

## 유방암 진행에 따른 Telomerase Activity 발현 증가

연세대학교 의과대학 <sup>1</sup>연세 암연구소, <sup>2</sup>암센터, <sup>3</sup>내과학교실, <sup>4</sup>외과학교실

박규현<sup>1</sup> · 라선영<sup>1,2,3</sup> · 김태수<sup>1</sup> · 이병찬<sup>4</sup> · 박세호<sup>4</sup>  
정현철<sup>1,2,3</sup> · 이원영<sup>1</sup> · 김주형<sup>1,2,3</sup> · 노재경<sup>1,2,3</sup>  
이경식<sup>4</sup> · 민진식<sup>1,2,4</sup> · 김병수<sup>1,2</sup>

### Increment of Telomerase Activity with Breast Cancer Progression

Kyu Hyun Park<sup>1</sup>, Sun Young Rha, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Tae Soo Kim<sup>1</sup>, Byung Chan Lee, M.D.<sup>4</sup>  
Sei Ho Park, M.D.<sup>4</sup>, Hyun Cheol Chung, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Won Young Lee, Sc.D.<sup>1</sup>  
Joo Hang Kim, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Jae Kyung Roh, M.D.<sup>1,2,3</sup>, Kyong Sik Lee, M.D.<sup>4</sup>  
Jin Sik Min, M.D.<sup>1,2,4</sup> and Byung Soo Kim, M.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Yonsei Cancer Research Center, <sup>2</sup>Yonsei Cancer Center, <sup>3</sup>Department of Internal Medicine,  
<sup>4</sup>General Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

**Purpose:** We studied the telomerase activity in normal and cancer tissues of the breast and then compared it to the clinical parameters.

**Materials and methods:** 36 paired normal and cancerous breast tissues were assayed for telomerase activity by PCR-based TRAP assay (telomeric repeat amplification protocol). In 17 cancer tissues, flow cytometric analysis for S-phase fraction was done.

**Results:** None of the normal breast tissue expressed telomerase activity while 23 out of 26 breast cancer tissue expressed telomerase activity (92%). Clinical parameters such as T-factor, tumor grade, hormone receptor expression, mitosis, S-phase fraction did not correlate with telomerase expression. However, telomerase activity increased with cancer progression such as; in a state of lymph node metastasis and in an advanced pathological stage.

**Conclusion:** Telomerase activity was expressed only from cancer tissues. And this expression increased with cancer progression suggesting a possible therapeutic target in breast cancer.

---

**Key Words:** Breast cancer, Telomerase

## 서 론

세포가 정상적 노화 현상을 극복하기 위해서는 transformation과 immortalization이 발생해야 한다. 즉, immortality를 획득하기 위해서는 서로 다른 기전에 의해 조절되는 mortality stage 1 (M1)과 mortality stage 2 (M2)를 극복할 수 있어야 한다. M1 stage는 정상세포가 더 이상 분열하지 못하고 소멸되는 세포사멸 시기로 바이러스 종양단백 혹은 유전자 변이 (p53, Rb 유전자)에 의해 극복된다(1~2). 종양 유전자에 의해 M1 stage를 극복한 세포는 M2 stage가 발생할 때까지 세포증식능이 유지되어 생존기간이 연장된다. 그러나 대부분의 세포는 M2 stage를 극복하지 못하고 사멸하며, 극히 일부의 세포만 telomerase가 활성화되어 M2 stage를 극복하고 immortality를 얻게 된다(3).

인간의 telomere는 모든 염색체 말단부위에 TTAGGG 6개 핵산이 규칙적 반복상태로 존재하며 'end replication problem'에 의해 매 세포 분열마다 손실이 발생한다(4~6). Telomere는 염색체 말단부위에서 염색체가 서로 융합하거나 재조합하는 것을 방지할 뿐만 아니라 핵막주위의 nuclear matrix에 염색체를 부착시킴으로써 DNase에 의한 염색체의 파괴를 방지시킨다. 따라서 반복적인 telomere의 손실에 의해 말단 부위에 telomere가 없는 염색체는 M1 세포사멸 기전을 활성화하게 된다(7).

