



TELOMERASAS: FUNCIONES EN EL CICLO CELULAR Y PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Yasmany Fornaris Cedeño¹, Lidia Cecilia Pérez Acevedo², Pedro Manuel García Verdecia², Lázaro Eduardo Valdés Izaguirre³

¹Estudiante de 2^{do} año de Medicina. Alumno Ayudante de Medicina Interna. Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Filial de Ciencias Médicas "Dr. Efraín Benítez Popa", Bayamo.

²Estudiante de 2^{do} año de Medicina. Alumno Ayudante de Cirugía General. Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Filial de Ciencias Médicas "Dr. Efraín Benítez Popa", Bayamo.

³Licenciado en Bioquímica y Biología Molecular. Tutor de la Investigación. Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Filial de Ciencias Médicas "Dr. Efraín Benítez Popa", Bayamo.

Correspondencia: Yasmany Fornaris Cedeño. Correo electrónico: presidente@pub.fcmb.grm.sld.cu

Recibido: 12 de mayo de 2015

Aceptado: 13 de julio de 2015

RESUMEN

Recientemente, se ha estudiado el comportamiento de las enzimas en células cancerosas y sus posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. En busca de la caracterización de la estructura, el mecanismo de acción y la regulación de una de ellas, la telomerasa, así como sus potencialidades en el tratamiento de las enfermedades proliferativas, se desarrolla esta consulta bibliográfica de 41 artículos científicos sobre el tema. En ella se reafirma el llamado a la comunidad científica mundial a que retome este importante campo de investigación, debido a la corroboración de que las telomerasas participan en la inmortalidad de las células cancerosas, por lo que pueden constituir una alternativa viable en el desarrollo de terapéuticas orientadas al tratamiento de patologías celulares proliferativas.

Palabras clave: telómero; telomerasa; neoplasia

ABSTRACT

Recently, the behavior of these enzymes has been studied in cancerous cells and its diagnostic and therapeutic possible applications. With the objective of characterizing the structure, the action mechanism and the regulation of the telomerases as well as their potentialities in the treatment of the proliferative illnesses, a bibliographical consultation of 41 scientific articles was developed. telomerases participate in the immortality of the cancerous cells and they constitute an alternative in the development of therapies guided toward the treatment of proliferative cellular pathologies, what justifies the necessity to make a call to the scientific world community so that it recaptures this important investigation field.

Key words: telomere; telomerase; neoplasms

INTRODUCCIÓN

Los telómeros constituyen estructuras especializadas que forman los extremos de los cromosomas eucariontes; son regiones de ADN no codificantes, altamente repetitivas, que participan en funciones celulares tan importantes como la mitosis, la estabilidad cromosómica y el tiempo de vida de los diferentes tipos de células. Recientemente se ha demostrado su relación con algunas enfermedades, especialmente con el cáncer.¹

Estas estructuras fueron descubiertas por Hermann Joseph Muller durante la década de los años 30, el cual propuso que los telómeros tenían la función de impedir que los cromosomas se fusionaran al ponerse en contacto por sus extremos, lo que produciría consecuencias desastrosas para las células.²

Los científicos Elizabeth Blackburn, Carol Greider y Jack Szostack fueron reconocidos con el premio Nobel de Medicina en 2009 por la descripción molecular de los telómeros, la demostración de su conservación evolutiva y el descubrimiento de la telomerasa, enzima central de la maquinaria celular para la replicación de estas estructuras; con lo que lograron un muy consistente modelo que explica el problema de la "terminación de la replicación" (donde la replicación de los extremos de los cromosomas se veía comprometida al no existir un soporte estable para la unión de la polimerasa) y el mecanismo molecular de protección de los extremos cromosomales.³

A pesar de los avances en el campo de la biología molecular en los últimos años, aún es insuficiente el conocimiento acerca de algunos aspectos de la dinámica de los telómeros. No obstante, la telomerasa y su esquema general de funcionamiento se erigen en los momentos actuales como potenciales blancos de terapias anticancerígenas novedosas y específicas. Los elementos expuestos evidencian la importancia del tema y conducen al planteamiento de la siguiente interrogante: ¿Cuáles son las funciones que desempeñan las telomerasas en el ciclo celular y qué perspectivas ofrecen para el tratamiento del cáncer?

