

# Leben am Ende der Chromosomen: Telomere und Telomerase\*\*

Thomas R. Cech\*

Telomerase ist das Enzym, das die Enden von linearen Chromosomen repliziert, z.B. von denen in menschlichen Zellen. Das Fehlen von Telomerase ist mit zellulären Alterungsprozessen in Verbindung gebracht worden; ihre Reaktivierung fördert die Tumorentstehung. Telomerase ist ein ungewöhnliches Enzym, da sie sowohl eine essentielle RNA-Untereinheit als auch Proteinkomponenten enthält. Obwohl die RNA-Komponente vor mehr als zehn Jahren beschrieben wurde, ist die erste katalytische Proteinuntereinheit der Telomerase erst kürzlich bei Untersuchungen an dem

Wimpertierchen *Euplotes aediculatus* entdeckt worden. Computergestützte Sequenzvergleiche und biochemische Experimente haben im Anschluss daran zur Identifizierung des Gens für die entsprechenden Telomerase-Untereinheiten in Hefe und Mensch geführt. Diese Proteine gehören zu einer neuen Unterklasse der Polymerase-Familie, die als TERT (telomerase reverse transcriptase = Reverse Transkriptase der Telomerase) bezeichnet wird. Diese Unterklasse ist entfernt verwandt mit dem Enzym, das RNA von HIV (menschliches Immundefizienzvirus) und anderen Retrovi-

ren kopiert. Der Weg, auf dem TERT mit der RNA-Untereinheit unter Bildung der Telomerase zusammengesetzt wird, und der Mechanismus der Replikation von Chromosomenenden sind zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. Darüber hinaus liefert die Identifizierung von TERT neue Ansätze zur gezielten Entwicklung von Inhibitoren, die sich möglicherweise als Antitumormittel eignen.

**Stichwörter:** Enzyme • Ribonucleoproteine • RNA • Telomerase • Tumorthherapie

## 1. Einleitung

Chemiker nehmen normalerweise von einem biologischen System erst dann Kenntnis, wenn die betreffenden Moleküle identifiziert und ihre biochemischen Rollen zumindest teilweise aufgeklärt worden sind. Eine derartige erste Charakterisierung liefert den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur Aufklärung von chemischen Reaktionsmechanismen und Struktur-Funktions-Beziehungen sowie für die Synthese oder Identifizierung reaktionsspezifischer Antagonisten oder Agonisten. Im Fall des Chromosomenenden-replizierenden Enzyms Telomerase wurden die biomolekularen Schlüsselkomponenten erst in den letzten beiden Jahren identifiziert. Seither konnten die Vorstellungen über einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der „Abschaltung“ der Telomerase

und der zellulären Seneszenz (dem Altern) einerseits und zwischen der Reaktivierung der Telomerase und der malignen Transformation von menschlichen Zellen andererseits auf bemerkenswerte Weise erhärtet werden. Diese Befunde liefern nun reichlichen Anreiz für Chemiker, sich über dieses faszinierende Enzym zu informieren.

Vor einer Diskussion der Telomerase ist es hilfreich, ihre Substrate, d.h. die Chromosomentelomere (telos (griech.) = das Ende; meros (griech.) = der Teil), zu definieren. Frühe Beobachtungen von Hermann Muller an Chromosomen der Fruchtfliege und von Barbara McClintock an Mais-Chromosomen hatten gezeigt, dass die natürlichen Enden von Chromosomen „versiegelt“ sind. Auf diese Weise sind sie vor Fusionsreaktionen geschützt, wie sie an Chromosomenenden auftreten, die durch Chromosomenbrüche entstanden sind.<sup>[1]</sup> Erst Jahrzehnte später wurde die molekulare Natur dieser „Schutzhülle“ an den Enden von Chromosomen ermittelt. DNA an den Chromosomenenden besteht nicht aus einer komplexen Protein-codierenden Sequenz, sondern aus einer einfachen Sequenzabfolge, beispielsweise TTGGGG im Wimpertierchen *Tetrahymena*<sup>[2]</sup> oder TTAGGG in menschlichen Zellen. Die Sequenzabfolgen wiederholen sich mehrere Dutzend oder sogar mehrere Tausend Mal an jedem Chromosomenende. An diese DNA-Sequenz binden spezifische Proteine, die das Chromosomenende entweder direkt<sup>[3]</sup>

[\*] Prof. Dr. T. R. Cech  
Department of Chemistry and Biochemistry  
and  
Howard Hughes Medical Institute  
University of Colorado  
Boulder, CO 80309-0215 (USA)  
Fax: (+1) 303-492-6194  
E-mail: thomas.cech@colorado.edu

[\*\*] Dieser Übersichtsartikel ist die erweiterte Fassung eines Vortrags, den der Autor am 15. August 1999 auf dem 37. IUPAC-Kongress in Berlin hielt.

versiegeln oder dadurch, dass sie eine bestimmte Struktur der DNA induzieren.<sup>[4]</sup>

Während das Gros der Telomer-DNA durch Basenpaarung der GT-reichen Sequenzen mit ihren CA-reichen Gegenstücken eine doppelhelicale Struktur einnimmt, steht das 3'-Ende der DNA in allen bisher untersuchten Eukaryonten als Einzelstrang über (Abbildung 1). Die vollständige Replikation des überhängenden Endes eines solchen Chromosoms kann mit gewöhnlichen DNA-Polymerasen aus dem einfachen Grund nicht erfolgen, dass für das überhängende Ende kein Matrizenstrang existiert, der dessen Synthese steuern könnte.<sup>[5]</sup> Selbst bei einem stumpfendigen (blunt-ended) Chromosom gäbe es Probleme mit der vollständigen Replikation seiner Enden.<sup>[6]</sup>

In fast allen Eukaryonten wird das Problem der Replikation von Chromosomenenden von Telomerase gelöst, die von

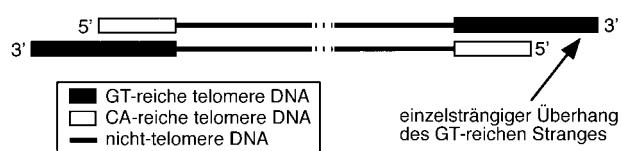


Abbildung 1. Telomere DNA an den Enden eukaryontischer Chromosomen. Schwarze Balken: Wiederholungen kurzer, typischerweise GT-reicher Sequenzabschnitte (TTAGGG beim Menschen, TTTTGGGG bei *Euplotes*); weiße Balken: die komplementäre, typischerweise CA-reiche Sequenz (CCCTAA beim Menschen, CCCCCAAA bei *Euplotes*).

Carol Greider und Elizabeth Blackburn 1985 entdeckt wurde.<sup>[7]</sup> Telomerase ist ein ungewöhnliches Enzym, da es ein RNA-Protein-Komplex (Ribonucleoprotein, RNP) ist. Ein Teil der RNA-Untereinheit liefert die Nucleinsäurematrize, die die DNA selbst nicht bereitstellt (Abbildung 2).<sup>[8, 9]</sup>

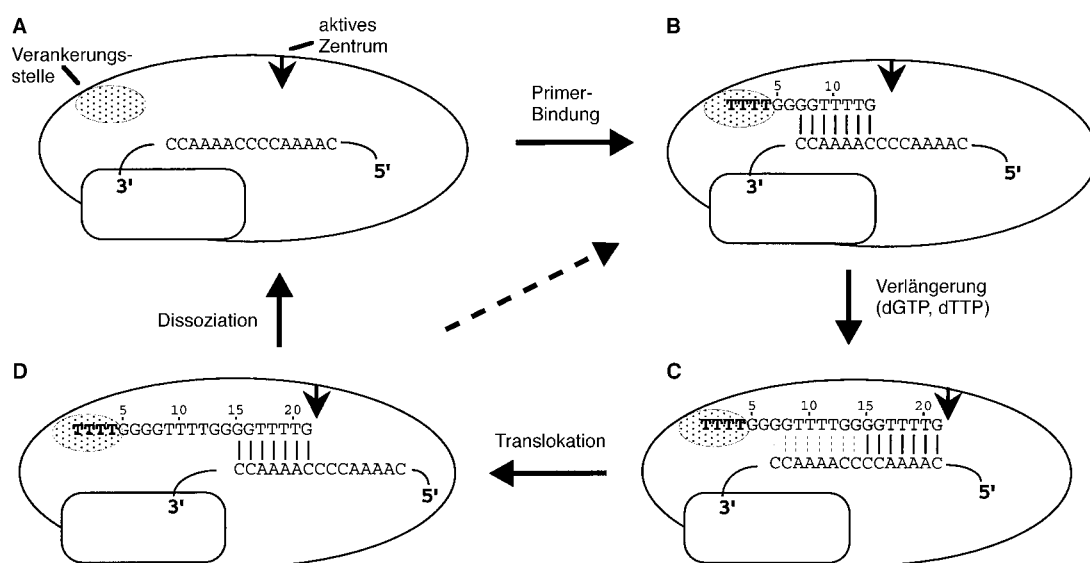


Abbildung 2. Telomer-DNA wird von dem Ribonucleoprotein-Enzym Telomerase synthetisiert. A) Leeres Telomerase-Enzym; gezeigt ist die Nucleotidsequenz der RNA-Matrizenregion (Sequenz aus *Euplotes*). Das Oval repräsentiert die katalytische Proteinuntereinheit (TERT); das abgerundete Rechteck stellt eine Spezies-spezifische Untereinheit mit Hilfsfunktion dar. B) Der DNA-Primer (3'-Ende des Chromosoms) bindet, durch Basenpaarung mit der RNA-Matrize und durch Wechselwirkung mit einer Verankerungsstelle, an die Telomerase.<sup>[61]</sup> C) Die Reverse-Transkriptase-Aktivität von TERT verlängert die DNA, bis das Ende der Matrize erreicht ist. Das Enzym hält ein mehr oder weniger konstantes Ausmaß der Basenpaarung zwischen Primer und Matrize während der Elongationsreaktion aufrecht und verhindert so die Bildung eines langen Duplex, der die Dissoziation blockieren würde.<sup>[62]</sup> D) Nach der Translokation kann der DNA-Primer nochmals verlängert werden (gestrichelter Pfeil), oder er kann abdissoziieren. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [62].)



