

DOI: 10.13376/j.cbbs/2014169

文章编号: 1004-0374(2014)11-1194-06



王 峰 教授

王峰, 天津医科大学基础医学院教授, 长期致力于端粒衰老生物学研究。王峰教授发现了体内首个端粒酶正调控因子 hnRNPA2*, 发现该因子能够将端粒酶招募到染色体末端, 进而增强端粒酶对端粒的延伸。其团队基于此提出下调 hnRNPA2* 以抑制端粒酶活性的新癌症治疗方案。另外, 王峰教授首次鉴定并研究了端粒结合复合体 CST 在端粒复制过程中的关键作用, 为临床案例中 CST 复合体突变导致多种早衰性疾病的诊断提供了重要理论依据。相关工作在 *PNAS*、*EMBO J* 以及 *Cell Reports* 等杂志发表。实验室的主要研究方向包括: (1) 端粒 DNA 复制的分子机制; (2) 端粒 DNA 高级结构形成对复制性衰老的影响; (3) 端粒长度缩短对智力发育以及认知水平的影响及机制研究。

人细胞端粒DNA复制与长度维持

景亚青¹, 赵 勇^{2*}, 王 峰^{1*}

(1 天津医科大学基础医学院, 天津 300070; 2 中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 端粒位于染色体末端, 由短的串联重复 DNA 片段及其结合蛋白组成。端粒在维持基因组稳定性及染色体结构完整性方面发挥着重要作用。端粒 DNA 由富含 G/C 的序列构成, 包括双链区及 G 含量高的 3' 悬垂单链区 (G-overhang, G-tail)。端粒 DNA 能够形成 G 四联体 (G-quadruplex) 和 T 环 (T-loop) 等高级结构。许多与 DNA 损伤修复相关的蛋白质参与端粒 DNA 的复制与端粒结构的维持, 并相对于基因组的其他区域, 端粒的 DNA 复制较为特别, 从广义上讲, 端粒 DNA 的复制可以包括双链复制 (telomere replication), 端粒酶复制延伸 (telomerase extension) 和 C 链补齐 (C-rich fill-in)。端粒双链复制引起的端粒长度缩短是导致人体细胞衰老的重要原因, 而端粒酶复制延伸及 C 链补齐是干细胞及肿瘤细胞维持其端粒长度及持续分裂能力的主要途径。端粒复制及其结构功能研究是生物医学领域的一个重要热点, 阐释端粒复制的机理将为疾病预防及治疗等提供新的思路。

关键词: 端粒; 端粒酶; 端粒 DNA 复制; C 链补齐

中图分类号: Q523; Q291

文献标志码: A

Human telomere replication and length maintenance

JING Ya-Qing¹, ZHAO Yong^{2*}, WANG Feng^{1*}

(1 Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

2 School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Telomeres are special nucleoprotein complex composed of repetitive sequence. Telomeres play important roles in chromosome integrality and genome stability. Telomeric DNA is usually G/C rich, and contains the double-stranded region and G-rich single-stranded region with a 3'-tail. In addition, telomere DNA can form G-quadruplex and T-loop structures. The replication of telomeric DNA is different from that of other genomic loci. In general, replication of telomere has three steps, including double-strand telomere DNA replication, telomerase extension and

收稿日期: 2014-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471293)

*通信作者: E-mail: zhaoy82@mail.sysu.edu.cn (赵勇); feng-w@hotmail.com (王峰)