기존의 telomerase activity 측정 방법은 많은 수의 세포가 필요할 뿐더러 민감도도 낮아서 주로 복수에서 채취된 암세포로 시행되었다. 그러나 민감도가 매우 증가된 polymerase chain reaction-based 방법 (telomeric repeat amplification protocol: TRAP)이 개발됨에 따라 아주 적은 양의 조직으로도 telomerase의 활성 측정이 가능하게 되었다(8). 증가된 telomerase 활성은 난소암에서 최초로 보고된 이래, 혈액암, 위암, 폐암, 간암, 대장암, 뇌종양, 전립선암, 두경부암, 유방암등 거의 모든 암에서 관찰되었다. 특히 증가된 telomerase 활성

은 위암과 neuroblastoma에서 환자의 불량한 예후와 관련이 있음으로 보고되었다. 그러나 대부분의 정상 조직에서는 telomerase의 활성이 거의 관찰되지 않고 있다(9~25).

본 연구에서는 동일인에서 채취된 유방암 조직과 정상 유방 조직에서 telomerase의 발현을 조사한 다음 기존의 예후 인자와의 상관성을 조사함으로써 유방암에서 telomerase 활성의 임상적 의의를 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 1) 검 체

유방암 환자로부터 채취한 정상 조직과 암조직 36쌍을 대상으로 하여 실험을 진행하였다. 조직은 수술즉시 채취하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 실험을 진행하였으며, 이들 신선조직에서 lysate를 추출하였다.

### 2) Telomerase assay

조직을 200  $\mu\text{l}$ 의 냉장 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 10% glycerol, 5mM beta-mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride, 0.5% 3-(3-cholamidopropyl-dimethyl-amino-1-propanesulfonate) 내에서 조직 균질화기를 사용하여 20,000 rpm으로 균질화시켰으며, 이 과정은 cold room에서 시행하였다. Suspension을 얼음 위에서 30분간 방치한 다음 15분간  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 원심분리하여 상층액을 분리하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 급속 냉동시켰다. 단백질 정량을 Bradford assay (Bio-rad)법에 의해 시행한 다음 Kim등(9)의 방법에 의해 TRAP assay를 시행하였다. TRAP reaction은 20 mM Tris-HCl (pH 7.9), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 63 mM KCl, 0.005% Tween 20, 1 mM EGTA, 50  $\mu\text{M}$  deoxynucleoside triphosphate, 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA, 1 $\mu\text{g}$  T4 gene 32 protein, T4 polynucleotide kinase에 의해 ( $\alpha^{32}\text{P}$ )ATP가 부착된 0.1  $\mu\text{g}$  TS oligonucleotide (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')를 혼합한 50  $\mu\text{l}$  용량으로 시행하였다. 실온에서 20

분간 방치함으로써 telomerase에 의해 TS primer가 연장되도록 하고 나서 이 반응물질을 94°C에서 3분간 가열함으로써 telomerase를 비활성화 시킨 다음, (5'-CCCTTACCCCTTACCCCTTACCCCTTA-3')의 CX primer 0.1 ug과 2 unit의 Taq polymerase가 함

유되어있는 tube에 첨가하였다. 이 혼합물을 94°C에서 45초, 50°C에서 30초, 72°C에서 90초간 반응하는 cycle을 32회 반복시켰다. PCR 산물을 15%의 non-denaturing polyacrylamide gel에서 분리시킨 후 X-ray film에 감광시키고 하룻밤 exposure 후 전형적인 6 bp의 사다리 모양이 densitometer에 의해 관찰되고 band density 측정이 가능한 경우 만

**Fig. 1.** TRAP assay of the cancer tissues. 1: 293 positive cell line, 2-6: cancer tissues from different patients, (-): TRAP assay without RNase pre-treatment, (+): TRAP assay with RNase pre-treatment.

**Fig. 2.** Comparison of telomerase expression between cancer and normal tissues by serial sample dilution. 293: positive cell line, C: cancer tissue, N: normal tissue, 1:6 ug loading, 2:0.6 ug loading, 3:0.06 ug loading.

