev* 1999; 13: 2633-8.
6. Luderus ME, van Steensel B, Chong L, Sibon OC, Cremers FF, de Lange T. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* 1996; 135: 867-81.
7. Kipling D. The telomere. *Oxford University Press* ed; 1996
8. Simonsson T. G-quadruplex DNA structures-variations on a theme. *Biol Chem* 2001 382: 621-8.
9. Li JL, Harrison RJ, Reszka AP, et al. Inhibition of the Bloom's and Werner's syndrome helicases by G-quadruplex interacting ligands. *Biochemistry* 2001; 40: 15194-202.
10. Imamura O, Fujita K, Itoh C, Takeda S, Furuichi Y, Matsumoto T. Werner and Bloom helicases are involved in DNA repair in a complementary fashion. *Oncogene* 2002; 21: 954-63.
11. Bacchetti S, Counter CM. Telomeres and telomerase in human cancer. *Int J Oncol* 1995; 7: 423-32.
12. Bouffler SD, Blasco MA, Cox R, Smith PJ. Telomeric sequences, radiation sensitivity and genomic instability. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 995-1005.
13. Lansdorp PM. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* 2000; 118: 23-34.
14. Cottliar AS, Slavutzky IR. Telómeros y actividad de telomerasa: su participación en el envejecimiento y el desarrollo neoplásico. *Medicina (Buenos Aires)* 2001; 61: 335-42.
15. Xu D, Gruber A, Peterson C, PISA P. Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. *Brit J Haematol* 1998; 102: 1367-75.
16. Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 2001; 269: 1-12.
17. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999; 402: 551-5.
18. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific asso-

- ciation of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-15.
19. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Rad Res* 2001; 155: 188-93.
 20. Ulaner GA, Hu J, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 1997; 58: 4168-72.
 21. Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Tanaka M, Inoue M. Human telomerase reverse transcriptase as a critical determinant of telomerase activity in normal and malignant endometrial tissues. *Int J Cancer* 1999; 80: 60-3.
 22. Ueda M, Ouhitit A, Bito T, et al. Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res* 1997; 57: 370-4.
 23. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leucocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995; 85: 2315-20.
 24. Norrback KF, Roos G. Telomeres and telomerase in normal and malignant haematopoietic cells. *Eur J Cancer* 1997; 33: 774-80.
 25. Cerone MA, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S. Telomere maintenance by telomerase and by recombination coexist in human cells. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1945-52.
 26. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 2002; 21: 598-610.
 27. Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 2000; 26: 447-50.
 28. Brunori M, Gilson E, Puisieux A, *Médecine Sciences* 2001; 17: 1184-86.
 29. Goytisolo F.A Samper E, Martin-Caballero J, et al. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 2000; 192: 1625-36.
 30. Fannon P, Wong H, Silver A, Slijepcevic P, Bouffler S. Long but dysfunctional telomeres correlate with chromosomal radiosensitivity in a mouse AML line. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 1151-62.
 31. Pathak S, Multani AS, Furlong CL, Sohn SH. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer. *Int J Oncol* 2002; 20: 637-41.
 32. Ranganathan V, Heina WF, Ciccone DN, et al. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* 2001; 11: 962-6.
 33. Oexle K, Zwirner A, Freudenberg K, Kohlschutter A, Speer A. Examination of telomere lengths in muscle tissue casts doubt of replicative aging as cause of progression in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 1997; 42: 226-31.
 34. Allsop RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10114-8.
 35. Vaziri H, Schachter F, Uchida I, et al. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 661-7.
 36. Leteurtre F, Li X, Guardiola P, et al. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *Brit J Hematol* 1999; 105: 883-93.
 37. Adelfalk C, Lorenz M, Serra V, Von Zglinicki T, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Accelerated telomere shortening in Fanconi anemia fibroblasts- a longitudinal study. *FEBS Letters* 2001; 506: 22-6.
 38. Pandita TK. The role of ATM in telomere structure and function. *Rad Res* 2001; 156: 642-7.
 39. Smith S, Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 2000; 10: 1299-302.
 40. Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, Lange T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000; 25: 347-52.
 41. Ziegler M, Oei SL. A cellular survival switch: poly(ADP-ribosylation) stimulates DNA repair and silences transcription. *Bio Essays* 2001; 23: 543-8.
 42. Huang J, Dynan WS. Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 667-74.
 43. Wu G, Lee WH, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 2000; 275: 30618-22.
 44. Neuhof D, Ruess A, Wenz E, Weber J. Induction of telomerase activity by irradiation in human lymphoblasts. *Rad Res* 2001; 155: 693-7.
 45. Slijepcevic P, Bryant PE. Chromosome healing, telomere capture and mechanisms of radiation-induced chromosome breakage. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 1-13.
 46. Flint J, Craddock CF, Villegas A. Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 505-12.
 47. Preston RJ. Telomeres, telomerase and chromosome stability. *Rad Res* 1997; 147: 529-34.
 48. Meltzer PS, Guan XY, Trent JM. Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nat Genet* 1993; 4: 252-5.
 49. Leteurtre F, Li X, Gluckman E, Carosella ED. Telomerase activity during the cell cycle and in gamma-irradiated hematopoietic cells. *Leukemia* 1997; 11: 1681-9.
 50. Marcand S, Brevet V, Mann C, Gilson E. Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* 2000; 10: 487-90.
 51. Mattson MP, Klapper W. Emerging roles for telomerase in neuronal development and apoptosis. *J Neuroscience Res* 2001; 63: 1-9.
 52. Xu D, Wang Q, Gruber A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000; 19: 123-33.
 53. Kanaya T, Kyo S, Hamada K, et al. Adenoviral expression of p53 repress telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Cin Can Res* 2000; 6: 1239-47.
 54. Li H, Cao Y, Berndt MC, Funder JW, Liu JP. Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene* 1999; 18: 6785-94.
 55. Kharbanda S, Kumar V, Dhar S, et al. Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr Biol* 2000; 10: 568-75.
 56. Ogretmen B, Schady D, Usta J, et al. Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 24901-10.
 57. Pouget JP, Mather SJ. General aspects of the cellular response to low-and high-let radiation. *Eur J Nucl Med* 2001; 28: 541-61.
 58. Hande MP, Lansdorp PM, Natarajan AT. Induction of telomerase activity by in vivo X-irradiation of mouse splenocytes and its possible role in chromosome healing. *Mut Res* 1998; 404: 205-14.
 59. Hyeon-Joo O, Hande MP, Lansdorp PM, Natarajan AT. Induction of telomerase activity and chromosomal aberrations in human tumor cell lines following X-irradiation. *Mut Res* 1998; 40: 121-31.
 60. Terashima M, Ogawa Y, Toda K, et al. Effects of irradiation on telomerase activity in human lymphoma and myeloma