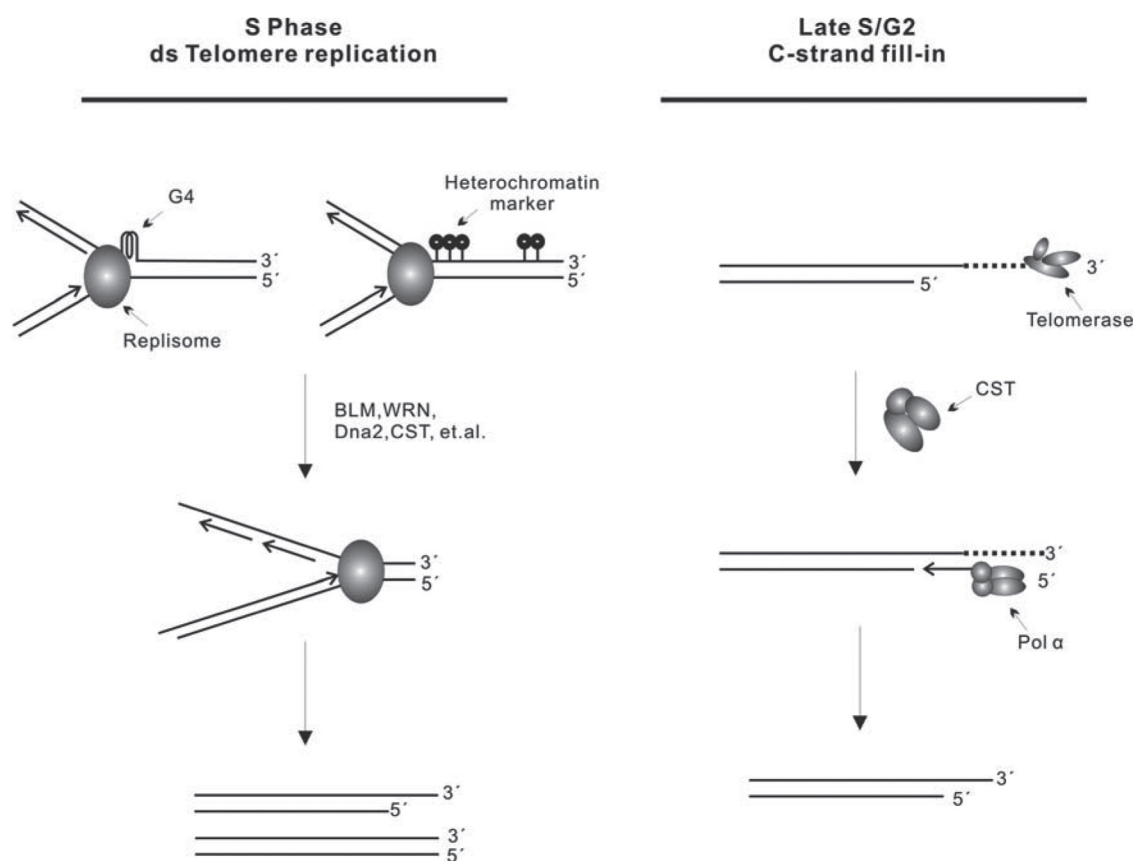
C-rich fill-in. While telomere DNA replication leads to progressive telomere shortening due to “End Replication Problem”, telomerase elongation and C-rich fill-in extend telomere, thus maintaining telomere length homeostasis in most human cancer cells and stem cells. Telomere replication is a hot spot in telomere biology, and the findings in this field will provide a new clue for disease prevention and treatment.

Key words: telomere; telomerase; DNA replication; C-rich fill-in

端粒位于真核生物染色体的末端^[1], 由富含 G/C 的串联重复的双链 DNA 及结合于其上的蛋白质组成。在脊椎动物细胞中, 端粒 DNA 由重复序列 (TTAGGG)_n 组成^[2], 其长度在不同物种间存在明显差异, 人类端粒 DNA 长 2~15 kb, 大鼠为 20~100 kb, 小鼠为 100~150 kb。端粒在维持基因组稳定性以及染色体完整性中发挥了相当重要的作用^[3]。在人类正常体细胞中, 端粒长度随着细胞的分裂而缩短, 当端粒短于特定的长度时, 染色体变得不稳定, 容易发生融合、畸变, 最终引起细胞的衰老和凋亡^[4]。端粒长度与人类自身免疫性疾病、

炎症、细胞分化、组织再生以及恶性肿瘤的发生等过程密切相关。人类端粒功能的行使还需要众多蛋白质的参与, 其核心部分是被称为 “Shelterin” 的复合体, 包括 TRF1、TRF2、RAP1、TIN2、TPP1 和 POT1 等 6 种端粒蛋白^[5-7]。该复合体可以有效保护端粒 DNA, 阻止染色体末端被识别为双链 DNA 损伤, 并抑制 DNA 损伤修复应答通路的激活。Shelterin 蛋白的突变与众多遗传性疾病密切相关。

