Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Innere Medizin
I. Medizinische Klinik und Poliklinik
(Gastroenterologie mit Sektionen Infektiologie und Tropenmedizin)

Direktor Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Quantitative Bestimmung der relativen Telomeraseaktivität (RTA) in malignem Lebergewebe

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Philipp Schriefer
aus Winsen/Luhe

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 20.01.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. Petersen

Prüfungsausschuss, 2.Gutachter: PD Dr. Dr. J. Pollok

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. O. Stöltzing

Inhaltsverzeichnis

I. Arbeitshypothese und Fragestellung 6
II. Abbildungsverzeichnis 7
III. Tabellenverzeichnis 7
IV. Abkürzungsverzeichnis 8
1. Einleitung 9
1.1 Telomere und Telomerase 9
1.1.1 Geschichte der Telomere und der Telomerase 9
1.1.2 Struktur und Funktion der Telomere 9
1.1.3 Bedeutung intakter Telomere für den Organismus 10
1.1.4 Struktur und Funktion der Telomerase 11
1.1.5 Regulation der TA 12
1.1.6 TA in regulärem Gewebe 13
1.1.7 Telomeraseaktivierung in malignen Tumoren 14
1.1.8 Die Rolle der Telomerase bei der Immortalisierung von Zellen 14
1.1.9 TA in verschiedenen Tumorentitäten 16
1.1.10 Klinische Einsatzmöglichkeiten der Telomerbiologie 17
1.2 Möglichkeiten zur Messung der TA 18
1.2.1 Der TRAP-Assay 18
1.2.2 Modifikationen des TRAP-Assays 19
1.3 Das hepatozelluläre Karzinom 20
1.3.1 Epidemiologie 20
1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren 20
1.3.3 Diagnostik und Früherkennung 21
1.4 TA in Lebergewebe 21
2. Material und Methoden 23
2.1 Gewebe 23
2.2 Bestimmung der RNA-Integrität 23
2.2.1 Extraktion der RNA 23
2.2.2 RNA-Elektrophorese 23
2.2.2.1 Bestandteile der verwendeten Puffer 24
2.2.2.2 Zusammensetzung des Gels 24
2.3 Messung der TA 24
2.3.1 Herstellung des Gewebelysates 24

2.3.2 Quantifizierung des Proteingehalts 25
2.4 Messung der TA mittels tRQ-TRAP 25
2.4.1 Auswahl der Primer 26
2.4.2 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes 26
2.4.2.1 Probe 26
2.4.2.2 *Master Mix* 26
2.4.3 Die Standardreihe 26
2.4.4 Das tRQ-TRAP PCR-Protokoll 27
2.4.4.1 Auswertung der Messung 27
2.4.4.1.1 Berechnung der Standardkurve 27
2.4.4.1.2 Berechnung der relativen TA aus den Messwerten 29
2.5 Ausschluss von PCR-Inhibitoren 30
2.5.1 Auswahl der Proben 30
2.5.2 Inaktivierung der Telomerase 30
2.5.2.1 RNAse-Verdau 30
2.5.2.2 Hitze-Inaktivierung 30
2.5.3 Verdünnungsreihe der inaktivierten Proben 30
2.5.4 PCR-Kontrolle 31
2.6 Vergleich mit kommerziellem TRAP-Assay 31
2.7 Korrelation mit den histologischen Diagnosen 31
2.8 Statistische Auswertung 31
3. Ergebnisse 32
3.1 Gewebeproben 32
3.2 Optimierung der Messmethode 33
3.2.1 Gelanalyse der RNA-Qualität 34
3.2.2 Messung der TA mittels konventionellem TRAP-Assay (TRAPeze) 34
3.2.3 Ausschluss von Inhibitoren 36
3.3. Gemessene TA mit tRQ-TRAP 37
3.4 Statistische Auswertung 39
3.4.1 Verkleinerung der Kohorten nach Ausschluss nicht verwertbarer Proben 39
3.4.2 Deskriptive Statistik der Messwerte 39
3.4.3 Vergleichende Statistik 41
3.4.3.1 Benignes vs. malignes Lebergewebe 41
3.4.3.2 HCC vs. Kontrollen 42

3.4.3.3 Vergleichende Statistik der HCC-Untergruppen 43
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse 44
4. Diskussion 45
4.1 Diskussion des Ausgangsmaterials 45
4.2 Diskussion der Methodenoptimierung 46
4.3 Diskussion der gemessenen TA 47
4.4 Vergleich mit anderen Methoden zur TA-Quantifizierung in Gewebeproben 49
4.5 Resümee und Ausblick: Möglichkeit der klinischen Anwendung von tRQ-TRAP 51
5. Zusammenfassung 52
6. Literaturverzeichnis 53
7. Danksagungen 61
8. Lebenslauf 62
9. Eidesstattliche Versicherung 63
10. Anhang 64
10.1 Patienteneinwilligung in die Probenverwertung zu Forschungszwecken 64

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Proliferation sind ausreichend lange und stabile Telomere notwendig. Das Enzym Telomerase ist in der Lage, die durch Zellteilung bedingte Telomerverkürzung zu kompensieren.

Die Aktivität der Telomerase ist in den meisten somatischen Zellen herabreguliert und die Reaktivierung des Enzyms wird als wichtiger und früher Schritt in der Hepatokarzinogenese angesehen.

Telomeraseaktivität (TA) ist daher bereits vielfach als potentieller Biomarker für verschiede Tumoren benannt worden. Allerdings ist bislang kein Verfahren etabliert, um die Enzymaktivität zuverlässig und schnell aus Gewebeproben zu quantifizieren.

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) zeichnet sich durch eine häufig schlechte Prognose aus, die auch darauf zurückzuführen ist, dass aufgrund der oft diffizilen Diagnosestellung viele Patienten zu spät für eine potentiell kurative Therapie evaluiert werden können.

Mit einem zusätzlichen Marker könnte die Diagnostik bei Risikopatienten verbessert und das therapeutische Fenster vergrößert werden. Da die TA in regulärem Lebergewebe supprimiert ist, für das primäre Leberzellkarzinom aber stark erhöhte Enzymaktivitäten bereits in prämalignen Läsionen beschrieben sind, scheint sich eine quantitative Messung der TA als ein solcher diagnostischer Marker anzubieten.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur schnellen Quantifizierung der TA weiterentwickelt, so dass eine zuverlässige Messung aus Lebergewebeproben möglich ist.

Die Methode sollte praktikabel genug für einen Einsatz in der klinischen Diagnostik sein, um TA etwa aus Organbiopsien zu quantifizieren. Damit könnte ein zusätzlicher Parameter zur Diagnose bzw. zur Prognoseabschätzung des HCC etabliert werden.

Das Ausgangsverfahren für die Arbeit war das von Wege *et al*. entwickelte PCR-gestützte *real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol (RQ-TRAP)*.

Zentrale Fragen bei der Optimierung der Methode waren: (i) Ist das Verfahren sensitiv genug, um eine Messung auch aus kleinen Gewebemengen zu ermöglichen und so Biopsiematerial zu evaluieren? (ii) Welchen Einfluss haben PCR-Inhibitoren, die in aufbereiteten Gewebeproben zu vermuten sind? (iii) Welchen Einfluss hat die Integrität des Gewebes auf die Messergebnisse?

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des Telomers mit stabilisierenden Proteinen 10
Abbildung 2: Schema zur Funktion der Telomerase 12
Abbildung 3: Schema der Mortalitätsstadien durch Telomerverkürzung 15
Abbildung 4: Beispielhafte TRAP-Polyacrylamidgelanalyse 19
Abbildung 5: Amplifikationskurven der 293T-Standards 28
Abbildung 6: Standardkurve mit Geradengleichung und Standardfehler 29
Abbildung 7: Organigramm der Arbeitsschritte für tRQ-TRAP 33
Abbildung 8: FA-Gelanalyse der RNA-Qualität 34
Abbildung 9: PAGE-Analyse nach konventionellen TRAP-Assay der Proben 35
Abbildung 10: Ausschluss von PCR-Inhibitoren 36
Abbildung 11: Darstellung der gemessenen RTA Werte aller Proben 38
Abbildung 12: Darstellung der RTA-Werte nach Ausschluss zweier Proben 40
Abbildung 13: Vergleich der Gruppen im Bezug auf den *cut off*-Wert 41
Abbildung 14: RTA-Werte der HCC-Proben im Punktdiagramm 43

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TA in einigen wichtigen malignen Tumorentitäten 16
Tabelle 2: TA in Gewebe verschiedener Dignität 17
Tabelle 3: Neoplastische Proben mit histopathologischen Angaben 32
Tabelle 4: Histologische Angaben zu den Kontrollgeweben 32
Tabelle 5: Gemessene RTA-Werte und histologische Diagnosen 37
Tabelle 6: Gruppierung der Proben zur statistischen Evaluation 39
Tabelle 7 Vergleich der malignen und benignen Gewebeproben 41
Tabelle 8: U-Test zwischen den Gruppen „maligne“ und „benigne“ 42
Tabelle 9: Vergleich der HCC-Proben mit der Kontrollgruppe 42
Tabelle 10: U-Test zwischen HCC-Proben und Kontrollen 42
Tabelle 11: Beschreibende Statistik der HCC-Untergruppen 43
Tabelle 12: U-Test zwischen den Gruppen der G2- und der G3-Tumoren 44

IV. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AASLD	*American Association for the Study of Liver Diseases*
ALT	*alternative lengthening of telomeres* (alternative Telomerverlängerung)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ct	*cycle threshold* (Schwellenwert)
cDNA	komplementäre DNA
d/o	*drop-out*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASL	*European Association for the Study of the Liver*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
G	Guanin
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HPV	humanes Papillomavirus
hTERT	*human telomerase reverse transcriptase* (katalytische Untereinheit)
hTERC	*human telomerase RNA component* (RNA-Untereinheit)
kD	kilo Dalton
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonische Säure
n.a.	*no amplification*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RQ-TRAP	*real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol*
tRQ-TRAP	*tissue real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol*
RNA	Ribonukleinsäure
RTA	relative TA
SEM	*standard error of the mean*
T	Tyrosin
TA	Telomeraseaktivität
TGF	*tissue growth factor*
TRAP	*telomeric repeat amplification protocol* (Methode zur TA-Detektion)
TRF	*telomeric repeat binding factor* (telomerassoziiertes Protein)

1. Einleitung

1.1 Telomere und Telomerase

Als Telomere werden die Enden eukaryotischer Chromosomen bezeichnet, die im Rahmen voranschreitender Zellteilungen in somatischen Zellen stetig verkürzt werden. Das Enzym Telomerase kann diese Verkürzung durch Verlängerung der Telomersequenz noch während der Zellteilung kompensieren. Die dynamische Interaktion von Telomeren und Telomerase wird mit der Zellalterung, aber auch mit der Entstehung maligner Tumore in Verbindung gebracht.

1.1.1 Geschichte der Telomere und der Telomerase

Müller und McClintock erkannten die Bedeutung der Chromosomenenden für deren Stabilität und prägten den Begriff Telomer (griechisch: Endteil) (Blackburn 1984, McClintock 1941). 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 jeder Zellteilung (Pantel & von Knebel 2000). 1985 entdeckten Greider und Blackburn bei dem Einzeller *Tetrahymena* das Enzym Telomerase, welches die Telomere durch Anfügen von $(TTGGGG)_n$ verlängert und somit den teilungsbedingten Verlust dieser Sequenzen ausgleicht (Greider & Blackburn 1985). Die gleiche Arbeitsgruppe entdeckte wenig später auch die RNA-Untereinheit des Telomerase-Enzyms (Greider & Blackburn 1987).

Die Aktivität der Telomerase (TA) wurde 1994 erstmals in menschlichem Tumorgewebe eines Ovarialkarzinoms nachgewiesen (Counter *et al.* 1994). Die Entwicklung des *telomeric repeat amplification protocol* (TRAP) von Kim und Mitarbeitern (Kim *et al.* 1994) erlaubte schließlich die rasche Analyse großer Gewebeserien. Im Jahr 1995 wurde das erste Telomer-bindende Protein TRF1 (*telomeric repeat binding factor*) charakterisiert (Chong *et al.* 1995).

1.1.2 Struktur und Funktion der Telomere

Telomere sind spezielle Strukturen aus Heterochromatin und befinden sich an den Enden eukaryotischer Chromosomen. Sie bestehen aus einer 6 Basenpaare (bp) messenden, GT-reichen, hochrepetetiven Sequenz ohne transkriptive Aktivität. In humanen Zellen ist dies das Hexanukleotid 5‘-TTAGGG-3’. Die Telomere sind mit verschiedenen Proteinen assoziiert (Cerni 2000). Dabei erreichen sie eine Länge von etwa 2.000 bis 15.000 bp.

Die Telomere erfüllen verschiedene Aufgaben im Zellkern: Sie stabilisieren und schützen die Chromosomen, indem sie mit Hilfe der beiden Strukturproteine TRF1 und

TRF2 eine Schleifenformation bilden und so Fusionen und Rekombinationen innerhalb des Chromosoms verhindern. Außerdem verankern sie die Chromosomen im Nukleus der Zelle und begünstigen eine lineare DNA-Replikation während der Mitose (Cerni 2000).

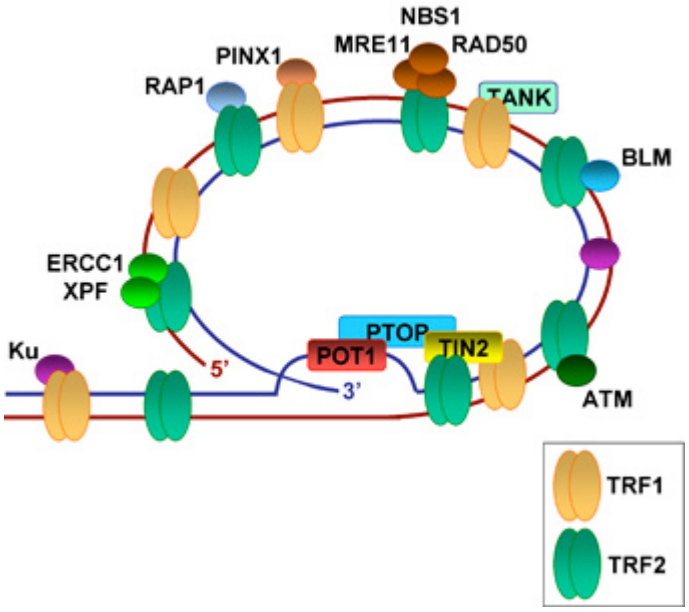


Abbildung 1: Struktur der Telomere mit stabilisierenden Proteinen. Zum Schutz des 3'-Endes wird eine Schleifenformation gebildet (Abbildung aus Wege & Brümmendorf 2008).

1.1.3 Bedeutung intakter Telomere für den Organismus

Die Telomere spielen eine wichtige Rolle bei der Zellalterung und als Proliferationskontrolle. Dies geschieht durch die replikationsassoziierte Telomerverkürzung. Da die konventionelle DNA-Polymerase einen Nukleotidstrang nur in 5'-3'-Richtung replizieren kann, entsteht bei jeder Zellteilung am Ende der Replikation eines neuen DNA-Stranges eine 50 bis 200 bp große Lücke mit einem Überhang des 3'-Stranges (Harley 1991). Durch dieses sogenannte Endreplikationsproblem (Levy *et al.* 1992) verkürzt sich die Telomer-DNA mit den fortschreitenden Zellteilungen, bis ab einer kritischen Länge von ca. 1.500 bis 4.000 bp die Telomere ihre Funktion nicht mehr wahrnehmen können. Die Zelle kann schließlich nicht mehr proliferieren und tritt in einen irreversiblen Proliferationsarrest mit erhaltenen Zellfunktionen ein, der als zelluläre Seneszenz bezeichnet wird (Greider 1996, Harley 1991).

Diese begrenzte zelluläre Proliferationskapazität wird nach ihrem Entdecker als *Hayflick-limit* bezeichnet.

Der Begriff der zellulären Seneszenz definiert also die limitierte proliferative Kapazität normaler Zellen *in vivo* und *in vitro* (Hayflick & Moorhead 1961). Harley und Mitarbeiter

bezeichneten daher die replikationsassoziierte Telomerverkürzung als mitotisches Uhrwerk *(mitotic clock*) (Harley *et al.* 1990), ein Begriff der in den 1990er Jahren von vielen Autoren aufgegriffen wurde (Iqbal 1998, Ishikawa 2000) und der impliziert, dass die Lebenszeit einer Zelle durch die Telomerlänge programmiert sei. Dieses Modell ist in den folgenden Jahren durch neuere Erkenntnisse über die multifaktoriell beeinflussbare Telomerase weitgehend relativiert worden (siehe unten), hat aber an seiner Anschaulichkeit nichts verloren.

Die zelluläre Seneszenz stellt nicht nur eine Begrenzung der Proliferationskapazität der Zelle dar, sondern auch einen Schutzmechanismus vor unkontrollierter Proliferation und möglicher Entartung.

Wie wichtig diese Kontrolle für eine normale Zellfunktion ist, zeigen Ergebnisse in Zellkulturen mit schadhaften Telomeren. Es kommt zu Chromosomenabberationen in Form von dizentrischen Chromosomen, zu Ligationen und schließlich zu Schäden auf DNA-Ebene (Cerni 2000).

In somatischen Zellen des Menschen sind die Telomere stets signifikant kürzer als in Keimbahnzellen und in 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*, zum Beispiel beim Vergleich hämatopoetischer Stammzellen fetaler und adulter Spender, beobachten (Vaziri *et al.* 1994). Junge Individuen weisen in den meisten Fällen längere Telomere auf als ältere, was durch Bestimmung der mittleren Telomerlänge in peripheren Blutzellen gezeigt werden konnte (Rufer *et al.* 1999). Bodnar und Mitarbeiter demonstrierten den kausalen Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und der Lebensdauer von Zellen *in vitro* (Bodnar *et al.* 1998).

1.1.4 Struktur und Funktion der Telomerase

Das Enzym Telomerase bezeichnet einen Ribonukleoproteinkomplex und ist mit einem Molekulargewicht von ca. 1.000 kD (kilo Dalton) ein relativ großes Molekül mit mindestens zwei essentiellen Untereinheiten, und zwar einer RNA-Untereinheit und einer katalytischen Domäne.

Die RNA-Komponente hTERC (*human telomerase RNA component*) dient der katalytischen Untereinheit als Matrize für die *de novo* Synthese von Telomersequenzen. Sie hat eine Länge von elf Basen und ist komplementär zum Telomerstrang aufgebaut, wodurch auch die Bindung am Chromosomenende möglich wird (Morin 1989).

