

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
– Klinische Navigation und Robotik

der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Der Nachweis der Telomeraseaktivierung
in Tumorgeweben und dem Tumor benachbarten
Geweben von Plattenepithelkarzinomen
im Kopf-Hals-Bereich

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Ulrike Gurr
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. mult. h.c. J. Bier
 2. Prof. Dr. Dr. B. Hoffmeister
 3. Prof. Dr. Dr. W. Wagner

Datum der Promotion: 25.09.2003

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sind durch einen aggressiven Krankheitsverlauf mit häufigem Auftreten von Lokalrezidiven und Zweitkarzinomen gekennzeichnet. Molekulare Veränderungen des Tumorrandes und der Tumor benachbarten Gewebe könnten in Ergänzung zur Histopathologie eine kurative chirurgische Tumorextirpation bestätigen. Wir bestimmten die Telomeraseaktivität in verschiedenen Entfernungen vom Tumorzentrum, um ihre Verwendung als molekularen Marker zu prüfen. Wir untersuchten 80 kryokonservierte Gewebeschnitte von 40 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich, davon 33 karzinomfreie Tumorrandgewebe. 50% der 20 karzinomhaltigen Gewebe, 28 % der karzinomfreien Tumorrandgewebe und 35 % der tumorfernen Proben waren telomerasepositiv. Der Vergleich ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Es konnte keine sichere Korrelation zwischen der Telomeraseaktivität in den untersuchten Geweben mit dem weiteren Krankheitsverlauf gefunden werden, allerdings zeigte die Telomerasepositivität in karzinomfreien Tumorrändern die Tendenz, mit einer besseren Prognose zu korrespondieren. Unsere Befunde sollten an einer größeren und homogeneren Patientengruppe überprüft werden.

Schlüsselwörter: Kopf-Hals-Tumore, Plattenepithelkarzinom, Tumorrand, Telomerase, Prognose, TRAP-Assay, ELISA

Squamous cell carcinomas of the head-neck region are characterised by an aggressive course of disease and a strong tendency to loco-regional recurrence and second primary tumours. As a complement to histopathology, molecular changes of tumour marginal and tumor distant tissue may confirm curative surgical tumour extirpation. We tested telomerase activity at different distances to the tumour centre of squamous cell carcinomas to consider the use for molecular marker. We examined 80 cryo-conserved tissue samples from 40 patients with a squamous cell carcinoma of the head-neck region, among them 33 carcinoma-free margin tissues. 50 % of the carcinoma centres, 28 % of the carcinoma-free margin tissues and 35% of the tumour distant samples were telomerase-positive. The comparison showed no statistically significant difference. We have found no reliable correlation between telomerase activity in the carcinoma-free margin tissues and the further course of disease, but telomerase positivity in carcinoma-free tumour margins tended to correlate with a better prognosis. Confirmation of the results in a larger and more homogeneous patient group is needed.

Keywords: Head-and-neck cancer, squamous cell carcinoma, surgical tumor margin, telomerase, prognosis, TRAP assay, ELISA

1	Einleitung	7
1.1	Telomere und Telomerase	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.1.1	Geschichte der Telomere und der Telomerase	7
1.1.2	Charakterisierung der Telomere und der Telomerase	7
1.1.3	Bedeutung der Telomere und der Telomerase	10
1.1.4	Telomere, Telomerase und Immortalisierung	12
1.1.5	Telomeraseaktivierung in Tumoren	13
1.2	Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC)	18
1.2.1	Lokalrezidive und minimal residual disease (MRD)	19
1.2.2	Ergänzung der histopathologischen Diagnose von Tumorrangewebe aus Kopf-Hals-Tumoren durch Marker	19
1.2.3	Risikofaktoren der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	20
1.2.4	Epidemiologie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	20
1.3	Nachweismöglichkeiten der Telomerase	21
1.3.1	Messung der Telomeraseaktivität durch den TRAP-Assay	22
1.3.2	Nachweis der Telomeraseaktivität mit einem PCR-ELISA	22
1.4	Aufgabenstellung	23
2	Materialien und Methoden	24
2.1	Patienten	24
2.1.1	Charakterisierung der Patientengruppen	25
2.2	Materialgewinnung	30
2.2.1	Gewebeentnahme	30
2.2.2	Histopathologische Kontrolle der molekularbiologisch untersuchten Gewebe	31
2.2.3	Zelllinien und deren Kultivierung	31
2.2.4	Aufschluss der Gewebe und Zellen für die PCR	32
2.3	Bestimmung der Telomeraseaktivität	34
2.3.1	Testprinzip des Nachweises der Telomeraseaktivität	34
2.3.2	Telomerase-PCR	35
2.3.3	Hybridisierung des PCR-Produktes	37
2.3.4	ELISA zum Nachweis des PCR-Produktes	37
2.4	Valuierung der Methode	38
2.4.1	Negativ-, Positiv- und Versuchskontrollen	38
2.4.2	Untersuchung der negativen Versuchsergebnisse	39
2.5	Statistische Auswertung der Ergebnisse	41

3	Ergebnisse	41
3.1	Extinktionsergebnisse des PCR-ELISA	41
3.1.1	Ermittlung des Cut-off-Wertes	41
3.1.2	Bewertungsgrundlage der ELISA-Ergebnisse	42
3.1.3	Bewertung der Telomeraseaktivität in den Geweben der Kontrollpatienten	42
3.1.4	Bewertung der Telomeraseaktivität in den Zelllinien	44
3.1.5	Bewertung der Telomeraseaktivität in den Geweben der Tumorpatienten	44
3.1.6	Untersuchung aller negativen Proben	48
3.1.7	Statistische Auswertung der Telomeraseaktivität	50
3.2	Auswertung der Patientendaten	52
3.2.1	Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten	52
3.2.2	Nikotin- und Alkoholabusus der Patienten	52
3.2.3	Lokalisation der untersuchten Gewebe	54
3.2.4	Verlauf der postoperativen Tumorerkrankung	55
3.2.5	Statistische Auswertung der klinischen Daten	57
4	Diskussion	65
4.1	Telomeraseaktivität in Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen	65
4.2	Bedeutung der Telomeraseaktivierung als diagnostischer und prognostischer Marker	66
4.2.1	Bedeutung der Telomeraseaktivierung in den Tumorzentren von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich	67
4.2.2	Bedeutung der Telomeraseaktivierung in Tumorrandgeweben und tumor-entfernten Geweben von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich	71
4.3	Einordnung der Patienten hinsichtlich Tumorlokalisierung, Alter und Geschlecht der Patienten sowie Tumorrisikofaktoren	79
4.4	Vergleich der Befunde der Telomeraseaktivierung mit dem Nachweis von HPV und p53 in früheren Tumorprojekten	80
4.4.1	Vergleich ausgewählter Tumorpatienten zur diagnostischen Bedeutung von Telomeraseaktivität, HPV und p53 in Tumorzentren von Plattenepithelkarzinomen	82
4.4.2	Vergleich ausgewählter Tumorpatienten zur prognostischen Bedeutung der Telomeraseaktivität	83
4.5	Ausblick: Möglichkeit einer Anti-Telomerase-Therapie	84
5	Zusammenfassung	86

6	Literaturverzeichnis	88
7	Abkürzungsverzeichnis	99
8	Tabellenverzeichnis	101
9	Abbildungsverzeichnis	103

1 Einleitung

1.1 Telomere und Telomerase

Telomere sind aus repetitiven DNA-Sequenzen und Proteinen bestehende Strukturen am Ende von Chromosomen und sind für die Stabilität der Chromosomen erforderlich. Das Enzym Telomerase verlängert telomere DNA und kompensiert damit den physiologischen Prozess der zellteilungsabhängigen Verkürzung von Telomeren. Telomerase wird mit den Vorgängen der zellulären Alterung und Immortalisierung in Verbindung gebracht.

1.1.1 Geschichte der Telomere und der Telomerase

Müller [111] und McClintock [102] erkannten die Bedeutung der Chromosomenenden für deren Stabilität und prägten den Begriff Telomer (griechisch: End-Teil). Bei der Replikation der doppelsträngigen DNA ist es der DNA-Polymerase nicht möglich, Chromosomen in vollständiger Länge zu replizieren, deswegen verkürzen sich die Chromosomen kontinuierlich mit jedem Zellteilungsvorgang [122]. 1985 entdeckten Greider und Blackburn [43] bei dem Einzeller Tetrahymena das Enzym Telomerase, welches die Telomere durch Anfügen von $(TTGGGG)_n$ verlängert und somit den teilungsbedingten Verlust telomerer Sequenzen kompensiert. 1987 entdeckten Greider und Blackburn die RNA-Struktur der Telomerase [44]. Die Telomeraseaktivität wurde 1994 erstmals in menschlichem Tumorgewebe eines Ovarialkarzinoms nachgewiesen [26]. Die Entwicklung des „Telomeric Repeat Amplification Protocol“ (TRAP-Assay) durch Kim et al [75] erlaubte die rasche Analyse großer Gewebeserien. Im Jahr 1995 wurde ein erster telomerer Bindungsfaktor TRF1 (telomeric repeat binding factor) durch Chong et al [20] charakterisiert. Das Gen einer Proteinuntereinheit hTERT (human telomerase associated protein) wurde 1997 durch Harrington identifiziert [52].

1.1.2 Charakterisierung der Telomere und der Telomerase

1.1.2.1 Aufbau und Funktion der Telomere

Telomere sind Endstücke von eukaryonten Chromosomen (Abb. 1) [102, 111]. Sie bestehen aus einer DNA-Komponente und verschiedenen Proteinen. Die telomere DNA setzt sich aus repetitiv aufeinanderfolgenden gleichen Basenhexameren TTAGGG zusammen. Beim Menschen sind die Telomere zwischen 2000 und 15000 Basenpaare (bp) lang [110]. Die Telomere sind mit spezifischen telomerbindenden Proteinkaskaden assoziiert [21]. Durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden die Telomere als gelbe Punkte an jedem Chromosomenende sichtbar (Abb. 2).

Die schützende Kappenfunktion wird durch die besondere Architektur des Chromosomenendes ausgeübt. Die Telomere bilden durch Rückfaltung des Einzelstrangs in den Doppelstrang eine t-Loop-Formation, die sie vor dem DNA-Reparatur-System schützt.

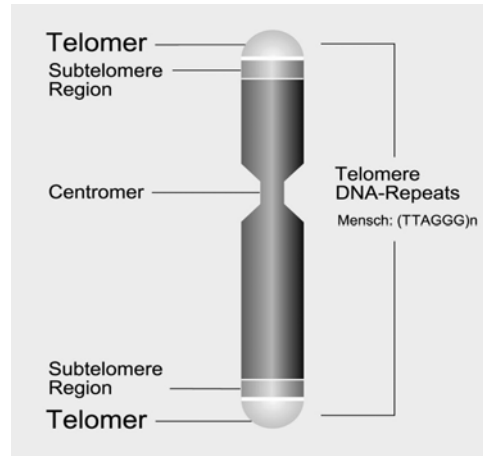


Abbildung 1: Struktur des Chromosoms mit den Telomeren (modifiziert nach Dahse et al [29]; mit freundlicher Genehmigung der Autoren und vom Springer-Verlag)

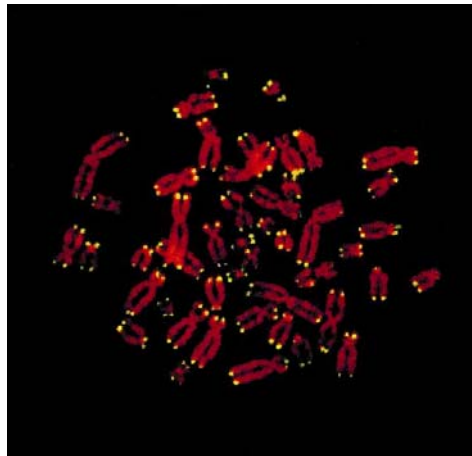


Abbildung 2: Chromosomen in der Metaphase im Fluoreszenzmikroskop (nach Parkinson et al [124]; mit freundlicher Genehmigung der Autoren und von Elsevier Science)

1.1.2.2 Aufbau und Funktion der Telomerase

Das Enzym Telomerase (telomere terminale Transferase) ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der eine eigene interne RNA-Komponente besitzt (Abb. 3). Die Telomerase-RNA wird als Matrize für die Synthese von telomeren DNA-Sequenzen benutzt. Die als Schablone dienende Region der humanen Telomerase-RNA (hTR,

auch hTERC) ist 11 Basen lang und komplementär zum Telomerstrang aufgebaut [38, 109]. Die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (human telomerase reverse transcriptase) wirkt als reverse Transkriptase und ist für die Nukleotidaddition an den 3'-Enden der chromosomalen DNA verantwortlich [114]. Die Telomerase ist mit einem Molekulargewicht von ca. 1000 kD (kilo-Dalton) ein relativ großes Molekül mit mindestens zwei Proteinuntereinheiten.

Die Telomeraseproteine haben strukturelle und katalytische Funktionen. Die Proteinuntereinheit hTEP1 spielt eine Rolle bei der Anbindung des Enzymkomplexes an die chromosomale DNA und bei der Bindung von Desoxynukleosidtriphosphaten.

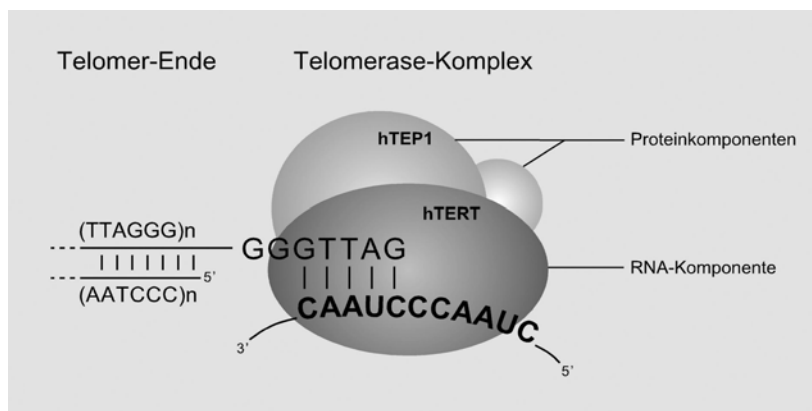


Abbildung 3: Aufbau der Telomerase (modifiziert nach Martens und Lange [98]; mit freundlicher Genehmigung der Autoren und des Verlags)

1.1.2.3 Regulierung der Telomeraseaktivität

Die Telomerase ist ein reguliertes Enzym, aber die beteiligten Mechanismen sind noch nicht ausreichend bekannt [83].

Es werden experimentell diverse Mechanismen der Telomeraseaktivierung diskutiert:

- Die Regulation des hTERT-Gens spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Telomerase während der Immortalisierung der Zellen und ist vermutlich der entscheidende Faktor bei der Telomeraseaktivität [106].
- Nakayama et al [115] nahmen an, dass für die Regulation der Telomeraseaktivität in vivo die Modifikation des Proteins hTEP1, z.B. durch eine Änderung des Molekulargewichts, zuständig sein könnte.
- Die Proteinphosphorylierung scheint die Telomeraseaktivität zu beeinflussen. Sie wird durch Phosphatasen [90] inhibiert, dagegen durch Proteinkinasen stimuliert [71, 91].

- Die Telomeraseaktivierung durch Onkogene wie c-myc [165] oder das E6-Protein des humanen Papillomvirus (HPV) [77] scheint nicht ausreichend für die Immortalisierung von Zellen zu sein. Der Einfluss weiterer Onkogene wie pRb (Protein des Retinoblastomgens) [76], SV (simian virus)-40T-large Onkoprotein und H-ras [48] auf die Telomeraseaktivität wurde untersucht.
- Der Transkriptionsfaktor NF- κ B trägt eventuell zur Aktivierung der hTERT-Expression bei [172].
- Östrogen aktiviert Telomerase über direkte und indirekte Effekte auf die hTERT-Promotorregion [83].

Die Repressionsmechanismen der Telomerase und des hTERT-Gens sind ebenfalls wenig bekannt. Die Vorstellungen einiger Autoren werden hier dargestellt:

- Cuthbert et al [28] beschrieben, dass durch das Einbringen des normalen humanen Chromosomen 3 in Tumorzellen die zelluläre Seneszenz induziert wird.
- In einer Arbeit von Oh et al [119] ist das Wilms-Tumor 1-Suppressor-Gen ein direkter Repressor des hTERT-Gens.
- Die Histon-Deacetylierung scheint in die Repression von hTERT involviert zu sein [22].

Eine weitere Ebene der Regulation der Telomeraseaktivität stellen die telomerasebindenden Proteine dar. Die telomeren Bindungsproteine TRF1 und TRF2 sind auf humanen Telomeren bekannt [144, 161].

1.1.3 Bedeutung der Telomere und der Telomerase

1.1.3.1 Bedeutung der Telomere

Am Endstück der Chromosomen schützt der Telomerkomplex aus repetitiven TTAGGG-Sequenzen und Bindungsproteinen vor illegitimer Rekombination durch Fusionen, Translokationen und Rearrangements [9]. Durch Interaktionen mit Proteinen der Zellkernwand können die Chromosomenenden vor degenerativen enzymatischen Prozessen abgeschirmt werden [31]. Die Bedeutung der Telomere wird als „Achillesferse des Chromosoms“ charakterisiert [10].

Die Länge der Telomere in einer Zelle wird sowohl von der Zellteilung als auch von der Aktivität des Enzyms Telomerase beeinflusst. Telomere von Fibroblasten verlieren pro Verdopplung ihrer Zellpopulation in vitro ca. 50-200 bp ihrer Telomerasequenzen [51]. Die telomere DNA der meisten menschlichen somatischen Zellen verkürzt sich mit den aufeinanderfolgenden Zellteilungen, bis sie ab einer kritischen Telomerlänge von ca. 1500 bis 4000 bp nicht mehr proliferieren können [42, 50]. Dieser Punkt wird nach

seinem Entdecker als Hayflick-Limit bezeichnet und gibt das Signal zum Eintreten in die zelluläre Seneszenz. Harley et al bezeichneten das Telomer daher als „Uhrwerk der Mitose“ [51, 66]. Die zelluläre Seneszenz definiert die limitierte proliferative Kapazität normaler Zellen in vivo und in vitro [53]. Eine auf Olovnikov [122] zurückgehende Theorie bringt das Phänomen der zellulären Seneszenz mit dem Problem der Endreplikation [89, 166] in Zusammenhang. Seiner Meinung nach führt der Verlust telomerer DNA zum Verlust essentieller Gene und damit zum Zelltod.

In somatischen Zellen des Menschen sind die Telomere stets signifikant kürzer als in Keimbahnzellen und fetalen Zellen. Ihre Länge nimmt in den somatischen Zellen mit zunehmendem Alter ab. Die altersabhängige progressive Verkürzung von Telomeren bei der Replikation lässt sich auch in vivo, z.B. beim Vergleich hämatopoetischer Stammzellen fetaler und adulter Spender, beobachten [162]. Junge Individuen besitzen in den meisten Fällen Zellen mit längeren Telomeren als ältere, was durch Bestimmung der mittleren Telomerlänge in peripheren Blutzellen gezeigt werden konnte [134]. Bodnar et al [12] demonstrierten den kausalen Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und der Lebensdauer der Zellen in vitro. Sie wiesen die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT in primären Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen nach, die verlängerte Telomere und reduzierte Seneszenzmarker (β -Galactosidase) zeigten.

1.1.3.2 Bedeutung der Telomerase

Das Enzym Telomerase kann Telomere verlängern und somit den teilungsbedingten Verlust telomerer Sequenzen kompensieren. Dazu benutzt es die eigene interne RNA-Komponente als Matrize für die Synthese von telomeren DNA-Sequenzen. Die Matrizen-RNA enthält ungefähr anderthalbmal die komplementäre Sequenz zur telomeren Sequenz. Greider und Blackburn [43] vermuteten, dass dieser Überhang die Telomerase befähigt, an eine existierende telomere Sequenz mehrere Basenpaare zu hybridisieren und diese Sequenz zu verlängern, indem sie die eigenen restlichen Basen als Schablone nutzt.

Die Telomerase wird physiologischerweise in der Embryonalzeit synthetisiert. Nach Abschluss der Organogenese sistiert die Telomeraseaktivität [75, 168].

In Untersuchungen lässt sich aktive Telomerase in embryonalen Zellen, in Keimgewebe, gelegentlich in Stammzellen und häufig in Tumorzellen nachweisen. In den meisten normalen somatischen Zellen ist die Telomerase nicht exprimiert [50, 132]. Ausnahmen bilden die basalen Kompartimente der Stammzellen von hochregenerativen Geweben, wie des Immunsystems, der Haut und des Intestinaltraktes.

So ließ sich Telomeraseaktivität sowohl in Leukozyten von peripherem Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark [15, 25, 60] nachweisen, als auch in stimulierten Lymphozyten [11, 60], in den multipotenten Basalzellen der Epidermis [47] und im Epithel lichtexponierter normaler Haut [153]. Hsiao et al [64] konnten zeigen, dass proliferierende Endothelzellen Telomeraseaktivität besitzen. In einer Studie am gesunden Endometrium fanden Kyo et al [84] die höchste Telomeraseaktivität in der späten Proliferationsphase, gefolgt von einem drastischen Abfall in der Sekretionsphase. Eine weitere Untersuchung zu einer positiven Telomeraseaktivität in regenerativen Geweben gibt es an Haarfollikeln [130].

Auch in benignen Tumorgeweben lässt sich eine Telomeraseaktivierung nachweisen, so z.B. in Fibroadenomen der Mamma [56], in tubulären Adenomen des Gastrointestinaltraktes [152] und in benignen Prostata-Adenomen [146].

1.1.4 Telomere, Telomerase und Immortalisierung

Ein Stufenmodell beschreibt, wie die Zellen durch Umgehung der zellulären Seneszenz eine unbeschränkte Teilungskapazität, die sog. Immortalisierung, erreichen können [169].

Nach ca. 20 Zellverdopplungen tritt ein initialer Wachstumsstopp auf. Dieser Zustand wird als M0-Stadium (M für mortality) bezeichnet [76].

Die zelluläre Seneszenz entspricht dem ersten Mortalitätsstadium M1 mit einer Verkürzung der Telomerlänge in humanen Zellen auf ungefähr 5000 bp. Die stetige Reduktion der Telomere im Genom löst DNA-Schädigungssignale („DNA damage response pathways“) aus. Durch Interaktionen zwischen Tumorsuppressorproteinen wie p53 und pRb wird der Zellzyklus in der ersten gap-Phase (G 1) angehalten [170].

Zellen können ihre Lebensspanne verlängern, wenn onkovirale Infektionen (z.B. HPV 16 oder SV-40) durch Mutationen in der DNA weitere Zellteilungen ermöglichen. Damit können sie ab einer kritischen Telomerlänge das zweite Mortalitätsstadium M2 erreichen, die „crisis“ [141, 169].

Die derzeitige Telomerasehypothese postuliert, dass die M2-Krise durch die Aktivierung von Telomerase umgangen werden kann. Die verkürzten Telomere werden in ihrer Länge erhalten, im Einzelfall sogar verlängert. Die Zellen können sich ungebremst weiter teilen und erreichen einen potenziell immortalen Zustand [170]. Bei immortalisierten Zellen in vitro [24] und in Tumorzellen in vivo [32] fanden sich dann auch kurze, aber teilungsunabhängige stabile Telomere.

1.1.5 Telomeraseaktivierung in Tumoren

Für die Transformation zur Malignität sind vermutlich bis zu sieben verschiedene Alterationen notwendig [49]:

- Generierung selbststimulierender Wachstumssignale,
- Unempfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Wachstumssignalen,
- Resistenz gegenüber Apoptose,
- unbegrenztes Proliferationspotenzial (Telomeraseaktivierung),
- Fähigkeit zur Angiogenese,
- Gewebeinvasion und
- Metastasierung.

Um die Bedeutung der Telomerase bei der Entstehung und dem Wachstum menschlicher Tumoren zu erkennen, wurden zahlreiche Untersuchungen an vielen verschiedenen Tumorgeweben durchgeführt.

Nach der Entwicklung ihres TRAP-Assays untersuchten Kim et al [75] erstmals Gewebeproben von 12 verschiedenen Tumoren. Dabei wiesen sie aktive Telomerase in 90 von 101 Biopsien (89 %) verschiedener Tumoren, jedoch in keinen der untersuchten 50 normalen somatischen Gewebeproben nach.

1.1.5.1 Telomeraseaktivierung während der Karzinogenese

Die Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der multiple genetische Alterationen beinhaltet [6]. Zu den genetischen Veränderungen bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen zählen besonders eine Überexpression von Onkogenen sowie der Funktionsverlust von Tumorsuppressor-Genen. Die meisten Zellen unterliegen bei angehäuften Mutationen nicht der malignen Transformation, sondern nur einzelne Zellen nehmen an der Karzinogenese teil. Diese drückt sich histologisch als Progression des normalen Epithels über hyperplastische und dysplastische Veränderungen zum Carcinoma in situ und schließlich zum invasiven Karzinom aus [142].

In allen bisher untersuchten Tumorarten wurden verkürzte Telomere gefunden [5]. Das Vorhandensein von kurzen Telomeren bei nachweisbarer Telomeraseaktivität scheint auf die Aktivierung als spätes Ereignis in der Karzinogenese hinzuweisen.

Entgegengesetzt dazu gibt es Untersuchungen, die die Telomeraseaktivierung auch schon in frühen Stadien von oralen Plattenepithelkarzinomen finden [149]. So wurde z.B. auch der Telomerasenachweis in Leukoplakien mit verschiedenen Dysplasiestufen [72, 96, 150] als ein relativ frühes Auftreten in der Karzinogenese gewertet.

Die Telomeraseaktivierung in prämaligen Läsionen und in Normalgeweben aus dem Randbereich maligner Tumoren erklärten Kim et al [75] mit der Präsenz von vereinzelten, histopathologisch noch nicht erkennbaren, aber bereits immortalisierten Zellen.

1.1.5.2 Telomeraseaktivierung in prämaligen Geweben aus dem Kopf-Hals-Bereich

Im Gegensatz zu telomerasenegativen normalen oralen Mukosaproben wurde in Dysplasien und Hyperplasien eine zwar geringe, aber positive Telomeraseaktivität nachgewiesen [150]. Die Leukoplakie ist eine Präkanzerose, auch ohne Zellatypien, und ist in der Umgebung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC, head neck squamous cell carcinomas) zu finden [72, 96, 150]. In 36 % entwickeln Leukoplakien, die epitheliale Dysplasien aufweisen, nach ca. 7 Jahren ein Plattenepithelkarzinom [142].

38 % bis 75 % der Leukoplakien mit leichten bis schweren Dysplasien waren in verschiedenen Untersuchungen telomerasepositiv [72, 107, 113, 133]. In einigen Studien fand sich eine Korrelation der positiven Proben zum Dysplasiegrad, zum abnehmenden Differenzierungsgrad und zum Proliferationsstatus [72, 97, 113].

In Tabelle 1 sind aus der Literatur Arbeiten über die Telomeraseaktivität in prämaligen Läsionen des Kopf-Hals-Bereiches aufgeführt.

Tabelle 1: Telomeraseaktivität in prämaligen Läsionen des Kopf-Hals-Bereiches

Präkanzerosen	Telomeraseaktivität (positive/ untersuchte Proben)	Literaturquelle
oraler Lichen planus	70 % (14/ 20)	Thongprasom et al [156]
orale Leukoplakien	75 % (27/ 36)	Kannan et al [72]
	55 % (12/ 22)	Liao et al [93]
	38 % (10/ 26)	Miyoshi et al [107]
	38 % (10/ 26)	Mutirangura et al [113]
	50 % (4/ 8)	Ries et al [133]
Mittelwert:	53 % (63/ 118)	

1.1.5.3 Telomeraseaktivierung in malignen Tumoren und Tumorrangewebe verschiedener Lokalisation

Nach einer Übersicht bei Rhyu [132] wurden in 340 von 400 verschiedenen malignen Tumorproben eine Telomeraseaktivität nachgewiesen. Mit Ausnahme des Retinoblastoms [45] scheint die Telomerase in menschlichen Tumoren in 70 % bis 100 % aktiv zu sein [138, 140; Tab. 2].

