

Telomerer og Telomerase ved aldring og ved enkelte sykdommer

av

Knud B. Landmark

Knud_landmark@hotmail.com, 91 70 20 16

Furulundtoppen 19, 0282 Oslo

og

Amund Evensen

Amund_evensen@hotmail.com, 99 35 52 55

Strandveien 80, 9007 Tromsø

Kull 2007

5. årsoppgave i Stadium IV – Profesjonsstudiet i medisin, Universitetet i Tromsø

Veiledere:

Knud H. Landmark, professor emeritus, dr. med., Universitetet i Oslo

K.h.landmark@medisin.uio.no, 97 51 92 55

Ørjan Olsvik, professor i klinisk mikrobiologi, Universitetet i Tromsø

Orjan_olsvik@uit.no, 77 64 62 01

Nøkkelord: Telomerer, Telomerase, Aldring, Kardiovaskulær sykdom, Kreft.

Innholdsfortegnelse

I. Sammendrag	3
II. Introduksjon	4
III. Metode og materiale	7
IV. Resultater	7
A. Effekter av telomerer og telomerase på aldring	7
1. Dyreeksperimentelle studier	7
2.0 Humane studier	8
2.1 Telomerlengde som en mitotisk klokke	12
2.2 Faktorer som bestemmer telomerlengde i befolkningen	13
2.3 Telomerlengde som biomarkør på aldring	14
B. Telomerer og telomerase ved forskjellige sykdomstilstander	21
1. Kardiovaskulære sykdommer	21
2. Kreft- og blodsykdommer	29
3. Autoimmune sykdommer	39
4. Progeroid syndrom	41
5. Demens og Alzheimers sykdom	45
6. Andre sykdommer	45
C. Intervensjoner rettet mot telomerer og telomerase	47
V. Konklusjon	49
VI. Litteraturliste	50
VII. Figurtekster	54
VIII. Ordliste	58
IX. English summary	59

I. Sammendrag

Den store økningen på fokus rundt telomerer og telomerases innvirkning på menneskers biologi, og det faktum at dette er et forholdsvis nytt forskningsfelt i et historisk perspektiv, er bakgrunnen for denne oppgaven.

Metode og materiale: grunnlaget for denne oppgaven er et ikke-systematisk litteratursøk i PubMed samt et skjønnsmessig utvalg av eksisterende, relevante artikler.

Telomerer er korte DNA-sekvenser på enden av humane kromosomer, som beskytter kromosomendene og hindrer tap av funksjonelt DNA.

Telomerene forkortes ved hver celledeling, og når tilstrekkelig antall telomerer blir kritisk korte, trigges cellulær aldring eller apoptose.

Telomerforkortning er assosiert med akselerert aldring og økt dødelighet fra en rekke sykdomstilstander, deriblant kardiovaskulære, autoimmune og progeroide sykdommer, Alzheimers demens, kognitiv svikt, paranoid schizofreni og kreft.

Enzymet telomerase bygger opp telomerene, og forhindrer dermed telomerforkortning. Normalt uttrykkes imidlertid ikke telomerase i humane somatiske celler, men i 90 % av krefttilfeller er telomerase aktivert og spiller dermed en svært viktig rolle i kreftutvikling. I fremtiden kan intervensjoner rettet mot å hemme telomerase tenkes å kunne behandle kreft på den ene siden, og forhindre aldring ved å aktivere telomerase på den andre side.

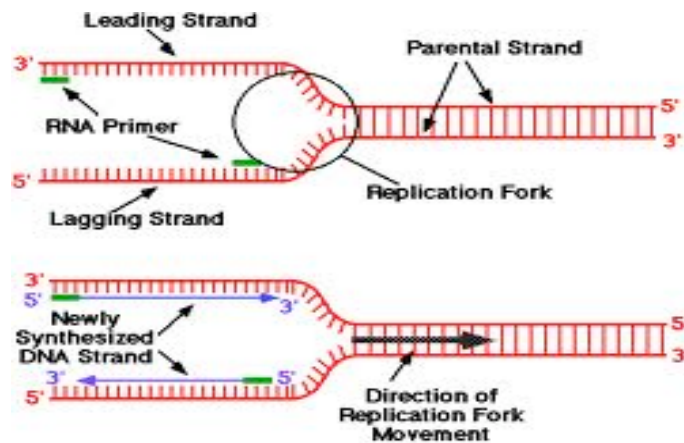
II. Introduksjon

Telomerer er korte DNA-sekvenser som ikke koder for funksjonelt DNA. Det vil si at telomerenes baserekkefølge ikke er gjenstand for DNA-replikasjon eller RNA-syntese (1). Telomerenes lengde varierer mye. Avhengig av donoralder, vev, og cellens replikasjonshistorie, varierer telomerlengden hos mennesker mellom 500 – 15000 basepar (2).

Telomerene finnes på enden av kromosomene og består av repeterende sekvenser av nukleobasene: TTAGGG (3). Telomerens hovedfunksjon er å beskytte kromosomene og hindre tap av funksjonelt DNA. Telomerenes beskyttelse av DNAet er nødvendig for å skille kromosomene fra DNA-brudd i selve genomet. Et slikt DNA-brudd i genomet leder til cellesyklusarrest og DNA-reparasjon, eller induserer apoptose når skaden er for alvorlig eller ikke reparerbar. I kontrast til DNA-brudd, er det ikke ønskelig at kromosomene utløser tilsvarende DNA-skaderespons. Telomerene forhindrer induksjon av en slik respons, og er en forutsetning for å opprettholde kromosomal stabilitet (4).

For å oppfylle sin beskyttende funksjon må telomerer ha en viss lengde. Telomerbindende proteiner binder med høy spesifisitet til telomerer, og er avgjørende for å stabilisere telomerstrukturen. Problemet med telomerer er at de forkortes ved hver celledeling, det såkalte endereplikasjonsproblemet til DNA-polymerase (4). Måten telomerer hindrer tap av funksjonelt DNA, er som følger: for å kunne initiere DNA-replikasjon på "leading strand", må primeren ha et sete å feste seg på. Primeren er en enkelttrådet baserekke som er startstedet for DNA-replikasjonen. Årsaken til at det trengs en primer er at DNA-polymerase, enzymet som lager DNAet, kun kan legge nukleotider (bestående av en base, en karbonring og en fosfatgruppe) til en allerede eksisterende nukleotidrekkefølge, i dette tilfellet primeren. Telomeren fungerer altså for setet der primeren fester seg (Figur 1). Dersom man tenker seg at primeren skulle feste seg på det funksjonelle DNAet, ville denne korte DNA-biten

(som DNA-primeren fester seg på) ikke bli replikert ved celledeling, og dermed ville den ha gått tapt. Den "nye" DNA-tråden ville altså mangle en del av basene som den opprinnelige DNA-tråden hadde dersom telomerer ikke fantes (5).



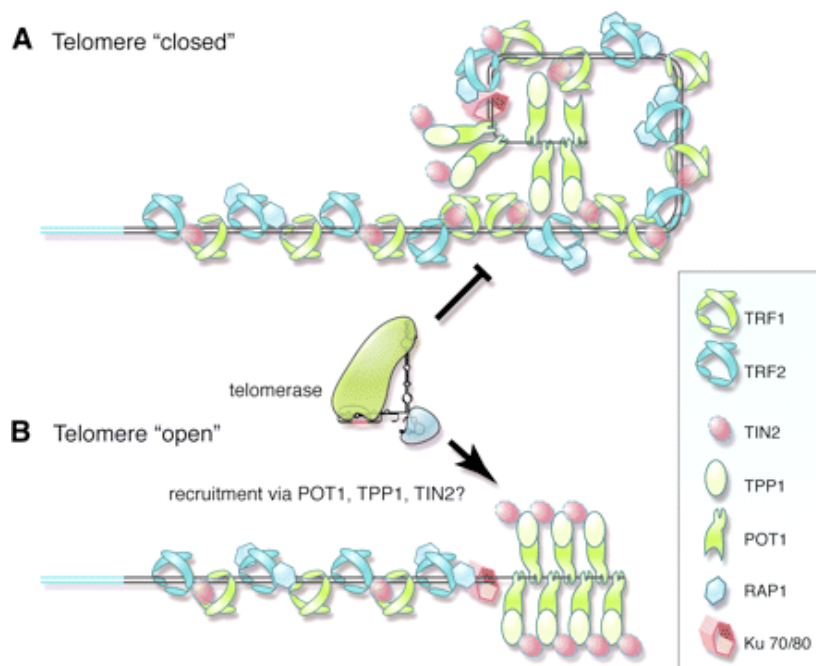
Figur 1

Kritisk korte, dysfunksjonelle telomerer gjenkjennes som DNA-skade og induserer cellesyklus sjekkpunkt, en mekanisme der cellen undersøker om den er klar for å gå inn i neste fase av cellesyklus. To sjekkpunkter har blitt identifisert til å begrense cellulær levealder som respons på telomerdysfunksjon. Det første punktet (første mortalitetsstadium, M1) karakteriseres av en permanent cellesyklusarrest. Dette sjekkpunktet kalles cellulær aldring, og avhenger av at tumorsuppressorgenet p53 aktiveres. Dersom DNAet skades, kan p53 initiere apoptose, stoppe cellesyklus eller aktivere DNA-reparasjonsproteiner. Humane fibroblaster entrer cellulær aldring etter 50-70 celledelinger. Celler med mutert p53 kan omgå M1, og fortsette å proliferere til tross for kritisk korte og dysfunksjonelle telomerer. Imidlertid vil videre telomerforkorting lede til ytterligere dysfunksjon, og 2. sjekkpunkt (andre mortalitetsstadium, M2) induseres. Dette stadiet blir kalt krise, er uavhengig av p53, og er karakterisert av massiv kromosomustabilitet og celledød. Telomerforkorting, cellulær aldring og krise begrenser den replikerende levalderen til celler, ved å virke som en tumorsuppressormekanisme. På en annen side kan

telomerdysfunksjon og -sjekkpunkt, bidra til å utmatte cellulære funksjoner og svekke opprettholdelse av organer under aldring (4).

Gjennomsnittlig telomerlengde er vist å være omvendt proporsjonal med alder. Menn har noe kortere telomerlengde enn kvinner, og forkortingen av telomerer skjer forttere hos menn enn hos kvinner, 30 mot 20 basepar per år, og kan i så måte være med på å forklare at telomerlengde er en indikasjon for biologisk alder (3).

Spesielle proteiner er assosiert med telomerisk DNA: telomerase, terminalt restriksjonsfragment 1 (TRF1) og terminalt restriksjonsfragment 2 (TRF2). Telomerase er enzymet som bygger opp telomeren. Telomerasen består av to subenheter: TERT, (telomerase reverse transcriptase) som lager nye TTAGGG-sekvenser, og TERC (telomerase RNA component) som fungerer som RNA-malen for telomerasekvensene. TRF1 og TRF2 binder seg til TTAGGG-sekvensene på telomeren og danner store proteinkomplekser som regulerer telomerlengde- og struktur (Figur 2) (2, 6). Telomerase er aktivt i embryogenesen, men undertrykkes så i de fleste somatiske celler med unntak av kjønnsceller og enkelte stamceller og progenitorceller (4).



Figur 2

III. Metode og materiale

Grunnlaget for denne oppgaven er et ikke-systematisk litteratursøk i PubMed samt et skjønnsmessig utvalg av eksisterende, relevante artikler.

IV. Resultater

A. Effekter av telomerer og telomerase på aldring

1. Dyreeksperimentelle studier

Studier på mus med defekt telomerase, har vist de første eksperimentelle bevis på at forøkt telomerforkortning kan svekke vedlikehold av organer og redusere levealder. Mus bærer en homozygot delesjon av enten RNA-komponenten til telomerase (TERC -/-), eller den katalytiske subenheten (TERT -/-). Begge "knockouts" mangler telomeraseaktivitet, og viser lik fenotype (fremtoningspreg) i respons på telomerforkortning. TERC -/-mus med korte telomerer, viste fenotype for prematur aldring, som spesielt rammet organsystemer med stor celleomsetning. Akselerert aldring hos disse musene, korrelerte med den økte frekvensen av celler med kritisk korte telomerer og frie kromosomender. Aldrende mus med dysfunksjonelle telomerer viste en atrofi av intestinalt epitel og av miltens hvite pulpa, svekket B-lymfopoese og reduksjon i antall og funksjon av hematopoetiske stamceller. Videre hadde musene redusert evne til organregenerasjon, samt redusert stressrespons (4).

Eksperimenter på TERC -/-mus avslørte at cellens indre sjekkpunkter og forandringer i cellens ytre miljø bidrar til reduksjon i stamcellefunksjon. Cellesyklusinhibitoren p21 er et protein, hvis uttrykk reguleres av p53. p21 induserer cellesyklusarrest som respons på DNA-skade (studier på humane fibroblaster har vist at en oppregulering av p21 induserer cellulær aldring som respons på telomerdysfunksjon). Delesjon av p21 forlenger levealder hos TERC -/-mus, uten å fremme utvikling av kreft. Den økte levealder hos p21 -/- TERC -/-mus korrelerer med en forbedring i stamcellefunksjon og

vedlikehold av organer. Eksperimentene viser at cellens indre sjekkpunkter kan begrense stamcellefunksjon og organismens levealder, som respons på telomerdyfunksjon. Videre indikerer funnene at hemming av cellens indre sjekkpunkter, kan være et terapeutisk mål for behandling av aldersassosiert organdegenerasjon (4).

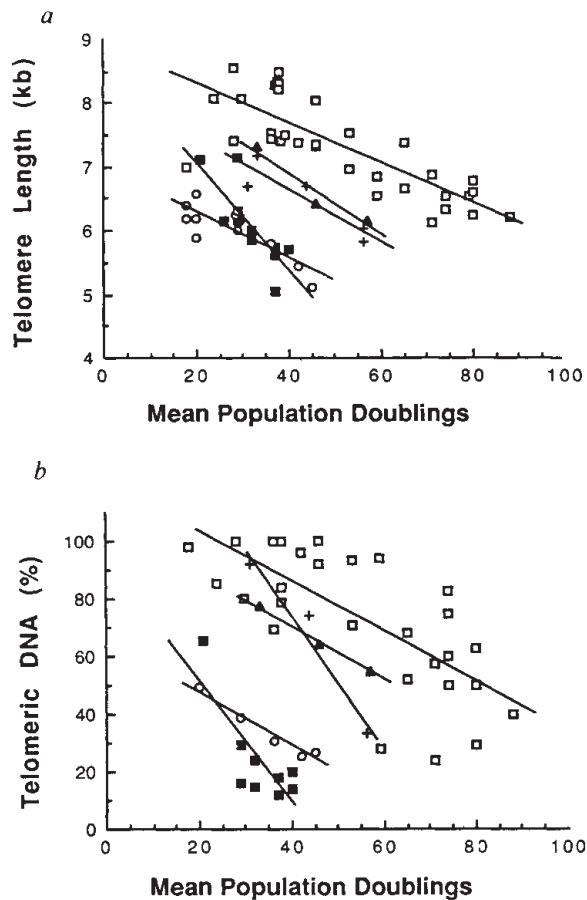
2.0 Humane studier

Populasjonsstudier viser at eldre mennesker i gjennomsnitt har kortere telomerer enn den yngre befolkningen. Kan det å forhindre telomerforkortning, være viktig for å leve et langt liv? Hvis tap av telomerisk DNA (tDNA) fortløpende kan erstattes ved hver replikasjon, kan antallet celledelinger teoretisk være uendelig, og ingen tegn til aldring vil fremkomme. Imidlertid er uendelig antall celledelinger også en egenskap man ser hos kreftceller. Videre har man sett at ikke alle mennesker har redusert telomerlengde med økende alder. Om lag 1/3 av den aldrende befolkningen viser uforandret eller økt telomerlengde. Selv om signifikansen av denne observasjonen fortsatt ikke er kjent, tror noen forskere at dette kan være en utrolig anti-aldningsmekanisme, mens andre tror det er en tidlig indikator for kreft. For at telomerer skal forlenges, trengs telomerase for å erstatte DNA-sekvensene som går tapt ved replikasjon. Med aldring deaktiveres telomerase, og cellereproduksjon er ikke lenger mulig. Cellene som ikke dør, er de som kan replikeres uendelig antall ganger, slik som kreftceller. Disse cellene må ha aktiv telomerase. To aktuelle spørsmål blir da om det er mulig å kurere kreft ved å deaktivere telomerase, og om man kan forhindre aldring ved å aktivere telomerase. Hvis forskere kan aktivere enzymet telomerase i hele kroppen til eldre mennesker, kan man tenke seg at cellereplikasjon igjen finner sted, men med fare for kreft (7).