OBJETIVO

Caracterizar a las telomerasas según el mecanismo de acción, la regulación y sus potencialidades en el tratamiento de las enfermedades proliferativas.

DESARROLLO

La mayoría de los estudios sobre los telómeros se han realizado principalmente en protozoos ciliados. Posteriormente, se ha comprobado que los aspectos descritos en ciliados están presentes en otros organismos.¹

En los ciliados y en *Sacharomyces cerevisiae*, los telómeros se encuentran en una forma de estructura cromatínica particular no nucleosómica que ha sido denominada telosoma¹. Los nucleosomas adyacentes presentan histonas hipoacetiladas características de la cromatina que no se transcribe activamente. En mamíferos, donde son mucho más largos, se presentan formados por nucleosomas pero hacia la zona más extrema aparecen como telosomas. Esto evidencia que al menos en parte hay conservación estructural de los telómeros. También muestran marcadas diferencias interespecies.⁴

El ADN telomérico

En casi todos los eucariontes estudiados, el ADN telomérico (ADNt) consiste en repeticiones en tandem de pequeñas secuencias nucleotídicas con una distribución asimétrica de los pares G:C, pues las G se acumulan en una de las hebras (llamada hebra G) donde se encuentran agrupadas. La hebra G está orientada de 5' a 3' hacia el extremo del telómero y forma el extremo 3' del ADN cromosómico. En la zona más extrema no está pareada, formando un segmento final monofibrilar con una longitud que varía según la especie. En algunos organismos la longitud promedio de los telómeros responde a cambios genéticos o nutricionales.⁵

La mayoría de las secuencias de ADNt son cortas y precisas, como en *Tetrahymen*, que es de 6 pb (TTGGGG). Sin embargo, en *S. cerevisiae* es heterogénea, y muy larga en *Kluyveromyces lactis* donde presenta 25 pb.

Las proteínas teloméricas

Las proteínas teloméricas (PT) tienen por regla general varios dominios (o motivos) de unión al ADN, son de carácter predominantemente ácido y se unen de manera

específica a las regiones repetitivas de los telómeros. Pueden presentarse asociadas al extremo monofibrilar o a la zona adyacente de doble hebra.⁵

Entre las primeras se ha identificado una proteína de *Oxytricha* que no está relacionada estructuralmente con ninguna otra proteína. In vitro, facilita la formación de cuartetos G, lo cual sugiere la existencia de estas estructuras in vivo. No se le ha detectado unión a zonas internas del cromosoma por lo que parece ser una proteína exclusivamente telomérica.⁶

La principal PT de unión a la zona de doble hebra en *S. cerevisiae* es el producto del gen RAP1. Su unión a las repeticiones $(TG_{13})_n$ de hebra simple se realiza con menos afinidad que a las de doble hebra. Se ha demostrado que RAP1p contiene 2 motivos estructurales de unión al ADN.²

A partir de células HeLa se purificó una proteína de 60 kDa que se une a los telómeros humanos y se le denominó hTRF. La proteína tiene 439 aminoácidos para una masa molecular de 50 341 dalton y su expresión in vitro da lugar a una proteína de tamaño similar a la identificada en los extractos nucleares de células HeLa.⁷

Funciones de los telómeros

Sin embargo, su función más notoria de los telómeros es la de servir como un reloj mitótico que mide y regula el número de las divisiones celulares.¹¹ Los telómeros se acortan con cada división celular y el número de divisiones que la célula puede experimentar se correlaciona con su longitud. Este acortamiento pudiera eliminar genes indispensables para la vida o silenciar genes cercanos por el efecto de posición del telómero. Una longitud crítica pudiera ser la señal para la entrada en la senescencia celular. Sin embargo, vale tener presente que no está relacionada con la edad del organismo.¹²