Magentumoren zeigten in 85 % eine Telomeraseaktivierung an, auch bei frühen Karzinomen. Die meisten der telomerasepositiven Tumoren waren in einem fortgeschrittenen Stadium und metastasiert. Die Überlebensrate der Patienten mit nachweisbarer Telomeraseaktivität im Tumorgewebe war signifikant geringer als die der Patienten mit telomerasenegativem Tumorgewebe [59]. Eine andere Arbeitsgruppe unter Hiyama et al [61] untersuchte Telomerasespiegel in Lungentumoren. Dabei fand sie in allen Proben von kleinzelligen Bronchialkarzinomen und deren Metastasen eine hohe Telomeraseaktivität, während diese in Proben von nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen sowohl negative als auch positive Werte zeigte. In der Mehrzahl von hepatozellulären Karzinomen [117], Nierenzellkarzinomen [104] und gynäkologischen Tumoren [82] wurde eine Telomeraseaktivität nachgewiesen. Während bei Mehle et al [104] kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis der Telomeraseaktivität bei Nierenzellkarzinomen und klinisch-pathologischen Parametern wie dem Differenzierungsgrad, der Stadieneinteilung und klinischem Verlauf festgestellt wurde, fanden Hiyama et al [56] bei Mammakarzinomen eine starke Assoziation zwischen der Stadienklassifikation und der Telomeraseaktivität.

In Tabelle 2 wurden aus der Literatur Arbeiten über den Telomerasenachweis in malignen Tumoren nach Shay und Bacchetti [138] sowie nach Dhaene et al [35] zusammengefasst.

Tabelle 2: Telomeraseaktivität in wichtigen malignen Tumoren

Lokalisation maligner Tumoren	Telomeraseaktivität (positive/ untersuchte Proben)	Literaturquelle
Mammakarzinome	93 % (130/ 140)	Hiyama et al [56]
Ovarialkarzinome	86 % (18/ 21)	Kyo et al [82]
Endometriumkarzinome	92 % (12/ 13)	Kyo et al [82]
Bronchialkarzinome	80 % (109/ 136)	Hiyama et al [61]
Kolorektumkarzinome	80 % (40/ 50)	Li et al [92]
Hepatozelluläre Karzinome	85 % (22/ 26)	Kojima et al [78]
Magenkarzinome	85 % (56/ 66)	Hiyama et al [59]
Nierenzellkarzinome	71 % (40/ 56)	Mehle et al [104]
Prostatakarzinome	84 % (21/ 25)	Sommerfeld et al [146]
Melanome	86 % (6/ 7)	Taylor et al [153]
Basalzellkarzinome	95 % (73/ 77)	Taylor et al [153]
Mittelwert:	85 % (527/ 617)	

Bei vielen Tumoruntersuchungen wurden auch die angrenzenden Gewebe bewertet. Dabei sind Angaben über die genaue Entfernung zum Tumorzentrum sowie über einen Restkarzinomgehalt häufig nicht benannt worden. In einer Übersicht von Dhaene et al [35] schwankten die Angaben zu einer Telomeraseaktivierung in tumorbenachbarten Geweben zwischen 0 % bei Mammakarzinomen, 7 % bei Tumoren im Gastrointestinaltrakt und 17 % bei Tumoren der Schilddrüse. Die Telomeraseaktivität in histopathologisch unauffälligen, dem malignen Tumor benachbarten Geweben z.B. von Bronchialkarzinomen, Nierenzellkarzinomen oder Prostatakarzinomen wurde zwischen 12 % und 17 % angegeben. Tahara et al [152] wiesen in normalen Tumorrandgeweben bei Kolonkarzinomen in 25 % eine Telomeraseaktivität nach.

1.1.5.4 Telomeraseaktivierung in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) und ihren angrenzenden Geweben

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region sind zu ca. 80-90 % telomerasepositiv [97]. Nach Sumida et al [149] korreliert die Telomeraseaktivität mit der Progressivität der oralen Tumoren.

In extraoral gelegenen Tumoren wies man eine positive Telomeraseaktivität in 25 % bis 88 % bei kutanen Plattenepithelkarzinomen und Melanomen nach [125, 153].

Die Telomeraseaktivität war in den untersuchten Tumorproben unterschiedlich. Die mittleren und wenig differenzierten Plattenepithelkarzinome zeigten eine höhere Aktivität als die gut differenzierten HNSCC. Auch war in den metastatischen Geweben die Telomeraseaktivität höher als in den primären HNSCC [150].

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse wichtiger Arbeitsgruppen zur Telomeraseaktivität in Kopf-Hals-Tumoren.

Tabelle 3: Telomeraseaktivität in Kopf-Hals-Tumoren

Tumorlokalisation	Telomeraseaktivität (positive/ untersuchte Proben)	Literaturquelle
orale Plattenepithelkarzinome	90 % (18/ 20)	Curran et al [27]
	89 % (32/ 35)	Hohaus et al [62]
	75 % (39/ 52)	Kannan et al [72]
	92 % (24/ 26)	Kim et al [75]
	68 % (52/ 77)	Koscielny et al [79]
	82 % (32/ 39)	Liao et al [93]
	90 % (26/ 29)	Mao et al [97]
	97 % (30/ 31)	Miyoshi et al [107]
	88 % (14/ 16)	Mutirangura et al [113]
	78 % (25/ 32)	Patel et al [127]
	48 % (22/ 46)	Ries et al [133]
	96 % (28/ 29)	Sumida et al [145]
Mittelwert:	79 % (342/ 432)	
extraorale Plattenepithelkarzinome der Haut	30 % (3/ 10)	Chen et al [19]
	88 % (7/ 8)	Ogoshi et al [118]
	25 % (3/ 12)	Parris et al [125]
	83 % (15/ 18)	Taylor et al [153]
	Mittelwert:	58 % (28/ 48)

Eine Telomeraseaktivität in histopathologisch normalen Geweben in der Umgebung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ist erstmals in einer Studie von Mao et al [97] untersucht worden. Ein großer Anteil der korrespondierenden, nichtneoplastischen Gewebeverbände von Kopf-Hals-Tumoren wurde als telomerasepositiv beschrieben [62, 97, 127].

Tabelle 4 zeigt Ergebnisse aus der Literatur über den Telomerasenachweis in benachbarten Geweben von Kopf-Hals-Tumoren.

Tabelle 4: Telomeraseaktivität in benachbarten Geweben von Kopf-Hals-Tumoren

normales Tumorrandgewebe	Telomeraseaktivität (positive/ untersuchte Proben)	Literaturquelle
Orale Plattenepithelkarzinome	76 % (16/ 21)	Hohaus et al [62]
	38 % (6/ 16)	Kim et al [75]
	58 % (38/ 66)	Koscielny et al [79]
	74 % (22/ 30)	Patel et al [127]
	33 % (1/ 3)	Ries et al [133]
Mittelwert:	61 % (83/ 136)	
Mundspüllösungen bei Plattenepithelkarzinomen	32 % (14/ 44)	Califano et al [17]
	27 % (4/ 15)	Sumida et al [150]
Mittelwert:	30 % (18/ 59)	

1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC)

Orale und extraorale Kopf-Hals-Tumoren sind zu 90-95 % Plattenepithelkarzinome. Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens betreffen die Lippe, die Zunge, den Mundboden, den Gaumen und den Rachen. Karzinome der Speicheldrüsen sind Adenokarzinome [33].

Klinische Symptome wie Heiserkeit, Schluckbeschwerden, Fremdkörpergefühl und schlecht heilende Ulzera werden in frühen Stadien häufig nicht beachtet. Die Symptomatik variiert in Abhängigkeit von der Primärlokalisierung und dem Krebsstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung [164].

Operation, Radiotherapie und Chemotherapie sowie deren Kombinationen gelten heute als anerkannte Therapiemodalitäten. Die Grenzen der Operabilität bzw. Resektabilität werden von der Größe des Primärtumors, der Lymphknotenmetastasierung und der Lokalisation bestimmt. Die Operation des Primärtumors wird häufig mit einer Ausräumung verschiedener Lymphknotengruppen (Neckdissection) verbunden [33, 63].

Trotz therapeutischer Fortschritte durch die Einführung von Kombinationstherapien bleibt die Prognose der HNSCC schlecht und hat sich während der letzten drei Jahrzehnte nicht signifikant geändert [63, 108].

1.2.1 Lokalrezidive und minimal residual disease (MRD)

Das Therapieversagen bei Kopf-Hals-Tumoren wird durch Lokalrezidive und Lymphknotenmetastasen sowie durch das Auftreten von Zweittumoren (second primary tumours, SPT) bestimmt. Das Rezidivrisiko ist vom Tumorstadium abhängig [87]. Mundbodenkarzinome haben eine besonders schlechte Prognose. Die Karzinome, so auch die HNSCC, metastasieren vorwiegend lymphogen [40, 167]. Fernmetastasen treten relativ selten auf, meist erst im weiteren Fortschritt der Tumorerkrankung und betreffen hauptsächlich die Lunge [69]. Ein signifikanter Prozentsatz von 10-30 % der Patienten entwickelt Lokalrezidive, obwohl die Resektionsränder histopathologisch als karzinomfrei beurteilt wurden [87, 158]. Der hohe Anteil von Lokalrezidiven und Zweitkarzinomen wird durch zwei Theorien zu erklären versucht.

Zum einen spielt die Verteilung von malignen Zellen als Mikrometastasen eine Rolle. Einzelne disseminierte, mikroskopisch nicht zu entdeckende Tumorzellen im unmittelbaren Tumorrand im Sinne von Mikrometastasen werden als minimal residual disease (MRD) oder auch als disseminated cancer cells (DCC) beschrieben [40, 1230, 159, 160].

Zum anderen finden multiple transformierende Ereignisse nach der Theorie der Feldkanzerisierung [143] statt. Demnach wird ein Gewebegebiet wiederholt Karzinogenen, im Kopf-Hals-Bereich vor allem Tabak und Alkohol, ausgesetzt. Am Anfang steht die genetische Alteration einzelner Zellen als Ursprung späterer prämaligener Felder, deren verwandte Klone zur Entstehung von unabhängigen prämaligen und malignen Herden führen [151].

1.2.2 Ergänzung der histopathologischen Diagnose von Tumorrangewebe aus Kopf-Hals-Tumoren durch Marker

Der Nachweis und die Therapie der minimalen residualen Erkrankung zur Reduzierung von Lokalrezidiven und Fernmetastasen hatten das Management der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region erheblich verändert [159]. Die klassische Diagnose durch die Histopathologie und die Radiologie erscheint nicht sensitiv genug, wenige maligne Einzelzellen aufzudecken.

In histopathologisch karzinomfreien Tumorrangewebe werden neben der Immunhistochemie molekulare Techniken eingesetzt. Gegenwärtige Forschungen prüfen, inwieweit spezifische genetische Veränderungen von Tumorzellen als molekulare Marker genutzt werden können.

Ein molekularer Marker muss zur Tumorcharakterisierung drei Kriterien erfüllen: Erstens muss er eng mit der Entstehung von Tumoren assoziiert sein, zweitens muss er zum Zeitpunkt der Tumorinvasion auftreten und drittens soll er in allen neoplastischen Zellen unverändert vorhanden sein [14].

Bei HNSCC sind molekulare Marker etabliert, die p53-Mutationen [8, 14, 126] und Mikrosatelliten-Veränderungen von den drei Chromosomen 9p, 3p, 17p [151] erfassen. In der Immunhistochemie werden z.B. monoklonale Antikörper (MAbs) gegen die Epitope E 48, U 36 oder Zytokeratine angewendet oder die sehr sensitive RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) eingesetzt [40, 159, 160].

Der molekulare und immunzytochemische Nachweis von MRD in Lymphknoten, Knochenmark und peripherem Blut und von Feldkanzerisierung [143] sollen zu einer Präzisierung der TNM-Klassifikation beitragen und zur Identifikation jener Patienten führen, die lokale oder entfernte Rezidive entwickeln könnten [126, 159].

1.2.3 Risikofaktoren der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Zu den Hauptrisikofaktoren der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich gehören der Tabak- und ein hoher Alkoholkonsum, wobei besonders für den Tabakkonsum eine Dosisabhängigkeit nachgewiesen ist [63, 95]. Raucher erkranken an bösartigen Tumoren des Mundes und des Rachens bis zu sechs Mal häufiger als Nichtraucher, wobei die Kombination von Alkoholkonsum und Rauchen das Risiko verstärkt. Auch der Genuss von rohem Tabak, wie z.B. Kautabak, stellt ein hohes Risiko dar [2, 164]. Weitere Risikofaktoren sind unzureichende Mundhygiene und ein zu geringer Verzehr von Obst und Gemüse [63, 147]. Für oropharyngeale Plattenepithelkarzinome konnte eine ätiologische Beziehung zu Hochrisiko-Typen von HPV 16 und 18 nachgewiesen werden [41, 105, 128, 174].

Für extraorale Lokalisationen von Plattenepithelkarzinomen ist die Exposition der Haut mit UV B-Licht ein wichtiger Risikofaktor [153].

1.2.4 Epidemiologie der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Die Inzidenz für Krebserkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches hat sich bei den Männern in Deutschland seit der Mitte der 80er Jahre kaum verändert, dagegen bei Frauen zugenommen. Die geschätzte Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen ist in Deutschland bei Männern mit etwa 7800 mehr als doppelt so hoch wie bei Frauen mit etwa 3000. Das durchschnittliche Erkrankungsalter ist in den letzte Jahren gesunken

und liegt derzeit für Männer bei 58 Jahren und für Frauen bei 63 Jahren. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Sterblichkeit. Die relative 5 Jahres-Überlebensrate wird für Männer mit 43 % und für Frauen mit 56 % angegeben [2, 63].

1.3 Nachweismöglichkeiten der Telomerase

Für den Nachweis von Telomerase gibt es unterschiedliche methodische Möglichkeiten (Tab. 5).

Zunächst wurde die Telomeraseaktivität indirekt durch die Messung der Änderung der durchschnittlichen Telomerlänge bestimmt [1].

Vor 1994 wurde als initiale Standardmethode zur Bestimmung der Telomeraseaktivität die Verlängerung eines kurzen synthetischen DNA-Stückchens, eines sogenannten Oligonukleotidprimers, gemessen. Allerdings erforderte die Nachweismethode der Primerverlängerung bis zu diesem Zeitpunkt relativ hohe Mengen an Zellen bzw. Geweben [26]. Erst durch die hochsensitive PCR und die Entwicklung des Nachweisprotokolls TRAP von Kim et al 1994 [75] war es möglich, Telomerase reproduzierbar nachzuweisen. Die Einführung der PCR durch Mullis und Faloona im Jahr 1985 [112] konnte die Sensitivität des Telomerasenachweises um den Faktor 10^4 verbessern. Durch ein Detergenz-vermitteltes Lyseverfahren wurde eine effiziente Telomeraseextraktion aus einer geringeren Zellanzahl möglich.

Modernere Nachweismethoden der Telomerase umfassen die Untersuchungen der Genexpression einzelner Komponenten, wie z.B. der hTR anhand von In-situ-Hybridisierung, Northern-Blot, RT-PCR und Immunhistochemie [35, 73, 145]. Für den indirekten Telomerasenachweis gibt es mehrere Ansätze durch Nachweis der katalytischen Untereinheit hTERT-mRNA und hTERT-Protein [35, 65, 145, 171]. Ein neuer Ansatz liegt im Nachweis von Seneszenzmarkern, wie der SA- β -gal-Aktivität, der p16- oder p21-Expression [73]. Die In-situ-Hybridisierung wird eingesetzt, um die Telomeraseaktivität in Tumorzellen auf zytologischer Ebene zu untersuchen [54, 118, 137].

Tabelle 5: Nachweismöglichkeiten von Telomerase und Telomeren (nach Keith et al [73])

Telomerlänge	Telomerase-Genexpression	Telomeraseaktivität	Seneszenz-Phänotyp
Southern-Blot	Northern-Blot	TRAP-Assay	SA- β -gal-Aktivität
In-situ-Hybridisierung	In-situ-Hybridisierung		p16-Expression
Flow-Cytometrie	RT-PCR		p21-Expression

1.3.1 Messung der Telomeraseaktivität durch den TRAP-Assay

Der TRAP-Assay von Kim et al [75] wurde 1994 veröffentlicht. Das Protokoll umfasst die Präparation eines Proteinextrakts aus lysierten Zellen und die Zugabe der Primer-Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dUTP und eines Primers als künstliches Telomer. Ist im Proteinextrakt Telomerase vorhanden, werden an den Primer typische TTAGGG-Wiederholungseinheiten angehängt. Dieses verlängerte Reaktionsprodukt kann in einer konventionellen Polymerasekettenreaktion (PCR) um ein Vielfaches der Basenhexamere vervielfältigt (amplifiziert) werden. Der PCR liegt die in den Zellen ablaufende DNA-Replikation zugrunde. Sie verläuft in drei Schritten in vorgegebenen Temperaturbereichen. Im Abschnitt der Denaturierung wird bei einer Temperatur von 90 °C die Doppelstrang-DNA zu Einzelsträngen aufgeschmolzen. In der Phase der Aushärtung (Annealing) bei 50 °C dienen die komplementären Einzelstrangabschnitte als Matrize für die mit ihnen hybridisierenden Primer aus synthetischen Oligonukleotiden. Die Polymerisation bildet ein Hybridisierungsprodukt, welches die DNA-Polymerase zur Neusynthese zum neuen Doppelstrang nutzen kann.

In der Polyacrylgel-Elektrophorese kommt als Beweis für eine Enzymaktivität ein typisches 6 bp-Bandenmuster zur Darstellung, eine Hexamerleiter.

Es wurden zahlreiche Modifikationen des Originalprotokolls eingeführt, um die Reproduzierbarkeit (Reliabilität) und die Sensitivität zu verbessern. Während im Originalprotokoll radioaktiv markierte Nukleotide für eine Gel-Elektrophorese als Detektionsverfahren verwendet werden, sind verschiedene nichtradioaktive Nachweisvarianten der Amplifikationsprodukte in Gebrauch, wie z.B. der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) und fluoreszierende Primer. Modifizierte Hybridisierungsverfahren nutzen die komplementäre Basenpaarung von einzelsträngigen Nukleinsäuren.

Ohyashiki et al [120] kombinierten den TRAP-Assay mit einer In-situ-Hybridisierung in der In-situ-PCR und verbanden damit die Empfindlichkeit der PCR mit dem In-situ-Nachweis der Telomerase. Erste Arbeiten über eine immunhistochemische Darstellung der Telomerase über den Nachweis von hTERT wurden publiziert [58, 129].

1.3.2 Nachweis der Telomeraseaktivität mit einem PCR-ELISA

Der in dieser Arbeit verwendete Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA-Kit [144, 155] ist eine Erweiterung der Originalmethode von Kim et al [75] zum Nachweis von Telomeraseaktivität durch eine nichtradiologische Methode. Der Nachweis der Telomeraseaktivität erfolgt in zwei Schritten: einer PCR mit anschließender Hybridisierung und einem ELISA mit immunologischem semiquantitativen Nachweis telomerasenspezifischer Sequenzen.

1.4 Aufgabenstellung

Plattenepithelkarzinome in der Kopf-Hals-Region wachsen aggressiv und weisen eine hohe Rezidivrate auf. Seit Jahren wird daher zusätzlich zur histopathologischen Diagnose nach Markern gesucht, die zur frühen Erkennung von Veränderungen in Tumorrangeweben geeignet sind. Es wurde vermutet, dass die Telomeraseaktivität eine solche Markerfunktion erfüllen könnte.

Meine Arbeit beschäftigt sich mit der Bestimmung der Telomeraseaktivität in Gewebeproben von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich, wobei zwischen Tumor-, Tumorrand- und tumorfernen Geweben differenziert wird. Parallel wird eine Kontrollgruppe tumorfreier Patienten untersucht, bei der die Ergebnisse telomerasenegativ erwartet werden.

Der Schwerpunkt meiner Arbeit ist auf die Frage gerichtet, ob der Telomerasenachweis sowohl als ein molekularer Marker für Tumorzentren als auch für histopathologisch karzinomfreie Tumorrangewebe eingesetzt werden kann.

Dabei untersuche ich, ob die Telomeraseaktivität mit dem Tumorstaging oder dem Tumorgrading korreliert.

Weiterhin werden klinische Daten der Patienten erfasst, um zu überprüfen, ob mit der bestimmten Telomeraseaktivität eine statistische Korrelierung zu dem weiteren Krankheitsverlauf unserer Patienten besteht.

Ich werte anhand der Patientenakten die Verteilung der bekannten Risikofaktoren wie Alter, Nikotin- und Alkoholkonsum sowie die Lokalisation der entnommenen Gewebe aus, um die Tumorpatienten mit den Kontrollpatienten zu vergleichen.

An ausgesuchten Patientenfällen werden die Telomeraseergebnisse meiner Arbeit mit den Ergebnissen eines Doktoranden-Tumorprojekt aus unserer Klinik [80, 88] in Beziehung gesetzt. Es wird der Frage nachgegangen, ob der Nachweis der Telomeraseaktivität besser als Tumormarker geeignet sei als der Nachweis von HPV 16 und 18 bzw. der Expression von p53. In dem Tumorprojekt wurde in Plattenepithelkarzinomgeweben und Geweben aus dem unmittelbaren Tumorrangewebe sowie aus tumorfernem Gewebe immunhistochemisch die Expression der Onkogene p53, bcl-2 (B-cell-lymphoma-2 Gen) und mdm-2 (murin double-minute-chromosome 2) untersucht und in der PCR humane Papillomviren, insbesondere HPV 16 und 18, nachgewiesen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gewebe von 40 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich untersucht. Für alle Proben stand die Gewebebank des Labors der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Charité, Campus Virchow-Klinikum, zur Verfügung. Von 20 dieser Patienten waren unmittelbar im Operationssaal drei Gewebeproben, aus dem Tumorzentrum, vom chirurgischen Tumorrand (2-3 cm vom Zentrum entfernt) und aus einem uni- bzw. kontralateral gelegenen, makroskopisch tumorfreien Gewebestück, entnommen worden. Der Zielstellung dieser Arbeit entsprechend wurden für die zu untersuchende Gruppe der Tumorrandgewebe Proben von weiteren 20 Patienten ausgewählt.

Die Kontrollgruppe erfasste 40 Patienten. Diese Gewebeproben stammen auch von Mundschleimhaut oder Haut aus dem Kopf-Hals-Bereich und waren im Operationssaal entnommen worden.

Tabelle 6: Zusammenstellung der drei Patientengruppen

Patientengruppe	Charakterisierung	Anzahl der Patienten
I	Tumorpatienten mit drei untersuchten Gewebegebieten (Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfern)	20
II	karzinomfreies Tumorrandgewebe von Tumorpatienten	20
III	tumorfreie Gewebe von Kontrollpatienten	40

Von allen 80 Patienten wurden aus den Patientenakten der Klinik und der Poliklinik Nikotin- und Alkoholkonsum als Risikofaktoren für eine Krebserkrankung sowie Angaben über den weiteren Verlauf der Tumorerkrankung ermittelt, um die Ergebnisse auch prognostisch auswerten zu können. Ebenso wurde erfasst, ob das zur Verfügung stehende Gewebe von einem Primärtumor oder von einem Rezidiv stammte, ob die Patienten prä- oder postoperativ eine Strahlen- und/oder Chemotherapie erhielten und ob im weiteren Verlauf Folgerezidive beobachtet wurden.

Die Zusammenstellung der Patientengewebe aus den Jahren 1994 bis 1997 ist bezüglich der Tumorlokalisierung relativ heterogen, da für die Labor-Tumorbank nur dann Gewebe zur Verfügung gestellt werden konnte, wenn dieses nicht insgesamt für

die histopathologische Diagnosestellung benötigt wurde. Von allen Patienten lag eine schriftliche Einwilligung zur Gewebeentnahme vor.

2.1.1 Charakterisierung der Patientengruppen

2.1.1.1 Charakterisierung der Tumorpatienten

In der Tabelle 7 sind die Lokalisationen der untersuchten Gewebe von den 40 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zusammengestellt.

Tabelle 7: Tumorlokalisation der 40 Tumorpatienten

Tumorlokalisation	Anzahl der Patienten
oral:	34:
Mundhöhle:	
Mundboden	8
Zunge	5
Mundboden/ Zunge	8
Kiefer	7
Planum buccale	3
Oropharynx:	
Tonsille	1
Weichgaumen	1
Zungengrund/ Uvula	1
extraoral:	6:
Ohr	2
Hals (unter M.sternocleidom.)	1
Lippe	2
Nase	1

Die Tabellen 8 und 9 zeigen in einer Übersicht das Geschlecht, das Alter zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme und die Tumorlokalisation der 40 Tumorpatienten. Weiterhin werden die zur Charakterisierung notwendige postoperative pTNM-Klassifikation mit der daraus abgeleiteten Stadieneinteilung und der Differenzierungsgrad der untersuchten Tumorgewebe angegeben. Zusätzlich ist aufgeführt, ob das untersuchte Gewebe aus einem Primärtumor oder einem Tumorrezidiv stammte und ob der Patient präoperativ bestrahlt oder chemotherapiert wurde. Dabei befinden sich in Tabelle 8 die 20 Tumorpatienten mit drei untersuchten Gewebegebieten (Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfern) und in Tabelle 9 die 20 weiteren Tumorpatienten, von denen nur histopathologisch karzinomfreies Tumorrandgewebe untersucht wurde.

Tabelle 8: Charakterisierung der 20 Tumorpatienten der Gruppe I mit drei untersuchten Tumorgebieten

Pat.-Code	Ge-schlecht	Alter [Jahre]	Lokalisation	Rezidiv-gewebe	TNM-Klassifikation	S	G	Radiatio (präop.)	Chemoth. (präop.)
5	m	39	Mundboden/ Zunge	nein	pT 3; pN 1	3	3	nein	nein
128	m	50	Kieferwinkel	nein	pT 2; pN 2b	4a	2	nein	nein
148	m	55	Tonsille	nein	pT 2; pN 1	3	3	nein	nein
158	w	76	Planum buccale	nein	pT 3; pN 1	3	2	nein	nein
175	m	58	unter M. sternocleido.	ja	pT 3; pN 2	4a	3	nein	nein
180	m	66	Kieferwinkel	ja	pT 1; pN 0	1	3	nein	nein
209	m	61	Mundboden	nein	pT 2; pN 2	4a	3	nein	nein
253	m	50	Mundboden	nein	pT 4; pN 1	4a	3	nein	nein
382	m	75	Ohr	ja	pT 4; pN 1	4a	2	ja	ja
385	m	58	Ohrknorpel	nein	pT 4; pN 1	4a	3	nein	nein
473	m	52	Mundboden	nein	pT 1; pN 0	1	2	nein	nein
474	m	58	Zungenrand	nein	pT 2; pN 1	3	2	nein	nein
539	m	59	Kieferwinkel	nein	pT 4; pN 2c	4a	2	nein	nein
7	w	72	Oberkiefer	nein	pT 2; pN 2	4a	2	nein	nein
13	m	45	Zungenrand	nein	pT 3; pN 2	4a	3	nein	nein
85	w	65	Mundboden/ Zunge	nein	pT 2; pN 0	2	2	nein	nein
86	m	52	Mundboden	ja	pT 4; pN 0	4a	3	ja	nein
461	m	63	Mundboden	nein	pT 2; pN 0	2	2	nein	nein
466	m	57	Mundboden/ Zunge	nein	pT 4; pN 0	4a	2	nein	nein
679	w	61	Unterkiefer	nein	pT 4; pN 0	4a	2	nein	nein

m: männlich; w: weiblich; S: Staging; G: Grading

Tabelle 9: Charakterisierung der 20 Tumorpatienten mit karzinomfreiem Tumorrangewebe (Gruppe II)

Pat.-Code	Ge-schlecht	Alter [Jahre]	Lokalisation	Rezidiv-gewebe	TNM-Klassifikation	S	G	Radiatio (präop.)	Chemoth. (präop.)
14	m	49	Mundboden	nein	pT 2; pN 1	3	2	nein	nein
36	w	53	Mundboden	nein	pT 1; pN 0	1	2	nein	nein
78	m	42	Mundboden/ Zunge	nein	pT 4; pN 2c	4a	2	nein	nein
83	m	52	Weichgaumen	ja	pT2; pN2; pM1	4c	3	ja	nein
93	m	50	Zungenrand	nein	pT 1; pN 0	1	3	nein	nein
103	m	53	Mundboden/ Zunge	nein	pT 2; pN 0	2	3	nein	nein
106	m	52	Zunge	ja	pTx; pN 0	Sx	1	nein	nein
133	m	57	Zungengrund/ Uvula	ja	pT 1; pN 0	1	2	nein	nein
142	w	59	Unterlippe	nein	pT 2; pN 0	2	2	nein	nein
293	m	53	Mundboden/ Zunge	nein	pT 1; pN 0	1	2	nein	nein
332	m	55	Planum buccale	nein	pT 1; pN 1	3	3	nein	nein
337	w	71	Planum buccale	nein	pT 3; pN 0	3	1	nein	nein
374	w	89	Nasenrücken	ja	pT 2; pN 0	2	2	nein	nein
412	m	74	Unterlippe	nein	pT 2; pN 0	2	2	nein	nein
413	m	54	Mundboden/ Zunge	nein	pT 1; pN 0	1	3	nein	nein
478	m	52	Mundboden	nein	pT 1; pN 0	1	2	nein	nein
502	m	58	Oberkiefer	nein	pT4; pN3; pM1	4c	2	nein	nein
535	w	48	Mundboden/ Zunge	nein	pT 4; pN 2	4a	2	nein	nein
667	m	58	Kieferwinkel	nein	pT 1; pN 0	1	2	nein	nein
678	w	64	Zungenspitze	nein	pT 2; pN 2c	4a	3	nein	nein

m: männlich; w: weiblich; S: Staging; G: Grading

2.1.1.2 Charakterisierung der Kontrollpatienten

Wir wählten aus unserer Gewebekbank Kontrollgewebe von 40 Patienten ohne einen malignen Tumor aus, deren Lokalisationen mit denen der Tumorgewebe annähernd vergleichbar waren. In Tabelle 10 ist die Lokalisation dieser Kontrollgewebe zusammengestellt.

