

## Replikative Seneszenz

# Telomere und Telomerase in Zellalterung und Karzinogenese

HENNING WEGE<sup>1</sup>, TIM H. BRÜMMENDORF<sup>2</sup>

<sup>1</sup>GASTROENTEROLOGIE UND HEPATOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

<sup>2</sup>KLINIK FÜR HÄMATOLOGIE UND ONKOLOGIE, UNIVERSITÄTSKLINIKUM AACHEN

Die replikative Zellalterung ist durch eine Telomerverkürzung charakterisiert. Kurze Telomere sind mit erhöhter genetischer Instabilität assoziiert. Das Enzym Telomerase wirkt der Telomerverkürzung in Keimbahnzellen und Tumorzellen entgegen.

Replicative cellular aging is characterized by progressive telomere attrition. Critically short telomeres are associated with increased genetic instability. The enzyme telomerase counterbalances telomere shortening in germ line and tumour cells.

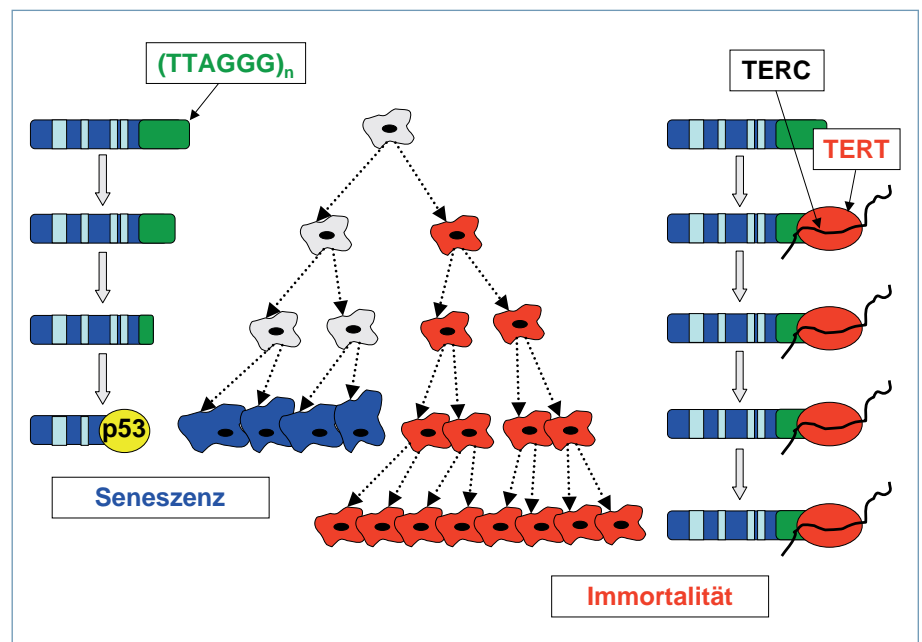
### Telomere und die replikative Zellalterung

■ In Eukaryoten, also auch in humanen Zellen, werden die Enden der Chromosomen als Telomere bezeichnet. Der Begriff leitet sich vom griechischen *τέλος* ([*telos*], Ende) und *μέρος* ([*meros*], Teil) ab und wurde vom Genetiker und späteren Nobelpreisträger Hermann J. Müller im Jahre 1938 geprägt. Bereits Müller erkannte, dass die Telomere eine entscheidende Funktion für die Stabilität und Integrität linearer Chromosomen haben. Telomere bestehen aus einer kurzen DNA-Sequenz (beim Menschen das Hexanukleotid 5'-TTAGGG-3'), die sich hundert- bis tausendfach wiederholt, und bilden einen essenziellen 3'-Überhang am Chromosomenende. Mit der Telomer-DNA sind heterochromatische Proteine assoziiert, insbesondere POT1 (*protection of telomeres 1*), TRF1 (*telomeric repeat binding factor 1*), TRF2, TINF2 (*TRF1-interacting nuclear factor 2*), TPP1 (*TINF2-interacting protein*) und RAP1 (*transcriptional repressor/activator protein*). Zusammen formen diese als Shelterin bezeichneten Nukleoproteinkomplexe molekulare Kappen an den Chromosomenenden und schützen dadurch die codierenden Abschnitte vor Degradation, Rekombination und Fusion. Durch die Bildung molekularer Kappen werden die Chromosomenenden dem Zugriff zelleigener Repa-