Thomas R. Cech machte 1970 seinen B.A.-Abschluss in Chemie am Grinnell College und promovierte 1975 an der University of California in Berkeley zum Ph.D. in Chemie. Nach einem Postdoktoranden-Aufenthalt im Department of Biology am Massachusetts Institute of Technology wurde er Mitglied des Lehrkörpers der University of Colorado in Boulder, wo er nun Distinguished Professor of Chemistry and Biochemistry und Investigator of the Howard Hughes Medical Institute ist. 1982 wiesen er und seine Arbeitsgruppe nach, dass RNA biochemische Reaktionen katalysieren kann. Für diese Entdeckung bekam er viele Preise, darunter den Lasker Award (1988) und den Nobel-Preis für Chemie (1989). Seit Januar 2000 ist Tom Cech Präsident des Howard Hughes Medical Institute (Chevy Chase, Maryland), führt sein Forschungsprogramm in Boulder aber weiterhin fort.

Die katalytische Proteinuntereinheit (TERT)<sup>[\*]</sup> katalysiert die Polymerisierung von Desoxynucleotridtriphosphaten (dNTPs) an die Chromosomenenden (Abbildung 3), wie in Abschnitt 4 ausgeführt wird.

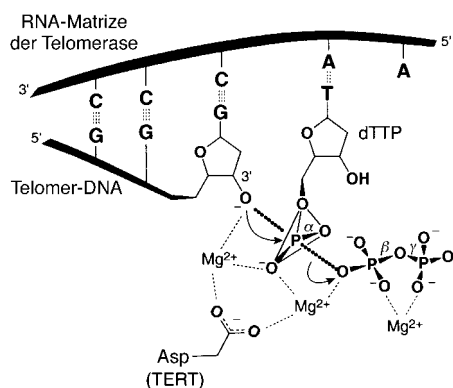


Abbildung 3. Vorschlag für den Mechanismus der chemischen Katalyse der Verlängerung von Telomer-DNA durch Telomerase, der auf dem Modell der Reverse-Transkriptase-Reaktion von Joyce und Steitz<sup>[63]</sup> basiert. Drei Asparaginsäure-Seitenketten im aktiven Zentrum, von denen nur eine gezeigt ist, koordinieren zwei divalente Metallionen, die ihrerseits mit dem Nucleophil (3'-Oxyanion von G), der  $\alpha$ -Phosphatgruppe des eintretenden Nucleotids und dem Sauerstoffatom der Abgangsgruppe wechselwirken. Die Metallionen-Liganden-Koordination wird durch gestrichelte Linien angezeigt. In dieser hypothetischen Darstellung des Übergangszustands geben die gepunkteten Linien halb gebildete oder halb gebrochene Bindungen an.

## 2. Neu entdeckte Funktionen für Telomere und Telomerase beim Menschen

### 2.1. Verlängerung der zellulären Lebensdauer

Normale menschliche Zellen, die in Gewebekultur gehalten werden, durchlaufen nur eine begrenzte Zahl von Zellteilungen. Sie stellen ihr Wachstum ein, wenn die so genannte Hayflick-Grenze erreicht ist,<sup>[10a]</sup> die bei Bindegewebszellen (Fibroblasten) bei etwa 50 Zellverdopplungen liegt. In diesem Stadium des Alterns exprimieren die Zellen einen anderen Satz von Genen und können durch Ausplattierung bei niedrigeren Zelldichten oder Zusatz von frischem Wachstumsmedium nicht zu weiterem Wachstum angeregt werden. Diese Zellen können zwar durch Infektion mit bestimmten Viren oder durch Transformation mit einem Onkogen zur Proliferation gezwungen werden, aber die erzwungenen Zellteilungen führen zu einem Zustand massiven Zelltodes, der als „Krise“ bezeichnet wird.

Es ist vorgeschlagen worden, dass die Längen der Telomere als eine Art von Maßstab fungieren, mit dem die Zahl der einer Zelle möglichen Zellteilungen erfasst wird, bevor sie die Hayflick-Grenze erreicht (siehe Lit. [10b]). Da die Telomerase in den meisten somatischen Zellen – jedoch nicht in den Keimbahnzellen – etwa zur Zeit der Geburt abgeschaltet

wird, können Chromosomentelomere nicht vollständig repliziert werden. Aus diesem Grund verringert sich ihre ursprüngliche Größe von etwa 15 kbp (bp = Basenpaar) mit jeder Zellteilung jeweils um etwa 100 bp.<sup>[11]</sup>

Einer Arbeitshypothese zufolge tritt eine Zelle in das Seneszenzstadium ein, wenn die Telomere eine kritische untere Länge erreichen (oder wenn das kürzeste Telomer in der Zelle die kritische Unterlänge erreicht). Der genaue Signalweg, der die Telomerlänge mit dem Stillstand des Zellzyklus verbindet, ist nicht bekannt. Er beinhaltet jedoch wahrscheinlich die Freisetzung von Telomer-gebundenen Proteinen, wenn ihre entsprechenden DNA-Bindungsstellen verloren gegangen sind.

Der Zusammenhang zwischen der Lebensdauer einer Zelle in Kultur und der Telomerlänge muss nicht notwendigerweise einen ursächlichen Zusammenhang widerspiegeln. Die Entdeckung von hTERT (siehe Abschnitt 4), der katalytischen Untereinheit der menschlichen Telomerase, ermöglichte eine direkte Überprüfung dieser Hypothese. Die anderen Komponenten, die für die Telomeraseaktivität benötigt werden, sind in Telomerase-negativen normalen menschlichen Zellen noch vorhanden, so dass die Wiedereinführung von hTERT ausreicht, die Telomeraseaktivität wiederherzustellen und die Chromosomentelomere zu verlängern.<sup>[12, 13]</sup> Die Transfektion<sup>[\*\*]</sup> des *hTERT*-Gens (das unter der Kontrolle eines starken heterologen Transkriptionspromotors steht) führte ebenfalls dazu, dass zwei Typen normaler menschlicher Zellen (Fibroblasten und Epithelzellen der Retina) weit über die Hayflick-Grenze hinaus weiterwachsen konnten.<sup>[12]</sup> (Diese Zellen sind möglicherweise sogar unsterblich; angesichts der durchaus nicht unendlichen Zeitspanne, in der ein Übersichtsartikel geschrieben werden muss, werden wir hier das Wachstumsverhalten als „sehr stark verlängerte Lebensdauer“ beschreiben.) Die Transfektion mit dem *hTERT*-Gen war nicht einfach nur ein neuer Weg der Transformation menschlicher Zellen, da die transfizierten Zellen ihren normalen Karyotyp behielten und nicht in der Lage waren, in Weich-Agar zu wachsen. Letzteres ist ein Charakteristikum transformierter Zellen.

Dieser bemerkenswerte lebensverlängernde Effekt stellt insofern kein verallgemeinerbares Phänomen dar, als beispielsweise andere Zelltypen wie Epithelzellen der Brust oder Keratinocyten zusätzlich zur wiederhergestellten hTERT-Funktion die Inaktivierung des Rb/p16-Wachstumskontrollweges benötigen, um eine verlängerte Lebensdauer zu erreichen.<sup>[14]</sup> (Rb ist von Retinoblastom abgeleitet, einem Tumor, der durch Verlust oder Mutation beider Kopien dieses Tumorsuppressorgens verursacht wird. p16 ist ein weiterer Tumorsuppressor, der im gleichen Wachstumskontrollweg aktiv ist wie Rb.) Darüber hinaus weisen einige normale menschliche Zellen nachweisbare Telomeraseaktivität in vitro auf, unterliegen aber trotzdem dem Alterungsprozess.<sup>[15]</sup>

Von einigen Forschern ist vorgeschlagen worden, dass die Fähigkeit, die zelluläre Lebensdauer zu verlängern, möglicherweise den Schlüssel für die Verlängerung des mensch-

[\*] TERT = telomerase reverse transcriptase (Reverse Transkriptase der Telomerase). In diesem Aufsatz werden konventionsgemäß kursiv geschriebene Bezeichnungen für Gene (*TERT*; *hTERT* für das menschliche Gen) und nicht kursive Bezeichnungen in Großbuchstaben für die jeweiligen Proteine verwendet.