Tabelle 10: Lokalisation der Gewebe von 40 tumorfreien Kontrollpatienten

Gewebelokalisation	Anzahl der Patienten
oral:	13:
Mundhöhle:	
Schleimhaut Mundhöhle	1
Gingiva	6
Lippenschleimhaut	1
Kiefer	2
Gaumen	1
Oropharynx:	
Uvula	2
extraoral:	27:
Ohr	11
Kopf-, Gesichtshaut	6
Lippe	1
Hals (Tracheostoma)	1
Nase	2
LKG- Spalte	2
Stirnhaut	1
Auge	3

In der Tabelle 11 ist das Geschlecht, das Alter zum Zeitpunkt der Operation und die Tumorlokalisierung der 40 Kontrollpatienten ohne eine Tumorerkrankung zusammengestellt.

Tabelle 11: Charakterisierung der 40 Kontrollpatienten ohne Tumorerkrankung (Gruppe III)

Pat.-Code	Ge-schlecht	Alter [Jahre]	Lokalisation	Pat.-Code	Ge-schlecht	Alter [Jahre]	Lokalisation
extraoral				oral			
38	w	10	Kopfhaut	15	m	58	Uvula
39	w	7	Ohrhaut	82	m	58	Uvula
179	w	44	Ohrhaut	173	w	5	Gingiva
181	w	30	Stirnhaut	212	w	18	Gingiva
183	m	31	Ohrhaut	233	m	12	Unterkiefer
195	m	54	Kopfhaut	336	m	23	Gingiva
199	m	10	Nase	427	m	30	Gingiva
208	m	12	LKG- Spalte	433	w	15	SH Lippe
230	w	17	Tracheostoma	437	m	20	Gingiva
231	m	3	LKG- Spalte	438	w	50	SH Mundhöhle
239	m	18	Stirnhaut	445	m	36	Gingiva
240	w	35	Ohrhaut	449	m	20	Unterkiefer
241	m	34	Kinn	479	w	30	Gaumen
243	m	20	Mittelgesicht				
273	m	4	Ohrhaut				
291	m	1	Lippe				
375	w	41	Atherom Auge				
381	w	46	Naseneingang				
383	w	78	Gesichtshaut				
390	m	8	Ohrhaut				
394	m	15	Ohrhaut				
453	w	24	Ohrhaut				
464	w	7	Ohrhaut				
465	w	57	Augenlid				
521	M	11	Ohrmuschel				
537	M	46	Augenbraue				
541	M	5	Ohrhaut				

LKG: Lippen-Kiefer-Gaumen; SH: Schleimhaut; m: männlich; w: weiblich

2.2 Materialgewinnung

In den verwendeten Gewebeschnitten der Tumorpatienten war es erforderlich zu überprüfen, ob Karzinomgewebe enthalten war. Für diese histopathologische Kontrolle wurden die Gewebeschnitte einer Kontroll-Färbung mit Hämalaun-Eosin (HE) unterzogen und durch einen Pathologen befundet. Er bewertete auch die mononukleäre Infiltration in den Tumorrangeweben.

Der Nachweis der Telomeraseaktivität in den zu untersuchenden Geweben beruht auf dem Nachweis von RNA, die aus den kryokonservierten Gewebeschnitten und aus etablierten Zelllinien gewonnen wurde. Die Isolierung der RNA aus den etablierten Zelllinien erforderte einen zusätzlichen Trypsinierungsprozess.

Während aller Arbeitsschritte bis zum ELISA waren nukleasefreie Bedingungen einzuhalten. Es musste eine Kontamination mit RNase (falsch-negative Ergebnisse) durch den Untersucher, aber auch eine Kontamination der Proben untereinander während der PCR (falsch-positive Ergebnisse) verhindert werden. Deshalb wurden destilliertes, nukleasefreies Wasser und sterile Einwegartikel verwendet und Aliquots der Fertiglösungen von Untersuchungskits hergestellt. Weiterhin wurden gestopfte Pipettenspitzen und RNase-freie Reaktionsgefäße benutzt. Alle Arbeitsgeräte und Arbeitsflächen reinigte ich vor jedem Gebrauch mit 70 %igem Alkohol und trug bei allen Arbeitsschritten Handschuhe. Eine Trennung der Arbeitsplätze für die Zellysierung, die PCR und den ELISA wurde eingehalten.

2.2.1 Gewebeentnahme

Die Tumor- und Kontrollgewebe sind nach der Entnahme im Operationssaal in steriler isotoner Kochsalzlösung transportiert worden. Innerhalb von 30 Minuten wurden Gewebelöcke von ca. 4 mm Kantenlänge in Gefriermedium (Tissue-Tek, Wiles Inc. Diagnostic Div., USA) eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert. Im Rahmen eines vorherigen Tumorprojekts an der Klinik wurden von einem großen Teil der Gewebe am Kryostaten bereits 4-6 μm dicke Gefrierschnitte angefertigt und ebenfalls bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert. Für die Telomerasebestimmung wurden an einem Kryomikrotom (Jung CM 3000, Leica, Nußloch) zusätzlich 20 μm dicke Schnitte hergestellt. Für die histopathologische Kontrolluntersuchung wurden ca. 5 μm dicke Schnitte angefertigt. Nach kurzer Lufttrocknung wurden alle neugefertigten Schnitte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.2.2 Histopathologische Kontrolle der molekularbiologisch untersuchten Gewebe

Von allen Geweben standen die histopathologischen Befunde aus den Patientenakten zur Verfügung. Dennoch war es erforderlich in den angrenzenden Gewebestücken zu überprüfen, ob der histopathologische Befund auf die verwendeten Schnitte zutraf. Dazu färbte ich 4-5 µm dicke Schnitte mit Hämalaun-Eosin: Nach einem schonenden Auftauen wurden die Schnitte 10 Minuten in Aceton (Fluka) fixiert, dann 5 Minuten in Hämatoxylin (DAKO) gefärbt und unter Sicht in Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung in 1%iger alkoholischer Eosinlösung (Chioma) für 15 Minuten. Nach gründlicher Spülung in Aqua destillata wurden die gefärbten Präparate mit Kaisers-Glycerin-Gelatine (MERCK) eingedeckt und zu einem späteren Zeitpunkt einem Pathologen zur Beurteilung vorgelegt.

2.2.3 Zelllinien und deren Kultivierung

2.2.3.1 Herkunft der Zelllinien

Für meine Untersuchungen standen drei Zelllinien eines Plattenepithelkarzinoms des Mundbodens einer Patientin zur Verfügung. Sie stammen von Lokalrezidiven eines Mundbodenkarzinoms nach verschiedenen Therapien. In Tabelle 12 ist die Herkunft der Zelllinien zusammengestellt.

Tabelle 12: Herkunft der untersuchten Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen

Zelllinie	Ursprung	etabliert von	TNM	Alter
UM-SCC 14A	1. Lokalrezidiv eines Plattenepithelkarzinoms im Mundboden nach Tumoroperation	Prof. T Carey*, University of Michigan (USA)	T1; N0; G 2-3	58 J.
UM-SCC 14B	2. Lokalrezidiv eines Plattenepithelkarzinoms im Mundboden, 8 Monate nach dem ersten Rezidiv	Prof. T Carey, University of Michigan (USA)	T1; N0; G3	58 J.
UM-SCC 14C	3. Lokalrezidiv eines Plattenepithelkarzinoms im Mundboden nach mehrfacher Vorbehandlung, 18 Monate nach dem 2. Rezidiv	Prof. T Carey, University of Michigan (USA)	T1; N0; G3	60 J.

SCC: squamous cell carcinoma; UM: University of Michigan

* Herrn Prof. T. Carey gilt ein Dank für die Etablierung der verwendeten Zelllinien.

2.2.3.2 Kultivierung der Zelllinien

Kultivierte Zellen überleben nur in Anwesenheit geeigneter Medien. Diese bestehen meist aus einer mit Aminosäuren und Vitaminen versetzten Salzlösung. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in unserem Labor in folgenden Medien (Tab. 13):

Tabelle 13: Kultivierung der Zelllinien

Zelllinie	Kulturmedium und zusätzliche Reagenzien	Dauer der Kultivierung	eingesetzte Zellmenge/ ml
UM-SCC 14A	DMEM (Gibco) 10 % FKS 4 mM Glutamin 50 U/ ml Penicillin 50 µg/ ml Streptomycin	8 Tage	$5-7 \times 10^5$
UM-SCC 14B	s. UM-SCC 14A	7 Tage	1×10^6
UM-SCC 14C	s. UM-SCC 14A	5 Tage	$1,5 \times 10^6$

SCC: squamous cell carcinoma; UM: University of Michigan; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium;
FKS: Fetales Kälberserum

2.2.4 Aufschluss der Gewebe und Zellen für die PCR

2.2.4.1 Trypsinierung der untersuchten Zelllinien

Die adhärent wachsenden Zellen mussten aus ihrem Zellverband mittels Trypsinierung gelöst werden, um sie der RNA-Lysierung zuführen zu können. Nach Entfernen des alten Mediums und Spülen mit 5 ml PBS-EDTA-Lösung (Phosphate buffered saline mit Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure-Zusatz; Dulbecco's, PAA Laboratories GmbH, Österreich) wurde jede Zellschale für 10-15 Minuten mit 2,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % - 0,02 % in PBS; TRN-Biochrom KG) versetzt und der Lösungsvorgang durch leichtes Klopfen mechanisch unterstützt. Das mehrmalige Spülen der Zellschalen mit 10 ml PBS ergab eine Zellsuspension, die 7 Minuten bei Raumtemperatur mit 850 rpm (rounds per minutes) und Bremse 9 zentrifugiert (Hettich Rotanta, TRC) wurde. Nach dem Entfernen des Überstandes schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit 10 ml PBS und jeweiliger Zentrifugation an. Das letzte Zellpellet wurde in 1 ml PBS in ein RNase-freies Reaktionsgefäß (Eppendorf) für die anschließende RNA-Isolierung überführt.

2.2.4.2 RNA-Lysierung

Zur Isolierung der RNA wurden die Kryostatschnitte bzw. das Zellpellet in 80-200 μl Lysispuffer (Fertiglösung 1 des Kits TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA) suspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. In einer vorgekühlten Zentrifuge (Hettich, EBA 12R) bei 14000 rpm und bei einer Temperatur von 4 °C wurde die Lösung für 20 Minuten zentrifugiert. Nach der Lysierung wurde der zellfreie Überstand in sterilen, RNase-freien Reaktionsgefäßen nach kurzem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.4.3 Proteinbestimmung in den Lysaten

Die PCR-Ansätze sind vergleichbar, wenn eine definierte Menge Protein eingesetzt wird. Dazu war eine vorherige Bestimmung der Proteinkonzentration notwendig. Für die verwendete Standardmethode nutzte ich den Bio-Rad DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) basierend auf dem von Lowry entwickelten Prinzip [94]: In einem alkalischen Medium kommt es zu einer Reaktion zwischen Protein und Kupfer, die eine Reduktion von Folin-Reagenz zu einer Substanz mit charakteristischer blauer Farbe messbarer Intensität ermöglicht. In einer Doppelbestimmung wurden zu 5 μl von jedem Lysat auf einer Mikrotiterplatte mit U-Wells 25 μl von Reagenz A (alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung) und 200 μl von Reagenz B (Folin-Reagenz) zugesetzt und nach 10 Minuten Inkubation die blaue Farbentwicklung an einem Mehrkanalphotometer (Dynatech MR 5000) bei 690 nm gemessen.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Bio-Rad

Reagenz A	alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung, NaOH	25 μl auf 5 μl des Lysats
Reagenz B	verdünntes Folin-Reagenz	200 μl auf 5 μl des Lysats
Standard II	Bovines Serum Albumin (BSA)	5 μl

Jeder PCR-Ansatz von 50 μl enthielt Proteinmengen von 3 bis 0,05 μg , die sich durch Verdünnungen der Lysate mit Lysispuffer ergaben.

Aus acht Standardverdünnungen der Proteinstammlösung BSA (Biorad DC Protein-Standard II) erstellte ich eine Konzentration-Extinktions-Kurve, aus der die gesuchten Konzentrationswerte der Lysate im Photometer ermittelt werden konnten (Abb. 4).

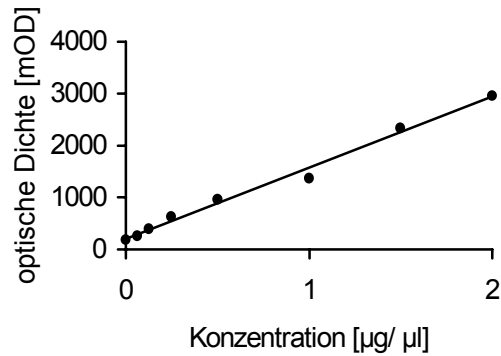


Abbildung 4: Standardkurve zur Ermittlung der Proteinkonzentration

2.3 Bestimmung der Telomeraseaktivität

Zum Nachweis der Telomeraseaktivität verwendete ich die Kits TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA (Roche, Cat.-No. 1 854 666) und TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{Plus} (Roche, Cat.-No. 2 013 789), die alle benötigten Reagenzien enthielten.

2.3.1 Testprinzip des Nachweises der Telomeraseaktivität

Zuerst erfolgt die Elongation und Amplifikation (Abb. 5). Nach der Primerverlängerung (Elongation von P1-TS mithilfe der Telomerase und von P2 mithilfe der Taq-DNA-Polymerase) laufen 30 Amplifikationszyklen mit den abwechselnden Phasen aus Denaturierung, Aushärtung und Polymerisation ab.

In der Hybridisierung wird das denaturierte PCR-Produkt an eine telomerase-spezifische, digoxigenierte Sonde gebunden.

Für die Detektion im ELISA wird das an eine Mikrotiterplatte (SA-MTP) fixierte hybridisierte PCR-Produkt dann einem monoklonalen Antikörper gegen Digoxigenin (anti-DIG-POD) ausgesetzt, der mit dem Enzym Peroxidase (POD) konjugiert ist.

Um das Produkt der PCR im ELISA sichtbar zu machen, wird die Fähigkeit des Enzyms Peroxidase (POD) genutzt, das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem farbigen Reaktionsprodukt umzusetzen. Nach Abstoppen der Enzymreaktion wird im letzten Schritt die Farbintensität des Reaktionsproduktes an einem Mehrkanalphotometer gemessen, die einen Rückschluss auf die Telomeraseaktivität zulässt.

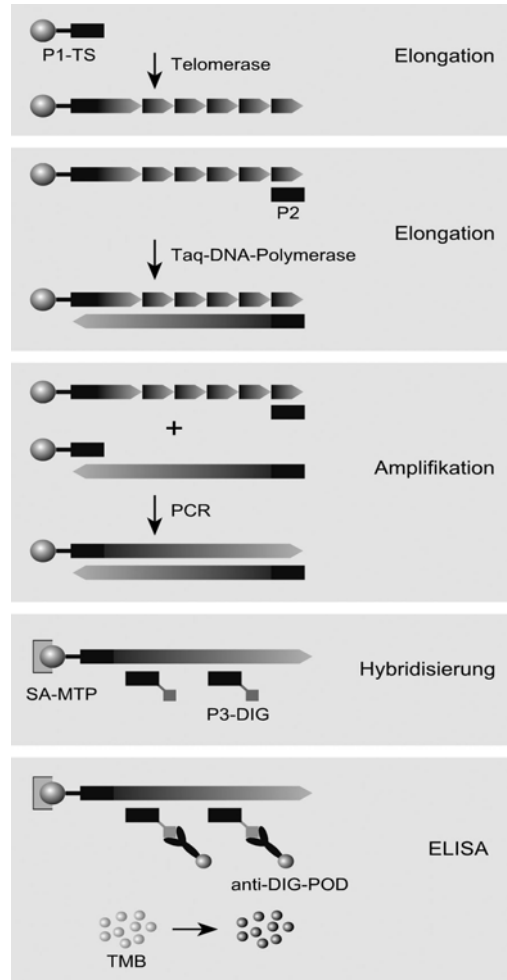


Abbildung 5: Nachweis der Telomeraseaktivität mit Hilfe des PCR-ELISA-Kits (mit freundlicher Genehmigung von Roche-Diagnostics, Mannheim, 1997)

P1-TS: Biotin-markierter synthetischer Primer; P2: Anker-Primer; P3-DIG: Digoxigenin-markierte Sonde; SA-MTP: Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte; anti-DIG-POD: mit Peroxidase konjugierter monoklonaler Antikörper gegen Digoxigenin

2.3.2 Telomerase-PCR

Die vorbereitenden Pipettierschritte für die PCR wurden am Laminararbeitsplatz (Reinstarbeitsplatz) auf Eis und mit gestopften Pipettenspitzen durchgeführt. Die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Reagenzien und die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten Lysatproben wurden zum Auftauen auf Eis gestellt.

Um für die PCR-Ansätze Proteinmengen der Lysate von $0,05\text{ }\mu\text{g}$ bis $3\text{ }\mu\text{g}$ untersuchen zu können, verdünnte ich diese mit Lysispuffer auf ein Volumen von $15\text{ }\mu\text{l}$. Dazu wurden $25\text{ }\mu\text{l}$ des Reaktionsgemisches (Fertiglösung 2, Tab. 15) pipettiert, das u.a. den synthetischen und Biotin-markierten Primer P1-TS enthält, an den die in den Proben

enthaltenen Telomerasesequenzen angefügt werden sollen. Der PCR-Ansatz wurde weiterhin mit 10 µl RNase freiem Wasser (ICN, Biomedicals, Inc., Ohio, USA) auf das eingesetzte Volumen von 50 µl aufgefüllt. Tabelle 15 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des in der PCR eingesetzten Reaktionsansatzes von 50 µl.

Bei jedem PCR-Ansatz wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt (vgl. Tab. 18). Als Positivkontrolle setzte ich 0,5 µg Protein des Lysats der Zelllinie UM-SCC 14C ein, deren Telomeraseaktivität in einem Vorversuch als sehr hoch ermittelt worden war. Zur Negativkontrolle wurde die gleiche Proteinmenge des Lysats der Zelllinie UM-SCC 14C nach einer Hitzeinaktivierung bei 85 °C über 25 Minuten in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2500) verwendet.

Tabelle 15: In der PCR eingesetztes Reaktionsvolumen von 50 µl

Probe	In Lysispuffer verdünnt auf die eingesetzte Proteinmenge	15 µl
Reaktionsgemisch (2x konzentriert)	Fertiglösung 2: Biotin-markiertes Telomerase-Substrat P1-TS unmarkierter Anker-Primer P2 Primer-Nukleotide (dNTPmix: dATP, dCTP, dGTP, dUTP) Taq-Polymerase in Tris-Puffer	25 µl
RNase freies Wasser		10 µl

Die PCR-Gefäße (MicroAmp, Perkin Elmer, Weiterstadt) wurden in den Thermocycler übertragen und die kombinierte Elongations-Amplifikations-Reaktion nach dem in Tabelle 16 aufgeführten Programm gestartet. Das Elongationsprodukt wurde in der PCR in 30 Zyklen amplifiziert, so dass am Ende dieses Schrittes PCR-Produkte mit Telomerase-spezifischen 6-Nukleotid-Anhängen standen.

Tabelle 16: Zusammenstellung der Temperaturen und des zeitlichen Ablaufes der PCR

Stufe	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1. Primer-Elongation	30:00	25
2. Telomerase-Inaktivierung	5:00	94
3. Amplifikation (30x)		
- Denaturierung	0:30	94
- "Annealing"(Aushärten)	0:30	50
- Polymerisation (Elongation)	1:30	72
4. Finale Elongation	10:00	72
5. Haltbarkeit des PCR-Produktes	maximal eine Woche	4

2.3.3 Hybridisierung des PCR-Produktes

Um die Sequenzen immunologisch nachweisen zu können, wurde der biotinylierte RNA-Strang mit einer telomerasespezifischen Sonde hybridisiert.

Zuerst wurden 10 µl des Amplifikats durch Zugabe von 20 µl Denaturierungsreagenz (vgl. Tab. 17) für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (IKA-Schüttler MTS 4, electronic) denaturiert.

Die Hybridisierung erfolgte aus technischen Gründen in zwei Schritten. Zuerst wurde das denaturierte Amplifikat mit 225 µl des Hybridisierungspuffers zwei Stunden bei 37 °C auf einem Thermomixer (Eppendorf) bei 500 rpm inkubiert. Der Hybridisierungspuffer enthielt die Digoxigenin-markierte, für Telomerasesequenzen hochspezifische Sonde (vgl. Tab. 17). Dann wurden jeweils 100 µl der Mixtur auf die mit Streptavidin vorbeschichteten Mikrotiterplatten-Strips übertragen und für eine weitere Stunde folienabgedeckt bei 37 °C inkubiert (Inkubator Störk-Tronic). Der Biotin-markierte Primer konnte in dieser Zeit über die Digoxigenin-Markierung mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion das Hybridisierungsprodukt an die Mikrotiterplatte fixieren.

2.3.4 ELISA zum Nachweis des PCR-Produktes

Die nicht gebundene Hybridisationslösung auf den Mikrotiterstreifen wurde nach Ablauf der Inkubationszeit in drei Waschschrritten mit Waschpuffer ausgewaschen.

Es wurden 100 µl der mit Peroxidase konjugierten, monoklonalen Anti-Digoxigenin-Antikörper pro Well in einer Arbeitsverdünnung von 1:50 für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 300 rpm dem Hybrid zugesetzt. Die lyophilisierten Antikörper wurden vor dem ersten Gebrauch in das ursprüngliche Volumen von 240 µl mit destilliertem Wasser aufgelöst, um eine Konzentration von 0,5 U/ml zu erreichen. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C. Die Verdünnung des Antikörperkonzentrates erfolgte vor jeder Benutzung mit dem Konjugat-Dilutionspuffer.

In fünf Waschschrritten wurden die nicht gebundenen Anteile des Antikörpers entfernt.

Der gebundenen Peroxidase wurden 100 µl des Substrats TMB angeboten, damit die Enzym-Farbreaktion zwischen der Peroxidase und dem Substrat ablaufen konnte. Dieser Prozess wurde nach maximal 30 Minuten durch Zugabe von 100 µl Stopp-reagenz unterbrochen. Am Mehrkanalphotometer wurde die Absorption bei 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die Absorptionswerte wurden gegen mitgeführte ELISA-Blank-Werte ermittelt (vgl. Tab. 18). Der Messbereich lag zwischen 0 und 3500 mOD (Tausendstel der Optischen Dichte).

Tabelle 17 enthält eine Übersicht über die in der Hybridisierung und im ELISA verwendeten Reagenzien.

Tabelle 17: Für die Hybridisierung und den Nachweis im ELISA verwendete Reagenzien

Amplifikat		10 µl
Denaturierungsreagenz	Fertiglösung (enthält Natriumhydroxid < 0,5 %)	20 µl
Hybridisierungspuffer	Fertiglösung (enthält zu Telomer-repeat-Sequenzen komplementäre DIG-markierte Sonde)	225 µl
Waschpuffer (10x konzentriert)	1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser	8 x 220 µl
Konjugat-Dilutionspuffer	Fertiglösung zur Herstellung der 1:50 Arbeitsverdünnung des Antikörpers	100 µl
Anti-Digoxigenin-Peroxidase	Lösen in 240 µl redestilliertem Wasser	
TMB	Fertiglösung (enthält das POD-Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	100 µl
Stoppreagenz	Fertiglösung (enthält < 5 %ige Schwefelsäure)	100 µl

DIG: Digoxigenin; POD: Peroxidase; TMB: Tetramethylbenzidin

2.4 Valuierung der Methode

2.4.1 Negativ-, Positiv- und Versuchskontrollen

Bei jedem Versuch wurde eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Eine bekannte telomeraseaktive Zelllinie diente als positive Kontrolle. Die Extinktion der hitzebehandelten Negativkontrolle sollte in jedem Fall unter dem Cut-off-Wert (< 150 mOD, vgl. 3.1.1.) liegen. Die Extinktion der Positivkontrolle sollte stets im stark positiven Bereich (> 1500 mOD) liegen.

Es wurden weiterhin Kontrollansätze in der PCR, in der Hybridisierung und im ELISA mitgeführt, in denen steriles Wasser anstelle der Proben mit den Reagenzien versetzt wurde (Tab. 18). Ein Ergebnis dieser Ansätze nahe dem Nullwert sprach für die saubere Durchführung des jeweiligen Arbeitsschrittes.

Alle Telomerase-Messwerte ermittelte ich abzüglich des ELISA-Blankwertes.

Tabelle 18: Zusammensetzung der mitgeführten Versuchskontrollen

Kontrollansatz	Zusammensetzung des Ansatzes	Volumen
Positivkontrolle	0,5 µg Protein des Lysats der Zelllinie UM-SCC 14C auf 15 µl mit Lysispuffer verdünnt; 25 µl Reaktionsgemisch; 10 µl Aqua dest.	50 µl
Negativkontrolle	0,5 µg Protein des Lysats der Zelllinie UM-SCC 14C nach Hitzeinaktivierung auf 15 µl mit Lysispuffer verdünnt; 25 µl Reaktionsgemisch; 10 µl Aqua dest.	50 µl
PCR-Kontrolle	15 µl Lysispuffer; 25 µl Reaktionsgemisch; 10 µl Aqua dest.	50 µl
Hybridisierungs-Kontrolle	10 µl Aqua dest.; 20 µl Denaturierungsreagenz; 225 µl Hybridisierungspuffer	255 µl
ELISA-Blank	100 µl Aqua dest.	100 µl

2.4.2 Untersuchung der negativen Versuchsergebnisse

Negative Versuchsergebnisse überprüfte ich nochmals auf ihre Richtigkeit, um PCR- und Telomerase-Inhibitoren in diesen Geweben erkennen zu können.

2.4.2.1 Kontrolle des Amplifikationsprozesses

Da in Gewebeproben Inhibitoren der Taq-Polymerase vorkommen können, mussten alle negativen Ergebnisse verifiziert werden, denn die Aktivität dieses Enzyms ist für die Kettenverlängerung (Polymerisation) bei der DNA- bzw. RNA-Replikation verantwortlich.

Um zu überprüfen, ob die negativen Ergebnisse durch das Fehlen der Telomerase oder durch eine Hemmung der Taq-Polymerase bedingt waren, schloss ich mit allen negativen Gewebelysaten eine zweite Versuchsreihe mit dem TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{Plus}-Kit (Roche, Cat.-No. 2 013 789) an. Dabei setzte ich dem Reaktionsgemisch in der PCR 5 µl eines internen Standards (IS) mit 216 bp zu (Tab. 19). Die Standardbasenpaare werden von der aktiven Taq-Polymerase erkannt und können amplifiziert werden, so dass in der Nachweisreaktion positive Extinktionswerte zu erwarten sind. In unserem Labor setzten wir als Grenzwert für eine positive PCR des internen Standards eine Extinktion über 500 mOD fest. Um dies zu erreichen, reduzierte ich bei den negativen Probenlysaten die Proteinmenge im PCR-Ansatz so lange, bis die angestrebte Extinktion des internen Standards über 500 mOD erreicht war. Mit dieser reduzierten Proteinmenge untersuchte ich alle Probenlysate erneut in der Telomerase-PCR.

Diese Kontrollversuche mit allen negativen Proben wurden in der Hybridisierung und im ELISA mit halben Mengen ausgeführt, wobei der passende Hybridisierungspuffer IS verwendet wurde. Der Ablauf der PCR und der folgenden Nachweisreaktion erfolgte analog dem Telomerasenachweis.

