

마우스피부암 발생과정에 있어서 텔로머레이저 활성에 관한 연구

강호일* · 지승완 · 김옥희
국립독성연구원 유전독성과

Studies on the activity of telomerase in the mouse skin carcinogenesis

Hoil Kang*, Sung Wan Jee, and Ok Hee Kim

Division of Genetic Toxicology, National Institute of Toxicological Research, 5 Nokbun-dong, Eunpyung-ku, Seoul 122-704, Korea

(Received May 31, 2005 / Accepted June 20, 2005)

ABSTRACT : Telomerase, a specialized RNA-directed DNA polymerase that extends telomeres of eukaryotic chromosomes, has activity in most malignant tumors and provides a mechanism for the unlimited potential for division of neoplastic cells. Although telomerase is known to be a regulated enzyme, the factors and mechanisms involved in telomerase regulation are not well understood. In the present study, we compared the effect of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) and non-phorbol ester tumor promoters such as okadaic acid, anthralin and benzoyl peroxide on the expression of telomerase in the mouse skin carcinogenesis system, a well characterized model for studying pre-malignant and malignant progression. We found that most early papillomas harvested after 10 weeks of TPA promotion showed telomerase activity. Other papillomas harvested after 10 weeks of okadaic acid, anthralin and benzoyl peroxide promotion and after single treatment of DMBA only also showed telomerase activity, respectively. On the other hand, normal and all skins surrounded by papillomas harvested after 10 weeks of these promoters has no telomerase activity. Taken together these results, there appears to be no clear association between the level of telomerase activity and protein phosphorylation in mouse skin papillomas and telomerase may be useful as bio-markers in early detection of tumors.

Key words : Telomerase, mouse skin carcinogenesis, tumor promoters

서 론

진핵세포의 염색체 말단부분에 존재하는 텔로미어 DNA는 염색체의 말단을 안정하게 유지하며 유전자의 발현을 조절하는 중요한 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Greider *et al.*, 1991; Zakian *et al.*, 1989). 척추동물에서 텔로미어 DNA는 5'-TTAGGG-3'라고 하는 6개 염기의 긴 반복배열을 가지고 있으며 포유류의 경우에 10 kb 이상으로 알려져 있다. 그러나 DNA 복제시 DNA 중합효소가 텔로미어 DNA를 완전히 복제할 수 없기 때문에 세포분열이 일어날 때마다 일정 부분씩 감소한다 (Allshire *et al.*, 1989). 실제 사람의 체세포를 배양해서 세대 (subculture)를 계속하면 할수록 텔로미어 DNA가 단축되며 개체 레벨에서도 연령이 증가할수록 텔로미어 DNA가 짧아지는 것으로 보고되어 있다 (Hastie *et al.*, 1990;

Levy *et al.*, 1992).

텔로머레이저는 염색체의 말단부분인 텔로미어를 합성하는 효소로서 RNA와 단백질의 복합체로 이루어진 역전사 효소이다. 텔로머레이저는 세포의 암화, 노화와 깊은 관계를 가지고 있는 것으로 알려지면서 최근 전 세계적으로 주목을 받고 있다 (Chadeneau *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1995; Hiyama *et al.*, 1996; Shay *et al.*, 1996). 사람의 경우 생식세포 및 골수세포, 피부 등을 제외한 체세포에는 텔로머레이저 활성이 없지만 정상세포가 암세포로 변환되어 가는 과정 중에 텔로머레이저가 재활성화 됨으로써 암 형질 획득의 열쇠가 되는 것으로 생각되어지고 있다. 지금까지 연구보고에 의하면 2000개 이상의 생체 암 조직에 대해 텔로머레이저 활성이 측정되었으며 그 결과 이들 암 조직에 대해 80-90%의 높은 빈도로 텔로머레이저 활성이 있는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1994; Shay *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1999). 또한 암세포로부터 추출한 DNA를 정상세포의 것과 비교하여 보면 굉장히 짧은

