

Artículo de revisión



Vol. 4, Núm. 2
Abril-Junio 2015
pp 78-85

Mantenimiento de telómeros y tumores óseos

Telomere maintenance and bone tumors

Alberto Hidalgo Bravo,* Margarita Valdés Flores*

* Departamento de Genética.
Instituto Nacional de Rehabilitación.

Dirección para correspondencia:
Alberto Hidalgo Bravo
Departamento de Genética.
Instituto Nacional de Rehabilitación «Luis Guillermo Ibarra Ibarra»
Calzada México-Xochimilco
Núm. 28, Col. Arenal de Guadalupe, 14389,
Deleg. Tlalpan, México, D.F.
Tel: 5559991000, ext. 19405
E-mail: ahidalgo@inr.gob.mx

Recibido: 12 de febrero de 2015.
Aceptado: 30 de abril de 2015.

Este artículo puede ser consultado
en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: Telómero,
mantenimiento, tumor, óseo,
telomerasa.

Key words: Telomere,
maintenance, tumor, bone,
telomerase.

Resumen

Los telómeros son complejos de ADN y proteínas localizados en los extremos de los cromosomas lineales que ayudan a mantener la estabilidad genómica. En condiciones normales en células somáticas, los telómeros se acortan con cada división celular. Cuando los telómeros alcanzan cierta longitud, la célula entra en un periodo llamado «senescencia». Sin embargo, algunas células pueden escapar de la senescencia; los telómeros de dichas células se siguen acortando hasta que alcanzan una longitud en la cual la célula entra a una etapa llamada «crisis», donde se empieza a presentar inestabilidad cromosómica, lo cual puede llevar a muerte celular. Algunas células logran activar un mecanismo para restablecer la longitud de los telómeros y continuar proliferando. La activación de un método de mantenimiento de telómeros es una característica primordial de las células tumorales. Existen dos mecanismos conocidos para el mantenimiento de telómeros: uno es la reactivación de la enzima telomerasa –el cual es usado por 85% de los cánceres humanos– y el segundo es la activación de la vía alternativa de mantenimiento del largo de los telómeros (ALT) –presente en el 15% de los tumores malignos, en su mayoría sarcomas–. El mecanismo de mantenimiento de telómeros presente en un tumor puede servir como indicador pronóstico o de respuesta al tratamiento. Y en un futuro, como blanco para tratamientos antineoplásicos.

Abstract

Telomeres are DNA and protein complexes located at the end of linear chromosomes; they help to maintain genomic stability. Under normal conditions, in somatic cells, telomeres shorten after each cell division. When telomeres reach a certain length, the cell enters a phase called «senescence». However, some cells escape senescence; telomeres from those cells continue getting shorter until they reach a length at which the cell enters a phase called «crisis». At this point, genomic instability occurs and can lead to cell death. Some cells successfully activate a mechanism to restore telomere length and continue proliferating. The activation of a telomere maintenance mechanism is a key feature of neoplastic cells. There are two known telomere maintenance mechanisms: one is the reactivation of the enzyme telomerase, which is used in 85% of human cancers, and the second is the activation of an alternative lengthening of telomeres pathway (ALT), which is present in 15% of malignant tumors. The telomere maintenance mechanism present in a tumor could be useful as prognostic or treatment indicator. And in the future, it could be a target for antineoplastic therapies.

www.medigraphic.org.mx

Telómeros y su organización

Los telómeros son estructuras formadas por ADN y proteínas que ayudan a proteger los extremos de los cromosomas lineales de ser reconocidos y procesados como rupturas de doble cadena; de esa manera,

mantienen la integridad y estabilidad cromosómica. En mamíferos, los telómeros consisten en trectos del hexanucleótido TTAGGG, y su longitud varía desde cinco hasta 20 kilobases (kb) en células somáticas y células germinales, respectivamente.¹ Es importante mencionar que al inicio del telómero se encuentran

algunos repetidos que se denominan «degenerados» por ser variantes del hexanucleótido TTAGGG, por ejemplo, TCAGGG, TGAGGG, etcétera. La naturaleza del repetido canónico hace que una de las cadenas de ADN del telómero que corre en dirección 5'→3' sea rica en guaninas (cadena G) y, por lo tanto, la cadena complementaria que corre en dirección 3'→5' sea rica en citosinas (cadena C). Una de las principales características de los telómeros es que el extremo de la molécula de ADN no es romo. La cadena G forma una saliente de cadena sencilla a la cual se ha nombrado «3'overhang». El telómero es capaz de doblarse sobre sí mismo para formar un bucle, llamado «t-loop», y de esta manera facilita que el 3'overhang invada la cadena C, desplazando a la cadena G.² Esta estructura que adquiere el telómero permite «ocultar» el fragmento de cadena sencilla, evitando que sea reconocido como una ruptura de cadena del ADN (Figura 1).³