[\*\*] Transfektion bezieht sich auf die Einführung eines Gens in Säugerzellen in einer Form, die die Expression des Gens ermöglicht. Transformation bezieht sich auf den onkogenen, d.h. den durch unreguliertes Wachstum charakterisierten Zustand.

lichen Lebens darstellt. Aus diesem Grund ist an dieser Stelle ein nachdrückliches Dementi angebracht: Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsspanne einer Primärkultur menschlicher Zellen in vitro und der Lebensdauer eines Organismus ist weit hergeholt.<sup>[16]</sup> Wie im folgenden Abschnitt diskutiert wird, ist darüber hinaus die Inaktivierung der Telomerase höchstwahrscheinlich ein Mechanismus zur Unterdrückung der Tumorentstehung; obwohl normale Zellen mit einem transfizierten *hTERT*-Gen keinerlei Anzeichen der Transformation zeigen,<sup>[12]</sup> haben wir mittlerweile Gründe genug anzunehmen, dass diese Zellen der Transformation einen Schritt näher gekommen sind. In keiner Weise schmälert dies jedoch das Potential dieser normalen Zellen mit einer verlängerten Lebensdauer, als verbesserte Untersuchungsobjekte für die zellbiologische Forschung oder als „Bioreaktoren“, mit denen kontinuierlich pharmazeutisch wichtige Proteine produziert werden können, eingesetzt zu werden.

## 2.2. Telomerase ist für die Carcinogenese beim Menschen erforderlich

Dieser Abschnitt liest sich vermutlich wie der vorhergehende. Was lange Zeit eine faszinierende Korrelation darstellte – in diesem Fall die Reaktivierung der Telomerase und die Entstehung menschlicher Tumoren – scheint sich nun als Ursache-Wirkungs-Beziehung zu erweisen.

Ungefähr 85–90 % der unterschiedlichsten menschlichen Tumoren weisen Telomerase-Aktivität auf, während das benachbarte gesunde Gewebe typischerweise Telomerase-negativ ist. Daher wird die Telomerase, die ganz generell in somatischen Zellen nicht nachzuweisen ist, in den Tumoren reaktiviert. Die in normalen Zellen fehlende Telomerase-komponente ist das *hTERT*-Protein;<sup>[17, 18]</sup> die RNA-Untereinheit ist nicht nur in Telomerase-negativen Zellen vorhanden, sondern wird auch nach der Einführung des *hTERT*-Proteins in den aktiven Telomerasekomplex übernommen.

Vor kurzer Zeit ist es Weinberg und Mitarbeitern gelungen, ein seit langem bekanntes Problem der menschlichen Krebsbiologie zu lösen: die maligne Transformation menschlicher Zellen mit definierten genetischen Komponenten. Eine derartige Transformation kann in Nagerzellen leicht durch die Expression zweier zusammenwirkender Onkogene erreicht werden. Es war jedoch bekannt, dass die Einführung der gleichen Gene in kultivierte menschliche Zellen für eine stabile Transformation nicht ausreicht. Die fehlende Komponente wurde als *hTERT* identifiziert.<sup>[19]</sup> Zumindest ein Weg der Transformation menschlicher Zellen erfordert daher drei Schritte: die Aktivierung der Zellproliferation (erreicht durch die Expression einer mutierten Form des *ras*-Onkogens), die Inaktivierung der Tumorsuppressor-Proteine p53 und Rb (erreicht durch die Expression des SV40-T-Onkoproteins) und die Aktivierung der Telomerase (erreicht durch die Expression von *hTERT*).<sup>[\*]</sup> Aus diesem Grund ist die Telomerase nicht nur ein Indikator für neoplastisches Wachstum; sie ist ein vielversprechendes Zielmolekül für die chemotherapeutische Behandlung von verschiedenen Krebsarten.

[\*] Genauer gesagt zeigen die Experimente,<sup>[19]</sup> dass eine Funktion der *hTERT* aktiv sein muss. Wir nehmen an, dass diese Funktion in der Aktivierung der Telomeraseaktivität besteht, aber eine katalytisch inaktive Mutante der *hTERT* muss noch getestet werden, um diese Hypothese weiter zu untermauern.

merase nicht nur ein Indikator für neoplastisches Wachstum; sie ist ein vielversprechendes Zielmolekül für die chemotherapeutische Behandlung von verschiedenen Krebsarten.

## 3. Die RNA-Komponente der Telomerase

### 3.1. Biosynthese

Die zuerst identifizierten RNA-Komponenten stammen aus Telomerasen von Wimpertierchen. Sie werden von RNA-Polymerase III transkribiert, die eine kurze Abfolge von U-Resten am 3'-Ende des Transkripts erzeugt.<sup>[8, 20]</sup> In der Evolution gab es einen Wechsel im Gebrauch der RNA-Polymerase, da die RNA-Untereinheit aus Hefe (TLC1) von RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert wird.<sup>[21]</sup> Aus diesem Grund wird nun die Hefe-RNA mit einer 5'-Kappe versehen und ist (anfänglich) am 3'-Ende polyadenyliert. Man glaubt, dass die menschliche RNA ebenfalls ein Pol-II-Transkript ist; die reife Form hat ebenfalls eine 5'-Trimethylguanosin-Kappe.<sup>[22]</sup> Die 3'-Hälfte der menschlichen RNA-Untereinheit besteht aus einer Small-nucleolar-RNA(snoRNA)-Domäne,<sup>[23]</sup> die man zunächst nur in RNAs gefunden hatte, welche in stabilen RNAs die Umwandlung bestimmter Uracilreste in Pseudouracilreste vermitteln. Diese snoRNA-Domäne wird für die korrekte Entstehung des 3'-Endes der menschlichen RNA benötigt.<sup>[23]</sup>

### 3.2. RNA-Struktur

Falls die RNA-Untereinheit der Telomerase bezüglich der Sequenz und/oder der Struktur hochkonserviert wäre, würde sie ein attraktives Zielmolekül für niedermolekulare Inhibitoren darstellen. Leider weist die RNA-Untereinheit jedoch große Spezies-spezifische Unterschiede auf. Selbst innerhalb der Gruppe der Wimpertierchen konnten nur wenige konservierte Nucleotidpositionen identifiziert werden, obwohl die generelle, einer Bratpfanne ähnelnde Sekundärstruktur konserviert ist (Abbildung 4).<sup>[20, 24]</sup> Die menschliche RNA-Untereinheit ist beträchtlich größer (450 Nucleotide (nt)).<sup>[25]</sup> Lässt man jedoch die snoRNA-Domäne außer Acht, unterscheidet sich die restliche Matrizen-enthaltende Domäne der RNA mit 210 nt in ihrer Länge nicht zu sehr vom entsprechenden Molekül aus Wimpertierchen (160–190 nt). Aus diesem Grund ist es von Interesse herauszufinden, ob die Sekundärstruktur der 5'-Domäne irgendwelche Übereinstimmungen mit der der Wimpertierchen-RNAs aufweist.

### 3.3. RNA-Funktion

Die offensichtlichste Funktion der RNA-Untereinheit ist die einer Matrize, anhand derer die Addition von sich wiederholenden Telomer-DNA-Sequenzabschnitten an den Chromosomenenden erfolgt. Alle bekannten Telomerase-RNAs enthalten ca. 1.5 Wiederholungen einer Sequenz, die zur sich wiederholenden Sequenz der Telomer-DNA im

