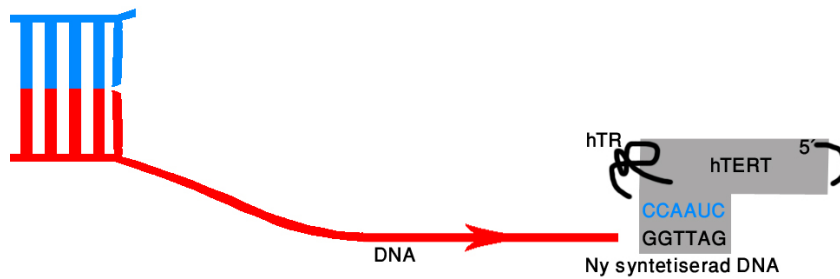




UPPSALA
UNIVERSITET

Telomeras - Funktion och reglering



Halgord Abdulla Hassan

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2009
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Telomeras – funktion och reglering

Halgord Abdulla Hassan

Självständigt arbete i biologi 2009

Sammandrag

Somatiska cellers kromosomer förkortas, normalt, varje gång cellen prolifererar. De förkortade kromosomerna i cancerceller förlängs åter till längden av moder kromosomen i cellen efter varje proliferering. Detta sker med hjälp av enzymet telomeras, som tillsätter telomeriskt DNA, med hjälp av flera associerade proteiner, till telomererna. Telomeras består av en RNA- subenhet (TR) och en katalytiskt omvänt transkriptas (TERT). Humant telomeras (hTERT) regleras intracellulärt, och kan påverkas intercellulärt, båda negativt och positivt. Vid negativ påverkan, som i normala celler, växer celler först normalt för att över gå i scenescens eller apoptos, men vid positiv påverkan, som i cancerceller, uppstår tumörer. hTERT nedregleras också epigenetiskt, något som gör att celler kan få en normal utveckling.

Inledning

Telomeriskt DNA skyddar kromosomändarna från att förstöras och nedregleras (Abdalla *et al.* 2009). Telomererna förlängs av ett specialiserat enzym, nämligen telomeras. Enzymet telomeras består av en RNA- subenhet (TR) och ett telomeras omvänt transkriptas (TERT) som är den katalytiska subenheten (Miri-Moghaddam *et al.* 2009). RNA- subenheten i telomeraset fungerar som en mall för nya telomersegment(Wienberg 2007). Telomerasaktiviteten är väldigt hög i cancerceller, men i somatiska celler är den nästan obefintlig (Miri-Moghaddam *et al.* 2009) och dessa celler kan därför inte upprätthålla telomerlängden, således uppstår en åldring av cellen (Lustig 2009).

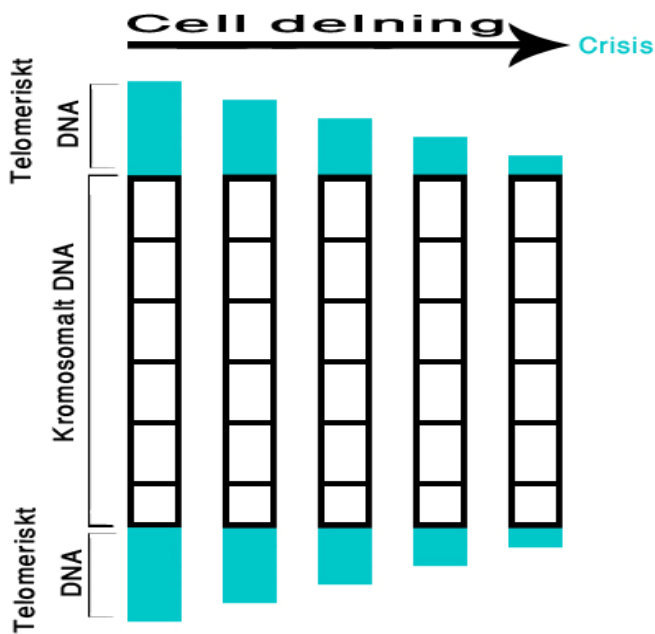
Telomeriskt DNA i humana celler är starkt konserverat och hårt packat i ändarna på en kromosom (Swanberg and Delany 2003) och består av en mångrepeterad, icke kodande, nukleotidsekvens (5'-TTAGGG-3') (Weinberg. 2007). Trots att DNA polymeras spelar en viktig roll i DNA replikation och reparation, kan DNA polymeras inte replikera kromosomändarna, då DNA polymeras kan tillsätta nukleotider endast från 5' ledar strängen (leading strand) änden(Campbell and Reece 2005) vilket leder till att den eftersläpande strängen (lagging strand) replikeras ofullständigt. Normal telomerförkortning leder till föråldring av cellen (se fig. 1) (Norrback *et al.* 1998). Telomererna förkortas vid varje DNA- replikation i cellcykeln, men exakt

vilken kritisk telomerlängd som orsakar föråldring av cellen är fortfarande okänt (Abdalla *et al.* 2009).