Proteínas de unión al telómero

Los telómeros se encuentran asociados a lo largo de todo el ciclo celular a un grupo de seis proteínas conocidas como el «complejo de la shelterina», el cual consiste en TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y RAP1. Las proteínas TRF1 y TRF2 se unen a la región de doble cadena de repetidos teloméricos. Por otro lado, POT1 es una proteína de unión a cadena sencilla que se encarga de proteger a la cadena rica en G que fue desplazada como consecuencia de la invasión del 3'overhang sobre la cadena C. Las proteínas TIN2 y TPP1 se encargan de formar la conexión entre las proteínas de unión a doble cadena y las proteínas de unión a cadena sencilla, en tanto que RAP1 se encuentra asociada con TRF2.⁴ Además del complejo de la shelterina, existen proteínas que se asocian con el telómero de manera transitoria de acuerdo con el ciclo celular, como las proteínas que intervienen en

la reparación/replicación del ADN; por ejemplo, las helicasas WRN y BLM y el complejo MRN (Figura 2).¹

La longitud del telómero, la integridad del 3'overhang, el complejo de la shelterina y las proteínas que participan en la reparación/replicación del ADN son factores de suma importancia para garantizar una adecuada función del telómero.⁵ Se ha demostrado que la pérdida del 3'overhang, un tracto muy corto de repetidos TTAGGG o la disminución en la expresión de componentes de la shelterina pueden ocasionar disfunción telomérica y activación de la maquinaria de respuesta y reparación de daño al ADN.^{6,7} Esta respuesta al daño puede llevar a fusiones teloméricas, ocasionando una mayor inestabilidad genómica.⁸

El «reloj biológico»

Bajo condiciones normales, en células somáticas, los telómeros se acortan con cada división celular como consecuencia del llamado «problema de replicación».⁹ Se piensa que este proceso de acortamiento de los telómeros funciona como un «reloj mitótico», limitando el número de veces que una célula se puede dividir, y funciona como un importante mecanismo supresor de tumores.¹⁰ Cuando los telómeros alcanzan cierta longitud crítica, la célula entra en un periodo llamado «senescencia» o «M1», en el cual la célula permanece metabólicamente activa, pero detiene su replicación.¹¹ Sin embargo, algunas células logran escapar de la senescencia mediante la inactivación de las vías dirigidas por p53 o retinoblastoma y continúan dividiéndose. Los telómeros de las células que escapan a la senescencia se siguen acortando hasta que alcanzan una longitud en la cual la célula entra a una etapa llamada «crisis» o «M2». Las células en crisis empiezan a presentar telómeros disfuncionales e inestabilidad cromosómica, lo cual puede llevar a muerte celular.¹⁰ Sin embargo, algunas

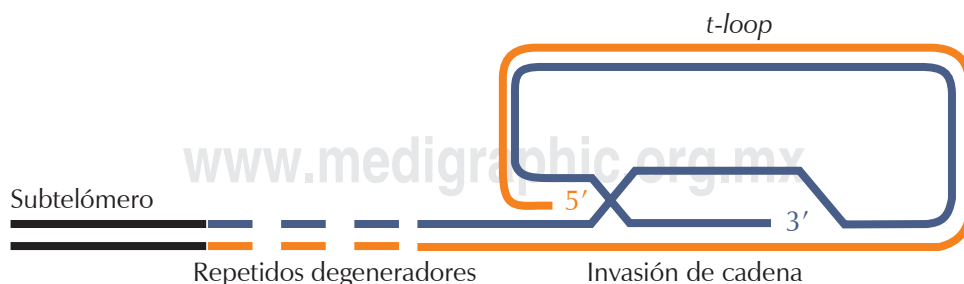


Figura 1. Estructura de t-loop del telómero. El 3'overhang de la cadena G (azul) invade la cadena C (naranja). Esto evita que el 3'overhang sea reconocido como una ruptura en la cadena de ADN y active los mecanismos de reparación. Modificado de la referencia 1. **Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid**