Tabelle 19: Zusätzlich benötigte Reagenzien bei der Verwendung des internen Standards

Interner Standard (IS)	Fertiglösung (enthält 216 bp-Standard; DNA 0,001 mol/ μ l) zur internen Amplifikationskontrolle von Inhibitoren der Taq-Polymerase	5 μ l
Hybridisationspuffer IS	Fertiglösung (enthält zu IS komplementäre DIG-markierte Sonde)	50 μ l

2.4.2.2 Untersuchung einer Telomerasehemmung

Mit den negativen Gewebelysaten wurde ein weiterer Kontrollversuch durchgeführt, um das Fehlen der Telomerase von einer Telomerasehemmung als Ursache negativer Ergebnisse abzugrenzen.

Dabei setzte ich ca. 0,04 μ g der Zelllinie UM-SCC 14C mit einem bekannt positiven Telomerasespiegel den mit Lysispuffer auf ein Volumen von 25 μ l verdünnten PCR-Ansätzen der negativen Proben mit einer Proteinmenge von 0,05 bis 3 μ g zu. Nach Zugabe der 25 μ l des Reaktionsgemisches erfolgte der Ablauf der PCR und die folgenden Nachweisreaktion analog dem Telomerasenachweis. Die Extinktionswerte wurden in Doppelbestimmung ermittelt. Falsch-negative Ergebnisse wurden ausgeschlossen, wenn der Telomerasespiegel von der bekannten Ausgangsextinktion der telomerasepositiven Zelllinie UM-SCC 14C nicht differierte.

2.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Für die Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe der deskriptiven Statistik und Analysetests nutzte ich das Statistikprogramm SPSS für Windows (Version 10.0.5).

Alle Daten zur Telomeraseaktivität sind mit Mittelwerten \pm Standardfehler, mit den Medianen sowie mit der 25. und 75. Quartile angegeben, um die Extinktionswerte gegenüberstellen zu können. Da keine Normalverteilung der Ergebnisse vorliegt und der Mittelwert sich unempfindlich gegenüber Ausreißern zeigt, habe ich die Mittelwerte und die Standardabweichungen nur zusätzlich mit angegeben.

Nichtparametrische Tests wurden zur Analyse von Zusammenhängen aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Ergebnisse und des kleinen Patientenkollektives angewendet.

Der Friedmann-Test diene zum Vergleich verbundener Stichproben. Im Falle einer Signifikanz zwischen mehreren Gruppen erfolgte der paarweise Vergleich im Wilcoxon-Test. Der Stichprobenvergleich der unverbundenen Parameter erfolgte mit Hilfe des U-Testes nach Mann-Whitney und des Kruskal-Wallis-Testes. Der Kruskal-Wallis-Test dient dabei der Analyse von mehr als zwei Parametern. Für den Vergleich von Häufigkeiten in 2 x 2-Felder-Tafeln wurde der χ^2 -Test eingesetzt. Zum Häufigkeitsvergleich von mehr als zwei Parametern bei verbundenen Stichproben diene der Q-Test nach Cochran. Weiterhin verwendete ich Kreuztabellen, um Abweichungen zwischen beobachteten und erwarteten Häufigkeiten analysieren zu können. Für eine prognostische Aussage nutzte ich die Kaplan-Meier-Analyse [135].

Testergebnisse mit $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Extinktionsergebnisse des PCR-ELISA

Die Gewebe wurden in verschiedenen Proteinmengen pro 50 μ l PCR-Ansatz untersucht. Für die Bewertung der Telomeraseaktivität wurde in jedem Gewebe die höchste gemessene Telomeraseextinktion zugrunde gelegt.

3.1.1 Ermittlung des Cut-off-Wertes

Zur Unterscheidung zwischen positivem und negativem Ergebnis wurde ein laborinterner Cut-off-Wert (positiver Grenzwert) zugrunde gelegt, der sich aus dem Mittelwert und der zweifachen Standardabweichung s der Extinktionen der 40 Kontrollgewebe berechnete. Nach Aufrundung wurde für den Cut-off-Wert die Extinktion von

150 mOD (vgl. Tab. 21) festgelegt. Die Extinktionen aller Proben ab 150 mOD wurden als positiv bewertet. In den folgenden Ergebnistabellen sind die positiven Ergebnisse optisch hervorgehoben. Nach Ausschluss eines falsch-negativen Befundes wurden Proben mit Extinktionswerten unter 150 mOD als telomerasenegativ beurteilt.

3.1.2 Bewertungsgrundlage der ELISA-Ergebnisse

Positive Telomerasespiegel bewertete ich in einer semiquantitativen Unterteilung der Extinktionswerte. Dazu bildete ich vier Gruppen von einfach bis vierfach positiver Telomeraseaktivität (Tab. 20).

Tabelle 20: Extinktionsgruppen zur Bewertung der Telomerasespiegel

Telomerasespiegel [mOD]	Telomeraseaktivität
0 – 149	0 = negativ, wenn interner Standard > 500 mOD
150 – 449	1 = einfach positiv (+)
450 – 749	2 = zweifach positiv (++)
750 – 1049	3 = dreifach positiv (+++)
ab 1050	4 = vierfach positiv (++++)

3.1.3 Bewertung der Telomeraseaktivität in den Geweben der Kontrollpatienten

Von 40 Patienten ohne eine Tumorerkrankung wurden 40 Gewebe von Mundschleimhaut oder Haut aus dem Kopf-Hals-Bereich als Kontrollen verwendet (vgl. Tab. 11). Die Extinktionen der untersuchten Kontrollgewebe lagen zwischen 0 und 187 mOD. Bis auf eine Ausnahme (Probe 381) war Telomerase in den Kontrollgeweben nicht aktiviert. Tabelle 21 zeigt die auswertbaren Extinktionswerte in diesen 40 tumorfreien Kontrollgeweben (vgl. Tab. 11).

Tabelle 21: Extinktionswerte der tumorfreien Kontrollgewebe von 40 Patienten (Gruppe III)

Patienten-Code	Kontrollgewebe			Patienten-Code	Kontrollgewebe		
	TS [mOD]	TA	IS [mOD]		TS [mOD]	TA	IS [mOD]
extraoral				oral			
38	98	0	793	15	0	0	1028
39	33	0	2079	82	2	0	519
179	116	0	639	173	96	0	1282
181	5	0	1878	212	4	0	1901
183	19	0	1723	233	33	0	1891
195	137	0	1626	336	52	0	973
199	79	0	1513	427	9	0	1242
208	8	0	991	433	12	0	1836
230	17	0	2123	437	37	0	1858
231	53	0	1316	438	59	0	895
239	1	0	1056	445	20	0	952
240	8	0	1058	449	4	0	1848
241	66	0	620	479	11	0	899
243	23	0	863	Mittelwert:	46		
273	1	0	739	s:	45		
291	22	0	1195	Median:	27		
375	25	0	659	P₂₅:	10		
381	187	1	/	P₇₅:	79		
383	79	0	1440	Cut-off-Wert:	136 (aufgerundet 150 mOD)		
390	116	0	588				
394	28	0	2123				
453	116	0	1502				
464	90	0	1105				
465	46	0	1048				
521	92	0	2029				
537	25	0	2289				
541	19	0	1461				

TA: Telomeraseaktivität; TS: Telomerespiegel; IS: interner Standard; s: Standardabweichung; P: Perzentile

3.1.4 Bewertung der Telomeraseaktivität in den Zelllinien

Alle drei verwendeten Zelllinien (vgl. Tab. 12) zeigten in den untersuchten Protein-konzentrationen eine hohe Telomeraseaktivität, die entsprechend den Protein-verdünnungen pro 50 µl PCR-Ansatz abnahm (Tab. 22).

Tabelle 22: Extinktionswerte der drei Zelllinien bei verschiedenen Proteinmengen pro 50 µl PCR-Ansatz

Zelllinie	E [mOD] 0,5 µg	E [mOD] 0,25 µg	E [mOD] 0,125 µg	E [mOD] 0,063 µg	E [mOD] 0,032 µg
UM-SCC 14A	3500	3500	3500	2174	1258
UM-SCC 14B	2359	2063	1928	1647	999
UM-SCC 14C	3500	3500	3500	1305	815

E: Extinktion; UM: University of Michigan; SCC: squamous cell carcinoma

3.1.5 Bewertung der Telomeraseaktivität in den Geweben der Tumorpatienten

In Tabelle 23 sind die Extinktionswerte der Tumorgewebe von 20 Patienten der Gruppe I (vgl. Tab. 8) zusammengestellt, bei denen ich jeweils drei Tumorgebiete untersuchte. Bei 7 Gewebeproben des Tumorrandes ergab die histopathologische Nachkontrolle restliche Karzinomanteile. Für die statistische Auswertung konnten die Ergebnisse von 13 karzinomfreien Tumorrändern der Patientengruppe I herangezogen werden.

Abbildung 6 veranschaulicht die Verteilung der Telomeraseaktivität in den drei untersuchten Gewebegebieten der Patientengruppe I.

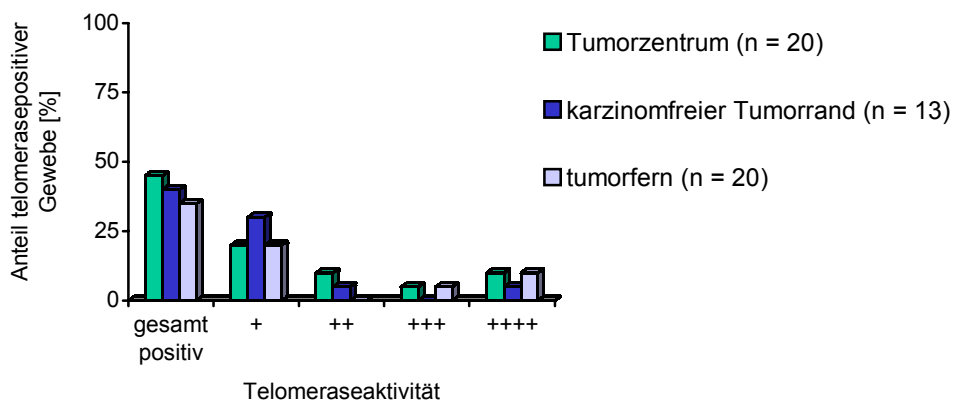


Abbildung 6: Telomeraseaktivität in den Tumorgeweben von 20 Patienten mit drei untersuchten Tumorgebieten (Gruppe I)

Tabelle 23: Extinktionswerte in den Tumorgeweben von 20 Patienten mit drei untersuchten Tumorgebieten (Gruppe I)

Patienten-Code	Tumorzentrum			Tumorrand (n = 13)*			tumorferrn		
	TS [mOD]	TA	IS [mOD]	TS [mOD]	TA	IS [mOD]	TS [mOD]	TA	IS [mOD]
5	7	0	1101	0	0	2132	1558	4	/
128	65	0	1684	165	1	/	21	0	1914
148	3500	4	/	274	1	/	2	0	2216
158	34	0	1503	229	1	/	76	0	1907
175	86	0	1835	19	0	1763	153	1	/
180	461	2	/	0	0	1542	16	0	1346
209	414	1	/	6	0	1931	36	0	2136
253	433	1	/	32	0	1412	4	0	984
382	41	0	1488	7	0	1782	7	0	883
385	789	3	/	410	1	/	77	0	1619
473	23	0	950	266	1	/	54	0	1911
474	63	0	1830	3	0	738	1032	3	/
539	503	2	/	2	0	1326	317	1	/
7*	270	1	/	543*	2*	/*	36	0	1715
13*	49	0	586	4*	0*	1530*	18	0	607
85*	182	1	/	15*	0*	797*	328	1	/
86*	95	0	1821	39*	0*	2014*	36	0	2288
461*	446	1	/	424*	1*	/*	321	1	/
466*	70	0	1495	24*	0*	1435*	1127	4	/
679*	3500	4	/	2128*	4*	/*	28	0	2246
Mittelwert:	565			109			262		
s:	1029			142			444		
Median:	139			19			45		
P₂₅:	53			3			19		
P₇₅:	493			248			320		
ges. positiv:		10/ 20			5/ 13*			7/ 20	
ges. negativ:		10/ 20			8/ 13*			13/ 20	

*: 7 Tumorrandstücke aufgrund Restkarzinomgehalt statistisch nicht ausgewertet;

TA: Telomeraseaktivität; TS: Telomerespiegel; IS: interner Standard; s: Standardabweichung; P: Perzentile

Tabelle 24 bietet eine Übersicht der Extinktionswerte von 20 Patienten mit karzinomfreiem Tumorrangewebe (Gruppe II, vgl. Tab. 9). Die Probe des Patienten 93 wurde aus der Auswertung herausgenommen, weil eine Telomerasehemmung vorlag (vgl. 3.1.6.2). Damit konnte ich von insgesamt 33 karzinomfreien Tumorrangeweben der Patientengruppen I und II 32 Gewebe statistisch auswerten.

Tabelle 24: Extinktionswerte in den karzinomfreien Tumorrangeweben von 20 Patienten (Gruppe II)

Patienten-Code	karzinomfreier Tumorrang			Patienten-Code	karzinomfreier Tumorrang		
	TS [mOD]	TA	IS [mOD]		TS [mOD]	TA	IS [mOD]
14	16	0	1233	412	478	2	/
36	10	0	1765	478	7	0	3500
78	8	0	1614	502	289	1	/
83	89	0	1561	535	5	0	1331
93*	13	0	649	667	41	0	1216
103	4	0	913	678	25	0	591
106	333	1	/	Mittelwert:	80		
133	18	0	1247	s:	133		
142	51	0	1593	Median:	18		
293	161	1	/	P₂₅:	7		
332	4	0	832	P₇₅:	80		
337	5	0	1512	ges. positiv:	4/ 20		
374	18	0	1145	ges. negativ:	16/ 20		

TA: Telomeraseaktivität; TS: Telomerespiegel; IS: interner Standard; s: Standardabweichung; P: Perzentile;
 *: Pat. 93 aufgrund von Telomerasehemmung nicht in statistische Auswertung einbezogen

Tabelle 25 fasst die Telomeraseergebnisse in den Geweben der 40 Tumorpatienten zusammen.

In zehn der 20 Gewebe aus den Tumorzentren (Gruppe I) konnte eine positive Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, darunter waren drei Gewebe mit einem höheren Telomerasespiegel (3+/ 4+; vgl. Tab. 23). Die 32 karzinomfreien Tumorrangewebe waren in 28 % telomerasepositiv. Die Telomerasespiegel waren niedriger (1+/ 2+, vgl. Tab. 23 und 24). Von den 20 tumorfernen Gewebeproben waren 35 % telomerasepositiv, wobei drei Proben sehr hohe Telomerasespiegel zeigten (Patienten 5, 466, 474; vgl. Tab. 23).

Tabelle 25: Telomerasespiegel der Gewebe von 39 Tumorpatienten

Tumorgebiet	Anzahl telomerasepositiver Gewebe					Anzahl der untersuchten Gewebe	
	gesamt positiv		+	++	+++		++++
Tumorzentrum	10	50 %	5	2	1	2	20
karzinomfreier Tumorrangewebe	9	28 %	8	1	/	/	32
	5 aus Gruppe I (n = 13) 4 aus Gruppe II (n = 19)						
tumorfern	7	35 %	4	/	1	2	20
Gesamt	26	36 %	17	3	2	4	72

Abbildung 7 veranschaulicht die Verteilung der telomerasepositiven Gewebe in den drei untersuchten Patientengruppen.

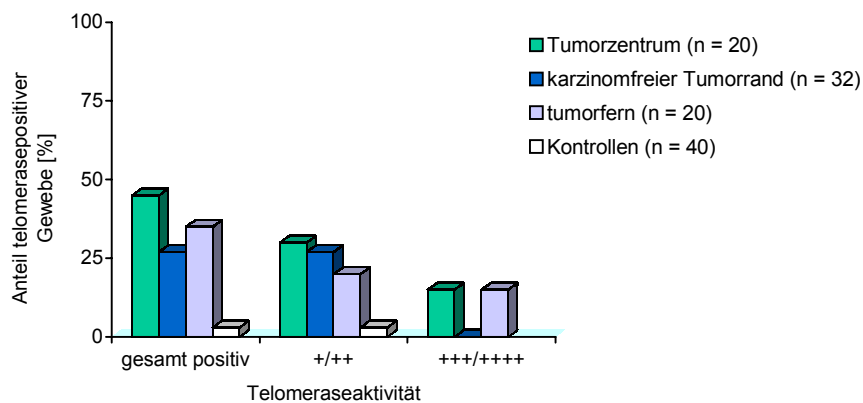


Abbildung 7: Telomeraseaktivität in Geweben von 40 Patienten mit Plattenepithelkarzinom und in Kontrollgeweben von 40 Patienten ohne Tumor

3.1.6 Untersuchung aller negativen Proben

3.1.6.1 Ergebnisse der PCR mit dem internen Standard zur Überprüfung der Hemmung der Taq-Polymerase

In allen Patientengruppen wurden insgesamt 81 negative Proben gefunden. Bei der Kontroll-PCR der negativen Proben mit dem internen Standard (vgl. 2.4.2.1) waren 17 Proben weiter negativ. Diese Proben wurden erneut in einer PCR mit dem internen Standard und einer reduzierten Proteinmenge der Probenlysate untersucht, bis die von mir angestrebte Extinktion über 500 mOD erreicht war. Alle bisherigen telomerase-negativen Ergebnisse bestätigten sich in der Wiederholung der Telomerase-PCR mit der reduzierten Proteinmenge weiterhin als telomerasenativ (vgl. Tab. 21, 23 und 24) und waren nicht durch eine Hemmung der Taq-Polymerase verursacht.

3.1.6.2 Ergebnisse der Überprüfung der Telomerasehemmung

Die telomerasenegativen Gewebeproben von 11 Tumorzentren, 9 Tumorrändern und einem tumorfernen Gebiet wurden auf eine Hemmung der Telomerase (vgl. 2.4.2.2) untersucht (Tab. 26). Dabei wurde die Telomeraseaktivität nur bei einer Probe (unmittelbarer Tumorrand des Patienten 93) der zugesetzten positiven Zelllinie deutlich auf ca. 64 % der Ausgangsextinktion reduziert. In dieser Probe war es durch die Hemmung mit dem PCR-ELISA nicht möglich, eine Telomeraseaktivität zu bestimmen. Sie wurde aus der statistischen Auswertung herausgenommen.

Tabelle 26: Extinktionen in ausgewählten telomerasenegativen Geweben (n = 21) untersucht auf eine Hemmung der Telomerase

Patienten-Code	Extinktion [mOD]	% von E von UM-SCC 14C
UM-SCC 14C	2583	100
5 (Tmz)	2642	102
13 (Tmz)	2851	110
13 (Tmr)	2600	101
14 (Tmr)	2687	104
78 (Tmr)	2668	103
85 (Tmr)	2356	91
86 (Tmz)	2119	82
93* (Tmr)	1662	64
128 (Tmz)	2659	103
158 (Tmz)	2504	97
175 (Tmz)	2561	99
180 (Tmr)	2527	97
180 (tmf)	2613	101
253 (Tmz)	2416	94
337 (Tmr)	2271	88
382 (Tmz)	2459	95
466 (Tmz)	2868	111
466 (Tmr)	2414	94
473 (Tmz)	2492	97
474 (Tmz)	2374	92
535 (Tmr)	2560	99

E: Extinktion [mOD]; UM: University of Michigan; SCC: squamous cell carcinoma;

Tmz: Tumorzentrum; Tmr: Tumorrang; tmf: tumorfern; *: Pat. 93 aufgrund von Telomerasehemmung nicht in statistische Auswertung einbezogen

3.1.7 Statistische Auswertung der Telomeraseaktivität

Die Extinktionswerte der Telomeraseaktivitäten (mOD) wurden erstens in den drei untersuchten Gewebegebieten innerhalb der Patientengruppe I, zweitens in den Tumorrangeweben zwischen den Patientengruppen I und II und drittens in den Geweben der Kontroll- und den Tumorpatienten der Gruppe I und II statistisch verglichen. In diesen Konstellationen wurden auch die Häufigkeiten der telomerasepositiven Ergebnisse statistisch untersucht (Tab. 27).

Der Vergleich der Telomerasespiegel in den Geweben der Patienten der Gruppe I (vgl. Tab. 23) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den 20 Tumorzentren, den 13 karzinomfreien Tumorrändern und den 20 tumorentfernten Geweben (Friedmann-Test: $p = 0.212$).

Die Tumorränder beider Tumorpatientengruppen I und II (vgl. Tab. 23 und Tab. 24) unterschieden sich in ihren Extinktionen nicht signifikant voneinander (U-Test: $p = 0.673$). Ein signifikanter Unterschied der Extinktionen fand sich zwischen den Geweben der Tumorzentren und den Geweben der Tumorränder der Gruppe II (U-Test: $p = 0.001$).

Der statistische Gruppenvergleich der Telomeraseaktivität in den 40 Kontrollgeweben (vgl. Tab. 21) mit den 20 karzinomhaltigen Tumorgeweben (vgl. Tab. 23), mit den 32 karzinomfreien unmittelbaren Tumorrangeweben (vgl. Tab. 23 und 24) und mit den 20 tumorfernen Geweben (vgl. Tab. 23) zeigte einen signifikanten Unterschied (Kruskall-Wallis-Test: $p = 0.000$). Der paarweise Vergleich ergab nur einen signifikanten Unterschied zwischen den Telomerasespiegeln der Kontrollgewebe und der Tumorzentren (U-Test: $p = 0.000$), jedoch keine Signifikanz zwischen den Telomerasespiegeln der Kontrollgruppe und den karzinomfreien Tumorrändern (U-Test: $p = 0.905$) bzw. den tumorentfernten Geweben (U-Test: $p = 0.072$).

Die statistische Auswertung der Häufigkeiten der telomerasepositiven Proben ergab keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppe I der Tumorpatienten, bei denen drei Gewebegebiete untersucht wurden (Cochrans Q-Test: $p = 0.500$). Die Anteile der telomerasepositiven Proben in den Tumorrändern der beiden Gruppen der Tumorpatienten unterschieden sich auch nicht signifikant voneinander (χ^2 -Test: $p = 0.282$). Im Gegensatz zur Auswertung der Telomerasespiegel war der Unterschied im Anteil telomerasepositiver Tumorrangewebe der Patientengruppe II zu telomerasepositiven Geweben der Tumorzentren noch nicht signifikant (χ^2 -Test: $p = 0.060$).

Der paarweise Vergleich der Häufigkeit einer Telomeraseaktivierung zwischen den Kontrollgeweben und den verschiedenen Gewebegebieten der Tumorpatienten war anders als beim statistischen Vergleich der Telomerasespiegel signifikant unterschiedlich (χ^2 -Test: zu Tumorzentren und tumorentfernten Gebieten $p = 0.000$; zu Tumorrändern $p = 0.002$).

Tabelle 27: Statistischer Vergleich der Telomerasespiegel* bzw. der Telomeraseaktivität** in den Geweben zwischen Tumor- und Kontrollpatienten

Telomeraseaktivität im Gewebegebiet	Telomeraseaktivität im Vergleichsgewebe	Test	TS* TA** p-Werte
1. Vergleich innerhalb der Patientengruppe I:			
Tumorzentrum (n = 20)	Tumorrand I (n = 13) und tumorfern (n = 20)	Friedmann-Test	0.212
		Cochrans Q-Test	0.500
2. Vergleich zwischen Patientengruppe I und II:			
Tumorrand II (n = 19)	Tumorrand I (n = 13)	U-Test	0.673
		χ^2 -Test	0.282
	Tumorzentrum (n = 20)	U-Test	0.001
		χ^2 -Test	0.060
	tumorfern (n = 20)	U-Test	0.122
		χ^2 -Test	0.333
3. Vergleich zwischen Kontrollpatienten (III) und Tumorpatienten (I und II)			
Kontrollgewebe (n = 40)	Tumorzentrum (n = 20), Tumorrand I/ II (n = 32) und tumorfern (n = 20)	Kruskal-Wallis-Test	0.000
		χ^2 -Test	0.000
	Tumorzentrum (n = 20)	U-Test	0.000
		χ^2 -Test	0.000
	Tumorrand I/ II (n = 32)	U-Test	0.905
		χ^2 -Test	0.002
	tumorfern (n = 20)	U-Test	0.072
		χ^2 -Test	0.000

*: statistische Auswertung über die Extinktionswerte (TS, Telomerasespiegel);

** : statistische Auswertung über die Häufigkeit der telomerasepositiven Proben (TA, Telomeraseaktivität)

3.2 Auswertung der Patientendaten

3.2.1 Alters- und Geschlechtsverteilung der Patienten

Die 40 Tumorpatienten meiner Arbeit waren zehn Frauen und 30 Männern im Alter von 39 bis 89 Jahren (vgl. Tab. 8 und 9). Das mittlere Alter betrug zum Zeitpunkt der Operation und Gewebeentnahme insgesamt 58 Jahre (± 10 Jahre) und war bei den Männern mit 55 Jahren deutlich niedriger als bei den Frauen mit 66 Jahren.

In der Gruppe der 40 Kontrollpatienten reichte das Alter der 17 Frauen und 23 Männer von einem Jahr bis zu 78 Jahren und war im Mittel von 26 Jahren (± 18 Jahre) deutlich niedriger als das der Tumorpatienten (vgl. Tab. 11). Das mittlere Alter der Männer lag mit 23 Jahren auch in der Kontrollgruppe niedriger als bei den Frauen mit 30 Jahren.

3.2.2 Nikotin- und Alkoholabusus der Patienten

In Tabelle 29 habe ich durch Auswertung der Angaben in den Patientenakten die Rauch- und Trinkgewohnheiten der untersuchten Patienten zusammengestellt und getrennt nach den drei Patientengruppen (vgl. Tab. 6) aufgelistet.

Bei den Tumorpatienten gaben 64 % (25 von 39) einen täglichen Alkoholkonsum und 80 % (32 von 40) regelmäßigen Nikotingenuss an.

Die Kontrollpatienten wiesen in 29 % (9 von 31) den täglichen Bedarf von Nikotin auf und bei 9 % (3 von 32) dieser Gruppe ließ sich ein täglicher Alkoholkonsum nachweisen (Tab. 28).

Tabelle 28: Prozentuale Verteilung der Rauch- und Trinkgewohnheiten der Patienten

Patientengruppe	Nicht-trinker	mäßiger Alk.-konsum	Alkoholabusus	Nicht-raucher	mäßiger Nik.-konsum	Nikotinabusus
Tumorpatienten mit drei Tumorgebieten	40 %	15 %	45 %	30 %	40 %	30 %
Tumorrandidpatienten	33 %	11 %	56 %	11 %	63 %	26 %
Kontrollpatienten	91 %	3 %	6 %	71 %	26 %	3 %

mäßiger Konsum: < 70g Alk. bzw. 20 Zig./ d; Abusus: > 70g Alk. bzw. > 20 Zig./ d [3]

Tabelle 29: Nikotin- und Alkoholkonsum der Patienten

Tumorpatienten mit drei Tumorgebieten			Tumorrandpatienten			Kontrollpatienten					
Pat.-Code	Alkohol	Nikotin	Pat.-Code	Alkohol	Nikotin	Pat.-Code	Alkohol	Nikotin	Pat.-Code	Alkohol	Nikotin
5	2	2	14	2	2	38	0	0	394	0	0
128	2	2	36	1	2	39	0	0	453	0	0
148	0	1	78	2	1	179	0	?	464	0	0
158	0	0	83	2	1	181	0	1	465	0	0
175	2	2	93	2	1	183	0	1	521	0	0
180	2	1	103	2	1	195	0	0	537	0	1
209	2	1	106	2	1	199	0	0	541	0	0
253	1	1	133	2	2	208	0	0	15	0	0
382	0	1	142	2	1	230	0	1	82	?	?
385	1	0	293	2	1	231	0	0	173	0	0
473	2	1	332	0	0	239	2	1	212	0	0
474	0	1	337	0	1	291	0	0	233	0	0
539	2	2	374	0	0	375	0	1	336	?	?
7	0	0	412	0	2	381	?	?	427	0	1
13	2	2	413	2	2	383	0	0	433	0	0
85	0	0	478	1	1	390	0	0	437	?	?
86	1	1	502	?	1	240	2	2	438	?	?
461	2	2	535	2	1	241	?	?	445	?	?
466	0	0	667	0	1	243	0	0	449	1	1
679	0	0	678	0	1	273	0	0	479	?	?

