

» Telomeraseaktivität beim Bronchialkarzinom^{1,2}

Der Nachweis des „Unsterblichkeitsenzym“ in Bürstenbiopsien erhöht die diagnostische Ausbeute bei Verdacht auf ein peripheres Karzinom

Zusammenfassung: Die Replikationsfähigkeit normaler somatischer Zellen ist zeitlich begrenzt durch den zunehmenden Verlust ihrer chromosomalen Endstücke, der Telomere (Hayflick-Limit). Eine wesentliche Eigenschaft maligner Zellen ist die Immortalität. Der wahrscheinlich häufigste Mechanismus, durch den Tumorzellen eine scheinbar unbegrenzte Teilungsfähigkeit erlangen, ist die Aktivierung des Enzyms Telomerase, einer reversen Transkriptase, die den Verlust der Telomere rückgängig machen kann. Telomeraseaktivität konnten wir mit einem PCR-basierten TRAP-Assay in Tumorgewebsbiopsien, Ergussflüssigkeiten und Bronchiallavagen bei verschiedensten thorakalen Malignomen nachweisen. Bei 47 Patienten mit Verdacht auf ein peripheres Bronchialkarzinom bestätigte sich durch spätere Operation oder invasive Diagnostik in 38 Fällen ein Malignom. Bei 25 von diesen 38 Patienten (66%) war präoperativ in durchleuchtungsgestützten, bronchoskopischen Bürstenbiopsien Telomeraseaktivität nachweisbar gewesen. Es gab einen falsch positiven Fall (Tuberkulose). Mit einer Ausnahme waren die gleichzeitig entnommenen Bürstenbiopsien der Gegenseite negativ. In 23 Fällen (61%) konnten zytologisch Tumorzellen gefunden werden. Bei 33 Patienten war mindestens ein Wert positiv. Die Kombination von Zytologie und Telomerase-Test in Bürstenbiopsien erreichte damit eine diagnostische Sensitivität von 87%.

Telomerase in Lung Cancer. Testing the Activity of the „Immortality Enzyme“ in Bronchial Brush Biopsies Increases the Diagnostic Yield in Cases of Suspected Peripheral Bronchogenic Carcinomas: The proliferative capability is time-limited in normal somatic cells by the shortening of their chromosomal ends, the telomeres (Hayflick limit). An important feature of malignant cells is their immortality. The probably most common mechanism of tumour cells to achieve unlimited replicability is the activation of the enzyme telomerase. The reverse transcriptase can compensate the loss of telomeres. Using a PCR-based TRAP assay we found telomerase activity in tumour biopsies, exsudates and bronchial washings in various thoracic malignancies. In 38 of 47 patients with suspected peripheral lung cancer eventually surgery or invasive procedures proved a malignancy. In fluoroscopically guided bronchial brushings from 25 of these 38 patients (66%) the TRAP assay revealed telomerase activity. There was a single false positive case (tuberculosis) and with a single exception, the simultaneously taken brushes of the contralateral lobes were all telomerase negative. In 23 patients (61%) tumour cells were found

L. Freitag¹, P. Litterst¹, B. Obertriffter¹, V. Velehorsch¹, H. P. Kemmer, A. Linder², I. Brightman³

Lungenklinik Hemer

¹ Institut für experimentelle Pneumologie

² Abteilung Thoraxchirurgie

³ Institut für Pathologie

in the cytological examination. In 33 patients at least one marker was positive. Thus the combination of cytology and telomerase test in bronchial brush biopsies attained a diagnostic yield of 87%.

Einleitung

Telomere und Telomerase

Vor 40 Jahren arbeitete ein engagierter Forscher namens Leonard Hayflick am Wistar Institut in Philadelphia mit Kulturen verschiedener Körperzellen. Man ging zu dieser Zeit davon aus, dass man Zellkulturen in optimalen Medien unendlich lange am Leben halten könne. Hayflick musste aber feststellen, dass ihm über kurz oder lang alle Zellkulturen eingingen, was auch immer er unternahm. Alle frischen Zellen, die er seinen Kulturen hinzufügte, machten eine festgesetzte Zahl von Teilungen durch. Danach ließen sie sich durch nichts mehr zur Replikation bringen und starben ab. Zur damaligen Zeit erntete der junge Wissenschaftler nicht wenig Spott, weil er offensichtlich irgendetwas übersehen hatte. Heute ist seine erste Arbeit über die replikative Seneszenz ein anerkannte Klassiker [1]. Die Grenze der Zellteilungsfähigkeit wird nach ihm als „Hayflick-Limit“ bezeichnet. Fibroblasten von Feten teilen sich unter Kulturbedingungen höchstens 80-mal, die von Greisen weniger als 20-mal. Genaue experimentelle Beobachtungen zeigten, dass die Chromosomenenden, die so genannten Telomere, bei der Zellteilung allmählich kürzer werden. Ihre Restlänge scheint die Zahl der noch möglichen Teilungen zu bestimmen [2]. Theoretische Überlegungen von James D. Watson, dem Entdecker der DNA-Struktur näherten sich dem Replikationsproblem in den siebziger Jahren von der molekularbiologischen Seite [3]. Bei jeder Zellteilung, bei der die chromosomale DNA verdoppelt wird, teilen sich zunächst die beiden Elternstränge der DNA zur Replikationsgabel auf. Es entstehen zwei Matrizen, die die Sequenz der Tochterstränge festlegen. Am Replikationsursprung lagert zunächst ein kurzes RNA-Stück als Starter (Primer) an. Dieser wird dann an seinem freien 3'-Ende durch die DNA-Polymerasen um die komplementären Nukleotide verlängert. Da alle Polymerasen in Eukaryonten nur in 5' > 3' - Richtung lesen, erfolgt die