Den begrensede replikasjonskapasiteten til humane fibroblaster i cellekultur er vel etablert, og har i stor utstrekning blitt brukt som modell for cellulær aldring. I en canadisk studie fra 1990 undersøkte man effekten

av celledeling og alder på telomerisk DNA. Til dette dyrket man ikke-transformerte humane fibroblaster in vitro inntil cellulær aldring oppstod (når normale diploide celler mister evnen til å vokse og dele seg mer), og med jevne mellomrom ble størrelsen av terminalt restriksjonsfragment (TRF) bestemt med Southern blotanalyse (metode for å detektere en spesifikk DNA-sekvens fra DNA-prøve). TRF kan brukes som mål på telomerlengde. (8).

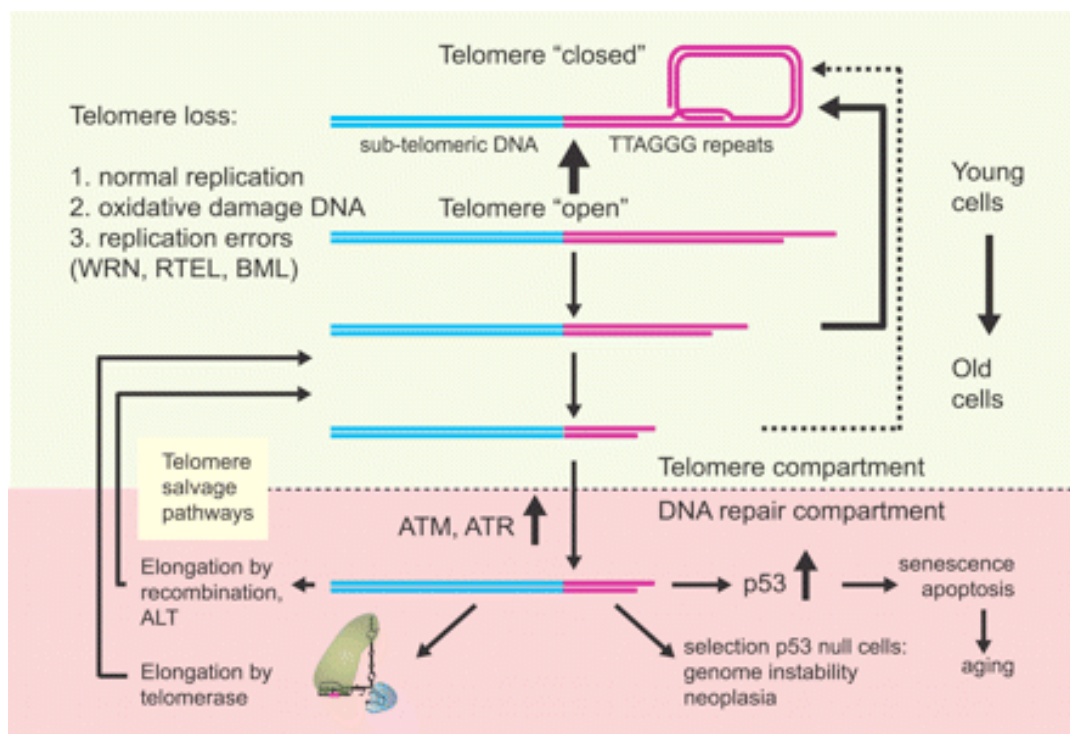
Gjennomsnittlig telomerlengde ble redusert med om lag 2 kilobaser (kb) ved kumulative populasjonsdoblinger, og den totale mengden telomerisk DNA minket, noe som indikerer et faktisk tap, og ikke bare rearrangering av telomerer (Figur 3). Studien antar at telomerlengden til somatiske celler er om lag 4 kb, og et tap på 2 kb vil derfor representere et tap av store deler av den funksjonelle telomerfunksjonen. Denne telomerforkortningen gjennom aldring hos humane fibroblaster i cellekultur kan være signifikant. Ettersom hver celle inneholder 92 telomerer (2 X 46 kromosomer) og distribusjonen av telomerlengde er stor, vil et tap av 2 kb fra den gjennomsnittlige lengden kanskje kunne medføre en stor økning i andelen celler som mangler TTAGGG fra minst en telomer. Tap av bare en telomer kan forårsake permanent cellesyklusarrest og kromosomal instabilitet (CIN), som er karakteristisk i aldrende fibroblaster. CIN involverer mutasjoner som gir tap eller vinn av hele eller deler av kromosomer, og er antatt å være en tidlig hendelse i karsinogenesen. I studien spekuleres det i om tapet av telomerisk DNA i takt med aldringen in vitro, også kan forekomme når somatiske celler deler seg in vivo, og fremhever videre at det er viktig å bestemme effekten av donoralder og vevstype på telomerlengde (8).



Figur 3

Telomerlengde hos mennesker er i stor grad genetisk bestemt, men vi kjenner også til en aldersavhengig forkortning. Telomerlengde er derfor blitt lagt fram som en markør på biologisk aldring, og er blitt assosiert med aldersrelatert sykdom som for eksempel kardiovaskulær sykdom. Imidlertid er det uklart om telomerlengde som biomarkør for bestemte sykdommer skyldes korte telomerer ved fødsel, akselerert telomerforkortning i livet, eller en kombinasjon av de to. Sammenhengen mellom oksidativt stress og inflammasjon på telomerforkortning støttes i dag av tverrsnittstudier, men det trengs longitudinelle studier for mer presist å kunne vurdere telomerforkortning og dens antatte effekt på akselerert aldring. I teksten som følger vil vi se på noen av ideene som De Meyer et al. presenterer i sin oversiktsartikkel (9).

Ideen om at telomerer fungerer som en biologisk klokke på cellulært nivå ble først anerkjent da Alexey Olovnikov oppdaget at DNA-replikasjon medførte progressiv telomerforkortning, det såkalte endereplikasjonsproblemet. I normale somatiske celler leder denne telomerforkortningen til kritisk korte telomerer og cellulær aldring, en tilstand karakterisert av fravær av replikasjon og biokjemiske forandringer. Dette forklarer observasjonene av at de fleste cellekulturer bare kan gjennomgå et begrenset antall delinger in vitro, kalt "the Hayflick limit". Videre påvirkes telomerforkortning av at reparasjonen av enkel DNA-trådskaade assosiert med oksidativt stress, er mindre effektiv i telomerisk DNA enn centromerisk DNA (den delen av kromosomet som binder søsterkromatidene sammen). Dette gjør at DNA-forkortning påvirkes av både oksidativt stress og den cellulære antioksidantkapasiteten (Figur 4) (2, 9).



Figur 4

På organismenivå er virkningen av telomerlengde på den komplekse aldringsprosessen, først og fremst vurdert gjennom epidemiologiske tverrsnittstudier. I de fleste tilfeller blir telomerlengden til perifere leukocytter brukt som systemisk telomerlengde, da observasjoner støtter at denne lengden i stor grad gjenspeiles i forskjellig vev. Det synes som systemisk telomerlengde reflekterer funnene in vitro, da det i en populasjon er en klar negativ assosiasjon mellom telomerlengde i leukocytter og personens kronologiske alder. Man antar derfor at telomerlengde i perifere leukocytter også in vivo er en systemisk markør for biologisk alder. Imidlertid er telomerlengde som biomarkør for systemisk aldring fortsatt uavklart. Den kausale sammenhengen vi ser mellom kritisk korte telomerer og cellulær aldring, holder nødvendigvis ikke stand på organismenivå. Det er like sannsynlig at biologiske prosesser som ligger til grunn for alderdom, også påvirker telomerlengde som en konfunderende faktor. Økt nivå av oksidativt stress og inflammasjon er de mest sannsynlige prototypene på slike konfunderende faktorer (9).

2.1 Telomerlengde som en mitotisk klokke

Det nåværende paradigmet om telomerfunksjon, er at telomerer fungerer som en mitotisk klokke som teller antallet celledelinger, og initierer cellulær aldring når en eller flere telomerer er kritisk korte. Som tidligere nevnt kan celler unngå kritisk telomerforkortning, cellulær aldring og oppnå så godt som evig liv, ved å aktivere enzymet telomerase. Denne egenskapen ser vi i stamceller, kimceller og i de fleste tilfeller av kreft. En farmakologisk aktivering av telomerase kan derfor tenkes å være en mulig terapi mot aldersrelatert sykdommer med cellulær aldring. På en annen side er telomeraseinhibitorer blitt foreslått som en ny mulighet for kjemoterapi. Dette illustrerer kompromisset mellom akselerert biologisk aldring, og risiko for kreft (9).

2.2 Faktorer som bestemmer telomerlengde i befolkningen

Hos mennesker er arv estimert til å stå for 40% til 80% av telomerlengden. Nåværende bevis peker mot at telomerlengde nedarves paternalt. Paternal alder ved fødsel er identifisert som en viktig faktor for telomerlengde. Barn av eldre fedre synes å ha lengre telomerer, noe som samsvarer med tidligere funn om at sædcellers telomerlengde øker med donoralder. Etter fødsel reduseres lengden på telomerene gradvis med kalenderår. Hos barn er telomerforkortningsraten større enn hos voksne. Selv om telomerlengde ved fødsel er lik mellom kjønnene, har voksne menn i gjennomsnitt kortere telomerer enn kvinner (9). I følge Statistisk Sentralbyrå vil en 26 år gammel mann bosatt i Akershus kunne forvente å bli 80 år og to måneder, en like gammel kvinne bosatt i samme fylke vil kunne forvente å bli 83 år og ni måneder (10). Dette kan forklares med at menn har en høyere telomerforkortningsrate. En foreslått hypotese er at menn i gjennomsnitt er høyere og større enn kvinner, og flere celledelinger er derfor nødvendig for å oppnå og opprettholde deres kroppsstørrelse. Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor menn i gjennomsnitt har kortere forventet levetid enn kvinner (9).

Siden telomeraseaktivitet er høyere og i større grad regulert hos barn i utvikling, vil spesielt postnatal vektøkning være viktig. Denne teorien imøtekommer Barkerhypotesen, som sier at lavere fødselsvekt vil predisponere barn for aldersrelaterte sykdommer, spesielt hjerte- og karsykdommer, da de må innhente den lave fødselsvekten i tidlig barndom. Deler av denne hypotesen synes å være korrekt, men telomerenes medvirkning er tvilsom. Barn rundt 5 årsalder med lav fødselsvekt ser ut til å ha kortere telomerer, men tverrsnittstudier viser ingen eller bare begrenset assosiasjon mellom telomerlengde og kroppsstørrelse senere i livet. Dette er utilstrekkelig for å forklare forskjellen i telomerlengde mellom menn og kvinner, og til å koble denne forskjellen med kjønnsforskjeller i forventet alder (9).

2.3 Telomerlengde som biomarkør på aldring

Som tidligere nevnt er telomerlengde blitt lagt fram som en markør på biologisk aldring, da det er en klar negativ assosiasjon mellom telomerlengde og personers kronologiske alder. Dette blir støttet av in vitro-resultater på cellulær aldring og telomerforkortning med økt kalenderår, og ytterligere forsterket av at menn har raskere telomerforkortningsrate enn kvinner, som samsvarer med forskjell i forventet levealder mellom kjønn. Dette har ledet til mange studier som ser på mulige assosiasjoner mellom telomerlengde og aldersrelaterte sykdommer. Imidlertid er det uklart om telomerlengde som biomarkør for bestemte sykdommer, skyldes korte telomerer ved fødsel, akselerert telomerforkortning i livet, eller en kombinasjon av de to. Mens korte telomerer ved fødsel først og fremst er genetisk bestemt, avhenger telomerforkortningsraten mest sannsynlig av samspillet mellom genetikk og livsstil. Dette leder til flere mulige scenarier som kan forklare biomarkørrollen til systemisk telomerlengde i aldersrelatert sykdom, der forskjellige sykdommer kanskje krever forskjellige modeller. Det er derfor viktig å forstå forskjellen mellom systemisk telomerlengde da for eksempel i perifere blodleukocytter, og fokal telomerlengde i vev (9).

En teori går på at aldring som fenotype er assosiert, kausalt eller ikke, med oksidativt stress, inflammasjon eller andre telomerforkortningsfaktorer, men ikke cellulær aldring. Hvis denne prosessen virker på systemisk nivå i stor grad, kan dette resultere i at kortere systemisk telomerlengde assosieres med aldring som fenotype. En observasjon som støtter denne mekanismen er at det er observert kortere systemisk telomerlengde hos personer med osteoartrose, mest sannsynlig som følge av oksidativt stress og kronisk inflammasjon (9).

En annen teori foreslår at aldring som fenotype fortrinnsvis bestemmes av en genetisk bestemt telomerlengde ved fødsel, uten at en akselerert telomerforkortningsrate er til stede. Personene er da predisponert for at en aldersrelatert sykdom skal oppstå senere i livet. Hvis dette er tilfelle, vil den høye synkroniteten mellom telomerlengde i ulike vev ved fødsel, antyde at telomerlengde i perifere leukocytter kan være en god biomarkør for fokal telomerlengde. Skjønt dette vil reflektere en kausal sammenheng mellom telomerlengde ved fødsel og levealder (9).

Endelig kan aldring som fenotype være assosiert med både telomerlengde ved fødsel og akselerert telomerforkortning. Dette betyr at det er en kausal sammenheng mellom aldring som fenotype og cellulær aldring. Der telomerlengde ved fødsel er ansvarlig for en aldring som fenotype, vil det være telomerforkortningsraten som bestemmer ved hvilke punkt i livet en kritisk kort telomerlengde vil bli nådd, og fenotypen oppstår (9).

Siden endret telomerforkortningsrate resulterer i forskjellig telomerlengde, vil bare longitudinelle studier være i stand til å tilskrive viktigheten av telomerlengde og/eller telomerforkortningsrate, og dermed kartlegge dynamikken til telomerer og betydningen av telomerlengde som biomarkør i aldring som fenotype (9).

De fleste humane vev og organer viser signifikant telomerforkortning under aldring, deriblant perifere blodceller, lymfocytter, nyreepitel, vaskulære endotelceller, hepatocytter, intestinale epitelceller, lungeepitelceller og muskler. Noen få organer og vev viser ingen signifikant telomerforkortning under aldring. Ved analyse av hel organbiopsi av hjernen, så man ingen signifikant telomerforkortning, men det er uvisst om enkelte subpopulasjoner, som humane neuronale stamceller, kan ha aldersrelatert forkortning. Det er mulig at andre celletyper med telomerforkortning, kan påvirke hjernens funksjon under aldring. I den forbindelse ser man lymfocytter med unormalt korte telomerer hos pasienter med Alzheimers sykdom (4).