La actividad de la telomerasa varía en diferentes etapas de la vida. Se ha detectado en ovarios y testículos en fetos, recién nacidos y adultos, pero no en óvulos ni espermatozoides maduros.¹³ También es elevada en tejidos adultos, en los que presenta una intensa proliferación celular, como en las células endoteliales¹⁴ y el

endometrio.¹⁵ En otras células puede ser inducida en determinadas etapas de la vida, como ocurre con la activación de los linfocitos T¹⁶ y los B.¹⁷

Las telomerasas

La telomerasa es la ribonucleoproteína encargada de la replicación de los telómeros. El descubrimiento de esta enzima resolvió en principio el problema de la replicación de los extremos de moléculas lineales de ADN. Su actividad fue detectada por primera vez en *Tetrahymena* y después en otros eucariontes. La telomerasa de dicho protozoo presenta un ARN de una longitud de 159 nucleótidos en la que se puede encontrar la secuencia 3´-AACCCCAAC -5´, que es complementaria a la secuencia telomérica de *Tetrahymena* (5´-TTGGGG -3´).¹ Sobre la estructura y mecanismo de acción de estas proteínas se han escrito numerosos trabajos.¹⁸ Para la actividad de esta proteína son esenciales tanto el componente proteico como el ARN (ácido ribonucleico).

La telomerasa humana presenta un componente de ARN denominado HTR (human telomerase RNA), el cual consiste en una cadena molde de ARN que sirve para la síntesis del ADN telomérico; es una subunidad proteica con funciones catalíticas que actúa como una transcriptasa inversa semejante a la transcriptasa inversa viral denominada HTERT (human telomerase inverse transcriptase).¹⁹

Estas enzimas difieren de todas las polimerasas en que utilizan un molde interno en vez de uno externo, lo cual impone limitaciones estéricas específicas para la elongación del iniciador y la catálisis. La telomerasa alarga el ADN iniciador por la adición uno a uno de los desoxinucleósidos trifosfatados y así genera las repeticiones en tandem de los telómeros.²⁰

Actualmente, se propone la existencia de 2 sitios enzimáticos independientes de interacción con el ADN iniciador. Uno contiene el molde de ARN y alinea el extremo 3´ del iniciador para su elongación en el centro catalítico. El otro se une al ADN iniciador hacia el lado 5´ del molde y proporciona una vía de salida para la hebra en crecimiento. Este modelo explica la adición de varias repeticiones sin que la enzima se disocie del ADN iniciador. Este sitio catalítico único debe moverse en relación con el ARN molde. La enzima posee también actividad endonucleasa que pudiera estar relacionada con una función de corrección.¹⁸

Mecanismos de regulación de la actividad de la telomerasa

Los dos componentes de la telomerasa son necesarios y suficientes para su actividad in vitro, aunque los equipos de Bachan y Mosutomi²³ demostraron que varias moléculas adicionales son necesarias para la actividad funcional de la telomerasa in vivo, pues estos componentes desempeñan un papel esencial en la regulación de actividad de la enzima. Por ejemplo, la proteína TRF1, TRF2, tanquirasa, TIN2, RAP1 y POT1 están involucrados en la interacción con el telómero y regulan la apertura y cierre de este, permitiendo el acceso de otros complejos proteicos tales como las telomerasas.²⁴

Una variedad de proteínas y ribonucleoproteínas, incluyendo HSP90 así como DKC1, L22, P23, GAR1, también participan en el ensamblaje de la telomerasa y facilitan la interacción de la enzima con el telómero. Otras proteínas tales como MR11A, NBS1, KU70, KU80, DNAPK y ATM funcionan en la detección de telómeros cortos y disponen las vías de respuestas para la reparación de las secuencias teloméricas.²³

La regulación de la actividad de la telomerasa in vivo es, por tanto, sumamente compleja, pues depende de la accesibilidad al telómero y de la coordinación con múltiples proteínas. De igual forma sucede con la regulación de la expresión de los genes que codifican para la síntesis de las subunidades enzimáticas.²⁵ Estos mecanismos de regulación son capaces de modificar la actividad enzimática en repuestas a cambios que se producen en el medio interno variando la capacidad funcional de la enzima.