Einteilung der Rauch- und Trinkgewohnheiten nach Arndt et al [3]: 0: Nichttrinker/ Nichtraucher; 1: mäßiger Konsum; 2: Abusus (> 70g Alk./ d bzw. > 20 Zig./ d); ?: keine Angaben in der Patientenakte

3.2.3 Lokalisation der untersuchten Gewebe

Die Herkunft der untersuchten Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich wurde in drei große Regionen zusammengefasst: Mundhöhle, Oropharynx und extraoral (vgl. Tab. 7 und 10). Die Lokalisationen zwischen den Patientengruppen unterscheiden sich in ihrer Häufigkeit. Bei den 40 Tumorpatienten überwiegen die intraoralen Plattenepithelkarzinome (85 %), während die Gewebe der Kontrollgruppe zu 68 % aus extraoralen Lokalisationen stammen. In Tabelle 30 ist die Verteilung der Lokalisation der untersuchten Gewebe von den Tumor- und Kontrollpatienten zusammengestellt und in Abbildung 8 grafisch veranschaulicht.

Tabelle 30: Lokalisation der untersuchten Gewebe

Lokalisation	Tumorpatienten		Kontrollpatienten	
	Häufigkeit	Prozent	Häufigkeit	Prozent
Mundhöhle	31	77	11	28
Oropharynx	3	8	2	5
extraoral	6	15	27	67
Gesamt	40	100	40	100

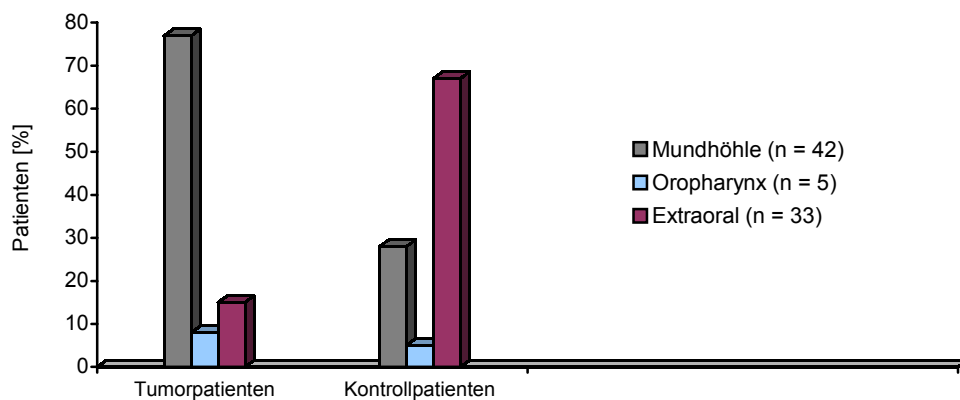


Abbildung 8: Verteilung der Gewebe auf die Lokalisation

3.2.4 Verlauf der postoperativen Tumorerkrankung

Von den 40 untersuchten Karzinomen waren 32 Primärtumore. Bei acht Patienten stammte das Gewebe von einem Rezidiv. Drei dieser acht Patienten waren nach der Operation des Primärtumors bestrahlt und einer dieser acht Patienten erhielt nach der Operation des Primärtumors zu der Bestrahlung noch eine Chemotherapie. Von 32 Primärtumoren wurden postoperativ 18 Patienten strahlentherapeutisch und drei Patienten chemotherapeutisch behandelt. Ein Patient war schon bei seinem Primärtumor präoperativ bestrahlt worden. Von 40 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom erlitten 14 Patienten im Beobachtungszeitraum nach der Operation und der Gewebeentnahme mindestens ein Rezidiv. Klinisch lagen zum Zeitpunkt der Operation bei 20 Patienten (50 %) Lymphknotenmetastasen vor. Zum Abschluss der Untersuchung im Mai 2001 waren 20 der 40 Tumorpatienten verstorben.

Neun der 40 Tumoren befanden sich im Tumorstadium 1, sechs im Tumorstadium 2 und sieben Tumoren waren im Tumorstadium 3. Dem Stadium 4a waren 15 Tumoren und zwei Tumoren dem Stadium 4c zugeordnet. Der Differenzierungsgrad von 15 Tumoren war als schlecht differenziert, von 23 Tumoren als mäßig differenziert und von zwei Tumoren als gut differenziert beurteilt worden. Bei einem Patienten war die Tumorgröße nicht angegeben und er konnte keinem Tumorstadium zugeordnet werden (vgl. Tab. 8 und 9).

Anhand der Patientenakten habe ich den weiteren Krankheitsverlauf nach der operativen Gewebeentnahme in einem Beobachtungszeitraum von wenigstens 3 Monaten bis maximal 6,75 Jahren ausgewertet. Es wurden der Zeitpunkt von Rezidiven, Zweitkarzinomen und der Tod der Patienten an ihrer Tumorerkrankung erfasst. Ein Krankheitsrückfall trat bei 25 der 40 Tumorpatienten auf (63 %).

In den Tabellen 31 und 32 habe ich den postoperativen Krankheitsverlauf und die therapeutische Nachbetreuung in einer Übersicht zusammengefasst.

Tabelle 31: Verlauf der Tumorerkrankung und das therapeutische Vorgehen nach der Gewebeentnahme bei 20 Tumorpatienten mit drei untersuchten Gewebegebieten (Gruppe I)

Pat.-Code	Rezidiv	Radiatio	Chemo-therapie	ge-storben	Pat.-Code	Rezidiv	Radiatio	Chemo-therapie	ge-storben
5	ja	ja	nein	ja	474	ja	ja	ja	ja
128	nein	ja	nein	nein	539	nein	ja	nein	nein
148	nein	ja	nein	nein	7	ja	ja	nein	nein
158	nein	ja	nein	nein	13	ja	ja	nein	ja
175	nein	nein	nein	ja	85	nein	nein	nein	nein
180	ja	ja	nein	ja	86	ja	ja	nein	ja
209	nein	ja	nein	ja	461	nein	nein	nein	nein
253	nein	ja	nein	nein	466	nein	ja	nein	ja
382	nein	nein	nein	ja	679	ja	ja	ja	ja
385	nein	ja	nein	ja	ja:	7	15	2	11
473	nein	nein	nein	nein	nein:	13	5	18	9

Tabelle 32: Verlauf der Tumorerkrankung und das therapeutische Vorgehen nach der Gewebeentnahme bei 20 Tumorpatienten mit dem untersuchten karzinomfreien Tumorrund (Gruppe II)

Pat.-Code	Rezidiv	Radiatio	Chemo-therapie	ge-storben	Pat.-Code	Rezidiv	Radiatio	Chemo-therapie	ge-storben
14	nein	nein	nein	ja	337	ja	nein	nein	nein
36	nein	nein	nein	nein	374	ja	nein	ja	nein
78	nein	ja	nein	ja	412	nein	nein	nein	nein
83	ja	nein	nein	ja	413	ja	nein	nein	nein
93	nein	nein	nein	nein	478	nein	nein	nein	nein
103	nein	nein	nein	ja	502	nein	ja	nein	ja
106	nein	nein	nein	nein	535	ja	ja	nein	ja
133	ja	ja	nein	ja	667	nein	nein	nein	nein
142	nein	nein	nein	nein	678	nein	ja	nein	ja
293	nein	nein	nein	ja	ja:	7	6	2	9
332	ja	ja	ja	nein	nein:	13	14	18	11

3.2.5 Statistische Auswertung der klinischen Daten

3.2.5.1 Altersstruktur

Die statistische Auswertung der Altersstruktur (vgl. 3.2.1) ergab keine signifikanten Unterschiede bei den beiden Gruppen der Tumorpatienten (U-Test: $p = 0.375$), die Kontrollpatienten waren signifikant jünger als die Tumorpatienten (U-Test: $p = 0.000$, Tab. 33).

Tabelle 33: Statistischer Vergleich der Tumor- und Kontrollpatienten in ihrer Altersstruktur

Patientengruppe	Vergleichsgruppe	Test	p
Tumorpatienten mit drei Gewebegebieten (n = 20)	Tumorrandpatienten (n = 19)	U-Test	0.375
Kontrollpatienten (n = 40)	Tumorpatienten mit drei Gewebegebieten (n = 20)	U-Test	0.000
	Tumorrandpatienten (n = 19)	U-Test	0.000

Nachfolgend wird die Altersverteilung in den drei untersuchten Patientengruppen getrennt nach Geschlecht grafisch dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass in allen Patientengruppen die Frauen durchschnittlich älter als die Männer sind.

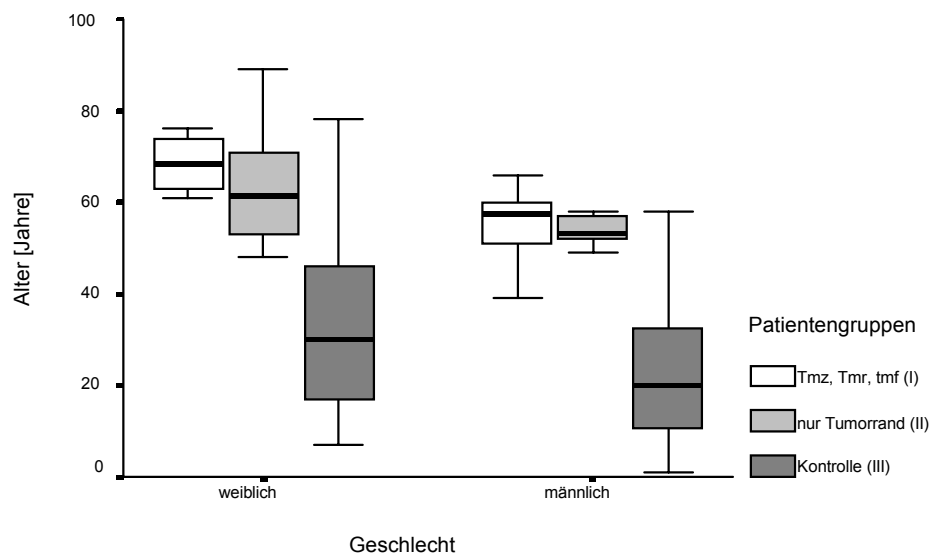


Abbildung 9: Altersverteilung der Patientengruppen getrennt nach Geschlecht

3.2.5.2 Nikotin- und Alkoholkonsum

Die statistische Auswertung des Nikotin- und Alkoholkonsums (vgl. Tab. 28) in einer Kreuztabelle erfasst die Abweichungen (Residuen), welche die Differenz zwischen beobachteten und erwarteten Häufigkeiten der auftretenden Merkmale messen. Wird der kritische Wert von ± 1.96 überschritten, sind die Abweichungen im häufigen bzw. seltenen Auftreten als nicht zufällig anzunehmen.

In Tabelle 34 wurden die drei Patientengruppen nach ihrem Nikotinkonsum in einer Kreuztabelle miteinander verglichen. Der χ^2 -Test ($p = 0.000$) zeigt, dass das Merkmal Nikotinkonsum von der untersuchten Patientengruppe abhängig ist. Dabei unterscheiden sich nicht die Tumorpatienten der Gruppe I und II signifikant in ihrem Nikotinkonsum (χ^2 -Test: $p = 0.238$), sondern die Tumorpatienten und die Kontrollpatienten (χ^2 -Test: $p = 0.000$).

Die standardisierten Residuen weisen darauf hin, dass Nichtraucher häufiger in der Kontrollgruppe vertreten sind, während sich bei den Tumorpatienten häufiger ein Missbrauch von Nikotin findet.

Tabelle 34: Korrigierte Residuen bei den Tumor- und Kontrollpatienten beim Nikotinkonsum

Patientengruppen	Nichtraucher	mäßiger Verbrauch	Abusus
Tumorpatienten mit drei Gewebegebieten	- 1.4	- 0.0	+ 1.8
Tumorrandpatienten	- 3.3	+ 2.4	+ 1.2
Kontrollpatienten	+ 4.2	- 2.2	- 2.8
χ^2 -Test:	p = 0.000		

kritischer Wert bei Residuen: ± 1.96 ; mäßiger Konsum: < 20 Zig./ d; Abusus: > 20 Zig./ d [3]

Der statistische Vergleich des Alkoholkonsums wurde für die drei Patientengruppen ebenfalls in einer Kreuztabelle vorgenommen (Tab. 35). Auch das Merkmal Alkoholkonsum ist nach dem χ^2 -Test ($p = 0.000$) von der untersuchten Patientengruppe abhängig. Innerhalb der Tumorpatienten finden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Alkoholkonsum (χ^2 -Test: $p = 0.805$), sondern der Unterschied liegt auch hier zwischen den Tumor- und Kontrollpatienten ($p = 0.000$).

Der Vergleich der Residuen weist darauf hin, dass bei den Kontrollpatienten häufiger Nichttrinker und weniger ein Alkoholabusus zu finden sind als bei den Tumorpatienten.

Tabelle 35: Korrigierte Residuen bei den Tumor- und Kontrollpatienten beim Alkoholkonsum

Patientengruppen	Nichttrinker	Normalverbrauch	Abusus
Tumorpatienten mit drei Gewebegebieten	- 2.3	+1.2	+ 1.7
Tumorrandpatienten	- 2.8	+ 0.4	+ 2.7
Kontrollpatienten	+ 4.6	- 1.5	- 4.0
χ^2 -Test:	p = 0.000		

kritischer Wert bei Residuen: ± 1.96 ; mäßiger Konsum: < 70g Alk./ d; Abusus: >70g Alk./ d [3]

3.2.5.3 Differenzierungsgrad und Stadieneinteilung der Karzinome in Bezug zur Telomeraseaktivität

Der statistische Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und dem Differenzierungsgrad der Tumoren (vgl. Tab. 8 und 9) wurde im χ^2 -Test geprüft. Um ausreichend große Fallzahlen zu erreichen, wurden die Ergebnisse bei den G1- und G2-Tumoren zusammengefasst und diese mit den Befunden der G3-Tumoren verglichen. Es zeigte sich im statistischen Vergleich der Telomeraseaktivität in den Tumorzentren, den Tumorrändern und den entfernten Geweben kein statistisch signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (χ^2 -Test: p > 0.05, Tab. 36).

Tabelle 36: Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität bei den Tumorpatienten in Abhängigkeit vom Tumordifferenzierungsgrad

	TA im Tumorzentrum (n = 20)		TA im Tumorrand (n = 32)		TA tumorfern (n = 20)	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
G 1/2	5	6	7	13	5	6
G 3	5	4	2	10	2	7
χ^2 -Test:	p = 0.653		p = 0.264		p = 0.279	

G: grading; TA: Telomeraseaktivität

Ferner untersuchte ich den Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und der Tumorausbreitung, der Tumorgröße bzw. dem Stadium der Lymphknotenmetastasierung anhand der vorgenommenen Stadieneinteilung der Tumorgewebe (vgl. Tab. 8 und 9). Auch hier wurden für die statistische Auswertung die Stadien S1 und S2 als frühe bzw. S3 und S 4a-c als späte Stadien zusammengefasst. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Telomeraseaktivität in den untersuchten Gewebegebieten und dem Tumorstadium errechnet werden (χ^2 -Test: $p > 0.05$, Tab. 37).

Tabelle 37: Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität bei den Tumorpacienten in Abhängigkeit von der Stadieneinteilung

	TA im Tumorzentrum (n = 20)		TA im Tumorrand (n = 32)		TA tumorfern (n = 20)	
	positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
S 1/2	3	1	4	9	2	2
S 3/4	7	9	5	14	5	11
χ^2-Test:	p = 0.264		p = 0.783		p = 0.482	

S: staging; TA: Telomeraseaktivität

3.2.5.4 Krankheitsverlauf in Bezug zur Telomeraseaktivität

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und dem postoperativen Krankheitsverlauf, definiert durch das erste Auftreten eines krankheitsverschlechternden Ereignisses infolge des primären Tumorleidens (Rezidiv, Zweitumor oder Tod), besteht (vgl. Tab. 31 und 32).

Die Tabellen 38 und 39 fassen die Angaben zum postoperativen Krankheitsverlauf als rezidivfreie Zeit bis zum Auftreten eines krankheitsverschlechternden Ereignisses bei den Tumorpatienten zusammen.

Tabelle 38: Mittlere Dauer der rezidivfreien Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls bei 20 Tumorpatienten mit untersuchten Tumorzentren

Patienten-Code	Telomeraseaktivität*	Krankheitsrückfall	rezidivfreie Zeit [Monate]
5	0	ja	7
128	0	nein	79
148	1	nein	79
158	0	nein	77
175	0	ja	7
180	1	ja	3
209	1	ja	20
253	1	nein	72
382	0	ja	6
385	1	ja	8
473	0	nein	62
474	0	ja	9
539	1	nein	61
7	1	ja	14
13	0	ja	20
85	1	nein	81
86	0	ja	6
461	1	nein	62
466	0	ja	3
679	1	ja	9
telomerasepositiv: 10/ 20			
Krankheitsrückfall:		12/ 20	

* qualitative Bewertung der Telomeraseaktivität: 0 = negativ, 1 = positiv (> 150 mOD)

** : Abschluss der Untersuchung im Mai 2001

Tabelle 39: Mittlere Dauer der rezidivfreien Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls bei den 33 Patienten mit karzinomfreien Tumorrangewebe

Pat.- Code	TA	Krankheitsrückfall	rezidivfreie Zeit** [Monate]	Pat.- Code	TA	Krankheitsrückfall	rezidivfreie Zeit** [Monate]
5	0	ja	7	103	0	ja	4
128	0	nein	79	106	1	nein	71
148	1	nein	79	133	0	ja	30
158	0	nein	77	142	0	nein	79
175	0	ja	7	293	1	ja	25
180	1	ja	3	332	0	ja	51
209	1	ja	20	337	0	ja	6
253	1	nein	72	374	0	ja	9
382	0	ja	6	412	1	nein	64
385	1	ja	8	413	0	ja	40
473	0	nein	62	478	0	nein	61
474	0	ja	9	502	1	ja	3
539	1	nein	61	535	0	ja	14
14	0	ja	13	667	0	nein	52
36	0	nein	75	678	0	ja	18
78	0	ja	6	telomerasepositiv: 10/ 33			
83	0	ja	3	Krankheitsrückfall: 20/ 33			
93***	0	nein	81				

* qualitative Bewertung der Telomeraseaktivität: 0 = negativ, 1 = positiv (> 150 mOD)

** : Abschluss der Untersuchung im Mai 2001;

*** : Pat. 93 aufgrund von Telomerasehemmung nicht in statistische Auswertung einbezogen

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode (Tab. 40). Es wurde keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Telomeraseaktivität in den Geweben sowohl aus den Tumorzentren als auch den Tumorrändern und dem Auftreten eines Krankheitsrückfalls ermittelt (log Rank: $p > 0.05$).

Tabelle 40: Statistischer Vergleich der Telomeraseaktivität bei den Tumorpatienten mit dem Auftreten eines Krankheitsrückfalles

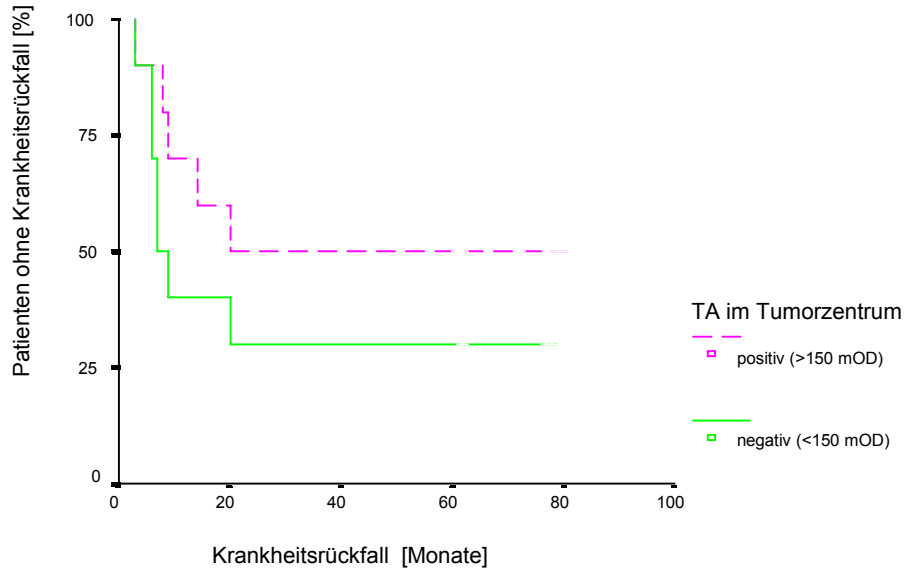
	TA im Tumorzentrum (n = 20)		TA im Tumorrand (n = 32)	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Krankheitsrückfall ja	5	7	5	15
Krankheitsrückfall nein	5	3	5	7
gesamt	10	10	10	22
Kaplan-Meier-Analyse:	p = 0.266		p = 0.086	

TA: Telomeraseaktivität

Obwohl ich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Telomeraseaktivität und dem postoperativen Verlauf gefunden habe, zeigen die Überlebenskurven nach Kaplan-Meier (Abb. 10 und 11) sowohl für die Tumorzentren (n = 20) als auch für die Tumorrandgebiete (n = 32) bei positiver Telomeraseaktivität längere rezidivfreie Zeiten. Bei den Tumorrandgeweben ist diese Tendenz fast signifikant (log Rank: $p = 0.086$).

Bei den 20 Tumorpatienten der Gruppe I traten ein Krankheitsrückfall unabhängig von der Telomeraseaktivierung im Tumorzentrum innerhalb der ersten 20 Monate nach der Gewebeentnahme auf (Abb. 10).

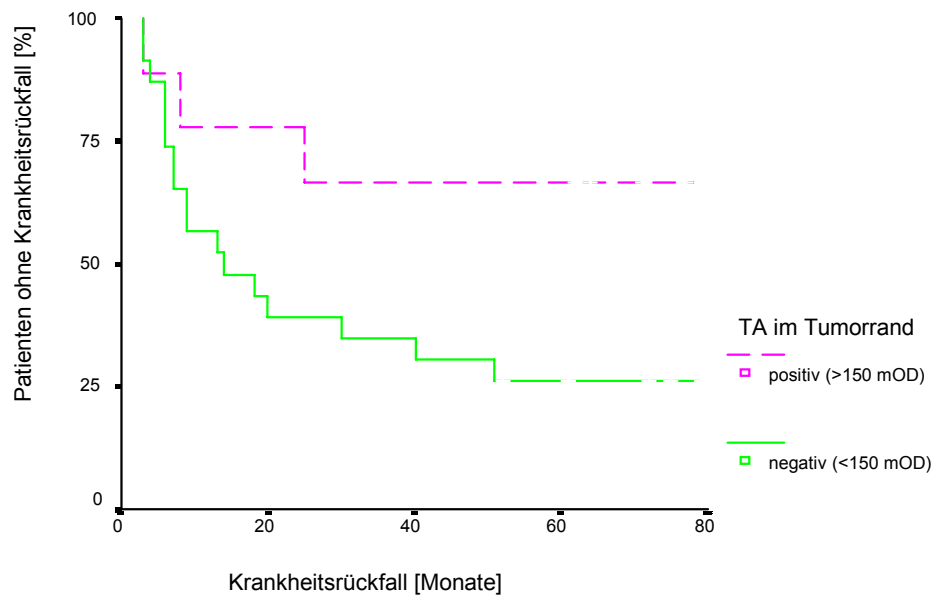
Während auch bei den 32 Tumorrandpatienten mit einer Telomeraseaktivierung Rezidive oder der Tod innerhalb der ersten 20 Monate nach der Gewebeentnahme auftraten, fanden sich bei den Tumorrandpatienten mit telomerasenegativen Geweben krankheitsverschlechternde Ereignisse über einen längeren Zeitraum verteilt (nach 51 Monaten; Abb. 11).



log Rank: $p = 0.266$

TA: Telomeraseaktivität

Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve zur rezidivfreien Zeit für die Tumorpatienten in Abhängigkeit einer Telomeraseaktivität im Tumorzentrum (n = 20)



log Rank: $p = 0.086$

TA: Telomeraseaktivität

Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve zur rezidivfreien Zeit für die Tumorpatienten in Abhängigkeit einer Telomeraseaktivität im Tumorrand (n = 32)

4 Diskussion

4.1 Telomeraseaktivität in Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen

Zur Einarbeitung in die Methodik und als Positivkontrollen wurden Zelllinien untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien UM-SCC 14A, 14B und 14C (vgl. Tab. 12) waren telomerasepositiv, die Telomerespiegel der Zelllinien lagen immer über denen der untersuchten Gewebeproben (vgl. Tab. 22). Die eingesetzte Proteinmenge hatte Einfluss auf die Höhe der Telomerespiegel. Der PCR-ELISA war in unseren Untersuchungen ab einer Zellzahl von ca. 3×10^4 / ml positiv. Bei Einsatz von 0,5 μ l der Zelllinien entspricht dies einer Zellzahl von 15 Zellen pro PCR-Ansatz. Mit dem verwendeten TRAP-Assay lassen sich positive Telomeraseergebnisse ab einer eingesetzten Proteinmenge äquivalent zu 10^3 Zellen erzielen [75, 155]. Die Sensitivität der verwendeten Nachweismethode lag damit im vorgegebenen Toleranzbereich.

Die Zelllinie UM-SCC 14C zeigte in einer parallelen Untersuchung im Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch durch einen abgewandelten TRAP-Assay mit einer Gel-Elektrophorese mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP-markiertem telomerspezifischen Primer eine starke Hexamerleiter (Abb. 12).

Mit dieser abgewandelten Nachweismethode wurde am untersuchten Patientenmaterial ein gleiches Telomeraseergebnis erzielt, so dass von einer korrekten Anwendung des benutzten TRAP-Assays ausgegangen werden kann.

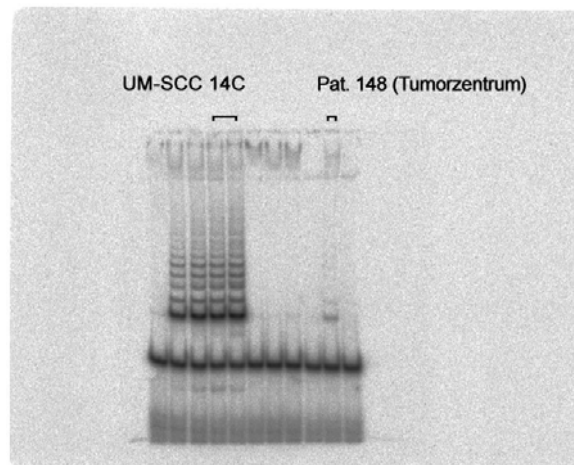


Abbildung 12: Telomeraseaktivität in der Zelllinie UM-SCC 14C und im Tumorzentrum von Patient 148 mit vergleichender Gel-Elektrophorese [Matthes und Lehmann, Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch]

Sumida et al [150] bestätigten in ihren Untersuchungen der Zelllinien UM-SCC 2, 4, 5 und 6 mit dem TRAP-Assay eine positive Telomeraseaktivität in Zelllinien von oralen Plattenepithelkarzinomen. In Übereinstimmung mit der vergleichenden Untersuchung im Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch entwickelten die von Sumida et al in der Gel-Elektrophorese untersuchten Zelllinien ebenfalls eine längere Hexamerleiter als die Gewebeproben [150]. Ebenso wiesen Mao et al [97] in Übereinstimmung mit meinen Befunden mit dem TRAP-Assay eine hohe Telomeraseaktivität in 16 Zelllinien, darunter auch in UM-SCC 14A und 14B, nach.

4.2 Bedeutung der Telomeraseaktivierung als diagnostischer und prognostischer Marker

Der Nachweis der Telomeraseaktivität bietet alle gewünschten Kriterien eines potenziellen Tumor-Screenings [139]. Der Telomerasenachweis

- erfordert nur kleine Gewebemengen,
- kann mit verschiedenen Gewebearten oder Körperflüssigkeiten minimal-invasiv durchgeführt werden,
- ist eine sensitive Nachweismethode,
- sollte in seiner Spezifität hoch sein und
- sollte kostengünstig sein.

Obwohl der Gold-Standard in der Tumordiagnostik zur Zeit immer noch die morphologische Beurteilung ist, erwartet man von molekularen Markern, dass sie weniger subjektiv sind. Bei einigen Tumorarten hat sich die Telomeraseaktivität als gesichert erwiesen, verschiedene Tumorstadien zu unterscheiden. Bei der Prostata ermöglicht die Telomeraseaktivität, zwischen benigner Hyperplasie und Prostatakarzinom zu unterscheiden [146]. Die Untersuchung von hTERT aus Feinnadel-Aspirationen (FNA) bietet sich als sensitiver Marker z.B. zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Schilddrüsenläsionen an [173]. Ein klassisches Beispiel ist ebenfalls die hTERT-Expression bei Patienten mit einem Blasenkarzinom bei noch negativer Urinzytologie [67]. Bei Patienten mit oralen Karzinomen ist eine Telomeraseaktivität in Mundspülflüssigkeiten nachweisbar [17, 150].