Celler som undkommer föråldrande genom inaktivering av en kritisk cellcykelgen, som p53, kan dela sig och förkorta telomererna ännu mer tills de uppnår ett andra dödlighetssteg (Counter *et al.* 1992). Somatiska celler kan dela sig ett begränsat antal gånger med ett maximalt antal känt som Hayflicks gräns (Hayflick 1965).

Förkortning av kromosomer kan ske av olika anledningar, där nedreglering av enzymet telomeras, dess komponenter och telomer-bindande proteiner kan påverka förkortningen. Förkortning av telomerer leder till DNA- degenerering och kromosom instabilitet (Swanberg & Delany 2003). Kromosom instabilitet leder till en programmerad självdöd (apoptos), cellåldrande eller onormal celledning (Chantal & Neal 2006). Stimulering av apoptos är också en skyddande genetisk mekanism för att förhindra att onormala dotterceller från föråldrade moderceller produceras (Swanberg & Delany 2003).

Förlängning av förkortade telomerer sker gradvis efter varje celledning till en tröskellängd. Telomerer är markerade epigenetiskt, (saknar TATA och CAAT boxar, men är väldigt GC-rika och bildar CpG öar (Horikawa *et al.* 1999)). Markeringen påvisas genom den gradvisa förlängningen och en tröskellängd, då telomererna



Figur 1. Telomeriskt DNA (blå) förkortas efter varje celledning tills de blir så korta att inte kan skydda kromosomändarna, vilket leder till crisis.

förlängs till en specifik längd (Bethan *et al.* 2009). Celler som undgår föråldring eller apoptos, och kan upprätthålla telomerlängden via aktivering av telomeras, kan dela sig obehindrat, vilket leder till cellulär odödlighet och cancer.

Cancerceller upprätthåller telomeras aktiviteten genom att återaktivera enzymet då telomererna förkortats eller genom att bevara cellens förmåga att uttrycka telomeras aktivitet och förstärka den (Norrback *et al.* 1998).

Syftet med uppsatsen är att redogöra för vad enzymet telomeras har för funktion i somatiska celler och i tumörceller. Hur enzymet upprätthålls och om telomeras är en huvudfaktor i cancercellers okontrollerade celledelning på grund av sin roll i telomerförlängningen. Jag vill också ta reda på om det finns specifika genuttryck som leder till ett överuttryckt telomeras i elakartade tumörer.

hTR och hTERT

Humant RNA polymeras II transkriberar hTR (humant telomeras) vid sitt 3'ände och producerar en 451 nukleotider lång sekvens. Den omvända transkriptionens templet ligger nära 5'ändan av telomeren (Tesmer *et al.* 1999).

hTR innehåller fyra funktionella enheter, CR2/CR3, CR4/CR5 domän, en box H/ACA domän och en CR7 (snoRNA) domän. Box H/ACA domänen påminner om en box A/ACAsnoRNAs, och är essentiell för hTR ansamling, bearbetning av hTR 3' och telomerasaktivitet i cellen (Dez *et al.* 2001). hTR interagerar direkt med ett antal proteiner för att stabiliseras, ackumuleras och hålla sig funktionellt. Exempel på dessa proteiner är hStau, hNHP2, L22, La, hnRNP C1/C2, hNOP10 och dyskerino (Lance *et al.* 2001).

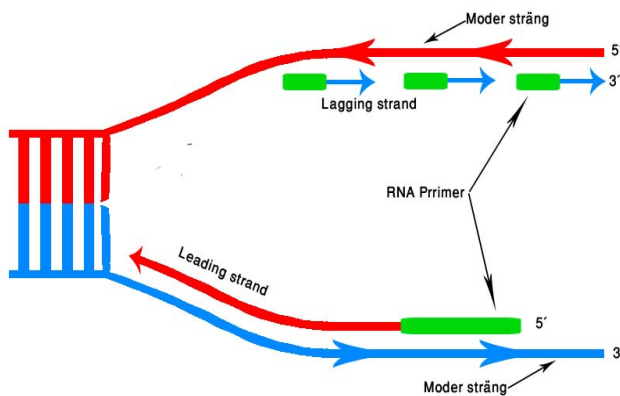
Regionen som innehåller mallen för nya telomerasegment, och regionen som innehåller boxen H/ACA och CR4/CR5 interagerar med hTERT, oberoende av varandra, på ett icke samverkande sätt (Mitchell & Collins 2000). Detta tyder på att RNA-sekvensen/strukturen som är involverad i bindningen till hTERT och dess katalys är funktionellt separerade (Beattie *et al.* 2001).

Telomerasets katalytiska subenheter från olika organismer är fylogenetiskt bevarade i sitt omvänt transkriptas tema (motif) med andra omvända transkriptas. Men de är mer relaterade till varandra än till andra (icke-telomeriska) omvända transkriptaser och därför bildar de en egen undergrupp inom omvänttranskriptasfamiljen. (Nakamura *et al.* 1997). hTERT(humant telomeras omvänt transkriptas) utmärker sig från de andra transkriptasen med några särdrag, till exempel; omvänttranskriptaset ligger i den C-terminala halvan av proteinet medan båda ett telomeras - specifikt område och viktiga domäner för hTERT:s funktion ligger i N-terminalen (Xia *et al.* 2000, Moriarty *et al.* 2002). hTERT framställdes första gången ur ciliaten *Euplotes aediculatus* som p123 (Joachim & Thomas 1996). Sekvensanalyser har påvisat att p123 proteinet innehåller omvänt transkriptas, ett protein som är essentiellt för telomerlängd-upprätthållningen (Joachim *et al.* 1997).