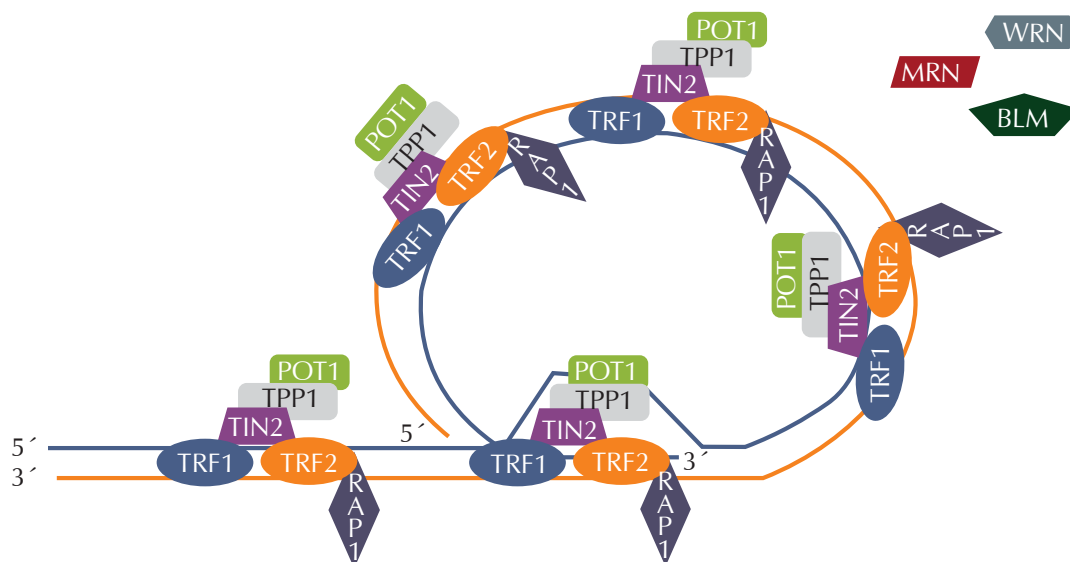


Figura 2. Proteínas asociadas al telómero. El complejo hexaproteico de la shelterina se asocia con el telómero a lo largo de todo el ciclo celular. Proteínas que participan en la reparación/replicación del ADN se asocian de una manera dependiente de la etapa del ciclo celular.

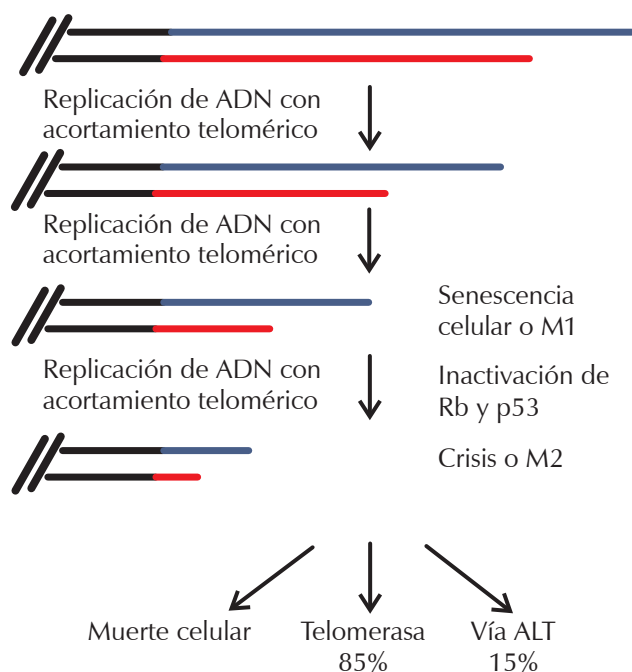


Figura 3. El «reloj biológico». Con cada ciclo de replicación el telómero se acorta hasta llegar a un límite donde la célula entra en senescencia. Al escapar de la senescencia, la célula continúa su replicación y el telómero sigue acortándose hasta llegar a la etapa de crisis, donde se observa inestabilidad genómica. En esta etapa, la célula puede morir a menos que se active uno de los mecanismos de mantenimiento de telómeros.

células logran activar un mecanismo para restablecer la longitud de los telómeros y continuar proliferando, aunque esto representa un riesgo latente de transformación neoplásica (Figura 3).¹²

