

文章编号: 1004-0374(2009)06-0760-10

## 端粒和端粒酶的发现及其生物学意义

童夏静\*, 周金秋

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,  
分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

**摘要:** 2009年的诺贝尔生理学或医学奖授予了美国加州大学旧金山分校的Elizabeth H. Blackburn、约翰霍普金斯大学的Carol W. Greider以及哈佛医学院的Jack W. Szostak三位科学家, 肯定他们在发现端粒以及端粒酶保护染色体末端方面所做出的贡献。端粒以及端粒酶的发现历经近半个世纪, 追溯起端粒和端粒酶整个发现过程, 却是耐人寻味, 给人启发。端粒是真核生物中位于染色体末端的DNA和蛋白质的复合物, 它对于维持基因组的完整性以及染色体的稳定性都有着至关重要的作用。端粒DNA可以被一种特化的称为“端粒酶”的逆转录酶延伸。端粒长度的维持以及端粒结构的稳定在细胞衰老、癌症发生以及干细胞全能性自我更新能力维持等生命过程中都起重要作用。

**关键词:** 端粒; 端粒酶; DNA复制; 染色体; 衰老; 癌症; 干细胞

**中图分类号:** Q279; R522; R730.43 **文献标识码:** A

## Telomere, telomerase and their biological senses

TONG Xia-jing\*, ZHOU Jin-qiu

(The State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology,  
Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences,  
Shanghai 200031, China)

**Abstract:** The 2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine is shared by Elizabeth H. Blackburn (University of California San Francisco), Carol W. Greider (Johns Hopkins University School of Medicine) and Jack W. Szostak (Harvard Medical School) for their discovery of how chromosomes are protected by telomeres and the enzyme telomerase. It took about half a century to solve the chromosome end protection problem, and the entire process of discovery is very intriguing and highly enlightening. Telomeres are protein-DNA complexes found at the ends of eukaryotic linear chromosomes. They are essential for maintaining genome integrity and chromosome stability. The telomere length could be elongated by a specialized reverse transcriptase telomerase. The maintenance of telomere length and structure plays important roles in many biological processes including cellular aging, tumor genesis and stem cell self-renewal.

**Key words:** telomere; telomerase; chromosome stability; aging; cancer; stem cell

### 1 端粒的发现

早在1938年, 美国遗传学家Hermann J. Müller (1946年诺贝尔生理或医学奖获得者) 在爱丁堡动物遗传研究所用X射线照射果蝇时, 便发现染色体的末端与其他的位置有着性质上的不同。在受到照射后, 染色体末端并不像其他部分表现出缺失或者逆转现象。因此, 他猜测染色体的末端必定有着某种特殊的保护结构, 并命名为末端基因 (terminal gene),

之后又改为端粒 (telomere)。在希腊语中 “telos” 表示末端, 而 “meros” 表示部分。在之后的研究中人们也证实了端粒在染色体中的重要作用。1941年密苏里大学的研究员Barbara McClintock (1983年

收稿日期: 2009-11-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30630018)

\*通讯作者 E-mail: xjtong@sibs.ac.cn

诺贝尔生理或医学奖获得者)在玉米的遗传学研究中发现染色体断裂会导致末端融合, 形成具有双着丝粒的染色体。然而, 若断裂末端含有端粒结构则可以恢复这种异常现象, 因此推断出染色体末端对于染色体的稳定性有着非常重要的作用<sup>[1]</sup>。

端粒的化学组成究竟是什么在当时是一个很难回答的问题, 因为那时人们对染色体及DNA的理解也比较肤浅。直到1953年, Waston和Click阐明DNA双螺旋结构; 1957年, Kornberg发现DNA聚合酶, 以及1975年Sanger和Clouson发明了双脱氧终止法, 实现DNA序列的测序<sup>[2]</sup>, 从此, 端粒的研究才重新开启了一扇天窗。

1978年, Elizabeth H. Blackburn在Joseph Gall (2006年Albert Lasker医学特殊贡献奖获得者)实验室从事博士后研究, 他们对纤毛虫(Ciliate)的核糖体DNA(ribosomal DNA, rDNA)复制很感兴趣。他们利用四膜虫(Tetrahymena, 纤毛虫的一种)作实验材料。四膜虫的小核含5对染色体, 用于生殖传代。而大核在发育过程中染色体断裂成成百个小染色体。多拷贝的rDNA从染色体上断裂后经过复制形成上万个微小染色体。通过对纯化的rDNA微小染色体测序, 发现微小染色体末端是20—70拷贝的TTGGGG序列。由此, 他们推断四膜虫的端粒DNA是由许多重复的TTGGGG/CCCCAA六个碱基序列组成<sup>[3]</sup>, 这一推断被证明是正确的。他们的思想和实验过程又一次验证了人们经常重复的“格言”: 解决生物学问题一定要选好实验材料和实验模型; 新技术的应用可以回答以前不能回答的问题; 研究某一个问题的可能会让你获得意外的收获。

至此, 新的问题是: 端粒重复序列与早期Müller和McClintock推测的端粒对染色体的保护功能有何联系呢? 后面发生的故事回答了这一问题, 也为我们提供了一个合作研究的典范。1980年, Blackburn在一次研究会议上与遗传学家Jack Szostak进行了交流, 他们决定在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中检测四膜虫所谓的端粒DNA的功能。Szostak的研究兴趣是在酵母体内构建人工染色体。他们将线性的DNA转入酿酒酵母后, 却发现线性DNA很容易通过同源重组整合到染色体的同源序列中, 或者在某些情况下, 线性的DNA末端会被降解或者以一种非重组方式互相连接, 得不到预先设想的人工染色体。有趣的是, 当在线性DNA的两端接上四膜虫端粒DNA序列后, 这些被导入酵母细胞中的外源DNA能够稳定存在。这个实验充分说明

