

# Telomerase – Potential und Grenzen der klinischen Anwendbarkeit

A. Hoos und H. Nekarda

Chirurgische Klinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. J. R. Siewert), Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Krebszellen unterscheiden sich von gesunden Körperzellen besonders durch ihr hohes Teilungspotential. Die fortwährende Teilungsfähigkeit von Krebszellen ist darin begründet, daß diese die physiologische Zellalterung (replikative Seneszenz) umgehen und dadurch unsterblich werden (Immortalisierung). Ein wichtiger Steuerungsmechanismus der Zellalterung in somatischen Zellen ist die kontinuierliche Verkürzung der Chromosomenenden (Telomere). Schreitet deren Verkürzung bis zu einem kritischen Punkt fort, wird die Seneszenzphase der Zelle, verbunden mit einem Proliferationsstopp, eingeleitet.

Immortale Tumorzellen hingegen besitzen die Fähigkeit zur Regeneration der Telomere durch die Expression des Enzyms Telomerase. Dieses ist zur De-novo-Synthese der DNA-Sequenz der Telomere in der Lage und ermöglicht somit eine chromosomale Stabilisierung (**Abb. 1**). In den letzten 10 Jahren hat sich im Bereich der molekularen Krebsforschung durch die Charakterisierung der Telomerase eine rasante Weiterentwicklung ergeben. Hierbei sind neue Ansatzpunkte für die Therapie maligner Erkrankungen entstanden. Dabei wurden Mechanismen der physiologischen Zellalterung, Funktionen von Tumor-Suppressor-Genen sowie klinische Zusammenhänge zwischen Telomerase-Expression und der Entstehung von Krankheiten, insbesondere Krebserkrankungen, weiter aufgeklärt. Ziel dieser Übersicht ist es, die Funktion der Telomerase im Rahmen der Zellalterung und der Krebsentstehung darzustellen und ihre absehbare klinische Bedeutung aufzuzeigen.

## Replikative Seneszenz, Telomere und Telomerase

### Replikative Seneszenz

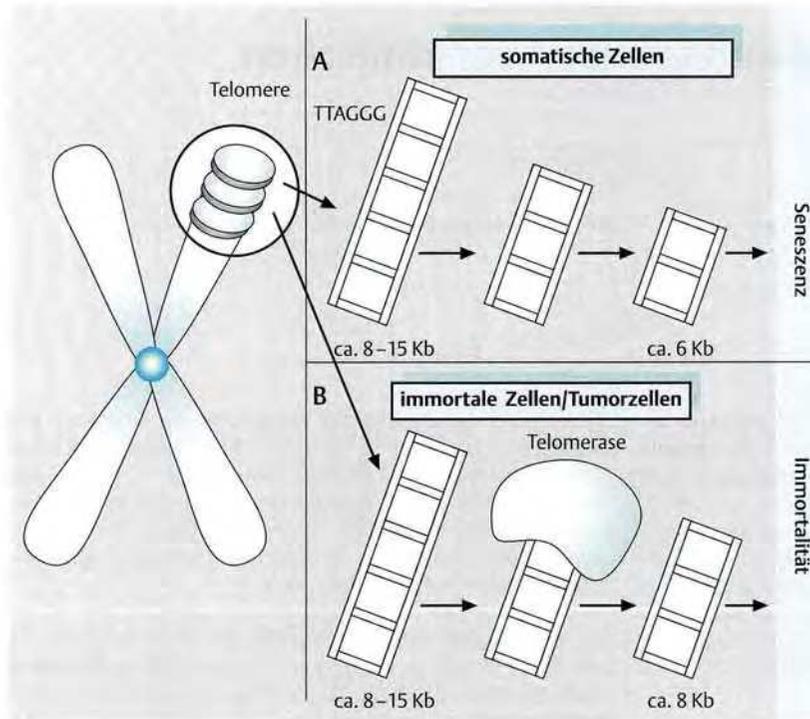
Die meisten Zellen somatischer Gewebe sind in vivo einem Alterungsmechanismus unterworfen, der das Teilungspotential der Zellen limitiert. Dieser Prozeß wird als replikative Seneszenz bezeichnet (24). Das Prinzip der replikativen Seneszenz ermöglicht es dem Organismus, die Zahl der Teilungen pro Zelle auf ein physiologisches Maß zu reduzieren. Ihm unterliegen nahezu alle somatischen Zellen mit der Ausnahme von einigen Stammzellen sowie den Zellen maligner Tumore. Wichtigste Grundvoraussetzung für die replikative Seneszenz ist die Kontrolle der Zellteilungen im Laufe der Lebensspanne einer Zelle mit Hilfe der Länge der Telomere an den Chromosomenenden. Im Zusammenhang mit der replikativen Seneszenz ergeben

sich einige charakteristische genetische und phänotypische Veränderungen der Zelle. Diese beinhalten die Repression von Transkriptionsfaktoren über die Aktivierung von Tumor-Suppressor-Genen bis hin zum spezifischen Wachstumsstopp. Dieses Prinzip erweist sich als Tumor-Suppressor-Mechanismus und als Mechanismus zur Vermeidung anderer altersgebundener pathologischer Veränderungen.

Seit der Erstbeschreibung der replikativen Seneszenz 1965 (24) wurde diese bei verschiedenen Zelltypen und Spezies genau charakterisiert. In Abhängigkeit von Spezies, Zelltyp und dessen genetischer Ausstattung kann sich die Zelle bis zum Eintritt in die Seneszenzphase bis zu 60–80mal (fetale humane Zellen) teilen (11, 59). Von besonderer Bedeutung für die Erkennung der Teilungszahl sind dabei die Telomere an den Chromosomenenden. Ihre Länge korreliert direkt mit der Anzahl bereits durchlaufener Teilungen einer Zelle (3). Durchschnittlich liegt die Telomer-Länge von Keimzellen bei 10–15 Kilobasen (Kb), jene von neonatalen somatischen Zellen bei 8–10 Kb (2, 21, 36). Für humane Fibroblasten ließ sich ermitteln, daß die durchschnittliche Verkürzung der Telomere pro Zellteilung bei 50 Basen liegt (3, 35). Unabhängig von der Ausgangslänge treten Zellen mit einer kritischen Verkürzung der Telomere auf 6 Kb in die Seneszenzphase ein (3).