Problem vid kromosomändarna

DNA- replikationen startar när Y-formade gafflar bildas på motsatta sidor av replikationsbubblan, där de båda DNA- strängarna separeras. DNA syntesen startar från 5' till 3' änden med RNA-primers som är komplementära till modersträngen, och med hjälp av DNA-polymeras fortgår syntesen. Det har påvisats att hTERT inte har TATA eller CAAT boxar för bindning till ribosomer (Campbell och Reece 2005).

Leading strand replikeras utan problem då den komplementära RNA- primren går från 5'till 3' änden, men när lagging strand ska replikeras uppstår kromosomens ändproblem (Campbell and Reece 2005). Lagging strand syntetiseras från 3'till 5'. RNA- primrer tillsätts först, vilket gör syntesen möjlig, och därefter nukleotider vilka DNA polymeraset använder och formar okazaki fragment av. Med hjälp av DNA-ligas sätts sedan en ny DNA sträng ihop. Den första RNA-primren som sätter sig på lagging strand inte kan användas och tas bort i änden vilket leder till att den ny syntetiserade DNA strängen blir kortare än modersträngen i 5' änden (se fig.2). Förkortning av kromosomer sker efter varje celledelning (Lingner *et al.* 1995).



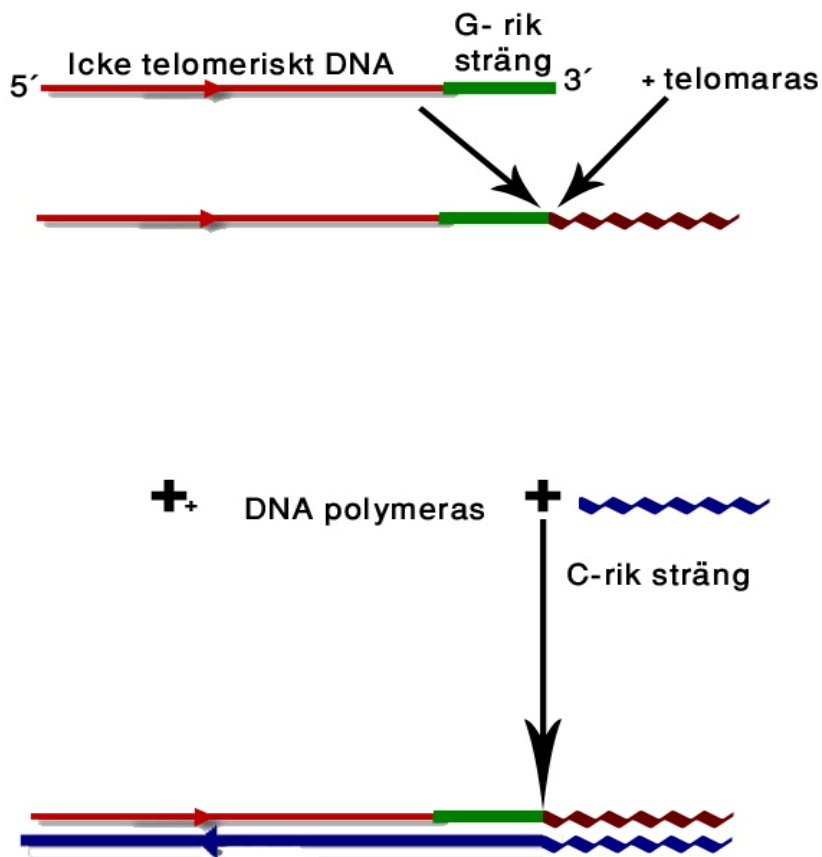
Figur 2. Båda dubbel- helixarna öppnas under DNA- replikation. Lagging strängen (överst) syntesen görs med hjälp av RNA- primer (gröna fyrkanter) lagda som en intervall. Syntetisering av leading sträng (nederst) initieras av RNA- primer, som tas bort när strängen syntetiseras klart.

Telomeras funktion

Enzymet telomeras tillsätter telomeriskt DNA till korta, G rika, telomerer. Tillsättningen är inte endast beroende av telomerasets närvaro, utan också av vissa genprodukter, som TEP1 (telomerasassocierat protein 1), som är associerad med telomerasaktivitet. Humant TEP1 består av 2629 aminosyror. De sista 900 aminosyror i TEP1s ända interagerar med telomeras RNA-subenheten. Karboxyländan av TEP1 består av 12 WD40 upprepningar, ett sekvensmotiv känt för sin inblandning i protein-protein interaktioner. Uttryck av TEP1 har upptäckts i de flesta

vävnader, oavsett deras telomeras aktivitet (Beattie *et al.* 2000). Dessa genprodukter är inblandade i RNA- subenhetens strukturförändring vid den aktiva nukleotid tillsättningen (Min Hsu *et al.* 2007).