了四膜虫的端粒DNA具有保护线性DNA的作用。这项发现被认为是构建人工染色体的关键步骤之一。在进一步的实验中, 他们将线性DNA的一端连接核糖体DNA, 另一端则接入一段较短的非规则酵母DNA序列(类似于四膜虫的富含TG的端粒序列), 他们惊奇地发现这段酵母DNA序列会被延伸加入200 bp的TG核苷酸序列。于是, 他们首次确认了酵母的端粒DNA序列, 并再次证明了端粒维持了线性DNA在酵母体内的稳定性<sup>[4, 5]</sup>。这项研究同时还发现, 这些酵母端粒的特征性序列能够被添加到包含有四膜虫端粒DNA的外源DNA末端。于是, 他们推测, 酵母细胞可能以端粒DNA本身的序列为模板, 在线性染色体末端添加端粒DNA重复序列。这些有趣的发现不仅证实了端粒保护染色体功能, 而且帮助人们提出了“端粒DNA的复制可能不是通过同源重组途径实现的, 而是通过一个特殊的酶来完成的”的假说。

## 2 端粒复制问题的提出

自从1953年Waston和Click提出了DNA的双螺旋结构模型<sup>[6]</sup>, 人们发现DNA的复制是通过一种半保留复制的方式(semiconservative replication)进行的, 即子代的DNA双链一条来自亲代, 而另一条是新合成的。DNA双链属反向平行, 因此在复制过程中复制叉(replication fork)附近所解开的DNA单链, 其中一条是5'-3'方向的引导链(leading strand), 另一条则是3'-5'方向的后续链(lagging strand)。1957年, 美国科学家Arthur Kornberg在大肠杆菌中首次发现了DNA聚合酶(DNA polymerase)<sup>[7]</sup>, DNA聚合酶只能沿着5'-3'的方向进行合成, 因此很难解释DNA的3'-5'链的复制问题。1972年, 日本学者冈崎(Okazaki)等用<sup>3</sup>H脱氧胸苷短时间标记大肠杆菌内核酸, 交联变性后用梯度离心的方法发现存在很多不同长度被<sup>3</sup>H标记且与RNA引物共价结合的DNA片段(即后人称作冈崎片段的DNA)。延长标记时间, 冈崎片段可转变为成熟DNA链, 推断出这些片段必然是复制过程中的中间产物。因此, 他们提出了DNA的半不连续复制(semidiscontinuous replication)理论<sup>[8]</sup>。

之后的研究发现DNA聚合酶只能延长已存在的DNA链, 而不能进行起始合成, 因此揭示了在DNA在复制过程中, 首先需要RNA聚合酶(RNA polymerase)在DNA模板上合成一段RNA引物(RNA primer), 而后DNA复制酶再从RNA引物的3'端继续合成新的DNA链。因此, 前导链的复制只需一

段 RNA 引物, DNA 聚合酶就可以合成下去; 然而, 后续链进行半不连续复制, 每隔一段就需要 RNA 引物, 然后由 DNA 聚合酶 III 合成 DNA, 直至遇到下一处的冈崎片段为止。进而由 RNA 酶 H (RNaseH) 降解 RNA 引物, 留下各处缺口由 DNA 聚合酶 I 补齐, 最后在 DNA 连接酶 (DNA ligase) 的作用下连接成大分子 DNA 链。DNA 聚合酶 I 在催化合成 DNA 时, 需要自由 3' -OH 作为引物, 因此染色体的 5' 最末端无法被填补, 新合成的染色体就会比母链短一点。如果不填补, 那么细胞每复制一次, 染色体就会缩短一些。于是 1972 年, Jim Watson 提出了染色体复制的末端隐缩问题<sup>[9]</sup>。

### 3 端粒酶的发现

由于存在染色体末端的复制问题, 在 DNA 的复制过程中, 端粒会逐渐缩短。然而, 有些细胞在传代的过程中, 端粒的长度却是一直保持稳定, 甚至在锥虫和四膜虫中还发现了端粒逐渐延长的现象。那么端粒必须通过一定的机制来维持长度, 要么利用重复序列进行同源重组, 要么通过聚合酶的作用复制末端。1974 年, 英国的学者 Cavalier-Smith 提出端粒的反转重复序列 (inverted repeats) 模型<sup>[10]</sup>, 1975 年, Betaman 简化该模型, 认为染色体末端只要是发卡结构 (hairpin) (DNA 双链共价连接另一条连续链) 就可以被复制<sup>[11]</sup>, 即 DNA 聚合酶到达染色体末端后可以回头继续复制, 从而完成末端的复制问题。可是在 1982 年, Blackburn 和 Szostak 确定了端粒序列之后, 他们的这些发现与当时比较认可的端粒发卡结构似乎有冲突, 并且同源重组也不能解释, 因此他们猜测是否存在一种末端转移酶类似的酶可以增加核苷酸到染色体末端, 从而维持端粒长度于一恒定水平。

于是 Blackburn 和 Szostak 分别采取了不同的途径去寻找他们设想的酶。Blackburn 用生化的方法在四膜虫细胞裂解液中寻找端粒酶。1985 年, Blackburn 实验室的研究生 Carol W. Greider 在四膜虫的细胞裂解液中分离出了一种新的酶活性, 它可以在体外特异性地增加 TTGGGG 重复序列到端粒 DNA 序列上, 她们便猜测端粒长度的维持就是依赖这种新发现的末端转移酶的活性而实现的, 该末端转移酶就是端粒酶<sup>[12]</sup> (图 1)。而此时端粒酶的化学组成仍然不是很明了。

Szostak 和他的博士后 Vicki Lundblad 在 1984 年开始用遗传学的方法筛选酿酒酵母中的端粒酶。他们筛选的原理是: 在酵母中若转化了含有方向相反



图1 1982年Blackburn实验室的研究生Carol W. Greider在四膜虫裂解液中发现端粒酶活性(引自[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2009/greider-photo.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/greider-photo.html))