### Telomere

Bei den Telomeren handelt es sich um stumpf abschließende DNA-Strukturen an den Enden der Chromosomen, welche charakteristische DNA-Wiederholungssequenzen (»terminal repeats«) enthalten. Beim Menschen ist die typische Wiederholungssequenz TTAGGG (42). Diese Sequenzen und die an sie bindenden Proteine formen zusammen eine Struktur, deren besondere Aufgabe es ist, die Chromosomenenden wie durch eine Kappe vor Degradation, Fusion mit anderen Chromosomenenden, Translokationen und Non-Disjunctions zu schützen (63). Daher erklärt sich die Bedeutung der Telomere für die Stabilität der Chromosomen und letztlich für das gesamte Genom (7). Die Besonderheit der Telomere hinsichtlich ihrer eigenen Replikation ist die Problematik der endständigen Replikation des linearen DNA-Moleküls durch die DNA-Polymerase: An den stumpfen DNA-Enden der Telomere existiert keine freie 3'-DNA mehr, an die ein entsprechender Primer binden kann (35, 66). Somit bleibt das Endstück der Telomere nach jeder Zellteilung unrepliziert. Mit jeder Teilung geht ein Abschnitt der Wiederholungssequenzen verloren und die Enden der Chromosomen verkürzen sich (21). Erreicht diese Verkürzung einen kritischen Punkt, tritt die Zelle in die Seneszenzphase ein (22). Charakteri-



**Abb. 1** Prinzip der Zellalterung (replikative Seneszenz) durch Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden mit jeder Zellteilung.

A: Replikative Seneszenz bei somatischen Zellen durch kontinuierliche Verkürzung der Telomere bis zum Erreichen der kritischen Länge von zirka 6 Kb. Danach tritt ein Wachstumsstopp ein. Die Zellen verfügen nicht über Telomerase-Aktivität.

B: In Tumorzellen verlängert das Enzym Telomerase die nach jeder Zellteilung verkürzten Telomere und sorgt für eine chromosomale Stabilisierung. Die Telomere behalten eine mittlere Länge. Dadurch erhalten diese Zellen das Potential zur kontinuierlichen Proliferation.

siert ist diese durch eine Vielzahl genetischer und phänotypischer Veränderungen.

### Charakteristika der Seneszenz durch Telomerverkürzung

Durch die Verkürzung der Telomere werden regulatorische Gene reprimiert oder vermehrt exprimiert. Dies läßt sich durch die genetische Regulation nach Passieren von speziellen Alterskontrollpunkten und durch die Verlagerung der Gene aus den oder in die transkriptionell aktiven Chromatin-Bereiche im Rahmen der Verkürzung der Chromosomen erklären (70). Für humane Fibroblasten zum Beispiel konnte belegt werden, daß das c-fos Proto-Onkogen, die Helix-Loop-Helix ID-1 und ID-2 Gene und die E2F-1 und E2F-5 Transkriptionsfaktoren im Rahmen der replikativen Seneszenz reprimiert sind. Weiterhin verbleibt bei diesen Zellen das Retinoblastoma-Tumorsuppressor-Protein (pRb) in seiner unphosphorylierten und damit wachstumshemmenden Form. Außerdem werden im Rahmen des Zell-Zyklus die beiden Inhibitoren cyclin-abhängiger Proteinkinasen p16 und p21 vermehrt exprimiert, was ebenfalls einen wachstumshemmenden Effekt unterstützt. Die Gesamtheit dieser genetischen Regulationen führt zu einem Wachstumsstopp der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, ohne daß der erneute Eintritt der Zellen in die S-Phase mit herkömmlichen physiologischen Mitogenen stimulierbar ist (11, 59). Neben dem charakteristischen Wachstumsstopp der Zellen beim Eintritt in die Seneszenzphase zeigen seneszente Zellen eine Resistenz gegenüber apoptotischen Einflüssen (37). Das heißt, seneszente Zellen lassen sich nicht mehr durch apoptotische Stimuli zum programmierten Zelltod lenken, sondern sterben nach Ablauf ihrer Lebensspanne eines »natürlichen Zelltodes«. Ebenfalls zei-

gen seneszente Zellen besondere Veränderungen in der vermehrten Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen IL-1 $\alpha$ , ICAM-1 in Fibroblasten) (38, 39) als auch von Metalloproteinasen und Zellulärmatrix-abbauenden Enzymen (40, 67).

### Telomerase

Keimzellen, Stammzellen, Basalzellen der Epidermis und andere undifferenzierte Vorläuferzellen differenzierter Zellen und Gewebe haben ein hohes Potential zur kontinuierlichen Teilung, welches sich im Wesentlichen aus der Kompensation der Telomerverkürzung begründet. Die Verlängerung der Telomere erfolgt durch eine spezialisierte RNA-abhängige DNA-Polymerase, die Telomerase, welche die nach der Zellteilung verlorenen DNA-Wiederholungssequenzen de novo synthetisiert und das Potential der Zelle zur weiteren Teilung erhält (7, 9, 19, 20) (siehe Abbildung 1). Die Telomerase setzt sich aus einer RNA-Matrize (hTR, human telomerase RNA) (17) und einer reversen Transkriptase, welche als katalytische Untereinheit des Enzyms fungiert (hTERT, »human telomerase reverse transcriptase«) zusammen (45). Neben diesen Molekülen wurde ein Telomerase-assoziiertes Protein (TP1) identifiziert (23). Die Telomerase ist anfällig für Ribonukleasen. Der Nachweis des Enzyms kann durch die Anwesenheit von Ribonuklease-enthaltenden Zellen erschwert sein. Zugabe von Ribonuklease-Inhibitoren kann zur Detektion von Telomerase-Aktivität führen (48).

Die Aktivität des Enzyms Telomerase wird durch einen noch nicht klar definierten Mechanismus reguliert. Diese Regulation drückt sich darin aus, daß initial verkürzte und durch Telomerase verlängerte Telomere auf eine für die Zelle typische mittlere Telomer-Länge regeneriert werden, nicht jedoch darüber

Zelltyp	Seneszenz*	Telomer-Länge	Telomerase-Aktivität
differenzierte somatische Zellen	+	kontinuierliche Verkürzung	–
Lymphozyten			
aktiviert	verzögert	nach 5–10 Teilungen Verkürzung	nach 5–10 Teilungen abfallende Aktivität
inaktiviert	+	Verkürzung	ca. 1% der Aktivität immortalisierter Zellen
Keimzellen, Stammzellen	verzögert	langsame Verkürzung	+
immortalisierte Zellen, Tumorzellen	–	verkürzt, aber stabil	++

\* Zellalterung

**Tab. 1** Charakteristika verschiedener Zelltypen hinsichtlich Zellalterung, Telomer-Länge und Telomerase-Aktivität

hinaus (5). Es werden zur Zeit zwei Hypothesen zur Regulation der Telomerase-Aktivität favorisiert: Nach der ersten müßte ein Telomer-bindendes Protein die bis zum gewünschten Maß verlängerten Telomere maskieren und vor einer Degradation durch Nucleasen schützen, während die über das Maß hinaus verlängerten Telomer-Anteile enzymatisch abgebaut würden. Nach der zweiten Hypothese müßte die Aktivität der Telomerase so reguliert werden, daß nur die verkürzten Telomere exakt auf das gewünschte Maß verlängert würden. Dies könnte entweder durch eine direkte genregulatorische Telomerase-Steuerung oder durch die Bindung des Telomerase-Substrates durch ein spezifisches Protein erfolgen. In beiden Fällen ist jedoch ein Mechanismus zur Messung der Telomer-Länge erforderlich, welcher noch nicht genauer definiert wurde (44).