Die katalytische Untereinheit der Telomerase hTERT (*human telomerase reverse transkriptase*) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und ermöglicht die Addition von Nukleotiden am 3'-Ende der chromosomalen DNA (Nakamura *et al.* 1997).
Die Aufgabe der Telomerase besteht darin, die Verkürzung der Telomere zu kompensieren, indem sie dessen hexamerische Sequenz synthetisiert und an das 3'-Ende des Telomers anhängt.
So ermöglicht das aktive Telomeraseenzym die Aufrechterhaltung ausreichend langer und funktioneller Telomere und damit eine erweiterte Proliferationsspanne sowie die Überwindung der zellulären Seneszenz. Die Aktivierung der meist herunterregulierten Telomerase wird als ein wichtiger Schritt bei der Entstehung vieler maligner Tumoren angesehen (Cerni 2000, Holt & Shay 1999, Klingelhutz 1999).

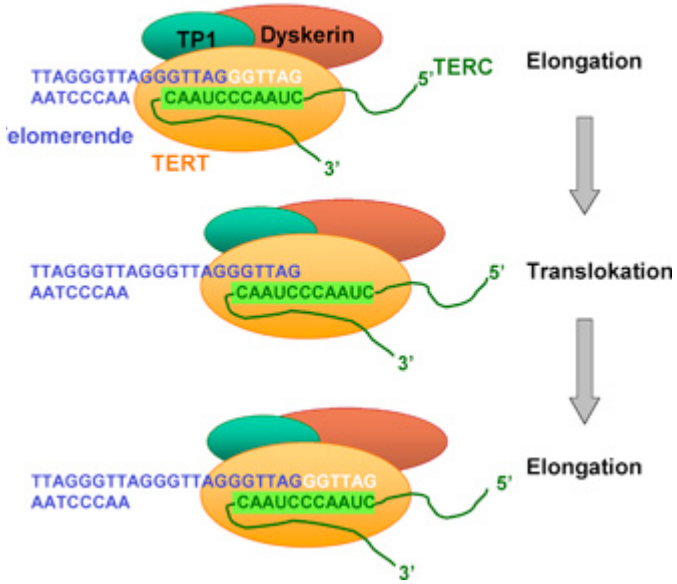


Abbildung 2: Funktion der Telomerase. Mittels der RNA-Untereinheit als Schablone kann die Telomersequenz in 3'-Richtung elongiert werden (Abbildung aus Wege & Brümmendorf 2008).

1.1.5 Regulation der TA

Telomerase ist ein reguliertes Enzym, die beteiligten Mechanismen sind bisher allerdings nur teilweise bekannt (Kyo *et al.* 2008). Dabei ist die hTERT-Untereinheit der limitierende Faktor der TA, da sich hTERC auch in Zellen ohne nachweisbare TA isolieren lässt, hTERT jedoch nur in solchen mit messbarer Enzymaktivität (Cerni 2000, Liu 2000).
Es werden experimentell diverse Mechanismen der Telomeraseaktivierung diskutiert.
In Studien zum Mammakarzinom zeigte sich, dass die TA durch Proteinphosphorylierung beeinflussbar ist. Sie wird durch Phosphatasen inhibiert (Li *et*

al. 1998), dagegen durch Proteinkinasen stimuliert (Kang *et al.* 1999). Die Telomeraseaktivierung ist außerdem durch Onkoproteine wie c-Myc (Cerni 2000) oder das E6-Protein des humanen Papillomavirus (HPV) möglich (Klingelhutz *et al.* 1996). Der Einfluss weiterer Onkoproteine wie *SV-40T-large* und *H-ras* (Hahn *et al.* 1999) auf die TA wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen. Yin *et al* zeigten darüber hinaus eine Aktivierung der hTERT-Expression durch den Transkriptionsfaktor NF-κB in murinen Hepatozyten *in vitro* (Yin *et al.* 2000). Überzeugende Daten sind bezüglich des Effektes von Östrogen auf die TA vorhanden. Das Hormon stimuliert die hTERT-Expression auf direktem und indirektem Weg (Kyo *et al.* 1999).

Die Repressionsmechanismen der Telomerase und des hTERT-Gens sind ebenfalls nur unzureichend bekannt. Dennoch sind bereits auch hier einige Abläufe isoliert beschrieben worden. Cuthbert *et al.* zeigten, dass durch das Einbringen des normalen humanen Chromosom 3 in Tumorzellen die TA unterdrückt wird, was einen Wachstumsarrest der Tumorzellen zur Folge hat (Cuthbert *et al.* 1999). Außerdem konnte das Wilms Tumor 1-Suppressor-Gen als direkter Repressor des hTERT-Gens identifiziert werden (Oh *et al.* 1999). Die Histon-Deacetylierung scheint in die Unterdrückung von hTERT involviert zu sein (Cong & Bacchetti 2000). Auch die Telomer–bindenden Proteine TRF-1 und TRF-2 und mit ihnen eine intakte Schleifenformation des Telomers wirken bei der Herabregulation der TA mit (Blackburn 2000, Smogorzewska *et al.* 2000, van Steensel & de Lange 1997).

Die obige Zusammenstellung repräsentativer Studienergebnisse impliziert, dass die Regulation der TA komplexen Mechanismen unterliegt, von denen bislang nur Teilstücke verstanden sind.

1.1.6 TA in regulärem Gewebe

Telomerase wird in der Embryonalzeit synthetisiert. Nach Abschluss der Organogenese ist die TA jedoch stark herunterreguliert (Kim *et al* 1994, Wright *et al.* 1996).

In Untersuchungen lässt sich aktive Telomerase in embryonalen Zellen, in keimbahnspezifischen Geweben, gelegentlich in Stammzellen und häufig in malignen Tumorzellen nachweisen. In den meisten normalen somatischen Zellen ist hTERT nicht exprimiert (Harley 1991, Schaetzlein & Rudolph 2005).

Ausnahmen bilden die basalen Kompartimente von Stammzellen hochregenerativer Gewebe, wie denen des Immunsystems, der Haut und des Intestinaltraktes. So ließ sich TA sowohl in Leukozyten von peripherem Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark nachweisen (Broccoli *et al.* 1995, Counter *et al.* 1995, Hiyama *et al.* 1995), als auch in stimulierten Lymphozyten (Bodnar *et al.* 1996), in den pluripotenten Basalzellen der

Epidermis (Härle-Bachor & Boukamp 1996) und im Epithel lichtexponierter normaler Haut (Taylor *et al.* 1996).
Hsiao *et al.* konnten zeigen, dass proliferierende Endothelzellen TA besitzen (Hsiao *et al.* 1997). In einer Studie am gesunden Endometrium fanden Kyo und Mitarbeiter die höchste TA in der späten Proliferationsphase, gefolgt von einem drastischen Abfall in der Sekretionsphase (Kyo *et al.* 1997). Eine weitere Untersuchung zu erhöhter TA in regenerativen Geweben gibt es an Haarfollikeln (Ramirez *et al.* 1997).
Auch in benignen Tumorgeweben lässt sich eine diskrete Telomeraseaktivierung nachweisen, so z.B. in Fibroadenomen der Mamma (Hiyama *et al.* 1996), in tubulären Adenomen des Gastrointestinaltraktes (Tahara *et al.* 1995a) und in benignen Prostataadenomen (Sommerfeld *et al.* 1996). Allerdings könnte eine nachweisbare TA in gutartigen Neubildungen auf eine bereits beginnende maligne Entartung im Sinne einer prämalignen Läsion hindeuten (Holt & Shay 1999).

1.1.7 Telomeraseaktivierung in malignen Tumoren

Für die maligne Transformation einer Zelle sind nach aktuellem Paradigma sechs Mechanismen notwendig (Hanahan & Weinberg 2000):
-Generierung selbststimulierender Wachstumssignale
-Unempfindlichkeit gegenüber inhibitorischen Wachstumssignalen
-Umgehung von Apoptosemechanismen
-unbegrenztes Wachstumspotential (Immortalisierung, i.d.R. durch TA)
-Fähigkeit zur Angiogenese
-Gewebeinvasion und Metastasierung
Die Reihenfolge dieser Ereignisse ist dabei bei den verschiedenen Tumorentitäten sehr unterschiedlich. Dabei geht die am meisten verbreitete Theorie davon aus, dass Telomeraseaktivierung ein wichtiger Faktor zur Aufrechterhaltung der Tumorprogression, jedoch nicht zur Initiierung eines Malignoms ist (Holt & Shay 1999, Satyanarayana *et al.* 2004).

1.1.8 Die Rolle der Telomerase bei der Immortalisierung von Zellen

Die Erlangung uneingeschränkter Teilungskapazität, die sogenannte Immortalisierung, gilt im Allgemeinen als ein wesentlicher Zwischenschritt bei der malignen Entartung einer Zelle (Hanahan & Weinberg 2000).
Ein Stufenmodell beschreibt, wie die Zellen durch Umgehung der zellulären Seneszenz die Immortalisierung erreichen können (Wright & Shay 1992). Durch die replikationsbedingte natürliche Telomerverkürzung in Zellen ohne suffiziente TA erreichen Zellen das Stadium der Seneszenz, auch M1 Stadium genannt (M für

mortality). Die sukzessive Reduktion der Telomere löst DNA-Schädigungssignale (*DNA damage response pathways*) aus. Durch Interaktionen zwischen Tumorsuppressorproteinen, vor allem p53 und pRb, wird der Zellzyklus in G1 angehalten (Wright & Shay 1995).

Bei fehlender Regulation durch pRb und p53, etwa durch onkovirale Infektion mit SV-40 oder HPV-16, wird dieser Mechanismus umgangen. Die Zelle kann durch weitere 20 bis 30 Zyklen gehen und erreicht das M2 Stadium (*crisis*), das durch verlangsamten Stoffwechsel und schließlich eintretenden Zelltod charakterisiert ist (Newbold 2002).

Die derzeit plausibelste Theorie hierzu postuliert, dass der M2 Kontrollpunkt 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 (Stewart & Weinberg 2000, Wright & Shay 1995).

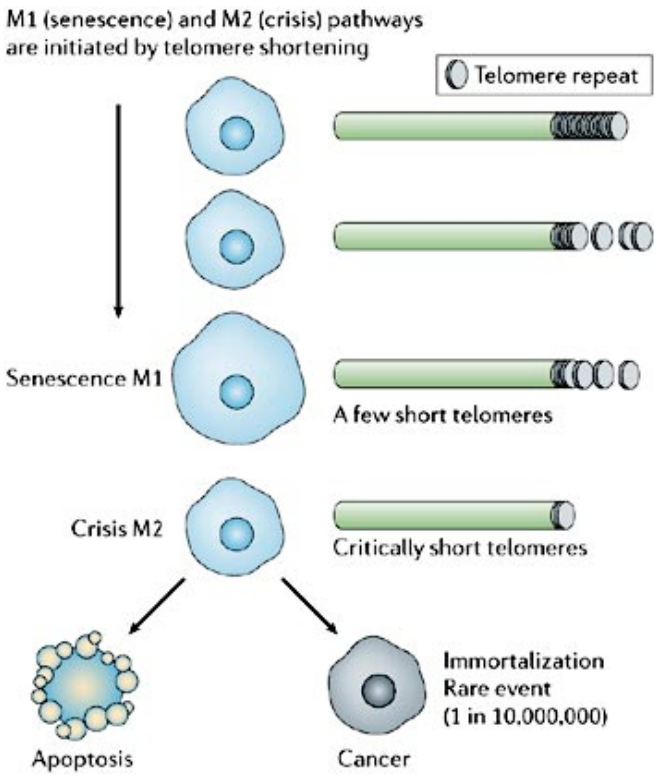


Abbildung 3: Erreichen des M1- und M2-Stadiums durch fortschreitende Telomerverkürzung. Eine Immortalisierung ist durch Reaktivierung von TA möglich. (aus Shay & Wright 2006).

Bei einer Reihe von Tumorspezies fanden sich kurze, aber teilungsunabhängige stabile Telomere.

Verschiedene experimentelle Studien haben gezeigt, dass auch normale Zellen durch Heraufregulierung von hTERT *in vitro* immortalisiert werden können (Wege *et al.*

2003c). Das ließ sich zunächst an Fibroblasten nachweisen, die nach Transfektion mit einem hTERT-Expressionsvektor verlängerte Telomere bei normalem Karyotyp aufwiesen (Bodnar *et al* 1998).

1.1.9 TA in verschiedenen Tumorentitäten

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

Die Entwicklung des TRAP-Assays durch Kim *et al.* ermöglichte erstmals breit angelegte Studien zur TA in Tumoren (Kim *et al* 1994). Dabei wurden Gewebeproben von zwölf verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Insgesamt konnte TA in 90 von 101 Biopsien (89%) von Malignomen, jedoch in keinen der untersuchten 50 normalen somatischen Gewebeproben nachgewiesen werden. Einigen Tumorspezies, vor allem Malignome mesenchymalen Ursprungs und die Astrozytome, zeigen keine signifikant erhöhte TA. Dort wird ein anderer, telomeraseunabhängiger Mechanismus für die Aufrechterhaltung der Telomerlänge verantwortlich gemacht, über dieses *alternative lengthening of telomeres* (ALT) ist allerdings bislang nur wenig bekannt (Stewart 2005).

Shay und Bachetti haben in einer Übersichtsarbeit eine Reihe von Tumoren mit nachweisbarer TA im Vergleich zu normalem Gewebe zusammengefasst (Shay & Bacchetti 1997). Während diskrete TA auch in normalen hochproliferativen Zellen nachweisbar war, zeigten sich signifikant höhere Werte bereits in gut differenzierten Malignomen.

Tumor	TA positive / untersuchte Proben	TA positive Proben in %
Bronchialkarzinom	113/140	81
Mammakarzinom	300/339	88
Prostatakarzinom	52/58	90
kolorektales Karzinom	123/138	89
hepatozelluläres Karzinom	149/173	86
Blasenkarzinom	172/185	93
Magenkarzinom	72/85	85
Zervixkarzinom	16/16	100
Pankreaskarzinom	49/51	96

Tabelle 1: TA in einigen wichtigen Tumorentitäten (modifiziert nach Shay & Bacchetti 1997).

In dieser Übersicht wurde darüber hinaus signifikant erhöhte TA in als prämaligne eingestuftem Gewebe sowie in tumorumgebendem Gewebe aufgezeigt. Letzteres führen Holt und Shay auf okkulte Mikrometastasierung zurück (Holt & Shay 1999).

Dignität	TA positive/untersuchte Proben	TA positive Proben in %
normal	1/196	0,5
präinvasiv (benigne)	125/410	30
maligne	1.734/2.031	85
tumor-umgebend	77/660	11

Tabelle 2: TA in Gewebe verschiedener Dignität nach Holt & Shay 1999).

Die verschiedenen Ergebnisse der untersuchten telomerasepositiven Tumoren lassen sich vermutlich auch auf deren unterschiedliche Stadien der Karzinogenese zurückführen. Für einige Tumoren wurde die Telomeraseaktivierung als früher Schritt in der Krebsentstehung identifiziert. Beispiele hierfür sind das kolorektale Karzinom, das HCC, Nierenzell- und Blasenkarzinome (Urquidi *et al.* 1998).

1.1.10 Klinische Einsatzmöglichkeiten der Telomerbiologie

Die Kenntnisse über die Rolle der Telomerase in der Zellbiologie führen zu verschiedenen Ansätzen, ihre messbare Aktivität sowohl diagnostisch als Proliferations- und Tumormarker einzusetzen (Hiyama *et al.* 2001), als auch das Enzym therapeutisch anzugehen. Mögliche Anwendungsgebiete der kontrollierten Telomeraseaktivierung wären Verbesserungen der Geweberegeneration, etwa bei Patienten mit Leberzirrhose (Wege *et al* 2003c) und HIV-Patienten (Lichterfeld *et al.* 2008), sowie der Telomerasesuppression als Krebstherapeutikum (Siddiqa *et al.* 2006, Urquidi *et al* 1998).

Das diagnostische Potential einer TA-Quantifizierung als Tumormarker wurde bereits in vielen Publikationen diskutiert (Hiyama & Hiyama 2003, Holt & Shay 1999, Kyo *et al.* 2000), wobei eine Bestimmung aus tumorverdächtigem Gewebe erfolgen muss. Im peripheren Blut wäre erhöhte TA nicht repräsentativ für Tumoren (Urquidi *et al* 1998).

Dabei könnte hohe TA als Biomarker hinsichtlich der Aggressivität des Wachstums für einige Tumoren bei bereits feststehender Diagnose dienen, zum Beispiel bei Magen- und Mammakarzinomen.

Ein Monitoring eines Therapieerfolges und Rezidivrisikobewertung nach Resektion sind weitere potentielle Ansätze, TA im klinischen Kontext zu bewerten.

Trotz großer Fortschritte in der Messung der TA und stark verbesserter Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, konnte bislang kein Verfahren ausreichend quantitative und vergleichbare Ergebnisse liefern, um Einsatz in der klinischen Diagnostik zu finden.

1.2 Möglichkeiten zur Messung der TA

Bevor sich in den 1990er Jahren TRAP etablieren konnte, wurde TA indirekt durch die Messung der Änderung der durchschnittlichen Telomerlänge mittels Immunoblot nach Southern bestimmt. Mit der Einführung des durch Kim *et al.* (Kim *et al* 1994) entwickelten Protokolls (TRAP) war erstmal eine reproduzierbare Messung der TA möglich.

Modernere Nachweismethoden der Telomerase sind Weiterentwicklungen des TRAP-Assays und umfassen aber auch die Untersuchungen der Genexpression von hTERT anhand von *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie (Bettendorf *et al.* 2003, Hiyama *et al* 2001).

1.2.1 Der TRAP-Assay

TRAP stellt das Standardverfahren zur Messung von TA in Zellen dar. Bei diesem auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhenden Protokoll wird ein Telomerprimer mit einem Zelllysat inkubiert. Die Telomerase der entsprechenden Zellen elongiert nun den Primer um die 6 bp langen Telomersequenzen. Je höher die Aktivität der Telomerase ist, desto mehr Sequenzen werden während der Inkubationsphase an das 3‘-Ende des Primers angehängt. Nach Hitzedenaturierung des Enzyms wird ein reverser Amplifikationsprimer hinzugefügt, um die Telomersequenzen mittels der Taq-Polymerase zu amplifizieren.

In der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) lässt sich die Enzymaktivität dann indirekt nachweisen, indem die entstandenen Telomersequenzen als typische Hexamerleiter zur Darstellung kommen (siehe Abbildung 4).

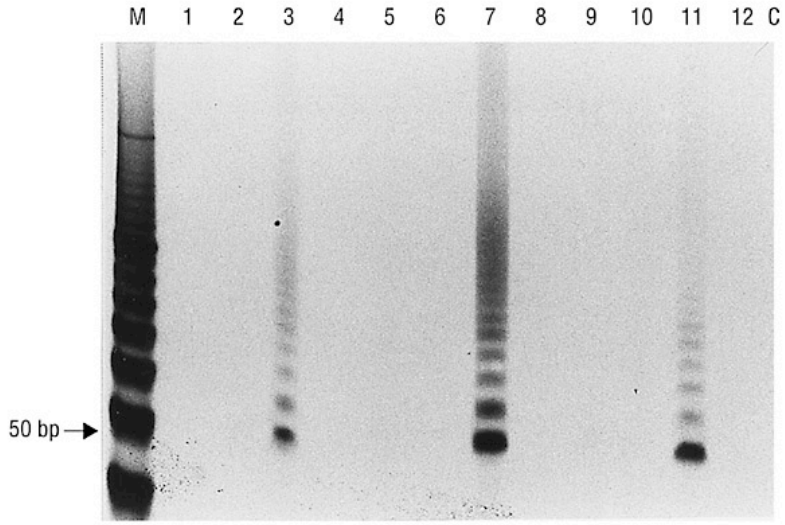


Abbildung 4: TRAP-Polyacrylamidgelanalyse. Der Marker am linken Rand besteht aus Nukleotidsequenzen, die sich um jeweils eine hinzugefügte Telomersequenz unterscheiden. Je mehr entsprechende Banden in einer Probe zu finden sind, desto höher ist die TA dieser Probe (Abbildung aus Curran *et al.* 1998).