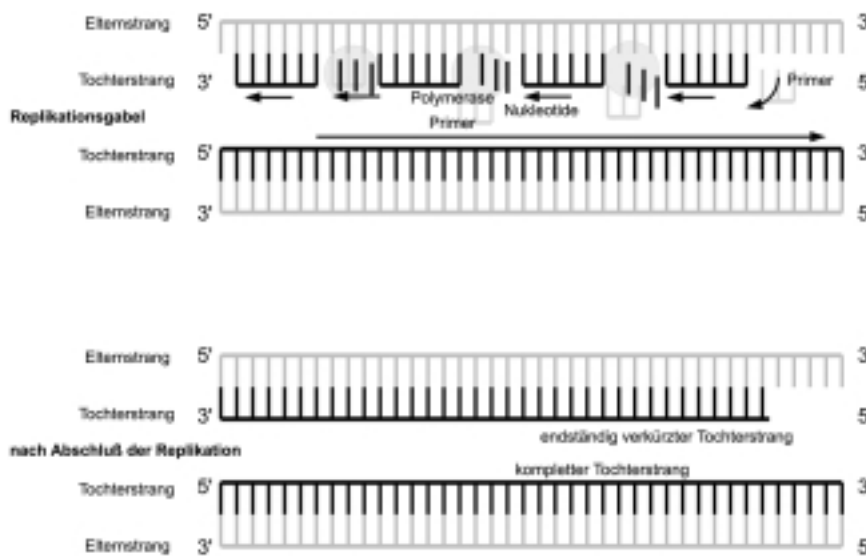


Abb.1 Das Endreplikationsproblem entsteht, weil Polymerasen nur in 5'-3'-Richtung ablesen können. Am 5'-Ende eines Tochterstranges fehlt zum Schluss ein Primer. Der Tochterstrang wird bei der Zellteilung um ein Telomerstück kürzer.

Synthese an einem Strang kontinuierlich und an der 3';-5'-Gegenseite in Bruchstücken, den Okazakifragmenten, die durch Polymerasen zusammengefügt werden müssen. Da der Primer abschließend wieder enzymatisch entfernt wird, verbleibt am 5'-Strangende eine Lücke, die nicht aufgefüllt werden kann. Es fehlt eine freie 3'-DNA um einen Primer anzulagern (Abb.1). Auf diese Weise wird das Telomer bei jeder Teilung unvermeidbar um einige Basenstücke kürzer [4]. Lagen an diesen chromosomalen Endstücken relevante Exons, würde die Translationsmatrize zerstört, und es käme zu zellulären Fehlfunktionen. Alle untersuchten Zellen haben jedoch an ihren Enden repetitive Sequenzen, die offensichtlich nur die eine Funktion haben, die Chromosomenenden zu schützen. Diese genfreien Schutzkappen verhindern z.B. Fusionen und Translokationen. Am Ende humaner Chromosomen finden sich ca. 2000 Wiederholungen der Sequenz TTAGGG. Jede Zellteilung führt nun zum Verlust einiger Wiederholungsabschnitte dieser Schutzkappen-Basen. Da deren Zahl groß, aber dennoch endlich ist, ergibt sich das anschauliche Bild von der „Uhr des Lebens“ die unaufhaltsam abläuft. Die Telomere des Menschen verkürzen sich bei jeder Mitose um 25 bis 200 DNA Basen. Bei Erreichen einer kritischen Länge von ca. 6 Kb tritt die somatische Zelle in die Seneszenz [5]. Sie teilt sich nicht mehr und stirbt schließlich ab (Abb. 2). Das Fibroblastensterben von Len Hayflick hat damit eine Erklärung gefunden. Es ergibt sich aber ein neues Phänomen. Mindestens zwei Zellarten scheinen sich nämlich dem Hayflick-Limit zu entziehen: Keimzellen und Tumorzellen. Beide können sich offensichtlich unbegrenzt teilen. Sie scheinen das Endreplikationsproblem zu umgehen, oder, um das Bild noch einmal zu verwenden, einen Trick gefunden zu haben, die „Uhr des Lebens“ immer wieder aufzuziehen. Carol Greider und Elizabeth Blackburn fanden 1985 die Lösung dieses Rätsels [6]. Sie identifizierten ein erstaunliches Enzym, eine Telomer-Terminal-Transferase (Telomerase). Die Telomerase ist eine reverse Transkriptase, die über ein eigenes RNA-Matrizenstück mit dem internen Gegenstück zu den telomeren TTAGGG-Sequenzen verfügt. Der katalytische Proteinanteil der Telomerase (hTERT) kann mit seiner eigenen Matrize (hTR) den kritischen DNA-Abschnitt synthetisieren und ihn den chromosomalen Endstücken anlagern. Zellen, die Telomerase aktivieren können, sind unbegrenzt teilungsfähig. Diese

Immortalisierungsfähigkeit hat der Telomerase auch die Bezeichnung „Unsterblichkeitsenzym“ verschafft.

