

# Telomere und Telomerase: Das Ende ist entscheidend (Nobel-Aufsatz)\*\*

Elizabeth H. Blackburn\*

DNA · Nobel-Vortrag · Telomerase · Telomere

## Autobiographie

### Kindheit und Schule

Ich wurde 1948 in der kleinen Stadt Hobart in Tasmanien in Australien geboren. Meine Eltern waren Hausärzte. Mein Großvater und mein Urgroßvater mütterlicherseits waren Geologen. Mein Urgroßvater väterlicherseits hatte, bevor er als anglikanischer Seelsorger nach Australien kam, einige Zeit in Hawaii gelebt, wo er Coleoptera (Käfer) gesammelt hatte. Er vervollständigte seine Sammlung in Australien und verkaufte sie irgendwann an das British Museum of Natural History. Mein Onkel und meine Tante (die Schwester meines Vaters und der Bruder meiner Mutter) waren ebenfalls Hausärzte, die nach England zogen, dort heirateten und sich niederließen, um als Ärzte zu arbeiten und die Familie großzuziehen.

Ich war das zweitälteste von sieben Geschwistern. Ich verbrachte meine ersten vier Lebensjahre in der winzigen Stadt Snug am Meer bei Hobart. Weil mich Tiere interessierten, sammelte ich Ameisen in unserem Hinterhof und Quallen am Strand. Dann zog meine Familie nach Launceston im Norden von Tasmanien um. Unser erstes Haus in der Abbott Street 120 war einstöckig mit Veranda, eine typische

australische Vorstadtarchitektur. Ich ging in eine Mädchenschule, die Broadland House Girls Grammar School in Launceston.

Ich hielt Kaulquappen in einem Hinterzimmer unseres Hauses, die Glasgefäße fingen aber schnell an riechen. Bevor ich zwölf Jahre war, zogen wir in ein größeres Haus um, das Elphin House, hinter dem ein großer Garten lag. Im Lauf der Jahre hatten wir viele Haustiere. Bei einer Gelegenheit umfasste die häusliche Menagerie Wellensittiche und Kanarienvögel in einer Voliere in einer Gartenecke, Goldfische in einem Teich, Hühner und Küken (wegen der Eier und gelegentlich gebratenem Geflügel) in einem Hühnerstall, Kaninchen und Meerschweinchen in Käfigen, und Katzen und einen Hund, die sich überall in Haus und Garten herumtrieben. Ich mochte all diese Haustiere und auch Tiere und die Natur im Allgemeinen.



Elizabeth Blackburn und ihre Schwester Katherine, bereit für Elizabeths ersten Schultag. Launceston, Tasmanien, um 1953.



Die Geschwister Blackburn im Garten ihres Hauses Olive Street 3, Launceston, Tasmanien, um 1965. Von links nach rechts: hintere Reihe: Andrew, Elizabeth, Katherine, John, Barbara; vordere Reihe: Caroline, Margaret. Um 1965.

Vielleicht ausgelöst durch die Faszination, die von den Tieren ausging, erschien mir Biologie in meiner Kindheit als

[\*] Prof. E. H. Blackburn  
Department of Biochemistry and Biophysics  
The University of California San Francisco  
San Francisco, CA 94158 (USA)  
E-Mail: elizabeth.blackburn@ucsf.edu

[\*\*] Copyright© Nobel-Stiftung 2009. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung dieses Aufsatzes.

die interessanteste Wissenschaft. Ich war fasziniert vom Bild der Wissenschaften in Sachbüchern für Jugendliche und vom romantischen Ideal des wissenschaftlichen Strebens. Letzteres wurde vor allem durch die Biographie von Marie Curie (geschrieben von ihrer Tochter) angeregt, die ich als Kind immer wieder las. Als Teenager fasste ich den Entschluss, dass ich Wissenschaftlerin werden wollte. Ich wurde an der Broadland House Girls Grammar School unterrichtet und erhielt eine insgesamt ausgezeichnete Erziehung. Nur Physik wurde nicht angeboten, und so besuchte ich abends die Physikurse an der örtlichen Volkshochschule. Latein und Griechisch wurden an meiner Mädchenschule ebenfalls nicht gelehrt, was ich in meinem späteren Leben ziemlich bedauert habe. An der Schule gab es aber eine hervorragende Klavierlehrerin, Helen Roxburgh, von der ich während meiner gesamten Schulzeit in Launceston unterrichtet wurde. Ich liebte das Klavierspiel und malte mir zeitweise sogar aus, Musikerin werden zu können. Zum Glück war ich realistisch genug um zu sehen, dass ich beim Klavierspiel zwar geschickt, aber nicht außergewöhnlich begabt war und so wandte ich mich der Wissenschaft zu.

Nach einigen familiären Turbulenzen zogen wir nach Melbourne in Australien um, gerade rechtzeitig, dass ich mein letztes Jahr auf der High School an der University High School abschließen konnte. Ich beschloss, mich anschließend an der University of Melbourne für ein Bachelor-Studium zu bewerben.

### Studium

Ich wählte Biochemie als Hauptfach und schloss nach vier Jahren mit Auszeichnung ab. Während dieser Zeit hatte ich die biochemische Forschung lieben gelernt, auch wenn ich mich an die Laborarbeit noch gewöhnen musste.

Der Leiter des Biochemistry Department, Frank Hird, bot mir eine Stelle als Master-Studentin in seinem Forschungslabor an, wo die Biochemie des Aminosäurestoffwechsels untersucht wurde. Die Betreuer meiner Bachelor-Arbeit, Theo Dopheide und später Barrie Davidson, hatten mich ermutigt, für die Doktorarbeit ins Ausland zu gehen. Barrie legte mir das MRC Laboratory of Molecular Biology (LMB) in Cambridge in England ans Herz, an dem er als Postdoc gearbeitet hatte. Um allerdings als Biologie-Doktorand in Cambridge angenommen zu werden, mussten Bewerber von außerhalb Großbritanniens ein Jahr Forschungserfahrung nachweisen. Eine Master-Arbeit bei Frank Hird über den Glutaminstoffwechsel in der Rattenleber erschien zu diesem Zweck dazu geeignet.

Frank Hird hatte eine starke Persönlichkeit und brachte seinen Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe die Freude und Ästhetik der Forschung nahe. Nach seiner Auffassung sollte jedes Experiment so schön und zugleich einfach sein wie eine Mozart-Sonate. Manchmal fuhren wir gemeinsam für ein Picknick im Grünen in die Hügel außerhalb von Melbourne – die ganze Arbeitsgruppe war in sein Auto gequetscht, und Mozart erklang laut aus dem Autoradio.

Ich war noch in Frank Hirds Labor, als Fred Sanger Melbourne besuchte. Frank Hird hatte in England kurz nach

dem Zweiten Weltkrieg zusammen mit Fred Sanger an Aminosäuren gearbeitet; er stellte mich Fred vor und ermunterte mich, ihm von meinem Wunsch nach einer Doktorandenstelle in Cambridge am LMB zu erzählen. Und so konnte ich nach meiner Zulassung am LMB als Doktorandin in Freds Arbeitsgruppe anfangen.

Das Abenteuer, mich nach England aufzumachen, weg von Heimat und Familie, war ein großer Schritt, aber ich war bereit dazu. Meine Tante und mein Onkel und ihre Familie in Cambridge, die in der Nähe des LMB wohnten, waren meine Verbindung zu einer Familie, weg von zu Hause. Ich liebte das LMB, die Wissenschaft, die dort betrieben wurde, die Atmosphäre, im Epizentrum der Biologie zu sein, die Konzentration der Wissenschaftler und die ständigen Diskussionen über Wissenschaft. Es war wie eine abgeschlossene Welt. Für meine Doktorarbeit sequenzierte ich Teile des Bakteriophagen  $\Phi$ X174, eines kleinen Einzelstrang-DNA-Bakteriophagen. Ich transkribierte Fragmente der Phagen-DNA in RNA und wandte dann die Methoden an, die Fred entwickelt hatte, um RNA-Sequenzen zusammenzufügen. Wir kombinierten die Sequenzen, die wir mit dieser Methode aufgeklärt hatten, mit den DNA-Sequenzen, die John Sedat, Ed Ziff und Francis Galibert in Freds Labor entdeckt hatten. Alle Sequenzen passten. Die erste Sequenz eines 48 Nucleotide langen Fragments dieses winzigen Bakteriophagen-DNA-Genoms war ungeheuer spannend. Ich zeigte sie meinem mathematisch begabten Cousin aus Cambridge, der damals 12 Jahre alt war, um zu sehen, ob sein mathematisch geschultes Auge auf irgendwelche Muster stoßen würde. Er wies auf die Sequenzwiederholungen hin, aber die Zeit war noch nicht reif, um über die Analyse von DNA-Sequenzmustern nachzudenken!

### In den Vereinigten Staaten

Der Horizont für die Entdeckung von DNA-Sequenzen weitete sich, und ich war von den Möglichkeiten überwältigt, die sich eröffneten. Ich hatte vor, ab 1975 als Postdoc zu Howard Goodman und seinem Kollegen Herb Boyer an die University of California, San Francisco, zu gehen – eine Entscheidung, die nach einem Gespräch mit Herb im Garten eines belgischen Klosters gefällt wurde, wo wir beide einen wissenschaftlichen Kongress besuchten, ich noch als Doktorandin. Aber dann kam die Liebe dazwischen: John Sedat und ich beschlossen zu heiraten, und weil John nach Yale ging, versuchte ich, anstelle der Postdoc-Stelle an der UCSF (für die ich schon ein Anna Fuller-Stipendium hatte) etwas Vergleichbares in Yale zu erhalten. Howard Goodman hatte Verständnis, als ich ihm von den Gründen für meinen Sinneswandel berichtete, und ich begann eine Postdoc-Stelle in Yale zu suchen.

So kam es, dass die Liebe eine höchst glückliche und folgenreiche Entscheidung für mich traf: Sie führte mich in Joe Galls Labor in Yale. Nach einigen kleineren Pannen, die durch fehlgeleitete internationale Post und andere Faktoren verursacht wurden, nahm Joe mich 1975 als Postdoc in seinem Labor an, wohin ich auch mein Anna-Fuller-Stipendium mitnehmen durfte. Ich begann sofort mit der Suche nach Methoden, um die DNA zu sequenzieren, die sich in den

terminalen Regionen der häufigen kurzen linearen „Minichromosomen“ befand, die das Ribosomen-Gen tragen. Joe und seine Kollegen hatten diese Minichromosomen gleichzeitig mit Jan Engberg in Dänemark im somatischen Kern des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* (der damals noch *Tetrahymena pyriformis* hieß) entdeckt.

#### An der University of California

Nach meiner Postdoc-Zeit bei Joe Gall zog ich mit John Sedat, den ich 1975 geheiratet hatte, Ende 1977 nach San Francisco. Dort trat John eine Position als Assistant Professor an der University of California, San Francisco (UCSF) an. Ich hatte mich auf mehrere Stellen als Assistant Professor bei verschiedenen Universitäten beworben, war aber von vielen abgelehnt worden, was eine entmutigende Erfahrung war. Ich hatte mich auch für eine solche Position am Department of Molecular Biology an der University of California in Berkeley beworben, hatte aber noch keine Nachricht, ob ich noch im Rennen war. Währenddessen bot mir UCSF eine Forschungsstelle und einen Arbeitsplatz im Department of Biochemistry in der Genetik-Abteilung unter Herb Boyer an. Aus meinem ersten NIH-Projekt wurden mein Gehalt und meine Forschungsaufwendungen bezahlt. Ich hatte den Antrag mit Unterstützung der UCSF geschrieben, um meine Forschung über *Tetrahymena*-Telomere und ihre assoziierten Proteine fortzusetzen. Diese Arbeit war aus dem erwachsen, was ich bei Joe Gall in Yale gemacht hatte. Mein Projekt wurde vom NIH General Medicine Institute gefördert. Da ich mir meiner Aussicht auf Förderung nicht sicher war, hatte ich den selben Antrag an die National Institutes of Health, die National Science Foundation und die American Cancer Society geschickt, in der Hoffnung, zumindest von einem Geldgeber gefördert zu werden. Die Gepflogenheiten unter Grundlagenforschern waren damals noch weniger formell, und so erzählte mir einer der Gutachter einige Zeit später, dass er von meinem Autoradiogramm, auf dem zu sehen war, dass die Telomer-DNA von *Tetrahymena* geheimnisvoll zu etwas anderem als zu Nucleosomen verpackt war, so fasziniert war, dass er das Photo behalten habe.

Dann bot mir Berkeley eine Stelle als Assistant Professor im Molecular Biology Department an, die ich sofort annahm. Ein weiteres Mal transferierte ich meine Förderung von der UCSF, diesmal in mein eigenes Labor an der UC Berkeley.

Da die Forschung damals wie heute ein zentraler Bestandteil meines Lebens war, wäre meine Autobiographie unvollständig ohne eine Beschreibung meiner Erfahrungen als Forscherin. Um sie in lebhafteren Farben schildern zu können, beschreibe ich hier einige der Ereignisse meiner frühen wissenschaftlichen Forschung über die molekularen Eigenschaften der Chromosomenenden.