1.2.2 Modifikationen des TRAP-Assays

Um die Reproduzierbarkeit (Reliabilität) und die Sensitivität zu verbessern, wurde das Originalprotokoll bereits vielfach modifiziert. Während im Originalprotokoll radioaktiv markierte Nukleotide für eine Gelelektrophorese als Detektionsverfahren verwendet werden, sind verschiedene nichtradioaktive Nachweisvarianten der Amplifikationsprodukte in Gebrauch, wie z.B. der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) und der Einsatz von Fluorochromen (Uehara *et al.* 1999, Wege *et al.* 2003b). Kim und Wu verbesserten die Spezifität und Sensitivität des Assays durch eine Weiterentwicklung der Telomerprimer (Kim & Wu 1997).

Die Notwendigkeit einer post-PCR-Analyse und die damit verbundene Gefahr von Kontaminationen am Arbeitsplatz durch Amplifikationsprodukte (sog. *carry-over contamination*) wurden durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen und der *real-time* PCR umgangen (Hou *et al.* 2001, Jakupciak *et al.* 2005).

Um die klinische Anwendbarkeit voranzutreiben, haben Jakupciak *et al*. eine *high throughput* Methode beschrieben, mit der die TA auch in großen Kohorten von Zellkulturen und Körperflüssigkeiten messbar ist (Jakupciak *et al.* 2004).

Wege *et al.* stellten 2002 einen quantitativen *real-time* TRAP-Assay (RQ-TRAP) mit signifikant verbesserter Sensitivität und Linearität vor (Wege *et al* 2003b).

1.3 Das hepatozelluläre Karzinom

Das HCC macht 90% aller primären Leberkarzinome aus. Häufig geht der Tumor aus einer vorbestehenden Leberzirrhose hervor. Eine Verschlechterung des klinischen Zustandes eines Zirrhosepatienten, ein Druckschmerz im rechten Oberbauch und paraneoplastische Symptome wie Fieber oder Polyglobulie sind wichtige Anzeichen, die an ein primäres Leberzellkarzinom denken lassen müssen (Denzer *et al.* 2006).

Partielle Hepatektomie und Lebertransplantation sind bei rechtzeitiger Diagnosestellung aktuell die einzigen kurativen Therapiemöglichkeiten. Lokal-ablative Verfahren und Chemoembolisation können den Krankheitsprogress verlangsamen. Inhibitoren endothelialer Wachstumsfaktoren wie Sorafinib zeigen in neueren Studien verbesserte Überlebensraten auch bei fortgeschrittenen Tumoren. Durch das aggressive Wachstum und die oft frühe Metastasierung ist die Prognose des Tumors jedoch äußerst schlecht.

1.3.1 Epidemiologie

Das HCC ist mit jährlich mehr als 500.000 Neuerkrankungen, davon etwa 50.000 in Europa, das fünfthäufigste Malignom und macht etwa sechs Prozent aller Krebserkrankungen aus (Bosch *et al.* 2004).

Das Auftreten des Tumors unterliegt erheblichen geographischen Schwankungen. In den Drittweltländern Afrikas und Südostasiens tritt er etwa zwei- bis dreimal häufiger auf als in Europa und das Erkrankungsalter liegt unter 40 Jahren. Jedoch ist in den westlichen Industrieländern in den letzten Jahrzehnten ein Anstieg der Neuerkrankungsrate zu beobachten, wobei die Patienten hier bei Erkrankungsbeginn in der Regel älter als 40 Jahre sind (Bruix *et al.* 2001).

Die Inzidenz in Europa wird dabei mit 5,8 bis 9,8 pro 100.000 Einwohner angegeben mit einem Überwiegen der Männer im Verhältnis 3:1 (Ferlay *et al.* 2009).

Die extrem hohe Letalität mit 5-Jahres-Überlebensraten von nur 6,5 Prozent ergibt sich aus dem raschen, aggressiven Wachstumsverhalten des Tumors und einer Diagnose häufig erst im fortgeschrittenen Stadium. Die meisten Patienten überleben nach Diagnosestellung weniger als ein Jahr.

1.3.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Risikofaktoren für das HCC sind gut definiert. Insgesamt geht das Karzinom in etwa 80 bis 90% der Fälle aus einer Leberzirrhose hervor. Besonders die Hämochromatose, die aktiven Virushepatitiden Typ B und C und hoher Alkoholkonsum weisen ein erhöhtes Risiko für die HCC-Entstehung auf. Eine chronische Exposition gegenüber Aflatoxinen hat darüber hinaus durch Schädigung des p53-Gens besonders

in Kombination mit einer Hepatitis B einen synergistischen Effekt auf die Karzinomentstehung (Pineau *et al.* 2008).
Dieser Synergismus wird als Grund dafür angesehen, dass in weiten Teilen Afrikas und Asiens das HCC in den meisten Fällen ohne vorbestehende Zirrhose auftritt, da in diesen Teilen der Erde eine häufige Konstellation von perinatal oder frühkindlich erworbener Hepatitis B und chronischem Verzehr von Aflatoxinen aus kontaminierten Lebensmitteln in der Bevölkerung vorliegt (Bruix *et al* 2001).
Die Zunahme der Inzidenz des Tumors in den letzten Jahrzehnten in westlichen Ländern lässt sich durch die gestiegenen Überlebensraten bei Patienten mit Leberzirrhose und die effektivere Behandlung ihrer Komplikationen sowie auf die zunehmende Ausbreitung der Hepatitis C zurückführen (Fattovich *et al.* 2004).

1.3.3 Diagnostik und Früherkennung

Eine Früherkennung des Tumors ist oft nur durch engmaschige klinische und diagnostische Überwachung von Risikopatienten möglich. Eine plötzliche Verschlechterung des klinischen Zustandes sowie ein Anstieg des Alpha-Fetoproteins und ein suspekter Leberrundherd in bildgebenden Verfahren, die so genannten nicht-invasiven diagnostischen Kriterien der *European Association for the Study of the Liver* (EASL) (Bruix *et al* 2001), sind wichtige Hinweise auf ein Karzinom. Die *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) führt in etwa die gleichen Kriterien in ihren Leitlinien auf (Bruix & Sherman 2005).
Eine Feinnadelbiopsie des Organs ermöglicht häufig eine definitive histopathologische Diagnose sowie ein Grading des HCC. Besonders im Frühstadium ist ein eindeutiges histologisches Erkennen des HCC jedoch oft nicht möglich. Das zirrhotische Zellbild und die Ähnlichkeit der Tumorzellen mit nur geringgradig dysplastischen Hepatozyten bei gut differenzierten Malignomen stellt auch erfahrene Pathologen vor Probleme (Denzer *et al* 2006).
Hier könnten gewebediagnostische Verfahren zusätzliche Informationen über tumorbiologische Eigenschaften eines Biopsates geben und so zur besseren Einschätzung von Prognose und Therapieoptionen beitragen.

1.4 TA in Lebergewebe

Intaktes Lebergewebe weist unter normalen Bedingungen keine detektierbare TA auf (Wege *et al.* 2003a) wobei das HCC als telomerasepositiv gilt (s.o.).
Verschiedene Studien zu TA in Lebergewebe zeigten positive Ergebnisse in einem Teil der Gewebeproben oder TA, die messbar, aber deutlich niedriger war als in malignen Leberveränderungen (Hytiroglou *et al.* 1998, Tahara *et al.* 1995b). Mögliche

Erklärungen hierfür sind zum einen regenerative Vorgänge im Lebergewebe. Wege *et al* wiesen an einem Tiermodel, mit Telomerbiologie vergleichbar zum Menschen, Telomeraseaktivierung nach partieller Hepatektomie nach (Wege *et al.* 2007).

Bei entzündlichen Veränderungen der Leber findet eine Infiltration des Gewebes mit Lymphozyten statt. Diese weisen TA auf und können zu positiven Messergebnissen führen (Kojima *et al.* 1997, Nakashio *et al.* 1997). Bei Exzisionen oder Biopsien aus tumorumgebendem Lebergewebe spielt möglicherweise Mikrometastasierung eine Rolle für die schwach positive TA.

Signifikant erhöhte TA ist bereits in geringgradig dysplatischen Proben und sogenannten prämalignen Läsionen (Hytiroglou *et al* 1998) nachgewiesen worden und zwar auch bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen ohne Hinweise auf ein Karzinom. Bei einem Teil der Patienten entwickelte sich im weiteren Verlauf ein HCC, was darauf schließen lässt, dass die Reaktivierung des Enzyms ein früher Schritt in der Entstehung maligner Lebertumoren ist (Hytiroglou *et al* 1998). Die einzelnen Schritte der multifaktoriellen Hepatokarzinogenese sind bislang nur teilweise entschlüsselt.

Die histopathologisch häufig schwierige Diagnose eines frühen, gut differenzierten HCC besonders in kleinen Läsionen (Nakashio *et al* 1997, Takaishi *et al.* 2000) könnte durch den Einsatz von Biomarkern erleichtert werden. Thorgeirsson *et al* haben dazu beispielhaft als möglichen Ansatzpunkt die funktionelle genetische Analyse des TGFß1-Signalweges proklamiert (Thorgeirsson *et al.* 1998). Auch die Quantifizierung von TA in karzinomverdächtigen Lebergewebeproben könnte die Diagnosefindung erleichtern.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebe

Bei den verwendeten Proben handelte es sich um humanes Lebergewebe, das uns die Gewebebank der Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Viszerale Transplantation im Universitätsklinkum Hamburg Eppendorf (UKE) unter Leitung von Prof. Dr. X. Rogiers zur Verfügung stellte.

Alle Patienten haben die allgemeine „Patienteninformation zur Einwilligung in die Verwendung von Probenresten (die zu Behandlungszwecken entnommen wurden) zu wissenschaftlichen Forschungszwecken“ des UKE unterzeichnet.

Die Proben sind in den Jahren von 1994 bis 2001 intraoperativ gewonnen worden. Die histologischen Diagnosen wurden im Institut für Pathologie am UKE Hamburg unter Direktion von Prof. Dr. U. Helmchen gestellt. Das Gewebe wurde bei -160°C gelagert.

2.2 Bestimmung der RNA-Integrität

Um die Intaktheit der Gewebeproben zu überprüfen, wurde die Qualität der RNA per Gel-Elektrophorese bestimmt.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter streng RNAse-freien Bedingungen durchgeführt.

2.2.1 Extraktion der RNA

Um die RNA aus den Gewebeproben zu extrahieren,wurde das *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwandt. Die Säulenextraktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Jeweils ein Gewebestück von etwa 20 µg wurde dazu in 600 µl einer Pufferlösung homogenisiert. Das so gewonnene Lysat wurde in mehreren Arbeitsschritten bei 8.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und dann mit den Pufferlösungen des *RNeasy Mini Kit* die reine RNA ausgewaschen.

Die aufgereinigte RNA ist dabei schließlich in einem 50 µl Aliquot enthalten, das bei -80°C aufbewahrt wurde.

2.2.2 RNA-Elektrophorese

Um die Integrität der RNA zu verifizieren, wurden die gewonnenen RNA-Extrakte mittels Formaldehyd-Agarosegel-Elektrophorese (FA-Gel) aufgetrennt.

Als Referenzmarker für die Proben wurde die 0,24 – 9,5 kb RNA-Markerleiter der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) verwendet.

Die Elektrophorese lief bei einer Spannung von 60 V für eine Stunde. Das FA-Gel war dabei in der Elektrophoresekammer von 1x FA-Laufpuffer bedeckt.

Die RNA-Extrakte wurden jeweils in einem Volumen entsprechend 1 µg RNA eingesetzt. Dazu wurde jeder Probe 5x Ladepuffer im Verhältnis 1:5 hinzugefügt.

2.2.2.1 Bestandteile der verwendeten Puffer

10x FA-Gel-Puffer

200 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonische Säure (MOPS)

50 mM Natrium-Acetat

10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

5x Ladepuffer

16 µl gesättigte wässrige Bromphenol Blau-Lösung

80 µl 500 mM EDTA; pH 8,0

720 µl 37% (12,3 M) Formaldehyd

2 ml 100% Glycerol

3084 µl Formamid

4 ml 10x FA-Gel-Puffer

100 µl RNAse-freies Wasser

1x FA-Laufpuffer

100 ml 10x FA-Gel-Puffer

20 ml 37% (12,3 M) Formaldehyd

880 ml RNAse-freies Wasser

2.2.2.2 Zusammensetzung des Gels

Das FA-Gel setzte sich wie folgt zusammen:

1,2 g Agarose

10 ml 10x FA-Puffer

100 ml RNAse freies Wasser

Nach dem Erhitzen dieser Mischung bei 65°C, wurden 1,8 ml 37%iges (12,3 M) Formaldehyd und 1 µl einer wässrigen10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung hinzugefügt.

2.3 Messung der TA

2.3.1 Herstellung des Gewebelysates

Hierzu wurde ein für Telomerase-Assays spezifischer Lysepuffer (*TRAPeze 1xCHAPS Lysis Buffer)* der Firma Chemicon (Temecula, CA, USA) mit dem RNAse-Inhibitor *RNAse OUT* von Invitrogen behandelt.

Es wurde ein 20 bis 50 µg großes Stück aus jeder Gewebeprobe unter sterilen Kautelen isoliert und in 500 µl Lysepuffer homogenisiert.

Das so gewonnene Lysat wurde für 30 min mit dem Puffer inkubiert, dann der Überstand abzentrifugiert. 100 µl Portionen wurden aliquotiert und bei –80°C gelagert.

2.3.2 Quantifizierung des Proteingehalts

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der TRAP-Lysate wurde das *Compat-Able Protein Assay Kit* der Firma Pierce (Rockford, IL, USA) verwandt, dessen Prinzip auf einer Isolation und photometrischen Quantifizierung des vorhandenen Proteins beruht.

Die Lysate wurden hierzu im Verhältnis 1:10 verdünnt, da sich der optimale Detektionsbereich der Methode in diesem Verhältnis am besten erreichen ließ.

Zudem wurden neun Standards aus bovinem Serumalbumin (BSA) in definierten Konzentrationen angefertigt.

Es wurden dreifache Ansätze gemessen.

Da der verwendete Lyse-Puffer Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA) enthält, was zu einer Inhibition der enzymatischen Messmethode führt, wurden die Proben und Standards vor der eigentlichen Quantifizierung mit dem *BCA Protein Assay Kit No. 23215* der Firma Pierce behandelt, um das reine Protein aus der Probe zu isolieren.

Das ausgefällte Protein wurde mit dem BCA-Arbeitsreagenz auf einer Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Mit dem *KC4 Elx808 Plate Reader* von Biotek (Winooski, VT, USA) wurden die Absorptionswerte der Proben bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch gemessen.

2.4 Messung der TA mittels tRQ-TRAP

Zur Messung der TA aus Lebergewebeproben wurde der von Wege *et al* etablierte RQ-TRAP-Assay abgewandelt. Das Messverfahren des optimierten tRQ-TRAP (tissue *real-time quantitative* TRAP) basiert ebenfalls auf einer quantitativen *real-time*-PCR. Es wurde das System ABI 7000 der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) eingesetzt.

Dabei kam das DNA-abhängige Fluorochrom SYBR Green I zum Einsatz, als passive Referenz diente das Fluorochrom ROX. Die Fluoreszenz des SYBR-Green I wird nach Einbindung in die *de novo* synthetisierte doppelsträngige DNA, das sind in diesem Fall die Telomersequenzen, nach jedem PCR Zyklus vom System gemessen. Dabei korreliert die emittierte Fluoreszenz mit der Menge der neu synthetisierten DNA nach jedem PCR Zyklus.

2.4.1 Auswahl der Primer

Als Primer wurden die von Kim und Wu entwickelten Telomerprimer TS und ACX gewählt. Diese sind aufgrund ihrer Strukturen weniger anfällig für die Formation von Primerdimeren sowie für Produktverkürzungen während der Amplifikationsphase (Kim & Wu 1997).

Der vorwärtsgerichtete Primer TS (5‘-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3‘) ist komplementär zur Telomersequenz und dient der Initiierung der Telomerasereaktion. Das Enzym kann während der Inkubationsphase hier die hexamerische Struktur (5`TTAGGG-3’) an den Primer TS synthetisieren.

Der rückwärtsgerichtete Amplifikationsprimer ACX weist neben einem komplemetären Abschnitt am 5‘-Ende eine 6 bp lange Ankerstruktur auf, die weder der Telomerstruktur entspricht, noch ihr komplementär ist (5‘-GCGCGG[CTTACC]$_3$CTAACC-3‘). Dadurch wird während der Amplifikationsphase der PCR eine Verkürzung der Telomeraseprodukte verhindert.

2.4.2 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Das Reaktionsvolumen betrug 40 µl, das sich aus 5 µl Standard oder Probe und 35 µl *Master Mix* zusammensetzte.

2.4.2.1 Probe

Für den 5 µl Ansatz jeder Probe wurden 0,02 µg Protein eingesetzt. Mit dieser Konzentration konnten in einem vergleichbaren Tiermodell valide und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden (Wege *et al* 2007).

2.4.2.2 *Master Mix*

Der *Master Mix* setzte sich wie folgt zusammen:

20 µl SYBR-Green PCR *Master Mix* (Applied Biosystems)

2 µl Primer Mix, mit 40 µg TS und 20 µg ACX

13 µl PCR-reines Wasser

2.4.3 Die Standardreihe

Bei jedem tRQ-TRAP-Lauf wurde eine Standardreihe aus 293T Zellen gemessen. Diese Zelllinie ist Telomerase-positiv (Counter *et al.* 1998) und stellt für die Bestimmung der relativen TA (RTA) die Referenz dar.

Die Konzentrationen der eingesetzten 293T-Stadards wurden so gewählt, dass eine spätere Berechnung der Standardkurve aus dem logarithmischen Format der Amplifikationskurven möglichst übersichtlich ist:

A: TRAP-Extrakt aus 1000 Zellen in 5 µl

B: TRAP-Extrakt aus 500 Zellen in 5 µl

C: TRAP-Extrakt aus 100 Zellen in 5 µl

D: TRAP-Extrakt aus 50 Zellen in 5 µl

E: TRAP-Extrakt aus 10 Zellen in 5 µl

F: Negativkontrolle (Lysepuffer)

2.4.4 Das tRQ-TRAP PCR-Protokoll

Bei dem angewandten PCR-Protokoll handelte es sich um eine *two-step* PCR mit 40 Amplifikationszyklen.