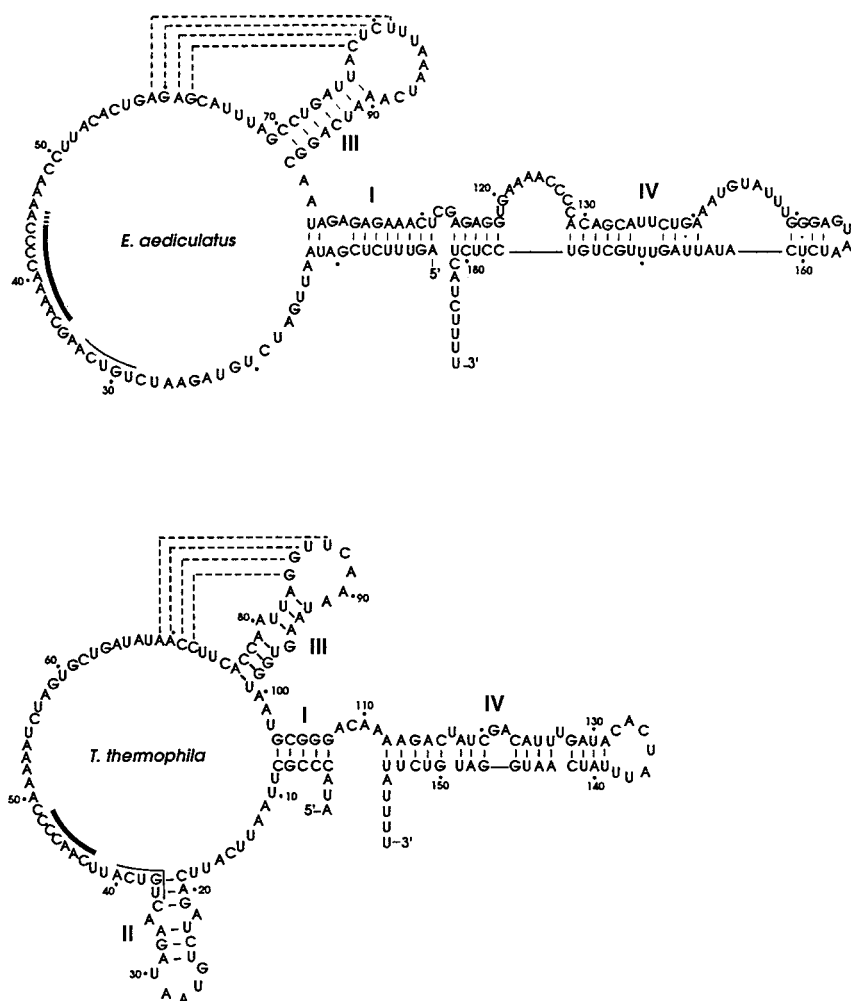


Abbildung 4. Die Sekundärstruktur, jedoch nicht die Nucleotidsequenz der Telomerase-RNA ist bei evolutionär unterschiedlichen Wimpertieren konserviert. Gestrichelte Linien: Basenpaarung der Schleife von Helix III mit einer benachbarten Sequenz unter Bildung eines Pseudoknotens. Fettgedruckte Linien zeigen die Matrizensequenzen an. Benachbarte dünne Linien markieren eine bei Wimpertieren konservierte Sequenz. Die Daten für *Euplotes aediculatus* wurden aus Lit. [20], die für *Tetrahymena thermophila* aus Lit. [24a] entnommen. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [64].)

entsprechenden Organismus komplementär ist. Dass diese RNA-Sequenz tatsächlich als Matrize dient, wurde zuerst bei *Tetrahymena*<sup>[9]</sup> und Hefe<sup>[26]</sup> gezeigt; in beiden Organismen führen Mutationen in der RNA-Matrizensequenz immer zum Einbau der entsprechend vorhersagbaren Sequenzvariante an den Chromosomenenden. Mutationen in der RNA verändern nicht immer einfach nur die Sequenz des DNA-Produkts, sondern können auch Ungenauigkeiten bei der Polymerisation verursachen oder andere Probleme hervorrufen.<sup>[27]</sup> Wahrscheinlich wechselwirkt die RNA-Matrize mit dem aktiven Zentrum von TERT auf eine viel engere Weise als die Matrizen-RNAs, die durch retrovirale Reverse Transkriptasen kopiert werden.

Eine weitere Funktion der RNA-Untereinheit ist zumindest in *S. cerevisiae* die Bereitstellung von Bindungsstellen für Sm-Proteine.<sup>[22]</sup> Hierbei handelt es sich um sieben Proteine, von denen bereits bekannt war, dass sie nur mit kleinen nucleären RNAs (snRNAs, small nuclear RNAs) assoziiert sind, die an der RNA-Prozessierung beteiligt sind. Sie ver-

mitteln die Trimethylierung der 5'-Kappe von snRNAs und sind möglicherweise auch an deren intrazellulärem Transport beteiligt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass andere Regionen der Telomerase-RNAs daran beteiligt sind, weitere Proteine an den Telomerase-Komplex heranzubringen (siehe Abschnitt 4.4), jedoch sind bisher keine RNA-Bindungsstellen für irgendeines dieser Proteine näher spezifiziert worden.

## 4. TERT und andere Proteinkomponenten

### 4.1. Entdeckung von TERT

hTERT, die Reverse Transkriptase der menschlichen Telomerase, war die Telomerasekomponente, die eine Verlängerung der Lebensdauer normaler menschlicher Zellen und die erste maligne Transformation menschlicher Zellen mit einer definierten genetischen Komponente ermöglichte. Trotz intensiver Anstrengungen war diese Schlüsselkomponente beim Menschen viele Jahre lang unentdeckt geblieben. Schließlich identifizierte man sie durch Reinigung des entsprechenden Proteins aus *Euplotes aediculatus*, Identifizierung und genetische Analyse des homologen Proteins aus Hefe sowie die computergestützte Suche nach dem homologen menschlichen Gen in einer EST-Datenbank (EST = expressed sequence tag).

Warum *Euplotes*? Dieser einzellige eukaryontische Organismus vereint in einer Zelle diploide Keimbahn-Mikrokerne und einen somatischen polyploiden Makrokern.<sup>[28]</sup> Jeder Makrokern enthält etwa 50000000 DNA-Moleküle, von denen jedes ein Gen trägt, das von kanonischen Telomerasequenzen flankiert wird (Wiederholungseinheiten von TTTTGGGG-Sequenzen mit einem 3'-überhängenden Ende aus zwei zusätzlichen Wiederholungseinheiten). Aus diesem Grund gibt es in *Euplotes* etwa 1000000-mal mehr Telomere pro Zelle als in menschlichen Zellen und eine entsprechend größere Menge an Telomerase.

Eine affinitätschromatographische Reinigungsmethode für die Isolierung der *Euplotes*-Telomerase aus Zellkernextrakten wurde in meinem Labor von Joachim Lingner entwickelt (Abbildung 5).<sup>[29]</sup> Wie aus dem Verhältnis von enzymatischer Aktivität zum Gehalt an Telomerase-RNA geschlossen werden konnte, blieb das Enzym während der Reinigung vollständig aktiv. Zwei Polypeptide wurden zusammen mit der RNA im aktiven Komplex gereinigt. Das eine hatte ein Molekulargewicht von 123 kDa (p123), das andere von 43 kDa (p43); die errechneten Mengenverhältnisse ließen

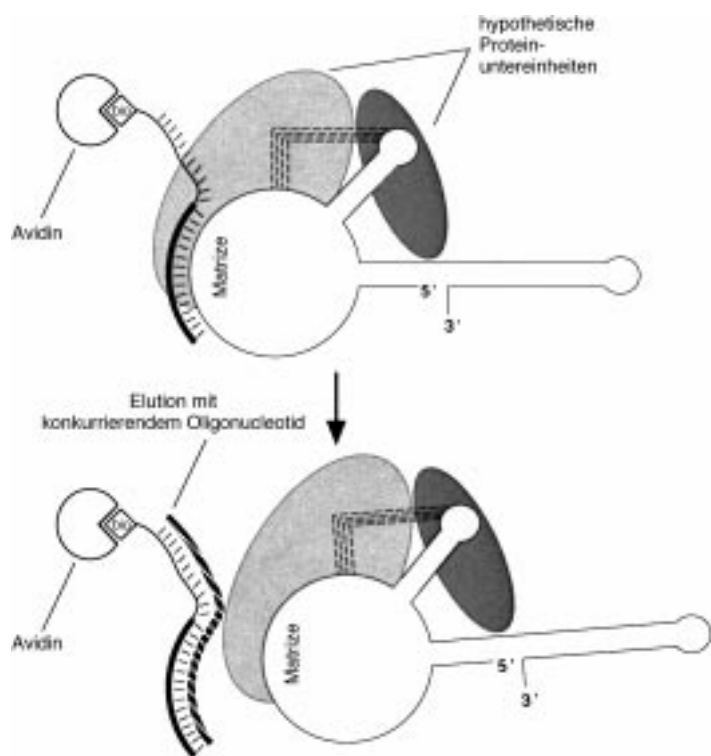


Abbildung 5. Aktive *Euplotes*-Telomerase wurde durch Affinitätschromatographie gereinigt. Oben: Wenn ein Extrakt aus *Euplotes* mit Agarose gemischt wird, an die ein Oligonucleotid gebunden ist, wird die Telomerase über Hybridisierung adsorbiert. Andere Komponenten im Extrakt können anschließend durch einen Waschschrift entfernt werden. Unten: Durch Zusatz eines konkurrierenden Oligonucleotids, das ein stabileres Hybrid mit dem Oligonucleotid auf der Säule bildet, wird die Telomerase von der Säule freigesetzt. (Übernommen aus Lit. [29].)

den Schluss zu, dass es sich um einen 1:1:1-Komplex von zwei Proteinen und der RNA handeln müsse.<sup>[29]</sup>

Untersuchungen mit Elektrospray-Massenspektrometrie in Zusammenarbeit mit Matthias Mann und Andrej Shevchenko (EMBL, Heidelberg) lieferten dann genügend Peptidsequenzdaten, um die Gene für p123 und p43 klonieren und sequenzieren zu können.<sup>[30]</sup> Das größere der beiden Proteine erwies sich als besonders interessant, da es Reverse-Transkriptase-Motive enthielt (kurze, für diese Proteinfamilie charakteristische Aminosäuresequenzabschnitte).<sup>[31]</sup> Da die Telomerase eine RNA-Matrize verwendet, um Telomer-DNA zu synthetisieren, handelt es sich bei ihr per definitionem um eine Art von Reverser Transkriptase. Die Identifizierung der Reverse-Transkriptase-Motive zeigte darüber hinaus, dass das Telomerase-Protein aus *Euplotes* bezüglich der Proteinstruktur und höchstwahrscheinlich auch der evolutionären Herkunft mit anderen bekannten Reversen Transkriptasen verwandt war, beispielsweise mit denen, die von Retrotransposons und Retroviren codiert werden.<sup>[30]</sup>