Videre korrelerer korte telomerer i perifert blod med dårlig utfall og restfunksjon etter hjerneslag. I samsvar med sitt høye uttrykk av telomerase, opprettholder kjønnsceller lange telomerer ved aldring. Imidlertid ser vi en telomerforkortning i stamceller under aldring, til tross for uttrykk av telomerase (riktignok lave nivåer). En teori er at telomerase i stamceller besørger den store proliferative kapasiteten, men telomerasenivået er ikke tilstrekkelig for å opprettholde stabile telomerer i stamcellers levealder. I tråd med denne hypotesen, er det tenkelig at telomerforkortning bidrar til aldersrelatert reduksjon i stamcellefunksjon. (4).

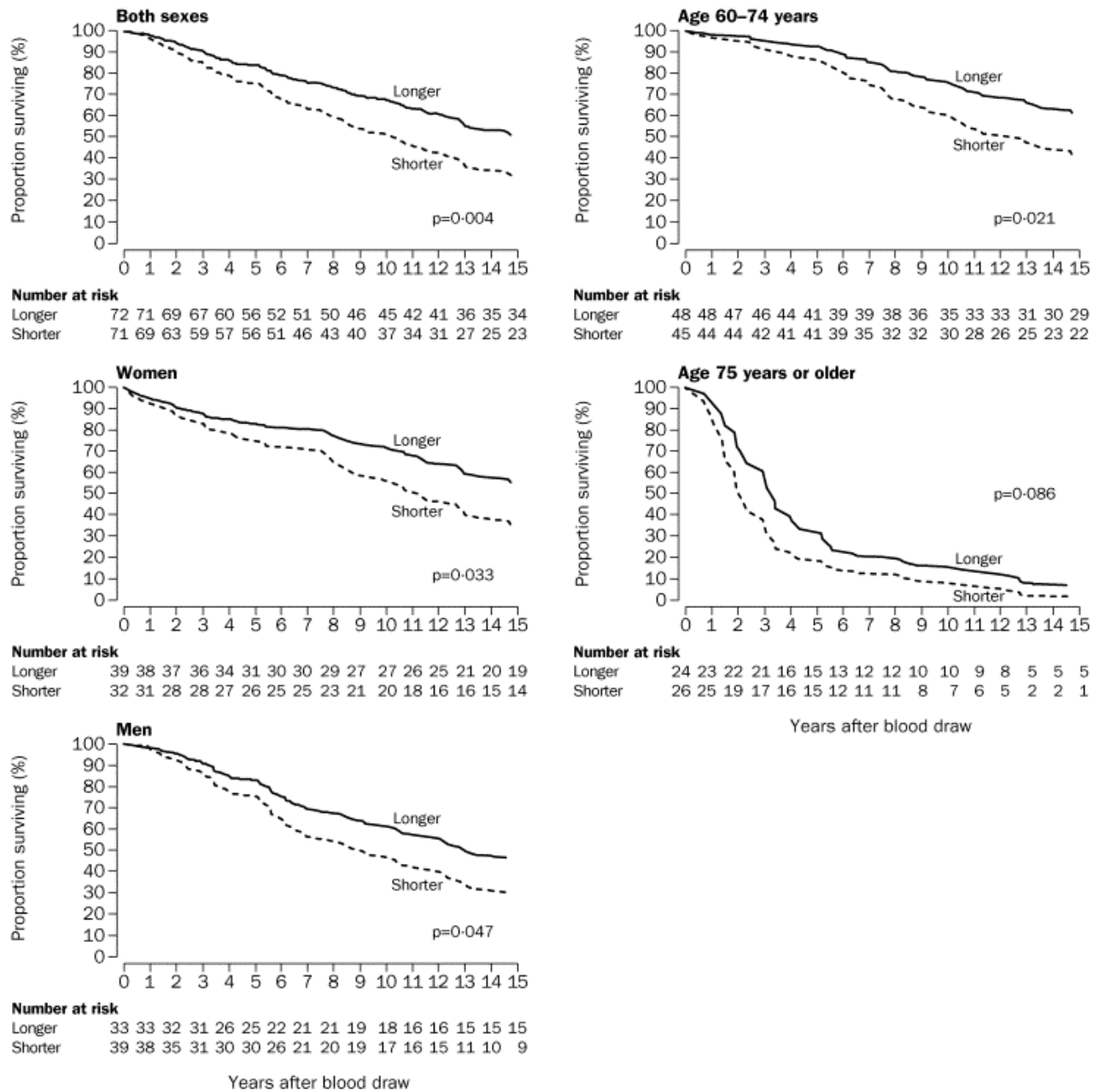
Telomerlengden reduseres med alder i alt mitotisk (som gjennomgår celledeling) vev med unntak av kimbanen (den veien arvestoffet overføres fra generasjon til generasjon) hvor lengden opprettholdes av enzymet telomerase. Pasienter med autosomal dominant dyskeratosis congenita, en medfødt sykdom med progeroide trekk, bærer en mutasjon i genet som koder for TERC. Disse pasientene har kortere telomerer, funn som indikerer akselerert aldring og tidlig død, som regel av infeksjoner sekundært til benmargsvikt. Den korteste gjennomsnittlige telomerlengden i blod-DNA hos normale eldre, overlapper pasienter med dyskeratosis congenita med lengst telomerlengde. Videre samsvarer telomerlengden i blod med vev for øvrig i kroppen hos pasienter med dyskeratosis congenita (11).

Med dette som utgangspunkt, gjorde Cawthon et al. en studie der man ønsket å finne ut om korte telomerer i blod-DNA var assosiert med økt mortalitetsrate fra multiple aldersrelaterte sykdommer. For å undersøke dette, sammenlignet man telomerlengde med overlevelse og dødsårsak hos 143 personer som hadde gitt blod mellom 1982-1986. Medio 2002 var 101 dødsfall kjent, mens de resterende 42 personene ble undersøkt i forhold til når de sist var observert i live. Ved tidspunkt for blodgivning var alle forsøkspersonene mellom 60-97 år, ingen var i slekt, og de hadde ikke en bestemt sykdomstilstand. Ved å måle T/S-ratio (telomere-to-single-copy

gene ratio – som er demonstrert å være proporsjonal med gjennomsnittlig telomerlengde i en celle) relativt til en DNA-prøverefranse, kunne man bestemme størrelsen på TRF, og deretter beregne telomerlengde tilnærmet i antall basepar (bp). Etersom eldre gjennomsnittlig har kortere telomerer enn yngre, og det derfor er uhensiktsmessig å sammenlikne telomerlengde hos 60 og 97 åringer, ble personene i studien inndelt i 6 grupper på bakgrunn av alder ved blodgivning. Gruppene ble også delt inn i halvdel og kvartiler på bakgrunn av telomerlengden. Personene med telomerlengde i nedre halvdel i sin aldersgruppe ble slått sammen, og deres overlevelse ble sammenliknet med personene i den øvre halvdel. Tilsvarende ble utført for nedre kvartil, sammenliknet med personene i øvre 75%. Det var ingen statistisk signifikant forskjell i gjennomsnittlig alder mellom nedre og øvre halvdel innenfor hver gruppe ($p=0,894$), eller nedre og øvre kvartil ($p=0,469$). Coxmodellen ble brukt for å kontrollere variasjoner i mortalitetsrate som skyldes aldersforskjeller, både mellom og innad i aldersgruppen (11).

Telomerlengden hos personene varierte fra 1930 til 4310 bp, og for hvert år fra blodgivning ble omkring 14 bp tapt. Man så ingen signifikant forskjell i telomerforkortningen mellom menn og kvinner ($p=0,645$). Kvinners telomerer var 3,5 % lengre enn menns etter aldersjustering, men funnet var ikke statistisk signifikant ($p=0,157$). Personene i halvdel med kortest telomerer hadde nesten dobbel så høy mortalitetsrate, med en ratio på 1,86 (95 % konfidensintervall (KI) 1,22-2,83, $p=0,004$), i forhold til den øvre halvdel. Tapet i median levealder assosiert med kortere telomerer var 4,8 år for kvinner ($p=0,033$) og 4,0 år for menn ($p=0,047$). Telomerlengde var en signifikant prediktor for mortalitet for personer mellom 60-74 år ($p=0,021$), og en moderat prediktor for de over 75 år ($p=0,086$) (Figur 5). Personene med telomerlengde i nedre halvdel hadde 3,18 høyere mortalitetsratio for hjertesykdom (95 % KI 1,36-7,45, $p=0,0079$), sammenliknet med den øvre halvdel. Videre hadde de 25 % i nederste kvartil 8,54 ganger høyere mortalitetsratio fra infeksjøs sykdommer (95 %

KI 1,52-47,9, $p=0,015$), sammenlignet med de 25% i øverste kvartil. Man fant ingen signifikant sammenheng mellom telomerlengde og cerebrovaskulære sykdom eller kreft (11).



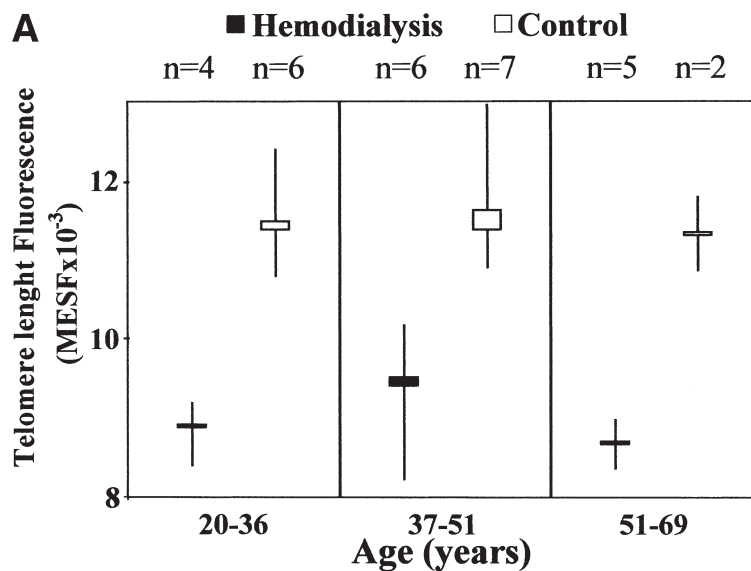
Figur 5

Disse resultatene støtter hypotesen om at telomerforkortning bidrar til økt mortalitetsratio for flere aldersrelaterte sykdommer. Alternativt kan det hende at telomerforkortning ikke påvirker mortalitet, men blir kontrollert av biologisk aldring som øker mortalitetsraten ved andre mekanismer. Telomerlengde kan påvirkes av flere faktorer, som telomeraseaktivitet, antall celledelinger og oksidativt stress, som igjen vil kunne påvirkes av miljø og genetiske faktorer (11).

I en kasus-kontrollstudie ønsket man å studere akselerert cellealdring i blodceller hos hemodialysepasienter. Til dette så man på perifere mononukleære celler fra 15 hemodialysepasienter og 15 jevnaldrene kontroller. Vanligvis gjennomgår uremiske pasienter hemodialyse tre ganger per uke, og hos disse pasientene vil de perifere mononukleære blodcellene aktiveres ved hver hemodialyseprosedyre. Man ønsket å se om gjentatt stimulerte mononukleære blodceller kan innta telomeravhengig celledelingsarrest, såkalt stressindusert prematur aldring, som et resultat av stadig aktiveringsindusert replikasjon. Karakteristiske trekk ved aldrende mononukleære blodceller inkluderer telomerforkortning, økt uttrykk av p53, forandret uttrykk av celleoverflatemolekylene CD14/CD16 og overproduksjon av interleukiner. Således kan prematurt aldrende celler identifiseres hvis disse karakteristikkene er til stede, og studeres med flowcytometri, hvis hensikt er analyse og sortering av celler i løsnings- og studere cellens egenskaper (12).

Telomerforkortning var tilstede i 40 ± 6 % av cellene fra hemodialysepasientene mot under 5% hos kontrollene, og gjennomsnittlig telomerlengden i de to gruppene var henholdsvis $8,2 \pm 0,4$ mot $11,5 \pm 0,7$ ($p < 0,001$) (Figur 6). Prosentandelen av cellene med korte telomerer korrelerte positivt med serumnivået av CRP ($r = 0,74$, $p = 0,007$), som reflekterer inflammasjon. Dette funnet støtter teorien om at celler med korte telomerer har en rolle i kronisk inflammasjon hos disse pasientene, men en endelig patofysiologisk forklaring på dette er fortsatt ikke kjent.

Uttrykk av p53 var økt i mononukleære blodceller fra hemodialysepasienter, og høyt uttrykk av p53 var observert i $39 \pm 5\%$ av cellene, mens resten av cellene viste samme p53-nivå som kontrollgruppen. Mononukleære celler fra hemodialysepasienter med redusert telomerlengde, viste i hovedsak CD14dim/CD16brightfenotype, mens celler med normal telomerlengde presenterte CD14bright/CD16dimfenotype. Endelig produserte mange mononukleære blodceller fra hemodialysepasienter spontant de proinflammatoriske cytokinene IL-1 β ($29,5 \pm 6\%$) og IL-6 ($31,1 \pm 5\%$), mens bare en liten prosentandel av kontrollcellene var cytokinproduserende (12).



Figur 6

Studien viser tilstedeværelse av en prematurt aldrende subpopulasjon av perifere mononukleære blodceller hos 30-47 % av hemodialysepasientene. Disse aldrende cellene resulterer sannsynligvis fra repetert aktivering, og kan ha en patofysiologisk rolle i den kroniske inflammasjonen som er beskrevet hos hemodialysepasienter (12).

B. Telomerer og telomerase ved forskjellige sykdomstilstander

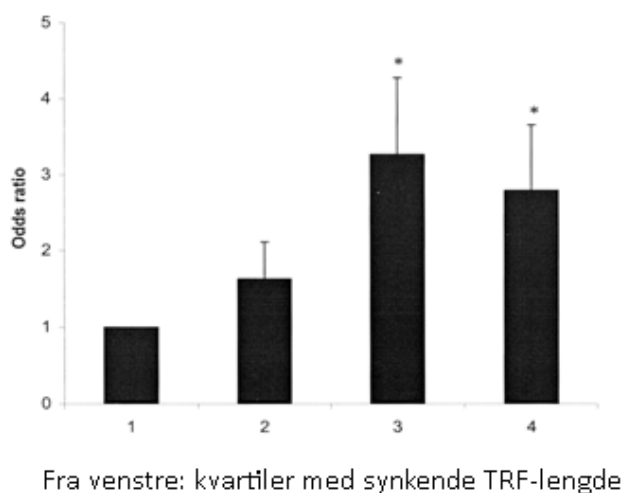
1. Kardiovaskulære sykdommer

Telomerlengde og telomerforkorting er antatt å ha en direkte korrelasjon med biologisk aldring og kardiovaskulære sykdommer. Fordi kardiovaskulære sykdommer ofte er aldersbetingete sykdommer (forekomst øker med alder), er det tenkt at telomerlengde kan være en viktig markør for risiko for nettopp denne typen sykdommer og også ha en prediktiv egenskap med tanke på utvikling av kardiovaskulær sykdom. Det er gjort studier der kortere telomerer ble påvist hos personer som hadde diabetes, økt pulstrykk (systolisk minus diastolisk blodtrykk), degenerativ aortastenose, økt insulinresistens, økt fysiologisk stress, gjennomgått hjerteinfarkt i ung alder, økt risiko for død som følge av kardiovaskulær sykdom og hos personer som røykte. Men ikke alle disse resultatene kunne påvises i andre studier (3).

I en kasus-kontrollstudie ble lengden på telomerer i hvite blodceller sammenliknet med risiko for å få hjerteinfarkt i ung alder. Bakgrunnen for studien var at en del av de samme forskerne i den ovennevnte studien tidligere hadde funnet i en annen studie at gjennomsnittlig terminalt restriksjonsfragment (TRF) var signifikant kortere hos personer der alle tre koronararteriene viste aterosklerose ved angiografi sammenliknet med personer med normal angiografi (13).