Zunächst wurden die Standards und Proben für 20 Minuten bei 25°C inkubiert, um eine Inkubation mit der potentiell enthaltenen Telomerase zu ermöglichen.

Dann folgte eine Erhitzung auf 95°C für zehn Minuten, um die Taq-Polymerase zu aktivieren und die Telomerase zu deaktivieren.

Nach erneuter Abkühlung wurde die DNA 10 Sekunden bei 95°C denaturiert.

Nun folgten 40 Amplifikationszyklen, für jeweils eine Minute bei 60°C zur Primerbindung und Elongation.

2.4.4.1 Auswertung der Messung

2.4.4.1.1 Berechnung der Standardkurve

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit der Software SDS 2.1 von Applied Biosystems. Diese zeigt nach dem Lauf die Emissionskurven der Standards und Proben an, die der Menge der Amplifikationsprodukte entsprechen.

Anhand der Amplifikationskurven der Standards wird zunächst eine minimale Fluoreszenzschwelle bestimmt. Diese Schwelle ist so anzulegen, dass alle 293T Standards einen Schnittpunkt mit ihr in der log-linearen Amplifikationsphase haben, Werte der Negativkontrolle (F) aber unter der Schwelle bleiben. So werden „Hintergrundrauschen“ und Artefakte wie Primerdimere ausgeblendet. Die Schnittpunkte ergeben die sog. *cycle threshold*-Werte (Ct), also die Anzahl der PCR-Zyklen, bei denen eine Lichtemission sicher durch Telomerase-Amplifikationsprodukte bedingt ist (siehe Abbildung 5).

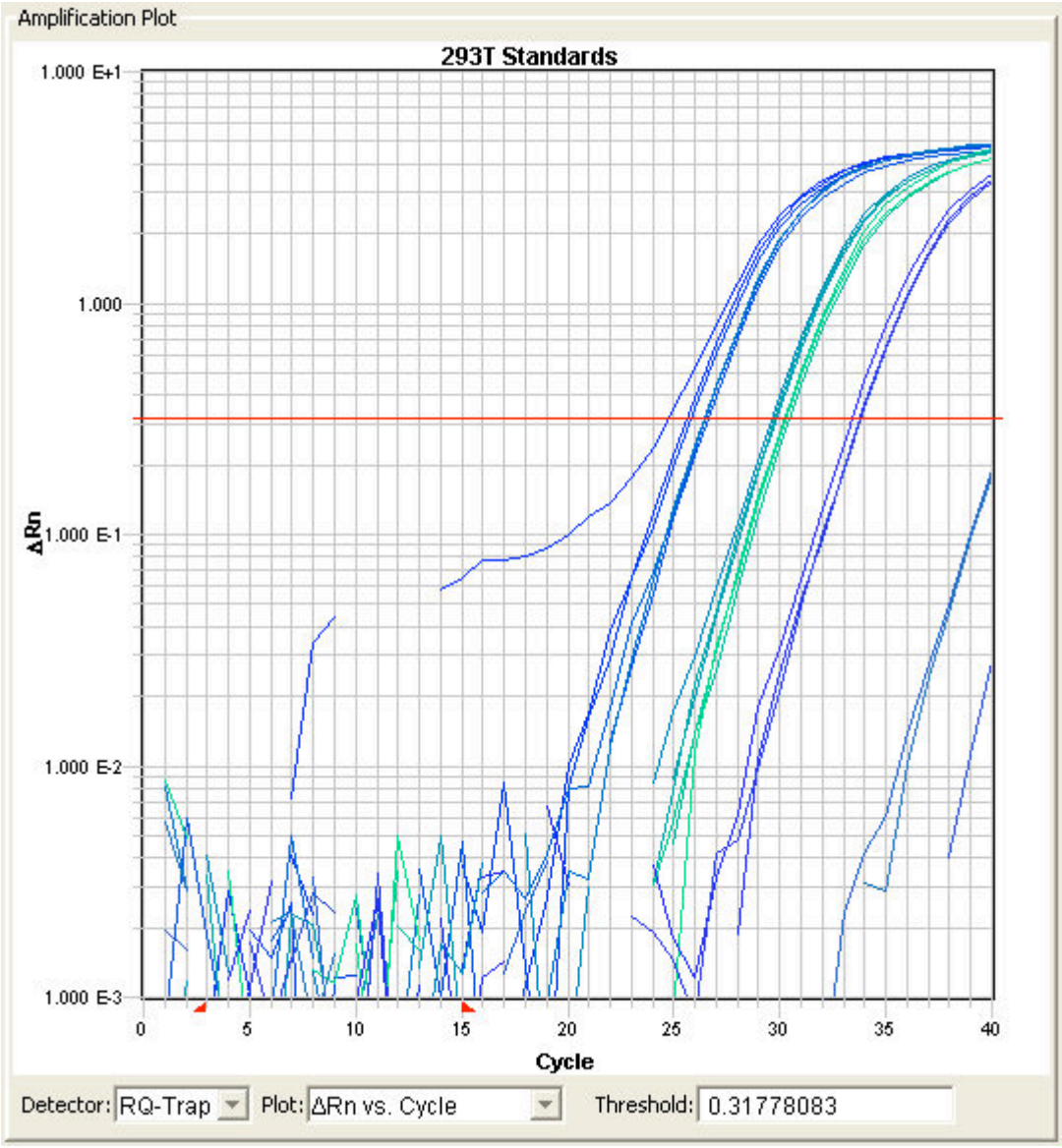


Abbildung 5: Amplifikationskurven der Standards in dreifachem Ansatz von links nach rechts in absteigender Konzentration. Der *cycle threshold* schneidet die Kurven in der exponentiellen Phase, schließt aber artefaktbedingte Messungen in der Negativkontrolle aus.

Aus den oben ermittelten Schnittpunkten ergibt sich schließlich die Standardkurve (Abbildung 6). Die Steigung zeigt die erforderliche Anzahl an PCR-Zyklen für eine 10-fache Amplifikation an (rechnerisch ca. 3,3).

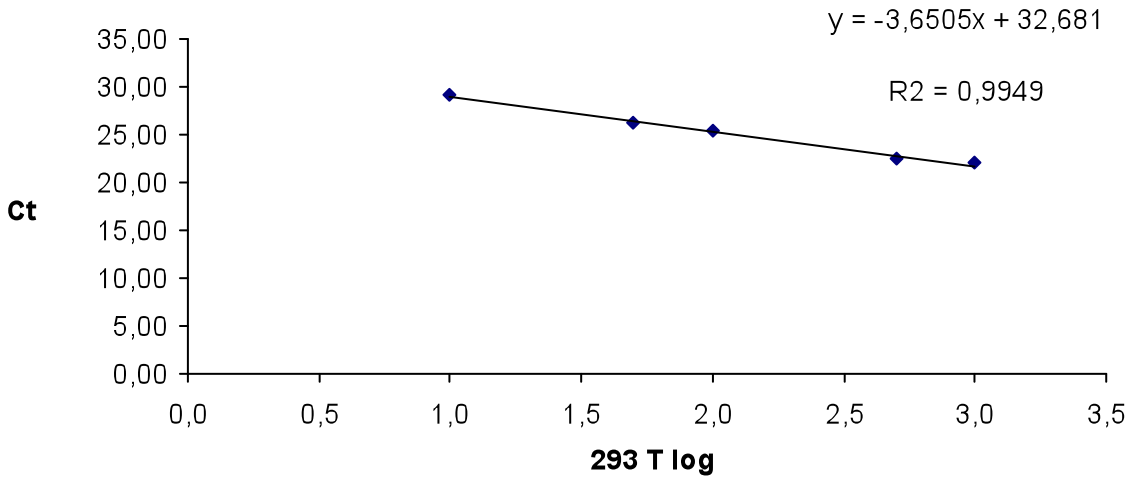


Abbildung 6: Standardkurve mit Geradengleichung und Standardfehler.

2.4.4.1.2 Berechnung der relativen TA aus den Messwerten

Mit der Standardkurve lässt sich die RTA in 293T Zell-Äquivalenten pro µg Protein ermitteln.

Die RTA ergibt sich aus der umgeformten Geradengleichung der Standardkurve y=mx+b.

Dabei wird der Ct-Wert jeder Probe als y-Wert eingesetzt. Für die Gleichung aus Abbildung 4 ergibt sich:

$$x=(y-32,681)/(-3,6505)$$

Beispielhaft für eine Probe mit einem Ct-Wert von 32,0 bei einer Verdünnung von 0,1 µg pro Ansatz:

$$x=(32,0-32,681)/(-3,6505)$$
$$x=-0,681/(-3,6505)$$
$$x=0,187$$

Die RTA ergibt sich dann aus dem Verdünnungsfaktor des Ansatzes, der wegen der logarithmischen Darstellung der Kurven mit dem x-Wert aus der obigen Gleichung potenziert werden muss. Im selben Beispiel:

$$10x10^{0,187}= 15,38$$

Hier würde also die RTA etwa 15 293T-Zelläquivalenten pro µg Protein entsprechen.

2.5 Ausschluss von PCR-Inhibitoren

Der Einfluss von PCR-Inhibitoren war bei der Optimierung der Methode ein wichtiges Kriterium, um einerseits die klinische Anwendbarkeit, aber auch die Reliabilität der erzielten Ergebnisse abschätzen zu können.

Um eventuelle Inhibitoren auszuschließen bzw. nachzuweisen, wurde mit einzelnen Proben das PCR-Protokoll etwas abgewandelt.

2.5.1 Auswahl der Proben

Dazu wurden insgesamt fünf Proben und eine Positivkontrolle ausgewählt. Die Proben wiesen zuvor gemessene hohe oder mäßig erhöhte RTA-Werte, sodass bei vorhandenen Inhibitoren im Reaktionsansatz ein nachweisbarer Unterschied im Absorptionsverhalten nachweisbar wäre.

2.5.2 Inaktivierung der Telomerase

Die Telomerase in den Proben wurde auf zwei Arten inaktiviert, um eine Denaturierung möglicher Inhibitoren auszuschließen.

2.5.2.1 RNAse-Verdau

Zum einen wurde von jeder Probe ein 50 µl-Ansatz mit 10 µg Proteingehalt und 5 µl DNAse-freier Ribonuklease hergestellt. Dieser wurde für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise wurde die RNA-Untereinheit des Enzyms verdaut.

2.5.2.2 Hitze-Inaktivierung

Außerdem wurde von jeder Probe ein zweiter Ansatz des gleichen Volumens, jedoch ohne RNAse angefertigt.

Dieser wurde für 20 Minuten bei 70°C inkubiert, um so die katalytische Untereinheit der Telomerase zu denaturieren.

2.5.3 Verdünnungsreihe der inaktivierten Proben

Die einzelnen inaktivierten Proben wurden nun kontinuierlich in einem 1:10 Schema verdünnt, so dass von jeder Probe pro Inaktivierungsverfahren vier Verdünnungen entstanden:

1,0 µg pro 5 µl
0,1 µg pro 5 µl
0,01 µg pro 5 µl
0,001 µg pro 5 µl

2.5.4 PCR-Kontrolle

Bei dem für diesen Versuch abgewandelten PCR-Protokoll wurde dem *Master Mix* jeweils 5 µl des 293T Standards C (TRAP-Extrakt aus 100 Zellen in 5 µl) bei gleichem Gesamtvolumen hinzugegeben. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit Standard C und PCR-reinem Wasser eingesetzt.

Da nun alle Reaktionsansätze die gleiche Menge an Telomerase enthalten, würde sich die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren dadurch zeigen, dass die entsprechenden Proben später amplifizieren, als die Positivkontrolle bzw. keine Amplifikation stattfindet.

2.6 Vergleich mit kommerziellem TRAP-Assay

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Heinrich-Pette-Institut Hamburg wurden die Proben mit einem kommerziell erhältlichen konventionellen TRAP-Assay gemessen. Die TA lässt sich dabei mittels Polyacrylamidgelanalyse (PAGE) indirekt und semiquantitativ durch die Anzahl der aufgetrennten Telomersequenzen bestimmen.

Es wurde der *TRAPeze Assay* (Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA) mit 0,5 µg Protein pro Ansatz verwendet.

2.7 Korrelation mit den histologischen Diagnosen

Die Messungen der TA wurden ohne Kenntnis der histologischen Diagnosen durchgeführt. Danach wurden die entsprechenden Befundberichte der Proben beim Institut für Pathologie angefordert. Erwartet wurde eine signifikant höhere RTA in Karzinomproben als in normalem Gewebe. Innerhalb der Gruppe der malignen Tumoren sollte ferner eine Korrelation der RTA-Werte mit dem Grading hergestellt werden. Nach relevanten histopathologischen Nebendiagnosen (z.B. höhergradige entzündliche Infiltration) sollten dabei ebenfalls gesucht werden, da diese die Interpretation der Messergebnisse entscheidend beeinflussen könnten.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse wurde mit der Software Sigmastat Version 3.1 sowie Microsoft Excel XP durchgeführt. Aufgrund der begrenzten Anzahl der Proben wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Gewebeproben

Die Lebergewebeproben sind in Tabelle 3 aufgelistet. Dabei sind zunächst die neoplastischen Proben mit Zusammenfassung des histologischen Befundes dargestellt. Neben dem Tumorgrading sind auch relevante Zusatzbemerkungen aus dem histologischen Bericht angegeben.

Probe	Diagnose	Grading	Bemerkung/histol. Nebenbefunde
8	HCC	G3	herdförmige Nekrosen
17	HCC	G3	ausgedehnte Nekrosen
42	HCC	G3	k.A.
61	HCC	G2	k.A
130	HCC	G2	k.A
2569	HCC	G2	ausgedehnte Nekrosen, Steatosis
22 I	HCC	G2	Siderose, Steatosis
130 I	HCC	G2	k.A
148 I	HCC	G2	k.A
23	Metastase (Kolonkarzinom)	G2	entzündliche Infiltrate
2908	Metastase (Kolonkarzinom)	G2	partielle Nekrosen
129 I	Adenom	-	entzündliche Infiltrate

Tabelle 3: Neoplastische Proben mit relevanten histopathologischen Angaben.

Die Kontrollgewebe mit Angaben zu Grunderkrankungen und weiteren wichtigen diagnostischen Kriterien sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es sind hier die jeweilige Grunderkrankung und, soweit im Befundbericht erwähnt, Angaben zu entzündlichen oder fibrotischen Veränderungen aufgelistet. Diese Angaben sind relevant für die kritische Interpretation der gemessenen TA.

Probe	Fibrose	Entzündung	Grunderkrankung	Histol. Nebenbefunde
8 III	gering	k.A.	met. Sigma-Ca	20%ige Verfettung
10 III	k.A.	k.A.	met. Rektum-Ca	30%ige Verfettung
16 III	portal	k.A.	met. Sigma-Ca	k.A.
17 III	portal	k.A.	met. Colon-Ca	atypische Mitosen
22 III	portal	teils portal	HCC	Steatose, Siderose
23 III	portal	floride, lymphozytär	Rektum-Ca	k.A.

Tabelle 4: Histologische Angaben zu den Kontrollgeweben.

3.2 Optimierung der Messmethode

Um das Prinzip des RQ-TRAP auf die Lebergewebeproben anzuwenden, sind mehrere vorbereitende Arbeitsschritte notwendig. Zunächst wird aus einem Gewebestück RNA zur Qualitätsanalyse extrahiert. Aus einem anderen Stück wird das Gewebelysat hergestellt. Hieraus werden nach Quantifizierung des Proteingehaltes die Probe zur Messung der TA sowie eine inaktivierte weitere Probe zum Ausschluss von Telomeraseinhibitoren gewonnen. Abbildung 7 gibt einen Überblick über die methodischen Abläufe.

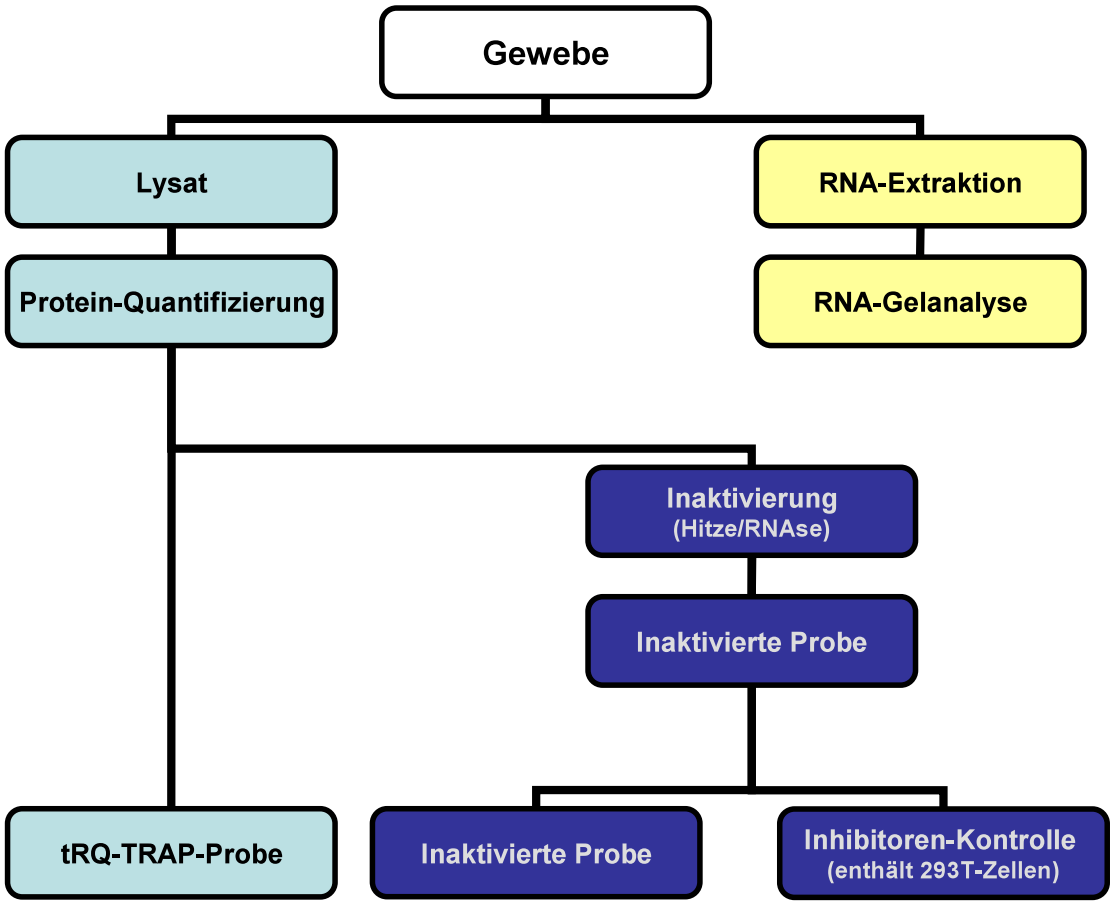
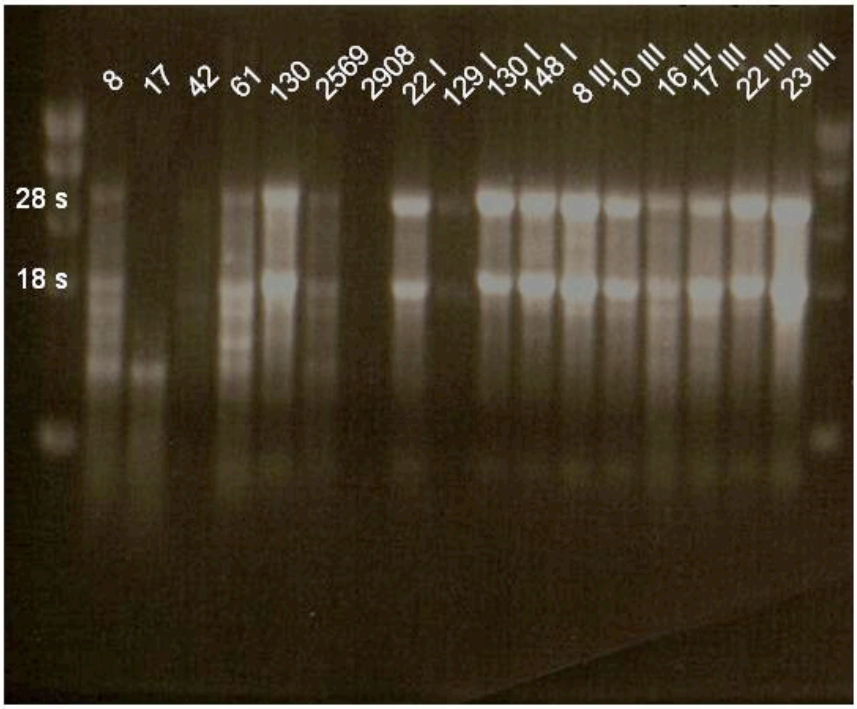


Abbildung 7: Organigramm zur Veranschaulichung der Arbeitsschritte für tRQ-TRAP

3.2.1 Gelanalyse der RNA-Qualität

Nach RNA-Extraktion aus den Proben wurden diese auf einem FA-Gel aufgetrennt. Scharfe 18s (Svedberg) und 28s-Banden wurden als Nachweis intakter RNA gewertet. Diese konnte in den meisten Proben nachgewiesen werden. Lediglich in den Proben 17 und 2908 zeigten sich keine eindeutigen Banden. Hier muss demnach die Integrität des Gewebes in Frage gestellt werden (siehe Abbildung 8).



