

1.3 Molekulare Grundlagen des Alterns – eine Einführung

CHRISTIAN BEHL

Inhaltsverzeichnis			
1.3.1	Altern – Phänomen und Theorien	67	
1.3.2	Replikative Seneszenz als zelluläres Altersmodell	68	
1.3.2.1	Das Hayflick-Limit	68	
1.3.2.2	Gene der replikativen Seneszenz	69	
1.3.2.3	Replikative Seneszenz in vivo	70	
1.3.3	Die Freie-Radikale-Theorie	70	
1.3.3.1	Quellen der Sauerstoffradikale	71	
1.3.3.2	Apoptose und Nekrose: Die beiden grundlegenden Mechanismen des Zelltods	74	
1.3.3.3	Schutz durch Antioxidanzien	75	
1.3.3.4	Verlängerung der Lebensspanne durch Antioxidanzien	76	
1.3.4	Die Telomertheorie	76	
1.3.4.1	Biologische Funktion der Telomere	78	
1.3.4.2	Telomerbiologie in vivo	78	
1.3.4.3	Das Enzym Telomerase	78	
1.3.4.3.1	Struktur und Funktion	78	
1.3.4.3.2	Regulation der Telomeraseaktivität	80	
1.3.4.4	Telomere in der Pathophysiologie	80	
1.3.4.4.1	Telomere bei Altersphänomenen und bei Syndromen mit beschleunigtem Altern	80	
1.3.4.4.2	Telomerase – Zielstruktur zukünftiger Krebs- und Anti-Aging-Therapien?	81	
1.3.5	Klotho – ein Anti-Aging-Hormon?	82	
1.3.6	Expressionsprofile in der molekularen Alternsforschung – ein Ausblick	82	
1.3.7	Ausblick	83	
1.3.8	Literatur	83	

1.3.1 Altern – Phänomen und Theorien

Jeanne L. Calment, geboren am 21. Februar 1875, gestorben am 4. August 1997 im Alter von 122 Jahren in einem Alterspflegeheim in Arles, Frankreich, war der bisher älteste Mensch, dessen Lebensalter bestätigt ist. In den westlichen Industriestaaten steigt der Anteil der älteren Bevölkerung stetig an. Dies wird dazu führen, dass bis zum Jahr 2050 etwa ein Viertel der Bevölkerung über 65 Jahre alt sein wird. Noch zu Beginn des letzten Jahrhunderts lag die durchschnittliche Lebenserwartung des Menschen in den entwickelten Ländern bei etwa 37 Jahren. Heute beträgt diese etwa 73 Jahre, Tendenz steigend. Den steilsten Anstieg in der Lebenserwartung erlebt seit 1950 Japan, wo das durchschnittliche Lebensalter sogar 87 Jahre bei Frauen und 78 Jahre bei Männern beträgt (Wemmer 1993). Die Gründe für diese immense Verlängerung der Lebenserwartung seit dem letzten Jahrhundert sind vielfältig und werden unter anderem in der verbesserten Hygiene, der veränderten Ernährung und nicht zuletzt in den wesent-

lich weiterentwickelten Behandlungsmethoden der Medizin gesehen.

Auch wenn die Diskussion, ob „unendliches Leben“ wirklich erstrebenswert ist oder nicht, eine eher philosophische ist, hat die Frage nach dem Wann, Warum und Wie wir altern und sterben erhebliche, vor allem auch medizinische Bedeutung. Hohes Alter hat oftmals einen hohen persönlichen Preis, der in einer ganzen Reihe von altersassoziierten Erkrankungen sichtbar wird. Beispiele sind Arteriosklerose, Katarakte, Osteoporose und vor allem auch neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Krankheit. Der amerikanische Alzheimer-Forscher Dennis Selkoe antwortete in einem Vortrag auf die Frage nach Möglichkeiten, der altersbedingten Alzheimer-Demenz vorzubeugen: „Choose your parents properly and die young.“ Hiermit hat er die wesentlichen Komponenten dieses Krankheitsprozesses sowie generell aller altersassoziierten Erkrankungen in einfacher Weise zusammengefasst. Entscheidend sind der genetische Hintergrund, die genetische Prädisposition und das Alter. Aber welche molekularen Mechanismen induzieren den Altersprozess und treiben diesen

voran? Welche genetischen Programme sind beteiligt und wie kann man den Altersprozess möglicherweise modifizieren?

„Aging is the accumulation of diverse adverse changes that increase the risk of death“, sagt Denham Harman. Er erklärt das Altern mit der verstärkten Belastung des Organismus durch Sauerstoffradikale und definiert es als die Akkumulation verschiedener negativer Veränderungen, die das Todesrisiko erhöhen. Der Alterungsprozess ist begleitet von Veränderungen, deren Entstehungsrate sich mit steigendem Alter unaufhaltsam und exponentiell erhöht. Dies führt dazu, dass nach dieser Meinung nur wenige Menschen das 100. Lebensjahr erreichen (Harman 1998 a). Auf zellulärer Ebene bedeutet Seneszenz das Ende der DNA-Replikation und somit das Ende eines wesentlichen Merkmals des Lebens, der Zellteilung. Die Zelle ist der Ausgangspunkt altersassoziierter Veränderungen. Die Frage, ob sich der zelluläre Alterungsprozess kultivierter Zellen (in vitro) auf das physiologische Altern des gesamten Organismus (in vivo) einfach linear übertragen lässt, soll hier nicht detailliert besprochen werden. Aber ohne klares Verständnis der molekularen und biochemischen Veränderungen auf zellulärer Ebene wird ein Verstehen des gesamten Alterungsprozesses nicht möglich. In der Alternsforschung werden unterschiedliche Modellsysteme eingesetzt, beginnend bei kultivierten Fibroblasten über Kulturen intakter Gewebe bis hin zu Modellorganismen, wie etwa dem Fadenwurm *Caenorabditis elegans* (*C. elegans*), der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) und dem Säugetier Maus (*Mus musculus*), welche sich vor allem auch für genetische Manipulationen eignen.

Verschiedene molekulare Theorien versuchen, das Altern zu erklären (zur Übersicht: Kirkwood u. Austad 2000). Mittelpunkt aller dieser Theorien sind jeweils spezifische zelluläre und molekulare Prozesse. Folgende Theorien, die sich in bestimmten Aspekten überschneiden, lassen sich u. a. unterscheiden (zur Übersicht: Harman 1998 b):

- Die *Kreuzvernetzungstheorie*, welche die gegenseitige chemische Vernetzung von Proteinen als wesentlichen Alterungsprozess auf molekularer Ebene beschreibt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass aus jungen humanen Gehirnen isolierte Proteine durch die Behandlung mit Kreuzvernetzungsagenzien (z.B. Glutaraldehyd) chemisch so verbunden werden können, dass sie den Proteinen aus alten humanen Gehirnen gleichen (Bjorksten u. Tenhu 1990).
- Die *Immuntheorie*, die eine Dysfunktion des Immunsystems und die sich daraus ergebenden entzündlichen Prozesse sowie die zerstörerischen Aktivitäten von Immunmediatoren (z.B. Zytokine) für das Altern verantwortlich macht (Cheney u. Walford 1974).
- Die *Seneszenzgentheorie*, welche die Aktivität definierter Genprodukte als Ursache für die Einleitung und das Fortschreiten des Alterungsprozesses beschreibt (Hayflick 1987).
- Die *Freie-Radikale-Theorie*.
- Die *Telomertheorie*.

Die Telomertheorie ist die jüngste dieser Sichtweisen und wird momentan auf molekularer Ebene, unterstützt durch die Technologien der modernen Molekular- und Zellbiologie, intensiv untersucht. Auch wenn die molekularen Belege die Telomertheorie entscheidend stützen, sind die alternativen Sichtweisen nicht völlig verdrängt. Vielmehr gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen der Telomertheorie und der Freie-Radikale-Theorie aufzeigen. Diese beiden biochemischen und molekularen Erklärungsmodelle des zellulären Alterungsprozesses sollen hier besonders diskutiert werden.

1.3.2 Replikative Seneszenz als zelluläres Altersmodell

1.3.2.1 Das Hayflick-Limit

Viele unterschiedliche molekulare Mechanismen sind am Alterungsprozess beteiligt. Erstmals beschrieben wurde der Verlauf der replikativen oder zellulären Seneszenz von Hayflick (Hayflick 1965). Die replikative Seneszenz beginnt nach Erreichen des *Hayflick-Limits*, das als *die begrenzte Zahl von Teilungen, die primäre humane Zellen in der Kulturschale durchführen können*, definiert wird. In der Kultur geht die Teilungsfähigkeit verloren. Dieser Verlust ist irreversibel und mit charakteristischen morphologischen, zellphysiologischen, molekularen und biochemischen Veränderungen verbunden (zur Übersicht: Kanungo 1994). Die Versuchung ist sehr groß, dieses Modell der begrenzten Zellteilung in vitro (replikative Seneszenz) in die In-vivo-Situation zu übertragen, was vom heutigen Wissensstand aus gesehen nur mit großen Einschränkungen möglich ist. In der Tat wurde zunächst gefunden, dass die Anzahl der in der Kul-

tur noch möglichen Zellteilungen von Ex-vivo-Zellen direkt vom Lebensalter des Spenderorganismus und der maximalen Lebensdauer der Spenderspezies abhängt (Hayflick 1965; Rohme 1981). Inzwischen wurden aber auch andere Befunde vorgelegt, die diese inverse Beziehung zumindest bezweifeln (Cristofalo et al. 1998). Dennoch, die replikative Seneszenz bietet als Altersmodell die Grundlage einer Reihe von molekularen Mechanismen, die am Altersprozess beteiligt zu sein scheinen. Welche Gene sind an den Vorgängen der replikativen Seneszenz beteiligt?

1.3.2.2 Gene der replikativen Seneszenz

Bei der Untersuchung des Verlustes der Zellteilungsfähigkeit stehen zunächst der Mechanismus der Zellteilung, der Zellzyklus sowie die zellzyklus-assoziierten Gene im Mittelpunkt. Eine Zelle muss in jedem einzelnen Zellteilungszyklus ihre DNA replizieren. In den meisten Fällen ist hiermit gleichzeitig ein Zellwachstum und damit eine Verdopplung der Zellinhaltsstoffe verbunden. Der Zellzyklus lässt sich in verschiedene Phasen einteilen (Abb. 1.3.1). In der mitotischen oder M-Phase werden die replizierten Chromosomen in getrennte Zellkerne aufgeteilt. Damit teilt sich die Mutterzelle in zwei Tochterzellen. Der Zeitabschnitt zwischen zwei Zellteilungen wird als Interphase bezeichnet, welche sich wiederum in einzelne Phasen einteilen lässt. In der Synthese- oder S-Phase läuft die DNA-Replikation ab. Die Zeitspanne zwischen der S- und der M-Phase wird in die G_1 - und die G_2 -Phase unterteilt. Die Abfolge der Zellzyklusphasen lautet somit: M-, G_1 -, S-, G_2 -, M-Phase. Die G_0 -Phase wird als Zustand der Ruhe im Eukaryonten-Zellteilungszyklus definiert. Differenzierte Zellen befinden sich in der G_0 -Phase des Zellzyklus.

Die Reihenfolge der Prozesse während des Zellzyklus sowie die in den einzelnen Phasen ablaufenden Vorgänge werden durch Kontrollsysteme reguliert, welche die DNA-Replikation und die Chromosomentrennung periodisch auslösen. Diese Kontrollsysteme werden durch Proteinkinasen kontrolliert. Die Proteinkinasen bestehen aus der Familie der cyclinabhängigen Proteinkinasen (CDK), welche die nachfolgenden Prozesse durch die Phosphorylierung bestimmter Proteine an Serin- und Threoninresten auslösen. Die aktivierenden Proteine sind die Cycline, die an CDK-Proteine binden können und diese somit in ihrer Phosphorylierungsaktivität regulieren. Die periodische Bildung von solchen Cyclin-CDK-Komplexen ist die

treibende Kraft des Zellzyklus (Abb. 1.3.2) (zur Übersicht: Zhu u. Skoultchi 2001).