Tumorzellen und Telomerase

Die Seneszenzforscher und die Tumorbologen haben sich in den letzten Jahre intensiv mit der Telomerase beschäftigt [7]. Während die einen Wege suchen, durch Aktivieren oder gar Zuführen von Telomerase das Altern aufzuhalten [8], suchen die anderen nach Möglichkeiten, die Telomeraseaktivität von Tumorzellen zu neutralisieren, um ihnen die Immortalität zu nehmen [9,10,11]. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Telomerlängen von Krebszellen relativ kurz aber stabil sind. Es gibt einen klaren Zusammenhang zwischen gesteigerter Proliferationsrate, Entartung und Telomeraseaktivität [12]. Die z. Z. favorisierte Hypothese ist, dass eine schnelle Verkürzung der Telomerlänge bei den mitosereichen Tumorzellen die Aktivierung der Telomerase triggert. Dem p53 kommt wahrscheinlich eine Sensorfunktion zu [13]. Durch Hochregulation der hTERT mRNA wird die reverse Transcriptase

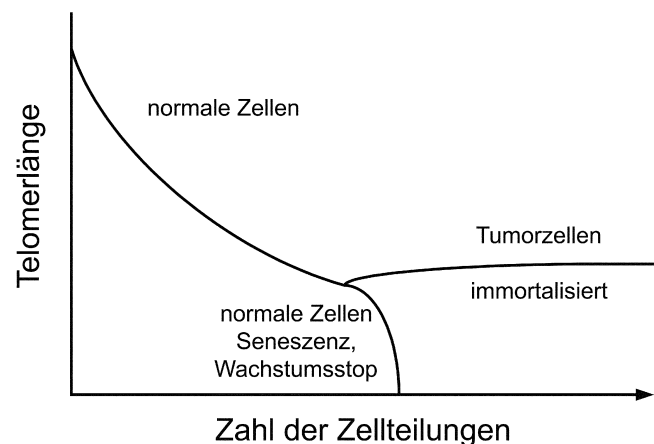


Abb.2 Mit jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere. Wenn die chromosomalen Endstücke eine kritische Untergrenze erreicht haben, sistiert die Teilungsfähigkeit. Falls, wie im Fall von Tumorzellen Telomerase aktiviert werden kann, sind weitere Teilungen möglich.

aktiv und die replikative Seneszenz der Tumorzellen wird umgangen. Sie gewinnen unbegrenzte Teilungsfähigkeit [7].

In den allermeisten Malignomen konnte inzwischen Telomeraseaktivität nachgewiesen werden [14,15,16]. In Operationspräparaten von Bronchialkarzinomen lagen die Raten zwischen 80% [17] und 84% [12]. Es gibt erste Hinweise, dass die Aktivierung von Telomerase mit dem histologischen Grading korreliert und prognostisch bedeutsam sein kann [18]. In einer Gruppe von 103 operierten Patienten war der klinische Verlauf der 85 Telomerase-positiven schlechter als der der 18 Telomerase-negativen. Von den 32 Patienten mit dem Tumorstadium T1, die Telomerase-positiv waren, verstarben 8 innerhalb der ersten zwei Jahre. Alle 9 Telomerase-negativen Patienten lebten noch nach vier Jahren [19]. Der Test auf Telomeraseaktivität wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen zum Tumornachweis eingesetzt [20,21,22]. Durch Kombination zweier In-situ-TRAP-Assays konnte die Arbeitsgruppe des Tokyo Medical College bei 18 von 22 Patienten in bronchialen Spülflüssigkeiten Telomeraseaktivität nachweisen [23]. Mit einem ähnlichen TRAP-Assay fanden britische Kollegen in 16 von 23 BAL-Flüssigkeiten von Tumorpacienten Telomeraseaktivität. Eine Wiederholung dieser Studie ergab bei uns vergleichbare Ergebnisse. Segmentbronchuspülungen erwiesen sich jedoch als relativ umständlich. Wir untersuchten daher, ob gewöhnliche Bürstenbiopsien neben der cytologischen Untersuchung zur Telomerasebestimmung geeignet sind.