Abildung 8: FA-Gelanalyse der RNA-Qualität. 18s- und 28s-Banden weisen intakte RNA nach.

3.2.2 Messung der TA mittels konventionellem TRAP-Assay (TRAPeze)

Zum qualitativen Nachweis der TA wurde die Enzymaktivität mit dem kommerziell erhältlichen TRAPeze Kit (Serologicals Corporation, Norcross, GA, USA) gemessen. Es wurden 500 ng Protein per Reaktion für 30 PCR-Zyklen eingesetzt.

In Abbildung 9 ist das Ergebnis der PAGE-Analyse dargestellt. Der 293T-Standard weist dabei die typische Hexamerleiter auf. Die Negativkontrolle zeigt nur wenige und unscharfe Banden, die als Primerdimer-Artefakte zu werten sind. Die meisten Proben zeigen hier deutliche Banden, TA ließ sich folglich grundsätzlich nachweisen.

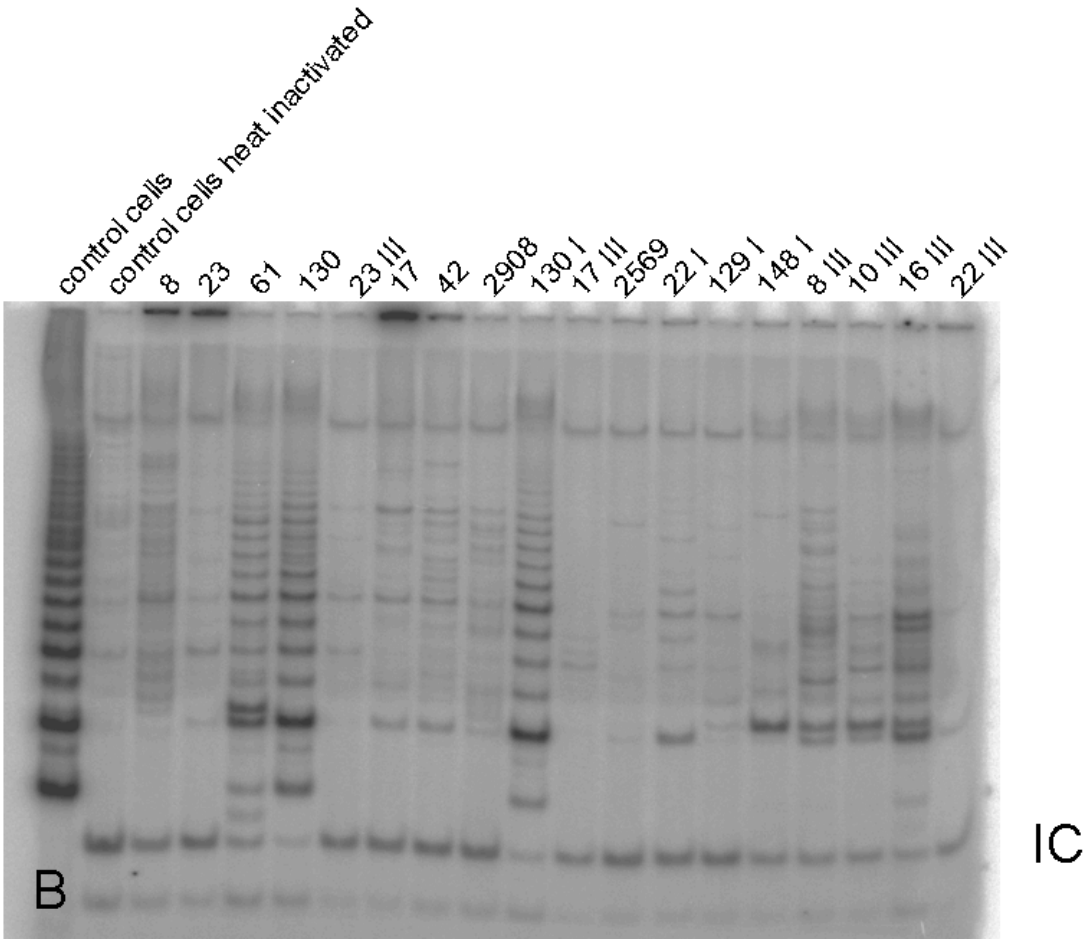


Abbildung 9: PAGE-Analyse nach konventionellem TRAP-Assay der Proben. IC bezeichnet die interne Kontrolle des TRAPeze Kits.

Vergleicht man die Ergebnisse der Gelanalyse mit den RTA-Werten der tRQ-TRAP-Messung, zeigt sich eine annähernde Übereinstimmung. Einige Werte weichen hier allerdings voneinander ab. In Probe 23 III lassen sich in der Gelanalyse nur wenige schwache Banden nachweisen, die RTA wurde hier jedoch mit 382,1/µg als deutlich erhöht gemessen. Umgekehrt zeigen sich beispielsweise in Probe 8III kräftige Banden in der PAGE-Analyse, mittels tRQ-TRAP kann hier aber nur eine RTA von 1,3/µg gemessen werden.

Diese Inkongruenz kann mit der nicht für Gewebeproben optimierten Methode des TRAPeze zu erklären sein, dieser Assay ist für eine Messung aus kultivierten Zellen konzipiert worden. Hinzu kommt ein möglicher hemmender Einfluss von im Reaktionsansatz zu vermutenden Inhibitoren der Taq-Polymerase bei einem Einsatz von 500 ng je Messung (im Vergleich tRQ-TRAP 20 ng je Messung), welche die Messergebnisse des TRAPeze beeinflussen können.

3.2.3 Ausschluss von Inhibitoren

Um einen möglichen Einfluss von im Gewebelysat enthaltenen PCR-Inhibitoren auszuschließen, wurden ausgewählte Proben mittels Hitze oder RNAse inaktiviert und später mit dem Standard C (TRAP-Extrakt aus 100 Zellen in 5 µl) versetzt. Danach erfolgte die TA-Messung nach dem tRQ-TRAP-Protokoll.

Deutliche Unterschiede in den Amplifikationsverläufen der Proben und damit der Ct-Werte würden dabei auf Inhibitoren hinweisen. Da hier die Standardreihe nicht mitgemessen wurde, wurden keine TA-Werte errechnet, sondern die Ct-Werte gegenübergestellt.

Abbildung 10 zeigt unabhängig von der Verdünnung annähernd gleiche Amplifikationen der Proben. In keinem Ansatz ist eine deutliche Verminderung der Amplifikation auszumachen.

Daraus lässt sich schließen, dass mögliche Inhibitoren auf die Methode aufgrund der Verdünnung keinen relevanten Einfluss haben.

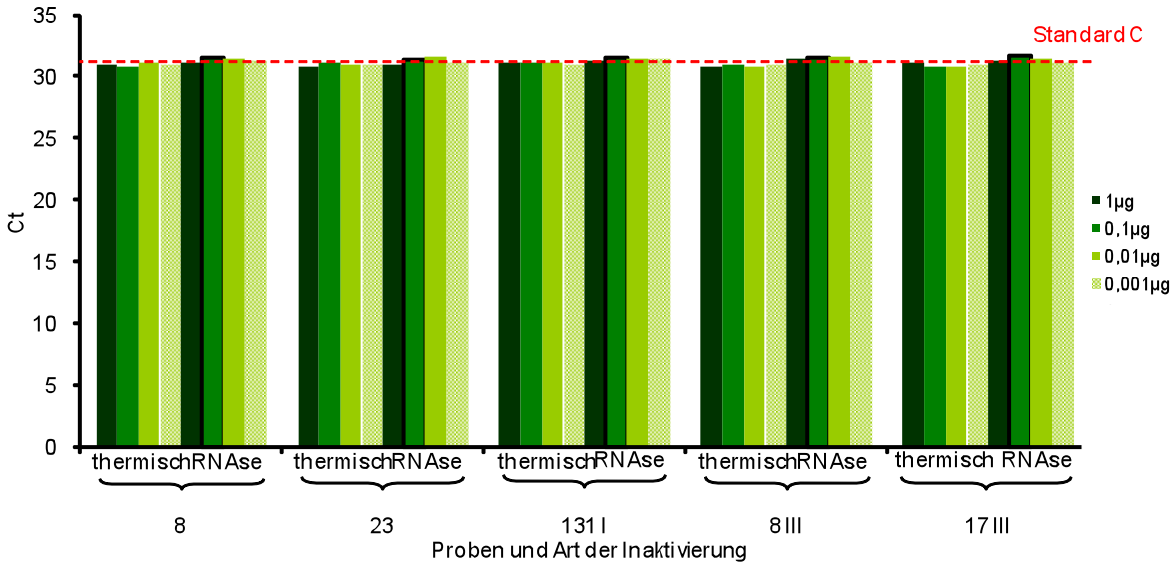


Abbildung 10: Ct-Werte von Verdünnungsreihen 5 inaktivierter Proben. Zum Ausschluss von PCR-Inhibitoren enthält jede Probe den 293T-Standard C (TRAP-Extrakt aus100 Zellen in 5 µl). Die eingezeichnete Linie gibt den Wert der Positivkontrolle an.

3.3. Gemessene TA mit tRQ-TRAP

Nach Vorbereitung der Proben und Optimierung des Assays wurde die relative TA mittels tRQ-TRAP gemessen.

In Tabelle 5 sind die Ct-Mittelwerte aus den dreifachen Reaktionsansätzen und die daraus errechnete RTA für die Proben angegeben. Abbildung 11 stellt die Messwerte graphisch gegenüber.

Probe	Ct (Mittelwert)	RTA/µg	Histologie
8	30,59	187,4	HCC (G3)
17	32,63	51,8	HCC (G3)
23	31,66	95,2	Metastase
42	31,64	96,2	HCC (G3)
61	30,76	167,9	HCC (G1)
130	31,01	143,6	HCC (G2)
2569	34,41	16,8	HCC (G2)
2908	33,35	32,7	Metastase
22 I	36,67	4,0	HCC (G2)
129 I	38,29	1,5	Adenom
130 I	33,50	29,8	HCC (G2)
148 I	34,84	12,8	HCC (G2)
8 III	38,41	1,3	Kontrolle
10 III	36,11	5,7	Kontrolle
16 III	34,50	15,9	Kontrolle
17 III	31,89	82,5	Kontrolle
22 III	35,19	10,3	Kontrolle
23 III	29,46	382,1	Kontrolle

Tabelle 5: Mit tRQ-TRAP gemessene RTA-Werte mit Angabe der histologischen Diagnosen.

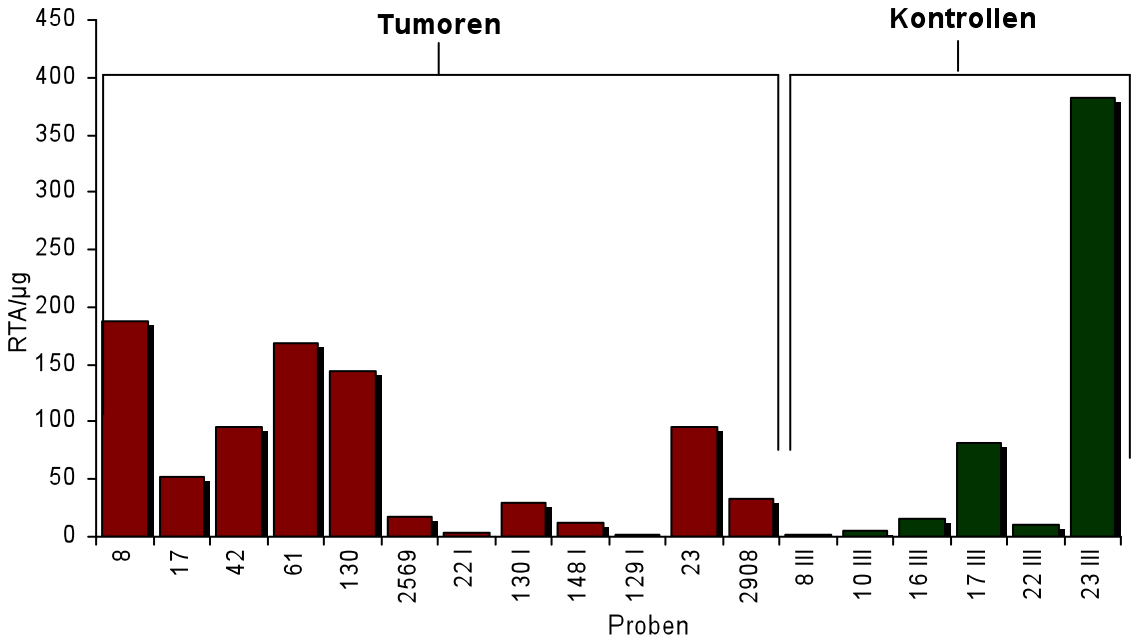


Abbildung 11: Graphische Darstellung der gemessenen RTA Werte aller Proben.

Aus Abbildung 11 wird rasch ersichtlich, dass in den meisten Proben maligner Dignität eine hohe TA nachweisbar ist, während die Mehrzahl der Kontrollgewebe erwartungsgemäß nur marginal erhöhte Werte aufweist. Auffällig ist daher die deutlich erhöhte TA in den Kontrollproben 17 III und 23 III.

3.4 Statistische Auswertung

3.4.1 Verkleinerung der Kohorten nach Ausschluss nicht verwertbarer Proben

Bei der tabellarischen und graphischen Gegenüberstellung der Messwerte fällt zunächst auf, dass in der Kontrollgruppe sowohl hohe, als auch sehr niedrige RTA-Werte vorkommen. Keine, oder nur leicht erhöhte TA ist charakteristisch für reguläres Lebergewebe (Satyanarayana *et al* 2004). Die hohen Messwerte für die Proben 17 III und 23 III lassen sich anhand der histopathologischen Befunde erklären.

Die im Befundbericht bei Probe 17 III erwähnten „atypischen Mitosen“ ziehen eine Einstufung der Probe als gesundes Lebergewebe in Zweifel. Eine maligne Transformation muss hier angenommen werden. Folglich wurde die Probe aus der Gruppe „normales Lebergewebe“ ausgeschlossen.

Die beschriebe „floride Hepatitis“ in Probe 23 III muss ebenfalls einen Ausschluss aus der Gruppe der normalen Gewebeproben bedeuten, da die erhöhte TA hier aus eingewanderten Lymphozyten stammt (Kojima *et al* 1997).

Darüber hinaus ist die Probe 129I histologisch ein Leberzelladenom und damit weder der Gruppe der Karzinome, noch dem regulären Gewebe zuzuordnen.

3.4.2 Deskriptive Statistik der Messwerte

Zur statistischen Auswertung der gemessenen Werte wurden zunächst die Proben nach histologischen Gesichtspunkten gruppiert und deskriptiv verglichen.

Zur Korrelation von benignem und malignem Lebergewebe wurde die Probe 129I in die Kontrollgruppe übernommen. Es wurden die Kontrollgruppe (n=5) mit allen malignen Proben (n=11), mit den HCC-Proben allein (n=9) und den Lebermetastasen (n=2) verglichen. Ferner wurden in der HCC-Gruppe Untergruppen entsprechend dem Tumorgrading gebildet: G1 (n=2), G2 (n=4) und G3 (n=3).

Gruppe	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Kontrollen	5	1,30	15,90	6,94	6,22
Malignom	11	4,00	187,40	76,20	65,94
HCC (gesamt)	9	4,00	187,40	78,90	71,73
HCC (G3)	3	51,80	187,40	111,80	57,88
HCC (G2)	6	4,0	143,60	41,40	62,32
HCC (G1)	1	167,90	167,90	167,90	0
Metastasen	2	32,70	95,20	63,95	44,19

Tabelle 6: Gruppierung der Proben zur statistischen Evaluation.

Bei der graphischen Gegenüberstellung der Werte wird der Unterschied zwischen den benignen und den malignen Proben deutlich.
Um eine klinische Anwendbarkeit als Biomarker möglich zu machen, ist die Definition einer Grenze von nicht-malignitätsbedingter und malignitätsbedingter TA notwendig. Nakashio *et al.* haben bei einer vergleichbaren Untersuchung an malignem und regulärem Lebergewebe diesen *cut-off*-Wert als das Zweifache des höchsten TA-Wertes aus der Gruppe der Kontrollgewebe proklamiert (Nakashio *et al* 1997).
Wendet man dies auf die vorliegenden Daten an, beträgt dieser Wert 31,8/µg (2x15,9/µg). Damit liegen 7 von 11 Karzinomproben (64%) oberhalb des Wertes.