Existen dos procesos básicos en la regulación molecular: la regulación de la expresión genética, que modifica la cantidad de enzima a sintetizar a través de mecanismos de inducción y represión genética, y la modificación cualitativa de la enzima que puede ser a través de la regulación covalente, y que varía el status de fosforilación de la enzima, lo que aumenta o disminuye la actividad enzimática.²⁵

Para la telomerasa se han estudiado todos los niveles de regulación genética. El nivel transcripcional es un factor determinante que regula el aumento de la actividad de la telomerasa en las células normales y cancerosas al permitir o no la expresión de los genes específicos que forman el complejo enzimático.²⁶

En el nivel postranscripcional, uno de los enfoques más utilizado ha sido el de bloquear el funcionamiento del ARN mensajero de las subunidades HTR y HTERT mediante el uso de ribozimas con actividad ribonucleasa contra secuencias trinucleotídicas preferentemente G, U, C. Como los ARNs mensajeros de HTR y HTERT son ricos en esta secuencia, son un blanco directo para la acción de estas enzimas.²⁷

La facilidad de estas moléculas para inhibir la actividad de la telomerasa ha sido bien demostrada en dos líneas de carcinoma endometrial²⁸.

Estudios más recientes desarrollados por Yokayama y sus colaboradores²⁹ dan fe de que el splicing (corte y empalme del ARN mensajero) de la subunidad catalítica de la telomerasa, provoca la eliminación de dominios importantes para la actividad de la enzima.

Al nivel postraducciona se ha comprobado que, aunque la enzima solo necesita dos subunidades para presentar actividad funcional in vitro, esta se encuentra supeditada al ensamblaje del complejo telomérico. Algunos constituyentes de este complejo tienen función reguladora intrínseca, entre ellos la proteína tanquirasa, que facilita el ensamblaje del complejo telomérico, demostrándose que este es uno de los principales mecanismos de regulación postraducciona implicados no sólo en la regulación de la enzima telomerasa, sino también de proteínas involucradas en la respuesta a daños del ADN.³⁰

El ARN telomerásico

Los estudios con mutantes de ARNtl en Tetrahymena han mostrado que cambios en algunos de los 6 nt del extremo 5' (CAACCCAA) producen secuencias repetidas alteradas; sin embargo, los 3 últimos no son utilizados como molde y más bien parecen participar en alinear el iniciador.³¹

Al introducir cambios en la secuencia molde del ARNtl en Tetrahymena, las células se hacen muy grandes con problemas en la división nuclear y pierden viabilidad después de varias generaciones. Existe una alteración en los mecanismos que regulan la longitud de los telómeros, tal vez porque se inhibe la unión de las PT al cambiar la secuencia. En *S. cerevisiae* la delección de EST1 produce un

acortamiento progresivo de los telómeros y al cabo de unas 50 generaciones las células se hacen muy grandes y muchas de ellas mueren.³¹

Papel de los telómeros en el envejecimiento y la carcinogénesis

Las teorías del envejecimiento y de la carcinogénesis se basan en que los telómeros son como los relojes o temporizadores de las células, pues marcan el número de divisiones celulares hasta que la célula muere. Esta teoría se fundamenta en que el ADN contenido en los telómeros no se duplica completamente durante la replicación, pues las enzimas ADN polimerasas solo pueden trabajar en dirección 5' -3' . Para la hebra conductora esto no supone problema, pero para poder duplicar simultáneamente la hebra retrasada (que se presenta en dirección 3' -5') deben formarse los fragmentos de Okazaki, que luego serán empalmados mediante una ligasa. El inicio de cada segmento está constituido por un primer de ARN. Estos son finalmente sustituidos por DNA; sin embargo, el primero del extremo 5' de la hebra no puede ser completado, pues se requeriría trabajar en dirección 3' -5' producto de la terminación de la cadena de ADN. En consecuencia, el telómero se va haciendo cada vez más corto con cada replicación.¹⁸