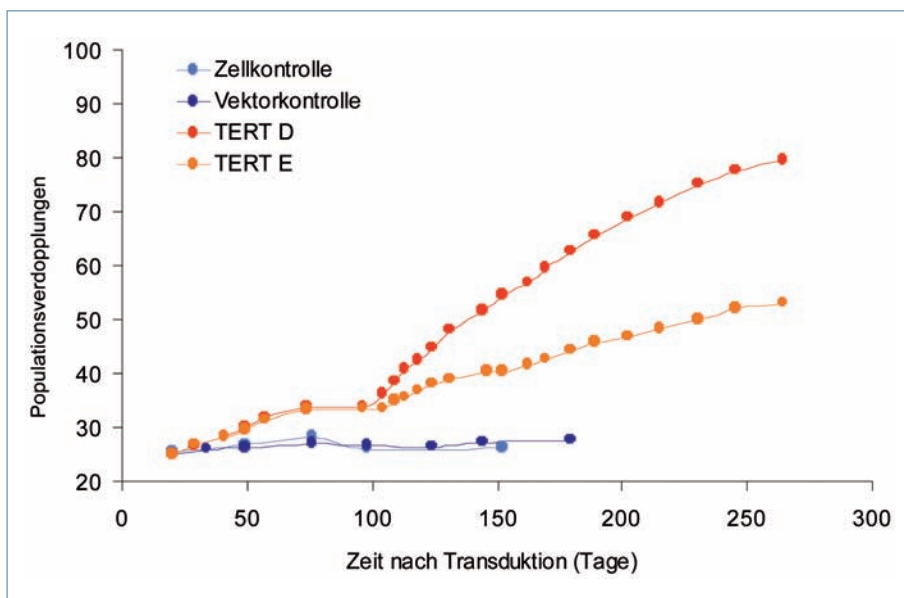
ratorsysteme, die durch Doppelstrangbrüche aktiviert werden, entzogen. Die Sequenz der Telomer-DNA und auch die Länge der Telomere zeigen speziesspezifische Unterschiede. Während der Mensch im Durchschnitt

über einige Tausend Repetitionen pro Chromosomenende verfügt (Telomerlänge bei der Geburt: ca. 15 bis 20 Kilobasenpaare), findet man in einzelnen Mausspezies ein Vielfaches dieser Länge. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Telomerlänge auch innerhalb einer Spezies, selbst innerhalb verschiedener Gewebe und sogar von Chromosomenarm zu Chromosomenarm variiert [1].

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts galt die Annahme, dass somatische Zellen von Vertebraten unbegrenzt in Zellkultur expandiert werden können. Erst 1961 widerlegten Hayflick und Moorhead dieses Dogma. Sie zeigten, dass sich diploide Fibroblasten *in vitro* nur für eine begrenzte Zeit teilen (60 bis 80 Populationsverdopplungen), bevor sie in einen irreversiblen Proliferationsarrest mit Erhalt der metabolischen Funktionen eintreten (replikative Seneszenz). Die Zeit bis zur Aktivierung des Seneszenz-Programms (auch als Hayflick-Limit bezeichnet) wird nicht



▲ **Abb. 1:** Replikative Telomerverkürzung. Mit jeder Zellteilung kommt es aufgrund der semikonservativen DNA-Replikation zu einer Verkürzung der Telomere. Das Enzym Telomerase mit den Komponenten TERC und TERT gleicht die Telomerverkürzung noch während der Replikation aus und ermöglicht eine unbegrenzte zelluläre Proliferation (Immortalität). Weitere Erklärungen im Text.