#### Frühe Arbeiten über die DNA an den Enden eukaryotischer Chromosomen

Sehr bald, nachdem ich meine Arbeit bei Joe Gall in Yale Anfang 1975 aufgenommen hatte, begann ich, Methoden zu

entwickeln, um terminale DNA-Sequenzen von *Tetrahymena*-rDNA-Molekülen zu erhalten. Ich hatte eine ganze Reihe von Methoden in Fred Sangers Labor in Cambridge gelernt, wo ich gerade meine Doktorarbeit abgeschlossen hatte. Ich brannte darauf, die Enden dieser Minichromosomen zu sequenzieren und begann 1975 sofort, ermuntert von Joe, Endmarkierungsverfahren anzuwenden. Ich baute  $^{32}\text{P}$ -markierte Desoxynucleosidreste in die *Tetrahymena*-rDNA ein und verwendete dazu käufliche DNA-Polymerasen für enzymatische In-vitro-DNA-Reparaturreaktionen. Die Ergebnisse waren sofort vielversprechend. Als erstes stellte sich heraus, dass die Endregionen der rDNA durch gewisse Kombinationen von  $^{32}\text{P}$ -markierten Nucleosidsubstraten selektiv markiert wurden. Und etwa im Juni 1975 wurde es für mich ausgesprochen spannend: Ich hatte meine erste Autoradiographie der zweidimensionalen Trennung der  $^{32}\text{P}$ -markierten Depurinierungsprodukte erhalten. Ein starkes Signal einer Folge von vier Cytosinresten (C) war sichtbar. Außerdem war jede dieser  $\text{C}_4$ -Sequenzen von einem Purinrest (also einem Adenosinrest A oder einem Guanosinrest G, wobei in diesen ersten Daten nicht zwischen beiden unterschieden werden konnte) flankiert. Eine Depurinierungsreaktion läuft folgendermaßen ab: Der Neuseeländer Ken Burton hatte eine chemische Reaktion entwickelt, mit der das DNA-Rückgrat an beiden Seiten jedes Purinnucleotids gespalten wird, die aber alle Sequenzabschnitte aus ununterbrochenen Pyrimidinnucleotiden (wie Cytosinresten), intakt lässt. Diese Depurinierungsmethode wurde durch Vic Ling während seiner Postdoc-Zeit bei Fred Sanger in Cambridge auf komplexe DNA-Sequenzen wie ein ganzes Bakteriophagen-genom angewendet und weiter ausgearbeitet. Vic hatte gezeigt, dass die entstehenden kurzen Pyrimidinstücke (Mono-, Di-, Trinucleotide etc.) ein Produktmuster wie ein Gitter ergeben, wenn sie durch eine 2D-Fraktionierung aufgetrennt wurden (siehe Abschnitt Nobelvortrag). Die häufigsten Produkte, die zufällig entstehen würden, sind natürlich Mono- und Dinucleotide, während die längeren Tri- und Tetranucleotide statistisch immer weniger häufig vorkommen. Daher war das starke  $\text{C}_4$ -Signal interessant und informativ.

Mir war auch klar, dass die rDNA-Moleküle nicht einfach Lambda-Phagen-ähnliche DNA ist. Erstens sind die terminalen Fragmente heterogen; dagegen sind für solche Phagen die DNA-Moleküle in jedem Viruspartikel exakt gleich wie in jedem anderen – eine perfekte Kopie. Zweitens wurde pro DNA-Molekül viel mehr markierte Nucleotid-Vorstufe eingebaut als erwartet, wenn die rDNA-Moleküle wären wie die „klebrigen“ DNA-Enden der Lambda-Phagen. Es war außerdem ein Glücksfall, dass die  $\text{C}_4$ -Wiederholungseinheit so regelmäßig war und dass zufällig vier C-Gruppen hintereinander lagen. Auch drei C-Gruppen wären schon auffällig gewesen, aber sie wären schwieriger aufzutrennen. So wirkte der  $\text{C}_4$ -Fleck konsistent wie ein Leuchtsignal in allen meinen wiederholten 2D-Fraktionierungen („Homochromogramme“ nannten wir sie bei Fred Sanger).

Als nächstes musste ich unabhängig bestätigen, dass das, was ich in vitro markierte, tatsächlich auch die rDNA-Sequenz widerspiegelt und außerdem versuchen, eine genauere Abschätzung der Zahl von  $\text{C}_4$ -Einheiten pro rDNA-Molekül zu erhalten. Ich beschloss daher, die rDNA in vivo



mit  $^{32}\text{P}$  zu markieren. Der bei Weitem größte Anteil der  $^{32}\text{P}$ -Isotope (chemisch in Form anorganischer Phosphationen zugegeben), die die Zellen aufnehmen, würde in andere Moleküle eingebaut werden, darunter die viel häufigere zelluläre RNA; nur sehr wenig würde in die DNA gelangen und sogar noch weniger in die rDNA (in *Tetrahymena* ist höchstens ungefähr ein Prozent der DNA rDNA). Daher bat ich Joe Gall um die Erlaubnis, genügend  $^{32}\text{P}$ -Phosphat zu bestellen, um damit das Wachstumsmedium der Zellen zur Markierung der rDNA versetzen. Dies bedeutete den Einsatz von 2 mCi auf einmal, was in Joes Labor vorher noch nie gemacht worden war. Mir war bei dem Gedanken nicht ganz wohl, aber ich wusste, dass dies die gegenwärtig einzige Möglichkeit war, genügend  $^{32}\text{P}$  in die rDNA einzubauen, um den C<sub>4</sub>-Fleck in einem Autoradiogramm vor dem Hintergrundrauschen nachzuweisen. Wahrscheinlich ebenfalls mit einer gewissen Beklemmung stimmte Joe zu. Ich arbeitete in einer „heißen Zelle“, einem abgeschlossenen Raum für die Handhabung radioaktiver Isotope. Am 9. Oktober 1975 wurde das  $^{32}\text{P}$  nach Yale abgeschickt. In meinem Laborbuch aus dieser Zeit findet sich der Eintrag: „ $^{32}\text{P}$  im Kühlschrank bis zum Gebrauch – vorgesehen für den 14.10. 15.00 h, 14.10. Start der Kultur mit 1 % PPS-Medium. Zugabe von 2 mCi  $^{32}\text{P}$  als  $\text{H}_3\text{PO}_4$  in Wasser in 1 mL mit einer Spritze.“ Bei der nächsten Präparation steigerte ich die Zugabe auf 5 mCi. Neugierig wegen dieser unüblichen Laboraktivitäten schauten mir meine Laborkollegen regelmäßig durch das Fenster in der Tür der „heißen Zelle“ bei der Arbeit zu.

Bis zum 22. Oktober 1975 hatte ich die  $^{32}\text{P}$ -rDNA gereinigt. An diesem Tag schrieb ich triumphierend in meinem Laborbuch die Pläne für diese kostbare Probe nieder:

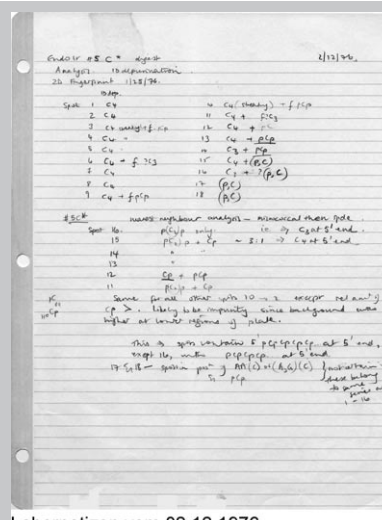
- 1) Depurinierung
- 2) denaturierendes Gel nach EcoRI-Behandlung
- 3) 1.4 % Agarosegel

Ich behandelte die terminale Region der rDNA nacheinander mit verschiedenen Nucleasen. Dabei fand ich heraus, dass sie selektiv markiert werden konnte, wenn man ein  $^{32}\text{P}$ -markiertes Triphosphat in einem Ansatz verwendete. Danach führte ich sämtliche Analysen durch, die damals möglich waren und die es mir ermöglichen würden, die Nucleotidsequenz zusammenzusetzen: Ich verdaut die radioaktiv markierten Endregionen mit Endonuclease IV oder Mikrokokken-Nuclease, führte Depyrimidierungen und Nachbarschaftsanalysen an den Nucleotiden durch und verdaute mit Milz-Phosphodiesterase.

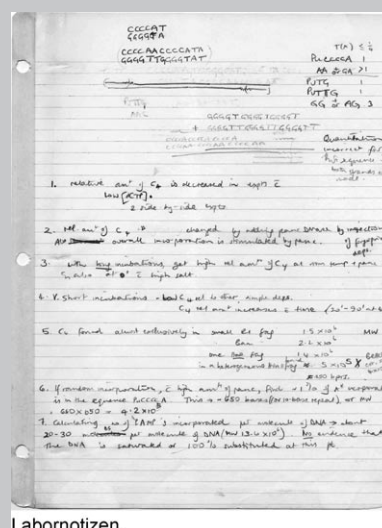
Die Sequenz der rDNA-Enden zusammenzusetzen war wie das Lösen eines Puzzles. Aus meinem Laborbuch aus jener Zeit sieht man, dass ich an einem Punkt für die Wiederholungssequenzen zwei Möglichkeiten in Betracht ziehen musste – CCCAG und CCCAA. Eindeutig dagegen war die Tatsache, dass es eine große Zahl von Kopien dieser Sequenz gab.

Bis zum 8. April 1976 war ich dann überzeugt, dass ich die korrekte Sequenz abgeleitet hatte, wie dies aus dem Eintrag dieses Tages in meinem Laborjournal zu entnehmen ist: Sequenzdaten von:

- 1) Depurinierung
- 2) Endo IV
- deps [meine Abkürzung für Depurinierungen]



Labornotizen vom 02.12.1976.



Labornotizen.

- Nachbarschaftsanalyse
- 3) Teilverdau Mikrokokkus
- deps
- Nachbarschaftsanalyse
- Teilverdau spdes [meine Abkürzung für Milz-Phosphodiesterase-Verdau]
- 4) Gelanalyse des Endo-IV-Verdau von Restriktionsfragmenten t Enden der rDNA
- AACCCC wiederholt
- (AACCCCAACCCCAACCCC)etc.

Eine andere Seite in meinem Laborjournal, datiert vom 17. August 1976, zeigte, dass ich mich stets routinemäßig auf die Sequenz  $(\text{CCCCAA})_n$  bezog – von da an auch in Experimenten, mit denen ich untersuchen wollte, ob die gleiche wiederholte Sequenz auch in der übrigen (viel längeren) chromosomalen DNA von *Tetrahymena* vorkommt.

Ich entwarf ein Bild, in dem ich versuchte, alle meine zahlreichen Beobachtungen unterzubringen. Die abgeleitete Sequenz bestand aus einer Tandemanordnung von CCCCAA-Wiederholungen. In einem Experiment, das ich

1979 durchführte, markierte ich die rDNA nur mit  $^{32}\text{P}$ -markiertem dCTP zusammen mit unmarkiertem dATP. Nach Auftrennung der Produkte durch denaturierende Gelelektrophorese wurde ein hübsches Leitermuster über das Gel hin sichtbar. Jede Bande in dieser regelmäßigen Leiter stand für ein um 6 Basen größeres Fragment als die unmittelbar darunter liegende Bande! Dieses charakteristische Bandenmuster war wie ein Vorbote des Musters, das später für unsere Entdeckung der Telomerase-Aktivität so wichtig werden würde, wie es im Vortrag meiner Mitpreisträgerin Carol Greider beschrieben wird.

In den Monaten nach dem April 1976 war ein großer Teil meiner Bemühungen darauf gerichtet, die Anordnung der Diskontinuitäten entlang des Strangs mit den CCCCAA-DNA-Wiederholungen zu verstehen. Ich führte zahlreiche Versuche durch, in denen ich die Kinetik und die Spezifität der Markierung der RNA-Endregionen verfolgte, wobei ich eine Reihe unterschiedlicher Enzyme, Vorschriften und Analysen anwendete. Auch dies war eine Art von Puzzle – und es gab keine Vorlage, nach der ich arbeiten konnte.

In den späten 1970er und frühen 1980er Jahren machte ich eine Reihe von Markierungsexperimenten, mit denen ich versuchte, die Struktur unmittelbar an den Enden der Telomere von begeißelten Protozoen und linearen Hefepiasmiden vorauszusagen. Ich konnte ein Bild zusammensetzen, das aber noch unvollständig war. Einige der Eigenschaften könnten rückblickend gesehen mit der terminalen G-Strang-Sequenz an den Enden der Telomere zusammenhängen, wenn man dort G-G-Paarungen oder G-Quartett-Strukturen annimmt. Andere Eigenschaften sind nicht so leicht erklärbar. Warum ich die Stränge mit DNA-Polymerase oder einer Kinase markieren konnte und so die Muster markierter Stränge und Nucleotide erhielt, die ich fand, ließ sich noch immer nicht in ein schlüssiges Bild der molekularen Struktur der DNA-Enden einfügen. Verschiedene Arten von Experimenten mit radioaktiver Markierung deuteten darauf hin, dass es sowohl bei *Tetrahymena*-rDNA als auch bei makronucleärer DNA hypotricher Ciliaten einen kurzen Überhang des G-reichen Strangs aus einigen wenigen Wiederholungen der Telomerasequenz gibt. Gegenwärtig geht man bei Säuger-Telomeren von einem lang herausragenden G-reichen Strang aus. Dies berücksichtigt allerdings nicht die klaren Hinweise darauf, dass sich die kurzen Oligonucleotid-Wiederholungssequenzen, die ich entdeckte, leicht vom Ende der Telomer-DNA abspalten lassen. Dieser Befund ergab sich bei den *Tetrahymena*-rDNA-Minichromosomen ebenso wie bei den linearen Plasmiden aus Hefe. Diese winzigen Telomerasequenz-Oligonucleotide konnten radioaktiv markiert und mit zweidimensionalen Fraktionierungen eindeutig identifiziert werden. Ihre Bedeutung ist allerdings noch immer unbekannt. Bis heute sind manche Aspekte der Struktur am äußersten Ende der Telomer-DNA rätselhaft; die Enden der Chromosomen bleiben eine Herausforderung.

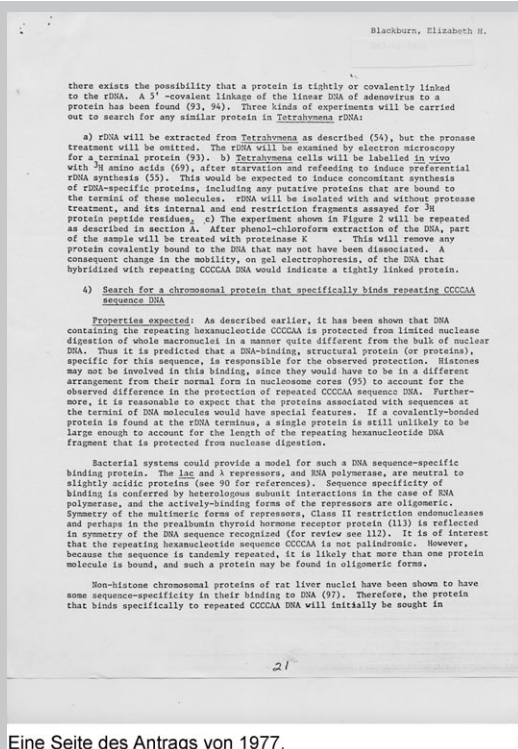
#### Telomerproteine: erste Versuche und Fehlschläge

In meinen frühen Arbeiten war mein „molekularbiologischer“ Blick auf die Telomere zunächst auf die DNA kon-

zentriert, und zwar nicht nur, weil die DNA in meinen Gedanken ganz oben stand, sondern auch, weil mehrere Jahre lang die DNA der einzige nachgewiesene Bestandteil der Telomere war. Dabei fehlte es nicht an weitergehenden Versuchen. Ich war der Meinung, dass sich die Geschichte der Chromosomenenden nicht in der DNA erschöpfen würde und in Fortsetzung der Arbeiten über Chromatin im Allgemeinen aus den 1970ern war es wahrscheinlich, dass die DNA-Wiederholungen in den Telomerregionen mit Proteinen verpackt wären. In den 1970ern hatten das Chromatin und die Entdeckung der Nucleosomen als Grundverpackungseinheit eukaryotischer DNA großes Interesse gefunden. Die Telomerasequenzen von *Tetrahymena* faszinierten mich auch unter diesem Gesichtspunkt und sobald ich die Telomer-DNA identifiziert hatte, wollte ich in die Hand bekommen, was immer sie verpackte. Daher führte ich noch während meiner Postdoc-Zeit bei Joe Gall Verdau-Experimente mit Mikrokokken-Nuclease an isolierten *Tetrahymena*-Zellkernen durch. Ich fand heraus, dass die  $(\text{CCCCAA})_n$ -Strecken der Telomere in Chromatin als eine heterogene Klasse von DNA-Fragmenten auf eine Art geschützt wurden, die sich stark von dem unterschied, was bei einer nucleosomalen Verpackung zu erwarten gewesen wäre.

