

2.2 Telomere und Telomerase

2.2.1 Telomere

Als Telomere werden die Enden der Chromosomen von Eukaryonten bezeichnet (Abbildung 2-2). Die Bezeichnung Telomere stammt aus dem griechischen und setzt sich aus den Wörtern telos, dt. Ende, und meros, dt. Ort, zusammen.

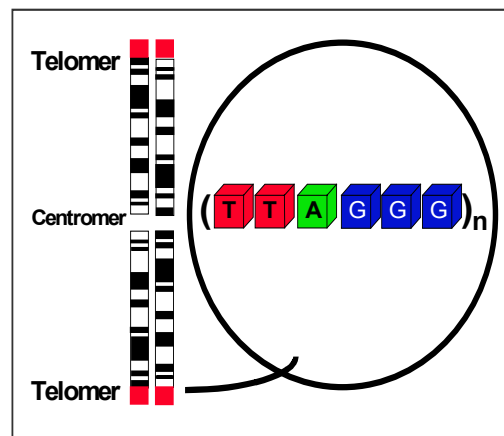


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der Struktur der humanen Chromosomenenden

Die späteren Nobelpreisträger Müller und McClintock erkannten in den 30er und 40er Jahren im Rahmen von anderen Untersuchungen als erste, dass die Telomere eine schützende Funktion für die Chromosomenenden haben (Müller, 1938; McClintock, 1941). Anfang der 70er Jahre gelang es Blackburn und Gall, die Telomerasequenz bei dem Protozoon *Tetrahymena* aufzuklären, welche die repetitive Sequenz TTGGGG darstellt (Blackburn & Gall, 1978). Diese Sequenzen sind bei Eukaryonten und höheren Pflanzen nahezu identisch (siehe Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3 Telomerasequenzen unterschiedlicher Organismen

Organismus	Telomerasequenz	Referenz
Euplotes, Oxytricha, Stylonychia	TTTTGGGG	(Preston, 1997)
Tetrahymena	TTGGGG	(Blackburn & Gall, 1978)
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	T(G) ₂₋₃ (TG) ₁₋₆	(Shampay <i>et al.</i> , 1984)
Ascaris	TTAGGC	(Muller <i>et al.</i> , 1991)
Arabidopsis	TTTAGGG	(Richards & Ausubel, 1988)
Maus	TTAGGG	(Kipling & Cooke, 1990)
Mensch	TTAGGG	(Moyzis <i>et al.</i> , 1988)

Die ersten humanen Telomere wurden 1988 durch Moyzis *et al.* isoliert (Moyzis *et al.*, 1988). Beim Menschen handelt es sich um Wiederholungen der Sequenz (TTAGGG)_n, die Tausende von Basenpaaren umfassen kann.

Die Telomere haben zwei wichtige Funktionen. Zum einen stabilisieren sie die Chromosomenenden, indem sie diese vor Rekombination und Degradation schützen. An Hefen konnte gezeigt werden, dass das Entfernen von Telomeren einen großen Verlust von Basensequenzen auf dem betreffenden Chromosom nach sich zieht (Sandell & Zakian, 1993). Bisher konnte nicht genau nachgewiesen werden, auf welche Weise die Telomere diesen Schutz bewerkstelligen. Es werden aber Regulationen durch telomerbindende Proteine vermutet, die den Abbau von Chromosomenenden durch Enzyme verhindern (de Lange, 1992) (siehe Kapitel 2.2.2). Zum anderen spielen Telomere eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation (siehe Abbildung 2-3). Bei der semikonservativen Replikation benötigt die DNA-Polymerase einen RNA-Primer, der sich an die DNA-Stränge bindet, um die DNA-Polymerisation in 5'-3'-Richtung zu beginnen. Nach Beendigung der Polymerisation wird der Primer abgebaut und durch DNA ersetzt. Die Primer am äußersten 5'-Ende der neusynthetisierten Tochterstränge können nicht ersetzt werden (Olovnikov, 1973; Watson, 1972). Somit würden bei jeder Zellteilung genetische Informationen verloren gehen. Dies wird als das Endreplikationsproblem bezeichnet.

