

Weitere Forschungen beschrieben in dem Interphasekern von ALT Zelllinien, jedoch nicht in telomerase-positiven immortalen oder telomerase-negativen sterblichen Zellen, sogenannte „promyelocytic leukemia bodies“ – PML-Körper, deren Funktion noch unbekannt ist. Die ALT assoziierten PML-Körper enthielten ein PML-Protein, Telomer-DNA und telomerbindende Proteine, wie TRF1 und TRF2, sowie Proteine, die bei der DNA-Synthese und Rekombination beteiligt sind (Yeager *et al.*, 1999). Kass-Eisler und Greider vermuten, dass ähnlich wie in der Hefe alle TMM – „telomere maintenance mechanism“ – zusammen auftreten, jedoch die Telomerase der dominierende Weg zur Erhaltung der Telomere ist. Unter bestimmten Umständen kommt es dann zur Selektion des einen oder anderen Mechanismus (Kass-Eisler & Greider, 2000).

2.3 Telomerase - ein Antitumortarget?

Die Erkenntnisse über Bestandteile, Funktion und Regulation des Enzyms Telomerase haben in den vergangenen Jahren zugenommen und bieten heute eine Vielzahl von Angriffsmöglichkeiten zur Hemmung der Aktivität der Telomerase (Abbildung 2-7).

Mögliche Inhibitoren der Telomerase

- können potentiell an der hTERT und hTR Transkription und RNA Prozessierung angreifen,
- können hTERT und hTR RNA zerstören bzw. ihre Bindungsstellen blockieren,
- können translationale und post-translationale Modifikationen der hTERT verhindern,
- können die Zusammensetzung des Enzyms und dessen aktives Zentrum beeinflussen,
- können die Translokation in den Nukleus stoppen oder
- an den Telomeren als Substrat der Telomerase angreifen.

Die Bedeutung der Telomerase für die Zellproliferation zeigen besonders die Studien zur mTR „knock-out“ Maus (Blasco *et al.*, 1997). Hierbei handelt es sich um Mäuse, in denen beide Allele der Telomerase-RNA ausgeschaltet worden. Diese mTR-negativen Mäuse entwickeln sich innerhalb der ersten sechs Generationen, abgesehen von kleinen phänotypischen Veränderungen, relativ symptomfrei. Jedoch sind deutliche Telomerverkürzungen, je Generation zusammengehend mit Abberationen und Fusionen von Chromosomen zu beobachten (Lansdorp, 1997). In der siebenten Generation treten markante Veränderungen in stark proliferativen Geweben, wie Hoden, Knochenmark und Milz, auf; diese Generationen sind nicht mehr fortpflanzungsfähig (Herrera *et al.*, 1999; Herrera *et al.*, 2000). Das Auftreten der Schädigungen erst nach einer sogenannten „Lag“-phase von sieben Generationen bestätigt die Hypothese, dass eine Inhibierung der Telomerase erst nach Verkürzung der Telomere wirksam wird. Aufgrund der sehr langen Telomere von ungefähr 40 kb in der Maus im Gegensatz zu 3-10 kb in menschlichen Zellen ist diese „Lag“-phase bei der Behandlung von menschlichen Zellen glücklicherweise viel

geringer, was von Bedeutung beim Einsatz von Hemmstoffen gegen die Telomerase in Tumorzellen sein kann.

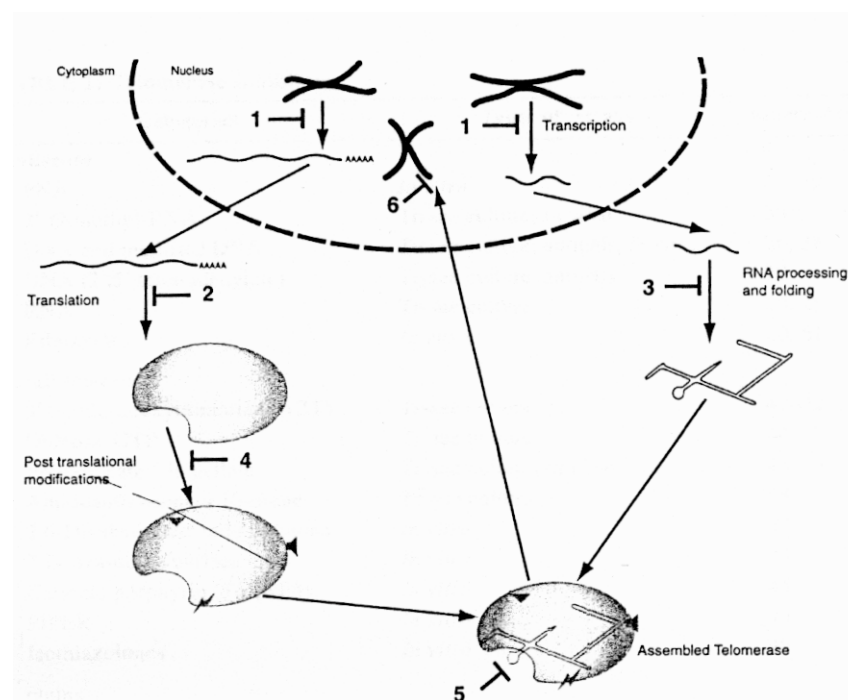


Abbildung 2-7 Schematische Darstellung der Angriffsmöglichkeiten am Enzym Telomerase nach (Lichtsteiner *et al.*, 1999) (1) Hemmung der Transkription, (2) Hemmung der Translation der katalytischen Untereinheit, (3) Oligonukleotid-vermittelter Angriff an der Telomerase-RNA, (4) posttranslationale Hemmung, (5) Hemmung des Enzymkomplexes, (6) Hemmung der Telomerase durch Veränderungen des Telomersubstrates