广义上的端粒 DNA 的复制包含 3 个步骤 (图 1): (1) 端粒双链 DNA 从亚端粒区起始以半保留形式进行复制; (2) 当双链复制完成之后, 端粒酶会



(1) 端粒双链的复制主要发生在细胞周期的S期, 而端粒区DNA能够形成高级结构G4, 其异染色质化程度较高, 因此, 端粒DNA复制相对于基因组其他位置更为复杂, 极可能产生复制叉的停滞。因此, 为保证端粒DNA准确、高效的复制, 其需要更多额外的辅助因子, 如BLM、WRN、Dna2以及CST等等。(2) 双链复制完成后, 端粒酶会对端粒进行延伸, 形成较长的3'端悬垂。(3) 接下来, CST和DNA聚合酶α共同参与, 对端粒酶延伸的悬垂进行补齐, 并最终形成闭合状态的端粒末端。

图1 端粒DNA的复制过程

被招募到染色体末端对端粒进行延伸,并形成一条较长的 G-rich 的 3' 悬垂 (G-overhang); (3) 当细胞进入 G2/S 晚期时,细胞内启动 C-链补齐 (C-rich fill-in) 机制,对端粒酶延伸形成的悬垂进行补齐。当整个 DNA 复制完成之后,3' 末端的端粒悬垂会插入到端粒 DNA 的双链区形成一种类似套马索的 T 环 (T-loop) 结构,进而抑制端粒 DNA 的水解和非正常的端粒融合,从而实现对染色体的保护^[8]。本文将详细探讨端粒 DNA 复制过程及其分子基础。

1 半保留复制引起端粒缩短

端粒复制所引起的 DNA 丢失是引起端粒缩短的重要原因。细胞在分裂过程中染色体 DNA 需要进行复制,以保证遗传物质平均分给两个子细胞。端粒 DNA 的复制发生在整个 S 期,采用传统的半保留复制的方式进行。由于 DNA 聚合酶只能从 5'→3' 的方向进行合成, DNA 复制分为先导链 (leading strand) 和后随链合成。先导链以 5'→3' 的方向一直合成到端粒的末端,而后随链则以冈崎片段的方式一段一段地合成,然后通过连接酶形成完整的 DNA 链。对于端粒 DNA 来说,富含 G 的链 (G-rich strand) 以后随链的方式合成,新合成的是富含 C 的链。由于冈崎片段合成需要短的 RNA 作为引物, RNA 引物结合的位置决定了冈崎片段起始的位置。对于端粒 DNA 复制来说,最后一个冈崎片段的 RNA 引物不可能总是落到端粒 DNA 最末端,所以会有一段 DNA 不能被复制,产生了 3' 的富含 G 的尾巴 (G-overhang), 这就是线性 DNA 的末端复制问题^[9]。因此,新合成的染色体末端 (端粒) 会比母细胞端粒短一些。而先导链的合成能够进行到 DNA 的最末端,所以不会产生 DNA 的丢失。然而,最新的研究表明,先导链在完成复制后,由 DNA 外切酶从 5'→3' 的方向切除一部分 C 链 DNA,从而形成 G-overhang, 此过程可能涉及多种核酸酶和解旋酶,对该加工过程的研究仍处于探索阶段。由于这些原因,端粒 DNA 每复制一次,就缩短一些。对正常细胞而言,随着细胞的分裂和增殖,端粒长度不断变短。人类细胞每分裂一次,端粒丢失 50~200 个碱基^[10]。当端粒缩短到临界长度时,细胞将失去分裂能力,停止增殖,表现为细胞复制性衰老 (replicative senescence)^[11]。