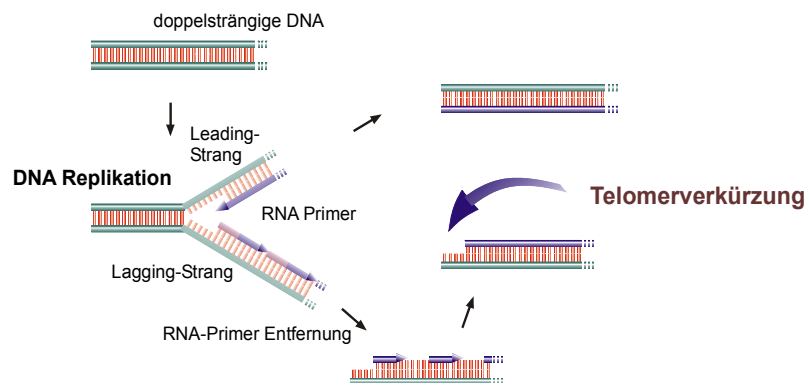


Abbildung 2-3 Darstellung des Endreplikationsproblem

Die DNA-Polymerisation wird beginnend an einem RNA-Primer in 5'-3'-Richtung durchgeführt. Am Leading-Strang findet eine vollständige Replikation statt. Am Lagging-Strang können zuerst nur kurze Fragmente (Okazaki-Fragmente) synthetisiert werden, die dann nach der RNA-Primer-Entfernung vervollständigt werden. Die Primer am 5'-Ende des Lagging-Stranges können nicht durch Neusynthese ersetzt werden. Somit kommt es zur Telomerverkürzung.

Da die Telomere jedoch keine entscheidende genetische Information tragen, sondern nur Wiederholungen der Sequenz TTAGGG darstellen, gehen mit jeder Zellteilung keine

genetischen Informationen verloren. Es werden lediglich die Telomere verkürzt. Nach jeder Replikation verliert die Zelle 25-200 Basenpaare am Chromosomenende. Die Länge der Telomere scheint die Anzahl der möglichen Teilungen der Zelle zu bestimmen („mitotic clock“ oder „molecular clock“) (Allsopp *et al.*, 1992). Bei somatischen Zellen nimmt im Gegensatz zu Keimzellen oder Stammzellen die Telomerlänge mit jeder Zellteilung ab, so dass es ab einem bestimmten Verlust an Telomeren zum Zelltod kommt. Zu kurzen Telomeren ist es nicht mehr möglich die Enden der Chromosomen zu schützen. Als Folge kann es zu „end-to-end“ Chromosomenfusionen oder Umlagerung von Chromosomen kommen. Diese Zellen besitzen somit eine limitierte Lebensspanne die auch replikative Kapazität genannt wird. Aktivieren die Zellen jedoch das Enzym Telomerase, werden die Chromosomen wieder stabilisiert und ein möglicher Zelltod verhindert (Counter *et al.*, 1992; Shay *et al.*, 1993).

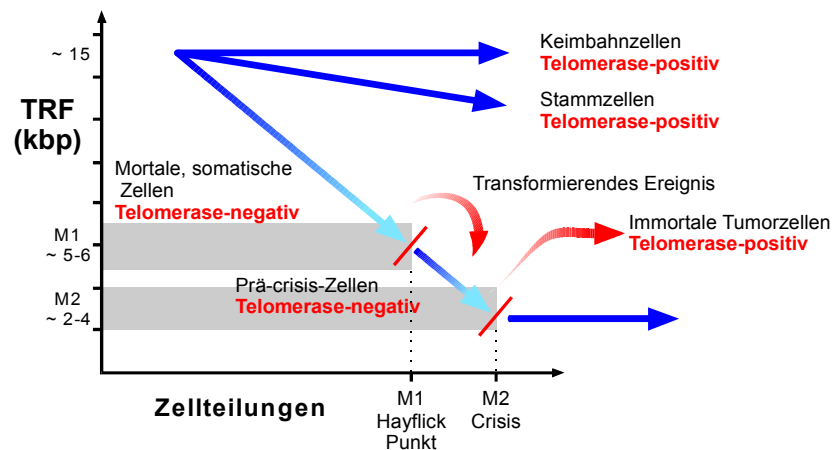


Abbildung 2-4 Hypothese zur Rolle der Telomere beim Prozess der Zellalterung und Immortalisierung [nach Harley 1991]. Die mittlere Länge der terminalen Restriktionslängenfragmente (TRF) in kbp ist im Diagramm gegen den Zeitpunkt im Zellzyklus aufgetragen.

