Journal of Korean Association
of Cancer Prevention
2002; 7(3): 161-167

Telomere의 기능 손실에 의한 Telomerase 결핍 세포의 성장 억제에 대한 연구

[1]원자력의학원 방사선의학 연구센터, [2]국립암센터,
[3]경희대학교 생물학과, [4]서울여자대학교 자연과학부

주연진[1,4] · 박정은[1] · 전경미[1] · 김창민[2] · 김상훈[3] · 박원봉[4] · 이기호[1]

Impaired Growth of Telomerase-Deficient Cells by Telomere Dysfunction

Yeun-Jin Ju[1,4], Jeong Eun Park[1], Kyoung Mi Juhn[1], Chang-Min Kim[2], Sang-Hoon Kim[3], Won-Bong Park[4] and Kee-Ho Lee[1]

[1]Laboratory of Molecular Oncology, Korea Cancer Center Hospital, Seoul 139-240, Korea
[2]National Cancer Center, Ilsan-Gu, Gyeonggi-do 411-764, Korea,
[3]Department of Biology, Kyung Hee University, Seoul, Korea,
[4]Division of Natural Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

Gradual loss of telomere ends limits the growth capacity of primary cells whereas telomerase reactivation facilitates telomere maintenance and immortal cell growth in over 85% of human cancers. While telomerase activity is not detectable in most human somatic cells, inhibition of telomerase activity is thought to be a potential target for anticancer therapies. Here we show that telomerase inhibition has a profound effect on cell growth in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from telomerase-deficient mice. Telomere dysfunction exemplified by the formation of chromosomal end-to-end fusions was found to be an important factor of the growth impairment in telomerase-deficient cells. Multi-chromosomal fusion after exposure to doxorubicin is a typical characteristic of chromosomal abnormality. These findings indicate that chromosomal end-to-end fusion is a critical factor for the impairment of cell growth in telomerase-deficient cells and multi-chromosomal fusion might be one mechanistic basis of doxorubicin in conjunction with telomere function.

Key Words: Telomerase, Telomere, Chromosomal end to fusion, Cell growth

책임저자 : 이기호, ㉾ 139-240, 서울특별시 노원구 공릉 2동, 원자력의학원 방사선의학 연구센터 분자종양학실험실
Tel: 02-970-1312, Fax: 02-977-0381, E-mail: khlee@kcch.re.kr

이 논문은 과학기술부 인간 유전체사업(FG0101-002), 과학재단 특정기초 연구비(R01-2000-000-00089-0)로 수행되었음.
This work was supported by National Nuclear R & D program and 21C Frontier Human Genome Project (5607-2002), Korean Ministry of Science and Technology, and the Basic Research Program of the Korea Science and Engineering Foundation (2000-2-20400-002-3).
접수일 : 2002년 7월 10일, 게재승인일 : 2002년 9월 9일

서 론

Telomere는 chromosome의 말단에 위치하고 있는 핵단백 복합체[1]로 선형 chromosome의 말단을 분해, 재조합 및 fusion 등으로부터 보호함으로써[2] chromosome 구조의 안정성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 왔다.[3] 정상 체세포에서는 불완전한 DNA 복제로 인하여 세포 분열 시 마다 지속적으로 telomere의 길이가 감소하게 된다. 이로 인하여 세포는 극도로 짧은 길이의 telomere를 갖게 되며 senescence 또는 crisis 과정에 들어가게 된다[4~6]

이와 같이 세포 분열 시 마다 짧아지게 되는 telomere는 telomerase에 의하여 합성되어지며, catalytic subunit인 telomerase reverse transcriptase (TERT)와 RNA subunit인 telomerase RNA component (TERC)로 이루어져 있다. 이러한 telomerase의 활성은 대부분의 암 세포들에서 발견되어지고 있으며,[7,8] 세포의 immotalization 과정에 있어서 필수적인 요소로 알려지고 있다.[4,9] 이러한 측면에서 볼 때 telomerase의 활성 억제는 선택적인 암 치료를 위한 새로운 방법 중의 하나로 제안되어지고 있다.