을 양성으로 판정하였다. 각 검사 시마다 양성 대조 군으로 293 세포주 (human embryonic kidney cell line)의 추출물을 사용하였다(Fig. 1). 각 검체는 Hiyama등(12)이 시행한 방법에 따라 0.06 ug, 0.6 ug, 6 ug으로 희석하여 loading 한 후, 0.06 ug 검체에서부터 telomerase activity가 나타나는 경우를 high expression, 0.6 ug 검체에서부터 나타나는 경우를 intermediate expression, 6.0 ug 검체에서만 나타나는 경우를 low expression으로 정하였다. 세 가지 검체 모두에서 band density를 측정할 수 없는 경우를 음성으로 하였다(Fig. 2).

Table 1. Patient characteristics

Age	median 49 (range 36~66)
Size	median 3 cm (range 1~7 cm)
T-factor	
T0	1
T1	6
T2	25
T3	3
T4	1
Node	
negative	19
positive	17
Stage	
0	1
I	6
IIA	11
IIB	12
IIIA	5
IIIB	1
Estrogen receptor	
negative	25
positive	11
Progesterone receptor	
negative	25
positive	11
Histologic grade	
1	12
2	14
3	9

3) Proliferation assay

Flowcytometry는 조직을 phosphate-buffered saline (PBS)용액에서 잘게 썰은 후 mesh로 filter하여 단세포 화하였다. 세척후 viable 세포 수를 10,000/ul로 조정 한 다음 분석하였다. 현미경하에서 mitosis count는 400배 시야 10 fields에서 mitosis가 발생한 세포를 센 후 합하였다.

4) 병리학적 병기 설정

병리학적 병기는 TNM staging classification, 분화도는 WHO criteria에 의해 정하였다.

5) 통계적 방법

각 군의 categorical analysis는 chi-square test 및 Mann-Whitney 법으로 시행하였다.

결 과

1) 대상 환자의 임상적 특성

36예의 중앙연령은 49세 (범위: 36~66세)였다. T-factor상 T0 1예, T1 6예, T2 25예, T3 3예, T4 1예 였으며, 림프절 전이가 없는 경우가 19예였다. 병리학적 병기는 병기 0 1예, I 6예, II 23예, III 6예였다. 그 외 임상적 특성은 Table 1과 같다.

2) 유방 조직에서 telomerase 발현 비교

정상 유방 조직 36예 모두에서 telomerase activity는 관찰되지 않았다. 유방암 조직 중 33예 (92%)에서 telomerase activity가 관찰되었으며, 이

Table 2. Telomerase expression from paired normal and cancer breast tissues

	Negative	Positive		
		low	intermediate	high
Normal	36(100%)	0	0	0
Cancer	3( 8%)	8(22%)	16(45%)	9(25%)