Prognosefaktoren sollen eine gute Vorhersage des Krankheitsverlaufes für den einzelnen Patienten und damit eine individuelle Therapieplanung ermöglichen. Viele Autoren leiteten aus ihren Befunden einer Telomeraseaktivität in den verschiedenen

Tumoren, wie z.B. in Neuroblastomen [57], in Magen- [59] und in Mammakarzinomen [56], eine mögliche prognostische Relevanz ab. So schien z.B. in einer retrospektiven Studie mit Meningeom-Patienten der Nachweis von Telomeraseaktivität mit einem Krankheitsrückfall einherzugehen [85].

4.2.1 Bedeutung der Telomeraseaktivierung in den Tumorzentren von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Mit dem eingesetzten Telomerase-Nachweiskit konnte ich in den Geweben aus den untersuchten Tumorzentren von Plattenepithelkarzinomen Telomerespiegel semi-quantitativ anhand der photometrisch ermittelten Extinktionswerte zwischen 0 und 3500 mOD bestimmen. Die von mir untersuchten Gewebeproben von Plattenepithelkarzinomen wiesen in 50 % (10/ 20) im Tumorzentrum eine Telomeraseaktivität auf (vgl. Tab. 23). Nach Mao et al [97] liegt der Anteil der telomerasepositiven Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region bei ca. 80-90 % (vgl. Tab. 3). Da alle Arbeitsgruppen den TRAP-Assay in mehr oder weniger abgewandelter Form benutzen, sind die Ergebnisse methodisch vergleichbar. Sumida et al [150] stellten fest, dass die Telomeraseaktivität in den untersuchten Tumorproben sehr unterschiedlich sein kann. Es gibt nur wenige Arbeitsgruppen, bei denen der Anteil der telomerasepositiven Proben so niedrig ist wie in meinen Untersuchungen. So beschrieben Kannan et al [72] und Patel et al [127] in oralen Plattenepithelkarzinomgeweben eine Telomeraseaktivität von 75 % bis 78 %. Nur die Arbeitsgruppen von Ries et al [133] mit 48 %, Kagata et al [70] mit 67 % und Koscielny et al mit 68 % [79] wiesen einen mit meinen Ergebnissen vergleichbaren niedrigen Anteil an telomerasepositiven Proben auf. Koscielny et al [79] vermuteten aufgrund ihrer Ergebnisse, dass die Expressionsrate der Telomerase bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich möglicherweise geringer als bei anderen Tumoren sei. Nach Ries et al stützen diese kontroversen Ergebnisse die These von parallel existierenden telomerase-abhängigen und -unabhängigen Mechanismens in der oralen Karzinogenese. Die von Bryan et al [16] beschriebenen alternativen Mechanismen zur Verlängerung der Telomere während der Immortalisierung werden immer wieder zitiert, aber die vermuteten Rekombinationsmechanismen konnten noch nicht konkret benannt werden. Bei der Suche nach Erklärungen für die von mir nachgewiesene geringe Telomeraseaktivität im Tumorzentrum sind auf der einen Seite das verwendete Patientenmaterial in der Zusammensetzung der untersuchten Gewebe kritisch zu betrachten. Für Spezialuntersuchungen in unserem Labor stand nur das Tumormaterial zur Verfügung, das nicht für die vorrangige pathologische Beurteilung benötigt wurde. Wie Carey et al

[18] bei 105 untersuchten invasiven Mammakarzinomgeweben nachwies, konnte der Anteil telomerasenegativer Proben durch sorgfältige Auswahl vor allem vitaler Gewebe und durch Entnahme unter Bedingungen der Mikrodissektion von 22 % auf 5 % reduziert werden. Die von uns eingesetzten Gewebeproben wurden nach makroskopischen Gesichtspunkten ausgewählt, da bei den speziellen Operationsbedingungen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie die Operationsgebiete je nach Lokalisation möglichst klein zu halten sind. Um zu sichern, dass die untersuchten Tumorzentren Karzinomgewebe enthielten, wurde jeweils ein unmittelbar angrenzender Kryoschnitt meiner Gewebeproben durch einen Tumorpathologen histopathologisch bewertet.

Auf der anderen Seite sind für die Interpretation der Telomeraseaktivität die Mechanismen der Telomerverlängerung durch die Telomerase zu beachten, da hemmende Mechanismen falsch-negative Ergebnisse verursachen könnten. In 17 von 81 Gewebelysaten (21 %) der Tumorpatienten fand ich in der PCR mit dem internen Standard (vgl. 3.1.4.1) viele negative Ergebnisse, die durch eine gehemmte Taq-Polymerase entstanden sein könnten. Durch die Wiederholung der PCR mit dem internen Standard mit einer reduzierten Proteinmenge konnte ich bei negativen Ergebnissen eine Hemmung der Taq-Polymerase ausschließen (vgl. 2.4.2.1). In Kontrollversuchen (vgl. 2.4.2.2) lag in einer Probe (Pat. 93) eine Hemmung der Telomerase vor. Als Ursache dieser Hemmung spielt nach Boukamp (persönliche Mitteilung 2001) möglicherweise Heparin eine Rolle. Matthes et al [100] konnten eine Hemmung der Telomerase durch Heparine in Abhängigkeit vom Molekulargewicht nachweisen. Es ist denkbar, dass Heparin von Mastzellen im Stroma oder in der Umgebung der von mir untersuchten Tumoren sezerniert wurde [36].

Neben den beschriebenen Hemmvorgängen können weitere Ursachen zu negativen Telomeraseergebnissen in den Karzinomgeweben führen. Eine mögliche Ursache, die die Telomerverlängerung in der PCR und damit die Bestimmung der Telomeraseaktivität beeinflussen könnte, ist die nicht auszuschließende Vermischung der Präparate aus dem Kopf-Hals-Bereich mit nekrotischem Gewebe, wie es Sumida et al [148, 150] und Koscielny et al [79] an Plattenepithelkarzinomen diskutierten. Allerdings fand sich bei den 9 Patienten meiner Arbeit mit G 3-Tumoren im Vergleich zu den Patienten mit G 1 und 2-Tumoren (vgl. Tab. 8) keine Beziehung zur Telomeraseaktivität im Tumorzentrum (vgl. Tab. 36). Sumida et al [150] vermuteten weiterhin, dass neben Tumornekrosen normale Leukozyten und Erythrozyten sowie Zahnplaques und Bakterien falsch-negative Ergebnisse verursachen.

Durch experimentierbedingte Kontamination verursachte falsch-positive Ergebnisse habe ich durch die mitgeführten Negativkontrollen ausgeschlossen.

Der Nachweis der Telomeraseaktivität ist bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich aufgrund der kontroversen Ergebnisse in den karzinomhaltigen Geweben der Tumorzentren nicht als diagnostischer Marker geeignet.

4.2.1.1 Beziehung der Telomeraseaktivität in den Geweben aus dem Tumorzentrum zum postoperativen Krankheitsverlauf

Um der Frage nach der Eignung der Telomeraseaktivität als prognostischer Marker nachzugehen, untersuchte ich die Beziehung der Telomeraseaktivität zum postoperativen Verlauf, zur Tumordifferenzierung und zum Tumorstadium.

Laut DÖSAK-Bericht [34] können nur Aussagen zur Überlebensprognose getroffen werden, wenn für mindestens 80 % der Patienten ein Endzeitpunkt – Tod oder Nachsorgedatum – in der Nachbeobachtung bekannt ist. Die dort präsentierte Kaplan-Meier-Überlebenskurve zeigte ein Überleben von 57 % der Patienten nach einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren. Bei den 20 Tumorpatienten meiner Arbeit konnte ein Beobachtungszeitraum von 3 Monaten bis 6,75 Jahren nachvollzogen werden (vgl. Tab. 38 und 39). 35 % der Patienten erlitten mindestens ein Rezidiv. Zum Abschluss meiner Untersuchung im Mai 2001 waren 50 % der Patienten an der Tumorerkrankung verstorben. Insgesamt erlitten 63 % der Patienten einen Krankheitsrückfall. Das Ergebnis meiner Untersuchung des postoperativen Krankheitsverlaufes entspricht den Erfahrungen des DÖSAK-Berichtes, nur dass dort keine Beziehungen zu Tumormarkern untersucht wurden.

In der vorliegenden Arbeit war die Beziehung zwischen der Telomeraseaktivität in den Tumorzentrums Geweben ($n = 20$) und dem krankheitsfreien Intervall statistisch nicht signifikant (log Rank: $p = 0.266$). Entgegen unseren Erwartungen zeigte die Kaplan-Meier-Kurve erstaunlicherweise eine längere Überlebenszeit bei nachweisbarer Telomeraseaktivität im Tumorzentrum (vgl. Abb. 10). Dabei trat der erste Krankheitsrückfall unabhängig von der Telomeraseaktivierung im Tumorzentrum innerhalb der ersten 20 Monate nach der Gewebeentnahme auf.

Eine korrekte Interpretation der Überlebenskurven nach Kaplan-Meier ist nur sichergestellt, wenn das zu vergleichende Patientenkollektiv ein identisches Risikoprofil (Tumorstadien und sonstige Einflussgrößen wie z.B. Therapiemodalitäten) aufweisen kann [34]. Diese Bedingungen waren bei unseren Patientengruppen nicht gegeben. Der unerwartete Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und dem postoperativen Krankheitsverlauf in der hier erfolgten Analyse nach Kaplan-Meier lässt aufgrund der sehr inhomogenen Zusammenstellung der Patienten vor allem bezüglich

der prä- und postoperativen Behandlungsschemata keine Schlussfolgerung hinsichtlich einer prognostischen Aussagefähigkeit der Telomerase zu.

In der Literatur fand ich nur eine Arbeit, die den Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und dem Auftreten eines Krankheitsrückfalls bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren untersuchte, um die prognostische Bedeutung der Telomeraseaktivität als einen molekularen Marker neben dem klinischen Staging und histopathologischen Grading einschätzen zu können. Ries et al [133] beschrieben in Übereinstimmung mit meiner Analyse keine Korrelation zwischen krankheitsfreiem Intervall und Telomeraseaktivität innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 6 bis 27 Monaten.

Im Gegensatz dazu stellte Bezeluk [7] bei Basalzellkarzinomen einen Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität im Tumorzentrum und dem postoperativen Verlauf fest. Der Anteil telomerasepositiver Basalzellkarzinome (26/ 30) war deutlich höher als bei in meiner Arbeit untersuchten Plattenepithelkarzinomen. Während die Aktivierung der Telomerase in den Plattenepithelkarzinomen nicht mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf einherging, korrespondierte die Telomeraseaktivität bei den Patienten mit Basalzellkarzinomen mit einer höheren Rezidivrate, jedoch ohne Signifikanz [7, 37].

4.2.1.2 Beziehung der Telomeraseaktivität in den Geweben aus dem Tumorzentrum zur Tumordifferenzierung und zum Tumorstadium

Die Tumoroperation bei den 20 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom, von denen ich neben dem Tumorzentrum noch zwei weitere Gewebe untersuchte, erfolgte in relativ fortgeschrittenem Tumorstadium (vgl. Tab. 8). Von diesen Patienten hatten 65 % (13/ 20) bereits Lymphknotenmetastasen, 80 % (16/ 20) befanden sich in späten Tumorstadien (S 3/4), 9 der 20 Gewebe aus dem Tumorzentrum (45 %) waren schlecht differenziert (G3). Diese Ergebnisse stimmten mit den Beobachtungen aus dem DÖSAK-Bericht gut überein [34, 63].

Statistisch ließ sich bei meinem Patientenkollektiv weder vom Differenzierungsgrad (vgl. Tab. 36) noch vom klinischen Tumorstadium (vgl. Tab. 37) eine signifikante Beziehung zur Telomeraseaktivität herstellen (χ^2 -Test, $p > 0.05$). Dagegen zeigten bei Sumida et al [150] schlecht differenzierte Tumoren (G3) eine ca. doppelt so hohe Telomeraseaktivität als gut differenzierte (G1). Allerdings stand mir in meiner Arbeit kein Gewebe aus dem Tumorzentrum von G1-Tumoren zur Verfügung. Im Gegensatz zu meinen Befunden, aber in Übereinstimmung mit Sumida et al [150] wiesen Kannan et al [72] auch eine Beziehung zwischen der Telomeraseaktivität und dem Grad der Tumordifferenzierung nach. Der Unterschied in der Telomeraseaktivität bei T1 und T2-

Tumoren im Vergleich zu T4-Tumoren war bei Curran et al statistisch signifikant [27]. Es gibt jedoch auch Arbeiten, die in Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen keine Beziehung zwischen dem Differenzierungsgrad, der Stadieneinteilung und der Telomeraseaktivität bei Kopf-Hals-Tumoren fanden [107, 133]. Sie sehen den Telomerasenachweis bei Plattenepithelkarzinomen eher als Möglichkeit, maligne von benignen Geweben zu unterscheiden.

Thurnher et al [157] zeigten in einer Studie, dass im Gegensatz zu meinen Ergebnissen Patienten mit N0-Tumoren signifikant niedrigere Telomeraseaktivitäten als Patienten mit einer positiven Lymphknotenmetastasierung aufweisen. Bei den von mir untersuchten Patienten mit einem N0-Status (vgl. Tab. 8) wiesen zwar 4 von 7 Geweben aus dem Tumorzentrum (57 %) eine positive Telomeraseaktivität auf, aber nur 6 von 13 Geweben von Patienten mit einem Lymphknotenbefall (46 %) waren telomerasepositiv (vgl. Tab. 23).

Meine Ergebnisse zur Telomeraseaktivität im Tumorzentrum erwiesen sich in Bezug auf tumorrelevante Parameter wie Differenzierungsgrad, Tumorstadium sowie krankheitsfreies Intervall als kontrovers und nicht eindeutig interpretierbar. Die Telomeraseaktivität in Geweben aus den Tumorzentren ist nach Analyse meiner Ergebnisse unter Einbeziehung der Literatur kein zuverlässiger diagnostischer und prognostischer Marker.

4.2.2 Bedeutung der Telomeraseaktivierung in Tumorrandgeweben und tumorentfernten Geweben von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Der Schwerpunkt meiner Arbeit lag darin, in karzinomfreien Randgeweben mit unterschiedlicher Distanz zum Tumor Telomerase nachzuweisen und zu überprüfen, welche Faktoren zur Telomeraseaktivierung in karzinomfreien Tumorrandgeweben von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich führen könnten.

Die beiden untersuchten Gruppen mit dem Tumor benachbarten Geweben unterscheiden sich in der Entfernung der entnommenen Proben vom Tumorzentrum (vgl. Tab. 8 und 9). Bei den insgesamt untersuchten 32 Tumorrandgeweben handelt es sich um die chirurgischen Resektionsränder, die 20 tumorentfernten Gewebe wurden im Abstand von ca. 2-3 cm zum Tumorrand entnommen. Alle 52 Proben waren karzinomfrei nach nochmaliger histopathologischer Kontrolle. Die 32 unmittelbaren Tumorrandgewebe waren in 28 % telomerasepositiv und die Höhe der Telomerase-Spiegel im Vergleich zu den Karzinomzentren niedriger (vgl. Tab. 23 und 24). Meine

Ergebnisse in der Gruppe der unmittelbaren Tumorrangewebe liegen prozentual leicht unter denen anderer Arbeitsgruppen (vgl. Tab. 4). Vergleichbar mit meinen Ergebnissen sind die von Kim et al [75] und Ries et al [133] beschriebenen Untersuchungen mit 37 % (7/ 19) telomerasepositiven Tumorrändern von Kopf-Hals-Tumoren. Hohaus et al [62] und Patel et al [127] fanden dagegen mit insgesamt 75 % einen wesentlich höheren Anteil an Telomeraseaktivität im Tumorrand bei 38 von 51 Patienten.

In der Gruppe der von mir untersuchten tumorfernen Gewebe der 20 Tumorpatienten war in 35 % eine Telomeraseaktivität vorhanden (vgl. Tab. 23). Der hohe Prozentsatz meiner telomerasepositiven tumorfernen Gewebe stimmt mit Curran et al [27] überein, die eine Telomeraseaktivität ebenfalls in 35 % (7/ 20) von histopathologisch normalen Geweben in der Umgebung von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle nachwies. Mao et al [97] untersuchten 30 benachbarte karzinomfreie Tumorrangewebe und fanden in Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen eine Telomeraseaktivität in 43 % der Geweben, die dysplastisch verändert waren.

Aus den Angaben der Autoren, die die Telomeraseaktivität in Tumorrangeweben von Kopf-Hals-Tumoren untersuchten (vgl. Tab. 4), lässt sich oft nicht nachvollziehen, wie weit die Tumorrangewebe vom Tumorzentrum entfernt waren und ob diese Befunde daher mit meinen vergleichbar sind. In dem Tumor benachbarten Geweben findet sich eine auffallend große Spannweite der Ergebnisse, ohne dass konkret diskutiert wird, wie diese starken Differenzen erklärt werden können. Die möglichen Erklärungen für eine Telomeraseaktivierung in dem Tumor benachbarten Geweben werden im folgenden vorgestellt.

4.2.2.1 Theorie der minimal residual disease (MRD) in Tumorrangeweben und tumorentfernten Geweben

Hohaus et al [62] veröffentlichten einen ersten Nachweis von abnehmender Telomeraseaktivität in normaler Mukosa mit zunehmender Entfernung vom Tumorzentrum bei Larynxkarzinomen. Diese Beobachtung erklärte er durch wahrscheinlich verstreute telomerasepositive Tumorzellen. Er nahm Bezug auf eine wichtige Studie von Brennan et al [14], die in histopathologisch karzinomfreien Tumorrändern molekulare Veränderungen im p53-Gen fanden. Das Konzept der minimalen residualen Erkrankung von unentdeckt verbleibenden Tumorzellen bietet einen Erklärungsansatz für eine positive Telomeraseaktivität in den karzinomfreien Randgeweben von Tumoren [40, 123, 159, 160]. Zugleich liegt in diesem Zusammenhang eine mögliche Ursache für das häufige Auftreten von Lokalrezidive, die vor allem bei Kopf-Hals-Tumoren zu einer schlechten

Prognose führen [87, 158]. Brennan et al [14] schlugen bereits 1995 vor, dass die Analyse von p53 aus chirurgischen Tumorrangewebe die histopathologische Beurteilung ergänzen und die Vorhersagemöglichkeiten eines Tumorrezidives verbessern könnte. Er fügte aber einschränkend an, dass p53-Mutationen nur in ca. 50 % der Kopf-Hals-Tumoren nachweisbar sind. Böckmann et al [13] beschrieben, dass der Nachweis von disseminierten Tumorzellen, die für Entstehung von Rezidiven und Metastasen von Tumoren verschiedener Lokalisationen verantwortlich gemacht werden, als molekulare Markerfunktion genutzt werden könnte. Der Nachweis dieser Zellen sollte z.B. zur Prognoseeinschätzung und Therapieauswahl dienen und die histopathologische Diagnose von Tumorrangewebe von Kopf-Hals-Tumoren ergänzen. Zum jetzigen Zeitpunkt hat nach Woolgar et al [167] der Lymphknotenstatus nach wie vor die größte prognostische Bedeutung.

4.2.2.2 Theorie der Feldkanzerisierung in Tumorrangewebe und tumorentfernten Gewebe

Eine parallel stattfindende, unabhängige Aktivierung des umgebenden Gewebes im Sinne der Feldkanzerisierung könnte des weiteren für eine positive Telomeraseaktivität in Tumorrangewebe verantwortlich sein [151]. Mit der Aktivierung der Telomerase in Tumorrangewebe kann möglicherweise eine frühe Phase der Karzinogenese erfasst werden, die noch nicht im Rahmen der histopathologischen Beurteilung darstellbar ist. Dafür spricht der Telomerasenachweis in Leukoplakien mit zunehmendem Dysplasiegrad [72, 74, 96, 107]. Nach Dhaene et al [35] scheinen dagegen die kurzen Telomere trotz nachweisbarer Telomerase auf die Aktivierung als ein spätes Ereignis in der Karzinogenese hinzuweisen. Die Tumorzellen mit verkürzten Telomeren haben wahrscheinlich eine große Anzahl von Zellteilungen mit einer Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen durchlaufen, wobei an einem Punkt der kritischen Telomerverkürzung die Telomerase reaktiviert wurde, um die Telomere zu stabilisieren. Fujimoto et al [39] fanden die Telomeraseaktivierung an zwei Stufen in der Karzinogenese: zum einen in der Verbreitung von telomerasepositiven Keratinozyten aus der Basalzellschicht von normaler Mukosa in einem prämaligen Status, zum anderen erst in der Expression von hTERT in malignen Epithelzellen. Matthews und Jones [101] kommen am Beispiel einer hohen Telomeraseaktivität in sonnenexponierter Haut zu dem Schluss, dass nur mit Morphologie-erhaltenen Techniken, wie der Immunhistochemie, der In-situ-Hybridisierung oder der In-situ-PCR zu klären ist, ob der Telomerasenachweis im Sinne einer Kanzerisierung zu deuten oder Ausdruck einer Infiltration mit aktivierten Lymphozyten ist.

4.2.2.3 Aktivierung von mononukleären Zellen in Tumorrandgeweben und tumorentfernten Geweben

Mao et al [97] stellten die Frage, ob die positive Telomeraseaktivität in histopathologisch karzinomfreien Tumorrandgeweben nicht nur infiltrierenden Tumorzellen (Theorie der MRD) oder präneoplastischen Läsionen (Theorie der Feldkanzerisierung) sondern auch infiltrierenden Lymphozyten zugeschrieben werden kann. Dafür sprechen Untersuchungen von Hiyama et al [60], Counter et al [25] und Broccoli et al [15], die eine schwache Telomeraseaktivität in normalen hämatopoetischen Zellen fanden. Shay und Wright [140] untersuchten die Telomeraseaktivität mononukleärer Zellen in 124 Blutproben in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellmenge. Im Gegensatz zum Nachweis einer positiven Telomeraseaktivität bereits von 15 Tumorzellen der etablierten Zelllinie eines Mundbodenkarzinomes UM-SCC 14C (vgl. 4.1) sind für den Nachweis der Telomeraseaktivität durch aktivierte lymphozytäre Zellen wesentlich höheren Zellzahlen erforderlich: bei 10^4 Zellen Telomeraseaktivität in 44 % und bei 10^5 Zellen Telomeraseaktivität in 81 % nachweisbar.

Alle in meiner Arbeit untersuchten tumorbenachbarten Gewebe wurden von einem Histopathologen auf eine Infiltration mit lymphozytären Zellen beurteilt (Tab. 41 und 42). Diese Infiltrationen ließen sich insgesamt in 8 von 9 telomerasepositiven Tumorrandgeweben und in 7 von 7 telomerasepositiven tumorfernen Geweben nachweisen (Tab. 43). Allerdings konnte ich keine statistische Korrelation zwischen der Telomeraseaktivität (vgl. Tab. 23 und 24) und der lymphozytären Reaktion nachweisen, da auch die telomerasenegativen Gewebe lymphozytär infiltriert waren.

Tabelle 41: Histopathologische Bewertung der 33 karzinomfreien Tumorrangewebe hinsichtlich einer lymphozytären Reaktion

Pat.-Code	Telomerase-aktivität*	lymphozytäre Reaktion**	Pat.-Code	Telomerase-aktivität*	lymphozytäre Reaktion**
5	0	1	103	0	1
128	1	2	106	1	1
148	1	1	133	0	1
158	1	0	142	0	1
175	0	0	293	1	2
180	0	2	332	0	1
209	0	1	337	0	1
253	0	2	374	0	0
382	0	0	412	1	1
385	1	1	413	0	0
473	1	2	478	0	1
474	0	1	502	1	2
539	0	2	535	0	1
14	0	1	667	0	1
36	0	1	678	0	1
78	0	2	TA positiv: 9/ 32 (28 %)		
83	0	1	lymphozytäre Reaktion: 0: 5/ 33 (15 %)		
93***	0	2	1: 19/ 33 (58 %)		
			2: 9/ 33 (27 %)		

* qualitative Bewertung der Telomeraseaktivität: 0 = negativ, 1 = positiv (> 150 mOD)

** Bewertung der lymphozytären Infiltration: 0 = keine; 1 = gering; 2 = mäßig;

***: Pat. 93 aufgrund von Telomerasehemmung nicht in statistische Auswertung einbezogen (vgl. 3.1.6.2)

Tabelle 42: Histopathologische Bewertung der 20 tumorentfernten Gewebe hinsichtlich einer lymphozytären Reaktion

Pat.-Code	Telomeraseaktivität*	lymphozytäre Reaktion**	Pat.-Code	Telomeraseaktivität*	lymphozytäre Reaktion**
5	1	2	474	1	1
128	0	1	539	1	1
148	0	1	7	0	1
158	0	1	13	0	1
175	1	1	85	1	1
180	0	1	86	0	1
209	0	0	461	1	1
253	0	1	466	1	1
382	0	1	679	0	1
385	0	2	TA positiv: 7/ 20 (35 %)		
473	0	0	lymphozytäre Reaktion: 0: 2/ 20 (10 %) 1: 16/ 20 (80 %) 2: 2/ 20 (10 %)		

* qualitative Bewertung der Telomeraseaktivität: 0 = negativ, 1 = positiv (> 150 mOD)

** Bewertung der lymphozytären Infiltration: 0 = keine; 1 = gering; 2 = mäßig

Tabelle 43: Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und der lymphozytären Reaktion in den Tumor benachbarten Geweben

graduelle Bewertung der lymphozytären Reaktion	TA im Tumorrand (n = 32)		TA tumorfern (n = 20)	
	negativ (n = 23)	positiv (n = 9)	negativ (n = 13)	positiv (n = 7)
keine Infiltration	4	1	2	0
geringe Infiltration	15	3	10	6
starke Infiltration	4	5	1	1
χ^2 -Test:	p = 0.283		p = 0.517	

TA: Telomeraseaktivität

Der positive Nachweis von Telomeraseaktivität in B- und T-Lymphozyten führte zur Diskussion, die Telomerase im Zusammenhang mit antigenstimulierten Lymphozyten zu sehen [171].

Hiyama et al [60] beschrieben telomerasepositive T- und B-Lymphozyten, die unter mitogener Stimulation mit Phytohämagglutinin *in vitro* noch zu einer Steigerung der Telomeraseaktivität fähig waren. Die gleiche Reaktion beschrieben Hiyama et al für hämatopoetische Vorläuferzellen während ihrer Proliferation. Dieser Sachverhalt wurde bei Norrback et al [116] durch Untersuchungen an normalen Tonsillen bestätigt. Dabei scheint die Telomeraseaktivität vor allem mit den normalen B-Gedächtnis-Zellen des nach Immunstimulation entstandenen Keimzentrums assoziiert zu sein. Bei der Untersuchung von Lymphozyten durch Bodnar et al [11] war die Aktivierung von T-Zellen mit einer verstärkten Telomeraseaktivität verbunden. Die Telomeraseaktivierung reichte allerdings nicht aus, um die Telomerlänge aufrecht zu erhalten. Die Literaturhinweise zur Telomeraseaktivierung in lymphatischem Gewebe *in vivo* sind jedoch widersprüchlich. Curran et al [27] fanden trotz inflammatorischer Zellen in normaler Mukosa keine Telomeraseaktivität und damit keine direkte Beziehung zwischen der Telomeraseaktivierung und der lymphatischen Infiltration. Auch Kannan et al [72] konnten keine signifikanten Unterschiede in telomerasepositiven und -negativen Geweben bezüglich einer Infiltration mit lymphozytären Zellen finden. Dies deckt sich mit meinen Befunden in den tumorbenachbarten Geweben (vgl. Tab. 41-43).

In einer Untersuchung von Liao et al [93] war der Proliferationsmarker Ki-67 in oralen Plattenepithelkarzinomen und in dysplastischen Leukoplakien mit einer hohen Telomeraseaktivität statistisch signifikant höher exprimiert als in denen mit geringer oder keiner Telomeraseaktivierung. Bei Untersuchungen von Fibroadenomen der Mamma als typisch benigne Tumoren mit seltener Entartungstendenz fanden Hiyama et al [56] in 45 % eine Telomeraseaktivierung. Dies spricht ihrer Meinung nach eher dafür, dass die Telomerase ein proliferationsassoziierter und kein malignitätsspezifischer Marker ist. Wahrscheinlich ist daher, dass die Telomeraseaktivität nicht allein das auslösende Moment in der malignen Transformation ist. Nach Jiang et al [68] führt die Telomerase zwar zur Immortalisierung von Zellen, aber sie induziert nicht aktiv einen transformierten Phänotyp.