Mehrere Gene spielen für die Einleitung und das Fortschreiten der replikativen Seneszenz eine zentrale Rolle. Tumorsuppressorproteine, wie p53, die Transkriptionsfaktoren darstellen, zeigen in alternden Zellen eine veränderte DNA-Bindungs-

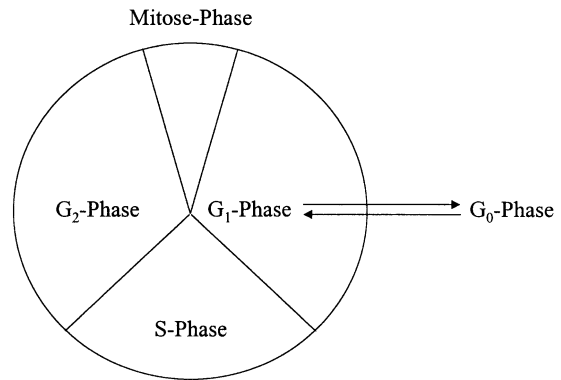


Abb. 1.3.1. Zellzyklusphasen: Mitose-Phase, Synthese-Phase (S-Phase), verschiedene G-Phasen (G = „gap“, Lücke). Aufgrund fehlender Wachstumssignale (z. B. Wachstumsfaktoren) oder in pathologischen Situationen können Zellen von der G_1 -Phase in die G_0 -Phase eintreten und in dieser Phase sehr lange Zeit (bis zu lebenslang) verharren. (Modifiziert nach Löffler u. Petrides 1998)

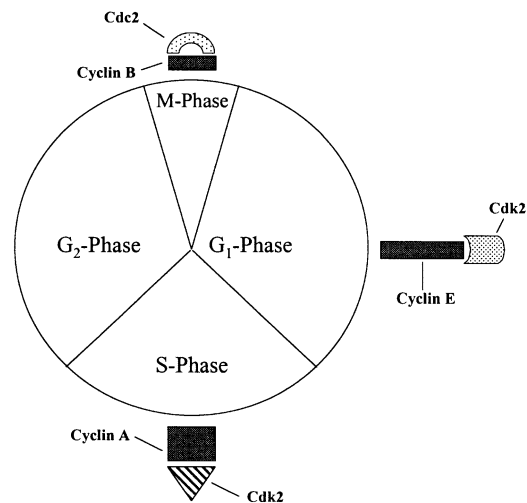


Abb. 1.3.2. Der Zellzyklus wird durch Kontrollsysteme reguliert, welche wiederum durch Proteinkinasen kontrolliert werden. Die Aktivität zellzyklusspezifischer Proteinkinasen hängt von der Ausbildung eines heterodimeren Proteinkomplexes mit einem sog. Cyclinprotein ab. Cyclinproteine sind für die jeweilige Zellzyklusphase spezifisch. Die Proteinkinasen werden auch als cyclinabhängige Kinasen (Cdk) bezeichnet. Während in Hefezellen nur eine Cdk vorkommt, die als Cdc2 bezeichnet wird, findet sich bei Säugerzellen eine größere Familie. (Modifiziert nach Löffler u. Petrides 1998)

kapazität. Ebenso ist die Aktivität der p53-induzierten Transkriptionsaktivierung modifiziert (Bond et al. 1996). Der Transkriptionsfaktor p53 ist somit in seiner wesentlichen Funktion, der Induktion der Gentranskription, altersabhängig verändert. p53 induziert das Protein p21, dessen Expression in seneszenten Zellen hoch reguliert ist. p21 wiederum inhibiert verschiedene cyclinabhängige Kinasen im Zellzyklus und wirkt somit direkt auf den Verlauf des Zellzyklus ein (Noda et al. 1994). Dadurch wird die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (RB) verhindert, was zu einer Blockade des Zellzyklus führt (Harper et al. 1993).

Das RB ist ebenfalls das Produkt eines Tumorsuppressorgens und bindet an verschiedene genregulatorische Proteine im Zellkern, die Transkriptionsfaktoren. Dabei hängt seine Bindungsaffinität vom Phosphorylierungsgrad ab. In unphosphorylierter Form bindet das RB an regulatorische Proteine, die für die Zellproliferation verantwortlich sind und inaktiviert sie. Diese Regulatorproteine werden erst freigesetzt, wenn das RB phosphoryliert ist. In seneszenten Zellen ist das RB wenig oder nicht phosphoryliert und kann somit den Verlauf des Zellzyklus nicht mehr induzieren. Neben dem p21 wird die Aktivität des RB auch durch den Zellzyklusinhibitor p16 reguliert, der in seneszenten Zellen stark hochreguliert ist. In diesem Modell der replikativen Seneszenz sind die Prozesse der Alterung, das Einstellen der Replikation und somit der Zellteilung alleine durch die Wechselwirkung von Tumorsuppressorproteinen (z. B. p53, RB) und Zellzyklusmodulatoren (z. B. p16, p21) erklärbar (Abb. 1.3.3).

1.3.2.3 Replikative Seneszenz in vivo

Wie bereits erwähnt, ist die Rolle der replikativen Seneszenz für das Altern humaner Zellen und Gewebe in vivo noch unklar. In der Tat ist die Anzahl postmitotischer Fibroblasten in humanen Epithelien im Alter erhöht. Auch ist die Bedeutung des veränderten Expressionsprofils in alternden Zellen noch unklar. Die Frage, ob eine veränderte Genexpression für den Seneszenzprozess kausal oder nur ein Sekundärphänomen ist, ist noch offen. Der direkte Einfluss verschiedener in alternden Zellen verändert regulierter Proteine, z. B. die Produkte der Tumorsuppressorgene, auf die Initiation und das Fortschreiten des Zellzyklus deuten eher auf eine kausale Rolle hin. Für Gewebe mit hoher Regenerationsrate, wie Epidermis, Mukosa oder Immunsystem, könnten die Prozesse der replikativen Seneszenz eine besondere Bedeutung haben. An solchen Geweben lassen sich die molekularen Grundlagen der replikativen Seneszenz besonders gut untersuchen.

1.3.3 Die Freie-Radikale-Theorie

Die Freie-Radikale-Theorie des Alterns macht die zerstörerische Wirkung sog. freier Sauerstoffradikale für die altersassoziierten Störungen in Zellen und Geweben verantwortlich (Harman 1956). Diese Theorie wurde in überarbeiteter Form verschied-

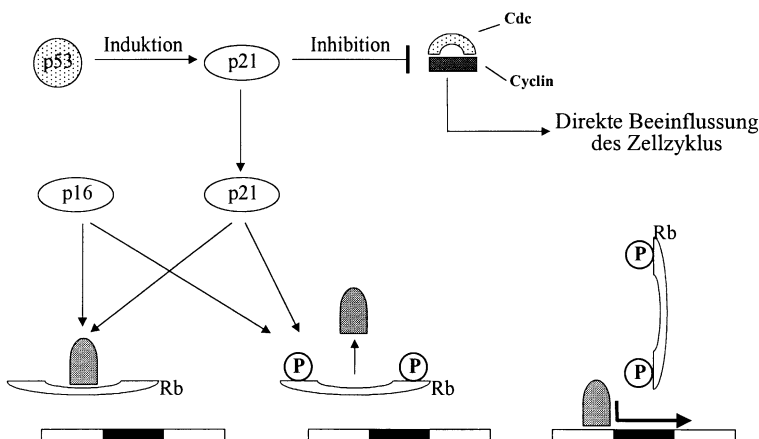


Abb. 1.3.3. Einfluss von Tumorsuppressorgenen auf den Zellzyklus. p53, Tumorsuppressorprotein und Transkriptionsfaktor, induziert das Protein p21, welches verschiedene cyclinabhängige Kinasen inhibiert. Damit wirkt p53 direkt auf den Zellzyklusverlauf ein. Das Tumorsuppressorprotein Rb bindet in unphosphorylierter Form an genregulatorische

Proteine (P), die für die Zellproliferation verantwortlich sind. Durch die Anbindung von Rb ist deren transkriptionelle Aktivität inhibiert. Die Phosphorylierung von Rb setzt diese regulatorischen Faktoren frei, was transkriptionelle Aktivität ermöglicht. Die Proteine p21 und p16 regulieren u. a. die Aktivität des Rb

dentlich neu aufgelegt, was deren Aktualität unterstreicht (zur Übersicht: Beckman u. Ames 1998; Finkel u. Holbrook 2000). Unser Leben steht unter dem ständigen Einfluss von molekularem Sauerstoff (O_2), wodurch sich schützende enzymatische und nichtenzymatische Systeme entwickelt haben. Entstehende Sauerstoffradikale werden durch diese Schutzsysteme (z.B. Antioxidanzien) entgiftet, was zur Einstellung eines oxidativen Gleichgewichts in den Zellen führt. Eine Störung dieses ausgewogenen Gleichgewichts zwischen prooxidativen Signalen (z.B. Sauerstoffradikale) und Antioxidanzien (z.B. Vitamine C, E) ist definiert als *oxidativer Stress*, ein Begriff, der durch Helmut Sies eingeführt wurde (Sies 1986). Heute ist die Freie-Radikale-Theorie nicht nur für das Altern von besonderer Bedeutung, sondern bildet auch die Grundlage der Prävention und Therapie einer Vielzahl von altersassoziierten neurodegenerativen Erkrankungen, z.B. des Morbus Parkinson oder des Morbus Alzheimer (Beal 1995; Behl 1999). Wo und wie entstehen freie Sauerstoffradikale?

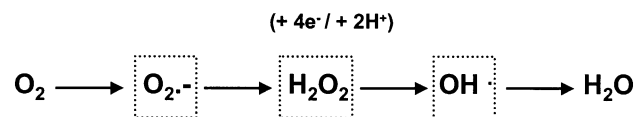
1.3.3.1 Quellen der Sauerstoffradikale

Die verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxidradikal, $O_2^{\bullet-}$; Hydroxylradikal, $OH^{\bullet}$; Wasserstoffperoxid, H_2O_2) können, wenn extrazellulär gebildet, auf Zellen einwirken (exogene Noxen) oder werden endogen erzeugt (Abb. 1.3.4). Für die zelleigene Produktion stehen verschiedene enzymatische Systeme im Zytoplasma zur Verfügung. Hierzu gehört vor allem die wachsende Familie der NADPH-Oxidasen. Diese Oxidasen erzeugen Superoxidradikale und wurden zuerst in Phagozyten, einer wichtigen zellulären Komponente der körpereigenen Abwehr („oxidative burst“), charakterisiert. Auch die nicht phagozytären NADPH-Oxidasen erzeugen Superoxidradikale, induzieren aber,

abhängig vom spezifischen Enzymtyp, entweder zelluläre Transformation oder replikative Seneszenz (Suh et al. 1999; Geiszt et al. 2000).

Der größte Teil der intrazellulär erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies entsteht in den Mitochondrien und dort vor allem am mitochondrialen Komplex I und Komplex III. Die Produktionsrate der freien Radikale hängt somit stark von der metabolischen Rate der Zelle ab. Zusätzlich zu der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies bildet der Metabolismus eine ganze Reihe anderer Nebenprodukte, die ihrerseits oxidative Veränderungen bewirken können, so etwa die Bildung von „advanced glycation end products“ (AGEs). Mit dem physiologischen Alterungsprozess geht auch ein Anstieg an AGEs einher; diese sind am Phänotyp des Alterns beteiligt (zur Übersicht: Smith et al. 1995; Golubev 1996). Die AGEs entstehen nichtenzymatisch durch Glykosylierung von Proteinen und verursachen die Vernetzung von Proteinen, sog. „cross linkings“ (siehe 1.3.1). Dadurch werden Proteine, Enzyme und Strukturkomponenten der Zelle funktionsuntüchtig.

