

Tesis de Posgrado

Efectos del tratamiento prolongado con AZT sobre células tumorales : acortamiento telomérico, inducción de senescencia y apoptosis, y reducción de tumorigenicidad

Tejera, Agueda Mercedes

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tejera, Agueda Mercedes. (2002). Efectos del tratamiento prolongado con AZT sobre células tumorales : acortamiento telomérico, inducción de senescencia y apoptosis, y reducción de tumorigenicidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3502_Tejera.pdf

Cita tipo Chicago:

Tejera, Agueda Mercedes. "Efectos del tratamiento prolongado con AZT sobre células tumorales : acortamiento telomérico, inducción de senescencia y apoptosis, y reducción de tumorigenicidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3502_Tejera.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOLÓGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis de Doctorado

Título:

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON
AZT SOBRE CÉLULAS TUMORALES:**

**ACORTAMIENTO TELOMÉRICO, INDUCCIÓN DE SENESCENCIA Y
APOPTOSIS, Y REDUCCIÓN DE TUMORIGENICIDAD**

Autor:

Águeda Mercedes Tejera

Director:

Dr. Daniel E. Gomez

Director asistente:

Dr. Daniel F. Alonso

**Laboratorio de Oncología Molecular
Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes**

-2002-

LABOR IMPROBUS OMNIA VINCET

(Virgilio)

A Leandra

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, que participaron y colaboraron en cada una de las etapas que involucró el desarrollo del mismo.

A mis directores, los Dres. Daniel Gomez y Daniel Alonso, a quienes aprecio sinceramente, les agradeceré siempre por haberme dado la posibilidad de trabajar con ellos para llevar a cabo esta tesis, con confianza y con libertad. Por brindarme generosamente su tiempo y experiencia científica para llevar adelante el trabajo en el laboratorio. También por su comprensión, su contención, sus consejos, no sólo profesionales, sino para la vida, y por algo fundamental para mí, su buen humor...en general.

A la Dra. Elisa Lombardo, con quien empecé a trabajar en ciencia, por darme la primera oportunidad de trabajar en un laboratorio y por estar siempre dispuesta a brindarme su ayuda y sus conocimientos.

A toda la gente que trabaja en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes y que, directa o indirectamente, colaboró en la concreción de este trabajo.

A la Dra. Ofelia Olivero, del National Cancer Institute, por su colaboración y por haberme permitido trabajar a su lado, y haber obtenido así una experiencia sumamente enriquecedora, le agradezco sinceramente sus enseñanzas, su experiencia, su confianza y sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio, que diariamente compartieron estos años de trabajo en Oncología. A los que, por diversos motivos, no se encuentran hoy conmigo pero a quienes siempre recordaré con gran afecto: a Willy Skilton, por un sentido del humor compartido y por su ejemplo; a Mariana De Lorenzo, sobre todo por hacerme conocer este grupo y por tantos momentos, buenos y malos, compartidos incluso aprendiendo juntas a hacer docencia y a Débora Bublik, en quien encontré una gran amiga, con quien puedo contar permanentemente.

A todos los que están hoy trabajando en el laboratorio, que han participado de diferentes maneras no sólo en la realización de esta tesis, sino que han contribuido también en mi formación personal. Especialmente a las chicas: Giselle Ripoll, Leticia Peche y Mónica Pomiés, por su compañerismo, su disposición permanente y, sobre todo, por su calidez. También a Hernán Farina y Mariano Gabri que estuvieron presentes desde las primeras etapas.

Un agradecimiento especial para Pablo Lorenzano Menna y Santiago Girón, a quienes realmente los considero amigos y los aprecio muchísimo. A Pablo, por brindarme desinteresadamente su experiencia, también sus reactivos, por las discusiones, no sólo científicas, pero siempre productivas. A Santiago, por su excelente predisposición para el trabajo, por los "animal studies", por su invaluable ayuda informática y por su colaboración incondicional. A ambos, por su presencia permanente, su gran humor, por las charlas, los consejos; en síntesis, por hacer más agradables los días de trabajo: gracias totales!

A mis amigos en general, por su compañía y por su ayuda en toda esta compleja e intensa etapa. Muy especialmente, mi agradecimiento y mi afecto por siempre a Carolina y Cecilia, con quienes iniciamos juntas esta carrera y, desde entonces, siempre han estado cerca de mí, llevando casi vidas paralelas, sorteando los mismos obstáculos, disfrutando los mismos logros; realmente espero que podamos seguir siempre compartiéndolos. Es imposible enumerar todos los motivos por los cuales les quiero agradecer, pero quiero destacar todos los momentos compartidos haciendo más llevaderos los problemas y más agradables aún las alegrías, la paciencia mutua, los consejos brindados y pedidos, el ánimo, el compañerismo, la ayuda desinteresada, en suma, su gran amistad.

Finalmente, mi eterno agradecimiento a toda mi familia, por quienes he podido llegar a concretar este sueño y en especial a mi mamá, Leandra, Lara, Pablo, Marilé, Claudio y Viviana. No tengo palabras para expresar mi gratitud por creer en mí, por su presencia constante y por su apoyo incondicional, cada día, cada momento y porque se que será así en cada nueva etapa que inicie.

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Ph.D. Thesis

Title:

**EFFECTS OF AZT PROLONGED TREATMENT
ON TUMOR CELLS:
TELOMERE SHORTENING, INDUCTION OF SENESENCE AND
APOPTOSIS AND REDUCTION OF TUMORIGENICITY**

Author:

Agueda Mercedes Tejera

Director:

Daniel E. Gomez, MD, Ph.D.

Assistant Director:

Daniel F. Alonso, MD, Ph.D.

**Laboratory of Molecular Oncology
Department of Science and Technology
Quilmes National University**

-2002-

ABREVIATURAS PRINCIPALES

ALT	<i>Alternative Lengthening of Telomeres</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
AZT	3'-azido-2',3'-dideoximidina
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
DR	<i>Death receptor</i>
DTT	Ditiotreitol
HIV-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1
hTERT	Subunidad catalítica de la telomerasa humana
hTR	Componente RNA de la telomerasa humana
IL	Interleuquina
mTERT	Subunidad catalítica de la Telomerasa de ratón
mTR	Componente RNA de la Telomerasa de ratón
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal
NTPs	Nucleótidos Trifosfato
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PD	Duplicaciones de la Población
PI3	Fosfatidilinositol 3
PKC	Proteína quinasa C
RT-PCR	Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SF	Solución Fisiológica
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TRAP	Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas
TRF	Fragmentos de Restricción Terminales

ÍNDICE

Abstract	1
Publicaciones	2
Resumen general	4
Objetivos	7
PRIMERA PARTE:	
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
CAPÍTULO I: Senescencia replicativa e inmortalidad celular	9
La biología de la senescencia replicativa.....	10
Mediadores de la senescencia replicativa.....	13
Mediadores de la senescencia que sigue a la activación de oncogenes.....	16
Inmortalización celular.....	17
Senescencia celular, envejecimiento y cáncer.....	17
CAPÍTULO II: Apoptosis	20
Apoptosis versus necrosis.....	21
Activación de las caspasas.....	23
Vía de los receptores de la muerte.....	27
Vía mitocondrial y reguladores apoptóticos de la familia Bcl-2.....	28
La regulación de la apoptosis.....	30
Apoptosis y tumorigénesis.....	34
CAPÍTULO III: Dinámica telomérica	39
Estructura y función telomérica.....	40
Proteínas de unión a telómeros.....	41

Mecanismos de elongación telomérica en mamíferos.....	44
Telómeros en inmortalización celular.....	46
CAPÍTULO IV: Telomerasa.....	49
Estructura y función.....	50
Regulación de la telomerasa.....	53
• hTERT.....	54
• hTR.....	60
• El telómero.....	62
CAPÍTULO V: Perspectivas en Oncología.....	71
La telomerasa como marcador para el pronóstico y el diagnóstico en cáncer.....	72
La telomerasa y el telómero como blancos de terapias antitumorales: Inhibidores...	73
• Dirigidos a la subunidad catalítica (hTERT).....	75
• Dirigidos al componente de RNA.....	78
• Dirigidos a proteínas asociadas.....	80
• Dirigidos al DNA telomérico.....	80
• Varios.....	84
SEGUNDA PARTE:	
ACORTAMIENTO IRREVERSIBLE DE LOS TELÓMEROS POR TRATAMIENTO PROLONGADO CON 3´-AZIDO- 2´, 3´-DIDEOXITIMIDINA (AZT) EN UNA LÍNEA TUMORAL HUMANA.....	87
Introducción.....	88
Materiales y Métodos.....	91
Resultados.....	94
Discusión.....	97

TERCERA PARTE:

INDUCCIÓN DE SENESCENCIA Y APOPTOSIS DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO

MURINO POR TRATAMIENTO PROLONGADO CON AZT <i>IN VITRO</i>.....	100
Introducción.....	101
Materiales y Métodos.....	104
Resultados.....	108
Discusión.....	113

CUARTA PARTE:

REDUCCIÓN DE LA TUMORIGENICIDAD IN VIVO DE CÉLULAS DE CARCINOMA

MAMARIO MURINO POR TRATAMIENTO PROLONGADO CON AZT <i>IN VITRO</i>.....	116
Introducción.....	117
Materiales y Métodos.....	118
Resultados.....	121
Discusión.....	130

QUINTA PARTE:

DISCUSIÓN.....	134
-----------------------	------------

SEXTA PARTE:

CONCLUSIONES.....	140
--------------------------	------------

Referencias.....	143
-------------------------	------------

ABSTRACT

Normal cells in culture divide a certain amount of times and undergo a process termed replicative senescence. Telomere loss is thought to control entry into senescence. Activation of telomerase in tumors bypasses cellular senescence and is thus a requirement for tumor progression. In this work, we have investigated the effects of chronic *in vitro* 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine (AZT) exposure on human and murine carcinoma cells. We demonstrate the irreversible telomere shortening in human cervical cancer cells (HeLa) cultured for long-term with AZT, but without evidence of senescence. Furthermore, we demonstrate, for the first time, that AZT-treated murine mammary carcinoma cells (F3II) have a reduced tumorigenicity in syngeneic BALB/c mice. Tumor incidence was reduced and survival was prolonged in animals inoculated with AZT-treated cells when comparing with control counterparts. The number and size of spontaneous metastases were also decreased in animals receiving AZT-treated F3II cells. In addition, we present morphological and biochemical evidence of senescence, and induction of apoptosis in tumor cells exposed to AZT. These data indicate that chronic exposure of mammary carcinoma cells to AZT may be sufficient to induce a senescent phenotype and to reduce tumorigenicity.

Key words: apoptosis, AZT, breast cancer, senescence, telomerase.

LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS HAN SIDO DADO ORIGEN A LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

ARTÍCULOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS CON REFERATO:

1. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. (1998) Daniel E. Gomez, Agueda M. Tejera and Ofelia A. Olivero. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **246**:107-110.

2. Chronic *in vitro* exposure to 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine induces senescence and apoptosis and reduces tumorigenicity of metastatic mouse mammary tumor cells. (2001) Agueda M. Tejera, Daniel F. Alonso, Daniel E. Gomez and Ofelia A. Olivero. **Breast Cancer Research and Treatment**, **65(2)**: 93-99.

3. Hacia nuevas formas de tratamiento prolongado del cáncer. (2002) Daniel F. Alonso, Hernán G. Farina, Agueda M. Tejera, Mariano R. Gabri y Daniel E. Gomez. **Ciencia Hoy**, en prensa.

ARTÍCULOS BREVES EN REVISTAS CIENTÍFICAS CON REFERATO:

1. Inducción de senescencia y apoptosis en un carcinoma mamario murino expuesto a tratamiento crónico con 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina (AZT). (1999) Agueda Tejera, Daniel Alonso, Daniel Gomez, Ofelia Olivero. **Medicina**, **59**: 565.

2. Chronic *in vitro* exposure to 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine induces senescence and apoptosis and reduces tumorigenicity of metastatic mouse mammary tumor cells. (2000) Agueda M. Tejera, Daniel F. Alonso, Daniel E. Gomez and Ofelia A. Olivero. **International Journal of Molecular Medicine**, **6** (Supplement 1): S34.

LOS RESULTADOS DE LA PRESENTE TESIS HAN RECIBIDO LAS SIGUIENTES DISTINCIONES:

1. Award for an outstanding achievement, for the best 10 abstracts presented in the 5th World Congress on Advances in Oncology and 3rd International Symposium on Molecular Medicine. "Chronic *in vitro* exposure to 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine induces senescence and apoptosis and reduces tumorigenicity of metastatic mouse mammary tumor cells" Agueda M. Tejera, Daniel F. Alonso, Daniel E. Gomez and Ofelia A. Olivero. Hersonissos, Creta, Grecia. Octubre, 2000.

2. Premio Accesit Fundación "Florencio Fiorini" en Investigación básica en cáncer experimental y humano, otorgado por la Liga Argentina de Lucha Contra el Cáncer (LALCEC). "Búsqueda de nuevos tratamientos prolongados para el manejo del cáncer residual. Ensayos preclínicos con lovastatina y azidotimidina en un modelo animal de cáncer mamario". Daniel F. Alonso, Hernán G. Farina, Agueda M. Tejera, Débora R. Bublik, Santiago Girón y Daniel E. Gomez. Buenos Aires. Octubre, 2001.

RESUMEN GENERAL

Las células somáticas humanas normales presentan un mecanismo intrínseco de control que les permite dividirse un determinado número de veces, más allá del cual se desencadena un proceso de envejecimiento que puede culminar en la muerte celular. Esta capacidad limitada de proliferación junto con el perfil de expresión génica que exhiben al final de su vida replicativa, se ha llamado senescencia replicativa.

Distintas evidencias indican que la longitud de los telómeros juega un rol fundamental en la senescencia replicativa. En las células somáticas humanas, los telómeros se acortan en cada ciclo celular debido a la replicación incompleta de un extremo de cada cadena de DNA, conocido como el "problema de la replicación terminal". La erosión de los telómeros podría constituir el mecanismo por el cual las células registran su historia replicativa y los telómeros que se acortan hasta una longitud crítica podrían desencadenar la senescencia replicativa, en ausencia de un mecanismo de elongación telomérica. El más estudiado en células de mamíferos es mediado por la actividad de la enzima telomerasa, una ribonucleoproteína con actividad de transcriptasa reversa que sintetiza y extiende el DNA telomérico para compensar la replicación incompleta. Ha sido demostrado que la expresión forzada de esta enzima previene la erosión telomérica en fibroblastos normales y en consecuencia evita el inicio de la senescencia replicativa.

Uno de los eventos críticos de la carcinogénesis de las células humanas es, precisamente, el escape a las limitaciones en la proliferación impuestas por la senescencia celular. En tal sentido ha sido demostrado que la actividad de telomerasa está aumentada en un 80-90% de los tumores humanos y líneas celulares inmortalizadas, en comparación con los tejidos somáticos normales -en la mayoría de los cuales es prácticamente indetectable-, y esto podría contribuir activamente al crecimiento del tumor.

Esta información sugiere que la telomerasa es necesaria para el crecimiento indefinido de células inmortalizadas y su expresión diferencial, aumentada en los tumores, la convierte en un excelente blanco para el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales. Así, un inhibidor de la telomerasa actuando sobre células tumorales podría ser capaz de revertir el estado de inmortalización que las caracteriza,

conduciéndolas a la senescencia replicativa mediante el acortamiento de sus telómeros.

Las semejanzas de la telomerasa con las retrotranscriptasas virales sugirieron que un inhibidor de las mismas podría actuar sobre la actividad de la enzima. Previamente había sido probada la incorporación preferencial del análogo de nucleósido 3'-azido-2', 3'-didesoxitimidina (AZT) con los telómeros de células inmortalizadas, pero no en telómeros de células que no expresaban telomerasa. En este trabajo, analizamos los efectos de la AZT sobre dos líneas celulares tumorales, *in vitro* e *in vivo*.

En primer término encontramos que la exposición continua *in vitro* a AZT de la línea celular humana de cáncer cervical HeLa producía un acortamiento de las repeticiones teloméricas de las células tratadas con respecto a los controles, y que tal acortamiento era irreversible. Las secuencias teloméricas acortadas por el tratamiento con la droga no se alargaban al remover la AZT del medio de cultivo.

Por otro lado, demostramos que la exposición crónica de cultivos de la línea de carcinoma mamario murino F3II a AZT *in vitro* conducía a la senescencia replicativa y a la muerte celular por apoptosis. Luego exploramos los efectos del tratamiento con AZT en ratones singénicos BALB/c inoculados con células F3II.

En un modelo experimental de enfermedad residual en animales cuyos tumores primarios fueron extirpados, no observamos diferencias en la supervivencia o formación de metástasis pulmonares en los animales tratados con AZT por vía oral, con respecto a los controles. A pesar de que los telómeros son más cortos en los tumores, el tiempo de tratamiento con AZT durante el crecimiento del tumor en los ratones no es suficiente para apreciar los efectos de acortamiento telomérico e inducción de senescencia inducidos por la droga.

En cambio, cuando tratamos previamente las células F3II con AZT en cultivo hasta un estadio previo a la senescencia, y luego las inoculamos en animales que además continuaron con un tratamiento con AZT por vía subcutánea, pudimos apreciar una tendencia a la reducción de la incidencia y del número de metástasis en pulmón, con respecto a los controles sin tratar.

Por último, en nuestro modelo experimental, la formación del tumor primario se redujo y la supervivencia se prolongó cuando los animales fueron inoculados con células F3II tratadas crónicamente *in vitro* con AZT hasta la senescencia, comparados con los controles que recibieron células sin tratar. Además, el número y el tamaño de las metástasis espontáneas disminuyeron significativamente en los animales que fueron inoculados con células tratadas con AZT. Cuando los animales fueron inoculados con una baja carga tumoral, la formación de tumores primarios se redujo significativamente en los animales que recibieron células crónicamente tratadas con AZT, comparándolos con los controles. Analizando estos datos en conjunto, observamos una tumorigenicidad reducida y un retraso en la enfermedad.

La inmortalidad puede ser entendida como un escape anormal de la senescencia celular. En este trabajo demostramos que la AZT, mediante su acción inductora de senescencia y apoptosis en células tumorales, se constituye en un excelente candidato como droga para el tratamiento en el cáncer, ya que toda la evidencia apunta hacia su acción específica en células que expresan telomerasa. Dado que el acortamiento telomérico es un proceso lento, la AZT podría constituir una excelente terapia complementaria en los casos donde la cirugía o las drogas convencionales reducen la masa tumoral primaria, originando una ventana terapéutica que brinde el tiempo suficiente para que la AZT actúe sobre las células tumorales residuales, revertiendo su inmortalidad y conduciéndolas a la senescencia o apoptosis.

OBJETIVOS

El objetivo central del presente trabajo consiste en determinar si el tratamiento *in vitro* en forma continua con AZT de cultivos de una línea tumoral es capaz de inducir la aparición de signos de senescencia y apoptosis, revirtiendo el estado de inmortalización característico de las células tumorales.

A partir de este objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares:

- 1.** Evaluar si la exposición continua a AZT de las células HeLa de carcinoma cervical humano en cultivo produce el acortamiento de los telómeros y si el mismo es irreversible.
- 2.** Estudiar la actividad de la enzima telomerasa en la línea F3II de carcinoma mamario murino y analizar si tal actividad es inhibida por el tratamiento *in vitro* con AZT, conduciendo a la senescencia celular y a la apoptosis en las células tratadas.
- 3.** Determinar si el tratamiento crónico *in vitro* con AZT de los cultivos de F3II lleva a la reducción de la tumorigenicidad de la línea *in vivo* en el modelo singénico.
- 4.** Evaluar, en forma preliminar, los efectos de la AZT en modelos preclínicos de enfermedad residual con el fin de encontrar la ventana terapéutica de utilización de la droga.

PRIMERA PARTE

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO I

SENESCENCIA REPLICATIVA E INMORTALIDAD CELULAR

LA BIOLOGÍA DE LA SENESCENCIA REPLICATIVA

El envejecimiento humano es un proceso complejo que resulta de una suma de cambios deletéreos que se acumulan con el paso del tiempo. Dada la ausencia de buenos modelos experimentales, no ha sido posible hasta el momento, validar críticamente la relevancia de las teorías sobre potenciales mecanismos del envejecimiento humano. Sin embargo, una teoría particularmente atractiva se centra en el papel de la senescencia replicativa en enfermedades relacionadas con la edad.

La senescencia replicativa se refiere no sólo a la capacidad limitada de proliferación que presentan las células somáticas humanas, sino también al perfil de expresión génica observado en las células senescentes, al final de su vida replicativa.

Hace más de 30 años, las pioneras observaciones de Hayflick [Hayflick L, 1965] establecieron que los fibroblastos diploides humanos exhiben una declinación espontánea en su velocidad de crecimiento en un cultivo continuo, que no depende directamente del tiempo de cultivo transcurrido, sino del incremento en el número de duplicaciones de la población (PD). Eventualmente, después de unos 50 a 70 PD, terminan en un estado quiescente pero viable, precisamente llamado senescencia replicativa. Un comportamiento similar ha sido observado en una amplia variedad de células normales, tanto epiteliales como mesenquimáticas, y es ampliamente aceptado que las células somáticas normales humanas poseen una vida media proliferativa intrínsecamente limitada, aun en condiciones ideales de crecimiento [Campisi J, 1997].

La cinética de la senescencia replicativa no genera un compromiso abrupto de toda la población celular, sino una disminución gradual en la proporción de células en división, que puede variar tanto entre tipos celulares distintos como entre clones hermanos [Thomas E *et al.*, 1997].

Este comportamiento puede ser mejor explicado como el resultado de (i) un mecanismo de control intrínseco ligado al número de divisiones –el “replicómetro”– el cual desensibiliza progresivamente a la maquinaria del ciclo celular a la estimulación por factores de crecimiento, junto con (ii) un componente estocástico que probablemente tenga las mismas bases, poco conocidas, como aquellas observadas en

células inmortales bajo condiciones de restricción de factores de crecimiento [Brooks RF *et al.*, 1984] (FIGURA 1).

En un campo puramente teórico, Olovnikov postuló originalmente que el “reloj biológico” que cuenta los eventos de división celular está basado en la erosión progresiva de los telómeros de los cromosomas con cada ciclo celular, lo cual ocurre en las células somáticas humanas debido a la replicación incompleta de un extremo de cada cadena de DNA, conocido como el “problema de la replicación terminal” [Olovnikov AM, 1973; Morin GB, 1997] (FIGURA 2).

El acortamiento resultante de los telómeros podría generar una señal por efectos en *cis* sobre genes subteloméricos, por la liberación de factores que actúen en *trans*, o por la pérdida de proteínas de unión a los telómeros que expongan este extremo y esto sea visto como una señal de daño del DNA [de Lange T, 1994; Harley CB y Villaponteau B, 1995; Wynford-Thomas D *et al.*, 1995].

Además de la extensa evidencia experimental posterior que ha ido fortaleciendo esta hipótesis, la misma ha sido convincentemente probada –al menos para fibroblastos- a partir de datos que demuestran que la prevención de la erosión telomérica por la expresión forzada de la enzima telomerasa, evita el inicio de la senescencia replicativa [Bodnar AG *et al.*, 1998]. Este tema será desarrollado con mayor detalle en los próximos capítulos.

Otro “reloj” potencial incluye la disminución progresiva en la metilación del DNA observada en los cultivos senescentes, la cual podría encender reguladores inhibitorios intrínsecos, como p16^{INK4A}, por desmetilación del promotor [Holliday R, 1996]. No obstante, aun no ha sido esclarecida la forma en que esto podría estar asociado a las divisiones celulares ocurridas.

También se ha propuesto que el daño al DNA acumulado aleatoriamente podría constituir otra posibilidad, más que un mecanismo del tipo “reloj”, aunque es más probable que los efectos observados sobre la vida media celular por daño oxidativo pudieran operar a través de la tasa de erosión telomérica [von Zglinicki T *et al.*, 1995]. El cultivo de células en condiciones de hiperoxia suave reduce la vida media replicativa de las mismas e induce una aceleración del acortamiento telomérico. En cambio, las

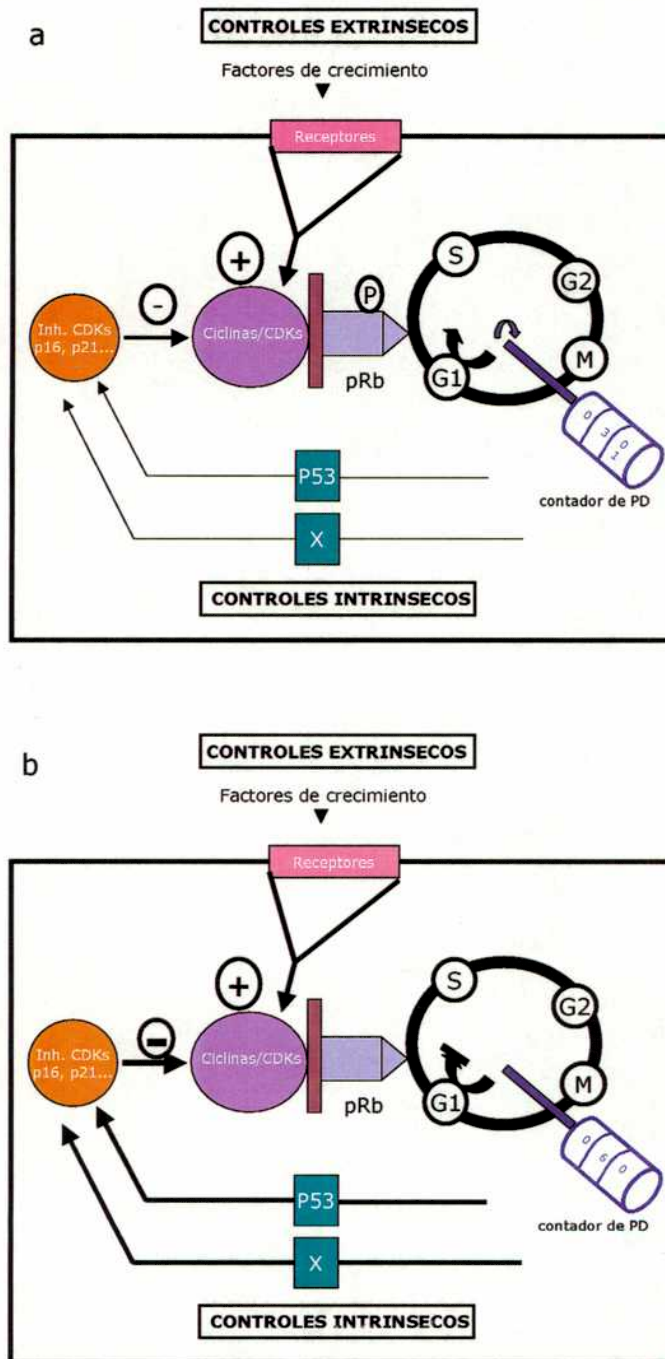


FIGURA 1: Mecanismos del detenimiento del ciclo celular en la senescencia replicativa. Para simplificar se muestra el ciclo celular regulado sólo por pRb, el cual controla la progresión G1→S dependiendo de su estado de fosforilación por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Estas actúan como integradoras de las vías de señales estimuladoras activadas por factores de crecimiento extrínsecos y de señales inhibitorias internas activadas por un contador de las divisiones celulares (contador de PD). Uno de estos caminos opera vía p53 para estimular a p21^{WAF1}, un inhibidor de CDKs, y actúa por lo menos otro camino, acá representado por X, posiblemente involucrando el inhibidor de CDKs, p16^{INK4A}. En un fibroblasto joven (a) creciendo en condiciones óptimas de factores de crecimiento predominan las señales estimuladoras, resultando en la fosforilación de pRb y la progresión del ciclo celular. (b) Al incrementarse la edad replicativa (PD), en cambio, hay una activación progresiva de los controles inhibitorios, hasta que las señales estimuladoras son contrarrestadas, se previene la fosforilación de pRb, y se arresta el ciclo celular. Este estado de senescencia replicativa ocurre en promedio a los 60 PD en los fibroblastos humanos.

células cultivadas con una baja tensión de oxígeno tienen una vida media replicativa extendida y se retrasa su senescencia [Chen Q *et al.*, 1995; Saito H *et al.*, 1995].

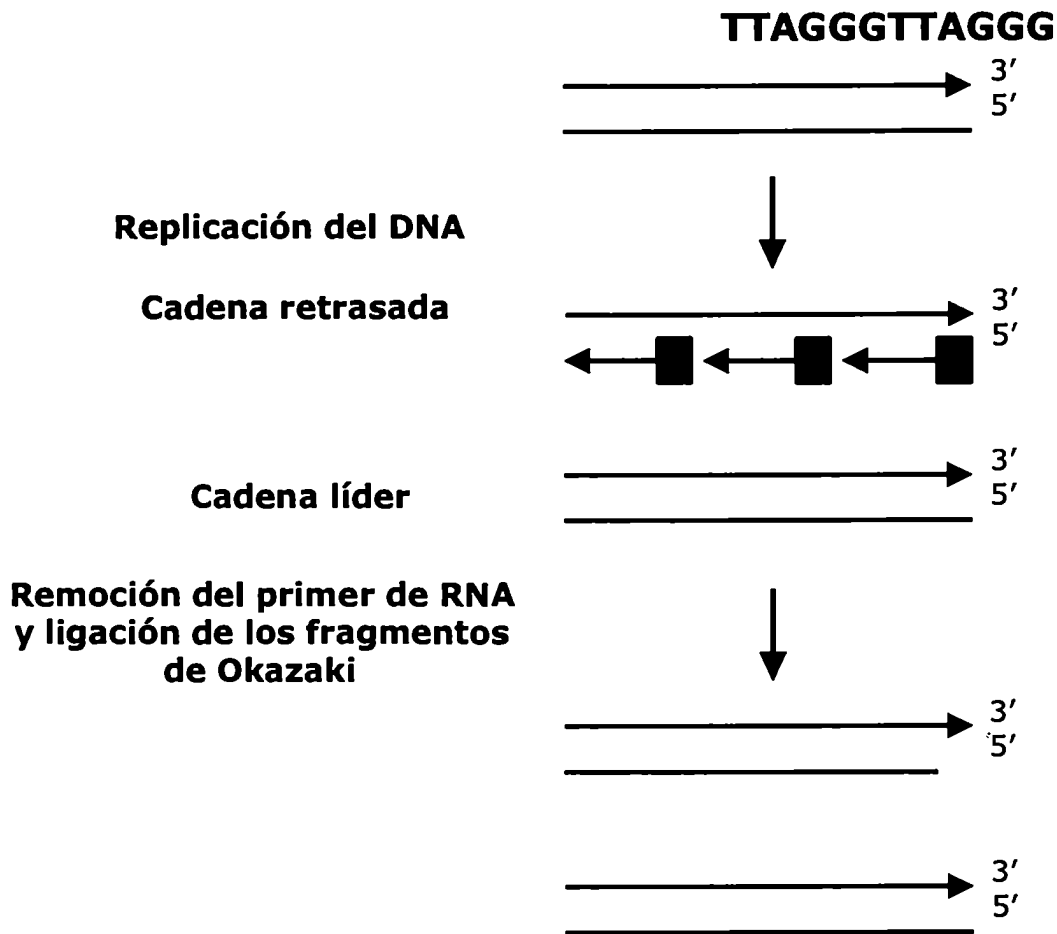


FIGURA 2: Problema de la replicación terminal. La síntesis de la hebra retrasada produce una serie de fragmentos de Okazaki unidos a cortos *primers* de RNA (rectángulos). La degradación de los *primers*, el relleno del hueco y la ligación reemplazan todos los *primers* excepto el último, resultando en un hueco en el extremo 5', y la pérdida de la secuencia del *primer*, un efecto conocido como el problema de la replicación terminal.

MEDIADORES DE LA SENESCENCIA REPLICATIVA

Aceptada la existencia de una especie de "reloj" celular, éste debería controlar la senescencia a través de las vías de algún efector. Varias proteínas regulatorias han

sido propuestas como transductoras de señales inductoras de senescencia o como mediadoras del ingreso de las células en la senescencia (FIGURA 3).

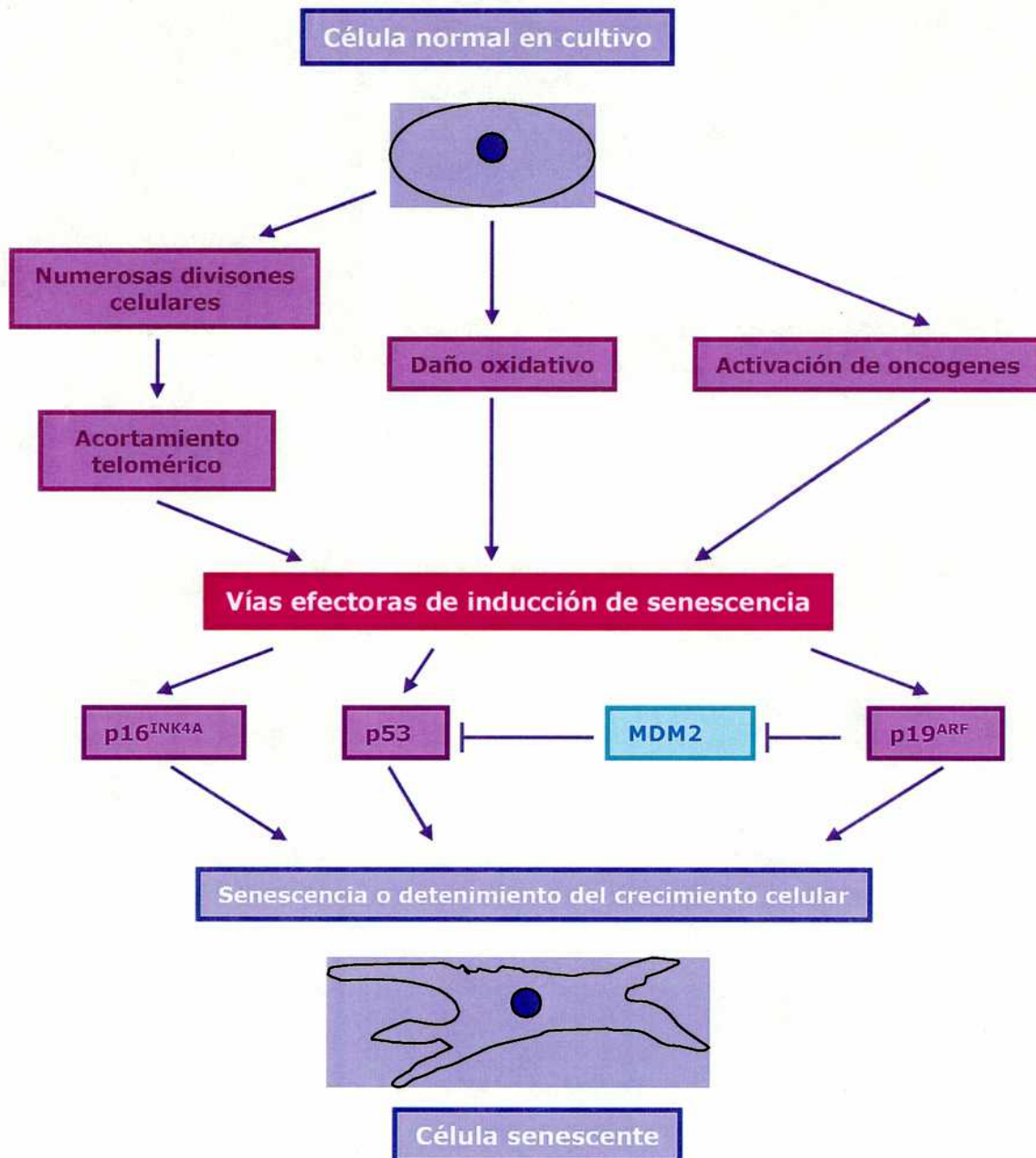


FIGURA 3: Vías efectoras que inducen senescencia. Como resultado de la extensa replicación en cultivo, la activación de oncogenes o el daño oxidativo, en los cultivos primarios de células de mamíferos se producirá un arresto del crecimiento irreversible. Un conjunto de proteínas regulatorias transducen las señales de senescencia o median la entrada de la célula en senescencia. Estas proteínas incluyen el supresor de tumor p16^{INK4A}, y p19^{ARF}, el cual se une y secuestra a MDM2, inhibiendo la degradación de p53 dependiente de MDM2. Esto resulta en la estabilización de p53 y la activación del arresto celular o la apoptosis dependiente de p53. p19^{ARF} también puede actuar por mecanismos independientes de p53.

Entre las mismas juega un papel fundamental la proteína supresora de tumores p16^{INK4A}, que se acumula en fibroblastos que han sufrido un gran número de divisiones celulares y se acercan a la senescencia [Alcorta DA *et al.*, 1996; Hara E *et al.*, 1996]. Los fibroblastos de ratón que han logrado superar la senescencia a menudo han perdido la expresión de p16^{INK4A}. En ciertos tipos celulares humanos en los cuales sólo la expresión de telomerasa ha sido insuficiente para evitar la senescencia, la inactivación adicional de p16^{INK4A}, por mecanismos genéticos o epigenéticos, ha sido requerida para superar la senescencia y conferir inmortalidad a las células [Kiyono T *et al.*, 1998; Dickson MA *et al.*, 2000].

Un segundo gen implicado en el programa de senescencia, p19^{ARF} (p14^{ARF} en células humanas), es codificado por un marco de lectura parcialmente superpuesto en el locus de p16^{INK4A}. p19^{ARF} se une directamente a MDM2 y la secuestra, inhibiendo la capacidad de MDM2 de inducir la degradación del supresor de tumor p53. La pérdida de la función de MDM2 resulta entonces en la estabilización de p53 y la activación del detenimiento del ciclo celular o la apoptosis mediados por p53 [Sherr CJ y Weber JD, 2000]. Si bien se sabía que p53 era otro supresor de tumores clave en el control de este programa, dado que la pérdida de la función p53 salvaje era suficiente para escapar de la senescencia [Bond JA *et al.*, 1995, Rogan EM *et al.*, 1995], no se habían establecido con precisión los mecanismos por los cuales era activado. Así, la liberación y estabilización de p53, mediada por MDM2, que es suficiente para causar el arresto celular en fibroblastos jóvenes [Blaydes JP y Wyndford-Thomas D, 1998], brinda una explicación posible de la participación de p53 en una vía efectora esencial. p19^{ARF} también puede actuar a través de mecanismos que son independientes de p53 [Carnero A *et al.*, 2000].

El locus INK4A se encuentra frecuentemente deletado o silenciado en cánceres humanos y líneas celulares inmortalizadas humanas, inactivando de esta forma ambas vías, tanto la de p16^{INK4A}/pRb como la de p19^{ARF}/p53, a través de un único evento. Esto sugiere que la inactivación de estos genes constituye un paso crítico en la inmortalización y la tumorigénesis.

p16^{INK4A} y p19^{ARF} parecen estar causalmente involucrados en el inicio de la senescencia, dado que se ha encontrado la acumulación de estas proteínas en células senescentes, y que la expresión ectópica de las mismas es capaz de inducir un estado similar senescencia bajo ciertas condiciones experimentales [McConnell BB *et al.*, 1998;

Kato D *et al.*, 1998]. Sin embargo, la activación de las vías de p16^{INK4A}/pRb como la de p19^{ARF}/p53 parecen depender del tipo celular [Kim H *et al.*, 2002].

Otra señal implicada en la senescencia replicativa es p21^{cip1}. Aislada en células senescentes, ha sido bien caracterizada como un efector corriente debajo de la detención del crecimiento mediado por p53 inducido por daño al DNA. Aunque p53 media la detención del ciclo celular durante la senescencia, la participación de p21^{cip1} no es aun muy clara [Bond JA *et al.*, 1995; Brown JP *et al.*, 1997; Pantoja C y Serrano M, 1999]. Aun si p21^{cip1} no fuera esencial para iniciar un programa de senescencia en fibroblastos de ratón, podría igualmente facilitar la detención del crecimiento de las células senescentes.

MEDIADORES DE LA SENESCENCIA QUE SIGUE A LA ACTIVACIÓN DE ONCOGENES

Los mediadores de la senescencia que son activados como consecuencia de la activación de oncogenes son similares a los mediadores bioquímicos de la senescencia replicativa.

En células primarias de roedores, la expresión ectópica de Myc, E1A, o Ras es acompañada por la inducción de los genes p15^{INK4b}, p16^{INK4A} y p19^{ARF}. La integridad de las vías de p16^{INK4A}/pRb y de p19^{ARF}/p53 es esencial en la senescencia inducida por oncogenes [Serrano M *et al.*, 1997; Palmero I *et al.*, 1998]. Myc y E1A activan un programa de senescencia, al menos en parte, a través de su habilidad de contrarrestar la función de pRb, el cual regula la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular. Esto, a su vez, resulta en la desrepresión de los factores de transcripción E2F y la regulación positiva de p19^{ARF} [Zindy F *et al.*, 1998; de Stanchina E *et al.*, 1998]. En efecto, la expresión ectópica de E2F1 solo induce directamente la expresión de p19^{ARF}, como también senescencia, sugiriendo que éste es un paso crítico en la activación del programa de senescencia en células que expresan un oncogén [Bates S *et al.*, 1998, Dimri GP *et al.*, 2000].

La dramática inducción de p19^{ARF} en respuesta a la expresión de Myc y E1A ha llevado a sugerir que p19^{ARF} directamente contrarresta la activación de oncogenes en

la célula. Sin embargo, la expresión ectópica de Ras conduce a una activación más débil de la proteína p19^{ARF}. Además, aun no se ha esclarecido cómo la proteína homóloga a p19^{ARF} en humanos, p14^{ARF}, media la detención del ciclo celular inducido por Ras o si específicamente neutraliza la activación de oncogenes *in vivo*.

Varios otros genes han sido implicados también en la senescencia que sigue a la expresión de oncogenes. Por ejemplo, los queratinocitos de ratón sufren senescencia en respuesta a la expresión de v-ras, que es dependiente de la expresión autocrina o paracrina de TGFβ, la cual conduce a su vez al aumento en la expresión del gen p15^{INK4b} [Tremain R *et al.*, 2000].

INMORTALIZACIÓN CELULAR

La expresión de los genes virales SV40T o HPVE6/E7 previene la entrada en senescencia de fibroblastos humanos normales y les confiere una extensión de su vida media proliferativa de 30 a 40 PD, después de la cual, sin embargo, el crecimiento neto termina en un estado llamado "crisis" o "estadio de mortalidad 2 (M2)". Este difiere fundamentalmente de la senescencia [estadio de mortalidad 1 (M1)] en que la detención del crecimiento no se debe tanto a una reducción en la proliferación sino a un incremento en la tasa de muerte celular. El escape de M2 puede ocurrir raramente como un evento espontáneo (en fibroblastos humanos, a una frecuencia de aproximadamente 1 en 10⁷ divisiones celulares) dando origen a un subclon inmortal.

La pérdida del control del crecimiento y la adquisición de mecanismos moleculares que permitan a las células escapar de la mortalidad celular brindan a las mismas las condiciones necesarias que les posibilitan la inmortalidad celular, característica fundamental de las células tumorales.

SENESCENCIA CELULAR, ENVEJECIMIENTO Y CÁNCER

El envejecimiento está asociado a una declinación progresiva en las funciones corporales, resultando en última instancia en enfermedad y muerte. Los mecanismos responsables del envejecimiento son poco conocidos, pero la acumulación del daño

celular, como resultado del daño oxidativo a las macromoléculas, se piensa que es un contribuyente importante [Johnson FB *et al.*, 1999]. La senescencia replicativa ha sido propuesta como uno de los componentes del proceso de envejecimiento. A medida que éste ocurre, una acumulación de células al final de su vida media proliferativa podría disminuir el potencial regenerativo e incrementar el daño genético.

Una acumulación de células senescentes dentro del cuerpo podría también contribuir al envejecimiento, dadas las propiedades diferenciales como resultado de un perfil alterado en la expresión génica. Las células senescentes serían capaces de comprometer la función tisular. Tal vez, la mejor evidencia de esta hipótesis puede ser vista en el Síndrome de Werner, una rara enfermedad genética, en la cual los pacientes muestran las características de un envejecimiento acelerado, junto con una vida media replicativa comprometida en ciertos linajes celulares [Ostler EL *et al.*, 2000]. Otro ejemplo lo constituyen los fibroblastos senescentes que secretan elevados niveles de colagenasa, lo cual podría explicar la pérdida de elasticidad de la piel envejecida [West MD *et al.*, 1989].

El rol de la senescencia replicativa en el envejecimiento es controvertido. Además, aun no es posible distinguirla, tanto *in vivo* como *in vitro*, de la senescencia prematura, que ocurre en respuesta a distintas señales de daño celular.

La incidencia de cáncer aumenta con la edad. En general, se ha asumido que este hecho refleja el tiempo requerido para acumular las mutaciones suficientes para permitir el desarrollo de un tumor. Esta idea es reforzada por la observación de que una persona que porte una mutación genética en un gen vinculado al cáncer (un gen supresor tumoral, por ejemplo) desarrolla cáncer a una temprana edad. Pero, además, ha sido propuesto que también podría contribuir un incremento en la inestabilidad genética [Hastie ND *et al.*, 1990; DePinho RA, 2000].

También se ha sugerido que la acumulación de células senescentes con la edad crea un ambiente que es más sustentable para el crecimiento del tumor [DePinho RA, 2000]. Esta idea surge de las observaciones que muestran que otros tipos celulares no transformados son importantes para el desarrollo exitoso de un tumor. En particular el microambiente del estroma parece ser crítico para el desarrollo de cánceres epiteliales [Olumi AF, 1999; Krtolica A, 2001; Krtolica A y Campisi J, 2002].

La investigación de la senescencia celular y la inmortalidad abren un campo de creciente exploración destinado a comprender eventos claves que posibilitarán el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a dos procesos de interés prioritario y masivo en la actualidad, el cáncer y el envejecimiento.

CAPÍTULO II

APOPTOSIS

Los animales multicelulares necesitan a menudo liberarse de células que están en exceso, ya que podrían ser potencialmente peligrosas. Con este fin utilizan un programa molecular activo tan importante como la división o la migración celular: la muerte celular programada o regulada. La misma le permite al organismo controlar precisamente el número celular y el tamaño del tejido, como así también protegerse de células indeseables que podrían amenazar la homeostasis.

Descubierta y redescubierta varias veces por diversos citólogos y biólogos del desarrollo, la muerte celular programada recibió varias denominaciones en los siglos pasados [Vaux DL y Korsmeyer SJ, 1999]. El término adoptado finalmente es apoptosis, acuñado por Curie y sus colaboradores en 1972 para describir un tipo común de muerte celular programada que los autores observaron repetidamente en varios tejidos y tipos celulares [Kerr JF *et al.*, 1972]. En principio lo utilizaron para describir las características morfológicas de un cierto tipo de muerte celular como opuesto a la necrosis. Los autores notaron que las células que estaban muriendo compartían muchas características, las cuales diferían de aquellas observadas en células que estaban sufriendo una muerte celular patológica, necrótica, y sugirieron así que estas características morfológicas compartidas podrían ser el resultado de un programa subyacente, endógeno, común y conservado, de muerte celular [Wyllie AH *et al.*, 1980].

APOPTOSIS VERSUS NECROSIS

La necrosis y la apoptosis son los dos tipos de muerte celular que ocurren en los organismos vivos. La apoptosis es una forma de muerte celular eucariota morfológica y bioquímicamente distinta que ocurre bajo una serie de condiciones fisiológicas y patológicas [Arends MJ y Wyllie AH, 1991].