Det ble i studien påvist en signifikant sammenheng mellom gjennomsnittlig TRF-lengde og tidlig hjerteinfarkt. Gjennomsnittlig TRF-lengde ble delt opp i kvartiler (lengst i kvartil 1, kortest i kvartil 4) og for de to kvartilene med kortest telomelengde, var odds ratio for hjerteinfarkt henholdsvis 3,27 (kvartil 3, $p < 0,0001$, 95 % KI 1,79-5,97) og 2,79 (kvartil 4, $p = 0,0001$, 95 % KI 1,53-5,11) sammenliknet med kvartilet med lengst telomerlengde) (Figur 7). For begge kjønn i både kasus-gruppen og kontroll-gruppen i denne studien var gjennomsnittlig årlig tap av telomerlengde 26,4 basepar.

Gjennomsnittlig forskjell på TRF hos personer med aterosklerose (kasuser) i de tre koronararteriene sammenliknet med personer med normal angiografi (kontroller) var $299,7 \pm 69,3$ basepar – dette representerer dermed en biologisk aldersforskjell på elleve ($299,7/26,4 = 11,35$) år ($p < 0,0001$) (13).



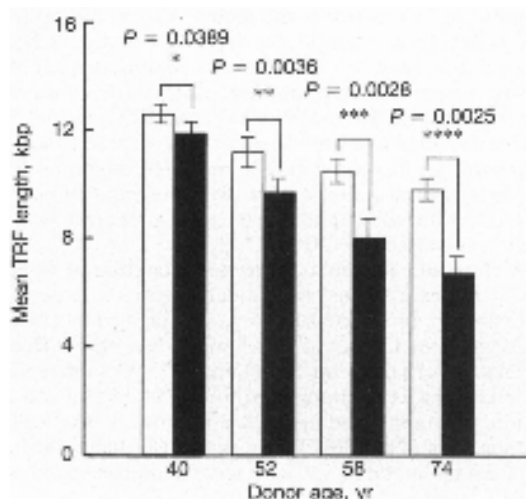
Figur 7

I en annen studie ble telomerlengden i leukocytter brukt for å undersøke mortalitet hos pasienter med koronarsykdom (aterosklerose i koronararteriene). Deltakerene i studien, 780 personer, ble delt inn i kvartiler med 195 personer i hvert kvartil som representerte deres telomerlengde. I løpet av en gjennomsnittlig oppfølgingstid på 4,4 år var det 166 dødsfall blant de 780. Det viste seg å være en signifikant forskjell i andel døde i hvert kvartil ($p=0,04$). Det var 54 dødsfall i kvartilet med kortest telomerlengde og 31 dødsfall i kvartilet med lengst telomerlengde. Etter aldersjustering var risikoen 1,8 ganger så høy i kvartilet med kortest telomerlengde ($p=0,008$, 95 % KI 1,2-2,9) (14).

I en (kvalitativ) studie undersøkte man telomerlengde til endotelceller, da gjentatte skader på endotel med påfølgende celleomsetning fra tunica intima og media, er delaktig i dannelsen av aterosklerose. Man ønsket å se på om telomerlengde i endotelceller, er en markør for replikativ alder og

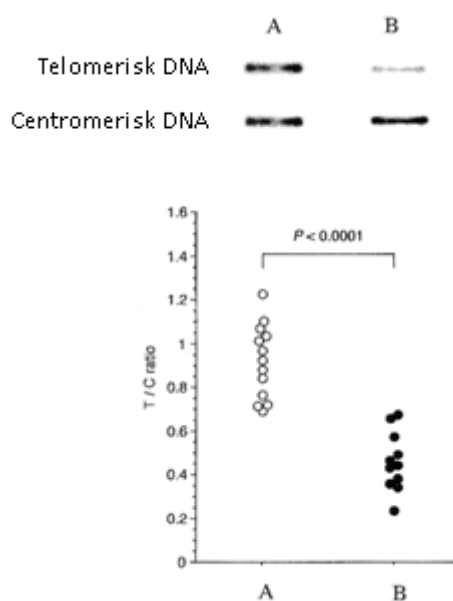
delingskapastitet i humant vaskulært vev. Til dette ble humane endotelceller fra vena umbilicalis og arteria og vena iliaca samlet inn for in vitro-studier. Vevsprøver fra aorta, samt arteria og vena iliaca ble innhentet med autopsi 4-24 timer post mortem fra 13 personer i alderen 3 – 102 år for in vivo-studier. Telomerlengde (TRF) ble vurdert med Southern Blot-analyse (metode for å detektere spesifikke DNA-sekvenser) (15).

Gjennomsnittlig TRF-lengde ble redusert som en funksjon av populasjonsdoblinger i humane endotelceller i kultur fra vena umbilicalis, samt arteria og vena iliaca. Når endotelceller ble undersøkt for gjennomsnittlig TRF-lengde in vivo som funksjon av donoralder, så man en signifikant større reduksjonsrate hos celler i arteria iliaca enn i vena iliaca (102 bp/år vs. 47 bp/år, $p < 0,05$). Disse tallene samsvarer med høyere hemodynamisk stress og økt celleomsetning i arteriene. Man så videre at telomerforkortningsraten som funksjon av donoralder, var større i DNA fra intimaceller i arteria iliaca, sammenlignet med intimaceller fra arteria thoracica interna (147 bp/år vs. 87 bp/år, $p < 0,05$), en region av arterietreet som er gjenstand for mindre hemodynamisk stress, og som indikerer at effekten ikke er vevsspesifikk (Figur 8). DNA fra vev i tunica media fra arteria iliaca og arteria thoracica interna, viste ingen signifikant forskjell i telomerforkortningsraten. Dette tyder på at kronisk stress leder til cellulær aldring, og at denne er mer uttalt i intima enn i media. Endotelceller in vitro opplever telomerforkortning som en funksjon av replikativ alder, mens in vivo vil telomerforkortningen generelt være størst i vev som er involvert i, eller påvirket av, aterogenesen. Studien viser at telomerlengde kan anvendes til å monitorere replikasjonshistorien til vev som er involvert i aterosklerose, og at replikativ aldring i vaskulære celler kan spille en kritisk rolle i aterogenesen (15).



Figur 8

Aldersbetinget endotel dysfunksjon er også en risikofaktor for utvikling av kardiovaskulær sykdom. Det ble i en studie vist at telomerlengden i endotelceller fra koronararterier var signifikant lavere hos pasienter med koronarsykdom enn hos alderssammenliknbare personer uten ($p < 0,00001$). Dette ble vist ved hjelp av T/C-ratio som sier noe om forholdet mellom telomerisk (T) og centromerisk (C) DNA i et kromosom, og dermed lengden på telomeren i det aktuelle kromosomet (Figur 9) (16).



Figur 9

T/C-ratio for personer med aterosklerose: $0,462 \pm 0,135$.

T/C-ratio for personer uten aterosklerose: $1,002 \pm 0,212$.

I samme studie ble det også vist at telomerene i endotelcellene hos personer med koronarsykdom var kortere i segmenter av arteriene der det var aterosklerose enn i segmenter uten aterosklerose ($p < 0,05$) (16).

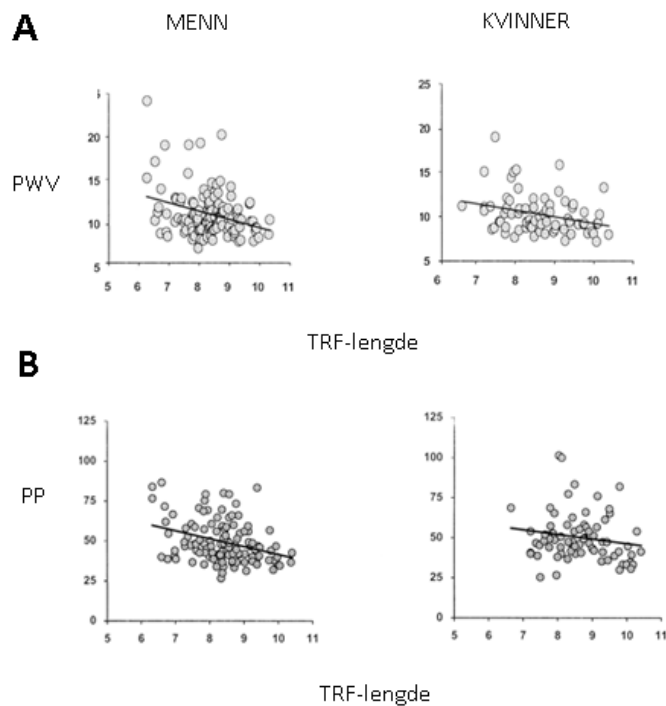
Statinbehandling har vist seg å hindre forkorting av telomerer i endotelprogenitorceller (EPC). Opprettholdelse av endotelets funksjon og integritet er viktig for å hindre utvikling av aterosklerotiske plakk.

Endotelprogenitorcellene står for dette. De fjerner endotelceller som er apoptotiske eller skadet på grunn av kardiovaskulære risikofaktorer. Få endotelprogenitorceller kan lettere føre til dannelse av aterosklerotiske plakk. I en studie ble det undersøkt om behandling med lipidsenkende medikamenter forhindret telomerforkorting i endotelprogenitorceller. I studien ble 100 personer med stabil koronarsykdom sammenliknet med 25 personer uten koronarsykdom (17).

Av de 100 med koronarsykdom fikk 50 personer 10 mg atorvastatin daglig (ansett som intensiv lipidsenkende behandling) og 50 fikk 10 mg pravastatin daglig (ansett som moderat lipidsenkende behandling). Disse hundre hadde ikke tidligere fått statinbehandling. Oppfølgingstiden var tolv måneder. Ved starten av studien var det ingen forskjell på kolesterolnivåene i de to gruppene som skulle få lipidsenkende behandling ($p < 0,05$). Telomerlengde i gruppen med koronarsykdom sammenliknet med gruppen uten koronarsykdom var ved studiestart 31 % kortere ($p < 0,05$). Hos begge gruppene var det nedgang i LDL- og totalkolesterol og økning i HDL-kolesterol. I den gruppen der det ble gitt intensiv lipidsenkende behandling, var det en statistisk signifikant større nedgang i både LDL-kolesterol (30 % mot 17 %, $p < 0,01$) og totalkolesterol (43 % mot 30 %, $p < 0,01$), og statistisk signifikant økning i HDL-kolesterol (34 % mot 13 %, $p = 0,03$). Når det gjaldt antall sirkulerende endotelprogenitorceller, viste det seg at intensiv lipidsenkende behandling førte til en statistisk

signifikant økning fra 79,1 til 100,5 celler per mm², $p < 0,01$. For den moderate lipidsenkende behandlingen var det en økning på 76,1 til 79,9 celler per mm², men denne økningen var ikke statistisk signifikant. Når det gjaldt telomerlengden i endotelprogenitorcellene, var det ingen endring i telomerlengden hos dem med intensiv behandling, dette funnet var ikke signifikant. Men telomerene viste ved hjelp av fluorescensmåling 12,4 % mindre skade som følge av oksidativt stress ($p < 0,01$). For gruppen som fikk moderat behandling med lipidsenkende medikamenter, var telomerene etter tolv måneder 3,9 % kortere ($p < 0,05$), mens skade som følge av oksidativt stress, viste 2,2 % mindre skade (ikke statistisk signifikant). En mulig forklaring på hvorfor atorvastatin forhindrer aldring av endotelcellene er fordi atorvastatin fører til lavere nivåer av frie oksygenradikaler inne i endotelcellene. En mulig forklaring på hvorfor ikke pravastatin har samme effekt, er fordi atorvastatin er mer lipofilt og derfor lettere kan trenge gjennom cellemembranen til endotelcellene. Det er også en mulighet at atorvastatin har større antioksidantegenskaper enn pravastatin (17).

Kronologisk aldring er hovedrisikofaktoren for stivhet i store arterier. Dette er igjen en risikofaktor for kardiovaskulær sykdom. I en fransk (kohort) studie ble det undersøkt om kortere telomerer (TRF) hadde signifikant sammenheng med økt pulstrykk (PP) og økt pulsølgehastighet (PWV) (to faktorer som tyder på økt arteriell stivhet). For menn ble det vist statistisk negativ korrelasjon mellom økt pulsølgehastighet og lengden på TRF ($r = -0,31$, $p = 0,001$) og mellom pulstrykk og TRF-lengde ($r = -0,34$, $p = 0,0002$). For kvinner kunne det ikke vises en signifikant sammenheng (negativ korrelasjon) mellom TRF og pulstrykk ($r = -0,17$, $p = 0,15$), kun pulsølgehastighet ($r = -0,29$, $p = 0,02$) (Figur 10) (18).



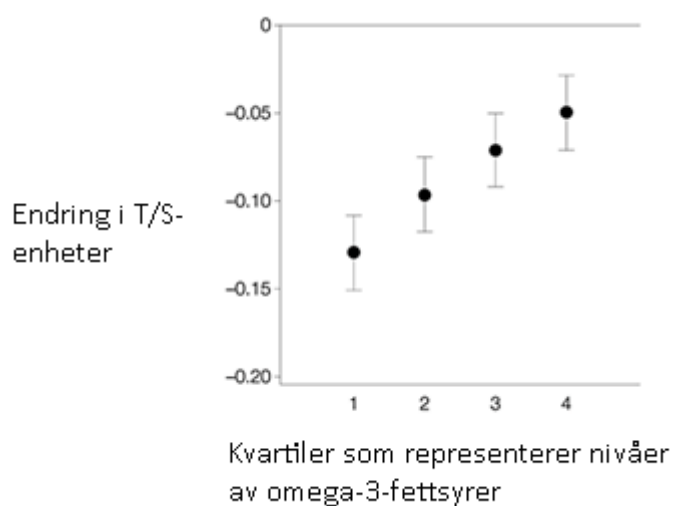
Figur 10

Telomerlengde i leukocytter kan forutsi morbiditet og mortalitet hos pasienter med kardiovaskulær sykdom. En rekke epidemiologiske studier har avdekket at personer med kjent kardiovaskulær sykdom har større overlevelse dersom de har et høyt inntak av omega-3-fettsyrer (19).

Hva mekanismen bak dette er, er ikke fullstendig kartlagt. I en longitudinell studie med 608 personer ble det i løpet av en femårsperiode undersøkt om nivåene av omega-3-fettsyrer i blodet hadde sammenheng med telomerforkorting i leukocytter. Personene i studien ble delt opp i kvartiler ut fra deres nivåer av omega-3-fettsyrer. Personen i kvartilet med lavest nivåer av omega-3-fettsyrer (kvartil 1), hadde størst forkorting av telomere. Sammenliknet med personene i gruppen med høyest nivåer av omega-3-fettsyrer (kvartil 4) hadde de en forkorting på 0,13 (95 % KI 0,09-0,17) T/S-enheter (telomere-to-single-copy gene ratio – et mål på forhold mellom telomerasekvenser og betaglobin-DNA i kromosomet) mot 0,05 (95 % KI 0,02-0,08) T/S-enheter for dem med høyest nivå av omega-3-

fettsyrer ($p < 0,01$) (Figur 11). Dette resultatet indikerer at omega-3-fettsyrer kan hindre den biologiske aldringsprosessen (19).

Tilskudd av omega-3-fettsyrer i kosten har vist økt overlevelse hos personer med gjennomgått hjerteinfarkt. Positiv helseeffekt av omega-3-fettsyrer er også vist ved en rekke andre tilstander hos dyr og mennesker som for eksempel stive blodkar, sviktende kognitiv funksjon, makuladegenerasjon og forventet levealder hos gnagere (så mye som en tredel). Redusert forkortning av telomerer er en mulig forklaring på dette (19).



Figur 11

En mulig forklaring på hvorfor omega-3-fettsyrer bremser telomerforkorting kan forklares ut fra forståelsen av oksidativt stress og hvordan oksidativt stress øker forkorting av telomerer.