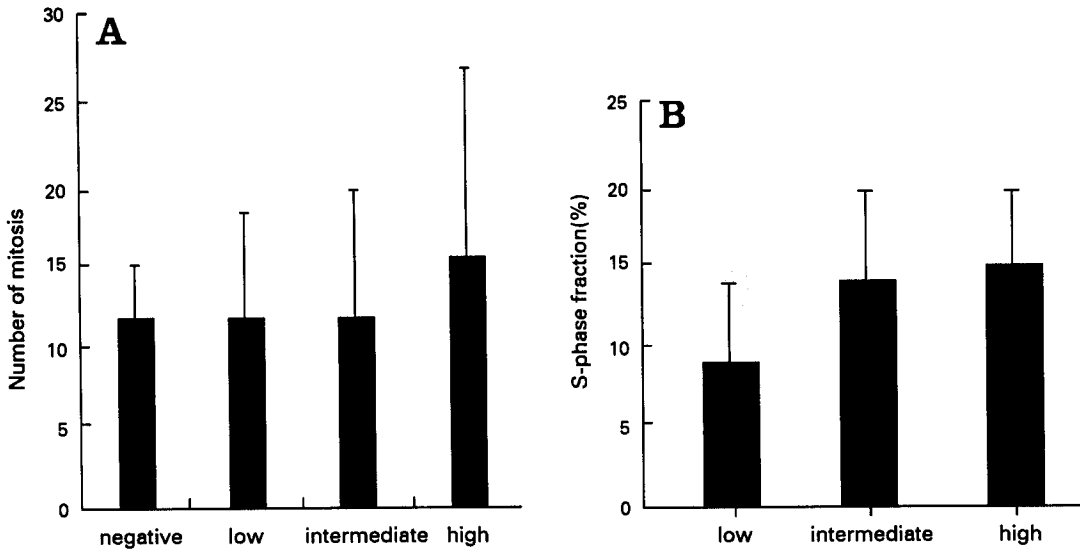


Fig. 3. Comparison of telomerase activity with proliferation index. A: number of mitosis B: S-phase fraction by flow cytometry(%).

Table 3. Comparison of telomerase expression by stages

	Negative-low	intermediate-high	p-value
T0-T2	11	21	
T3-T4	0	4	0.21
Node negative	9	10	
positive	2	15	0.02
Stage			
0-II	11	19	
III	0	6	0.004

중 high expression은 9예 (25%), intermediate expression은 16예 (45%), low expression은 8예(22%)에서 관찰되었다(Table 2).

3) 각 임상 인자에 따른 telomerase 발현 비교

Histologic tumor grade, estrogen receptor, progesterone receptor 발현에 따른 telomerase의 발현도에는 차이가 없었다. 중앙 증식 인자인 mitotic index와 telomerase 발현과의 상관성은 관찰하지 못하였다. 반면 S-phase fraction (%)은 telomerase의 발

현이 증가함에 따라 같이 증가하는 경향이 관찰되었으나 검체별 variation이 심하였다(Fig. 3).

4) 병기에 따른 telomerase 발현 비교

암의 크기와 telomerase 발현과의 상관성은 관찰할 수 없었다. 반면, 림프절 전이가 있는 경우 88% (15/17)에서 telomerase activity가 intermediate-high level로 관찰되었으나 림프절 전이가 없는 경우는 53% (10/19)에서 intermediate-high level이 관찰되었다. 병기 II의 경우 6예 모두에서 telomerase activity가 intermediate-high level로 관찰되었으며, 병기 0-II의 경우 63%에서 intermediate-high level로 관찰되었다 (Table 3).

고 찰

Telomerase는 RNA-dependent DNA polymerase로 TTAGGG의 염기서열을 반복적으로 생성시킴으로써 세포분열시에 발생한 유전자 손실을 보충하는 중요한 역할을 담당하고 있다(3). Telomerase의 발현은 난소와 고환의 germline 세포에서는 관찰

된 반면, 정상 체세포에서는 관찰되지 않는다(13~17). 따라서 정상 체세포는 수 차례의 세포분열 끝에 telomere 길이가 일정길이 이하로 감소하면 더 이상 분열하지 못하고 사멸한다. 그러나 일부 세포에서 telomerase의 활성이 재 가동됨으로써 손실된 telomere를 보충하여 immortality를 나타낸다. 본 연구에서도 유방암 환자의 정상 유방 조직에서는 전 예에서 telomerase의 발현이 관찰되지 않았다. 그러나 유방암 조직에서는 92%에서 발현이 관찰되었으며 그 발현정도가 조직에 따라 다름을 관찰하였다. 일반적으로 암의 진단은 생물학적 특성인 분열능의 조사에 의하기보다는 병리학적인 형태의 변화에 의해서 시행되므로, 대부분의 암세포는 M1 사멸기전은 극복되어 있지만 반드시 M2 기전이 극복되어 있지는 않다. 즉 1개의 암세포가 M1 stage에서 transformation되면, 이 세포는 충분히 M2 stage를 극복하지 않고도 임상적인 종양 형성이 가능하게 되는데 이는 이들 세포가 M2 사멸기전에 이르기 전에 적어도 50번은 분열할 수 있기 때문이다. 이와 같이 M1과 M2 사멸기전 사이에서 계산된 세포 분열 수는 transformation이 된 세포주에서 계산한 결과이기 때문에 실제 인체 내에서 이 기간에 발생하는 세포 분열수에 대해서는 전혀 정보가 없지만 암환자의 치료방향은 암조직이 얼마나 많은 immortalized 세포로 구성되어 있느냐에 따라 정해질 수도 있음을 제시하고 있다(26).