Bald nachdem ich Joe Galls Arbeitsgruppe in Yale verlassen hatte, während ich noch vorübergehend eine unabhängige Forscherstelle an der University of California, San Francisco innehatte (bevor ich Assistant Professor an der University of California, Berkeley wurde), schrieb ich am 1. März 1978 an Joe Gall: „Ich bin sehr gespannt darauf, einen  $(\text{CCCCAA})_n$ -bindenden Proteinkomplex aus den *Tetrahymena*-Makronuclei zu isolieren, und so habe ich eifrig rDNA, die  $(\text{CCCCAA})_n$ -Sonde und Mikrokokken-Nuclease-Verdaus des Makronucleus hergestellt. Bislang habe ich herausgefunden, dass sich mit einer einfachen Salzfractionierung  $(\text{CCCCAA})_n$ -Sequenzen plus die gewünschten Proteine anreichern lassen. Gegenwärtig plane ich, sie etwas weiter zu reinigen, um so einige Strukturmerkmale eines solchen Komplexes herauszufinden, also den S-Wert und die Identifizierung einiger Proteine aufgrund ihrer Eigenschaften bei 1D- und 2D-Gelelektrophoresen. [...] Der andere Aspekt ist natürlich, nach irgendetwas zu fischen, das an einer  $(\text{CCCCAA})_n$ -Säule hängenbleibt.“

Bis 1980 hatte ich in Experimenten gezeigt, dass die Telomerregion der DNA in *Tetrahymena* in eine Schutzhülle von Protein eingekapselt ist, die keine Nucleosomen enthält. Der weit überwiegende Teil der chromosomalen DNA ist als Nucleosomen genannte DNA-Protein-Komplexe gepackt. Jedes Nucleosom ist ein abgeflachter Ball aus Histonen, um den die DNA zweimal herumgewickelt ist. Die sehr basischen (und daher positiv geladenen) Histonproteine neutralisieren die negative Ladung der Phosphatgruppen, die entlang dem Phosphodiester-Rückgrat der DNA aufgereiht sind, und ermöglichen so eine sehr dichte Packung und kompakte Faltung der chromosomalen DNA im Zellkern. Nucleosomen in künstlich gestreckten Chromosomen sehen aus wie Perlen an einer Kette, obwohl sie im Kern meist dicht in kürzere dickere Fasern gepackt sind. Wenn man das Chromatin mit einem Enzym wie der Mikrokokkus-Nuclease zerschneidet, die beide Stränge der verbindenden DNA zwischen benachbar-



Eine Seite des Antrags von 1977.

ten Nucleosomen durchtrennt, und dann die Histone abtrennt, kann man die zurückbleibenden nucleosomengroßen DNA-Fragmente nachweisen – ein Fragment von etwa 142 Basenpaaren wird vom Histonkern des Nucleosoms geschützt, nachdem die DNA-Verbindungssequenzen abgespalten wurden. Dieses Verhalten gegenüber Nucleasen ist ein wichtiger Hinweis auf ein Nucleosom. Dagegen tragen spezielle Regionen der DNA, zum Beispiel Promotoren, die Transkriptions-Initiationsfaktoren binden müssen, die die Transkription steuern, andere Proteine anstelle der Histone. Die Region mit den Wiederholungssequenzen am Telomer stellte sich als eine solche nichtnucleosomale Region heraus. Wenn ich das Chromatin mit einem Enzym verdaute, das im Verbindungsbereich zwischen benachbarten Nucleosomen schneidet, wurde die Hauptmasse der DNA in nucleosomengroße Stücke geschnitten, während die Telomer-DNA als einzelner geschützter Bereich zurückblieb. Der entstehende Komplex der Telomer-DNA und ihrer gebundenen Ladung aus schützendem Protein verhielt sich in verschiedenen Tests völlig anders als nucleosomales Standardchromatin, und deshalb schloss ich, dass es weder Histone hat noch Nucleosomen bildet.

Etwa 1977 war aus den Arbeiten von Rekosh et al. bekannt, dass adenovirale DNA ein kovalent gebundenes terminales Protein trägt, vermutlich für die Replikation des viralen Genoms. Daher begann Marcia Budarf, eine Postdoktorandin in meinem Labor an der UC Berkeley, im Jahr 1979 mit radioaktivem Jod (mit dem Bolton-Hunter-Reagens) zu experimentieren, um zu sehen, ob wir vergleichbare Proteine an den Enden der rDNA finden könnten. Obwohl Marcia ein kovalent gebundenes Protein fand (das im Nachhinein betrachtet die Topoisomerase I gewesen sein könnte), das zum Ende der transkribierten rRNA-Region hin angereichert war,

war es nicht in den terminalen Teilen der rDNA-Moleküle angereichert. Marcia konnte keine anderen kovalent gebundenen Proteine irgendwo auf der rDNA nachweisen. Jeder Hinweis auf ein Protein, das sich auf dem Großteil der rDNA-Molekülen befand, so wie gelelektrophoretisches Laufverhalten und das Auftauchen von rDNA-Molekülen unter dem Elektronenmikroskop, fehlte auffälligerweise. Dies bestärkte mein Gefühl, dass es keine kovalent gebundenen Proteine am äußersten Ende dieses Minichromosoms gebe. Aber welche anderen Proteine befanden sich an den Telomeren?

Meine Gruppe war die erste, die versuchte, diese schützenden Proteine zu identifizieren. Wir probierten es mit biochemischen Fraktionierungen von *Tetrahymena*-Kernextrakten. Mein Laborjournal von 1979 verzeichnet, dass ich zusammen mit meiner Assistentin San San Chiou im Department of Molecular Biology der UC Berkeley wieder und wieder versuchte, Telomerproteine aus den Nucleoli zu reinigen. Nucleoli sind die winzigen Körperchen innerhalb des Zellkerns von *Tetrahymena*, die die aktiv transkribierten rDNA-Minichromosomen beherbergen. Geduldig führte San San eine Fraktionierung nach der anderen aus, meist über Saccharose-Gradienten. Dann vergrößerten wir unsere Ansätze – ich kaufte einen riesigen Waring-Mixer, der wie ein Dämon auf der Laborbank auftragte. Die *Tetrahymena*-Zellen sollten gerade soweit aufgebrochen werden, dass die Nucleoli vom Rest des Zellkerns befreit wurden. An einer Stelle steht nur lakonisch in meinem Notizbuch: „Habe nur ein Drittel des Ganzen aufgearbeitet [...] der Waring-Mixer ging kaputt.“

All diese frühen Versuche führten zu nichts. Rückblickend war der experimentelle Ansatz vernünftig – Reinigung der Nucleoli als der am höchsten angereicherten bekannten Form von Telomerchromatin, dann Verdau mit Mikrokoken-Nuclease in Fragmente, von denen die endständigen die terminalen DNA-Stücke der Telomere und die daran gebundenen Proteine enthalten. Diese wollte ich dann vom Rest des Proteins durch selektive Fällung mit Kaliumchlorid-Lösungen oder nach der Größe über Saccharose-Gradienten abtrennen. Ziel war zu sehen, welche Proteine gemeinsam mit der Telomer-Wiederholungssequenz, die ich anhand des Hybridisierungssignals verfolgen konnte, durch diese vielen Fraktionierungsschritte geschleust würden. Aber wir erhielten nur geringe Mengen Chromatin und Bindefaktoren, und wir versuchten erfolglos, genug Material in die Hand zu bekommen, um irgendwelche Faktoren zu identifizieren, die spezifisch für die rDNA-Enden wären. Heute weiß ich, dass wir gegen die Mengenverhältnisse kämpfte – unsere Nachweismethoden waren zu unempfindlich und unser Präparationsmaßstab zu klein. Deshalb waren es die Hefegenetik und Ansätze anderer, die für die nächsten großen Sprünge hin zum Verständnis der Telomerproteine sorgten. Dass ich mit meinen frühen Versuchen mit *Tetrahymena* scheiterte, verstärkte nur meine Entschlossenheit, wenn möglich mit anderen Ansätzen zu versuchen, die Natur und die biologische Bedeutung dieser merkwürdigen Wiederholungssequenzen an den Enden der Chromosomen zu verstehen.

Ich möchte auch daran erinnern, dass unsere vergeblichen Versuche, die Telomerproteine nachzuweisen, uns eine Lek-



tion lehrten, von der wir profitierten, als wir unsere Arbeiten über die *Tetrahymena*-Telomerase begannen. Wie Carol Greider in ihrem Nobel-Vortrag beschreibt, wurde ihr an einer Stelle klar, wie wichtig eine Maßstabsvergrößerung für die Präparationen der Telomeraseaktivität war. Als Carol vorschlug, eine sehr große Glassäule für präparative Gelfiltrationschromatographie zu kaufen, stimmte ich diesem scheinbar teuren Kauf sehr bereitwillig zu, als ich mich reumütig an die Geschichte meiner zu verzagten Maßstabsvergrößerung der Präparationen des *Tetrahymena*-Chromatins erinnerte.

## An der University of California in San Francisco

1986 wurde ich nach acht Jahren an der UC in Berkeley zum Full Professor ernannt, und im Dezember 1986 kam unser Sohn Benjamin David zur Welt. Weil die Pendlerei von unserem Haus in San Francisco nach Berkeley es schwierig machte, Wissenschaft und Familienleben optimal miteinander zu verbinden, entschied ich um 1989, nach Alternativen Ausschau zu halten. Ich wechselte auf eine Professorenstelle an die UCSF und schloss den Umzug meines Labors zum Department of Microbiology and Immunology der UCSF bis Mitte des Jahres 1990 ab. Seitdem bin ich an der Fakultät der UCSF geblieben. Dort hatte ich das große Glück, mich weiterhin intensiv in die Natur und die Mechanismen von Telomeren und Telomerase vertiefen zu können. Zusammen mit Kollegen in und außerhalb der UCSF und mit vielen talentierten Studenten und Postdocs und Technikern in meiner Gruppe konnte ich mich auf die wunderbaren biologischen Systeme konzentrieren, die aus Telomeren und Telomerase bestehen. Eine phantasievolle Darstellung, die die Telomerdynamik und die Telomereforscher heraufbeschwört, zeigt ein Bild der Künstlerin Julie Newdoll aus dem Jahr 2008: Sie stellt das Telomer als einen Bienenstock dar, der einem altsumerischen Tempel ähnelt und von einem Schwarm altsumerischer Bienengöttinnen behütet wird. Die Tontäfelchen im Hintergrund sind mit Banden beschriftet, wie man sie von DNA-Sequenziergelen kennt.



Grillfest der Arbeitsgruppe, Mission Bay, August 2007.



Julie Newdoll, *Bee Goddesses*.

## Abseits des Labors

In den 1990er Jahren begann ich mich auch für die Konsequenzen meiner Forschung für die Menschen zu interessieren, aber neben wissenschaftlicher Forschung, Verpflichtungen in der Leitung von Fakultät und Department, Familie und vielen damit verbundenen Aufgaben hatte ich wenig Zeit, mich in die philosophischen und politischen Fragen zu vertiefen, die auftauchen können, wenn die Wissenschaft neue Möglichkeiten eröffnet. 1998 war ich Präsidentin der American Society for Cell Biology und wurde stärker mit der nationalen Wissenschaftspolitik konfrontiert. Und so hatte die Anfrage, Mitglied der neu geschaffenen U.S. Federal Commission, dem Bioethik-Beirat des Präsidenten, beizutreten, einen gewissen Reiz. Ich spürte, dass meine Kenntnisse auf dem entsprechenden Wissenschaftsgebiet und lange Forschungserfahrung nützlich für den Beirat sein könnten. Außerdem kam die Anfrage zu einer Zeit, als ich selbst zunehmend über diese Dinge nachdachte. Ich ging davon aus, dass ich als Mitglied des Beirats die Gelegenheit bekäme, über einige Auswirkungen der Forschung und über die möglichen Rückwirkungen meines eigenen Forschungsgebiets nachzudenken.

Eine Zeit ruhiger Betrachtung dieser und ähnlicher Fragen stand mir aber nicht bevor. Von Anfang an war mir klar, dass der Bioethik-Beirat mit öffentlich diskutierten Fragen befasst sein würde, darunter somatischer Zellkerntransfer beim Menschen und Forschung an embryonalen Stammzellen sowie andere Themen, die zu Beginn der Beratungen weniger klar abgegrenzt waren. Ich glaubte, ich sollte der Berufung in den Beirat zustimmen, denn als erfahrene Zell- und Molekularbiologin könnte ich Perspektiven anbieten, die in Hinblick auf die nationale Wissenschaftspolitik hilfreich sein könnten. Ich war mir bewusst, dass der Beirat, der von George W. Bushs Regierung berufen worden war, mit politisch brisanten Themen befasst sein würde. Aus

diesem Grund hielt ich es für wichtig, ein starkes Fundament wissenschaftlicher Tatsachen bereitzustellen, und nützliche Ratschläge dieser Art konnte ich tatsächlich in diesem Gremium beitragen.