Oksygenradikaler, som dannes pga. oksidativt stress, angriper særlig GGG-baserekker i telomerer (telomerer består som nevnt av repeterende sekvenser av nukleobasene TTAGGG) og fører til økt telomerforkorting under mitosen. Et økt inntak av omega-3-fettsyrer fører til lavere nivåer av F2-isoprostaner, et anerkjent mål på systemisk oksidativt stress, og høyere nivåer av antioksidantene katalase og superoksid dismutase. Resultatet av

dette vil være økt hemming av de frie radikalene og derfor begrense den negative effekten av oksidativt stress på telomerene. En annen mulig forklaring på omega-3-fettsyrenes beskyttende effekt på telomerene kan være en økt aktivitet i enzymet telomerase. Det var tidligere antatt at telomerase kun fantes i stamceller, kreftceller og kjønnseller. Det har imidlertid blitt påvist telomeraseaktivitet i perifere blodceller. Det viste seg at omega-3-fettsyrer bidro til økt telomeraseaktivitet i nettopp denne typen celler. På den annen side ble det i adenocarcinomceller fra colonkreft vist at omega-3-fettsyrer førte til nedsatt telomeraseaktivitet (19).

Det er sannsynlig at telomerlengde ikke er den risikofaktoren som har størst betydning for utvikling av kardiovaskulær sykdom. Som nevnt over, er disse typer sykdommer ofte aldersbetinget. Histologisk er cellealdring en viktig faktor i dannelsen av aterosklerotisk plakk, og in-vitro aldringsinduksjon av endotelceller i hjertet, fører til uttrykk av molekyler som er involvert i aterogenesen. Dette har bidratt til, i alle fall delvis, at hypotesen om at individuelle forskjeller i risiko for kardiovaskulær sykdom har sammenheng med variasjonen i biologisk aldring (13).

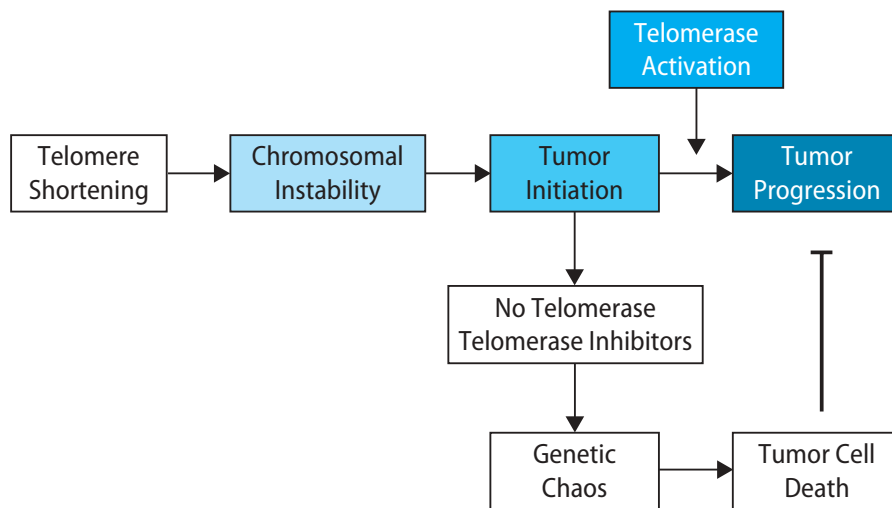
2. Kreft- og blodsykdommer

Insidensen av kreft øker kraftig med alder, og kreft kan således ses på som en aldersrelatert sykdom. Telomerforkortning synes å ha en todelt rolle i kreftutvikling. Opprinnelig tenkte man at telomerforkortning begrenset levetiden til humane celler, og dermed virker som en tumorsuppressormekanisme. I følge denne hypotesen må kreftceller stabilisere telomerene for å oppnå udødelig proliferativ kapasitet, og man ser i over 90% av krefttilfeller en sterk reaktivering av telomerase for å sikre dette. Det kan da virke motstridende at de aller fleste kreftceller har veldig korte telomerer, og vesentlig kortere enn omliggende ikke-transformert vev (4).

Studier på mus med defekt telomerase, har sørget for en plausibel forklaring på dette tilsynelatende paradokset. Disse studiene har vist at telomerdysfunksjon inducerer kromosomal instabilitet (CIN), og dermed øker kreftinitieringsraten. Telomerdysfunksjon inducerer DNA-skaderespons, inkludert aktivering av DNA-reparasjon. Den vanligste veien for DNA-reparasjon i humane celler er ikke-homolog endesammenbinding (NHEJ – non homologous end junction), hvis funksjon er å reparere dobbeltrådet DNA-brudd. Aktivering av NHEJ fører til dannelse av kromosomale fusjoner, som respons på telomerdysfunksjon. I tillegg har det blitt vist at NHEJ-uavhengige mekanismer kan inducere kromosomale fusjoner, som respons på telomerforkortning. Når celler med fuserte kromosomer entrer celledyklus, må fusjonen brytes i anafasen, stadiet der kromosomene beveger seg til de motliggende polene under mitosen. Denne prosessen leder til tap og vinn av DNA i dattercellene. Ytterligere er det generert nye bruddpunkter i DNA-tråden, som vil inducere en ny runde med fusjoner og brudd i neste runde av celledeling. Denne "fusjon-brudd-syklusen", kan bidra til akkumulering av CIN i aldrende humane celler, og således til akkumulering av genetiske endringer som leder til cellulær transformasjon. Studier på TERC -/-mus har vist at tap av sjekkpunkt gener (spesielt p53), samarbeider med telomerdysfunksjon om å inducere CIN og kreftinitiering (4).

I kontrast til økning i kromosomal instabilitet (CIN) og tumorinitiering, hemmer telomerforkortning utvikling av kreft og formasjon av makroskopisk tumor i TERC -/-mus. Svekket tumorutvikling i telomerdysfunksjonelle mus, korrelerer med en akkumulering av høye nivåer av CIN- og DNA-skade i tumorceller, svekket tumorcelleproliferasjon, og økt frekvens av tumorcelleapoptose. Sammen indikerer disse studiene at telomerforkortning har en todelt rolle i kreft. På en side kan det øke kreftinitiering, ved å inducere kromosomal ustabilitet og genetiske forandringer som leder til cellulær transformasjon. På en annen side trenger kreftceller å stabilisere telomerforkortningen, for å unngå

akkumulering av for høye nivåer av ustabilitet som til slutt vil drepe kreftcellen (Figur 12). Ved å aktivere telomerase kan kreftceller oppnå stabiliseringen av telomerene og sikre kreftutvikling. Telomeraseinhibitorer er derfor et lovende forskningsområde for å behandle humane telomerasepositive kreftformer (4).



Figur 12

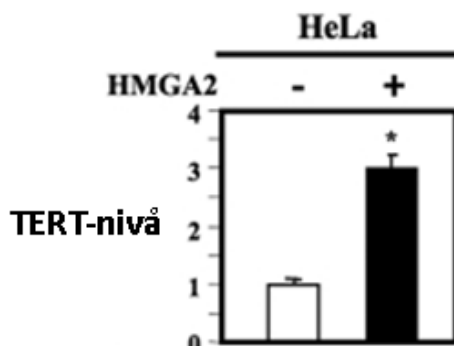
Uttrykk og aktivering av telomerase, samt bortfall av p53, er observert i de fleste krefttilfeller. Motsatt har forsterket p53-respons vist seg å gi økt kreftresistens, kortere levetid og tidlig aldringsassosierte fenotyper i studier på mus. I begge tilfeller ser aldring ut til å delvis drives av en gradvis utmattelse av funksjonsevnen til stamceller. Sammenhengen mellom p53 og telomerer illustreres videre ved Li-Fraumenisyndrom (LFS), et syndrom som predisponerer for kreft og er assosiert med p53-mutasjon i kjønncellerekken. Det har vist seg at progressiv kreftdebut i tidlig alder hos LFS-pasienter, er relatert til en reduksjon i telomerlengde for hver generasjon (2).

I cellulære in vitro modeller fra mange forskjellige celletyper, har overuttrykk av TERT vist seg å øke proliferasjon og celleoverlevelse signifikant. In vivo funn i tumormodeller hos dyr, viser at TERC oppreguleres tidlig i karsinogenesen og at telomerase blir først aktivert i sent stadium av

kreftutvikling. Overuttrykk av TERT har vist seg å være assosiert med spontan brystepitelialneoplasi og invasivt carcinom i aldrende mus, og uttrykk av TERT i thymocytter fremmer T-cellelymfom. Uttrykk av TERC på grunn av tilstedeværelsen av multiple genkopier, har blitt assosiert med cervikal dysplasi og invasiv kreftprogresjon (2).

Karsinogenesisen er ofte assosiert med oppregulering av det regulatoriske genet c-MYC, som kan induseres ved retroviral insersjon eller translokasjon. c-MYC-bindingssekvenser er beskrevet inne i TERT-promotoren, og MYC-proteinet stimulerer TERT-transkripsjon. Uttrykk av TERT kan tillate overaldrende celler til å proliferere forbi krisestadiet, og mutert MYC kan dermed bidra til karsinogenese og tumorprogresjon (2).

HMGA2-genet er et gen hvis protein ofte sees i økte mengder ved flere typer kreft, og det antas å ha en viktig rolle i tumorigenesen. Tidligere har mekanismen bak hvordan HMGA2 påvirker tumorigenesen vært ukjent. En studie har vist at HMGA2 påvirker reguleringen av TERT, telomerasens katalytiske subenhet, og i så måte øker cellenes celledelingspotensiale hvilket er en viktig faktor i tumorigenesen. Såkalte HeLa-celler (celler som i utgangspunktet har et lavt uttrykk av HMGA2) ble brukt. Celler med og uten HMGA2 ble sammenliknet, og det viste seg at celler med HMGA2 hadde tre ganger så høy telomeraseaktivitet ($p < 0,05$) (Figur 13) (20).

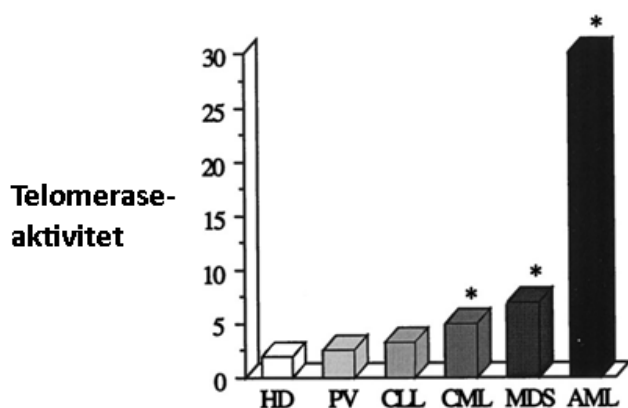


Figur 13

I en prospektiv studie ble det undersøkt om det var sammenheng mellom telomerlengde ved studiestart og henholdsvis kreftforekomst og kreftdødelighet hos 787 personer. I løpet av en tiårsperiode fikk 92 av 787 personer kreft. Telomerlengde (i leukocytter) ble målt ut fra T/S-ratio. Det viste seg at telomerlengde ved studiestart var signifikant kortere hos dem som utviklet kreft (telomerlengde: 1,12, 95 % KI 1,01 – 1,23) mot dem som forble friske (telomerlengde: 1,53, 95 % KI 1,47 – 1,59), $p < 0,001$. Hos dem med aller kortest telomerer ved studiestart, ble det vist en paradoksal økning i telomerlengden, noe som tyder på økt telomeraseaktivitet og dermed økt celledelingspotensiale/potensiell karsinogenese. Av de 92 som fikk kreft, døde 44 personer. De 787 ble delt opp i tre grupper på bakgrunn av deres telomerlengde ved studiestart. Sammenliknet med gruppen med de lengste telomerene, var HR (hazard ratio) for kreftmortalitet 5,63 (95 % KI 1,27 – 24,98) for gruppen med middels lange telomerer og 11,11 (95 % KI 2,61 – 47,36) for gruppen med kortest telomerer, $p < 0,001$ (21).

I en kasus-kontroll-studie ble telomeraseaktivitet og telomerlengde i hematopoetiske progenitorceller fra perifert blod og beinmarg hos 93 pasienter med enten akutt eller kronisk myelogen leukemi, kronisk lymfatisk leukemi, polycytemia vera eller myelodysplastisk syndrom sammenliknet med 108 friske personer. Når det gjaldt telomeraseaktiviteten var den uforandret hos pasienter med polycytemia vera og kronisk lymfatisk leukemi. Det var en moderat, men likevel statistisk signifikant, økning hos pasienter med kronisk myelogen leukemi og myelodysplastisk syndrom og 18 ganger så høy hos pasienter med akutt myelogen leukemi ($p < 0,05$) (Figur 14). Telomerlengden var signifikant kortere i celler fra pasienter med akutt myelogen leukemi og kronisk myelogen leukemi ($p < 0,01$) og polycytemia vera og myelodysplastisk syndrom ($p < 0,05$) og ikke signifikant forskjellig hos pasienter med kronisk lymfatisk leukemi. Pasienter (med leukemi) som fikk moderat kjemoterapibehandling (under seks runder) hadde signifikant lengre telomerer enn pasienter som fikk omfattende kjemoterapibehandling (mer enn seks runder) med en

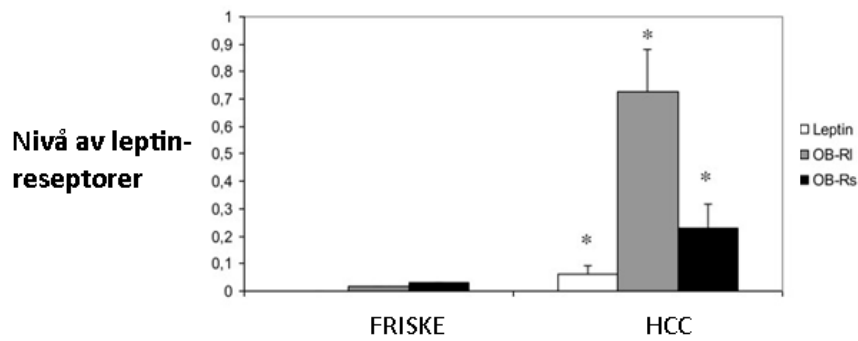
gjennomsnittlig telomerlengde på 6,4 kbp (kilobasepar) mot 5,0 kbp ($p < 0,0001$). Pasienter som ikke fikk kjemoterapi hadde en gjennomsnittlig telomerlengde på 6,5 kbp. Disse funnene sett under ett kan indikere at den initiale kjemoterapibehandlingen eliminerte den leukemiske celleklonen og at den mer omfattende behandlingen forkortet telomerene hos normale, friske celler. Man kan heller ikke se bort fra at grunnen til disse funnene kan være at pasienter med behov for mer omfattende kjemoterapi i utgangspunktet hadde flere leukemiske celler, og at det er grunnen til at de har gjennomsnittlig kortere telomerer enn de som fikk moderat behandling (22).