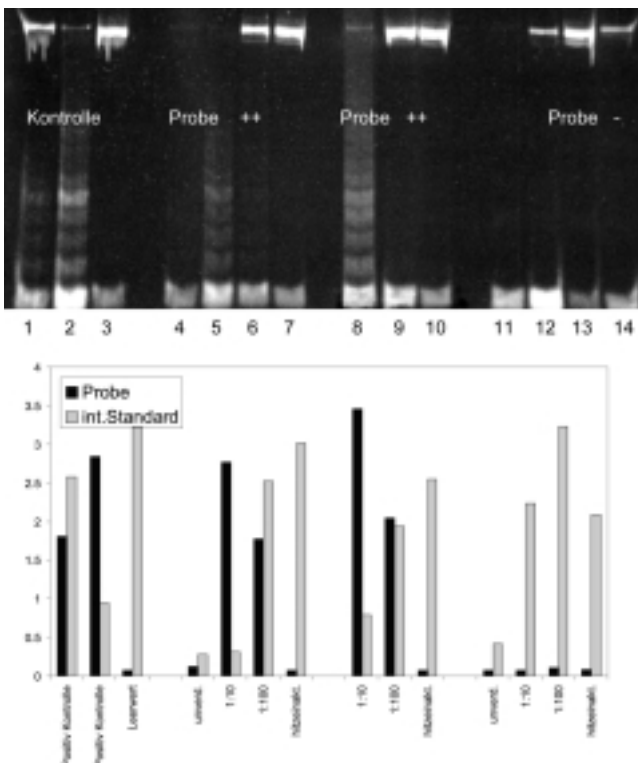


Abb.3 Gelelektrophorese und ELISA-Test nach der PCR. Interne Standards mit Positivkontrollen (1,2) und Leerwerten (3) sowie hitzeinaktivierte Patientenproben (7,10,14) vermeiden falsch positive Werte. Verfälschungen durch Anwesenheit von Inhibitoren der Taq-Polymerase werden durch Verdünnungsreihen (4 versus 5 und 6) ausgeschlossen. Bei echt negativen Werten muss der interne Standard positiv werden (12–14).

Material und Methoden

Patientenkollektiv, Protokoll und Probeentnahme

Insgesamt wurde bei über 100 Patientenproben die Telomerase mit dem PCR-ELISA-Test bestimmt. Telomeraseaktivität fand sich bei Tumorpacienten in Ergussflüssigkeiten, Operationspräparaten, Nadelsaugbiopsien, Biopsien von Thorakoskopien und Bronchoskopien. Nachdem wir genügend Erfahrung mit dem Test gesammelt hatten und Schwellenwerte für positiv, schwach positiv und negativ ermittelt waren, wurde er eingesetzt bei Patienten mit Verdacht auf ein peripheres Bronchialkarzinom. Bestimmt wurde die Telomerase in Bürstenbiopsien. Zur der im Folgenden dargestellten Auswertung kamen nur die Fälle (47 von 79), bei denen später durch invasive Diagnostik wie Thorakotomie, VATS oder transbronchiale Biopsie eine eindeutige histologische Diagnose erzielt werden konnte.

Die 47 Patienten (37 männlich, 10 weiblich) mit einem Durchschnittsalter von 61 Jahren (28–83 Jahre) wurde wegen Tumorverdacht flexibel bronchoskopiert. Die Bronchoskopie erfolgte nach ausreichender Lokalanästhesie und Gabe von Midazolam. Die tumorverdächtigen Stellen (Infiltrate, Rundherde) wurden unter Durchleuchtung sondiert. Zunächst wurde eine Bürstenbiopsie aus dem korrespondierenden Segment der Gegenseite des Tumorverdachts entnommen. Verwendet wurden geschützte Bürsten mit einem Durchmesser von 3 mm und einer Länge von 11 mm (Mill-Rose, Mentor, Ohio, USA). Die Bürste wurde in PBS-Lösung ausgeschüttelt. Es folgte eine Bürstenbiopsie aus dem tumorverdächtigen Infiltrat bzw. dem Rundherd unter Durchleuchtung. Dabei wurde vom Untersucher notiert, ob er meinte, die Struktur unter Durchleuchtung fraglich, sicher oder wahrscheinlich nicht erreicht zu haben. Die Bürste wurde sofort auf einem Objektträger ausgestrichen und für die zytologische Untersuchung schnellfixiert. Anschließend wurde die Bürste in einem zweiten PBS-Röhrchen ausgeschüttelt. Meistens wurde diese Bürstenbiopsie wiederholt, um genügend Material für die PCR-Untersuchung zu gewinnen. Die Objektträger wurden konventionell nach Papanicolaou gefärbt und mikroskopisch zytologisch untersucht. Die beiden PBS-Röhrchen wurden zentrifugiert und gegebenenfalls mit von roten Blutkörperchen befreit. Die in Lysis-Puffer aufgeschwämmten Zentrifugate wurden mit einem TRAP-Assay auf Telomeraseaktivität untersucht. Ein Teil des Lysats wurde hitzeinaktiviert und als Negativkontrolle dem gleichen Test unterzogen.