的四膜虫端粒序列的环状质粒, 酵母细胞将会随机地打开该质粒使之成为线性 DNA, 同时两端粒之间的基因就被破坏不能表达; 但是该过程的完成需要在这个线性 DNA 的末端加上酵母的端粒 DNA, 因此在端粒酶突变的酵母中, 由于不能在线性染色体末端加入端粒序列, 环状质粒的线性化就会受到影响, 端粒序列间的基因不会破坏而能正常表达。利用这个原理, 他们将 *URA3* 基因插入这两个倒置的端粒之间, 然后利用 5-氟乳清酸 (5-fluorouracil, 5-FU) 筛选 *URA3* 基因表达完好的突变体<sup>[13]</sup> (图 2a)。经过随机突变, 在 7 000 多个突变菌株中, 有一个突变体呈现这样的表型, 同时发现在该突变体中染色体末端的端粒序列逐渐缩短, 并且细胞趋于衰老, 把该基因命名为 *EST1* (ever shorter telomeres 1)<sup>[13]</sup> (图 2b)。Lundblad 发现 *EST1* 包含一段 RNA 依赖性的聚合酶保守结构域, 因此猜测 *EST1* 所编码的蛋白可能就是人们一直寻找的端粒酶。然而, 后来的研究证明, *EST1* 所编码的蛋白并不具有反转录酶活性, 不是端粒酶, 但是它已经非常接近了, 因为 Est1 是端粒酶核心酶的调控亚基, 并且首次发现端粒逐渐缩短会导致细胞衰老。

那么真正的端粒酶是如何被发现的呢? 一般的末端转移酶是随机的将核苷酸加到 DNA 3' 末端, 然而, 端粒酶却是有规则的增加 TTGGGG 这样的重复序列, 因此, 端粒酶需要特定的模板作为底物来合成该重复序列。1989 年, Greider 和 Blackburn 从端粒酶活性中纯化得到一种 RNA, 在基因组上找到了编码该 RNA 的基因, 并发现在编码区包含 CAACCCCAA

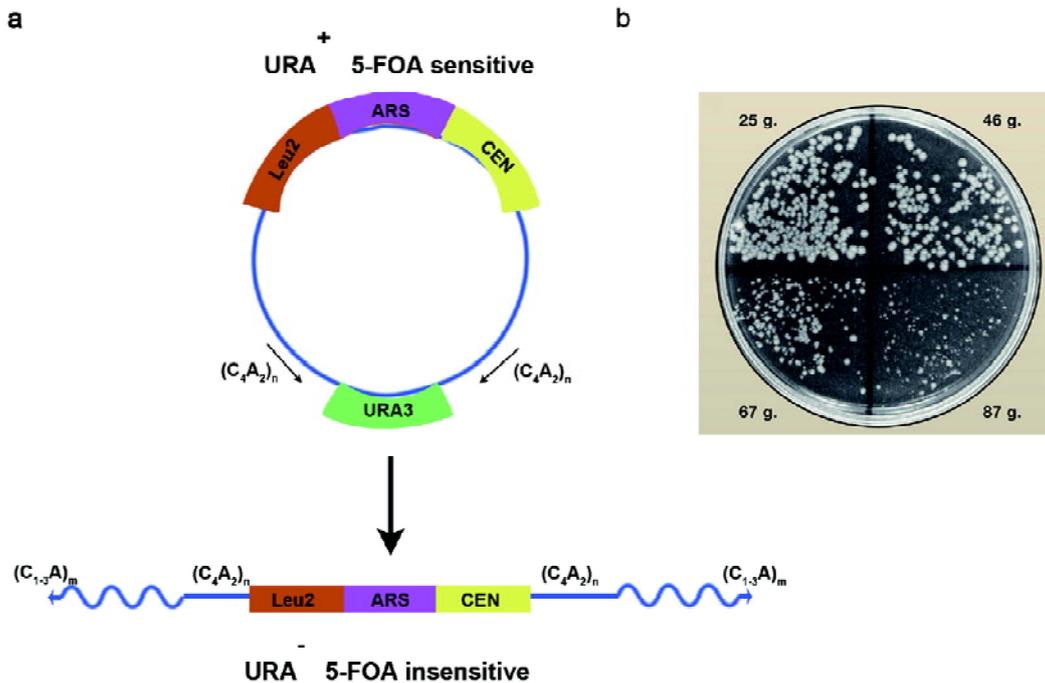


图2 Lundblad 和 Szostak 在酵母中筛选端粒合成缺失的突变<sup>[13]</sup>

a: 质粒解开(Plasmid resolution assay)实验原理 b: 铺板显示*est1-1* (“ever shortening telomeres”)酵母突变体导致细胞衰老, 传代次数如图中所标

的序列, 从而确定了该基因所转录的 RNA 就是端粒酶的模板<sup>[14]</sup>。其后, 各物种的 RNA 模板都被陆续发现报道。1997 年, Tom Cech 实验室的 Lingner 在 *Euplotes aediculatus* 以及酿酒酵母中发现了真正的端粒酶催化亚基<sup>[15]</sup>。同年, 该实验室还找到了裂殖酵母和人类的端粒酶<sup>[16]</sup>。端粒酶的 RNA 模板和催化亚基构成了端粒酶的核心酶。后期的研究中, 越来越多的端粒特异性结合蛋白被发现, 而端粒酶的活动是如何被其他因子调控的成为了研究的热点。同样, 细胞中的端粒结合蛋白如何保护染色体也成为了研究热点。洛克菲勒大学的 Titia de Lange 在哺乳动物的端粒和端粒酶的研究中做出了突出性的贡献, 进一步丰富了端粒和端粒酶领域。

#### 4 端粒的非端粒酶维持途径

前面提到在染色体末端复制问题提出以后, 人们提出了两种主要观点: 一种观点认为, 因为端粒 DNA 是简单重复序列, 所以可能利用同源重组复制端粒 DNA; 另一种观点就是聚合酶复制端粒 DNA。自从端粒酶被发现起, 人们似乎都认为端粒酶是延伸端粒的惟一途径。然而, 事实又一次证明符合逻辑的科学的假设往往会得到验证, 让人们感受到自然界的生命是多么神奇。1993 年, Lundblad 在 Blackburn