La telomerasa es reprimida en las células somáticas maduras después del nacimiento, produciéndose un acortamiento del telómero después de cada división celular.² Cuando la longitud del telómero alcanza cierto límite, se interrumpen las mitosis y quedan las células en un estado de G₀.³

El desgaste del telómero en el transcurso de los ciclos celulares impide su función protectora del cromosoma, con lo que este se vuelve inestable, se fusiona o se pierde. Las células que presentan estos defectos, no solo son incapaces de duplicarse, sino que provocan la activación de los procesos de apoptosis. Se estima que cada telómero pierde unos cien pares de bases en cada replicación. Esto representa unos 16 fragmentos TTAGGG. Teniendo en cuenta el número inicial de estas secuencias, al cabo de unas 125 divisiones mitóticas, el telómero se ha perdido completamente.¹⁸

Los experimentos de Hayflickn³² demostraron que las células normales (no cancerosas) no crecen in vitro de forma indefinida pese a suministrárseles todos los nutrientes y factores de crecimiento necesarios. Las células de recién nacidos,

cultivadas in vitro, experimentan unas 100 divisiones, mientras que las células obtenidas de sujetos mayores, sólo se dividen de unas 20 a 24 veces.

El papel determinante de los telómeros en el ciclo celular se apoya en el hecho de que algunas células como las germinales, las eucariotas unicelulares, el Paramecium y algunas células tumorales, son inmortales por acción de la telomerasa. En todas ellas la enzima actúa protegiendo la integridad de los telómeros.⁵

Tofgard¹⁸ introdujo en dos tipos de células humanas normales telomerasa negativa, el gen que codifica esta enzima. En contraste con las células normales que mostraban senescencia y un acortamiento de los telómeros, los clones expresando la TERT mostraron telómeros alongados, se dividían vigorosamente así como una reducción de beta-galactosidasa, un biomarcador de la senescencia. Las células transformadas para sintetizar la TERT presentaron un cariotipo normal y su longevidad superó la usual en más de 20 divisiones.

Luego de este análisis la función de los telómeros los relaciona de inmediato con la transformación cancerosa. En uno de los primeros trabajos sobre el tema, se encontró que en células cultivadas de 18 diferentes tejidos humanos, 98 de cada 100 inmortales y ninguna de 22 mortales mostraban actividad de telomerasa. Asimismo, 90 de 101 biopsias de 12 tipos de tumores y ninguna de 50 de tejidos somáticos normales poseían actividad de la enzima.³²

Estudios posteriores han confirmado una actividad incrementada de telomerasa en cáncer de mama ³³, próstata ³⁴ y astrocitomas ³⁵, hallazgos que pudieran tener importantes implicaciones clínicas. La determinación de la actividad de telomerasa pudiera ser utilizada para el diagnóstico precoz del cáncer en pruebas no invasivas y los inhibidores de la enzima pudieran ser usados como agentes antitumorales con un alto grado de selectividad para las células transformadas.³⁶

Muchas células cancerosas derivan de células somáticas, y se ha comprobado la presencia de telomerasa en el 75 a 80% de las líneas tumorales. Esto no quiere decir que la telomerasa induzca el cáncer. Collins²⁰ encontró que pacientes con una enfermedad congénita muy poco frecuente, la disqueratosis congénita, tenían niveles de telomerasa anormalmente bajos, muriendo, no obstante, de cáncer gastrointestinal en muchos casos. A pesar de esto, se sabe que la agresividad de las

células tumorales está relacionada con sus niveles de telomerasa y que niveles altos de esta enzima son indicativos de la malignidad del tumor.¹⁸

Recientemente, se ha descubierto que las mutaciones en el gen promotor TERT, que controla las instrucciones para la producción de la telomerasa, está involucrado en algunos tumores cancerosos.³⁷ Al parecer, esa mutación del gen promotor TERT, esencialmente, crea un ímpetu de crecimiento constante de forma tal que los telómeros jamás se acortan y la célula puede dividirse por siempre.³⁸