La necrosis es una muerte no fisiológica que en general se produce luego de un daño celular severo en la célula que no puede ser reparado y puede desencadenarse

por situaciones de isquemia, de hipertermia o por traumatismos químicos y físicos. Las células juegan un rol pasivo mientras son destruidas, el proceso no requiere de la síntesis de nuevas proteínas y no se produce en el contexto normal del desarrollo, la necrosis es siempre patológica. Comúnmente, involucra células contiguas y está asociada con la disrupción de la arquitectura tisular. [Kazanietz MG, 2000]

Las células que sufren este tipo de muerte muestran un importante aumento de volumen del citoplasma y de las organelas subcelulares, especialmente de las mitocondrias. El resultado final del proceso es la disgregación de las organelas y la ruptura de la membrana plasmática con la consecuente liberación del material citoplasmático, lo cual desencadena una reacción inflamatoria que puede producir daños secundarios posteriores en el tejido.

Todos estos cambios morfológicos son causados por alteraciones en las actividades intercambiadoras de iones que conducen a la pérdida de la permeabilidad selectiva de membrana plasmática. El libre movimiento de los cationes a través de la membrana produce el ingreso de fluidos hacia el interior de la célula produciendo un gran aumento de su volumen. Al aumentar el Ca^{2+} dentro del citoplasma son activadas fosfolipasas que actúan sobre los fosfolípidos de la membrana desorganizándola, también son inhibidas enzimas que participan de la ruta de producción del ATP. Al estallar, los lisosomas liberan hidrolasas que aceleran el proceso de desintegración celular. Las desoxirribonucleasas lisosomales degradan al azar y en fragmentos de múltiples tamaños, el DNA que ha quedado expuesto por la degradación de las histonas. Finalmente, la fagocitosis es llevada a cabo sólo por macrófagos [Kazanietz MG, 2000].

Durante el proceso de apoptosis, ocurren cambios coordinados en el núcleo, el citoplasma y la superficie celular [Arends MJ y Wyllie AH, 1991]. Las primeras alteraciones afectan las uniones intercelulares, las células pierden el contacto con las células vecinas y se redondean. A continuación, el retículo endoplasmático se dilata y la cisterna superficial se fusiona con la membrana plasmática, el resto de las organelas no es significativamente alterado. Al mismo tiempo hay una importante pérdida de volumen celular, aparentemente debida a una pérdida de fluido intracelular y de iones con la consecuente compactación de las organelas y el aumento de densidad celular [Bellamy CO *et al.*, 1995]. La membrana plasmática se repliega por esa pérdida de volumen y por la desorganización por proteólisis de las proteínas del citoesqueleto que

la sustentan. El DNA es clivado por una nucleasa entre los octámeros de histonas originando la llamada escalera de fragmentos nucleosomales, ya que se generan fragmentos de DNA que son múltiplos enteros de aproximadamente 180 pb [Wyllie AH, 1980]. La presencia de esta escalera ha sido extensivamente utilizada como marcador de la muerte celular apoptótica.

En una etapa más avanzada, la membrana se fragmenta y va a formar los llamados cuerpos apoptóticos: pequeñas porciones de membrana que engloban material nuclear fragmentado, restos de orgánulos y proteínas de citoesqueleto muy compactadas. Los cuerpos apoptóticos son inmediatamente fagocitados por las células vecinas o por macrófagos. Para esa eliminación, la membrana plasmática que rodea a estos cuerpos apoptóticos ha modificado ligeramente su composición exponiendo ahora en su cara externa glicoproteínas inmaduras con un contenido elevado de N-acetilglucosamina, y fosfolípidos típicos de su cara interna como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina. Estos cambios servirán como señales de reconocimiento para las células fagocíticas que se ocuparán de su eliminación, evitando así la inflamación inapropiada [Desagher S y Martinou JC, 2000]. La apoptosis, a diferencia de la necrosis, generalmente afecta células únicas y preserva la arquitectura tisular (excepto en circunstancias especiales como la remodelación embrionaria).

La apoptosis en vertebrados puede ser dividida en cuatro fases o etapas: una primera de *toma de decisión o compromiso*, en la cual la célula recibe el estímulo apoptótico y decide si dispara o no el proceso; una segunda de *ejecución*, en la que se pone en marcha todo el mecanismo de efectores, se manifiestan todas las características del proceso, y acaba con la formación de los cuerpos apoptóticos; una tercera de *fagocitosis* de esos cuerpos por las células macrofágicas del tejido circundante, y una etapa final de *destrucción* por la actividad lítica de estas células.

ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS

La mayoría de los cambios observado por Kerr y colaboradores son llevados a cabo por una serie de cisteína proteasas que son activadas específicamente en células apoptóticas, son homólogas entre sí y forman una gran familia de proteínas conocida como caspasas [Alnemri ES *et al.*, 1996]. Las caspasas son consideradas como las

ejecutoras del proceso de apoptosis ya que los cambios más visibles que caracterizan esta muerte celular programada son resultado de su actividad. Aunque ocurra la muerte celular a través de mecanismos no apoptóticos independientes de caspasas, las características morfológicas que definen el proceso de apoptosis dependen de la actividad de las mismas.

Las caspasas están altamente conservadas en la evolución y pueden ser encontradas en seres humanos y hasta en insectos, nematodos y metazoos [Budihardjo I *et al.*, 1999; Cikala M *et al.*, 1999; Earnshaw WC *et al.*, 1999]. En humanos han sido identificadas más de una docena de caspasas y dos tercios de ellas tendrían funciones en la apoptosis [Earnshaw WC *et al.*, 1999; Thornberry NA y Lazebnik Y, 1998].

Todas las caspasas conocidas poseen una cisteína en el sitio activo y clivan los sustratos después de un residuo de ácido aspártico (es decir, uniones Asp-Xxx). La especificidad de sustrato para una determinada caspasa está dada por los cuatro residuos hacia el amino-terminal del sitio de clivaje [Thornberry NA *et al.*, 1997]. Las caspasas han sido divididas en subfamilias de acuerdo con sus preferencias de sustrato, extensión de su identidad de secuencia y similitudes estructurales.

La activación de las caspasas no produce la degradación total de las proteínas celulares; clivan un grupo restringido de proteínas blanco, usualmente en una o unas pocas posiciones en la secuencia primaria, dando como resultado la inactivación de esa proteína. Las caspasas además pueden activar proteínas en forma directa, clivando un dominio regulatorio negativo, o indirecta, inactivando una subunidad regulatoria [Hengartner M, 2000].

Como la mayoría de las proteasas, las caspasas son sintetizadas como zimógenos enzimáticamente inertes. Estos están compuestos por tres dominios: un prodominio N-terminal, y los dominios p20 y p10, los cuales son encontrados en la enzima madura. En todos los casos examinados hasta ahora, la enzima madura es un heterotetrámero que contiene dos heterodímeros p20/p10 y dos sitios activos [Earnshaw WC *et al.*, 1999].

La mayoría de las caspasas son activadas por el clivaje proteolítico del zimógeno ente los dominios p20 y p10. Llamativamente, todos estos sitios de clivaje ocurren en sitios Asp-Xxx, candidatos como sustratos de caspasas, lo cual sugiere la posibilidad de que ocurra una activación autocatalítica [Thornberry NA *et al.*, 1997]. En efecto, la forma más simple de activar una procaspasa es exponerla a otra caspasa, previamente activada. Esta estrategia de activación "en cascada" de las caspasas es ampliamente utilizada por las células para la activación de las caspasas 3, 6 y 7, que son consideradas como las efectoras de la proteólisis en el proceso apoptótico. En síntesis, las caspasas "efectoras" son generalmente activadas proteolíticamente por una caspasa que se encuentra corriente arriba, mientras que las caspasas "iniciadoras" (como las caspasas 8 y 9) son activadas a través de interacciones reguladas entre proteínas [Hengartner M, 2000]. Los mecanismos que intervienen en la activación de las caspasas iniciadoras aun no han sido completamente determinados.

Se han descrito dos caminos canónicos de activación de caspasas [Kaufmann SH y Hengartner MO, 2001] que son esquematizados en la FIGURA 4. Uno comienza con la unión del ligando en unos receptores especializados de la superficie celular llamados "receptores de la muerte" (DRs: *death receptors*) y el otro involucra la activación por la vía mitocondrial. Ambos serán descritos con mayor detalle más adelante.

Se han propuesto otras vías adicionales para la activación de caspasas. Una de ellos involucra en principio la activación directa de la caspasa-3 por la granzima B, una serina proteasa dirigida a aspartato. Basándose en evidencia posterior, se sugirió que la granzima B cliva la proteína Bid, la cual luego activa la vía mitocondrial [Barry M *et al.*, 2000]. Los linfocitos T citotóxicos y las células NK (*natural killer*) inyectan a la granzima B en las células blanco a través de canales de perforina, para inducir la apoptosis.

En células murinas se describió un camino que involucra la activación de la procaspasa-12 en retículo endoplasmático [Nakagawa T *et al.*, 2000], y se sugirió que podría jugar un rol central en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, pero un trabajo reciente de Fischer y col. concluye que no se encuentra la caspasa-12 funcional en humanos, por haber adquirido mutaciones deletéreas [Fischer H *et al.*, 2002].

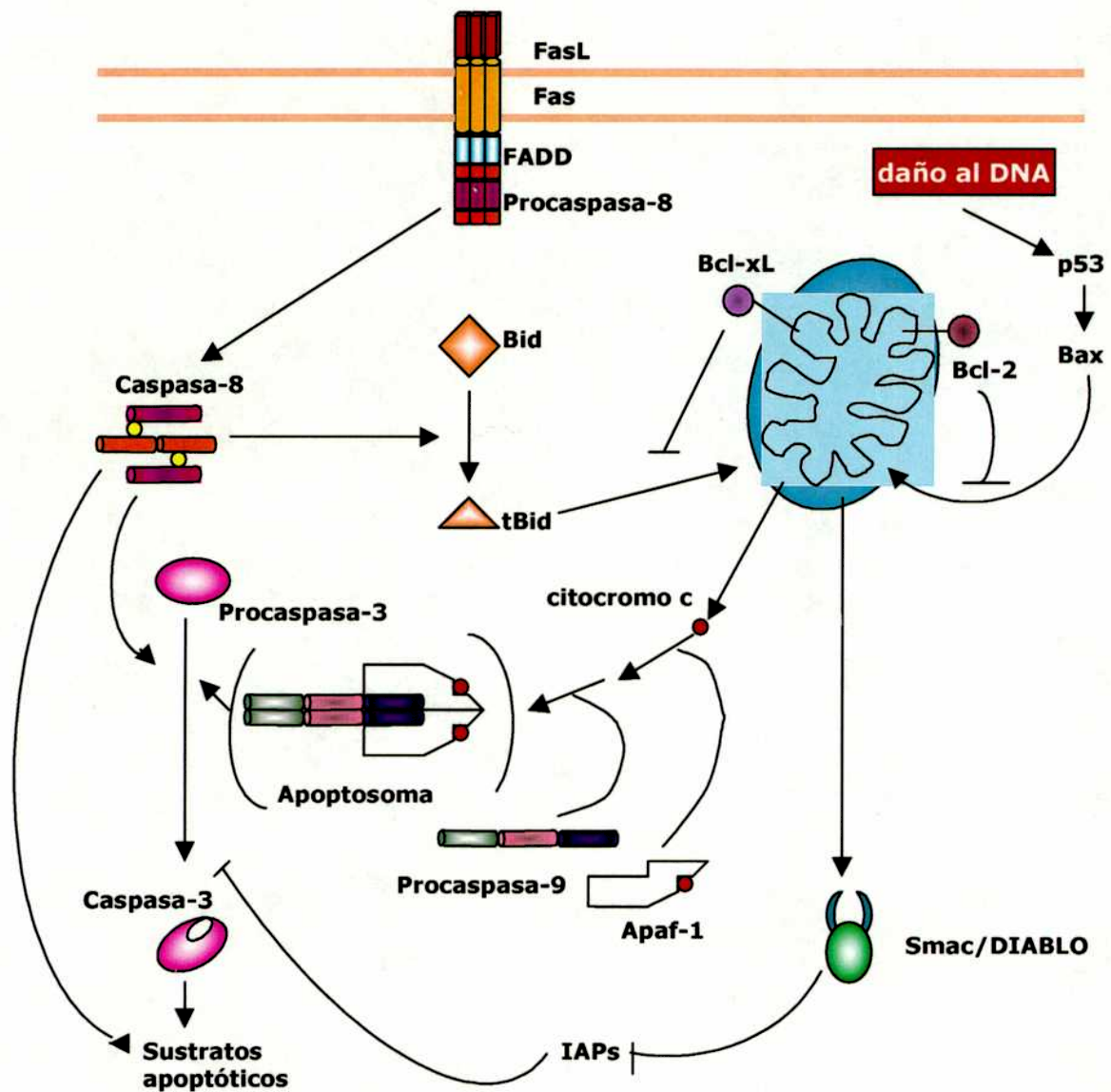


FIGURA 4: Las dos vías principales de activación de caspasas. La vía de los receptores de la muerte (DR) es gatillada por miembros de la familia de los DR (representados por Fas). La unión del ligando Fas induce la agrupación de los receptores y la formación de un complejo de señalización de inducción de muerte celular. Este complejo, vía las moléculas adaptadoras FADD, recluta múltiples moléculas de procaspasa-8, resultando en la activación de caspasa-8 por proximidad inducida. La vía mitocondrial es activada en general en respuesta a señales externas y a insultos internos como el daño al DNA. Los diversos caminos de respuesta convergen en la mitocondria, en general a través de la activación de un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 que conducen a la liberación de distintas moléculas de la mitocondria, principalmente del citocromo c. Los miembros pro- y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 se encuentran en la superficie de la mitocondria, donde compiten por regular la salida del citocromo c de la misma. Si prevalecen los miembros proapoptóticos, este es liberado y se asocia con moléculas de Apaf-1 y de Procaspasa-9 para formar el apoptosoma. Ambos caminos convergen a nivel de la activación de caspasa-3. Su activación y su actividad son antagonizadas por las proteínas IAP, las cuales a su vez son antagonizadas por la proteína Smac/DIABLO, liberada también de la mitocondria. La integración entre ambas vías ocurre a nivel de la proteína Bid cuya actividad proapoptótica aumenta al ser clivada por caspasa-8 y resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c.

VÍA DE LOS RECEPTORES DE LA MUERTE

La familia de los DRs incluye Fas/CD95, el receptor del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y dos receptores, DR4 y DR5, que unen al ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF- α (TRAIL: *TNF- α -related apoptosis-inducing ligand*) [Ashkenazi A y Dixit VM, 1999].

La característica común de estos receptores es la presencia del motivo citoplasmático conservado en estas proteínas de transmembrana que es llamado el "dominio de muerte" (DD: *death domain*), el cual es capaz de unir dominios homólogos a moléculas adaptadoras citoplasmáticas bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, la unión del dominio extracelular de Fas con el ligando de Fas lleva a la unión de la molécula adaptadora FADD (*Fas-associated protein with death domain*) a Fas a través de interacciones DD-DD [Strasser A *et al.*, 2000; Hengartner M, 2000; Ashkenazi A y Dixit VM, 1999]. FADD a su vez se une al prodominio de la procaspasa-8, esta vez a través de interacciones homotípicas que involucran los "dominios efectores de la muerte" (DED: *death effector domains*). De esta forma se reclutan varias moléculas de procaspasa-8, hecho que resulta en una alta concentración local del zimógeno. De acuerdo con el modelo de proximidad inducida, se propone que bajo estas condiciones, la baja actividad intrínseca de proteasa de la procaspasa-8 es suficiente para permitir a estas moléculas de proenzima clivarse mutuamente y activarse así unas a otras [Muzio M *et al.*, 1998].

Se piensa que otros DRs activan la caspasa-8 a través del mismo mecanismo de proximidad inducida [Ashkenazi A y Dixit VM, 1999]. Aunque esta acumulación forzada de zimógenos es suficiente en muchos casos para activar caspasas [Salvesen GS y Dixit VM, 1999], es una forma más bien primitiva de controlar el destino de una célula. Seguramente *in vivo* existen otros niveles de regulación para modular el proceso. Es posible que otros factores más allá de la concentración local (por ejemplo cambios conformacionales inducidos por la unión de FADD) también desempeñarían un papel en la activación de procaspasa-8 inducida por DRs bajo condiciones normales.

En algunos tipos celulares, la caspasa-8 directamente cliva y activa la procaspasa-3; en otros, cliva la proteína citoplasmática Bid, generando un fragmento

que activa la vía mitocondrial [Thornberry NA y Lazebnik Y, 1998], el otro camino que conduce a la activación de las caspasas.

VÍA MITOCONDRIAL Y REGULADORES APOPTÓTICOS DE LA FAMILIA

BCL-2

La mitocondria desempeña un papel crucial en la iniciación de la activación de caspasas en respuesta a diferentes señales apoptóticas [Green DR y Reed JC, 1998], incluyendo la activación por Bid truncada (t-Bid), y esta vía involucra la liberación de una serie de polipéptidos a partir de la mitocondria.

El citocromo *c*, una de estas proteínas que pertenece a la cadena de transporte de electrones, es uno de los componentes requeridos para la activación de caspasa-9 en el citosol [Li P *et al.*, 1997]. Su liberación al citosol se produce por la disrupción de la membrana mitocondrial externa por un estímulo apoptótico, y se une al Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas) citosólico, causando un cambio conformacional dependiente de ATP o dATP, que resulta en la oligomerización de Apaf-1. La unión de la procaspasa-9 a los oligómeros de Apaf-1, esta vez mediada por interacciones homotípicas entre los "dominios de reclutamiento de caspasas" (CARD: *caspase recruitment domains*), lleva a la formación de un complejo de alto peso molecular llamado apoptosoma [Kaufmann SH y Hengartner MO, 2001]. Esta interacción entre Apaf-1 y la procaspasa-9 aumenta significativamente la actividad enzimática de esta última, por un mecanismo aun desconocido. Se piensa que el complejo Apaf-1/procaspasa-9 representa en realidad la verdadera forma activa de la caspasa-9 [Rodríguez J y Lazebnik Y, 1999]. Así, Apaf-1 no debería ser visto como un simple activador de la caspasa-9, sino como una subunidad regulatoria de la holoenzima caspasa-9, es decir del apoptosoma, que contiene varias proteínas adicionales [Cain K *et al.*, 1999; Cain K *et al.*, 2000; Beere HM *et al.*, 2000]. La caspasa-9, a su vez, activa proteolíticamente la caspasa-3.

Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis, al mediar la liberación de citocromo *c*, también mediante interacciones proteicas. Esta familia, que comprende más de una docena de proteínas, ha sido dividida en tres grupos basándose en

similitudes estructurales y en un criterio funcional. Los miembros del grupo I, como Bcl-2 y Bcl-x_L, poseen una actividad antiapoptótica, mientras que los miembros de los grupos II y III (que incluyen Bax, Bid y Bik) promueven la muerte celular.

Muchos miembros de la familia son capaces de formar homodímeros, pero también heterodímeros [Reed JC, 1997; Adams JM y Cory S, 1998; Antonsson B y Martinou JC, 2000], por lo cual son posibles un gran número de combinaciones entre ellos. Como una primera aproximación se podría pensar que la heterodimerización podría resultar en la neutralización mutua de las proteínas pro- y antiapoptóticas unidas, pero la función clave de las proteínas de la familia Bcl-2 sería la regulación de la liberación de factores proapoptóticos, en particular del citocromo *c*, desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol [Adams JM y Cory S, 1998; Antonsson B y Martinou JC, 2000].

Los miembros proapoptóticos como Bax y Bak, que residen en el citoplasma, se translocarían hacia la membrana mitocondrial externa, donde sufrirían un cambio conformacional, formarían un oligómero y se insertarían en la membrana, facilitando la liberación del citocromo *c* [Nomura M *et al.*, 1999; Eskes R *et al.*, 2000; Wei MC *et al.*, 2000; Suzuki M *et al.*, 2000; Antonsson B *et al.*, 2001]. Por el contrario, los miembros antiapoptóticos podrían unirse selectivamente a Bax en la conformación activa, y prevendrían la inserción de Bax en la membrana externa de la mitocondria [Antonsson B *et al.*, 2001; Wei MC *et al.*, 2001]. Hasta el momento se desconocen aquellos eventos que conducen a la oligomerización y a la inserción de Bax y Bak en la membrana mitocondrial, del mismo modo aun no ha sido precisamente establecido el mecanismo por el cual la inserción de Bax, Bak o ambos, facilitan la liberación del citocromo *c*.

Además del citocromo *c*, otros polipéptidos también son liberados a partir de la mitocondria durante la apoptosis [Desagher S y Martinou JC, 2000], tres de los cuales jugarían roles importantes durante el proceso apoptótico:

- 1) el factor inductor de apoptosis (AIF), una oxidoreductasa mitocondrial involucrada en la muerte celular programada durante el desarrollo.
- 2) la endonucleasa G, implicada en la degradación apoptótica del DNA que es copurificada con una endonucleasa involucrada en la degradación del DNA independiente de la desoxirribonucleasa activada por caspasa (CAD), la

principal endonucleasa que media el clivaje internucleosomal del DNA en células de mamíferos.

3) el segundo activador mitocondrial de caspasas (SMAC), también llamado Diablo, que modula los eventos apoptóticos uniéndose e inactivando ciertas proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que son capaces de unirse e inactivar las caspasas 3, 7 y 9, neutralizando así la actividad antiapoptótica de las IAPs.

LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS

Existen varias razones por las cuales una célula podría activar el camino apoptótico [Hofmann K, 1999]. La apoptosis fisiológica ocurre durante el desarrollo embrionario en situaciones donde las células han cumplido su función y dejado de ser necesarias o donde las células han sido incapaces de realizar los contactos apropiados [Clarke PG, 1990; Rubin LL, 1997; Sanders EJ y Wride MA, 1995]. Una forma muy importante de apoptosis, que se ha estudiado exhaustivamente, ocurre durante el desarrollo del sistema inmune. La remoción de las células T autorreactivas o de timocitos con el rearreglo incompleto de los genes del receptor de las células T es llevado a cabo por la apoptosis de estas células [King LB y Ashwell JD, 1994].

La apoptosis constituye también un sistema de defensa contra el daño celular. Las células que contienen daños irreparables de su DNA sufren apoptosis [Bellamy CO, 1997]. Además, las células bajo un estrés oxidativo excesivo inician la apoptosis en lugar de morir por necrosis [Clutton S, 1997; Buttke TM y Sandstrom PA, 1994]. Otra grupo de situaciones que conducen a la apoptosis es la infección con virus, bacterias u hongos, previniendo así la diseminación del patógeno al detectar las células su propia infección y morir.

Así, podemos estudiar la apoptosis como una vía sujeta a la regulación por señales externas, por la competencia por factores de supervivencia, como así también por señales intracelulares que incluyen la regulación por diversos oncogenes y genes supresores de tumores.

a) SEÑALES EXTRACELULARES

La unión específica ligando-receptor puede transducir tanto señales de muerte como de supervivencia celular. Los llamados factores de supervivencia no son necesariamente mitógenos, y no siempre actúan como tales. La superfamilia del receptor TNF incluye varios miembros que participan de la regulación positiva o negativa de la muerte celular; así, la activación del receptor no necesariamente determina el destino celular y la señal del contexto es crítica [Bellamy CO *et al.*, 1995]. Por ejemplo, la estimulación por Fas, induce la muerte de las células T crónicamente activadas pero no de las que lo han sido recientemente, lo cual se ha postulado como un mecanismo limitante de la extensión de la respuesta inmune normal [Krammer PH *et al.*, 1994]. Por otro lado, algunos agentes tienen efectos duales sobre la misma población celular, por ejemplo TGF β 1 es una citoquina que inhibe la síntesis de DNA y también estimula la apoptosis de células de hígado y endometrio [Oberhammer F *et al.*, 1991; Moulton BC, 1994].

En una población de células en crecimiento, la selección competitiva por factores de supervivencia es otra estrategia que asegura que sólo sobrevivirán las células mejor preparadas, el resto sufrirá apoptosis. Es un método clave en la regulación del tamaño de la población. Un tejido con renovación constante como el epitelio intestinal o la médula ósea, está constituido por células precursoras, una progenie celular en tránsito (que puede o no dividirse unas pocas veces) y células diferenciadas (post-mitóticas). Normalmente hay una sobreproducción de las células en tránsito de las cuales sólo va a sobrevivir una fracción para madurar, mediante la acción de factores de rescate específicos, por ejemplo, IL-1 α e IL-6 para células progenitoras mieloides. Así, la concentración de estos factores de rescate es limitante y determinante del tamaño final de la población. La regresión del parénquima mamario después de la lactancia, de la próstata después de la castración y la atrofia de la tiroides o las glándulas adrenales después de una hipofisectomía, eventos caracterizados por una apoptosis aumentada, son ejemplos del requerimiento de factores de supervivencia para células maduras [Bellamy CO *et al.*, 1995].

Además de las interacciones con factores solubles o intercelulares, las interacciones de la célula con la matriz extracelular también regulan la apoptosis. En células endoteliales y epiteliales, el contacto específico de receptores de integrinas de la superficie con moléculas de la matriz extracelular, constituye una importante señal de supervivencia [Meredith JE *et al.*, 1993; Frisch SM y Francis H, 1994]. Sin esta unión integrina-matriz estas células sufren apoptosis, un fenómeno que ha sido denominado "anoikis" [Frisch SM y Francis H, 1994].

b) REGULACIÓN GENÉTICA

Los factores de transcripción que desempeñan roles importantes en el desarrollo, y en la proliferación y diferenciación celular, parecen estar implicados también en la regulación del proceso de apoptosis, por ejemplo AP-1, NF- κ B y c-Myc [Kazanietz MG, 2000].

La familia de factores de transcripción AP-1 (*Activating protein -1*) está constituida por homo y heterodímeros de las proteínas nucleares Fos y Jun y las proteínas con cierre de leucina ATF (ATF-2, ATF-3, B-ATF), y su principal nivel de control es ejercido sobre la transcripción de los genes de estas proteínas. Hay discrepancias con respecto a la implicación de AP-1 en apoptosis, un gran número de trabajos la asocian con su inducción pero también hay evidencias que sugieren que, en algunos casos, no es requerida para el proceso. La participación de los factores de transcripción AP-1 en la apoptosis estaría relacionada con la dependencia o no de una nueva síntesis de macromoléculas. Así, la misma ocurriría en los procesos de apoptosis que requieren síntesis proteica *de novo*, como el inducido en células PC12 por privación de NGF, y, por el contrario, no estarían involucrados en procesos apoptóticos independientes de la nueva síntesis proteica, como el inducido en linfocitos T por Fas y TNF- α . Dado que AP-1 regula la expresión de varios genes, su participación dependería de cuáles de estos ejercen una actividad promotora o protectora de la apoptosis.

Esta dualidad de efectos también es observada para el factor de transcripción NF- κ B, cuyo efecto pro o antiapoptótico depende en última instancia del tipo celular y del estímulo inductor, y para c-Myc, que conduciría a procesos de

proliferación o apoptosis celular dependiendo de la presencia o ausencia de señales apropiadas para la supervivencia. Esta actividad inductora de apoptosis de c-Myc es, en cierto modo, paradójica, dado que es considerado como un protooncogen y su actividad se encuentra aumentada en una amplia variedad de tumores. En algunos casos la sobreexpresión de c-myc conduce un incremento de la apoptosis.

c) SEÑALES INTRACELULARES

Una situación similar a la de c-Myc es planteada con el protooncogén Ras, cuyas mutaciones están involucradas en la formación de una serie de neoplasias humanas, tanto por promover la proliferación como por inhibir la apoptosis. Sin embargo, se ha encontrado que la señalización mediada por Ras puede conducir a los procesos inversos, es decir, a inhibir la proliferación e inducir apoptosis. El resultado final dependería de la vía de señalización que es regulada por Ras, del tipo celular, del estímulo, y de la presencia o ausencia de otras influencias reguladoras [Kazanietz MG, 2000].

En situaciones de estrés ambiental, como radiación ionizante o estrés oxidativo, se podría inducir la apoptosis por la vía de la esfingomielina, un fosfolípido de membrana. Un producto de su catabolismo, la ceramida, actúa como segundo mensajero en una amplia gama de funciones celulares, y sería el iniciador de la apoptosis.

La familia de las PKC también exhiben un comportamiento dual, ya que pueden actuar como inductoras y como protectoras de la vía apoptótica, posiblemente esto podría ser explicado por la existencia de varias isoformas de la enzima con diferente distribución tisular, e incluso, diferente localización subcelular.

La fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) participa también en la transmisión de señales en el proceso de apoptosis celular, probablemente mediante la fosforilación de reguladores apoptóticos de la familia Bcl-2, en última instancia previniendo la activación de las caspasas. En la ataxia telangiectasia, caracterizadas por alteraciones en el programa de muerte celular, se han identificado mutaciones en un gen con regiones homólogas a PI3K.

La familia de las Abl tirosina quinasas también serían capaces de bloquear la apoptosis, pero por un mecanismo aún no establecido que involucraría también los miembros de la familia Bcl-2 [Green DR *et al.*, 1996].

APOPTOSIS Y TUMORIGÉNESIS

La evasión de la apoptosis es una de las capacidades fundamentales que posee una célula tumoral. La muerte celular podría verse como un proceso que ocurre inevitablemente si la célula no recibe señales de supervivencia. Este proceso es comprometido por ejemplo cuando las células están sometidas a un daño macromolecular como el daño al DNA, lo cual podría iniciar la carcinogénesis. Además, la apoptosis es iniciada por el desequilibrio en los mecanismos homeostáticos que regulan el crecimiento y la diferenciación, como podría ser la expresión aberrante de protooncogenes.

El significado de la apoptosis en el proceso de oncogénesis es resaltado por, al menos, tres importantes observaciones. La primera es que la mayoría de los agentes con actividad antitumoral actúan induciendo apoptosis. La segunda es que la frecuencia de las células apoptóticas en un tumor correlaciona muy bien con su progreso, a la inversa de lo que ocurre con la necrosis. Los tumores con menores índices apoptóticos tienden a ser más agresivos que los que muestran mayor incidencia de muerte celular apoptótica, y la apoptosis es así un factor clave en la tasa de crecimiento de un tumor [Arends MJ *et al.*, 1994]. La tercera observación es que han sido encontrados varios oncogenes, como hemos mencionado, que regulan el proceso de apoptosis [Green DR *et al.*, 1996]. Por estos motivos, el estudio de la apoptosis puede verse como una vía posible del entendimiento de la oncogénesis.

La atenuación de la apoptosis permite que pueda tener lugar la tumorigénesis. Diversos estudios *in vitro* de modelos de transformación maligna sostienen la noción de que habría una presión selectiva para evadir la apoptosis. Por ejemplo, para escapar de la senescencia replicativa en cultivo, las células epiteliales que sobreviven a la apoptosis que sufre la mayoría de la población durante la crisis, deben haber podido ser capaces de adecuar su inestabilidad genómica para evitar, precisamente, la muerte

apoptótica [Romanov SR *et al.*, 2001]. Las células tumorales también sufren una situación de estrés durante su escape metastásico, una característica clave de la tumorigénesis. La habilidad de sobrevivir al pasaje a un ambiente celular extraño y mantener la capacidad de crecimiento, también requiere que la apoptosis sea atenuada [Wong CW *et al.*, 2001].

Esta atenuación de la apoptosis para permitir la tumorigénesis puede ocurrir de varias formas [Hickman JA, 2002]. Una primera posibilidad podría consistir en una mutación temprana que incapacite una parte vital del sistema de detección de daños, así la señal proveniente del "sensor" podría estar disminuida o directamente ausente. Cualquier pérdida de los sistemas de reparación de daños en el DNA atenúan la señalización hacia la maquinaria apoptótica, porque están íntimamente involucrados con la misma [Fishel R, 1999]. Aún se desconoce cómo se integran estas señales que emergen de distintos tipos de daño genómico y sus respectivos sistemas de reparación, una posibilidad es que lo hagan a nivel del locus de la familia de proteínas Bcl-2 [Hickman JA, 2002].

Los potenciales mecanismos para incrementar la supervivencia ante un desafío tumorigénico implica que habría una perturbación inicial en la célula que eleva su umbral de sobrevivencia por sobre los normales que le permite sostener un daño o perturbación posterior. Este umbral dependería del tipo celular y cuanto más bajo sea más protegerá a la célula contra la carcinogénesis, porque la célula iniciaría más rápidamente el proceso apoptótico. Esta idea de jerarquía de supervivencia tendría su contraparte en que existe también una jerarquía de eventos oncogénicos que pueden promover la carcinogénesis. Esto no sólo tiene importancia para el entendimiento de la iniciación y progresión tumoral, sino también para el desarrollo de tratamientos en los cuales se podría dirigir drogas hacia un blanco específico dentro de esta compleja patología, lo cual podría resultar en un efecto terapéutico positivo [Hickman JA, 2002].

Dos de los blancos más frecuentes de mutaciones de genes supresores de tumores en la mayoría de los tumores humanos son *TP53* y *RB1*. El producto del gen *TP53*, p53, protege a la célula contra la inestabilidad genómica y la expresión de oncogenes mediante la inducción del arresto del ciclo celular y la apoptosis. Por el contrario, la proteína de retinoblastoma (pRb), regula la apoptosis durante el desarrollo y su pérdida resulta en el crecimiento desregulado y la apoptosis, precisamente, los tumores deben suprimir la apoptosis para desarrollarse.

Los niveles de p53 normalmente son bajos debido a la vida media corta de la proteína, sin embargo, señales extra e intracelulares de estrés pueden inducir la estabilización y activación de p53, mediante diferentes mecanismos que, precisamente, dependen de la señal [Hickman ES *et al.*, 2002]. p53 también puede ser estabilizado y activado por aberraciones internas tales como la desregulación de oncogenes celulares. La sobreexpresión de algunos oncogenes induce la expresión de p14/19^{ARF}, el cual bloquea la degradación de p53 mediante la inactivación de MDM2, como hemos mencionado en un capítulo anterior. Una vez activada p53 es capaz de inducir tanto el arresto del ciclo celular como apoptosis; el resultado exacto de tal inducción dependerá tanto del tipo celular como de la fuerza del estímulo. Las células que sobreexpresan oncogenes o que han perdido las vías de supresores de tumores, frecuentemente expresan niveles elevados de p53 y están incapacitadas para establecer el arresto del ciclo celular. En consecuencia, las células tumorales generalmente son mucho más sensibles, que sus equivalentes primarias, a los agentes que dañan el DNA, un principio básico en el desarrollo de la quimioterapia convencional.

Las características de la inducción de la apoptosis mediada por p53 no están completamente determinadas hasta el momento. La función más estudiada de la proteína es como factor de transcripción, mediante la transactivación o la transrepresión de sus genes blanco, y muchos de estos genes participan en caminos apoptóticos, por ejemplo miembros de las familias Bcl-2 y el receptor de TNF. [Miyashita T *et al.*, 1994; Miyashita T y Reed JC, 1995; Owen-Schaub LB *et al.*, 1995].

Por otro lado, pRb participa de un camino que también está desregulado en la mayoría de los cánceres humanos [Weinberg RA, 1995; Lipinski MM y Jacks T, 1999]. Esta vía incluye tanto los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) de la familia de proteínas INK4 -que son reguladores negativos de la proliferación celular- y las ciclinas de tipo D -que son reguladoras positivas- y que forman complejos de quinasas activos con CDK4 o CDK6. Las CDKs fosforilan pRb y anulan su actividad. La actividad de las CDKs y, por ende, de pRb, está regulada por factores mitogénicos y antimitogénicos externos. Frecuentemente, la inactivación de la vía de pRb es un paso obligatorio en el cáncer que produce células insensibles a señales antimitogénicas externas [Hanahan D y Weinberg RA, 2000].

Dado que pRb está activada en la salida del ciclo celular durante la diferenciación, se piensa que la función de pRb es proteger de la apoptosis a las células en proceso de diferenciación. Los mecanismos por los cuales pRb regula la apoptosis, están todavía bajo una intensa investigación. En función de la fuerte correlación encontrada entre la pérdida de pRb y la carencia de p53 funcional en los tumores humanos [Weinberg RA, 1995] y también considerando que varios virus oncogénicos – como el virus de papiloma humano- codifican proteínas que inactivan a pRb y a p53, ha sido sugerido que la pérdida de pRb resulta en una apoptosis dependiente de p53 [Hickman ES *et al.*, 2002]. Los mecanismos moleculares de la inducción de apoptosis por pRb también involucran los blancos más conocidos de la actividad de pRb: los factores de transcripción E2F1 [Dyson N, 1998]. Muchos de los potenciales genes blanco de E2F pueden estar involucrados en la apoptosis mediada por E2F [Zindy F *et al.*, 1998], particularmente, *Apaf1* es un blanco directo de E2F [Soengas MS *et al.*, 2001; Zindy F *et al.*, 1998].

La pérdida de pRb resulta en la apoptosis de células normales, y un mecanismo que suprima la apoptosis podría proveer una oportunidad de sobrevivir a las células deficientes en pRb. En esta perspectiva, es claro por qué existe una presión selectiva para inactivar genes que median la apoptosis y en este sentido, esto también explicaría por qué un 50% de los tumores humanos no expresan una p53 funcional.

Hasta el momento no se han podido determinar completamente las alteraciones que permiten la supervivencia celular en una fracción relativamente alta de cánceres humanos. Estas alteraciones podrían incluir una expresión aumentada de señales de supervivencia (por ejemplo en la forma de factores de crecimiento), o alteraciones genéticas en genes que son activados por p53 o E2F, o en componentes que son centrales en la ejecución de la apoptosis.

Por todo lo dicho, la inducción de la apoptosis debería ser un objetivo fundamental en la búsqueda y el desarrollo de nuevas terapias antitumorales. Además, dado que dentro de las células se están llevando a cabo actividades antiapoptóticas, es necesario también intentar abolir esos efectos para facilitar la acción de los agentes proapoptóticos que están corrientemente en uso o en desarrollo. Entonces, la combinación de agentes que bloqueen estos efectos antiapoptóticos combinados con agentes específicos que sean capaces de inducir apoptosis, podrían constituir una

nueva generación de terapias antitumorales más dirigidas, y por lo tanto, con efectos colaterales más controlados.

CAPÍTULO III

DINÁMICA TELOMÉRICA

Los mecanismos moleculares que definen la vida media replicativa de los fibroblastos humanos normales estarían controlados principalmente por un complejo proceso que es el acortamiento telomérico.

Los extremos de los cromosomas eucarióticos poseen propiedades especiales comparados con los extremos creados por una ruptura al azar. Hace más de 60 años que Muller y McClintock establecieron que los extremos de los cromosomas eucarióticos están compuestos por una estructura distinta [Muller HJ, 1938; McClintock B, 1941]. Usando rayos X para generar rearrreglos cromosómicos en *Drosophila*, Muller no pudo recuperar los cromosomas que estaban delecionados en un extremo, a diferencia de los que portaban deleciones internas o translocaciones. Supuso así que el extremo debía constituir una estructura especial necesaria para la integridad del cromosoma y lo llamó "telómero". Pocos años después, McClintock demostraba en maíz que los cromosomas rotos se podían fusionar entre sí para formar un cromosoma dicéntrico el cual era altamente inestable por rupturas frecuentes en la mitosis, resultando en la pérdida de parte del cromosoma. A partir de estos experimentos concluyó que una función esencial de los telómeros era proteger a los cromosomas de fusiones entre los extremos.

Décadas más tarde, diversas técnicas moleculares revelaron, en protozoos ciliados primero y en numerosos eucariotas más tarde, que el verdadero extremo de los cromosomas consistía en repeticiones ricas en guanina [Blackburn EH y Gall JG, 1978]. Este descubrimiento brindó el primer punto de entrada molecular en el estudio de los telómeros.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN TELOMÉRICA

El término telómero hace referencia al gran complejo nucleoproteico que se encuentra en el extremo de los cromosomas, cuya estructura difiere del resto de la cromatina [Blackburn EH, 1994; Zakian VA, 1995]. Los telómeros funcionales son estructuras estables que no están sujetas a degradación, recombinación o fusiones con otros extremos cromosómicos. Además, no son detectados por los sistemas de

reconocimiento de daño del DNA, pese a que, formalmente, un extremo cromosómico constituye un corte de la doble cadena del DNA [Sandell LL y Zakian VA, 1993]. Estas propiedades de los telómeros eucarióticos son identificadas usualmente como la función de "capping" del cromosoma de los telómeros [Blackburn EH, 1994; Zakian VA, 1995; Greider CW, 1996].

El DNA telomérico de virtualmente todos los organismos eucariotas consiste en secuencias cortas, repetidas en tándem [Greider CW y Blackburn EH, 1985]. La secuencia primaria y la organización de estas repeticiones en muchas especies están claramente relacionadas ya que las repeticiones usualmente contienen agrupaciones de tres o más residuos G y la hebra que las contiene (llamada la hebra rica en G) siempre constituye el extremo 3' del cromosoma [Greider CW y Blackburn EH, 1985].

El número de repeticiones en los extremos de los cromosomas varía ampliamente entre diferentes organismos y también entre telómeros distintos del mismo organismo. Para todos los vertebrados, incluyendo los humanos, la repetición es $d(\text{TTAGGG})_n$ [Moyzis RK *et al.*, 1988; Meyne J *et al.*, 1989]. Los telómeros individuales pueden contener unas pocas Kb, como en algunas líneas celulares transformadas, o hasta más de 100 Kb, como en algunas células de ratón, de las repeticiones en la forma de doble cadena. La mayoría de este DNA está organizado en nucleosomas y sólo la porción más distal podría encontrarse en una conformación especial como cromatina no-nucleosómica que podría ser análoga a la estructura especial encontrada en los telómeros de levaduras o *Tetrahymena* [Blackburn EH y Chiou SS, 1981; Wright WE y Shay JW, 1992; Tommerup H *et al.*, 1994; Lejnine S *et al.*, 1995].

La hebra rica en G del DNA telomérico siempre está orientada 5'-3' hacia la porción terminal del cromosoma y tiene un extremo protuyente de unos 200 nucleótidos [McElligott R y Wellinger RJ, 1997; Wright WE *et al.*, 1997] como consecuencia del problema de la replicación terminal.

PROTEÍNAS DE UNIÓN A TELÓMEROS

La FIGURA 5 muestra diferentes proteínas teloméricas en el telómero de mamíferos. En células humanas, las proteínas de unión al DNA telomérico conocidas son TRF1 y TRF2 (*TTAGGG repeat factors 1 y 2*). La primera identificada fue TRF1 [Chong L *et al.*, 1995]. La secuencias C-terminal de los mismos, llamadas "teloboxes", reconocen específicamente un fragmento de DNA telomérico pero requieren de una dimerización por el dominio N-terminal para unirse firmemente al DNA [Bilaud T *et al.*, 1996; Bianchi A *et al.*, 1999; Vassetzky NS *et al.*, 1999].

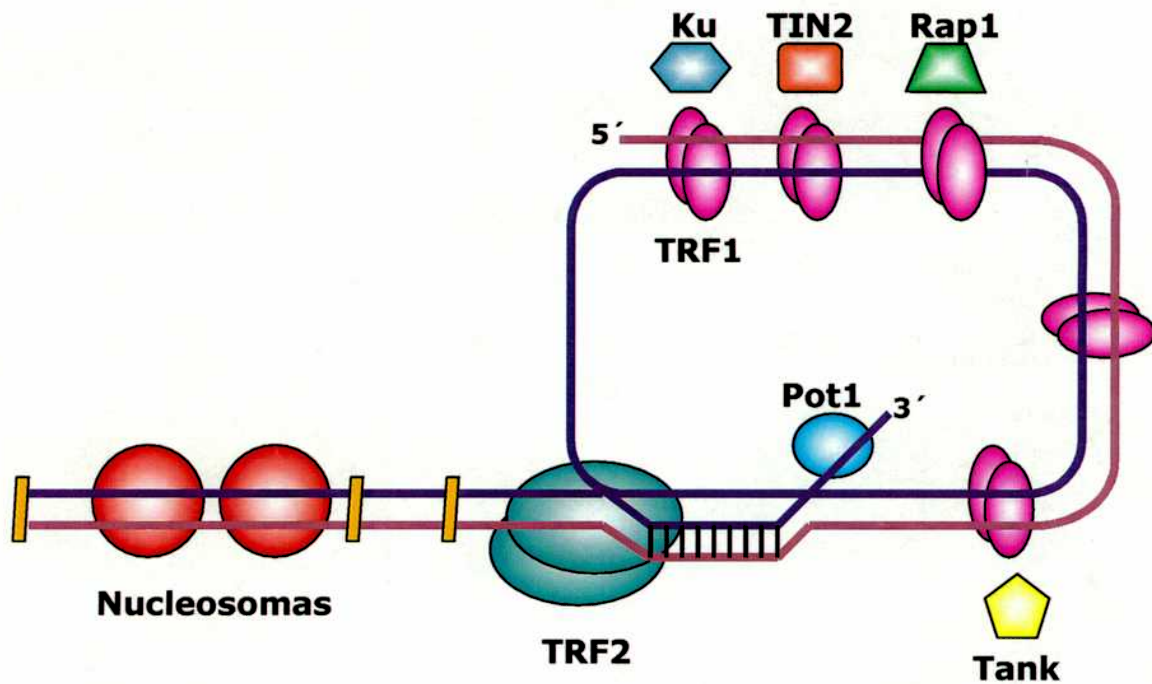


FIGURA 5: Esquema de la estructura del T-loop y proteínas asociadas en el telómero de mamíferos. En este el *T-loop* es estabilizado por las proteínas de unión al telómero TRF1 y TRF2. Esta conformación del telómero ("cerrado") protege la hebra G de la actividad de la telomerasa y de otras actividades celulares como la degradación por nucleasas y la recombinación. La pérdida de las repeticiones teloméricas hasta una longitud crítica o la pérdida de estas proteínas de unión al telómero podrían resultar en una conformación "abierto" del telómero, el cual a su vez podría exponer la hebra G quedando accesible a la telomerasa o a otras actividades celulares. TRF1 y 2: factores de unión a las repeticiones teloméricas 1 y 2; Pot1: protección de los telómeros; TIN2: proteína nuclear que interactúa con TRF1; Tank: tanquirasa.

TRF1 es un regulador negativo de la longitud telomérica y su función está regulada por TIN2 (*TRF1-interacting nuclear protein 2*) [Kim SH *et al.*, 1999], y por dos proteínas altamente homólogas entre sí, TANK1 (también conocida como

tanquirasa) y TANK2 [Smith S *et al.*, 1998; Kaminker PG *et al.*, 2001]. Se piensa que TIN2 aumenta el apareamiento de las repeticiones teloméricas dependiente de TRF1. Además TIN2 es un regulador negativo de la longitud telomérica [Kim SH *et al.*, 1999].

TANK1 y TANK2 poseen un dominio catalítico homólogo al de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP1), una enzima nuclear que es activada por extremos rotos de DNA y cataliza la adición de residuos de poli(ADP-ribosa) a una serie de proteínas nucleares y tiene un rol en la reparación por escisión de bases [Goytisolo FA y Blasco MA, 2002]. TANK1 inactiva TRF1 por poli(ADP-ribosil)ación [Smith S *et al.*, 1998], y causa elongación telomérica al ser sobreexpresada [Smith S and de Lange T, 2000]. TANK2, por el contrario, al ser sobreexpresada lleva rápidamente a la muerte celular por necrosis [Kaminker PG *et al.*, 2001].

Otra proteína de unión a la repetición TTAGGG es TRF2 [Bilaud T *et al.*, 1997; Broccoli D *et al.*, 1997], también un regulador negativo de la longitud telomérica [Smogorzewska A *et al.*, 2000]. Además TRF2 tiene funciones únicas en el telómero como estabilizar la hebra G protuyente, y prevenir fusiones teloméricas [van Steensel B *et al.*, 1998]. La sobreexpresión de una mutante negativa dominante de TRF2 causa senescencia prematura [van Steensel B *et al.*, 1998], y la activación de la cascada apoptótica mediada por ATM y p53 [Karlseder J *et al.*, 1999]. Ambos, TRF1 y TRF2, son encontradas en la estructura de *capping* telomérico y sus efectos sobre la longitud telomérica y la protección terminal podrían estar mediados por esta propiedad [Griffith JD *et al.*, 1999].