Im Gegensatz zu den undifferenzierten Keim- und Stammzellen des Körpers mit hohem Teilungspotential und entsprechender Telomerase-Aktivität haben differenzierte somatische Zellen keine Telomerase-Aktivität und unterliegen damit dem Mechanismus der Seneszenz (57) (Tab. 1). Eine besondere Stellung kommt den Lymphozyten zu. Inaktive T- und B-Zellen im peripheren Blut exprimieren nur eine minimale Menge an Telomerase, die etwa 1% der Aktivität von immortalen Zellen entspricht. Nach Aktivierung steigt jedoch die Aktivität der Telomerase in den Lymphozyten erheblich an, um nach 5–10 Teilungszyklen auf ein niedrigeres Niveau abzufallen (10, 14, 27). Mit diesem Abfall der Aktivität ist eine zunehmende Verkürzung der Telomere verbunden (8) (siehe Tabelle 1). Aufgrund dieser Daten wird vermutet, daß die vorübergehende Aktivitätssteigerung der Telomerase nur eine kurzzeitige Erhaltung der Telomer-Länge ermöglicht, um den vermehrten Teilungsanforderungen der Lymphozyten nach Antigen-Stimulation gerecht zu werden.

Am Beispiel proliferationsaktiver Organe bei Mäusen mit defizienter Telomerase-Expression wurde kürzlich die Bedeutung des Enzyms anschaulich demonstriert. Die Mäuse zeigten eine defiziente Spermatogenese sowie eine reduzierte proliferative Aktivität in den Testes, im Knochenmark und in der Milz. Damit verbunden waren sowohl eine deutliche Telomerverkürzung, als auch Fusionen und der Verlust von Chromosomen (34). Ein Zusammenhang zwischen kurzer Telomer-Länge und reduziertem Teilungspotential konnte ebenfalls bei verfrühter Alterung des menschlichen Organismus nachgewiesen werden (3). Für hämatopoietische Stammzellen, welche im Rahmen einer Knochenmarktransplantation übertragen werden, bedeutet das Anwachsen und die Etablierung eines neuen vollwertigen Kno-

chenmarkes eine enorme proliferative Belastung, bei welcher ebenfalls eine Telomerverkürzung bei den Telomerase-exprimierenden Stammzellen beobachtet werden kann (71). Dies zeigt, daß selbst pluripotente Stammzellen der Dynamik des Alterungsprozesses unterworfen sind.

Zusätzlich zur Funktion der Telomerase bei der Verlängerung der Chromosomenenden wurde ein weiterer, noch nicht näher definierter Mechanismus beschrieben, der bei fehlender Telomerase-Aktivität die Telomere in immortalen Zellen verlängert. Dieser wurde als »alternative mechanism for lengthening of telomeres« (ALT) beschrieben (52). Interessanterweise wurden die meisten Zelllinien, welche über diesen Mechanismus verfügen, von Weichgewebssarkomen und nicht von Karzinomen abgeleitet. Dies könnte das deutlich häufigere Auftreten des ALT bei immortalisierten Zellen, welche aus Fibroblasten hervorgingen, im Vergleich zu von Epithelzellen stammenden immortalen Zellen erklären. Dies erklärt auch, warum der ALT bei malignen Tumoren des Menschen eine sehr geringe Inzidenz aufweist, da über 90% der Tumoren epithelialen Ursprungs sind (52).

In den letzten fünf Jahren wurden die meisten malignen Tumoren des Menschen auf ihre Telomerase-Aktivität hin untersucht. Dabei zeigte sich eine hohe Enzymaktivität in den Tumoren im Vergleich zu keiner nachweisbaren Aktivität in Normalgeweben (57). Analog zum malignen Phänotyp von Krebszellen exprimieren nahezu alle malignen Tumoren eine hohe Telomerase-Aktivität, was die Telomerase als Tumor-Marker charakterisiert (4, 32, 55). Als besonders wichtig erweist sich dabei die Tatsache, daß die Telomerase-Aktivität nicht allein die Proliferationsaktivität von Zellen widerspiegelt, sondern auch abhängig ist von Immortalisierung und Differenzierung der Zellen (6, 53, 72). Dies zeigt sich deutlich in dem Gegensatz, daß einerseits proliferierende Tumorzellen eine hohe Telomerase-Aktivität aufweisen und andererseits in der Ruhephase befindliche immortale Zellen die Telomerase-Aktivität herunterregulieren, während schnell proliferierende, gut-differenzierte somatische Zellen keine meßbare Telomerase-Aktivität besitzen und daher nach kritischer Verkürzung der Telomere in die Seneszenzphase eintreten (1, 12, 32). Wäre die Telomerase-Aktivität allein assoziiert mit der Proliferationsaktivität von Zellen, müßten auch differenzierte somatische Zellen mit Teilungsaktivität Telomerase exprimieren.

Zusammenfassend könnte die Bedeutung der Telomerase für die klinische Onkologie in der Verwendung als molekularer, mit

der Proliferationsaktivität assoziierter Marker maligner Erkrankungen liegen.

Im Verlauf der zunehmenden Zahl an Zellteilungen verkürzen sich die Telomere, und die betroffene Zelle altert. Ab einer kritischen Telomer-Verkürzung unterliegt die Zelle einem Wachstumsstopp. Durch Expression des Enzyms Telomerase werden die Telomere verlängert, und die Zelle behält ihr Teilungspotential. Dies kann bis zur Immortalität führen.