Perspectivas de aplicación

El descubrimiento de la singular estructura nucleoproteínica de los telómeros y su conservación filogenética estructural y funcional, demuestran el carácter esencial de esas estructuras para la vida de la célula. La existencia de las telomerasas soluciona el viejo problema sobre la replicación de los extremos de moléculas lineales de ADN. Sin embargo, estos hallazgos plantean nuevos problemas, entre los que se encuentra la determinación de la función del ARNtI en la zona que no funciona como molde y su posible participación en la catálisis enzimática, así como de los factores que regulan la actividad de la enzima por una parte y la longitud de los telómeros por otra. A su vez, es menester esclarecer los mecanismos moleculares que vinculan los telómeros con la regulación de la proliferación celular.³⁹

Recientemente se ha estado utilizando el ARNm de la telomerasa como marcador de la transformación maligna en carcinomas de cuello de útero, pulmón e hígado.³⁹⁻⁴¹

Además se han autorizado dos estudios clínicos con telomerasas, uno de ellos encaminado a obtener un mejor diagnóstico del cáncer cervical y el otro para evaluar un fármaco contra la leucemia mieloide.³⁷

En Japón está siendo utilizado el conocimiento sobre los telómeros en niños con neuroblastoma 4S. Al parecer los infantes tiene un cáncer metastático, pero los tumores son telomerasa negativos y aproximadamente el 80% llegan a una remisión espontánea tras ser extirpada quirúrgicamente la lesión. Estos estudios también permiten identificar los tumores telomerasa positivos, de manera que puedan ser tratados de un modo más agresivo.⁴¹

Científicos estadounidenses recurrieron a la reprogramación genética para crear células tomadas de pacientes con una rara enfermedad degenerativa y fueron capaces de reconstruir sus telómeros. Los investigadores tomaron células de la piel de tres pacientes afectados de disqueratosis congénita y las convirtieron en células madre pluripotentes capaces de reactivar la telomerasa, con lo cual lograron revertir en alguna medida los síntomas de la enfermedad.³⁷

CONCLUSIONES

Los telómeros, cuyo principal actor es la ribonucleoproteína enzimática denominada telomerasa, constituyen la estructura protectora de los extremos cromosómicos y actúan como un reloj mitótico que mide y regula el número de divisiones celulares. La expresión de la enzima telomerasa participa en la inmortalidad de la célula cancerosa, por lo que promete alternativas en el desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas hacia el tratamiento de patologías celulares proliferativas. Ello justifica la necesidad de hacer un llamado a la comunidad científica mundial para que se retome este campo de investigación, que ha dejado de ser centro de atención en los últimos años, limitándose sólo a demostrar la incidencia de la telomerasa en disímiles tipos de enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hernández E. Telomero y telomerasa: su estructura y dinámica en la salud y la enfermedad. *Rev Esp Clínico-Quirúrgicas*. 2010; 26(3).
2. Pierce B. *Genética. Un enfoque conceptual (2^{da} Edición)*. México: Editorial Médica Panamericana; 2009.
3. Klug W. *Conceptos de Genética (8^{va} Edición)*. New York: Editorial Pearson Prentice Hall; 2009.
4. Zakian VA. Telomeres beginning to understand the end. *Science*. 1995;270:1601-7.
5. Witzany G. The viral origins of Telomeres and Telomerase and their important role in Eukaryogenesis and Genome Maintenance. *Biosemiotics* 1; 2009.
6. Viria V, Morris DK, Lundblad V. Est 1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev*. 1996;10:3094-104.
7. Smith S, Lange T. TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet*. 1997;13:21-6.
8. Pommier JP, Lebeau J, Ducray C, Sabatier L. Chromosomal instability and alteration of telomere repeat sequence. *Biochimic*. 1995;77:817-25.
9. Kirk KE, Harmon BP, Reichardt IK, Sedat JW, Blackburn EH. Block in znapase chromosome separation caused by telomerase template mutation. *Science*. 1997;275:1478-81.
10. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997;214:99-106.
11. Counter CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res*. 1996;366:45-63.