반면, 암 진행의 전 단계인 양성 종양조직에서는 telomerase의 활성이 관찰될 뿐 아니라 여러 암 조직에서는 감소된 telomere의 길이도 보고되었다(27~30). 따라서 telomere의 길이가 짧은 암은 길이가 긴 암에 비해 세포분열이 보다 많이 발생하였다고 가정할 수가 있으며, 그 결과 전이 암조직에서의 telomere 길이는 정상 조직에 비해 차이가 있으므로 즉, 보다 길거나 짧음을 발견하였다(31,32). 이러한 근거로서 terminal restriction fragment (TRF) 길이는 세포증식의 과거력으로 이용될 수 있으며 증식능을 대변한다고 할 수 있다. 반면 pre-M2 stage에 있는 암세포는 telomere의 길

이가 짧지도 않을 뿐 더러 telomerase의 활성이 증가되어 있지 않다고 해석할 수가 있다. 이러한 이유에서 현재까지 보고된 여러 문헌에서 telomere의 변화 및 telomerase의 발현이 암조직에서 관찰되나 세포증식과의 상관성은 확인되지 않고 있다(31~33). 본 연구에서도 종양의 크기 (T-factor), 암 분화도, 호르몬 수용체 발현 등의 기존의 예후 인자와 telomerase 발현과의 상관성은 관찰할 수 없었다. 또한 세포 증식인자인 mitosis number, flow cytometry에 의한 S-phase fraction(%)은 telomerase 활성이 많은 암에서 그 정도가 증가하는 경향만 관찰할 수 있어 추후 이들 조직에서 관찰되는 telomere의 변화와의 상관성을 조사하고 있다 (manuscript in preparation).

M1 stage 활성화 기전이 다양한 또 다른 이유로 telomere는 heterochromatic하여 telomere 근처의 유전자가 비 활성화되어 있을 수 있다는 가정이다(34,35). 따라서 telomere의 길이가 긴 짧은 세포는 subtelomeric heterochromatin도 상대적으로 길기 때문에 비교적 많은 유전자가 silent 상태로 존재한다. 그러나 세포가 노화하고 telomere의 길이가 짧아지게 되면 subtelomeric heterochromatin의 길이도 상대적으로 짧아지게 되고 마침내 M1 세포 사멸기전이 작동하기 시작한다는 것이다. 그러나 telomerase가 활성화되는 경우에는 여러 가지 유전자의 변화가 있음에도 불구하고 세포는 생존할 수 있다. 이러한 가정은 본 연구에서도 림프절 전이가 발생할 수록, 혹은 유방암의 병기가 진행할 수록 telomerase activity가 증가함으로 관찰된 점과 일치한다 하겠다. 즉, 암이 진행할수록 여러 가지 유전자 변화가 발생하며 그 중 일부에서 telomerase 활성화 유전자도 발현한다고 생각된다. 이러한 telomerase의 발현은 암이 진행된 시기에서만 발현되는 것이 아니고 DCIS에서부터 발현되기 시작하며(36), 암이 진행하여 유전자의 변이가 증가할 수록 전술한 바와 같이 telomerase를 발현하는 세포가 증가할 것으로 생각된다. 본 연구에서도 pure DCIS에서 telomerase의 발현이 관찰되었으며 각 침윤성 유방암에 존재하는

DCIS component와 telomerase activity와의 상관성을 관찰할 수 없음이(data not shown) 이를 뒷받침한다 하겠다.