Die Ergebnisse dieser biochemischen Untersuchungen liefen nachfolgend mit einem genetischen Ansatz zusammen, der vollständig unabhängig im Labor von Victoria Lundblad (Baylor College of Medicine, Houston) verfolgt wurde. Lundblad hatte mit einem genetischen Screeningprogramm begonnen, mit dem Gene identifiziert werden sollten, die in einer mutierten Form den gleichen verkürzenden Einfluss auf

die Telomerlänge hatten, wie dies von Telomerasemutanten erwartet wird. In ihrem Labor wurden vier derartige Gene gefunden, die als *EST1*, *EST2*, *EST3* und *EST4* (*EST* = ever shorter telomeres) bezeichnet wurden.<sup>[32]</sup> (*EST1* war zuvor von Lundblad und Szostak beschrieben worden;<sup>[33]</sup> *EST4* ist auch als *CDC13*<sup>[34]</sup> bekannt.) Die besten Sequenzübereinstimmungen zu p123 in den Proteinsequenzdatenbanken ergaben sich für Lundblads Est2p.<sup>[30]</sup>

Die Identifizierung des Hefe-Homologs war aus mehreren Gründen eine wichtige Entdeckung. Zum einen erschien es attraktiv anzunehmen, dass eine einzige katalytische Unter-einheit in allen Telomerasen konserviert ist. Wäre dies der Fall, sollte das vollständig sequenzierte Hefegenom eine entsprechende Kopie enthalten, und dies war tatsächlich so. Zum zweiten war der eindeutige Nachweis dafür, dass dieses Reverse-Transkriptase-haltige Protein tatsächlich essentiell für die Telomeraseaktivität ist, viel einfacher in Hefe als in *Euplotes* zu erbringen, da für Hefezellen einfache genetische Testmethoden zur Verfügung stehen. In der Tat konnte durch Zusammenarbeit zwischen unserem Labor und dem von Lundblad 1996 sowohl durch einen enzymatischen Test in vitro als auch anhand der Erhaltung der Telomere in vivo der Nachweis erbracht werden, dass Est2p eine Reverse Transkriptase ist, die für die Telomeraseaktivität essentiell ist.<sup>[30]</sup>

Die Sequenz des p123-Proteins aus *Euplotes* ergab auch, dass ein Abschnitt der entsprechenden menschlichen Sequenz in der EST-Datenbank (Washington University, St. Louis) enthalten ist. Die Deletion einer einzigen Aminosäure in Est2p aus Hefe hatte die Zuordnung der entsprechenden menschlichen Sequenz verhindert. Nachdem diese jedoch identifiziert war, ergaben paarweise Sequenzvergleiche ganz eindeutig die Verwandtschaft mit der menschlichen Sequenz. Zur gleichen Zeit hatte Toru Nakamura in meinem Labor *TERT* aus *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife) identifiziert und sequenziert. Mit diesem Gen konnte ebenfalls das menschliche Gegenstück aus der EST-Datenbank identifiziert werden.<sup>[17]</sup> Im Anschluss daran klonierten und sequenzierten wir in Zusammenarbeit mit Wissenschaftlern der Geron Corporation den gesamten offenen Leserahmen des menschlichen Gens.<sup>[17]</sup> Das gleiche Gen, das nun als *hTERT* bezeichnet wird, wurde unabhängig von diesen Arbeiten in verschiedenen anderen Laboratorien kloniert und sequenziert, wobei die Arbeiten alle von der Sequenz des p123-Gens aus *Euplotes* ausgingen.<sup>[18, 35–37]</sup>

Wie die anderen TERTs ist auch *hTERT* ein relativ großes Protein mit einer insgesamt basischen Nettoladung und Reverse-Transkriptase-Motiven im C-terminalen Sequenzbereich (Abbildung 6 A). In der Folgezeit kamen die TERTs aus *Tetrahymena*,<sup>[38, 39]</sup> *Oxytricha*<sup>[38]</sup> und Maus<sup>[40]</sup> zur Sequenzsammlung hinzu (Abbildung 6 A), und erst kürzlich wurde das entsprechende Gen aus der Pflanze *Arabidopsis* identifiziert.<sup>[41]</sup>

Das *hTERT*-Gen wird in Telomerase-negativen normalen menschlichen Zellen nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Seine Expression ist hingegen sehr leicht in Telomerase-positiven immortalisierten menschlichen Zellen nachweisbar. Dies steht im Gegensatz zur überall auftretenden Expression der RNA-Komponente der Telomerase in allen untersuchten



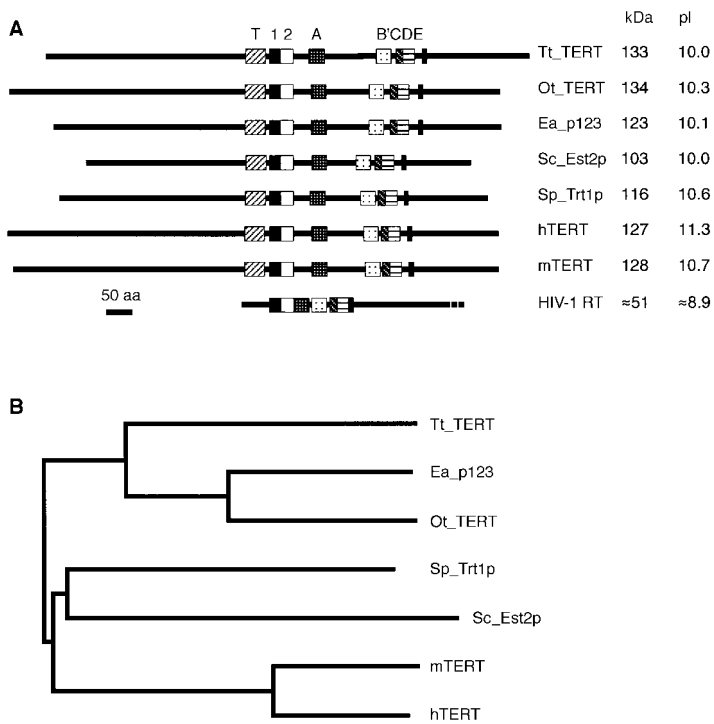


Abbildung 6. Verwandtschaft der Mitglieder der TERT-Familie untereinander und zur retroviralen Reversen Transkriptase aus HIV-1 (HIV-1 RT). A) Proteinsequenzen sind als Linien dargestellt. Schräg schraffiertes Kästchen: Telomerase-spezifisches Motiv T;<sup>[17]</sup> die anderen Kästchen stehen für die Reverse-Transkriptase-Motive 1 und 2 sowie A–E.<sup>[31]</sup> Bei der Reversen Transkriptase aus HIV-1 wurde die RNase-H-Domäne weggelassen. – pI = isoelektrischer Punkt. B) Phylogenetischer Stammbaum von TERTs, berechnet anhand der Sequenzvergleiche der in A) gezeigten Motive. – Tt = *Tetrahymena thermophila*; Ot = *Oxytricha trifallax*; Ea = *Euplotes aediculatus*; Sc = *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe); Sp = *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife); mTERT = TERT aus Maus. (Übernommen aus Lit. [38].)

Zellen und führte zur Vorstellung, dass die Anwesenheit von hTERT möglicherweise einen Schalter darstellt, der bestimmt, ob eine menschliche Zelle Telomeraseaktivität aufweist oder nicht. Die Richtigkeit dieser Vorstellung wurde später belegt, als gezeigt werden konnte, dass die ektopische Expression von *hTERT* in Telomerase-negativen Zellen ausreicht, um in lebenden Zellen chromosomale Telomere zu verlängern und in Zellextrakten die Telomeraseaktivität wieder herzustellen.<sup>[37, 42]</sup>

#### 4.2. Eine neue Unterklasse von Polymerasen

Aminosäuresequenzvergleiche haben gezeigt, dass die TERT-Proteine eine diskrete Unterklasse von Reversen Transkriptasen darstellen, die untereinander enger verwandt sind als mit anderen Reversen Transkriptasen.<sup>[30, 43]</sup> Folgende Eigenschaften unterscheiden diese Proteine von anderen Reversen Transkriptasen:

- 1) Es gibt einige kritische Variationen innerhalb der Reverse-Transkriptase-Motive. Beispielsweise lautet bei den TERT-Proteinen die Sequenz in der Nähe der beiden katalytischen Asparaginsäure-Reste (D) im Motiv C LxDD(F/Y)L; wobei x für eine weniger stark konservierte

Aminosäure und (F/Y) für die Anwesenheit von Phe oder Tyr an dieser Position steht. Im Unterschied dazu lautet in anderen Reversen Transkriptasen die Sequenz (F/Y)xDDxx.