Harley hat 1991 die Hypothese zur Rolle der Telomere bei dem Prozess der Zellalterung und Immortalisierung formuliert (Abbildung 2-4) (Harley, 1991). Bei somatischen Zellen ohne Telomeraseaktivität nimmt die Telomerlänge mit jeder Zellteilung ab, bis sie einen kritischen Punkt erreichen. Dieser kritische Punkt wird als Hayflick Punkt (M1- „mortality stage“) oder Seneszenz, ein Zustand von ruhenden lebenden Zellen, bezeichnet. Diese seneszierenden Zellen leben weiter und sind stoffwechselaktiv, haben aber die Fähigkeit zur Teilung verloren. In diesem Zustand kann es zur Aktivierung der Tumorsuppressorgenen p53 und Rb kommen. Zellen können diesen Punkt, durch z.B. Verlust von p53 und Rb, Aktivierung von viralen Onkogenen wie SV40 Large T-Antigen, Papiloma Virus E6/E7 Proteinen oder Adenovirus E1A Protein, sowie Strahlung oder karzinogenen Stoffen, überwinden (Counter *et al.*, 1992). Dies führt zur weiteren Proliferation der Zellen und Verkürzung der Telomere.

Durch Defekte, wie Chromosomenbrüche und Fusionen, und die zunehmende Verkürzung der Telomere erreichen manche Zellen eine kritische Länge der Telomere und gehen dann in die Phase der Krisis/Crisis (M2) über. Hier kommt es zum Zelltod dieser Zellen. Andere können durch Reaktivierung der Telomerase den Eintritt in die Krisis verhindern, wodurch die Telomerenden stabilisiert werden und dadurch der Zelltod umgangen wird. Diese telomerase-positiven Zellen besitzen nun eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit - Immortalität. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Telomerase fähig ist, Fibroblasten und Endothelzellen zu immortalisieren (Nakayama *et al.*, 1998). Keratinozyten jedoch benötigen zusätzlich zur Telomeraseexpression die Inaktivierung des Rb/p16 Signalweges zur Überwindung der Seneszenz (Kiyono *et al.*, 1998). Keimbahnzellen besitzen von Beginn an Telomeraseaktivität und können somit ihre Telomerlängen über ihre gesamte Lebenszeit erhalten. Stammzellen, wie z.B. epitheliale Basalzellen oder T- und B-Zellen zeigen eine geringe Telomeraseaktivität, die jedoch ausreichend ist für eine relative Erhaltung der Telomerlängen und der replikativen Kapazität über die gesamte Lebensdauer des Organismus.

2.2.2 Telomerase

Die Telomerase ist ein Enzym, welches zur Gruppe der Reversen Transkriptasen gehört. Neben seiner Proteinstruktur enthält es eine RNA-Komponente und ist somit ein Ribonukleoprotein (siehe Abbildung 2-5). Das Enzym ermöglicht eine Neusynthese von DNA an den Telomerenden.

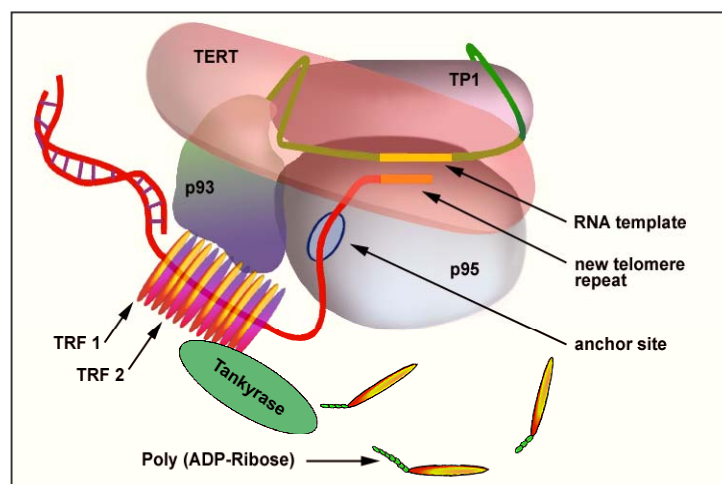


Abbildung 2-5 Schematische Darstellung der Telomerase mit ihren Untereinheiten am Telomer nach (McKenzie *et al.*, 1999)