La activación de un método de mantenimiento de telómeros es una característica primordial de las células tumorales para lograr la inmortalidad. Existen por lo menos dos mecanismos conocidos para el mantenimiento de los telómeros: uno es la reactivación de la enzima telomerasa —el cual es usado por 85% de los cánceres humanos— y el segundo es la activación de la vía alternativa de mantenimiento del largo de los telómeros (*alternative lengthening of telomeres*, ALT) —presente en el 15% de los tumores malignos, en su mayoría sarcomas—.^{13,14}

Mecanismos de mantenimiento de telómeros

La reactivación de la enzima telomerasa es el mecanismo mejor estudiado, en tanto que los mecanismos moleculares subyacentes de la vía ALT no han sido completamente aclarados. Hasta la fecha no se tiene claro de qué depende que una célula active uno u otro mecanismo; llama la atención que los tumores originados en tejidos derivados del mesodermo activen con mayor frecuencia el mecanismo ALT. Con base en estos hallazgos, algunos autores han propuesto que estos tejidos tienen un mecanismo más estricto para controlar la expresión de la enzima telomerasa.¹⁵

La telomerasa fue descubierta en 1987; se trata de una ribonucleoproteína con múltiples subunidades.¹⁶ La subunidad catalítica de la enzima, TERT (*telomerase reverse transcriptase*), posee una actividad de retrotranscriptasa y tiene homología con retrotranscriptasas virales. A diferencia de otras retrotranscriptasas, la telomerasa posee su propio templado de ARN, el cual se conoce como el componente de ARN de la telomerasa (TERC). La secuencia de nucleótidos de TERC permite que la enzima extienda el extremo 3' del telómero mediante la adición de repetidos TTAGGG; la cadena complementaria es sintetizada mediante un mecanismo similar al de reparación del ADN. Las subunidades TERT y TERC forman el núcleo de la enzima, ya que son suficientes para detectar la actividad de retrotranscriptasa *in vitro*.¹⁵ Además de estos dos componentes, existen otras subunidades que regulan la actividad enzimática y facilitan la unión de la enzima al telómero en una manera dependiente del ciclo celular.¹⁷ En humanos, la expresión de TERC se encuentra en diversos tejidos, pero la expresión de TERT está estrictamente controlada en células somáticas; por lo tanto, el control de la actividad de telomerasa está dado por la regulación de la expresión de TERT.¹⁸ La actividad de la telomerasa puede ser detectada en células madre embrionarias, células madre de médula ósea, espermatogonias, entre otros tipos celulares.¹⁵ El conocimiento de la telomerasa ha sido utilizado para diseñar algunas estrategias antineoplásicas. Se ha intentado introducir inhibidores de la acción de telomerasa en las células neoplásicas, inmunoterapia dirigida hacia las células que expresan la telomerasa, transfección con genes bajo el control del promotor de la telomerasa cuyo producto genera un metabolito tóxico a partir de un sustrato específico.¹⁹

Por otro lado, la evidencia existente sugiere que la vía ALT se basa en un mecanismo similar a la recombinación homóloga (RH). Estudios previos han mostrado que una secuencia que se inserta en un telómero específico puede ser copiada a otro telómero en células ALT+, mas no en células telomerasa+.²⁰ Otra observación es que los telómeros presentan mutaciones en la secuencia de repetidos que sólo pueden explicarse mediante la recombinación con una molécula no homóloga; a este tipo de mutaciones se les ha llamado mutaciones complejas y no ocurren en células telomerasa+.²¹ Además, el complejo MRN, que es clave para la RH, es indispensable para el progreso de la vía ALT.²²

Las células ALT+ presentan ciertas características que las distinguen de las células telomerasa positivas:

1. Poseen ADN extracromosómico con repetidos teloméricos, el cual puede estar en forma lineal o circular.²³
2. Cuerpos PML asociados a ALT (APBs). Los APBs contienen los elementos que se observan comúnmente en los cuerpos PML más ADN telomérico y proteínas involucradas en la reparación/replicación del ADN.²⁴ Aún existe el debate sobre si los APBs son los sitios donde se lleva a cabo la extensión del telómero o son sólo repositorios para el ADN telomérico extracromosómico.^{25,26}
3. Los telómeros presentan una gran heterogeneidad en su longitud, con un rango que puede ir desde los dos hasta los 50 kb.²⁷
4. Se ha observado inestabilidad del microsatélite MS32 localizado en el cromosoma 1. Resulta interesante que es el único microsatélite que ha mostrado inestabilidad.²⁸
5. Tienen una alta tasa de intercambio de cromátides hermanas exclusivamente a nivel de los telómeros.²⁹