### Einfluß der Telomerase auf die Entstehung von Krankheiten

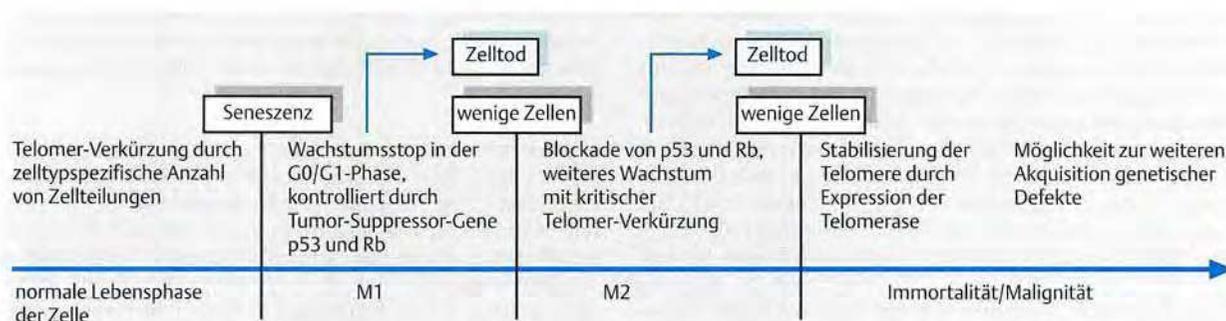
Es stehen zwei grundsätzliche Theorien hinter der Bedeutung der Telomerase für die Entstehung von Krankheiten im Allgemeinen. Dies ist zum einen das, durch die Regeneration der Chromosomen, gewonnene Potential zur weiteren Zellteilung und die Ausschaltung der replikativen Seneszenz. Bedeutend ist dabei auch die Zeitspanne, welche sich zur physiologischen Lebenszeit einer Zelle hinzuaddiert und die Möglichkeit zur Akquisition genetischer Schäden bis zum Erreichen einer phänotypisch relevanten Zahl schafft. Zum anderen führt die fälschliche Erkennung eines glatten Doppelstrangbruchs der DNA durch die Telomerase zur Entstehung eines neuen Telomers an der proximalen Bruchstelle mit der Konsequenz des kompletten Verlustes genetischer Information distal der Bruchstelle (18). Der erste Mechanismus ist von Bedeutung für jene wenigen Zellen, welchen es gelingt, die Kontrollpunkte der Zellalterung zu passieren, ohne in die Seneszenzphase einzutreten

(Abb. 2). Hierbei sind charakteristische genetische Veränderungen zu beobachten, welche eine elementare Rolle für den Beitrag der Telomerase zur Krebsentstehung spielen. Sie werden im folgenden Abschnitt besprochen.

Der zweite Mechanismus der fälschlichen Strangbruch-Erkennung ist durch die fehlende Telomerase-Aktivität in somatischen Zellen in seiner Bedeutung auf die wenigen Telomerase-aktiven Zellen, insbesondere die Keimzellen limitiert. Da einige Fälle von  $\alpha$ -Thalassämie durch terminale Chromosomen-Deletionen ausgelöst sind, könnte hier die fälschliche Erkennung der glatten Chromosomen-Bruchenden durch die Telomerase in den Keimzellen eine Regeneration der auf dem distalen Fragment gelegenen genetischen Information verhindert haben. Bindungsstudien haben die Möglichkeit der Erkennung der DNA-Enden durch Telomerase nachgewiesen und diesen Mechanismus als mögliche pathogenetische Ursache der  $\alpha$ -Thalassämie bestätigt (18, 43). Die Bedeutung dieses Mechanismus für andere Erkrankungen der Keimbahn wird derzeit evaluiert.

### Bedeutung der Telomerase für die Immortalisierung von Zellen und den Prozeß der Kanzerogenese

Die Zellalterung humaner Zellen wurde anhand charakteristischer Veränderungen der Zellen in Stadien eingeteilt (Abb. 2). Das Mortalitäts-Stadium 1 (M1) wird erreicht, nachdem eine signifikante Verkürzung der Telomere aufgetreten ist. In diesem Stadium unterliegen die Zellen einem Wachstumsstopp im G0-



**Abb. 2** Modell für den Weg der Zellalterung über die Mortalitätsstadien zu Immortalität und Malignität: Nach Ablauf einer zelltyp-spezifischen Anzahl von Teilungen haben sich die Telomere soweit verkürzt, daß die Zellen in die Seneszenzphase eintreten. Diese läßt sich unterteilen in die Mortalitätsstadien M1 und M2. M1 ist durch den Wachstumsstopp in der G0/G1-Phase des Zellzyklus gekennzeichnet. Kontrolliert wird dieser Zustand durch die Funktion von Wachstumskontrollgenen wie p53 und Rb. Die meisten Zellen sterben in der M1-Phase der Seneszenz. Durch Einflüsse wie jene viraler Onkogene (zum Beispiel HPV-16 E7, SV-40 T-Antigen) oder Mutationen können p53 und Rb blockiert werden. Die wenigen betroffenen Zellen treten in die M2-Phase ein und teilen sich weiter. Ab einer kritischen Telomer-Verkürzung sterben die meisten dieser Zellen. Einigen wenigen wiederum kann es jedoch gelingen, Telomerase zu exprimieren und ihre Telomere zu stabilisieren. Sie werden immortal und können weitere genetische Defekte akquirieren. Durch die Ausschaltung der Seneszenz kann es zur Immortalität der Zelle und zur malignen Entartung kommen.

oder G1-Stadium des Zell-Zyklus, welcher durch die Funktionen von Tumor-Suppressor-Genen und den von ihnen codierten Proteinen wie p53 und pRb kontrolliert wird. Die meisten alternen Zellen verbleiben in diesem Stadium, bis sie schließlich sterben. Durch kanzerogene Einflüsse wie zum Beispiel virale Onkoproteine (HPV-16E7, SV-40 T-Antigen) oder Mutationen können diese Tumor-Suppressor-Funktionen blockiert werden. Die betroffenen Zellen erreichen dann das Mortalitäts-Stadium 2 (M2). Dieses ist charakterisiert durch das Verbleiben einiger weniger Wiederholungssequenzen an den Chromosomenenden, repräsentativ für die kritische Verkürzung der Telomere. Wiederum nur wenigen Zellen ist es möglich, aus dem M2-Stadium auszubrechen und durch Stabilisierung der Telomere ins Stadium der Immortalität einzutreten (56, 69). Verbunden mit diesem seltenen Ereignis ist eine Expression der Telomerase, deren Aktivität sich in den immortalisierten Zellen nachweisen läßt (29). Dadurch, daß diese Zellen den Tumor-Suppressions-Mechanismus der replikativen Seneszenz umgehen und durch die Immortalisierung die Möglichkeit zur extensiven Zellteilung erhalten, können sie (weitere) genetische Veränderungen akquirieren, welche maligne Zellen auszeichnet (32). Aus diesem Zusammenhang heraus erklären sich auch die bei humanen Tumoren am häufigsten beobachteten Phänomene der Deregulation der Tumor-Suppressor-Gene p53 und Rb (28, 54), da diese als Wächter des Wachstumsstop im Rahmen der Seneszenz auf dem Weg zur Immortalisierung und Cancerogenese als Erste betroffen werden. Schließlich findet sich dabei eine Heraufregulation der Telomerase-Aktivität, ein Phänomen das sich in nahezu allen malignen Tumoren nachweisen läßt (siehe Abbildung 2). In dieses Szenario fügt sich auch die kürzlich beschriebene Entdeckung der Aktivierung der Telomerase durch das Myc-Onkogen ein (65). Dieses wird durch genetische Veränderungen überexprimiert und übt seinen proliferationssteigernden Effekt auch über die Aktivierung der Telomerase aus.