Die Aufklärung der Struktur der RNA-Komponente und der katalytischen Untereinheit ermöglichten vielseitige Angriffspunkte zur Hemmung der Telomerase. Schon vor der Isolierung der Bestandteile der Telomerase wurde die Wirkung von G-quartett DNA-Struktur bindenden Molekülen zur Hemmung der Telomerase beschrieben (Zahler *et al.*, 1991). Diese weiterentwickelten Moleküle wie Anthraquinone, kationische Porphyrine und Akridine sind im zellfreien Assay sehr potente Inhibitoren der Telomerase (Kelland, 2000). Sehr vielversprechend sind weiterhin die Anwendung von antisense-Konstrukten gegen hTR, hTERT und die telomerase-bindenden Proteine, sowie Hemmstoffe der reversen Transkriptase.

Die erste Anwendung von antisense-Molekülen, die die RNA-Komponente angriffen, beschrieben Feng *et al.* in HeLa-Zellen (Feng *et al.*, 1995). Weitere Inhibitoren, welche direkt gegen die Matrize der Telomerase-RNA gerichtet sind und somit die de-novo Synthese von Telomer-DNA blockieren, sind retrovirale antisense-Konstrukte (Bisoffi *et al.*, 1998), „Peptid Nucleic Acids“ -PNA (Norton *et al.*, 1996), Phosphodiester DNA Oligonukleotide (Glukhov *et al.*, 1998), Ribozyme (Kanazawa *et al.*, 1996). Auch Nukleosidderivate (Fletcher

et al., 1996), phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide (Matthes & Lehmann, 1999; Mata *et al.*, 1997) oder 2'-O-methyl-RNA (Pitts & Corey, 1998) sind ebenfalls als sehr wirksam beschrieben worden. Sehr erfolgreich ist die Anwendung von 2-5A-antisense Telomerase-RNA in-vivo und in-vitro. 2-5A aktiviert in der Zelle die RNase L, welche nach Hybridisierung der spezifisch gebundenen antisense-RNA die natürliche RNA enzymatisch abbaut (Mukai *et al.*, 2000; Koga *et al.*, 2001). Die Hemmstoffe, die direkt die reverse Transkriptaseaktivität der Telomerase angreifen, wie Azidothymidin (AZT) (Melana *et al.*, 1998) und Nukleosidanalogs (Gomez *et al.*, 1998), haben dagegen den Nachteil einer begrenzten Spezifität und Wirksamkeit aufgrund ihrer Wirkung auch gegen andere Polymerasen.

Mit der Identifizierung der katalytischen Untereinheit gelang es durch Expression einer mutierten inaktiven katalytischen Untereinheit eine Hemmung der Telomerase und die Induktion des Zelltodes in menschlichen Zellen hervorzurufen (Hahn *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 1999). Die mutierte Untereinheit wirkt hier als dominant-negative Mutante über die endogene exprimierte katalytische Untereinheit. Diese Ergebnisse berechtigen zum ersten Mal, das Telomeraseprotein als möglichen Angriffspunkt zur Hemmung der Telomerase anzusehen.

Neuere Veröffentlichungen zeigen eine Anwendung der Telomerase auf dem Gebiet der Immuntherapie auf. Die Telomerase wird von einer großen Anzahl von menschlichen Tumoren exprimiert und ist deshalb ein guter Kandidat zum Einsatz als universelles tumor-assoziiertes Antigen. Vonderheide *et al.* beschrieben hTERT-spezifische Peptide mit Bindungsmotiven für MHC-Klasse I Antigene des Typs HLA-A 2.1 auf Tumorzellen (Vonderheide *et al.*, 1999). In einer großen Anzahl von Gesunden und Patienten mit Prostata Tumoren fanden Minev *et al.* hTERT-spezifische, zytotoxische T-Lymphozyten, die in der Lage waren HLA-A2+ Zellen von Brust-, Darm- und Hautkrebstumoren zu lysieren (Minev *et al.*, 2000).

Die Strategien zum Einsatz der Telomerase sind vielseitig und komplex. Erste Erfolge auch in-vivo mit den 2-5A antisense Konstrukten, sowie der Weg in die Immuntherapie versprechen für die Zukunft hoffnungsvolle Möglichkeiten bei der Anwendung der Telomerase in der Tumorthherapie.