实验室进行博士后研究期间, 发现在酿酒酵母中, 缺失端粒酶的任何组分都会导致端粒逐渐缩短, 越来越多的细胞趋于衰老死亡, 但是仍有极少部分细胞 (小于  $1/10^6$ ) 却能够通过同源重组的方式存活下来。端粒酶缺失的某些细胞可以利用亚端粒区的序列扩增来维持端粒长度<sup>[17]</sup>。之后 Virginia A. Zakian 实验室又发现除了利用亚端粒序列以外, 酵母细胞还可以利用其他染色体的端粒序列进行同源重组延伸自身端粒<sup>[18]</sup>。这些研究证明端粒酶是端粒复制的主要机制, 但是在端粒酶缺失或者丧失活性的情况下, 还可以通过同源重组途径来进行。

在哺乳动物细胞中也存在着这种端粒酶非依赖性的端粒维持机制, 称之为替代的端粒延伸机制 (alternative lengthening of telomeres, ALT)<sup>[19, 20]</sup>。这类细胞表现为端粒很长, 并且不同染色体之间端粒长度的变异度很大。此外, 这类细胞一般都包含 APBs (ALT-associated promyelocytic leukaemia bodies) 结构和环形染色体外端粒 DNA (circular extrachromosomal telomeric DNA, telomeric t circle)。APBs 位于细胞核内, 包含有端粒 DNA、端粒结合蛋白以及很多同源重组相关的蛋白<sup>[21]</sup>, 因此该区域很有可能是细胞进行同源重组延伸端粒的场所。对于同源重组进

行的具体分子机制, 现在仍然不是很清楚, 很多研究者认为这种替代的端粒延伸机制是通过复制由同源修复(homology directed repair)产生的t circle, 或者利用姐妹染色体的端粒作为模板来延伸自身端粒。通过分析上百种癌细胞, 人们发现大约 10% 的癌细胞就是通过这种替代的端粒延伸机制来维持细胞的永生化的<sup>[22]</sup>, 甚至在某些哺乳动物细胞中也有端粒酶途径和同源重组途径共存的情况。

## 5 端粒的结构

**5.1 酿酒酵母的端粒结构** 在酿酒酵母中, 端粒包括染色体末端的 DNA 序列(即端粒 DNA) 以及它的结合蛋白(图 3a)。端粒 DNA 包含大约 350 bp 的非规则 TG1-3 重复序列组成的双链 DNA 以及 3' 端突出的富含 G 的单链 DNA 末端(3' overhang)<sup>[23-25]</sup>。端粒 DNA 的结合蛋白主要包括 Rap1 蛋白和 Cdc13 蛋白。其中 Rap1 蛋白特异性的结合端粒的双链 DNA 区域, 它通过结合 Rif1/2p 异源复合物<sup>[26, 27]</sup>, 对端粒长度起到负调控的作用: 当端粒延伸时, 结合在端粒上的 Rap1 蛋白就会增多, 从而发挥抑制端粒酶的作用, 维持端粒在恒定长度内, 这种机制称为“计算机制”(counting mechanism)<sup>[28]</sup>; 另一方面 Rap1p 还能够结合 Sir2/3/4p 复合物, 构成了染色体的异染质区域, 并对端粒临近基因的表达起到抑制作用, 称之

为端粒位置效应(telomere position effect)<sup>[29-31]</sup>。Cdc13p 蛋白则结合端粒的单链 DNA 区域, 它能阻止外切酶进攻端粒, 从而保护端粒末端。除此之外, Cdc13p 还担负着对端粒酶的正调控以及负调控功能。Cdc13p 的正调控功能主要通过它能够和端粒酶的调控亚基 Est1p 结合从而招募端粒酶延伸端粒, 而它的负调控功能在于它又能够和端粒特异性蛋白 Ten1p、Stn1p 结合形成异源三聚体从而抑制端粒酶<sup>[32, 33]</sup>。在 DNA 双链区域和单链区域之间还有 Ku70/Ku80 复合物结合, Ku 复合物通过和端粒酶 Tlc1 结合从而在细胞周期的 G<sub>1</sub> 期招募端粒酶, 同时也保护端粒末端不受外切酶的剪切<sup>[34-37]</sup>。最新的研究发现端粒 DNA 还能被转录出一种端粒 RNA, 称为 TERRA。初步的实验显示 TERRA 对于端粒长度起到负调控的作用<sup>[38]</sup>。

酿酒酵母端粒酶全酶包括催化亚基 Est2p、RNA 模板 Tlc1 以及调控亚基 Est1p 和 Est3p。Est2p 和 Tlc1 组成端粒酶的核心酶, 在体外就可以发挥延伸增加端粒核苷酸(nucleotide addition)的功能<sup>[15, 39-42]</sup>。然而在体内, Est1p 和 Est3p 对于端粒酶的功能也是必不可少的, 任何一个组分的缺失都会导致端粒缩短, 细胞衰老。端粒酶在 G<sub>1</sub> 期被 Ku 复合物招募到端粒, 在 S 期则被 Est1p、Cdc13p 和 Tlc1 组成的复合物所