Telomerasebestimmung

Das Testprinzip des Telomeric Repeat Amplification Protocols (TRAP) wurde erstmals 1994 von Kim u. Mitarb. beschrieben [15]. Modifizierte Kits sind von verschiedenen Firmen wie Shugai Pharmaceuticals, Oncor und Roche-Boehringer erhältlich. Wir verwendeten den TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA-Plus-Kit von Roche Molecular Biochemicals, Mannheim.

TRAP-Protokoll

Im ersten Reaktionsschritt wird ein biotinmarkierter P1-TS Primer dem nativen Bürstenbiopsieextrakt, der hitzeinaktivierten Probe und einem internen Standard zugefügt. Die spezifischen Telomeric Repeats TTAGGG (sechs Nukleotide)

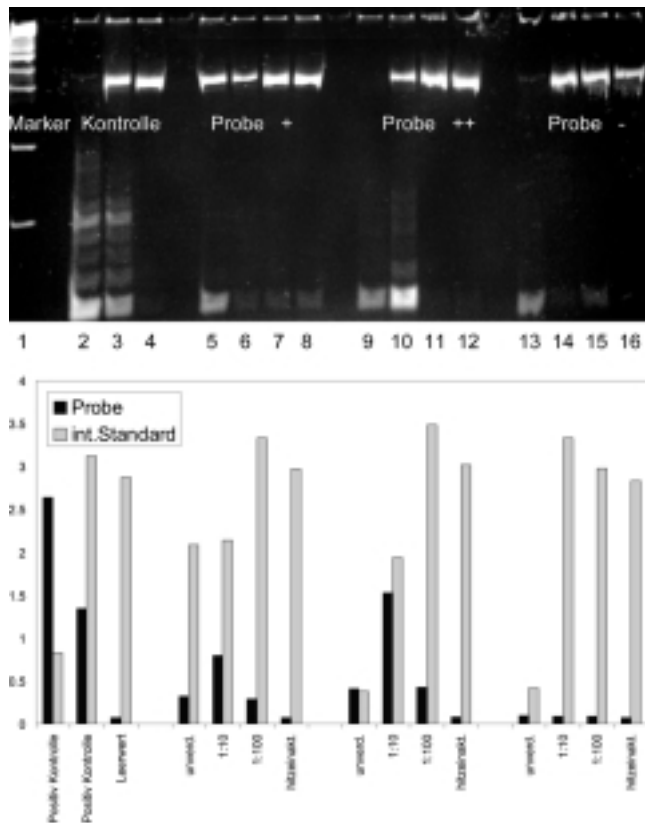


Abb. 4 Schwellenwerte für schwach, einfach und doppelt positive Werte sowie echt negative Werte wurden entsprechend der Extinktion im ELISA-Test sowie der Bandenausprägung der Gele bestimmt.

werden dabei dem biotinmarkierten synthetischen Primer angelagert. Aus dem internen Standard entstehen Produkte von 216 Basenpaaren. Die, in Anwesenheit von Telomerase entstandenen Produkte, werden mit dem P1-TS Primer und einem zweiten Primer durch 20 PCR-Zyklen amplifiziert (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg). Die Proben werden denaturiert und hybridisiert an eine, für die Telomeric Repeats spezifische, digoxinmarkierte Sonde, gebunden an einer streptavidincoated Mikrotiterplatte.

Analyse des TRAP-Tests

Die immobilisierten PCR-Produkte wurden mit einem Anti-Digoxin-Peroxidase-Antikörper versetzt, und nach Zugabe von TMB – wurde der Farbumschlag bei 450 nm in einem ELISA-Reader (Sensident Scan 352, Labsystems, Finnland) nachgewiesen. Verdünnungsstufen von 1:1 bis 1:100 wurden gemessen. Eine Extinktion unter 0,2 wurde als negativ [-], eine zwischen 0,2 und 0,4 als schwach positiv [(+)], eine zwischen 0,4 und 1 als positiv [+] und alle darüber als stark positiv [++] bewertet.

Zusätzlich zu dem ELISA-Test wurde in einigen Fällen eine Elektrophorese auf einem 12,5%igen Polyacrylamidgel bei 200 V durchgeführt. Ein DNA Molekulargewichtsmarker IX von Roche und eine Sybr-Green-Färbung (Roche) wurden verwendet. Die Übereinstimmung von ELISA-Test und Gel zeigt Abb. 3. Der Einfluss von Inhibitoren der Taq-Polymerase

in der Probe wurde durch die Verdünnung neutralisiert. Ein Wert wurde als echt negativ [-] gewertet, wenn der interne Standard ein positives Signal zeigte (Wertepaare rechts außen in Abb. 4 a, b). Der interne Standard musste positiv und die hitzeinaktivierte Probe musste negativ ausfallen, damit der Test als valide angesehen werden konnte.