Telomeras och DNA polymeras samverkar för syntetisering av lagging strand vid M fasen i cellcykeln. Nukleotid tillsättningen sker i hög grad till en början för att sedan avta genom en negativ "feedback". Den snabba nukleotid tillsättningen i början ökar mängden bindningsplatser för proteiner som binder till telomeriskt DNA vilket inhiberar telomeras från att fortsätta nukleotid tillsättningen i samma höga grad (se fig. 3)(Scott & Daniel 1999). För att tillsättningen ska vara möjlig måste telomeras ha två tydliga egenskaper; att känna igen telomerens substratstruktur och känna igen sekvensen i 3' änden för att rätt nukleotid ska tillsättas efter den befintliga nukleotiden (Greider & Blackburn 1987).



Figur 3. Experiment som har påvisat att telomeras känner igen telomerstrukturen och känner igen telomerens 3' ände (grönt). Telomeras tillsätter telomerer (brunt) till den förkortade DNA- strängen (rött + grönt) tills strängen blir lika lång som den andra strängen (blått), och på så sätt förlängs kromosomen.

Reglering av telomerasaktivitet

Telomerasaktivitets reglering sker vid olika processer i den humana cellcykeln, såsom vid transkription, mRNA splitsning, modifiering av hTR och hTERT. Telomerasaktivitet, under vävnadsutveckling och homeostas, är anpassat genom fysiologiska förhållanden (Hiyama *et al.* 1995, Wright *et al.* 1996, Kyo *et al.* 1997), såsom cellväxt-relaterad reglering och celldifferentiering (Xu *et al.* 1999).

Regleringen av telomeras påverkas av andra yttre och inre faktorer, såsom UV-strålning (Hande *et al.* 1997), och hormonet östrogen (Kyo *et al.* 1999, Misiti *et al.* 2000). Endast den katalytiska subenheten (hTERT) är begränsande för telomerasets aktivitet (Cong and Bacchetti 1999), som är starkt kopplad till cancer igångsättning och spridning (Horikawa *et al.* 1999). I normala somatiska celler är hTERT transkriptionellt undertryckt men i cancer celler är den återaktiverad eller uppreglerad (Meyerson *et al.* 1997).

Reglering av hTERT genen

hTERT genen, i humana celler, är lokaliserad på kromosomremsan 5p15.33, den mest avlägsna remsan av kromosom 5p (Meyerson *et al.* 1997). Genen omfattar mer än 37kb, och är uppdelad i 16 exoner och 15 introner. Den innehåller 7 starkt konserverade omvända transkriptaser (Linger *et al.* 1997).

Många hTERT mRNA är uttryckta under embryonal utveckling och tumör utveckling (Ulander *et al.* 1998). Korrelationen mellan hTERT och telomeras aktivitet tyder på en transkriptionell reglering av hTERT genen (Wick *et al.* 1999).

hTERT är splitsat differentiellt i humana celler, och innehåller flera olika transkript (Kilian *et al.* 1997). Bland dessa är hellängds transkript; α - splitsade transkript, som saknar 26 nukleotider från 5' ändan av exon 6; β - splitsade transkript, som saknar exon 7 och 8; båda α och β splitsade transkript och en tilläggs alternativt transkript, som innehåller transkript med ett 159 nukleotider långt tillägg av intron 14, en partiellt tillägg av intron 14, en 38 nukleotiders tillägg av intron 4 och en ersättare av exon 15 samt en del av exon 16. Alla dessa transkript är uttryckta under embryonal utveckling (Ulander *et al.* 1998, 2000).

Det är fortfarande okänt hur dessa transkript fungerar, men många av dem kan koda för proteiner utan omvänt transkriptas aktivitet, som kan motsvara viktiga mekanismer för kontroll av telomeras (Wick *et al.* 1999).

Flera kopior av genen hTERT har påträffats i humana tumörceller (Bryce *et al.* 2000), som kan bidra till uppreglering av telomeras aktivitet i odödliga celler (Jiang *et al.* 1999).

Aktivering av hTERT

c-Myc

hTERT promotorn, ligger i regionen mellan -43 till -1125 uppströms av ATG, innehåller bindnings platser för många transkriptions faktorer, som kan vara involverade i dess reglering (Cong *et al.* 1999). Wick *et al.* hittade två bindningsplatser för onkogenen c-Myc, varav en var lokaliserad i den region som ger högt basalaktivitet (1999). c-Myc främjar proliferering, växt och apoptos (Grandori *et al.* 2000), och mutation i genen leder till cancer (DePinho *et al.* 1991). Det har påvisats att c-Myc genen inducerar uttrycket av hTERT och telomeras aktivitet i HMEC (Human mammary epithelial cell) (Wang *et al.* 1998). Detta tyder på att hTERT är ett direkt mål för uttrycket av c-Myc (Xu *et al.* 2001).