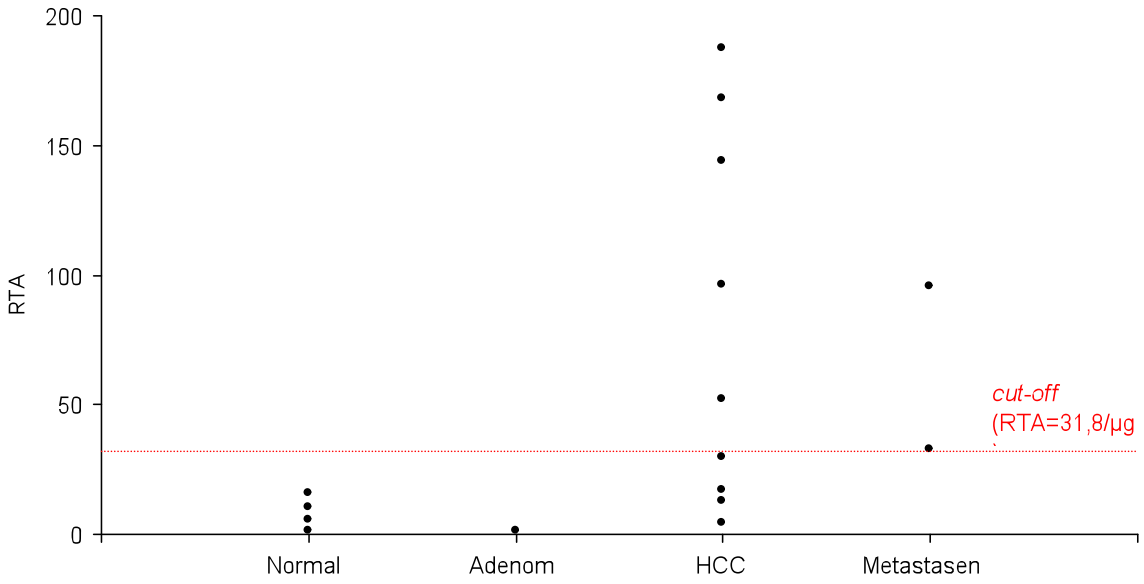


Abbildung 12: Graphische Darstellung der RTA-Werte nach Ausschluss der Proben 23 III und 17 III geordnet nach Histologie. Der *cut-off*-Wert bei RTA=31,8/µg markiert die von Nakashio *et al*. beschriebene Schwelle von unspezifischer zu malignitätsbedingter TA.

Stellt man die RTA-Mittelwerte der Gruppen gegenüber, sind die Unterschiede zwischen malignem und benignem Gewebe deutlicher, wie Abbildung 13 zeigt.

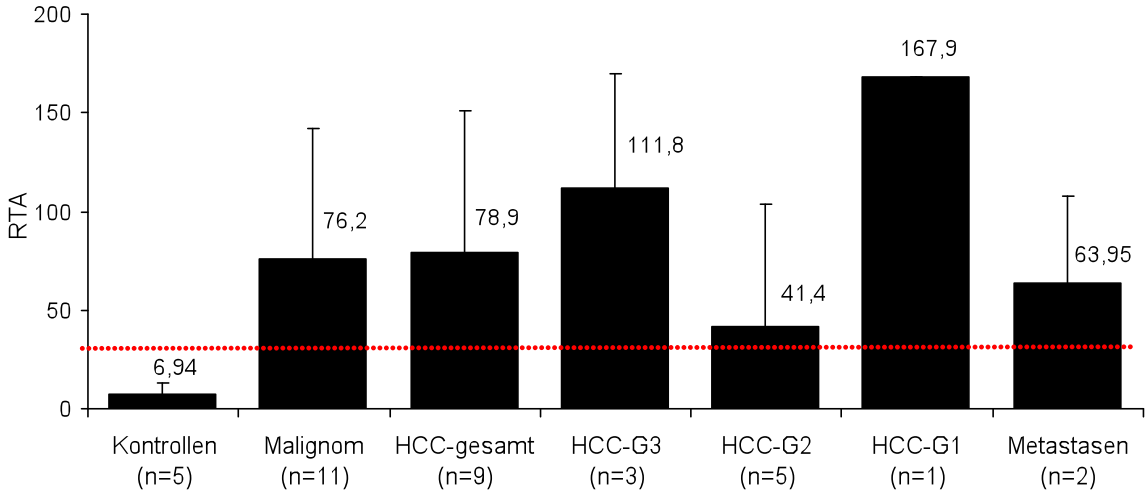


Abbildung 13: Vergleich der histologischen Gruppen im Bezug auf den errechneten *cut-off*-Wert (RTA=31,8/µg).

3.4.3 Vergleichende Statistik

Bei Betrachtung von Tabelle 6 wird deutlich, dass aufgrund der relativ geringen Anzahl der Proben die Werte auch innerhalb der Gruppen großen Schwankungen um die Mittelwerte unterlegen sind und vergleichende statistische Test hierbei nur eingeschränkte Aussagefähigkeit haben.

Die Gruppen wurden daher anhand des parameterfreien Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Ein p-Wert von kleiner oder gleich 0,05 wurde als signifikant gewertet.

3.4.3.1 Benignes vs. malignes Lebergewebe

Zunächst wurden alle Proben maligner Dignität mit den benignen Geweben, also Kontrollen und Adenom verglichen.

Variable	Beobachtungen	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
maligne	11	4,0	187,4	76,20	65,94
benigne	5	1,3	15,9	6,94	6,22

Tabelle 7: Vergleich der malignen und benignen Gewebeproben.

Aus Tabelle 7 wird bereits im beschreibenden Vergleich der Gruppen ein deutlicher Unterscheid der RTA-Werte sichtbar. Durchschnittlich ist die Enzymaktivität bei den Malignomen mehr als zehnfach erhöht. Dabei fällt auf, dass die Werte der Gruppe der

malignen Proben einem großen Schwankungsspektrum unterliegen. Der Median liegt hier bei 51,8/µg, die Standardabweichung beträgt 65,94/µg.
Der zweiseitige Mann-Whitney-Test in Tabelle 8 weist hier, wie erwartet, einen signifikanten Unterschied (p=0,005) nach.

U	51,000
Erwartungswert	27,500
Varianz (U)	77,917
p-Wert (zweiseitig)	0,005
Alpha	0,05

Tabelle 8: Mann-Whitney-U-Test zwischen den Gruppen „maligne“ und „benigne“.

3.4.3.2 HCC vs. Kontrollen

Beim Vergleich der HCC-Proben mit den Kontrollen zeigen sich deskriptiv zunächst kaum Unterschiede zur vorangegangenen Gegenüberstellung, da die Gruppe der Malignome hauptsächlich aus den primären Leberzellkarzinomen besteht.
Auch hier ist der Median 51,8/µg. Der Mittelwert beträgt 78,92/µg in ist damit in etwa gleich dem in Tabelle 7.
Bei der vergleichenden Statistik zeigt sich im U-Test ebenfalls ein signifikanter Unterschied in zwischen den Gruppen (p=0,012).

Variable	Beobachtungen	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
HCC	9	4,0	187,4	78,92	71,73
Kontrollen	5	1,3	15,9	6,94	6,22

Tabelle 9: Vergleich der HCC-Proben mit der Kontrollgruppe.

U	41,000
Erwartungswert	22,500
Varianz (U)	56,250
p-Wert (Zweiseitig)	0,012
Alpha	0,05

Tabelle 10: U-Test zwischen HCC-Proben und Kontrollen.

3.4.3.3 Vergleichende Statistik der HCC-Untergruppen

Im Weiteren sind die Werte der jeweiligen HCC-Untergruppen nach ihrem Grading gegenübergestellt. In Tabelle 11 und bei der graphischen Gegenüberstellung in Abbildung 14 zeigt sich zunächst, dass hohe Messwerte in jeder Gruppe vorkommen, wobei tendenziell höhere Werte bei G3-Tumoren (RTA-Mittelwert 111,8/µg) verglichen mit den G2-Tumoren (RTA-Mittelwert 41,4/µg) auszumachen sind.

Im Mann-Whitney-Test kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p=0,143). Über G1 mit nur einem Messwert kann hier keine valide Aussage getroffen werden, obgleich dieser Wert mit 167,9/µg relativ hoch ist. Die Aussagekraft dieser Statistik bleibt allerdings aufgrund der geringen Probenanzahl grundsätzlich eingeschränkt.

Grading	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
G3	3	51,8	187,4	111,8	69,1
G2	5	4,0	143,6	41,4	57,9
G1	1	167,9	167,9	167,9	-

Tabelle 11: Beschreibende Statistik der HCC-Untergruppen.

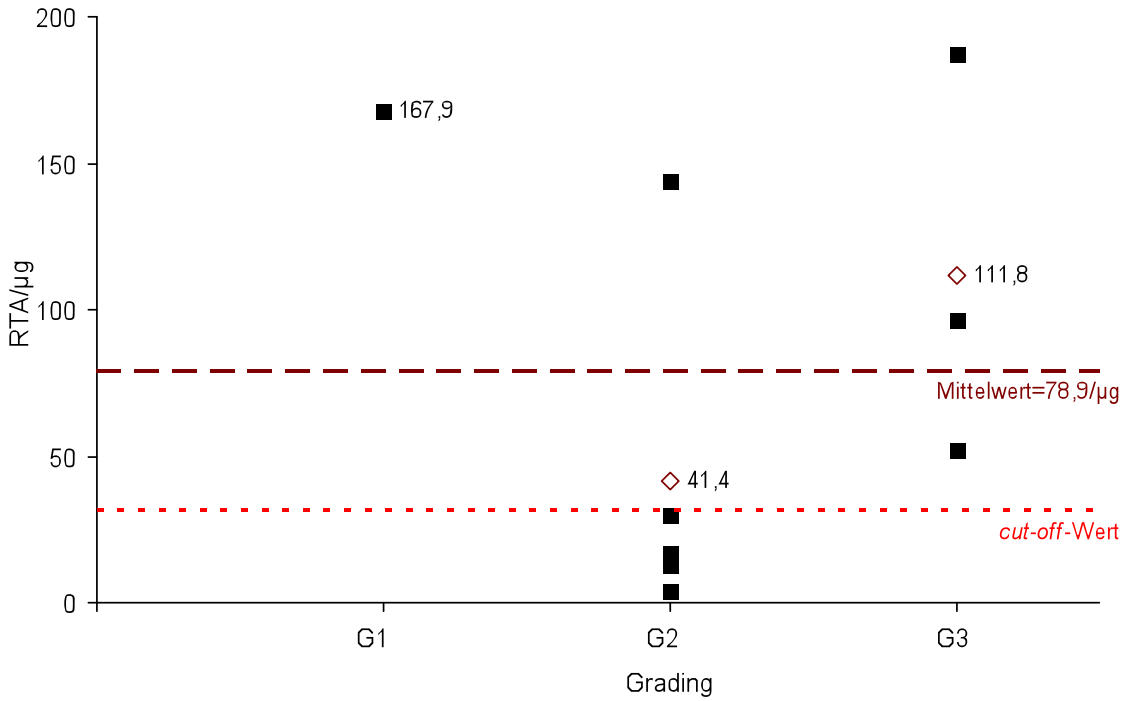


Abbildung 14: Verteilung der RTA-Werte der HCC-Proben im Punktdiagramm. Die jeweiligen Mittelwerte der Untergruppen sind als Rauten markiert. Der Mittelwert aller HCC-Proben und der *cut-off*-Wert nach Nakashio *et al.* sind als Parallelen zur Abszisse eingezeichnet.

U	13,000
Erwartungswert	7,500
Varianz (U)	11,250
p-Wert (zweiseitig)	0,143
Alpha	0,05

Tabelle 12: Mann-Whitney-U-Test zwischen den Gruppen der G2- und der G3-Tumoren.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass sich TA mit tRQ-TRAP in Lebergewebe quantitativ nachweisen lässt. Die weitgehende Übereinstimmung mit dem semiquantitativen *TRAPeze Kit* weist darauf hin, dass die beobachteten Amplifikationen der *real-time-PCR* Telomeraseprodukten entsprechen.

Die Methode hat eine hohe Sensitivität und vermag zum einen nur sehr geringe TA-Werte in Proben zu detektieren (RTA=1,5/µg in Probe 8 III), andererseits lassen sich aber auch Enzymaktivitäten präzise bestimmen, die um mehr als den Faktor 200 höher liegen (RTA=382,1/µg in Probe 23 III).

Bei der eingesetzten Proteinverdünnung haben mögliche PCR-Inhibitoren keinen messbaren Einfluss auf das Verfahren.

In Gewebeproben der malignen Tumoren lässt sich signifikant höhere TA nachweisen als in regulärem oder benigne verändertem Lebergewebe (p=0,005). 64% der HCC-Proben weisen Enzymaktivitätswerte oberhalb des von Nakashio *et al*. vorgeschlagenen Grenzwertes auf, der zur Unterscheidung von tumorbedingter und nicht-tumorbedingter TA-Erhöhung dient (Nakashio *et al* 1997).

Innerhalb der Gruppe der untersuchten Tumoren zeigt sich eine Tendenz zu höherer Enzymaktivität in entdifferenzierten (RTA=111,8/µg) verglichen mit mittelgradig differenzierten Tumoren (RTA=41,4/µg), hier lässt sich jedoch in der untersuchten Kohorte kein signifikanter Unterschied feststellen.

4. Diskussion

Es wurde TA in Lebergewebeproben unterschiedlicher Dignität mittels des modifizierten tRQ-TRAP quantifiziert. Für eine valide Ergebnisinterpretation muss das zu untersuchende Gewebe bestimmten Vorgaben bezüglich Gewebequalität und intrahepatischer Nebenerkrankungen entsprechen.
Um zu verifizieren, dass die gemessenen Amplifikationen den Telomeraseprodukten entsprechen, wurden die Proben ebenfalls mittels des kommerziell erhältlichen semiquantitativen TRAPeze gemessen. Der Einfluss von möglichen Inhibitoren des PCR-gestützten Verfahrens wurde mit einer definierten Menge TA-positiver Zellen in zuvor inaktivierten Proben untersucht.
Eine deutlich erhöhte TA wurde in Karzinomproben erwartet. In normalem Lebergewebe sollte TA nicht, oder nur sehr gering erhöht sein.
Aufgrund der wichtigen Rolle der Telomerasereaktivierung während der Hepatokarzinogenese wurden höhere Werte in schlechter differenzierten Proben im Vergleich zu gut differenzierten Tumoren erwartet.

4.1 Diskussion des Ausgangsmaterials

tRQ-TRAP ist eine Methode, die hohe Ansprüche an die Qualität des Ausgangsmaterials stellt. Diese wird mit der Analyse der RNA-Integrität im Vorwege überprüft.
Die gemessenen Proben stammen aus einer Gewebebank und waren zum Zeitpunkt der Messungen teilweise bereits 5 Jahre kryokonserviert worden. Eine Schädigung der Gewebeintegrität ist dabei nicht auszuschließen, besonders wenn eine Probe mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren wurde.
In zwei der Proben (17 und 2908) konnte keine intakte RNA nachgewiesen werden. Die Messwerte (Probe 17: RTA=51,8/µg, Histologie: HCC (G3), ausgeprägte Nekrosen; Probe 2908: RTA=32,7/µg, Histologie: Metastase eines Kolonkarzinoms (G2), umgebende Nekrosen) sind in diesen Proben folglich nur unter Vorbehalt verwertbar.
Beide Proben weisen für maligne Tumoren eher niedrige RTA-Werte auf. Ob die tatsächliche TA in diesen Proben höher liegt, bleibt hier allerdings Gegenstand von Spekulationen.

Ferner birgt eine entzündliche Begleitreaktion des Gewebes das Risiko falsch-positiver, beziehungsweise falsch-hoher RTA-Werte, was in Probe 23 III der Fall ist (RTA=382,1/µg, Histologie: floride lymphozytäre Hepatitis, kein Anhalt für Malignität).

Diese Ergebnisse indizieren, dass tRQ-TRAP zwar eine sensitive Methode zur TA-Quantifizierung darstellt, jedoch bezüglich der Ursache einer erhöhten Enzymaktivität unspezifisch ist.
Hieraus lässt sich die Wichtigkeit der zusätzlichen Gewebeuntersuchungen (RNA-Qualitätsbestimmung, histologische Aufarbeitung) bei der Interpretation der Messwerte ableiten.
Für eine mögliche klinische Anwendbarkeit von tRQ-TRAP bedeuten die oben beschriebenen Einschränkungen, dass die Methode aufgrund der Vorgaben an die Gewebequalität als ergänzendes, aber keinesfalls einziges Verfahren zur Tumordiagnose in Lebergewebeproben eingesetzt werden könnte.
Die oben erwähnten Begleitreaktionen des umgebenden Lebergewebes lassen sich interindividuell nicht ohne zusätzliche histologische Untersuchungen abschätzen.

4.2 Diskussion der Methodenoptimierung

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sich mit tRQ-TRAP TA aus menschlichen Lebergewebeproben valide quantifizieren lässt. Der Vergleich mit dem qualitativen TA-Detektionskit weist die Enzymaktivität in den Proben nach.
Die Methode ist eine Abwandlung des von Wege *et al*. vorgestellten RQ-TRAP (Wege *et al* 2003b) und ermöglicht eine äußerst sensitive Messung auch aus kleinen Gewebemengen. Bei eingesetzten 20 ng Protein pro Reaktion konnten reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.
Im Gegensatz zu RQ-TRAP, das TA aus Zellsuspensionen quantifiziert, sind für tRQ-TRAP vorbereitende Arbeitsschritte notwendig: Zum einen die Quantifizierung des Gesamtproteins, anderseits die Bestimmung der RNA-Integrität. Diese Schritte sind Routinearbeiten im Laboralltag, zahlreiche Hersteller bieten entsprechende Fertigsets inklusive der erforderlichen Reagenzien an.
Die praktischen Vorzüge von RQ-TRAP können auch in tRQ-TRAP genutzt werden. So kann aufgrund der *real-time* Auswertung auf post-PCR Analysen verzichtet werden. Die Amplifikationsprodukte verbleiben im geschlossenen Reaktionsgefäß, es besteht somit keine Gefahr für *carry-over* Kontaminationen am Arbeitsplatz. Ferner ist die Methode für einen hohen Probendurchsatz geeignet. In dem verwendeten System können 96 bis 384 Reaktionsansätze gleichzeitig gemessen werden.
Mögliche Inhibitoren der PCR-basierten Methode können in Reagenzien zur Extraktion des Lysates (z.B. EGTA) oder in den Gewebeproben selbst (z.B. Hämoglobin) zu finden sein (Piatyszek *et al.* 1995). Ein relevanter Einfluss von PCR-Inhibitoren konnte für tRQ-TRAP ausgeschlossen werden, was in der hohen Verdünnung des Lysats begründet ist.

Eine interne PCR-Kontrolle, wie in einigen TA-Detektionsassays vorhanden, kommt bei tRQ-TRAP nicht zum Einsatz. Eine solche Kontrolle ist grundsätzlich für die Kontrolle der Validität eines PCR-gestützten Verfahrens sinnvoll.