Se han propuesto diferentes modelos para explicar el mecanismo de recombinación homóloga que pudiera ocurrir en células ALT+: a) uno de los modelos propone que una molécula de ADN telomérico extracromosómico (lineal o circular) puede servir como templado para la extensión de un telómero con un acortamiento crítico; b) otro modelo propone que la extensión puede iniciar con el 3'overhang actuando como cebador para iniciar la síntesis de la cadena rica en G y que, posteriormente, se extendería la cadena complementaria; c) el modelo mejor aceptado propone que una vez que un telómero se acorta de manera crítica, utiliza la cromátide hermana o un cromosoma no homólogo como templado y se lleva un evento similar a la RH, que al resolverse podría resultar en un telómero muy largo y otro muy corto (*Figura 4*).²⁰

Es por esto que los genes que participan en la RH han sido estudiados para determinar si participan en la vía ALT. Existe un modelo en *S. cerevisiae* en el cual se generan levaduras telomerasa- y se obtienen dos tipos de sobrevivientes llamados tipo I y tipo II de acuerdo con el mecanismo de regeneración de telómeros.³⁰ Los sobrevivientes tipo II logran recuperar la longitud de los telómeros mediante un mecanismo similar RH, algo muy parecido a lo que se observa en las células de humanos ALT+.³¹ Los datos experimentales en levadura muestran que al menos existen dos vías para que ocurra la regeneración del telómero. Una de las vías es gobernada por Sgs1, que es el homólogo de la helicasa BLM y WRN (asociadas con el síndrome de Bloom y síndrome de Werner, respectivamente), en