*To whom correspondence should be addressed

것으로 알려져 있는데 이러한 현상은 정상세포가 암세포로 변환되어 가는 단계 중에 암세포로서의 형질을 획득한 시점부터 활발한 증식을 하게 되어 점점 염색체중의 텔로미어가 단축되지만 어느 순간에 텔로머레이저 활성이 부활된 후에는 텔로미어가 일정 수준으로 유지되기 때문으로 생각되어지고 있다 (Greider *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999). 그리고 텔로머레이저 활성이 없는 암세포의 경우에는 더 이상의 증식을 하지 못하고 사멸하는 등의 지금까지의 연구결과를 종합하여 보면 텔로머레이저와 암 발생과는 아주 밀접한 상관관계가 있는 것으로 추정되어지고 있으나 암 발생 과정에 있어서 구체적으로 어떤 기전으로 텔로머레이저가 재활성화 되는지에 대해서는 아직 알려진 바가 없는 실정이다. 텔로머레이저 연구는 지금까지 암의 확정 진단에 주로 사용되어져 왔던 형태학적 진단법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 조기 암 진단법의 개발 차원에서도 좋은 기초 연구가 될 것으로 생각되어지고 있다.

마우스 피부암 모델은 다단계 화학발암 과정의 진행상태를 비교적 쉽게 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 마우스의 다른 정상 장기에 비해 피부에서는 텔로머레이저 활성이 전혀 발현되지 않는다는 점을 고려할 때 텔로머레이저 기전 연구에 최적의 모델이 되고 있다 (Bednarek *et al.*, 1995). 본 연구에서는 텔로머레이저가 재활성화 되는 기전을 연구하기 위해 우선 ICR 마우스를 이용하여 암 발생 단계별로 텔로머레이저 활성을 측정함으로써 마우스 피부암 발생과정중 어느 단계에서 텔로머레이저 활성이 부활되는지에 대해 조사하였으며, 또한 마우스 피부암 발생 과정중에서 다른 특성을 지닌 발암촉진제 (tumor promoter)를 사용함으로써 발암촉진제의 종류에 따라 텔로머레이저의 활성이 어떻게 변화하는가에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

시약

TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), benzoyl peroxide, anthralin, DMBA (7,12-dimethylbenz [a]anthracene)는 Sigma Chemical 회사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 okadaic acid는 LC Services (Woburn, MA, USA)로부터 구입하였다. Telomerase activity assay 용 키트는 Intergen Corporation (New York, NY, USA)에서, Taq DNA polymerase는 Roche 회사 (Mannheim, Germany)로부터 각각 구입하였다. 그 외의 시약은 특급을 사용하였다.

마우스 피부암 발생

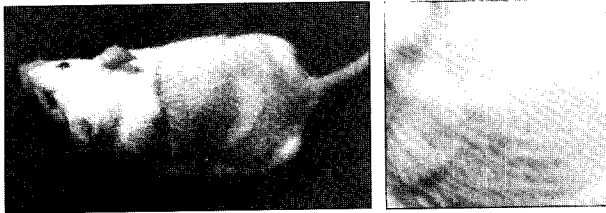
실험동물은 국립독성연구원 실험동물자원실에서 분양받

은 암컷 ICR 마우스를 사용하였으며 동물 발암 모델은 2 단계 마우스 피부암 모델을 사용하였다. 우선 모 (hair) 발육 정지기 (resting phase)에 들어 있는 마우스에 대해 동물용 모 제거기 (hair shaver)를 이용하여 등 부분의 모 (hair)를 깨끗이 제거한 다음 3일 동안 모 (hair)가 생기지 않은 동물에 대해 DMBA (10 nmol)를 처리하였다. DMBA 처리 후 2주일이 경과된 시점부터 TPA (4 nmol), okadaic acid (2.5 nmol), anthralin (220 nmol), benzoyl peroxide (83 μ mol)를 일주일에 각각 두 번 처리하여 발암을 촉진시켰다. 본 실험에서 사용한 발암촉진제는 2단계 마우스 피부암 모델에서 발암촉진 효과가 입증된 농도를 각각 사용하였으며 (Battalora *et al.*, 1993; Battalora *et al.*, 1995; Klein-Szanto *et al.*, 1982; Klein-Szanto *et al.*, 1984; Slaga *et al.*, 1981; Suganuma *et al.*, 1988) acetone 200 μ l에 녹여 사용하였고 대조군은 acetone만 처리하였다. 각 군의 동물수는 10~30 마리로 설정하였다.