Zur Evaluation der Methode stand hier lediglich eine relativ kleine Kohorte von Lebergewebeproben zur Verfügung. Aus den Ergebnissen lässt sich folglich nur ableiten, dass tRQ-TRAP grundsätzlich eine reproduzierbare Quantifizierung von TA ermöglicht. Für dezidierte Aussagen zur genauen Spezifität, Sensitivität sowie zu Linearität der Messmethode sind breiter angelegte Studien mit deutlich größeren Kohorten vonnöten.

4.3 Diskussion der gemessenen TA

Mit tRQ-TRAP war TA in allen untersuchten Proben detektierbar.
Ein Leberadenom sowie die Proben von regulärem Lebergewebe wiesen TA nur in geringer Höhe auf (1,3/µg – 15,9/µg).
Wie bereits unter 1.4 angeführt, können geringe Mengen von TA in regulärem Gewebe durch Regenerationsvorgänge (Wege *et al* 2007), entzündliche Veränderungen (Kojima *et al* 1997, Nakashio *et al* 1997) oder durch Mikrometastasierung bedingt sein. Eine Probe (23 III) wurde aufgrund einer Entzündungsreaktion und dadurch stark erhöhter TA aus der Kohorte ausgeschlossen. Der Einfluss von regenerativen Vorgängen kann im untersuchten Material nur ungenügend abgeschätzt werden. Bei entsprechender Lebervorschädigung, z.B. durch Medikamente oder die individuelle Grunderkrankung des Patienten können schwach positive Messwerte durch Geweberegeneration bedingt sein. Da es sich bei den Kontrollproben um Exzisionen aus tumorumgebendem Lebergewebe handelt, könnten, auch bei unauffälliger Histologie, leicht erhöhte TA-Werte in den Kontrollproben durch Mikrometastasierung begründet sein.

In Gewebeproben der malignen Tumoren ließ sich signifikant höhere TA nachweisen als in regulärem oder benigne verändertem Lebergewebe (p=0,005).
64% (7/11) der Karzinome und 67% (6/9) der HCC-Proben wiesen RTA-Werte oberhalb des von Nakashio *et al*. vorgeschlagenen Grenzwertes auf, der zur Unterscheidung von tumorbedingter und nicht-tumorbedingter TA-Erhöhung dienen soll (Nakashio *et al* 1997).
Shay und Bacchetti publizierten 1997 qualitative Daten zur Telomerasepositivität verschiedener Tumorspezies im Rahmen einer Metaanalyse (Shay & Bacchetti 1997). Eine erhöhte TA wird in 86% (149/173) der hepatozellulären Karzinome beschrieben.

Tahara *et al*. gaben 85% (28/33) an und Nakashio *et al.* wiesen ebenfalls hohe Enzymaktivität in 85% der untersuchten HCC-Proben nach. Youssef *et al.* zeigten mittels eines *in-situ*-TRAP mit positivem Ergebnis in 85% (23/27) vergleichbare Daten.
Diese Detektionsaten konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Da es sich bei den zum Vergleich angeführten Daten um Ergebnisse aus qualitativen bzw. semiquantitativen Messungen handelt, ist zunächst die Vergleichbarkeit mit der hier vorgestellten Methode nur eingeschränkt möglich.
Mögliche Quellen dieser Diskrepanz können sicher die geringe Probenanzahl (n=9) oder aber eine methodenbedingte Schwäche des Assays sein.
Die mit tRQ-TRAP erzielten Ergebnisse waren reproduzierbar und es ergab sich kein Anhalt für eine relevante Inhibition der Amplifikation. Die hohe Sensitivität von TRAP wurde bereits vielfach publiziert, ebenso wie die erhöhte Messpräzion von *real-time*-Assays. Diese methodischen Vorteile spiegeln sich bei tRQ-TRAP in der hohen Detektionsrate auch kleiner Mengen von TA wider.
Anhand von breiter angelegten Messungen mit tRQ-TRAP könnte sich zeigen, ob sich die Unterschiede zu den publizierten Daten nivellieren oder entgegen den Erwartungen bestätigt werden.

Die Höhe der TA-Werte in den malignen Proben sollte eine Aussage über das Ausmaß der Aggressivität des Tumors ermöglichen. Es wurde daher versucht, einen Zusammenhang der gemessenen TA-Werte mit dem Grading der HCC-Proben herzustellen. Für entdifferenzierte Karzinome ist eine höhere Enzymaktivität im Vergleich zu Tumoren mit günstigerem Grading publiziert (Jakupciak 2005).
Die Ergebnisse von Nakashio *et al*. spiegeln das wider mit TA oberhalb des angeführten *cut-off*-Wertes bei G1 von 68% (15/22), G2 von 89% (39/44) und G3 von 100% (12/12).
Die Arbeitsgruppe um Hidetoshi Tahara kam zu ähnlichen Ergebnissen. Sie konnte erhöhte TA in 71% (5/7) der G1-Tumoren, 86% der G2-Tumoren (19/22) und in 100% in G3-Tumoren (4/4) nachweisen (Tahara *et al* 1995b).
Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben zeigt sich eine Tendenz zu höherer TA in 100% (3/3) der G3-Tumoren (RTA=111,8/µg±57,88) verglichen mit 20% (1/5) der G2-Tumoren (RTA= 41,4/µg±62,32), hier lässt sich jedoch in der untersuchten Kohorte kein signifikanter Unterschied feststellen (p=0,143). Wie oben erwähnt, ist die Kohorte vergleichsweise klein (n=9), die Aussagefähigkeit der Ergebnisse folglich eingeschränkt. Ob sich eine signifikante Korrelation von RTA mit dem Tumorgrading herstellen lässt, ließe sich in Untersuchungen an größeren Kohorten abschätzen,

ebenso eine diagnostische Unterscheidung von malignitätsverdächtig und nicht-malignitätsverdächtig erhöhter TA.
Des Weiteren kann eine Evaluation von weiteren Probenkohorten von Lebermetastasen klären, ob hier im Vergleich zum HCC vergleichbare oder relativ höhere bzw. niedrigere RTA-Werte vorliegen.

4.4 Vergleich mit anderen Methoden zur TA-Quantifizierung in Gewebeproben

Aufgrund seiner hohen Sensitivität und Praktikabilität bilden das von Kim *et al.* entwickelte TRAP und seine methodischen Abwandlungen das heutige Standardverfahren zur Detektion von TA (Fajkus 2006). Modifikationen der Methode beinhalten stets die Grundprinzipien, also die Inkubation mit Telomerprimern zur reversen Tranksription und anschließende Amplifikation der synthetisierten Telomersequenzen.
Andere, PCR-unabhängige, Verfahren konnten sich bislang nicht etablieren. Ob sich jedoch Assays zur TA-Detektion etwa mittels fluoreszenzmarkierter *hairpin*-DNA-Sequenzen (Ding *et al.* 2010) oder Biosensor-Technologien (Maesawa *et al.* 2003) gegen TRAP-Verfahren durchsetzen werden, bleibt derzeit offen.
Insbesondere *real-time*-Variationen von TRAP sind geeignet, auch größere Mengen an Proben zu evaluieren. Sie erfüllen so ein wichtiges Kriterium, um in der klinischen Diagnostik einsetzbar zu sein. Darüber hinaus ist die Messpräzision dieser Assays dem klassischen Protokoll überlegen. Ferner sind quantitative TA-Bestimmungen möglich, was die Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse stark vereinfacht (Jakupciak 2005).
Um erhöhte TA als Biomarker für die Tumordiagnostik einsetzbar zu machen, wurden bereits viele TRAP-Modifikationen zur Messung aus Gewebeproben vorgestellt.

Ein Verfahren zur Detektion TA in Lebergewebeproben wurde bereits 1998 von der Arbeitsgruppe um Ryo Nakashio aus Hiroshima entwickelt (Nakashio *et al* 1997). Proben mit den Diagnosen HCC (n=37), benigne chronische Leberkrankungen (n=22) und reguläres Lebergewebe (n=3) wurden nach entsprechender Vorbereitung in einem PCR-Protokoll fluoreszenzmarkiert. Die semiquantitative Auswertung fand mittels PAGE-Analyse statt. Nakashio *et al*. konnten eine sensitive Methode aufzeigen, mit der sich erhöhte TA-Werte in Korrelation zum Tumorgrading feststellen ließen. Ferner legten sie einen Schwellenwert (*cut off*) für TA in Leberzellkarzinomen fest, auf den auch andere Arbeitsgruppen ihre Ergebnisse bezogen haben (Nakamura *et al.* 1999). Die Nachteile einer notwendigen post-PCR-Gelanalyse bleiben bei diesem Protokoll bestehen.

Die Pariser Arbeitsgruppe um Nelly Youssef stellte 2001 eine *in-situ*-Modifikation von TRAP als Weiterentwicklung eines kommerziell erhältlichen PCR-ELISA vor (Youssef *et al.* 2001). Mit dieser Methode wurde TA in 84 Lebergewebeproben unterschiedlicher Dignität gemessen. Als Positivkontrolle dienten humane männliche Keimzellen, die inaktiviert die Negativkontrollen darstellten. Eine interne Kontrolle des PCR-ELISA diente zum Monitoring eventueller Inhibitoren. Das semiquantitative Verfahren erwies sich als hochsensitiv und konnte TA in 85% (23/27) der HCC-Proben detektieren. Damit ließ sich die vorbeschriebene Rate an TA-positiven Leberzellkarzinomen bestätigen.
Ein Vorteil der Methode besteht in der verbesserten Spezifität bezüglich der Ursache der TA-Erhöhung. Fluoreszenzmikroskopisch kann zwischen kernständiger TA innerhalb der Hepatozyten und TA in eingewanderten Lymphozyten unterschieden werden. Letztere findet sich häufig bei Virushepatitiden.
Im Hinblick auf eine klinische Anwendbarkeit erscheint, verglichen mit tRQ-TRAP, die Methode allerdings arbeits- und zeitintensiver (ELISA, Fluoreszenzmikroskopie) zu sein. Das Risiko von *carry-over*-Kontaminationen wird in der Studie nicht diskutiert.

Liu *et al.* haben darüber hinaus kürzlich neue Primer vorgestellt, mit denen eine noch bessere Spezifität erreicht werden und Primer-Dimer-Artefakte weiter eingeschränkt werden sollen (Liu *et al.* 2010). Mit dem quantitativen *real-time*-Assay wurde TA in 68 Proben von menschlichem Lungengewebe gemessen, wobei als Positivkontrolle und Referenz die humane Bronchialkarzinom-Zellinie A549 diente.
Die Gruppe aus Beijing wies signifikant höhere TA in Bronchialkarzinomen im Vergleich zu Normalgewebe nach, wobei sich in kleinzelligen Tumoren signifikant höhere TA-Werte zeigten als in Nicht-Kleinzellern. Auch diese TRAP-Variation besitzt folglich eine gute Sensitivität. Die Kontrolle von PCR-Inhibitoren wird nicht thematisiert.

Die Vergleiche von tRQ-TRAP mit anderen Methoden zur TA-Detektion aus klinischen Proben zeigen, dass obwohl alle Verfahren auf demselben Protokoll basieren, eine relative Heterogenität bei den verschiedenen TRAP-Modifikationen vorherrscht. Dies gilt insbesondere für die Art der Positivkontrolle.
Aktuellere Publikationen nutzen die Vorteile der *real-time*-PCR, eine hohe Sensitivität wird von vielen Arbeitsgruppen beschrieben. Über die methodischen Differenzen hinaus zeigen die Ergebnisse der einzelnen Autoren erhebliche Unterschiede abhängig von der Art der untersuchten Gewebe (Liu *et al* 2010, Nakamura *et al* 1999, Youssef *et al* 2001).

4.5 Resümee und Ausblick: Möglichkeit der klinischen Anwendung von tRQ-TRAP

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen gemeinsam mit denen der oben erwähnten vergleichbaren Publikationen, dass eine klinische Messung von TA auch aus kleinen Gewebeproben zur Tumordetektion grundsätzlich möglich ist. tRQ-TRAP erscheint im Vergleich mit anderen Verfahren methodische Vorteile zu besitzen, jedoch sind die Ergebnisse der aufgrund der relativ geringen Probenanzahl noch nicht aussagekräftig. Für einen möglichen Einsatz eines solchen Assays in der klinischen Diagnostik sind als nächstes Messungen an weitaus größeren Kohorten von Gewebeproben notwendig.

Bei der angesprochenen Heterogenität der TRAP-basierten Messverfahren ist wichtig, dass ein Verfahren als Standard etabliert wird. Darüber hinaus müssen Referenzbereiche definiert werden, um eine fundierte Interpretation der Ergebnisse zu erlauben, und schließlich eine vermutlich benigne oder unspezifische Enzymaktivität von einer malignombedingten TA-Erhöhung möglichst sicher unterscheiden zu können.

Unter diesen Bedingungen wäre ein Einsatz von TA als diagnostischer Biomarker für das HCC durchaus vorstellbar. Dabei ist wichtig zu verstehen, dass sowohl die Diagnosefindung als auch die Prognoseeinschätzung des Tumors multifaktorielle Prozesse in der Medizin sind.

Für den HCC-Patienten kann das bedeuten, dass ergänzend zu den nicht-invasiven Kriterien der EASL und AASLD und dem histologischen Bild die Messung der TA aus einer Biopsie die Diagnose erleichtern kann bzw. die Aggressivität des Tumors besser einzuschätzen wäre.

Hinsichtlich der beschriebenen erhöhten TA in prämaligne Läsionen und dem Paradigma, dass die Telomerasereaktivierung ein früher Schritt in der Hepatokarzinogenese ist, wäre eine Tumordiagnose zum möglichst frühen Zeitpunkt unterstützt durch den Biomarker TA wünschenswert. Gelingt dies, könnte eine präzise TA-Messung einem Patienten eine potentiell kurative operative Therapie ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Das Ribonukleoprotein Telomerase vermag aufgrund seiner Fähigkeit zur reversen Transkription die chromosomale Stabilität von Zellen zu bewahren und hält somit ihre proliferative Kapazität aufrecht. Die Reaktivierung der Telomerase im Rahmen der Hepatokarzinogenese wurde bereits mehrfach nachgewiesen. Daher wurde die Nutzung der Aktivitätsmessung der Telomerase (TA) als Biomarker für das HCC von mehreren Autoren als Möglichkeit propagiert, die histopathologisch oft schwierige Diagnose des HCC und das Grading des Tumors zu erleichtern. In der klinischen Anwendung sind konventionelle PCR-basierte Methoden zur Messung von TA in Gewebeproben bislang nicht etabliert. Das liegt zum großen Teil an den oft erforderlichen aufwendigen und zeitintensiven post-PCR Analysen der Protokolle, die zusätzlich ein hohes Risiko an *carry-over*-Kontaminationen am Arbeitsplatz bergen.

In dieser Arbeit wurde eine von Wege *et al*. entwickelte Methode zur Quantifizierung von TA weiterentwickelt, so dass mit wenig Aufwand eine zuverlässige Messung in Lebergewebeproben möglich ist. Mit diesem tRQ-TRAP wurde TA in insgesamt 18 menschlichen Lebergewebeproben quantifiziert: Normales Gewebe (n=6), Leberadenom (n=1), HCC (n= 9) und Lebermetastasen (n=2). Da die RNA-Untereinheit der Telomerase essentiell für die Enzymaktivität ist, wurde die RNA-Integrität mittels Gelanalyse überprüft.

TA-positive 293T-Zellen dienten als Standards und Positivkontrollen in dem auf dem Fluorochrom SYBR Green basierenden PCR-Verfahren. Aus diesen Standards wurde die relative TA (RTA) pro μg Protein berechnet, inaktivierte Proben wurden als Negativkontrollen verwendet. Der Einfluss von möglichen PCR-Inhibitoren konnte gesondert durch Hinzufügen von TA-positiven Proben zu den Negativkontrollen ausgeschlossen werden.

Geringe RTA zeigte sich erwartungsgemäß in normalem Lebergewebe (6,94±6,22), wobei Karzinomproben signifikant höhere Enzymaktivitäten aufwiesen (76,2±65,94, p=0,005). Tendenziell konnten höhere Werte für die RTA in G3-Tumoren (n=3) im Vergleich zu G2-Tumoren (n=5) beobachtet werden (111,8±57,88 vs. 41,4±62,32). Der Nachweis von TA wurde durch ein kommerziell erhältliches semiquantitatives Detektionskit bestätigt.

Zusammenfassend ist tRQ-TRAP, bei Einhaltung der diskutierten Voraussetzungen bezüglich Qualität des Ausgangsmaterials, eine valide Methode zur TA-Quantifizierung aus Lebergewebeproben. Die Methode könnte grundsätzlich eine klinische Anwendung als unterstützendes Hilfsmittel bei der Diagnosefindung des HCC finden. Um hierfür Referenzbereiche zu definieren und Aussagen zur Sensitivität und Spezifität zu treffen, müsste zunächst an größere Kohorten von Proben gemessen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Bettendorf, O., Heine, B., Kneif, S., Eltze, E., Semjonow, A., Herbst, H., Stein, H., Bocker, W., & Poremba, C. 2003, "Expression-patterns of the RNA component (hTR)and the catalytic subunit (hTERT) of human telomerase in nonneoplastic prostate tissue, prostatic intraepithelial neoplasia, and prostate cancer", *Prostate*, vol. 55, no. 2, pp. 99-104.

2. Blackburn, E. H. 1984, "The molecular structure of centromeres and telomeres", *Annu.Rev.Biochem.*, vol. 53, pp. 163-194.

3. Blackburn, E. H. 2000, "Telomere states and cell fates", *Nature*, vol. 408, no. 6808, pp. 53-56.

4. Bodnar, A. G., Kim, N. W., Effros, R. B., & Chiu, C. P. 1996, "Mechanism of telomerase induction during T cell activation", *Exp.Cell Res.*, vol. 228, no. 1, pp. 58-64.

5. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. 1998, "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells", *Science*, vol. 279, no. 5349, pp. 349-352.

6. Bosch, F. X., Ribes, J., Diaz, M., & Cleries, R. 2004, "Primary liver cancer: worldwide incidence and trends", *Gastroenterology*, vol. 127, no. 5 Suppl 1, p. S5-S16.

7. Broccoli, D., Young, J. W., & de, L. T. 1995, "Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 92, no. 20, pp. 9082-9086.

8. Bruix, J. & Sherman, M. 2005, "Management of hepatocellular carcinoma", *Hepatology*, vol. 42, no. 5, pp. 1208-1236.

9. Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J. M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A. K., Christensen, E., Pagliaro, L., Colombo, M., & Rodes, J. 2001, "Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver", *J.Hepatol.*, vol. 35, no. 3, pp. 421-430.

10. Cerni, C. 2000, "Telomeres, telomerase, and myc. An update", *Mutat.Res.*, vol. 462, no. 1, pp. 31-47.

11. Chong, L., van, S. B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., & de, L. T. 1995, "A human telomeric protein", *Science*, vol. 270, no. 5242, pp. 1663-1667.