TRF2 recluta en los telómeros humanos la proteína hRAP1 (homóloga a la RAP1 de levaduras) cuya sobreexpresión causa elongación telomérica [Li B *et al.*, 2000]. TRF2 también recluta el complejo MRE11 en los telómeros humanos [Zhu XD *et al.*, 2000], este complejo está compuesto por RAD50, MRE11 y NSB1 y constituye un componente clave en las vías de recombinación homóloga y no homóloga de unión de los extremos.

Por otro lado, Ku es una proteína heterodimérica en la unión no homóloga de extremos de DNA y en células humanas, Ku70 y Ku86, junto con DNA-PKcs, forman una enzima llamada protein-quinasa dependiente de DNA (DNA-PK) la cual está involucrada en la reparación de DNA doble cadena por mecanismos de recombinación no homóloga de unión de los extremos [Smith GC y Jackson SP, 1999]. En las

levaduras, yKu se une al DNA telomérico e interviene directamente en el silenciamiento telomérico [Mishra K y Shore D, 1999]. En mamíferos, Ku86 también cumple un rol fundamental en el telómero previniendo las fusiones teloméricas [Samper *et al.*, 2000]. Las proteínas Ku también interactúan con las repeticiones TTAGGG [Bianchi A y de Lange T, 1999; Hsu HL *et al.*, 1999] y con las proteínas teloméricas TRF1 y TRF2 [Hsu HL *et al.*, 2000; Song K *et al.*, 2000]. El estudio de ratones deficientes en las proteínas Ku86 y DNA-PKcs indican que las mismas desempeñan roles esenciales en el telómero de mamíferos [Bailey SM *et al.*, 1999, Samper E *et al.*, 2000; Hsu HL *et al.*, 2000; Goytisolo FA *et al.*, 2001]. Las proteínas Ku desempeñan así un papel relevante al unirse al DNA telomérico como también al molde de RNA telomérico y proteínas esenciales.

La TABLA 1 resume el efecto neto sobre la longitud telomérica de las principales proteínas que interactúan con los telómeros en mamíferos.

TABLA 1. Proteínas de unión al telómero. Efectos de su expresión sobre la longitud telomérica en mamíferos (Para mayor detalle, ver el texto).

Proteínas de unión al telómero y tipo de regulación de la longitud telomérica		Cita
REGULACIÓN NEGATIVA	TRF1	van Steensel B y de Lange T, 1997
	TRF2	Smogorzewska A <i>et al.</i> , 2000
	TIN2	Kim SH <i>et al.</i> , 1999
	Ku	Espejel S <i>et al.</i> , 2002
REGULACIÓN POSITIVA	TANK1	Smith S y de Lange T, 2000
	TANK2	Kaminker PG <i>et al.</i> , 2001

MECANISMOS DE ELONGACIÓN TELOMÉRICA EN MAMÍFEROS

Una función fundamental de los telómeros es actuar como una especie de *buffer* para soportar la erosión de los extremos del DNA cromosómico debido al mencionado

problema de la replicación terminal. Las polimerasas de DNA convencionales son unidireccionales y no pueden copiar todas las bases en el extremo 3' de un dúplex lineal después de la remoción del *primer*. El resultado es que con cada ciclo de replicación, no puede ser sintetizado completamente un extremo dado del cromosoma y éste se pierde, y así el material genético que contenía. Si los organismos no pudieran resolver este problema replicativo no podrían pasar su carga genética completa de generación en generación. Como consecuencia, todas las especies deben poseer, al menos a nivel de las células germinales, un mecanismo que prevenga la mencionada replicación incompleta de sus genomas.

Si bien diversos organismos han adquirido evolutivamente distintos métodos para prevenir la pérdida de DNA de los extremos de sus cromosomas, la mayoría de los mamíferos utiliza la telomerasa, una retrotranscriptasa especializada que sintetiza los telómeros *de novo*, y que será descrita en mayor detalle en el Capítulo 4.

Las líneas celulares humanas que carecen de actividad de telomerasa, son capaces de mantener o elongar sus telómeros por mecanismos alternativos, los cuales han sido llamados ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*) [Bryan TM *et al.*, 1995; 1997]. En células de mamíferos que exhiben ALT, las secuencias de DNA son copiadas de un telómero a otro sugiriendo que ALT involucraría procesos de recombinación homóloga [Dunham MA *et al.*, 2000].

En *Saccharomyces cerevisiae*, existen dos vías de recombinación homóloga involucradas en ALT, las cuales dependen de RAD50 o RAD51 [Lundblad V y Blackburn EH, 1993; Le S *et al.*, 1999; Chen Q *et al.*, 2001]. Además, las helicasas RecQ (WRN y BLM en mamíferos) son requeridas para ALT en levaduras [Cohen H y Sinclair DA, 2001; Huang P *et al.*, 2001; Johnson FB *et al.*, 2001]. Los mecanismos ALT también pueden ser aumentados mediante la eliminación de las vías de reparación de *mismatch* (MMR) en levaduras, y la maquinaria de MMR inhibe la recombinación homóloga [Rizki A y Lundblad V, 2001].

Es de esperar que en los próximos años se determinen los roles de las proteínas involucradas en los procesos de recombinación homóloga y MMR en los mecanismos ALT que ocurren en mamíferos, por ejemplo estudiando diversos modelos murinos para estas proteínas.

TELÓMEROS EN INMORTALIZACIÓN CELULAR

Sobre la base de experimentos iniciales que demostraron que, en ausencia de telomerasa, los telómeros se acortan en los fibroblastos a medida que aumenta el número de divisiones en cultivo, se sugirió que la pérdida de los telómeros podría explicar la senescencia celular luego de un número determinado de duplicaciones *in vitro* [Harley CB *et al.*, 1990; Hastie ND *et al.*, 1990; Hayflick L, 1965].

En efecto, estudios con fibroblastos cultivados han indicado que la longitud telomérica sería mejor que la edad real del dador para predecir la capacidad replicativa de las células [Allsopp RC *et al.*, 1992]. Se ha propuesto que la pérdida de repeticiones teloméricas, cuando se alcanza una longitud telomérica crítica, induce una señal de daño al DNA que resulta en la salida del ciclo celular y la senescencia replicativa [Campisi J, 1997]. Según este modelo, los telómeros actúan como un reloj mitótico que determina la vida replicativa de una célula [Vaziri H *et al.*, 1994; Campisi J, 1997]. El uso de la longitud telomérica como un marcador de la historia replicativa de las células ha sido también ilustrado por Chang y Harley quienes demostraron que la longitud telomérica decrece en función de los PD en cultivos de células endoteliales [Chang E y Harley CB, 1995]. Finalmente, Bodnar *et al.* brindaron las pruebas más definitivas mostrando que la reintroducción del componente catalítico de la telomerasa en fibroblastos primarios humanos y en células endoteliales que carecían de actividad de telomerasa elongaba las repeticiones teloméricas en estas células resultando en un significativo incremento de la vida replicativa [Bodnar AG *et al.*, 1998].

La "hipótesis telomérica de envejecimiento celular e immortalización" describe la potencial relación entre la dinámica telomérica y la immortalización [Harley CB *et al.*, 1992]: la telomerasa es expresada en las células de la línea germinal las cuales tienen telómeros largos (~10 Kb) [Hastie ND *et al.*, 1990]. En células somáticas normales, la telomerasa está reprimida y los telómeros se acortan hasta una longitud crítica en la cual las células dejan de dividirse [Harley CB *et al.*, 1990; Allsopp RC y Harley CB, 1995] (FIGURA 6).

La detención del ciclo celular que es impuesta en estas células es mantenida por señales que activan las vías de los genes supresores de tumores p53 y Rb. Este límite de Hayflick (estadio de mortalidad M1) puede ser salteado por la transformación con

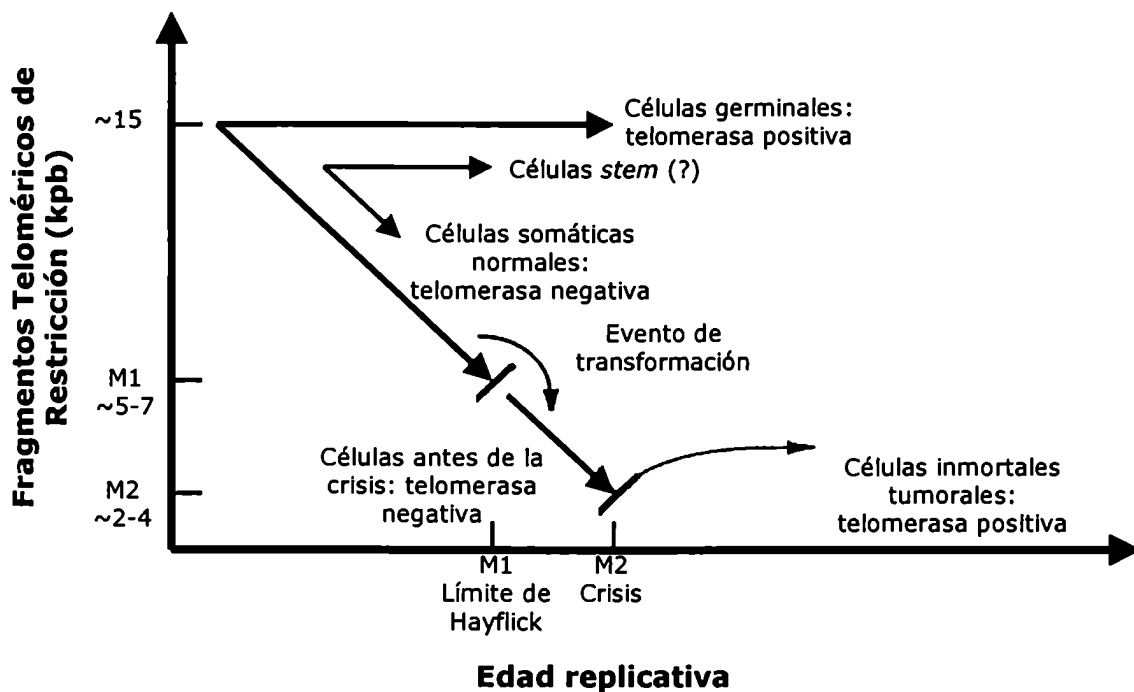


FIGURA 6: La hipótesis telomérica del envejecimiento celular y la inmortalización. La telomerasa es activa en las células germinales, manteniendo la longitud telomérica estable, pero está reprimida en la mayoría de las células somáticas normales, resultando en la pérdida telomérica en las células en división. La actividad de telomerasa y la longitud telomérica aun no han sido precisamente caracterizadas durante el desarrollo embrionario y células precursoras somáticas. En el estadio de Mortalidad 1 (M1 o límite de Hayflick) se llega a una longitud telomérica crítica en uno o unos pocos cromosomas que producen un arresto irreversible del ciclo celular. Los eventos de transformación pueden permitir a las células somáticas sobrepasar M1 sin activar telomerasa. Cuando los telómeros se vuelven críticamente cortos en un gran número de cromosomas, las células sufren una crisis (M2). Raros clones que activan telomerasa escapan de M2, estabilizan los cromosomas y adquieren una capacidad de crecimiento indefinida.

agentes virales como SV40 o el antígeno T que inactivan p53 o Rb y permiten a las células sufrir otros PD adicionales. Estas células aun no se pueden dividir indefinidamente y no son consideradas inmortales. Esta proliferación es acompañada por una posterior erosión telomérica, hasta que las células alcanzan un segundo estadio de mortalidad (M2), en el cual los telómeros son críticamente cortos (~3 Kb) [Counter CM *et al.*, 1994b]. En este estadio de crisis, las células pueden continuar proliferando pero muestran altas tasas de apoptosis -gatillada por importantes anomalías cromosómicas- de forma tal que no hay un incremento neto en el número celular. La progresión más allá de este punto es un evento muy raro que

requiere la alteración por mutación de oncogenes adicionales y genes supresores de tumores. Sin embargo, las células que logran sobrepasar M2, correlacionan fuertemente con la reactivación de la actividad de telomerasa, la estabilización de los telómeros y la adquisición de un fenotipo inmortal [Counter CM *et al.*, 1994].

En general ha sido aceptado que el acortamiento telomérico es responsable de limitar la vida media de los fibroblastos humanos normales, como también que la expresión de la telomerasa en estas células es suficiente para sobrepasar tanto la senescencia replicativa como la crisis y conferirles inmortalidad [Bodnar AG *et al.*, 1998; Vaziri H y Benchimol S, 1998] (FIGURA 7).

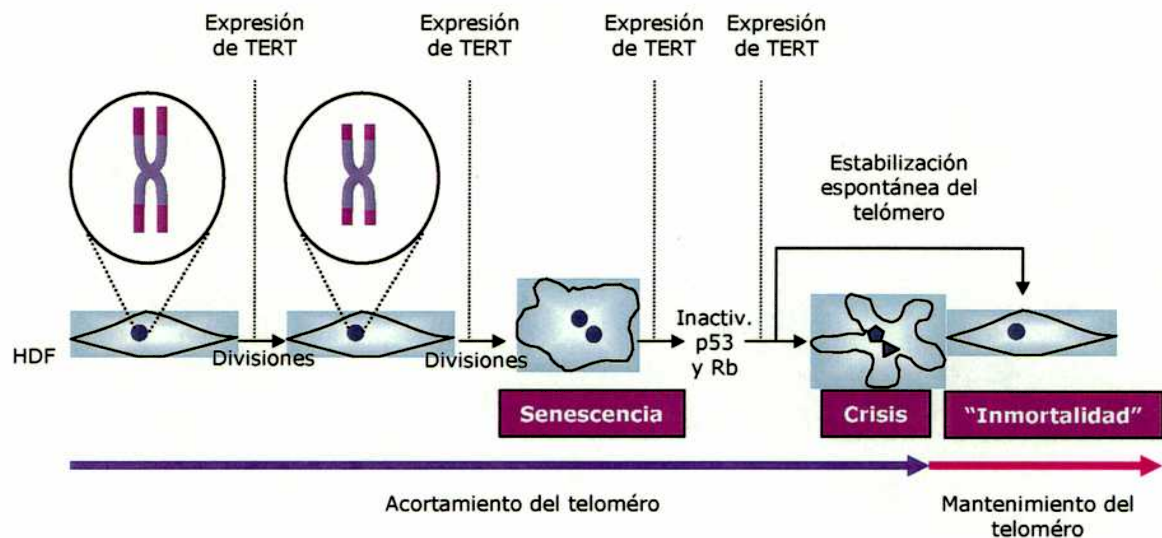


FIGURA 7: El acortamiento telomérico determina la vida media proliferativa de los fibroblastos diploides humanos (HDF). Después de 60-80 duplicaciones en cultivo, los telómeros acortados en los HDF gatilla una respuesta de daño que conduce a la senescencia. La abolición de las vías de los supresores de tumores p53 y retinoblastoma (Rb) permite evitar la senescencia, permitiendo que continúe la división celular hasta que los telómeros críticamente cortos desencadenan la crisis. Unas pocas células emergen de la crisis activando mecanismos de estabilización de los telómeros. La expresión exógena de la hTERT en cualquier estadio de la historia replicativa permite la inmortalización de estas células.

CAPÍTULO IV

TELOMERASA

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

En la mayoría de los mamíferos, el mantenimiento de la longitud telomérica es llevado a cabo principalmente por una retrotranscriptasa específica, la telomerasa, la cual fue inicialmente identificada en ciliados [Greider CW y Blackburn HE, 1985; Lingner J *et al.*, 1997]. La holoenzima telomerasa humana es una ribonucleoproteína [Morin GB, 1989] compuesta por una subunidad catalítica, hTERT [Meyerson M *et al.*, 1997; Kilian A *et al.*, 1997; Nakamura TM *et al.*, 1997], y un componente de RNA (hTR) [Feng J *et al.*, 1995], el cual actúa como molde para la adición de una secuencia repetitiva corta $d(\text{TTAGGG})_n$ en el extremo 3' del DNA telomérico. El tercer componente es la proteína asociada a la telomerasa 1 (hTEP1), que se une a hTERT y a hTR y mantiene la estructura terciaria o cuaternaria de la holoenzima [Harrington L *et al.*, 1997].

Las células diploides humanas normales que expresan hTERT en forma transiente, adquieren actividad de telomerasa, demostrando que hTERT es el componente limitante necesario para la restauración de la actividad de telomerasa en estas células [Bodnar AG *et al.*, 1996; Vaziri H y Benchimol S, 1999]. El gen hTERT, de unas 37Kb, está presente en el genoma humano como una secuencia de copia única en el cromosoma 5p15.33 [Bryce LA *et al.*, 2000]. hTERT es una proteína relativamente grande (127 kDa), con una carga neta básica (pI 11.3) y los motivos de transcriptasa reversa en su extremo C-terminal.

La molécula de RNA de la telomerasa ha sido aislada de ciliados, levaduras y mamíferos y es esencial para la actividad de telomerasa [Greider CW y Blackburn HE, 1989; Blasco MA *et al.*, 1995; Feng J *et al.*, 1995; Singer MS y Gottschling DE, 1994], pero a diferencia de la subunidad catalítica, hTR no es un factor limitante para la telomerasa [Feng J *et al.*, 1995], a veces es considerado como un RNA basal, constitutivo, con niveles de expresión relativamente constantes, si bien estaría aumentado en líneas celulares derivadas de tumores. El componente de RNA de la telomerasa de ciliados presenta una longitud comprendida entre 148 y 209 nucleótidos y comparte una estructura secundaria conservada [Lingner J *et al.*, 1994; McCormick-Graham M y Romero DP, 1995; Romero DP y Blackburn EH, 1991]. En los vertebrados, los RNA de la telomerasa poseen una extensión mayor, de 382 a 559 nucleótidos

[Chen JL *et al.*, 2000; Blasco MA *et al.*, 1995; Feng J *et al.*, 1995; Tsao DA *et al.*, 1998], y en levaduras, tienen de 1200 a 1300 nucleótidos de longitud [Singer MS y Gottschling DE, 1994; McEachern MJ y Blackburn EH, 1996]. En humanos, el componente de RNA tiene 451 nucleótidos de longitud (hTR) [Feng J *et al.*, 1995] y contiene una secuencia de 11 pb (5'-CUAACCCUAAC-3') que codifica para las repeticiones teloméricas [Morin GB, 1989]. El gen *hTR* está presente en el genoma humano también como una secuencia de copia única en el cromosoma 3q26.

La FIGURA 8 muestra la elongación del telómero por telomerasa, un proceso que ocurre en varios pasos. a) Primero, los nucleótidos del extremo 3' del DNA telomérico son hibridados en un extremo del molde de RNA dentro del dominio RNA del complejo telomerasa. La secuencia molde de 11 nucleótidos es complementaria a casi dos repeticiones teloméricas. b) La brecha en el extremo del templado luego es completado mediante la síntesis utilizando nucleótidos trifosfato en el sitio catalítico de la enzima (hTERT). Así, se ensambla una repetición hexanucleotídica completa en el templado. c) La hebra recientemente sintetizada luego es traslocada en la dirección 5', para permitir la formación de una nueva brecha y así permitir que el ciclo se repita.

La telomerasa es activa en la línea germinal, como también en *stem cells* pero es inactiva en la mayoría de las células somáticas. Se ha asumido, aunque no ha sido firmemente demostrado, que la longitud original de los telómeros de esas células sería suficiente para actuar como un buffer apropiado contra la pérdida excesiva por las divisiones celulares: la longitud telomérica inicial es probablemente suficiente para un tiempo de vida replicativa normal [Mergny JL *et al.*, 2002].

Por otra parte, la telomerasa está activada en la gran mayoría de las líneas celulares inmortales y en un 85 a 90% de tumores humanos. En un estudio realizado en células cultivadas que representaban 18 tejidos humanos diferentes, se encontró que 98 de 100 poblaciones inmortales, la actividad de telomerasa era positiva pero era negativa en las 22 poblaciones mortales analizadas. De la misma forma, se encontró actividad de esta enzima en 90 de 101 biopsias que representaban 12 tipos tumorales humanos, pero ninguno de los 50 tejidos somáticos normales estudiados fue positivo [Dhaene K *et al.*, 2000].

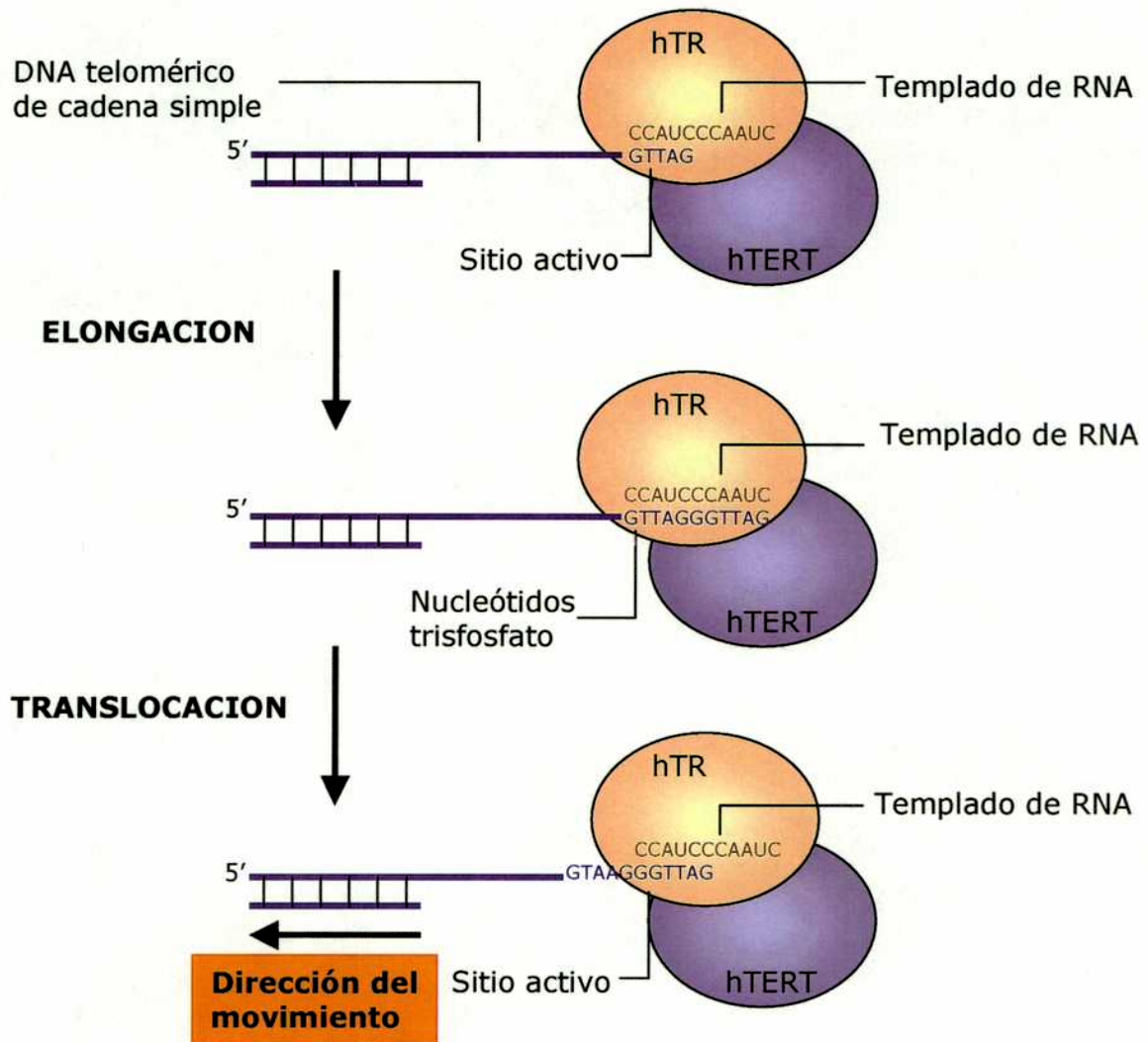


FIGURA 8: Elongación del telómero por la telomerasa. El proceso ocurre en una serie de pasos que se repiten y que involucran la hibridación del extremo 3' del DNA telomérico de cadena simple con el molde de RNA de la enzima, la elongación del DNA en una repetición telomérica y la translocación de la enzima en la dirección 5'. Para detalles ver el texto.

En esta línea de investigación, por otra parte, mediante una serie de experimentos recientes se ha demostrado que:

- i) la telomerasa es suficiente para la inmortalización de muchos tipos celulares [Bodnar AG *et al.*, 1998] y suficiente para permitir a las células transformadas escapar de la crisis [Halvorsen TL *et al.*, 1999], sin embargo, la

telomerasa sola no induce cambios asociados con un fenotipo transformado [Jiang XR *et al.*, 1999; Morales CP *et al.*, 1999];

ii) la inhibición de la telomerasa limita el crecimiento de células cancerosas humanas [Hahn WC *et al.*, 1999a];

iii) la expresión ectópica de la subunidad catalítica de la telomerasa en combinación con varios oncogenes, resulta en la conversión directa de fibroblastos normales o células epiteliales humanas normales a tumorigénicas [Hahn WC *et al.*, 1999b; Elenbaas B *et al.*, 2001].

REGULACIÓN DE LA TELOMERASA

La actividad de telomerasa está ausente en muchas células somáticas normales humanas y la represión de su actividad durante el desarrollo somático está estrictamente controlada. En ciertos tejidos humanos está altamente regulada por el crecimiento y es el blanco de varios programas celulares. El estudio de la expresión de hTERT en linfocitos durante el desarrollo, la diferenciación y la activación han corroborado esta aseveración. La activación de los linfocitos B y T de sangre periférica aumenta los niveles de los transcritos de hTERT y la actividad de telomerasa [Hiyama K *et al.*, 1995; Bodnar AG, 1996; Buchkovich KJ y Greider CW, 1996; Weng NP *et al.*, 1997; Liu K *et al.*, 1999]. La actividad de telomerasa también está aumentada en el endometrio durante el ciclo menstrual [Kyo S *et al.*, 1997]. En contraste, la maduración terminal o la diferenciación de las células han sido correlacionadas con la represión de la actividad de telomerasa [Sharma HW *et al.*, 1995; Bestilny LJ *et al.*, 1996; Xu D *et al.*, 1996; Koyanagi Y *et al.*, 2000]. Una variedad de señales extra o intracelulares son capaces de modular la actividad de la telomerasa, tales como la radiación UV [Ueda M *et al.*, 1997], calcio [Bickenbach JR *et al.*, 1998], zinc [Nemoto K *et al.*, 2000], interferón α [Xu DW *et al.*, 2000], estrógenos [Kyo S *et al.*, 1999; Misiti S *et al.*, 2000] y citoquinas [Yang H *et al.*, 2001].

Es posible la reconstitución *in vitro* de la telomerasa humana en extractos celulares contando con sus dos componentes: el molde de RNA (hTR) y la subunidad catalítica proteica (hTERT) [Weinrich SL *et al.*, 1997; Beattie TL *et al.*, 1998]. Por otra parte, también el telómero mismo sería capaz de regular la actividad de la telomerasa.

Cada uno de los componentes constituye un blanco de regulación del complejo, que discutiremos en detalle (FIGURA 9):

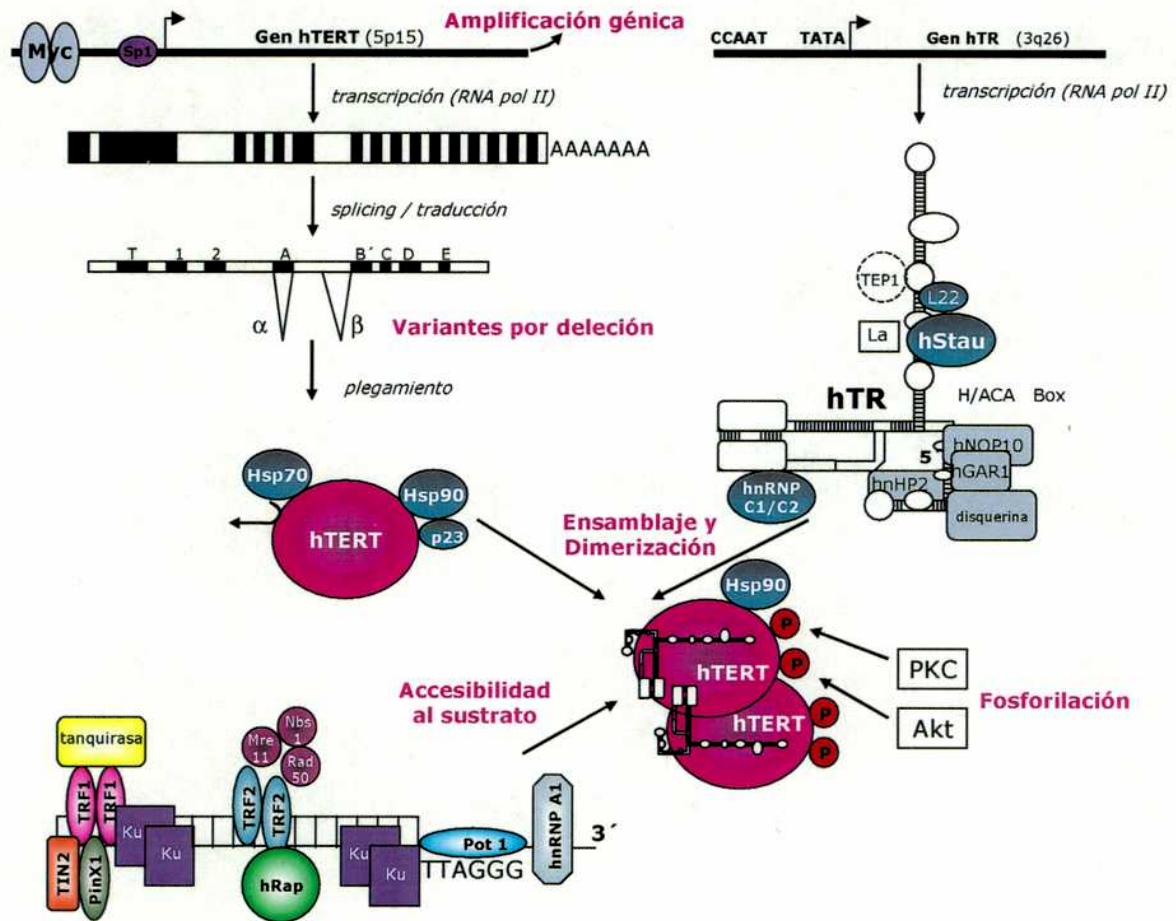


FIGURA 9: Componentes de la telomerasa. La telomerasa está compuesta por dos componentes principales: la subunidad catalítica (hTERT) y el templado de RNA (hTR). Varias proteínas están asociadas con la hTERT o hTR y facilitan su plegamiento o ensamblaje. Muchas proteínas interactúan con el DNA telomérico y participan en el reclutamiento de la telomerasa. La figura muestra los distintos niveles posibles de regulación del complejo.

1. hTERT

- a. **Amplificación génica.** Un incremento en el número de copias del *hTERT* podría constituir una forma de regulación positiva de los niveles de telomerasa

en las células tumorales, dado que el gen *hTERT* está amplificado en un 31% de líneas celulares tumorales y en un 30% de tumores primarios [Bryce LA *et al.*, 2000; Zhang A *et al.*, 2000].

- b. Regulación de la transcripción.** De acuerdo con el rol clave que juega la telomerasa en la vida replicativa celular, su promotor es el blanco de un gran número de vías de señalización e integra múltiples niveles de regulación génica. La desregulación de la expresión del gen *hTERT* es un factor clave en la carcinogénesis. El estudio de la región promotora de *hTERT* ha demostrado que éste es activo en las células somáticas humanas normales, pero es activado durante la inmortalización celular [Cong YS *et al.*, 1999]. Sin embargo, aun no se conocen bien los mecanismos involucrados en la transcripción diferencial del *hTERT* en células normales y tumorales. Los transcritos de *hTERT* son bajos o indetectables en las células somáticas normales, pero detectables en las contrapartes transformadas [Counter CM *et al.*, 1998b]. Así, la expresión de *hTERT* parece estar reprimida en la mayoría de las células somáticas normales: el número de moléculas del mRNA de *hTERT* por célula se encuentra por debajo de la sensibilidad de una RT-PCR cuantitativa (<0.004 moléculas/célula), al compararlas con las 0.2 a 6 moléculas del mRNA de *hTERT* por célula con actividad de telomerasa [Ducrest AL *et al.*, 2001]. Esta regulación positiva podría ser consecuencia de cambios epigenéticos producidos en el gen *hTERT*.
- c. Una red compleja de factores de transcripción.** El análisis de la secuencia del promotor de *hTERT* reveló la presencia de varios sitios de unión para diversos factores de transcripción [Horikawa I *et al.*, 1999] sugiriendo que la expresión de *hTERT* está sujeta a múltiples niveles de control y está regulado por diferentes factores en distintos contextos celulares. Estos factores de transcripción que participan en la expresión del gen *hTERT* [Poole JC *et al.*, 2001], incluyen Myc, Sp1, el receptor de estrógenos [Misiti S *et al.*, 2000], E2F-1 [Crowe DL y Nguyen DC, 2001], WT-1 [Oh S *et al.*, 1999], NF- κ B [Yin L *et al.*, 2000] y MZF-2 [Fujimoto K *et al.*, 2000].

Entre todos ellos, Myc ha sido estudiado con mayor detalle, e induce la telomerasa al incrementar el nivel de expresión de *hTERT* [Wang J *et al.*, 1998]. Específicamente, una región de 59 pb del promotor, requerida para su máxima

actividad, contiene un sitio potencial de unión a la proteína Myc (E-box), y la cotransfección de un plásmido de expresión con *c-myc* aumentó marcadamente su actividad promotora, mientras que la utilización de oligonucleótidos antisentido de *c-myc* resultó en la regulación negativa de la actividad de telomerasa en líneas celulares de leucemia humana [Fujimoto K y Takahashi M, 1997]. Si bien la expresión de hTERT correlaciona con la sobreexpresión de *myc* en el cáncer de próstata [Latil A *et al.*, 2000] y cervical [Sagawa Y *et al.*, 2001] en humanos y aunque c-Myc es un mediador directo de la activación de la telomerasa [Wu KJ *et al.*, 1999; Sagawa Y *et al.*, 2001], una publicación reciente indica que la regulación de la actividad de la telomerasa mediada por c-Myc, no sería funcional en las células inmortalizadas [Drissi R *et al.*, 2001].

Además, ha sido observada la asociación endógena de BRCA1 con Nmi (*N-Myc-interacting protein*) en células de cáncer de mama [Li H *et al.*, 2002]. Nmi funcionaría como una molécula adaptadora para reclutar c-Myc a un complejo conteniendo Nmi/c-Myc/BRCA1. Si bien Nmi o BRCA1 solas no tuvieron efecto sobre actividad del promotor de hTERT inducida por c-Myc, BRCA1 y Nmi, en conjunto, la inhibieron significativamente. Estos resultados revelarían un nuevo mecanismo patogénico por el cual las mutaciones en BRCA1, por medio de este complejo conteniendo BRCA1, c-Myc y Nmi, impedirían la inhibición de la actividad del promotor inducida por c-Myc, lo cual permitiría la activación sostenida de la telomerasa. Sp1 coopera con c-Myc en la activación de la transcripción de hTERT [Kyo S *et al.*, 2000], pero una interacción con p53 podría inhibir la unión de Sp1, resultando en la represión de hTERT [Kanaya T *et al.*, 2000; Xu DW *et al.*, 2000].

Diversos estudios de la regulación de hTERT han mostrado que una variedad de oncogenes regulan positivamente la actividad de telomerasa mientras que los genes supresores de tumores realizan lo opuesto. En células epiteliales mamarias, variantes oncogénicas de la proteína E6 de HPV indujeron fuertemente la actividad de telomerasa, mientras que las variantes débilmente oncogénicas, lo hicieron en menor grado [Klingelhutz AJ *et al.*, 1996]. Otros oncogenes como SV40, *K-ras* [Burger AM *et al.*, 1998], la proteína quinasa C (PKC) [Yu CC *et al.*, 2001], bcl-2 (Mandal M y Kumar R, 1997), y Akt [Kang SS *et al.*, 1999], también inducen la expresión de hTERT.

Por el contrario, la introducción de genes supresores de tumores como pRB [Xu HJ *et al.*, 1997], el TGF- β [Yang H *et al.*, 2001] y p21^{WAF1} [Terasaki M *et al.*, 1999] en líneas celulares tumorales han resultado en la represión de la actividad de telomerasa. Además, la introducción del cromosoma 3 en células de carcinoma renal o de mama con actividad de telomerasa, resultó en la represión de la expresión de hTERT, la regulación negativa de la actividad de telomerasa y la detención del crecimiento celular [Horikawa I *et al.*, 1998].

Todos estos resultados en conjunto sugieren que la activación de oncogenes o la pérdida de función de genes supresores de tumores puede servir para anular la estricta represión de hTERT en células no neoplásicas [Elenitoba-Johnson KS, 2001].

- d. Modificaciones epigenéticas.** El análisis de la secuencia de DNA alrededor del posible sitio de inicio de la transcripción revela un promotor rico en GC, localizado en una isla CpG [Takakura M *et al.*, 1999; Horikawa I *et al.*, 1999]. El significado funcional de los 72 sitios CpG dentro del promotor ha sido confirmado por la observación de que la expresión de hTERT puede ser modulada a nivel epigenético por la metilación del promotor. En dos líneas celulares, la desmetilación del DNA ha inducido la expresión de hTERT, sugiriendo que la metilación de DNA podría contribuir a la represión de hTERT en algunas células. Sin embargo, en algunos cultivos primarios de tejidos sin telomerasa y en células cultivadas no inmortalizadas, la isla CpG de TERT no está metilada, indicando que la expresión de hTERT puede ser prevenida por otros mecanismos independientes de la metilación del DNA [Dessain SK *et al.*, 2000].

La inhibición de las desacetilasas de histonas (HDAC) por tricostatina A en células humanas normales resulta en su activación y en la regulación positiva del mRNA de hTERT en estas células sin actividad de telomerasa [Cong YS y Bacchetti S, 2000; Xu DW *et al.*, 2001; Takakura M *et al.*, 2001]. El reclutamiento de las HDAC podría ser llevado a cabo tanto por los heterodímeros Myc/Mad [Laherty CD *et al.*, 1997] como por Sp1 [Cong YS y Bacchetti S, 2000; Takakura M *et al.*, 2001] cumpliendo así un rol dual en la regulación de la transcripción de hTERT, como activador y como represor.

Por otro lado, ha sido reportado que la tricostatina A redujo los niveles de actividad de telomerasa en células cancerosas humanas de hígado, sin afectar los niveles de transcripción de hTERT [Nakamura M *et al.*, 2001]. Este resultado sugeriría que la telomerasa, en principio, cumpliría un rol en el mantenimiento de la estabilidad de la nucleoproteína, y también en los tratamientos de las leucemias mieloide aguda y linfocítica basados en inhibidores de desacetilasas de histonas [Bernhard D *et al.*, 1999; Ferrara FF *et al.*, 2001].

- e. **Splicing alternativo.** Estudios recientes han sugerido que la actividad de telomerasa también puede ser regulada por el *splicing* alternativo de los transcritos de hTERT. Por lo menos 6 variantes de *splicing* de hTERT han sido encontradas. Una de ellas carece de los residuos conservados del *core* catalítico de la proteína y es capaz de inhibir la actividad de telomerasa endógena [Colgin LM *et al.*, 2000; Yi X *et al.*, 2000]. Sólo los tejidos que expresan la hTERT que contiene los motivos de retrotranscriptasa completos muestran actividad de telomerasa [Ulaner GA *et al.*, 2000]. Varias líneas celulares y tejidos muestran diferencias considerables en sus patrones de *splicing* [Kilian A *et al.*, 1997; Villa R *et al.*, 2001].

- f. **Ensamblaje.** La telomerasa existe como un gran complejo que actúa como dímero o multímero [Beattie TL *et al.*, 2001; Wenz C *et al.*, 2001], han sido clonadas seis subunidades que componen el complejo: hTERT, hTR, TEP1, Hsp90 (*heat shock protein 90*), p23 y disquerina. Sólo la expresión de hTERT cambia proporcionalmente con el nivel de actividad de telomerasa, mientras que los otros elementos son expresados en una forma aproximadamente constantes. Aunque la subunidad catalítica tenga un efecto limitante de la velocidad en la actividad enzimática, las otras subunidades participan en la realización de la actividad enzimática [Chang JT *et al.*, 2002]. Una vez que la hTERT es expresada, el resto de las subunidades deben ser ensambladas para formar una holoenzima activa, y tal ensamblaje estaría regulado por chaperonas relacionadas con la Hsp-90 [Akalín A *et al.*, 2001].

La concentración de estas proteínas se encuentra marcadamente aumentada durante la transformación, como así también en carcinomas de

próstata avanzados. En extractos celulares, la adición de estas chaperonas purificadas aumenta la reconstitución de la actividad de telomerasa, lo cual propone un nuevo mecanismo para el aumento del ensamblaje de la telomerasa mediado por las chaperonas relacionadas con Hsp 90 [Akalin A *et al.*, 2001].

- g. Localización celular.** En los linfocitos T humanos, el aumento de la actividad de telomerasa está asociado con la relocalización celular de la enzima desde el citoplasma hacia el núcleo y no requiere un aumento de la expresión de hTERT. Así, el mecanismo de activación en estas células parece diferente del que ocurre en células tumorales [Liu K *et al.*, 2001].
- h. Fosforilación.** La fosforilación es un modo post-transcripcional clave de regular la estructura y la función de las proteínas, y es también un importante regulador de la actividad de la telomerasa. La subunidad catalítica de la telomerasa parece ser una fosfoproteína cuya actividad es modulada por un complejo grupo de proteínas quinasas, que proveen conexiones adicionales entre la actividad de telomerasa y las vías de transducción de señales. La PKC aumentaría la actividad de telomerasa mediante la fosforilación de hTERT [Kim YW *et al.*, 2001; Ku WC *et al.*, 1997; Li H *et al.*, 1998], y en una forma inversa, la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A) inhibiría tal actividad [Li H *et al.*, 1997]. De este modo, es posible que PKC y PP2A estén involucradas en el control recíproco de la actividad de telomerasa. Esta hipótesis es consistente con la noción que sugiere que el balance entre PKC y PP2A juega un rol importante en la tumorigénesis [Gopalakrishna R *et al.*, 1999].

La proteína quinasa B (PKB o Akt) participa también en la regulación positiva de la actividad de telomerasa [Kang SS *et al.*, 1999], no sólo a través del aumento en la expresión de hTERT que hemos mencionado. También la fosforilación de hTERT por Akt en las células cancerosas humanas estaría involucrada en la señalización celular producida por la activación de la vía de PI3 por factores de crecimiento [Kang SS *et al.*, 1999]. La telomerasa podría ser así uno de los blancos moleculares de Akt en los procesos de apoptosis, supervivencia celular y proliferación durante el envejecimiento y la tumorigénesis.

Finalmente, se encontró que la tirosina quinasa c-Abl, una enzima que es activada por ruptura en el DNA doble cadena, es capaz de asociarse directamente con la hTERT, fosforilarla e inhibir la actividad de telomerasa en células expuestas a radiación ionizante. Además, células deficientes en c-Abl muestran un alargamiento en los telómeros [Kharbanda S *et al.*, 2000].

La telomerasa podría, entonces, existir en dos configuraciones diferentes pudiendo ser activada o desactivada por la fosforilación o desfosforilación reversibles.

2. hTR

- a. **Expresión y maduración.** Si bien el componente de RNA de la telomerasa no es el limitante de la velocidad de la actividad enzimática, la tasa de transcripción de hTR está significativamente incrementada en células que expresan hTERT endógena. La vida media del hTR en células sin actividad de telomerasa es de unos 5 días y se incrementa 1.6 veces en presencia de hTERT [Yi XM *et al.*, 1999] y un nivel de hTR aumentado en el estado estacionario también probablemente se debería al incremento en la vida media.

El promotor del gen hTR también puede ser sujeto de metilación ya que contiene islas CpG [Zhao JQ *et al.*, 1998]. En algunas líneas celulares que exhiben mecanismos ALT, el promotor está metilado y esto ha sido asociado con una ausencia total de expresión de hTR en estas líneas [Hoare SF *et al.*, 2001]. Sin embargo, no hay evidencia de la metilación del promotor de hTR en tejidos somáticos normales.

En cuanto a la forma madura de hTR, esta tiene un cap de 5'-trimetilguanosa, que constituye una marca característica de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snoRNP), partículas involucradas en el splicing del RNA [Seto AG *et al.*, 1999].

- b. Proteínas de unión a hTR.** El componente de RNA de la telomerasa humana contiene un dominio en 3' estructural y funcionalmente relacionado con la caja H/ACA de los RNA pequeños nucleolares (snoRNA) [Mitchell JR *et al.*, 1999] que no es necesario para el ensamblaje in vitro de la telomerasa. Sin embargo, es esencial para la acumulación del hTR in vivo, el procesamiento del extremo 3' del hTR y la actividad de telomerasa. Las cuatro proteínas comúnmente asociadas con los H/ACA snoRNAs (hGAR1, NAP57/disquerina, hNOP10 y hNHP2) también se unen al hTR. En levaduras, la acumulación del componente de RNA maduro de la telomerasa humana depende de su asociación con tres de las cuatro proteínas de H/ACA snoRNP y es probable que esto también ocurra en humanos [Dez C *et al.*, 2001].

Además, se ha encontrado que individuos enfermos por la disqueratosis congénita humana (DKC) presentan mutaciones en el gen de una de estas proteínas la disquerina y tienen reducidos los niveles de telomerasa y los telómeros más cortos. Los pacientes con DKC presentan defectos en tejidos altamente regenerativos como la piel y la médula ósea, inestabilidad cromosómica y una predisposición a desarrollar ciertos tipos de cánceres. La patología de la DKC es consistente con una actividad de telomerasa comprometida que conduce a un defecto en el mantenimiento de los telómeros, el cual limita la capacidad proliferativa de las células somáticas humanas en sangre y epitelios [Mitchell JR *et al.*, 1999].

- c. Dimerización y asociación con hTERT.** En levaduras, la telomerasa contendría más de un sitio activo por cada complejo enzimático. Están presentes por lo menos dos moléculas funcionales de RNA que interactúan y ambas serían utilizadas como templado para la polimerización del DNA [Prescott J y Blackburn EH, 1997]. La telomerasa funcional humana también contiene dos moléculas de hTR, y por lo menos dos subunidades hTERT. Estos dos templados de RNA son interdependientes y cooperan funcionalmente entre sí [Tesmer VM *et al.*, 1999; Wenz C *et al.*, 2001]. Esto sugiere que un complejo de telomerasa es capaz de acoplar la elongación de los extremos de ambas cromátidas en una única ronda de replicación. El templado de RNA localizado hacia el extremo 5' del RNA de hTR está asociado establemente con la subunidad catalítica, haciendo de la telomerasa una transcriptasa reversa particular. Aun no está claro si la actividad de telomerasa puede ser modulada

normalmente por un nivel de asociación variable de sus componentes esenciales [Mergny JL *et al.*, 2002].

3. El telómero

El telómero en sí mismo también participa en la regulación de la actividad de telomerasa. En varios organismos, la longitud telomérica de células con actividad de telomerasa es mantenida en un valor medio constante que puede ser visto como el balance entre la elongación y el acortamiento [Larson DD *et al.*, 1987; Greider CW, 1996]. En algunas levaduras, este balance está determinado por la regulación negativa de la actividad de la telomerasa por el telómero mismo cuando su longitud excede un cierto umbral [Murray AW *et al.*, 1988; McEachern MJ y Blackburn EH, 1995]. Esta regulación negativa parece ser mediada por un grupo complejo de proteínas teloméricas que actúan en *cis* sobre la actividad de telomerasa tanto sobre la hebra G protuberante como sobre la porción de doble cadena del DNA telomérico. Estas dos vías podrían actuar en forma coordinada o independiente. En este nivel de regulación estarían involucrados los siguientes procesos:

- a. **Regulación de la telomerasa en cis por la hebra G protuberante.** La holoenzima telomerasa no es libre para alargar los extremos de los cromosomas porque su actividad requiere funciones específicas de la hebra G protuberante. En tal sentido, no es sorprendente que la conformación de esta porción distal del telómero esté sujeta a un complejo conjunto de controles [Mergny JL *et al.*, 2002].