Telomerase의 in vivo 역할을 규명하기 위하여 개발된 telomerase knockout mouse는 교배를 통하여 1 세대(G1)에서 6 세대(G6)까지 얻을 수 있으며,[10,11] 이들은 telomerase의 활성이 결핍되어 있기 때문에 세대를 거치면서 점진적으로 짧은 길이의 telomere를 지니게 된다. 특히 G4~G6 세대에서는 chromosome 말단간의 end-to-end fusion 등 telomere의 기능 손실 현상이 나타나게 된다.[10,11] 따라서 이 마우스 모델로부터 telomere의 길이가 길고 telomerase의 활성을 갖는 세포(mTERC+/+), telomere의 길이는 길지만 telomerase의 활성이 결핍된 세포(G1- G2 mTERC-/-), 그리고 telomere의 길이가 짧고 telomerase의 활성이 결핍 된 세포(G4- G6 mTERC-/-)를 얻게 되고, 이와 같은 특징을 갖는 마우스는 telomerase와 telomere 기능의 상대적인 역할을 연구하는데 중요하게 이용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 telomerase와 대표적인 암 억제 유전자인 $p16^{INK4a}$를 동시에 knockout 시킨 마우스의 embryonic fibroblast (MEF)로 부터 얻은 세포에서 telomere의 길이와 telomerase의 활성이 세포 성장에 미치는 영향을 조사하였고 chromosome의 안정성과의 상관 관계를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

1) Telomerase가 결핍된 MEF 세포의 transformation 및 세포배양

mTERC 유전자와 INK4a 유전자가 모두 결핍되어 있는 마우스[12,13]로부터 얻은 mTERC-/- INK4a-/- MEF와 mTERC+/+ INK4a-/- MEF 세포에 Myc/ $H\text{-}Ras^{G12}$/Bluescript KS (+) control vector 또는 Myc/ $H\text{-}Ras^{G12}$/mTERC plasmid DNA를 calcium phosphate precipitation 방법으로 cotransfection 하였다.[13,14] Transfection 시키기 24시간 전에 8×10^5의 MEF 세포들을 10 cm dish에 심고 배양한 뒤 각각 2μg의 plasmid를 cotransfection 시켰다. 14일 뒤에 형성 된 foci들로부터 형질 전환된 클론들을 얻었으며, 이들 개별 클론에 대하여 TRAP assay를 수행하여 telomerase 활성을 확인하였다.[7] 10% FBS를 포함한 Dulbeco's modified Eagle's medium 배지를 사용하여 수행하였다.

2) 세포 성장 측정

12-well plate에 2.5×10^4/well이 되도록 세포를 심은 후 지정된 시간에 세포를 10% formalin으로 10분간 고정시켰다. 증류수로 세척한 뒤 0.1% crystal violet으로 30분간 염색하고 증류수로 여러 번 세척한 뒤 건조시켰다. 세포에 침착된 염색약을 10% acetic acid로 추출한 뒤 증류수로 4배 희석하고, 96-well microtiter plate에 옮겨 590 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장률을 구하였다.

3) Metaphase 분석

활발히 자라는 세포에 100μl/10 ml media 농도로 colcemid (Gibco-BRL, USA)를 처리한 뒤 1시간 동안 배양시켰다. 세포를 trypsin 처리하여 단일 세포 상태의 pellets으로 얻은 뒤 0.075 M potassium chloride 용액을 넣고 37℃에서 20분간 반응시켰다. 고정 용액 (methanol : acetic acid=3 : 1 vol/vol)을 넣어 실온에서 10분간 고정시키고 이들을 유

리 슬라이드에 적하하여 세포를 부착시켰다. 실온에서 overnight 동안 건조한 뒤 55~60°C dry oven에 넣고 2~3시간 동안 굽고 Gimsa-staining을 하여 metaphase 상태의 chromosome을 염색하였다. 이와 같이 준비한 metaphase를 광학 현미경으로 관찰하여 chromosome간의 fusion 개수를 측정하였다.

4) Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Telomere의 signal이 손실된 free ends 측정을 위하여 FISH를 다음과 같이 수행하였다.[13] Metaphase 분석을 위해 준비한 슬라이드를 4% formaldehyde/PBS로 고정하고 1 mg/ml pepsin/10 mM HCl (pH 2.0)으로 20분간 37°C에서 처리한 뒤 4% formaldehyde/PBS로 반복 고정하였다. PBS로 세척한 뒤 70%, 85% 및 100% ethanol을 순차적으로 처리하여 수분을 제거하고 건조 시켰다. Cy-3로 표지된 $(CCCTAA)_3$ PNA probe를 80°C에서 3분간 그리고 37°C에서 overnight으로 hybridization 반응을 시켰다. 70% formamide/10 mM Tris (pH 7.0)와 0.05% triton X-100/PBS 순으로 세척한 뒤 4', 6-diamidino-2-phenylindole로 대조 염색하였다. 이와 같이 염색된 metaphase로부터 형광 현미경을 이용하여 chromosome상의 free ends 수를 측정하였다.

결 과

1) Telomerase 결핍에 의한 transformation된 MEF 세포의 성장 억제

mTERC 유전자가 결핍된 마우스들간의 지속적인 교배는 점진적으로 짧은 길이의 telomere를 갖는 마우스들을 만들게 되며,[10,13] INK4a 유전자가 결핍된 MEF 세포는 oncogene에 의한 transformation을 쉽게 한다.[15] 따라서 INK4a와 mTERC 유전자가 동시에 결핍된 마우스들간의 지속적인 교배를 통해 얻은 마우스들은 transformation된 세포에서의 telomere의 길이와 telomerase의 활성이 미치는 여러 가지 영향들의 연구를 쉽게 할 수 있다.[13,16] 이와 같이 Myc/Ras oncogene으로 transformation된 INK4a-/-mTERC-/- MEF 세포는 세포 배양시 빠른 속도로 자라며 SCID 마우스에서 종양을 형성한다.[13] 따라서 본 실험에서는 mTERC-/-INK4a-/-인 마우스로부터 얻은 MEF 세포를 Myc/Ras 유전자로 transformation한 뒤 이들 세포에서의 telomere의 길이와 telomerase의 활성이 세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다. Telomere의 길이가 짧고 telomerase의 활성이 결핍 된 G5 mTERC-/-INK4a-/- MEF 세포에 Myc/Ras/Bluescript KS (+) DNA를 cotransfection시켜 transformation 된 클론들을 얻었으며 동시에 Myc/Ras/mTERC DNA로 cotransfection시켜 telomerase의 활성을 다시 복구시킨 transformation 된 클론들을 준비하였다. 이들 클론들을 대상으로 하여 telomere의 길이가 짧은 상태에서 telomerase 활성의 존재 유무가 세포 성장 속도에 미치는 영향을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 telomerase의 활성이 결핍된 5개 클론들 중에 1번, 2번 및 3번의 3개 클론들의 경우 mTERC로 telomerase의 활성을 복구 시켜서 실험에 사용된 4개 클론(6번, 7번, 8번 및 9번) 모두에 비교하여 세포 성장 속도가 감소하였다. 그러나 telomerase의 활성이 결핍된 4번 및 5번 클론들의 경우는 telomerase의 활성을 복구 시켜 준 클론들과 비슷한 세포 성장 속도를 나타내었다. 한편 G1 세대에서 얻은 클론들의 경우 telomerase 활성 복구와 상관없이 동일한 수준의 세포 성장률을 보여 주었다 (data not shown). 따라서 telomerase의 활성보다는

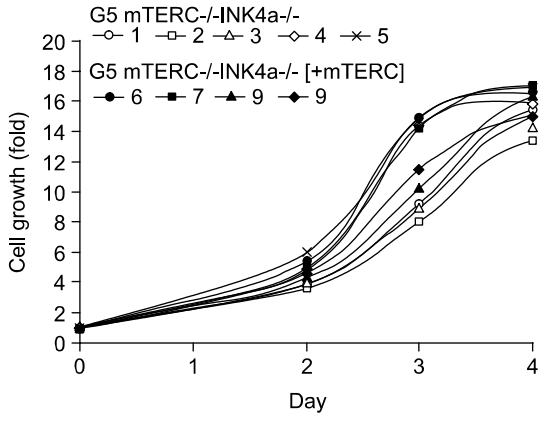

Fig. 1. Growth curve of Myc/Ras-transformed mTERC-/-INK4a-/- MEFs in culture. The growth characteristics of Myc/Ras transformed G5 mTERC-/-INK4a-/- MEF cultures were measured for 4 days in individually isolated clones with (clone 6~9) or without mTERC-reconstitution (clone 1~5).