Der Prozeß der Veränderung der Telomerase-Expression im Rahmen der Krebsentstehung konnte am konkreten Beispiel der Multi-Step-Kanzerogenese im distalen Ösophagus demonstriert werden. Dabei entwickelt sich aus der Barrett-Metaplasie des Ösophagus über die Stufen der leichten und schweren Dysplasien das Adenokarzinom des distalen Ösophagus. Durch In-situ-Hybridisierungs-Experimente konnte gezeigt werden, daß die Menge der in Barrett-Metaplasien nachweisbaren Telomerase-RNA im Vergleich zu jener in leichten und schweren Dysplasien sowie in Adenokarzinomen des Ösophagus erheblich geringer ist und mit dem Grad der Dysplasie bis zur Malignität zunimmt. Daraus wurde geschlossen, daß bereits im metaplastischen Epithel des Barrett-Ösophagus immortalisierte Zellen enthalten sind, welche mit fortschreitender Kanzerogenese entarten und zunehmende Mengen an Telomerase exprimieren (41).

Die durch die Telomerase erreichte chromosomale Regeneration führt zu einer Verlängerung der Lebenszeit der Zelle. Dadurch kann die Zelle vermehrt genetische Defekte akquirieren. Auf der Basis genetischer Veränderungen und der infiniten Teilungsfähigkeit durch Immortalisierung können Zellen maligne entarten.

## Messung der Telomerase-Aktivität

Die Standard-Methode für die Messung der Telomerase-Aktivität ist das Telomerase-Repeat-Amplification-Protocol (TRAP)

(32). Dabei handelt es sich um einen PCR-basierten Assay, über den die Telomerase-Produkte aus lysierten vitalen Zellen amplifizierte werden. In einem zweiten Schritt wird die amplifizierte DNA entweder via Gelelektrophorese aufgetrennt oder alternativ mit Hilfe eines an einen PCR-Primer gebundenen Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Komplexes im ELISA vermessen. Diese indirekte Nachweismethode wurde gewählt, da pro Zelle nur etwa 200 Moleküle Telomerase vorliegen, so daß ein direkter Nachweis bisher äußerst schwierig war. Die ersten Untersuchungen zum Nachweis der Telomerase-Aktivität in malignen Tumoren wurden mit dem TRAP-Assay durchgeführt. Da der konventionelle TRAP-Assay eine Quantifizierung der Telomerase-Aktivität nicht erlaubt, wurden initial nur Ja/Nein-Aussagen oder Viel/Wenig-Aussagen gemacht. Durch die Standardisierung der im TRAP-Assay verwendeten Zellzahl oder der Bestimmung der 28s-rRNA-Mengen als Maß der Zellularität der getesteten Proben wurden erste quantifizierende Faktoren eingeführt (13, 31). Eine weitere Verbesserung erfolgte durch die Verwendung interner PCR-Standards. Seit der Identifizierung der Telomerase-RNA (hTR) und der katalytischen Untereinheit hTERT (»human telomerase reverse transcriptase«) werden vermehrt auch RT-PCR (reverse Transkriptions-PCR) Analysen dieser Telomerase-Bestandteile durchgeführt (17, 45, 64).

## Telomerase als klinischer Marker

Durch die charakteristisch hohe Telomerase-Aktivität in nahezu allen malignen Tumoren des Menschen wurden vielseitige Untersuchungen zur möglichen klinischen Relevanz angeregt. Dabei ließ sich der Wert der Telomerase als potentieller klinischer Marker in der Diagnostik und Beurteilung der Prognose von Patienten mit Krebserkrankungen belegen. Ebenfalls ist es wahrscheinlich, daß die Telomerase einen Stellenwert für das Monitoring des Therapieansprechens maligner Erkrankungen auf zytostatische Therapie haben könnte.

## Diagnostik

Aufgrund der oben geschilderten Charakteristika der Telomerase-Expression (57), insbesondere der deutlichen Aktivität in malignen Zellen im Gegensatz zu nicht malignen Zellen wurde die Telomerase mehrfach als potentieller Marker für die Diagnose von Krebs vorgeschlagen (46). Trotz der klaren Trennbarkeit zwischen malignen und benignen Gewebeproben mit Hilfe der Telomerase-Aktivitäts-Bestimmung kann dieser Test im heutigen Routine-Betrieb der histopathologischen Diagnostik jedoch nur ergänzende Funktion haben. Die besondere Bedeutung für die Diagnostik liegt in der Beurteilung der Dignität von Zellen, welche aus Blasenspülungen, Aszites-Punktionen oder Sputumproben gewonnen wurden. Ebenso ist die Diagnostik von Feinnadelpunktionen und Abstrichen verbesserbar (62). Erste klinische Erfahrungen mit Material aus Blasenspülungen versprechen eine Verbesserung der Diagnostik, des Monitorings und der Screeninguntersuchungen beim Blasenkarzinom (15). Bei zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) der Portio uteri nimmt die Häufigkeit der Expression von Telomerase-RNA bzw. die Telomerase-Aktivität mit der Progression von leichten Läsionen (CIN I) über schwere Dysplasien (CIN III) bis zum Zervixkarzinom hin zu. Hingegen gibt es derzeit noch widersprüchliche Aussagen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der Präsenz von »high-risk« Human-Papilloma-Virus-DNA und der Telomerase-Expression in diesen Zellen (58, 68).

## Prognose

Basierend auf Daten aus Studien zur klinischen Bedeutung der Telomerase für die Prognose von Krebspatienten wurde mehrfach postuliert, daß die Telomerase ein Biomarker für die klinische Prognose von Patienten mit malignen Erkrankungen sein kann (26, 46). Verschiedene Studien konnten zeigen, daß eine Korrelation zwischen der Aktivität der Telomerase und der Aggressivität des Tumorwachstums bzw. der klinischen Prognose von Tumorpatienten besteht. So war bei Patienten mit einem Neuroblastom eine schlechte Prognose mit einer hohen Telomerase-Aktivität des Tumors korreliert, während Patienten mit metastasiertem Neuroblastom ohne meßbare Telomerase-Aktivität Spontanremissionen erlebten (25). Bei Patientinnen mit Mammakarzinom konnte ebenfalls eine hochsignifikante Korrelation zwischen etablierten prognostischen Markern, dem Patienten-Überleben und der Telomerase-Aktivität festgestellt werden. Der Zusammenhang zwischen steigender Tumor-Aggressivität bei steigender Telomerase-Aktivität wurde für das Mammakarzinom in verschiedenen Untersuchungen bestätigt (13, 31, 33). Bis zur klinischen Anwendung müssen diese Ergebnisse noch in weiteren klinischen Studien mit Langzeitbeobachtungen bestätigt werden. Insgesamt erscheint die Telomerase jedoch als ein vielversprechender prognostischer Marker für Patienten mit malignen Erkrankungen.