- 2) Eine charakteristische Aminosäuresequenz, die als T(Telomerase-spezifisches)-Motiv bezeichnet wird, geht dem Reverse-Transkriptase-Motiv 1 voraus.

Im Vergleich zu anderen Reversen Transkriptasen sind die TERTs sehr eng verwandt mit den Reversen Transkriptasen von gewissen bakteriellen und mitochondrialen Elementen und von Nicht-LTR-Retrotransposons (LTR = long terminal repeat). (Retrotransposons sind DNA-Elemente, die sich über ein RNA-Intermediat innerhalb und zwischen Genomen bewegen. Sie benötigen dazu eine Reverse Transkriptase, um eine DNA-Kopie zu erzeugen, die in das Chromosom eingebaut werden kann. Einige Retrotransposons enthalten an ihren Enden eine lange Sequenzwiederholung, die den LTRs ähnelt, welche an der retroviralen Replikation beteiligt sind; die Nicht-LTR-Retrotransposons weisen diese Sequenzwiederholung nicht auf.) Die TERTs sind entfernter verwandt mit den Reversen Transkriptasen der LTR-Retrotransposons und Viren und ebenfalls mit den RNA-abhängigen RNA-Polymerasen von Viren wie dem Poliovirus.

Die Transposition von Nicht-LTR-Retrotransposons und Gruppe-II-Introns erfolgt durch zielsequenzvermittelte reverse Transkription, bei der die Reverse Transkriptase ein 3'-OH-Ende an einem DNA-Strangbruch verlängert; die Bruchstelle kann entweder durch eine Endonuclease oder durch die intrinsische katalytische Aktivität der Intron-RNA erzeugt werden. Auf ähnliche Weise erweitert die Telomerase das 3'-OH-Ende eines chromosomalen DNA-Endes. Eine weitere Ähnlichkeit besteht darin, dass bestimmte Gruppe-II-Introns und mitochondriale Reverse Transkriptasen als stabile Komplexe mit ihren RNA-Matrizen gefunden werden, wie dies bei der Telomerase der Fall ist. Die durch Sequenzvergleich ermittelte enge Verwandtschaft von TERTs mit den Reversen Transkriptasen vom Nicht-LTR-Typ wird daher auch noch durch funktionelle Kriterien gestützt.<sup>[43]</sup>

Der phylogenetische Stammbaum der TERTs ähnelt qualitativ gesehen dem der Organismen, aus denen die Telomerasen isoliert wurden: Die beiden Säuger-TERTs sind am engsten verwandt, die beiden Hefe-Spezies gehören ebenfalls zusammen, und die drei Wimpertierchen bilden den dritten Zweig, wobei die beiden Mitglieder der Unterordnung Hypotricha (*Euplotes* und *Oxytricha*) enger miteinander verwandt sind als mit *Tetrahymena* (Ordnung Holotricha; Abbildung 6B). Der phylogenetische Stammbaum ist daher nicht besonders bemerkenswert – er sieht genau so aus, wie man dies für andere evolutionär alte Gene erwarten würde. Wir schließen daraus, dass TERT wahrscheinlich genau so alt ist wie das Reich der Eukaryonten (siehe hierzu auch Lit. [43, 44]).

#### 4.3. Funktionen von TERT

Die Synthese der Telomer-DNA ist die hervorstechendste Funktion von TERT. So weit dies derzeit beurteilt werden



kann, reicht die durch TERT vermittelte Verlängerung der chromosomalen Telomere aus, die weiter oben beschriebenen erstaunlichen Befunde zu erklären: die durch die ektopische Expression von hTERT hervorgerufene Verlängerung der Lebensdauer normaler menschlicher Zellen und die Funktion als fehlendes Verbindungsglied („missing link“) bei der stabilen Transformation menschlicher Zellen in Zellkultur. TERTs sind jedoch große Proteine, viel größer als einige retrovirale Reverse Transkriptasen, und dies legt die Möglichkeit nahe, dass sie neben ihrer Rolle als Polymerasen noch andere Funktionen aufweisen.

Das Telomerase-spezifische T-Motiv des menschlichen TERT-Proteins ist mutiert worden, wobei sich gezeigt hat, dass dieses Motiv zur katalytischen Aktivität der Telomerase *in vitro* beiträgt.<sup>[43]</sup> Die N-terminale Hälfte von Est2p (Hefe-TERT) wurde analysiert, indem eine große Bibliothek zufällig mutierter Varianten hergestellt und daraus diejenigen Varianten isoliert wurden, die in der Lage waren, im Seneszenz-Stadium befindliche *EST2*-negative Hefezellen vor dem Zelltod zu retten.<sup>[45]</sup> Vier essentielle Regionen des N-Terminus wurden kartiert, von denen zwei vermutlich an der Bindung der RNA-Untereinheit beteiligt sind und eine andere wahrscheinlich eine noch nicht identifizierte Untereinheit in den Komplex einbringt.<sup>[45]</sup> Ebenfalls in der Hefe assoziiert Est3p mit der Telomerase-RNA in einer Est2p-abhängigen Weise.<sup>[46]</sup> Es ist daher anzunehmen, dass Est2p eine Bindungsstelle für Est3p bereitstellt. Man ist erst dabei, die spezifischen Beiträge des T-Motivs und der restlichen N-terminalen Domäne von TERT aufzuklären. Es ist daher sehr wohl möglich, dass die Einführung oder die Reaktivierung von TERT in menschliche Zellen neben der offensichtlichen Telomerenverlängerung noch andere Wirkungen haben.

#### 4.4. Andere Protein-Komponenten der Telomerase

(Da diese Komponenten kürzlich in einem Übersichtsartikel beschrieben wurden,<sup>[47]</sup> werden sie hier nur kurz diskutiert.) Abgesehen von TERT scheinen die anderen in Assoziation mit der Telomerase gefundenen Proteine Spezies-spezifisch zu sein. Eine Ausnahme ist das aus *Tetrahymena* stammende p80,<sup>[48]</sup> das große Homologie zu einer Domäne eines viel größeren (230–240 kDa) menschlichen Telomerase-assoziierten Proteins aufweist, das als TEP1 bezeichnet wird.<sup>[49, 50]</sup> Zurzeit gibt es noch keine publizierten Hinweise auf die Wichtigkeit dieser Proteine für die Telomeraseaktivität *in vivo* oder *in vitro*.

Est1p und Est3p sind zwei Telomerase-assoziierte Proteine vom Nicht-TERT-Typ, die *in vivo* in Hefezellen für die Telomeraseaktivität essentiell sind.<sup>[32, 33]</sup> Est1p ist ein Protein, das einzelsträngige Telomer-DNA bindet; es erscheint daher plausibel, dass Est1p der Telomerase hilft, Telomere in der Zelle zu lokalisieren.<sup>[51]</sup> Dies würde auch erklären, warum das Protein für Assays zur Bestimmung der Telomerase-Aktivität *in vitro* unabdingbar ist, bei denen Telomer-DNA-Substrate als proteinfreie Oligonucleotide eingesetzt werden und somit für die Telomerase leicht zugänglich sind. Eine Funktion für Est3p ist noch nicht vorgeschlagen worden.

#### 5. Möglichkeiten der chemischen Intervention

Nachdem nun die Wichtigkeit der Telomerase für die maligne Transformation von Zellen und für die Verlängerung der Lebensdauer menschlicher Zellen belegt worden ist, konzentrieren medizinisch und pharmazeutisch forschende Chemiker ihr Interesse auf Möglichkeiten, Telomerasereaktionen zu beeinflussen. Inhibitoren der Telomerase sind vielversprechende Kandidaten für Medikamente gegen eine große Palette unterschiedlicher Krebsarten. Andererseits sollten Aktivatoren der Telomerase in der Lage sein, die Lebensdauer normaler menschlicher Zellen in Kultur zu verlängern, und könnten daher nützliche medizinische Anwendungen bei bestimmten altersabhängigen Erkrankungen finden.

Der naheliegendste Anti-Telomerase-Angriffspunkt ist der hTERT-RNA-Kern des Enzyms. Die Proteinkomponente dieses Komplexes ist, wie bereits erwähnt, mit anderen Reversen Transkriptasen verwandt. Eine mögliche Klasse von Inhibitoren sind daher Nucleosidanaloga. Unterschiede bei wichtigen Aminosäuren der aktiven Zentren legen jedoch den Schluss nahe, dass TERTs eine von anderen Reversen Transkriptasen verschiedene Struktur aufweisen (siehe Abschnitt 4.2); es ist daher nicht verwunderlich, dass AZT (Azidothymidin) und andere Inhibitoren der Reversen Transkriptase von HIV nur schwache Inhibitoren der Telomerase sind.<sup>[52]</sup> Aus diesem Grund müssen für hTERT spezifisch wirkende Inhibitoren entwickelt werden. Die RNA-Matrizenkomponente der Telomerase kann durch Oligonucleotide mit stabilen 2'-O-Methylribose-Einheiten oder durch Peptidnucleinsäuren (PNAs) inhibiert werden.<sup>[53]</sup>

Die Aktivierung der Telomerase in normalen menschlichen Zellen kann nicht durch Verbindungen erreicht werden, die gegen hTERT gerichtet sind, da hTERT in diesen Zellen nicht exprimiert wird.<sup>[17, 18]</sup> Chemische Ansätze für dieses Problem könnten die Entwicklung von Verbindungen umfassen, die auf der Ebene der Induktion der Transkription des *hTERT*-Gens eingreifen, dessen Promotor durch den Transkriptionsfaktor c-Myc<sup>[54]</sup> und möglicherweise auch durch andere, noch nicht beschriebene Proteine aktiviert wird. Das alternative Spleißen der mRNA bietet eine weitere Möglichkeit, in gewissen Zellen die Expression der Telomerase zu verringern, so dass Verbindungen, die in der Lage sind, die RNA-Spleißmaschinerie zu beeinflussen, hierfür von Interesse sein könnten. Letztlich könnte die Einführung eines *hTERT*-Gens durch gentherapeutische Eingriffe eine weitere Möglichkeit eröffnen, die Telomerase im Menschen zu aktivieren, zumal sich die Transfektion, wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, bereits bei der Aktivierung der Telomerase in menschlichen Zellen als erfolgreich erwiesen hat.