Figur 14

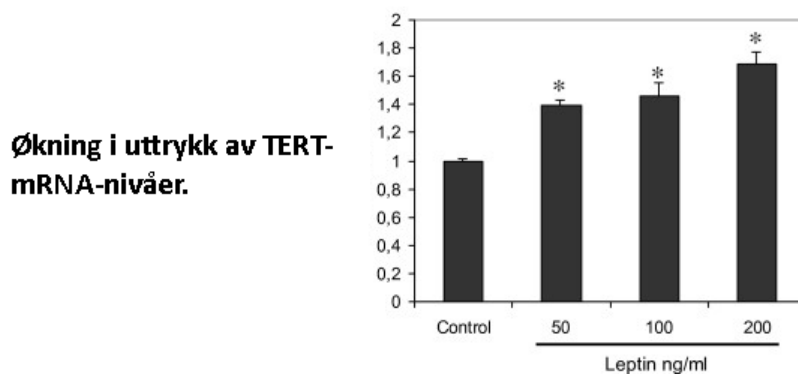
En rekke epidemiologiske studier har vist sammenheng mellom hepatocellulært karsinom og overvekt. I en studie ble det undersøkt om det var noen sammenheng mellom leptin, biomarkør for overvekt, hepatocellulært karsinom og TERT. TERT kan forårsake nærmest ubegrenset celledelingspotensiale gjennom oppbygning av telomerene. TERT blir vanligvis undertrykt i normale somatiske celler etter fødsel. Leverprøver hos 23 personer uten leversykdom ble sammenlignet med leverprøver fra 23 personer med kjent hepatocellulært karsinom. For å se på leptins mulige maligne egenskaper, ble leptin og leptinreseptornivåer i de aktuelle levercellene undersøkt. Hos 18 av 23 med hepatocellulært karsinom (HCC), ble det funnet leptin i levercellene. Det var signifikante

høyere nivåer av to leptinreseptorer (OB-RI og OB-Rs) i levercellene med kreft sammenliknet med de friske cellene (OB-RI: $0,726 \pm 0,155$ mot $0,0165 \pm 0,0031$, OB-Rs: $0,227 \pm 0,092$ mot $0,0292 \pm 0,00194$, $p < 0,001$) (Figur 15) (23).



Figur 15

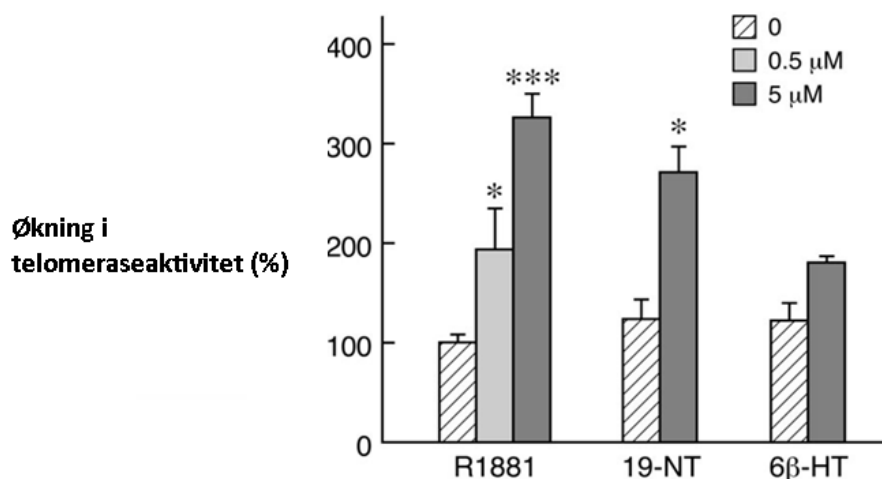
Videre ble det undersøkt om det var sammenheng mellom uttrykk av leptin og uttrykk av TERT, noe det viste seg å være ($r=0,79$, $p < 0,05$). Denne sammenheng mellom leptin og TERT gjorde at forskerne i den aktuelle studien ville se på hvordan TERT i celler fra HepG2 (leverceller tatt fra en 15 år gammel gutt med hepatocellulært karsinom) reagerte på leptinstimulering. Celler fra HepG2 fikk 50, 100 og 200 ng/ml leptin over et gitt tidsrom. Sammenliknet med friske leverceller, førte dette til en henholdsvis økning i uttrykk av TERT og telomeraseaktivitet på ca. 40, 45 og 70 %, $p < 0,05$ (Figur 16) (23).



Figur 16

Androgener er brukt som behandling der beinmargen svikter, for eksempel hos personer med dyskeratosis congenita eller aplastisk anemi. Som beskrevet i avsnitt over, er abnorm opprettholdelse av telomeraseaktivitet en viktig faktor ved en rekke sykdommer. Dyskeratosis congenita, en sykdom der anemi er en av flere tilstander som opptrer hos personer med sykdommen, er et eksempel på en sykdom med mutasjoner i gener som koder for blant annet TERT og TERC. Mutasjoner i disse genene er også genetiske risikofaktorer for aplastisk anemi, selv om dette ikke er den vanligste årsaken til denne sykdommen. Disse mutasjonene fører til lav telomeraseaktivitet, korte telomerer i leukocytter og redusert hematopoetisk funksjon. Androgener har blitt brukt som behandling for beinmargssvikt siden 1960-tallet, men hvordan terapien fungerer på hematopoesen vites ikke (24).

I en studie ble det forsøkt kartlagt hvordan androgene virker på telomeraseaktivitet og α -uttrykk i perifere lymfocytter og T-celler fra beinmarg. 20 ml blod ble hentet fra tre friske personer med mutasjoner, og samme mengde blod ble hentet fra personer uten mutasjoner (artikkel oppgir ikke antall). T-celler fra beinmarg ble hentet fra friske personer. To cellekulturer med normale lymfocytter ble tilsatt henholdsvis 0,5 μ M og 5 μ M med et androgen (methyltrienolone (R1881)). Telomeraseaktiviteten økte med ca. 100 prosent for cellekulturen som fikk minst dose, mens økningen i cellekulturen som fikk høyest dose, var noe over 200 prosent sammenliknet med kontrollgruppen ($p < 0,001$) (Figur 17). Det ble også undersøkt om to andre androgener ga samme effekt (kun 5 μ M ble gitt disse to). 19-nortestosterone-17-decanoate (19-NT) ga da en dobling i telomeraseaktiviteten sammenliknet med kontrollene ($p < 0,05$). For 6 β -hydroxy-testosterone (6 β -HT) ga denne dosen ikke signifikant økning i telomeraseaktiviteten (24).

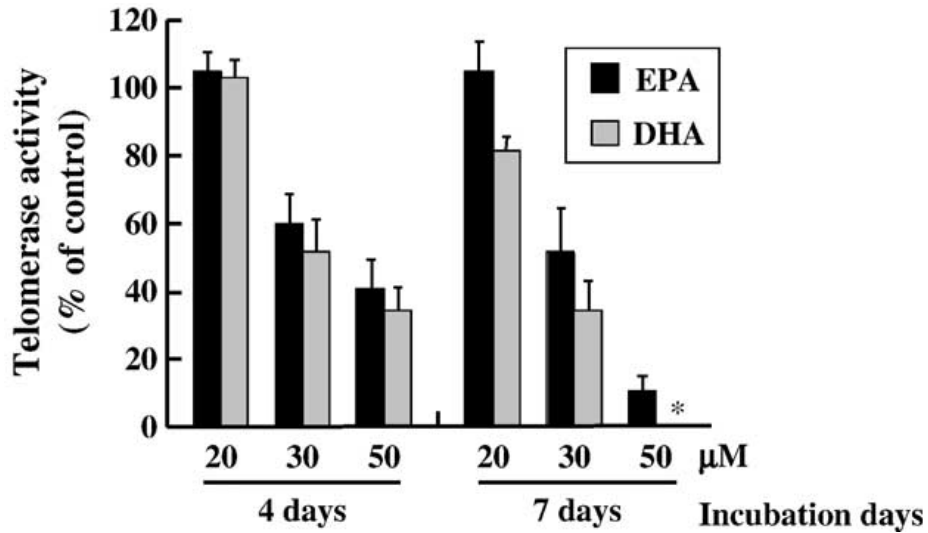


Figur 17

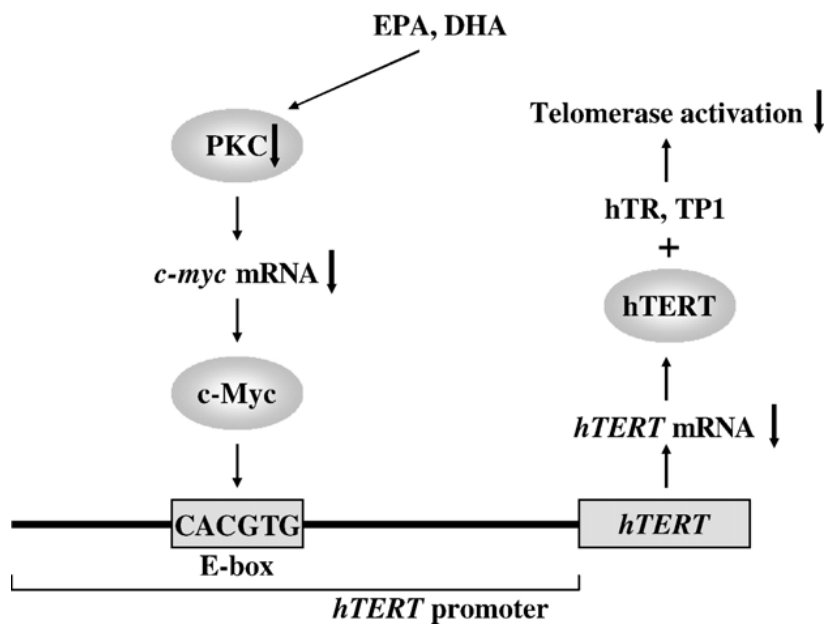
I en studie undersøkte man den hemmende effekten til forskjellige fettsyrer på telomerase, med spesielt henblikk på fettsyrene med antitumoregenskaper, som eicosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA). Bakgrunnen for studien var at flere studier støtter sannsynligheten for at flerumettede fettsyrer i kosten har gunstige effekter på å hemme tumorutvikling (25).

For å evaluere den direkte effekten av fettsyrer på telomerase, lyserte man celler fra DLD-1 humane kolorektale adenocarcinomceller og blandet det med forskjellige fettsyreprøver. Telomeraseaktiviteten ble så bestemt. Mettede fettsyrer og *trans*-fettsyrer viste veldig svak eller ingen hemming på telomerase. I kontrast hemmet *cis*-umettede fettsyrer enzymet signifikant, og den hemmende potensen var større ved en økning i antall dobbeltbindinger. Som ved EPA og DHA, viste andre flerumettede fettsyrer seg å være kraftfulle telomerasehemmere. For å vurdere den transkripsjonelle effekten, ble DLD-1-cellene dyrket i nærvær av fettsyreprøver, og telomeraseaktivitet og genuttrykk ble deretter evaluert. Dyrkede DLD-1-celler med enten EPA eller DHA resulterte i en bemerkelsesverdig reduksjon i telomeraseaktivitet (Figur 18). EPA og DHA hemmet telomerase ved å nedregulere uttrykk av TERT og c-MYC (Figur

19). Disse resultatene indikerer at flerumettede fettsyrer direkte hemmer den enzymatiske aktiviteten til telomerase, så vel som modulerer telomerase på transkripsjonsnivå (25).



Figur 18

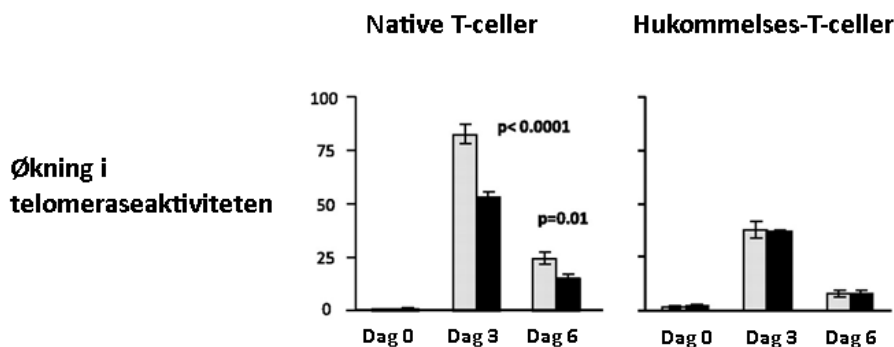


Figur 19

3. Autoimmune sykdommer

Reumatoid artritt er en kronisk inflammatorisk sykdom som angriper synovia og etter hvert fører til bruskskade og ødeleggelse av leddets struktur. Alder er en stor risikofaktor for utvikling av sykdommen (26). Kronisk stimulerte T-celler forårsaker vevsødeleggelsen i reumatoid artritt (27). Det kan derfor tenkes at et aldrende immunsystem er en viktig faktor for utvikling av sykdommen. Når man eldes, øker mortalitet av infeksjonssykdommer, man har dårligere respons av vaksiner og det er en økning i reaktivering av virale infeksjoner. Dette indikerer at immunsystemet blir mindre effektivt med alderen. Som hos alle andre celler, vil telomerene i T-celler forkortes ved celledeling. Hos pasienter med reumatoid artritt er det funnet at telomerene i lymfocytene forkortes raskere enn det som er normalt, og dermed gjør at immunsystemet har høyere biologisk alder enn den faktiske kronologiske alderen (26).

I en kase-kontroll-studie ble 38 pasienter med reumatoid artritt sammenliknet med 26 friske personer. Telomerreparasjon og -vedlikehold ble vurdert ut fra telomerasens respons på induksjon/stimulering. I T-celler hos både friske og syke ble telomeraseaktiviteten oppregulert som respons på induksjon. Responsen i hukommelses-T-cellene var lik hos friske og syke, men i de native T-cellene var det en signifikant forskjell. Maksimal enzymaktivitet i T-celler hos pasienter med reumatoid artritt var kun ca. 60 % av aktiviteten i den friske T-cellepopulasjonen tre dager etter induksjon ($p < 0,001$) og var fortsatt signifikant lavere etter seks dager ($p = 0,01$) (Figur 20) (27).



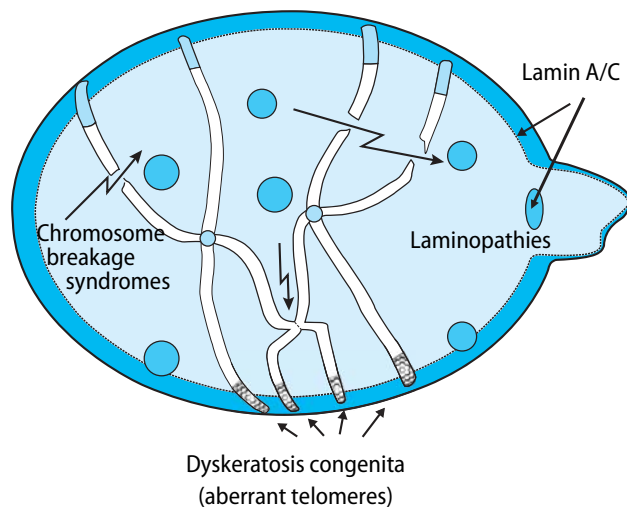
Figur 20

Telomeraseaktiviteten etter tre dager korrelerte med telomerlengden i CD4+T-celler, altså har de aktuelle T-cellene som spiller en viktig rolle i reumatoid artritt, kortere telomerer enn vanlig. For å undersøke effekten av nedsatt telomeraseaktivitet, ble TERT-enheten i native CD4+T-celler hemmet. Enzymaktiviteten falt da til omtrent halvparten, samtidig som disse cellene hadde lavere overlevelse enn normale CD4+T-celler og heller ikke klarte å danne en like stor celleklon ($p=0,04$). Dette kan tyde på at nedsatt telomeraseaktivitet gjør de aktuelle T-cellene hos personer med reumatoid artritt mer utsatt for apoptose. Etter seks dager var 2-3 % av T-cellene hos de friske apoptotiske, mens tallet var omtrent det dobbelte for dem med reumatoid artritt ($p<0,001$). Native CD4+T-celler hos pasienter med reumatoid artritt har høyere nivåer av det apoptoseinitierende proteinet Bim ($p=0,01$) og lavere nivåer av overlevelsesproteinene Bcl-2 ($p=0,02$) sammenliknet med friske personer (27).