기존의 telomerase activity 측정 방법은 많은 수의 세포가 필요할 뿐더러 민감도도 낮아서 주로 복수에서 채취된 암세포로 시행되었다. 최근 들어 민감도가 매우 증가된 polymerase chain reactionbased 방법 (telomeric repeat amplification protocol: TRAP)이 개발됨에 따라 아주 적은 양의 조직으로도 telomerase의 활성 측정이 가능하게 되었다(9). 그러나 이 방법의 문제점은 객관적인 수치화가 어려워 임상적으로 응용하기에는 여러 가지 제약점이 있다(37). 또한 PCR Taq-polymerase의 억제물질에 의한 위 음성 가능성이 기술적으로 상존하고 있다는 점이다. 특히 세포 혹은 조직의 추출물에 다량의 단백질이 존재할 경우 이와같은 현상이 자주 나타나기도 한다. 본 연구에서도 3예에서 telomerase activity 발현이 관찰되지 않아 이들의 위음성 가능성을 조사하기 위해 serial dilution하여 TRAP assay를 시행하였으나 telomerase activity는 관찰하지 못하였다. 또한 Taq-polymerase 억제 물질의 존재 가능성을 조사하기 위해 telomerase 발현 대조군인 293 세포주의 세포 추출물에 telomerase 음성인 조직의 추출물을 첨가하였을 때 293 세포주 추출물의 telomerase activity는 영향을 받지 않아 위음성의 가능성을 배제할 수 있었다 (data not shown). 따라서 이들 세 유방암 조직에서는 아직까지 telomerase activity 활성화가 이루어지지 않았거나 telomerase 이외의 다른 알려지지 않은 기전에 의해 세포분열과 생존이 지속될 것으로 생각하였다. 반면 암 조직에서 발현되는 telomerase activity는 검체를 Hiyama등(12) 시행한 바와같이 반복 희석하여 TRAP assay 시행 시에 activity가 점차 감소함을 확인할 수 있어 이들의 발현을 low, intermediate, high expression group으로 분류하여 비교할 수 있었다. 그러나 이 방법은 densitometer에 의해 scan된 band density를 비교한 semi-quantitation 방법이므로, 이를 보다 수치화하기 위해 telomerase

activity를 inhibition 하거나 telomere length를 측정하여 이들의 변화와 임상양상과의 관계를 조사하고 있다 (manuscript in preparation).

암의 치료 성적은 현재까지 multimodality treatment 개념에 의해 괄목할만한 성장을 이루었으나 아직도 50%의 환자는 적절한 치료를 시행 받음에도 불구하고 사망하게 된다. 따라서 암의 치료율을 증가시키기 위해 시행되는 새로운 시도는 크게 두 가지로 대별되고 있다. 한 가지는 새로운 약제의 개발이며 또 다른 한가지가 tumor biology를 이해한 후 이를 억제시키는 biological treatment의 개발이다. 최근 들어 cell biology, molecular biology가 발달함에 따라 점차 biotherapy에 대한 관심이 증가하고 있다. Telomere와 telomerase는 proliferation index, mitotic clock으로 사용할 수 있다는 개념이 제시되면서 이 두 기능을 치료 target으로 사용하려는 개념을 설립하게 되었다 (38~41). 특히 telomere는 그 동안의 proliferation history 및 future proliferation capacity를 나타내므로 이를 정확하게 분석할 수 있다면 현재 시행하는 표준 약물치료의 schedule을 정하는 기본 ruler가 될 수 있다고 가정할 수가 있다. 또한 telomerase는 암 세포 혹은 암조직의 변화된 유전자 상태와 immortality를 나타내므로 이러한 immortality를 나타내는 세포 비를 계산할 수 있다면 telomerase 역시 치료계획을 설립하는 근거가 될 수 있을 뿐 아니라 이 자체가 바로 치료 target으로 이용될 것으로 기대한다.

## 결 론

유방암 조직의 92%에서 telomerase activity를 관찰하였으며, 정상조직에서는 관찰되지 않았다. 따라서 유방암 조직에서 관찰되는 telomerase activity의 임상적 의의 조사와 activity를 보다 객관화하는 방법의 개발이 추후 필요하다.