▲ **Abb. 2:** Immortalisierung. Humane Hepatozyten wurden mit TERT transduziert und im Vergleich zu einer Zellkontrolle und einer Vektorkontrolle in Langzeitkultur expandiert. Telomerase-rekonstituierte Zellklone (TERT D und TERT E) proliferieren über das Hayflick-Limit hinaus mit stabilen Telomeren.

durch die chronologische Zeit in Zellkultur, sondern durch die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen und der damit verbundenen Erosion der Telomere kontrolliert. Diese replikative Telomerverkürzung (beim Menschen 50 bis 200 Basenpaare je Zellteilung) ist eine Folge der inkompletten semikonservativen Replikation der DNA sowie enzymatischer Prozesse während der S-Phase im Zellzyklus. Nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen wird eine kritische Telomerlänge erreicht, die eine ausreichende Protektion der Chromosomenenden nicht mehr zulässt. Hierzu ergaben unsere Untersuchungen, dass auch die *in vitro*-Expansion humaner Progenitorzellen der fetalen Leber durch die replikative Telomerverkürzung auf 35 bis 45 Populationsverdopplungen begrenzt wird [2]. Anschaulich beschrieb Calvin Harley 1990 die Begrenzung der Proliferationskapazität durch die replikative Telomerverkürzung als „mitotische Uhr“. Aufgrund dieser Zusammenhänge können aus der Telomerlänge peripherer Blutzellen indirekt die replikative Lebensspanne hämatopoetischer Stammzellen und die Kinetik des Stammzellularumsatzes abgeleitet werden [3, 4]. Patienten mit aplastischer Anämie mit erhöhtem Stammzellularumsatz zeigen z. B. eine beschleunigte Telomerverkürzung, die auch prognostisch relevant ist [5]. Ebenfalls kommt es nach allogener Knochenmarktransplantation anfänglich zu einer akzelerierten Telomerverkürzung [6].

Auch eine Destabilisierung der Telomere bei suffizienter Telomerlänge, z. B. durch Modifikation der Telomersequenz oder Suppression der stabilisierenden Proteine, induziert einen Verlust der Schutzfunktion mit Aktivierung des Seneszenz-Programms. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass nicht allein die Länge der Telomere für eine unbegrenzte Proliferation von Bedeutung ist, sondern vielmehr deren Funktion, das heißt die Interaktion der stabilisierenden Proteine und der Telomer-DNA.

### Telomerase und die zelluläre Immortalität

Im Gegensatz zu normalen somatischen Zellen lässt sich in Tumorzellen und in Keimbahnzellen eine konstante oder sich nur geringfügig ändernde Telomerlänge trotz unbegrenzter Proliferation (Immortalität) beobachten (**Abb. 1**). In diesen Zellen wirkt das Enzym Telomerase, das erstmalig 1985 in Wimperntierchen nachgewiesen wurde, der Telomerverkürzung entgegen [7]. Elizabeth H. Blackburn, Jack W. Szostak und Carol W. Greider erhielten für die Erstbeschreibung der Telomerase 2009 den Nobelpreis für Medizin. Das Ribonukleoprotein Telomerase enthält die essenzielle RNA-Komponente TERC (*telomerase RNA component*), die zur Bindung an das Chromosomenende und als Matrize für die Neusynthese von Telomer-DNA dient. Die Aktivität des Holoenzym wird von der katalytischen reversen Transkriptase TERT

(*telomerase reverse transcriptase*) bestimmt, deren Expression in differenzierten humanen Zellen supprimiert ist. Zusätzlich modulieren zahlreiche Telomerase-bindende Proteine, insbesondere TP1 (*telomerase associated protein 1*) und Dyskerin, die Telomerase-Aktivität. In Keimbahnzellen und humanen Malignomen lassen sich hohe Spiegel für die Expression von TERT und eine robuste Telomerase-Aktivität nachweisen.