Für die Inhibition der Telomerase hat die Erkenntnis, dass die Reifung und der Zusammenbau dieses Enzyms sehr komplexe Vorgänge sind (Abbildung 7),<sup>[21–23]</sup> andere Interventionspunkte aufgezeigt. Darüber hinaus haben Holt et al.<sup>[55]</sup> gefunden, dass die Chaperon-Proteine p23 und hsp90 (ein Hitzeschock-Protein) für die Zusammenlagerung von Telomerasekomponenten zu einem enzymatisch aktiven Komplex *in vitro* notwendig sind und dass diese Proteine

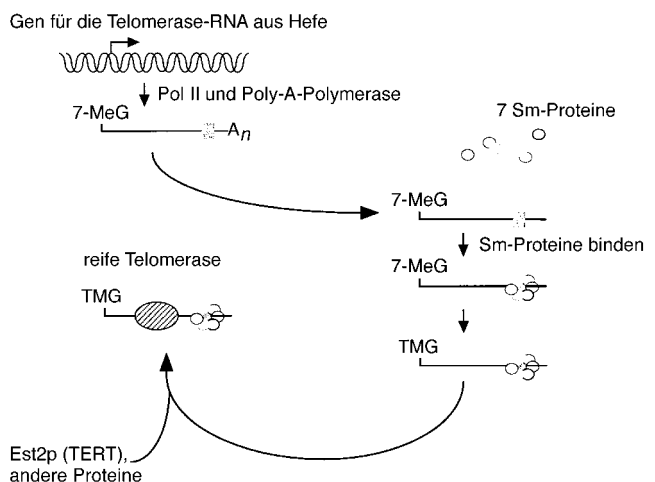


Abbildung 7. Die Reifung und der Zusammenbau der Telomerase erfolgt über einen komplexen Weg in mehreren Schritten. Das hier gezeigte Modell für den Weg in Hefe beruht auf Daten von Chapon et al.<sup>[21]</sup> und Seto et al.<sup>[22]</sup> – 7-MeG = 7-Methylguanosin; TMG = 2,2,7-Trimethylguanosin.

wahrscheinlich in Zellextrakten mit dem vorgebildeten Komplex assoziiert bleiben. Geldanamycin (ein Benzochinon), das Funktionen von hsp90 durch Bindung an dessen ATP-Bindungsstelle inhibiert, blockiert den Zusammenbau der aktiven Telomerase in vitro und in kultivierten menschlichen Zellen.<sup>[55]</sup> Gegen die pharmazeutische Anwendung der gezielten Beeinflussung der Reifung und der Zusammenlagerung der Telomerase oder der Chaperonkomponenten spricht die Tatsache, dass derartige Komponenten höchstwahrscheinlich ebenfalls in anderen biochemischen Reaktionswegen verwendet werden. Wenn keine Telomerase-spezifischen Eigenschaften identifiziert werden können, ist eine Blockade dieser zellulären Prozesse sehr wahrscheinlich toxisch.

Zum Schluss soll noch die spezifische Beeinflussung der Telomere (Chromosomenenden) selbst betrachtet werden, da sie die Substrate sind, auf die die Telomerase einwirkt. Die Enden der Chromosomen weisen sowohl einzelsträngige DNA als auch Proteinkomponenten auf. In vielen Organismen, den Menschen eingeschlossen, enthält die einzelsträngige DNA G-reiche Sequenzwiederholungen, die sich intramolekular (oder intermolekular) zu quadrupelhelicalen Strukturen falten können; jeder G-Rest ist über Hoogsteen-Wasserstoffbrücken mit einem anderen G-Rest in einer quadratisch-planaren Anordnung verbunden, die als G-Quartett bezeichnet wird.<sup>[56]</sup> In dieser Struktur ist das 3'-Ende der DNA vor der Telomerase verborgen, so dass die Verlängerung durch die Telomerase inhibiert wird.<sup>[57]</sup> Hurley und Mitarbeiter<sup>[58]</sup> entwickeln Verbindungen, die die G-Quartett-Form der Telomer-DNA stabilisieren und so möglicherweise die Funktion der Telomerase blockieren. Proteinkomponenten der Telomere fungieren ebenfalls als negative Regulatoren der Telomerase (für eine Übersicht siehe Lit. [47]). Die Stabilisierung der Wechselwirkung zwischen den Proteinkomponenten der Telomere und der DNA oder die Inhibierung von Komponenten, die normalerweise diese Proteine verdrängen, könnten einen weiteren Weg darstellen, die Aktivität der Telomerase zu blockieren.

Eine Herausforderung beim erfolgreichen Einsatz von Anti-Telomerase-Therapeutika ist möglicherweise der Be-

fund, dass einige wenige menschliche Tumoren einen alternativen Nicht-Telomerase-Mechanismus verwendet, um Telomerlängen zu stabilisieren.<sup>[59]</sup> Dieser ALT-Weg (*alternative lengthening of telomeres*) beinhaltet möglicherweise die Verlängerung von Telomeren mit Hilfe eines anderen Telomers als Matrize, wobei DNA-Rekombinationsproteine, welche die DNA-Stranginvasion katalysieren, den Prozess erleichtern. Die Anwendung eines Telomeraseinhibitors könnte einen selektiven Wachstumsvorteil für die wenigen Zellen darstellen, die den ALT-Weg verwenden und daher keine Telomerase benötigen. Möglicherweise sieht man sich daher demnächst genötigt, auch Inhibitoren für den ALT-Weg zu entwickeln. Andererseits gibt es immer Reaktionswege für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber pharmazeutisch wirksamen Substanzen, so dass dieses potentielle Problem das Interesse an der Entwicklung effektiver Anti-Telomerase-Wirkstoffe nicht bremsen sollte.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Telomerase ist ein ungewöhnliches Enzym, ein RNA-Protein-Komplex, der die DNA-Sequenzwiederholungen an den Chromosomenenden verlängert und dadurch eine vollständige Replikation ermöglicht. In den vergangenen Jahren haben wir große Fortschritte beim Verständnis dieses Enzyms erlebt. Die katalytisch aktive Proteinuntereinheit der Telomerase wurde in verschiedenen Organismen einschließlich des Menschen identifiziert. Sie repräsentiert einen neuen Zweig im Stammbaum der Familie der Reversen Transkriptasen. An der biomedizinischen Forschungsfront erlebten wir eine grundlegende experimentelle Bestätigung der lang gehegten Annahme, dass die Telomerase-Desaktivierung eine Rolle bei der zellulären Seneszenz und die Telomerase-Aktivierung eine Rolle bei der Tumorentstehung spielt.

Daher haben Chemiker sehr viel mehr Anreize, Verbindungen zu entwickeln, die die Telomeraseaktivität modulieren können, und sie haben eine klar definierte molekulare Komponente als Zielmolekül. Ein besonders attraktives Zielmolekül ist die katalytische Untereinheit der Telomerase, hTERT. Darüber hinaus kann die Entwicklung von Verbindungen in Betracht gezogen werden, die die Expression des *hTERT*-Gens modulieren, die den Zusammenbau des Protein-RNA-Komplexes beeinträchtigen, oder die den Zugang der Telomerase zu ihrem Telomer-DNA-Substrat verhindern. Kürzlich wurden dominant-negative Varianten von hTERT gefunden, die in der Lage sind, Tumorzellen durch Apoptose (programmierten Zelltod) zu töten.<sup>[60]</sup> Diese Befunde verstärken den Enthusiasmus dafür, dass Anti-Telomerase-Medikamente tatsächlich eine Antitumorwirkung aufweisen werden.