Ich machte meine Ansichten über einige der Empfehlungen des Beirats öffentlich, die nicht unbedingt mit denen des Weißen Hauses oder des Beiratsvorsitzenden übereinstimmten. Nach zwei Jahren wurde ich vom Personnel Office von George W. Bush informiert, dass ich dem Beirat nicht länger angehöre. Diese Entlassung fand damals einige Beachtung in der Öffentlichkeit. Ich war überwältigt von der großen Zahl von Briefen und Nachrichten, die ich erhielt. Sie waren fast ausnahmslos positiv und unterstützend und kamen von überall her aus den Vereinigten Staaten und sogar von einem Musiker aus London. Seine (für mich) unerwartete Besorgnis um die Wissenschaftspolitik brachte mir zu Bewusstsein, wie verbreitet der Wunsch in der Öffentlichkeit ist, dass politische Entscheidungen durch gute wissenschaftliche Evidenz gestützt werden. Diese Episode bestärkte mich in der Suche nach der Wahrheit, nach der so viele in Forschung und Wissenschaft streben.

#### **Menschen, die Einfluss auf mein Leben als Wissenschaftlerin hatten**

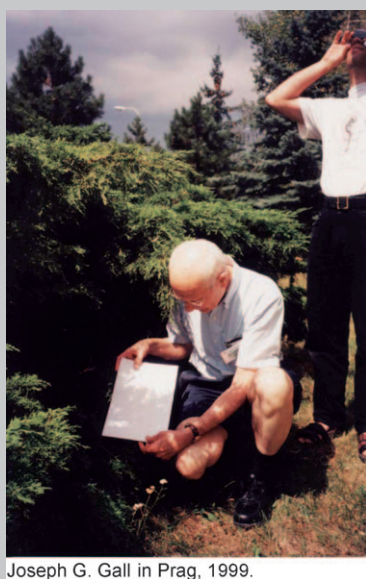
Ich bin so vielen Menschen zu Dank verpflichtet, dass ich hier nur wenige erwähnen kann. Als Kind wurde ich von dreien meiner Lehrer besonders in meinem Interesse an Biologie, Chemie und Mathematik bestärkt – Nan Hughes, Jenny Phipps und Len Stuttard. Sie zeigten mir, dass sie an meine Fähigkeiten auf diesen Gebieten glaubten.

Als ich mit biologischer Forschung begann, teilten meine Lehrer, Ratgeber und Mentoren – vor allem Frank Hird in Australien, Fred Sanger in England und Joe Gall in den USA – nicht nur ihr wissenschaftliches Können, ihre Visionen und ihre Weisheit mit mir, sondern sie wirkten auch als Vorbilder. Eine Photographie von Joe Gall aus dem Jahr 1999, schon einige Jahre, nachdem ich in seiner Arbeitsgruppe war, fängt

auf prägnante Art etwas von Joes Charakter visuell ein, das mich beeinflusste. Ich nahm das Photo während einer Konferenz auf, die er im Sommer 1999 in Prag besuchte. Während der Konferenz gab es eine partielle Sonnenfinsternis, und alle Konferenzteilnehmer rannten aus dem Hörsaal, um das Ereignis zu beobachten. Auf dem Bild zeigt Joe, wie man dies sehr einfach und sicher tun kann: Man braucht nur ein Blatt Papier unter einen belaubten Busch zu halten, sodass das Licht, gestreut durch die Blätter, auf das Papier fällt und dort ein Bild des „Bisses“ durch den vorbeiziehenden Mond in der Sonnenscheibe erzeugt. Ich erinnere mich, dass die meisten Teilnehmer nie eine solche Demonstration angewandter Optik gesehen hatten. Dieses Photo vergegenwärtigt sofort Joe Galls Wunsch und Fähigkeit zu lehren – indem er mit einer überzeugenden Demonstration den Konferenzteilnehmern etwas Neues zeigte – und lässt nicht zuletzt einen Blick erhaschen auf sein umfangreiches Wissen, das auch Optik und Naturwissenschaften im Allgemeinen umfasst.

Wie so viele andere, die vom Verhalten der Chromosomen fasziniert sind, verdanke ich Barbara McClintock viel wegen ihrer wissenschaftlichen Erkenntnisse. Darüber hinaus gab sie mir einen beherzigenswerten Ratschlag: Bei einer Unterhaltung 1977, während der ich ihr von meinen unerwarteten Befunden mit den Endsequenzen der rDNA erzählte, bestärkte sie mich darin, meiner Intuition über meine Forschungsergebnisse zu trauen. Dieser Rat war für mich damals überraschend, denn intuitives Denken war nichts, das ich zu dieser Zeit als Tugend eines biologischen Forschers betrachtete. Ich glaube, ihr Ratschlag erkennt einen wichtigen und manchmal übersehenen Aspekt der intellektuellen Vorgänge, die zur Forschung dazugehören. Für mich hatte es etwas Befreiendes. Auch dafür bin ich Barbara McClintock sehr dankbar.

Mein Ehemann, John Sedat, selbst ein hervorragender Wissenschaftler, hat mich immer ermutigt, tief in mich hineinzuhören und die Kraftreserven zu finden, die ich vielleicht noch nicht entdeckt hatte – seine Ermutigungen auf diese Art haben mir über Jahre hin geholfen. Unser Sohn Ben inspirierte mich bei der Suche nach Wegen, Familie und Wissen-



Joseph G. Gall in Prag, 1999.



Elizabeth und ihr Sohn Ben am Klavier, um 1989.



schaft zu verbinden, etwas, das ich versucht habe, jungen Wissenschaftlern zu vermitteln, die am Anfang ihrer Karriere standen. Schließlich meine Eltern, die beide Hausärzte waren: Von ihnen empfang ich ein Gefühl für die Bedeutung, den Menschen so freundlich und so gut man kann zu dienen. Ich glaube noch immer, dass Bioethik, gut durchdacht und gestützt auf die besten verfügbaren wissenschaftlichen Erkenntnissen, darüber mitbestimmen kann, welchen Einfluss die biologische und medizinische Forschung auf die Menschen in unserer Gesellschaft haben.

## Nobel-Vortrag

### Einleitung

DNA trägt codierende und nichtcodierende Sequenzen. Nichtcodierende DNA reguliert und sichert die kontinuierliche Vererbung der codierten Information. In Eukaryoten ist die Telomer-DNA eine Klasse nichtcodierender DNA, die die stabile Vererbung des genetischen Materials sichert, indem sie die Chromosomenenden und damit die Chromosomen selbst schützt. Die Forschung begann in den 1930er Jahren mit der Cytogenetik der Telomere; dem folgten seit den 1970er Jahren molekularbiologische Forschungen über die Telomer-DNA und ihre Erhaltung, die bis heute andauern. Dank dieser Grundlagenforschung sind der Humanmedizin nunmehr neuartige Informationen über Gesundheit und Krankheit zugänglich.

### Ein Anfang an den Enden

„Ihr Maiskörner, ... möget ihr Erfolg haben, möget ihr genau sein.“

Popul Vuh

Verfolgt man die verwobenen Anfänge der Wissenschaftsgeschichte, kann dies fesselnd werden, denn die Anfänge liegen oft im Nebel der Vorzeit verborgen. Für mich begann die Geschichte von Telomeren und Telomerase vor Tausenden von Jahren in den Maisfeldern des Maya-Hochlandes in Mittelamerika. Heute bedecken unter dem strahlenden Sonnenlicht des mittelamerikanischen Hochlands üppige Maispflanzen jeden Flecken des steilen Landes, wo immer sie im Boden Halt finden. Dort brachten über tausend Jahre Pflanzenzüchtung Maissorten aus der Wildpflanze Teocinte hervor. Man schätzt, dass der Maisanbau im mittelamerikanischen Hochland vor etwa 7000 Jahre begann; während die ersten Maiskolben aus dieser Zeit noch winzig waren, wurden sie über ein Jahrtausend immer größer und größer. Pflanzenzucht ist ein Prozess der bewussten Auswahl der „besten“ Pflanzen. Es war bekannt, dass „Ähnliches Ähnliches hervorbringt“; nimmt man also die Körner der größten Kornähren (oder Maiskolben) für die Aussaat des nächsten Jahres, so wird die Ernte besser. Im mittelamerikanischen Regenwald wurden dicht bewachsene Flächen gerodet und für die Maisproduktion reserviert. Mais spielte eine zentrale Rolle in Landwirtschaft und Kultur der alten Maya,



Abbildung 1. Darstellung des Maisgottes der Maya.

und die Mayas verehrten eine Maisgöttin (Abbildung 1). Ihr altes heiliges Buch, das Popul Vuh („Ratsbuch“), enthält viele Bezüge zu Mais. Das Popul Vuh erinnert sogar an genetische Prinzipien: „Ihr Maiskörner, ... möget ihr Erfolg haben, möget ihr genau sein.“

Als das Nahrungsmittel Mais weltweit an Bedeutung gewann, setzte die moderne landwirtschaftliche Forschung die Zuchtbemühungen fort, die vor Tausenden von Jahren im mittelamerikanischen Hochland begonnen hatte.

### Das Telomer-Konzept

„Das ist der Anfang vom Ende.“

Charles Maurice de Talleyrand 1754–1838

(als er Napoleons Niederlage bei Borodino verkündete)

Ein anderer, modernerer Anfang der Geschichte von der Telomerforschung ist vielleicht die Entdeckung der Röntgenstrahlen. Hermann Muller, der mit der Fruchtfliege *Drosophila* arbeitete, zeigte, dass Röntgenstrahlen Mutationen und Chromosomenbrüche verursachen können. Am Ende der 1920er Jahre hatte man erkannt, dass das Erbgut in den Chromosomen lag. Mendels Arbeit über vererbare Merkmale war mit Befunden zusammengeführt worden, die zeigten, dass der Erbgang der genetischen Merkmale (oder Gene) den regelmäßigen Verteilungen der Chromosomen in Zellen bei Meiose und Mitose entspricht. In den 1930ern wurden in den Vereinigten Staaten nach solchen genetischen Prinzipien öffentlich geförderte Zuchtprogramme für Mais in landwirtschaftlichen Versuchsstationen durchgeführt. Und in einer solchen Station, der Missouri Agricultural Research Station, arbeitete die Genetikerin und Zellbiologin Barbara McClintock mit Mais. Dabei wendete sie Methoden an, die sie für die Untersuchung einzelner Chromosomen entwickelt hatte. Gene waren entlang der Chromosomen aufgereiht, wie Mullers Arbeiten gezeigt hatten. In den 1930ern gab es kein besonderes Interesse daran, was an den Enden dieser Genanordnungen war, bis man bemerkte, dass die Enden einige besondere Eigenschaften hatten (ein kurzer Überblick findet

sich in Lit. [1]). In den frühen 1930er Jahren zog McClintock den Schluss, dass die „natürlichen Enden“ der Chromosomen (so McClintocks Ausdruck 1931<sup>[2]</sup>) sich funktionell von experimentell induzierten oder zufälligen Chromosomenbrüchen unterschieden. Die „Klebrigkeit“ der Enden gebrochener Chromosomen (die eine Ursache für Chromosomenfusionen ist) war einer der entscheidenden Unterschiede zu Telomeren, den natürlichen Enden der Chromosomen, die diese „Klebrigkeit“ nicht aufwiesen. Dies ergab sich aus McClintocks Forschung über Chromosomen-Bruchstellen und ihr Verhalten.<sup>[3]</sup> Aus seiner Arbeit mit Fruchtfliegen kam Muller unabhängig davon zum selben Schluss. Er nannte diese Enden 1938 „Telomere“.<sup>[4]</sup> (zusammengefasst in Lit. [1].)

### Der Sprung ins kalte Wasser

„Dies ist nicht das Ende. Es ist noch nicht einmal der Anfang des Endes. Aber es ist vielleicht das Ende des Anfangs.“

Sir Winston Churchill, Rede im November 1942

Beim Lesen der frühen zellbiologischen Arbeiten von McClintock und Muller aus den 1930ern und 1940er Jahren vergisst man leicht, dass ihre Ableitungen fundamentaler cytogetischer Eigenschaften der natürlichen Enden der Chromosomen jeglichem Wissen um die DNA als genetisches Material vorausging. Der molekulare Mechanismus, der den Telomer-Eigenschaften zugrundeliegt, war vollständig unbekannt, als ich Mitte der 1970er Jahre meine Forschungen an DNA begann, die ich aus dem Ciliaten *Tetrahymena* isolierte hatte. Aus diesen molekularen Analysen ergab sich die Natur des spezialisierten DNA-Protein-Komplexes, aus dem das Telomer besteht und der es von einem zufälligen DNA-Bruch unterscheidet.

Zunächst mussten die Sequenz und die strukturellen Eigenschaften der Telomer-DNA verstanden werden. Anfang bis Mitte der 1970er Jahre hatte man virale und Bakteriophagen-DNA biochemisch und genetisch untersucht, in einigen Fällen auch die Enden der DNA. Aber wie sah das Ende der zellulären DNA in einem eukaryotischen Kern – das Ende eines Chromosoms – aus? Was einen Molekularbiologen, der an dieser Frage interessiert war, in den 1970ern kurz vor der Einführung der DNA-Klonierungsverfahren am meisten abschreckte, war die schiere Länge typischer chromosomaler DNA.

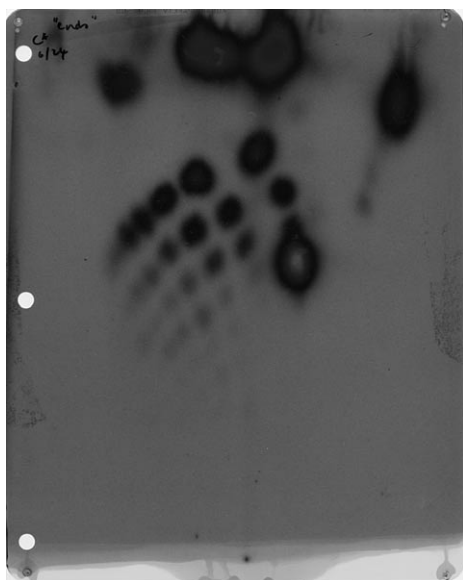
Zu Beginn des Jahrzehnts hatten Kavanoff und Zimm chromosomale DNA vorsichtig so intakt wie eben möglich aus Fruchtfliegenzellen isoliert.<sup>[5]</sup> Der Molekulargewichtsbe reich, den sie abgeleitet hatten, sprach für lange DNA-Moleküle, die von einem Ende des Chromosoms zum anderen reichten. Die typischen langen chromosomalen DNAs aus einem Zellkern waren also Tausende mal länger als Phagen-DNA. Dies stellte eine enorme technische Hürde bezüglich der Untersuchung der Telomer-Region dar. Um eine Antwort auf die Frage nach der molekularen Natur der Telomere zu erhalten, musste man quasi ins kalte Teichwasser springen.