Es konnte 1985 erstmals bei dem Protozoon *Tetrahymena* nachgewiesen werden, dass eine de-novo-Synthese der Telomerenden mit Hilfe der Telomerase möglich ist (Greider &

Blackburn, 1985). Vier Jahre später gelang es, die RNA-Komponente der Telomerase bei Tetrahymena zu klonieren (Greider & Blackburn, 1989). Die Sequenz der RNA-Komponente der Telomerase ist komplementär zur Telomersequenz. Dies konnte bestätigt werden, indem von Yu *et al.* gezeigt wurde, dass eine Mutation der RNA-Komponente zu einem vorhergesagten Wechsel der Telomersequenz führt, wenn die mutierte RNA in-vivo überexprimiert wurde (Yu *et al.*, 1990). Mittels reverser Transkription synthetisiert die Telomerase eine DNA-Kopie ihrer RNA-Sequenz und verbindet diese mit dem 3'-Ende des Chromosoms. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass auch bei humanen Zellen mit jeder Zellteilung die Länge der Telomere abnimmt (de Lange *et al.*, 1990; Allsopp *et al.*, 1992). Morin beschrieb erstmals 1989 die humane Telomerase in Zervixkarzinomzellen (HeLa) (Morin, 1989).

Nach Aufklärung der Struktur des RNA-Anteils sowie des dafür kodierenden Gens der Maus (mTR) (Blasco *et al.*, 1995), gelang dies auch für den Menschen (hTR) (Feng *et al.*, 1995). Die Matrize der RNA-Komponente (5'-CUAACCCUAAC)_n der humanen Telomerase ist komplementär der humanen Telomersequenz (TTAGGG)_n. Das Gen für den RNA-Anteil der humanen Telomerase ist auf dem Chromosom 3q26.3 lokalisiert (Soder *et al.*, 1997b). Die regulatorische Region wurde von Soder *et al.* nachgewiesen (Soder *et al.*, 1997a). Nakayama *et al.* konnten 1997 ein Telomerase-assoziiertes Protein (TLP-1) beim Menschen identifizieren (Nakayama *et al.*, 1997).

Tabelle 2-4 Nomenklatur der Telomeraseuntereinheiten

Name	alternative Bezeichnung	Funktion	Größe	EMBL Accession No.
hTR	hTERC, hTER	Humane Telomerase RNA	530bp	U 86046, U 85256 S 79400 AF 047386
hTERT	hTRT, hEST2, TP2	humane Telomerase Reverse Transkriptase	127 kD	AF 015950 AF 018167
TLP-1	TP1, TEP 1	Telomerase assoziiertes Protein	80 kD	U 86136 U 96180
p23		Chaperon	23 kD	
HSP 90		Hitzeschockprotein	90 kD	
mTR	mTERC, mTER	Maus Telomerase RNA		U 33831
mTERT	MTRT	Maus Telomerase Reverse Transkriptase	127 kD	AF 051911

Von besonderer Bedeutung für die Aufklärung der Funktion der Telomerase war die Klonierung des katalytischen Proteinanteils der humanen Telomerase, der als hTERT - humane Telomerase Reverse Transkriptase - bezeichnet wird (Tabelle 2-4) (Nakamura *et al.*, 1997; Meyerson *et al.*, 1997; Kilian *et al.*, 1997). Die Klonierung der hTERT erbrachte den

Beweis, dass das Ribonukleoprotein Telomerase zur Familie der Reversen Transkriptasen gehört. Greenberg *et al.* beschrieben die mTERT - murine Telomerase Reverse Transkriptase, als das Homolog der hTERT mit einer Aminosäureidentität von 64 % (Greenberg *et al.*, 1998). Das Vorhandensein von sieben konservierten Motiven der Reversen Transkriptasen und eines speziellen Telomerasemotives von Säuger- bis zu Hefe-Telomerasen zeigt eine starke Konservierung der Telomerase über eine weite phylogenetische Distanz. Diese evolutionäre Konservierung der TERT weist darauf hin, dass sie gemeinsam mit der RNA-Komponente den Kernkomplex des Ribonukleoproteins Telomerase bilden.