- b. **Estructura del DNA.** Las repeticiones teloméricas ricas en guaninas se han conservado en los vertebrados durante la evolución, posiblemente debido a las conformaciones específicas no canónicas que son capaces de formar, como los cuartetos de G, los cuales se pueden apilar para formar las estructuras conocidas como cuádruplex de G (FIGURA 10) [Oka Y y Thomas CA, 1987; Williamson JR, 1994] que serían capaces de inhibir la actividad de telomerasa [Zahler AM *et al.*, 1991]. También podría deberse a los requerimientos de proteínas regulatorias que reconocen estas importantes regiones, ya que esta estructura es estable bajo condiciones fisiológicas y podría ser reconocida por

proteínas nucleares [Mergny JL *et al.*, 1998] que están involucradas en la regulación del telómero, especialmente TRF1, TRF2 y la proteína de *capping* de los telómeros, Pot1 (*Protection of telomeres*) [van Steensel B y de Lange T, 1997].

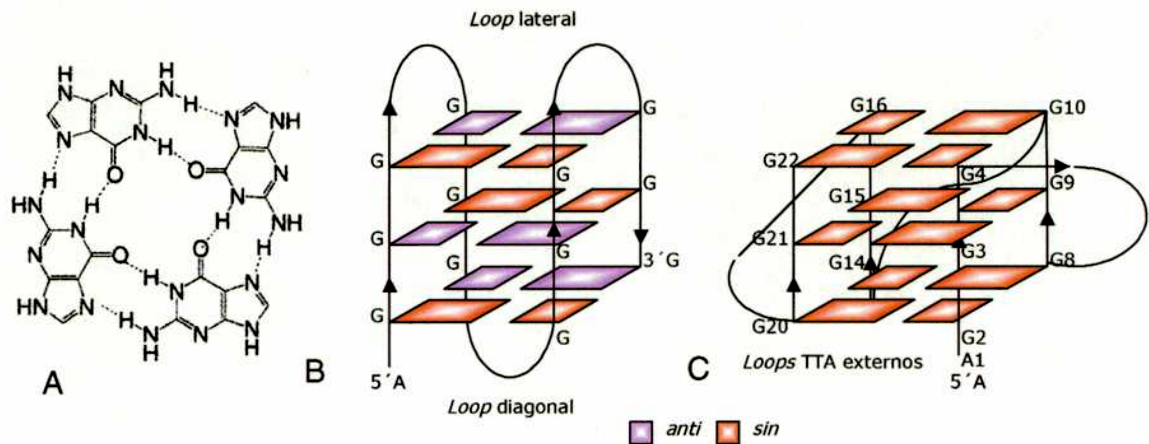


FIGURA 10: El plegamiento del DNA telomérico: G-cuádruplex. A) Cuatro residuos de guanina forman una estructura plana a través de uniones de hidrógeno de Hoogsteen. Este tipo de unión ocurre en secuencias de DNA ricas en G cuando se asocian. El arreglo resultante, la tétrada G, comprende cuatro hebras de nucleótidos, de cada una de las cuales participa una guanina en la unión de hidrógeno. Los nucleósidos de guanosina pueden estar en una conformación "sin" o "anti" con respecto a la unión glicosídica, dependiendo de la polaridad de la hebra. B) Las tétradas G se apilan unas con otras y requieren sodio o potasio para mantener la integridad y la estabilidad de la estructura. Las cuatro cadenas de nucleótidos se pueden asociar de diferentes formas para producir los G-cuádruplex. El que se muestra en la figura, es el plegamiento intramolecular encontrado para cuatro cadenas de repeticiones teloméricas humanas. Como las hebras no son paralelas entre sí, los ángulos glicosídicos adoptan una mezcla de conformaciones "sin" y "anti". Los cuádruples que involucran una o dos cadenas necesariamente tienen por lo menos un *loop*, que es rico en timina. C) Un G-cuádruplex paralelo que muestra un arreglo completamente distinto, con todas las cadenas paralelas, todos los ángulos glicosídicos en el dominio "anti" y los *loops* de TTA externos al apilamiento de tétradas G.

c. Activación y reclutamiento de telomerasa. En levaduras, uno de los roles de la proteína Cdc13 es activar la holoenzima telomerasa o reclutarla en los extremos de los cromosomas [Nugent CI *et al.*, 1996; Evans SK y Lundblad V, 1999; Grandin N *et al.*, 2000; Chandra A *et al.*, 2001]. Es probable que el contacto entre Cdc13 y la telomerasa sea transitorio y, probablemente esté restringido al período del ciclo celular en el cual la telomerasa es activa [Diede SJ y Gottschling DE, 1999; Marcand S *et al.*, 2000]. Así como Cdc13 se une específicamente a la hebra G protuberante telomérica *in vitro* [Lin JJ y Zakian VA, 1996; Wang MJ *et al.*, 2000] y a los telómeros *in vivo* [Bourns BD *et al.*,

1998], es probable que otras proteínas de unión al DNA telomérico lleven a cabo las funciones de Cdc13 en otros organismos que no sean las levaduras. En mamíferos, un homólogo funcional posible de Cdc13 es hnRNP A1, un factor de unión a DNA simple cadena que modula la replicación telomérica [La Branche H *et al.*, 1998].

La proteína humana Pot1 [Baumann P y Cech TR, 2001] muestra homología en la secuencia aminoacídica con proteínas de unión a extremos de ciliados [Gottschling DE y Zakian VA, 1986]. En levaduras, la delección del gen *pot1*⁺ tiene un efecto inmediato sobre la estabilidad cromosómica causando la rápida pérdida de DNA telomérico y la circularización del cromosoma [Baumann P y Cech TR, 2001]. Sin embargo, aun no existen pruebas contundentes acerca de la participación de Pot1, hnRNP A1 u otras proteínas en la activación de la telomerasa en los extremos de los cromosomas humanos.

Una proteína que podría desempeñar un rol en el reclutamiento o la activación de una transcriptasa reversa es la proteína de nucleocápside NCp7 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV1). Es una proteína de unión a ácidos nucleicos que cubre el RNA genómico y que interactúa tanto con RNA como con DNA y con las subunidades de la transcriptasa reversa, y sería capaz de estimularla durante la síntesis de DNA viral [Lener D *et al.*, 1998].

Ambas, NCp7 y la proteína de unión a extremos de ciliados poseen propiedades de protección de ácidos nucleicos y *annealing* [Fang G y Cech TR, 1993; Darlix JL *et al.*, 2000], lo cual implicaría que podría haber algún tipo de actividad de chaperona involucrada en las funciones de Cdc13. En cualquiera de los casos, el paralelismo entre los roles de Cdc13, Ncp7 y las proteínas de unión a extremos de ciliados contribuiría a la lista de las semejanzas existentes entre la retrotransposición y el mantenimiento del telómero.

Otras proteínas muy conservadas de levaduras a humanos están también involucradas en el procesamiento correcto de la hebra G protuberante para la telomerasa y desempeñan roles adicionales en la reparación por recombinación, como por ejemplo la proteína heterodimérica Ku.

Los fibroblastos humanos derivados de pacientes con ataxia-telangiectasia (una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por la degeneración cerebelar progresiva, inmunodeficiencias, atrofia gonadal e inestabilidad genómica [Wood LD *et al.*, 2001] exhiben una longitud telomérica reducida [Xia SJ *et al.*, 1996] y en levaduras, las mutaciones en el gen *Tel1*, el homólogo más cercano al gen humano de ATM, resulta en el acortamiento telomérico [Greenwell PW *et al.*, 1995]. Tel1 aparentemente actúa a través del complejo MRE11 (Rad50-Mre11-Xrs2/Nbs1), probablemente controlando su actividad a nivel de telómeros.

- d. Inhibición de telomerasa.** Cdc13 tiene roles antagónicos en el mantenimiento de los telómeros. Las mutaciones que producen la pérdida de función de dos factores que interactúan con Cdc13, Stn1 o Ten1, resultan en el alargamiento telomérico en una manera que es dependiente de telomerasa [Grandin N *et al.*, 1997; Grandin N *et al.*, 2001a]. Sin embargo, Stn1 no estaría involucrada en las funciones de activación de telomerasa de Cdc13 [Pennock E *et al.*, 2001]. Cdc13, Stn1 y Ten1 en conjunto, formarían un complejo dentro de la célula que inhibiría la telomerasa. Dado que Cdc13 también regula positivamente la telomerasa, es probable que exista en dos configuraciones que tienen efectos opuestos sobre la actividad de telomerasa. Así, el balance entre las formas de Cdc13 que actúan en forma positiva o negativa sobre la telomerasa jugarían un rol de importancia en la regulación de la longitud telomérica [Mergny JL *et al.*, 2002].
- e. Acoplamiento entre la telomerasa y la síntesis de la hebra C.** La síntesis de la hebra C ocurre concomitantemente o poco después de la elongación de la hebra G por la telomerasa y se piensa que es llevada a cabo por la maquinaria de replicación de la hebra retrasada [Wellinger RJ *et al.*, 1996]. En levaduras, las mutaciones en la DNA polimerasa (*cdc17/pol1*) que no causan un defecto obvio en la replicación general pueden perturbar la replicación del telómero y conducir a la elongación telomérica y acumulación de DNA simple cadena en las regiones teloméricas [Carson MJ y Hartwell L, 1985; Diede SJ y Gottschling DE, 1999; Qi HY y Zakian VA, 2000].

En el ciliado *Euplotes* se había demostrado primero que las hebras C de los telómeros recientemente sintetizados tenían una longitud precisamente controlada, en cambio, las hebras G eran más heterogéneas. A partir de estos resultados se sugirió que si bien la síntesis de la hebra G por la telomerasa era el primer paso en la adición de telómeros, tenía lugar un importante punto de regulación durante la subsiguiente síntesis de la hebra C. Mediante la utilización de un inhibidor de las DNA polimerasas α y δ , se determinó que la síntesis de las dos cadenas estaba coordinada y estaba mediada precisamente por la DNA polimerasa. La inhibición parcial de la síntesis de la cadena C causó un alargamiento general de las hebras G y un incremento en la heterogeneidad de las hebras C, sugiriendo además que la síntesis de la hebra retrasada inhibe la elongación telomérica [Fan X y Price CM, 1997]. La asociación física encontrada posteriormente entre la telomerasa y la primasa podría explicar la regulación coordinada de la síntesis de las hebras G y C teloméricas y la eficiencia de la adición de los telómeros en *Euplotes* [Ray S *et al.*, 2002].

El incremento en la longitud de la hebra G por la inhibición de la síntesis de la hebra C, podría ser explicado por varios mecanismos. Se esperaría que una falla en la replicación completa de la hebra C, incrementara la longitud del DNA simple cadena en la hebra G correspondiente. En consecuencia, hebras G más largas podrían unir proteínas Cdc13 adicionales [Hughes TR *et al.*, 2000], las cuales podrían favorecer el reclutamiento o la activación de la telomerasa resultando en una retroalimentación positiva para el alargamiento de la hebra G. También podría haber un efecto inhibitorio directo de la maquinaria de replicación de la hebra C sobre la telomerasa. Finalmente, el alargamiento de la hebra G puede ser amplificado en un contexto defectivo para la replicación por enmascaramiento de una actividad nucleasa, ya que la inactivación de la polimerasa α altera la estructura de la cromatina y produce un rápido incremento en el DNA de cadena simple en los telómeros [Adams Martin A *et al.*, 2000].

Los fenotipos teloméricos de cepas con la DNA polimerasa α mutante son muy similares a los observados en las cepas que portan alelos llamados "elongadores de telómeros" de Cdc13 y Stn1 [Grandin N *et al.*, 1997; Grandin N *et al.*, 2000; Qi HY y Zakian VA, 2000; Chandra A *et al.*, 2001]. Esto sugeriría

que Cdc13 y Stn1 serían requeridas para la síntesis de la hebra C. Un fuerte argumento en favor de este modelo es la interacción entre Cdc13 y la DNA polimerasa α revelado por ensayos de doble híbrido y de co-inmunoprecipitación *in vivo* [Qi HY y Zakian VA, 2000]. Además mutaciones puntuales en Cdc13 o Cdc17/Pol1 que reducen esta interacción, resultan en el alargamiento telomérico [Qi HY y Zakian VA, 2000]. Cdc13, probablemente asistida por Stn1, podría cargar el complejo DNA polimerasa α -primasa para iniciar la síntesis de la hebra C en los extremos de los cromosomas. Este rol propuesto para el complejo Cdc13-Stn1 en la iniciación de la síntesis de la hebra C proveería una explicación simple para el efecto negativo de este complejo sobre la actividad de la telomerasa, dado que se cree que la síntesis de la hebra retrasada inhibe la telomerasa.

Cdc13, Stn1 y Ten1 juegan papeles adicionales en el *capping*: sus mutaciones conducen a un arresto en el crecimiento en G2 y un sobre-alargamiento de la hebra G. Tomando en cuenta el otro rol de Stn1 en la replicación de los telómeros, se podría proponer que Stn1 regula la longitud de de la hebra G y asegura la estabilidad de los extremos de los cromosomas controlando la síntesis de la hebra C [Mergny JL *et al.*, 2002].

- f. **Las proteínas que se unen a la porción dúplex del DNA telomérico reprimen la elongación telomérica en *cis*.** En levaduras de gemación, la proteína Rap1p se une al DNA telomérico doble cadena y provee un nivel de regulación adicional. Un exceso de moléculas de Rap1p unidas al telómero causa la represión en *cis* de la actividad de telomerasa [Kyrion G *et al.*, 1992; Krauskopf A y Blackburn EH, 1996; Marcand S *et al.*, 1997; Marcand S *et al.*, 1999]. Esto crea un ciclo de retroalimentación negativa que contribuye al establecimiento de la longitud telomérica. En esta regulación actúan también otros dos factores junto con Rap1p, Rif1p y Rif2p. La delección del gen *taz1*⁺ en levaduras de fisión, un gen que codifica para una proteína de unión a telómeros, aumenta dramáticamente la longitud telomérica [Cooper JP *et al.*, 1997].

En células humanas, las proteínas de unión al DNA telomérico conocidas son TRF1 y TRF2. Aunque las secuencias de las repeticiones teloméricas de

estos dos tipos de levaduras y de humanos difieren, las tres proteínas de unión a estas repeticiones comparten similares dominios de unión al DNA. Fuera del mismo, Taz1p tiene escasa homología con TRF1 y no la tiene en absoluto con Rap1p [Shore D, 1997].

Un exceso de TRF1 y TRF2 inhibe la elongación telomérica [van Steensel B y de Lange T, 1997; Smogorzewska A *et al.*, 2000]. Además, su direccionamiento a un único telómero conduce al acortamiento telomérico, indicando que ellas actúan en *cis* para reprimir la elongación telomérica [Ancelin K *et al.*, 2002]. Al sumarle al direccionamiento de TRF1 la utilización de un oligonucleótido antisentido contra la telomerasa para inhibir su actividad no incrementó aún más la erosión telomérica, sugiriendo que la telomerasa misma podría ser el blanco de la regulación por TRF1 mismo o mediado por proteínas asociadas. En este sentido, se debería tener en cuenta que un factor que interactúa con TRF1, TIN2 inhibe la elongación telomérica mediada por telomerasa [Kim SH *et al.*, 1999]. En cualquier caso, este efecto de TRF1 refleja la inhibición de telomerasa en *cis* por Rap1 [Marcand S *et al.*, 1997; Marcand S *et al.*, 1999].

Por el contrario, el direccionamiento de TRF2 y la inhibición de la telomerasa tuvieron efectos aditivos [Ancelin K *et al.*, 2002], sugiriendo que TRF2 podría controlar la longitud telomérica independiente de la telomerasa, por ejemplo activando nucleasas en los telómeros. TRF2 podría estar involucrado directamente en el procesamiento del DNA de los extremos del cromosoma, por ejemplo dirigiendo hacia los telómeros el complejo Rad50-Mre11, el cual tiene actividad nucleolítica [Trujillo KM y Sung P, 2001] y se ha visto que funciona a nivel de los telómeros, posiblemente modulando la formación del *T-loop* [Zhu XD *et al.*, 2000]. En este sentido, TRF2 podría contribuir a la regulación de la longitud telomérica en células sin actividad de telomerasa. Aun se desconocen los mecanismos que controlan el acortamiento telomérico en células humanas [McEachern MJ *et al.*, 2000a] y parecen estar regulados por el desarrollo [Frenck RW *et al.*, 1998]. La modulación del dosaje y la expresión de TRF2 podrían ser parte de esta regulación. La proteína equivalente a Rap1 en humanos, hRap1 está localizada a nivel de telómeros y afecta la longitud telomérica pero no se une al DNA directamente sino que es reclutada mediante su interacción con TRF2 [Li B *et al.*, 2000]. Se podría

especular con que el complejo TRF2-hRAP1 podría constituir otra forma de limitar la proliferación telomérica, posiblemente reprimiendo la actividad de telomerasa en *cis*, como la proteína Rap1 de levaduras.

Otra proteína involucrada en la regulación de la elongación telomérica a nivel del telómero es la tanquirasa [Smith S *et al.*, 1998; Smith S y de Lange T, 2000] una poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), fue identificada a través de su interacción con TRF1. La ADP ribosilación mediada por tanquirasa inhibe la unión de TRF1 a las repeticiones teloméricas *in vitro* y actúa como un regulador posible de la elongación telomérica *in vivo*, aparentemente inhibiendo TRF1 [Smith S y de Lange T, 2000]. La sobre-expresión a largo plazo de tanquirasa en células humanas con actividad de telomerasa resulta en una elongación progresiva y gradual de los telómeros. Recientemente se encontró otra proteína que interactúa con TRF1, un segundo producto del gen de tanquirasa, Tank2, con un 85% de homología con Tank1 [Kaminker PG *et al.*, 2001; Cook BD *et al.*, 2002]. La sobre-expresión de Tank2 causa la rápida muerte celular.

PinX1 es una proteína nuclear que interactúa con Pin2/TRF1 y hTERT, inhibe la telomerasa y afecta la tumorigenicidad. La sobre-expresión de PinX1 conduce a una detención del crecimiento, la expresión de marcadores de senescencia y al acortamiento telomérico [Zhou XZ y Lu KP, 2001]. La expresión de PinX1 está reducida en muchos tumores humanos y una construcción antisentido contra el mRNA de PinX1 favorece la formación de tumores en ratones *nude* [Zhou XZ y Lu KP, 2001].

No se conoce aún a nivel molecular cómo las proteínas teloméricas reprimen distalmente la telomerasa localizada en *cis*. Se podría especular con que el plegamiento gradual de la cromatina telomérica en una configuración de orden superior podría dificultar la actividad de telomerasa. Se ha propuesto que el plegamiento de los telómeros humanos en *T-loops*, favorecidos por la unión de proteínas teloméricas brinda una forma de secuestrar la hebra G dificultando así al acceso de la telomerasa a su sustrato [Mergny JL *et al.*, 2002].

- g. Conexiones entre la regulación de la telomerasa y el *capping* del extremo.** Aquellos factores que están involucrados en el *capping*, como Rap1 y

el complejo Cdc13-Stn1-Ten1 en levaduras y TRF2 en vertebrados, se comportan como represores en *cis* de la telomerasa y la elongación telomérica [Grandin N *et al.*, 1997; Marcand S *et al.*, 1997; Smogorzewska A *et al.*, 2000; Grandin N *et al.*, 2001b]. Además, varios factores que intervienen en puntos de control del ciclo celular y la reparación del DNA parecen activar la telomerasa. Por ejemplo: Mec3 [Corda Y *et al.*, 1999], el complejo Rad50-Mre11-Xrs2/Nbs1, Rad1/Rad17/Mtr2 [Ahmed S y Hodgkin J, 2000] y para RPA, una proteína de unión a simple cadena [Mergny JL *et al.*, 2002]. De acuerdo con esto, una relajación transitoria de los complejos de protección del extremo en el momento de la replicación del telómero podría constituir un paso crucial para la activación de la telomerasa. En tal sentido, la telomerasa podría verse como un enzima de reparación de rupturas de doble cadena que actuaría sobre los telómeros parcial o temporalmente desprotegidos. Esto relaciona fuertemente la telomerasa con la estabilidad de los extremos cromosómicos.

Si bien los mecanismos involucrados en la regulación de la telomerasa no han sido completamente establecidos, el progresivo entendimiento de los mismos, está aportando las bases necesarias para la investigación y manipulación de la actividad de telomerasa como un potencial blanco terapéutico.

CAPÍTULO V

PERSPECTIVAS EN ONCOLOGÍA

La telomerasa está sobreexpresada en una gran proporción de los tumores humanos, mientras que su actividad no es detectable en la mayoría de las células somáticas normales, las cuales suelen tener telómeros más largos. Esta expresión diferencial hace de la telomerasa un blanco útil para el desarrollo de nuevas estrategias antitumorales, pero también un posible marcador universal tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de tumores e incluso para el seguimiento de las terapias convencionales.

LA TELOMERASA COMO MARCADOR PARA EL PRONÓSTICO Y EL DIAGNÓSTICO EN CÁNCER

Últimamente ha sido muy explorada la detección de la actividad de telomerasa y sus componentes esenciales (hTR y hTERT) en tumores malignos y en tejidos no cancerosos [Hiyama E e Hiyama K, 2002]. Como hemos mencionado previamente, en general, la expresión de hTERT está aumentada en casi todos los tumores humanos malignos, en algunos benignos, pero no en los tejidos normales con excepción de las células germinales, las células precursoras proliferativas y los linfocitos activados. Muchos trabajos han sido llevados a cabo para comprobar la utilidad de la telomerasa como un marcador para el diagnóstico del cáncer y, en alguna instancia, como un indicador con valor pronóstico del progreso de la enfermedad.

La detección de la telomerasa ha sido determinada en células derivadas de aspirados de mama con aguja fina [Hiyama E *et al.*, 2000] y biopsias de cáncer de esófago [Kubota M *et al.*, 2002]. También ha sido ensayada en diversos fluidos corporales incluyendo lavados bronquiales [Sen S *et al.*, 2001], ascitis [Tangkijvanich P *et al.*, 1999; Tseng CJ *et al.*, 2001], efusiones pleurales [Dejmek A *et al.*, 2001], orina [Muller M, 2002], lavados de vejiga [Fukui T *et al.*, 2001], enjuagados bucales [Sumida T *et al.*, 1998], jugos pancreáticos [Uehara H *et al.*, 1999] y plasma o sangre periférica [Soria JC *et al.* 1999; Gauthier RL *et al.*, 2001; Sapi E *et al.*, 2002] mostraron alta sensibilidad y especificidad para la detección de cáncer.

En muestras de tejidos, el nivel de la actividad de telomerasa ha constituido un factor pronóstico útil en diversos tipos de cáncer de adultos como gástrico y de colon

[Tatsumoto N *et al.*, 2000], neuroblastomas [Nozaki C *et al.*, 2000; Streutker CJ *et al.*, 2001] y mieloma múltiple [Shiratsuchi M *et al.*, 2002].

La detección de células tumorales en sangre periférica que tendrían la capacidad potencial de originar metástasis, ha sido otro campo de aplicación en el cual se ha utilizado la telomerasa o alguno de sus componentes como marcador. Así el mRNA de la hTERT ha sido ensayado como marcador molecular del cáncer gástrico [Shin JH *et al.*, 2002], el RNA de la telomerasa en cáncer de mama [Chen XQ *et al.*, 2000], y la actividad de telomerasa en cáncer de colon [Gauthier RL *et al.*, 2001] y de mama [Soria JC *et al.* 1999].

La detección de la telomerasa o de sus componentes podría constituir un marcador sensible y específico que, combinado con procedimientos no invasivos de toma de muestras, sería de gran utilidad tanto en el diagnóstico de ciertos tumores como en el monitoreo de las terapias aplicadas.

LA TELOMERASA Y EL TELÓMERO COMO BLANCOS DE TERAPIAS ANTITUMORALES: INHIBIDORES

En los últimos años se ha investigado exhaustivamente en este campo y se han desarrollado diferentes estrategias para inhibir el mantenimiento de la longitud telomérica por la telomerasa, con el objetivo de impedir el crecimiento tumoral, de las cuales haremos una síntesis (FIGURA 11). Cada uno de los componentes del complejo telomerasa constituye un blanco potencial para la búsqueda de inhibidores: la subunidad catalítica, el componente RNA, las otras proteínas asociadas y el telómero mismo.

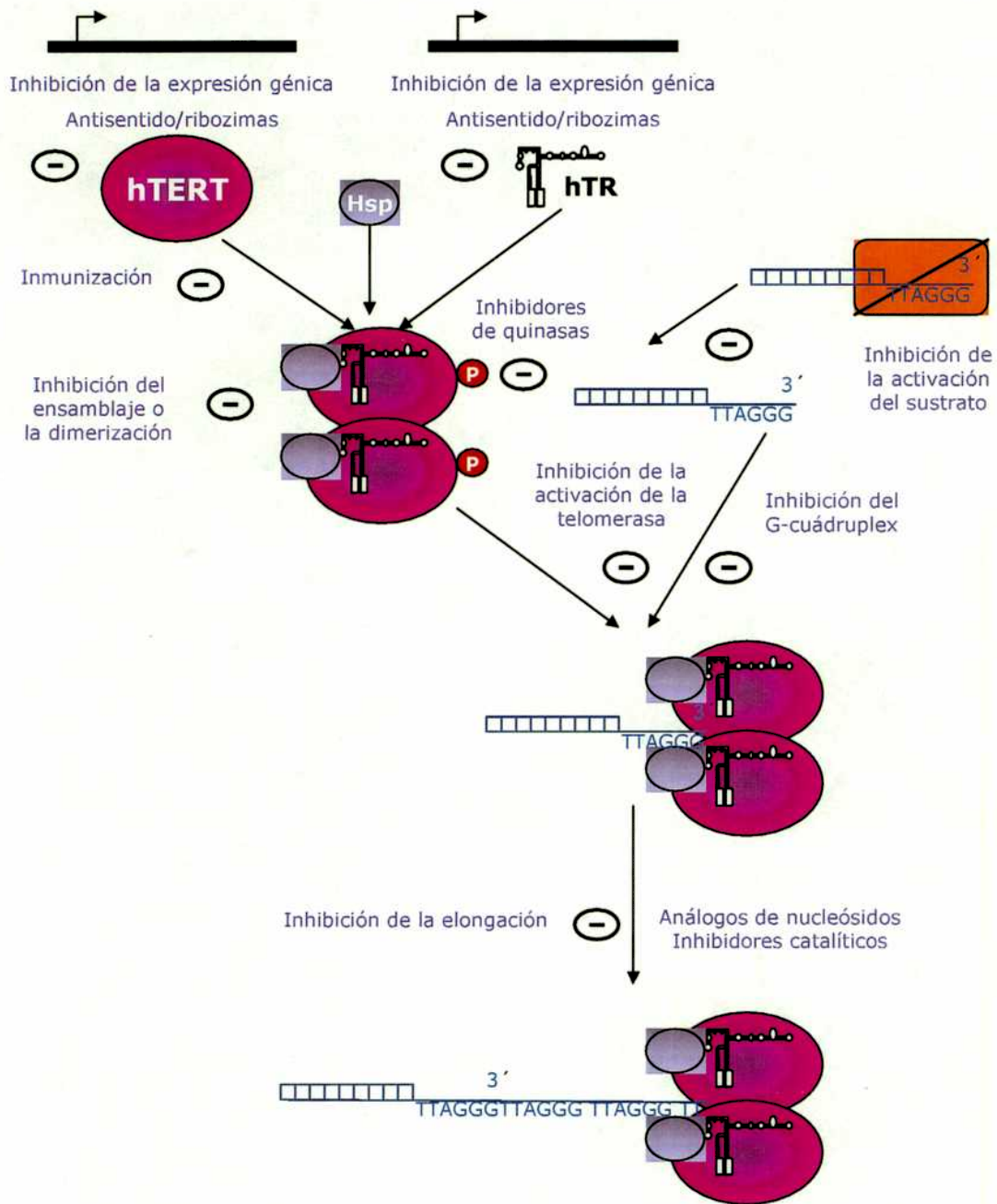


FIGURA 11: Estrategias para la inhibición de la telomerasa. Posibles vías de la inhibición farmacológica de la telomerasa dirigidas a sus componentes hTERT o hTR, o al DNA telomérico.

1. Dirigidos a la subunidad catalítica (hTERT)

a. Análogos de nucleósidos

Desde los trabajos de Strahl y Blackburn en *Tetrahymena termophila*, se han utilizado los análogos de nucleósidos, conocidos inhibidores de las retrotranscriptasas virales actuando como terminadores de cadena en la síntesis del DNA, para inhibir a la telomerasa [Strahl C y Blackburn EH, 1994]. Asociado al trabajo pionero de Kim de 1994 [Kim NW *et al.*, 1994] demostrando una fuerte asociación entre la actividad de telomerasa y el cáncer, el primer trabajo que vinculó a la AZT con los telómeros de células inmortales fue realizado en 1995 [Gomez DE *et al.*, 1995]. Otros autores demostraron que la AZT produjo el acortamiento telomérico *in vivo* en *T. termophila* pero en cambio, el comportamiento fue variable en cultivos de líneas de células T y B, probablemente debido a que en estas líneas la longitud telomérica está determinada por mecanismos dependientes e independientes de telomerasa [Strahl C y Blackburn EH, 1996].

Han sido ensayados otros inhibidores de retrotranscriptasas, pero no han mostrado alta selectividad para la telomerasa versus otras polimerasas. Entre los enantiómeros L de los NTPs, sólo han mostrado un efecto inhibitorio sobre la telomerasa L -dTTP y L -dGTP [Yamaguchi T *et al.*, 2000].

Recientemente, ha sido desarrollado un nucleósido que sería un potente inhibidor de la telomerasa, con una baja IC₅₀ (0.06 µM) y con relativa especificidad con respecto a otras retrotranscriptasas, el 6-tio-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato (TD-GTP) [Fletcher TM *et al.*, 2001].

Otros análogos que han sido capaces de inhibir la telomerasa *in vitro* son 2',3'-didesoxiguanosina 5' trifosfato, carbovir 5' trifosfato y D-carbociclic-2'-desoxiguanosina 5' trifosfato [Yegorov YE *et al.*, 1997; Fletcher TM *et al.*, 2001].

b. Otros inhibidores catalíticos

El *screening* de una biblioteca química que incluía 16.000 compuestos sintéticos, reveló que seis de ellos, cuatro derivados de isotiazolona y otros dos no relacionados, inhibían la actividad de telomerasa de extractos de células humanas en cultivo. El inhibidor más potente fue el 2-[3-(trifluorometil)fenil]isotiazolin-3-uno (TMPI), con una IC_{50} de 1 μ M. El estudio del tipo de inhibición fue realizado utilizando telomerasa parcialmente purificada de células de hepatoma de rata (AH7974), y resultó no competitiva para el *primer* de repeticiones teloméricas y mixta para los dNTPs. El TMPI no inhibió las DNA polimerasas humanas α y β , ni a la transcriptasa reversa del HIV, así la inhibición por TMPI fue altamente selectiva para la telomerasa [Hayakawa N *et al.*, 1999].

También se encontró una fuerte inhibición de la telomerasa por un grupo de rubromicinas y sus análogos, una clase de quinonas con actividad antibiótica, con una IC_{50} de 3 μ M aproximadamente para las rubromicinas β y γ , y para purpuromicina. La inhibición de la telomerasa por β -rubromicina sería competitiva por el *primer* telomérico, y mixta por los nucleótidos. β -rubromicina también inhibió fuertemente retrotranscriptasas virales, pero no tuvo efecto sobre otras enzimas modificadoras del DNA o RNA, incluyendo DNA y RNA polimerasas, desoxirribonucleasas y topoisomerasas [Ueno T *et al.*, 2000].

Otra serie de inhibidores de telomerasa que no son análogos de nucleósidos sino derivados de una amida carboxílica, fue desarrollada por Boehringer Ingelheim y fueron probados *in vitro* e *in vivo*. Mostraron una baja IC_{50} (0.093 μ M) y el tratamiento de células cancerosas con estos inhibidores condujo a un progresivo acortamiento telomérico sin citotoxicidad aguda, y a una reducción de la capacidad tumorigénica de las células tumorales tratadas con la droga *in vivo* [Damm K *et al.*, 2001].

c. Oligonucleótidos antisentido y ribozimas

La estrategia antisentido no ha sido tan utilizada contra el mRNA de la subunidad catalítica de la telomerasa como contra el componente de RNA. Fueron diseñados oligonucleótidos fosforotioatos antisentido (PTO) contra la hTERT y fueron probados en la línea celular DU145 de cáncer de próstata. La viabilidad de las células se redujo significativamente después de 15 días de tratamiento con

una concentración de 5-15 μ M de los oligonucleótidos, pero sin reducción de la longitud telomérica, incluso luego de 45 días [Schindler A *et al.*, 2001].

En ratón, un oligonucleótido antisentido contra la mTERT que abarcaba el codón de iniciación de la traducción, inhibió la producción de la proteína en neuronas cerebrales en desarrollo [Fu W *et al.*, 2000].

También ha sido ensayado el uso de ribozimas contra la hTERT mediante procedimientos de transfección estables y transientes. La mayor inhibición encontrada fue obtenida con una ribozima dirigida 13 nt corriente abajo del extremo 5' del mRNA de la hTERT [Yokoyama Y *et al.*, 2000].

d. Inhibidores de la fosforilación de la hTERT

Dado que había sido demostrada que la inhibición de la PKC disminuía la actividad de la telomerasa en células de carcinoma nasofaríngeo humano, se probaron oligonucleótidos antisentido dirigidos contra los distintos isotipos de la PKC en estas células. La actividad de la telomerasa fue inhibida por los oligos dirigidos contra la PKC- ζ , demostrando la participación de la enzima en la regulación de la telomerasa mediante la fosforilación directa o indirecta de las proteínas del complejo [Yu CC *et al.*, 2001]. Dos inhibidores de PKC (bis-indolilmaleimida I y H-7) también produjeron una fuerte inhibición de la telomerasa en las células tratadas. Pero si bien la inhibición de la actividad de telomerasa por inhibidores de PKC parece ser específica, dado que las células tratadas son viables y mantienen la capacidad de síntesis de proteínas [Ku WC *et al.*, 1997], es difícil pensar que sólo sería afectada la fosforilación de la hTERT sin interferir con la de otros blancos fisiológicos de la PKC.

e. Inhibidores de la transcripción de hTERT

La inhibición de la transcripción del gen que codifica para la hTERT constituye una estrategia escasamente explorada. Se encontró que el arsénico, un compuesto efectivo en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, inhibía la transcripción de la hTERT, posiblemente por disminuir las actividades de los factores de transcripción c-Myc y Sp1 [Chou WC *et al.*, 2001].

2. Dirigidos al componente de RNA

Si bien el componente RNA de la telomerasa, a diferencia de la subunidad catalítica, se expresa en tejidos normales, los cuales no presentan actividad de esta enzima, no se ha encontrado hasta ahora una función para el hTR en las células negativas para telomerasa. En consecuencia, se esperaría que una terapia basada en la inhibición del hTR no fuera tóxica en las células normales que no muestran actividad de telomerasa.

a. Oligonucleótidos antisentido

La utilización de oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el hTR ha sido ampliamente explorada. Originalmente se transfectaron células de un glioma maligno humano con un vector antisentido contra el hTR, y después de 30 duplicaciones algunas subpoblaciones sufrieron apoptosis pero las células que sobrevivieron, mostraron una reducción en la síntesis de DNA, en la capacidad invasiva y en tumorigenicidad en ratones *nude*. Otras subpoblaciones que no gatillaron apoptosis en cambio expresaron marcadores asociados a un estadio diferenciado [Kondo S *et al.*, 1998a].

Otra estrategia que mostró alta selectividad y también una inhibición eficiente, es la utilización de PNAs (ácidos nucleicos peptídicos), en los cuales la columna de azúcar-fosfato ha sido reemplazada por *N*-(2-aminoetil)glicina, y que reconocen el hTR, alcanzando valores de IC₅₀ en el rango picomolar a nanomolar [Norton JC *et al.*, 1996]. La introducción de los mismos en células humanas inmortales inhibió la actividad de telomerasa en células intactas, acortó los telómeros y arrestó la proliferación celular después de 5 a 30 generaciones celulares [Shammas MA *et al.*, 1999]. La inhibición por PNAs es de 10 a 50 veces más eficiente que la inhibición por oligómeros fosforotioatos (PS) análogos, que inhiben la telomerasa en una forma que no es selectiva para la secuencia [Norton JC *et al.*, 1996]. El 2'-*O*-metil-RNA (2'-*O*-MeRNA) inhibe la telomerasa con una potencia superior a la de los PNAs, a pesar de tener una afinidad menor por el RNA complementario [Pitts AE y Corey DR, 1998; Herbert B *et al.*, 1999]. Los 2'-*O*-metoxietil-RNAs (2'-MOE) poseen propiedades farmacocinéticas favorables e

inhiben la telomerasa humana con valores de IC_{50} entre 5 y 10 nM [Elayadi AN *et al.*, 2001].

Los oligonucleótidos antisentido 2',5'-oligoadenilato (2-5A) dirigidos contra el RNA de la telomerasa también se unen eficientemente [Kondo S *et al.*, 1998b; Kushner DM *et al.*, 2000]. Un 2',5'-oligoadenilato es unido al oligonucleótido para reclutar y activar una endorribonucleasa específica (RNasa L) al sitio blanco de la secuencia del RNA. El tratamiento con 2-5A en células de glioma maligno humano suprimió el crecimiento de las células e indujo apoptosis *in vitro* y el tratamiento de tumores crecidos en ratones *nude* con estos oligonucleótidos antisentido inhibió la supervivencia de las células tumorales [Kondo S *et al.*, 1998b; Mukai S *et al.*, 2000].

Varios derivados de fosforamidato han sido ensayados contra la telomerasa *in vitro*, incluyendo 2'-desoxi-, hidrox-, metoxi- y fluoro-N3→'P5'fosforamidatos (NPs). Estos compuestos mostraron especificidad de secuencia y actividades dependientes de la dosis con valores de IC_{50} menores a 1 nM, en varias líneas celulares [Gryaznov S *et al.*, 2001]. La unión de los oligonucleótidos NP a su sitio alostérico en el hTR resulta en una marcada disminución en la afinidad de la enzima por el sustrato (el *primer* de DNA de cadena simple) [Pruzan R *et al.*, 2002].

b. Ribozimas

Una ribozima dirigida contra el componente de RNA de la telomerasa humana mostró una actividad de clivaje específica para el hTR e inhibió la actividad de telomerasa en extractos celulares [Kanazawa Y *et al.*, 1996]. Cuando ribozimas anti-hTR fueron introducidas en células de carcinoma de endometrio o melanoma, se redujo la actividad de telomerasa [Yokoyama Y *et al.*, 1998; Folini M *et al.*, 2000].

c. El dúplex RNA/DNA

Otro blanco posible de inhibición de la telomerasa lo constituye el dúplex de RNA/DNA que se forma temporalmente durante la síntesis del DNA telomérico

por la transcripción reversa a partir del componente RNA de la telomerasa. Las moléculas que se pudieran unir a este dúplex podrían inhibir la enzima previniendo la disociación de las hebras o por una suficiente disociación del sustrato, causando el alineamiento incorrecto de residuos catalíticos clave. Algunos intercalantes han mostrado actividad antitelomerasa en el rango micromolar bajo [Francis R *et al.*, 2001].

3. Dirigidos a proteínas asociadas

En este sentido, básicamente se han probado drogas dirigidas a las chaperonas necesarias para el ensamblaje de la telomerasa (Hsp90), pero las mismas interferirían con muchos otros procesos celulares, además de inhibir la telomerasa [Holt SE *et al.*, 1999; Masutomi K *et al.*, 2000; Wadhwa R *et al.*, 2000].

4. Dirigidos al DNA telomérico

El sustrato de la enzima, en este caso el telómero, también puede constituir un blanco para la inhibición de la misma. Los telómeros se encuentran en todas las células, independientemente de su actividad de telomerasa, pero, a diferencia del hTR, ellos sí tienen una función conocida y fundamental incluso en las células sin actividad de telomerasa, que es la protección (*capping*) de los extremos cromosómicos. Las moléculas que pudieran interaccionar con el telómero podrían tener efecto también en las células que mantienen su longitud telomérica por mecanismos independientes de telomerasa (ALT), pero también sobre células normales (mortales), conduciendo a una toxicidad no deseada [Mergny JL *et al.*, 2002].

a. Agentes antitumorales

Dentro de la serie de agentes antitumorales utilizados corrientemente, algunos muestran la capacidad de inhibir la telomerasa. Por ejemplo, el cisplatino, que reduce la actividad de telomerasa en una forma específica y dependiente de la concentración en células testiculares tumorales humanas [Burger AM *et al.*, 1997], aunque no lo hace en células de cáncer nasofaríngeo [Ku WC *et al.*, 1997]. La vincristina, en dosis subletales, indujo una reducción en

la actividad de telomerasa en tres diferentes líneas celulares humanas de linfomas, pero sin una disminución de los niveles del mRNA de hTERT [Lin Z *et al.*, 2001]. El etopósido, un inhibidor conocido de la topoisomerasa II también puede interferir con la replicación del DNA telomérico sin inhibir la telomerasa, sino por las lesiones de la topoisomerasa a nivel de los telómeros [Yoon HJ *et al.*, 1998; Lee CC y Huang TS, 2001].

b. G-cuádruplex (G4)

El DNA cromosómico en ciliados, levaduras y vertebrados termina en un extremo 3' de cadena simple extendido, que en humanos puede estar involucrado en diversas conformaciones como *T-loops* [Griffith JD *et al.*, 1999], de tríplex [Voloshin ON *et al.*, 1992] o G-cuádruplex [Oka Y y Thomas CA, 1987; Sen D y Gilbert W, 1988; Sundquist WI y Klug A, 1989]. EL complejo telomerasa requiere que el *primer* de DNA telomérico se encuentre en forma de cadena simple para que ocurra una hibridación efectiva con el templado de RNA. De la misma forma, la función quiescente de *capping* de la telomerasa requiere un extremo de cadena simple para una unión efectiva. Así, el plegamiento de las repeticiones teloméricas en la proximidad del extremo 3' en una estructura de DNA de orden superior puntualiza la forma de dificultar ambos procesos. Hace algunos años se demostró que la formación de un cuádruplex de DNA inactivaba la telomerasa [Zahler AM *et al.*, 1991]. Esto fue deducido a partir de la observación de que una molécula que favorecía la formación del cuádruplex fijaba al sustrato telomérico en una conformación que ya no era reconocida o extendida por la enzima. Así se puede plantear la estabilización del G-cuádruplex como una estrategia antitumoral [Mergny JL y Helene C, 1998; Mergny JL *et al.*, 1999], la cual sería aplicable en principio tanto a células tumorales con actividad de telomerasa como a aquellas con un fenotipo ALT. Gran parte de la evidencia de la participación de los G-cuádruplex proviene de la demostración de las correlaciones entre la afinidad de unión al cuádruplex y la inhibición de la telomerasa en varios estudios utilizando la secuencia telomérica humana, y una serie de diversos ligandos [Koeppel F *et al.*, 2001; Read M *et al.*, 2001; Mergny JL *et al.*, 2001].

Una diferencia con el modelo de inhibición convencional de la telomerasa es que no es necesaria la reducción de la longitud telomérica para el inicio de una

respuesta a los ligandos del G-cuádruplex. Por el contrario, se ha encontrado relativamente rápido una inhibición selectiva del crecimiento celular y consecuente senescencia o apoptosis.

Evidencia adicional en apoyo a este modelo surge de la demostración de fusiones entre extremos cromosómicos a partir de cambios en la longitud telomérica [McEachern MJ *et al.*, 2000b] y, más recientemente, la demostración directa de efectos antitumorales [Gowan SM *et al.*, 2002]. Parece que los telómeros más cortos en una población son los más sensibles a tales efectos y los que conducen a la senescencia [Hemann MT *et al.*, 2001]. Este hallazgo tiene importantes implicancias en la futura utilidad clínica de esta clase de inhibidores, ya que claramente indican que no requieren un extenso período de tiempo para que sus efectos sean significativos.

En los últimos años ha sido encontrado un gran número de ligandos del cuádruplex, la mayoría con modesta potencia inhibitoria ($IC_{50} > 1 \mu M$), pero algunos con valores de IC_{50} entre 0.02 y 0.2 μM [Read M *et al.*, 2001; Mergny JL *et al.*, 2001; Koeppel F *et al.*, 2001; Gowan S *et al.*, 2001].

El temprano descubrimiento de que el bromuro de etidio, un agente intercalante convencional del dúplex de DNA, podía unirse a al DNA telomérico [Guo Q *et al.*, 1992], sugirió que este compuesto podría inhibir la telomerasa. El estudio de una serie de compuestos de antraquinonas sustituidas (desarrolladas originalmente como agentes citotóxicos convencionales) ejercieron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la telomerasa humana [Sun D *et al.*, 1997]. Estos compuestos pueden tener selectividad para distintos tipos de estructuras del DNA (inicialmente DNA triple versus doble cadena), y, en base a consideraciones de modelos moleculares, se sugirió que ellos podían interactuar con el DNA cuádruplex, y que esa era la base de su inhibición de la telomerasa [Neidle S y Parkinson G, 2002].

Miles de moléculas han sido ensayadas en su capacidad de inhibidores de telomerasa basados en G4, y se encontraron por lo menos estas familias de ligandos independientes: derivados de etidio [Koeppel F *et al.*, 2001], dibenzofenantrolinas [Read M *et al.*, 2001], triazinas [Riou JF *et al.*, 2002],

bisacridinas [Alberti P *et al.*, 2001] y porfirinas [Izbicka E *et al.*, 1999]. Sólo unos pocos de estos ligandos han sido ensayados en células. Las porfirinas son absorbidas rápidamente en el núcleo de células tumorales en cultivo [Izbicka E *et al.*, 1999] y ha sido analizada su citotoxicidad en células humanas normales (de mama y fibroblastos) y tumorales representando modelos seleccionados para alta actividad de telomerasa y telómeros cortos (carcinomas de mama y próstata y linfoma). La inhibición de la telomerasa observada ocurre en paralelo con el arresto del crecimiento celular en G2/M.

Se está trabajando intensamente en este campo en la búsqueda de ligandos del G4, las estrategias abarcan el diseño racional basado en la estructura, búsqueda informática y el *screening* convencional en bibliotecas químicas existentes [Neidle S y Parkinson G, 2002]. Un compuesto diseñado por modelado computacional de pequeño tamaño ha sido recientemente descrito, la 9-[4-(N, N-dimetilamino) fenilamino]-3, 6- bis(3-pirolodinopropionamido)acridina (BRACO19). Con una IC₅₀ de 115 nM representa uno de los inhibidores más potentes de la telomerasa humana en condiciones libres de células, además posee baja citotoxicidad no específica, efectos inhibitorios del crecimiento y de inducción de senescencia en una línea celular de cáncer de mama humano y, además, una significativa actividad antitumoral *in vivo* cuando es administrado después del tratamiento con paclitaxel a ratones portadores de un carcinoma humano xenógrafo subcutáneo [Gowan SM *et al.*, 2002].

c. Imitación del telómero

Se han llevado a cabo una serie de estudios de inhibición de la telomerasa utilizando oligonucleótidos PS con motivos de secuencia telomérica con diferentes longitudes y secuencias. También fue estudiado el rol del extremo 3' y la estructura secundaria de estos "imitadores" del telómero, encontrando que la inhibición de la telomerasa requiere nucleótidos de guanina en el extremo 3' [Page TJ *et al.*, 1999]. El mejor compuesto encontrado para esta función es un oligodesoxinucleótido fosforotioato de 9 bases de longitud (GGGTTAGGG) con una IC₅₀ de 0.3 μM.