## 참 고 문 헌

1. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for

- both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 1991; 196: 33-39.
2. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 3088-3092.
  3. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256: 271-282.
  4. Allshire RC, Dempster M, Hastie ND: Human telomerase contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 4611-4627.
  5. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere function in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990; 346: 866-868.
  6. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-573.
  7. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992; 225: 951-960.
  8. Landberg G, Nielsen NH, Nilsen P, Emdin SO, Cajander J, Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 549-554.
  9. 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.
  10. Zhang W, Piatyszek MA, Kobayashi T, Estey E, Andreeff M, Deisseroth AB, Wright WE, Shay JW. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 799-803.
  11. Mao L, El-Nagger AK, Fan YH, Lee JS, Lippman SM, Kayser S, Lotan R, Hong WK. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 1996; 56: 5600-5604.
  12. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3258-3262.
  13. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ, Johnston DA, Aldaz CM. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 11-16.
  14. Wan M, Li WZ, Duggan BD, Felix JC, Zhao Y, Dubeau L. Telomerase activity in benign and malignant epithelial ovarian tumors. *J Natl Vancr Inst* 1997; 89: 437-441.
  15. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610-614.
  16. Yoshida K, Sugino T, Tahara H, Woodman A, Bolodeoku J, Nargund V, Fellows G, Goodison S, Tahara E, Tarin D. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection of exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 1997; 79: 362-369.
  17. Gupta J, Han LP, Wang P, Gallie BL, Bacchetti S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1152-1157.
  18. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW, Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res* 1996; 56: 218-222.
  19. Mutirangura A, Supiyaphun P, Triekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhai A, Yenrudi S, Voravud N. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3530-3533.
  20. Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, Hirohisa U, Inoue M. Telomerase activity in gynecological tumors. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 2023-2028.
  21. Ueda M, Ouhtit A, Bito T, Nakazawa K, Lubbe J, Ichihashi M, Yamasaki H, Nakazawa H. Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. *Cancer Res* 1997; 57: 370-374.
  22. Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, Kajiyama G, Ide T. Telomerase activity in human liver tissue: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 2734-2736.
  23. Califano J, Ahrendt SA, Meiningner G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res* 1996; 56: 5720-5722.
  24. Lin Y, Miyamoto H, Fujinami K, Uemura H, Hosaka M, Iwasaki Y, Kubota Y. Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 929-932.
  25. Hohaus S, Cavallo S, Bellacosa A, Genuardi M, Galli J, Cadoni G, Almadori G, Lauriola L, Litwin S, Maurizi M, Neri G. Telomerase activity in human



- laryngeal squamous carcinomas. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1895-1900.
26. Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D, Van der Hagen BA. E6 of human papilloma virus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* 1993; 8: 1407-1413.
  27. Kyrion G, Liu K, Liu C. RAPI and telomere structure regulate telomere position effects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1993; 7: 1146-1159.
  28. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Bruce FA, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10114-10118.
  29. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-460.
  30. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO* 1992; 11: 1921-1929.
  31. Rogalla P, Rohen C, Bonk U, Bullerdiek J. Telomeric repeat fragment lengths are not correlated to histological grading in 85 breast cancers. *Cancer Letters* 1996; 106: 155-161.
  32. Rogalla P, Rohen C, Henning Y, Deichert U, Bonk U, Bullerdiek J. Telomere repeat fragment sizes do not limit the growth potential of uterine leiomyomas. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 175-182.
  33. Landberg G, Nielsen NH, Nilsen P, Emdin SO, Cajander J, Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 1997; 57: 549-554.
  34. Wright WE, Shay JW. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* 1992; 8: 193-197.
  35. Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL. Position effects of *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* 1990; 63: 751-762.
  36. Bednarek AK, Sahin A, Brenner AJ. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 11-16.
  37. Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acid Res* 1995; 23: 3794-3795.
  38. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Amgen EST Program, Bass MB, Arruda I, Robinson MO. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; 275: 973-977.
  39. Raymond E, Sun D, Chen SF, Windle B, Von Hoff DD. Agents that target telomerase and telomeres. *Pharmaceutical Biotech* 1996; 7: 583-591.
  40. de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2882-2885.
  41. Parkinson EK. Do telomerase antagonists represent a novel anti-cancer strategy? *Br J Cancer* 1996; 73: 1-4.