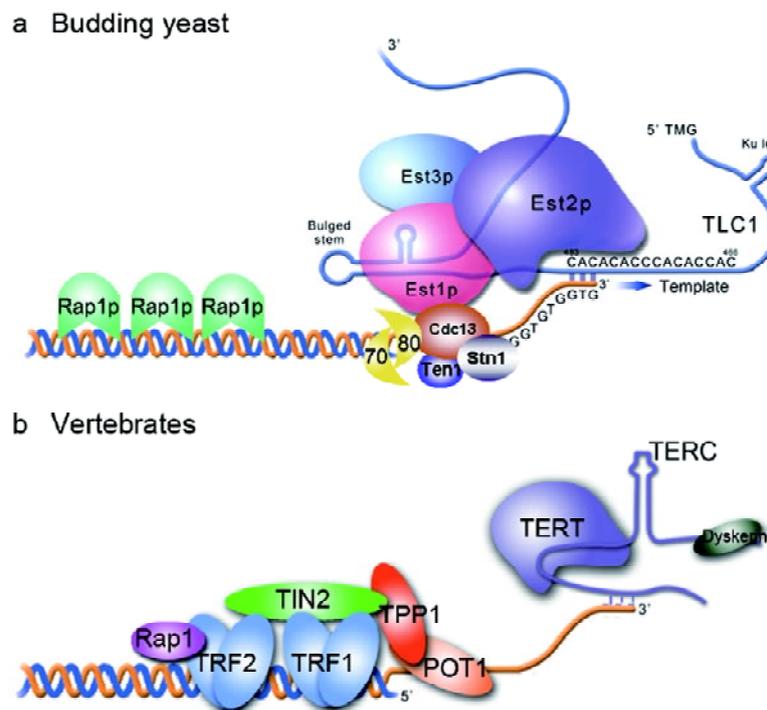


图3 酿酒酵母(Budding yeast)和哺乳动物(Vertebrates)中端粒结构

招募<sup>[43]</sup>。虽然端粒酶在G<sub>1</sub>期和S期都可以被招募到端粒上, 然而只有在S期端粒才能延伸, 这就意味着除了招募以外, 端粒酶还需被激活才能发挥功能<sup>[44, 45]</sup>。

**5.2 哺乳动物的端粒结构** 哺乳动物的端粒同样包括端粒DNA以及它的结合蛋白(图3b)。哺乳动物的端粒DNA为TTAGGG的规则重复序列构成的双链DNA以及一段50—500 nt富含G的单链DNA作为末端, 但是端粒末端的结构并非简单的单双链结构, 电子显微镜实验表明在人类和老鼠的端粒末端形成一种非常大的双链套索样结构, 称之为t-loop<sup>[46]</sup>。t-loop的存在可以很好的保护端粒末端单链DNA, 能防止外切酶的进攻, 并且发现和端粒的同源重组途径也有一定联系<sup>[47]</sup>。3'末端的富含G的单链DNA会入侵亚端粒的双链DNA区域, 与C链配对从而形成一种类似于字母D的结构, 称为D-loop。这种结构在锥虫、纤毛虫、植物以及果蝇中都有发现。同时, 各个物种中的端粒DNA长短不同, 人类在出生的时候端粒有10—15 kb, 而实验小鼠和大鼠的端粒长度达20—50 kb。最新的研究还发现端粒的长度在一个家系中变化也很大, 这意味着端粒的长度进化很快<sup>[47]</sup>。

哺乳动物细胞中端粒DNA的结合蛋白是由六个蛋白组成的端粒特异性复合体, 这个复合体被称之为Shelterin(又称为telosome), 包括端粒重复序列结合蛋白1(telomere repeat binding factor1, TRF1)、端粒重复序列结合蛋白2(telomere repeat binding factor2, TRF2)、Rap1、TIN2、TPP1和端粒保护蛋白1(protection of telomeres 1, POT1)六个蛋白。这些Shelterin组分特异性的结合在端粒上, 并且在细胞周期的各个阶段都有表达。Shelterin的端粒特异性功能主要归功于TRF1和TRF2对端粒序列TTAGGG双链DNA的特异性结合。除此之外, TRF2还能促进t-loop的形成<sup>[48]</sup>; Rap1通过和TRF2相互作用而结合在端粒上; 而TIN2在很大程度上发挥了一种桥连作用, 同时和TRF1、TRF2以及TPP1相互作用; 端粒的单链DNA由Shelterin的另一组分POT1结合; TPP1同时与TIN2以及POT1相互作用连接起Shelterin在单链DNA和双链DNA结合的蛋白复合物, 从而形成一个庞大的六元复合体结合端粒末端。Shelterin的存在使得细胞得以区分端粒末端和普通的DNA双链断裂(DNA double strand break, DSB), 从而抑制DNA损伤修复蛋白, 同时调控端粒的端粒酶延伸途径。Shelterin的稳定对于端粒的维持有着至关重要的作用, 它可以抑制DNA末端激

活DNA损伤信号通路, 同时还可以防止染色体末端异常融合。TRF2敲除的小鼠是致死的, 因为TRF2的缺失会导致整个Shelterin结构的瓦解, 从而导致染色体末端裸露, 激活DNA损伤的ATM信号通路, 从而使得细胞滞留在G<sub>2</sub>/M期, 不能进一步分裂<sup>[49]</sup>。POT1在端粒上的定位在TPP1存在的情况下可以得到进一步加强, 该二元复合物结合在端粒上可以抑制ATR信号通路的激活, 由此可见, Shelterin对于端粒结构的维持有着非常重要的作用。

在哺乳动物中, 大部分的细胞通过端粒酶途径来缓和端粒的磨损。哺乳动物的端粒酶复合物主要有反转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和RNA模板(telomerase RNA component, TERC)组成。除此之外另外四个蛋白GAR1、NHP2、NOP10和dyskerin组成核仁核糖蛋白复合物结合端粒酶, 这些蛋白的缺失会导致端粒酶失活。与酿酒酵母中类似, 随着端粒序列的延伸, 结合在端粒末端的Shelterin会越来越多, 因此也存在counting机制来维持端粒的长度。实验显示Shelterin的组分对于端粒的长度都有负调控作用。POT1通过与端粒酶竞争3'端单链DNA从而抑制端粒酶的活性<sup>[50]</sup>; TPP1通过增加POT1在端粒末端的结合来加剧这种抑制效应<sup>[51]</sup>。因此, POT1发挥着末端传感器的功能, 将TRF1的抑制作用传递到最末端。