Sp1

En annan transkriptions faktor som kan binda till hTERT är Sp1. Sp1 samarbetar med c-Myc och binder till de fem GC- boxar (E-box), som är lokaliserade i regionen mellan -34 till- 242 uppströms av ATG. Regionen innehåller de flesta initieringsplatser för hTERT transkription (Kyo *et al.* 2000) . Sp1 integrerar också med andra komponenter ur transkriptions-maskineriet såsom, TBP (TATA-box binding protein), för igångsättning av transkriptionen då promotorn saknar TATA-box (Pugh & Tjian. 1991).

HPV-16E6

HPV-16E6 protein (Human papillomavirus 16E6) kan inducera hTERT aktiviteten i keratinocyter och i bröstepitelceller med hjälp av E7 (Werness *et al.* 1990). E6 förmedlar telomeras aktiviteten (Kiyono *et al.* 1998) och E7 odödliggör primära keratinocyter på låg telomerasfrekvens, som tyder på att E7 är kapabel att aktivera telomeras på en låg nivå (Halbert *et al.* 1991).

Även steroidhormoner kan aktivera telomeras, till exempel under menstruationen, som är korrelerad med proliferering av celler i endometrium (Kyo *et al.* 1997).

hTERT inhibering

Frånvaro av telomerasaktivitet i de flesta somatiska celler orsakas av transkriptionell repression av *hTERT* genen. Inhibering av repressionen leder då till uppreglering av *hTERT* uttryck och uppreglering av telomerasaktivitet. Fusion av odödliga celler och normala diploida celler kan ibland resultera i en dödlig hybrid (Smith & Smith 1983).

Införande av en normal kromosom i en cell med telomeras aktivitet leder till inhibering av telomeras aktivitet (Ogata *et al.* 1995). Inhibering av *hTERT* genen transkriptionen leder till brist på telomeras aktivitet, vilket i sin tur leder till uppreglering av hTERT (Wright *et al.* 1996)

Negativ feedback

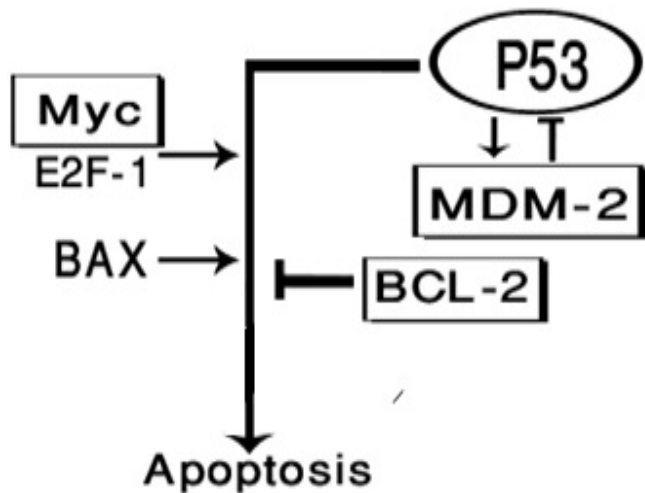
c-Myc/Mad1

hTERT är ett direkt mål för c-Myc (Wu *et al.* 1999), och uttryck av Mad1 protein inhiberar hTERT uttrycket (Oh 2000). I Xu *et al.* 2000 analys av HL60 celler, för undersökning av c-Myc och Mad1 roll för hTERT, visades att cellerna uttryckte olika proteiner of Myc/Max/Mad, beroende på sin differentierings grad. c-Myc är uttryckt under en logaritmisk celluppväxt och är nedreglerat under celldifferentieringen, samtidigt induceras Mad1. Xu *et al.* (2000) påvisade också att c-Myc binder *in vivo* till hTERT promotorn i växande HL60 celler och att bindningsaktiviteten ökar med differentieringen, däremot observerades Mad1 uttrycket och dess bindning till hTERT promotorn enbart i differentierade celler (Xu *et al.* 2000).

Myc/Max bindningen till hTERT promotorn ersätts dominant av Mad1/Max och den ömsesidiga bindningen av c-Myc och Mad1 *in vivo* är förenlig med aktivering och inhibering av hTERT transkriptionen i växande celler och differentierade leukemiceller (HL60), vilket tyder på att hTERT är ett fysiskt mål för c-Myc och Mad1 (Xu *et al.* 2001)

p53

Genen p53 uttrycker ett protein som inhiberar bildning av tumörer genom inducering av cellcykelstopp eller apoptos som respons till olika typer av cellskada (se fig. 4) (El-Deiry *et al.* 1993). p53 funktionen är inaktiverad i 50 % av alla humana cancerceller (Hollstein *et al.* 1994). Kanaya *et al.* (2000) påvisade att p53 inducerar forcerat cellväxtstopp följt av inhibering av telomerasaktivitet i humana gliom (tumör i nervsystemet som består av gliavävnad) celler.



Figur 4. Onkogenen p53 och tumör suppressorgen (Myc, MDM-2 och BCL-2) kan negativt inducera apoptos. Aktivering av p53 leder till inhibering av MDM-2 och BCL-2, och aktivering av Myc vilket, i sin tur, leder till en programmerad celledöd.

Telomerasaktivitetens inhibition sker via transkriptionell repression av hTERT. Repressionen sker kort efter p53 induktionen, innan cellcykelstopp eller apoptos sker. Detta tyder på att p53 repression av hTERT kan vara oberoende av cellcykelstopp eller apoptos (Kanaya *et al.* 2000).