- cell lines. *Int J Mol Med* 1998; 2: 567-71.
61. Sawant S, Gregoire V, Dhar S, et al. Telomerase activity as a measure for monitoring radiocurability of tumor cells. *FASEB J* 1999; 13: 1047-54.
 62. Zhao P, Li X, Yang Z, Wang D. Telomerase activity in radiation-induced chronic human skin ulcers. *J Environ Pathol Tox* 1999; 18: 17-9.
 63. Fannon P, Silver AR, Bouffler. Upregulation of telomerase activity by X-irradiation in mouse leukaemia cells is independent of Tert, Terc, Tnks and Myc transcription. *Carcinogenesis* 2000; 21: 573-8.
 64. Wang X, Liu Y, Chow L, et al. Regulation of telomerase activity by γ -radiation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Anticancer Res* 2000; 20: 433-8.
 65. Pérez MR, Dubner D, Michelin S, et al. Radiation-induced up-regulation of telomerase in KG1a cells is influenced by dose-rate and radiation quality. *Int J Radiat Biol* 2002; in press.
 66. Von Zglinicki T, Pilger R, Sittte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radical Bio Med* 2000; 28: 64-74.
 67. Rothkamm K, Kuhne M, Jeggo PA, Lobrich M. Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 2001, 61: 3886-93.

The hybridoma technology was a by-product of basic research. Its success in practical applications is to a large extent the result of unexpected and unpredictable properties of the method. It thus represents another clear-cut example of the enormous practical impact of an investment in research which might not have been considered commercially worthwhile, or of immediate medical relevance. It resulted from esoteric speculations, for curiosity's sake, only motivated by the desire to understand nature. It is to the credit of the Medical Research Council in Britain to have fully appreciated the importance of basic research to advances in medicine. We are delighted to belong to the small, lucky group of those who are at the window-dressing end of the justification for the wisdom of that policy.

La tecnología de los hibridomas fue un producto secundario de la investigación básica. Su éxito en las aplicaciones prácticas es en gran medida el resultado de las inesperadas e impredecibles propiedades del método. Representa otro claro ejemplo del enorme impacto práctico de la inversión en investigación la cual no hubiera sido considerada comercialmente digna de atención o de inmediata relevancia médica. Resultó de especulaciones esotéricas por pura curiosidad, sólo motivadas por el deseo de entender la naturaleza. Es mérito del *Medical Research Council* de Gran Bretaña el haber apreciado en su medida la importancia de la investigación básica para el avance de la medicina. Estamos encantados de pertenecer al pequeño, afortunado grupo de aquellos que se encuentran en la vidriera para justificar la sabiduría de esta política.

César Milstein (1927-2002)

Discurso de recepción del Premio Nobel de Medicina y Fisiología (1984).
The Nobel Foundation, 1985