## 6 端粒与衰老

在单细胞生物(如酿酒酵母)中, 由于总是有端粒酶活性, 细胞可以维持端粒在相对恒定长度。然而, 在大部分多细胞真核生物中, 胚胎细胞有较高的端粒酶活性, 但是大多数成体细胞中端粒酶的活性较低或缺失, 只有在卵巢、睾丸等高分化的组织中才能检测到明显的端粒酶活性<sup>[52]</sup>。因此, 随着每次细胞分裂端粒DNA会缩短50—200 bp。当端粒DNA缩短到一定长度时, 细胞虽然活着, 但会停止分裂。这种不可逆的生长停滞被称为细胞的复制性衰老(replicative senescence), 但失活细胞的抑癌通路可以使得细胞逃离这种复制性衰老, 细胞可以继续分裂, 端粒则继续缩短, 直到细胞到达第二个分裂阻滞阶段(crisis stage)。此时, 由于端粒异常短致使细胞死亡。此外, 一些DNA的损伤也会导致核酸外切酶进攻端粒末端, 从而加速了端粒的缩短。在人类的体细胞中发现, 随着年龄的不断增长, 端粒长度的损耗会不断加剧。因此, 端粒的缩短被认为是一种较好的用来解释正常细胞生长限制性的模型, 但是至于短端粒如何引发机体衰老的

机制仍然不是很清楚：一种可能性就是端粒缩短引发细胞周期的滞留以及细胞凋亡，从而减少细胞数目，引起组织异常；另一种可能就是端粒的缩短会破坏干细胞对于组织的再生，从而引发器官障碍。

有很多与年老相关的疾病以及早衰综合征都与端粒的加快缩短相关，因此端粒的缩短也被认为可能是机体衰老的原因之一。支持该观点最好的证据就是端粒酶 RNA *Terc* 敲除的小鼠模型。*Terc* 缺失的小鼠表现出端粒缩短的加快，寿命减短，并且这种寿命的减短会随着小鼠的传代增多而加剧<sup>[53]</sup>。相反，Wright 实验室通过在端粒酶阴性细胞色素上皮细胞以及人包皮成纤维细胞中表达端粒酶，发现端粒延伸，细胞凋亡减少，寿命显著延长<sup>[54, 55]</sup>。

除此之外，端粒酶基因的突变体还会引起很多人类的一些综合征，包括先天性角化不良(*dyskeratosis congenita*)、再生障碍性贫血(*aplastic anemia*)、先天性肺纤维症(*idiopathic pulmonary fibrosis*)等。先天性角化不良主要是因为有些基因的突变影响了端粒酶或者端粒酶相互作用蛋白，从而使得端粒酶的稳定性下降，端粒缩短<sup>[56, 57]</sup>。而被诊断为再生障碍性贫血的患者被发现由于 *Tert* 或者 *Terc* 的突变，从而导致端粒缩短，呈现早衰现象<sup>[58, 59]</sup>。先天性肺纤维化的典型特征是肺的结疤，从而导致呼吸衰竭，该病例中也发现了端粒酶的异常现象<sup>[60, 61]</sup>。另外，在衰老过程中，端粒缩短的速率和性别、社会经济地位、压力、吸烟习惯以及肥胖程度等都有一定的关系<sup>[62-65]</sup>，但端粒酶的缺失只是引起细胞衰老的原因之一。换言之，除了端粒酶途径之外，还有很多途径会导致细胞衰老<sup>[66]</sup>。

## 7 端粒与癌症

对于正常细胞来说，当进行了一定次数的分裂后，端粒缩短到一定程度便会引起衰老。正如前文所提到的，在人类成体细胞中端粒酶活性受到严格调控，大部分成体细胞缺失端粒酶活性，因此，端粒逐渐缩短成为一种必然趋势。当端粒缩短到一定程度就不能承担保护染色体的责任，细胞进入衰老凋亡。

为了逃避这种死亡，癌细胞必须重新获取一种机制来维持端粒长度。在大多数情况下，细胞选择端粒酶重新表达，从而构成细胞的永生性，因此对于大部分体细胞来说，端粒酶的重新激活都是成为癌细胞的标志。当然也有例外，对于某些类型的人源细胞来说，重新表达端粒酶使得细胞一直保持分裂活性，但是又不会形成肿瘤<sup>[67]</sup>。

那细胞是怎样重新表达端粒酶活性的呢？这是人们一直想解决的问题。体内和体外实验都表明，在大多数情况下细胞通过扩增 hTERT 在基因组上的位置，复制或者转移该位置来实现端粒酶的重新激活。除此之外，hTERT 基因的启动子是很多抑癌基因(*oncogene*, 如 *c-myc*)、肿瘤抑制因子(*tumor suppressor*, 如 p53)或者转录因子(*transcriptional factors*, 如 USF1)等的靶位点。除了通过重新激活端粒酶，少部分细胞还可以激活端粒替代机制(ALT)来维持端粒，尤其在一些神经上皮细胞原性或者间质细胞原性的细胞中<sup>[68]</sup>。在 ALT 细胞中，染色体的紊乱仍然会存在，有时还会一直保持很短的端粒。大约 90% 以上的癌细胞都是通过端粒酶途径来维持端粒长度，只有 10% 的细胞通过这种替代途径维持端粒。

由于在大约 85% 的肿瘤细胞中，TRAP(*telomeric repeat amplification protocol*)检测到端粒酶的活性有明显提高，因此目前癌症的治疗主要把目光放在端粒酶上。遗传学证据显示通过显性失活内源端粒酶组分(hTR 或者 hTERT)可以抑制端粒的延伸，从而使得肿瘤细胞的端粒逐渐缩短，抑制癌细胞的增殖<sup>[69]</sup>。因此，设计一些发挥显性失活端粒酶组分的小分子为癌症治疗提供了一种可能性。