Der entscheidende Teichbewohner war der einzellige Ciliate *Tetrahymena thermophila*. In den frühen 1970er

Jahren hatte Joe Gall in Yale entdeckt, dass *Tetrahymena* eine Klasse häufiger, homogener, kurzer und linearer Chromosomen („Minichromosomen“) enthält. An diesen konnte ich die Telomer-DNA direkt analysieren. Ich arbeitete zum ersten Mal mit *Tetrahymena*, als ich Postdoc bei Joe Gall in Yale war. Die zu den Protozoen gehörenden Wimperntierchen (Ciliaten) wie *Tetrahymena thermophila* sind zwar einzellig, enthalten aber zwei verschiedene Arten von Zellkernen. Grell beschreibt es so:<sup>[6]</sup> „Die meisten Ciliaten [...] besitzen generative Zellkerne, die sich unbegrenzt teilen können, und somatische Zellkerne, die früher oder später verschwinden und aus Nachkömmlingen der generativen Kerne wieder gebildet werden.“ Auf diese Weise kombiniert *Tetrahymena* auf ökonomische Art „Soma“ und „Keimbahn“ in einer Zelle. Die häufig vorkommenden „Minichromosomen“, die Joe Gall entdeckte, befinden sich im somatischen Kern. Diese linearen DNA-Moleküle tragen die Gene, die für ribosomale RNAs codieren (rDNA), wobei ihre hohe Kopienzahl eine ausreichende Expression für die große *Tetrahymena*-Zelle sicherstellt. Kathleen Karrer, zu jener Zeit Diplomandin bei Joe Gall, hatte gerade herausgefunden, dass die rDNA-Moleküle aus zwei gleichen, als Palindrom angeordneten Hälften bestehen. Dies machte sie um so attraktiver: Jede Telomer-Endregion wäre an jedem Ende die gleiche. Das häufige Vorkommen und die relative Kürze (nur 20000 Basenpaare) dieser Moleküle würde es nach meiner Meinung möglich machen, Methoden anzuwenden wie die, mit denen Ray Wu und Mitarbeiter zum Beispiel die Nucleotidsequenzen an den Enden von Bakteriophagen-DNA in den frühen 1970ern bestimmt hatten.

Schon kurz nachdem ich 1975 in Yale angefangen hatte, begann ich an diesen rDNA-Molekülen, die DNA-Sequenzen an den rDNA-Enden zu bestimmen. Die Experimente, mit denen ich die Sequenz der Telomere zusammensetzte, sind genauer im autobiographischen Abschnitt beschrieben. Kurz gesagt, sofort nach Fraktionierung der Depurinierungsprodukte radioaktiv markierter rDNA-Enden tauchte der besonders informative CCCC-Fleck auf (Abbildung 2).

Bis August 1976 war ich ziemlich sicher, dass die *Tetrahymena*-rDNA-Moleküle mit der Sequenz (CCCCAA)<sub>n</sub> enden würden, und ich wollte wissen, ob dieselbe wiederholte Sequenz auch bei den anderen (viel längeren) chromosomalen DNAs von *Tetrahymena* vorkommen und wollte dazu die molekularen Strukturen der DNA-Endregionen untersuchen. Die Beschreibung tandemartig wiederholter CCCCCA-Sequenzen an den rDNA-Enden wurde 1978 publiziert.<sup>[7]</sup> Eines der Experimente aus dem Jahr 1979, in dem wir die rDNA nur mit <sup>32</sup>P-markiertem dCTP in Gegenwart von unmarkiertem dATP radioaktiv markiert hatten und die Produkte dann mit denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt hatten, ergab ein wunderschönes Leitermuster, das sich über das Gel erstreckte. Jede Bande in dieser regelmäßigen Leiter stand für ein um 6 Basen größeres Fragment als die Bande darunter – eine überwältigende visuelle Bestätigung der hexameren Wiederholungssequenzen, die ich abgeleitet hatte! Dieses charakteristische Bandenmuster war das erste Beispiel für ein Muster, das später für unsere Entdeckung der Telomeraseaktivität wichtig werden würde, wie dies meine Mitpreisträgerin Carol Greider in ihrem Nobel-Vortrag beschreibt.



**Abbildung 2.** Erstes Autoradiogramm, das eine auffällige CCCC-Sequenz zeigt.

In meinen frühen Arbeiten konzentrierte sich unser molekularbiologischer Blick auf die Telomere zunächst auf die DNA. Dies war nicht nur so, weil die DNA eine zentrale Komponente beim Problem der unvollständigen Replikation linearer DNAs war, das bereits Anfang der 1970er Jahre erkannt worden war (zusammengefasst von Blackburn und Szostak<sup>[8]</sup>), sondern weil DNA über Jahre hin die einzige identifizierte Telomerkomponente war. Bis 1980 waren DNA-Sequenzen der Enden einiger weniger eukaryotischer nucleärer DNAs bekannt. Wir hatten bis zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen, dass die DNA-Enden der makronucleären DNA aus *Tetrahymena* im Allgemeinen und nicht nur der rDNA-Moleküle aus langen Anordnungen der gleichen einfachen CCCCAA-(oder  $C_4A_2$ -)Wiederholungen aus 6 Nucleotiden bestehen.<sup>[9]</sup> Andere konnten nachweisen, dass der Ciliat *Oxytricha* und seine Verwandten sehr kurze DNA-Anordnungen mit Wiederholungen von 8 Nucleotiden ( $C_4A_4$ ) an den Enden der macronucleären DNA tragen und dass die zahlreichen Kopien der linearen rDNA-Minichromosomen von zwei verschiedenen Schleimpilzen Bereiche aus der einfachen Wiederholungssequenzen CCCTAA bzw.  $C_{1-8}T$  an ihren Enden tragen (Übersichten: Lit. [10–12]). Sie ähnelten alle der Sequenz, die ich bei den rDNA-Molekülen von *Tetrahymena* gefunden hatte. Das Vorliegen gemeinsamer Anordnungen von DNA-Sequenzen am Ende nucleärer DNA sich immer klarer herauszuschälen, doch wie ließen sich daraus spezielle Eigenschaften der Telomere ableiten? Ein Ansatz war, zu untersuchen, welche Proteine sich auf der Telomer-DNA befinden. Ich habe meine ersten erfolglosen Versuche, Telomer-Proteine zu identifizieren, bereits im autobiographischen Abschnitt beschrieben.

Inzwischen wissen wir, dass die entscheidenden Telomersequenzen sich auch bei phylogenetisch weit entfernten Eukaryoten überraschend ähnlich sehen. Jedes Chromosomenende besteht aus einem Block sehr einfacher Telomersequenzen, die in Tandemanordnung bis zum Molekülende der

chromosomalen DNA wieder und wieder wiederholt werden. Alle Chromosomen eines Organismus haben die gleiche speziesspezifische Telomer-Wiederholungssequenz. Dieselbe Sequenz taucht aber auch in sehr unterschiedlichen Eukaryoten auf. Beispielsweise bestehen Telomere beim Menschen aus AGGGTT-Einheiten, tandemartig wiederholt über Tausende von Nucleotiden an den Enden all unserer Chromosomen. Dieselbe wiederholte AGGGTT-Sequenz findet sich in den Telomeren des Pilzes *Neurospora*, des Schleimpilzes *Physarum* und des parasitischen Protozoen *Trypanosoma*. Somit sind Telomer-DNA-Sequenzen wahrscheinlich unter allen DNA-Sequenzen am schlechtesten geeignet, um phylogenetische Stammbäume abzuleiten. Telomer-DNA weist im Allgemeinen eine Asymmetrie der Strangzusammensetzung auf, nämlich einen G-reichen und einen C-reichen Strang. Der G-reiche Strang ist immer in 5'-3'-Richtung zum Chromosomenende hin orientiert. Diese übergreifende Konservierung der Telomerstruktur lässt erwarten, dass die allgemeine Anordnung und die Zusammensetzung der DNA-Stränge von zentraler Bedeutung für die Telomerfunktion sind.

#### Indizienketten, die zum Konzept einer Telomeraseaktivität führten

Hinweise darauf, dass Telomer-DNA gewisse molekulare Eigenschaften hat, die auf dynamische Eigenschaften in vivo hindeuten, kamen in den frühen 1980er Jahren auf. Vier Hauptargumente spornten mich an, nach einer neuartigen Enzymaktivität zu suchen, die Telomer-DNA synthetisiert und Telomere verlängert. Diese Hinweise kamen in Form von Beobachtungen an Telomer-DNA auf, die mit dem bisher verfügbaren Wissen über DNA-Replikation und -Rekombination nicht zwanglos erklärbar waren.

Erstens sind die DNA-Stücke mit den Telomer-Wiederholungssequenzen CCCCAA (die wir später nach der Sequenz auf dem komplementären Strang mit GGGGTT bezeichneten) in den Ciliaten *Tetrahymena* und *Glaucoma* unterschiedlich lang. Somit tragen die DNA-Moleküle einer Population eine unterschiedliche Zahl an Sequenzwiederholungen.<sup>[7,13]</sup> Eine perfekte Replikation von DNA in zwei Töchtermoleküle würde eine solche Heterogenität nicht erzeugen.

Zweitens fand man heraus, dass sich während der Entwicklung des somatischen Makronucleus in verschiedenen *Tetrahymena*-Stämmen DNA-Strecken mit GGGGTT-Telomer-Wiederholungssequenzen auf rätselhafte Weise vereinigten und unterschiedliche Sequenzen in den rDNA-Minichromosomen bildeten. An den makronucleären Chromosomen wurden also neue Telomere gebildet. Meng-Chao Yao, der damit seine Arbeiten fortsetzte, die er als Doktorand bei Martin Gorovsky und dann als Postdoc bei Joe Gall (zur gleichen Zeit, als ich auch dort arbeitete) begonnen hatte, hatte dies zuerst an *Tetrahymena*-rDNA-Telomeren beobachtet.<sup>[14]</sup> Aber eine einzelne TTGGGGTT-Sequenz, die bereits in dieser Position in der Vorläufer-DNA-Sequenz vorkam, machte es vorstellbar, dass diese Sequenz selbst irgendwie als Startpunkt für wiederholte ungleiche Rekombi-



nationen dienen könnte und so vielfache Wiederholungen erzeugen könnte. Dann machten wir in meinem Labor in Berkeley jedoch ähnliche Beobachtungen bei anderen rDNAs und Nicht-rDNA-Telomeren des somatischen Kerns mit dem Unterschied, dass in diesen Fällen die Telomer-DNA-Sequenzen an Sequenzen angrenzten, in denen es überhaupt kein GGGTT als Initiationseinheit gab.<sup>[15]</sup> 1982 notierte ich über diese Beobachtungen: „Die Sequenzen, die mit den makronucleären DNA-Termini übereinstimmen, müssen durch diese subchromosomalen Segmente während der Bildung erworben werden. Zwei Wege können dorthin führen: Telomersequenzen werden auf die sich entwickelnden makronucleären DNA-Termini transponiert oder rekombiniert oder – noch einfacher – die sich wiederholenden Telomersequenzen werden de novo durch eine spezifische Synthesemaschinerie an diesen Termini synthetisiert.“<sup>[15]</sup> Gleichzeitig hatten David Prescott und Mitarbeiter in Colorado beobachtet, dass die T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>-Einheiten offenbar ähnlich an den Enden der kurzen Chromosomen des Makronucleus von hypotrichen Ciliaten zusammengefügt werden.<sup>[16]</sup>

Drittens hatten wir (wie im Nobel-Vortrag meines Mitpreisträgers Jack Szostak im Einzelnen beschrieben) entdeckt, dass die Telomersequenz der Hefe-DNA (unregelmäßige TG<sub>1-3</sub>-Wiederholungen, die Janice Shampay, eine Diplomandin in meinem Labor an der UC Berkeley, als erstes als Teil unserer Zusammenarbeit mit Jack sequenziert hatte) direkt an die Enden der *Tetrahymena*-GGGGTT-Telomere angehängt wurden, die in Hefe erhalten wurden.<sup>[17,18]</sup> In dieser Zusammenarbeit zeigten wir, dass ein Telomer von dem Protozoen *Tetrahymena*, bestehend aus GGGTT-Einheiten, auch in der Hefe *S. cerevisiae* in einem bestimmten Sinn als Telomer fungierte: Namentlich konnten die *Tetrahymena*-Telomersequenzen, wenn sie auf die Enden linearisierter Plasmid-DNA transferiert wurden, dieses in Hefezellen so stabilisieren, dass es nun unbegrenzt als extrachromosomales lineares DNA-Molekül über viele Replikationszyklen, Mitose und sogar Meiose, erhalten und weitergegeben wurde. Daneben geschah aber immer etwas sehr Interessantes mit den eingeführten fremden (*Tetrahymena*-)Telomeren in Hefe: Wir fanden, dass hefespezifische Telomersequenzen mit der Wiederholungssequenz TG<sub>1-3</sub>, die Janice Shampay sequenziert hatte, am distalen Ende der fremden GGGTT-Einheiten angefügt worden waren, nachdem sich die Hefezellen geteilt hatten. Weitere Beobachtungen warfen später zusätzlich Licht auf die Dynamik der Telomer-DNA in Zellen. So hatte Janice Shampay Anfang der 1980er Jahre

auch gefunden, dass nach Einführung eines linearen „High-copy-number“-Plasmids in Hefe (und damit von etwa 100 zusätzlichen Telomeren in diesen Zellen) die Telomere der Chromosomen selbst, deren Durchschnittslänge vorher über 300 Generationen mit mitotischer Teilung konstant geblieben war, nun eine langsame Verkürzung im Verlauf der folgenden Zellteilungen durchmachten (Elizabeth H. Blackburn und Janice Shampay, unveröffentlichte Ergebnisse).