Die Bedeutung der Telomerase für eine ungestörte zelluläre Proliferation wurde eindrücklich in Mausexperimenten belegt. Untersuchungen an Mäusen, deren Telomerase-Aktivität durch homozygote Deletion der essenziellen RNA-Komponente unterdrückt wurde (*mTERC<sup>-/-</sup>*), zeigten eine kontinuierliche Telomerverkürzung. In späten Generationen mit kritischer Telomerlänge wurden eine Zunahme von Fusionen und eine erhöhte genetische Instabilität beobachtet. Die Mäuse wiesen Defekte in der Spermatogenese bis hin zur Infertilität, Milzatrophy, Störungen der Wundheilung, Defizite in der Infektabwehr sowie eine Reduktion der Knochenmarkreserve auf [8]. Es kam außerdem zu einer vier- bis sechsfach erhöhten Tumorzinzidenz, wahrscheinlich aufgrund der gesteigerten genetischen Instabilität. Wir bestätigten für humane Leberzellen, dass eine ektope Expression von TERT zur Stabilisierung der Telomere und zur Immortalität führt (**Abb. 2**).

Neuere Untersuchungen offenbarten, dass die Regulation der Telomerlänge wahrscheinlich komplexer ist, als ursprünglich vermutet, und nicht nur von der Aktivität der Telomerase und der Geschwindigkeit der replikativen Telomerverkürzung abhängt. Während 90 Prozent der humanen Malignome eine hohe Telomerase-Aktivität aufweisen, stabilisieren die restlichen zehn Prozent ihre Chromosomenenden durch einen Telomerase-unabhängigen Prozess, der erstmals 1995 als ALT-Mechanismus (*alternative lengthening of telomeres*) postuliert wurde.

Neben der Stabilisierung der Telomere werden auch Funktionen der Telomerase beschrieben, die unabhängig von der Telomerlänge ablaufen (nicht-kanonische Funktionen der Telomerase) und zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber Apoptose-Induktion und oxidativem Stress führen. Möglicherweise lassen sich diese Funktionen auf eine verbesserte Schutzfunktion der Telomere bei hoher Telomerase-Aktivität zurückführen. In embryonalen Stammzellen mit hoher Telomerase-Aktivität konnte z. B. eine

verringerte Akkumulation von Peroxiden als Hinweis auf eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden [9]. Die zusätzlichen Funktionen der Telomerase, die vor allem in Stammzellen relevant zu sein scheinen, könnten auch in der Karzinogenese eine Rolle spielen.

### Telomerstabilisierung in der Karzinogenese

Die robuste Stabilisierung der Telomere ist eine notwendige Voraussetzung für eine unbegrenzte Expansion (prä-)maligner Zellklone. In der überwiegenden Zahl maligner Tumoren besteht eine hohe Telomerase-Aktivität, während sich im umliegenden Normalgewebe kaum aktive Telomerase nachweisen lässt. Die Telomerstabilisierung wird auf eine Re-Expression von TERT zurückgeführt, die *per se* jedoch noch keine Transformation auslöst, was z. B. Langzeitkulturen in immortalisierten humanen Leberzellen belegen [10].

Ähnlich wie der Apoptose wird auch der Telomerverkürzung und der replikativen Seneszenz eine tumorsuppressive Funktion zugeschrieben. Dysfunktionale Telomere werden als Doppelstrangbrüche erkannt und verhindert via p53 und/oder dem Retinoblastoma-Tumorsuppressor-Signalweg (RB) mit konsekutiver Induktion von p21 und/oder p16 eine weitere zelluläre Expansion. Bei Inaktivität oder Mutation dieser Signalwege führt die kritische Telomerverkürzung jedoch zu instabilen Chromosomen mit deutlich erhöhtem Risiko für Aberrationen (Fusionen und Aneuploidien). Die Telomerverkürzung ist

somit bei inkompetenter DNA-Schadensantwort durch Steigerung der genetischen Instabilität relevant für die Initiierung (prä-)maligner Zellklone. Bei der chronisch myeloischen Leukämie ist die Telomerlänge mit dem Progressionsrisiko korreliert und ermöglicht Rückschlüsse auf das Ausmaß der genetischen Instabilität [11]. Für die weitere Tumorentwicklung ist dann jedoch eine Stabilisierung der kurzen Telomere notwendig, um eine mitotische Katastrophe mit Proliferationsarrest und Zelltod zu vermeiden [12].