Die These wird durch die Rekonstitutionsexperimente der Telomerase in Mensch und Tetrahymena unterstützt, in denen in-vitro translatierte TERT und Telomerase-RNA in ein Kaninchen Retikulozyten-Lysat eingebracht wurde und Telomeraseaktivität nachgewiesen wurde (Chen *et al.*, 2000). Auch in humanen telomerase-negativen Fibroblasten wurde anhand von in-vitro Transfektionsexperimenten nachgewiesen, dass diese nach der Transfektion mit hTERT Telomeraseaktivität aufwiesen (Nakayama *et al.*, 1998). Holt *et al.* zeigten, dass die rekonstituierte Telomeraseaktivität außerdem vom Vorhandensein zweier Chaperone p23 und Hsp90 abhängig ist (Holt *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist das Telomerase-assoziierte Protein TLP-1 für die Telomeraseaktivität nicht notwendig (Beattie *et al.*, 1998).

Die Aktivität der Telomerase an den Telomerenden wird von verschiedenen weiteren Proteinen moduliert. Diese können entweder an die einsträngige Telomer-DNA oder an die doppelsträngige DNA binden und spielen eine Rolle als Schutzproteine für die Telomere. Die Proteine TRF1 und TRF2 (telomere repeat factor) sind direkt mit der doppelsträngigen DNA assoziiert (Abbildung 2-5). TRF1 bindet als Dimer über Myb-DNA-Bindungsdomänen und wirkt als Telomeraserepressor.

Eine Überexpression von Wildtyp-TRF1 in telomerase-positiven Zellen führt zu einer Telomerverkürzung, wohingegen eine Expression einer dominant-negativen Mutante von TRF1 eine Verlängerung der Telomere hervorruft (van Steensel & de Lange, 1997). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass TRF1 Proteinfilamente an der Telomer-DNA bildet, welche eine Interaktion von zwei DNA-Strängen befürwortete. Durch die Vermittlung der Telomerstrangbindung wirkt TRF1 als Schutzfaktor für die Telomere. TRF2 ist dem TRF1 verwandt, nur besitzt dieses ein basisches Aminoende im Gegensatz zum sauren Aminoterminal von TRF1. Eine Überexpression von TRF2 reduziert ebenfalls die Telomerlänge, obwohl die Expression einer Mutante und verschiedener

verkürzter Formen von TRF2 „End-to-end“ Chromosomenfusionen und Seneszenz in den Zellen hervorrufen kann (van Steensel *et al.*, 1998).

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse entwickelten Griffith and Greider ein neues Modell der Telomerstruktur (Abbildung 2-6), in dem es durch die Bildung von T-Loops der doppelsträngigen Telomer-DNA zu einem Schutz der Telomerenden kommt. Die T-Loops erklären außerdem, dass einzelsträngige Telomerenden nicht von DNA-Reparaturmechanismen erkannt werden. Die Tankyrase besitzt eine homologe Domäne zur Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), die eine Synthese von ADP-Ribosegruppen an Proteine katalysiert (Smith *et al.*, 1998) (Abbildung 2-5).