2 端粒双链复制

端粒 DNA 与基因的大部分 DNA 不同,其序

列具有很高的重复性并且富含鸟嘌呤,复制又在端粒区运行时更为困难。造成端粒复制困难的原因主要有以下 3 个方面:第一,单链的端粒 DNA, -TTAGGG-, 较易形成热稳定性很高的 G 四聚体结 (G-quadruplex, G4)^[12]。该结构中相邻的两个鸟嘌呤通过 G•G Hoogsteen 氢键配对形成平面结构 G 四方形,再由一组或几组 G 四方形平面之间的碱基堆积形成更高级的四重折叠结构^[13]。而当 DNA 进行复制时,双链端粒需要打开并形成短暂的单链状态,这为 G4 结构的形成创造了条件。体外研究证实,形成 G4 的 DNA 链将无法作为复制的模板,并可能导致 DNA 复制又在此处停滞^[14]。为推动受阻复制叉的移动并顺利完成端粒 DNA 的复制, G4 结构需要被打开,多种蛋白因子共同参与 G 四聚体的解旋^[15]。在此过程中,解旋酶 BLM、WRN 以及 Pif1^[16-18] 可能发挥了极为重要的作用。在没有端粒结合蛋白 TRF1 存在的情况下,端粒复制受阻,表现为复制速度变慢、复制叉停滞等,提示 TRF1 参与端粒 DNA 复制,但具体的功能需要进一步的研究^[19]。另外, RPA、Shelterin 复合体中 POT1 以及核糖体蛋白 hnRNPA2* 都是重要的单链结合蛋白^[20], 它们能主动地打开 G4,从而有利于端粒 DNA 复制的顺利进行。

第二,端粒 DNA 的高度异染色质化状态也会造成复制叉移动的受阻^[21]。端粒区、亚端粒区的染色质包装成紧密、处于固缩的异染色质状态,表现为亚端粒区 DNA 的高度甲基化、端粒及亚端粒区组蛋白 H3k9 及 H4 的乙酰化水平降低以及 H3、H4 的甲基化水平增加等。同时,与异染色质相关的蛋白质,如 HP1 等在端粒区富集^[22]。异染色质区的基因转录活性下降,其 DNA 复制也比常染色质区 DNA 复制要慢,需要额外的辅助因子才能顺利完成正常复制^[23]。

第三, T 环 (T-loop) 结构的形成也会加剧端粒复制的困难程度^[24]。T 环是由端粒单链的 G-overhang 插入到端粒双链区所形成的高级结构。Shelterin 蛋白参与 T 环的形成并与之形成稳定的复合体,起到稳定的作用。虽然 T 环可以有效保护端粒 DNA,但也给端粒 DNA 的复制增添了障碍。在 DNA 复制时, T 环需要被打开,而当复制完成之后, T 环需要重新形成。控制 T 环形成及打开的机制目前还不清楚,但 Doksan 等^[25] 研究表明,端粒结合蛋白 TRF2 可能在其中起着重要作用。

基于以上原因,端粒较基因组其他位置更易产

生复制性损伤。为了解决这些问题, 细胞激活DNA损伤修复途径, 帮助端粒完成复制。例如在S期, ATM、MRE11、RAD51等与DNA同源重组相关的蛋白质在端粒DNA上富集。另外, 与DNA复制修复相关的蛋白质, 如Pol- β 、RAD17、FEN1、PCNA等也特异性地在S期富集到端粒DNA上。虽然它们在端粒复制中所起的作用还需要进一步的阐明, 端粒DNA复制需要DNA损伤修复蛋白的参与却是不争的事实。除此之外, 众多的端粒结合蛋白, 如TRF1、Applo、CST复合体等也参与了端粒DNA的复制, 进一步说明端粒DNA复制的复杂性。

3 端粒酶对端粒的延伸

端粒酶能够延伸端粒DNA, 使细胞获得永久增殖的能力。人体的正常体细胞中没有端粒酶, 而在人体干细胞、生殖细胞及~85%的肿瘤细胞中可以检测到端粒酶的表达^[25]。因此, 端粒酶是重要的肿瘤细胞分子标记物。端粒酶是一种自身携带模板的逆转录酶, 它是由RNA模板(TERC)和具有催化功能的蛋白亚基(TERT)构成的核糖核蛋白复合体^[26]。人的端粒酶RNA模板区包括的11个核苷酸(5'-CUAACCCUAAC), 与人类端粒串联序列互补, 从而能够以自身的RNA为模板合成端粒序列, 添加到染色体末端, 以补偿末端复制造成的端粒片段丢失。