I en studie i Japan ble det tatt biopsier fra epitelceller i glandula lacrimalis hos elleve personer. Hos fire av disse fikk man påvist Sjögrens syndrom med tørt øye. Ved hjelp av kvantitativ fluorescensmåling av telomerprober ("in situ hybridization") kunne man måle telomerintensitet hos henholdsvis personer med og uten Sjögrens syndrom. Telomerintensitet (jo høyere intensitet, jo lenger telomerer) i epitelcellene fra personer uten Sjögrens syndrom var statistisk signifikant høyere i forhold til dem med Sjögrens syndrom ($7494,7\pm 477$ mot 6785 ± 455 , $p=0,02$) (28).

4. Progeroid syndrom

Aldring kan defineres som tap av homeostase. Videre påvirker homeostase opprettholdelse av alle strukturelle, metabolske, nevroendokrine, immunologiske og genomiske systemer i kroppen vår. Fra et genetisk synspunkt vil tap av genetisk homeostase vise seg å bidra som en nøkkelfaktor til aldring i celler og organismer. Tap av genetisk stabilitet og kjerneintegritet leder til cellulær og organismedysfunksjon, samt fremvekst av maligne celler. Mye av det vi nå vet om den tette sammenhengen mellom tap av genetisk homeostase og prematur forekomst av kreft og aldring, er utledet fra grundige studier på sjeldne syndromer som skyldes defekt i DNA- og kromatinvedlikeholdssystemer. Disse tilstandene kan manifestere seg på kromosom-, telomer- eller kjernemembrannivå (Figur 21) (29).



Figur 21

Pasienter med progeroid syndrom eller akselerert aldrende fenotyper, viser en rekke fysiske og biologiske særpreg som varierer bredt mellom vev, sykdom og blandt personer. Et generelt dilemma i studier på telomerenes rolle i progeroid syndrom, er at telomerenes engasjement i akselerert aldring kan være direkte så vel som indirekte. For eksempel kan økt celledød som følge av defekt DNA-reparasjon, resultere i

telomerforkortning via økt kompensatorisk celleomsetning, eller via direkte effekt på telomerisk DNA (tDNA) (2).

Hutchinson-Gilford Progeriasyndrom (HGPS) er en sykdom som fører til ekstremt rask aldring. Årsaken til den svært raske aldringen skyldes en mutasjon Lamin A-genet (LMNA). Dette fører til et mutert Lamin-A-protein kjent som progerin. Progerin fins i små mengder også hos mennesker uten HGPS. Det er antatt at telomerskade spiller en rolle når det kommer til å aktivere progerinproduksjonen (30). Sykdommen rammer 1/4-8 millioner barn. Symptomer ligner dem på normal aldring, slik som tynn hud, tap av subkutan vev, hårtap, stive ledd, osteoporose og kardiovaskulær sykdom. Personer som er rammet av sykdommen blir i gjennomsnitt 13 år gamle og dør av hjerteinfarkt eller slag. En av de cellulære defektene hos personer med HGPS er korte telomerer. I en studie ble det undersøkt om telomerase kunne hindre den premature aldringen av cellene hos personer med HGPS. Retroviral TERT ble infisert i fibroblaster affisert av HGPS som var på slutten av sitt proliferative potensiale (to gjenstående populasjonsdoblinger). Cellegruppen som fikk infisert TERT viste ingen tegn til nedgang i proliferativ kapasitet etter 70 populasjonsdoblinger, mens cellegruppen som ikke fikk infisert TERT, stoppet å proliferere etter to populasjonsdoblinger. På tross av tilsynelatende økt celledelingspotensiale, sank ikke nivået av progerin i cellene som fikk infisert TERT. Det viste seg også at TERT-infiserte fibroblaster hadde lavere aktivitet i p53- og retinoblastom-tumorsupressorveiene. Dersom DNA-et skades, kan p53 initiere apoptose, stoppe celledelingspotensiale og aktivere DNA-reparasjonsproteiner. Retinoblastom (Rb) hindrer skadet DNA i å replikere seg. Effekten av p53 og Rb ble undersøkt, og i fibroblaster som var nær slutten av sitt celledelingspotensiale ble disse to hemmet. Dette førte til 68 populasjonsdoblinger. Progerin induserer DNA-skade. DNA-skade induserer aktivering og/eller fosforylering av proteiner om er involvert i DNA-skaderesponsen. Disse proteinene samles i områder med DNA-skade og er i så måte gode indikatorer på nettopp dette. HGPS-fibroblaster har

økt DNA-skadesignalering. I fibroblaster infisert med TERT var det langt færre områder i DNAet med aggregering av nettopp slike proteiner. Dette indikerer at TERT hindrer progerinets DNA-skadelige effekter. Hvordan progerinet fører til telomerdysfunksjon er ikke kartlagt, men det er ting som tyder på at det progerinet fører til dysfunksjon i et enzym, histon deacetylase, som er viktig i reguleringen av DNA-replikasjonen og som modulerer telomerkromatinstrukturen. Dette fører til raskere cellealdring og DNA-skadesignalering på telomerene (31).

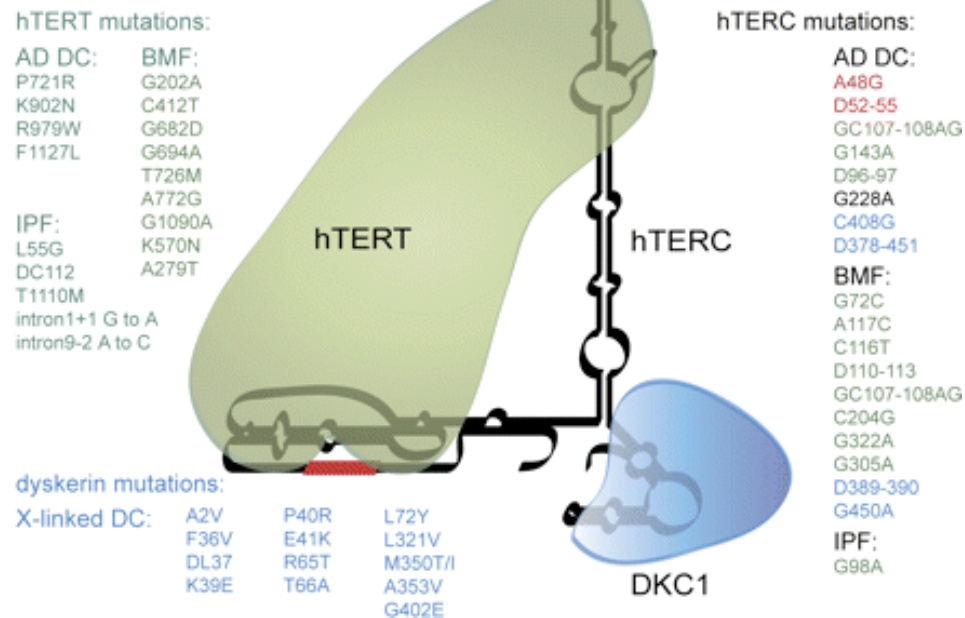
En rekke andre aldringssykdommer har vært mer direkte relatert til telomerdysfunksjon. Blant disse er Fanconianemi (FA) og ataxia telangiektasia (AT), som begge er autosomal recessive sykdommer. FA skyldes mutasjon i ett av minst 12 forskjellige Fanconigener (som koder for Fanconianemikomplementeringsgruppeprotein), mens AT skyldes ataxia telangiektasiamutert gen (som koder for ATM-proteinet). Felles for disse proteinene er at de er delaktig i DNA-skade- og reparasjonssystemet. Begge sykdommer er assosiert med akselerert telomerforkortning. Avvik i telomerreplikasjon- eller reparasjon antas å spille en viktig rolle i patogenesen, spesielt i utvikling av sykdommer som skyldes immundefekt eller benmargssvikt, så vel som økt predisposisjon for malignitet hos unge voksne (2).

I motsetning til celler fra enhver annen human sykdom, er FA-celler unikt sensitive for oksidativt stress. I en situasjon med defekt DNA-reparasjon, vil oksidativt stress lede til akkumulering av DNA-skade. Oksidativt stress er den sannsynlige årsaken til benmargssvikt, neoplasi og prematur aldring i FA, og denne sjeldne sykdommen er dermed den eneste kjente humane modellen for teorien om frie radikalers effekt på aldring (29).

Dyskeratosis congenita (DC) er en sjelden multisystemsykdom, som eksemplifiserer viktigheten av telomerintegritet for en mengde tilsynelatende ikke-relaterte cellulære funksjoner. Den X-bundne formen av DC skyldes en mutasjon i dyskeringenet (DKC1), som er assosiert med

RNA-komponenten til telomerasekomplekset (TERC). Den autosomale dominante formen for DC har vist seg å stamme fra mutasjon i selve TERC (Figur 22). Pasienter med DC har derfor vist homogent reduserte nivåer av TERC, og som følge av svekket telomerasefunksjon, har de kortere telomerer enn sine jevngamle kontroller. Mens unormal hudpigmentering, negldystrofi og leukoplaki utvikles i barne- og ungdomsårene, vil voksne pasienter kunne ha gastrointestinale, geniuretrale, nevrologiske, lunge- og skjelettmisdannelser. Den mest alvorlige komplikasjonen er likevel at 80-90 % utvikler pancytopeni på grunn av benmargssvikt i 30 års alder og økt risiko for malignitet. Pasienter med DC viser derfor en rekke progeroide kjennetegn, noe som kan tyde på en kausal sammenheng mellom korte telomerer og prematur aldring. TERC-mutasjoner har også blitt observert sporadisk hos pasienter uten typiske DC-kjennetegn, inkludert undergrupper av aplastisk anemi, myelodysplastisk syndrom og paroxysmal nattlig hemoglobinuri, som alle er stamcellesykdommer (29).

Telomerase complex



Figur 22

5. Demens og Alzheimers sykdom

Pasienter med Alzheimer har unormalt korte telomerer i lymfocytter, sammenliknet med ikke Alzheimer-kontroller. I en studie ble denne hypotesen testet. Personer med Alzheimers ble sammenliknet for telomerlengde i monocytter. Telomerlengden hos personer med Alzheimers var $6,6 \pm 0,2$ kb, mens den hos friske (kontrollgruppe) var $7,3 \pm 0,2$ kb, $p < 0,05$. For personer med mild kognitiv svikt, var det ingen statistisk forskjell sammenliknet med kontrollgruppen. Det var ingen sammenheng mellom telomerlengde og MMS-score (mini mental state examination) (4, 32).

Telomerlengde kan, som det er for biologisk alder, være en biomarkør for demens. I en studie gjort på 62 kvinnelige sykepleiere ble det funnet en kraftig økning i risiko for utvikling av kognitiv svikt hos dem med korte telomerer. Odds ratio for utvikling av demens/mild kognitiv svikt eller mild kognitiv svikt var henholdsvis 9,63 ganger så høy (95 % KI 1,73–53,65) og 12 ganger så høy (95 % KI 1,24–116,5). Det var også en statistisk signifikant sammenheng mellom kort telomerlengde og liten hippocampus. For hver T/S-ratioenhet mindre var hippocampus 25 ml mindre ($p=0,038$) (33). Hippocampus er viktig for blant annet lagring av langtidsminnet (34).

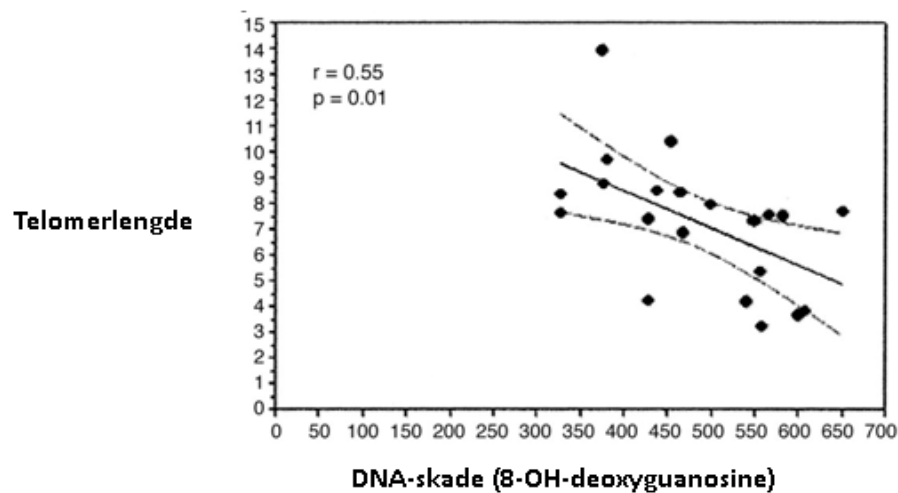
6. Andre sykdommer

Telomerforkortning har blitt observert i lymfocytter ved kronisk HIV-infeksjon, i hepatocytter ved kronisk hepatitt, i intestinalt epitel ved kronisk inflammatorisk tarmsykdom, i forskjellige former for anemi, i lymfocytter hos Alzheimerpasienter og i vaskulære endotelceller i aterosklerotisk plakk. Ytterligere synes telomerforkortning å korrelere med sykdomsprogresjonen i enkelte sykdommer. Et eksempel på dette er levercirrhose, som utvikles i endestadiet av kronisk leversykdom. En modell indikerer at kronisk hepatocyttskade leder til økt hepatocytptomsetning og akselerert telomerforkortning. Kritisk korte telomerer vil da føre til

hepatocytaldring, som fremmer utviklingen av levercirrhose karakterisert ved redusert regenerativ reserve, fibrotisk arrvev og organsvikt. I samsvar med denne modellen, korrelerer telomerforkortning med utvikling og progresjon av levercirrhose (4). Nyere studier har vist at mutasjoner i genene som koder for telomerasekomponenter, er også implisert i familiær idiopatisk pulmonal fibrose (2).

I en studie ble telomerlengden hos 68 pasienter med schizofreni undersøkt. På bakgrunn av hvordan de reagerte på antipsykotisk medisinering ble de delt inn i grupper, såkalte "good responders" og "poor responders", 34 i hver gruppe. Disse ble sammenliknet med 76 friske personer. Som mål på telomerlengde ble TRF (i kb) brukt. For "good responders" var TRF 8,88 med standardavvik (SD) på 0,90, for "poor responders" var TRF 7,41 med SD på 0,97, for friske var TRF 8,91 med SD 1,35. Det var statistisk signifikant forskjell mellom "poor responders" og friske, $p < 0,001$ (35).

I en studie ble 21 type 2-diabetikere sammenlignet med 29 friske personer. Hos diabetikerne var telomerene i monocytter signifikant kortere enn hos friske individer (4,0 mot 5,5 kb, $p < 0,0001$). Hos diabetikerne var det et invertert forhold mellom telomerlengden i perifere mononukleære blodceller og mengde oksidativ DNA-skade ($r = -0,55$, $p = 0,018$) (Figur 23), noe som tyder på at type 2-diabetikere er mer utsatt for oksidativt stress. Oksidativt stress angriper, som tidligere beskrevet, GGG-sekvenser i telomerene, og fører så til forkorting av telomerene (se under kardiovaskulære sykdommer) (36).



Figur 23

C. Intervensjoner rettet mot telomerer og telomerase

Intervensjoner rettet mot telomerer og telomerase har vært gjenstand for mange forskningsprosjekter de siste årene, og noen applikasjoner blir nå utforsket i kliniske utprøvnings (2).

Strategier for å redde humane celler in vitro fra biologisk aldring, eller forlengende deres livsløp ved å uttrykke ektopisk telomerase, ble først beskrevet for over et tiår siden og er nå rutinemessig brukt i mange laboratorier for å forlengende levetiden til primære humane celler. Denne tilnærmingen appellerer også til terapi av celler eller vev, ettersom antall tilgjengelige celler ofte er begrenset. Selv om ektopisk uttrykk av TERT fortsatt er på et utviklingsstadium, har signifikante fremskritt allerede blitt gjort for å forsterke allografter og konstruere vev for transplantasjon. Denne typen tilnærming kan også være nyttig for spesifikke T-celleimmunoterapi protokoller, der spesifikke T-celler gjenkjenner spesifikke antigener (antigener spesifikke til melanomceller eller HIV-virus) for deretter å bli rensset, ekspandert in vitro og infusert i pasienter. Ektopisk uttrykk av TERC og TERT i fibroblaster fra DC-pasienter har vist seg å redde disse cellenes proliferative egenskaper, og man kan tenke seg at

tilsvarende strategi kan brukes i behandling av beinmargssvikt knyttet til mutasjon i telomerasegenet (2).