5. Varios

Existe un número creciente de inhibidores que son activos contra la telomerasa pero cuyo blanco es desconocido, pudiendo ser tanto la subunidad catalítica, el RNA o el sitio de reconocimiento de la holoenzima.

a. Terapia suicida

Dado que la telomerasa es expresada principalmente en células tumorales, han sido utilizadas secuencias regulatorias de la transcripción de la telomerasa (*hTR* y *hTERT*) para dirigir la síntesis de un gen suicida y así eliminar selectivamente las células cancerosas. Por ejemplo, estas secuencias regulatorias han sido ligadas al gen de la cadena A de la toxina de la difteria (*DT-A*) en vectores de expresión. En células de carcinoma hepatocelular y de vejiga transfectadas con estos plásmidos se ha producido una inhibición de la síntesis de proteínas [Abdul-Ghani R *et al.*, 2000]. La inducción de la expresión del gen *Bax* mediante el promotor de *hTERT* desencadenó la apoptosis específica de tumor *in vitro* y suprimió el crecimiento tumoral en ratones *nude* [Gu J *et al.*, 2000]. En este mismo sentido, se utilizó un vector de expresión de caspasa-8 dirigido por el promotor de *hTERT* y la apoptosis fue restringida a células tumorales con actividad de telomerasa, en cambio no fue observada en fibroblastos normales que carecen de tal actividad. Además, el tratamiento de tumores subcutáneos en ratones *nude* con la construcción *hTERT/caspasa-8* inhibió el crecimiento tumoral e indujo apoptosis [Koga S *et al.*, 2000]. En células de glioma maligno fue ensayada una construcción similar pero con caspasa-6 (*hTERT/caspasa-6*), en las cuales llevó a la inducción de apoptosis, pero no lo hizo en astrocitos, fibroblastos y células ALT, que no expresaban telomerasa [Komata T *et al.*, 2001]. Otro estudio fusionó el gen de la timidina quinasa al promotor de *hTERT*, el cual sensibiliza a las células al ganciclovir. Así, el promotor de *hTERT* aparece como un promotor fuerte y específico para células tumorales con potencial utilidad en terapia génica contra el cáncer para alcanzar la muerte selectiva de las células cancerosas.

b. Inmunoterapia

Dado que la hTERT se expresa principalmente en células tumorales podría ser vista como una especie de antígeno asociado al tumor y convertirse en un blanco atractivo para la inmunoterapia. La subunidad catalítica de la telomerasa es capaz de gatillar una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL) [Vonderheide RH *et al.*, 1999; Minev B *et al.*, 2000], sin embargo, no se encontró un efecto CTL en células hematopoiéticas normales CD34⁺, positivas para telomerasa. La inmunización contra TERT estimula los linfocitos T citotóxicos, los cuales lisaron células tumorales de melanoma y timoma e inhibieron el crecimiento de tumores no relacionados en ratones con distintos fondos genéticos [Nair SK *et al.*, 2000]. Estudios preliminares no han revelado manifestaciones autoinmunes resultantes de la vacunación con TERT [Nair SK *et al.*, 2000] y hTERT podría ser considerada como un candidato a una especie de “vacuna universal” contra el cáncer.

c. Blanco desconocido

Han sido publicados varios compuestos capaces de inhibir la telomerasa en un rango de IC₅₀ entre 1 y 30 μM en general, pero sin un conocimiento preciso de su mecanismo de acción. Entre ellos podemos mencionar dos quinolonas, ofloxacina y levofloxacina [Yamakuchi M *et al.*, 1997], derivados de bis-indol aniónico [Sasaki S *et al.*, 2001], catequinas de té que llevaron al acortamiento telomérico e inducción de senescencia en células tumorales [Naasani I *et al.*, 1998], el metabolito de origen fúngico alterperinol [Togashi K *et al.*, 1998], el compuesto FJ5002, derivado de un inhibidor de la familia de chaperonas hsp70 [Naasani I *et al.*, 1999] y la telomestatina, un potente inhibidor de la telomerasa aislado de *Streptomyces anulatus* [Shin-Ya K *et al.*, 2001], con una IC₅₀ de 0.005 μM, la cual la convierte en el más potente inhibidor de la telomerasa (entre las moléculas pequeñas) descrito hasta el momento.

Por último, también cabe mencionar que el DMSO mismo también es capaz de afectar la actividad de la telomerasa, pero han sido reportados efectos contradictorios. En bajas concentraciones, podría actuar como un agente diferenciador conduciendo a la represión de la telomerasa [Bestilny LJ *et al.*, 1996], sin embargo, dosis menores (< 0.07%) indujeron un incremento de 2 a 3 veces en la actividad de la telomerasa en línea celulares epiteliales de ovario

[Alfonso De Matte MY *et al.*, 2001]. Es necesario tener en cuenta esta información dado que el DMSO suele usarse como solvente de moléculas poco solubles en agua y muchos inhibidores farmacológicos de la telomerasa pueden contener cantidades comparables a las mencionadas de este solvente.

En suma, el mantenimiento del telómero es una característica fundamental que distingue las células cancerosas de las normales y la telomerasa y la longitud telomérica constituyen marcadores consistentes tanto para el diagnóstico como para la validación de terapias antitumorales. El hecho de que unos pocos tipos celulares no tumorales expresen también hTERT, tales como las células precursoras, no debería dificultar la terapia anti-telomerasa de las células cancerosas, ya que poseen telómeros mucho más largos y su acortamiento hasta una longitud crítica tomaría más ciclos de replicación que en las células tumorales.

Como otra ventaja adicional, podemos mencionar que la telomerasa es prevalente en casi todos los tumores sólidos como también en los cánceres hematológicos, con lo cual existe una amplia variedad de tipos tumorales en los cuales se podrían iniciar los ensayos clínicos con inhibidores de telomerasa.

**ACORTAMIENTO IRREVERSIBLE DE LOS TELÓMEROS POR
TRATAMIENTO PROLONGADO CON 3'-AZIDO- 2', 3'-
DIDEOXITIMIDINA (AZT) EN UNA LÍNEA TUMORAL HUMANA**

INTRODUCCIÓN

Distintas líneas de evidencia indican que la telomerasa y la longitud de los telómeros juegan un importante rol en la senescencia replicativa. Esta constituye la primer barrera que previene la proliferación indefinida de las células en cultivo, y parece ser un importante mecanismo supresor de tumores en animales [Reddel RR, 2000; Sager R, 1991; Wright WE y Shay JW, 2001]. Con los sucesivos pasajes en cultivo, los telómeros se acortan en cada división celular, y así, las células senescentes tienen típicamente telómeros más cortos que las células primarias [Counter CM *et al.*, 1992; Hastie ND *et al.*, 1990; Harley CB *et al.*, 1990]. Además, las células de cultivos primarios y las senescentes expresan en general bajos niveles de telomerasa. En contraste, la mayoría de las células inmortales y tumorales mantienen la longitud de los telómeros y expresan telomerasa [Counter CM *et al.*, 1992; Bryan TM *et al.*, 1997; Holt SE *et al.*, 1996; Kim NW *et al.*, 1994; Murnane JP *et al.*, 1994].

Los telómeros en las células tumorales son, en general, significativamente más cortos que en el tejido somático normal. Esto ha sido sugerido en función del incremento en el número de divisiones de las células del tumor, que en principio pueden carecer de actividad de telomerasa, perdiendo así más repeticiones teloméricas que las células de los tejidos circundantes. Cuando la telomerasa es reactivada en estas células cancerosas, la longitud de los telómeros se estabiliza en una longitud menor [Strahl C y Blackburn EH, 1996].

Estos hallazgos sugieren que la erosión de los telómeros podría ser el mecanismo por el cual las células registran su historia replicativa, en ausencia de un mecanismo de elongación telomérica. Los telómeros cortos podrían iniciar la senescencia replicativa [Allsopp RC y Harley CB, 1995; Harley CB, 1991; Olovnikov AM, 1973; Reddel RR, 1998]. Efectivamente, la expresión constitutiva de un gen de telomerasa exógeno que previene el acortamiento telomérico permite la proliferación indefinida de algunos tipos celulares humanos, tales como fibroblastos y células epiteliales pigmentarias de retina [Zhu J *et al.*, 1999; Yang J *et al.*, 1999; Vaziri H y Benchimol S, 1998; Halvorsen TL *et al.*, 1999; Counter CM *et al.*, 1998a; Bodnar AG *et al.*, 1998].

Inversamente, la inhibición de la telomerasa en células cancerosas o inmortales conduce al acortamiento telomérico y eventual senescencia o muerte celular [Bisoffi M *et al.*, 1998; Hahn WC *et al.*, 1999a; Herbert B *et al.*, 1999; Zhang X *et al.*, 1999]. Por lo tanto, si el mantenimiento de la longitud de los telómeros constituye un prerrequisito para la continuidad del crecimiento de los tumores, el acortamiento telomérico puede ser considerado como un mecanismo supresor de tumores [Kim NW *et al.*, 1994; de Lange T, 1998).

La utilización de agentes inhibidores de telomerasa sobre células tumorales podrían revertir el estado de immortalización que las caracteriza conduciéndolas a la senescencia celular mediante el acortamiento de sus secuencias teloméricas. La subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) parece ser el blanco de elección para inhibir la actividad de telomerasa, dado que esta proteína es el factor limitante en la actividad del complejo enzimático. Una motivación fuerte para la elección de este blanco es la existencia de inhibidores de transcriptasas reversas que ya son empleados a nivel clínico [Mergny JL *et al.*, 2002].

La conservación de las subunidades TERT entre eucariotas apoya el modelo que propone que la telomerasa posee un core conservado (TERT más la subunidad de RNA), mientras que las otras subunidades de la holoenzima serían más variables entre las especies [Bryan TM *et al.*, 1998]. Además de las telomerasas, las retrotranscriptasas (RT) son codificadas por una amplia variedad de elementos genéticos parasitarios que comparten poco de su organización genómica o de sus métodos de propagación y cuya única conexión es la presencia de genes RT. Estudios filogenéticos moleculares, muestran las semejanzas de las retrotranscriptasas virales con la telomerasa [Nakamura TM y Cech TR, 1998], y han sugerido la posibilidad de que la actividad de telomerasa pudiera ser inhibida *in vitro* por análogos de nucleósidos que actúan como terminadores de cadena. Los análogos de nucleósidos fueron inicialmente evaluados contra la telomerasa de ciliados [Strahl C y Blackburn EH, 1994]. Algunos nucleósidos inhibidores de las transcriptas reversas han mostrado una actividad anti-telomerasa [Fletcher TM *et al.*, 1996; Fletcher TM *et al.*, 2001].

La 3'-Azido-2', 3'-dideoximidina (AZT, azidotimidina o zidovudina), el primer análogo de nucleósido usado para el tratamiento del sida, bloquea la replicación del virus de inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1) por inhibir competitivamente la transcriptasa reversa [Cheng YC *et al.*, 1987; Furman PA *et al.*, 1986]. Estudios

previos han demostrado que a pesar de la baja afinidad de AZT-5'-trifosfato por las DNA polimerasas de mamíferos [White EL *et al.*, 1989; Huang P *et al.*, 1990; Vazquez-Padua MA *et al.*, 1990], AZT puede ser incorporada en DNA eucariótico. Esto ha sido demostrado en una línea celular de leucemia [White EL *et al.*, 1989], células linfoblastoides T [Sommadossi JP *et al.*, 1989] y líneas celulares de hámster, ratón y humanas [Olivero OA *et al.*, 1994; Olivero OA y Poirier MC, 1993].

Por otra parte, se ha demostrado la incorporación preferencial de AZT en las secuencias teloméricas de células CHO (Chinese hamster ovary), una línea celular inmortalizada que presenta actividad de telomerasa. Sin embargo, células con largas repeticiones teloméricas que carecen de actividad de telomerasa, no exhibieron tal unión preferencial de AZT en sus telómeros, sugiriendo que la telomerasa podría mediar este fenómeno [Gomez DE *et al.*, 1995].

Por lo tanto, si la AZT es capaz de inhibir la telomerasa de una línea de células tumorales, el tratamiento a largo plazo de las mismas con este análogo de nucleósido podría provocar el acortamiento progresivo de sus telómeros conduciéndola a la senescencia replicativa. El objetivo inicial de nuestro trabajo fue, entonces, evaluar si la exposición prolongada a AZT de células HeLa de carcinoma cervical humano en cultivo, producía el acortamiento de sus secuencias teloméricas, y si así ocurría, estudiar la reversibilidad del proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuesto

Para el tratamiento *in vitro*, la AZT (Sigma) fue disuelta en agua desionizada y luego diluida en el medio de cultivo.

Células tumorales y condiciones de cultivo

El stock de células HeLa (ATCC, Rockville, MD) fue mantenido en medio esencial mínimo Eagle (EMEM, Bio Whittaker, Walkersville, MD) suplementado con 8% de suero fetal bovino (Intergen, Purchase, NY) y antibióticos, en cultivo en monocapa en frascos plásticos de 25 cm² y 75 cm² (Corning y Nunc) a 37°C, en una atmósfera humificada con 5% CO₂ en aire. Las células fueron rutinariamente tripsinizadas al alcanzar confluencia siguiendo los procedimientos corrientes, e incubadas en EMEM sin suero durante 30-60 minutos a 37°C para su recuperación. La cuantificación del número de células fue realizada por recuento en hemocitómetro. En todos los casos, la viabilidad fue superior al 90%, según el ensayo de exclusión con azul tripán.

Tratamiento *in vitro* con AZT

Los cultivos celulares de HeLa fueron expuestos a tratamiento crónico con AZT, a una concentración de 800 µM. El rango de concentraciones de AZT hallado en la literatura que es capaz de inhibir el crecimiento de líneas tumorales, es muy amplio [Melana SM *et al.*, 1998], por lo tanto para el tratamiento crónico de las células HeLa seleccionamos una dosis que había sido ensayada en nuestro grupo y promovía la incorporación preferencial de AZT en las secuencias teloméricas [Gomez DE *et al.*, 1995]. Las células HeLa control fueron mantenidas en las mismas condiciones de cultivo sin AZT. Después de cultivarlas con AZT por 15 pasajes, la mitad de los frascos fueron cambiados a un medio de cultivo sin AZT y rotulados con las letras "PR", indicando el número de pasaje después de la remoción de la AZT del medio de cultivo.

Proliferación celular

Para determinar el número de divisiones celulares por pasaje, las células HeLa fueron crecidas en EMEM conteniendo 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]-timidina (25 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL) por 72 horas. Luego, las células fueron transferidas a placas de 6 wells y cultivadas en medio EMEM sin [^3H]-timidina. La radioactividad del DNA aislado a partir de las células en el momento de la transferencia fue considerado como "Tiempo 0" y cualquier dilución de la marca radioactiva después de 24 horas de cultivo fue considerado como el resultado de la replicación del DNA.

Extracción del DNA y digestión con enzimas de restricción

Se recolectaron células a partir de cada pasaje en presencia de AZT y fue extraído el DNA de alto peso molecular utilizando un procedimiento de extracción sin solventes orgánicos (Oncor, Gaithersburg, MD). El DNA fue digerido con las nucleasas de restricción Alu I, Rsa I y Sau 3A I (New England Biolabs, Beverly, MA) por 2 horas a 37°C.

Southern blotting

El DNA de HeLa digerido fue resuelto en un gel de agarosa 1% con un marcador molecular marcado con digoxigenina (Molecular Marker III, Boheringer Mannheim, IN). El DNA fue transferido a una membrana de nylon por capilaridad e inmovilizado y ligado a las membranas mediante luz UV. Las membranas fueron bloqueadas durante 30 min a 45°C con solución de bloqueo (Oncor) e hibridado con una sonda telomérica humana marcada con digoxigenina (200 ng/ml Hybrisol III, Oncor) durante toda la noche en una bolsa sellada a 45°C. Después de la hibridación se realizaron lavados con una solución de 0.16 X SSC/0.1% SDS por 1 h a 60°C. Las membranas luego fueron bloqueadas con una solución al 5% de leche descremada en TBS-Tween (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.2% Tween 20, pH 7.5) a temperatura ambiente por 30 min. El anticuerpo antidigoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Boheringer Mannheim) fue diluido 1:3000 en una solución al 5% de leche descremada en TBS-Tween y utilizado para incubar las membranas por 30 min con agitación. Después de lavar por 20 min en TBS-Tween, las membranas fueron teñidas usando 200 μl del sustrato de la fosfatasa alcalina, 5-bromo-4-cloro-3 indolilfosfato, sal de toluidina, (BCIP), junto con nitro blue cloruro de tetrazolio (NBT) (solución stock de NBT/BCIP Boheringer Mannheim) diluido en 10 ml de solución de tinción (0.1 M Tris-buffer, 0.05 M MgCl_2 , 0.1 M NaCl, pH 9.5).

Las membranas fueron sumergidas en solución de tinción a 37°C hasta que se desarrolló color azul, fueron lavadas con agua destilada, secadas con papel de filtro y fotografiadas.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Células HeLa cultivadas *in vitro* por 13 pasajes con o sin AZT fueron crecidas en cámaras Labteck. Las células fueron fijadas en formalina y desnaturalizadas con una solución de formamida al 70% a 70°C por 2 min. Los portaobjetos fueron incubados toda la noche con una sonda telomérica biotinilada (14.8 ng/muestra, Oncor) y lavados con una solución de post-hibridación conteniendo 50% de formamida. La detección de la señal telomérica biotinilada fue alcanzada con avidina marcada con fluoresceína (Oncor) y el núcleo fue contrateñido con yoduro de propidio. Los portaobjetos fueron fotografiados con un microscopio Nikon Labphot equipado para epifluorescencia (lámpara HMX-HBO-100w). Un filtro de doble paso fue utilizado para capturar simultáneamente las señales de la fluoresceína y del yoduro de propidio. Una película de luz-día Kodak Ektachrome (ASA 400) fue usada para las fotografías de inmunofluorescencia.

RESULTADOS

Proliferación celular

La cuantificación del DNA con [³H]-timidina incorporada, por dilución de la marca debido a la proliferación celular, reveló que en las células control tienen lugar 1.1 ciclos de replicación cada 24 h. Esto arrojaría un tiempo de duplicación teórico de aproximadamente 22 horas. En cambio, en las células tratadas con AZT y en las células posteriormente recuperadas, ocurren 1.5 y 1.8 ciclos, respectivamente.

El tratamiento con AZT induce acortamiento telomérico en células HeLa

El DNA de células HeLa tratadas *in vitro* por 0 (control), 4 y 15 pasajes con AZT (FIGURA 12, calles 1 a 3), y células HeLa tratadas por 15 pasajes con AZT y luego transferidas a un medio sin AZT por 6 y 25 pasajes (FIGURA 12, calles 4 y 5), fue analizado con una sonda telomérica humana marcada con digoxigenina en un Southern blot.

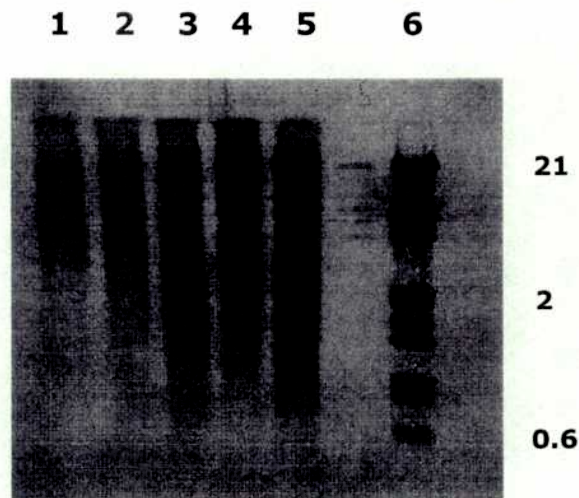


FIGURA 12: Southern blot. Calle 1: células HeLa sin tratar. Calles 2 y 3: células HeLa tratadas con AZT durante 4 y 15 pasajes, respectivamente. Calles 4 y 5: células HeLa tratadas por 15 pasajes con AZT y luego crecieron en medio sin AZT por 6 y 15 pasajes, respectivamente. Calle 6: marcador molecular conjugado a digoxigenina.

Una clara disminución en el tamaño del fragmento telomérico fue observada al aumentar el número de pasajes con AZT en cultivo. El tamaño alcanzado en el pasaje 15 se mantuvo, aun después de cultivar las células durante 25 pasajes en ausencia de AZT, indicando que el acortamiento telomérico resultante es irreversible. La reducción de la longitud telomérica fue revelada por un área más extendida en la membrana hibridando con la sonda telomérica (FIGURA 12) que indica una disminución en la longitud promedio del fragmento de restricción terminal (TRF) calculada a partir de la misma (FIGURA 13). Como se esperaba, el tratamiento con AZT por 15 pasajes también inhibió la actividad de telomerasa con respecto al control (datos no mostrados).

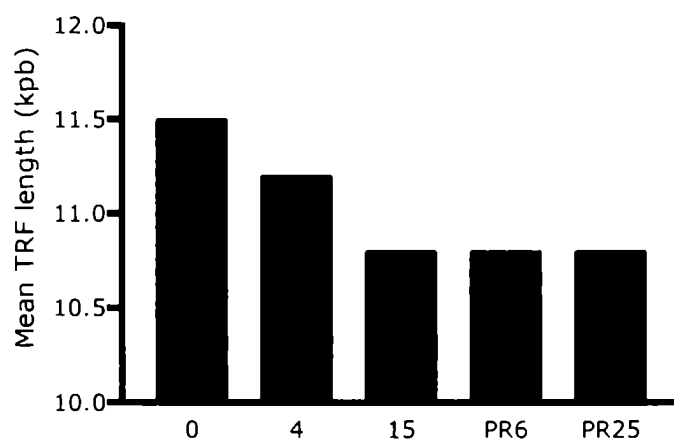


FIGURA 13: Media de los fragmentos terminales de restricción (TRF). La longitud del DNA está expresada en kpb para células HeLa sin tratar (0), tratadas con AZT por varios pasajes (4 y 15) y células cultivadas después de remover la AZT del medio (PR6 y PR25).

También fue realizada una hibridación *in situ* con fluorescencia en células crecidas en presencia o ausencia de AZT (FIGURA 14). Los puntos amarillos en la FIGURA 14 representan la hibridación de las sondas teloméricas fluorescentes a los telómeros.

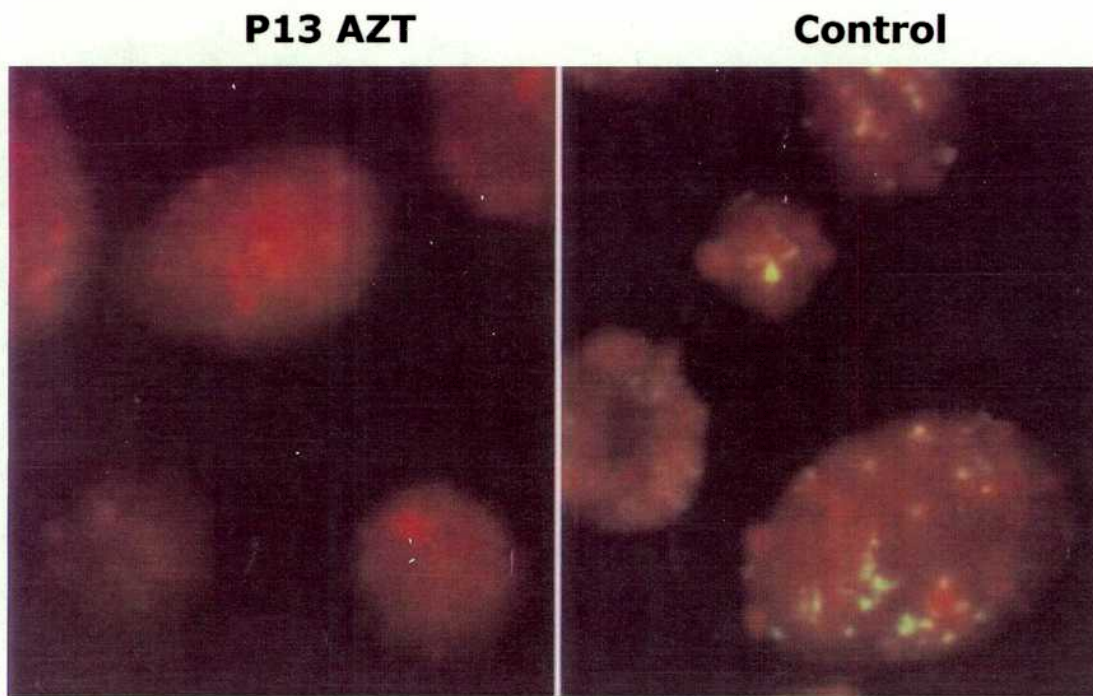


FIGURA 14: Hibridación *in situ* fluorescente de células HeLa con una sonda telomérica. P13 AZT: núcleos en interfase de células tratadas con AZT. Control: núcleos en interfase de células HeLa sin tratar. Los puntos amarillos representan secuencias teloméricas.

Se observó una señal más débil en las células expuestas a AZT por 13 pasajes, comparándolas con los controles sin tratar.

No se observaron cambios morfológicos o bioquímicos característicos de senescencia, como así tampoco de apoptosis.

DISCUSIÓN

Las repeticiones teloméricas son más largas durante la etapa embrionaria comparadas con la adulta, ya que se pierden aproximadamente 50 pb en cada división celular [Harley CB *et al.*, 1990]. Como hemos comentado previamente, cuando el acortamiento alcanza una longitud particular, la célula deja de dividirse, inicia un programa de senescencia y muere [Levy MZ *et al.*, 1992]. Así, las células embrionarias y las células inmortalizadas evitan el acortamiento telomérico replicando los extremos de sus cromosomas mediante la enzima telomerasa [Allsopp RC *et al.*, 1992].

La telomerasa agrega repeticiones *de novo* a los telómeros [Greider CW, 1990] y probablemente esté involucrada en la incorporación de AZT, como un terminador de cadena, en el DNA nuevamente sintetizado en lugar de timidina. Se sabe que la AZT tiene baja afinidad por las DNA polimerasas α , β y γ , y alta afinidad por la transcriptasa reversa de HIV-1 [Faraj A *et al.*, 2000; Rigourd M *et al.*, 2000].

Nuestros resultados muestran que el análogo de nucleósido AZT es capaz de acortar la longitud de las repeticiones teloméricas de células tumorales expuestas en cultivo a un tratamiento a largo plazo con la droga. El acortamiento fue progresando con el tiempo en cultivo y fue irreversible, ya que la longitud de los telómeros no fue recuperada después de terminar el tratamiento con AZT.

En nuestro modelo de estudio, cuando el acortamiento telomérico tiene lugar, algunos fragmentos teloméricos permanecen intactos, como puede verse en el Southern, por la extensión de la zona de hibridación. Después de 15 pasajes no se acortan lo suficiente como para iniciar un programa de senescencia. Adicionalmente, la actividad de telomerasa no pudo ser detectada en células HeLa cultivadas por 13 pasajes con AZT al compararlas con los controles sin tratar, con actividad de telomerasa

Nuestros resultados se corresponden con una publicación previa que demuestra que la AZT acorta los telómeros de *Tetrahymena* al disminuir la adición *de novo* de los telómeros [Strahl C y Blackburn EH, 1994]. Esto resultados fueron confirmados posteriormente por otros trabajos que demostraron que la AZT disminuye la longitud telomérica en dos líneas celulares humanas inmortalizadas al inhibir la telomerasa

[Strahl C y Blackburn EH, 1996]. También se demostró que inhibe la proliferación celular con inducción de un fenotipo similar senescente en fibroblastos de ratón en cultivo [Yegorov YE *et al.*, 1996] y que presenta una actividad inhibitoria del crecimiento sobre células humanas de cáncer de mama en cultivo y tumores mamarios de rata [Wagner CR *et al.*, 1997]. Por otro lado, se encontró que la AZT acorta los telómeros de ratones expuestos a la droga en el útero [Olivero OA *et al.*, 1997].

El hecho de que la longitud de los telómeros disminuyó en las células HeLa tratadas en forma prolongada en cultivo con AZT sin evidencia de senescencia podría ser el resultado de diferentes mecanismos. En principio, el número de pasajes con AZT pudo haber sido insuficiente para gatillar un programa de senescencia. En segundo término, podría emerger un fenotipo resistente a AZT como resultado de la selección por el tratamiento continuo. En tercer lugar, el acortamiento de los telómeros hasta una longitud crítica podría inducir un mecanismo compensatorio de preservación para prevenir pérdidas futuras, que podría ser independiente de la actividad de telomerasa.

Han sido reportados otros casos en los cuales la presencia de telómeros cortos no es suficiente para gatillar la senescencia celular. Por ejemplo, en fibroblastos humanos que expresan hTERT o queratinocitos humanos que expresan las proteínas E6/E7 de HPV 16, los telómeros se estabilizan a longitudes aun más cortas que aquellas de células en crisis [Klingelutz AJ *et al.*, 1994; Stoppler H *et al.*, 1997; Ouellette MM *et al.*, 2000]. En células HeLa, ha sido sugerido que la expresión de las proteínas E6 o E7 de HPV previenen la transducción de la señal de senescencia originada a partir de los telómeros cortos en la célula, y que una vez que la expresión de E6 o E7 es extinguida, las células detectan la presencia de telómeros cortos e inician el programa de senescencia. Alternativamente, el bajo nivel de telomerasa posterior a la represión de E6 o E7 podría ser la señal de senescencia [Goodwin EC y DiMaio D, 2001]. La presencia de telómeros largos y telomerasa activa no protege a las células HeLa de la senescencia inducida por la represión de E6 o E7 y mediada por las vías de p53 y Rb.

Sin embargo, estos resultados no descartan un rol para la telomerasa o la longitud telomérica en la senescencia inducida. Es posible que en las células que están expresando hTERT, un determinado telómero permanezca corto, aunque la longitud promedio de los telómeros esté extendida. Alternativamente, la célula podría detectar la disminución de la actividad de telomerasa, más que la actividad absoluta. Además,

los telómeros cortos podrían afectar la transcripción de genes involucrados en la senescencia o inducir anormalidades cromosómicas estructurales.

Aun no está claro si el nivel de telomerasa o la longitud telomérica controlan la senescencia replicativa. En queratinocitos humanos normales, el inicio de la senescencia replicativa correlaciona mejor con los niveles de telomerasa que con la longitud telomérica y en otros sistemas, sería la expresión de telomerasa y no el mantenimiento de los telómeros, lo que haría posible evitar la senescencia [Zhu J *et al.*, 1999; Kang MK *et al.*, 1998]. En cambio, en otros tipos celulares, el mantenimiento de los telómeros es un mejor factor de predicción de la proliferación que la actividad de telomerasa [Counter CM *et al.*, 1998b; Bodnar AG *et al.*, 1998].

En síntesis, conjugando ambos factores, si la inhibición de la telomerasa lleva a un acortamiento de las repeticiones teloméricas, esto a largo plazo podría desencadenar la senescencia replicativa, y la activación de esta vía en células tumorales podría limitar el crecimiento *in vivo* de varios tipos de tumores.

En tal sentido, en nuestro sistema demostramos un acortamiento telomérico irreversible por tratamiento con AZT, mediante la inhibición de la telomerasa. Además, la longitud más corta de los telómeros se mantiene sin posterior pérdida o adición de repeticiones teloméricas, después de remover la AZT del cultivo, sugiriendo la recuperación de la actividad de telomerasa. El mantenimiento de la longitud de los telómeros se corresponde con otros trabajos publicados. En varias líneas celulares inmortales humanas la longitud telomérica es estable, sugiriendo la existencia de un mecanismo regulador para limitar la elongación por la telomerasa que involucra al factor de unión a las repeticiones teloméricas TRF1. Dado que TRF1 no afecta significativamente la actividad de la telomerasa, es posible que la unión de TRF1 controle la longitud telomérica *in cis* inhibiendo la acción de la telomerasa en los extremos de los telómeros individuales [van Steensel B y de Lange T, 1997].

Con estos resultados iniciales, demostramos que la AZT, efectivamente podría ser un inhibidor de telomerasa con potenciales propiedades antitumorales, ya que sería capaz de actuar restringiendo un mecanismo clave de elongación telomérica en la mayoría de los tumores humanos, y suprimiría de esta forma uno de los requerimientos básicos para la progresión tumoral.

TERCERA PARTE

INDUCCIÓN DE SENESCENCIA Y APOPTOSIS DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO MURINO POR TRATAMIENTO PROLONGADO CON *AZT IN VITRO*

INTRODUCCIÓN

El telómero constituye un gran complejo nucleoproteico con una estructura que difiere del resto de la cromatina. El DNA telomérico de los mamíferos está compuesto por repeticiones en tándem, de la secuencia TTAGGG, la cual se extiende por 10 a 15 Kb en el extremo de los cromosomas humanos. En el ratón, las cepas derivadas del tipo salvaje tienen longitudes teloméricas semejantes a las humanas, mientras cepas endocriadas establecidas tienen telómeros de, aproximadamente, 40 Kb de longitud. La longitud promedio de las repeticiones TTAGGG, sin embargo, no parece ser clave para una apropiada función telomérica, excepto que los telómeros se acorten por debajo de una longitud funcional mínima, lo cual resulta en fusiones de los extremos de los cromosomas [revisado en Goytisolo FA y Blasco MA, 2002].

Por otra parte, el telómero se caracteriza por tener una hebra 3' extendida rica en G (llamada hebra G), el cual en mamíferos tiene una longitud de aproximadamente 200 nucleótidos [Mc Elligott R y Wellinger RJ, 1997; Wright WE *et al.*, 1997]. Esta cadena es el sustrato al cual la telomerasa adiciona las repeticiones teloméricas. El estudio de ratones deficientes en telomerasa, sin embargo, indicaría que la formación de esta hebra G extendida no requiere la actividad de telomerasa [Nikaido R *et al.*, 1999; Hemann MT y Greider CW, 1999], sino que probablemente es la consecuencia directa del problema de replicación terminal [Ohki R *et al.*, 2001]. La hebra G extendida puede replegarse e invadir el dúplex de las repeticiones teloméricas, desplazando una hebra e hibridando con su secuencia complementaria [Griffith JD *et al.*, 1999]. Esta estructura telomérica de orden superior ha sido llamada el "*T-loop*". El modelo del *T-loop* provee un mecanismo para el secuestro de la hebra G, la cual, de otro modo, podría activar controles de daño del DNA y enzimas reparadoras de DNA [Greider CW, 1999b; Collins K, 2000]. Una función adicional del *T-loop* podría ser prevenir el acceso de la telomerasa al telómero [Griffith JD *et al.*, 1999; Collins K, 2000].

En ausencia de un mecanismo compensatorio, los telómeros se acortan progresivamente dada la incapacidad de las DNA polimerasas convencionales para replicar secuencias terminales 3' [Greider CW, 1996]. En efecto, los telómeros de la mayoría de las células humanas y murinas de organismos adultos sufren un acortamiento telomérico de unas 120 pb por división celular [Harley CB *et al.*, 1990;

Prowse KR y Greider CW, 1995; Blasco MA *et al.*, 1997]. El mecanismo más estudiado para el mantenimiento de la longitud telomérica es la actividad de la enzima telomerasa [Greider CW y Blackburn EH, 1985; Harley CB *et al.*, 1990; Yu GL *et al.*, 1990; Counter CM *et al.*, 1992; Singer MS y Gottschling DE, 1994; McEachern MJ y Blackburn EH, 1996; Blasco MA *et al.*, 1997], si bien existen otros mecanismos que hemos mencionado previamente.

La telomerasa sintetiza los telómeros *de novo* utilizando la molécula de RNA interna como molde y previene así el acortamiento telomérico en aquellas células donde está expresada en niveles suficientemente elevados. El componente de RNA de la telomerasa ha sido caracterizado en varios organismos, incluyendo ciliados, levaduras, ratón y humano [Greider CW y Blackburn EH, 1989; Singer MS y Gottschling DE, 1994; Blasco MA *et al.*, 1995; Feng J *et al.*, 1995]. Cepas *knock-out* de levaduras y ratón que carecen del componente RNA de la telomerasa (llamado mTR para el ratón) son completamente deficientes para la función de telomerasa, y estos organismos son viables sólo por un limitado número de generaciones. En el caso de los ratones deficientes en telomerasa, los telómeros se acortan progresivamente de una generación a la próxima, esto es acompañado por un incremento progresivo en las aberraciones cromosómicas y por esterilidad en la sexta generación [Blasco MA *et al.*, 1997; Lee HW *et al.*, 1998]. La expresión del mRNA de la subunidad catalítica de la telomerasa de ratón (mTERT), tanto en tejidos adultos como embrionarios, es independiente del componente esencial de RNA de la telomerasa, mTR, y por lo tanto, de la formación de complejos activos de telomerasa. Durante el desarrollo embrionario el mRNA de la mTERT es expresado abundantemente en la totalidad del embrión, especialmente en regiones de proliferación intensiva. La proteína mTERT está presente exclusivamente en tejidos con actividad de telomerasa, tales como testículos, bazo y timo. Tanto en ratones como en humanos la subunidad catalítica de telomerasa está localizada en el núcleo celular y su localización no es regulada durante la progresión del ciclo celular [Martín-Rivera L *et al.*, 1998].

Como hemos mencionado anteriormente, la actividad de telomerasa está aumentada en más del 90 % de los tumores humanos [Shay JW y Bacchetti S, 1997] en comparación con los tejidos somáticos normales, y esto podría contribuir activamente al crecimiento del tumor [Weitzman JB y Yaniv M, 1999].

Previamente habíamos encontrado que la exposición prolongada *in vitro* a AZT de células HeLa produce un acortamiento telomérico irreversible, aunque sin mostrar signos de senescencia. Otros trabajos indican que el tratamiento con AZT inhibe la actividad de telomerasa y el crecimiento de células de cáncer de mama *in vitro* y de tumores mamarios de rata *in vivo* [Wagner CR *et al.*, 1997; Melana SM *et al.*, 1998]. Dentro de este marco conceptual, la AZT podría ser una droga capaz de revertir el estado de inmortalización de una célula tumoral y conducirla a la senescencia. El objetivo central de esta parte del trabajo consiste en determinar si el tratamiento crónico *in vitro* con AZT de cultivos de la línea de carcinoma mamario murino F3II induce senescencia y apoptosis, revirtiendo el estado de inmortalización característico de las células tumorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuesto

Para el tratamiento *in vitro*, la AZT (Sigma) fue disuelta en agua desionizada y luego diluida en el medio de cultivo.

Células tumorales y condiciones de cultivo

La línea celular de carcinoma sarcomatoide mamario F3II es una variante altamente invasiva y metastásica establecida a partir de un clon de un tumor de mama espontáneo de un ratón BALB/c [Alonso DF *et al.*, 1996b]. Después de la inyección subcutánea en el flanco, las células F3II crecieron como carcinomas de células ahusadas con una alta invasividad local y un 90-100% de incidencia de metástasis en pulmón [Alonso DF *et al.*, 1996a]. El stock de células F3II fue mantenido en medio esencial mínimo (MEM 41500, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 80 µg/ml de gentamicina y 20 µg/ml de tetraciclina en cultivo en monocapa en frascos plásticos de 25 cm² y 75 cm² (Corning y Nunc) a 37°C, en una atmósfera humificada con 5% CO₂ en aire. Las células fueron rutinariamente tripsinizadas al alcanzar confluencia siguiendo los procedimientos corrientes, e incubadas en MEM sin suero durante 30-60 minutos a 37°C para su recuperación. La cuantificación del número de células fue realizada por recuento en hemocitómetro. En todos los casos, la viabilidad fue superior al 90%, según el ensayo de exclusión con azul tripán.

Tratamiento *in vitro* con AZT

Los cultivos celulares de F3II fueron expuestos a tratamiento crónico con AZT, a una concentración de 800 µM [Gomez DE *et al.*, 1995]. Esta concentración no tuvo efectos citotóxicos relevantes sobre las células creciendo en fase logarítmica ni en monocapas semiconfluentes, de crecimiento lento, en el sistema celular en estudio. Las células F3II control fueron mantenidas en las mismas condiciones de cultivo sin AZT, y subcultivadas dos veces por semana.

Curva de crecimiento

Para ensayar el crecimiento *in vitro*, las células tumorales F3II fueron cultivadas en placas de 24 wells en el medio de crecimiento. Fueron tripsinizadas diariamente durante 6 días consecutivos, por cuadruplicado y el número de células viables se determinó mediante tinción con azul tripán y recuento en un hemocitómetro. Se construyó una curva de crecimiento para determinar el tiempo de duplicación en la fase logarítmica de crecimiento.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas en todos los extractos celulares fue determinada utilizando el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad).

Determinación de la actividad de telomerasa

La actividad de telomerasa de la línea F3II de carcinoma mamario murino fue determinada mediante un ensayo inmunoenzimático que consiste en una extensión del protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP) descrito por Kim y colaboradores [Kim NW *et al.*, 1994], utilizando el Telomerase PCR ELISA Kit (Boehringer Mannheim). Las células fueron cosechadas y lavadas una vez con PBS; 2×10^6 células fueron transferidas a un tubo eppendorf y centrifugadas por 8 minutos a $450 \times g$. El pellet fue rápidamente congelado y se almacenó a -70°C hasta su utilización. La actividad de telomerasa en las muestras se determinó siguiendo las instrucciones indicadas en el kit.

Inhibición de la actividad de telomerasa *in vitro* por AZT

La actividad de telomerasa presente en un extracto celular de F3II fue evaluada en presencia de concentraciones crecientes de AZT desde 0mM hasta 2mM, de acuerdo con el ensayo inmunoenzimático previamente descrito. La actividad de la muestra sin AZT fue considerada como control y su absorbancia como el 100% de actividad, así la inhibición fue del 0%.

Determinación de la longitud telomérica

La longitud de los telómeros fue examinada en el DNA proveniente de células F3II expuestas a AZT 800 μ M por 20, 34 y 51 pasajes *in vitro*, de acuerdo con lo descrito previamente. La longitud telomérica de las células tratadas fue comparada a la de las células F3II control antes de ser expuestas a AZT, como también a la de células cultivadas durante 51 pasajes en ausencia del compuesto.

Expresión de la subunidad catalítica de telomerasa de ratón por RT-PCR

Para el análisis de la expresión de la transcriptasa reversa de la telomerasa de ratón (mTERT), fueron utilizados 500 ng de RNA total aislado mediante el kit QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Amersham Pharmacia Biotech) de células F3II control o tratadas con AZT durante 58 pasajes *in vitro*, de acuerdo con las instrucciones indicadas. La reacción de transcripción reversa y amplificación mediante PCR se llevó a cabo utilizando las Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las indicaciones incluidas en el kit. Los primers utilizados en la amplificación por PCR fueron (5'-TCTGGCTGATGGACACATAGGTGGT-3') y (5'-TTATGGGGTCTTCTGTACTGGG-TATG-3'). Los ciclos de la PCR fueron los siguientes: 95°C por 5 min, 1 ciclo; 95°C por 40 s, 62°C por 1 min, 72°C por 1 min, 31 ciclos y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Para normalizar las cantidades de RNA en la reacción, fue utilizado RNA de β -actina como control.

Western blot para mTERT

Se prepararon extractos proteicos nucleares de células F3II control o tratadas *in vitro* con AZT por 35 pasajes. Las células crecidas en placas de 6 wells fueron lavadas 3 veces con PBS frío, sobre hielo, y tratadas con buffer NP40 1% en PBS para mantener intactos los núcleos. Se recuperó este extracto citoplasmático para determinar la concentración de proteínas y normalizar la cantidad de muestra a sembrar en el gel. Los núcleos que habían permanecido adheridos a la placa fueron lisados con el buffer de siembra (62.5 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 50 mM

DTT, 0.01% azul de bromofenol), levantados con un *scraper*, sonicados en hielo por 5 s e incubados a 95°C durante 5 min antes de sembrarlos en el gel. Las proteínas contenidas en los extractos fueron separadas por electroforesis y transferidas a una membrana de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech). La membrana fue bloqueada e incubada con el anticuerpo primario dirigido contra la subunidad catalítica de la telomerasa (TRT, H-231, Santa Cruz) a 4°C durante toda la noche. Luego fue incubada con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y revelada por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech)

Ensayo de Beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal)

Las células fueron analizadas para evaluar su actividad de SA-β-galactosidasa a pH 6.0 según lo descrito por Dimri y colaboradores [Dimri GP *et al.*, 1995]. Brevemente, las monocapas semiconfluentes fueron lavadas con PBS, fijadas durante 5 minutos con glutaraldehído 0.5% en PBS (pH 7.2) conteniendo 1 mM MgCl₂, e incubadas 24 horas a 37°C en solución de tinción (1 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido [Promega], 0.5 mM K₃Fe[CN]₆, 0.5 mM K₄Fe[CN]₆·3H₂O, 1 mM MgCl₂ en PBS, pH 6.0).

Determinación de la actividad de Caspasa-3

Se trabajó sobre monocapas semiconfluentes, las cuales fueron lavadas con PBS para eliminar trazas de suero e incubadas en MEM sin suero durante 16 horas con o sin el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. Las células fueron tripsinizadas y cosechadas por centrifugación a 450 x g durante 10 minutos. La actividad de Caspasa-3 en las muestras fue determinada utilizando el CaspACE Assay System colorimétrico (Promega), midiendo la liberación de p-nitroanilina (pNA) a partir del sustrato sintético Ac-DEVD-pNA a 405 nm, de acuerdo con las instrucciones indicadas en el kit. Como fuente de enzima, en todos los casos, se utilizaron extractos provenientes de 1 x 10⁶ células. La diferencia entre la intensidad de color amarillo producido en ausencia y en presencia del inhibidor se considera una medida de la actividad de caspasa-3 presente en la muestra.

RESULTADOS

AZT inhibe la actividad de telomerasa en las células F3II

La actividad de telomerasa en las células F3II fue demostrada en dos experimentos independientes mediante el ensayo Telomerase PCR-ELISA. Considerando tal actividad como el 100%, el tratamiento con AZT 800 μM *in vitro* por 15 pasajes indujo una disminución de la actividad de telomerasa de las células F3II del 36%. A los 30 pasajes con AZT la inhibición fue del 97%, y a los 39 pasajes la actividad de telomerasa fue indetectable. La longitud telomérica fue determinada mediante un Southern blot con una sonda telomérica. Tal determinación no mostró una disminución significativa del tamaño de los fragmentos teloméricos en las células tratadas con AZT (datos no mostrados).

El tratamiento crónico con AZT de las células F3II no modifica la expresión de mTERT

Si bien la actividad de la telomerasa era inhibida en las células tratadas crónicamente con AZT, la expresión del mensajero para la subunidad catalítica de la telomerasa de ratón (mTERT), en cambio, no disminuyó por el tratamiento con AZT de las células F3II por 58 pasajes, con respecto al control sin tratar (FIGURA 15).

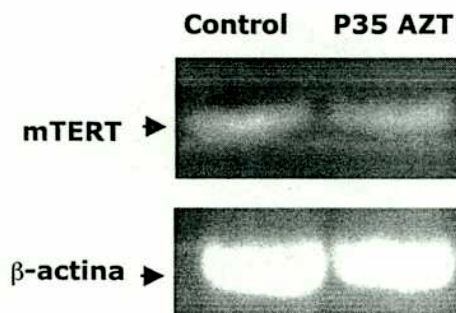


FIGURA 15: Expresión del mRNA de la mTERT. La expresión del mRNA de la subunidad catalítica de la telomerasa se evaluó por RT-PCR en células control sin tratar (Control) y en células tratadas *in vitro* con AZT por 35 pasajes (P35 AZT). Se utilizó β -actina para confirmar niveles de RNA equivalentes para la RT-PCR.