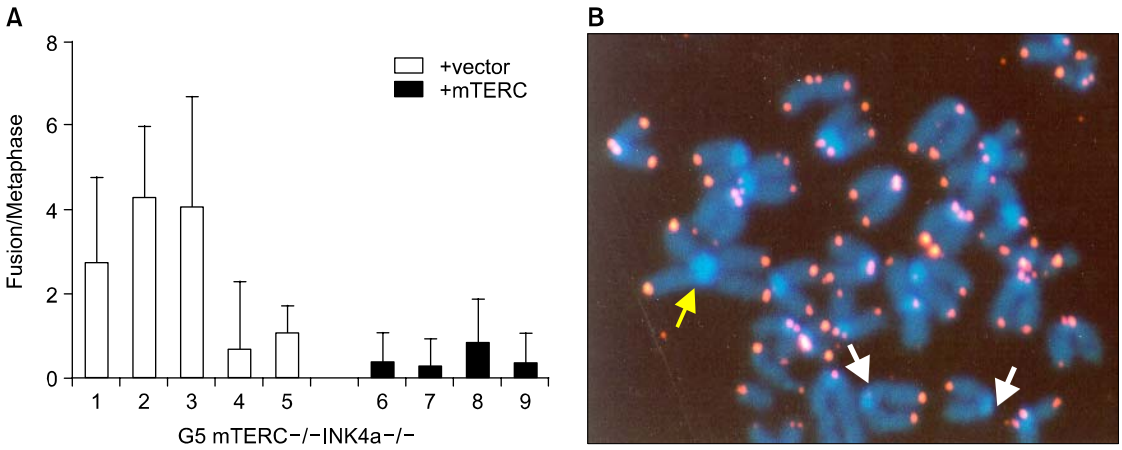

Fig. 2. Increased chromosomal instability in mTERC-/-INK4a-/-MEFs. (A) The frequency of cromosomal end-to-end fusions and (B) Telomere fluorescence of metaphase chromosomes. Myc/Ras-transformed G5 mTERC-/-INK4a-/- MEFs were hybridized with Cy3 labeled $(CCCTAA)_3$ PNA probe. Arrow indicate telomeres without detectable TTAGGG (white) and chromosomal end-to-end fusions (black).

telomere의 길이가 세포 성장에 큰 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었으며, telomere의 길이가 짧은 클론들간에 세포성장에 미치는 영향이 다양함을 알 수 있었다.

2) Telomerase 활성이 결핍된 세포에서의 chromosomal end-to-end fusion과 세포 성장의 상관관계

정상 세포나 telomerase의 활성을 억제시킨 암세포의 경우 세포 분열시 마다 지속적인 telomere의 손실을 일으킨다. 이로 인한 telomere의 마모는 telomere repeat를 갖지 않는 chromosome, end-to-end fusion과 같은 비정상적인 chromosome 및 세포내의 aneuploidy의 증가를 수반하며 이러한 현상들은 chromosome의 안정성을 감소시킨다.[17~19] G5 mTERC-/-INK4a-/-인 마우스로부터 얻은 Myc/Ras 유전자로 transformation된 MEF 세포는 chromosome간의 end-to-end fusion을 나타내며, mTERC를 복구 시켜준 경우 이와 같은 fusion이 저해됨으로써 telomere의 기능이 복구되어진다.[13] 이와 같이 telomere의 길이가 짧은 G5 세대에서 transformation된 MEF 세포는 telomerase의 활성이 chromosome 말단의 fusion에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

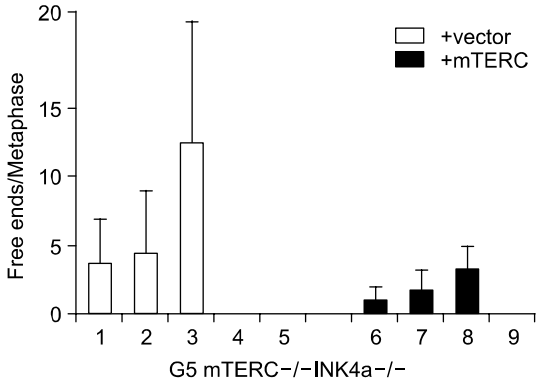

Fig. 3. Increased chromosomal free ends in mTERC-/-INK4a-/-MEFs. The number of telomeres without detectable TTAGGG repeats (free end chromosome) per metaphase were measured in the individual clones of Myc/Ras transformed G5 mTERC-/-INK4a-/- (clone 1~5) and G5 mTERC-/-INK4a-/-[+mTERC] (clone 6~9) MEFs.