端粒酶的合成是一个在时间和空间上受到严格调控的过程, 全酶的组装在细胞核内的Cajal小体内完成的^[27]。端粒酶的全酶除TERC和TERT两个核心成分之外, 还包括TCAB1和DKC1。TCAB1负责将端粒酶转运至Cajal小体内^[28-29], 而DKC1的功能是稳定整个端粒酶复合体, 它们的丢失会引起端粒缩短, 造成端粒功能紊乱。Cajal小体将组装好的端粒酶运送到端粒末端, 端粒结合蛋白TPP1通过自身的OB结构域和端粒酶的TEN结构域相互作用, 将组装成熟的端粒酶复合体招募到染色体的末端。

端粒酶的底物是G-overhang, 将GGTTAG的序列添加到其末端, 从而达到延伸端粒的目的。如前所述, G-overhang由DNA复制产生, 端粒酶延伸与端粒复制在时间上是紧密相连。进一步的实验表明, 在人类癌细胞中端粒酶延伸细胞中的每一个端粒, 而且具有很高的进行性(processivity), 一个端粒酶一次就可以完成大约60 nt DNA的添加^[30]。

4 C链补齐

端粒酶延伸了G链后, 端粒末端会形成一段长的单链悬垂。此时, 细胞将采用一种类似后随链合成的机制, 对G链进行补齐。由于新合成的链是CCCTAA的重复片段, 因此被称为C链补齐(C-rich fill-in)^[31]。长的G富集单链若不能得到及时补齐, 会导致DNA损伤信号的激活并影响基因组的稳定性。C链补齐机制最初在酿酒酵母中发现。2012年, Gu等^[32]和Wang等^[33]报道, 哺乳动物中也存在类似的C链补齐机制。

抑制DNA聚合酶 α 的活性能够阻断C链补齐, 证实DNA聚合酶 α 可能参加了C链补齐这一过程。另外, Huang等^[34]研究还发现, 如果抑制细胞周期调控蛋白CDK1的活性, 则无法观察到C链补齐现象, 导致细胞在S晚期/G2积累大量G链悬垂, 这一发现表明, C链补齐受到严格的细胞周期调控。

与此同时, 另外一个蛋白质复合体CST成为C链补齐的研究热点。CST最初在出芽酵母中被发现, 由Cdc13-Stn1-Ten13个蛋白组成, 形成类似与RPA复合体的异源三聚体^[35]。在酵母细胞中可同时调控端粒酶的活性以及C链补齐。CST通过其本身的寡核苷酸结合位点与端粒DNA相互结合, 保护端粒DNA 5'末端不被外切酶水解。Cdc13在调控端粒酶活性以及C链补齐过程中发挥关键的作用: 磷酸化的Cdc13能结合端粒酶(Est2和Est1)^[36], 将其招募到染色体末端对端粒进行延伸, 而Sumo-Cdc13可以与Stn1相互作用, 招募DNA聚合酶 α 继而完成C链补齐。与酵母不同, 哺乳动物的CTC1-STN1-TEN1不具备保护端粒DNA的功能, 其主要负责C链补齐。CST复合体的敲除, 能够大大增加细胞中G链悬垂, 引起C链补齐的延迟, 并最终引起端粒功能失调。由于哺乳动物CST能够促进DNA聚合酶 α 的活性, 因此, 推测哺乳动物的CST极有可能也通过招募聚合酶 α 来完成C链补齐这一生物学过程。

端粒复制过程在真核生物的不同物种间高度保守, 都包含端粒DNA的复制、端粒酶的延伸以及C链补齐3个阶段。然而, 不同物种中每个阶段在细胞周期中的实施存在很大差别的, 如酵母中C链补齐与端粒DNA的延伸过程几乎同时进行, 这两个过程彼此相互竞争。而哺乳动物细胞中C链补齐过程在时间上完全独立于端粒酶延伸。端粒酶的延伸主要发生在细胞周期中的S期, 而C链补齐则在