在前列腺癌细胞中，失活端粒酶组分或者结合蛋白会加快细胞的凋亡和衰老。例如用反义(*antisense*)寡核苷酸抑制 hTERT 会很快引起细胞生长停滞，激活凋亡，却并不影响端粒缩短<sup>[70]</sup>。另外，在人癌细胞中引入突变体端粒酶模板使得端粒酶末端保护丧失从而激活 DNA 损伤信号通路，引起癌细胞凋亡<sup>[71]</sup>。除了影响端粒酶组分外，端粒结合蛋白的丧失或者端粒 3' 单链 DNA 的失调也会引起细胞凋亡或者衰老。端粒 DNA 包括富含 G 的单链 DNA，体内体外实验发现该单链 DNA 可以形成 G4 链高级结构，并且该结构的形成对于端粒酶有抑制作用<sup>[72-74]</sup>。实验发现很多小的配体(*ligand*)对于该结构有稳定作用，因此这些化合物可以通过促进 G4 的稳定性从而发挥抑制端粒酶的效果，在癌症治疗上有一定的前景。但是 G4 结构对与端粒酶的作用大多在体外研究，尚需要更多的实验数据支持。而且最新研究发现在酿酒酵母中，该结构对于端粒酶的复制有正调控作用<sup>[75]</sup>，因此 G4 结构配体的应用仍值得商榷。

通过抑制端粒酶的活性来阻止癌细胞的生长一直是人们治疗癌症的一个策略。在体外细胞系和模型动物上已获得较好的实验结果<sup>[76-78]</sup>，临床试验也

在进行中<sup>[79-82]</sup>, 但这种针对端粒酶的药物何时上市还不能确定, 有可能还需等待很长时间。

## 8 端粒与干细胞

干细胞(stem cell)和诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cell)的最大的特点是自我更新(self-renewal)。自我更新是指干细胞通过均等分裂或者不均等分裂得到一个或者两个子干细胞的能力, 该能力对于在发育过程中扩增干细胞的细胞数目以及在受损伤时修复干细胞库都是必需的。

在衰老过程中, 组织器官的自我更新能力(regenerative capacity)不断下降, 而癌症发生的几率却逐渐增加, 这些过程是由于干细胞功能的下调而导致的。在高等动物, 比如人类中, 自我更新能力的维持和肿瘤的抑制处于一种平衡状态。调节这种平衡状态的一种机制就是端粒长度。

干细胞要维持自身的自我更新能力, 就必须维持端粒的长度或者减慢端粒缩短的速度。在小鼠中发现端粒酶缺失的造血干细胞在不断移植过程中比野生型造血干细胞提早衰竭, 从而证明端粒酶对于造血干细胞的自我更新潜能有着维持作用<sup>[83]</sup>。在成体神经干细胞的研究中也发现, 端粒酶的缺失会降低增殖能力, 增加基因组的不稳定性<sup>[84]</sup>。由此可见, 端粒酶对于干细胞自我更新能力的重要性。

成体干细胞进行分裂的频率相对较低, 因此复制潜能仍会受到端粒长度的限制; 研究得最广泛的造血干细胞(haematopoietic stem cell)能够表达端粒酶, 但是却不足以维持端粒长度, 因此虽然相对体细胞端粒缩短的速度较慢, 但最终随着衰老增殖潜能仍会不断下降。然而, 当受到T细胞或者B细胞的免疫刺激时, 端粒酶表达会上调, 从而维持端粒长度。精原干细胞(spermatogonial stem cell)能表达很高的端粒酶活性。因此, 后代一直能维持端粒长度, 这是在衰老过程中惟一可以延伸端粒的干细胞<sup>[85]</sup>。

## 9 展望

自从端粒酶发现以来, 深入和广泛的端粒、端粒酶研究使人们更好地理解DNA复制以及染色体末端是如何被保护的; 但是, 端粒酶活性调控和端粒蛋白保护端粒的很多精细的生物化学、细胞生物学过程仍然不明了。由于端粒与细胞衰老、癌症及干细胞等基本生物学问题相关, 对端粒进一步的研究还将会给人们带来意外的惊喜。

## [参 考 文 献]

[1] McClintock B. The stability of broken ends of chromo-

- somes in zea mays. *Genetics*, 1941, 26: 234-82
- [2] Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 1975, 94: 441-8
- [3] Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extra chromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol*, 1978, 120: 33-53
- [4] Szostak JW, Blackburn EH. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell*, 1982, 29: 245-55
- [5] Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature*, 1984, 310: 154-7
- [6] Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953, 171: 737-8
- [7] Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Harvey Lect*, 1957, 53: 83-112
- [8] Sugino A, Hirose S, Okazaki R. RNA-linked nascent DNA fragments in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 1863-7
- [9] Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol*, 1972, 239: 197-201
- [10] Cavalier-Smith T. Palindromic base sequences and replication of eukaryote chromosome ends. *Nature*, 1974, 250: 467-70
- [11] Bateman AJ. Simplification of palindromic telomere theory. *Nature*, 1975, 253: 379-80
- [12] Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 1985, 43: 405-13
- [13] Lundblad V, Szostak JW. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell*, 1989, 57: 633-43
- [14] Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 1989, 337: 331-7
- [15] Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 1997, 276: 561-7
- [16] Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 1997, 277: 955-9
- [17] Lundblad V, Blackburn EH. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell*, 1993, 73: 347-60
- [18] Teng SC, Chang J, McCowan B, et al. Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol Cell*, 2000, 6: 947-52
- [19] Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, et al. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J*, 1994, 13: 4953-62
- [20] Bryan TM, Englezou A, Gupta J, et al. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, 1995, 14: 4240-8
- [21] Hodges M, Tissot C, Howe K, et al. Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet*, 1998, 63: 297-304