Dada la localización nuclear de la subunidad catalítica de la telomerasa tanto en células humanas como murinas, para estudiar la expresión de la proteína mTERT en las células tratadas con AZT y los controles sin tratar, se prepararon extractos celulares nucleares. Los mismos fueron analizados mediante Western blot con un anticuerpo que reconoce la proteína mTERT, con una masa molecular esperada de 125 kDa [Martín-Rivera L *et al.*, 1998].

Tanto en los controles como en las células F3II tratadas durante 35 pasajes con AZT puede observarse una banda del peso molecular esperado para mTERT, siendo algo menos intensa la señal en las calles correspondientes a las células cultivadas en presencia de AZT (FIGURA 16).



FIGURA 16: Expresión de la proteína mTERT. Se analizó por Western blot la presencia de la proteína mTERT en células F3II control (calles 1 y 2) o tratadas por 35 pasajes con AZT (calles 3, 4 y 5). Se sembraron cantidades equivalentes de extractos nucleares y se revelaron con un anticuerpo que reconoce mTERT. Las bandas se encuentran a la altura del PM esperado para mTERT.

AZT inhibe la actividad de telomerasa en extractos de células F3II *in vitro*

El ensayo TRAP con extractos celulares solubles de F3II fue llevado a cabo en presencia de AZT. Con el aumento de las concentraciones de AZT en la reacción, se observó una reducción en las absorbancias generadas por la presencia de producto en el ELISA, considerando la actividad del control sin tratar con AZT como el 100% de actividad y, por lo tanto, como el 0% de inhibición (FIGURA 17).

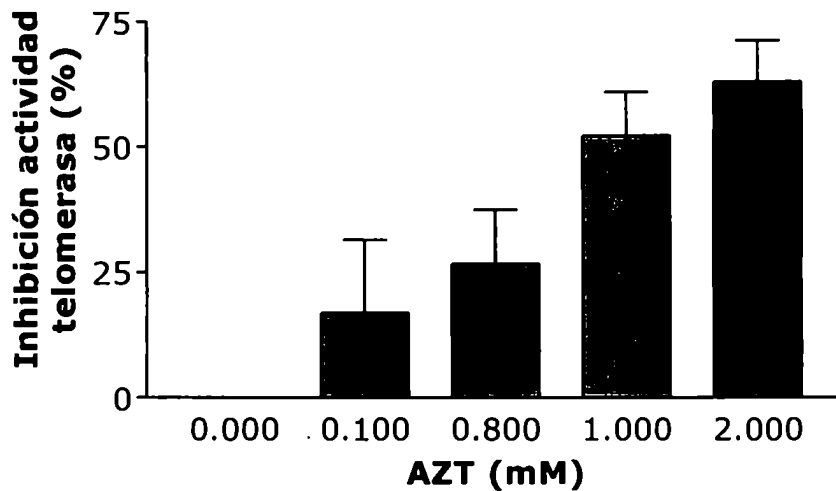


FIGURA 17: Inhibición de la actividad de telomerasa de células F3II por AZT. La actividad de telomerasa en los extractos solubles de células F3II fue evaluada en presencia de AZT mediante el ensayo TRAP revelado por ELISA. Se consideró como el 100% de actividad (y 0% de inhibición) la actividad del extracto en ausencia de AZT.

El tratamiento crónico con AZT reduce la velocidad de crecimiento *in vitro* de las células F3II

El efecto del tratamiento crónico con AZT sobre la velocidad de crecimiento *in vitro* de las células F3II fue evaluado en la fase de crecimiento logarítmico. Después de 42 pasajes, los cultivos celulares tumorales tratados con AZT mostraron un incremento significativo en el tiempo de duplicación de la población. El mismo fue de 16.9 ± 2.3 horas para los controles y de 41.1 ± 5.3 horas para las células tratadas con AZT ($p < 0.05$, Student's t test).

El tratamiento crónico con AZT induce senescencia en las células F3II

Como se muestra en la FIGURA 18, el tratamiento con AZT indujo signos morfológicos y bioquímicos de senescencia. Después de 34 pasajes con AZT, las células F3II adquirieron una morfología más grande y redondeada, característica de células senescentes (FIGURA 18A y 18B). Para corroborar estas observaciones morfológicas, se evaluó la actividad de β -galactosidasa, un marcador bioquímico de senescencia, en los cultivos. Este marcador es negativo en células diferenciadas,

quiescentes o inmortal. La tinción histoquímica para la actividad de SA- β -gal fue claramente positiva en los cultivos tratados crónicamente con AZT y negativa en los controles (FIGURA 18C, E y 18D).

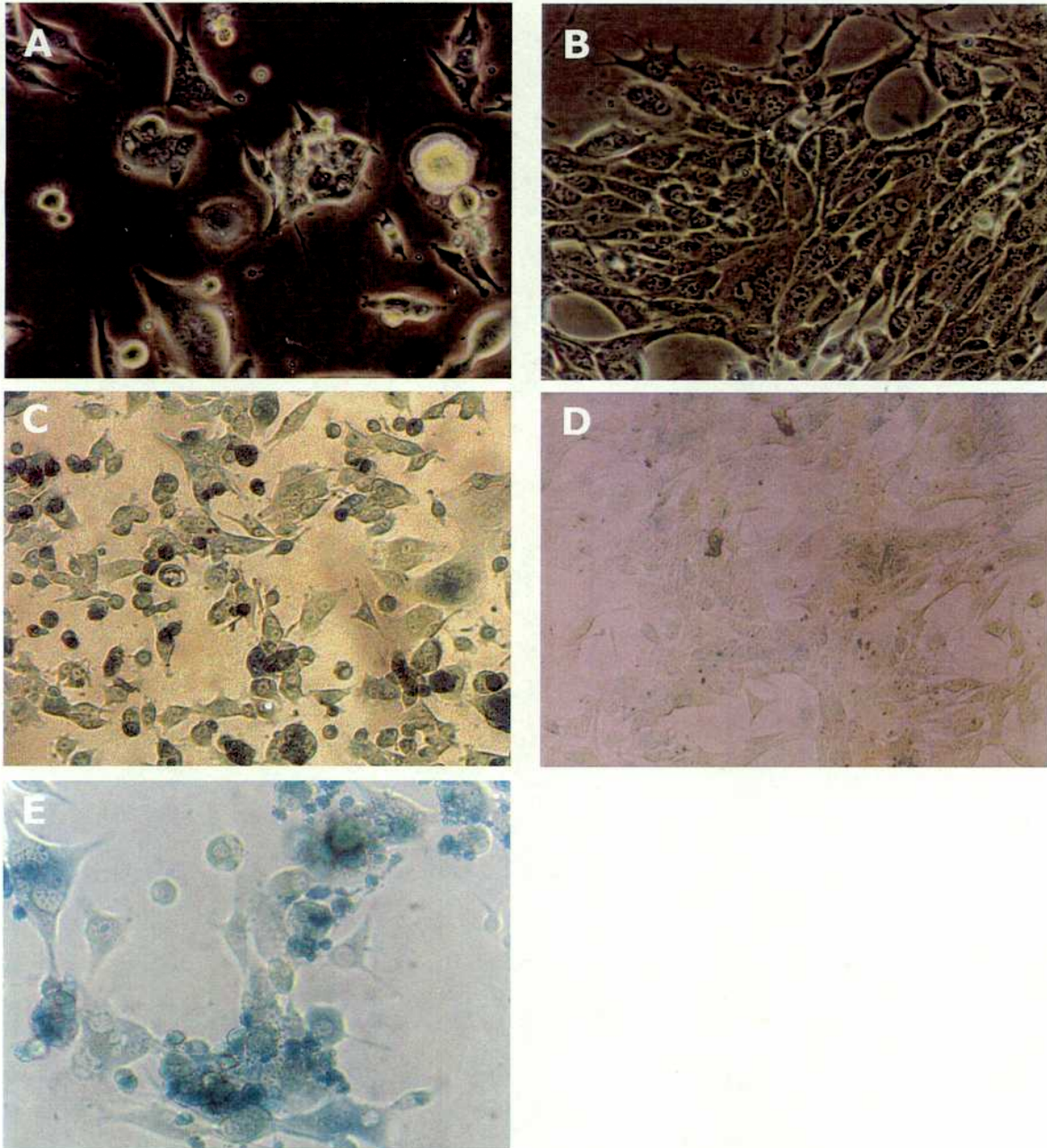


FIGURA 18: Cambios morfológicos y tinción de SA- β -gal en células F3II tratadas crónicamente *in vitro* con AZT. A, microfotografías de contraste de fase de los cultivos de F3II, que muestran las características morfológicas de células senescentes, después de 34 pasajes *in vitro* con AZT. B, células control sin tratar. C y E, la tinción histoquímica para la actividad de SA- β -gal fue positiva en las células tratadas con AZT. D, las células control sin tratar fueron negativas para la tinción de SA- β -gal. Las fotografías fueron tomadas a x200 (A, B y E) y x100 (C y D).

El tratamiento crónico con AZT aumenta la actividad de caspasa-3

Con el objetivo de evaluar si la senescencia replicativa producida por el tratamiento con AZT conducía a apoptosis, se midió la actividad de caspasa-3 en los cultivos. La caspasa-3 es un miembro de la familia de cisteína proteasas aspartato-específicas que juegan un papel central en la ejecución del proceso de muerte celular apoptótica [Porter AG y Janicke RU, 1999]. La actividad de caspasa-3 aumentó significativamente en las células tumorales tratadas con AZT por más de 50 pasajes *in vitro*, con valores 2.6 veces mayores que las células control (FIGURA 19).

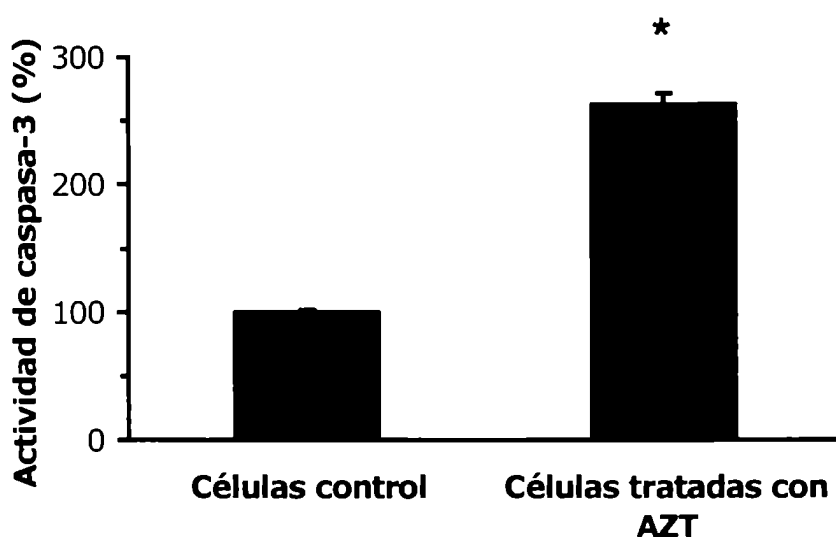


FIGURA 19: Aumento de la actividad de caspasa-3 en las células tratadas con AZT. La actividad de caspasa-3 fue determinada mediante el CaspACE Assay System, colorimétrico. Los resultados son expresados como el porcentaje de los controles sin tratar y representan el promedio de dos experimentos independientes. * $p < 0.005$, test t de Student.

DISCUSIÓN

En esta parte de nuestro trabajo demostramos, por primera vez, que las células de un carcinoma mamario experimental tratadas de manera prolongada con dosis no citotóxicas de AZT presentan evidencias claras de senescencia y muerte celular programada.

Como habíamos mencionado, en una publicación previa, nuestro grupo demostró la incorporación preferencial de AZT en las secuencias teloméricas de células CHO, señalando que dicha incorporación parecía ser mediada por telomerasa [Gomez DE *et al.*, 1995]. En la primer parte del trabajo, encontramos que células HeLa expuestas en forma prolongada a AZT sufrieron un acortamiento irreversible en su longitud telomérica.

Rhyu afirmó que las drogas diseñadas para la inhibición de la dinámica telomérica podrían proveer una terapia racional con efectos adversos limitados. Sin embargo, estas esperanzas descansaban sobre un par de cuestiones no resueltas, siendo la principal de ellas si el acortamiento telomérico, efectivamente produce senescencia [Rhyu MS, 1995]. En nuestra investigación, la actividad de telomerasa de las células F3II fue completamente inhibida luego de 30 pasajes *in vitro* en presencia de una concentración no citotóxica de AZT. La inhibición no tendría lugar a nivel de expresión del mRNA de la subunidad catalítica de la telomerasa (mTERT), dado que el análisis de la misma por RT-PCR no mostró diferencias entre las células control y las tratadas crónicamente con AZT. En contraste, al mRNA de la mTERT, si bien la proteína mTERT fue encontrada tanto en los controles como en las células tratadas crónicamente *in vitro* con AZT, en estas últimas la señal es más débil. Esto podría indicar que, probablemente, los niveles de la proteína mTERT estén regulados por mecanismos post-transcripcionales. Sin embargo, esta disminución no sería capaz de explicar por completo la inhibición de la actividad de la enzima que se observa en las células F3II, después de 30 pasajes en presencia de AZT.

Además de ser fosforilada e incorporarse a los telómeros en la forma de AZT-TP, actuando como inhibidor competitivo de la timidina trifosfato y, así, como terminador de cadena, la AZT *per se* podría producir una inhibición de la enzima

telomerasa. En un rango de concentraciones que abarca la utilizada para el tratamiento crónico en cultivo, la AZT fue capaz de disminuir *in vitro* la actividad de telomerasa presente en extractos celulares solubles de F3II. Esta inhibición podría ser irreversible, tal vez mediante interacción directa de la AZT con algún componente del complejo telomerasa, incluso con el componente RNA (mTR) de la enzima. En este sentido, ha sido demostrado que la expresión tanto del mRNA como del componente proteico de la mTERT son independientes de la expresión del componente esencial de RNA de la telomerasa, y así, de la formación de complejos de telomerasa activos en gran parte de los tejidos de ratones adultos [Martín-Rivera L *et al.*, 1998].

En estas células de carcinoma mamario murino, luego de 34 pasajes, comenzaron a observarse signos evidentes de senescencia celular. Las células tumorales F3II tratadas modificaron su morfología, haciéndose más grandes, redondeadas y con mayor contenido granular. Consecuentemente, la actividad de SA- β -gal, un biomarcador para senescencia, fue positiva en los cultivos de células tumorales tratadas con AZT, en contraste con su ausencia en los controles respectivos.

Dentro de este marco conceptual, otros autores han demostrado que AZT reduce los telómeros de *Tetrahymena* [Strahl C y Blackburn EH, 1994], que disminuye la longitud telomérica en dos líneas celulares humanas inmortalizadas mediante la inhibición de telomerasa [Strahl C y Blackburn EH, 1996], y que es capaz de inhibir el crecimiento celular y la actividad telomerasa *in vitro* en células de cáncer mamario [Melana SM *et al.*, 1998]. Yegorov y colaboradores han descrito, basados en observaciones morfológicas, la inducción de procesos similares a la senescencia en cultivos de fibroblastos murinos tratados con AZT [Yegorov YE *et al.*, 1996].

Dado que las repeticiones teloméricas no son palindrómicas y carecen de sitios de restricción, se mantienen como fragmentos de restricción terminal relativamente largos, los cuales pueden ser identificados mediante sondas teloméricas marcadas. En nuestro trabajo, hemos medido la longitud telomérica y no hemos observado un acortamiento telomérico significativo. En los ratones, se presentan secuencias teloméricas repetitivas muy largas, y no se ha descrito su acortamiento en procesos como el envejecimiento o la carcinogénesis. Estas observaciones en material de origen murino, ha desafiado la hipótesis general del acortamiento telomérico en función del envejecimiento y la inmortalización. Sin embargo, Zijlmans y colaboradores, utilizando

técnicas de hibridación *in situ* fluorescente cuantitativa, demostraron que la longitud telomérica en ratones es muy heterogénea, pero que cada cromosoma específico presentaba la misma longitud [Zijlmans J *et al.*, 1997]. Además, demostraron que la reducción de la longitud telomérica se desarrollaba, no sólo en todos los telómeros, sino que también en aquellos que eran los más cortos. Por lo tanto, puede hipotetizarse que los telómeros más cortos presentes en una célula de ratón, antes que la longitud telomérica global, serían los factores limitantes de su capacidad proliferativa.

Luego de demostrar evidencias morfológicas y bioquímicas de senescencia, nos abocamos a analizar si las células tratadas con AZT expresaban marcadores de apoptosis. Encontramos en ellas un aumento de casi un 300% en la actividad de caspasa-3, una enzima clave en el programa de muerte celular programada. En una cepa de ratones deficientes en telomerasa, Lee y colaboradores demostraron una espermatogénesis defectuosa con una apoptosis aumentada y una proliferación disminuida a nivel testicular, particularmente en animales de generaciones avanzadas [Lee HW *et al.*, 1998].

Estos resultados demuestran entonces que la exposición crónica a AZT, un inhibidor de la telomerasa, de células tumorales inmortales podría llevar a las mismas a alcanzar una longitud telomérica crítica que las conduzca a la senescencia replicativa, en primer término, y, por último, a desencadenar el proceso de muerte celular programada.

CUARTA PARTE

REDUCCIÓN DE LA TUMORIGENICIDAD *IN VIVO* DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO MURINO POR TRATAMIENTO PROLONGADO CON *AZT IN VITRO*

INTRODUCCIÓN

El vínculo entre el cáncer y el mantenimiento de los telómeros por telomerasa ha sido claramente establecido por Weinberg y col. [Weinberg AM, 1999]. Ellos encontraron que la expresión ectópica de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) en combinación con dos oncogenes (la oncoproteína large-T de SV40 y un alelo oncogénico de H-ras) resulta en la conversión tumorigénica directa de células epiteliales y fibroblastos humanos normales. Demostraron así que la expresión de telomerasa es uno de los pasos básicos requeridos para transformar células somáticas humanas normales en malignas. Los tres eventos clave son: la expresión de telomerasa, la inducción del oncogén *ras* y la inactivación de vías de control del ciclo celular que involucran p53 y Rb/p16.

El establecimiento de la telomerasa como un blanco terapéutico viable requirió experimentos determinantes que efectivamente demostraran que la inhibición de la telomerasa conducía a la reducción de la longitud telomérica, a la senescencia de las células tumorales y, en última instancia, a la apoptosis. Los mismos utilizaron tanto la transfección de las células de una construcción dominante negativa de la hTERT con mutaciones en la secuencia que anulan su actividad [Shammas MA *et al.*, 1999] u oligonucleótidos antisense del dominio hTR [Herbert B *et al.*, 1999].

Estos experimentos que demuestran que la inhibición de la telomerasa limita el crecimiento de las células tumorales fueron comprobados *in vitro* en células humanas. El aislamiento y la caracterización de la subunidad catalítica de la telomerasa de ratón y el desarrollo de modelos murinos que carecen o sobreexpresan tal gen [González-Suárez E *et al.*, 2001] han ayudado al mejor entendimiento del rol de la telomerasa y los telómeros en mamíferos. La utilización de modelos murinos posibilita el estudio de la progresión y capacidad metastásica de los tumores *in vivo* en un modelo singénico donde están adecuadamente representados.

Dado que habíamos demostrado que el tratamiento crónico con AZT de células de carcinoma mamario murino era capaz de inducir senescencia y conducir las a la apoptosis, decidimos ensayar las propiedades antitumorales de este inhibidor de la telomerasa *in vivo* en nuestro modelo experimental con ratones singénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuesto

Para el tratamiento *in vitro*, la AZT (Sigma) fue disuelta en agua desionizada y luego diluida en el medio de cultivo. Para los experimentos *in vivo*, la AZT (Sigma) fue disuelta en solución fisiológica para la inyección subcutánea o la AZT (Retrovir, Glaxo) fue disuelta en agua corriente para el tratamiento oral.

Células tumorales y condiciones de cultivo

La línea celular de carcinoma sarcomatoide mamario F3II fue cultivada en las condiciones descritas en la Parte III.

Tratamiento *in vitro* con AZT

Los cultivos celulares de F3II fueron expuestos a tratamiento crónico con AZT, a una concentración de 800 μM , como se mencionó en el capítulo anterior.

Determinación de la actividad de telomerasa

La actividad de telomerasa de los tumores fue determinada mediante el ensayo TRAP previamente descrito, utilizando el Telomerase PCR ELISA Kit (Boehringer Mannheim) y siguiendo las instrucciones indicadas en el mismo para ensayar muestras de tejidos. La concentración de proteínas en los extractos celulares fue determinada utilizando el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad).

Ensayos *in vivo*

Fueron utilizados ratones singénicos BALB/c hembras con una edad de 12-14 semanas y un peso de 20-25 g, del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

En un conjunto de experimentos, grupos de 10 animales recibieron en el espacio subcutáneo del flanco 2×10^5 células F3II. El tiempo de aparición de tumores locales fue monitoreado por palpación y posteriormente confirmado por histopatología.

En todos los casos, los tumores fueron diagnosticados como carcinomas de células ahusadas. El tamaño del tumor fue medido con un calibre dos veces por semana y el volumen tumoral fue calculado mediante la fórmula $\pi/6 \times (\text{diámetro menor})^2 \times (\text{diámetro mayor})$. El grupo tratado recibió AZT en forma oral contenida en el agua (60 mg/kg/día) desde el día en que fueron inoculados con las células (día 0 del experimento). Al día 30, los animales fueron anestesiados con ketamina (60 mg/kg) y xilacina (7 mg/kg) y los tumores subcutáneos fueron extirpados mediante cirugía. En un set de experimentos, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical cuando se encontraban moribundos o al final del experimento (día 140). En otro grupo, fueron sacrificados al día 60 y los pulmones fueron removidos y fijados en solución de Bouin. El número de nódulos superficiales en pulmón fue determinado por dos observadores independientes mediante una lupa de disección, como ha sido previamente descripto [Alonso DF *et al.*, 1996a].

En otra serie de experimentos, los ratones recibieron, en el espacio subcutáneo del flanco, 5×10^4 o 2×10^5 células F3II mantenidas con o sin AZT durante 30 pasajes *in vitro* (células presenescentes). En ambos casos, el grupo tratado recibió AZT s.c. 15 mg/kg/día (dosis equivalente a la que reciben los pacientes tratados con AZT) en solución fisiológica, en tanto que los controles recibieron sólo el vehículo. Los ratones fueron sacrificados el día 60 y los pulmones fueron fijados para el recuento de nódulos superficiales.

En otro ensayo *in vivo*, grupos de 5 animales recibieron en el espacio subcutáneo del flanco 5×10^4 o 2×10^5 células F3II mantenidas con AZT durante más de 35 pasajes *in vitro* (células senescentes) o células F3II sin tratar (controles). Cuando el tumor superaba los 15.000 mm³ o estaban moribundos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó una autopsia. En otro grupo de experimentos, para investigar la presencia de metástasis espontáneas, 60 días después de la inoculación de células tumorales, los animales fueron sacrificados, y los pulmones fueron fijados en solución de Bouin. Los tumores fueron removidos y fijados en formalina 10%, las secciones embebidas en parafina fueron teñidas con hematoxilina/eosina. Se determinó el índice mitótico y fue expresado como número de mitosis/10 campos a alto aumento (HPF). El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) fue detectado por inmunohistoquímica. La apoptosis fue evaluada en las secciones de tumores mediante el kit TdT 'TUNEL'-like *in situ* non-isotopic end labeling

(Oncogene Research Products, Boston, MA) de acuerdo con las instrucciones indicadas, fue determinado el índice apoptótico y fue expresado también como número de apoptosis/10 HPF.

RESULTADOS

Acción de la AZT en un modelo experimental de cirugía oncológica

En función de los resultados obtenidos *in vitro* de inducción de senescencia y apoptosis de las células F3II de carcinoma mamario murino, por inhibición de la telomerasa por AZT, fue ensayada la acción de esta droga en ratones singénicos BALB/c en un modelo experimental de cirugía, con el fin de encontrar la ventana terapéutica de aplicación de la misma. Dado que el acortamiento telomérico es un proceso lento, el efecto de la AZT podría ser de utilidad en una terapia secundaria después de la remoción o reducción de la masa tumoral por cirugía, radioterapia o la utilización de agentes citotóxicos convencionales. En este trabajo evaluamos el efecto de la administración en forma oral de la droga en una dosis que no es tóxica para los ratones, desde el día en que las células fueron inoculadas en los animales. La dosis efectiva, calculada a partir del consumo de agua, fue en promedio de 35 mg/kg/día.

TABLA 2. Efecto de la administración oral de AZT sobre la tumorigenicidad de las células F3II de carcinoma mamario y la formación de metástasis post-cirugía

Tratamiento oral ^a	Latencia tumoral ^b (días)	Incidencia tumoral al día 8 [positivos/total]	Volumen tumoral al día 30 (mm ³) ^c	Número de metástasis en pulmón ^d [mediana (rango)]
Agua (control)	4.9 ± 1.4	10/10 (100%)	285 ± 97.6	22 (2-89)
AZT	4.3 ± 0.9	10/10 (100%)	274.3 ± 135.8	25 (2-60)

^a El día 0 del experimento, se inyectaron 2x10⁵ células F3II en el espacio subcutáneo del flanco derecho de 10 ratones hembras en cada grupo. El grupo tratado recibió AZT en forma oral en el agua (dosis efectiva 35 mg/kg/día)

^b La latencia tumoral representa el tiempo entre la inyección de las células F3II y la aparición de tumores palpables. Los resultados son presentados como media ± DS.

^c Test t de Student, $p = 0.8419$ (no significativo)

^d El número de metástasis espontáneas en pulmón fue determinado 60 días después de la inoculación tumoral. Mann-Whitney U, $p = 0.6048$ (no significativo)

Tanto la latencia como la incidencia a los 8 días de iniciar el experimento fueron similares en ambos grupos (TABLA 2). Al día 30, también eran equivalentes los volúmenes tumorales, y se realizó la cirugía para extirpar el tumor subcutáneo de los animales previamente anestasiados. El recuento de metástasis espontáneas en pulmón de los animales sacrificados al día 60 no mostró diferencias significativas entre los animales control y los que habían recibido AZT en forma oral (TABLA 2).

En un experimento semejante, después de la cirugía los ratones fueron mantenidos con el tratamiento durante 140 días para evaluar la sobrevida. No encontramos diferencias en la incidencia, que fue del 100% en ambos grupos al día 9 el experimento (TABLA 3). Del mismo modo, la sobrevida tampoco difirió entre ambos lotes (FIGURA 20).

TABLA 3. Efecto de la administración oral de AZT sobre la incidencia de las células F3II de carcinoma mamario y volúmenes tumorales al día de la cirugía

Tratamiento oral^a	Incidencia tumoral al día 9 [positivos/total]	Volumen tumoral al día 30 (mm³)
Agua (control)	10/10 (100%)	375.1 ± 466.6
AZT	10/10 (100%)	477.6 ± 250.5 ^b

^a El día 0 del experimento, se inyectaron 2×10^5 células F3II en el espacio subcutáneo del flanco derecho de 10 ratones hembras en cada grupo. El grupo tratado recibió AZT en forma oral en el agua (dosis efectiva 38 mg/kg/día)

^b Test t de Student, $p = 0.5482$ (no significativo)

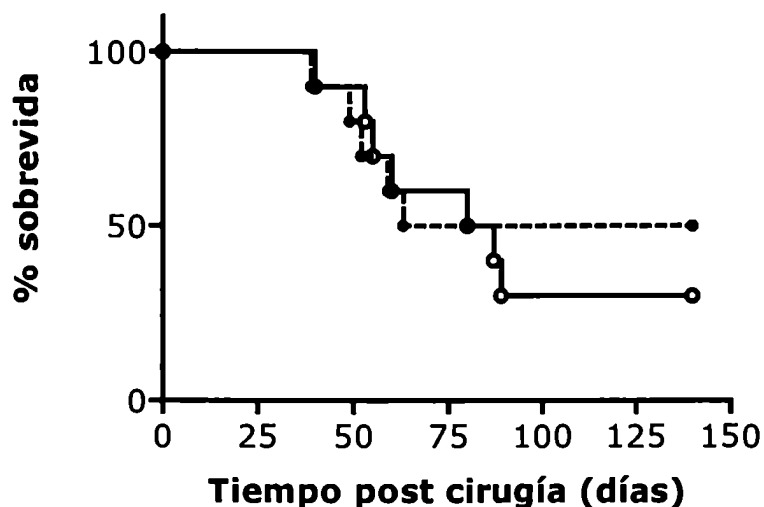


FIGURA 20: Efecto de la administración oral de AZT sobre la supervivencia de los ratones después de la inoculación de células F3II y cirugía al día 30. Grupos de 10 animales recibieron 2×10^5 células F3II el día 0 del experimento y AZT oral en una dosis efectiva de 38 mg/kg/día (círculos abiertos) o agua los controles (círculos llenos). La supervivencia de los animales fue analizada por el método de Kaplan-Meier (test Log-Rank, $p = 0.6351$, no significativo).

Tratamiento con AZT de animales inoculados con células tumorales presenescentes

Como hemos mencionado, el acortamiento telomérico por acción de la AZT constituye un proceso que requiere varias replicaciones celulares antes de ponerse en evidencia y, probablemente, es superado por la cinética de crecimiento de un tumor en el ratón. Por esta razón, realizamos un tratamiento previo de las células tumorales en presencia de AZT *in vitro*, con el objetivo de producir la erosión de los telómeros y permitir que *in vivo* ocurriera la última fase del acortamiento, alcanzando el límite crítico en su longitud, que podría conducir las a la senescencia.

TABLA 4. Efecto de la exposición *in vitro* a AZT por 30 pasajes y el tratamiento con AZT *in vivo* sobre la incidencia de las células F3II de carcinoma mamario

Incidencia tumoral al día 25 [positivos/total (%)]				
Células ^a	Células control		Células presenescentes ^b	
	SF	AZT ^c	SF	AZT ^c
50000	1/5 (20%)	0/5	1/5 (20%)	0/5 ^d
200000	4/5 (80%)	3/5 (60%)	2/4 (50%)	2/5 (40%) ^e

^a El día 0 del experimento, se inyectaron 5×10^4 o 2×10^5 células F3II en el espacio subcutáneo del flanco derecho de 5 ratones hembras en cada grupo.

^b Las células F3II fueron tratadas *in vitro* con AZT por 30 pasajes.

^c Los ratones recibieron solución fisiológica (SF) o AZT s.c. (15 mg/kg/día)

^d Chi-squared, $p = 0.4444$ (no significativo)

^e Chi-squared, $p = 0.1911$ (no significativo)

En el grupo de experimentos que constituyeron este ensayo piloto, los ratones BALB/c recibieron dos cargas tumorales diferentes, 5×10^4 o 2×10^5 células F3II control o tratadas *in vitro* con AZT durante 30 pasajes (células presenescentes), el día 0 de ensayo. Para la menor carga tumoral, sólo dos animales desarrollaron tumor. La incidencia fue más variable en los grupos que fueron inoculados con el mayor número de células, pero no difirió significativamente entre los lotes (TABLA 4).

Al día 60, los volúmenes tumorales fueron equivalentes en los animales que tenían tumores palpables, que fueron considerados como positivos para la presencia de tumor (TABLA 5). La incidencia y la mediana de las metástasis espontáneas, si bien no muestran diferencias significativas estadísticamente, exhiben una tendencia decreciente en los animales que recibieron células presenescentes, tratadas con AZT *in vitro* por 30 pasajes (TABLA 6). La FIGURA 21 muestra la distribución del número de nódulos pulmonares superficiales en los lotes que recibieron 2×10^5 células F3II, control o presenescentes.

TABLA 5. Efecto de la exposición *in vitro* a AZT por 30 pasajes y el tratamiento con AZT *in vivo* sobre el volumen de los tumores mamarios murinos al día 60

Volumen tumoral al día 60 (mm ³)				
Células ^a	Células control		Células presenescentes ^b	
	SF	AZT ^c	SF	AZT ^c
50000	2700	0	3170	0
200000	3368±2097	2128±1978	543±769	1797±2492 ^d

^a El día 0 del experimento, se inyectaron 5x10⁴ o 2x10⁵ células F3II en el espacio subcutáneo del flanco derecho de 5 ratones hembras en cada grupo.

^b Las células F3II fueron tratadas *in vitro* con AZT por 30 pasajes.

^c Los ratones recibieron solución fisiológica (SF) o AZT s.c. (15 mg/kg/día)

^d ANOVA, $p = 0.0606$ (no significativo)

TABLA 6. Efecto de la exposición *in vitro* a AZT por 30 pasajes y el tratamiento con AZT *in vivo* sobre la formación de metástasis espontáneas en pulmón.

	Células control ^a		Células presenescentes ^b	
	SF	AZT ^c	SF	AZT ^c
Incidencia de metástasis en pulmón (positivos/total)	4/5 (80%)	2/5 (40%)	1/4 (25%)	1/5 (20%)
Número de metástasis en pulmón^d [mediana (rango)]	2 (0-5)	0 (0-4)	0 (0-6)	0 (0-2)

^a El día 0 del experimento, se inyectaron 2x10⁵ células F3II en el espacio subcutáneo del flanco derecho de 5 ratones hembras en cada grupo.

^b Las células F3II fueron tratadas *in vitro* con AZT por 30 pasajes antes de la inoculación.

^c Los ratones recibieron solución fisiológica (SF) o AZT s.c. (15 mg/kg/día)

^d El número de metástasis espontáneas en pulmón fue determinado 60 días después de la inoculación tumoral. Kruskal-Wallis, $p = 0.3078$ (no significativo)

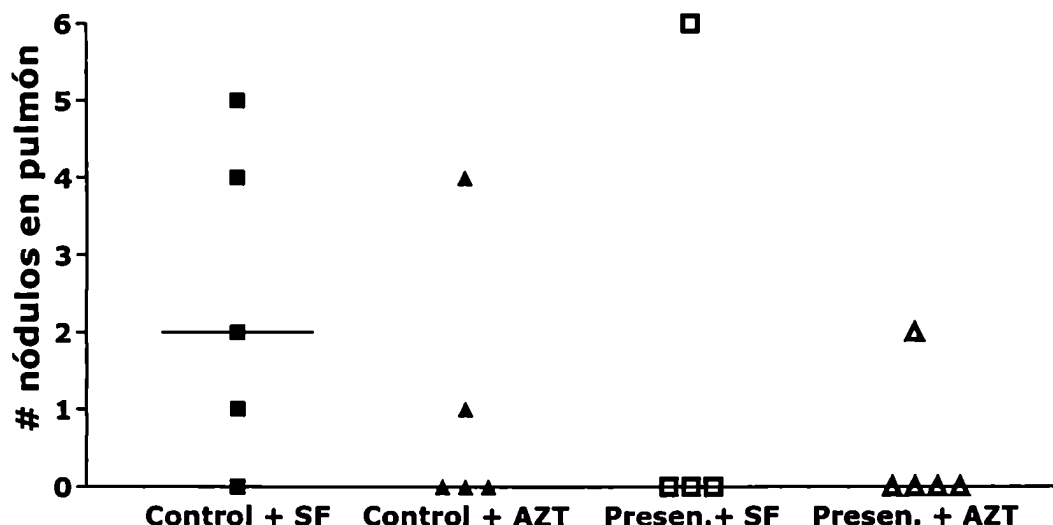


FIGURA 21: Efecto de la administración s.c. de AZT sobre la producción de metástasis pulmonares en ratones. Los animales fueron inoculados con 2×10^5 células F3II control o tratadas por 30 pasajes *in vitro* con AZT (presenescentes). Los lotes tratados *in vivo* recibieron AZT s.c. (AZT) en una dosis de 15 mg/kg/día en solución fisiológica, los controles recibieron solo el vehículo (SF). La línea horizontal indica la mediana, en el caso en difiere de 0.

Las células tumorales crónicamente tratadas con AZT son menos tumorigénicas *in vivo*

La tumorigenicidad *in vivo* de las células F3II tratadas *in vitro* con AZT por más de 35 pasajes fue evaluada en ratones singénicos BALB/c, inyectando distintas cargas tumorales en el espacio subcutáneo del flanco derecho. Los animales que recibieron 2×10^5 células tratadas con AZT mostraron una significativa reducción en el volumen de los tumores primarios (FIGURA 22A), y sobrevivieron más que los controles (FIGURA 22B). Además, cuando los ratones recibieron una carga tumoral menor (5×10^4 células), la formación de tumores mamarios se redujo significativamente en los animales inoculados con células tratadas con AZT, comparados con los animales que recibieron células sin tratar (TABLA 7).

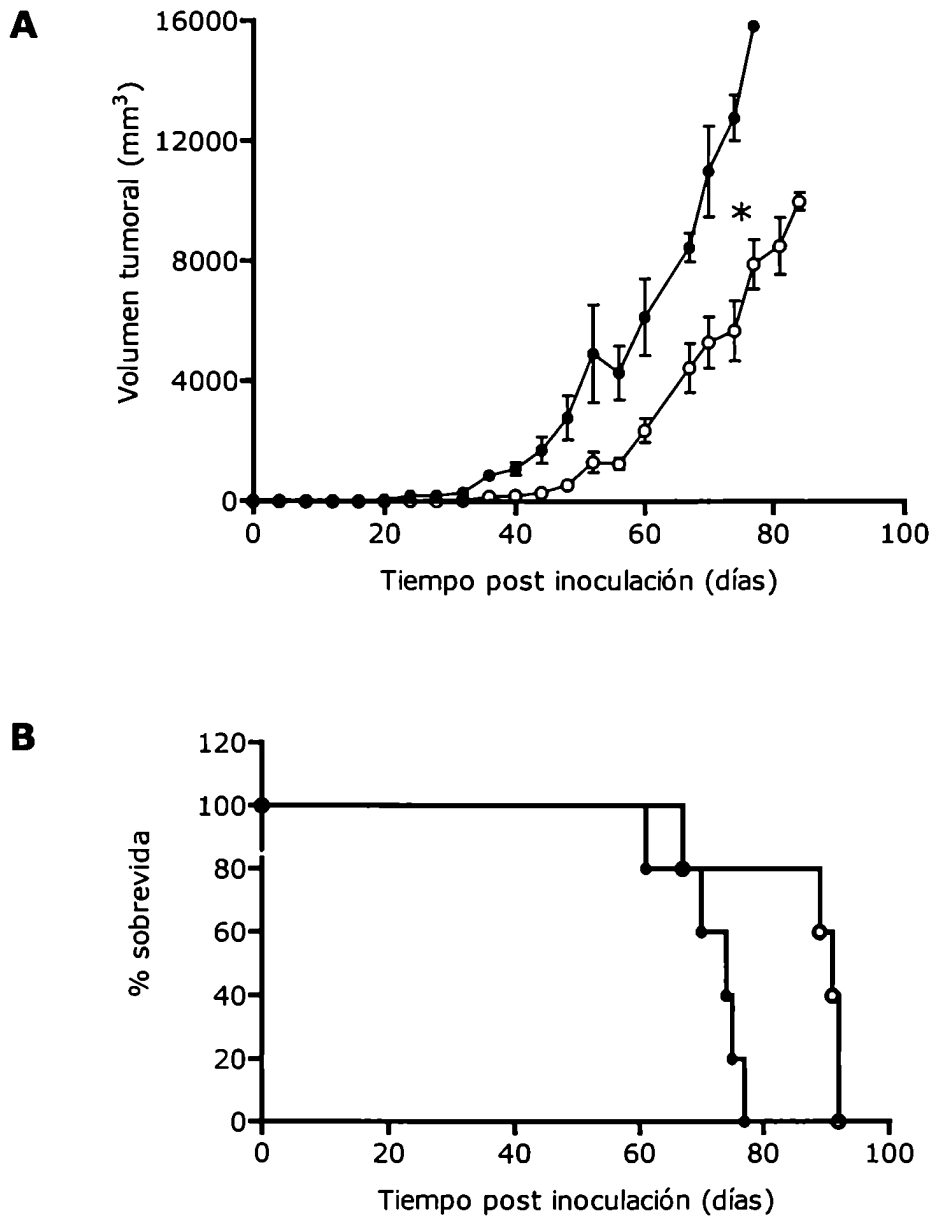


FIGURA 22: Efecto de la exposición crónica *in vitro* a AZT sobre el crecimiento de los tumores mamarios murinos (A) y la supervivencia de los ratones (B) después de la inoculación con células F3II. Los animales recibieron 2×10^5 células F3II tratadas con AZT (círculos abiertos) o células control sin tratar (círculos llenos). Los puntos son representativos de dos experimentos independientes con por lo menos 5 animales por grupo. * $p < 0.001$ desde el día 40 hasta el final del experimento, test t de Student. La supervivencia de los animales que portaban tumor fue analizada por el método de Kaplan-Meier (test Log-Rank, $p = 0.0274$; test de Wilcoxon, $p = 0.0374$).

TABLA 7. Efecto de la exposición prolongada *in vitro* a AZT sobre la tumorigenicidad de las células F3II de carcinoma mamario.

Células^a	Incidencia tumoral al día 10 [positivos/total]	Incidencia tumoral al día 25^c [positivos/total]	Latencia tumoral^d (días)
Control	2/5 (40%)	5/5 (100%)	13.4 ± 6.1
Tratadas con AZT ^b	0/5 (0%)	1/5 (20%)*	20

^a El día 0 del experimento, se inyectaron 5x10⁴ células F3II en el espacio subcutáneo del flanco derecho de 5 ratones hembras en cada grupo.

^b Las células F3II fueron tratadas *in vitro* con AZT por 35 pasajes por lo menos.

^c Se obtuvieron resultados similares al día 120.

^d La latencia tumoral representa el tiempo entre la inyección de las células F3II y la aparición de tumores palpables. Los resultados son presentados como media ± DS considerando los animales positivos al final del experimento.

*p<0.05; test exacto de Fisher.

En otro grupo de experimentos, los animales recibieron 2 x 10⁵ células, fueron sacrificados 60 días después de la inoculación y se analizaron los tumores subcutáneos y los pulmones. En los tumores, el índice mitótico fue similar en ambos grupos (TABLA 8) y no se registraron diferencias en la expresión de PCNA (datos no mostrados). Aunque la expresión de telomerasa fue positiva en tumores provenientes de ambos grupos, el índice apoptótico mostró un incremento dramático en los tumores derivados de células tratadas con AZT (TABLA 8). La velocidad de crecimiento del tumor fue significativamente menor y el número de metástasis espontáneas se encontró disminuido en los animales inoculados con células tratadas con AZT respecto del grupo control (TABLA 9). La distribución del tamaño de las metástasis que mostraban los animales control fue la siguiente: 56% nódulos pequeños (< 1 mm de diámetro), 31% medianos (1-2 mm), y 13% grandes (> 2mm). En contraste, el 100% de los nódulos hallados en los animales que recibieron células tratadas crónicamente *in vitro* con AZT fue muy pequeño (< 0.5 mm de diámetro).

TABLA 8. Efecto de la exposición prolongada *in vitro* a AZT sobre los índices mitótico y apoptótico de tumores mamarios originados por células F3II

Tumores derivados de células^a	Índice mitótico (mitosis/10 HPF)	Índice apoptótico (apoptosis/10 HPF)
Control	4.2 ± 1.3	9.5 ± 4.2
Tratadas con AZT ^b	4.0 ± 1.3	90.0 ± 10.3*

^aEl día 0, 2x10⁵ células F3II fueron inyectadas en espacio subcutáneo del flanco derecho de por lo menos 8 ratones hembras. Los tumores fueron analizados 60 días después de la inoculación de las células.

^b Las células F3II fueron tratadas *in vitro* con AZT por al menos 35 pasajes.

*p<0.001; test t con corrección de Welch.

TABLA 9. Efecto de la exposición prolongada *in vitro* a AZT sobre el crecimiento de tumores mamarios originados por células F3II y el desarrollo de metástasis espontáneas en pulmón

Células	Crecimiento tumoral^b (mm³/día)	Incidencia de metástasis en pulmón [positivos/total]	Número de metástasis en pulmón^c [mediana (rango)]
Control	141 ± 39	7/8 (88%)	16 (0-74)
Tratadas con AZT ^a	38 ± 36*	5/12 (42%)	0 (0-3)*

^a Las células F3II fueron tratadas *in vitro* con AZT por 35 pasajes por lo menos.

^b El día 0, 2x10⁵ células F3II fueron inyectadas en el espacio subcutáneo del flanco derecho de por lo menos 8 ratones hembras. El volumen tumoral promedio fue medido dos veces por semana y la velocidad de crecimiento tumoral fue calculada durante la fase de crecimiento exponencial. Los valores representan media ± SEM.

^c El número de metástasis espontáneas en pulmón fue determinado 60 días después de la inoculación tumoral.

*p<0.001; test t de Student.

*p<0.01, test U de Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

En la última parte de este trabajo mostramos, por primera vez, que las células de un carcinoma mamario experimental tratadas de manera prolongada con dosis no citotóxicas de AZT presentan una tumorigenicidad reducida y un menor potencial metastásico cuando se inoculan en ratones singénicos.

Habiendo encontrado evidencias claras de la inducción de senescencia y apoptosis *in vitro* en las células F3II de carcinoma mamario murino, exploramos los efectos del tratamiento *in vivo* en ratones singénicos BALB/c.

En nuestro modelo experimental, el análisis de la tumorigenicidad de las células F3II reveló que la formación del tumor primario se redujo y que la supervivencia se prolongó en animales inoculados con células tratadas de manera prolongada con AZT, comparados con los que recibieron células no expuestas a la droga. Además, el número y tamaño de las metástasis espontáneas disminuyó significativamente. Analizando todos estos datos en su conjunto, se observó una tumorigenicidad reducida y un retraso en la enfermedad.

A fin de profundizar sobre los fenómenos biológicos que podrían estar determinando la acción antitumoral, procedimos a analizar cortes histológicos de los tumores y explorar sus compartimientos mitóticos y apoptóticos, como así también la expresión de telomerasa. El índice mitótico y la expresión de PCNA no presentaron ninguna variación entre los tumores originados en células controles o en las tratadas con AZT. De manera similar, la expresión de telomerasa fue igualmente positiva en ambos grupos de tumores, lo cual es consistente con el hecho que la telomerasa retoma su actividad cuando el tratamiento con AZT es discontinuado, como demostramos en la Parte II de este trabajo. Sin embargo, el índice apoptótico aumentó dramáticamente en los tumores originados en células tratadas con AZT. Este hecho relevante, confirma nuestra hipótesis según la cual las células tumorales expuestas crónicamente a AZT son capaces de entrar en un programa de senescencia replicativa que termina en la apoptosis.

Dentro del mismo marco, Kondo y colaboradores transfectaron un vector antisentido contra el RNA de la telomerasa en las células de un glioma humano que

expresaba la enzima. Luego de 30 pasajes, algunas subpoblaciones de transfectantes comenzaron a expresar altos niveles de la enzima convertora de la interleuquina 1 β , entraron en apoptosis y exhibieron una tumorigenicidad reducida en ratones *nude* [Kondo *et al.*, 1998a]. No obstante, si bien las características fenotípicas de los tumores humanos que crecen en ratones *nude* reflejan aquellas del tumor original, su progresión y capacidad metastásica no estarían tan bien representadas como en los modelos singénicos [Williams SS *et al.*, 1993].