S/G2 晚期进行。不同物种之间,为什么会有如此差别,目前研究还尚无定论。

5 端粒与DNA损伤

端粒位于染色体的线性末端,可保护 DNA,防止造成双链损伤^[37]。机体/细胞在电离辐射、环境污染物的作用下,使端粒缩短或结构发生变化,造成端粒失去功能^[38]。失去功能的端粒可引起复杂的遗传学异常^[39],包括基因截断^[40]、杂合性缺失、染色体融合、基因表达异常、表型变异,使细胞基因组不稳定^[41],形成肿瘤和衰老^[42]。Shelterin 蛋白复合体除可控制端粒长度和结构外,还可以阻止不当的 DNA 损伤应答及同源重组/非同源重组修复通路。在 DNA 损伤监测的细胞中,失去功能的端粒可激活 ATM/ATR 信号通路,诱导肿瘤抑制基因 *p53* (人类细胞为 *p16*) 表达,迫使细胞进入衰老或凋亡状态。细胞可通过端粒相关蛋白的泛素化或类泛素化维持端粒结构。

6 结论与展望

随着端粒研究的不断深入,越来越多的蛋白质被发现与端粒的复制及长度维持有关,如 TRF1 或 Rtel1 基因的敲除,能够造成端粒双链复制紊乱,继而造成端粒的复制性损伤,最终导致个体或组织的病变。CST 基因的敲除则造成 C 链补齐的延迟,进而诱发癌症或早衰性疾病的发生。但是,对于“端粒 DNA 是如何克服困难完成复制的”这一关键问题,我们仍然知之甚少。这一方面是由于众多的蛋白质可能参与其中;另一方面是由于缺乏有效的研究手段。随着越来越多的端粒相关因子的发现,端粒相关蛋白质相互作用关系网络日渐清晰,明确各种蛋白质的功能,特别是在端粒 DNA 复制、端粒酶延伸过程中的作用是摆在人们面前的迫切任务。另外,为了切实有效地研究端粒 DNA 复制,综合利用最新的研究手段,如单分子技术等,以及发展新的研究方法显得很有必要。

[参 考 文 献]

- [1] Rajavel M, Mullins MR, Taylor DJ. Multiple facets of TPP1 in telomere maintenance. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1844(9): 1550-9
- [2] Maizels N, Gray LT. The G4 genome. *PLoS Genet*, 2013, 9(4): e1003468
- [3] Lu W, Zhang Y, Liu D, et al. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*, 2013, 319(2): 133-41
- [4] Jiang H, Ju Z, Rudolph KL. Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatrie*, 2007, 40(5): 314-24
- [5] Sfeir A, de Lange T. Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science*, 2012, 336(6081): 593-7
- [6] Longhese MP, Anbalagan S, Martina M, et al. The role of shelterin in maintaining telomere integrity. *Front Biosci*, 2012, 17: 1715-28
- [7] Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus*, 2011, 2(2): 119-35
- [8] Sampathi S, Chai W. Telomere replication: poised but puzzling. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(1): 3-13
- [9] Bianchi A, Shore D. How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol Cell*, 2008, 31(2): 153-65
- [10] Zhao Y, Steir AJ, Zou Y, et al. Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell*, 2009, 138(3): 463-75
- [11] Falandry C, Bonnefoy M, Freyer G, et al. Biology of cancer and aging: a complex association with cellular senescence. *J Clin Oncol*, 2014, [Epub ahead of print]
- [12] Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(11): 770-80
- [13] Tarsounas M, Tijsterman M. Genomes and G-quadruplexes: for better or for worse. *J Mol Biol*, 2013, 425(23): 4782-9
- [14] Murat P, Balasubramanian S. Existence and consequences of G-quadruplex structures in DNA. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 25: 22-9
- [15] Lin W, Sampathi S, Dai H, et al. Mammalian DNA2 helicase/nuclease cleaves G-quadruplex DNA and is required for telomere integrity. *EMBO J*, 2013, 32(10): 1425-39
- [16] Sanders CM. Human Pif1 helicase is a G-quadruplex DNA-binding protein with G-quadruplex DNA-unwinding activity. *Biochem J*, 2010, 430(1): 119-28
- [17] Indig FE, Rybanska I, Karmakar P, et al. Nucleolin inhibits G4 oligonucleotide unwinding by Werner helicase. *PLoS One*, 2012, 7(6): e35229
- [18] Huber MD, Lee DC, Maizels N. G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(18): 3954-61
- [19] Bower BD, Griffith JD. TRF1 and TRF2 differentially modulate rad51-mediated telomeric and nontelomeric displacement loop formation *in vitro*. *Biochemistry*, 2014, 53(34): 5485-95
- [20] Masuda-Sasa T, Polaczek P, Peng XP, et al. Processing of G4 DNA by Dna2 helicase/nuclease and replication protein A (RPA) provides insights into the mechanism of Dna2/RPA substrate recognition. *J Biol Chem*, 2014, 283(36): 24359-73
- [21] Novo C, Amoult N, Bordes WY. The heterochromatic chromosome caps in great apes impact telomere metabolism. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(9): 4792-801
- [22] Taddei A, Gasser SM. Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1677(1-3): 120-8