4.2.2.4 Bedeutung der Telomeraseaktivität in Tumorrangeweben als prognostischer Marker

Analog zur Einschätzung der prognostischen Aussage der Telomeraseaktivität in den karzinomhaltigen Geweben des Tumorzentrums (vgl. 4.2.1.1) konnte ich auch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Telomeraseaktivität in den untersuchten Tumorrangewebe und einem Krankheitsrückfall nachweisen (log Rank: $p = 0.086$). Die Tendenz, dass die Patienten mit telomerasepositiven Tumorrangeweben überraschenderweise ein längeres krankheitsfreies Intervall aufweisen, ist im Gegensatz zu den karzinomhaltigen Geweben noch deutlicher ausgeprägt (vgl. Abb. 11). Bei den Tumorrangepatienten mit telomerasenegativen Geweben traten die krankheitsverschlechternden Ereignisse auch über einen längeren Zeitraum (51 Monate) auf als bei denen mit einem telomerasepositiven Tumorrang (20 Monate). Dagegen stellte Bezeluk [7] in seiner parallel durchgeführten experimentellen Arbeit bei Patienten mit Basalzellkarzinomen einen signifikanten direkten Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivierung im Tumorrang und der Häufigkeit postoperativer Rezidive in der Kaplan-Meier-Kurve fest [7, 37].

Die von mir nachgewiesene Telomeraseaktivierung in Tumorrangeweben könnte als akute Immunreaktion gewertet werden und die Stimulierung des Immunsystems eine bessere Überlebenszeit zur Folge haben. Damit wäre die Telomeraseaktivierung in Tumorrangeweben als ein Immunmarker für eine bessere Prognose denkbar. Diese Schlussfolgerung muss jedoch erst an Untersuchungen mit einer hinsichtlich der postoperativen Behandlung homogenen Patientengruppe gesichert werden.

Ich kann mit der eingesetzten Nachweismethode der Telomerase nicht unterscheiden, ob die in einem Lysatgemisch gefundene Telomeraseaktivierung in karzinomfreien Tumorrangeweben durch Telomerase von disseminierten Karzinomzellen oder von reaktiven Lymphozyten einer Umgebungsentzündung stammt. Mit den im TRAP-Assay untersuchten Lysaten ist eine zelluläre Zuordnung der Telomeraseaktivierung in den Tumorrändern und den benachbarten Geweben nicht möglich, da es sich bei meinen Gewebeproben um ein heterogenes Zellgemisch handelt. Bei Tumorgeweben finden sich neben Karzinomzellen auch Bindegewebe-, Endothel- und lymphozytäre Zellen. Alle diese Zellen besitzen nachgewiesenermaßen die Fähigkeit, Telomerase zu exprimieren [145]. Diese Problematik wird gegenwärtig in einer weiteren Doktorarbeit in unserer Klinik durch den In-situ-Nachweis von hTERT in einzelnen Zellen der Tumorrangewebe untersucht.

4.3 Einordnung der Patienten hinsichtlich Tumorlokalisation, Alter und Geschlecht der Patienten sowie Tumorrisikofaktoren

In dieser Arbeit habe ich epidemiologische Daten und Risikofaktoren überprüft, um charakteristische Gemeinsamkeiten bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom mit Daten in größeren Studien zu vergleichen. Es wurden die Tumorlokalisation, das Alter sowie die bekannten Risikofaktoren Alkohol und Nikotin untersucht, da sie für die Prognose und den Krankheitsverlauf der Patienten bedeutsam sind. Es ist denkbar, dass die kokarzinogene Wirkung von Nikotin und/oder Alkohol im oralen Bereich auch an der Aktivierung der Telomerase beteiligt sind.

Die von mir untersuchten Patienten stimmen in Bezug zur Alters- und Geschlechtsverteilung (vgl. 3.2.1) mit den Angaben der Register vom Robert-Koch-Institut und der DÖSAK weitgehend überein [2, 34, 63]. Die Unterschiede zwischen Tumorpatienten und gesunden Kontrollpatienten hinsichtlich eines höheren Alkohol- und Nikotinkonsums sind statistisch gesichert (vgl. Tab. 34). Die bekannten Risikofaktoren waren demnach so verteilt, wie diese in der Literatur bei Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor beschrieben werden [2, 95, 164]. Eine Kombination aus Alkoholkrankheit, Rauchen und schlechter Mundhygiene wird im DÖSAK-Bericht bei 33 % der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom registriert [34, 63]. Allgemein wird das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen bei jungen Patienten mit einer schlechten Prognose verbunden, da die Tumoren zu einem frühen Zeitpunkt auftreten und aggressiv wachsen [30, 121]. Nach einer Studie von Verschuur et al [163] war jedoch die Prognose von Patienten unter 40 Jahren mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich nicht schlechter als die älterer Patienten. Patienten über 40 Jahre haben gegenüber jüngeren eine erhöhte Inzidenz von Zweitkarzinomen, was auf mögliche Veränderungen nach der Theorie der Feldkanzerisierung zurückgeführt wird, die vor allem durch häufigeren Tabakgenuss verursacht werden könnte.

Die von mir untersuchten Tumorpatienten entsprechen in ihren epidemiologischen Daten dem in der Literatur ausgewerteten Patientenkollektiv mit Kopf-Hals-Tumoren.

4.4 Vergleich der Befunde der Telomeraseaktivierung mit dem Nachweis von HPV und p53 in früheren Tumorprojekten

Da die Telomeraseaktivität sowohl in den Geweben aus den Tumorzentren und den Tumorrändern als auch in den tumorentfernteren Geweben nachweisbar war, versuche ich eine Analyse an ausgewählten Patienten, die in ihren Befunden zur Telomeraseaktivität die kontroversen Ergebnisse repräsentieren (vgl. 4.2).

Die Expression von p53 wurde immunhistochemisch mit der APAAP (Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase) in der Dissertation von Lehmann untersucht [88]. Es wurde sowohl mutiertes p53 (mt-p53) als auch Wildtyp-p53 (wt-p53) nachgewiesen. In einer korrespondierenden Doktorarbeit von Kowalski [80] im gleichen Doktorandenprojekt erfolgte der HPV-Nachweis mit Hilfe der PCR und nachfolgender Hybridisierung mit Hochrisiko-HPV- (u.a. für den Nachweis der Typen 16 und 18) sowie Niedrigrisiko-HPV-Sonden.

Aufgrund der geringen Patientenzahl wurden nur die positiven und negativen Häufigkeiten zwischen den drei Parametern verglichen. Der statistische Vergleich zwischen der Telomeraseaktivität und den p53- bzw. HPV-Befunden ergab in den untersuchten Geweben aus den Tumorzentren im χ^2 -Test keine Signifikanz (Tab. 44).

Tabelle 44: Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und den p53- bzw. HPV-Befunden in Tumorzentrum- und tumorfernen Geweben

	TA im Tumorzentrum (n = 20)		TA tumorfern (n = 20)	
	negativ (n = 11)	positiv (n = 9)	negativ (n = 13)	positiv (n = 7)
p53* positiv	8	6	2	2
p53* negativ	3	3	4	1
χ^2-Test	p = 0.343			
HPV** positiv	1	1	1	0
HPV** negativ	10	8	12	7
χ^2-Test:	p = 0.452			

TA: Telomeraseaktivität; *p53: wt-p53 (Wildtyp) und/oder mt-53 (mutiert); **HPV: Typen 16 und 18

In Tabelle 45 sind die Ergebnisse meiner Arbeit zur Telomeraseaktivität im Tumorzentrum (vgl. Tab. 23) und der zwei vorangegangenen Doktorarbeiten über den Nachweis von HPV [80] und p53 [88] zusammengefasst.

Tabelle 45: Telomerase-, HPV- und p53-Befunde im Tumorzentrum- und tumorfernen Geweben

Patienten-Code	Tumorzentrum			Tumorfern			
	TA*	p53**	HPV***	TA*	p53**	HPV***	lymphozytäre Infiltration****
5	0	1	0	1	/	0	2
128	0	1	0	0	1	0	1
148	1	1	1	0	/	1	1
158	0	1	0	0	0	0	1
175	0	1	0	1	/	0	1
180	1	0	0	0	0	0	1
209	1	1	0	0	/	0	0
253	1	1	0	0	/	0	1
382	0	1	0	0	0	0	1
385	1	0	0	0	0	0	2
473	0	1	0	0	/	0	0
474	0	0	0	1	/	0	1
539	1	1	0	1	/	0	1
7	1	0	0	0	1	0	1
13	0	0	0	0	/	0	1
85	0	1	0	0	/	0	1
86	0	1	1	1	1	0	1
461	1	1	0	1	0	0	1
466	0	0	0	1	1	0	1
679	1	1	0	0	/	0	1

* qualitative Bewertung der Telomeraseaktivität TA: 0 = negativ, 1 = positiv (> 150 mOD)

** qualitative Bewertung von p53 (Wildtyp und/oder mutiert): 0 = negativ, 1 = positiv (immunreaktiver Score IRS > 2),
/ = nicht untersucht

*** Bewertung von HPV (Typen 16 und 18): 0 = negativ, 1 = positiv

**** Bewertung der lymphozytären Infiltration: 0 = keine; 1 = gering; 2 = mäßig

4.4.1 Vergleich ausgewählter Tumorpatienten zur diagnostischen Bedeutung von Telomeraseaktivität, HPV und p53 in Tumorzentren von Plattenepithelkarzinomen

An drei ausgewählten Kasuistiken möchte ich meine Ergebnisse der untersuchten Gewebe aus den Tumorzentren mit denen aus den Dissertationen von Kowalski [80] und Lehmann [88] vergleichen und dabei den postoperativen Krankheitsverlauf mit einbeziehen.

In der ersten Beispieldiskussion möchte ich die Ergebnisse der zwei Tumorpatienten 148 und 679 mit einem sehr stark telomerasepositiven Tumorzentrum dem telomerasenegativen Tumorzentrum des Patienten 86 gegenüberstellen (vgl. Tab. 8, 23 und 31). Die Befunde aus den Tumorzentrumgeweben dieser drei Patienten aus drei Doktorarbeiten sind in der Tabelle 46 zusammengestellt.

Tabelle 46: Telomeraseaktivität, HPV- und p53- Befunde in den Tumorzentren der drei ausgewählten Tumorpatienten 86, 148 und 679

Patienten-Code	Telomeraseaktivität** [mOD]	wt-p53 (Wildtyp) IRS***	mt-p53 (mutiert) IRS***	HPV-Typen 16/ 18****
148	3500	12	6	1
679	3500	1	12	0
86 (Rezidiv*)	95	3	4	1

*: Primärtumor von 1993 war auch HPV-positiv;

** semiquantitative Bewertung der Telomeraseaktivität (vgl. Tab. 20): < 150 mOD = negativ, > 1050 mOD = 4x positiv

*** Bewertung von p53 (Wildtyp und/oder mutiert): immunreaktiver Score IRS > 2 = positiv, IRS \square 6 = stark positiv [131]

**** Bewertung von HPV (Typen 16 und 18): 0 = negativ, 1 = positiv

Der postoperative Verlauf der Tumorerkrankung war bei den Patienten 148 und 679 sehr unterschiedlich (vgl. Tab. 38). Die hohe Telomeraseaktivität im Tumorzentrumgewebe des Patienten 148 mit einem schlechten Differenzierungsgrad eines Tonsillenkarzinoms könnte mit der gleichzeitigen Infektion durch Hochrisiko-HPV Typen 16 und 18 [80] zusammenhängen. Das steht im Gegensatz zu dem unauffälligen postoperativen Verlauf der Erkrankung des Patienten. Bei Patient 679 deckt sich die hohe Telomeraseaktivität im Tumorzentrum mit dem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem sehr aggressiven Verlauf (Rezidiv und Zweitkarzinom). Im Gegensatz konnte ich im Tumorgewebe von Patient 86 mit einer schlechten Tumordifferenzierung, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem aggressiven postoperativen Verlauf mit Lymphangiosis carcinomatosa und nachgewiesenen Hochrisiko-HPV Typen 16 und 18 [80] keine Telomeraseaktivierung nachweisen.

Bei einer geringen Nachweishäufigkeit von Hochrisiko-HPV Typen (2/ 20) und von Telomerase (10/ 20, vgl. Tab. 27) trafen nur bei Patient 148 eine hohe Telomeraseaktivität und ein positiver HPV-Befall zusammen. Dies könnte für ein Zusammenwirken beider Faktoren bei der Karzinogenese im Waldeyer`schen-Rachenring diskutiert werden. In dieser Tumorlokalisation werden bei Plattenepithelkarzinomen häufiger Hochrisiko-HPV Typen ohne eine eindeutige prognostische Beziehung nachgewiesen als bei einer anderen Lokalisation im Kopf-Hals-Bereich [41, 105, 128, 174]. Die hohe Telomeraseaktivität im Tonsillenkarzinom könnte zusätzlich durch die Aktivierung des lymphatischen Gewebes mitbedingt sein (vgl. 4.2.2.3 und Tab. 45).

Das an der oralen Karzinogenese beteiligte Tumorsuppressor-Gen p53 [14] wurde in der mutierten Form am deutlichsten im Tumorgewebe von Patient 679 zusammen mit der erhöhten Telomeraseaktivität nachgewiesen, aber auch im Tumorgewebe von Patient 148 neben einer hohen Expression des Wildtyp-p53 [88]. Bei beiden Patienten könnte eine Beteiligung von p53 und der Telomerase bei der Kanzerogenese diskutiert werden. Henderson et al [55] wiesen in vitro eine Reduktion der Telomeraseaktivität durch p53 nach, was an den in der Tabelle 46 gezeigten Beispielen nicht erkennbar wird. Wie Klingelhutz et al [77] ebenfalls in vitro zeigten, gibt es auch eine p53 unabhängige Telomeraseaktivierung durch HPV. In meinen Beispielen fand ich trotz nachgewiesener p53-Exprimierung im Tumorgewebe des Patienten 86 keine Telomeraseaktivierung.

Aus dem Vergleich meiner Ergebnisse mit denen der zwei Doktorandenprojekte kann ich schlussfolgern, dass weder der Nachweis der Telomeraseaktivität allein, noch der Nachweis von p53 oder HPV molekulare Marker sind. Da ich nur Einzelfälle betrachtet habe, müsste dieses Ergebnis jedoch an einer größeren Patientenzahl überprüft werden.

4.4.2 Vergleich ausgewählter Tumorpatienten zur prognostischen Bedeutung der Telomeraseaktivität

In Anlehnung an die Analyse der untersuchten Gewebezentren von drei ausgewählten Patienten zu möglichen Tumormarkern möchte ich die Beziehung der Telomeraseaktivität, vor allem in den tumorfernen Geweben, zum postoperativen Krankheitsverlauf an den vier weiteren ausgewählten Tumorpatienten 5, 175, 466 und 474 (vgl. Tab. 8, 23 und 31) diskutieren.

In den drei tumorfernen Geweben der Patienten 5, 466 und 474 wies ich sehr hohe Telomerasespiegel nach (vgl. Tab. 23). Bei allen diesen Proben handelte es sich um tumorentferntes Gewebe eines mäßig bis schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinoms des Mundboden-Zungen-Bereiches mit einer Lymphknotenmetastasierung (vgl. Tab. 8). Alle drei Patienten starben innerhalb eines Jahres post operationem am Primärtumor oder an einem Folgerezidiv. Bei allen Geweben der drei Patienten wurden mikroskopisch tumorfern lymphatisches Gewebe bzw. lymphozytäre Infiltrationen beschrieben (vgl. Tab. 44). Die hohe Telomeraseaktivität in diesen Proben könnte sowohl auf die lymphatischen Zellen mit hoher proliferativer Kapazität bzw. auf maligne entartete Zellen in einem Frühstadium zurückzuführen sein und korreliert in allen drei Fällen auch mit einem aggressiven Krankheitsverlauf. Diesen drei beschriebenen Patienten mit der sehr hohen Telomeraseaktivität im tumorfernen Gewebe gegenüber steht Patient 175. Er zeigt bei Lymphangiosis carcinomatosa zwar ebenfalls einen sehr aggressiven Krankheitsverlauf, aber das tumorferne Gewebestück war nur schwach telomerasepositiv (vgl. Tab. 23).

Die nicht erklärable Verteilung der Telomeraseaktivität in Gewebeproben von diesen vier exemplarischen Patienten mit dem gemeinsam aggressiven postoperativen Krankheitsverlauf verdeutlicht, dass sich die Erwartungen einer prognostischen Markerfunktion der Telomeraseaktivität nicht erfüllen.

4.5 Ausblick: Möglichkeit einer Anti-Telomerase-Therapie

Da fast alle Tumorarten eine Telomeraseaktivität besitzen, setzt man große Hoffnungen in eine adjuvante „Anti-Telomerase-Therapie“. Telomerase-Hemmstoffe sind attraktive Ziele für diese Krebstherapie [81]. Nach Lavelle et al [86] ist eine Anti-Telomerase-Therapie durch eine direkte Hemmung der Telomerase, durch eine Interferenz mit den Telomeren oder durch eine Interaktion mit anderen Proteinen, die an der Regulierung der Telomerase und der Telomere beteiligt sind, denkbar. Das führt zur Entwicklung von selektiven Telomerase-Hemmern für eine neue Anti-Krebs-Strategie [100].

Telomeraseinhibitoren sollen nach Reduzierung der Tumormasse durch konventionelle Therapiemaßnahmen, wie Operation, Chemo- und Strahlentherapie zur adjuvanten Therapie eingesetzt werden. Das klinische Therapieziel liegt in einem verlängerten rezidivfreien Intervall. Die Effektivität einer Anti-Telomerase-Therapie ist in der Hemmung der Telomerase und in der Verkürzung der Telomere zu sehen [23]. In Therapiestudien fiel eine wochenlange Verzögerung des Wirkungseintrittes zwischen

Telomerasehemmung und Stopp des Zellwachstums auf, vor allem in Zellsystemen mit langen Telomeren [48]. Auch für Hackett und Greider [46] spielt der zeitliche Ablauf eine Rolle, da die Telomerverkürzung zum einen zur Tumorsuppression, zum anderen aber zur chromosomalen Instabilität führt.

Sharma et al [136] wiesen auf die Bedeutung einer potenziellen Toxizität und von Resistenzmechanismen hin, die durch eine Anti-Telomerase-Therapie auftreten könnten. Eine generelle Gabe von Telomeraseinhibitoren könnte verschiedene unerwünschte Nebenwirkungen auf alle proliferierenden Gewebe haben, wie z.B. eine Störung der Hämatopoese und eine Schädigung der basalen Hautzellen. Da die Telomerlängen von Tumorzellen gegenüber normalen Zellen im Mittel kürzer sind, sprechen Keith et al [73] von einem anzustrebenden „therapeutischen Fenster“. Shay [137] und Autexier [4] schlagen nach einer Chemotherapie zur Verkleinerung der Tumormasse eine anschließende Anti-Telomerase-Therapie im „therapeutischen Fenster“ vor. Ob die Telomerase ein besseres Ziel einer Krebstherapie ist als tumorspezifische Antigene, die in verschiedenen klinischen Studien erprobt werden, bleibt abzuwarten [103].

Die klinischen und wissenschaftlichen Erfahrungen kommen zu der Erkenntnis, dass die histopathologische Beurteilung des chirurgische Resektionsrandes durch molekulargenetische Kriterien ergänzt werden muss, um eine bessere Charakterisierung des Tumors in seinem biologischen Verhalten zu erreichen.

Böckmann et al [13] sehen im Nachweis molekularer Marker wie p53, chromosomale Mikrosatelliten-Veränderungen und auch der Telomeraseaktivität die Chance, unentdeckt bleibende disseminierte Tumorzellen (MRD) bzw. assoziierte genetische Veränderungen im umgebenden Gewebe (Feldkanzerisierung) aufzuzeigen. Vor dem Hintergrund der prognostischen Bedeutung eines karzinomfreien Tumorrandes könnte damit die analytische Lücke zwischen Primärtumor und einer Metastasierung geschlossen werden.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse einer Telomeraseaktivität in nichtneoplastischen Zellen werfen ein kritisches Licht auf die Wertigkeit des Telomerasenachweises in Tumorgeweben. In-situ-Untersuchungen sind notwendig, um die zelluläre Spezifität der Telomeraseaktivität in Tumoren zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

In den Geweben von 40 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich wurde die Telomeraseaktivität mit der Fragestellung untersucht, ob die Telomeraseaktivität als ein molekularer Marker für histopathologisch karzinomfreie Tumorrandgewebe diagnostisch eingesetzt werden kann und ob dieser Nachweis eine prognostische Bedeutung hat. Als Nachweismethode diente der TRAP-Assay mit einem ELISA als Detektionsmethode. Zwischen den untersuchten Patientengruppen wurde die Telomeraseaktivität statistisch verglichen. Die Ergebnisse der Telomeraseaktivität wurden auf eine Korrelation zum Differenzierungsgrad und zum Stadium der Tumoren sowie zum postoperativen Krankheitsverlauf geprüft. Präoperativ anamnestisch erhobene potenzielle Risikofaktoren, wie Nikotin- und Alkoholkonsum, wurden in die Analyse mit einbezogen. In einem vorherigen Doktoranden-Tumorprojekt wurden vergleichbare und teilweise identische Tumorgewebe und Tumorrandgewebe u.a. auf die Anwesenheit von humanen Papillomaviren bzw. die Expression von p53 untersucht und werden in dieser Arbeit mit der Telomeraseaktivität verglichen.

Die Telomeraseaktivität wurde in 20 karzinomhaltigen Geweben aus Tumorzentren von Plattenepithelkarzinomen, in 33 unmittelbaren karzinomfreien Tumorrandgeweben und in 20 tumorfernen, ebenfalls karzinomfreien Geweben im Vergleich zu 40 Kontrollgeweben von Patienten ohne Tumorerkrankung untersucht. Die Tumorpatienten entsprachen in der Alters- und Geschlechtsverteilung aber auch in der Verteilung der Hauptrisikofaktoren Nikotin und Alkohol den Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.

Die karzinomhaltigen Gewebe waren zu 50 %, die karzinomfreien Gewebe aus dem Tumorrand zu 28 % und die tumorfernen Gewebe zu 35 % telomerasepositiv. Der statistische Vergleich im U-Test und χ^2 -Test zwischen den Tumorpatienten ergab keine signifikanten Unterschiede im Anteil telomerasepositiver Proben. Wie erwartet war in den Karzinomgeweben der Telomerasespiegel im χ^2 -Test signifikant höher als in den karzinomfreien Tumorrandgeweben und in den normalen Kontrollgewebeproben.

Meine Ergebnisse zur Telomeraseaktivität zeigten zu keinem der prognostisch relevanten Parameter wie Tumordifferenzierungsgrad und Tumorstadium eine statistisch signifikante Beziehung.

Die Interpretation der in dieser Arbeit bestimmten Telomeraseaktivität lässt keine molekulare Beurteilung des histopathologisch karzinomfreien Tumorrandes zu. Die Ergebnisse zur Telomeraseaktivität sind nicht geeignet, diejenigen Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko z.B. für Lokalrezidive mit schlechter Prognose

tragen. Die Kaplan-Meier-Analyse des postoperativen Verlaufes zeigte überraschenderweise bei den Patienten mit telomerasepositiven Geweben sowohl der Tumorzentren als auch der Tumorränder die Tendenz zu einem günstigeren Krankheitsverlauf. In diesen Fällen könnte die Telomeraseaktivität Ausdruck einer akuten Entzündungsreaktion mit stimulierender Wirkung auf das Immunsystem sein.

Im Vergleich der in drei Doktorarbeiten untersuchten Tumormarker p53, HPV und Telomerase ist keiner der einzelnen molekularen Marker in einer diagnostischen und prognostischen Aussage zuverlässig genug. Eine individuelle prognostische Aussage ist nur im Zusammenspiel mehrerer Marker möglich, konnte hier jedoch bei geringen Patientenanzahl nicht bewiesen werden. Unter Berücksichtigung der inhomogenen Patientenpopulation hinsichtlich der Tumordifferenzierung, der Tumorstadien und der Therapiemodalitäten müssen die Ergebnisse dieser Arbeit speziell für die Tumorkolonisationen im Kopf-Hals-Bereich die These stützen, dass der Nachweis der Telomeraseaktivität als alleiniger Parameter in allen drei Tumorgebieten weder einen zuverlässigen diagnostischen Marker für Plattenepithelkarzinomzellen noch einen zuverlässigen Marker für die individuelle Prognose der Tumorerkrankung darstellt.

Obwohl sich der TRAP-Assay für den Nachweis der Telomeraseaktivität in vielen Tumoren als gut erwiesen hat, scheint er für den Nachweis von Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich nicht ausreichend tumorspezifisch zu sein. Die vorgelegten Ergebnisse sind zu unterschiedlich und schwer zu interpretieren. Bei Untersuchungen mit Hilfe des TRAP-Assays kann nicht differenziert werden, ob die Telomeraseaktivität in benachbarten Geweben von Plattenepithelkarzinomen infiltrierenden Lymphozyten, präneoplastischen Läsionen im Sinne einer Feldkanzerisierung oder infiltrierenden Tumorzellen im Sinne einer minimal residual disease zuzuschreiben sind.