Viertens berichteten Piet Borst und Mitarbeiter 1983 über eine faszinierende Beobachtung. Sie verfolgten die Vererbung eines Trypanosomen-Gens (Trypanosomen verursachen Schlafkrankheit), das für eine Variante des Oberflächenantigens kodiert. Dieses Antigen spielt eine wichtige Rolle für die Fähigkeit des Parasiten, der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Das Gen, das sie gefunden hatten, lag auf einem Restriktionsfragment aus dem Telomer. Während der Passage der Trypanosomenzellen wurde das Restriktionsfragments des Gens kontinuierlich länger, was darauf hindeutete, dass die Sequenz mit der Telomer-DNA kontinuierlich wuchs.<sup>[19]</sup>

Schließlich kam noch von einer anderen unabhängigen Seite eine cytogenetische Beobachtung von Barbara McClintock, die meinen wachsenden Verdacht bestärkte, dass eine noch unentdeckte Art entwicklungskontrollierter zellulärer Enzymaktivität auf die Telomere einwirkt. Zunächst in einer Unterhaltung, dann in einem Brief 1983 beschrieb McClintock, wie sie vor langer Zeit eine Maismutante identifiziert hatte, die die normale Fähigkeit von Mais verloren hatte, gebrochene Chromosomenenden zu heilen, die spezifisch sehr früh in der Pflanzenentwicklung bestehen – unmittelbar nach der Befruchtung (Abbildung 3):

Das Auffinden einer Mutante impliziert, dass es ein Gen gibt, das mit der Fähigkeit zur Heilung assoziiert ist – ein Gen, das zum Funktionsverlust mutiert werden kann. Ich war von der Folgerung aufgeschreckt, dass in Zygoten ein voll funktionales Telomer (‘geheilte Enden’ in McClintocks Terminologie) auch an einem gebrochenen Chromosom nicht durch

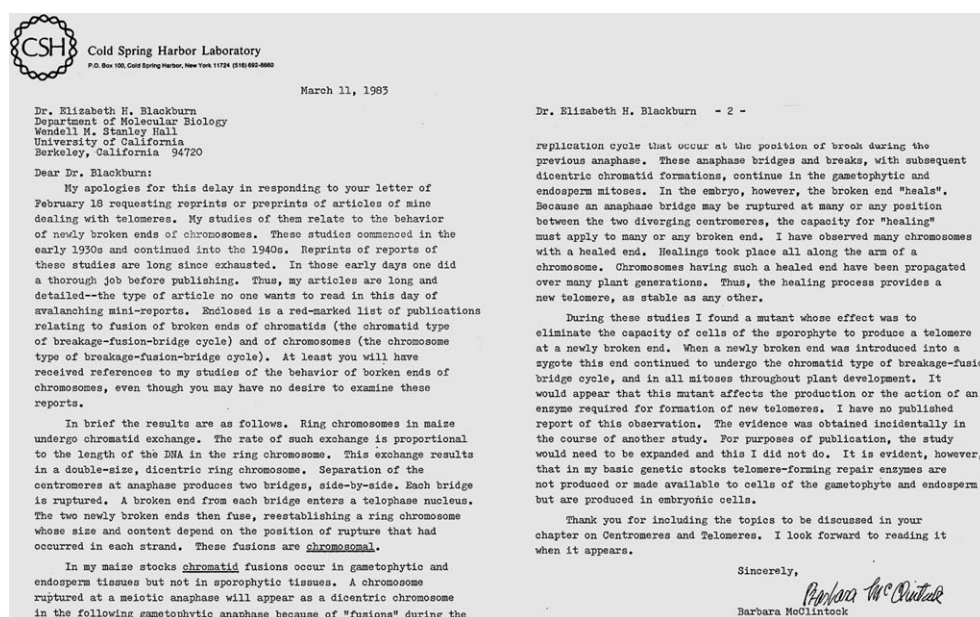


Abbildung 3. McClintocks Brief an Elizabeth H. Blackburn, 1983.

Zufall erzeugt wurde, sondern durch einen aktiven entwicklungs-kontrollierten Prozess; einen Prozess außerdem, der unmittelbar nach der Befruchtung abläuft – dem Entwicklungsstadium, das zu dem Stadium bei Ciliaten äquivalent ist, in dem Ciliatenchromosomen gebrochen werden (wenn in ihrem Fall auch freiwillig) und Telomer-DNA effizient an die neu entstandenen Enden ansynthetisiert wird.

Diese bemerkenswerte Information war ein weiterer Grund dafür, dass ich mich entschloss, nach der Telomerase zu suchen. Die Fähigkeit der Ciliaten, de novo Telomere unmittelbar nach der Befruchtung (was der Zygote äquivalent ist) zu bilden, war eine zu auffällige Parallele, um ignoriert zu werden.

## Tetrahymena-Zellen in einem biochemischen Ansatz

„Wenn Deine Knie nicht am Ende des Tages grün sind, solltest du ernstlich dein Leben überprüfen.“

Bill Watterson

amerikanischer Autor des Comics „Calvin & Hobbes“, geboren 1958

*Tetrahymena*-Zellen waren ein attraktives System, um die vermutete Enzymaktivität zu finden, die Telomer-DNA an Chromosomenenden anfügt. Ich begann damit, Extrakte aus *Tetrahymena*-Zellen herzustellen. Als ich vorgeschlagen hatte, die DNA-Endregionen zu sequenzieren, hatte Joe Gall darauf hingewiesen, dass sich die Ciliaten preisgünstig in großen Mengen züchten lassen. Außerdem lässt sich ihr Entwicklungszyklus dank der Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen (vor allem David Nanney, Peter Bruns, Ed Orias, Sally Allen und Kollegen) zeitlich synchronisieren. Daher kann man Zellextrakte von einer großen Zahl von Zellen herstellen, die gerade alle den Makronucleus entwickeln und in denen gleichzeitig – so meine Vermutung – die Reaktionen zur Telomeranfügung ablaufen. Dies schien mir daher wahrscheinlich ein Entwicklungsstadium, in dem für eine solche Aktivität ein großer Bedarf in der Zelle besteht und die daher dann am einfachsten nachzuweisen sein sollte. Die große Frage war, welches Substrat geeignet sei. Welche DNA wäre der beste Primer für das Anfügen von Telomer-DNA, und welche Vorstufen für die Nucleotidbausteine wären erforderlich? Würden beide Stränge der Telomer-DNA zusammen in einer gekoppelten Reaktion synthetisiert oder sogar in einer Reaktion, die mit der Produktion frisch geschnittener DNA-Enden einhergeht? Würde man besser DNA aus den frisch geschnittenen Enden des sich entwickelnden Makronucleus vorlegen, oder bereits fertige Telomerfragmente, die weiter verlängert werden könnten: Beide Reaktionen sollten in *Tetrahymena*-Zellen während dieses Entwicklungsschritts ablaufen. Um sicherzugehen, dass ich keine Möglichkeit übersehen hätte, gab ich eine Mischung aus allen vier Desoxynucleotid-Triphosphaten und allen vier Ribonucleosid-Triphosphaten, einem energieerzeugenden (ATP-erzeugenden) Enzymsystem und eine Mischung aus klonierten DNA-Fragmenten, gereinigt aus bakteriellen Zellen, die jedem Enzym aus den *Tetrahymena*-Extrakten Telomere- und Nicht-Telomer-DNA-Termini präsentieren würden, hinzu. Ich stellte Extrakte aus Zellen dieses Ent-

wicklungsstadiums her und passte dazu eine Methode an, die mein Diplomand Peter Challoner seinerseits aus Untersuchungen zur rDNA-Genexpression durch Tom Cech und Mitarbeitern übernommen hatte (und mit der Tom Cech die Entdeckung selbstspleißender RNA gelang). Peter hatte herausgefunden, dass die Inkubation solcher Extrakte ihm ermöglichte, Änderungen bei DNA-Restriktionsfragmenten nachzuweisen, die er zu den Extrakten zugegeben hatte. Die Veränderungen hatten sogar auf eine Art von Umwandlungen hingewiesen, die für die DNA der Telomerenden spezifisch war. Wie an anderer Stelle beschrieben,<sup>[10]</sup> beobachtete ich Anfang 1984 zunehmende Mengen der hybridisierenden Telomer-Wiederholungssequenzen GGGGTT, die irgendwo im Verlauf der Reaktionen gebildet wurden. Die Jagd hatte begonnen!

## Die Entdeckung der Telomerase

„... etwas beenden heißt, etwas beginnen.“

T. S. Eliot, 1888–1965

Vier Quartette: „Little Gidding“

Die nächste unmittelbare Aufgabe war, die Reaktionsbedingungen stark zu vereinfachen und zu verfeinern, um aufzuklären, was tatsächlich während der Reaktionen geschah, die durch die in den *Tetrahymena*-Zellextrakten offenbar vorhandenen Enzyme katalysiert werden. Im Jahr 1984 kam Carol Greider als Doktorandin in meine Arbeitsgruppe in Berkeley und interessierte sich sofort dafür. Diese Arbeit, bei der wir die Telomeraseaktivität entdeckten, ist im Einzelnen in Carol Greiders Nobel-Vortrag beschrieben, daher fasse ich hier nur einige Punkte kurz zusammen.

Wir fanden heraus, dass kurze DNA-Fragmente, die chemisch als DNA-Oligonucleotide synthetisiert und daher in hoher Konzentration verfügbar waren, an ihren 3'-Enden um die Telomereinheiten GGGGTT verlängert wurden, wenn sie mit *Tetrahymena*-Extrakten inkubiert wurden (Abbildung 4 und 5). Diese Enzymreaktion war effektiver, wenn die Extrakte aus Zellen gewonnen wurden, die gerade neue Telomere bei der Entwicklung der Makronuclei bildeten. Zum Glück war die Reaktion wenigstens im Reagensglas nicht zwingend oder mechanistisch an die Synthese des komplementären DNA-Strangs oder an eine DNA-Spaltung gekoppelt.<sup>[20]</sup>

Eine Behandlung mit Ribonuclease unterband die Fähigkeit des Extrakts, die Telomer-DNA-Einheiten anzuhängen. Die Enzymaktivität benötigte also RNA. Auch Proteasebehandlung unterband die Enzymreaktion, was darauf hindeutete, dass neben der RNA auch eine oder mehrere Proteinkomponenten erforderlich sind.<sup>[21]</sup>

Die erforderliche RNA-Komponente der Telomerase wurde identifiziert; sie enthielt die Sequenz 5'-CA-ACCCAA-3' (Abbildung 6). Diese Sequenz ist komplementär zu eineinhalb Einheiten der Wiederholungssequenz aus 6 Nucleotiden, die in vitro synthetisiert wurde. Ausgehend von diesem Hinweis fanden wir, dass alle Eigenschaften der Synthesereaktion in vitro, darunter auch die besonderen Erfordernisse bezüglich der DNA und der Nucleosidtriphos-

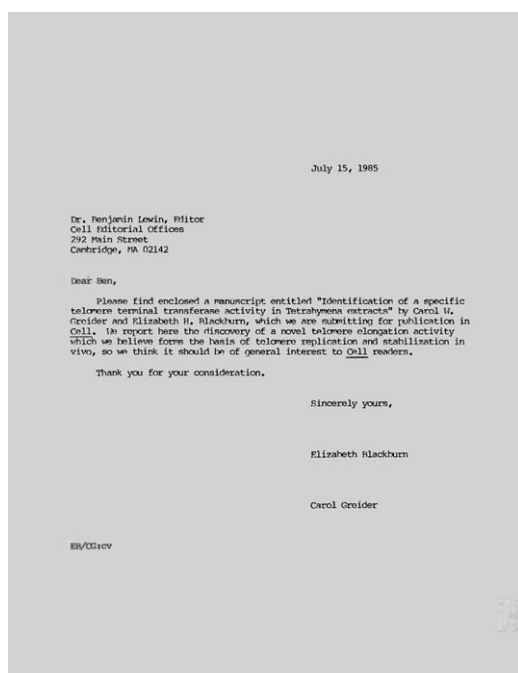


Abbildung 4. Brief an den Herausgeber von Cell, 1985.

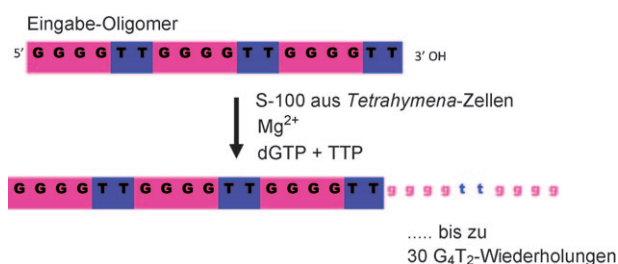


Abbildung 5. Der Original-Telomerasetest.<sup>[20,21]</sup>

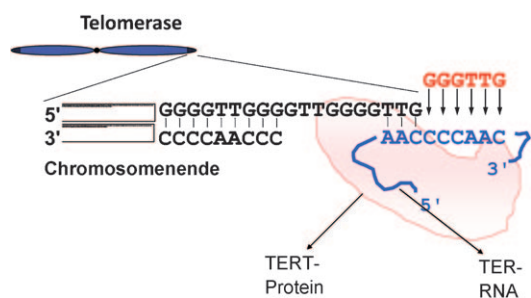


Abbildung 6. Ein Modell für die Reaktionsweise der *Tetrahymena*-Telomerase.<sup>[20–22]</sup>

phate, sich zu einem kohärenten Modell zusammenfügen, nach dem die Telomersynthese durch die Telomerase (wie wir die Enzymaktivität später nannten) durch wiederholte Kopierzyklen dieser kurzen Matrizensequenz in der Telomerase-RNA gesteuert wird. Die Synthese wird durch die Ausrichtung des 3'-Endes des DNA-Primers auf der Matrize unterstützt, wodurch der Primer für das Ansynthetisieren der nächsten Einheit positioniert wird.<sup>[22]</sup>

Wir hatten also entdeckt, dass die *Tetrahymena*-Telomerase hintereinander angeordnete Einheiten der Telomere-DNA-Sequenz, TTGGGG an das 3'-Ende einer Reihe von G-reichen Telomere-DNA-Sequenzen, die dabei als Oligonucleotid-Primer wirken, ansynthetisiert, unabhängig von exogenen Nucleinsäuren als Matrize. Die zelluläre Aktivität, die diese Reaktion katalysiert, ist RNase- und proteaseempfindlich. Ähnliche Experimente wurden zur Telomeraseaktivität bei den Ciliaten *Euplotes* und *Oxytricha* durchgeführt – von Dorothy Shippen-Lenz in meinem Labor und von Alan Zahler bei David Prescott, außerdem von Gregg Morin an humanen Zellen bei Joan Steitz in Yale. Jede Telomerase synthetisiert ihre eigene speziesspezifische Sequenz – GGGGTTT-Wiederholungen bei hypotrichen Ciliaten oder AGGGTT-Wiederholungen bei Humanzellen. Diese anderen Telomeraseaktivitäten ähnelten der *Tetrahymena*-Telomerase in der Primer-Erkennung und anderen Charakteristika, darunter die Ribonuclease-Empfindlichkeit, was für die allgemeine Verbreitung dieser Enzymaktivität unter den Eukaryoten spricht. Als Dorothy Shippen den RNA-Rest in der Telomerase des Ciliaten *Euplotes* identifizierte und sequenzierte, fand sie erfreulicherweise die Sequenz 5'-CA-AAACCCCAAAA-3'. Die Experimente deuteten darauf hin, dass diese Sequenz tatsächlich als Matrize für die Synthese der GGGGTTT-Einheiten dient, der Telomerasequenz von *Euplotes*. Zusammengenommen bestätigten diese Befunde, dass die Telomerase eine verbreitete spezialisierte reverse Transkriptase ist; ungewöhnlich ist, dass sie zellulären Ursprungs ist und eine eigene interne RNA-Matrize für die Synthese der repetitiven DNA trägt.