Rb och E2F

Rb och E2F samarbetar med p53 för detektering av produkter från skadat DNA. Nedreglering av Rb leder till G1-stopp, i cellcykeln, efter DNA skada, (Demers *et al.* 1994, Hickman *et al.* 1994), och apoptos (Howes *et al.* 1994).

Frånvaro av Rb leder till ökat E2F uttryck, som kan agera i cellcykelprogressions aktivering, vilket leder till G1-stopp inhibering och inducering av apoptos (Qin *et al.* 1994).

Överuttryck av E2F leder också till minskad hTERT mRNA uttryck och telomerasaktivitet (Cuthbert *et al.* 1999).

Överuttryck av Rb leder till inhibering av p53-beroende apoptos (Haupt *et al.* 1995)

Epigenetisk reglering

DNA- metylering är essentiell för djurs utveckling (Li *et al.* 1992). Programmerad växling i metylerings position av genomsekvens har hittats i olika stadium av embryo utveckling (Reik and Dean 2001).

Utvecklingsreglering av hTERT uttryck och ett högt CG-innehåll av hTERT promotorn tyder på att metylering är involverad i hTERT nedreglering i normala celler och i hTERT uppreglering i cancerceller, där telomeras är aktiverad (Dessain *et al.* 2000). Ökad metylering och/ eller acetylering av hTERT promotorn leder till transaktivering och hTERT genen (Xu *et al.* 2001), och histon metylering leder till förändring av kromatinstruktur och transkription i cellen (Strahl *et al.* 2000). Metylerad H3-K4 kan agera som en specifik bindningsplats för proteiner som förmedlar transkriptionsaktivering (Guccione *et al.* 2006)

Cheng *et al.* (2007) hittade, i humana cancerceller, försämrade funktion av transkriptionsfaktorerna c-Myc och Sp1 på hTERT promotorn, och en minskad histon H3 acetylering, följt av nedtystad SMYD3 (en histon H3-K4-specifik di- och trimetyleras). Inhibering av histondeacetylaser i normala celler resulterar i aktivering av telomeras och uppreglering av hTERT transkriptionen.

Slutsats

Tack vare det senaste årets forskning, har vår förståelse för telomeras och dess komponenter ökat kraftigt. Det omvända transkriptaset är avgörande för telomerförlängningen och behövs i nästan alla cancerceller.

Upptäckten av telomeras komponenter och förmåga att rekonstruera telomerasaktivitet i normala celler har lett till att forskarna kunnat påvisa telomerasets roll i många cellulära processer.

Telomeras tillsätter telomeriskt DNA till korta G-rika telomerer och skyddar kromosomerna från förkortning. Detta tillåter att cellen kan proliferera obegränsade gånger, vilket leder till att tumörer utvecklas och cancer uppstår.

Telomerasaktivitet är nedtryckt i normala celler på grund av en transkriptionell repression av den katalytiska subenheten hTERT men återaktiveras i de flesta cancerceller. hTERT kan aktiveras av onkogener som c-Myc, Sp1 eller virus som HPV-16E6, och inhiberas via ”negative feedback” med hjälp av p53 eller samarbete mellan olika gen som c-Myc/Mad1 och RB/E2F. hTERT kan också regleras epigenetiskt, då metylering påverkar kromatidernas struktur och transkription. Defekt i telomeras, dess komponenter, dess associerade proteiner och i dess aktivitet är direkt kopplat till genetiskt ostabilitet och uppkomst av cancer.

Frågan är nu, om telomerasaktivitet kan inhiberas i cancerceller, kan cancer botas? För att kunna få svar på detta måste ytterligare forskning göras vilket förhoppningsvis kan leda till att bättre botemedel upptäcks.

Tack

Jag vill tacka Sonja Buratovic för alla fina kommentarer på uppsatsen, Linnéa Petterson för allan nya idéer jag fick och Ken Andersson för all teknisk hjälp slutligen Lage Cerenius som tog sig tid att läsa och kommentera uppsatsen flera gånger!

Referenser

- A. J. Lustig. 2009. Separating the effects of telomere size from the mechanism of telomere elongation. *The EMBO Journal* **28**: 793-794.
- Beattie, T. L., W. Zhou, M. O. Robinson, and L. Harrington. 2001. Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Molecular and Cellular Biology* **21**:6151–6160.
- B. Britt-Compton, R. Capper, J. Rowson, D. M. Baird. 2009. Short telomeres are preferentially elongated by telomerase in human cells. *FEBS Letters* **583**: 3076-3080.
- Bryce, L. A., N. Morrison, S. F. Hoare, S. Muir, and W. N. Keith. 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.
- Cong, Y. S., J. Wen, and S. Bacchetti. 1999. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular Genetics* **8**:137–142.
- Chantal A. and Neal F. Lue. 2006. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annual Review of Biochemistry* **75**: 493-517.
- Carol W. Greider and E. H. Blackburn. 1987. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**: 887-898.
- Cheng L., Xiaolei., Zheng G., Marit J., Satoru K., Magnus B., Gruber A., Sjöberg J. and Dawei X. 2007. The *telomerase reverse transcriptase (hTERT)* gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3. *Cancer Research* **67**: 2626-2634.