Resultate

Bei 38 Patienten bestätigte sich im Verlauf ein maligner Tumor. In 23 Fällen hatte die Bürstenzytologie Tumorzellen gezeigt. Bei 25 Patienten war eine Telomeraseaktivität nachweisbar gewesen. Hiervon waren 5 schwach positiv, 9 positiv und 11 Fälle stark positiv. Bei den stark positiven Fällen handelte es sich in 5 Fällen um kleinzellige Tumoren, nur ein kleinzelliges Karzinom war Telomerase-negativ. Andere Häufungen waren nicht erkennbar, Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome verteilten sich gleichmässig. In einem Fall fand sich ein ++ Wert bei einem Carcinoma in situ, ein Alveolarkarzinom ergab ebenfalls einen ++ Wert. Bei 33 Patienten war mindestens ein Wert pathologisch. Abb. 5 veranschaulicht die Ergebnisse.

In 9 Fällen konnte ein Tumor ausgeschlossen werden, es fanden sich Infarktarnen, Abszesse und Pneumonien. Mit einer Ausnahme waren diese Patienten beidseits Telomerase-negativ.

Ein ++ Telomerasewert fand sich bei einer Patientin mit Tuberkulose. Es waren mikroskopisch säurefeste Stäbchen nachweisbar (Gaffky 3) und histologisch epitheloidzellige Granulome sowie eine lymphozytäre Infiltration der Bronchuswand.

Diskussion

Die Bestimmung der Telomeraseaktivität an den Zelllysaten von Bürstenbiopsien hat in unserer Studie vergleichbare Resultate ergeben wie die publizierten Arbeiten, bei denen bronchiale Spülflüssigkeiten untersucht worden waren [22,23,24]. Die Bürstenbiopsie ist aber einfacher und schneller durchführbar als eine Lavage. Sie hat zudem den Vorteil, dass sie in Verbindung mit einer Durchleuchtung gezielter bei kleineren Verschattungen und Rundherden eingesetzt werden kann. Bei der Mehrzahl unserer Patienten lagen infiltrative und dystelektatische Röntgenveränderungen vor. Nur in einem Viertel der Fälle handelte es sich um echte Rundherde ohne Umgebungsreaktion. Zurzeit sammeln wir weitere Daten, um die Sensitivität und Spezifität von Telomerase und anderen molekularen Markern bei peripheren Rundherden zu bestimmen. Bisher scheint sich die Telomerasebestimmung als sensitiver zu erweisen, als die Bestimmung von p53 und KRAS. Dies liegt in Übereinstimmung mit anderen Studien [25]. So fanden Ahrendt u. Mitarb., dass kein anderer tumoasoziiertes Marker (p53, KRAS, Mikrosatellitenveränderungen von p16) in mehr als 53% der Lavageflüssigkeiten von Tumorpatienten nachweisbar war.

Auch im Vergleich mit der konventionellen zytologischen Untersuchung sind die Ergebnisse beeindruckend. Bei 37 Tumorpatienten sahen Arai u. Mitarb. in 24 Fällen zytologisch Tumorzellen, konnten aber in 29 Fällen Telomeraseaktivität nachweisen [22]. Die Arbeitsgruppe um Yahata wies bei 18

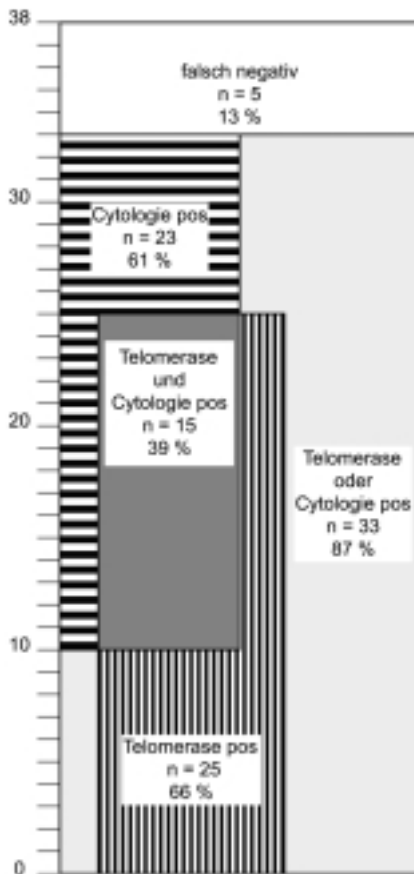


Abb. 5 Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Telomeraseaktivität und Zytologie bei 38 Patienten mit bewiesenem Tumor. Durch Kombination von Zytologie und Telomerase-Test ergibt bei peripheren Bronchialkarzinomen eine Sensitivität von 87%.

von 22 Patienten Telomerase nach, nur bei 9 Patienten wurden Tumorzellen gesehen [23]. Wir fanden bei unseren 38 Bürstenbiopsien 23-mal Tumorzellen und 25-mal Telomeraseaktivität. Es gab 15 Überschneidungen. In allen Studien zeigte sich, dass eine Kombination von zytologischer Untersuchung und Telomerasebestimmung die Sensitivität weiter erhöht. Wir erreichten mit 33 von 38 Fällen eine Sensitivität von 87% bei peripheren Tumoren. Dabei ist zu betonen, dass die Bestimmungen aus der gleichen Bürstenbiopsie erfolgten, also keinen weiteren Aufwand seitens des Endoskopikers erforderten. Denkbar wäre, dass man die Sensitivität durch weitere Kombinationen, z.B. mit Lavagen, zusätzlichen Bürsten, Katheter- oder Zangenbiopsien noch weiter steigern könnte.