- [22] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266: 2011–5
- [23] Henderson E, Hardin CC, Walk SK, et al. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine–guanine base pairs. *Cell*, 1987, 51: 899–908
- [24] Shampay J, Blackburn EH. Generation of telomere-length heterogeneity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 534–8
- [25] Klobutcher LA, Swanton MT, Donini P, et al. All genotyped DNA molecules in four species of hypotrachs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 3015–9
- [26] Conrad MN, Wright JH, Wolf AJ, et al. RAP1 protein interacts with yeast telomeres *in vivo*: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell*, 1990, 63: 739–50
- [27] Bourns BD, Alexander MK, Smith AM, et al. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 1998, 18: 5600–8
- [28] Levy DL, Blackburn EH. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 10857–67
- [29] Hardy CF, Sussel L, Shore D. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev*, 1992, 6: 801–14
- [30] Lustig AJ, Kurtz S, Shore D. Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science*, 1990, 250: 549–53
- [31] Palladino F, Laroche T, Gilson E, et al. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell*, 1993, 75: 543–55
- [32] Lin JJ, Zakian VA. The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TGI-3 telomeric DNA-binding protein *in vitro* that affects telomere behavior *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13760–5
- [33] Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, et al. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, 1996, 274: 249–52
- [34] Porter SE, Greenwell PW, Ritchie KB, et al. The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 582–5
- [35] Tsukamoto Y, Kato J, Ikeda H. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 1997, 388: 900–3
- [36] Gravel S, Larrivee M, Labrecque P, et al. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science*, 1998, 280: 741–4
- [37] Mishra K, Shore D. Yeast Ku protein plays a direct role in telomeric silencing and counteracts inhibition by rif proteins. *Curr Biol*, 1999, 9: 1123–6
- [38] Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriant L, et al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, 2007, 318: 798–801
- [39] Lingner J, Cech TR, Hughes TR, et al. Three ever shorter telomere (EST) genes are dispensable for *in vitro* yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 11190–5
- [40] Steiner BR, Hidaka K, Futcher B. Association of the Est1 protein with telomerase activity in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 2817–21
- [41] Hughes TR, Evans SK, Weilbaecher RG, et al. The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol*, 2000, 10: 809–12
- [42] Singer MS, Gottschling DE. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, 1994, 266: 404–9
- [43] Chan A, Boule JB, Zakian VA. Two pathways recruit telomerase to *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *PLoS Genet*, 2008, 4: e1000236
- [44] Taggart AK, Teng SC, Zakian VA. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science*, 2002, 297: 1023–6
- [45] Evans SK, Lundblad V. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science*, 1999, 286: 117–20
- [46] Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 1999, 97: 503–14
- [47] Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*, 2008, 42: 301–34
- [48] Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly *in vitro* involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J*, 2001, 20: 5532–40
- [49] Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, 2007, 448: 1068–71
- [50] Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, 2003, 423: 1013–8
- [51] Wang F, Podell ER, Zaug AJ, et al. The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, 2007, 445: 506–10
- [52] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 1990, 345: 458–60
- [53] Blasco MA, Lee HW, Hande MP, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 1997, 91: 25–34
- [54] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkiss M, et al. Extension of lifespan by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998, 279: 349–52
- [55] Steinert S, Shay JW, Wright WE. Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273: 1095–8
- [56] Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 1999, 402: 551–5
- [57] Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*, 2001, 413: 432–5
- [58] Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*, 2005, 352: 1413–24
- [59] Marrone A, Stevens D, Vulliamy T, et al. Heterozygous

- telomerase RNA mutations found in dyskeratosis congenita and aplastic anemia reduce telomerase activity via haploinsufficiency. *Blood*, 2004, 104: 3936-42
- [60] Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 7552-7
- [61] Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, 2007, 356: 1317-26
- [62] Cherkas LF, Aviv A, Valdes AM, et al. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell*, 2006, 5: 361-5
- [63] Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, et al. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*, 2005, 366: 662-4
- [64] Canela A, Vera E, Klatt P, et al. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 5300-5
- [65] Epel ES, Blackburn EH, Lin J, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 17312-5
- [66] Vijg J, Suh Y. Genetics of longevity and aging. *Annu Rev Med*, 2005, 56: 193-212
- [67] Masutomi K, Yu EY, Khurts S, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, 2003, 114: 241-53
- [68] Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, et al. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*, 2000, 26: 447-50
- [69] Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 4960-3
- [70] Folini M, Brambilla C, Villa R, et al. Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells. *Eur J Cancer*, 2005, 41: 624-34
- [71] Kim MM, Rivera MA, Botchkina IL, et al. A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 7982-7
- [72] Jin RZ, Breslauer KJ, Jones RA, et al. Tetraplex formation of a guanine-containing nonameric DNA fragment. *Science*, 1990, 250: 543-6
- [73] Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, et al. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature*, 1991, 350: 718-20
- [74] Paeschke K, Simonsson T, Postberg J, et al. Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 847-54
- [75] Zhang ML, Tong XJ, Fu XH, et al. Yeast telomerase subunit Est1p has guanine-quadruplex promoting activity that is required for telomere elongation. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, inpress
- [76] Nosrati M, Li S, Bagheri S, et al. Antitumor activity of systemically delivered ribozymes targeting murine telomerase RNA. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 4983-90
- [77] Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J*, 2001, 20: 6958-68
- [78] Pascolo E, Wenz C, Lingner J, et al. Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *J Biol Chem*, 2002, 277: 15566-72
- [79] Djojotubroto MW, Chin AC, Go N, et al. Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology*, 2005, 42: 1127-36
- [80] Herbert BS, Gellert GC, Hochreiter A, et al. Lipid modification of GRN163, an N3' → P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene*, 2005, 24: 5262-8
- [81] Akiyama M, Hideshima T, Shamma MA, et al. Effects of oligonucleotide N3' → P5' thio-phosphoramidate (GRN163) targeting telomerase RNA in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*, 2003, 63: 6187-94
- [82] Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Res*, 2003, 63: 3931-9
- [83] Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, et al. Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood*, 2003, 102: 517-20
- [84] Ferron S, Mira H, Franco S, et al. Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells. *Development*, 2004, 131: 4059-70
- [85] Allen ND, Baird DM. Telomere length maintenance in stem cell populations. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792: 324-8