Telomerase의 활성이 결핍된 클론 간에 세포 성장이 차별적으로 나타난 현상이 chromosome의 안정성과 상관 관계를 갖고 있는지 조사하기 위하여 이들 클론들을 대상으로 하여 chromosome 간의 end-to-end fusion의 수와 chromosome 말단에 telomere의 signal을 갖지 않는 free ends chromosome

의 수의 변화를 관찰하였다(Fig. 2, 3). 그 결과 telomerase의 활성이 결핍된 클론 중 세포 성장 속도가 감소되었던 1번, 2번 및 3번 클론들의 경우 chromosome 간의 end-to-end fusion의 수가 metaphase 당 각각 2.8, 4.3 및 4.1개로 측정되어(Fig. 2A, Fig. 3) mTERC로 telomerase 활성이 복구된 5번, 6번, 7번 및 8번 클론들의 각각 0.4, 0.3, 0.9 및 0.4개 보다 월등히 fusion이 증가하였음을 알 수 있었다. 또한 $(CCCTAA)_3$ PNA probe를 이용하여 FISH를 수행한 결과에서도 telomerase의 활성이 결핍된 클론들의 경우 telomerase가 복구된 클론들보다 free ends chromosome의 수가 많이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3). 반면 telomerase의 활성이 결핍되었지만 세포 성장 속도에 별다른 영향을 받지 않은 4번 및 5번 클론들의 경우 chromosome 말단 간의 fusion의 수가 각각 0.7개 및 1.1개로 매우 낮은 수준을 유지하고 있었으며 또한 free ends chromosome도 거의 측정되지 않았다. 이와 같은 결과로부터 telomere의 길이가 짧은 상태에서 telomerase의 존재가 chromosome의 말단을 보호함으로써 telomere의 안정성을 유지시키며 세포의 성장 속도를 유지시키는데 중요한 역할을 할 수 있다는 사실을 알 수 있다.

3) Telomere 기능 손실 세포에서 doxorubicin에 의한 multi-chromosomal fusion의 증가

항암 요법에 의한 암 치료에 있어서 가장 중요한 문제점 중의 하나는 정상 세포에 대한 독성을 최소화하고 암세포에 대한 선택적 치료를 가능하게 할 수 있는 항암제 및 치료 방법의 개발이다. Telomerase의 활성이 정상의 체세포에서는 전혀 없으나 대부분의 암 세포에서는 발견된다는 점에서[7,8] telomerase의 활성 억제를 이용한 암 치료 요법은 선택적인 암 치료를 위한 새로운 방법 중의 하나로 제안되어질 수 있다.

따라서 본 실험에서는 DNA double-strand break를 일으키는 대표적인 항암제 중의 하나인 doxorubicin 처리 시 transformation된 MEF 세포에서 telomere의 길이와 telomerase 활성에 따른 chromosome의 안정도 변화를 조사하여 telomerase의 활성 억제가 chromosome의 안정도를 선택적으로 감소시킬 수 있는가를 조사하였다. Myc/Ras 유전자로 transformation된 G5 mTERC-/-INK4a-/- MEF 세포로부터 얻은 클론 중 telomerase의 활성이 결핍된 클론과 활성을 복구 시켜준 클론 그리고 Myc/ Ras 유전자로 transformation된 mTERC+/+ INK4a-/- MEF 세포를 대상으로 doxorubicin의