Die replikative Telomerverkürzung schützt bei intakter DNA-Schadensantwort vor einer malignen Transformation. Bei Mutationen von p53 und/oder RB begünstigt die Telomerverkürzung jedoch die weitere Transformation. Folglich wird die Wirkung einer gezielten therapeutischen molekularen Aktivierung oder Inhibition der Telomerase in Bezug auf die Karzinogenese vom Funktionszustand der Telomere und dem Status der DNA-Schadensantwort bestimmt.

### Danksagung

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (WE 2903/1-3 sowie BR 3630/2-1), der Eppendorfer Krebs- und Leukämiehilfe und dem Forschungsförderungs fonds Medizin der Universität Hamburg gefördert.

### Literatur

- [1] Martens UM, Zijlman JM, Poon SS et al. (1998) Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 18:76-80
- [2] Wege H, Le HT, Chui MS et al. (2003) Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 124:432-444

- [3] Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S et al. (1999) Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 190:157-167
- [4] Drummond MW, Balabanov S, Holyoake TL et al. (2007) Concise review: Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 25:1853-1861
- [5] Brummendorf TH, Maciejewski JP, Mak J et al. (2001) Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* 97:895-900
- [6] Brummendorf TH, Rufer N, Holyoake TL et al. (2001) Telomere length dynamics in normal individuals and in patients with hematopoietic stem cell-associated disorders. *Ann N Y Acad Sci* 938:293-303
- [7] Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43:405-413
- [8] Blasco MA, Lee HW, Rizen M et al. (1997) Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found Symp* 211:160-170
- [9] Armstrong L, Saretzki G, Peters H et al. (2005) Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. *Stem Cells* 23:516-529
- [10] Haker B, Fuchs S, Dierlamm J et al. (2007) Absence of oncogenic transformation despite acquisition of cytogenetic aberrations in long-term cultured telomerase-immortalized human fetal hepatocytes. *Cancer Lett* 256:120-127
- [11] Brummendorf TH, Holyoake TL, Rufer N et al. (2000) Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 95:1883-1890
- [12] Keller G, Brassat U, Braig M et al. (2009) Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol Oncol* 27:123-129

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Tim H. Brummendorf  
Hämatologie und Onkologie  
Universitätsklinikum Aachen  
Pauwelsstraße 30  
D-52074 Aachen  
Tel.: 0241-80-89805  
Fax: 0241-80-82449  
tbruemmendorf@ukaachen.de

### AUTOREN



#### Henning Wege

Medizinstudium, Universität Witten/Herdecke. 1999-2002 Promotionsarbeit am Transplant Research Institute der University of California, Davis bei Prof. Dr. Mark Zern. 2003 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. 2009 Facharzt für Innere Medizin. 2010 Projektleiter SFB 841 (Leberentzündung: Infektion, Immunregulation und Konsequenzen).



#### Tim H. Brummendorf

1988-1995 Medizinstudium, Universitäten Heidelberg und Hamburg. 1995-1997/1999-2004 klinische Ausbildung zum Hämatologen/Onkologen am Universitätsklinikum Tübingen. 1997-1999 Postdoctoral Fellowship am Terry Fox Laboratory in Vancouver, Canada. 2004 Habilitation zum Thema „Telomerbiologie und zelluläre Alterung hämatopoetischer Stammzellen“. 2005-2009 Oberarzt und Medizinischer Geschäftsführer des Universitären Cancer Center Hamburg (UCCH) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Seit 2009 Direktor der Klinik für Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum der RWTH Aachen.