Hemming av telomeraseaktivitet er også et svært spennende område for telomerintervensjoner, da de fleste krefttilfeller uttrykker telomerase. Imidlertid gjør uklarheter rundt toksisitet, halveringstid, administrasjonsformer, samt lang tidsforsinkelse for å oppnå død av kreftceller både in vivo og in vitro, at det fortsatt gjenstår problemstillinger som kan svekke terapeutisk suksess. Andre former for antitelomerasekreftterapi tar sikte på å utnytte og å styrke immunresponsen til telomerase (TERT) gjennom vaksinasjonsliknende tilnærminger. Høyere nivåer av TERT-protein uttrykkes i mange kreftceller, og TERT-epitoper kan bearbeides og presenteres av antigenpresenterende celler til antigenspesifikke T-celler som igjen dreper målcellene. Denne gjenkjenningen av TERT-positive kreftceller er kjent for aktivt å forårsake kreftcelledød mye raskere enn andre strategier, der progressiv telomerforkortning må finne sted (2).

V. Konklusjon

Det er økende bevis for at korte telomerer og telomerdysfunksjon har en viktig rolle i humane sykdommer og bidrar til aldring. For å opprettholde telomerlengde, er enzymet telomerase helt essensielt. Studier på pasienter med telomerasemutasjoner understreker viktigheten av telomerlengde, da disse pasientene viser multiple tegn på prematur aldring og sykdom. Med økende alder blir telomere kortere, og evnen til cellereproduksjon går ned. Dette er nødvendigvis ikke en dårlig ting, da redusert celledeling i aldrende celler virker som en forsvarsmekanisme mot kreftutvikling. Dessverre vil telomermekanismene som begrenser vekst av premaligne celler, også besørge sterk seleksjon av celler som ikke lenger responderer på DNA-skademekanismene med aldring som resultat. Ved å forstå hvilke faktorer som begrenser cellulære funksjoner som respons på telomerdysfunksjon, vil man kanskje i fremtiden kunne finne molekylære mål for behandling, som tar sikte på å forbedre opprettholdelse og regenerasjon av organer, samt forbedre helse i den voksende, eldre befolkningen. To store intervensjonsspørsmål rettet mot telomerer det forskes mye på er om det er mulig å kurere kreft ved å deaktivere telomerase, og om man kan forhindre aldring ved å aktivere telomerase. Hvis forskere kan aktivere enzymet telomerase i hele kroppen til eldre mennesker, kan man tenke seg at cellereplikasjon igjen finner sted, men med fare for utvikling av kreft.

VI. Litteraturliste

1. Landmark K sr., Landmark K jr., Haarr H. Omega-3-fettsyrer, telomerer, telomerase og kardiovaskulær sykdom. *Hjerteforum*. 2011;24: 64-67.
2. Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev*. 2008 Apr;88(2):557-79.
3. Bekaert S, De Meyer T, Rietzschel E, et al. Telomere length and cardiovascular risk factors in a middle-aged population free of overt cardiovascular disease. *Aging cell*. 2007;6:639-647.
4. Jiang H, Ju Z, Rudolph K. Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatr*. 2007;40:314-324.
5. Alberts B, Bray D, Hopkin K, et al. *Essential cell biology*. 2th ed. New York and London: Garland Science; 2004.
6. Fuster J, Andres V. Telomere biology and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2006;99:1167-1180.
7. Rana A, Metzger P. OpenPit Blog [Internet]. USA: Aditya Rana. [cited 2009 Oct 12]. Available from:
<http://openpit.wordpress.com/2009/10/12/immortality/>
8. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990 May 31;345(6274):458-60.
9. De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, et al. Studying telomeres in a longitudinal population based study. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:2960-70.
10. SSB.no [Internet]. Statistisk sentralbyrå. [cited 2011]. Available from:
<http://www.ssb.no/befolkning/forventet.cgi>
11. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, et al. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 2003 Feb 1;361(9355):393-5.
12. Ramírez R, Carracedo J, Soriano S, et al. Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2005 Feb;45(2):353-9.

13. Brouillette S, Singh R, Thompson J, et al. White Cell Telomere Length and Risk of Premature Myocardial Infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003;23:842-846.
14. Farzaneh-Far R, Cawthon R, Na B, et al. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28:1379-1384.
15. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Nov 21;92(24):11190-4.
16. Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, et al. Telomere shortening in human coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24:546-550.
17. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, et al. Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clinical Science (London)*. 2009 May 1;116(11):827-35.
18. Benetos A, Okuda K, Lajemi M. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension*. 2001 Feb;37(2 Part 2):381-5.
19. Farzaneh-Far R, Lin J, Epel ES, et al. Association of marine omega-3 fatty acid levels with telomeric aging in patients with coronary heart disease. *JAMA*. 2010 Jan 20;303(3):250-7.
20. Li A, Lin H, Kuo C, et al. High-mobility group A2 protein modulates hTERT transcription to promote tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 2011 Jul;31(13):2605-2617.
21. Willeit P, Willeit J, Mayr A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA*. 2010 Jul 7;304(1):69-75.
22. Engelhardt M, Mackenzie K, Drullinsky P, et al. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Research*. 2000 Feb 1;60(3):610-7.
23. Stefanou N, Papanikolaou V, Furukawa Y, et al. Leptin as a critical regulator of hepatocellular carcinoma development through

- modulation of human telomerase reverse transcriptase. *BioMed Central Cancer*. 2010;10:442.
24. Calado R, Yewdell W, Wilkerson K, et al. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood*. 2009 September 10;114(11):2236–2243.
 25. Eitsuka T, Nakagawa K, Suzuki T, et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells: a dual mechanism approach. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Oct 15;1737(1):1-10.
 26. Goronzy J, Shao L, Weyand C. Immune aging and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2010 May;36(2):297-310.
 27. Fujii H, Shao L, Colmegna I, et al. Telomerase insufficiency in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci (PNAS) USA*. 2009 Mar 17;106(11):4360-5.
 28. Kawashima M, Kawakita T, Maida Y, et al. Comparison of telomere length and association with progenitor cell markers in lacrimal gland between Sjögren syndrome and non-Sjögren syndrome dry eye patients. *Molecular Vision*. 2011;17:1397-404.
 29. Neveling K, Bechtold A, Hoehn H. Genetic instability syndromes with progeroid features. *Z Gerontol Geriatr*. 2007;40:339-48.
 30. Cao K, Blair CD, Faddah DA, et al. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011 July;121(7):2833-44.
 31. Benson E, Lee S, Aaronson S. Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *Journal of Cell Science*. 2010 august;123:2605-2612.
 32. Hochstrasser T, Marksteiner J, Humpel C. Telomere length is age-dependent and reduced in monocytes of Alzheimer patients. *Exp Gerontol*. 2012 Feb;47(2):160-3.
 33. Grodstein F, van Oijen M, Irizarry MC, et al. Shorter telomeres may mark early risk of dementia: preliminary analysis of 62 participants from the nurses' health study. *PLoS One*. 2008 Feb 13;3(2):e1590.33.

34. Brodal P. Sentralnervesystemet. 3rd ed. Oslo: Universitetsforlaget; 2001.
35. Yu W, Chang H, Lin C, et al. Short telomeres in patients with chronic schizophrenia who show a poor response to treatment. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2008 May;33(3):244-7.
36. Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes J. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006 Feb;29(2):283-9.

VII. Figurtekster

Figur 1: Øverste figur viser hvordan primeren (grønn strek) festes til henholdsvis "leading" og "lagging strand" og hvordan basene primeren på "leading strand" fester seg til ikke vil replikeres.

Figur 2: figuren viser at bestemte proteiner binder seg til telomerene, og bestemmer telomerfunksjon ved å regulere telomerlengde og -struktur. A: telomeren er lukket og dermed ikke tilgjengelig for telomerase. B: telomeren er åpen og TTP1 og POT1 rekrutterer og stimulerer enzymatisk telomeraseaktivitet, fortrinnsvis hos kromosomender med korte telomerer.

Figur 3: figuren viser redusert mengden telomerisk DNA under gjentatt replikasjon hos humane fibroblaster i kultur. Gjennomsnittlig telomerlengde (a) og totalt telomerisk DNA (b) er vist som en funksjon av alder in vitro.

Figur 4: figuren viser faktorer som påvirker telomerlengde i humane celler. Når telomerene blir for korte som følge av replikasjon eller oksidativt stress, vil de gjenkjennes av DNA-reparasjonssystemet. Avhengig av celletype og gener som uttrykkes i cellen, kan enkelte korte telomerender forlenges av telomerase eller ved rekombinasjon. Når cellen akkumulerer for mange korte telomerender, vil DNA-skadesignaler som p53 aktiveres og cellen vil gå inn i cellulær aldring eller apoptose. Dersom cellen ikke aktiverer disse DNA-skadesignalene, vil cellen akkumulere genetisk ustabilitet med kreftutvikling som ytterste konsekvens.

Figur 5: figurene viser sammenhengen mellom telomerlengde i blod-DNA og overlevelse. Den mørke linjen illustrerer individer med telomerlengde i øvre halvdel, og stiplet linje illustrerer de i nedre halvdel.

Figur 6: figuren viser telomerlengde i humane mononukleære blodceller fra hemodialysepasienter og jevnaldrende kontroller.

Figur 7: figuren viser hvordan TRF-lengde synker fra venstre mot høyre og sammenhengen med Odds Ratio for hjerteinfarkt i tidlig alder.

Figur 8: figuren viser redusert lengde av terminalt restriksjonsfragment (TRF) med økt donoralder i intimaceller i arteria thoracica interna (hvit) og arteria iliaca (svart).

Figur 9: figuren demonstrerer mengdeforskjellen mellom telomerisk og centromerisk DNA hos friske (A) og personer med koronarsykdom (B) og således hvordan T/C-ratio kan beregnes.

Figur 10: A viser sammenhengen mellom pulsølgehastighet og TRF-lengde hos menn og kvinner. B viser sammenhengen mellom pulstrykk og TRF-lengde hos menn og kvinner.

Figur 11: figuren viser sammenhengen mellom endring i telomerlengde (uttrykt som T/S-enheter) og nivå av omega-3-fettsyrer.

Figur 12: figuren viser rollen til telomerforkortning på kreftutvikling. I aldrende vev har et økende antall celler kritisk korte og dysfunksjonelle telomerer. Som en konsekvens øker den kromosomale instabiliteten (CIN), spesielt når effekten av sjekkpunktgener som p53 er opphevet. Dette leder til en økning i kreftinitiering ved aldring. Imidlertid vil proliferasjon av kreftceller inducere ytterligere telomerforkortning og genetisk kaos, som vil hemme overlevelse av kreftceller. På dette stadiet er aktivering av telomerase i kreftcellene nødvendig for kreftprogresjon.

Figur 13: figuren viser sammenhengen mellom celler med og uten HMGA2 og nivå av TERT.

Figur 14: figuren viser sammenhengen mellom telomeraseaktivitet hos friske og hos personer med forskjellige blodsykdommer (HD = friske donorer, PV = polycythemia vera, CLL = kronisk lymfatisk leukemi, CML = kronisk myelogen leukemi, MDS = myelodysplastisk syndrom, AML = akutt myelogen leukemi). Stjerne angir statistisk økt telomeraseaktivitet.

Figur 15: figuren viser forskjell i leptinnivå og uttrykk av leptinreseptorer (OB-R1 og OB-Rs) hos friske og hos personer med hepatocellulært karsinom (HCC). Stjerne angir statistisk signifikant forskjell.

Figur 16: figuren viser sammenhengen mellom økning i uttrykk av TERT-mRNA-nivåer og nivåer av leptin administrert. Stjerne angir statistisk signifikant økning.

Figur 17: figuren viser sammenhengen mellom økningen i telomeraseaktiviteten og mengde av og hvilket androgen som ble administrert. Stjerne/stjerner angir statistisk signifikant økning.

Figur 18: figuren viser hvordan telomeraseaktivitet inhiberes i DLD-1-celler ved tilstedeværelse av fettsyrene EPA og DHA i forskjellige doser i 4 og 7 dager. Stjerne indikerer at telomeraseaktiviteten ikke kunne analyseres på grunn av cytotoxicitet.

Figur 19: figuren beskriver mekanismen for telomerasehemming av EPA og DHA i et cellekulturreksperiment.

Figur 20: figuren viser forskjell i telomeraseaktivitet etter induksjon i forskjellige T-celler hos friske (grå søyler) og personer med reumatoid artritt (sorte søyler).

Figur 21: figuren viser ulike kjerneinstabilitetssyndromer som forårsaker progeroide kjennetegn hos mennesker. Chromosome brakeage syndrom, laminopatier som Hutchinson-Gilford Progeriasyndrom og Dyskeratosis congenita, er alle sykdommer som skyldes defekt i viktige strukturer i cellekjernen.

Figur 22: figuren illustrerer telomerasekomplekset som består av proteinene TERT og dyskerin (DKC1), som begge binder spesifikt til TERC. Mutasjoner i hver komponent kan lede til bestemte sykdommer. Autosomal dominant og X-bundet Dyskeratosis congenita (DC), beinmargssvikt (BMF) og idiopatisk pulmonal fibrose (IPF).

Figur 23: figuren viser sammenhengen mellom telomerlengde i perifere mononukleære blodceller og nivå av oksidativ DNA-skade (målt i 8-OH-deoxyguanosine).

VIII. Ordliste

p53 – tumorsuppressorgen som kontrollerer cellesyklus. Mutasjon eller skade av dette vil kunne føre til økt fare for kreft.

TERT – telomerasens katalytiske subenhet. TERT lager nye TTAGGG-sekvenser.

TRF1 og TRF2 – terminalt restriksjonsfragment, også kalt telomerrestriksjonsfragment, 1 og 2. Kan brukes som mål på telomerlengde.

TERC – telomerasens RNA-komponent. Denne koder for TTAGGG-sekvensene.

p21 – cellesyklusinhibitor som reguleres av p53. Induserer cellesyklusarrest ved DNA-skade.

CIN – kromosomal instabilitet. Må ikke forveksles med cervical intraepitelial neoplasi.

MYC – regulatorisk gen. Mutert MYC er ofte til stede ved kreft.

Retinoblastom - tumorsuppressorgen som kontrollerer cellesyklus. Mutasjon eller skade av dette vil kunne føre til økt fare for kreft.

IX. English summary

The great increase in focus on the effect of telomeres and telomerase on human biology, and the fact that this, in a historical perspective, is a relatively new field of science, is the background for this thesis.

Methods and material: the basis for this thesis is a non-systematic search in literature on PubMed in addition to a personal selection of existing, relevant articles.

Telomeres are short sequences of DNA located on the end of human chromosomes. They protect the chromosome ends and prevent loss of functional DNA. Telomeres are shortened during each cellular division, and when telomeres become critically short, cellular ageing or apoptosis is triggered. Telomere shortening is associated with accelerated ageing and increased mortality in several diseases, among them cardiovascular, autoimmune, and progeroid diseases, Alzheimer's dementia, cognitive failure, paranoid schizophrenia, and cancer.

The enzyme telomerase is responsible for building telomeres, and can therefore inhibit telomere shortening. However, in normal, somatic cells telomerase is rarely expressed. On the contrary, in 90 % of cancer, telomerase is activated and therefore plays an important role in cancer development. In the future, interventions aimed to inhibit and activate telomerase are thought to be a method to treat cancer on the one hand, and prevent ageing on the other.