- Cuthbert, A. P., J. Bond, D. A. Trott, S. Gill, J. Broni, A. Marriott, G. Khoudoli, E. K. Parkinson, C. S. Cooper, and R. F. Newbold. 1999. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *Journal of National Cancer Institute* **91**:37–45.
- Christophe D., Anthony H., Bruno F., Denis L. J. Lafontaine, Michèle C. F. and Yves H. 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 Research* **29**: 598-603
- DePinho, R. A., N. Schreiber-Agus, and F. W. Alt. 1991. *myc* family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Advanced Cancer Reserch* **57**:1–46.
- Demers, G.W., S.A. Foster, C.L. Halbert, and D. 1994. Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *National Academy of Scences USA* **91**:4382-4386A.
- Dessain, S. K., H. Yu, R. R. Reddel, R. L. Beijersbergen, and R. A. Weinberg. 2000. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Research* **60**:537–541.
- E. Miri-Moghaddam & A. Deezagi & Z. S. Soheili. 2009. Downregulation of telomerase activity in human promyelocytic cell line using RNA interference. *Annals of hematology* **88**: 1169-1176.
- Ernesto G., Martinato F., Giacomo F., Lucilla L., Laura T., Dall' Olio V., Zardo G., Nervi C, Bernard L. & Amati B. 2006. Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nature Cell Biology* **8**: 764 – 770.
- En L., Timothy H. Bestor and Rudolf J. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**: 915-926.
- Grandori, C., S. M. Cowley, L. P. James, and R. N. Eisenman. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual Review Cell Development Biology*. **16**:653–699.
- Hickman, E.S., S.M. Picksley, and K.H. Vousden. 1994. Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced by p53 activation. *Oncogene* **9**: 2177-2181.
- Halbert, C. L., G. W. Demers, and D. A. Galloway. 1991. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *Journal Virology* **65**:473-478.
- Hayflick, L. 1965. The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Research*. **37**:614–636.
- Haupt, Y., S. Rowan, and M. Oren. 1995. p53-mediated apoptosis in HeLa cells can be overcome by excess pRB. *Oncogene* **10**: 1563-1571.
- Hiyama, K., Y. Hirai, S. Kyoizumi, M. Akiyama, E. Hiyama, M. A. Piatyszek, J. W. Shay, S. Ishioka, and M. Yamakido. 1995. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *Journal Immunology*. **155**:3711–3715.
- Hande, M. P., A. S. Balajee, and A. T. Natarajan. 1997. Induction of telomerase activity by UV irradiation in Chinese hamster cells. *Oncogene* **15**:1747–1752.
- Horikawa, I., P. L. Cable, C. Afshari, and J. C. Barrett. 1999. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Research* **59**:826-830.

- Howes, K.A., N. Ransom, D.S. Papermaster, J.G.H. Lasudry, D.M. Albert, and J.J. Windle. 1994. Apoptosis or retinoblastoma: Alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes & Development* **8**: 1300-1310.
- Lingner J., Cooper JP., Thomas R. Cech. 1995. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem?. *Science* **269**: 1533-1534.
- Linger J. & Thomas R. Cech. 1996. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: Requirement of a primer 3' overhang. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 10712-10717.
- Lingner J., Timothy R. Hughes, Shevchenko A., Mann M., Lundblad V., Thomas R. Cech. 1997. Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. *Science* **276**: 561-567.
- Jiang, X. R., G. Jimenez, E. Chang, M. Frolkis, B. Kusler, M. Sage, M. Beeche, A. G. Bodnar, G. M. Wahl, T. D. Tlsty, and C. P. Chiu. 1999. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nature Genet.* **21**:111–114.
- Kanaya, T., S. Kyo, K. Hamada, M. Takakura, Y. Kitagawa, H. Harada, and M. Inoue. 2000. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through downregulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clinical Cancer Reserch* **6**:1239–1247.
- Kilian, A., Bowtell, D.D.L., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R., Jefferson, R.A., 1997. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Human molecular genet.* **6**: 2011–2019.
- Kiyono, T., S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. McDougall, D. A. Galloway, and A. J. Klingelutz. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396**:84–88.
- Norrback K. F, Enblad G., Erlanson M., Sundström C., and Roos G. 1998. Telomerase activity in Hodgkin's disease. *Blood* **92**: 567-573.
- Kyo, S., M. Takakura, T. Kohama, and M. Inoue. 1997. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Research* **57**:610–614.
- Kyo, S., M. Takakura, T. Kanaya, W. Zhuo, K. Fujimoto, Y. Nishio, A. Orimo, and M. Inoue. 1999. Estrogen activates telomerase. *Cancer Research* **59**:5917–5921.
- Kyo, S., M. Takakura, T. Taira, T. Kanaya, H. Itoh, M. Yutsudo, H. Ariga, and M. Inoue. 2000. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Researsh* **28**:669–677.
- Ford L., Jerry W. Shay, and Woodinge E. Wright. 2001. The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *RNA* **7**:1068–1075.
- Min H., Eun Y. Yu, Sunitha M. Singh, and Neal F. Lue. 2007. Mutual Dependence of *Candida albicans* Est1p and Est3p in telomerase assembly and activation. *Eukaryotic Cell* **6**: 1330-1338.
- Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, P. Steiner, S. D. Caddle, L. Ziaugra, R. L. Beijersbergen, M. J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D. A. Haber, and R. A. Weinberg. 1997. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* **90**:785–795.
- Mitchell, J. R., and K. Collins. 2000. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Molcular Cell* **6**:361–371.