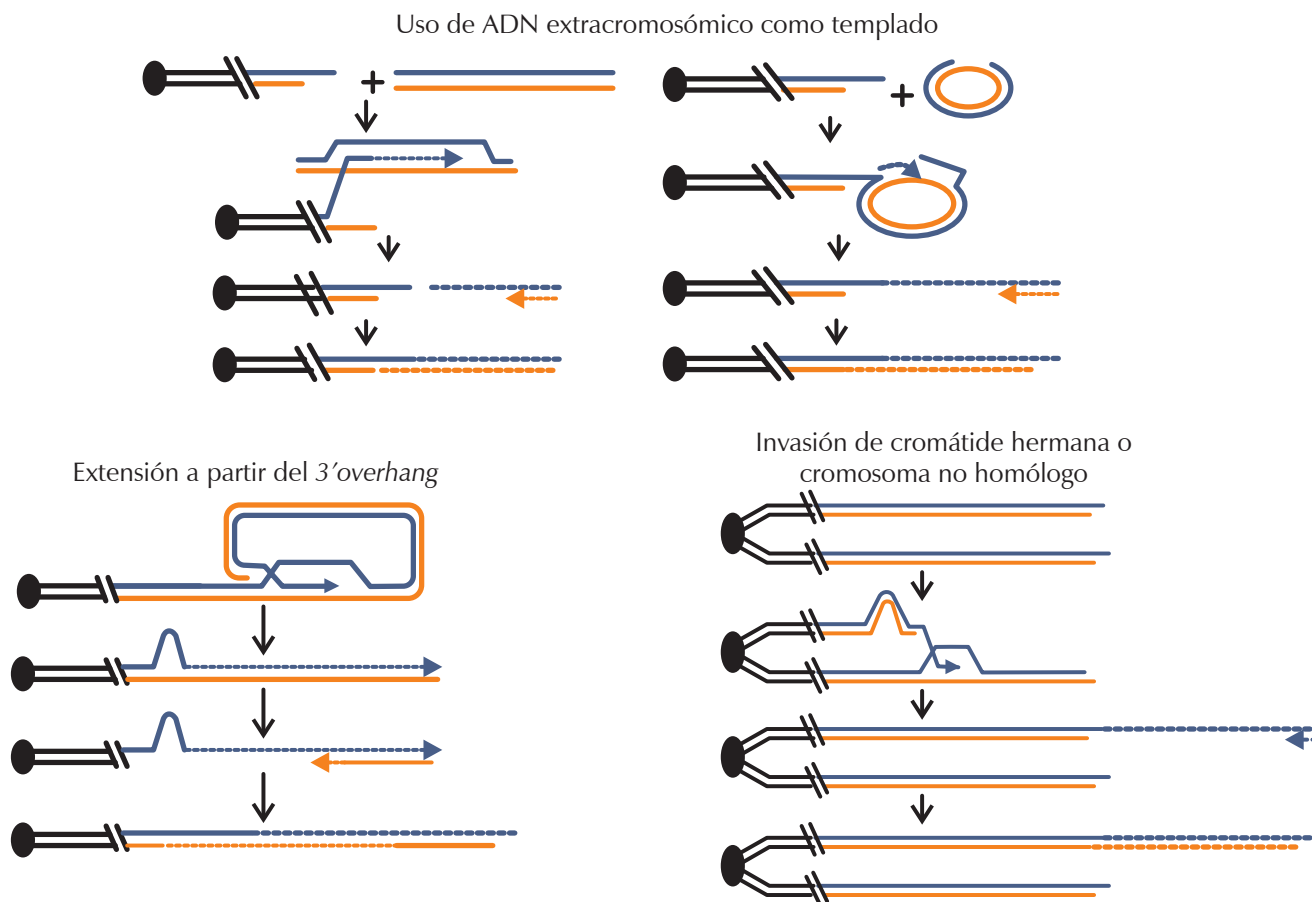


Figura 4. Modelos propuestos para la elongación de telómeros por medio de la vía ALT. (Arriba) Una molécula de ADN extracromosómica puede ser utilizada como molde para la extensión del telómero. (Abajo, izquierda.) La extensión del telómero puede comenzar utilizando el 3'overhang como iniciador y la cadena C como molde dentro del *t-loop*. (Abajo, derecha.) La extensión puede ocurrir si el telómero acortado invade una cromátide hermana o un cromosoma no homólogo; ocurre un mecanismo similar a la recombinación homóloga.

cooperación con la exonucleasa Exo1 o Dna2. La otra vía es comandada por el complejo MRX y Sae2, cuyos homólogos en humanos son el complejo MRN y CtIP, respectivamente; en esta vía también es necesaria la participación de Exo1.³²

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

Mecanismos de mantenimiento de telómeros en tumores óseos

Como se mencionó anteriormente, las células neoplásicas necesitan la activación de un mecanismo de

mantenimiento de telómeros para seguir proliferando. Se detecta actividad de telomerasa en aproximadamente el 85% de los tumores, y en el 15% restante están presentes marcadores relacionados con la vía ALT. Se ha observado que la vía ALT llega a detectarse hasta en un 70% de los sarcomas, a diferencia de otro tipo de tumores de origen epitelial o glandular donde una mínima proporción presenta actividad ALT. Esta característica hace que los tumores óseos sean un buen modelo para estudiar si la presencia de alguno de los mecanismos de mantenimiento de telómeros tiene algún significado clínico.

El osteosarcoma es el tumor óseo más frecuente y mejor estudiado en lo que se refiere a la presencia de un mecanismo de mantenimiento de telómeros. Se ha reportado que entre 32 y 40% presentan actividad