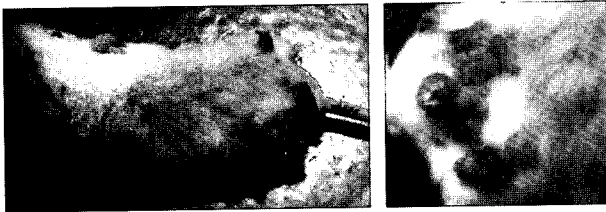
텔로머레이저 활성 측정

텔로머레이저 활성은 최근에 개발된 telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay에 의해 수행하였다 (Wright *et al.*, 1995). 각 단계별로 추출한 papilloma를 액체질소 중에서 조직을 미세하게 분쇄한 후, 차가운 CHAPS lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM benzamidine, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5% CHAPS, 10% glycerol, RNase inhibitor 100 unit/ml)를 첨가하여 얼음 위에서 30분간 반응시켰다. 반응액은 4°C에서 12,000 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 추출물은 액화질소에서 급속 냉동시켜 -80°C에서 보관하여 사용하였다. 추출물의 단백질 농도는 Lowary 방법으로 정량하였다. TRAP assay는 0.2 ml MicroAmp reaction tube (Perkin Elmer)를 사용하였다. PCR의 negative control은 CHAPS lysis buffer를 사용하였으며, positive control은 telomerase 활성도를 나타내는 cell line (단백질 농도 2 μ g)을 사용하였다. 텔로머레이저에 포함된 RNA를 분해시키기 위하여 90°C에서 10분간 열처리한 후 papilloma에 대한 대조군으로 사용하였다. PCR 반응조건은 TRAP reaction buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.3, 0.15 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0.05% Tween 20, 1 mM EGTA)와 50 mM deoxynucleoside triphosphate, TS primer (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'), TRAP primer mix, Taq DNA polymerase (2 Units)가 포함된 용액에서 30°C에서 30분간 반응한 후, 94°C/30s, 59°C/30s, 72°C/45s에서 30 cycle로 증폭시켰다. 반

응물은 12.5% non-denaturing polyacrylamide gel에서



(A)



(B)

Fig. 1. (A) Mouse skin treated with acetone only for 22 weeks. (B) Mouse skin papillomas induced by initiation with DMBA (10 nmol) and promotion with TPA (4 nmol) for 22 weeks.

전기영동 하였으며, ethidium bromide로 염색하고 deionized water로 탈색하여 UV 하에서 관찰하였다. 텔로머레이저 활성은 키트 내 TS primer와 TRAP primer mix 내의 K1, RP 및 TSK1 primer가 결합한 50개 염기를 시작으로 만약 텔로머레이저가 존재할 경우 생성되는 56개 염기 (6개의 염기가 추가되는 PCR 산물)로부터 확인하였다.

결 과

마우스 피부암 발생 실험

2단계 마우스 피부암 모델을 이용하여 ICR 마우스의 등 (back skin)에 암을 인위적으로 발생시켜 발암과정의 각 단계별 (promotion 10주에서 22주까지) papilloma 조직을 확보하였으며 이와 병행하여 DMBA 처리 후 다른 발암 촉진제 (benzoyl peroxide, anthralin, okadaic acid) 들로 처리한 papilloma 조직들도 각 단계별로 확보하였다. 그 결과 papilloma의 발생빈도는 TPA (77%) > okadaic acid (75%) > anthralin (54%) > benzoyl peroxide (38%) 순으로 나타났으며 acetone 만을 처리한 대조군에서는 피부암 발생은 보이지 않았다 (Fig. 1).