#### Nachweis der Reverse-Transkriptase-Aktivität der Telomerase in vivo

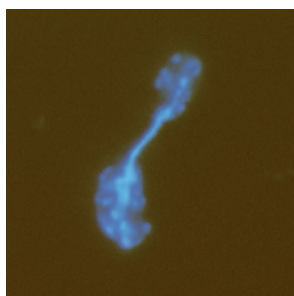
„Sie brauchten nicht umherzuwandern um zu sehen, was unter dem Himmel war; sie blieben einfach wo sie waren. [Und] als sie schauten, wurde ihre Erkenntnis tief.“

Popul Vuh, S. 165

Wir hatten nun gute Hinweise darauf, dass die Telomerase den G-reichen Strang der Telomere-DNA in vitro synthetisieren kann. Um zu beweisen, dass die 5'-CAACCCCAA-3'-RNA-Sequenz in der *Tetrahymena*-Telomerase die Matrize für die Telomersynthese in vivo ist, war eine ortsspezifische Mutagenese dieser Sequenz im Telomerase-RNA-Gen (das wir TER-Gen nannten) erforderlich. Erneut erwies sich *Tetrahymena* als erster Schlüssel für diese Experimente. Sein Telomerase-RNA-Gen war gerade von Carol Greider kloniert worden, und wir hatten in meinem Labor ein System ausgearbeitet, um solche mutierten Gene in *Tetrahymena*-Zellen überzuexprimieren. Wir inserierten die veränderten Telomerase-RNA-Gene in einen selbstreplizierenden Vektor, den mein Doktorand Guo-Liang Yu entwickelt hatte. Guo-Liang transferierte den Vektor dann durch Mikroinjektion der DNA-Moleküle in *Tetrahymena*-Zellen. Er analysierte und sequenzierte die Telomere aus Zellen, die die mutierten Telomerase-RNAs exprimierten. Diese Experimente, bei denen Guo Liang von seinen Kollegen Laura Attardi und



John Bradley unterstützt wurde, sicherten die In-vivo-Rolle der Telomerase auf drei Arten. Wie aus der Sequenz der Telomerase-RNA und den in vitro-Experimenten, die Carol Greider in ihrem Nobel-Vortrag beschreibt, vorhergesagt, tauchten veränderte Telomer-Wiederholungssequenzen in den Telomeren auf, die er aus den transformierten Zellen klonierte. Dies bewies, dass die Telomerase die zelluläre reverse Transkriptase ist, die die Telomere in den Zellen synthetisiert, indem sie ihre eigene interne RNA-Matrize innerhalb des TER-Rests des Enzymkomplexes kopiert. Die Zellen entwickelten schnell anormale Kerne als Zeichen für das Versagen einer korrekten DNA-Trennung (Abbildung 7). Dies weist darauf hin, dass die korrekte DNA-Sequenz für ein reguläres Verhalten des Kerns notwendig ist.<sup>[23]</sup>



**Abbildung 7.** Eine *Tetrahymena*-Zelle, die eine Telomerase-RNA mit mutierter Matrize exprimiert, versucht sich zu teilen.

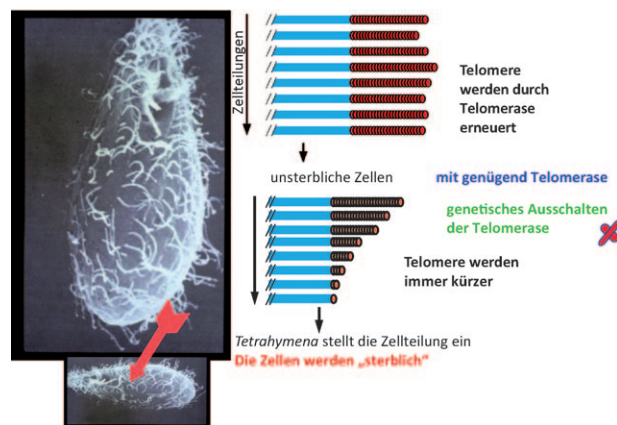
## Die Bedeutung der Telomerase für das Zellwachstum

„Like as the waves make towards the pebbled shore, so do our minutes hasten to their end.“

William Shakespeare, 1564–1616, Sonett Nr. 60

Wir konnten die Rolle der Telomerase-RNA als Matrize in *Tetrahymena* nachweisen. Daneben erhielten wir ein drittes, unerwartetes Ergebnis aus diesen Experimenten: *Tetrahymena*-Zellen sind normalerweise potenziell unsterblich. Bei einer bestimmten Mutation der Matrize fand Gwa-Liang aber keine der vorhergesagten DNA-Sequenzen an den Telomerenden. Stattdessen wuchsen die Zellen noch für ungefähr 20–25 weitere Zellzyklen. Während dieser Zeit verkürzten sich die Telomere laufend. Dann hörten die Zellen auf sich zu teilen. Dies war die erste Demonstration, dass ein Eingriff in die normale Telomerasefunktion die Lebenszeit einer Zelle begrenzen kann. Sie bestätigte, dass die kontinuierliche Wirkung der Telomerase selbst für die endlose Replikation der Zellen notwendig ist (Abbildung 8).<sup>[23]</sup>

Die Aktivität der Telomerase konnte so erklären, wie die Replikation am 5'-Ende der chromosomalen DNA abgeschlossen werden kann, ohne die terminalen Sequenzen zu verlieren, wie dies bei dem normalen halbkonservativen DNA-Replikationsmechanismus geschehen würde: das kontinuierliche Hinzufügen von Telomer-DNA an den Chromosomenenden könnte den vorhergesagten DNA-Verlust an den Enden kompensieren.



**Abbildung 8.** Abhängigkeit der *Tetrahymena*-Zellen von der Telomerase.<sup>[23]</sup>

## Telomere als Protein-DNA-Komplexe

„Having well polished the whole bow, he added a golden tip.“  
Homer, Die Ilias (Buch IV, III)

Wie ich in der Autobiographie erzählt habe, fand ich kurz nach der Identifizierung der Telomerase, dass im *Tetrahymena*-Chromatin die Telomer-DNA von gebundenen Proteinen geschützt ist, die keine Nucleosomen sind. Ich versuchte ohne Erfolg, diese Proteine an den *Tetrahymena*-Telomeren zu identifizieren. Andere öffneten mithilfe der Hefe-Molekulargenetik das Tor zu den Telomerproteinen. Inzwischen ist eine lange Liste von Proteinen, die mit Telomeren assoziiert sind, aus verschiedenen Eukaryoten bekannt. Viele von ihnen wurden unterschiedlich gut charakterisiert in Bezug auf Biochemie, Struktur, Bindungsumfang an den Telomeren und die Umstände, die zu messbaren Veränderungen des Bindungsumfanges führen. Viele Funktionen sind abgeleitet, oft, indem man nach den Konsequenzen einer Mutation oder Deletion des Proteins für die Zelle suchte. Doch trotz der umfangreichen Arbeiten, die das gegenwärtige Wissen um den molekularen Telomer-DNA-Protein-Komplex zusammengetragen haben, ist das momentane Bild von einem Telomer noch spukhaft und unvollständig. Dies liegt sicher auch daran, dass Telomere hoch dynamisch sind.

## Telomere als dynamisch-homöostatisches System

„Stabilität bedeutet nicht Unbeweglichkeit.“  
Klemens von Metternich, österreichischer Politiker, 1773–1859

Während der 1990er erschienen die Telomere als selbst-regulierende Einheiten, die gegenüber Veränderungen normalerweise durch eine Reihe molekularer Mechanismen abgepuffert sind. Mike McEachern, der zu dieser Zeit Postdoc in meinem Labor war, schlug ein Modell für die Telomerdynamik vor, das auf seinen Experimenten mit Telomeren aus *Kluyveromyces lactis*, einer Sprosshefe, beruhte. Kernpunkt dieses Modells ist erstens, dass die Geschwindigkeit, mit der

sich ein Telomer in Abwesenheit der Telomerase verkürzt, konstant bleibt. Die Wahrscheinlichkeit, mit der es durch die Telomerase verlängert wird, hängt von der momentanen Länge des Telomers ab – je kürzer das Telomer, desto wahrscheinlicher die Verlängerung durch die Telomerase. Mike leitete dies hauptsächlich aus einer Reihe von Experimenten ab, in denen er die RNA-Matrizensequenz der Telomerase veränderte, um die Synthese verschiedener Wiederholungssequenzen auszulösen. Anat Krauskopf, die gleichzeitig mit Mike bei mir arbeitete, weitete diese Befunde aus: Die Längenregulation der Telomere wurde auf eine Art verändert, die mit der veränderten Bindung eines Hefe-Telomerproteins an die mutierte Telomerasequenz einherging. Zusammengefasst zeigten Mikes und Anats Experimente, dass die Struktur des Telomer-Protein-DNA-Komplexes selbst einen großen Einfluss auf diese negative Regulation der Telomerase-Aktivität auf die Telomere hat. Das Telomer selbst wirkt also wie ein Türsteher, der den Zugang der Telomerase zum Telomer regelt, sogar in Gegenwart eines Überschusses an Telomerase in den Zellen. In den darauffolgenden Jahren kamen viele weitere Details über die beteiligten Proteine zum Vorschein, aber dieses allgemeine Modell hat noch immer seine Gültigkeit behalten.

Eine allgemeine und wichtige zusätzliche Vorstellung ist, dass Telomere in zwei Zuständen vorkommen können: blockiert und nicht blockiert. Blockierte Telomere signalisieren der Zelle, sich weiter zu teilen, alles ist in Ordnung. Nicht blockierte Telomere signalisieren der Zelle, wenn die fehlende Blockierung länger besteht, die Teilungen einzustellen. Mike McEachern und Anat Krauskopf zeigten, dass eine der auffälligsten Eigenschaften eines Telomers ist, wie flexibel es gegenüber verschiedenartige Verletzungen auf molekularer Ebene reagieren kann; irgendwann allerdings bringt eine weitere Veränderung als letzter Tropfen das Fass zum Überlaufen, und das Telomer bricht zusammen. So wurde auch offensichtlich, dass Zellen ausgeklügelte und überlappende, redundante oder sich gegenseitig verstärkende Mechanismen entwickelt haben, um sicherzustellen, dass ihre Telomere funktionsfähig bleiben.<sup>[24]</sup>

Das gegenwärtige Bild, zusammengesetzt aus den Ergebnissen vieler Forscher, zeigt das Telomer in der Zelle als eine hoch dynamische Struktur. Es ist kein starrer stabiler Komplex, sondern es erinnert eher an einen Bienenschwarm: Größe und Form des Schwarm scheinen insgesamt gleich zu bleiben, aber in Wirklichkeit ändert sich die Zusammensetzung laufend, weil einzelne Bienen (bildlich für die Telomerproteine) den Schwarm laufend verlassen und durch andere Bienen ersetzt werden.

### Ähnliche molekulare Maschinerie, unterschiedliche Lebensgeschichte

„Bedenke das Ende.“

[lat.: „finem respice“ (oder „respice finem“).]

Chilon von Sparta

Struktur und Funktion der Telomere sind unter den Eukaryoten über die Evolution hoch konserviert geblieben. Dies

erklärt, warum Jack Szostak und ich in den frühen 1980ern erfolgreich *Tetrahymena*-Telomere in dem sehr entfernt verwandten Organismus der Bäckerhefe vermehren konnten. Wie hier und im Einzelnen in Jack Szostaks Nobel-Vortrag beschrieben, fanden wir heraus, dass die Hefe-Telomerasequenzen an *Tetrahymena*-Telomeren angefügt wurden, die wir an den Enden eines linearisierten Plasmids eingeführt hatten. Dadurch wurde das Plasmid stabilisiert und konnte sich in der linearen Form extrachromosomal unbegrenzt weiter replizieren. Ein ähnlicher Mechanismus der Telomerase sichert die Integrität der Telomere: Allgemein wird bei den eukaryotischen Telomerasen (mit relativ wenigen Ausnahmen) ein spezialisiertes Ribonucleoprotein, eine reverse Transkriptase eingesetzt, um die Enden der eukaryotischen Chromosomen zu erhalten. Telomerase-RNA und das Proteinzentrum der Telomerase enthalten beide gut erkennbare konservierte Eigenschaften auch bei den am fernsten verwandten Eukaryoten.

Angesichts dieser verbreiteten Konservierung von Telomeren und Telomerase, die tief in der Evolution der Eukaryoten verwurzelt ist, ist es faszinierend, an wievielen verschiedenen Stellen im Leben der unterschiedlichen Eukaryoten die Erhaltung der Telomere eine Rolle spielt. Allein unter den Säugern und sogar unter günstigen Lebensbedingungen unterscheiden sich die Arten deutlich in ihrer Lebenserwartung, was darauf hindeutet, dass die maximale Lebensdauer in beträchtlichem Umfang genetisch bestimmt ist. Menschen haben eine Lebenserwartung von etwa achtzig Jahren, Labormäuse von etwa zwei Jahren. Daher zieht man vernünftigerweise die Möglichkeit in Betracht, dass die limitierenden Schritte, die Altern und Tod verursachen, sich zwischen diesen beiden Arten unterscheiden können, obwohl ihnen gemeinsame zelluläre und molekulare Mechanismen zugrundeliegen. Sogar innerhalb der Säuger scheinen sich die qualitativen und quantitativen Beiträge der Telomererhaltung zur zellulären proliferativen Lebensdauer deutlich zu unterscheiden.<sup>[25]</sup> Greift man noch weiter aus von Säugern zu Wirbellosen, kann es sein, dass trotz vieler Konservierungen grundlegender molekularer und zellulärer Mechanismen diejenigen, die bei Wirbellosen zu Altern und Tod (aus Altersschwäche) beitragen, andere sind, als die, die quantitativ bedeutsam oder limitierend für Altern und Tod von Menschen sind. All diese Betrachtungen haben die Frage aufgeworfen, ob die Telomererhaltung tatsächlich eine quantitativ bedeutsame Determinante für normales Altern und normale Lebenserwartung beim Menschen sind.