Zellen beziehen den größten Teil ihrer Energie aus der oxidativen Phosphorylierung während der Atmungskette in den Mitochondrien. Dabei wird der Sauerstoff durch sukzessive Übertragung von Elektronen und Protonen zu Wasser reduziert (Abb. 1.3.4). Durch eine fehlerhafte Weiterleitung der hoch energetischen Elektronen entstehen toxische Superoxidradikale (Halliwell u. Gutteridge 1999). Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt das Superoxid in H_2O_2 um, das ebenfalls ein Substrat für die Bildung Membran oxidierender Hydroxylradikale sein kann. Weitere enzymatische und nichtenzymatische Prozesse verursachen die Bildung und die Anhäufung von Superoxid und dessen Metabolit, dem H_2O_2 . Im Zentralnervensystem spielen dabei vor allem verschiedene Oxidasen (z.B. Xanthinoxidase, Flavinoxidasen) und Oxy-



Fenton-Reaktion

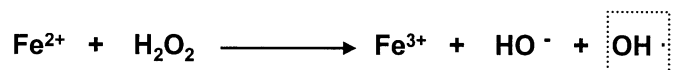


Abb. 1.3.4. Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies. Durch sukzessive Übertragung von Elektronen und Protonen entstehen z. B. bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien das Superoxidradikal ($O_2^{\bullet-}$), Wasserstoffper-

oxid (H_2O_2) sowie das hochreaktive Hydroxylradikal ($OH^{\bullet}$). In Anwesenheit z. B. von zweiwertigen Eisenionen entstehen über die Fenton-Reaktion aus H_2O_2 zusätzliche $OH^{\bullet}$ -Radikale. (Zur Übersicht: Halliwell u. Gutteridge 1999)

genasen (z.B. Lipooxygenasen, Zyklooxygenasen) sowie die Oxidation der Katecholamine durch Monoaminoxidasen eine wichtige Rolle (zur Übersicht: Behl 1999).

Wie erwähnt, existiert in gesunden Zellen ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen der Erzeugung reaktiver Sauerstoffradikale sowie H_2O_2 einerseits und der Entgiftung dieser hochreaktiven Moleküle durch eine Reihe von enzymatischen und nichtenzymatischen Antioxidanzien andererseits (Abb. 1.3.5). Die wesentlichen antioxidativ wirksamen Enzyme sind die SOD, die Katalase (CAT) sowie die Glutathionperoxidase (GPx) (Sies 1993). Die beiden letzteren wandeln H_2O_2 um. Die wesentlichen nichtenzymatischen Antioxidanzien sind das Vitamin C (Ascorbinsäure) und das Vitamin E (α -Tocopherol) sowie das Tripeptid Glutathion (GSH). Vitamin C gilt als das wichtigste wasserlösliche Antioxidans, das Vitamin E zeichnet sich durch hohe Fettlöslichkeit aus.

Freie Radikale sind hochreaktive Atome oder Moleküle, die zelluläre Biomoleküle oxidieren können. Die Funktion von Proteinen (z.B. Enzyme) wird durch Oxidation gestört (Abb. 1.3.6). Oxidative Modifikationen der DNA können zur Mutagenese und Tumorentstehung führen (*Proliferation*). Besonders oxidationsgefährdet sind die nichtgesättigten Kohlenwasserstoffseitenketten der Membranlipide. Die Oxidation der Seitenketten leitet eine Kettenreaktion ein, was zur strukturellen Zerstörung und zur Zelllyse führen kann (*Degeneration*).

Die Lipidperoxidation ist die am häufigsten beobachtete oxidative Modifikation bei verschiedenen chronischen (z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson) und akuten (z.B. Schlaganfall, Trauma) neurodegenerativen Ereignissen. Experimentell lassen sich Lipidperoxidationen durch die Zugabe von Oxidanzien zur Zellkultur einleiten. Krankheitsrelevante Noxen, wie beispielsweise die exzitatorische Aminosäure L-Glutamat oder das Alzheimer-assoziierte Amyloid- β -Protein ($\text{A}\beta$), und auch eine Reihe von Umwelttoxinen (z.B. Asbest) können nach Zugabe zu den Zellen Lipidperoxidationen und damit letztendlich den Zelluntergang durch Zelllyse initiieren (zur Übersicht: Halliwell u. Gutteridge 1999; Behl 1999). Vielfach werden von den unterschiedlichen Neurotoxinen die gleichen intrazellulären oxidativen Wege eingeleitet. So kommt es durch $\text{A}\beta$, aber auch durch exzitatorische Konzentrationen des Glutamat zur Aktivierung einer NADPH-Oxidase. Dies führt zur Produktion von Superoxidradikalen und nachfolgend zur Akkumulation von H_2O_2 in den Zellen. Nach Umwandlung des H_2O_2 zum hochreaktiven Hydroxylradikal kommt es direkt zur Attacke der Kohlenwasserstoffseitenketten der Lipide (Abb. 1.3.7). Vor allem aufgrund des hohen Gehalts an vielfach ungesättigten Kohlenhydraten in den Seitenketten der membranären Phospholipide sind die Nervenzellen des Gehirns besonders anfällig gegenüber Oxidationen. Hinzu kommen im Gehirngewebe weiterhin die vergleichsweise niedrigen Konzentrationen an endogenen Antioxidanzien, wie etwa

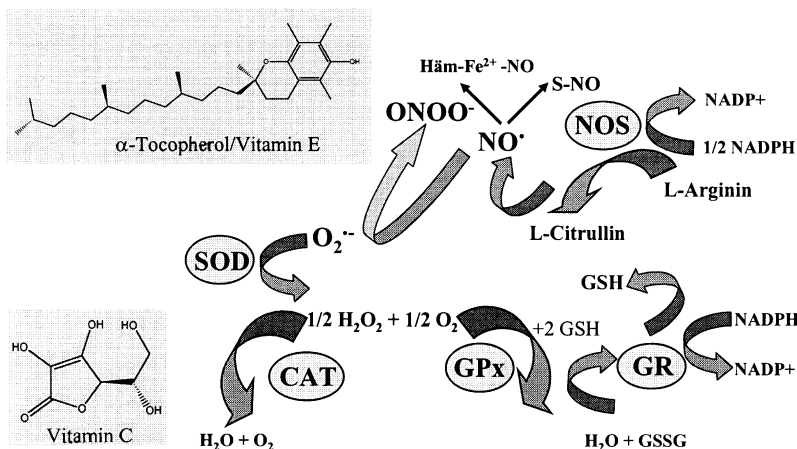


Abb. 1.3.5. Enzymatische und nichtenzymatische Antioxidanzien. Das wichtigste fettlösliche (lipophile) Antioxidans ist das α -Tocopherol (Vitamin E), das zentrale wasserlösliche das Vitamin C (Ascorbinsäure). Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPx) entgiften H_2O_2 . GPx wird durch die Aktivität der Glutathionreduktase (GR) regeneriert. Glu-

tathion (GSH) ist ein zentrales, antioxidativ wirkendes Tripeptid der Zelle. Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) katalysiert die Bildung von Stickstoffradikalen ($\text{NO}^\bullet$). Die Reaktion zwischen dem Superoxidradikal $\text{O}_2^{\bullet -}$ und $\text{NO}^\bullet$ führt zur Bildung des höchst reaktiven Peroxynitrit ($\text{ONOO}^\bullet$). (Zur Übersicht: Sies 1993)

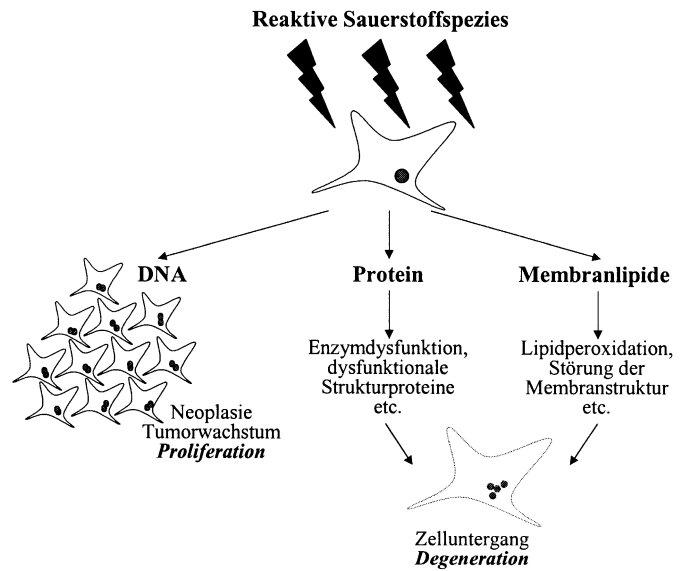


Abb. 1.3.6. Reaktive Sauerstoffspezies attackieren die zentralen Biomoleküle der Zelle. Die Oxidation der DNA kann zur Ausbildung von Mutationen und somit zur Tumorentstehung führen (*Proliferation*). Oxidierte Proteine werden dys-

funktional. Enzyme und Strukturproteine der Zelle verlieren ihre Funktion. Die Peroxidation von Membranlipiden führt zum Aufbrechen der Membran und somit zum Zellerfolg (*Degeneration*)

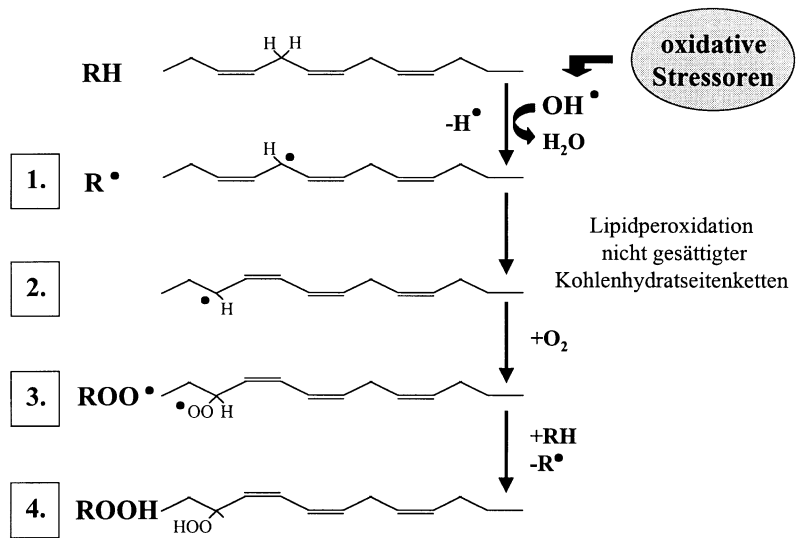


Abb. 1.3.7. Lipidperoxidation. Hydroxylradikale oxidieren die ungesättigten Kohlenwasserstoffseitenketten der Membranlipide. Die Reaktionsfolge lässt sich in unterschiedliche

Schritte unterteilen, erfolgt als Kettenreaktion und endet mit der Ausbildung von Lipidperoxiden ($ROOH$). (Zur Übersicht: Halliwell u. Gutteridge 1999)

dem Enzym Glutathionperoxidase (GPx) oder Vitamin E, und die sehr starke Anreicherung an enzymatisch aktiven Metallionen (z.B. Eisenionen), welche die Bildung von Radikalen (v.a. $OH^\bullet$) über die Fenton-Reaktion direkt beschleunigen und somit als Katalysator wirken (siehe Abb. 1.3.4) (zur Übersicht: Halliwell u. Gutteridge 1999).

Neue Befunde unterstreichen die Rolle von Oxidanzien und oxidativem Stress beim zellulären

Altern. Die Überexpression des Gens *ras* – das RAS-Protein ist Mitglied einer großen Familie von GTP-Bindungsproteinen, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind – induziert einen seneszenten Zustand in humanen Fibroblasten (Serrano et al. 1997), der unter anderem auch durch einen erhöhten Spiegel an intrazellulär generierten reaktiven Sauerstoffspezies gekennzeichnet ist. Dieser konnte durch Antioxidanzien wieder ge-

senkt werden (Lee et al. 1999). Intrazelluläre Oxidanzien könnten somit als zelleigene Induktoren des Alterns agieren und als molekulare Schalter wirken.