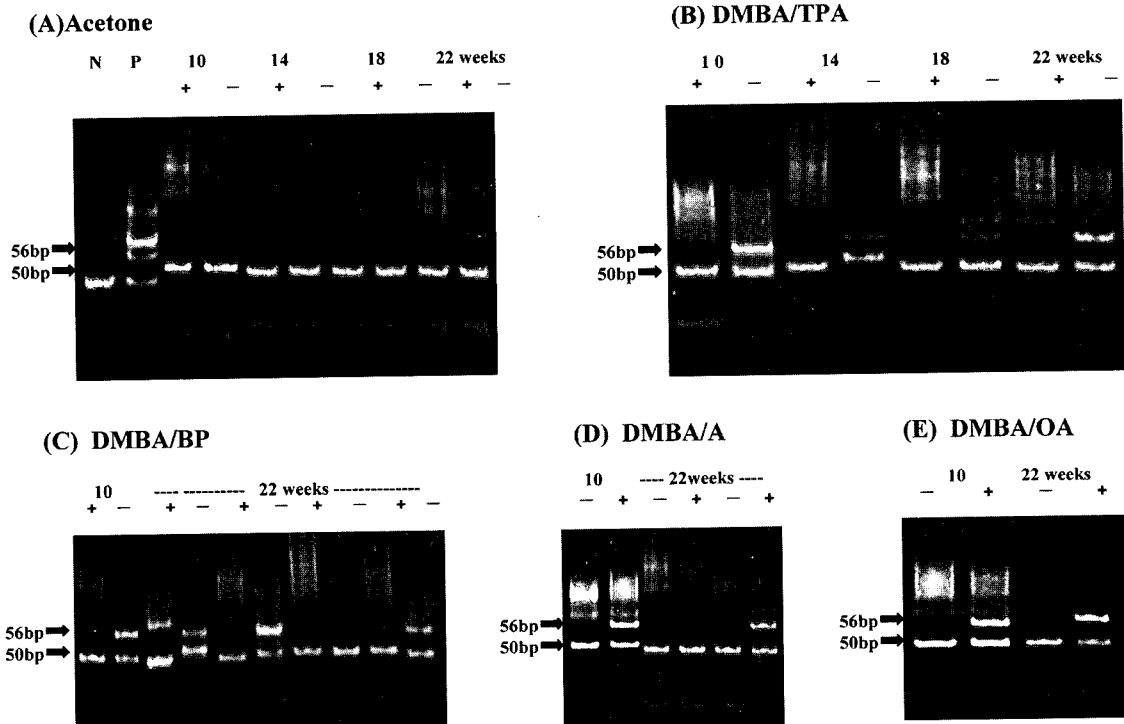


Fig. 2. TRAP assay for telomerase activity in mouse skin papillomas induced by initiation with DMBA (10 nmol) and promotion with TPA (4 nmol), okadaic acid (2.5 nmol), anthralin (220 nmol) and benzoyl peroxide (83 μ mol), respectively. P, positive control; N, negative control; +, heating for RNA degradation; -, without heating; BP, benzoyl peroxide; A, anthralin; OA, okadaic acid.

정상 및 papilloma 조직중의 텔로머레이저 활성 측정

ICR 마우스를 이용하여 암 발생 단계별로 텔로머레이저 활성을 측정함으로써 다단계 화학발암 과정 중 어느 단계에서 텔로머레이저 활성이 부활되는지에 대해 조사하기 위해 우선 DMBA/TPA 2단계 마우스 피부암 모델에서 얻은 정상 및 각종 papilloma 조직으로부터 단백질을 추출한 후 텔로머레이저 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 acetone 만을 처리한 정상 피부조직에서는 텔로머레이저 활성은 나타나지 않았으나 TPA promotion 10주에서 22주까지 얻은 papilloma 조직에서는 텔로머레이저 활성이 검출되었다.

텔로머레이저가 재활성화되는 기전을 연구하기 위해 마우스 피부암 발생과정 중에 서로 다른 기전으로 발암촉진 작용을 할 수 있는 4종류의 다른 발암촉진제 (tumor promoters)를 사용함으로써 발암촉진제의 종류에 따라 텔로머레이저의 활성이 어떻게 변화하는 가에 대해 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 TPA 대신 benzoyl peroxide, okadaic acid, anthralin 으로 처리하여 얻은 papilloma 조직 (promotion 10주에서 22주까지)에서도 텔로머레이저 활성이 나타나는 것을 발견하였으며 DMBA를 과량으로 단독 투여하여 얻은 papilloma에서도 텔로머레이저 활성이 있는 것을 확인하였다 (data not shown).

TPA를 포함한 이들 발암촉진제 등으로 처리한 동일 주령의 papilloma 주위조직 (hyperplasia가 매우 활발하며 papilloma 생성전의 조직)에서는 텔로머레이저 활성이 검출되지 않았으며 papilloma 연령에 따른 텔로머레이저의 활성의 증가는 확인되지 않았다.(data not shown)

고 찰

본 연구에서는 정상조직에 비해 각종 암 조직에서 80~90%의 높은 빈도로 활성화 경향을 보이고 있는 텔로머레이저에 대하여 다단계 화학발암 과정 중 어느 단계에서 재활성화되며 또한 구체적으로 어떤 기전으로 재활성화 되는지를 연구하기 위해 2단계 마우스 피부암 모델을 사용하였다. 마우스 피부암 모델은 다단계 화학발암 과정의 진행 상태를 비교적 쉽게 육안으로 관찰할 수 있을 뿐만 아니라 마우스의 다른 정상 장기에 비해 피부에서는 텔로머레이저 활성이 전혀 발현되지 않는 점 등을 고려할 때 본 연구에는 제일 적합하다고 사료된다.