- [23] Li Q, Zhang Z. Linking DNA replication to heterochromatin silencing and epigenetic inheritance. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(1): 3-13
- [24] Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*, 2004, 119(3): 355-68
- [25] Doksan Y, Wu JY, de Lange T, et al. Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell*, 2013, 155(2): 345-56
- [26] Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry: Moscow*, 2010, 75(13): 1563-83
- [27] Fu D, Collins K. Human telomerase and Cajal body ribonucleoproteins share a unique specificity of Sm protein association. *Genes Dev*, 2006, 20(5): 531-6
- [28] Yuan P, Wang ZT, Lv W, et al. Telomerase Cajal body protein 1 depletion inhibits telomerase trafficking to telomeres and induces G cell cycle arrest in A549 cells. *Oncol Letters*, 2014, 8(3): 1009-16
- [29] Stern JL, Zyner KG, Pickett HA, et al. Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(13): 2384-95
- [30] Zhao Y, Abreu E, Kim J, et al. Processive and distributive extension of human telomeres by telomerase under homeostatic and nonequilibrium conditions. *Mol Cell*, 2011, 42(3): 297-307
- [31] Zhao Y, Shay JW, Wright WE. Telomere terminal G/C strand synthesis: measuring telomerase action and C-rich fill-in. *Methods Mol Biol*, 2011, 735: 63-75
- [32] Gu P, Min JN, Wang Y, et al. CTC1 deletion results in defective telomere replication, leading to catastrophic telomere loss and stem cell exhaustion. *EMBO J*. 2012, 31(10): 2309-21
- [33] Wang F, Stewart JA, Kasbek C. Human CST has independent functions during telomere duplex replication and C-strand fill-in. *Cell Rep*, 2012, 2(5): 1096-103
- [34] Huang C, Dai X, Chai W. Human Stn1 protects telomere integrity by promoting efficient lagging-strand synthesis at telomeres and mediating C-strand fill-in. *Cell Res*, 2012, 22(12): 1681-95
- [35] Liu CC, Gopalakrishnan V, Poon LF, et al. Cdk1 regulates the temporal recruitment of telomerase and Cdc13-Stn1-Ten1 complex for telomere replication. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(1): 57-70
- [36] Tucey TM, Lundblad V. A yeast telomerase complex containing the Est1 recruitment protein is assembled early in the cell cycle. *Biochemistry*, 2013, 52(7): 1131-3
- [37] Zhang J, Ju Z. Telomere, DNA damage, and oxidative stress in stem cell aging. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(4): 297-307
- [38] Bhattacharjee P, Banerjee M, Giri AK. Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ Int*, 2013, 53: 29-40
- [39] Peuscher MH, Jacobs JJ. Posttranslational control of telomere maintenance and the telomere damage response. *Cell Cycle*, 2012, 11(8): 1524-34
- [40] Vlangos CN, O'Connor BC, Morley MJ, et al. Caudal regression in adrenocortical dysplasia (acd) mice is caused by telomere dysfunction with subsequent p53-dependent apoptosis. *Dev Biol*, 2009, 334(2): 418-28
- [41] Sakellariou D, Chiourea M, Raftopoulou C, et al. Alternative lengthening of telomeres: recurrent cytogenetic aberrations and chromosome stability under extreme telomere dysfunction. *Neoplasia*, 2013, 15(11): 1301-13
- [42] Shay JW, Wright WE. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(6): 349-53