de telomerasa, y entre 11 y 66% son positivos para la actividad ALT. De manera contradictoria a lo esperado, algunos estudios no han encontrado actividad de ningún mecanismo de mantenimiento de telómeros en muestras de osteosarcomas.³³ En sarcoma de Ewing se ha detectado actividad de telomerasa en un rango del 12 al 84%. Hasta la fecha sólo un trabajo ha intentado detectar marcadores de la vía ALT en sarcoma de Ewing, pero no encontró ningún tumor positivo.³⁴⁻³⁶ Existen pocos trabajos que hayan estudiado los mecanismos de mantenimiento de telómeros en tumores de células gigantes de hueso; en uno de esos reportes, se encontró actividad de telomerasa hasta en un 81% de las muestras analizadas.³⁷ Sin embargo, también se han encontrado marcadores de actividad ALT; algunos autores han propuesto que estos marcadores podrían estar más relacionados con reparación de telómeros que con su extensión en este tipo de tumores.³⁸ Evidencia que apoya este hecho es que en este tipo de tumor es frecuente encontrar fusiones teloméricas que, al parecer, no ocurren simplemente al azar.³⁹ Las fusiones son un recurso para proteger la integridad del cromosoma en caso de un telómero disfuncional.⁴⁰ En una serie de pacientes con osteosarcoma, los individuos en quienes no se detectó ninguno de los mecanismos de mantenimiento de telómeros presentaron una mejor supervivencia en comparación con aquellos en donde sí se evidenció alguno de ellos. Además, no se observó diferencia en la supervivencia entre sujetos que presentaron actividad de telomerasa o ALT.⁴¹ En otros estudios que incluyen pacientes con osteosarcoma y sarcoma de Ewing, se observó que la mayor parte de los tumores primarios no presentaban actividad de telomerasa y sí marcadores de actividad ALT. De manera interesante, se encontró que la mayor parte de los tumores metastásicos presentaban actividad de telomerasa y se observó una mayor supervivencia en los casos que no tenían actividad de telomerasa detectable en los tumores primarios.^{42,43} Estos hallazgos sugieren que la actividad de telomerasa confiere una mayor capacidad de originar metástasis, lo que tendría un impacto en la supervivencia de los enfermos. Los resultados deben interpretarse con precaución, ya que se ha demostrado que algunos tumores pueden presentar una proporción de sus células positivas para la actividad de telomerasa y otra proporción para ALT.⁴⁴ Este descubrimiento complica establecer una relación entre un mecanismo y el comportamiento clínico de la enfermedad. Una explicación a este fenómeno es que una célula que inicialmente activó un mecanismo enfrente una situación adversa que desencadene la activación del segundo mecanismo y, a partir de ese

momento, se expanda dando lugar a una segunda línea celular dentro del mismo tumor. La otra posibilidad es que las dos líneas celulares emerjan por eventos independientes en el inicio de la formación de la neoplasia.

Hasta la fecha no se ha podido determinar el significado clínico que tiene la presencia de uno u otro mecanismo de mantenimiento de telómeros. La falta de series grandes de pacientes con un seguimiento a largo plazo, aunada a las dificultades técnicas, no ha permitido que se establezca la utilidad clínica de este marcador molecular. Más allá de su uso como un marcador clínico de la progresión de la enfermedad, la identificación del mecanismo de mantenimiento de telómeros de un tumor permitirá diseñar estrategias terapéuticas más específicas. El estudio de la biología del telómero puede brindar grandes beneficios al manejo de los pacientes con tumores malignos.

Bibliografía

1. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet.* 2008; 42: 301-334.
2. Compton SA, Choi JH, Cesare AJ, Ozgur S, Griffith JD. Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. *Cancer Res.* 2007; 67 (4): 1513-1519.
3. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 1999; 97 (4): 503-514.
4. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005; 19 (18): 2100-2110.
5. Loayza D, de Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature.* 2003; 423 (6943): 1013-1018.
6. Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol.* 2003; 13 (17): 1549-1556.
7. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature.* 2007; 448 (7157): 1068-1071.
8. Cesare AJ, Kaul Z, Cohen SB, Napier CE, Pickett HA, Neumann AA et al. Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. *Nat Struct Mol Biol.* 2009; 16 (12): 1244-1251.
9. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990; 345 (6274): 458-460.
10. Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett.* 2003; 194 (2): 155-162.