El número exacto de nucleótidos perdidos en cada ciclo de división celular en una típica línea celular tumoral, generalmente no se conoce, pero probablemente es de unos 50 a 200 pb. Por lo tanto, para telómeros con una longitud promedio de 5 kb, deberían ocurrir unas 50 rondas de replicación antes del inicio de la senescencia celular y subsiguiente apoptosis, asumiendo que los telómeros deberían ser completamente erosionados antes de observar algún efecto. Esto implica la existencia de un período prolongado antes de que se pueda apreciar un efecto positivo de la droga. Para una célula tumoral que tiene un tiempo de duplicación de unas 24 horas, es posible que el crecimiento del tumor rápidamente se adelante a los efectos de acortamiento de los telómeros. Esta estadística ha recibido cierta confirmación a partir de resultados obtenidos con una pequeña molécula inhibidora del sitio catalítico de la telomerasa, en los cuales la reducción de la longitud telomérica en células cultivadas sólo fue observada unos 120 días después del inicio del tratamiento. En forma similar, aunque con este inhibidor fue observado un efecto antitumoral, el mismo ocurrió sólo después de unos 100 días [Damm K *et al.*, 2001].

Este resultado indica que las drogas antitelomerasa podrían ser beneficiosas para células tumorales que poseen telómeros cortos. En el ratón la longitud telomérica es de unos 20 a 150 kb, en cambio en las células humanas contienen entre 5 y 15 kb [Zijlmans J *et al.*, 1997]. A pesar de que los telómeros sean más cortos en los tumores, el tiempo de tratamiento con AZT que permite la dinámica de crecimiento del tumor en los ratones no es suficiente para apreciar los efectos de acortamiento e inducción de senescencia producido por la droga, incluso en el modelo de enfermedad residual mínima representado por la extirpación quirúrgica de los tumores. Así, no se ven diferencias en la sobrevivencia de los animales tratados con AZT en forma oral, como tampoco en la formación de metástasis pulmonares, en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, en un ensayo piloto, se realizó un tratamiento previo con AZT *in vitro* de las células tumorales, sin llegar a una senescencia masiva, y luego estas células fueron inoculadas en los animales que, a su vez, recibieron un tratamiento continuo con AZT s.c. *in vivo*. En este caso, se observó una tendencia a la reducción de la incidencia de metástasis en pulmón y del número de metástasis con respecto a los controles sin tratar. Si bien en este ensayo preliminar las diferencias no son significativas estadísticamente, es un dato interesante a tener en cuenta en la búsqueda de la ventana terapéutica de utilización de la AZT como una droga que se pueda sumar a la quimioterapia convencional.

Esto demostraría que los telómeros se acortaron por el tratamiento en cultivo con AZT y, una vez inoculadas en el ratón, en estas células continúa reduciéndose la longitud telomérica, ya que siguen recibiendo AZT, hasta alcanzar la longitud crítica que podría desencadenar la senescencia replicativa. De este modo, aunque puedan seguir liberando células eventualmente metastásicas, al limitar su potencial de crecimiento, se ve reducida su capacidad de establecer nuevos focos metastásicos en pulmón.

La gran ventaja de la utilización de inhibidores de telomerasa en el tratamiento del cáncer es su alta selectividad, ya que, en principio, deberían afectar sólo a las células tumorales y no a las células somáticas. De esta forma, los inhibidores no deberían tener el perfil de la citotoxicidad convencional, especialmente si requieren de una administración a largo plazo, lo cual es contrario al abordaje tradicional de la quimioterapia del cáncer. Además, la AZT aporta el beneficio adicional de ser un inhibidor de fácil administración -a diferencia de las estrategias basadas en oligonucleótidos- y, fundamentalmente, de ser una droga de actual utilización en la clínica.

La inmortalidad puede ser entendida como un escape anormal de la senescencia celular. La AZT, mediante su acción inductora de senescencia y apoptosis en células tumorales, se constituye en un excelente candidato como droga para el tratamiento en el cáncer, dado que toda la evidencia apunta hacia su acción específica en células que expresan telomerasa. Con respecto al potencial antitumoral de esta droga, es necesario tener en cuenta que, dado que el acortamiento telomérico es un proceso lento, la dinámica de la enfermedad puede poner en riesgo la vida del paciente antes

que la acción de la AZT sea evidenciable. Sin embargo, puede constituir una excelente terapia complementaria en los casos donde la cirugía o las drogas convencionales reducen la masa tumoral primaria, originando una ventana terapéutica que brinde el tiempo suficiente para que la AZT actúe sobre las células tumorales residuales, revirtiendo su inmortalidad y conduciéndolas a la senescencia o apoptosis.

QUINTA PARTE

DISCUSIÓN

Durante estas dos últimas décadas, la investigación básica ha abierto importantes caminos para el avance de la oncología médica. Han sido descubiertos muchos nuevos blancos potenciales en el campo de la oncología, y entre ellos, la telomerasa surgió como uno de los más atractivos y exhaustivamente explorado desde mediados de la década pasada.

El interés científico generado por la telomerasa yace en la función biológica única de esta enzima. Los blancos de las terapias evaluadas actualmente en oncología están, en su mayoría, implicados en el control de la proliferación celular gatillando la muerte celular o apoptosis, o mediante la inducción de un bloqueo citostático. La telomerasa ofrece la oportunidad potencial de controlar la proliferación celular interfiriendo con un proceso biológico único y recientemente descrito, la senescencia celular.

Para considerar la telomerasa como un blanco válido para la investigación terapéutica en oncología, era necesario demostrar en principio una correlación causal entre su expresión en muestras tumorales (preferentemente en tumores humanos que en líneas celulares establecidas *in vitro*, murinas o humanas), también ensayar la relevancia terapéutica de la telomerasa utilizando las metodologías clásicas de la validación biológica (transfecciones celulares del DNA, ratones *knock-out* y transgénicos, mutantes dominantes negativas y estrategias antisentido) y, finalmente, considerar las posibilidades farmacológicas [Lavelle F *et al.*, 2000].

La primer detección de telomerasa fue hecha en cáncer de ovario en 1994 [Counter CM *et al.*, 1994a). Un trabajo pionero en determinar la asociación específica de la actividad de la telomerasa humana con tumores y líneas celulares inmortales fue el de Kim y col. en el cual demostraron que la actividad de la telomerasa estaba presente en el 98% de las líneas celulares inmortales estudiadas, en varios tumores humanos y en ninguna de las 22 poblaciones normales analizadas [Kim NW *et al.*, 1994]. Una de las más recientes y extensas compilaciones en este sentido, incluyó 601 muestras de tumores humanos, y la telomerasa fue detectada en 476 (79%) muestras [Raymond E *et al.*, 1996]. Este elevado porcentaje concuerda con aquellos encontrados previamente en otras series y confirma a la telomerasa tanto como un marcador como un blanco, realmente atractivo, en oncología [Ryhu MS, 1995], especialmente dado que la telomerasa, además, es generalmente indetectable en los tejidos normales adyacentes a los tumores. Es necesario tener en cuenta también las

excepciones a esta aseveración que abarcan tanto los mecanismos alternativos de elongación telomérica en una minoría de tumores y la actividad de telomerasa presente en algunos tipos celulares normales (linfocitos activados, células de la línea germinal, y células precursoras mitóticas de algunos epitelios normales) [Autexier C y Greider CW, 1996; Greider CW, 1998]. En los tumores benignos, si bien la actividad de telomerasa puede ser detectable, es significativamente menor que en los malignos.

Considerando esta información, podemos observar una fuerte correlación entre la expresión de la telomerasa y el cáncer. La expresión diferencial de la telomerasa entre los tejidos normales y tumorales es notable y muy superior a aquella observada para los blancos terapéuticos clásicos como las topoisomerasas, tubulina y microtúbulos, y enzimas involucradas en el metabolismo o la replicación del DNA.

La validación biológica de la función de la telomerasa fue llevada a cabo en ratones *knock-out* para el componente RNA de la enzima [Blasco MA *et al.*, 1997]. Si bien los estudios indicaron que el acortamiento telomérico y la activación de la telomerasa podrían tener un efecto menor en la tumorigénesis murina, demostraron que la telomerasa está involucrada tanto en control de tamaño del DNA telomérico como en la estabilidad de los cromosomas [Blasco MA, 2002].

Mediante experimentos de transfección de líneas celulares con la hTERT se demostró que la inducción de la telomerasa era necesaria, aunque no suficiente, para superar la senescencia celular [Bodnar AG *et al.*, 1998]. Además, la habilidad de inducir la crisis celular en una línea inmortal por la expresión de un vector antisentido para el hTR [Feng J *et al.*, 1995], apoyan la noción de que la inhibición de la telomerasa es una causa y no una consecuencia de la inducción de senescencia.

Una vez validada la telomerasa como un blanco potencial en el desarrollo de una terapia antitumoral, muchos grupos se abocaron a ensayar distintos tipos de estrategias dirigidas a la inhibición de esta enzima, como ya hemos descrito.

Dado que la telomerasa puede ser vista como una transcriptasa reversa, la cual utiliza su molde endógeno de RNA para sintetizar las nuevas repeticiones teloméricas a partir del extremo 3' de su hebra de DNA rica en G, analizamos el efecto de un análogo de nucleótido, probado como inhibidor de la retrotranscriptasa del HIV1.

En este trabajo, en primer término, mostramos que el tratamiento continuo con AZT de las células tumorales humanas HeLa, producía un acortamiento progresivo de los telómeros, que además resultó irreversible, ya que los mismos no recuperaron su longitud cuando cesó el tratamiento con la droga.

Si bien este acortamiento no inició un proceso evidente de senescencia replicativa en los cultivos durante el período de tratamiento, brindó las pruebas necesarias con respecto al efecto de la AZT sobre la longitud telomérica, para ensayar sus propiedades antitumorales *in vivo*. La reducción progresiva de las repeticiones teloméricas podría conducir a largo plazo a la senescencia celular, y su activación en células cancerosas podría ser útil para reducir el crecimiento tumoral *in vivo*.

Con este objetivo, en principio evaluamos los efectos del tratamiento crónico con AZT sobre las células F3II de carcinoma mamario murino. La exposición continua de los cultivos a la droga reveló signos morfológicos y bioquímicos de senescencia y también de inducción de muerte celular programada, consecuencia de la inhibición de la telomerasa.

La utilización de una línea celular murina nos daba la incomparable ventaja de evaluar los efectos del tratamiento no sólo sobre el tumor primario sino también sobre la formación de metástasis en un modelo singénico.

El tratamiento *in vitro* con AZT de las células tumorales hasta un estadio anterior a la senescencia, previo a su inoculación en animales, mostró una tendencia a la reducción de la incidencia y del número de metástasis en pulmón en los animales que siguieron recibiendo AZT s.c., con respecto a los controles que recibieron células sin tratar. El resultado de este ensayo piloto, aunque no sea estadísticamente significativo, indicaría que efectivamente habría un acortamiento telomérico en cultivo por AZT que sigue progresando en el animal por la AZT administrada en forma s.c., reduciendo así la capacidad de crecimiento de las células potencialmente metastásicas.

En el mismo sentido, en nuestro modelo experimental, cuando los animales fueron inoculados con células senescentes por el tratamiento *in vitro* con AZT, se redujo el crecimiento de los tumores primarios (por inducción de apoptosis) y se prolongó la supervivencia, con respecto a los controles que recibieron células sin tratar con la droga. Además, tanto el número de las metástasis en pulmón como el tamaño de las

mismas fueron menores en los animales que habían sido inoculados con células tratadas con AZT. Así, la exposición crónica *in vitro* a AZT de las células de carcinoma mamario murino F3II, resultó en una tumorigenicidad reducida de las mismas y un retraso en la enfermedad en los ratones singénicos.

El principal punto a tener en cuenta en la utilización de la telomerasa como blanco de una terapia antitumoral es la relevancia clínica del resultado de la inhibición de la enzima en la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer [Lavelle F *et al.*, 2000]. De acuerdo con el paradigma corrientemente propuesto para los telómeros y telomerasa, que hemos discutido extensamente, se puede predecir que la inhibición de la telomerasa no afectará un tumor hasta que sus telómeros alcancen el tamaño crítico que gatille la senescencia. Esto significa que durante la terapia anti-telomerasa, las células tumorales continuarían creciendo, sufriendo unas 30 divisiones celulares, hasta que los telómeros alcanzaran la longitud crítica que conduzca a la senescencia. De este modo resulta obvio que la terapia no es aplicable a aquellos pacientes con tumores avanzados al inicio de la terapia, para el tratamiento del tumor primario.

Considerando el retraso de los potenciales efectos de los inhibidores de la telomerasa sugeridos por el paradigma "telómeros/telomerasa", actualmente existe consenso en considerar a los inhibidores de la telomerasa dentro de una terapia adyuvante. Serían beneficiarios sólo los pacientes con un volumen tumoral mínimo al inicio de la terapia, incluyendo aquellos en los cuales el tumor primario fue reducido por procedimientos convencionales, en los cuales el tratamiento tendría efecto también sobre la formación y el crecimiento de las metástasis.

Es indispensable ensayar los efectos de los inhibidores de la telomerasa en modelos experimentales que reflejen la situación clínica, como hemos hecho en el presente trabajo. Una de las principales dificultades yace, justamente, en el diseño del modelo preclínico más adecuado, y en la búsqueda de la ventana terapéutica que permita evaluar los efectos antitumorales de la droga.

Dado que serían necesarios tratamientos repetidos y prolongados, los inhibidores de la telomerasa no deberían ser tóxicos y deberían ser activos por la vía oral. En este sentido, la AZT cuenta con la gran ventaja de ser una droga fácilmente administrable, ya probada en otras patologías y muy utilizada en la clínica corrientemente.

En este trabajo demostramos, por primera vez, que a través de su acción inhibitoria de la telomerasa, la AZT es capaz de revertir el estado inmortal característico de las células tumorales conduciéndolas a un estado "mortal", actuando específicamente sobre células que expresan telomerasa. La AZT constituye así una droga potencialmente muy útil para una terapia adyuvante durante periodos prolongados. Considerando el cáncer como una enfermedad crónica, la AZT podría actuar sobre pequeños focos de células tumorales residuales, conduciéndolas a la muerte celular y produciendo así una prolongada remisión de la enfermedad.

SEXTA PARTE

CONCLUSIONES

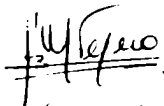
En el presente trabajo se analizaron los efectos del tratamiento crónico *in vitro* con AZT sobre dos líneas tumorales y su relevancia en la tumorigénesis. En primer lugar, investigamos si la exposición continua de la línea de cáncer cervical humano HeLa, que muestra actividad de telomerasa, llevaba al acortamiento de los telómeros. En una segunda etapa, con el objetivo de realizar estudios en un modelo animal, utilizamos la línea de carcinoma mamario murino F3II y evaluamos si la exposición crónica *in vitro* a AZT de cultivos de esta línea celular, era capaz de inducir senescencia y conducir a la apoptosis. Finalmente, realizamos ensayos *in vivo* con las células F3II, en ratones singénicos BALB/c, para evaluar los efectos del tratamiento con AZT sobre la tumorigenicidad de la línea.

Retomando los objetivos específicos, las conclusiones de los resultados presentados en este trabajo son las siguientes:

1. La exposición continua a AZT de cultivos de la línea celular humana HeLa de carcinoma cervical produjo un acortamiento irreversible de sus telómeros, ya que los mismos no se alargaron, sino que mantuvieron su longitud, al suspender el tratamiento con este análogo de nucleósido.
2. Las células F3II exhibieron actividad de telomerasa y la misma fue inhibida por el tratamiento crónico de los cultivos con AZT, sin disminuir la expresión del mRNA de la mTERT. Tampoco se observó una inhibición de la proteína en los cultivos expuestos a la droga, si bien los niveles se encontraron algo disminuidos. Las células tratadas en forma continua con AZT mostraron signos morfológicos y bioquímicos de senescencia celular y de inducción de apoptosis.
3. Las células F3II tratadas *in vitro* con AZT mostraron una fuerte reducción de la tumorigenicidad, con respecto a los controles, al ser inoculadas en ratones singénicos. Se redujo la formación del tumor primario y del número de metástasis espontáneas en pulmón, posiblemente debido a un aumento de la apoptosis en las células tratadas *in vitro* con AZT hasta la senescencia.
4. Los ensayos preliminares en modelos preclínicos sugirieron que la administración de AZT *in vivo* – en una dosis semejante a la utilizada en la clínica- podría conducir a una reducción de la capacidad tumorigénica y metastásica de las células pretratadas *in vitro* con AZT hasta un estadio anterior


a la senescencia. No obstante, resta experimentación preclínica dirigida a evaluar combinaciones con quimioterapia convencional.

Estos resultados muestran a la AZT como una droga capaz de inducir senescencia en células tumorales, revirtiendo así su estado de "inmortalidad", obtenido precisamente al escapar de los mecanismos inductores de senescencia. Su acción sería específica sobre células que expresan telomerasa, un marcador muy relacionado con células cancerosas. De acuerdo con los datos presentados en este trabajo, la utilización de este inhibidor de telomerasa en la clínica sería útil en una terapia complementaria en combinación o con posterioridad a la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia convencional. Así la AZT podría actuar sobre los pequeños focos de células cancerosas residuales conduciéndolas a la senescencia o apoptosis.


A. TEJERA
ÁGUEDA M. TEJERA


DAVIEL E GOMEZ

7


D.F. ALONSO

REFERENCIAS

- Abdul-Ghani,R., Ohana,P., Matouk,I., Ayesh,S., Ayesh,B., Laster,M., Bibi,O., Giladi,H., Molnar-Kimber,K., Sughayer,M.A., de Groot,N., and Hochberg,A. (2000). Use of transcriptional regulatory sequences of telomerase (hTER and hTERT) for selective killing of cancer cells. *Mol. Ther.* 2 , 539-544.
- Adams,J.M. and Cory,S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Adams,M.A., Dionne,I., Wellinger,R.J., and Holm,C. (2000). The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Mol. Cell Biol.* 20, 786-796.
- Ahmed,S. and Hodgkin,J. (2000). MRT-2 checkpoint protein is required for germline immortality and telomere replication in *C. elegans*. *Nature* 403, 159-164.
- Akalin,A., Elmore,L.W., Forsythe,H.L., Amaker,B.A., McCollum,E.D., Nelson,P.S., Ware,J.L., and Holt,S.E. (2001). A novel mechanism for chaperone-mediated telomerase regulation during prostate cancer progression. *Cancer Res.* 61, 4791-4796.
- Alberti,P., Ren,J., Teulade-Fichou,M.P., Guittat,L., Riou,J.F., Chaires,J., Helene,C., Vigneron,J.P., Lehn,J.M., and Mergny,J.L. (2001). Interaction of an acridine dimer with DNA quadruplex structures. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 19, 505-513.
- Alcorta,D.A., Xiong,Y., Phelps,D., Hannon,G., Beach,D., and Barrett,J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 13742-13747.
- Alfonso-De Matte,M.Y., Cheng,J.Q., and Kruk,P.A. (2001). Ultraviolet irradiation- and dimethyl sulfoxide-induced telomerase activity in ovarian epithelial cell lines. *Exp. Cell Res.* 267, 13-27.
- Allsopp,R.C., Vaziri,H., Patterson,C., Goldstein,S., Younglai,E.V., Futcher,A.B., Greider,C.W., and Harley,C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10114-10118.
- Allsopp,R.C. and Harley,C.B. (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 219, 130-136.
- Alnemri,E.S., Livingston,D.J., Nicholson,D.W., Salvesen,G., Thornberry,N.A., Wong,W.W., and Yuan,J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Alonso,D.F., Farias,E.F., Ladedo,V., Davel,L., Puricelli,L., and Bal de Kier,J.E. (1996a). Effects of synthetic urokinase inhibitors on local invasion and metastasis in a murine mammary tumor model. *Breast Cancer Res. Treat.* 40, 209-223.
- Alonso,D.F., Farias,E.F., Urtreger,A., Ladedo,V., Vidal,M.C., and Bal de Kier,J.E. (1996b). Characterization of F3II, a sarcomatoid mammary carcinoma cell line

originated from a clonal subpopulation of a mouse adenocarcinoma. *J. Surg. Oncol.* **62**, 288-297.

Ancelin,K., Brunori,M., Bauwens,S., Koering,C.E., Brun,C., Ricoul,M., Pommier,J.P., Sabatier,L., and Gilson,E. (2002). Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol. Cell Biol.* **22**, 3474-3487.

Antonsson,B. and Martinou,J.C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell Res.* **256**, 50-57.

Antonsson,B., Montessuit,S., Sanchez,B., and Martinou,J.C. (2001). Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 11615-11623.

Arends,M.J. and Wyllie,A.H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **32**, 223-254.

Arends,M.J., McGregor,A.H., and Wyllie,A.H. (1994). Apoptosis is inversely related to necrosis and determines net growth in tumors bearing constitutively expressed myc, ras, and HPV oncogenes. *Am. J. Pathol.* **144**, 1045-1057.

Ashkenazi,A. and Dixit,V.M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 255-260.

Autexier,C., Pruzan,R., Funk,W.D., and Greider,C.W. (1996). Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J.* **15**, 5928-5935.

Autexier,C. and Greider,C.W. (1996). Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 387-391.

Bailey,S.M., Meyne,J., Chen,D.J., Kurimasa,A., Li,G.C., Lehnert,B.E., and Goodwin,E.H. (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 14899-14904.

Barry,M., Heibein,J.A., Pinkoski,M.J., Lee,S.F., Moyer,R.W., Green,D.R., and Bleackley,R.C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. Cell Biol.* **20**, 3781-3794.

Bates,S., Phillips,A.C., Clark,P.A., Stott,F., Peters,G., Ludwig,R.L., and Vousden,K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**, 124-125.

Baumann,P. and Cech,T.R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**, 1171-1175.

Beattie,T.L., Zhou,W., Robinson,M.O., and Harrington,L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr. Biol.* **8**, 177-180.

Beattie,T.L., Zhou,W., Robinson,M.O., and Harrington,L. (2001). Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6151-6160.

- Beere,H.M., Wolf,B.B., Cain,K., Mosser,D.D., Mahboubi,A., Kuwana,T., Taylor,P., Morimoto,R.I., Cohen,G.M., and Green,D.R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2, 469-475.
- Bellamy,C.O., Malcomson,R.D., Harrison,D.J., and Wyllie,A.H. (1995). Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* 6, 3-16.
- Bellamy,C.O. (1997). p53 and apoptosis. *Br. Med. Bull.* 53, 522-538.
- Bernhard,D., Loffler,M., Hartmann,B.L., Yoshida,M., Kofler,R., and Csordas,A. (1999). Interaction between dexamethasone and butyrate in apoptosis induction: non-additive in thymocytes and synergistic in a T cell-derived leukemia cell line. *Cell Death. Differ.* 6, 609-617.
- Bestilny,L.J., Brown,C.B., Miura,Y., Robertson,L.D., and Riabowol,K.T. (1996). Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res.* 56, 3796-3802.
- Bianchi,A., Stansel,R.M., Fairall,L., Griffith,J.D., Rhodes,D., and de Lange,T. (1999). TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J.* 18, 5735-5744.
- Bianchi,A. and de Lange,T. (1999). Ku binds telomeric DNA in vitro. *J. Biol. Chem.* 274, 21223-21227.
- Bickenbach,J.R., Vormwald-Dogan,V., Bachor,C., Bleuel,K., Schnapp,G., and Boukamp,P. (1998). Telomerase is not an epidermal stem cell marker and is downregulated by calcium. *J. Invest Dermatol.* 111, 1045-1052.
- Bilaud,T., Koering,C.E., Binet-Brasselet,E., Ancelin,K., Pollice,A., Gasser,S.M., and Gilson,E. (1996). The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res.* 24, 1294-1303.
- Bilaud,T., Brun,C., Ancelin,K., Koering,C.E., Laroche,T., and Gilson,E. (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* 17, 236-239.
- Bisoffi,M., Chakerian,A.E., Fore,M.L., Bryant,J.E., Hernandez,J.P., Moyzis,R.K., and Griffith,J.K. (1998). Inhibition of human telomerase by a retrovirus expressing telomeric antisense RNA. *Eur. J. Cancer* 34, 1242-1249.
- Blackburn,E.H. and Gall,J.G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* 120, 33-53.
- Blackburn,E.H. and Chiou,S.S. (1981). Non-nucleosomal packaging of a tandemly repeated DNA sequence at termini of extrachromosomal DNA coding for rRNA in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 2263-2267.
- Blackburn,E.H. (1994). Telomeres: no end in sight. *Cell* 77, 621-623.

- Blasco,M.A., Funk,W., Villeponteau,B., and Greider,C.W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-1270.
- Blasco,M.A., Lee,H.W., Hande,M.P., Samper,E., Lansdorp,P.M., DePinho,R.A., and Greider,C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91, 25-34.
- Blasco,M.A. (2002). Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* 2, 627-633.
- Blaydes,J.P. and Wynford-Thomas,D. (1998). The proliferation of normal human fibroblasts is dependent upon negative regulation of p53 function by mdm2. *Oncogene* 16, 3317-3322.
- Bodnar,A.G., Kim,N.W., Effros,R.B., and Chiu,C.P. (1996). Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp. Cell Res.* 228, 58-64.
- Bodnar,A.G., Ouellette,M., Frolkis,M., Holt,S.E., Chiu,C.P., Morin,G.B., Harley,C.B., Shay,J.W., Lichtsteiner,S., and Wright,W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Bond,J.A., Blaydes,J.P., Rowson,J., Haughton,M.F., Smith,J.R., Wynford-Thomas,D., and Wyllie,F.S. (1995). Mutant p53 rescues human diploid cells from senescence without inhibiting the induction of SDI1/WAF1. *Cancer Res.* 55, 2404-2409.
- Bourns,B.D., Alexander,M.K., Smith,A.M., and Zakian,V.A. (1998). Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol. Cell Biol.* 18, 5600-5608.
- Broccoli,D., Smogorzewska,A., Chong,L., and de Lange,T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* 17, 231-235.
- Brooks,R.F., Richmond,F.N., Riddle,P.N., and Richmond,K.M. (1984). Apparent heterogeneity in the response of quiescent swiss 3T3 cells to serum growth factors: implications for the transition probability model and parallels with "cellular senescence" and "competence". *J. Cell Physiol* 121, 341-350.
- Brown,J.P., Wei,W., and Sedivy,J.M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834.
- Bryan,T.M., Englezou,A., Gupta,J., Bacchetti,S., and Reddel,R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 14, 4240-4248.
- Bryan,T.M., Englezou,A., Dalla-Pozza,L., Dunham,M.A., and Reddel,R.R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* 3, 1271-1274.
- Bryan,T.M., Sperger,J.M., Chapman,K.B., and Cech,T.R. (1998). Telomerase reverse transcriptase genes identified in *Tetrahymena thermophila* and *Oxytricha trifallax*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8479-8484.

- Bryce,L.A., Morrison,N., Hoare,S.F., Muir,S., and Keith,W.N. (2000). Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia*. 2, 197-201.
- Buchkovich,K.J. and Greider,C.W. (1996). Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human T cells. *Mol. Biol. Cell* 7, 1443-1454.
- Budihardjo,I., Oliver,H., Lutter,M., Luo,X., and Wang,X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 269-290.
- Burger,A.M., Double,J.A., and Newell,D.R. (1997). Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur. J. Cancer* 33, 638-644.
- Burger,A.M., Fiebig,H.H., Kuettel,M.R., Lautenberger,J.A., Kung,H.F., and Rhim,J.S. (1998). Effect of oncogene expression on telomerase activation and telomere length in human endothelial, fibroblast and prostate epithelial cells. *Int. J. Oncol.* 13, 1043-1048.
- Buttke,T.M. and Sandstrom,P.A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* 15, 7-10.
- Cain,K., Brown,D.G., Langlais,C., and Cohen,G.M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J. Biol. Chem.* 274, 22686-22692.
- Cain,K., Bratton,S.B., Langlais,C., Walker,G., Brown,D.G., Sun,X.M., and Cohen,G.M. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 6067-6070.
- Campisi,J. (1997). The biology of replicative senescence. *Eur. J. Cancer* 33, 703-709.
- Carnero,A., Hudson,J.D., Price,C.M., and Beach,D.H. (2000). p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat. Cell Biol.* 2, 148-155.
- Carson,M.J. and Hartwell,L. (1985). CDC17: an essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell* 42, 249-257.
- Chandra,A., Hughes,T.R., Nugent,C.I., and Lundblad,V. (2001). Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.* 15, 404-414.
- Chang,E. and Harley,C.B. (1995). Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11190-11194.
- Chang,J.T., Chen,Y.L., Yang,H.T., Chen,C.Y., and Cheng,A.J. (2002). Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur. J. Biochem.* 269, 3442-3450.
- Chen,J.L., Blasco,M.A., and Greider,C.W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503-514.

Chen,Q., Fischer,A., Reagan,J.D., Yan,L.J., and Ames,B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4337-4341.

Chen,Q., Ijpmma,A., and Greider,C.W. (2001). Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol. Cell Biol.* 21, 1819-1827.

Chen,X.Q., Bonnefoi,H., Pelte,M.F., Lyautey,J., Lederrey,C., Movarekhi,S., Schaeffer,P., Mulcahy,H.E., Meyer,P., Stroun,M., and Anker,P. (2000). Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 6, 3823-3826.

Cheng,Y.C., Dutschman,G.E., Bastow,K.F., Sarngadharan,M.G., and Ting,R.Y. (1987). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs. *J. Biol. Chem.* 262, 2187-2189.

Chong,L., van Steensel,B., Broccoli,D., Erdjument-Bromage,H., Hanish,J., Tempst,P., and de Lange,T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-1667.

Chou,W.C., Hawkins,A.L., Barrett,J.F., Griffin,C.A., and Dang,C.V. (2001). Arsenic inhibition of telomerase transcription leads to genetic instability. *J. Clin. Invest* 108, 1541-1547.

Cikala,M., Wilm,B., Hobmayer,E., Bottger,A., and David,C.N. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr. Biol.* 9, 959-962.

Clarke,P.G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol. (Berl)* 181, 195-213.

Clutton,S. (1997). The importance of oxidative stress in apoptosis. *Br. Med. Bull.* 53, 662-668.

Cohen,H. and Sinclair,D.A. (2001). Recombination-mediated lengthening of terminal telomeric repeats requires the Sgs1 DNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3174-3179.

Colgin,L.M., Wilkinson,C., Englezou,A., Kilian,A., Robinson,M.O., and Reddel,R.R. (2000). The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia.* 2, 426-432.

Collins,K. (2000). Mammalian telomeres and telomerase. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 378-383.

Cong,Y.S., Wen,J., and Bacchetti,S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet.* 8, 137-142.

Cong,Y.S. and Bacchetti,S. (2000). Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J. Biol. Chem.* 275, 35665-35668.

- Cook, B.D., Dynek, J.N., Chang, W., Shostak, G., and Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol. Cell Biol.* **22**, 332-342.
- Cooper, J.P., Nimmo, E.R., Allshire, R.C., and Cech, T.R. (1997). Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* **385**, 744-747.
- Cordeiro, Y., Schramke, V., Longhese, M.P., Smokvina, T., Paciotti, V., Brevet, V., Gilson, E., and Geli, V. (1999). Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomere functions. *Nat. Genet.* **21**, 204-208.
- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **11**, 1921-1929.
- Counter, C.M., Hirte, H.W., Bacchetti, S., and Harley, C.B. (1994a). Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2900-2904.
- Counter, C.M., Botelho, F.M., Wang, P., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1994b). Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J. Virol.* **68**, 3410-3414.
- Counter, C.M., Meyerson, M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Caddle, S.D., Haber, D.A., and Weinberg, R.A. (1998a). Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene* **16**, 1217-1222.
- Counter, C.M., Hahn, W.C., Wei, W., Caddle, S.D., Beijersbergen, R.L., Lansdorp, P.M., Sedivy, J.M., and Weinberg, R.A. (1998b). Dissociation among *in vitro* telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14723-14728.
- Crowe, D.L. and Nguyen, D.C. (2001). Rb and E2F-1 regulate telomerase activity in human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1518**, 1-6.
- Damm, K., Hemmann, U., Garin-Chesa, P., Huel, N., Kauffmann, I., Priepke, H., Niestroj, C., Daiber, C., Enekel, B., Guilliard, B., Lauritsch, I., Muller, E., Pascolo, E., Sauter, G., Pantic, M., Martens, U.M., Wenz, C., Lingner, J., Kraut, N., Rettig, W.J., and Schnapp, A. (2001). A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J.* **20**, 6958-6968.
- Darlix, J.L., Cristofari, G., Rau, M., Pechoux, C., Berthou, L., and Roques, B. (2000). Nucleocapsid protein of human immunodeficiency virus as a model protein with chaperoning functions and as a target for antiviral drugs. *Adv. Pharmacol.* **48**, 345-372.
- de Lange, T. (1994). Activation of telomerase in a human tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2882-2885.
- de Lange, T. (1998). Telomeres and senescence: ending the debate. *Science* **279**, 334-335.

- de Stanchina,E., McCurrach,M.E., Zindy,F., Shieh,S.Y., Ferbeyre,G., Samuelson,A.V., Prives,C., Roussel,M.F., Sherr,C.J., and Lowe,S.W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev.* 12, 2434-2442.
- Dejmek,A., Yahata,N., Ohyashiki,K., Ebihara,Y., Kakihana,M., Hirano,T., Kawate,N., and Kato,H. (2001). In situ telomerase activity in pleural effusions: a promising marker for malignancy. *Diagn. Cytopathol.* 24, 11-15.
- DePinho,R.A. (2000). The age of cancer. *Nature* 408, 248-254.
- Desagher,S. and Martinou,J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10, 369-377.
- Dessain,S.K., Yu,H., Reddel,R.R., Beijersbergen,R.L., and Weinberg,R.A. (2000). Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 60, 537-541.
- Dez,C., Henras,A., Faucon,B., Lafontaine,D., Caizergues-Ferrer,M., and Henry,Y. (2001). Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res.* 29, 598-603.
- Dhaene,K., Van Marck,E., and Parwaresch,R. (2000). Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch.* 437, 1-16.
- Dickson,M.A., Hahn,W.C., Ino,Y., Ronfard,V., Wu,J.Y., Weinberg,R.A., Louis,D.N., Li,F.P., and Rheinwald,J.G. (2000). Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell Biol.* 20, 1436-1447.
- Diede,S.J. and Gottschling,D.E. (1999). Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* 99, 723-733.
- Dimri,G.P., Lee,X., Basile,G., Acosta,M., Scott,G., Roskelley,C., Medrano,E.E., Linskens,M., Rubelj,I., Pereira-Smith,O., and . (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9363-9367.
- Dimri,G.P., Itahana,K., Acosta,M., and Campisi,J. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol. Cell Biol.* 20, 273-285.
- Drissi,R., Zindy,F., Roussel,M.F., and Cleveland,J.L. (2001). c-Myc-mediated regulation of telomerase activity is disabled in immortalized cells. *J. Biol. Chem.* 276, 29994-30001.
- Ducrest,A.L., Amacker,M., Mathieu,Y.D., Cuthbert,A.P., Trott,D.A., Newbold,R.F., Nabholz,M., and Lingner,J. (2001). Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity. *Cancer Res.* 61, 7594-7602.
- Dunham,M.A., Neumann,A.A., Fasching,C.L., and Reddel,R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* 26, 447-450.

- Dyson,N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-2262.
- Earnshaw,W.C., Martins,L.M., and Kaufmann,S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424.
- Elayadi,A.N., Demieville,A., Wancewicz,E.V., Monia,B.P., and Corey,D.R. (2001). Inhibition of telomerase by 2'-O-(2-methoxyethyl) RNA oligomers: effect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1683-1689.
- Elenbaas,B., Spirio,L., Koerner,F., Fleming,M.D., Zimonjic,D.B., Donaher,J.L., Popescu,N.C., Hahn,W.C., and Weinberg,R.A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev.* **15**, 50-65.
- Elenitoba-Johnson,K.S. (2001). Complex regulation of telomerase activity: implications for cancer therapy. *Am. J. Pathol.* **159**, 405-410.
- Eskes,R., Desagher,S., Antonsson,B., and Martinou,J.C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.* **20**, 929-935.
- Evans,S.K. and Lundblad,V. (1999). Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**, 117-120.
- Fan,X. and Price,C.M. (1997). Coordinate regulation of G- and C strand length during new telomere synthesis. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2145-2155.
- Fang,G. and Cech,T.R. (1993). The beta subunit of Oxytricha telomere-binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell* **74**, 875-885.
- Faraj,A., El Alaoui,A.M., Gosselin,G., Imbach,J.L., Morrow,C., and Sommadossi,J.P. (2000). Effects of beta-L-3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-triphosphate on host and viral DNA polymerases. *Antiviral Res.* **47**, 97-102.
- Feng,J., Funk,W.D., Wang,S.S., Weinrich,S.L., Avilion,A.A., Chiu,C.P., Adams,R.R., Chang,E., Allsopp,R.C., Yu,J., and . (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* **269**, 1236-1241.
- Ferrara,F.F., Fazi,F., Bianchini,A., Padula,F., Gelmetti,V., Minucci,S., Mancini,M., Pelicci,P.G., Lo,C.F., and Nervi,C. (2001). Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* **61**, 2-7.
- Fischer,H., Koenig,U., Eckhart,L., and Tschachler,E. (2002). Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 722-726.
- Fishel,R. (1999). Signaling mismatch repair in cancer. *Nat. Med.* **5**, 1239-1241.
- Fletcher,T.M., Salazar,M., and Chen,S.F. (1996). Human telomerase inhibition by 7-deaza-2'-deoxypurine nucleoside triphosphates. *Biochemistry* **35**, 15611-15617.

- Fletcher,T.M., Cathers,B.E., Ravikumar,K.S., Mamiya,B.M., and Kerwin,S.M. (2001). Inhibition of human telomerase by 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleoside triphosphate analogs: potent inhibition by 6-thio-7-deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate. *Bioorg. Chem.* 29, 36-55.
- Folini,M., Colella,G., Villa,R., Lualdi,S., Daidone,M.G., and Zaffaroni,N. (2000). Inhibition of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the RNA component of telomerase in human melanoma cells. *J. Invest Dermatol.* 114, 259-267.
- Francis,R., West,C., and Friedman,S.H. (2001). Targeting telomerase via its key RNA/DNA heteroduplex. *Bioorg. Chem.* 29, 107-117.
- Frenck,R.W., Jr., Blackburn,E.H., and Shannon,K.M. (1998). The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A* 95, 5607-5610.
- Frisch,S.M. and Francis,H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619-626.
- Fu,W., Killen,M., Culmsee,C., Dhar,S., Pandita,T.K., and Mattson,M.P. (2000). The catalytic subunit of telomerase is expressed in developing brain neurons and serves a cell survival-promoting function. *J. Mol. Neurosci.* 14, 3-15.
- Fujimoto,K. and Takahashi,M. (1997). Telomerase activity in human leukemic cell lines is inhibited by antisense pentadecadeoxynucleotides targeted against c-myc mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 775-781.
- Fujimoto,K., Kyo,S., Takakura,M., Kanaya,T., Kitagawa,Y., Itoh,H., Takahashi,M., and Inoue,M. (2000). Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res.* 28, 2557-2562.
- Fukui,T., Nonomura,N., Tokizane,T., Sato,E., Ono,Y., Harada,Y., Nishimura,K., Takahara,S., and Okuyama,A. (2001). Clinical evaluation of human telomerase catalytic subunit in bladder washings from patients with bladder cancer. *Mol. Urol.* 5, 19-23.
- Furman,P.A., Fyfe,J.A., St Clair,M.H., Weinhold,K., Rideout,J.L., Freeman,G.A., Lehrman,S.N., Bolognesi,D.P., Broder,S., Mitsuya,H., and . (1986). Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 8333-8337.
- Gauthier,L.R., Granotier,C., Soria,J.C., Faivre,S., Boige,V., Raymond,E., and Boussin,F.D. (2001). Detection of circulating carcinoma cells by telomerase activity. *Br. J. Cancer* 84, 631-635.
- Gomez,D.E., Kassim,A and Olivero,O.A. (1995) Preferential incorporation of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) in telomeric sequences of CHO cells. *Int. J. Oncol.* 7, 1057-1060.
- Gonzalez-Suarez,E., Samper,E., Ramirez,A., Flores,J.M., Martin-Caballero,J., Jorcano,J.L., and Blasco,M.A. (2001). Increased epidermal tumors and increased skin

wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J.* *20*, 2619-2630.

Goodwin,E.C. and DiMaio,D. (2001). Induced senescence in HeLa cervical carcinoma cells containing elevated telomerase activity and extended telomeres. *Cell Growth Differ.* *12*, 525-534.

Gopalakrishna,R., Gundimeda,U., Fontana,J.A., and Clarke,R. (1999). Differential distribution of protein phosphatase 2A in human breast carcinoma cell lines and its relation to estrogen receptor status. *Cancer Lett.* *136*, 143-151.

Gottschling,D.E. and Zakian,V.A. (1986). Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* *47*, 195-205.

Gowan,S.M., Heald,R., Stevens,M.F., and Kelland,L.R. (2001). Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol. Pharmacol.* *60*, 981-988.

Gowan,S.M., Harrison,J.R., Patterson,L., Valenti,M., Read,M.A., Neidle,S., and Kelland,L.R. (2002). A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol. Pharmacol.* *61*, 1154-1162.

Goytisolo,F.A., Samper,E., Edmonson,S., Taccioli,G.E., and Blasco,M.A. (2001). The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Mol. Cell Biol.* *21*, 3642-3651.

Goytisolo,F.A. and Blasco,M.A. (2002). Many ways to telomere dysfunction: in vivo studies using mouse models. *Oncogene* *21*, 584-591.

Grandin,N., Reed,S.I., and Charbonneau,M. (1997). Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev.* *11*, 512-527.

Grandin,N., Damon,C., and Charbonneau,M. (2000). Cdc13 cooperates with the yeast Ku proteins and Stn1 to regulate telomerase recruitment. *Mol. Cell Biol.* *20*, 8397-8408.

Grandin,N., Damon,C., and Charbonneau,M. (2001a). Cdc13 prevents telomere uncapping and Rad50-dependent homologous recombination. *EMBO J.* *20*, 6127-6139.

Grandin,N., Damon,C., and Charbonneau,M. (2001b). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J.* *20*, 1173-1183.

Green,D.R., McGahon,A., and Martin,S.J. (1996). Regulation of apoptosis by oncogenes. *J. Cell Biochem.* *60*, 33-38.

Green,D.R. and Reed,J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* *281*, 1309-1312.

Greenwell,P.W., Kronmal,S.L., Porter,S.E., Gassenhuber,J., Obermaier,B., and Petes,T.D. (1995). TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* 82, 823-829.

Greider,C.W. and Blackburn,E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.

Greider,C.W. and Blackburn,E.H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337, 331-337.

Greider,C.W. (1990). Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* 12, 363-369.

Greider,C.W. (1996). Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 337-365.

Greider,C.W. (1998). Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 90-92.

Greider,C.W. (1999a). Telomerase activation. One step on the road to cancer? *Trends Genet.* 15, 109-112.

Greider,C.W. (1999b). Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97, 419-422.

Griffith,J.D., Comeau,L., Rosenfield,S., Stansel,R.M., Bianchi,A., Moss,H., and de Lange,T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.

Gryaznov,S., Pongracz,K., Matray,T., Schultz,R., Pruzan,R., Aimi,J., Chin,A., Harley,C., Shea-Herbert,B., Shay,J., Oshima,Y., Asai,A., and Yamashita,Y. (2001). Telomerase inhibitors--oligonucleotide phosphoramidates as potential therapeutic agents. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20, 401-410.

Gu,J., Kagawa,S., Takakura,M., Kyo,S., Inoue,M., Roth,J.A., and Fang,B. (2000). Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res.* 60, 5359-5364.

Guo,Q., Lu,M., Marky,L.A., and Kallenbach,N.R. (1992). Interaction of the dye ethidium bromide with DNA containing guanine repeats. *Biochemistry* 31, 2451-2455.

Hahn,W.C., Stewart,S.A., Brooks,M.W., York,S.G., Eaton,E., Kurachi,A., Beijersbergen,R.L., Knoll,J.H., Meyerson,M., and Weinberg,R.A. (1999a). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.* 5, 1164-1170.

Hahn,W.C., Counter,C.M., Lundberg,A.S., Beijersbergen,R.L., Brooks,M.W., and Weinberg,R.A. (1999b). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.

Halvorsen,T.L., Leibowitz,G., and Levine,F. (1999). Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol. Cell Biol.* 19, 1864-1870.

Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

- Hara,E., Smith,R., Parry,D., Tahara,H., Stone,S., and Peters,G. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell Biol.* 16, 859-867.
- Harley,C.B., Futcher,A.B., and Greider,C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harley,C.B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* 256, 271-282.
- Harley,C.B., Vaziri,H., Counter,C.M., and Allsopp,R.C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 27, 375-382.
- Harley,C.B. and Villeponteau,B. (1995). Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 249-255.
- Harrington,L., McPhail,T., Mar,V., Zhou,W., Oulton,R., Bass,M.B., Arruda,I., and Robinson,M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275, 973-977.
- Hastie,N.D., Dempster,M., Dunlop,M.G., Thompson,A.M., Green,D.K., and Allshire,R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.
- Hayakawa,N., Nozawa,K., Ogawa,A., Kato,N., Yoshida,K., Akamatsu,K., Tsuchiya,M., Nagasaka,A., and Yoshida,S. (1999). Isothiazolone derivatives selectively inhibit telomerase from human and rat cancer cells in vitro. *Biochemistry* 38, 11501-11507.
- Hayflick L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 37, 614-636.
- Hemann,M.T. and Greider,C.W. (1999). G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res.* 27, 3964-3969.
- Hemann,M.T., Strong,M.A., Hao,L.Y., and Greider,C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107, 67-77.
- Hemann,M.T., Rudolph,K.L., Strong,M.A., DePinho,R.A., Chin,L., and Greider,C.W. (2001). Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 12, 2023-2030.
- Hengartner,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Herbert,B., Pitts,A.E., Baker,S.I., Hamilton,S.E., Wright,W.E., Shay,J.W., and Corey,D.R. (1999). Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 14276-14281.
- Hickman,E.S., Moroni,M.C., and Helin,K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 60-66.

Hickman,J.A. (2002). Apoptosis and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 67-72.

Hiyama,E., Saeki,T., Hiyama,K., Takashima,S., Shay,J.W., Matsuura,Y., and Yokoyama,T. (2000). Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer* **90**, 235-238.

Hiyama,E. and Hiyama,K. (2002). Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* **21**, 643-649.

Hiyama,K., Hirai,Y., Kyoizumi,S., Akiyama,M., Hiyama,E., Piatyszek,M.A., Shay,J.W., Ishioka,S., and Yamakido,M. (1995). Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* **155**, 3711-3715.

Hoare,S.F., Bryce,L.A., Wisman,G.B., Burns,S., Going,J.J., van der Zee,A.G., and Keith,W.N. (2001). Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter. *Cancer Res.* **61**, 27-32.

Hofmann,K. (1999). The modular nature of apoptotic signaling proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **55**, 1113-1128.

Holliday,R. (1996). Endless quest. *Bioessays* **18**, 3-5.

Holt,S.E., Wright,W.E., and Shay,J.W. (1996). Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2932-2939.

Holt,S.E., Aisner,D.L., Baur,J., Tesmer,V.M., Dy,M., Ouellette,M., Trager,J.B., Morin,G.B., Toft,D.O., Shay,J.W., Wright,W.E., and White,M.A. (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* **13**, 817-826.

Horikawa,I., Oshimura,M., and Barrett,J.C. (1998). Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Mol. Carcinog.* **22**, 65-72.

Horikawa,I., Cable,P.L., Afshari,C., and Barrett,J.C. (1999). Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res.* **59**, 826-830.

Hsu,H.L., Gilley,D., Blackburn,E.H., and Chen,D.J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 12454-12458.

Hsu,H.L., Gilley,D., Galande,S.A., Hande,M.P., Allen,B., Kim,S.H., Li,G.C., Campisi,J., Kohwi-Shigematsu,T., and Chen,D.J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev.* **14**, 2807-2812.

Huang,P., Farquhar,D., and Plunkett,W. (1990). Selective action of 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-triphosphate on viral reverse transcriptases and human DNA polymerases. *J. Biol. Chem.* **265**, 11914-11918.