Reaktive Sauerstoffradikale und oxidativer Stress spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle beim Zelltod. Oxidanzien können Initiatoren des Zelltods sein, können aber auch nach der Einleitung des Zelluntergangs als Nebenprodukte auftreten, die den Zelltod beschleunigen. Allgemein unterscheidet man beim Zelluntergang zwei grundsätzliche Formen: die Apoptose und die Nekrose.

1.3.3.2 Apoptose und Nekrose: Die beiden grundlegenden Mechanismen des Zelltods

Auf der Grundlage biochemischer und morphologischer Kriterien können die *Apoptose* und die *Nekrose* als Mechanismen des Zelltods unterschieden werden, zwei völlig unterschiedliche, aber oftmals sich überschneidende Prozesse. Die Apoptose, die häufig auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet wird, ist ein aktiver, durch bestimmte Gene kontrollierter Prozess. Die Aktivierung solcher proapoptotischer Gene ist durch eine ganze Reihe von Stimuli möglich, u.a. durch oxidativen Stress, Hormone, Entzug trophischer Moleküle, Zellgifte und Viren. Die Apoptose ist – sofern sie kontrolliert abläuft – ein notwendiger physiologischer Prozess, der beispielsweise während der Embryogenese, aber auch im adulten Organismus für die geordnete Entfernung überschüssiger Zellen verantwortlich ist (Wyllie et al. 1980). Diese Aktivität wird besonders im Nervensystem deutlich. Annähernd 50% der postmitotischen Nervenzellen werden durch Apoptose während der Entwicklung des Nervensystems entfernt (Burek u. Oppenheim 1996). Der Wettbewerb zu vieler Nervenzellen um ein nur beschränktes Angebot an Neurotrophinen bewirkt den Untergang vieler Nervenzellen; diese sterben „vor Hunger“ (Raff 1993).

Die biochemischen Exekutoren der Apoptose sind die Caspasen, die zur Familie der Cysteinproteasen gehören. Derzeit sind etwa 14 unterschiedliche Caspasen bekannt. Viele liegen in der Zelle als inaktive Vorläufermoleküle (Procaspasen) vor. Die Spaltung der Procaspasen bewirkt die Freisetzung und Stimulierung der Enzymaktivität. Die verschiedenen Caspasen bilden vielfach ein intrazelluläres Netzwerk, wobei die Caspase 3 eine zentrale Stellung einnimmt. Dies wird beispielhaft durch folgenden Befund verdeutlicht: Mäuse, deren Gen

für die Caspase 3 experimentell deletiert wurde („caspase-3-knock-out“) zeigen eine dramatische Hypertrophie des Nervensystems (Kuida et al. 1996). Die durch die Aktivität der Caspase 3 normalerweise bewirkte physiologische Entfernung von Nervenzellen ist in diesem Modell nicht mehr möglich. Aber wie führt nun die Aktivität der Caspasen zum Zelltod?

Verschiedene Substrate der Caspaseaktivität sind bekannt. Vielfach werden durch die caspasevermittelte Proteolyse lebenswichtige zelluläre Proteine in ihrer Funktion gestört. Ein Beispiel ist die Spaltung des Inhibitorproteins der caspaseaktivierten DNase („inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease“, ICAD), eines Enzyms, das die DNA direkt zerstört (Liu et al. 1997; Enari et al. 1998). Weitere bekannte Beispiele für Caspasesubstrate sind antiapoptotische Proteine der BCL2-Familie (Adams u. Cory 1998; Reed 2001). Caspasen können durch ihre proteolytische Aktivität auch Strukturproteine spalten und somit direkt die Zellarchitektur beeinträchtigen (Kothakota et al. 1997). Die Aktivität der Caspasen lässt sich experimentell u.a. durch spezifische Antikörper mit proteinanalytischen Verfahren (z.B. Western-Blotting-Methode) nachweisen.

Morphologisch zeichnet sich die Apoptose vor allem durch folgende Eigenschaften aus: Schrumpfen der Zellen, Ausstülpungen der Zellmembran („blebbing“) und Kondensation des Chromatins im Zellkern. Die Morphologie der Mitochondrien und der meisten Organellen bleibt unverändert. Die Disintegration der Zelle erfolgt verzögert durch das Abschnüren von Apoptosekörperchen („apoptotic bodies“). In Geweben (in situ) werden diese apoptotischen Vesikel durch benachbarte Makrophagen phagozytiert und somit eine inflammatorische Reaktion im apoptotischen Gewebe verhindert (Williams u. Smith 1993).

Dazu in krasssem Gegensatz steht der Zelltodprozess der Nekrose. Diese ist durch eine Entzündungsreaktion im nekrotischen Gewebe charakterisiert. Nekrotischer Zelltod ist nicht genetisch reguliert, sondern ein passiver Prozess, der in Zellen häufig durch einen spontanen Insult oder ein Trauma induziert wird. Die Nekrose zeichnet sich morphologisch durch ein schnelles Anschwellen der Zellen und der Organellen sowie durch die Pyknose des Zellkerns aus. Nachfolgend löst sich die Zellmembran auf und der Zellinhalt entleert sich, was eine massive Entzündungsreaktion im Gewebe auslöst. Während die DNA bei der Apoptose durch die Aktivität spezifischer DNasen in distinkte Fragmente gespalten wird, erfolgt wäh-

rend der Nekrose eine zufällige enzymatische Zerstörung der DNA. Gerade die DNA-Fragmentierung wird häufig als Indikator für Apoptose bzw. Nekrose eingesetzt, da sich die gerichtet gespaltene DNA apoptotischer Zellen nach gelelektrophoretischer Auftrennung als „DNA-Leiter“ („laddering“) darstellen lässt und die DNA aus nekrotischen Zellen als „DNA-Schmier“ („smear“) identifiziert werden kann (Williams u. Smith 1993; Behl 2000). Abschließend soll hier nochmals betont werden, dass die Apoptose einen aktiven genetisch kontrollierten Prozess darstellt, während die Nekrose passiv verläuft. Interessanterweise können unter bestimmten Voraussetzungen beide Prozesse ineinander übergehen, sodass ein Zelltod, der als Apoptose beginnt, nachfolgend einen nekrotischen Verlauf nimmt.

Eine gestörte Apoptose kann sowohl zur Tumorentstehung (verringerte Apoptose) als auch zu neurodegenerativen Prozessen (verstärkte Apoptose) führen. Tatsächlich sind apoptotische Zellen in pathologischen Geweben einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen worden. Auch hier kann sowohl Apoptose als auch Nekrose ablaufen. In Post-mortem-Geweben von Alzheimer-Patienten wurden beide Prozesse klar gezeigt, wobei die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose oftmals ein eher technisch experimentelles Problem darstellt (Behl 2000). Oxidative Sig-

nale, etwa ausgelöst durch Neurotoxine, welche die intrazelluläre Akkumulation von Oxidanzien induzieren (z.B. Glutamat), können beide Arten des Nervenzelltods auslösen. Vielfach scheint die genaue Art des Prozesses (Apoptose versus Nekrose) von der Art des oxidativen Signals, der Stärke des oxidativen Stresses und vom jeweiligen Zelltyp abhängig zu sein.

1.3.3.3 Schutz durch Antioxidanzien

Exogen den Zellen zugeführte Antioxidanzien können die zerstörerischen oxidativen Prozesse verhindern. Besonders geeignet zur Verhinderung der Lipidperoxidation und somit zum Membran- und Zellschutz sind monophenolische Antioxidanzien, wie das α -Tocopherol (Vitamin E). Durch Abgabe eines Protons an das Sauerstoffradikal wird dieses entgiftet (Abb. 1.3.8).

Andere Antioxidanzien wurden in verschiedenen Modellen des oxidativen Nervenzelltods in vitro, aber auch in vivo getestet, insbesondere das Pinealhormon Melatonin (Reiter et al. 2000), sowie Substanzen mit einer steroidal Grundstruktur, wie die 21-Aminosteroid, auch Lazarole genannt. Verschiedenen Steroiden, die sich durch ihre hohe Fettlöslichkeit auszeichnen, wurde eine potenzielle antioxidative Aktivität zugeschrieben.

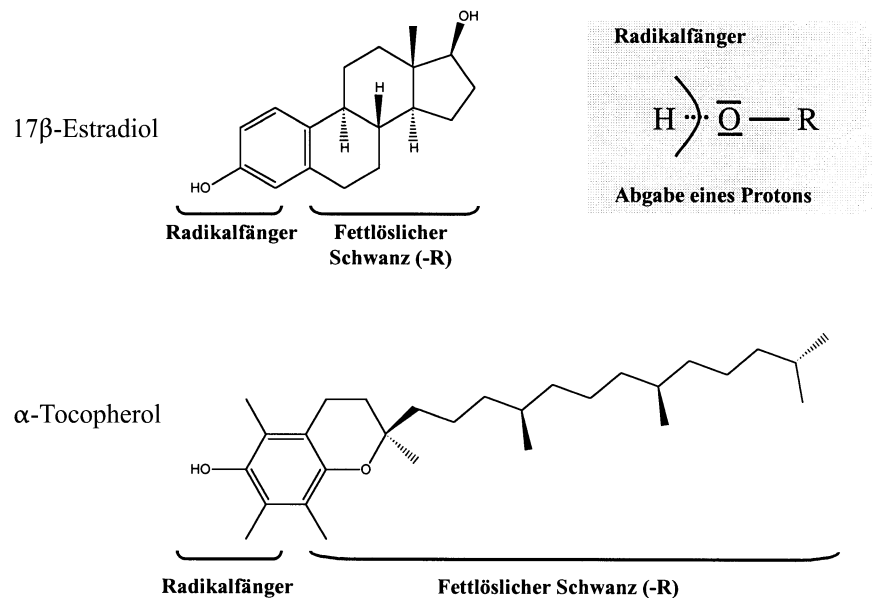


Abb. 1.3.8. Monophenolische Antioxidanzien als Radikalfänger. Die monophenolischen Antioxidanzien 17β-Estradiol (Östrogen) und α -Tocopherol (Vitamin E) bestehen aus ähnlichen Molekülgruppen, einer phenolischen Radikalfänger-

gruppe (OH-R) und einem fettlöslichen Schwanz (-R). Die phenolische Gruppe entlässt ein Proton, welches das freie Elektron des Radikalmoleküls absättigt und somit entgiftet

Der bekannte Glukokortikoid- und Progesteron-Rezeptorantagonist RU 486 (Mifepriston) kann ebenfalls Nervenzellen vor der Lipidperoxidation und somit dem Zelluntergang schützen. Steroidale Strukturen sind somit Prototypen für die Neusynthese antioxidativer Substanzen, sofern die entscheidenden antioxidativ wirkenden chemischen Gruppen (z. B. phenolische OH-Gruppen) verfügbar sind. Auch das weibliche Sexualhormon Östrogen ist ein biochemisches monophenolisches Antioxidans (Abb. 1.3.8) (Behl et al. 1995). Unterschiedliche Mechanismen sind beschrieben, die den durch Östrogen vermittelten Nervenzellschutz in vitro und in vivo beschreiben (zur Übersicht: Behl u. Holsboer 1999; Behl 1999). Die antioxidative Wirkung des Östrogens kann hierzu ebenfalls einen entscheidenden Beitrag leisten.

Ein wesentliches Merkmal des Alterns weiblicher Organismen ist der Verlust des Östrogens mit der Menopause. Verschiedene degenerative Prozesse gehen mit diesem Östrogenverlust einher. Beispiele hierfür sind Osteoporose, Arteriosklerose, kognitive Veränderungen sowie neurodegenerative Erscheinungen. Durch Östrogenersatz versucht man, diesen Östrogenverlust auszugleichen, zum Teil mit Erfolg, etwa zur Prävention der Arteriosklerose und der Alzheimer-Krankheit (zur Übersicht: Behl 2001). In vivo spielen vor allem die hormonellen genomischen und somit östrogenrezeptorabhängigen Prozesse eine zentrale Rolle.