Die Telomerase wird relativ früh im Verlauf einer malignen Entartung aktiviert [26]. Aus verschiedenen Gründen ist es dennoch unwahrscheinlich, dass sich ein Telomerasenachweis zur Früherkennung von Bronchialkarzinomen einsetzen lässt. Zwar kann man Telomerase auch im Sputum nachweisen, die derzeit verfügbaren Tests sind aber nicht empfindlich genug. Die Sensitivität des semiquantitativen PCR-Tests darf andererseits nicht zu sehr gesteigert werden, da auch andere endobronchial vorkommende Zellen, insbesondere Lymphozyten und Basalzellen Telomeraseaktivität aufweisen. Wie durch In-situ-TRAP-Assays nachgewiesen konnte, ist die Telomerase

adulter, somatischer Zellen nur herunterreguliert, nicht aber völlig eingestellt [26]. In den kontralateralen, gesunden Lungen unserer Tumorpatienten konnten wir keine Telomerase nachweisen. Hierbei gab es keine falsch positiven Werte. Spezifitätsprobleme des Tests ergeben sich aber durch die Sonderstellung der Lymphozyten [27,28]. In diesen Zellen ist auch ohne maligne Entartung eine leicht erhöhte Telomeraseaktivität messbar. Dies limitiert den Einsatz des Tests. Er ist z.B. ungeeignet für den Tumorzellnachweis an Mediastinoskopieproben [29]. Sofern im Bronchialsystem eine lymphozytenreiche Entzündung vorliegt, muss mit falsch positiven Ergebnissen gerechnet werden. Hiymas Arbeitsgruppe fand in 4 von 106 Lavagen von Nicht-Tumorpatienten mit dem TRAP-Assay Telomeraseaktivität. Diese vier Lavagen waren lymphozytenreich gewesen [21]. Die Lymphozytose wäre auch eine Erklärung für den hoch positiven Wert bei unserer Tuberkulosepatientin. Es scheinen zudem bei einer Tuberkulose besondere Bedingungen vorzuliegen. Eine chinesische Arbeitsgruppe konnte auch in Pleurapunktaten von Tuberkulosepatienten erhöhte Telomeraseaktivität nachweisen [30]. Später konnten diese Kollegen experimentell zeigen, dass gereinigtes Tuberkulin-Protein ausreicht, um die Telomeraseaktivität in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes hochzuregulieren [31]. In der spezifischen Immunantwort gegen Tuberkulose scheint das Enzym eine gewisse Rolle zu spielen. Bei einem peripheren Herd und positivem Tuberkulintest muss der Telomerase-Test daher mit Vorsicht bewertet werden. Falsch positive Werte sind zwar selten, aber möglich. Die tatsächliche Spezifität der Untersuchung muss sich an größeren Kollektiven zeigen. Schließlich muss man herausstellen, dass die Aktivierung von Telomerase nicht die einzige Möglichkeit ist, durch die Tumorzellen Immortalität erreichen können. Es gibt mindestens einen alternativen Weg zur unbegrenzten Replikationsfähigkeit, der aber bisher nicht aufgeklärt ist [32].

Falsch negative Werte können weiterhin durch Inhibitoren der Telomerase im Bronchialsekret oder einfach durch Inhibitoren der Taq-Polymerase in der PCR entstehen. Durch Verwendung eines internen Standards, einer hitzeinaktivierten Probe und einer Verdünnungsreihe lassen sich die Fehlermöglichkeiten minimieren. Der damit verbundene Mehraufwand erscheint uns unverzichtbar. Probe 4 in Abb. 3 ist beispielsweise negativ, während die 1 : 10 verdünnte Probe (Bande Nr. 5) des gleichen Patienten positiv wird. Eine weitere Verdünnung auf 1 : 100 ergibt dann wieder einen negativen Wert. Falsch positive Laborartefakte können durch zeitgleiches Messen hitzeinaktivierter Proben vermieden werden. Hier darf keine Bande auftreten bzw. keine Extinktionserhöhung messbar sein. In den Arbeitsanleitungen des Testkitherstellers und in den veröffentlichten Studien wird die Bestimmung des Gesamtproteins vor dem Test empfohlen [15,33]. Dies war bei der geringen Menge von Zellextrakt aus unseren Bürstenbiopsien nicht möglich. Wir glauben jedoch nicht, dass sich hierdurch die Aussagekraft des Tests relevant verändert. Die Gelelektrophorese und der Elisatest erwiesen sich als gleichwertig. Sie sind, je nach Laborausstattung alternativ verwendbar. Der ELISA-Test erschien uns praktikabler. Ob eine weitere Abstufung des semiquantitativen Tests zwischen hoch positiv (++) und negativ (-) über die von uns gewählten vier Stufen hinaus sinnvoll ist, oder ob vielleicht sogar zwei Stufen für klinische Fragestellungen ausreichen, wird sich an größere Patientenzahlen zeigen.