### Telomerase und Krankheiten beim Menschen

#### Telomerase in Tumorzellen

„Wir sollten das Ende bei Allem betrachten.“

[fr.: „En toute chose il faut considerer la fin.“]

Jean de la Fontaine, Fables (III, 5)

In einem wichtigen Zusammenhang spielt die Telomerase beim Menschen eine herausragende Rolle, nämlich in Tumorzellen. Eine überaktive Telomerase in den Krebszellen ist eine hervorstechende Eigenschaft der meisten bösartigen

humanen Tumore. Vor dem physiologischen Hintergrund der Tumorzelle – diese hat bei der Entwicklung der Malignität bereits viele andere genetische und epigenetische Veränderungen durchlaufen – spielt die Telomerase eine krebserfördernde Rolle. Klar ist, dass sie den Zellen Unsterblichkeit verleiht, indem sie Krebselomere erzeugt, die die Voraussetzung für kontinuierliches Wachstum sind. Die hohe Telomeraseaktivität, die menschliche Krebszellen auszeichnet, ist daher ein logischer Angriffspunkt für Tumorthapien.

## Telomererhaltung im Laufe eines Menschenlebens

*„The end crowns all, and that old common arbitrator, Time, will one day end it.“*

William Shakespeare 1564–1616, Troilus und Cressida (Hektor, Akt IV, v)

Wie oben beschrieben führt die Ausschaltung der Telomerase in ansonsten potenziell „unsterblichen“ Einzellern zur fortschreitenden Verkürzung der Telomere über mehrere Zellgenerationen bis zum Einstellen der Zellteilung („Seneszenz“). Daraus folgt die logische Frage, ob der gleiche fortschreitende Prozess auch beim Menschen das Altern verursacht und die Lebenserwartung begrenzt. Seltene Mutationen in Genen für Bestandteile der Telomerase, die zu verringerter Telomeraseaktivität und zur Telomerverkürzung beim Menschen führen, haben eindeutig ungünstige und krankheitsverursachende Auswirkungen und können verhindern, dass der Betroffene ein hohes Alter erreicht. Dennoch war bis vor Kurzem für den größten Teil der Menschen, die definitionsgemäß keine „Mutanten“ sind, die Rolle einer unzureichenden Erhaltung der Telomere für Altern und Lebenserwartung weniger klar. Was beobachtet man in der Bevölkerung im Allgemeinen?

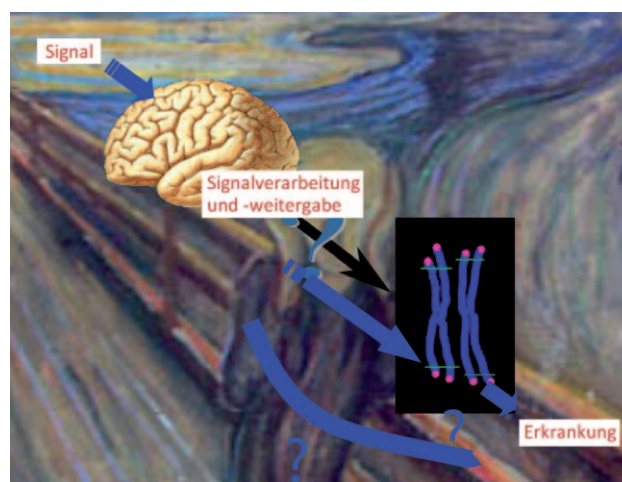
Inzwischen wurden umfangreiche epidemiologische Daten über die Telomererhaltung in lebenden Menschen gesammelt. Von unserer gegenwärtigen Kenntnis über Telomere haben wir den Schluss abgeleitet, dass die Telomererhaltung mit Alterungsprozessen und Alterserkrankungen verbunden ist. Erstens ist die Verkürzung der Telomere in weißen Blutzellen mit einer eindrucksvollen Liste schwerer Alterserkrankungen verknüpft: In vielen Gruppen aus Hunderten bis Tausenden von Probanden wiesen verkürzte Telomere auf ein erhöhtes Risiko des Auftretens von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Schlaganfall, Gefäßveränderungen, Osteoporose, Fettleibigkeit sowie von Diabetes und gewissen Krebsarten hin. Durchschnittlich längere Telomere in weißen Blutzellen sind zwar nicht durchgängig mit höherer Lebenserwartung verknüpft, sie weisen jedoch auf mehr gesunde Jahre hin, wie sich in einer Gruppe mit über Siebzigjährigen zeigte.<sup>[26]</sup>

Zweitens findet man Telomeraseaktivität nicht nur in vielen normalen humanen Körperzellen, sondern auch – was wichtig ist – messbar<sup>[27–30]</sup> bei Erwachsenen (auch Älteren), sogar in ruhenden weißen Blutzellen, außerdem in Stammzellen und verschiedenen proliferierenden Vorläuferzellen. Das bedeutet, dass die Telomerverkürzung in normalen Zellpopulationen während des Lebens auch ausgeglichen oder sogar umgekehrt werden kann. Während Querschnitts-

studien eine langsame Telomerverkürzung bei älteren Personen im Allgemeinen ergeben, streuen die einzelnen Datenpunkte stark: Es ist nicht ungewöhnlich, wenn die Telomere eines 80jährigen so lang wie die eines 30jährigen sind. Was könnte diese Streuung verursachen? Tatsache ist, dass die Verlängerung der Telomere in Populationen weißer Blutzellen inzwischen viel häufiger gefunden wird als nach den früheren Modellen einer unvermeidlichen Verkürzung der Telomere während der Lebenszeit zu erwarten war. Solche Modelle hatten sich jedoch nur auf Querschnittsuntersuchungen gestützt und waren von der Annahme ausgegangen, dass es in normalen Zellen erwachsener Menschen keine Telomerase gebe.

Was bestimmt und reguliert die Abweichungen in der Langzeit-Telomererhaltung beim Menschen? Nachdem genetische Einflüsse nachgewiesen wurden, tauchen nun auch nichtgenetische Faktoren mit signifikantem Einfluss auf den Erhalt der Telomerlänge in humanen weißen Blutzellen auf. Insgesamt ergibt sich der Telomerstatus beim Menschen aus den gemeinsamen Einflüssen vieler genetischer und nichtgenetischer Faktoren. Zu den nichtgenetischen Einflüssen gehören auch veränderbare Faktoren, besonders psychologischer Stress (Abbildung 9), Verhaltens- und auch Ernährungsgewohnheiten.

Die Hauptbedingungen und Krankheiten oder Krankheitsrisiken beim Altern des Menschen wurden inzwischen mit der Verkürzung von Blutzell-Telomeren assoziiert (Abbildung 10): In erster Linie sind dies Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Diabetes und eine Beeinträchtigung der Funktion des Immunsystems in verschiedenen Formen. Die Kürze der Telomere ist dabei nicht spezifisch mit einer dieser Krankheiten assoziiert. Stattdessen scheint es nützlicher zu sein, wenn man diese scheinbar fehlende Spezifität der Telomererhaltung als etwas betrachtet, das das Altern grundlegend widerspiegelt – und vielleicht verursacht. Der Telomerstatus ist – im Sinne eines „biologischen Alters“ – vielleicht ein zuverlässigeres Maß als das chronologische Alter. Außerdem beeinflussen auch die Lebensbedingungen die Telomererhaltung im Menschen. Vielleicht wird ein



**Abbildung 9.** Einfluss von Stress auf Telomere und die Entstehung von Krankheiten: Chronischer Stress verkürzt die Telomere.



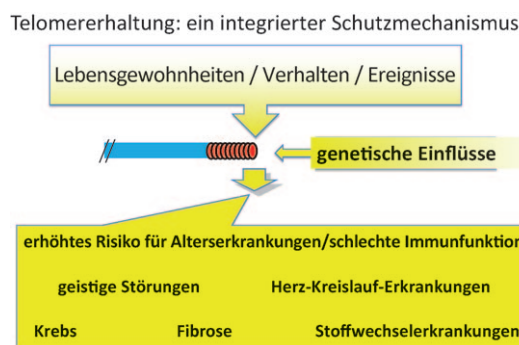


Abbildung 10. Das Telomer als vielseitiger Integrator.

Telomer-Monitoring einmal so selbstverständlich wie regelmäßiges Wiegen als integrativer Gesundheitsindikator. Mit Sicherheit weiten diese Befunde und Schlussfolgerungen das Feld der Telomer- und Telomerasebiologie in Bereiche aus, die weit von dem einzelligen Teichbewohner entfernt sind, mit dem ich meine Arbeit begann.

*Ich bin den vielen Kollegen zu Dank verpflichtet, die mir über die Jahre hin geholfen haben. Ohne sie hätte ich viel weniger erreichen können.*

Eingegangen am 22. April 2010

Online veröffentlicht am 6. September 2010

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] *Telomeres*, 2. Aufl. (Hrsg.: T. de Lange, V. Lundblad, E. Blackburn), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, **2006**, S. 1–19.
- [2] „Cytological observations of deficiencies involving known genes, translocations and an inversion in *Zea mays*“: B. McClintock, Agricultural Experiment Research Station Bulletin, University of Missouri College of Agriculture, **1931**, *163*, 4–30.
- [3] „A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in *Zea Mays*“: B. McClintock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1932**, *18*, 677–681.
- [4] „The remaking of chromosomes“: G. Muller, *Collecting Net* **1938**, *8*, 182–195.
- [5] „Chromosome-sized DNA molecules from *Drosophila*“: R. Kavenoff, *Chromosoma* **1973**, *41*, 1–27.
- [6] K. Grell, *Protozoology*, Springer, Berlin, **1973**.
- [7] „A tandemly repeated sequence at the termini of the extra-chromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*“: E. Blackburn, J. C. Gall, *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 33–53.
- [8] „The molecular structure of centromeres and telomeres“: E. Blackburn, J. Szostak, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 163–194.
- [9] „Tandemly repeated C-C-C-C-A-A hexanucleotide of *Tetrahymena* rDNA is present elsewhere in the genome and may be related to the alteration of the somatic genome“: M. Yao, E. Blackburn, J. Gall, *J. Cell Biol.* **1981**, *90*, 515–520.
- [10] „Telomeres and their Synthesis“: E. Blackburn, *Perspect. Sci.* **1990**, *249*, 489–490.
- [11] „A family of inverted repeat sequences and specific single-strand gaps at the termini of the *Physarum* rDNA palindrome“: E. Johnson, *Cell* **1980**, *22*, 875–886.
- [12] „An irregular satellite sequence is found at the termini of the linear extrachromosomal rDNA in *Dictyostelium discoideum*“: H. Emery, A. Weiner, *Cell* **1981**, *26*, 411–419.
- [13] „Sequence-specific fragmentation of macronuclear DNA in a holotrichous ciliate“: G. Katzen, G. Cann, E. Blackburn, *Cell* **1981**, *24*, 313–320.
- [14] „Tandemly repeated hexanucleotide at *Tetrahymena* rDNA free end is generated from a single copy during development“: B. King, M. Yao, *Cell* **1982**, *31*, 177–182.
- [15] „DNA termini in ciliate macronuclei“: E. H. Blackburn, M. L. Budarf, P. B. Challoner, J. M. Cherry, E. A. Howard, A. L. Katzen, W. C. Pan, T. Ryan, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1983**, *47*, Pt 2, 1195–1207.
- [16] „Inverted terminal repeats are added to genes during macronuclear development in *Oxytricha nova*“: R. Boswell, L. Klobutcher, D. Prescott, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3255–3259.
- [17] „Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors“: J. Szostak, E. Blackburn, *Cell* **1982**, *29*, 245–255.
- [18] „DNA sequences of telomeres maintained in yeast“: J. Shampay, J. Szostak, E. Blackburn, *Nature* **1984**, *310*, 154–157.
- [19] „Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes“: A. Bernards, et al., *Nature* **1983**, *303*, 592–597.
- [20] „Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts“: C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Cell* **1985**, *43*, 405–413.
- [21] „The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two distinct primer specificity“: C. Greider, E. Blackburn, *Cell* **1987**, *51*, 887–898.
- [22] „A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis“: C. Greider, E. Blackburn, *Nature* **1989**, *337*, 331–337.
- [23] „In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs“: G.-L. Yu, et al., *Nature* **1990**, *344*, 126–132.
- [24] „Switching and signaling at the telomere“: E. Blackburn, *Cell* **2001**, *106*, 661–673.
- [25] „Telomeres and telomerase. Inter-species comparisons of genetic, mechanistic and functional aging changes“: N. Gomes, J. Shay, W. Wright in *The Comparative Biology of Aging* (Hrsg.: N. Wolf), Springer, Dordrecht, **2010**, S. 227–258.
- [26] „Association between telomere length, specific causes of death, and years of healthy life in health, aging, and body composition, a population-based cohort study“: O. Njajou, et al., *J. Gerontol. Ser. A* **2009**, *64*, 860–864.
- [27] „Accelerated telomere shortening in response to life stress“: E. Epel, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17312–17315.
- [28] „Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors“: E. Epel, et al., *Psychoneuroendocrinology* **2006**, *31*, 277–287.
- [29] „Analyses and comparisons of telomerase activity and telomere length in human T and B cells: insights for epidemiology of telomere maintenance“: J. Lin, et al., *J. Immunol. Methods* **2010**, *352*, 71–80.
- [30] „Dynamics of telomerase activity in response to acute psychological stress“: E. S. Epel, J. Lin, F. S. Dhabhar, O. M. Wolkowitz, E. Puterman, L. Karan, E. H. Blackburn, *Brain Behav. Immun.* **2010**, *4*, 531–539.