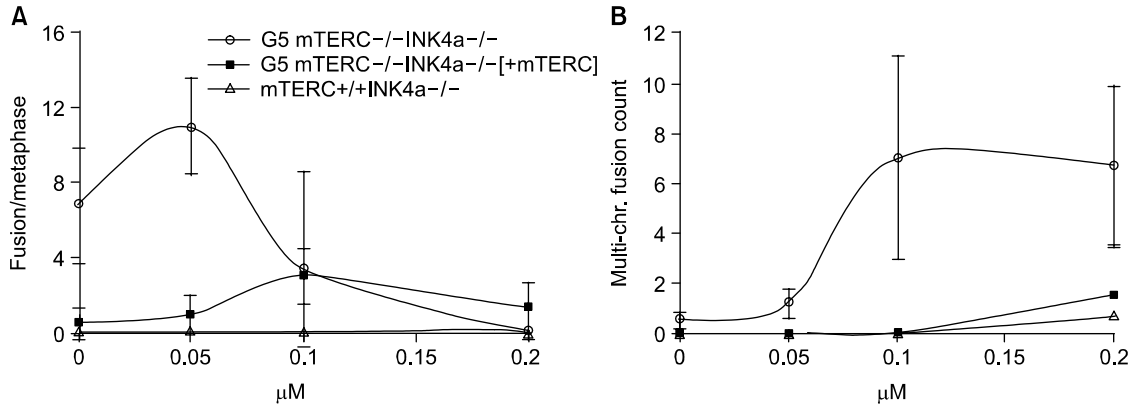

Fig. 4. Loss of telomere function increases chromosomal end-to-end fusions and multiple chromosomal fusions toward doxorubicin. Chromosomal stability of Myc/ Ras- transformed G5 mTERC-/-INK4a-/- MEF cultures with and without mTERC-reconstitution and Myc/Ras- transformed mTERC+/+INK4a-/- MEF cultures were measured by the frequency of (A) cromosomal end-to-end fusions and (B) multiple chromosomal fusions after exposure to doxorubicin.

농도에 따른 chromosome 간의 fusion 수와 multi-chromosomal fusion 수의 변화를 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 telomerase의 활성이 결핍된 클론은 metaphase 당 fusion의 수가 처리 전 6.8개에서 0.5μM 농도로 처리 시 11개로 증가됨을 보였으며(Fig. 4A), doxorubicin의 농도를 증가시킴에 따라 chromosome들 간의 반복적인 fusion 발생에 의한 multi-chromosomal fusion의 수가 비례적으로 증가함을 나타내었다(Fig. 4B). 이러한 연구 결과는 telomere의 길이가 짧고 telomerase의 활성이 결핍되어 telomere의 기능이 손실된 세포에 대하여 doxorubicin 처리 시 multi-chromosomal fusion에 의하여 chromosome의 안정도를 더욱 크게 떨어뜨릴 수 있음을 의미한다. 반면에 telomerase의 활성을 복구 시켜준 클론의 경우 fusion의 수 및 multi-chromosomal fusion의 수에 거의 변화를 나타내지 않았으며 Myc/Ras로 transformation된 mTERC+/+INK4a-/- MEF와도 비슷한 수준을 나타내었다(Fig. 4A, B). 이러한 결과로부터 동일한 농도의 doxorubicin 처리 시 telomere의 기능이 손실된 세포의 경우 multi-chromosomal fusion에 의하여 chromosome의 안정도가 크게 감소하며, 이는 telomere 기능 결핍 세포에서 doxorubicin에 대한 민감도 증가의 원인이 됨을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구를 통하여 telomere의 길이가 매우 짧고 telomerase의 활성이 결핍되었을 경우 transformation된 MEF 세포의 성장 속도가 감소되어짐을 알 수 있었다. 또한 세포 성장 속도의 감소를 나타낸 이들 클론들의 경우 모두 chromosome들 간의 end-to-end fusion 수의 증가와 free ends chromosome 수의 증가를 수반하였고, 이는 이들 클론 모두가 telomere 길이 감소에 따른 telomere의 기능 손실을 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 telomere의 길이 감소와 telomerase의 활성 결핍에 따른 telomere 기능의 손실은 chromosome들 간의 end-to-end fusion을 일으킴으로써 chromosome의 안정성에 감소를 일으키며 이로 인해 세포 성장이 저해됨을 알 수 있었다. 반면 telomere의 길이가 짧고 telomerase의 활성을 갖지 않음에도 불구하고 세포 성장 속도의 감소를 나타내지 않은 클론들은 end-to-end fusion 및 free ends chromosome 수에 변화를 나타내지 않아 지속적으로 chromosome의 안정성이 유지되고 있음을 보였다. 이러한 일부 클론에서의 지속적인 telomere 기능의 유지는 이들 클론이 비록 짧은 길이의 telomere를 갖고 있지만 아직은 그 기능을 손실할 정도에 이르지 못한 결과이거나 telomerase 활성을 갖지 않는 암 세포들에서 발견되어지는 ALT (Alternative lengthening of telomere)메카니즘, 즉 recombination을 통해 telomere 기능을 유지하는 작용 메카니즘을 이용하고 있기 때문이라고 설명할 수 있다.[20] 한편 telomerase의 활성을 복구 시켜준 모든 클론에서 나타난 정상적인 세포 성장과 chromosome의 안정성은 telomerase의 활성이 매우 짧은 길이의 telomere의 말단을 보호함으로써 chromosome의 안정성을 지속적으로 유지시키는데 결정적인 역할을 하고 있음을 나타낸다.[9,21]