Die kontroversen Ergebnisse des Telomerasenachweises bei Kopf-Hals-Tumoren mit dem TRAP-Assay stellen die Zuverlässigkeit dieser Methode als Nachweisverfahren von Tumorzellen in dieser Lokalisation in Frage. Untersuchungen auf zellulärer Ebene mit In-situ-Untersuchungen müssen angeschlossen werden. Damit kann geklärt werden, ob der Telomerasenachweis in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches eine Unterscheidung zwischen Tumorzellen und beispielsweise lymphozytären Zellen zulässt und dieses „therapeutische Fenster“ für eine Anti-Telomerase-Therapie genutzt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

1. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S et al. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10114-10118
2. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (2002) Krebs in Deutschland. 3. erweiterte Ausgabe, Saarbrücken
3. Arndt O, Zeise K, Bauer J, Brock (1993) Zusammenhag zwischen der chronisch hyperplastischen Laryngitis und der Infektion mit humanen Papillomviren. *HNO* 41: 123-127
4. Autexier Ch (1999) Telomerase as a possible target for anticancer therapy. *Chem Biol* 6: R299-303
5. Bacchetti S, Counter CM (1995) Telomeres and telomerase in human cancer. *Int J Oncol* 7: 423-432
6. Berenblum I (1941) The mechanism of carcinogenesis. A study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomenon. *Cancer Res* 1: 807-814
7. Bezeluk A (2003) Bestimmung der Telomeraseaktivität in Basalzellkarzinomgeweben und in Basalzellkarzinom-freien Tumorrangeweiben des Kopf-Hals-Bereiches in der PCR unter dem Aspekt der prognostischen Aussagefähigkeit für das Rezidiv-Verhalten. Dissertation der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin. In Vorbereitung
8. Bier H (2002) Mutation respectively inactivation of the tumour suppressor p53 in head and neck cancer. *Cancer Res Clin Oncol* 128 (Suppl. 1), 25th german cancer congress, Springer: I 220, p 43
9. Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569-573
10. Blackburn EH (1992) Telomerases. *Annu Rev Biochem* 61: 113-129
11. Bodnar AG, Kim NW, Effros RB, Chiu CP (1996) Mechanism of telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res* 228: 58-64
12. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE et al. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279: 349-352
13. Böckmann B, Grill HJ, Giesing M (2001) Molecular characterization of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomol Eng* 17(3): 95-111
14. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO et al. (1995) Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 332(7): 429-435
15. Broccoli D, Young JW, de Lange T (1995) Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9082-9086
16. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA et al. (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3: 1271-1274

17. Califano J, Ahrendt SA, Meisinger G, Westra WH et al. (1996) Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res* 56: 5720-5722
18. Carey LA, Hedican CA, Henderson GS, Umbricht CB et al. (1998) Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers. *Clin Cancer Res* 4: 435-440
19. Chen Z, Smith KJ, Skelton HG, Barrett TL et al. (2001) Telomerase activity in Kaposi's sarcoma, squamous cell carcinoma, and basal cell carcinoma. *Exp Biol Med (Maywood)* 226: 753-757
20. Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H et al. (1995) A human telomeric protein. *Science* 270: 1663-1667
21. Collins K (2000) Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 12: 378-383
22. Cong YS, Bacchetti S (2000) Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *J Biol Chem* 275: 35665-35668
23. Corey DR (2002) Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials. *Oncogene* 21: 631-637
24. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG et al. (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* 11: 1921-1929
25. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B et al. (1995) Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85: 2315-2320
26. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB (1994) Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2900-2904
27. Curran AJ, Denis KS, Irish J, Gullane PJ et al. (1998) Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124: 784-788
28. Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S et al. (1999) Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 91: 37-45
29. Dahse R, Fiedler W, Ernst G (1997) Telomere and Telomerase. *Pathologe* 18: 425-429
30. de Carvalho MB, Sobrinho JA, Rapoport A, Fava AS et al. (1998) Head and neck squamous cell carcinoma in childhood. *Med Ped Oncol* 31: 96-99
31. de Lange T (1992) Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *Embo J* 11: 717-724
32. de Lange T (1994) Activation of telomerase in a human tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2882-2885
33. Deutsche Krebsgesellschaft (2000) Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts. Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien der Dt. Krebsgesellschaft/ Dt. Ges. f. HNO-Heilkunde/ Dt. Ges. f. MKG-Chirurgie 10: 1-24

34. Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK) (1999) 9. Projektbericht: 1-52
35. Dhaene K, Van Marck E, Parwaresch R (2000) Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. *Virchows Arch* 437: 1-16
36. Engelberg H (1999) Actions of heparin that may effect the malignant process. *Cancer* 85: 257-272
37. Fabricius EM, Bezeluk A, Kruse-Boitschenko U, Wildner G-P et al. (2003) Clinical significance of telomerase activity in basal cell carcinomas and in tumor-free surgical margins. *Arch Dermatol Res*. In press
38. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL et al. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* 269: 1236-1241
39. Fujimoto R, Kamata N, Yokoyama K, Ueda N et al. (2001) Expression of telomerase components in oral keratinocytes and squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 37: 132-140
40. Gath HJ, Brakenhoff RH (1999) Minimal residual disease in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18: 109-126
41. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M et al. (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92: 709-720
42. Greider CW (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65: 337-365
43. Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43: 405-413
44. Greider CW, Blackburn EH (1987) The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887-898
45. Gupta J, Han LP, Wang P, Gallie BL et al. (1996) Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* 88: 1152-1157
46. Hackett JA, Greider CW (2002) Balancing instability: dual roles for telomerase and and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 21: 619-626
47. Härle-Bachor C, Boukamp P (1996) Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6476-6481
48. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL et al. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-468
49. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 59-70
50. Harley CB (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256: 271-282
51. Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-460

-
52. Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W et al. (1997) A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275: 973-977
53. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exper Cell Res* 25: 585-621
54. Heine B, Hummel M, Demel G, Stein H (1998) Demonstration of constant upregulation of the telomerase RNA component in human gastric carcinomas using in situ hybridization. *J Pathol* 185: 139-144
55. Henderson YS, Breau RL, Liu TJ, Clayman GL (2000) Telomerase activity in head and neck tumors after introduction of wild-type p53, p21, p16, and E2F-1 genes by means of recombinant adenovirus. *Head Neck* 22: 347-354
56. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K et al. (1996) Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 88: 116-122
57. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y et al. (1995) Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1: 249-255
58. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW (2001) Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia* 3: 17-26
59. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K et al. (1995) Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 55: 3258-3262
60. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M et al. (1995) Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. *J Immunol* 155: 3711-3715
61. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M et al. (1995) Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87: 895-902
62. Hohaus S, Cavallo S, Bellacosa A, Genuardi M et al. (1996) Telomerase activity in human laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 2: 1895-1900
63. Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M et al. (2000) Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4(Suppl. 1): S 216-225
64. Hsiao R, Sharma HW, Ramakrishnan S, Keith E et al. (1997) Telomerase activity in normal human endothelial cells. *Anticancer Res* 17: 827-832
65. Hultdin M, Gronlund E, Norrback K, Eriksson-Lindstrom E et al. (1998) Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 26: 3651-3656
66. Ishikawa F (2000) Aging clock: the watchmaker's masterpiece. *Cell Mol Life Sci* 57: 698-704
67. Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M et al. (1998) Detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA in voided urine samples as a useful diagnostic tool for bladder cancer. *Clin Cancer Res* 4: 2807-2810
68. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M et al. (1999) Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21: 111-114

69. Jones AS, Phillips DE, Husband D (1995) Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 75: 1343-1353
70. Kagata HY, Tsukuda M, Mochimatsu I, Kubota A et al. (1998) Telomerase activity of tumors in the head and neck. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 101: 205-211
71. Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI (1999) Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transkriptase subunit. *J Biol Chem* 274: 13085-13090
72. Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B et al. (1997) Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6: 413-420
73. Keith WN, Evans TRJ, Glasspool RM (2001) Telomerase and cancer: time to move from promising target to a clinical reality. *J Pathol* 195: 404-414
74. Kim HR, Christensen R, Park NH, Sap P et al. (2001) Elevated expression of hTERT is associated with dysplastic cell transformation during human oral carcinogenesis in situ. *Clin Cancer Res* 7: 3079-3086
75. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB et al. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015
76. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK et al. (1998) Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84-88
77. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papilloma virus type 16. *Nature* 380: 79-82
78. Kojima H, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H et al. (1997) Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. *Gastroenterology* 112: 493-500
79. Koscielny S, Fiedler W, Dahse R, Beleites E (2000) Reaktivierung der Telomerase in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Laryngo-rhinootologie* 79: 551-556
80. Kowalski SR (2001) Nachweis von Papillomvirus-DNA in Kopf-Hals-Tumoren und Tumorrangebieten mit der PCR. Dissertation der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin. 1-94
81. Krupp G, Klapper W, Parwaresch R (2000) Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell Mol Life Sci* 57: 464-486
82. Kyo S, Kanaya T, Ishikawa H, Ueno H et al. (1996) Telomerase activity in gynecological tumors. *Clin Cancer Res* 2: 2023-2028
83. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W et al. (1999) Estrogen activates telomerase. *Cancer Res* 59: 5917-5921
84. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M (1997) Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 57: 610-614
85. Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold S-CJ et al. (1997) Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Hum Pathol* 28: 416-420

86. Lavelle F, Riou J-F, Laoui A, Mailliet P (2000) Telomerase: a therapeutic target for the third millenium? *Crit Rev Oncol Hemat* 34: 111-126
87. Leemans RC, Tiwara R, Nauta JJ, van der Waal I et al. (1994) Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 73: 187-190
88. Lehmann K (2000) Immunhistochemischer Nachweis von p53, mdm-2 und bcl-2 in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und der Vergleich ihrer Expression in Abhängigkeit von der Entfernung zum Tumorzentrum. Dissertation der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin. 1-85
89. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW et al. (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225: 951-960
90. Li H, Zhao LL, Funder JW, Liu JP (1997) Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 272: 16729-16732
91. Li H; Zhao LL, Yang Z, Funder JW et al. (1998) Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cell. *J Biol Chem* 273(50): 33436-33442
92. Li ZH, Salovaara R, Aaltonen LA, Shibata D (1996) Telomerase activity is commonly detected in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Am J Path* 148: 1075-1079
93. Liao J, Mitsuyasu T, Yamane K, Ohishi M (2000) Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. *Oral Oncol* 36: 347-352
94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
95. Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P et al. (1995) Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31B: 181-187
96. Mao L (1997) Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med Today* 3: 442-448
97. Mao L, El Naggat AK, Fan YH, Lee JS et al. (1996) Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 56: 5600-5604
98. Martens U und Lange W (2000) Telomerase-Hemmung. Ein neues therapeutisches Konzept in der Onkologie? *Arzneimitteltherapie* 18: 387-391
99. Matthes E, Lehmann Ch (1999) Telomerase protein rather than ist RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 27: 1152-1158
100. Matthes E, Lehmann Ch, Stulich M, Wu Y et al. (2003) RNA and protein adresssing oligonucleotides as inhibitors of human telomerase. In Vorbereitung
101. Matthews P, Jones CJ (2001) Clinical implications of telomerase detection. *Histopathology* 38: 485-498
102. McClintock B (1941) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26: 234-282
103. McKenzie KE, Umbricht CB, Sukumar S (1999) Applications of telomerase research in the fight against cancer. *Mol Med Today* 5: 114-122

104. Mehle C, Piatyszek MA, Ljungberg B, Shay JW et al. (1996) Telomerase activity in human renal cell carcinoma. *Oncogene* 13: 161-166
105. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dallianis T et al. (2000) Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 89: 300-304
106. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW et al. (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90: 785-795
107. Miyoshi Y, Tsukinoki K, Imaizumi T, Yamada Y et al. (1999) Telomerase activity in oral cancer. *Oral Oncol* 35: 283-289
108. Mohr C (1997) Bericht über die 27. Jahrestagung des Deutsch-Österreichisch-Schweizerischen Arbeitskreises für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich (DÖSAK). *Mund Kiefer Gesichtschir* 1: 125-126
109. Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59: 521-529
110. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M et al. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6622-6626
111. Müller HJ (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net-Woods Hole* 13: 181-198 (zitiert aus Blackburn und Szostak (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. *Ann Rev Biochem* 53: 163-194)
112. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
113. Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekapan S, Sriuranpong V et al. (1996) Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 3530-3533
114. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL et al. (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277: 955-959
115. Nakayama J, Saito M, Nakamura H, Matsuura A et al. (1997) TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88: 875-884
116. Norrback KF, Dahlenborg K, Carlsson R, Roos G (1996) Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88: 222-229
117. Nouse K, Urabe Y, Higashi T, Nakatsukasa H et al. (1996) Telomerase as a tool for the differential diagnosis of human hepatocellular carcinoma. *Cancer* 78: 232-236
118. Ogoshi M, Le T, Shay JW, Taylor RS (1998) In situ hybridization analysis of the expression of human telomerase RNA in normal and pathologic conditions of the skin. *J Invest Dermatol* 110: 47-53
119. Oh S, Song Y, Yim J, Kim TK (1999) The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *J Biol Chem* 274: 37473-37478

120. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki J, Toyama K et al. (1997) Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res* 57: 2100-2103
121. Oliver RJ, Dearing J, Hindle I (2000) Oral cancer in young adults: a report of three cases and review of the literature. *Br Dent J* 188: 362-365
122. Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41: 181-190
123. Pantel K, von Knebel Doeberitz M (2000) Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol* 12: 95-101
124. Parkinson EK, Newbold RF, Keith WN (1997) The genetic basis of human keratinocyte immortalisation in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation. *Eur J Cancer* 33: 727-734
125. Parris CN, Jezzard S, Silver A, MacKie R et al. (1999) Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer* 79: 47-53
126. Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R et al. (2000) Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res* 6: 2718-2725
127. Patel MM, Patel DD, Parekh LJ, Raval GN et al. (1999) Evaluation of telomerase activation in head and neck cancer. *Oral Oncol* 35: 510-515
128. Paz IB, Cook N, Odom-Maryan T, Xie Y et al. (1997) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An Association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 79: 595-604
129. Poremba C, Heine B, Diallo R, Heinecke A et al. (2002) Telomerase as a prognostic marker in breast cancer: high-throughput tissue microarray analysis of hTERT and hTR. *J Pathol* 198: 181-189
130. Ramirez RD, Wright WE, Shay JW, Taylor RS (1997) Telomerase activity concentrates in mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermat* 108: 113-117
131. Remmele W, Stegner HE (1987) Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammagewebe. *Pathologe* 8: 138-140
132. Rhyu MS (1995) Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 87: 884-894
133. Ries JC, Hassfurther E, Steininger H, Kloss FR et al. (2001) Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis. *Anticancer Res* 21: 1057-1064
134. Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C et al. (1999) Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 190: 157-167
135. Sachs L. *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden*. 7. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1991. 1-88

136. Sharma S, Raymond E, Soda H, Sun D et al. (1997) Preclinical and clinical strategies for development of telomerase and telomere inhibitors. *Ann Oncol* 8: 1063-1074
137. Shay JW (1998) Telomerase in cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer J Sci Am* 4 (Suppl. 1): S26-34
138. Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33: 787-791
139. Shay JW, Gazdar AF (1997) Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 50: 106-109
140. Shay JW, Wright WE (1996) Telomerase activity in human cancer. *Curr Opin Oncol* 8: 66-71
141. Shay JW, Wright WE, Werbin H (1991) Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochem Biophys Acta* 1072: 1-7
142. Silverman JS, Gorsky M, Lozada F (1984) Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53: 563-568
143. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953) "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6: 963-968
144. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S et al. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20: 1659-1668
145. Soder AI, Hoare SF, Muir S, Going JJ et al. (1997) Amplification, increased dosage and in situ expression of the telomerase RNA gene in human cancer. *Oncogene* 14: 1013-1021
146. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS et al. (1996) Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Res* 56: 218-222
147. Spitz MR (1994) Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 21: 281-288
148. Sumida T, Hamakawa H (2001) Telomerase and oral cancer (review). *Oral Oncol* 37: 333-340
149. Sumida T, Hamakawa H, Sogawa K, Bao Y et al. (1999) Telomerase activation and cell proliferation during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Mol Carcinog* 25: 164-168
150. Sumida T, Sogawa K, Hamakawa H, Sugita A et al. (1998) Detection of telomerase activity in oral lesions. *J Oral Pathol Med* 27: 111-115
151. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA et al. (2001) Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res* 7: 1523-1532
152. Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W et al. (1995) Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1: 1245-1251

-
153. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Chaffins M et al. (1996) Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. *J Invest Dermatol* 106: 759-765
154. Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA. Instructional Manual, Version 2, September 2001. Roche Molecular Biochemicals, 1-18
155. Telo TAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS. Instructional Manual, Version 2, September 2001. Roche Molecular Biochemicals, 1-28
156. Thongprasom K, Mutirangura A, Cheerat S (1998) Telomerase activity in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 27: 395-398
157. Thurnher D, Knerer B, Formanek M, Kornfehl J (1998) Non-radioactive semiquantitative testing for expression levels of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinomas may be indicative for biological tumour behaviour. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 118: 423-427
158. van der Toorn PP, Veltman JA, Bot FJ, de Jong JM et al. (2001) Mapping of resection margins of oral cancer for p53 overexpression and chromosome instability to detect residual (pre)malignant cells. *J Pathol* 193: 66-72
159. van Dongen GA, Brakenhoff RM, ten Brink CT, van Gog FB et al. (1996) Squamous cell carcinoma-associated antigens used in novel strategies for the detection and treatment of minimal residual head and neck cancer. *Anticancer Res* 16: 2409-2413
160. van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F et al. (2000) Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 6: 3803-3816
161. van Steensel B, de Lange T (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385: 740-743
162. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE et al. (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9857-9860
163. Verschuur HP, Irish JC, O'Sullivan B, Goh C et al. (1999) A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 109: 249-258
164. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippmann SM, Hong WK (1993) Head and neck cancer. *New Engl J of Med* 328: 184-194
165. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D et al. (1998) Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12: 1769-1774
166. Watson JD (1972) Origin of concatameric T7 DNA. *Nature New Biol* 239: 197-201
167. Woolgar JA (1996) Carcinoma of the tongue: pathological considerations in management of the neck. *J R Soc Med* 89: 611-615
168. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W et al. (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18: 173-179
169. Wright WE, Shay JW (1992) The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 27: 383-389

-
170. Wright WE, Shay J (1995) Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends Cell Biol* 5: 293-297
171. Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM, Virmani AK et al. (1997) Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. *J Clin Pathol* 50: 110-117
172. Yin L, Hubbard AK, Giardina C (2000) NF- κ B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *J Biol Chem* 275: 36671-36675
173. Zeiger MA, Smallridge RC, Clark DP, Liang CK et al. (1999) Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in FNA samples from thyroid neoplasms. *Surgery* 126: 1195-1198
174. zur-Hausen H (1999) Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 581-587

7 Abkürzungsverzeichnis

bp	base pairs
SA- β -gal	Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase
BCC	basal cell carcinoma
BSA	Bovines Serumalbumin
DIG	Digoxigenin
DNA	desoxyribonucleid acid
DÖSAK	Deutsch-Österreichisch-Schweizerischer Arbeitskreis für Tumoren im Kiefer- und Gesichtsbereich
EDTA	Ethylen diamin tetraacetic acid
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
G	Grading
HE	Hämalaun-Eosin
HNSCC	head neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
hTEP	human telomerase associated protein
hTERC	human telomerase RNA component
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
hTR	human telomerase RNA
IS	interner Standard
M	Mortalitätsstadium
mt-p53	mutiertes p53
mOD	Tausendstel der Optischen Dichte
ME	Median
MRD	minimal residual disease
mRNA	messenger RNA
P ₂₅	25. Perzentile
P ₇₅	75. Perzentile
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pRb	Protein des Retinoblastom-Gens
RNA	ribonucleid acid

RNAse	RNA-spezifische Nuklease
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s	Standardabweichung
S	Staging
SCC	squamous cell carcinoma
TA	Telomeraseaktivität
Taq-Polymerase	Polymerase aus dem Organismus <i>Thermus aquaticus</i> isoliert
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tmf	tumorfern
Tmr	Tumorrand
Tmz	Tumorzentrum
TRAP	telomeric repeat amplification protocol
TRF (1 und 2)	telomeric repeat binding factor (1 und 2)
TS	Telomerespiegel
UM	University of Michigan
wt-p53	Wildtyp-p53

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Telomeraseaktivität in prämaligen Läsionen des Kopf-Hals-Bereiches	14
Tabelle 2:	Telomeraseaktivität in wichtigen malignen Tumoren	16
Tabelle 3:	Telomeraseaktivität in Kopf-Hals-Tumoren	17
Tabelle 4:	Telomeraseaktivität in benachbarten Geweben von Kopf-Hals-Tumoren	18
Tabelle 5:	Nachweismöglichkeiten von Telomerase und Telomeren	21
Tabelle 6:	Zusammenstellung der drei Patientengruppen	24
Tabelle 7:	Tumorlokalisierung der 40 Tumorpatienten	25
Tabelle 8:	Charakterisierung der 20 Tumorpatienten der Gruppe I mit drei untersuchten Tumorgebieten	26
Tabelle 9:	Charakterisierung der 20 Tumorpatienten mit karzinomfreiem Tumorrangewebe (Gruppe II)	27
Tabelle 10:	Lokalisation der Gewebe von 40 tumorfreien Kontrollpatienten	28
Tabelle 11:	Charakterisierung der 40 Kontrollpatienten ohne Tumorerkrankung (Gruppe III)	29
Tabelle 12:	Herkunft der untersuchten Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen	31
Tabelle 13:	Kultivierung der Zelllinien	32
Tabelle 14:	Zusammensetzung der Reagenzien zur Proteinbestimmung nach Bio-Rad	33
Tabelle 15:	In der PCR eingesetztes Reaktionsvolumen von 50 µl	36
Tabelle 16:	Zusammenstellung der Temperaturen und des zeitlichen Ablaufes der PCR	36
Tabelle 17:	Für die Hybridisierung und den Nachweis im ELISA verwendete Reagenzien	38
Tabelle 18:	Zusammensetzung der mitgeführten Versuchskontrollen	39
Tabelle 19:	Zusätzlich benötigte Reagenzien bei der Verwendung des internen Standards	40
Tabelle 20:	Extinktionsgruppen zur Bewertung der Telomerasespiegel	42
Tabelle 21:	Extinktionswerte der tumorfreien Kontrollgewebe von 40 Patienten (Gruppe III)	43
Tabelle 22:	Extinktionswerte der drei Zelllinien bei verschiedenen Proteinmengen pro 50 µl PCR-Ansatz	44
Tabelle 23:	Extinktionswerte in den Tumorgeweben von 20 Patienten mit drei untersuchten Tumorgebieten (Gruppe I)	45
Tabelle 24:	Extinktionswerte in den karzinomfreien Tumorrangeweben von 20 Patienten (Gruppe II)	46
Tabelle 25:	Telomerasespiegel der Gewebe von 40 Tumorpatienten	47
Tabelle 26:	Extinktionen in ausgewählten telomerasenegativen Geweben untersucht auf eine Hemmung der Telomerase	49
Tabelle 27:	Statistischer Vergleich der Telomerasespiegel bzw. der Telomeraseaktivität in den Geweben zwischen Tumor- und Kontrollpatienten	51
Tabelle 28:	Prozentuale Verteilung der Rauch- und Trinkgewohnheiten der Patienten	52
Tabelle 29:	Nikotin- und Alkoholkonsum der Patienten	53
Tabelle 30:	Lokalisation der untersuchten Gewebe	54
Tabelle 31:	Verlauf der Tumorerkrankung und das therapeutische Vorgehen bei 20 Tumorpatienten mit drei untersuchten Gewebengebieten (Gruppe I)	56
Tabelle 32:	Verlauf der Tumorerkrankung und das therapeutische Vorgehen bei 20 Tumorpatienten mit dem untersuchten karzinomfreien Tumorrangewebe (Gruppe II)	56

Tabelle 33:	Statistischer Vergleich der Tumor- und Kontrollpatienten in ihrer Altersstruktur	57
Tabelle 34:	Korrigierte Residuen bei den Tumor- und Kontrollpatienten beim Nikotinkonsum	58
Tabelle 35:	Korrigierte Residuen bei den Tumor- und Kontrollpatienten beim Alkoholkonsum	59
Tabelle 36:	Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität bei den Tumorpatienten in Abhängigkeit vom Tumordifferenzierungsgrad	59
Tabelle 37:	Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität bei den Tumorpatienten in Abhängigkeit von der Stadieneinteilung	60
Tabelle 38:	Mittlere Dauer der rezidivfreien Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls bei 20 Tumorpatienten mit untersuchten Tumorzentren	61
Tabelle 39:	Mittlere Dauer der rezidivfreien Zeit bis zum Eintreten des ersten Krankheitsrückfalls bei den 33 Patienten mit karzinomfreien Tumorrangewebe	62
Tabelle 40:	Statistischer Vergleich der Telomeraseaktivität bei den Tumorpatienten mit dem Auftreten eines Krankheitsrückfalles	63
Tabelle 41:	Histopathologische Bewertung der 33 karzinomfreien Tumorrangewebe hinsichtlich einer lymphozytären Reaktion	75
Tabelle 42:	Histopathologische Bewertung der 20 tumorentfernten Gewebe hinsichtlich einer lymphozytären Reaktion	76
Tabelle 43:	Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und der lymphozytären Reaktion in den Tumor benachbarten Geweben	76
Tabelle 44:	Statistischer Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und den p53- bzw. HPV-Befunden in Tumorzentrum- und tumorfernen Geweben	80
Tabelle 45:	Telomerase-, HPV- und p53-Befunde im Tumorzentrum- und tumorfernen Geweben	81
Tabelle 46:	Telomeraseaktivität, HPV- und p53- Befunde in den Tumorzentren der drei ausgewählten Tumorpatienten 86, 148 und 679	82

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Chromosoms mit den Telomeren	8
Abbildung 2: Chromosomen in der Metaphase im Fluoreszenzmikroskop	8
Abbildung 3: Aufbau der Telomerase	9
Abbildung 4: Standardkurve zur Ermittlung der Proteinkonzentration	34
Abbildung 5: Nachweis der Telomeraseaktivität mit Hilfe des PCR-ELISA-Kits	35
Abbildung 6: Telomeraseaktivität in den Tumorgeweben von 20 Patienten mit drei untersuchten Tumorgebieten (Gruppe I)	44
Abbildung 7: Telomeraseaktivität in Geweben von 40 Patienten mit Plattenepithelkarzinom und in Kontrollgeweben von 40 Patienten ohne Tumor	47
Abbildung 8: Verteilung der Gewebe auf die Lokalisation	54
Abbildung 9: Altersverteilung der Patientengruppen getrennt nach Geschlecht	57
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve zur rezidivfreien Zeit für die Tumorpatienten in Abhängigkeit einer Telomeraseaktivität im Tumorzentrum	64
Abbildung 11: Kaplan-Meier-Kurve zur rezidivfreien Zeit für die Tumorpatienten in Abhängigkeit einer Telomeraseaktivität im Tumorrand	64
Abbildung 12: Telomeraseaktivität in der Zelllinie UM-SCC 14C und im Tumorzentrum von Patient 148 mit vergleichender Gel-Elektrophorese	65

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. mult. h. c. Jürgen Bier als Direktor der Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie der Charité Campus Virchow-Klinikum für die Überlassung dieser experimentellen Arbeit. Den Mitarbeitern der Klinik danke ich für die Bereitstellung der Gewebe der Tumorbank.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Eva-Maria Fabricius für die umfassende und einsatzbereite Betreuung bei der Erstellung der Arbeit.

Frau Ute Kruse-Boitschenko danke ich für die Hilfe bei der Erlernung der Methoden und bei der labortechnischen Arbeit.

Für die Überlassung der histopathologischen Befunde bin ich dem Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Charité zu Dank verbunden. Herrn Prof. Dr. Gustav-Paul Wildner (Robert-Rössle-Klinik, Universitätsklinikum Charité Campus Berlin-Buch) möchte ich für die Nachbefundungen aller in meiner Arbeit eingesetzten Kryostat-Gewebeproben danken.

Frau Dr. rer. nat. Ingeborg Kuchler (Institut für Medizinische Biometrie, Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin) danke ich für die fachliche Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Herrn PD Dr. Markus Müller und Frau Dr. Jana Sachsinger (Urologische Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin) danke ich für die Einsatzbereitschaft während der Einarbeitung in die Methode.

Herrn PD Dr. Eckart Matthes und Frau Christine Lehmann (Max-Delbrück-Centrum Berlin-Buch) gilt mein herzlicher Dank, da sie während der Arbeitsphase ständig für inhaltliche Fragen zur Verfügung standen. Ich danke ihnen für die Überlassung der Abbildung 12.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Emrich (Roche Molecular Biochemicals, Penzberg/Mannheim) für die Beantwortung methodischer Fragen, die bei dem experimentellen Teil meiner Arbeit auftraten.

Einen Dank möchte ich Frau PD Dr. Petra Boukamp (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) aussprechen, die zu aktuellen Problemen in der Telomeraseforschung bereitwillig Auskunft gab.

Zum Schluss danke ich den Lektoren für die fachlichen Anregungen, die mir bei der Niederschrift der Arbeit sehr geholfen haben.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Publikationen

Publikationen 2001 bis 2002

Fabricius E-M, **Gurr U**, Bezeluk A, Wildner G-P, Klein M (2002) What significance do telomerase levels have in tumour margin tissues from squamous cell carcinomas and basal cell carcinomas in the head-neck region? J Cancer Res Clin Oncol 128: S94

Fabricius E-M, **Gurr U**, Wildner G-P (2002) Telomerase activity levels in the surgical margin and tumour distant tissue of the squamous cell carcinoma of the head-and-neck. Anal Cell Pathol 24: 25-39

Fabricius E-M, **Gurr U**, Wildner G-P, Hell B, Langford A, Bier J (2001) Characterization of telomerase activity in squamous cell carcinomas of the head-neck region and in tumour margin samples. Virchows Arch 439: 244

Poster und Vorträge 2001 bis 2002

Fabricius E-M, Bezeluk A, **Gurr U**, Wildner G-P, Hell B, Menneking H, Langford A, Bier J (2001) Telomerase activity in basal cell carcinoma of the head-neck region and in tumour margin cells. 8th World Congress on Cancer of the Skin, Zurich: p44

Fabricius E-M, **Gurr U**, Bezeluk A, Wildner G-P, Klein M (2002) What significance do telomerase levels have in tumour margin tissues from squamous cell carcinomas and basal cell carcinomas in the head-neck region? Poster zum 25th German Cancer Congress, 10.-14. März 2002, Berlin: P*474, p 97

Fabricius E-M, **Gurr U**, Bezeluk A, Wildner G-P, Klein M (2002) Telomerase activity (TA) in head-and-neck tumours and carcinoma-free tumour margin tissues - a comparison between squamous cell carcinomas (HNSCC) and basal cell carcinomas (BCC). Poster zum XIIth EuroCellPath Course: Cancer as a disease of genes and gene regulation, 12.-15. Mai, Berlin: p34

Fabricius E-M, **Gurr U**, Wildner G-P, Hell B, Langford A, Bier J (2001) Nachweis der Telomeraseaktivität zur Charakterisierung von Tumorrandschnitten bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Vortrag zum 51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 14.-16. Juni, Marburg: p21

Fabricius E-M, **Gurr U**, Wildner G-P, Hell B, Langford A, Bier J (2001) Characterization of telomerase activity in squamous cell carcinomas of the head-neck region and in tumour margin samples. Vortrag und Poster zum 18th European Congress of Pathology, 8.-13. September, Berlin

Gurr U, Wildner G-P, Fabricius E-M (2001) Is proof of telomerase activity a suitable molecular marker for histopathological carcinoma-free margin tissues of squamous cell carcinomas of the head-neck region? Vortrag zur 12th European Students' Conference (ESC) at Charité, 21.- 25. November, Berlin: p68