Zusammenfassend ist die Telomeraseforschung facettenreich. Neben Grundlagentenkenntnissen zur Tumorgenese und mögliche Anwendungen in der Tumortherapie [10, 34] ergibt sich für den Kliniker schon jetzt die Möglichkeit, mit einem relativ einfachen Labortest die Sensitivität bronchoskopischer Untersuchung von Patienten mit Tumorverdacht zu verbessern.

Literatur

- 1 Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614–634
- 2 Stanulis-Praeger B. Cellular senescence revisited: A review. *Mech Ageing Develop* 1987; 18: 1–48
- 3 Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 1972; 239: 197–201
- 4 Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458–460
- 5 Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 1992; 27: 375–382
- 6 Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989; 337: 331–337
- 7 Oulton R, Harrington L. Telomeres, telomerase, and cancer: life on the edge of genomic stability. *Current Opinion in Oncology* 2000; 12: 74–81
- 8 Fossel M. Das Unsterblichkeitsenzym. Piper Verlag, München, 1996
- 9 Yamaguchi F, Morrison RS, Takahashi H, Teramoto A. Anti-telomerase therapy suppressed glioma proliferation. *Oncol Rep* 1999; 6: 773–776
- 10 Sarvesvaran J, Going JJ, Milroy R, Kaye SB, Keith WN. Is small cell lung cancer the perfect target for anti-telomerase treatment? *Carcinogenesis* 1999; 2: 1649–1651
- 11 Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999; 5 (10): 1164–70
- 12 Albanell J, Lonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dmitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancer: association with increased cell proliferation rates and advanced pathological stage. *J Natl Cancer Inst* 1997; 5, 89: 1609–1615
- 13 Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, Greider CW, DePinho RA. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999; 97: 527
- 14 Bacchetti S, Counter CM. Telomeres and telomerase in human cancer. *Int J Oncol* 1995; 7: 423–432
- 15 Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011–2015
- 16 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Europ J Cancer* 1997; 3: 787–791
- 17 Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87 (12): 895–902
- 18 Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, Bevilacqua G. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Cin Cancer Res* 1999; 8: 2077–2081
- 19 Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yasumoto K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. *Ann Surg* 1999; 23: 715–720
- 20 Califano J, Ahrendt SA, Meisinger G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res* 1996; 56 (24): 5720–5722
- 21 Hiyama K, Ishioka S, Shay JW, Taooka Y, Maeda A, Isobe T, Hiyama E, Maeda H, Yamakido M. Telomerase activity as a novel marker of lung cancer and immune-associated lung diseases. *Int J Mol Med* 1998; Mar; 1(3): 545–549
- 22 Arai T, Yasuda Y, Takaya T, Ito Y, Hayakawa K, Toshima S, Shibuya C, Yoshimi N, Kashiki Y. Application of telomerase activity for screening of primary lung cancer in broncho-alveolar lavage fluid. *Oncol Rep* 1998; 5 (2): 405–408
- 23 Yahata N, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Ando K, Hirano T, Tsuchida T, Kato H, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings. *J Natl Cancer Inst* 1998; 9 (90): 684–690
- 24 Xinarianos G, Scott FM, Liloglou T, Prime W, Turnbull L, Walshaw M, Field JK. Evaluation of telomerase activity in bronchial lavage as a potential diagnostic marker for malignant lung disease. *Lung Cancer* 2000; 28 (1): 37–42
- 25 Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 332
- 26 Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, Milchgrub S, Srivastava S, Piatyszek MA, Shay JW, Gazdar AF. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57 (12): 2373–2377
- 27 Norrback KF, Dahlenborg K, Carlsson R, Roos G. Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1996; 88 (1): 222–9
- 28 Engelhardt K, Kumar R, Albanell J, Pettengell R, Han W, Moore MA. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood* 1997; 9 (1): 182–93
- 29 Ahrendt SA, Yang SC, Wu L, Westra WH, Jen J, Califano JA, Sidransky D. Comparison of oncogene mutation detection and telomerase activity for the molecular staging of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3 (7): 1207–14
- 30 Yang CT, Lee MH, Lan RS, Chen JK. Telomerase activity in pleural effusions: diagnostic significance. *J Clin Oncol* 1998; 16 (2): 567–573
- 31 Yang CT, Lin MC, Huang CC, Chen NH, Chen JK. Tuberculin purified derivative up-regulates the telomerase activity of peripheral blood mononuclear cells from patients with pulmonary tuberculosis. *Life Sci* 1999; 64 (16): 1383–1391
- 32 Reddel RR, Bryan TM, Murnane JP. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. *Biochemistry* 1997; 62: 1254–1262
- 33 Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama K, Hiyama E, Wright WE. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods Cell Sci* 1995; 17: 1–15
- 34 Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, Broni J, Marriott A. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 37–45

PD Dr. L. Freitag

Lungenklinik Hemer
Theo-Funccius-Str. 1
58675 Hemer

E-mail: lutzfrei@home.centernet.de