1.3.3.4 Verlängerung der Lebensspanne durch Antioxidanzien

Die wichtigsten Antioxidanzien des Menschen, die zum Zellschutz beitragen, sind die Vitamine C und E. Die Verabreichung von Antioxidanzien verlängert das Leben von *D. melanogaster* (Miquel u. Economos 1979). Auch die kombinierte Überexpression der Gene der antioxidativen Enzyme Cu/Zn-SOD und der Katalase in transgenen Drosophila-Fliegen verlängert die mittlere und die maximale Lebensdauer (Orr u. Sohal 1994; Parkes et al. 1998). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass synthetische SOD- und Katalase-Mimetika das Überleben von transgenen Mäusen, die ein ALS-Modell repräsentieren, verlängern (Jung et al. 2001). Diese SOD- und Katalase-Mimetika verlängerten ebenfalls die Lebensspanne des Fadenwurms *C. elegans* (Melov et al. 2000). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass folgende Beobachtungen die Freiradikale-Theorie des Alterns stark stützen:

- Die Überexpression antioxidativer Enzyme verzögert den altersassoziierten oxidativen Schaden und verlängert die maximale Lebensspanne von Modellorganismen.
- Die unterschiedlichen Lebenserwartungen verschiedener Spezies ist umgekehrt proportional zu der Rate der erzeugten Superoxidradikale und des H_2O_2 in den Mitochondrien.
- Kalorische Restriktion bei der Nahrungsaufnahme erniedrigt den generellen oxidativen Stress und den damit verbundenen oxidativen Schaden, verzögert altersassoziierte Veränderungen und verlängert die maximale Lebensspanne bei Säugetieren (zur Übersicht: Mattson et al. 2001; Mockett et al. 2001).

Nachdem die Mitochondrien die Hauptquelle der Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies sind, müssen die Elektronentransportvorgänge bei der mitochondrialen Energiegewinnung und die Folgen von Mutationen der mitochondrialen DNA beispielsweise besonders beachtet werden (zur Übersicht: Wallace 1999; Sastre et al. 2000).

Oxidativer Stress führt zu Proliferation oder Degeneration (siehe Abb. 1.3.6). Freie Sauerstoffradikale können somatische Genmutationen, Chromosomenabnormalitäten, Aneuploidien, mitotische und rekombinante Genkonversionen und Genamplifikationen verursachen. Alle diese genetischen Veränderungen betreffen sowohl die chromosomale als auch die mitochondriale DNA und können potenziell eine bedeutende Rolle bei der Einleitung und dem Fortschreiten des Alterungsprozesses sowie bei altersassoziierten Erkrankungen spielen. Die experimentellen Hinweise an kultivierten Zellen und im Tier sind vielfältig (zur Übersicht: Halliwell u. Gutteridge 1999). Verschiedenes deutet auf eine Rolle von Oxidationen bei den Veränderungen der chromosomalen Telomere hin.

1.3.4 Die Telomertheorie

Die Chromosomen des Menschen sowie aller Eukaryonten sind lineare Strukturen, deren Enden als *Telomere* bezeichnet werden (Abb. 1.3.9). Die Replikation der zellulären DNA während der S-Phase des Zellzyklus beginnt mit der synthetischen Verlängerung kleiner RNA-Stücke, genannt RNA-Primer, durch die DNA-Polymerase. Die RNA-Primer werden nach der Neusynthese der DNA entfernt und interne Lücken mit DNA auf-

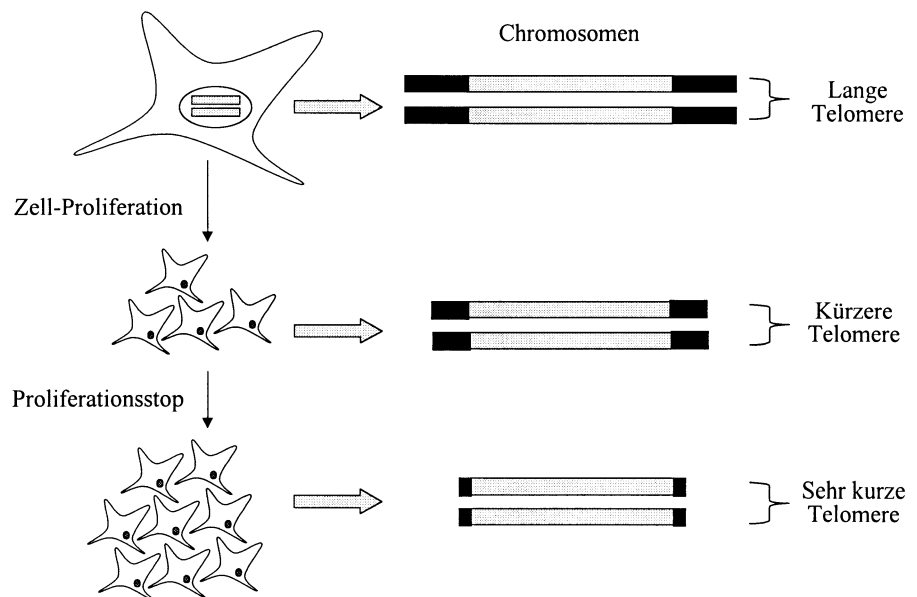


Abb. 1.3.9. Telomere sind Chromosomen-Endstücke. Die linearen Chromosomen aller eukaryontischen Zellen haben Telomere an beiden Enden. Mit der andauernden Proliferati-

on der Zellen verkürzt sich die Länge der Telomere. Die Zellen stellen die Proliferation ein. (Modifiziert nach Takahashi et al. 2000)

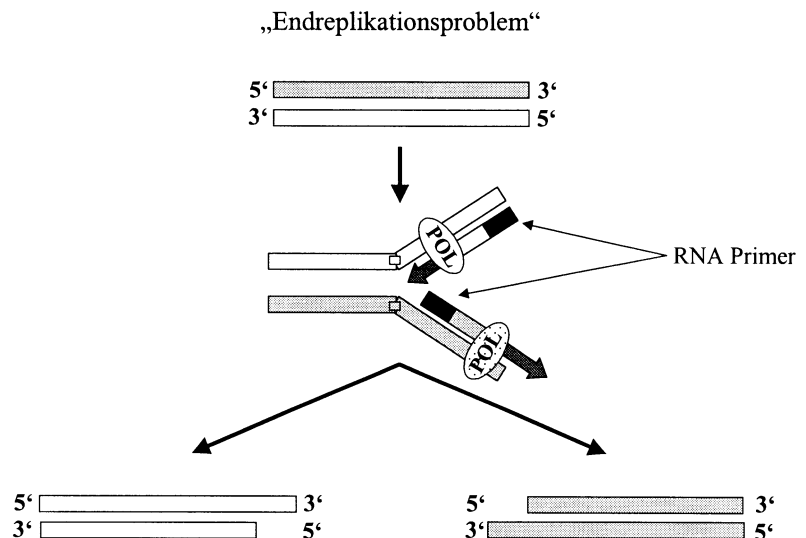


Abb. 1.3.10. Das „Endreplikationsproblem“. Doppelsträngige DNA wird durch das Fortschreiten der Replikationsgabel verdoppelt. RNA-Primer dienen als Startpunkte der DNA-Polymerase (POL). Diese RNA-Primer werden am gesamten Chromosom durch DNA ersetzt mit Ausnahme der äußers-

ten 5'-Enden der DNA. Folglich ist jeder neu synthetisierte DNA-Strang etwas kürzer als sein parentaler Templatestrang. Es gehen ungefähr 50–200 Basenpaare pro Zellteilungsprozess verloren. (Modifiziert nach Klapper et al. 2001)

gefüllt. Der Ersatz der RNA-Primer kann entlang der gesamten DNA-Replikationsgabel mit Ausnahme der äußersten 5'-Enden des DNA-Strangs stattfinden. Die Folge ist die Verkürzung des Tochter-DNA-Stranges durch die jeweilige Länge des RNA-Primers am Strangende. Diese Prozesse sind die

molekulare Basis der „Endreplikationsproblematik“ (Olovnikov 1996) (Abb. 1.3.10).

Bei fast allen Eukaryonten sind die Telomere aus langen DNA-Abschnitten kurzer Tandemwiederholungen zusammengesetzt. Diese DNA-Sequenz lautet TTAGGG, wobei das G-reiche 3'-DNA-

Ende etwa 200 Nukleotide länger ist als der C-reiche Strang. Die DNA-Sequenzen der Telomere tragen keine kodierenden Sequenzen und sind somit mit Blick auf den genetischen Informationsgehalt verzichtbar. Allerdings haben Telomere wichtige Funktionen während der Replikation (siehe 1.3.4.1.). So verhindern sie, dass das Chromosomenende als Doppelstrangbruch erkannt wird, und beeinflussen die korrekte Paarung der Nukleotidstränge sowie die Bewegung der Chromosomen bei der Mitose und Meiose. Die Struktur der Telomere und einiger Telomer bindender Proteine, die ihrerseits die Telomerfunktion modulieren können, ist beschrieben (zur Übersicht: Collins 2000). Fest steht, dass sich mit jeder Zellteilung die Telomere verkürzen. Diese konstante Telomerverkürzung ist das biochemische Substrat des Hayflick-Limits (zur Übersicht: Klapper et al. 2001).

Verschiedene Telomerbindungsproteine wurden bereits vor allem in der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert. Beim Menschen sind ebenfalls einige Bindungsproteine bekannt, beispielsweise die Duplex-Telomer-TTAGGG-Repeat-Bindungsfaktoren TRF1 und TRF2, die Einzelstrangbindungsproteine Telomerase Reverse Transkriptase (TERT), das telomeraseassoziierte Protein 1 (TEP1) und das Protein hnRNP A1 (van Steensel et al. 1998; Nakamura et al. 1997; Meyerson et al. 1997; Harrington et al. 1997; Nakayama et al. 1997; LaBranche et al. 1998). Vermutlich sind alle Telomer bindende Proteine in irgendeiner Weise an der Regulation der Telomerstruktur und -funktion beteiligt.

1.3.4.1 Biologische Funktion der Telomere

Folgende Funktionen der Telomere lassen sich klar unterscheiden:

- Schutz der Chromosomenenden vor Rekombination, Fusion und Abbau durch Exonukleasen und Ligasen,
- Regulation der Chromosomenerkennung und -auftrennung bei der Mitose,
- Positionierung und Verankerung der Chromosomen innerhalb der funktionellen Kernkomplexe zur Erleichterung der DNA-Replikation auf verschiedenen Stufen der Meiose und Mitose.

Die Signalwege, die zur Einleitung der zellulären Seneszenz durch die Telomerverkürzung führen, sind bisher nur schlecht beschrieben. Dennoch geht man davon aus, dass kurze Telomere verschiedene Signalwege direkt aktivieren können (Vojta u. Barrett 1995). Mechanistisch könnte dies

durch die Beeinflussung der Transkription telomerbenachbarter Gene durch die Verkürzung der Telomere vermittelt werden. Für den Hefemodellorganismus *S. cerevisiae* ist bereits bekannt, dass die Transkription von Genen in der Nähe der Telomere reversibel blockiert ist (Gottschling et al. 1990). Dies wird als Telomerpositionseffekt (TPE) bezeichnet. Das Verschwinden der Telomere könnte somit zur Aufhebung dieser Transkriptionsblockade und zur Aktivierung der Gentranskription führen. Die Identifizierung dieser Gene, die gegenüber der Telomerverkürzung sensitiv sind („telomer shortening-sensitive genes“, TSSG), ist somit von zentraler Wichtigkeit für das Verständnis der zellulären Effekte des Telomermetabolismus (zur Übersicht: Liu 1999). Ein solches TSSG könnte das Tumorsuppressorgen *p53* sein. So wurde kürzlich für Mäuse gezeigt, dass eine signifikante Telomerverkürzung die Aktivierung der Expression von *p53* sowie einen Wachstumsstillstand und eine Apoptose auslöst (Chin et al. 1999). Im Gegensatz dazu führt die Zerstörung des *p53*-Gens zur Immortalisierung von Zellen und zum Tumorstadium (Metz et al. 1995).