Huang,P., Pryde,F.E., Lester,D., Maddison,R.L., Borts,R.H., Hickson,I.D., and Louis,E.J. (2001). SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase. *Curr. Biol.* **11**, 125-129.

- Hughes,T.R., Weilbaecher,R.G., Walterscheid,M., and Lundblad,V. (2000). Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 6457-6462.
- Izbicka,E., Wheelhouse,R.T., Raymond,E., Davidson,K.K., Lawrence,R.A., Sun,D., Windle,B.E., Hurley,L.H., and Von Hoff,D.D. (1999). Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res.* 59, 639-644.
- Jiang,X.R., Jimenez,G., Chang,E., Frolkis,M., Kusler,B., Sage,M., Beeche,M., Bodnar,A.G., Wahl,G.M., Tlsty,T.D., and Chiu,C.P. (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat. Genet.* 21, 111-114.
- Johnson,F.B., Sinclair,D.A., and Guarente,L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell* 96, 291-302.
- Johnson,F.B., Marciniak,R.A., McVey,M., Stewart,S.A., Hahn,W.C., and Guarente,L. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *EMBO J.* 20, 905-913.
- Kaminker,P.G., Kim,S.H., Taylor,R.D., Zebardjian,Y., Funk,W.D., Morin,G.B., Yaswen,P., and Campisi,J. (2001). TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J. Biol. Chem.* 276, 35891-35899.
- Kanaya,T., Kyo,S., Hamada,K., Takakura,M., Kitagawa,Y., Harada,H., and Inoue,M. (2000). Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin. Cancer Res.* 6, 1239-1247.
- Kanazawa,Y., Ohkawa,K., Ueda,K., Mita,E., Takehara,T., Sasaki,Y., Kasahara,A., and Hayashi,N. (1996). Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of telomerase activity in extracts of human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 570-576.
- Kang,M.K., Guo,W., and Park,N.H. (1998). Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ.* 9, 85-95.
- Kang,S.S., Kwon,T., Kwon,D.Y., and Do,S.I. (1999). Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J. Biol. Chem.* 274, 13085-13090.
- Karlseder,J., Broccoli,D., Dai,Y., Hardy,S., and de Lange,T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325.
- Kato,D., Miyazawa,K., Ruas,M., Starborg,M., Wada,I., Oka,T., Sakai,T., Peters,G., and Hara,E. (1998). Features of replicative senescence induced by direct addition of antenapedia-p16INK4A fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Lett.* 427, 203-208.
- Kaufmann,S.H. and Hengartner,M.O. (2001). Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 11, 526-534.

- Kazanietz, M.G. (2000). *Farmacología Molecular. Receptores, transducción de señales y activación de genes*. Universidad Nacional de Quilmes Ediciones, Bernal, Argentina.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kharbanda, S., Kumar, V., Dhar, S., Pandey, P., Chen, C., Majumder, P., Yuan, Z.M., Whang, Y., Strauss, W., Pandita, T.K., Weaver, D., and Kufe, D. (2000). Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr. Biol.* 10, 568-575.
- Kilian, A., Bowtell, D.D., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R., and Jefferson, R.A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2011-2019.
- Kim, H., You, S., Farris, J., Kong, B.W., Christman, S.A., Foster, L.K., and Foster, D.N. (2002). Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere-regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells. *Exp. Cell Res.* 272, 199-208.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.
- Kim, S.H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat. Genet.* 23, 405-412.
- Kim, Y.W., Hur, S.Y., Kim, T.E., Lee, J.M., Namkoong, S.E., Ki, I.K., and Kim, J.W. (2001). Protein kinase C modulates telomerase activity in human cervical cancer cells. *Exp. Mol. Med.* 33, 156-163.
- King, L.B. and Ashwell, J.D. (1994). Thymocyte and T cell apoptosis: is all death created equal? *Thymus* 23, 209-230.
- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.
- Klingelutz, A.J., Barber, S.A., Smith, P.P., Dyer, K., and McDougall, J.K. (1994). Restoration of telomeres in human papillomavirus-immortalized human anogenital epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* 14, 961-969.
- Klingelutz, A.J., Foster, S.A., and McDougall, J.K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380, 79-82.
- Koeppel, F., Riou, J.F., Laoui, A., Mailliet, P., Arimondo, P.B., Labit, D., Petitgenet, O., Helene, C., and Mergny, J.L. (2001). Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* 29, 1087-1096.

Koga,S., Hirohata,S., Kondo,Y., Komata,T., Takakura,M., Inoue,M., Kyo,S., and Kondo,S. (2000). A novel telomerase-specific gene therapy: gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter. *Hum. Gene Ther.* *11*, 1397-1406.

Komata,T., Kondo,Y., Kanzawa,T., Hirohata,S., Koga,S., Sumiyoshi,H., Srinivasula,S.M., Barna,B.P., Germano,I.M., Takakura,M., Inoue,M., Alnemri,E.S., Shay,J.W., Kyo,S., and Kondo,S. (2001). Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter. *Cancer Res.* *61*, 5796-5802.

Kondo,S., Tanaka,Y., Kondo,Y., Hitomi,M., Barnett,G.H., Ishizaka,Y., Liu,J., Haqqi,T., Nishiyama,A., Villeponteau,B., Cowell,J.K., and Barna,B.P. (1998a). Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. *FASEB J.* *12*, 801-811.

Kondo,S., Kondo,Y., Li,G., Silverman,R.H., and Cowell,J.K. (1998b). Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA. *Oncogene* *16*, 3323-3330.

Kondo,Y., Kondo,S., Tanaka,Y., Haqqi,T., Barna,B.P., and Cowell,J.K. (1998). Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *Oncogene* *16*, 2243-2248.

Koyanagi,Y., Kobayashi,D., Yajima,T., Asanuma,K., Kimura,T., Sato,T., Kida,T., Yagihashi,A., Kameshima,H., and Watanabe,N. (2000). Telomerase activity is down regulated via decreases in hTERT mRNA but not TEP1 mRNA or hTERC during the differentiation of leukemic cells. *Anticancer Res.* *20*, 773-778.

Krammer,P.H., Behrmann,I., Daniel,P., Dhein,J., and Debatin,K.M. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* *6*, 279-289.

Krauskopf,A. and Blackburn,E.H. (1996). Control of telomere growth by interactions of RAP1 with the most distal telomeric repeats. *Nature* *383*, 354-357.

Krtolica,A., Parrinello,S., Lockett,S., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 12072-12077.

Krtolica,A. and Campisi,J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *34*, 1401.

Ku,W.C., Cheng,A.J., and Wang,T.C. (1997). Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *241*, 730-736.

Kubota,M., Yamana,H., Sueyoshi,S., Fujita,H., and Shirouzu,K. (2002). The significance of telomerase activity in cancer lesions and the noncancerous epithelium of the esophagus. *Int. J. Clin. Oncol.* *7*, 32-37.

Kushner,D.M., Paranjape,J.M., Bandyopadhyay,B., Cramer,H., Leaman,D.W., Kennedy,A.W., Silverman,R.H., and Cowell,J.K. (2000). 2-5A antisense directed

against telomerase RNA produces apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **76**, 183-192.

Kyo,S., Takakura,M., Kohama,T., and Inoue,M. (1997). Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res.* **57**, 610-614.

Kyo,S., Takakura,M., Kanaya,T., Zhuo,W., Fujimoto,K., Nishio,Y., Orimo,A., and Inoue,M. (1999). Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* **59**, 5917-5921.

Kyo,S., Takakura,M., Taira,T., Kanaya,T., Itoh,H., Yutsudo,M., Ariga,H., and Inoue,M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* **28**, 669-677.

Kyrion,G., Boakye,K.A., and Lustig,A.J. (1992). C-terminal truncation of RAP1 results in the deregulation of telomere size, stability, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **12**, 5159-5173.

LaBranche,H., Dupuis,S., Ben David,Y., Bani,M.R., Wellinger,R.J., and Chabot,B. (1998). Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat. Genet.* **19**, 199-202.

Laherty,C.D., Yang,W.M., Sun,J.M., Davie,J.R., Seto,E., and Eisenman,R.N. (1997). Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* **89**, 349-356.

Larson,D.D., Spangler,E.A., and Blackburn,E.H. (1987). Dynamics of telomere length variation in *Tetrahymena thermophila*. *Cell* **50**, 477-483.

Latil,A., Vidaud,D., Valeri,A., Fournier,G., Vidaud,M., Lidereau,R., Cussenot,O., and Biache,I. (2000). htert expression correlates with MYC over-expression in human prostate cancer. *Int. J. Cancer* **89**, 172-176.

Lavelle,F., Riou,J.F., Laoui,A., and Mailliet,P. (2000). Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **34**, 111-126.

Le,S., Moore,J.K., Haber,J.E., and Greider,C.W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**, 143-152.

Lee,C.C. and Huang,T.S. (2001). A novel topoisomerase II poison GL331 preferentially induces DNA cleavage at (C/G)T sites and can cause telomere DNA damage. *Pharm. Res.* **18**, 846-851.

Lee,H.W., Blasco,M.A., Gottlieb,G.J., Horner,J.W., Greider,C.W., and DePinho,R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**, 569-574.

Lejnine,S., Makarov,V.L., and Langmore,J.P. (1995). Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 2393-2397.

- Lener,D., Tanchou,V., Roques,B.P., Le Grice,S.F., and Darlix,J.L. (1998). Involvement of HIV-I nucleocapsid protein in the recruitment of reverse transcriptase into nucleoprotein complexes formed in vitro. *J. Biol. Chem.* 273, 33781-33786.
- Levy,M.Z., Allsopp,R.C., Futcher,A.B., Greider,C.W., and Harley,C.B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* 225, 951-960.
- Li,B., Oestreich,S., and de Lange,T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101, 471-483.
- Li,H., Zhao,L.L., Funder,J.W., and Liu,J.P. (1997). Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 272, 16729-16732.
- Li,H., Zhao,L., Yang,Z., Funder,J.W., and Liu,J.P. (1998). Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33436-33442.
- Li,H., Lee,T.H., and Avraham,H. (2002). A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J. Biol. Chem.* 277, 20965-20973.
- Li,P., Nijhawan,D., Budihardjo,I., Srinivasula,S.M., Ahmad,M., Alnemri,E.S., and Wang,X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lin,J.J. and Zakian,V.A. (1996). The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 13760-13765.
- Lin,Z., Lim,S., Viani,M.A., Sapp,M., and Lim,M.S. (2001). Down-regulation of telomerase activity in malignant lymphomas by radiation and chemotherapeutic agents. *Am. J. Pathol.* 159, 711-719.
- Lingner,J., Hendrick,L.L., and Cech,T.R. (1994). Telomerase RNAs of different ciliates have a common secondary structure and a permuted template. *Genes Dev.* 8, 1984-1998.
- Lingner,J., Hughes,T.R., Shevchenko,A., Mann,M., Lundblad,V., and Cech,T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276, 561-567.
- Lipinski,M.M. and Jacks,T. (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18, 7873-7882.
- Liu,K., Schoonmaker,M.M., Levine,B.L., June,C.H., Hodes,R.J., and Weng,N.P. (1999). Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 5147-5152.
- Liu,K., Hodes,R.J., and Weng,N. (2001). Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *J. Immunol.* 166, 4826-4830.

- Lundblad,V. and Blackburn,E.H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73, 347-360.
- Mandal,M. and Kumar,R. (1997). Bcl-2 modulates telomerase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 14183-14187.
- Marcand,S., Gilson,E., and Shore,D. (1997). A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275, 986-990.
- Marcand,S., Brevet,V., and Gilson,E. (1999). Progressive cis-inhibition of telomerase upon telomere elongation. *EMBO J.* 18, 3509-3519.
- Marcand,S., Brevet,V., Mann,C., and Gilson,E. (2000). Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr. Biol.* 10, 487-490.
- Martin-Rivera,L., Herrera,E., Albar,J.P., and Blasco,M.A. (1998). Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10471-10476.
- Masutomi,K., Kaneko,S., Hayashi,N., Yamashita,T., Shirota,Y., Kobayashi,K., and Murakami,S. (2000). Telomerase activity reconstituted in vitro with purified human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA component. *J. Biol. Chem.* 275, 22568-22573.
- McClintock,B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26, 234-282.
- McConnell,B.B., Starborg,M., Brookes,S., and Peters,G. (1998). Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr. Biol.* 8, 351-354.
- McCormick-Graham,M. and Romero,D.P. (1995). Ciliate telomerase RNA structural features. *Nucleic Acids Res.* 23, 1091-1097.
- McEachern,M.J. and Blackburn,E.H. (1995). Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature* 376, 403-409.
- McEachern,M.J. and Blackburn,E.H. (1996). Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev.* 10, 1822-1834.
- McEachern,M.J., Krauskopf,A., and Blackburn,E.H. (2000a). Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.* 34, 331-358.
- McEachern,M.J., Iyer,S., Fulton,T.B., and Blackburn,E.H. (2000b). Telomere fusions caused by mutating the terminal region of telomeric DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 11409-11414.
- McElligott,R. and Wellinger,R.J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J.* 16, 3705-3714.

- Melana,S.M., Holland,J.F., and Pogo,B.G. (1998). Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Clin. Cancer Res.* 4, 693-696.
- Meredith,J.E., Jr., Fazeli,B., and Schwartz,M.A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* 4, 953-961.
- Mergny,J.L., Phan,A.T., and Lacroix,L. (1998). Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* 435, 74-78.
- Mergny,J.L. and Helene,C. (1998). G-quadruplex DNA: a target for drug design. *Nat. Med.* 4, 1366-1367.
- Mergny,J.L., Mailliet,P., Lavelle,F., Riou,J.F., Laoui,A., and Helene,C. (1999). The development of telomerase inhibitors: the G-quartet approach. *Anticancer Drug Des* 14, 327-339.
- Mergny,J.L., Lacroix,L., Teulade-Fichou,M.P., Hounsou,C., Guittat,L., Hoarau,M., Arimondo,P.B., Vigneron,J.P., Lehn,J.M., Riou,J.F., Garestier,T., and Helene,C. (2001). Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3062-3067.
- Mergny,J.L., Riou,J.F., Mailliet,P., Teulade-Fichou,M.P., and Gilson,E. (2002). Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.* 30, 839-865.
- Meyerson,M., Counter,C.M., Eaton,E.N., Ellisen,L.W., Steiner,P., Caddle,S.D., Ziaugra,L., Beijersbergen,R.L., Davidoff,M.J., Liu,Q., Bacchetti,S., Haber,D.A., and Weinberg,R.A. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Meyne,J., Ratliff,R.L., and Moyzis,R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 7049-7053.
- Minev,B., Hipp,J., Firat,H., Schmidt,J.D., Langlade-Demoyen,P., and Zanetti,M. (2000). Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4796-4801.
- Mishra,K. and Shore,D. (1999). Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr. Biol.* 9, 1123-1126.
- Misiti,S., Nanni,S., Fontemaggi,G., Cong,Y.S., Wen,J., Hirte,H.W., Piaggio,G., Sacchi,A., Pontecorvi,A., Bacchetti,S., and Farsetti,A. (2000). Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol. Cell Biol.* 20, 3764-3771.
- Mitchell,J.R., Cheng,J., and Collins,K. (1999). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol. Cell Biol.* 19, 567-576.
- Miyashita,T., Krajewski,S., Krajewska,M., Wang,H.G., Lin,H.K., Liebermann,D.A., Hoffman,B., and Reed,J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.

Miyashita,T. and Reed,J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80** , 293-299.

Morales,C.P., Holt,S.E., Ouellette,M., Kaur,K.J., Yan,Y., Wilson,K.S., White,M.A., Wright,W.E., and Shay,J.W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* **21**, 115-118.

Morin,G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**, 521-529.

Morin,G.B. (1997). The implications of telomerase biochemistry for human disease. *Eur. J. Cancer* **33**, 750-760.

Moulton,B.C. (1994). Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro. *Endocrinology* **134**, 1055-1060.

Moyzis,R.K., Buckingham,J.M., Cram,L.S., Dani,M., Deaven,L.L., Jones,M.D., Meyne,J., Ratliff,R.L., and Wu,J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 6622-6626.

Mukai,S., Kondo,Y., Koga,S., Komata,T., Barna,B.P., and Kondo,S. (2000). 2-5A antisense telomerase RNA therapy for intracranial malignant gliomas. *Cancer Res.* **60**, 4461-4467.

Muller,M. (2002). Telomerase: its clinical relevance in the diagnosis of bladder cancer. *Oncogene* **21**, 650-655.

Muller,H.J. (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net.* **13**, 181-198.

Murnane,J.P., Sabatier,L., Marder,B.A., and Morgan,W.F. (1994). Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J.* **13** , 4953-4962.

Murray,A.W., Claus,T.E., and Szostak,J.W. (1988). Characterization of two telomeric DNA processing reactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **8**, 4642-4650.

Muzio,M., Stockwell,B.R., Stennicke,H.R., Salvesen,G.S., and Dixit,V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 2926-2930.

Naasani,I., Seimiya,H., and Tsuruo,T. (1998). Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 391-396.

Naasani,I., Seimiya,H., Yamori,T., and Tsuruo,T. (1999). FJ5002: a potent telomerase inhibitor identified by exploiting the disease-oriented screening program with COMPARE analysis. *Cancer Res.* **59**, 4004-4011.

Nair,S.K., Heiser,A., Boczkowski,D., Majumdar,A., Naoe,M., Lebkowski,J.S., Vieweg,J., and Gilboa,E. (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat. Med.* **6**, 1011-1017.

- Nakagawa,T., Zhu,H., Morishima,N., Li,E., Xu,J., Yankner,B.A., and Yuan,J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Nakamura,M., Saito,H., Ebinuma,H., Wakabayashi,K., Saito,Y., Takagi,T., Nakamoto,N., and Ishii,H. (2001). Reduction of telomerase activity in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor. *J. Cell Physiol* 187, 392-401.
- Nakamura,T.M., Morin,G.B., Chapman,K.B., Weinrich,S.L., Andrews,W.H., Lingner,J., Harley,C.B., and Cech,T.R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nakamura,T.M. and Cech,T.R. (1998). Reversing time: origin of telomerase. *Cell* 92, 587-590.
- Neidle,S. and Parkinson,G. (2002). Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 383-393.
- Nemoto,K., Kondo,Y., Himeno,S., Suzuki,Y., Hara,S., Akimoto,M., and Imura,N. (2000). Modulation of telomerase activity by zinc in human prostatic and renal cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 59, 401-405.
- Nikaido,R., Haruyama,T., Watanabe,Y., Iwata,H., Iida,M., Sugimura,H., Yamada,N., and Ishikawa,F. (1999). Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes Cells* 4, 563-572.
- Nomura,M., Shimizu,S., Ito,T., Narita,M., Matsuda,H., and Tsujimoto,Y. (1999). Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res.* 59, 5542-5548.
- Norton,J.C., Piatyszek,M.A., Wright,W.E., Shay,J.W., and Corey,D.R. (1996). Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat. Biotechnol.* 14, 615-619.
- Nozaki,C., Horibe,K., Iwata,H., Ishiguro,Y., Hamaguchi,M., and Takahashi,M. (2000). Prognostic impact of telomerase activity in patients with neuroblastoma. *Int. J. Oncol.* 17, 341-345.
- Nugent,C.I., Hughes,T.R., Lue,N.F., and Lundblad,V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* 274, 249-252.
- Oberhammer,F., Bursch,W., Parzefall,W., Breit,P., Erber,E., Stadler,M., and Schulte-Hermann,R. (1991). Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes. *Cancer Res.* 51, 2478-2485.
- Oh,S., Song,Y., Yim,J., and Kim,T.K. (1999). The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J. Biol. Chem.* 274, 37473-37478.
- Ohki,R., Tsurimoto,T., and Ishikawa,F. (2001). In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol. Cell Biol.* 21, 5753-5766.

- Oka,Y. and Thomas,C.A., Jr. (1987). The cohering telomeres of *Oxytricha*. *Nucleic Acids Res.* *15*, 8877-8898.
- Olivero,O.A. and Poirier,M.C. (1993). Preferential incorporation of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine into telomeric DNA and Z-DNA-containing regions of Chinese hamster ovary cells. *Mol. Carcinog.* *8*, 81-88.
- Olivero,O.A., Beland,F.A., Fullerton,N.F., and Poirier,M.C. (1994). Vaginal epithelial DNA damage and expression of preneoplastic markers in mice during chronic dosing with tumorigenic levels of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine. *Cancer Res.* *54*, 6235-6242.
- Olivero,O.A., Anderson,L.M., Diwan,B.A., Haines,D.C., Harbaugh,S.W., Moskal,T.J., Jones,A.B., Rice,J.M., Riggs,C.W., Logsdon,D., Yuspa,S.H., and Poirier,M.C. (1997). Transplacental effects of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT): tumorigenicity in mice and genotoxicity in mice and monkeys. *J. Natl. Cancer Inst.* *89*, 1602-1608.
- Olovnikov,A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* *41*, 181-190.
- Olumi,A.F., Grossfeld,G.D., Hayward,S.W., Carroll,P.R., Tlsty,T.D., and Cunha,G.R. (1999). Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* *59*, 5002-5011.
- Ostler,E.L., Wallis,C.V., Aboalchamat,B., and Faragher,R.G. (2000). Telomerase and the cellular lifespan: implications of the aging process. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab* *13 Suppl 6*, 1467-1476.
- Ouellette,M.M., Liao,M., Herbert,B.S., Johnson,M., Holt,S.E., Liss,H.S., Shay,J.W., and Wright,W.E. (2000). Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase. *J. Biol. Chem.* *275*, 10072-10076.
- Owen-Schaub,L.B., Zhang,W., Cusack,J.C., Angelo,L.S., Santee,S.M., Fujiwara,T., Roth,J.A., Deisseroth,A.B., Zhang,W.W., Kruzel,E., and . (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell Biol.* *15*, 3032-3040.
- Page,T.J., Mata,J.E., Bridge,J.A., Siebler,J.C., Neff,J.R., and Iversen,P.L. (1999). The cytotoxic effects of single-stranded telomere mimics on OMA-BL1 cells. *Exp. Cell Res.* *252*, 41-49.
- Palmero,I., Pantoja,C., and Serrano,M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* *395*, 125-126.
- Pantoja,C. and Serrano,M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* *18*, 4974-4982.
- Pennock,E., Buckley,K., and Lundblad,V. (2001). Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* *104*, 387-396.
- Pitts,A.E. and Corey,D.R. (1998). Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 11549-11554.

- Poole, J.C., Andrews, L.G., and Tollefsbol, T.O. (2001). Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 269, 1-12.
- Porter, A.G. and Janicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death. Differ.* 6, 99-104.
- Prescott, J. and Blackburn, E.H. (1997). Functionally interacting telomerase RNAs in the yeast telomerase complex. *Genes Dev.* 11, 2790-2800.
- Prescott, J.C. and Blackburn, E.H. (2000). Telomerase RNA template mutations reveal sequence-specific requirements for the activation and repression of telomerase action at telomeres. *Mol. Cell Biol.* 20, 2941-2948.
- Prowse, K.R. and Greider, C.W. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 4818-4822.
- Pruzan, R., Pongracz, K., Gietzen, K., Wallweber, G., and Gryaznov, S. (2002). Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates. *Nucleic Acids Res.* 30, 559-568.
- Qi, H. and Zakian, V.A. (2000). The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev.* 14, 1777-1788.
- Ray, S., Karamysheva, Z., Wang, L., Shippen, D.E., and Price, C.M. (2002). Interactions between telomerase and primase physically link the telomere and chromosome replication machinery. *Mol. Cell Biol.* 22, 5859-5868.
- Raymond, E., Sun, D., Chen, S.F., Windle, B., and Von Hoff, D.D. (1996). Agents that target telomerase and telomeres. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 583-591.
- Read, M., Harrison, R.J., Romagnoli, B., Tanious, F.A., Gowan, S.H., Reszka, A.P., Wilson, W.D., Kelland, L.R., and Neidle, S. (2001). Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4844-4849.
- Reddel, R.R. (1998). A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. *Bioessays* 20, 977-984.
- Reddel, R.R. (2000). The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 477-484.
- Reed, J.C. (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773-776.
- Rha, S.Y., Izbicka, E., Lawrence, R., Davidson, K., Sun, D., Moyer, M.P., Roodman, G.D., Hurley, L., and Von Hoff, D. (2000). Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines. *Clin. Cancer Res.* 6, 987-993.
- Rhyu, M.S. (1995). Telomeres, telomerase, and immortality. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 884-894.

Rigourd,M., Lanchy,J.M., Le Grice,S.F., Ehresmann,B., Ehresmann,C., and Marquet,R. (2000). Inhibition of the initiation of HIV-1 reverse transcription by 3'-azido-3'-deoxythymidine. Comparison with elongation. *J. Biol. Chem.* **275**, 26944-26951.

Riou,J.F., Guittat,L., Mailliet,P., Laoui,A., Renou,E., Petitgenet,O., Megnin-Chanet,F., Helene,C., and Mergny,J.L. (2002). Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 2672-2677.

Rizki,A. and Lundblad,V. (2001). Defects in mismatch repair promote telomerase-independent proliferation. *Nature* **411**, 713-716.

Rodriguez,J. and Lazebnik,Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* **13**, 3179-3184.

Rogan,E.M., Bryan,T.M., Hukku,B., Maclean,K., Chang,A.C., Moy,E.L., Englezou,A., Warneford,S.G., Dalla-Pozza,L., and Reddel,R.R. (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4745-4753.

Romanov,S.R., Kozakiewicz,B.K., Holst,C.R., Stampfer,M.R., Haupt,L.M., and Tlsty,T.D. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* **409**, 633-637.

Romero,D.P. and Blackburn,E.H. (1991). A conserved secondary structure for telomerase RNA. *Cell* **67**, 343-353.

Rubin,L.L. (1997). Neuronal cell death: when, why and how. *Br. Med. Bull.* **53**, 617-631.

Sagawa,Y., Nishi,H., Isaka,K., Fujito,A., and Takayama,M. (2001). The correlation of TERT expression with c-myc expression in cervical cancer. *Cancer Lett.* **168**, 45-50.

Sager,R. (1991). Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ. Health Perspect.* **93**, 59-62.

Saito,H., Hammond,A.T., and Moses,R.E. (1995). The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Exp. Cell Res.* **217**, 272-279.

Salvesen,G.S. and Dixit,V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10964-10967.

Samper,E., Goytisolo,F.A., Slijepcevic,P., van Buul,P.P., and Blasco,M.A. (2000). Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep.* **1**, 244-252.

Sandell,L.L. and Zakian,V.A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**, 729-739.

Sanders,E.J. and Wride,M.A. (1995). Programmed cell death in development. *Int. Rev. Cytol.* **163**, 105-173.

- Sapi,E., Okpokwasili,N.I., and Rutherford,T. (2002). Detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in ovarian cancer patients. *Cancer Detect. Prev.* **26**, 158-167.
- Sasaki,S., Ehara,T., Sakata,I., Fujino,Y., Harada,N., Kimura,J., Nakamura,H., and Maeda,M. (2001). Development of novel telomerase inhibitors based on a bisindole unit. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**, 583-585.
- Schindler,A., Fiedler,U., Meye,A., Schmidt,U., Fussel,S., Pilarsky,C., Herrmann,J., and Wirth,M.P. (2001). Human telomerase reverse transcriptase antisense treatment downregulates the viability of prostate cancer cells in vitro. *Int. J. Oncol.* **19**, 25-30.
- Sen,D. and Gilbert,W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **334**, 364-366.
- Sen,S., Reddy,V.G., Khanna,N., Guleria,R., Kapila,K., and Singh,N. (2001). A comparative study of telomerase activity in sputum, bronchial washing and biopsy specimens of lung cancer. *Lung Cancer* **33**, 41-49.
- Serrano,M., Lin,A.W., McCurrach,M.E., Beach,D., and Lowe,S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593-602.
- Seto,A.G., Zaug,A.J., Sobel,S.G., Wolin,S.L., and Cech,T.R. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **401**, 177-180.
- Shammas,M.A., Simmons,C.G., Corey,D.R., and Shmookler Reis,R.J. (1999). Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells. *Oncogene* **18**, 6191-6200.
- Sharma,H.W., Sokoloski,J.A., Perez,J.R., Maltese,J.Y., Sartorelli,A.C., Stein,C.A., Nichols,G., Khaled,Z., Telang,N.T., and Narayanan,R. (1995). Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 12343-12346.
- Shay,J.W. and Bacchetti,S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33**, 787-791.
- Sherr,C.J. and Weber,J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 94-99.
- Shin-Ya,K., Wierzba,K., Matsuo,K., Ohtani,T., Yamada,Y., Furihata,K., Hayakawa,Y., and Seto,H. (2001). Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1262-1263.
- Shin,J.H., Chung,J., Kim,H.O., Kim,Y.H., Hur,Y.M., Rhim,J.H., Chung,H.K., Park,S.C., Park,J.G., and Yang,H.K. (2002). Detection of cancer cells in peripheral blood of stomach cancer patients using RT-PCR amplification of tumour-specific mRNAs. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16 Suppl 2**, 137-144.
- Shiratsuchi,M., Muta,K., Abe,Y., Motomura,S., Taguchi,F., Takatsuki,H., Uike,N., Umemura,T., Nawata,H., and Nishimura,J. (2002). Clinical significance of telomerase activity in multiple myeloma. *Cancer* **94**, 2232-2238.

- Shore,D. (1997). Telomeres. Different means to common ends. *Nature* 385, 676-677.
- Singer,M.S. and Gottschling,D.E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* 266, 404-409.
- Smith,G.C. and Jackson,S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13, 916-934.
- Smith,S., Giriat,I., Schmitt,A., and de Lange,T. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
- Smith,S. and de Lange,T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr. Biol.* 10, 1299-1302.
- Smogorzewska,A., van Steensel,B., Bianchi,A., Oelmann,S., Schaefer,M.R., Schnapp,G., and de Lange,T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell Biol.* 20, 1659-1668.
- Soengas,M.S., Capodici,P., Polsky,D., Mora,J., Esteller,M., Opitz-Araya,X., McCombie,R., Herman,J.G., Gerald,W.L., Lazebnik,Y.A., Cordon-Cardo,C., and Lowe,S.W. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Sommadossi,J.P., Carlisle,R., and Zhou,Z. (1989). Cellular pharmacology of 3'-azido-3'-deoxythymidine with evidence of incorporation into DNA of human bone marrow cells. *Mol. Pharmacol.* 36, 9-14.
- Song,K., Jung,D., Jung,Y., Lee,S.G., and Lee,I. (2000). Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett.* 481, 81-85.
- Soria,J.C., Gauthier,L.R., Raymond,E., Granotier,C., Morat,L., Armand,J.P., Boussin,F.D., and Sabatier,L. (1999). Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 5, 971-975.
- Stoppler,H., Hartmann,D.P., Sherman,L., and Schlegel,R. (1997). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J. Biol. Chem.* 272, 13332-13337.
- Strahl,C. and Blackburn,E.H. (1994). The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in *Tetrahymena*. *Nucleic Acids Res.* 22, 893-900.
- Strahl,C. and Blackburn,E.H. (1996). Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol. Cell Biol.* 16, 53-65.
- Strasser,A., O'Connor,L., and Dixit,V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 217-245.
- Streutker,C.J., Thorner,P., Fabricius,N., Weitzman,S., and Zielenska,M. (2001). Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas. *Pediatr. Dev. Pathol.* 4, 62-67.

Sumida,T., Sogawa,K., Hamakawa,H., Sugita,A., Tanioka,H., and Ueda,N. (1998). Detection of telomerase activity in oral lesions. *J. Oral Pathol. Med.* 27, 111-115.

Sun,D., Thompson,B., Cathers,B.E., Salazar,M., Kerwin,S.M., Trent,J.O., Jenkins,T.C., Neidle,S., and Hurley,L.H. (1997). Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.* 40, 2113-2116.

Sundquist,W.I. and Klug,A. (1989). Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342 , 825-829.

Suzuki,M., Youle,R.J., and Tjandra,N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654.

Takakura,M., Kyo,S., Kanaya,T., Hirano,H., Takeda,J., Yutsudo,M., and Inoue,M. (1999). Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res.* 59, 551-557.

Takakura,M., Kyo,S., Sowa,Y., Wang,Z., Yatabe,N., Maida,Y., Tanaka,M., and Inoue,M. (2001). Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Res.* 29, 3006-3011.

Tangkijvanich,P., Tresukosol,D., Sampatanukul,P., Sakdikul,S., Voravud,N., Mahachai,V., and Mutirangura,A. (1999). Telomerase assay for differentiating between malignancy-related and nonmalignant ascites. *Clin. Cancer Res.* 5, 2470-2475.

Tatsumoto,N., Hiyama,E., Murakami,Y., Imamura,Y., Shay,J.W., Matsuura,Y., and Yokoyama,T. (2000). High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 2696-2701.

Terasaki,M., Kato,S., Sugita,Y., Shigemori,M., and Morimatsu,M. (1999). Adenovirus-mediated over-expression of p21Waf-1 differentially affects the proliferation, telomerase activity, and expression of glial fibrillary acidic protein in human glioma cells. *Int. J. Oncol.* 14, 63-69.

Tesmer,V.M., Ford,L.P., Holt,S.E., Frank,B.C., Yi,X., Aisner,D.L., Ouellette,M., Shay,J.W., and Wright,W.E. (1999). Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Mol. Cell Biol.* 19, 6207-6216.

Thomas,E., al Baker,E., Dropcova,S., Denyer,S., Ostad,N., Lloyd,A., Kill,I.R., and Faragher,R.G. (1997). Different kinetics of senescence in human fibroblasts and peritoneal mesothelial cells. *Exp. Cell Res.* 236, 355-358.

Thornberry,N.A., Rano,T.A., Peterson,E.P., Rasper,D.M., Timkey,T., Garcia-Calvo,M., Houtzager,V.M., Nordstrom,P.A., Roy,S., Vaillancourt,J.P., Chapman,K.T., and Nicholson,D.W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17907-17911.

Thornberry,N.A. and Lazebnik,Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.

- Togashi,K., Kakeya,H., Morishita,M., Song,Y.X., and Osada,H. (1998). Inhibition of human telomerase activity by alterperyleneol. *Oncol. Res.* 10, 449-453.
- Tommerup,H., Dousmanis,A., and de Lange,T. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. *Mol. Cell Biol.* 14, 5777-5785.
- Tremain,R., Marko,M., Kinnimulki,V., Ueno,H., Bottinger,E., and Glick,A. (2000). Defects in TGF-beta signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras. *Oncogene* 19, 1698-1709.
- Trujillo,K.M. and Sung,P. (2001). DNA structure-specific nuclease activities in the *Saccharomyces cerevisiae* Rad50*Mre11 complex. *J. Biol. Chem.* 276, 35458-35464.
- Tsao,D.A., Wu,C.W., and Lin,Y.S. (1998). Molecular cloning of bovine telomerase RNA. *Gene* 221, 51-58.
- Tseng,C.J., Jain,S., Hou,H.C., Liu,W., Pao,C.C., Lin,C.T., Horng,S.G., Soong,Y.K., and Hsueh,S. (2001). Applications of the telomerase assay in peritoneal washing fluids. *Gynecol. Oncol.* 81, 420-423.
- Ueda,M., Ouhitit,A., Bito,T., Nakazawa,K., Lubbe,J., Ichihashi,M., Yamasaki,H., and Nakazawa,H. (1997). Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res.* 57, 370-374.
- Uehara,H., Nakaizumi,A., Tatsuta,M., Baba,M., Takenaka,A., Uedo,N., Sakai,N., Yano,H., Iishi,H., Ohigashi,H., Ishikawa,O., Okada,S., and Kakizoe,T. (1999). Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: comparison with K-ras mutations. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 2513-2518.
- Ueno,T., Takahashi,H., Oda,M., Mizunuma,M., Yokoyama,A., Goto,Y., Mizushina,Y., Sakaguchi,K., and Hayashi,H. (2000). Inhibition of human telomerase by rubromycins: implication of spiroketal system of the compounds as an active moiety. *Biochemistry* 39, 5995-6002.
- Ulaner,G.A., Hu,J.F., Vu,T.H., Oruganti,H., Giudice,L.C., and Hoffman,A.R. (2000). Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int. J. Cancer* 85, 330-335.
- van Steensel,B. and de Lange,T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740-743.
- van Steensel,B., Smogorzewska,A., and de Lange,T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Vassetzky,N.S., Gaden,F., Brun,C., Gasser,S.M., and Gilson,E. (1999). Taz1p and Teb1p, two telobox proteins in *Schizosaccharomyces pombe*, recognize different telomere-related DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27, 4687-4694.
- Vaux,D.L. and Korsmeyer,S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.

Vaziri,H., Dragowska,W., Allsopp,R.C., Thomas,T.E., Harley,C.B., and Lansdorp,P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 9857-9860.

Vaziri,H. and Benchimol,S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* *8*, 279-282.

Vaziri,H. and Benchimol,S. (1999). Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. *Oncogene* *18*, 7676-7680.

Vazquez-Padua,M.A., Starnes,M.C., and Cheng,Y.C. (1990). Incorporation of 3'-azido-3'-deoxythymidine into cellular DNA and its removal in a human leukemic cell line. *Cancer Commun.* *2*, 55-62.

Villa,R., Porta,C.D., Folini,M., Daidone,M.G., and Zaffaroni,N. (2001). Possible regulation of telomerase activity by transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in human melanoma. *J. Invest Dermatol.* *116*, 867-873.

Voloshin,O.N., Veselkov,A.G., Belotserkovskii,B.P., Danilevskaya,O.N., Pavlova,M.N., Dobrynin,V.N., and Frank-Kamenetskii,M.D. (1992). An eclectic DNA structure adopted by human telomeric sequence under superhelical stress and low pH. *J. Biomol. Struct. Dyn.* *9*, 643-652.

von Zglinicki,T., Saretzki,G., Docke,W., and Lotze,C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* *220*, 186-193.

Vonderheide,R.H., Hahn,W.C., Schultze,J.L., and Nadler,L.M. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* *10*, 673-679.

Wadhwa,R., Sugihara,T., Yoshida,A., Nomura,H., Reddel,R.R., Simpson,R., Maruta,H., and Kaul,S.C. (2000). Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res.* *60*, 6818-6821.

Wagner,C.R., Ballato,G., Akanni,A.O., McIntee,E.J., Larson,R.S., Chang,S., and Abul-Hajj,Y.J. (1997). Potent growth inhibitory activity of zidovudine on cultured human breast cancer cells and rat mammary tumors. *Cancer Res.* *57*, 2341-2345.

Wang,J., Xie,L.Y., Allan,S., Beach,D., and Hannon,G.J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev.* *12*, 1769-1774.

Wang,M.J., Lin,Y.C., Pang,T.L., Lee,J.M., Chou,C.C., and Lin,J.J. (2000). Telomere-binding and Stn1p-interacting activities are required for the essential function of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13p. *Nucleic Acids Res.* *28*, 4733-4741.

Wei,M.C., Lindsten,T., Mootha,V.K., Weiler,S., Gross,A., Ashiya,M., Thompson,C.B., and Korsmeyer,S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* *14*, 2060-2071.

Wei,M.C., Zong,W.X., Cheng,E.H., Lindsten,T., Panoutsakopoulou,V., Ross,A.J., Roth,K.A., MacGregor,G.R., Thompson,C.B., and Korsmeyer,S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.

Weinberg,A.M. (1999). The birth of Big Biology. *Nature* 401, 738.

Weinberg,R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.

Weinrich,S.L., Pruzan,R., Ma,L., Ouellette,M., Tesmer,V.M., Holt,S.E., Bodnar,A.G., Lichtsteiner,S., Kim,N.W., Trager,J.B., Taylor,R.D., Carlos,R., Andrews,W.H., Wright,W.E., Shay,J.W., Harley,C.B., and Morin,G.B. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat. Genet.* 17, 498-502.

Weitzman,J.B. and Yaniv,M. (1999). Rebuilding the road to cancer. *Nature* 400, 401-402.

Wellinger,R.J., Ethier,K., Labrecque,P., and Zakian,V.A. (1996). Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* 85, 423-433.

Weng,N.P., Granger,L., and Hodes,R.J. (1997). Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc. Natl. Acad Sci U. S. A* 94, 10827-10832.

Wenz,C., Enenkel,B., Amacker,M., Kelleher,C., Damm,K., and Lingner,J. (2001). Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J.* 20, 3526-3534.

West,M.D., Pereira-Smith,O.M., and Smith,J.R. (1989). Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity. *Exp. Cell Res.* 184, 138-147.

White,E.L., Parker,W.B., Macy,L.J., Shaddix,S.C., McCaleb,G., Secrist,J.A., III, Vince,R., and Shannon,W.M. (1989). Comparison of the effect of Carbovir, AZT, and dideoxynucleoside triphosphates on the activity of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and selected human polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 393-398.

Williams,S.S., Alosco,T.R., Croy,B.A., and Bankert,R.B. (1993). The study of human neoplastic disease in severe combined immunodeficient mice. *Lab Anim Sci.* 43, 139-146.

Williamson,J.R. (1994). G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 703-730.

Wong,C.W., Lee,A., Shientag,L., Yu,J., Dong,Y., Kao,G., Al Mehdi,A.B., Bernhard,E.J., and Muschel,R.J. (2001). Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. *Cancer Res.* 61, 333-338.

Wood,L.D., Halvorsen,T.L., Dhar,S., Baur,J.A., Pandita,R.K., Wright,W.E., Hande,M.P., Calaf,G., Hei,T.K., Levine,F., Shay,J.W., Wang,J.J., and Pandita,T.K. (2001).

Characterization of ataxia telangiectasia fibroblasts with extended life-span through telomerase expression. *Oncogene* 20 , 278-288.

Wright,W.E. and Shay,J.W. (1992). Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet.* 8, 193-197.

Wright,W.E., Tesmer,V.M., Huffman,K.E., Levene,S.D., and Shay,J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* 11, 2801-2809.

Wright,W.E. and Shay,J.W. (2001). Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 98-103.

Wu,K.J., Grandori,C., Amacker,M., Simon-Vermot,N., Polack,A., Lingner,J., and Dalla-Favera,R. (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.* 21, 220-224.

Wyllie,A.H., Kerr,J.F., and Currie,A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306.

Wyllie,A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.

Wynford-Thomas,D., Bond,J.A., Wyllie,F.S., and Jones,C.J. (1995). Does telomere shortening drive selection for p53 mutation in human cancer? *Mol. Carcinog.* 12, 119-123.

Xia,S.J., Shammam,M.A., and Shmookler Reis,R.J. (1996). Reduced telomere length in ataxia-telangiectasia fibroblasts. *Mutat. Res.* 364, 1-11.

Xu,D., Gruber,A., Peterson,C., and Pisa,P. (1996). Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leukemia* 10, 1354-1357.

Xu,D., Wang,Q., Gruber,A., Bjorkholm,M., Chen,Z., Zaid,A., Selivanova,G., Peterson,C., Wiman,K.G., and Pisa,P. (2000). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 19, 5123-5133.

Xu,D., Erickson,S., Szeps,M., Gruber,A., Sangfelt,O., Einhorn,S., Pisa,P., and Grandt,D. (2000). Interferon alpha down-regulates telomerase reverse transcriptase and telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cells. *Blood* 96, 4313-4318.

Xu,D., Popov,N., Hou,M., Wang,Q., Bjorkholm,M., Gruber,A., Menkel,A.R., and Henriksson,M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 3826-3831.

Xu,H.J., Zhou,Y., Ji,W., Perng,G.S., Kruzelock,R., Kong,C.T., Bast,R.C., Mills,G.B., Li,J., and Hu,S.X. (1997). Reexpression of the retinoblastoma protein in tumor cells induces senescence and telomerase inhibition. *Oncogene* 15, 2589-2596.

- Yamaguchi,T., Yamada,R., Tomikawa,A., Shudo,K., Saito,M., Ishikawa,F., and Saneyoshi,M. (2000). Recognition of 2'-deoxy-l-ribonucleoside 5'-triphosphates by human telomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 475-481.
- Yamakuchi,M., Nakata,M., Kawahara,K., Kitajima,I., and Maruyama,I. (1997). New quinolones, ofloxacin and levofloxacin, inhibit telomerase activity in transitional cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 119, 213-219.
- Yang,H., Kyo,S., Takatura,M., and Sun,L. (2001). Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ.* 12, 119-127.
- Yang,J., Chang,E., Cherry,A.M., Bangs,C.D., Oei,Y., Bodnar,A., Bronstein,A., Chiu,C.P., and Herron,G.S. (1999). Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* 274, 26141-26148.
- Yegorov,Y.E., Chernov,D.N., Akimov,S.S., Bolsheva,N.L., Krayevsky,A.A., and Zelenin,A.V. (1996). Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts. *FEBS Lett.* 389, 115-118.
- Yegorov,Y.E., Chernov,D.N., Akimov,S.S., Akhmalisheva,A.K., Smirnova,Y.B., Shinkarev,D.B., Semenova,I.V., Yegorova,I.N., and Zelenin,A.V. (1997). Blockade of telomerase function by nucleoside analogs. *Biochemistry (Mosc.)* 62, 1296-1305.
- Yi,X., Tesmer,V.M., Savre-Train,I., Shay,J.W., and Wright,W.E. (1999). Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol. Cell Biol.* 19, 3989-3997.
- Yi,X., White,D.M., Aisner,D.L., Baur,J.A., Wright,W.E., and Shay,J.W. (2000). An alternate splicing variant of the human telomerase catalytic subunit inhibits telomerase activity. *Neoplasia.* 2, 433-440.
- Yin,L., Hubbard,A.K., and Giardina,C. (2000). NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 275, 36671-36675.
- Yokoyama,Y., Takahashi,Y., Shinohara,A., Lian,Z., Wan,X., Niwa,K., and Tamaya,T. (1998). Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res.* 58, 5406-5410.
- Yokoyama,Y., Takahashi,Y., Shinohara,A., Wan,X., Takahashi,S., Niwa,K., and Tamaya,T. (2000). The 5'-end of hTERT mRNA is a good target for hammerhead ribozyme to suppress telomerase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 316-321.
- Yoon,H.J., Choi,I.Y., Kang,M.R., Kim,S.S., Muller,M.T., Spitzner,J.R., and Chung,I.K. (1998). DNA topoisomerase II cleavage of telomeres in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 1395, 110-120.
- Yu,C.C., Lo,S.C., and Wang,T.C. (2001). Telomerase is regulated by protein kinase C-zeta in human nasopharyngeal cancer cells. *Biochem. J.* 355, 459-464.

Yu,G.L., Bradley,J.D., Attardi,L.D., and Blackburn,E.H. (1990). In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 344, 126-132.

Zahler,A.M., Williamson,J.R., Cech,T.R., and Prescott,D.M. (1991). Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* 350, 718-720.

Zakian,V.A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270, 1601-1607.

Zhang,A., Zheng,C., Lindvall,C., Hou,M., Ekedahl,J., Lewensohn,R., Yan,Z., Yang,X., Henriksson,M., Blennow,E., Nordenskjold,M., Zetterberg,A., Bjorkholm,M., Gruber,A., and Xu,D. (2000). Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res.* 60, 6230-6235.

Zhang,X., Mar,V., Zhou,W., Harrington,L., and Robinson,M.O. (1999). Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev.* 13, 2388-2399.

Zhao,J.Q., Hoare,S.F., McFarlane,R., Muir,S., Parkinson,E.K., Black,D.M., and Keith,W.N. (1998). Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences. *Oncogene* 16, 1345-1350.

Zhou,X.Z. and Lu,K.P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107, 347-359.

Zhu,J., Wang,H., Bishop,J.M., and Blackburn,E.H. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3723-3728.

Zhu,X.D., Kuster,B., Mann,M., Petrini,J.H., and Lange,T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25, 347-352.

Zijlmans,J.M., Martens,U.M., Poon,S.S., Raap,A.K., Tanke,H.J., Ward,R.K., and Lansdorp,P.M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 7423-7428.

Zindy,F., Eischen,C.M., Randle,D.H., Kamijo,T., Cleveland,J.L., Sherr,C.J., and Roussel,M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12, 2424-2433.