## Therapieansprechen bei malignen Tumoren

In-vitro-Untersuchungen konnten den senkenden Einfluß einer zytostatischen Therapie auf die Telomerase-Aktivität in malignen Zellen zeigen (16, 50). Kürzlich ließ sich in einer klinischen Studie erstmals auch die Wirkung von Chemotherapeutika auf die Telomerase-Aktivität in vivo bestätigen. Dabei wurde bei Patientinnen mit Mammakarzinom in chemotherapierten Tumoren eine erheblich geringere Enzym-Aktivität gemessen als in Tumoren, welche keiner zytostatischen Therapie ausgesetzt gewesen waren (31). Daraus läßt sich schließen, daß die Telomerase, bei Bestätigung der Ergebnisse in groß angelegten Studien, auch als molekularer Marker für das Ansprechen einer (neoadjuvanten) Chemotherapie fungieren könnte.

## Telomerase als therapeutischer Angriffspunkt

Die bisherigen Überlegungen zum therapeutischen Einsatz von Telomerase-Inhibitoren zielen auf die Krebstherapie ab. Durch die Besonderheiten der Verteilung der Telomerase-Expression eignet sich diese optimal als Angriffspunkt für ein therapeutisches Vorgehen. Die fehlende Expression der Telomerase in benignen Geweben im Gegensatz zur universellen Überexpression in nahezu allen Typen maligner Tumoren sowie ihre Rolle für die Regulation der zellulären Seneszenz bieten gute Voraussetzungen für ein effizientes therapeutisches Eingreifen. Wichtig erscheint dabei auch, daß die Aktivität der Telomerase für den Metabolismus benigner Körperzellen nicht erforderlich ist und daher, ganz im Gegensatz zu anderen Chemotherapeutika, gravierende Nebenwirkungen in diesem Bereich nicht zu erwarten sind. Es wurden bereits unterschiedliche Nucleotid-Analoga beschrieben (60), die die Telomerase-Funktion inhibieren. Allerdings besteht die Gefahr, daß dadurch auch andere Polymerasen der Zelle betroffen werden und erhebliche toxische Nebenwirkungen auftreten. Daher sind andere Interventionsmechanismen in der Diskussion. Besonders vielversprechend ist die Blockade der RNA-Komponente der Telomerase

durch ein sequenzspezifisches komplementäres Molekül. Dies wurde durch Norton und Mitarbeiter 1996 mit Hilfe eines Peptid-Nucleinsäure-Komplexes erreicht. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zur Verwendung von Oligonucleotiden besteht in der geringeren benötigten Menge, der höheren Bindungseffizienz und der Resistenz der Moleküle gegenüber Nucleasen oder Proteasen (49). Andere Telomerase-inhibierende Substanzen sind Dideoxiguanin (ddG) und Azidothymidin (AZT), welche beide die Nucleotidbindungsstelle der Telomerase inhibieren (61, 73). Als neue, potente Nucleosid-Telomerase-Inhibitoren wurden erst kürzlich verschiedene Aminoanthracen-Derivate beschrieben (51).

Weitere Strategien basieren auf der Störung der Konstruktion des Ribonucleoprotein-Komplexes der Telomerase, haben aber bisher rein hypothetischen Charakter. Erste Ansätze zur gentherapeutischen Beeinflussung der Telomerase-Aktivität sind ebenfalls in der Diskussion, erscheinen aber beim derzeitigen Stand noch nicht greifbar (47). Die zu erwartenden Nebenwirkungen einer Therapie mit Telomerase-Inhibitoren betreffen hauptsächlich Keimzellen, aktivierte Lymphozyten und andere proliferierende Stammzellen sich erneuernder Gewebe. Aufgrund der jedoch nur vorübergehenden Proliferationsaktivität dieser Zellen im Vergleich zu sich schnell und dauerhaft teilenden Krebszellen könnte trotzdem ein Einsatz von Telomerase-Inhibitoren möglich sein, ohne gefährliche Folgen für die genannten Zellen zu haben, da nach Eliminierung der Krebszellen die Anti-Telomerase-Therapie beendet wird, bevor die Keimzellen irreversibel geschädigt sind. Diese können sich dann in der Folge regenerieren (30).

Alle hier genannten Telomerase-Inhibitoren wurden bisher in vitro eingesetzt, Erfahrungen zur Anwendung an Patienten liegen noch nicht vor.

Das Potential der Telomerase für die klinische Anwendung liegt in ihrer möglichen Funktion als diagnostischer und prognostischer Marker bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Therapeutisch könnte die Inhibition der Telomerase einen zytostatischen Effekt auf sich schnell und dauerhaft teilende Zellen haben und somit einen Stellenwert in der Krebstherapie bekommen.

## Fazit

Die skizzierten Befunde geben einen Einblick in die molekulare Pathogenese maligner Erkrankungen. Sie zeigen insbesondere den Zusammenhang zwischen Tumor-Suppressor-Mechanismen und der Telomerase-Expression. Innerhalb weniger Jahre hat sich durch die Charakterisierung der Telomerase das Verständnis molekularer Mechanismen der Kanzerogenese entscheidend verbessert. Auf diesen basierend wurden klinische Anwendungen herausgearbeitet.

Dabei zeigte sich besonders das Potential der Telomerase als klinisch-onkologischer Marker. Die meisten Erfahrungen hinsichtlich der klinischen Anwendbarkeit liegen bisher im Bereich der Diagnostik und Prognose maligner Erkrankungen. Mit Hilfe weiterführender Studien könnte die Telomerase-Aktivität ein wertvoller klinischer Parameter zur Beurteilung der Prognose von Krebspatienten und für die Indikationsstellung zur adjuvanten Therapie werden. Für die Diagnostik maligner Tumoren erscheint ein Einsatz bei der Dignitäts-Beurteilung in der

Zytologie möglich. Hinsichtlich der therapeutischen Intervention mit Telomerase-Inhibitoren eröffnen sich neue Perspektiven einer möglichen spezifischen Tumorthherapie ohne die allgemeinen Nebenwirkungen bisheriger zytostatischer Therapien. Bis zur Anwendung am Patienten ist jedoch noch eine Vielzahl an Voruntersuchungen zu leisten.