1.3.4.2 Telomerbiologie in vivo

Zu Beginn der neunziger Jahre wurde das Telomerphänomen von verschiedenen Laboratorien gezeigt (Harley et al. 1990; Lindsey et al. 1991; Allsopp et al. 1992). Die Telomerverkürzung ist kein ausschließliches In-vitro-Phänomen, sondern wurde auch in Geweben während des Alterungsprozesses in vivo beobachtet, so etwa an Fibroblasten, Leukozyten und Schleimhautzellen. Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass auch in vivo eine bestimmte kritische minimale Länge der Telomere die Vorgänge der replikativen Seneszenz einleitet.

1.3.4.3 Das Enzym Telomerase

1.3.4.3.1 Struktur und Funktion

Die Funktion des Enzyms Telomerase besteht darin, der Telomerverkürzung entgegenzuwirken und hierfür die sich wiederholende DNA-Sequenz der Telomere zu verlängern, um den Nukleotidverlust nach Möglichkeit zu verhindern. Telomerase ist ein großer Ribonukleoproteinkomplex, der aus einer RNA-Untereinheit und verschiedenen Proteinkomponenten besteht. Die RNA-Einheit ist essen-

ziell für die enzymatische Funktion der Telomerase. Die humane Telomerase-RNA (hTR) ist 445 Nukleotide lang und beinhaltet eine 11 Nukleotide lange Templatesequenz (5'-CUAACCCUAAAC-3'), die für die Telomerwiederholungssequenzen (TTAGGG) n kodiert (Morin 1989). Die Telomerase funktioniert somit wie eine reverse Transkriptase. Zusätzlich zu ihrer Aufgabe, als Template für die reverse Transkription bei der Synthese der Telomer-DNA zu fungieren, ist die RNA-Untereinheit am aktiven Zentrum des Enzyms beteiligt (Bhattacharyya u. Blackburn 1997). Das Entfernen der RNA-Untereinheit führt zur

- Inhibition der Telomerase,
- Verkürzung der Telomere und
- Beeinflussung des replikativen Potenzials,

vor allem von embryonalen Stammzellen und anderen Zellen mit hohem proliferativen Potenzial (Niida et al. 1998). Obwohl bisher nur ein einziges Gen für die Telomerase-RNA-Untereinheit identifiziert wurde, konnten mindestens drei Gene kloniert werden, die Telomeraseproteinkomponenten kodieren.

Der genaue molekulare Mechanismus der Telomeraseaktivität ist nur unvollständig verstanden. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, die darauf hindeuten, dass das Telomeraseholoenzym direkt mit dem Einzelstrang der 3'-GT-reichen Telomerprimersequenzen interagiert und dabei Deoxynukleosidtriphosphate in der 5'-3'-Richtung polymerisiert. Hat die Telomerase erst einmal an die Telomerprimer gebunden und sich damit so positioniert, dass die RNA-Templatesequenz an den telomeren DNA-Primersequenzen anliegt, beginnt die enzymatische Transkription der DNA-Nukleotide. Sobald ein vollständiger Telomerenrepeat (TTAGGG) gebildet ist, kann die Telomerase an die nächste Stelle translozieren und sich der gesamte Vorgang wiederholen. Weder die Tertiär- oder die Quartärstruktur des Enzyms Telomerase noch die Kinetik der Wechselwirkung zwischen der Telomerase und den Telomeren sind bekannt. Auch ist die Frage der Assemblierung des Telomeraseholoenzym im Zellkern noch ungeklärt (zur Übersicht: Liu 1999).

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Die Telomerase ist ein Ribonukleoprotein, bestehend aus zwei Kernkomponenten: der katalytischen Untereinheit hTERT und der RNA-Komponente hTR (Collins 2000). Die Telomerase besitzt eine spezifische Reverse-Transkriptase-Aktivität und hält die Länge der Telomere konstant. Unterstützt wird diese Hypothese durch Befunde, bei denen nach

Transfektion und Überexpression der katalytischen Untereinheit des Enzyms Telomerase (hTERT) primäre humane Fibroblasten und Endothelzellen unsterblich werden. Die Zellen erhalten hiermit eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit, sind immortal und entgehen dem Hayflick-Limit, dem mortale Zellen ansonsten unterliegen (Bodnar et al. 1998; Yang et al. 1999). Die Telomerase ist in immortalen Zelllinien aktiv, ebenso in Tumorzellen und Stammzellen in vivo. Darüber hinaus ist die Telomerase in solchen Zellen exprimiert und aktiv, die generell ein erhöhtes replikatives Potenzial besitzen, wie etwa embryonale Zellen, T- und B-Lymphozyten und die Zellen der regenerativen Gewebe (zur Übersicht: Dhaene et al. 2000). Trotz der eindeutigen Befunde, die den Verlust der Telomere als Hauptgrund der replikativen Seneszenz und somit des Alterns erklären, kann dieser Telomerverlust nicht alle zellulären Alterungsphänomene in vitro erklären. Von großer Bedeutung sind – wie bereits diskutiert – ebenso die Folgen von oxidativem Stress, z.B. der oxidative Schaden der mitochondrialen DNA sowie anderer Träger vitaler Funktionen innerhalb der Zelle. Auch diese Faktoren bestimmen die Lebensspanne der Zellen (zur Übersicht: Johnson et al. 1999). Andererseits kann ohne die Aktivierung der Telomerase oder eine andere Lösung des Endreplikationsproblems keine unsterbliche Zelle in vitro erzeugt werden. In der Tat sind nur wenige immortale Zelllinien bekannt, die keine Telomeraseaktivität exprimieren. Diese müssen alternative Mechanismen zur Bewahrung der Telomerlängen und somit zur Umgehung des Hayflick-Limits aufweisen (Bryan et al. 1997). Obgleich diese alternativen Mechanismen für eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen sehr bedeutsam sein könnten, sind die Telomere zumindest in vitro eindeutig *die* Schlüsselstruktur der replikativen Seneszenz.

Telomere wirken in vitro als Sensoren für kumulativen oxidativen Stress. Die durch hyperoxische Behandlung in vitro künstlich gealterten Zellen weisen eine Reihe von Merkmalen auf, die exakt denen der normal gealterten kultivierten Zellen entsprechen. Sowohl die Morphologie der Zellen als auch die charakteristische Anhäufung des Alterspigments Lipofuszin, eine veränderte Atmungsaktivität und die Arretierung der Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus waren zwischen den beiden experimentellen Ansätzen (induziertes Altern im Vergleich zu natürlichem Altern) identisch (Saretzki et al. 1998; Sitte et al. 2000). Bereits sehr frühe Studien ergaben, dass humane Fibroblasten, die unter reduzierten Sauerstoffbedingungen (hy-

poxisch) kultiviert wurden, eine verlängerte Lebensspanne haben (Packer u. Fuehr 1977). Zellen unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck (hyperoxisch) haben eine reduzierte Lebensdauer (von Zglinicki et al. 1995). Auch nicht letale Dosen von H₂O₂ aktivieren einen schnellen altersähnlichen Wachstumsstillstand (Chen u. Ames 1994). Auch die Telomerlänge von hyperoxischen Fibroblasten zeigte eine sogar noch deutlichere Verkürzung als diejenige, die bei normal seneszenten Fibroblasten vorliegt. Oxidativer Stress, ausgelöst durch hyperoxische Bedingungen, führt zu einer beschleunigten Telomerverkürzung. Konsequenterweise könnten somit Antioxidanzien diese Prozesse verzögern oder sogar verhindern, was z. Z. intensiv untersucht wird. Die Telomerlänge ist somit auch ein Maß des in den Zellen herrschenden oxidativen Stresses (Serra et al. 2000).

1.3.4.3.2 Regulation der Telomeraseaktivität

Die Aktivität der Telomerase ist reversible reguliert. So lässt sich in den meisten normalen (nicht transformierten, mortalen) humanen somatischen Zellen keine Telomeraseaktivität nachweisen. In etwa 85% aller humanen Krebszellen und immortalisierten (transformierten) Zelllinien jedoch ist die Telomeraseaktivität sehr stark erhöht (Kim et al. 1994; Shay u. Bacchetti 1997). Ruhende Lymphozyten zeigen nur eine geringe Telomeraseaktivität, die jedoch nach Stimulation der Antigenrezeptoren verstärkt wird (Igarashi u. Sakaguchi 1997; Weng et al. 1998). In Krebszellen wird die hohe Telomeraseaktivität durch Verlassen des Zellzyklus unterdrückt (Sharma et al. 1996; Bestilny et al. 1996). Viele Fragen der molekularen Mechanismen der Repression und Induktion der Telomeraseaktivität sind noch offen. Allerdings wurde kürzlich ein Schlüsselement der Repression entdeckt. Eine die hTERT reprimierende Aktivität wurde auf dem Chromosom 3 lokalisiert (zur Übersicht: Shay 1999).

Die Regulation der Telomeraseaktivität erfolgt aller Voraussicht nach auch durch posttranskriptionelle Mechanismen (Li et al. 1997; Kang et al. 1999). Da die Telomerase mit einer Halbwertszeit von etwa 24 h nur vergleichsweise langsam metabolisiert wird, können direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen am Enzym dieses modifizieren. Hier sind allerdings noch viele Fragen offen (zur Übersicht: Liu 1999; Poole et al. 2001).

1.3.4.4 Telomere in der Pathophysiologie

1.3.4.4.1 Telomere bei Altersphänomenen und bei Syndromen mit beschleunigtem Altern

Bei unterschiedlichen Altersphänotypen wurden Telomerlängen untersucht. Eine Auswahl zeigt Tabelle 1.3.1. Mit Blick auf die wohl wichtigste altersassoziierte pathologische Veränderung, die Arteriosklerose, wurde gezeigt, dass die Telomere während der Gefäßalterung kürzer werden. Es wird vermutet, dass die beobachtete Telomerverkürzung die Folge einer erhöhten Replikationsrate der vasculären Zellen ist. Diese erhöhte Teilungsrate könnte eine Reaktion sein, die den Zellverlust kompensieren soll, dabei aber zur Bildung arteriosklerotischer Plaques beiträgt (Chang u. Harley 1995). In der Tat korreliert die Telomerlänge invers mit dem Grad der Arteriosklerose (Okuda et al. 2000).