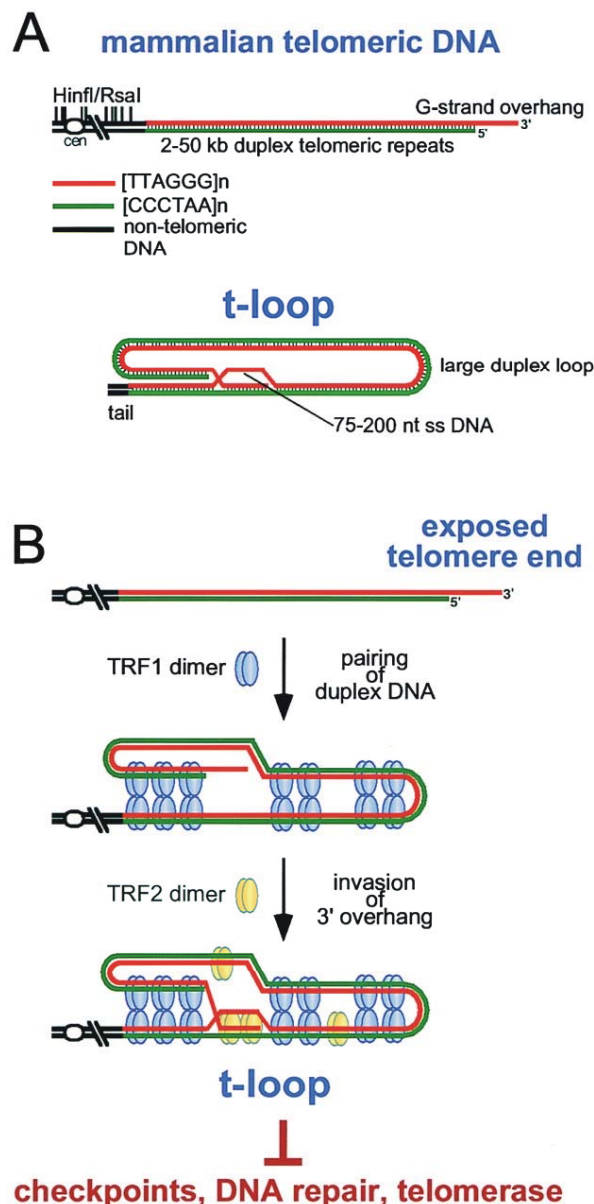


Abbildung 2-6 (A) Modell der T-Loops bildenden Telomere nach (Greider, 1999), die (B) durch die Bindung von TRF1 und TRF2 geschützt werden

Tankyrase ribosyliert sich selbst sowie TRF1 und verhindert somit die Bindung von TRF1 an die Telomer-DNA, was eine Erhaltung der Telomere zur Folge hat. Diese Untersuchungen zeigen, dass das Substrat für die Telomeraseaktivität keine nackte DNA ist. Weitere Proteine, wie z.B. Ku 86 und Ku 70, welche die Doppelstrangreparatur von DNA-Brüchen vermitteln, binden ebenfalls an die Telomere (Samper *et al.*, 2000).

2.2.3 Alternative Mechanismen zur Telomerase

Eine Anzahl von in-vitro immortalisierten Zelllinien und auch einige Tumoren, z.B. eine große Anzahl von Nierentumoren, können ihre Telomere ohne nachweisbare Telomeraseaktivität erhalten. Colgin und Reddel erläutern, dass alle Zellen einen „telomere maintenance mechanism“ TMM besitzen, welcher entweder Telomerase oder ein alternativer Mechanismus sein kann (Colgin & Reddel, 1999). Dieser weitere Mechanismus wurde erstmals von der Gruppe um Reddel 1995 beschrieben und wird als ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) bezeichnet (Bryan *et al.*, 1995). Ungefähr 35-40 % aller in-vitro immortalisierter Zelllinien und 7-15 % aller Tumoren existieren ohne nachweisbare Telomeraseaktivität, wobei Fibroblasten und andere Zellen mesenchymalen Ursprunges eher als epitheliale Zellen den ALT Mechanismus nutzen (Bryan *et al.*, 1997a).

Zellen mit ALT besitzen teilweise sehr lange Telomere und zeigen ein charakteristisches, heterogenes Muster der Telomerlängen. Man findet Chromosomen mit sehr kurzen bis zu sehr langen Telomeren. In Untersuchungen der Telomere von immortalen Zelllinien mit einer Fluoreszenz-in-situ Färbung konnte gezeigt werden, dass einige der Telomere sehr viel länger sind als in den Zellen vor der Immortalisierung (Bryan & Reddel, 1997).

Der Mechanismus des ALT ist derzeit noch wenig geklärt, bisher konnten keine daran beteiligten Proteine identifiziert werden. Am wahrscheinlichsten sind jedoch nicht-reziproke rekombinante Ereignisse zwischen den Telomeren, die den ALT Mechanismus bilden. Andere Hypothesen berufen sich auf mögliche Mutanten oder Varianten der Telomerase, die von ALT Zellen verwendet werden, aber mit den Standardnachweisen für die Telomerase nicht detektiert werden können (Bryan *et al.*, 1995). In einigen Fällen konnte der ALT Phänotyp in telomerase-negativen Zellen durch Transfektion mit der katalytischen Untereinheit der Telomerase unterdrückt werden. Es wurde jedoch beschrieben, dass ALT unabhängig von der Expression von hTR und hTR-Mutationen ist (Bryan *et al.*, 1997b). Neueste Untersuchungen zur Hypermethylierung der hTR und hTERT-Promotoren zeigten eine hohe Methylierungsfrequenz in den untersuchten ALT Zelllinien (Hoare *et al.*, 2001). Es kann nun spekuliert werden, ob die Hypermethylierung den Verlust der Telomeraseaktivität nach sich zieht oder ob es durch den Verlust der Telomeraseaktivität zur Hypermethylierung der Promotoren kommt.

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