*Ich danke Toru Nakamura, Anita Seto, Scott Silvermann, Tracy Bryan, Phil Hammond und Joachim Lingner für die Anfertigung von Abbildungen sowie ihnen und anderen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe für ihre Beiträge zu den hier beschriebenen Forschungsarbeiten. Peter Baumann und Christian Häring danke ich für das Korrekturlesen der deutschen Fassung.*

Eingegangen am 30. September 1999 [A 363]  
Übersetzt von Dr. Horst Ibelgaufs, München

- [1] J. G. Gall in *Telomeres* (Hrsg.: E. H. Blackburn, C. W. Greider), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1995**, S. 1–10.
- [2] E. H. Blackburn, J. G. Gall, *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 33–53.
- [3] M. P. Horvath, V. L. Schweiker, J. M. Bevilacqua, J. A. Ruggles, S. C. Schultz, *Cell* **1998**, *95*, 963–974.
- [4] J. D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. de Lange, *Cell* **1999**, *97*, 503–514.
- [5] J. Lingner, J. P. Cooper, T. R. Cech, *Science* **1995**, *269*, 1533–1534.
- [6] a) M. Olovnikov, *J. Theor. Biol.* **1973**, *41*, 181–190; b) J. D. Watson, *Nature (London) New Biol.* **1972**, *239*, 197–201.
- [7] C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Cell* **1985**, *43*, 405–413.
- [8] C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Nature* **1989**, *337*, 331–337.
- [9] G. L. Yu, J. D. Bradley, L. D. Attardi, E. H. Blackburn, *Nature* **1990**, *344*, 126–132.
- [10] a) L. Hayflick, *Exp. Cell Res.* **1965**, *37*, 614–636; b) T. de Lange, *Science* **1998**, *279*, 334–335.
- [11] C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider, *Nature* **1990**, *345*, 458–460.
- [12] a) A. G. Bodnar, M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, W. E. Wright, *Science* **1998**, *279*, 349–352; b) H. Vaziri, S. Benchimol, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 279–282.
- [13] C. M. Counter, M. Meyerson, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, S. D. Caddle, D. A. Haber, R. A. Weinberg, *Oncogene* **1998**, *16*, 1217–1222.
- [14] T. Kiyono, S. A. Foster, J. I. Koop, J. K. McDougall, D. A. Galloway, A. J. Klingelutz, *Nature* **1998**, *396*, 84–88.
- [15] C. D. Belair, T. R. Yeager, P. M. Lopez, C. A. Reznikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13677–13682.
- [16] V. J. Cristofalo, R. G. Allen, R. J. Pignolo, B. G. Martin, J. C. Beck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *95*, 10614–10619.
- [17] T. M. Nakamura, G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, T. R. Cech, *Science* **1997**, *277*, 955–959.
- [18] M. Meyerson, C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, P. Steiner, S. D. Caddle, L. Ziaugra, R. L. Beijersbergen, M. J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D. A. Haber, R. A. Weinberg, *Cell* **1997**, *90*, 785–795.
- [19] W. C. Hahn, C. M. Counter, A. S. Lundberg, R. L. Beijersbergen, M. W. Brooks, R. A. Weinberg, *Nature* **1999**, *400*, 464–468.
- [20] J. Lingner, L. L. Hendrick, T. R. Cech, *Genes Dev.* **1994**, *8*, 1984–1998.
- [21] C. Chapon, T. R. Cech, A. J. Zaug, *RNA* **1997**, *3*, 1337–1351.
- [22] A. G. Seto, A. J. Zaug, S. G. Sobel, S. L. Wolin, T. R. Cech, *Nature* **1999**, *401*, 177–180.
- [23] J. R. Mitchell, J. Cheng, K. Collins, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 567–576.
- [24] a) D. P. Romero, E. H. Blackburn, *Cell* **1991**, *67*, 343–353; b) M. McCormick-Graham, D. P. Romero, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 1871–1879.
- [25] A. J. Zaug, J. Lingner, T. R. Cech, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 532–533.
- [26] M. S. Singer, D. E. Gottschling, *Science* **1994**, *266*, 404–409.
- [27] D. Gilley, E. H. Blackburn, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 66–75.
- [28] D. M. Prescott, *Microbiol. Rev.* **1994**, *58*, 233–267.
- [29] J. Lingner, T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 10712–10717.
- [30] J. Lingner, T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad, T. R. Cech, *Science* **1997**, *276*, 561–567.
- [31] Y. Xiong, T. H. Eickbush, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3353–3362.
- [32] T. S. Lendvay, D. K. Morris, J. Sah, B. Balasubramanian, V. Lundblad, *Genetics* **1996**, *144*, 1399–1412.
- [33] V. Lundblad, J. W. Szostak, *Cell* **1989**, *57*, 633–643.
- [34] B. Garvik, M. Carson, L. Hartwell, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 6128–6138.
- [35] L. Harrington, W. Zhou, T. McPhail, R. Oulton, D. S. Yeung, V. Mar, M. B. Bass, M. O. Robinson, *Genes Dev.* **1997**, *11*, 3109–3115.
- [36] A. Kilian, D. D. Bowtell, H. E. Abud, G. R. Hime, D. J. Venter, P. K. Keese, E. L. Duncan, R. R. Reddel, R. A. Jefferson, *Hum. Mol. Genet.* **1997**, *6*, 2011–2019.
- [37] J. Nakayama, H. Tahara, E. Tahara, M. Saito, K. Ito, H. Nakamura, T. Nakanishi, E. Tahara, T. Ide, F. Ishikawa, *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 65–68.
- [38] T. M. Bryan, J. M. Sperger, K. B. Chapman, T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8479–8484.
- [39] K. Collins, L. Gandhi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8485–8490.
- [40] R. A. Greenberg, R. C. Allsopp, L. Chin, G. B. Morin, R. A. DePinho, *Oncogene* **1998**, *16*, 1723–1730.
- [41] K. Oguchi, H. Liu, K. Tamura, H. Takahashi, *FEBS Lett.* **1999**, *457*, 465–469.
- [42] S. L. Weinrich, R. Pruzan, L. Ma, M. Ouellette, V. M. Tesmer, S. E. Holt, A. G. Bodnar, S. Lichtsteiner, N. W. Kim, J. B. Trager, R. D. Taylor, R. Carlos, W. H. Andrews, W. E. Wright, J. W. Shay, C. B. Harley, G. B. Morin, *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 498–502.
- [43] T. M. Nakamura, T. R. Cech, *Cell* **1998**, *92*, 587–590.
- [44] T. H. Eickbush, *Science* **1997**, *277*, 911–912.
- [45] K. Friedman, T. R. Cech, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2863–2874.
- [46] C. I. Nugent, V. Lundblad, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1073–1085.
- [47] T. M. Bryan, T. R. Cech, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 318–324.
- [48] K. Collins, R. Kobayashi, C. W. Greider, *Cell* **1995**, *81*, 677–686.
- [49] L. Harrington, T. McPhail, V. Mar, W. Zhou, R. Oulton, M. B. Bass, I. Arruda, M. O. Robinson, *Science* **1997**, *275*, 973–977.
- [50] J. Nakayama, M. Saito, H. Nakamura, A. Matsuura, F. Ishikawa, *Cell* **1997**, *88*, 875–884.
- [51] V. Virta-Pearlman, D. K. Morris, V. Lundblad, *Genes Dev.* **1996**, *10*, 3094–3104.
- [52] a) C. Strahl, E. H. Blackburn, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 893–900; b) C. Strahl, E. H. Blackburn, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 53–65.
- [53] A. E. Pitts, D. R. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11549–11554.
- [54] a) J. Wang, L. Y. Xie, S. Allan, D. Beach, G. J. Hannon, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 1769–1774; b) K.-J. Wu, C. Grandori, M. Amacker, N. Simon-Vermot, A. Polack, J. Lingner, R. Dalla-Favera, *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 220–224.
- [55] S. E. Holt, D. L. Aisner, J. Baur, V. M. Tesmer, M. Dy, M. Ouellette, J. B. Trager, G. B. Morin, D. O. Toft, J. W. Shay, W. E. Wright, M. A. White, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 817–826.
- [56] a) J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, T. R. Cech, *Cell* **1989**, *59*, 871–880; b) W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature* **1989**, *342*, 825–829; c) Y. Wang, D. J. Patel, *Structure* **1993**, *1*, 263–282.
- [57] A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott, *Nature* **1991**, *350*, 718–720.
- [58] a) D. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, M. Salazar, S. M. Kerwin, J. O. Trent, T. C. Jenkins, S. Neidle, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113–2116; b) H. Han, C. L. Cliff, L. H. Hurley, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6981–6986.
- [59] T. M. Bryan, A. Englezou, L. Dalla-Pozza, M. A. Dunham, R. R. Reddel, *Nat. Med.* **1997**, *3*, 1271–1274.
- [60] a) X. Zhang, V. Mar, W. Zhou, L. Harrington, M. O. Robinson, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2388–2399; b) W. C. Hahn, S. A. Stewart, M. W. Brooks, S. G. York, E. N. Eaton, A. Kurachi, R. L. Beijersbergen, J. H. M. Knoll, M. Meyerson, R. A. Weinberg, *Nat. Genet.* **1999**, *5*, 1164–1170.
- [61] K. Collins, C. W. Greider, *Genes Dev.* **1993**, *7*, 1364–1376.
- [62] P. W. Hammond, T. R. Cech, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5162–5172.
- [63] C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 777–822.
- [64] T. R. Cech, J. Lingner, *Ciba Found. Symp.* **1997**, *211*, 20–34.