Während Phänomene, die allgemein mit Alterungsprozessen assoziiert sind („normales Altern“), die Folge unterschiedlicher Prozesse auf molekularer und zellulärer Ebene mit einer ansteigenden Zahl nicht funktionierender Zellen sind, werden Alterssyndrome durch einige definierbare genetische Defekte verursacht. Alle Zellen weisen dabei die gleichen genetischen Veränderungen auf. Dennoch zeigen manche der genetisch bedingten Syndrome eine Kombination verschiedener Phäno-

Tabelle 1.3.1. Telomerbiologie bei altersassoziierten Erkrankungen. (Modifiziert nach Klapper et al. 2001)

Phänotyp	Telomerbiologie in vivo
Verringerte Immunfunktion	Altersabhängige Telomerverkürzung in B- und T-Lymphozyten
Arteriosklerose	Altersabhängige Telomerverkürzung, vor allem in den arteriosklerotischen Gefäßen und im Endothelgewebe unter Stress
Erhöhtes Krebsrisiko	Telomeraseaktivität und zumeist kurze Telomere im Krebsgewebe
Muskelatrophie	Kürzere Telomere in dystrophem Muskelgewebe
Verringerung kognitiver Leistung	Keine altersassoziierte Telomerverkürzung im Gehirngewebe
Ergrauen des Haares und Haarverlust	Keine verringerte Telomeraseaktivität in Haarfollikelzellen

typen normalen Alterns, allerdings in zeitlich stark beschleunigter Art und Weise. Die größte Ähnlichkeit zum normalen Altern zeigen die folgenden Syndrome: Werner-Syndrom (WS), Bloom-Syndrom (BS), Hutchinson-Gilford-Syndrom und Down-Syndrom (DS). Alle diese Krankheitsbilder zeigen Veränderungen in ihrer Telomerbiologie (Nakura et al. 2000; Miki et al. 2000) (Tabelle 1.3.2)

Der genetische Defekt beim WS betrifft das *wrn*-Gen, das zur Familie der RecQ-DNA-Helikasen gehört (Gray et al. 1997). Helikasen sind an der Entwindung der DNA-Stränge beteiligt. Verschiedene Mutationen des *wrn*-Gens in WS-Patienten sind beschrieben (Moser et al. 2000; Wyllie et al. 2000). Obwohl *wrn* weder an die Telomerstruktur bindet noch ein Teil des Telomerenzymkomplexes ist, zeigen kultivierte Fibroblasten von WS-Patienten eine reduzierte Proliferation und eine beschleunigte Telomerverkürzung. Diese wird durch die Überexpression des *hTERT* und durch die somit erhöhte Telomeraseaktivität verhindert (Wyllie et al. 2000). Weiterhin wird die Hypersensitivität der kultivierten WS-Zellen gegenüber oxidativem Stress zumindest teilweise durch die Überexpression des Wildtyps *wrn* oder des *hTERT*-Gens aufgehoben (Hisama et al. 2000).

Auch beim BS, dem DS und dem Hutchinson-Gilford-Syndrom wurden Telomerdefekte beobachtet. Welche Rolle die Telomerbiologie und die pathologischen Veränderungen der Telomere bei Syndromen des beschleunigten Alters genau spielen und welche kausalen Verbindungen möglicherweise bestehen, ist bisher noch offen.

1.3.4.4.2 Telomerase – Zielstruktur zukünftiger Krebs- und Anti-Aging-Therapien?

Die Reaktivierung der Telomeraseaktivität erhöht die replikative und damit proliferative Lebensspanne kultivierter Zellen. Hieraus ergeben sich Ansätze dafür, die Telomeraseaktivität als Zielstruktur für mögliche Krebstherapien zu definieren. Eine Telomeraseaktivität wurde in etwa 85% aller untersuchten Krebsformen nachgewiesen (Kim et al. 1994; Dhaene et al. 2000). Zur Unterdrückung des Wachstums bestimmter Tumoren werden Antitelomerasekomponenten diskutiert (Yamaguchi et al. 1999; Pallini et al. 2001; Sasgary et al. 2001).

Mit Blick auf Alterungsprozesse sowie degenerative Erscheinungen, die sich im Gegensatz zur Krebsentwicklung durch eine gegenteilige Eigenschaft auszeichnen, nämlich durch ein Ende der Replikation und der Proliferation, wäre eher die Stimulierung der Telomeraseaktivität wünschenswert. Obwohl, wie bereits oben beschrieben, die Aktivierung des Enzyms Telomerase die replikative Seneszenz verzögert und Telomerase noch weitere Effekte hat, die das Zellüberleben stabilisieren, sind solche Ansätze natürlich auch mit Risiken verbunden. So wird etwa die sekundäre Aktivierung des Onkogens *c-myc* durch Telomerase diskutiert (Wang et al. 2000). Allerdings sind die replikative Expansion von Ex-vivo-Zellen mit pathologisch verkürzter Replikation und die nachfolgende Reimplantation in Zukunft zumindest denkbar. Erkrankungen, wie die Arteriosklerose, Diabetes, Muskelatrophie oder neurodegenerative Krankheiten, wären zukünftige Anwendungsgebiete. Ein solches „tissue engineering“ unter Einsatz der Telo-

Tabelle 1.3.2. Telomerbiologie bei Syndromen mit beschleunigtem Altern. (Modifiziert nach Klapper et al. 2001)

Syndrom	Alterspathologie	Genetischer Defekt	Molekulare Veränderungen	Telomerveränderungen
Werner-Syndrom	Ausgeprägte Ähnlichkeiten zu: Arteriosklerose, Osteoporose, Muskelatrophie, Katarakt, Diabetes u. a.	Mutation in der WRN-Helikase	Erhöhte Mutationsrate, Chromosomenverlust, DNA-Hypersensitivität	Reduzierte proliferative Kapazität, beschleunigte Telomerverkürzung
Bloom-Syndrom	Immundefizienz, Unfruchtbarkeit, kleine Statur, Krebsprädisposition	Mutation in der BLM-Helikase	Schwesterchromatidaustausch, somatische Mutationen	Beschleunigte Telomerverkürzung in vitro, normale Telomerlänge in vivo
Down-Syndrom	Ergrauen und Haarverlust, Amyloidose, alzheimerähnliche ZNS-Pathologie, Katarakt, Diabetes mellitus II, Hypogonadismus, häufig Leukämie	Trisomie 21	Schwere transkriptionelle Dysregulation	Altersabhängige, beschleunigte Telomerverkürzung in Blutlymphozyten
Hutchinson-Gilford-Syndrom	Arteriosklerose, Ergrauen und Haarverlust, Haut- und Knochenatrophie, Hypogonadismus	Unbekannt	Unbekannt	Verringerte proliferative Kapazität in vitro, verkürzte Telomere

meraseaktivität wird bereits in vitro untersucht (Halvorsen et al. 2000; Thomas et al. 2000).

1.3.5 Klotho – ein Anti-Aging-Hormon?

Obwohl verschiedene Syndrome beschleunigten Alterns die Folge einer Vielzahl pathophysiologischer Veränderungen und deren Wechselwirkungen mit teilweise genetischem Hintergrund (z.B. Trisomie 21, Down-Syndrom) sind, gibt es auch Phänomene, die durch die funktionelle Zerstörung eines einzelnen Gens hervorgerufen werden. Ein solches Gen wurde mit *klotho* in der Maus gefunden (Kuroo et al. 1997). Die *klotho*-Mausmutante zeigt eine ganze Reihe verschiedener Merkmale humanen Alterns, einschließlich einer reduzierten Lebensspanne, verringerter Aktivität, Unfruchtbarkeit, Osteoporose, Arteriosklerose und Atrophien der Haut. Alle diese Phänotypen wurden durch die Zerstörung eines einzigen Gens, des *klotho*-Gens, verursacht. Dieses Gen kodiert für ein sekretorisches Protein und unterscheidet sich somit von den anderen bisher identifizierten Genprodukten, die ein beschleunigtes Altern verursachen und zumeist im Kern aktiv sind. Das Klotho-Protein besitzt Homologien zu β -Glukosidasen und Hinweise mehrten sich, dass dieses sekretorische Protein möglicherweise direkt als humoraler Faktor wirkt. Klotho könnte somit ein Anti-Aging-Hormon sein. Tatsächlich verhindert wieder eingebrachtes Klotho-Protein die altersassoziierten Veränderungen im entsprechenden Zielgewebe der Maus (Kuroo et al. 1997). Zusätzlich ist die Insulinproduktion in den Klotho-Mutanten gestört (Utsugi et al. 2000). Störungen der Insulinfunktion und des Glukosestoffwechsels sind häufig ein Merkmal des Alterns. Inzwischen wurde noch ein weiteres klothoverwandtes Protein identifiziert (Yahata et al. 2000). Obwohl es weitere funktionelle Analysen des Klotho-Proteins abzuwarten gilt, ist diese Knock-out-Maus ein interessantes Modell zum weiteren Studium von Altersprozessen auf zellulärer und molekularer Ebene.

1.3.6 Expressionsprofile in der molekularen Alterungsforschung – ein Ausblick

Obwohl in einer Reihe von Tiermodellen (*D. melanogaster*, *C. elegans*, *Mus musculus*) die Manipulation eines Gens, Überexpression oder Deletion Altersprozesse direkt beeinflussen können, werden die Mechanismen des physiologischen („normalen“) Alterns auf molekularer Ebene sehr wahrscheinlich durch komplexe überlappende genetische Programme und die Wechselwirkungen ganzer Expressionsmuster gesteuert. Moderne Technologien wie die sog. DNA-Array-Technologie (Duggan et al. 1999) ermöglichen die Identifizierung solcher Expressionsmuster, die mit Altersprozessen assoziiert sind. So wurde beispielsweise im Mausmodell eine erste globale Analyse der Gehirnalterung durchgeführt. Es zeigte sich, dass im alternden Neokortex und Kleinhirn der Alterungsprozess von einem mRNA-Expressionsprofil begleitet ist, das auf verstärkten oxidativen Stress, Entzündung sowie einen reduzierten neurotrophen Input hinweist. Eine kalorische Restriktion, welche bekanntermaßen Alterungsprozesse verzögert, verzögerte ebenfalls selektiv diese altersassoziierte Genexpression (Lee et al. 2000). Interessanterweise wurden hier Genexpressionsprofile gefunden, die auf oxidativen Stress als wichtige Alternskomponente hinweisen. Somit erfährt die Freie-Radikale-Theorie des Alterns von Denis Harman aus dem Jahre 1956 erneut Unterstützung.

Durch die Methoden der strukturellen Proteinanalyse (Proteomik), die nach zweidimensionaler Auftrennung von Proteingemischen mit nachfolgender Massenspektrometrie Expressionsprofile auf Proteinebene erstellen kann, wird ein immer genaueres Bild der am Alterungsprozess beteiligten Proteine entstehen (Toda 2000; Maggio u. Ramnarayan 2001). Erst eine genaue Analyse des Phosphorylierungszustandes dieser Proteine sowie die Untersuchung der Interaktionen werden die molekularen Grundlagen des Alterns weiter aufklären können. Diese könnten dann therapeutische Ansätze zur Verhinderung und Behandlung von Syndromen mit beschleunigtem Altern sowie anderer altersassoziiierter degenerativer Erkrankungen liefern.

In der Literatur, vor allem in populärwissenschaftlichen Schriften, werden häufig sog. *Anti-Aging-Hormone* diskutiert. Der wissenschaftliche Hintergrund dabei ist beispielsweise, ein physiologisches Hormon, dessen Spiegel bekanntermaßen während des Alterns absinkt, dem Körper wieder

zuzuführen und somit der Alterung entgegenzuwirken. Allerdings ist oft nur wenig über die Effizienz und die Sicherheit solcher Substanzen bekannt. Hormone und Hormonvorläufer wie das Dehydroepiandrosteron (DHEA), das humane Wachstumshormon, Östrogen oder Testosteron sinken altersabhängig ab. Eine bloße Ersatztherapie eines einzelnen Hormons wird die komplexen Vorgänge des Alterns nicht umkehren können. Natürlich hat ein Hormon wie das weibliche Sexualhormon Östrogen einige positive und neuroprotektive Effekte hinsichtlich altersassoziierter degenerativer Prozesse (Behl 2001). Dennoch sollte es nicht als Anti-Aging-Hormon bezeichnet werden. Mit Blick auf das DHEA und das Wachstumshormon werden erst groß angelegte klinische Studien genauere Kenntnisse bringen. Auf der Grundlage des heutigen Wissens solche Hormone als Anti-Aging-Hormone einzusetzen und als Quelle ewiger Jugend anzupreisen, ist sicherlich nicht wünschenswert (Butler et al. 2000).