## Literatur

- 1 Albanell, J., W. Han, B. Mellado, R. Gunawardane, H. I. Scher, E. Dmitrovsky, M. A. Moore: Telomerase activity is repressed during differentiation of maturation-sensitive but not resistant human tumor cell lines. *Cancer Res.* 56(7) (1996), 1503–1508.
- 2 Allshire, R. C., M. Dempster, N. D. Hastie: Human telomeres contain at least three types of G-rich repeats distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 17 (1989), 4611–4627.
- 3 Allsopp, R. C., H. Vaziri, C. Patterson, S. Goldstein, E. V. Younglai, A. B. Futcher, C. W. Greider, C. B. Harley: Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1992), 10 114–10 118.
- 4 Bacchetti, S., C. M. Counter: Telomeres and telomerase in human cancer. *Int. J. Oncol.* 7 (1995), 423–432.
- 5 Barnett, M. A., V. J. Buckle, E. P. Evans: Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes. *Nucleic Acids Res.* 21 (1993), 27–36.
- 6 Bestilny, L. J., C. B. Brown, Y. Miura, L. D. Robertson, K. T. Riabowol: Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res.* 56(1996), 3796–3802.
- 7 Blackburn, E. H.: Structure and function of telomeres. *Nature* 350 (1991), 569–573.
- 8 Bodnar, A. G., N. W. Kim, R. B. Effros, C. P. Chiu: Mechanism of telomerase induction during T-cell activation. *Exp. Cell Res.* 228 (1997), 58–64.
- 9 Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C.-P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, W. E. Wright: Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279 (1998), 349–352.
- 10 Broccoli, D., J. W. Young, T. De Lange: Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995), 9082–9086.
- 11 Campisi, J., G. P. Dimri, E. Hara: Control of replicative senescence. In Schneider, E., J. Rowe (Ed.): *Handbook of the biology of ageing*. (New York, Academic Press, 1996) 121–149.
- 12 Chiu, C. P., W. Dragowska, N. W. Kim: Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. *Stem Cells* 4 (1996), 239–248.
- 13 Clark, G. M., C. K. Osborne, D. Levitt, F. Wu, N. W. Kim: Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J. natl. Cancer Inst.* 89(24) (1997), 1874–1881.
- 14 Counter, C. M., J. Gupta, C. B. Harley, B. Leber, S. Bacchetti: Telomerase activity in normal leucocytes and in hematological malignancies. *Blood* 85(1995), 2315–2320.
- 15 Dalbagni, G., W. Han, Z. F. Zhang, C. Cordon-Cardo, P. Saigo, W. R. Fair, H. Herr, N. W. Kim, M. A. S. Moore: Evaluation of the telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 3 (1997), 1593–1598.
- 16 Faraoni, I., M. Turriziani, G. Masci, L. DeVeccis, J. W. Shay, E. Bonmassar, G. Graziani: Decline in telomerase activity as a measure of tumor cell killing by antineoplastic agents in vitro. *Clin. Cancer Res.* 3 (1997), 579–585.
- 17 Feng, J., W. D. Funk, S. S. Wang, S. L. Weinrich, A. A. Avilion, C. P. Chiu, R. R. Adams, E. Chang, R. C. Allsopp, J. Yu: The RNA component of human telomerase. *Science* 269 (1995), 1236–1241.
- 18 Flint, J., C. F. Craddock, A. Villegas: Healing of broken human chromosomes by the addition of telomeric repeats. *Am. J. Hum. Genetics* 55 (1994), 505–512.
- 19 Greider, C. W., E. H. Blackburn: A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337 (1989), 331–337.
- 20 Harle-Bachor, C., P. Boukamp: Telomerase activity in the regenerative basal cell layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93(13) (1996), 6476–6481.
- 21 Harley, C. B., A. B. Futcher, C. W. Greider: Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 345 (1990), 458–460.
- 22 Harley, C. B.: Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation Res.* 256 (1991), 271–282.
- 23 Harrington, L., T. McPhail, V. Mar, W. Zhou, R. Oulton, M. B. Bass, I. Arruda, M. O. Robinson: A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275 (1997), 973–977.
- 24 Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37 (1965), 614–634.
- 25 Hiyama, E., K. Hiyama, T. Yokoyama, Y. Matsuura, M. A. Piatyszek, J. W. Shay: Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Med.* 1(3) (1995), 249–255.
- 26 Hiyama, E., L. Gollahon, T. Kataoka, K. Kuroi, T. Yokoyama, A. F. Gazdar, K. Hiyama, M. A. Piatyszek, J. W. Shay: Telomerase activity in human breast tumors. *J. natl. Cancer Inst.* 88 (2) (1996), 116–122.
- 27 Hiyama, K., Y. Hirai, S. Kyoizumi: Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J. Immunol.* 155 (1995), 3711–3715.
- 28 Hiyama, K., S. Ishioka, Y. Shirotani, K. Inai, E. Hiyama, I. Murakami: Alterations in telomeric repeat length in lung cancer are associated with loss of heterozygosity in p53 and Rb. *Oncogene* 10 (1995), 937–944.
- 29 Holt, S. E., W. E. Wright, J. W. Shay: Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Molec. cell Biol.* 16 (1996), 2932–2939.
- 30 Holt, S. E., J. W. Shay, W. E. Wright: Refining the telomere-telomerase hypothesis of ageing and cancer. *Nature Biotech.* 14 (1996), 834–837.
- 31 Hoos, A., H. H. Hepp, S. Kaul, T. Ahlert, G. Bastert, D. Wallwiener: Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 79 (1998), 8–12.
- 32 Kim, N. W., M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266 (1994), 2011–2015.
- 33 Kim, N. W., D. Levitt, G. Huang, F. Wu, K. Osborne, G. Clark: Correlation of telomerase with prognostic indicators of breast cancer. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 37 (1996), 562.
- 34 Lee, H. W., M. A. Blasco, G. J. Gottlieb, J. W. Horner, C. W. Greider, R. A. DePinho: Essential role of telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392 (1998), 569–574.
- 35 Levy, M. Z., R. C. Allsopp, A. B. Futcher, C. W. Greider, C. B. Harley: Telomere end replication problem and cell aging. *J. molec. Biol.* 215 (1992), 951–960.
- 36 Lindsay, J., N. Y. McGill, L. A. Lindsay, D. K. Green, H. J. Cooke: In vitro loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutation Res.* 256 (1991), 45–48.
- 37 Linskens, M., C. B. Harley, M. D. West, J. Campisi, L. Hayflick: Replicative senescence and cell death. *Science* 267 (1995), 17.
- 38 Maier, J. A. M., P. Voulalas, D. Roeder, T. Maciag: Extension of the life-span of human endothelial cells by an interleukin-1 $\alpha$  antisense oligomer. *Science* 249 (1990), 1570–1574.
- 39 Maier, J. A. M., M. Statuto, G. Ragnotti: Senescence stimulates U037-endothelial cell interactions. *Exp. Cell Res.* 208 (1993), 270–274.
- 40 Millis, A. J., M. Hoyle, H. M. McCue, H. Manini: Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 201 (1992), 373–379.
- 41 Morales, C. P., E. L. Lee, J. W. Shay: In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 83 (1998), 652659.
- 42 Morin, G. B.: The human telomere terminal transferase enzyme is a

- ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59 (1989), 521–529.
- 43 Morin, G. B.: Recognition of a chromosome truncation site associated with alpha-thalassaemia by human telomerase. *Nature* 353 (1991), 454–456.
- 44 Morin, G. B.: The implications of telomerase biochemistry for human disease. *Europ. J. Cancer* 33 (5) (1997), 750–760.
- 45 Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley, T. R. Cech: Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277 (1997), 955–959.
- 46 Nelson, N. J.: Researchers debate clinical role of telomerase. *J. natl. Cancer Inst.* 88(15) (1996), 1021–1023.
- 47 Nielsen, P. E.: A new target for gene therapeutics: telomerase. *Nat. Biotechnol.* 14(5) (1996), 580.
- 48 Norrback, K. F., G. Enblad, M. Erlanson, C. Sundstrom, G. Roos: Telomerase activity in hodgkin's disease. *Blood* 92 (1998), 567–573.
- 49 Norton, J. C., M. A. Piaryszek, W. E. Wright, J. W. Shay, D. R. Corey: Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nature Biotech.* 14 (1996), 615–619.
- 50 Park, K. H., S. Y. Rha, C. H. Kim, T. S. Kim, N. C. Yoo, J. H. Kim, J. K. Rho, S. H. Noh, J. S. Min, K. S. Lee, B. S. Kim, H. C. Chung: Telomerase activity and telomere lengths in various cell lines: changes of telomerase activity can be another method for chemosensitivity evaluation. *Int. J. Oncol.* 13 (1998), 489–495.
- 51 Perry, P. J., S. M. Gowan, A. P. Reszka, P. Polucci, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, S. Neidle: 1,4- and 2,4-disubstituted amidoanthracene-9,10-dione derivatives as inhibitors of human telomerase. *J. med. Chem.* 41 (1998), 3253–3260.
- 52 Reddel, R. R., T. M. Bryan, J. P. Murnane: Immortalized cells with no detectable telomerase activity. *Biochemistry* 62 (1997), 1254–1262.
- 53 Savorsky, E., K. Yoshida, T. Ohtomo, Y. Yamaguchi, K. Akamatsu, T. Yamatzaki, S. Yoshida, M. Tsuchiya: Down-regulation of telomerase activity is an early event in the differentiation of HL60 cells. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 226(2) (1996), 329–334.
- 54 Shay, J. W., O. M. Pereira-Smith, W. E. Wright: A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 196 (1991), 33–39.
- 55 Shay, J. W., W. E. Wright: Telomerase activity in human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 8 (1996), 66–71.
- 56 Shay, J. W., W. E. Wright: Mechanisms of escaping human cellular senescence. *Radiat. Oncol. Invest.* 3 (1996), 284–289.
- 57 Shay, J. W., S. Bacchetti: A survey of telomerase activity in human cancer. *Europ. J. Cancer* 33 (1997), 787–791.
- 58 Snijders, P. J., M. van Duin, J. M. Walboomers, R. D. Steenbergen, E. K. Risse, T. J. Helmerhorst, R. H. Verheijen, C. J. Meijer: Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res.* 58 (1998), 3812–3818.
- 59 Stanulis-Praeger, B.: Cellular senescence revisited: a review. *Mech. Ageing Develop.* 38 (1987), 1–48.
- 60 Strahl, C., E. H. Blackburn: The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in Tetrahymena. *Nucleic Acids Res.* 22 (1994), 893–900.
- 61 Strahl, C., E. H. Blackburn: Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cancer cell lines. *Molec. cell. Biol.* 16 (1996), 3437–3445.
- 62 Sugino, T., K. Yoshida, H. Tahara, I. Buley, S. Manek, C. Wells, S. Goodison, T. Ide, T. Suzuki, E. Tahara, D. Tarin: Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int. J. Cancer* 69 (1996), 301–306.
- 63 Tommerup, H., A. Dousmanis, T. De Lange: Unusual chromatin in human telomeres. *Molec. cell. Biol.* 14 (1994), 5777–5785.
- 64 Ulaner, G. A., J.-F. Hu, T. H. Vu, L. C. Giudice, A. R. Hoffmann: Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternative splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res.* 58 (1998), 4168–4172.
- 65 Wang, J., L. Y. Xie, S. Allan, D. Beach, G. J. Hannon: Myc activates telomerase. *Genes and Develop.* 12 (12) (1998) 1769–1774.
- 66 Watson, J. D.: Origin of concatameric T4 DNA. *Nature New Biol.* 239 (1972), 197–201.
- 67 Wick, M., C. Burger, S. Brusselbach, F. C. Lucibello, R. A. Muller: A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation and senescence. *J. biol. Chem.* 269 (1994), 18 953–18 960.
- 68 Wisman, G. B., H. Hollema, S. de Jong, J. ter Schegget, S. P. Tjong-A-Hung, M. H. Ruiters, M. Krans, E. G. de Vries, A. G. van der Zee: Telomerase activity as a biomarker for (pre)neoplastic cervical disease in scrapings and frozen sections from patients with abnormal cervical smear. *J. Clin. Oncol.* 16 (1998), 2238–2245.
- 69 Wright, W. E., O. M. Pereira-Smith, J. W. Shay: Reversible cellular senescence: implications for a two-stage model for the immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molec. cell. Biol.* 9 (1989), 3088–3092.
- 70 Wright, W. E., J. W. Shay: Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet.* 8 (1992), 193–197.
- 71 Wynn, R. F., M. A. Cross, C. Hatton, A. M. Will, L. S. Lashford, T. M. Dexter, N. G. Testa: Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet* 351 (998), 178–181.
- 72 Xu, D., A. Gruber, C. Peterson, P. Pisa: Suppression of telomerase activity in HL60 cells after treatment with differentiating agents. *Leukemia* 10(8) (1996), 1354–1357.
- 73 Yegorov, Y. E., D. N. Chernov, S. S. Akimov, A. K. Akhmalisheva, Y. B. Smirnova, D. B. Shinkarev, I. V. Semenova, I. N. Yegorova, A. V. Zeleinin: Blockade of telomerase function by nucleoside analogs. *Biochemistry* 62(11) (1997), 1296–1305.

Dr. Axel Hoos, Dr. Hjalmar Nekarda  
Chirurgische Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität  
Ismaninger Straße 22  
81675 München

Tel.: 089/41 40-4086  
Fax: 089/41 40-4092