12. Wright WE, Piatyszeck MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996;18:173-9.
13. Hsiao R, Sharma HW, Ramakrishnan S, Keith E, Narayanan R. Telomerase activity in normal human endothelial cells. *Anticancer Res.* 2010;17:827-32.
14. Saito T, Scheneider A, Martel N, Mizumoto H, Bulgay-Moeschel M, Kudo R, et al. Proliferation-associated regulation of telomerase activity in human endometrium and its potential implication in early cancer diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;321:610-4.
15. Weng N, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Regulation of telomerase RNA template expression in human T lymphocyte development and activation. *J Immunol.* 1997;158:3215-20.
16. Igarashi H, Sakagushi N. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood.* 1997;89:1299-307.
17. Tofgard R. Maintenance of the chromosomes by telomeres and the enzyme telomerase. The Nobel Assembly at Karolinska Institute; 2009.
18. Cooper JP, Nimmo ER, Alishire RC, Cech TR. Regulation of telomeric length and function by a myb-domain protein in fission yeast. *Nature.* 1997;385:744-7.
19. Collins K. Structure and function of telomerase. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:374-80. 5.
20. Lendva TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics.* 1996;144:1399-412.
21. Shimada Y, Nakano M, Kanda N, Murakami-Murofushi K, Kim JK, Ide T, et al. Cycle-dependent activation of telomerase in naturally synchronized culture of a true slime mold, *Physarum polycephalum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;232:4921-6.
22. Rufer AL. Tumor specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization. *Oncogene.* 2009;16: 979-83 .
23. Alon B. Of transcriptional regulatory sequences of telomerase (hTER and hTERT) for selective killing of cancer cells. *Mol Ther.* 2012;2:539-44.
24. Recal K. Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships. *J Med Chem.* 2009; 42: 4538-46.
25. Chiv CP. Inhibition of telomerase activity by ribozymes in endometrial carcinoma cells. *Cancer Research;* 2009.
26. Yokoyama Y. Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res.* 2010; 58: 5406-10.
27. Smith S. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science.* 2012; 282: 1484-87.
28. Battachay A, Blackburn EH. A functional telomerase RNA swap in vivo reveals the importance of nontemplate RNA domains. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:2823-7.
29. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cells. 2010. Available from: <http://www.cogforlife.org/HayflickExpCell.pdf> (2010/01/26)
30. Nawaz S, Hashizumi TL, Markkhan NE, Shroyer AL, Shroyer KR. Telomerase expression in human breast cancer with and without lymph node metastases. *Am J Clin Pathol.* 1997;107:542-7.
31. Lin Y, Uemura H, Fujinami K, Hosaka M, Harada M, Kubota Y. Telomerase activity in primary prostate cancer. *J Urol.* 1997;157:1161-5.
32. Sallinen P, Miettinen H, Sallinen SL, Haapasalo H, Helin H, Kononen J. Increased expression of telomerase RNA component is associated with increased cell proliferation in human astrocytomas. *Am J Pathol.* 1997;150:1159-64.
33. Shay JW, Gazdar AF. Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol.* 2002;50:106-9.

34. Castelo P, Choufani S, Mack S, Gallagher D, Zhang C, Lipman, et al. Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: an integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol.* 2013; 14(6): 534-42.
35. Meyerson M. Telomerase enzyme activation and human cell immortalization. *Toxicology Letters.* 2010: 102-03.
36. Li Y, Ye F, Lü WG, Zeng WJ, Wei LH, Xie X. Detection of human telomerase RNA gene in cervical cancer and precancerous lesions: comparison with cytological and human papillomavirus DNA test findings. *Int J Gynecol Cancer.* 2010; 20(4): 631-7.
37. Su LY, Li XL, Shen L, Zhang Y, Zhao MM, Yin ZH, et al. Polymorphisms of TERT and CLPTM1L and the risk of hepatocellular carcinoma in Chinese males. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(19):8197-201.
38. Li H, Fu J, Xiu Y, Zhou Q. Diagnostic significance of combining telomerase activity with CYFRA21-1 level in differentiating malignant pleural effusion caused by lung cancer from benign pleural effusion. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2010; 13(6): 652-4.