1.3.7 Ausblick

Verschiedene Alterungsmodelle versuchen die molekularen Grundlagen des Alterns aufzuklären. Unterschiedliche Theorien des Alterns sind formuliert und zahlreiche Belege finden sich für alle diese Sichtweisen. Besonders prominent und aktuell sind die Freie-Radikale-Theorie und die Telomertheorie des Alterns. Die modernen Methoden der Genomik, Proteomik und funktionellen Genomik werden langfristig diejenigen Gene identifizieren, die das zelluläre Altern, das Ende der Zellteilung (replikative Seneszenz) und andere Alternsmerkmale bedingen. Die Telomertheorie des Alterns zeigt eine Struktur auf, die in vielen Modellsystemen eine Indikatorfunktion für Alterungsprozesse besitzt. Auch bei der Aufklärung des genauen Mechanismus der Aktivität und Regulation des Enzyms Telomerase sind noch viele Fragen offen. In einem weiteren Schritt müssen in vitro gewonnene Befunde in die In-vivo-Situation übertragen und verifiziert werden. Aufgrund der stetig steigenden Lebenserwartung des Menschen ergibt sich die dringende Notwendigkeit, Alterungsprozesse zu verstehen, um auch altersbedingten Erkrankungen besser entgegenwirken zu können. Ziel wäre das gesunde Altern, was im angloamerikanischen Bereich gerne als „successful aging“ bezeichnet wird. Das Verständnis der komplexen Alternsprozesse,

des Zusammenspiels genetischer und nichtgenetischer Prozesse, muss zunächst ein rein molekulares sein.

1.3.8 Literatur

- Adams JM, Cory S (1998) The bcl-2 protein family – arbiters of cell survival. *Science* 281:1322–1326
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW et al (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10114–10118
- Beal MF (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38:357–366
- Beckman KB, Ames BN (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547–581
- Behl C (1999) Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol* 57:301–23
- Behl C (2000) Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 107:1325–44
- Behl C (2001) Estrogen – mystery drug of the brain? Springer, Berlin Heidelberg New York
- Behl C, Holsboer F (1999) The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant. *Trends Pharmacol Sci* 20:441–444
- Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F (1995) 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* 216:473–482
- Bestilny LJ, Brown CB, Miura Y, Robertson LD, Riabowol KT (1996) Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. *Cancer Res* 56:3796–3802
- Bhattacharyya A, Blackburn EH (1997) A functional telomerase RNA swap in vivo reveals the importance of non-template RNA domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2823–2827
- Bjorksten J, Tenhu H (1990) The cross linking theory of aging-added evidence. *Exp Gerontol* 25:91–95
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB et al (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349–352
- Bond J, Haughton M, Blaydes J, Gire V, Wynford-Thomas D, Wyllie F (1996) Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene* 13:2097–2104
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3:1271–1274
- Burek MJ, Oppenheim RW (1996) Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathol* 6:427–446
- Butler RN, Fossel M, Pan CX, Rothman DJ, Rothman SM (2000) Anti-aging medicine. 2. Efficacy and safety of hormones and antioxidants. *Geriatrics*. 55:48–58
- Chang E, Harley CB (1995) Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (24):11190–11194
- Chen Q, Ames BN (1994) Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4130–4134

- Cheney KE, Walford RL (1974) Immune function and dysfunction in relation to aging. *Life Sci* 14:2075–2084
- Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW et al (1999) p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 97:527–538
- Collins K (2000) Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 12:378–383
- Cristofalo VJ, Allen RG, Pignolo RJ, Martin BG, Beck JC (1998) Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10614–10619
- Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R (2000) Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 437:1–16
- Duggan DJ, Bittner M, Chen YD, Meltzer P, Trent JM (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21 (Suppl S):10–14
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43–50
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8010–8014
- Golubev AG (1996) The other side of metabolism – a review. *Biochemistry (Moscow)* 61:1443–1460
- Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of pole II transcription. *Cell* 63:751–762
- Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, Martin GM, Oshima J et al (1997) The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nat Genet* 17:100–103
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free radicals in biology and medicine, 3rd edn. Oxford University Press
- Halvorsen TL, Beattie GM, Lopez AD, Hayek A, Levine F (2000) Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet cells stimulated to divide in vitro. *J Endocrinol* 166:103–109
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458–460
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 2:298–300
- Harman D (1998a) Extending functional life span. *Exp Gerontol* 33:95–112
- Harman D (1998b) Aging: phenomena and theories. *Ann N Y Acad Sci* 854:1–7
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805–816
- Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I et al (1997) A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275:973–977
- Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614–636
- Hayflick L (1987) Origins of longevity. In: Warner HR, Butler RN, Sprott RL, Schneider EL (eds) *Modern biological theories of aging*. Raven, New York, pp 21–34
- Hisama FM, Chen YH, Meyn MS, Oshima J, Weissman SM (2000) WRN or telomerase constructs reverse 4-nitroquinoline 1-oxide sensitivity in transformed Werner syndrome fibroblasts. *Cancer Res* 60:2372–2376
- Igarashi H, Sakaguchi N (1997) Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood* 89:1299–1307
- Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L (1999) Molecular biology of aging. *Cell* 96:291–302
- Jung CW, Rong YQ, Doctrow S, Baudry M, Malfroy B, Xu ZS (2001) Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress and prolong survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model. *Neurosci Lett* 304:157–160
- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI (1999) Protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 274:13085–13090
- Kanungo MS (1994) *Genes and aging*. Cambridge University Press
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM et al (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011–2015
- Kirkwood TBL, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408:233–238
- Klapper W, Parwaresch R, Krupp G (2001) Telomere biology in human aging and aging syndromes. *Mech Ageing Dev* 122:695–712
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu KT, McGarry TJ et al (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin – effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294–298
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P et al (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384:368–372
- Kuroo M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohya Y (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45–51
- LaBranche H, Dupuis S, Ben-David Y, Bani MR, Wellinger RJ, Chabot B (1998) Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet* 19:199–202
- Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, Hirai T, Yu ZX et al (1999) Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274:7936–7940
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA (2000) Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet* 25:294–297
- Li H, Zhao LL, Funder JW, Liu JP (1997) Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 272:16729–16732
- Lindsey J, McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ (1991) In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 256:45–48
- Liu JP (1999) Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 13:2091–2104
- Liu XS, Zou H, Slaughter C, Wang XD (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175–184
- Löffler G, Petrides PE (1998) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Maggio ET, Ramnarayan K (2001) Recent developments in computational proteomics. *Trends Biotechnol* 19:266–272

- Mattson MP, Duan WZ, Lee J, Guo ZH (2001) Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. *Mech Ageing Dev* 122:757–778
- Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC et al (2000) Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289:1567–1569
- Metz T, Harris AW, Adams JM (1995) Absence of p53 allows direct immortalization of hematopoietic cells by the myc and raf oncogenes. *Cell* 82:29–36
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L et al (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90:785–795
- Miki T, Morishima A, Nakura J (2000) The genes responsible for human progeroid syndromes. *Intern Med* 39:327–328
- Miquel J, Economos AC (1979) Favorable effects of the antioxidants sodium and magnesium thiazolidine carboxylate on the vitality and life span of *Drosophila* and mice. *Exp Gerontol* 14:279–285
- Mockett RJ, Orr WC, Rahmandar JJ, Sohal BH, Sohal RS (2001) Antioxidant status and stress resistance in long- and short-lived lines of *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 36:441–463
- Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59:521–529
- Moser MJ, Kamath-Loeb AS, Jacob JE, Bennett SE, Oshima J, Monnat RJ Jr (2000) WRN helicase expression in Werner syndrome cell lines. *Nucleic Acids Res* 28:648–654
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997) Telomerase catalytic subunit homologues from fission yeast and human. *Science* 277:955–959
- Nakayama J, Saito M, Nakamura H, Matsuura A, Ishikawa F (1997) TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88:875–884
- Nakura J, Ye L, Morishima A, Kohara K, Miki T (2000) Helicases and aging. *Cell Mol Life Sci* 57:716–730
- Niida H, Matsumoto T, Satoh H, Shiwa M, Tokutake Y, Furuichi Y, Shinkai Y (1998) Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nat Genet* 19:203–206
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211:90–98
- Okuda K, Khan MY, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Aviv A (2000) Telomere attrition of the human abdominal aorta: relationships with age and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 152:391–398
- Olovnikov AM (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 31:443–448
- Orr WC, Sohal RS (1994) Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263:1128–1130
- Packer L, Fuehr K (1977) Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267:423–425
- Pallini R, Pierconti F, Falchetti ML, D'Arcangelo D, Fernandez E, Maira G, D'Ambrosio E et al (2001) Evidence for telomerase involvement in the angiogenesis of astrocytic tumors: expression of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA by vascular endothelial cells. *J Neurosurg* 94:961–969
- Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL (1998) Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* 19:171–174
- Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO (2001) Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 269:1–12
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262:695–700
- Reed JC (2001) Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 7:314–319
- Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR (2000) Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals* 9:160–171
- Rohme D (1981) Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5009–5013
- Saretzki G, Feng J, Zglinicki T von, Villeponteau B (1998) Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53:B438–442
- Sasgary S, Wieser M, Cerni C (2001) Targeted inhibition of telomerase in human cancer: will it be a double-edged sword? *Oncology* 24:22–26
- Sastre J, Pallardo FV, Asuncion JG de la, Vina J (2000) Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res* 32:189–198
- Serra V, Grune T, Sitte N, Saretzki G, Zglinicki T von (2000) Telomere length as a marker of oxidative stress in primary human fibroblast cultures. *Ann N Y Acad Sci* 908:327–30
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593–602
- Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA, Nichols G et al (1996) Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12343–12346
- Shay JW (1999) Toward identifying a cellular determinant of telomerase repression. *J Natl Cancer Inst* 91:4–6
- Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33:787–791
- Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chemie (Int edn)* 12:1058–1071
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213–219
- Sitte N, Huber M, Grune T, Ladhoff A, Doecke WD, Zglinicki T von, Davies KJ (2000) Proteasome inhibition by lipofuscin/ceroid during postmitotic aging of fibroblasts. *FASEB J* 14:1490–1498
- Smith MA, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (1995) Radical aging in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 18:172–176
- Steensel B van, Smogorzewska A, Lange T de (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92 (3):401–413
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase mox1. *Nature* 401:79–82

- Takahashi Y, Kuroo M, Ishikawa F (2000) Aging mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12407–12408
- Thomas M et al (2000) Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells express in telomerase reverse transcriptase. *Nat Biotechnol* 18:39–42
- Toda T (2000) Current status and perspectives of proteomics in aging research. *Exp Gerontol* 35:803–810
- Utsugi T, Ohno T, Ohyama Y, Uchiyama T, Saito Y, Matsumura Y, Aizawa H et al (2000) Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism* 49:1118–1123
- Vojta PJ, Barrett JC (1995) Genetic analysis of cellular senescence. *Biochim Biophys Acta* 1242:29–41
- Wallace DC (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482–1488
- Wang J, Hannon GJ, Beach DH (2000) Risky immortalization by telomerase. *Nature* 405:755–756
- Wemmer U (1993) Entwicklung der Weltbevölkerung. *Biol Med* 22:5–10
- Weng NP, Palmer LD, Levine BL, Lane HC, June CH, Hodes RJ (1998) Tales of tails: regulation of telomere length and telomerase activity during lymphocyte development, differentiation, activation, and aging. *Immun Rev* 160:43–54
- Williams GT, Smith CA (1993) Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74:777–779
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251–306
- Wyllie FS, Jones CJ, Skinner JW, Haughton MF, Wallis C, Wynford-Thomas D, Faragher RG et al (2000) Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat Genet* 24:16–17
- Yahata K, Mori K, Arai H, Koide S, Ogawa Y, Mukoyama M, Sugawara A et al (2000) Molecular cloning and expression of a novel klotho-related protein. *J Mol Med* 78:389–394
- Yamaguchi F, Morrison RS, Takahashi H, Teramoto A (1999) Anti-telomerase therapy suppressed glioma proliferation. *Oncol Res* 6:773–776
- Yang J, Chang E, Cherry AM, Bangs CD, Oei Y, Bodnar A, Bronstein A et al (1999) Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J Biol Chem* 274:26141–26148
- Zglinicki T von, Saretzki G, Docke W, Lotze C (1995) Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 220:186–193
- Zhu L, Skoultschi A (2001) Coordinating cell proliferation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 11:91–97

Molekularmedizinische Grundlagen von
altersspezifischen Erkrankungen

Ganten, D.; Ruckpaul, K. (Hrsg.)

2004, XXXIII, 546 S., Hardcover

ISBN: 978-3-540-00858-3