우선 ICR 마우스를 이용하여 마우스 피부암 발생 과정 중 어느 단계에서 텔로머레이저 활성이 부활되는지에 대해 조사한 결과 acetone 만을 실험시작부터 22주까지 처리한

정상 피부 조직에서는 텔로머레이저 활성은 나타나지 않았으나 TPA promotion 10주에서 22주까지 얻은 비교적 early papilloma에 속하는 암조직에서는 텔로머레이저 활성이 검출되었다. 그리고 동일 주령의 papilloma 주위조직 (hyperplasia가 매우 활발하며 papilloma 생성전의 조직)에서는 텔로머레이저 활성이 검출되지 않았다. 이 결과로부터 텔로머레이저는 papilloma가 생성되기 시작 단계인 TPA promotion 6주부터 10주 사이에 재활성화 되는 것으로 사료된다. 따라서 향후 텔로머레이저는 지금까지 암의 확정 진단에 주로 사용되어져 왔던 형태학적 진단법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 조기 암 진단지표로서 사용 가능성이 높다고 사료된다.

최근 배양세포계를 이용한 연구에서 텔로머레이저의 재활성화 기전으로 단백질 인산화가 관련되어 있는 것으로 보고 (Kang et al., 1997; Li et al., 1997; Li et al., 1998) 됨에 따라 본 연구에서는 동물체내에서도 단백질 인산화가 관련되어 있는지 알아보기 위하여 4가지의 각기 다른 기전으로 발암촉진작용을 하는 화합물을 사용하였다. 즉 TPA는 세포내 protein kinase C (PKC)의 인산화 반응을 촉진시키는 것으로 알려져 있으며 okadaic acid는 단백질 탈인산화 효소인 protein phosphatase 2A의 저해제로 잘 알려져 있다 (Faisst et al., 1992; Karin et al., 1992; Rieckmann et al., 1992; Solanki et al., 1981; Sukanuma et al., 1992). 즉 PKC와 okadaic acid는 세포내의 단백질 인산화를 통해서 세포증식에 필요한 유전자들의 전사조절 인자인 AP-1단백질의 활성을 증가시키는 공통점을 가지고 있다. 한편 benzoyl peroxide는 유해산소를 경유한 발암촉진 작용을 하며 (Slaga et al., 1981) anthralin은 Ca²⁺ mobilization 기전으로 발암촉진 작용을 하는 것으로 알려져 있지만 (Batallora et al., 1995) 구체적인 작용기전은 아직 해명되어 있지 않은 상태이다.

본 연구에서 이들 4종류의 다른 발암촉진제 (tumor promoters)의 종류에 따라 텔로머레이저의 활성이 어떻게 변화하는 가에 대해 조사한 결과, TPA 대신 benzoyl peroxide, okadaic acid, anthralin 으로 처리하여 얻은 papilloma 조직 (promotion 10주에서 22주까지)에서도 TPA와 유사하게 텔로머레이저 활성이 나타나는 것을 발견하였으며 DMBA를 과량으로 단독 투여하여 얻은 papilloma에서도 텔로머레이저 활성이 있는 것으로 나타났다. 따라서 세포내의 단백질 인산화와 무관하다고 알려진 benzoyl peroxide 및 anthralin 그리고 DMBA만 단독 투여하여 발생한 papilloma 조직에서도 텔로머레이저의 활성이 관찰된 점 등을 고려하면 마우스 피부암 발생과정에서는 텔로머레이저 재활성화와 단백질 인산화와는 관련이 전

혀 없는 것으로 추정되며 향후 이에 대한 다른 추가 기전 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청의 기본연구사업비로 수행되었음.