- Moriarty, T. J., S. Huard, S. Dupuis, and C. Autexier. 2002. Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit. *Molecular cell. Biol.* **22**:1253–1265.
- Misiti, S., S. Nanni, G. Fontemaggi, Y. S. Cong, J. Wen, H. W. Hirte, G. Piaggio, A. Sacchi, A. Pontecorvi, S. Bacchetti, and A. Farsetti. 2000. Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Molecular and Cellular Biology* **20**:3764–3771.
- M. Wick, D. Zubov, G. Hagen. 1999. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* **232**: 97-106.
- M Hollstein, K Rice, M S Greenblatt, T Soussi, R Fuchs, T Sørli, E Hovig, B Smith-Sørensen, R Montesano, and C C Harris. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Reserch* **22**: 3551–3555.
- N. A. Campbell and J. B. Reece. 2005. The molecular basis of inheritance. *Biology*, pp.293–308. Benjamin Cummings. San Francisco.
- Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, and T. R. Cech. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**:955–959.
- Oh, S., Song, Y. H., Yim, J. & Kim, T. K. (2000). Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* **19**: 1485–1490.
- Ogata, T., Oshimura, M., Namba, M., Fujii, M., Oishi, M., Ayusawa, D., 1995. Genetic complementation of the immortal phenotype in group D cell lines by introduction of chromosome 7. *Jpn. J. Cancer Research* **86**: 35–40.
- Abdallah P., Luciano P., Kurt W. R., Lisby M., Géli V., Gilson E. & M. Teresa Teixeira. 2009. A two-step model for senescence triggered by a single critically short telomere. *Nature Cell Biology* **11**: 988-993.
- Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., 1983. Evidence for the recessive nature of cellular immortality. *Science* **221**: 964–966.
- Pugh, B. F., and R. Tjian. 1991. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* **5**:1935–1945.
- Qin, X.-Q., D.M. Livingston, W.G. Kaelin Jr., and P.D. Adams. 1994. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *National Academy of Science* **91**: 10918-10922.
- Reik, W., and W. Dean. 2001. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* **22**:2838–2843.
- R. A. Weinberg. 2007. *Eternal Life: Cell immortalization and tumorigenesis. The biology of cancer*, pp. 357-398. Carland Science. United States of America.
- S.E. Swanberg and M.E. Delany 2003. Dynamics of telomere erosion in transformed and non transformed avian cells in vitro. *Cytogenetic and Genome Research* **102**: 318-325.
- Scott J. D. and D. E. Gottschling. 1999. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases a and d. *Cell* **99**: 723-733.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**:41–5.
- T. L. Beattie, W. Zhou, M. O. Robinson, and L. Harrington. 2000. Polymerization defects within human telomerase are distinct from telomerase RNA and TEP1 Binding. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 3329–3340,

- Ulaner, G.A., Hu, J.-F., Vu, T.H., Giudice, L.C., Hoffman, A.R., 1998. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Research* **58**: 4168–4172.
- Valerie M. Tesmer, L. Ford, Shawn E. Holt, Bryan C. Frank, Xiaoming Yi, Dara L. Aisner, Michel Ouellette, Jerry W. Shay, and Woodruff E. Wright. 1999. Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 6207–6212.
- Wright, W. E., M. A. Piatyszek, W. E. Rainey, W. Byrd, and J. W. Shay. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* **18**:173–179.
- Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D., Hannon, G.J., 1998. Myc activates telomerase. *Genes and Development.* **12**: 1769–1774.
- Werness, B. A., A. J. Levine, and P. M. Howley. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**:76–79.
- Wright, W. E., D. Brasky, M. A. Piatyszek, and J. W. Shay. 1996. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal × normal cell hybrids. *EMBL J.* **15**:1734–1741.
- Wu, K. J., C. Grandori, M. Amacker, N. Simon-Vermot, A. Polack, J. Lingner, and R. Dalla Favera. 1999. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genetics* **21**:220–224.
- W. S. El-Deiry, T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1990. *WAF1*, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**: 817–825.
- Xia, J., Y. Peng, I. S. Mian, and N. F. Lue. 2000. Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. *Molecular Cell Biology* **20**:5196–5207.
- Xu, D., A. Gruber, M. Bjorkholm, C. Peterson, and P. Pata. 1999. Suppression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms. *British Journal of Cancer* **80**:1156–1161.
- Xu, D., N. Popov, M. Hou, Q. Wang, M. Bjorkholm, A. Gruber, A. R. Menkel, and M. Henriksson. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**:3826–3831.