11. Wei W, Sedivy JM. Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp Cell Res*. 1999; 253 (2): 519-522.
12. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 1997; 33 (5): 787-791.
13. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 2004; 23 (16): 2919-2933.
14. Bryan TM, Reddel RR. Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalised human cells. *Eur J Cancer*. 1997; 33 (5): 767-773.
15. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*. 2010; 75 (13): 1563-1583.
16. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 1987; 51 (6): 887-898.
17. Hsu M, Yu EY, Singh SM, Lue NF. Mutual dependence of *Candida albicans* Est1p and Est3p in telomerase assembly and activation. *Eukaryot Cell*. 2007; 6 (8): 1330-1338.
18. Mitchell JR, Collins K. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell*. 2000; 6 (2): 361-371.
19. Skvortsov DA, Zvereva ME, Shpanchenko OV, Dontsova OA. Assays for detection of telomerase activity. *Acta Naturae*. 2011; 3 (1): 48-68.
20. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet*. 2010; 11 (5): 319-330.
21. Varley H, Pickett HA, Foxon JL, Reddel RR, Royle NJ. Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells. *Nat Genet*. 2002; 30 (3): 301-305.
22. Jiang WQ, Zhong ZH, Henson JD, Neumann AA, Chang AC, Reddel RR, et al. Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Mol Cell Biol*. 2005; 25 (7): 2708-2721.
23. Nabetani A, Ishikawa F. Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells. *Mol Cell Biol*. 2009; 29 (3): 703-713.
24. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR et al. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*. 1999; 59 (17): 4175-4179.
25. Draskovic I, Arnoult N, Steiner V, Bacchetti S, Lomonte P, Londono-Vallejo A et al. Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (37): 15726-15731.
26. Pickett HA, Cesare AJ, Johnston RL, Neumann AA, Reddel RR. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J*. 2009; 28 (7): 799-809.
27. Fasching CL, Neumann AA, Muntoni A, Yeager TR, Reddel RR. DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA. *Cancer Res*. 2007; 67 (15): 7072-7077.
28. Jeyapalan JN, Varley H, Foxon JL, Pollock RE, Jeffreys AJ, Henson JD et al. Activation of the ALT pathway for telomere maintenance can affect other sequences in the human genome. *Hum Mol Genet*. 2005; 14 (13): 1785-1794.
29. Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res*. 2004; 64 (7): 2324-2327.
30. Maringe L, Lydall D. EXO1 plays a role in generating type I and type II survivors in budding yeast. *Genetics*. 2004; 166 (4): 1641-1649.
31. Chen Q, Ijima A, Greider CW. Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell Biol*. 2001; 21 (5): 1819-1827.
32. Bonetti D, Martina M, Clerici M, Lucchini G, Longhese MP. Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres. *Mol Cell*. 2009; 35 (1): 70-81.
33. Matsuo T, Shimose S, Kubo T, Fujimori J, Yasunaga Y, Ochi M. Telomeres and telomerase in sarcomas. *Anticancer Res*. 2009; 29 (10): 3833-3836.
34. Ohali A, Avigad S, Cohen IJ, Meller I, Kollender Y, Issakov J et al. Association between telomerase activity and outcome in patients with non metastatic Ewing family of tumors. *J Clin Oncol*. 2003; 21 (20): 3836-3843.
35. Terasaki T, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Tsuchiya H, Tomita K et al. Analysis of telomerase activity and telomere length in bone and soft tissue tumors. *Oncol Rep*. 2004; 11 (6): 1307-1311.
36. Ulaner GA, Hoffman AR, Otero J, Huang HY, Zhao Z, Mazumdar M et al. Divergent patterns of telomere maintenance mechanisms among human sarcomas: sharply contrasting prevalence of the alternative lengthening of telomeres mechanism in Ewing's sarcomas and osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004; 41 (2): 155-162.
37. Matsuo T, Hiyama E, Sugita T, Shimose S, Kubo T, Mochizuki Y et al. Telomerase activity in giant cell tumors of bone. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14 (10): 2896-2902.
38. Forsyth RG, De Boeck G, Bekaert S, De Meyer T, Taminiau AH, Uyttendaele D et al. Telomere biology in giant cell tumour of bone. *J Pathol*. 2008; 214 (5): 555-563.
39. Gorunova L, Vult von Steyern F, Storlazzi CT, Bjerkehaugen B, Folleras G, Heim S et al. Cytogenetic analysis of 101 giant cell tumors of bone: nonrandom patterns of telomeric associations and other structural aberrations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009; 48 (7): 583-602.
40. Letsolo BT, Rowson J, Baird DM. Fusion of short telomeres in human cells is characterized by extensive deletion and microhomology, and can result in complex rearrangements. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38 (6): 1841-1852.

41. Ulaner GA, Huang HY, Otero J, Zhao Z, Ben-Porat L, Satagopan JM et al. Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Res.* 2003; 63 (8): 1759-1763.
42. Sanders RP, Drissi R, Billups CA, Daw NC, Valentine MB, Dome JS. Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 2004; 22 (18): 3790-3797.
43. Sotillo-Pineiro E, Sierrasesumaga L, Patinno-Garcia A. Telomerase activity and telomere length in primary and metastatic tumors from pediatric bone cancer patients. *Pediatr Res.* 2004; 55 (2): 231-235.
44. Gocha AR, Nuovo G, Iwenofu OH, Groden J. Human sarcomas are mosaic for telomerase-dependent and telomerase-independent telomere maintenance mechanisms: Implications for telomere-based therapies. *Am J Pathol.* 2013; 182 (1): 41-48.