참고 문헌

- Allshire, R.C., Dempster, M. and Hastie, N.D. (1989): Human telomeres contain at least three types of G-rich repeats distributed non-randomly. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 4611-4627.
- Battalora, M.S., Kruszewski, F.H. and DiGiovanni, J. (1993): Inhibition of chrysarobin skin tumor promotion in Sencar mouse by antioxidants. *Carcinogenesis*, **14**, 2507-2512.
- Battalora, M.S. and Johnston, D.A. (1995): The effects of calcium antagonists on anthrone skin tumor promotion and promoter-related effects in SENCAR mouse. *Cancer Letter*, **98**, 19-25.
- Bednarek, A., Budunova, I., Slaga, T.J. and Aldaz, C.M. (1995): Increased telomerase activity in mouse skin premalignant progression. *Cancer Res.*, **55**, 4566-4599.
- Chadeneau, C., Hay, K., Hirte, H.W., Gallinger, S. and Bacchetti, S. (1995): Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res.*, **55**, 2533-2536.
- Greider, C.W. (1991): Telomeres. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **3**, 444-451.
- Greider, C.W. (1996): Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **14**, 836-839.
- Faisst, S. and Meyer, S. (1992): Compilation of vertebrate-encoded transcriptional factors. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3-26.
- Hastie, C.B., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K. and Allshire, R.C. (1990): Telomere reduction in colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, **346**, 866-868.
- Hiyama, E., Yokohama, T., Tatsumoto, N., Hiyama, K., Imamura, Y., Murakami, Y., Kodama, T., Piatyszek, M.A., Shay, J.W. and Matsumura, Y. (1995): Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res.*, **55**, 3258-3262.
- Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokohama, T., Gazdar, A.F., Hiyama, K., Piatyszek, M.A. and Shay, J.W. (1996): Telomerase activity in human breast tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, **88**, 116-122.
- Kang, S.S., Kwon, T., Kwon, D.Y. and Do, S.I. (1999): Akt protein enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13085-13090.
- Karin, M. (1992): Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J.*, **6**, 2581-2590.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L. and Shay J.E. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-2015.
- Klein-Szanto, A.J.P. and Slaga T.J. (1982): Effects of peroxides on rodent skin: epidermal hyperplasia and tumor promotion. *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 30-34.
- Klein-Szanto, A.J.P. (1984): Morphological evaluation of tumor promoter effects on mammalian skin. In: mechanisms of Tumor Promotion. *Tumor Promotion and Skin Carcinogenesis*. Slaga T.J. (ed) vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL. pp.42-73.
- Lee, J.C., Jong, H.S., Yoo, C.G., Han, S.K., Shim, T.S. and Kim, Y.W. (1999): Telomerase activity in lung cancer cell lines and tissues. *Lung Cancer*, **2**, 99-103.
- Levy, M.Z., Allshopp, R.C., Fatcher, A.B., Greider, C.W. and Harley, C.B. (1992): Telomere end-replication problem and cell ageing. *J. Mol. Biol.*, **225**, 951-960.
- Li, H., Zhao, L.L., Funder, J.W. and Liu, J.P. (1997): Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16729-16732.
- Li, H., Zhao, L., Yang, Z., Funder, J.W. and Liu, J.P. (1998): Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol. Chem.*, **11**, 33436-33442.
- Rieckmann, P., Thevenin, C. and Kerl J.H. (1992): Okadaic acid is a potent inducer of AP-1, NF-kappaB and tumor necrosis factor alpha in human B lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **187**, 51,-57.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (1996): Telomerase activity in human cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, **8**, 66-71.
- Shay, J.W. and Bachetti S. (1997): A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, **33**, 787-791.
- Slaga, T.J. (1981): Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical generating compound. *Science*, **213**, 1023-1025.
- Solanki, V. and Slaga T.J. (1981): Specific binding of phorbol ester tumor promoters to intact primary epidermal cells from Sencar mice. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**, 2549.
- Suganuma, M., Fujiki, H., Sugari, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nskayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K. and Sugimura T. (1988): Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **85**, 1768-1771.
- Wright, W.E., Shay, J.W. and Piatyszek, M.A. (1995): Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3794-3795.
- Yan, P., Coindre, J.M., Benhattar, J., Bosman, F.T. and Guilou, L. (1999): Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology and proliferative activity. *Cancer Res.*, **59**, 3166-3170.
- Zakian, V.A. (1989): Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.*, **23**, 579-604.