Transformation된 MEF 세포에 DNA double-strand break를 일으키는 doxorubicin을 처리한 결과 telomere의 길이가 짧고 telomerase의 활성이 결핍된 세포에서 chromosome의 안정성 감소를 나타내는 chromosome end-to-end fusion 수 및 multi-chromosomal fusion 수의 급격한 증가를 확인하였다. 반면 telomerase 활성을 복구시켜준 경우 chromosome상에 변화를 나타내지 않았으며 이러한 결과는 telomerase의 활성이 doxorubicin에 의한 DNA 손상으로부터 chromosome의 말단을 보호할 수 있음을 의미한다. 따라서 대부분의 암세포가 정상 세포에 비해 telomere의 길이가 짧음에도 불구하고 telomerase의 활성에 의해 chromosome의 말단을 보호함으로써 그 기능과 안정성을 유지한다[9,21,22]는 사실은 암 세포의 선택적 치료 효과를 높이는데 telomerase 활성 억제가 중요한 수단으로 이용될 수 있음을 의미한다.

이러한 결과들로부터 볼 때 telomere의 기능의 유지에 따른 chromosome의 안정성 유지가 세포 성장 능력 결정에 중요한 역할을 함을 알 수 있다. 특히 암 세포의 경우 일반적으로 telomere 길이가 정상 세포에 비해 짧고 telomerase 활성을 갖는다는 점에서 볼 때[22,7] telomerase 활성 억제를 통한 암 세포 성장의 조절이 새로운 암 치료 수단

으로 이용될 수 있을 것이란 가능성을 높여주는 결과라고 말할 수 있다.

참고 문헌

1) Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extra chromosomal ribosomal RNA genes in Telrahymena. *J Mol Biol* 1978; 120: 33-53.
2) Greider CW. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem* 1996; 65: 337-365.
3) Blackburn EH. Telomeres: no end in sight. *Cell* 1994; 77: 621-623.
4) Harley CB. Futcher AB and Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-460.
5) Shay JW, Pereira-Smith O, Wright WE. A role for both RB and p53 in regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196: 33-39.
6) Bonder AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-352.
7) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2015.
8) Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33(5): 787-791.
9) Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre C, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11: 1921-1929.
10) Blasco MA, Lee H-W, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, Depinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25-34.
11) Lee H-W, Blasco MA, Grottlieb GJ, Horner JW, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998; 392: 569-574.
12) Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and MDM2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8292-8297.
13) Greenberg RA, Chin L, Femino A, Lee K-H, Gottlieb GJ, Singer RH, Greider CW, Depinho RA. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a$^{\triangle 2/3}$ cancer-prone mouse. *Cell* 1999; 97: 515-525.
14) Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee S-L, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA. p53 deficiency rescues the averse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999; 97: 527-538.
15) Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Crdo C, Beach D, Depinho RA. Role of INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85: 27-37.
16) Lee K-H, Rudolph KL, Ju Y-J, Greenberg RA, Cannizzaro L, Chin L, Weiler SR, DePinho RA. Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3381-3386.
17) Harley CB. Telomerase loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Res* 1991; 256: 271-182.
18) Blasco MA, Lee H-W, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25-34.
19) Zhang R, Wang X, Guo L, Xie H. Growth inhibition of BEL-7404 human hepatoma cells by expression of mutant telomerase reverse transcriptase. *Int J Cancer* 2002; 97: 173-179.
20) Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995; 14: 4240-4248.
21) Ducray C, Pommier JP, Martins L, Boussin FD, Sabatier L. Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* 1999; 18: 4211-4223.
22) De Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 518-527.