12. Cong, Y. S. & Bacchetti, S. 2000, "Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells", *J.Biol.Chem.*, vol. 275, no. 46, pp. 35665-35668.

13. Counter, C. M., Gupta, J., Harley, C. B., Leber, B., & Bacchetti, S. 1995, "Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies", *Blood*, vol. 85, no. 9, pp. 2315-2320.

14. Counter, C. M., Hahn, W. C., Wei, W., Caddle, S. D., Beijersbergen, R. L., Lansdorp, P. M., Sedivy, J. M., & Weinberg, R. A. 1998, "Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 95, no. 25, pp. 14723-14728.

15. Counter, C. M., Hirte, H. W., Bacchetti, S., & Harley, C. B. 1994, "Telomerase activity in human ovarian carcinoma", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 91, no. 8, pp. 2900-2904.

16. Curran, A. J., St, D. K., Irish, J., Gullane, P. J., MacMillan, C., & Kamel-Reid, S. 1998, "Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma", *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.*, vol. 124, no. 7, pp. 784-788.

17. Cuthbert, A. P., Bond, J., Trott, D. A., Gill, S., Broni, J., Marriott, A., Khoudoli, G., Parkinson, E. K., Cooper, C. S., & Newbold, R. F. 1999, "Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 91, no. 1, pp. 37-45.

18. Denzer, U., Guthoff, A., Wege, H., Hillert, C., & Krupski-Berdien, G. 2006, "Das hepatozelluläre Karzinom", *Hamburger Ärzteblatt* no. 4/2006, pp. 207-213.

19. Ding, C., Li, X., Ge, Y., & Zhang, S. 2010, "Fluorescence detection of telomerase activity in cancer cells based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction", *Anal.Chem.*, vol. 82, no. 7, pp. 2850-2855.

20. Fajkus, J. 2006, "Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives", *Clin.Chim.Acta*, vol. 371, no. 1-2, pp. 25-31.

21. Fattovich, G., Stroffolini, T., Zagni, I., & Donato, F. 2004, "Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors", *Gastroenterology*, vol. 127, no. 5 Suppl 1, p. S35-S50.

22. Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., & Parkin, D. M. 2009, "GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Version 1.0.", *IARC Press*.

23. Greider, C. W. 1996, "Telomere length regulation", *Annu.Rev.Biochem.*, vol. 65, pp. 337-365.

24. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. 1985, "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts", *Cell*, vol. 43, no. 2 Pt 1, pp. 405-413.

25. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. 1987, "The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity", *Cell*, vol. 51, no. 6, pp. 887-898.

26. Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. A. 1999, "Creation of human tumour cells with defined genetic elements", *Nature*, vol. 400, no. 6743, pp. 464-468.

27. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000, "The hallmarks of cancer", *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57-70.

28. Härle-Bachor, C. & Boukamp, P. 1996, "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis inhuman skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 93, no. 13, pp. 6476-6481.

29. Harley, C. B. 1991, "Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?", *Mutat.Res.*, vol. 256, no. 2-6, pp. 271-282.

30. Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. 1990, "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts", *Nature*, vol. 345, no. 6274, pp. 458-460.

31. Hayflick, L. & Moorhead, P. 1961, "The serial cultivation of human diploid cell strains", *Exp.Cell Res.*, vol. 25, pp. 585-621.

32. Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokoyama, T., Gazdar, A. F., Hiyama, K., Piatyszek, M. A., & Shay, J. W. 1996, "Telomerase activity in human breast tumors", *J.Natl.Cancer Inst.*, vol. 88, no. 2, pp. 116-122.

33. Hiyama, E. & Hiyama, K. 2003, "Telomerase as tumor marker", *Cancer Lett.*, vol. 194, no. 2, pp. 221-233.

34. Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., & Shay, J. W. 2001, "Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues", *Neoplasia.*, vol. 3, no. 1, pp. 17-26.

35. Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., Ishioka, S., & Yamakido, M. 1995, "Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells", *J.Immunol.*, vol. 155, no. 8, pp. 3711-3715.

36. Holt, S. E. & Shay, J. W. 1999, "Role of telomerase in cellular proliferation and cancer", *J.Cell Physiol*, vol. 180, no. 1, pp. 10-18.

37. Hou, M., Xu, D., Bjorkholm, M., & Gruber, A. 2001, "Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity", *Clin.Chem.*, vol. 47, no. 3, pp. 519-524.

38. Hsiao, R., Sharma, H. W., Ramakrishnan, S., Keith, E., & Narayanan, R. 1997, "Telomerase activity in normal human endothelial cells", *Anticancer Res.*, vol. 17, no. 2A, pp. 827-832.

39. Hytiroglou, P., Kotoula, V., Thung, S. N., Tsokos, M., Fiel, M. I., & Papadimitriou, C. S. 1998, "Telomerase activity in precancerous hepatic nodules", *Cancer*, vol. 82, no. 10, pp. 1831-1838.

40. Iqbal, M. A. 1998, "Chromosome telomeres: The aging clock", *Ann.Saudi.Med.*, vol. 18, no. 6, pp. 495-496.

41. Ishikawa, F. 2000, "Aging clock: the watchmaker's masterpiece", *Cell Mol.Life Sci.*, vol. 57, no. 5, pp. 698-704.

42. Jakupciak, J. P. 2005, "Real-time telomerase activity measurements for detection of cancer", *Expert.Rev.Mol.Diagn.*, vol. 5, no. 5, pp. 745-753.

43. Jakupciak, J. P., Barker, P. E., Wang, W., Srivastava, S., & Atha, D. H. 2005, "Preparation and characterization of candidate reference materials for telomerase assays", *Clin.Chem.*, vol. 51, no. 8, pp. 1443-1450.

44. Jakupciak, J. P., Wang, W., Barker, P. E., Srivastava, S., & Atha, D. H. 2004, "Analytical validation of telomerase activity for cancer early detection: TRAP/PCR-CE and hTERT mRNA quantification assay for high-throughput screening of tumor cells", *J.Mol.Diagn.*, vol. 6, no. 3, pp. 157-165.

45. Kang, S. S., Kwon, T., Kwon, D. Y., & Do, S. I. 1999, "Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit", *J.Biol.Chem.*, vol. 274, no. 19, pp. 13085-13090.

46. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., & Shay, J. W. 1994, "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer", *Science*, vol. 266, no. 5193, pp. 2011-2015.

47. Kim, N. W. & Wu, F. 1997, "Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)", *Nucleic Acids Res.*, vol. 25, no. 13, pp. 2595-2597.

48. Klingelhutz, A. J. 1999, "The roles of telomeres and telomerase in cellular immortalization and the development of cancer", *Anticancer Res.*, vol. 19, no. 6A, pp. 4823-4830.

49. Klingelhutz, A. J., Foster, S. A., & McDougall, J. K. 1996, "Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16", *Nature*, vol. 380, no. 6569, pp. 79-82.

50. Kojima, H., Yokosuka, O., Imazeki, F., Saisho, H., & Omata, M. 1997, "Telomerase activity and telomere length in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease", *Gastroenterology*, vol. 112, no. 2, pp. 493-500.

51. Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., & Inoue, M. 2008, "Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers", *Cancer Sci.*, vol. 99, no. 8, pp. 1528-1538.

52. Kyo, S., Takakura, M., & Inoue, M. 2000, "Telomerase activity in cancer as a diagnostic and therapeutic target", *Histol.Histopathol.*, vol. 15, no. 3, pp. 813-824.

53. Kyo, S., Takakura, M., Kanaya, T., Zhuo, W., Fujimoto, K., Nishio, Y., Orimo, A., & Inoue, M. 1999, "Estrogen activates telomerase", *Cancer Res.*, vol. 59, no. 23, pp. 5917-5921.

54. Kyo, S., Takakura, M., Kohama, T., & Inoue, M. 1997, "Telomerase activity in human endometrium", *Cancer Res.*, vol. 57, no. 4, pp. 610-614.

55. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W., & Harley, C. B. 1992, "Telomere end-replication problem and cell aging", *J.Mol.Biol.*, vol. 225, no. 4, pp. 951-960.

56. Li, H., Zhao, L., Yang, Z., Funder, J. W., & Liu, J. P. 1998, "Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells", *J.Biol.Chem.*, vol. 273, no. 50, pp. 33436-33442.

57. Lichterfeld, M., Mou, D., Cung, T. D., Williams, K. L., Waring, M. T., Huang, J., Pereyra, F., Trocha, A., Freeman, G. J., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., & Yu, X. G. 2008, "Telomerase activity of HIV-1-specific CD8+ T cells: constitutive up-regulation in controllers and selective increase by blockade of PD ligand 1 in progressors", *Blood*, vol. 112, no. 9, pp. 3679-3687.

58. Liu, J. P. 2000, "Telomerase: not just black and white, but shades of gray", *Mol.Cell Biol.Res.Commun.*, vol. 3, no. 3, pp. 129-135.

59. Liu, Y., Wu, B. Q., Zhong, H. H., Xu, M. L., & Fang, W. G. 2010, "Detection of telomerase activity in cultured cells and tumor tissue of lung carcinoma by modified telomeric repeat amplification protocol", *Pathol.Int.*, vol. 60, no. 5, pp. 386-394.

60. Maesawa, C., Inaba, T., Sato, H., Iijima, S., Ishida, K., Terashima, M., Sato, R., Suzuki, M., Yashima, A., Ogasawara, S., Oikawa, H., Sato, N., Saito, K., & Masuda, T. 2003, "A rapid biosensor chip assay for measuring of telomerase activity using surface plasmon resonance", *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 2, p. E4.

61. McClintock, B. 1941, "The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays", *Genetics*, vol. 26, no. 2, pp. 234-282.

62. Morin, G. B. 1989, "The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats", *Cell*, vol. 59, no. 3, pp. 521-529.

63. Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., & Cech, T. R. 1997, "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human", *Science*, vol. 277, no. 5328, pp. 955-959.

64. Nakamura, Y., Tahara, E., Tahara, H., Yasui, W., & Ide, T. 1999, "Quantitative reevaluation of telomerase activity in cancerous and noncancerous gastrointestinal tissues", *Mol.Carcinog.*, vol. 26, no. 4, pp. 312-320.

65. Nakashio, R., Kitamoto, M., Tahara, H., Nakanishi, T., Ide, T., & Kajiyama, G. 1997, "Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinoma", *Int.J.Cancer*, vol. 74, no. 2, pp. 141-147.

66. Newbold, R. F. 2002, "The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer", *Mutagenesis*, vol. 17, no. 6, pp. 539-550.

67. Oh, S., Song, Y., Yim, J., & Kim, T. K. 1999, "The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene", *J.Biol.Chem.*, vol. 274, no. 52, pp. 37473-37478.

68. Pantel, K. & von Knebel, D. M. 2000, "Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells", *Curr.Opin.Oncol.*, vol. 12, no. 1, pp. 95-101.

69. Piatyszek, M. A., Kim, N. W., Weinrich, S. L., Hiyama, K., Hiyama, E., Wright, W. E., & Shay, J. W. 1995, "Detection of telomerase activity in human cells and tumors
by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP)", *Methods in Cell Science*, vol. 17, pp. 1-15.

70. Pineau, P., Marchio, A., Battiston, C., Cordina, E., Russo, A., Terris, B., Qin, L. X., Turlin, B., Tang, Z. Y., Mazzaferro, V., & Dejean, A. 2008, "Chromosome instability in human hepatocellular carcinoma depends on p53 status and aflatoxin exposure", *Mutat.Res.*, vol. 653, no. 1-2, pp. 6-13.

71. Ramirez, R. D., Wright, W. E., Shay, J. W., & Taylor, R. S. 1997, "Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles", *J.Invest Dermatol.*, vol. 108, no. 1, pp. 113-117.

72. Rufer, N., Brümmendorf, T. H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Schulzer, M., & Lansdorp, P. M. 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.*, vol. 190, no. 2, pp. 157-167.

73. Satyanarayana, A., Manns, M. P., & Rudolph, K. L. 2004, "Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis", *Hepatology*, vol. 40, no. 2, pp. 276-283.

74. Schaetzlein, S. & Rudolph, K. L. 2005, "Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing", *Reprod.Fertil.Dev.*, vol. 17, no. 1-2, pp. 85-96.

75. Shay, J. W. & Bacchetti, S. 1997, "A survey of telomerase activity in human cancer", *Eur.J.Cancer*, vol. 33, no. 5, pp. 787-791.

76. Shay, J. W. & Wright, W. E. 2006, "Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions", *Nat.Rev.Drug Discov.*, vol. 5, no. 7, pp. 577-584.

77. Siddiqa, A., Cavazos, D. A., & Marciniak, R. A. 2006, "Targeting telomerase", *Rejuvenation.Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 378-390.

78. Smogorzewska, A., van, S. B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., & de, L. T. 2000, "Control of human telomere length by TRF1 and TRF2", *Mol.Cell Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1659-1668.

79. Sommerfeld, H. J., Meeker, A. K., Piatyszek, M. A., Bova, G. S., Shay, J. W., & Coffey, D. S. 1996, "Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue", *Cancer Res.*, vol. 56, no. 1, pp. 218-222.

80. Stewart, S. A. 2005, "Telomere maintenance and tumorigenesis: an "ALT"ernative road", *Curr.Mol.Med.*, vol. 5, no. 2, pp. 253-257.

81. Stewart, S. A. & Weinberg, R. A. 2000, "Telomerase and human tumorigenesis", *Semin.Cancer Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 399-406.

82. Tahara, H., Kuniyasu, H., Yokozaki, H., Yasui, W., Shay, J. W., Ide, T., & Tahara, E. 1995a, "Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions", *Clin.Cancer Res.*, vol. 1, no. 11, pp. 1245-1251.

83. Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J. W., Tahara, E., Kajiyama, G., & Ide, T. 1995b, "Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas", *Cancer Res.*, vol. 55, no. 13, pp. 2734-2736.

84. Takaishi, H., Kitamoto, M., Takahashi, S., Aikata, H., Kawakami, Y., Nakanishi, T., Nakamura, Y., Shimamoto, F., Kajiyama, G., & Ide, T. 2000, "Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay", *Cancer*, vol. 88, no. 2, pp. 312-317.

85. Taylor, R. S., Ramirez, R. D., Ogoshi, M., Chaffins, M., Piatyszek, M. A., & Shay, J. W. 1996, "Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions", *J.Invest Dermatol.*, vol. 106, no. 4, pp. 759-765.

86. Thorgeirsson, S. S., Teramoto, T., & Factor, V. M. 1998, "Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma", *Semin.Liver Dis.*, vol. 18, no. 2, pp. 115-122.

87. Uehara, H., Nardone, G., Nazarenko, I., & Hohman, R. J. 1999, "Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection", *Biotechniques*, vol. 26, no. 3, pp. 552-558.

88. Urquidi, V., Tarin, D., & Goodison, S. 1998, "Telomerase in cancer: clinical applications", *Ann.Med.*, vol. 30, no. 5, pp. 419-430.

89. van Steensel, B. & de Lange, T. 1997, "Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1", *Nature*, vol. 385, no. 6618, pp. 740-743.

90. Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., & Lansdorp, P. M. 1994, "Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 91, no. 21, pp. 9857-9860.

91. Wege, H. & Brümmendorf, T. 2008, "Telomerase-Inhibitoren," in *Molekulare Therapie in der Hämatologie/Onkologie*, 2 edn, Uni Med Verlag, Bremen, pp. 145-151.

92. Wege, H., Chui, M. S., Le, H. T., Strom, S. C., & Zern, M. A. 2003a, "In vitro expansion of human hepatocytes is restricted by telomere-dependent replicative aging", *Cell Transplant.*, vol. 12, no. 8, pp. 897-906.

93. Wege, H., Chui, M. S., Le, H. T., Tran, J. M., & Zern, M. A. 2003b, "SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity", *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 2, p. E3.

94. Wege, H., Le, H. T., Chui, M. S., Liu, L., Wu, J., Giri, R., Malhi, H., Sappal, B. S., Kumaran, V., Gupta, S., & Zern, M. A. 2003c, "Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential", *Gastroenterology*, vol. 124, no. 2, pp. 432-444.

95. Wege, H., Muller, A., Muller, L., Petri, S., Petersen, J., & Hillert, C. 2007, "Regeneration in pig livers by compensatory hyperplasia induces high levels of telomerase activity", *Comp Hepatol.*, vol. 6, p. 6.

96. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. 1996, "Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells", *Dev.Genet.*, vol. 18, no. 2, pp. 173-179.

97. Wright, W. E. & Shay, J. W. 1995, "Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism?", *Trends Cell Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 293-297.

98. Wright, W. E. & Shay, J. W. 1992, "The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization", *Exp.Gerontol.*, vol. 27, no. 4, pp. 383-389.

99. Yin, L., Hubbard, A. K., & Giardina, C. 2000, "NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit", *J.Biol.Chem.*, vol. 275, no. 47, pp. 36671-36675.

100. Youssef, N., Paradis, V., Ferlicot, S., & Bedossa, P. 2001, "In situ detection of telomerase enzymatic activity in human hepatocellular carcinogenesis", *J.Pathol.*, vol. 194, no. 4, pp. 459-465.

7. Danksagungen

Ich danke Professor Jörg Petersen für die Bereitstellung des Themas sowie für die freundliche und unkomplizierte Gestaltung.

Einen außerordentlich großen Dank schulde ich Dr. Henning Wege für die fantastische Betreuung des Projektes, das stets offene Ohr, die Engelsgeduld mit mir und das unerschöpfliche Engagement. Einen besseren Betreuer hätte ich mir nicht vorstellen können!

Auch den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung und die immer kollegiale und nette Stimmung in Labor und Büro: Nadine Knuth, Manuela Müller, Alejandro Nunez, Björn Haker und Kornelius Schulze.

Das Gelingen dieser Arbeit wäre sicher nicht möglich gewesen ohne die liebevolle, moralische und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung meiner Eltern Rolf und Charlotte Schriefer.
Euch danke ich für das Ermöglichen meines beruflichen und persönlichen Weges.

8. Lebenslauf

Persönliches

Geburtsdatum: 4. April 1981 in Winsen/Luhe

Familienstand: Ledig

Aus- und Weiterbildung

Seit 2010	Weiterbildungsassistent für Urologie Martiniklinik am UKE (Prof. Hartwig Huland)
2008 - 2010	Chirurgische Basisweiterbildung (*Common Trunk*) Krankenhaus Reinbek St. Adolf-Stift (Prof. Tim Strate)
2008	Abschluss des Medizinstudiums und Approbation als Arzt
2007	Praktisches Jahr am UKE Hamburg (Wahlfach Urologie)
2006	*Undergraduate clinical elective* Jewish General Hospital, Emergency Department McGill University; Faculty of Medicine; Montréal, Kanada
2004	Beginn der Dissertation in der Med. Klinik I des UKE
2003	Ärztliche Vorprüfung
2001	Beginn des Medizinstudiums am UKE Hamburg
2000 - 2001	Freiwilliges Soziales Jahr in der Krankenpflege des DRK Krankenhauses Hamburg-Rissen
2000	Abitur am Gymnasium Winsen/Luhe

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2006 auf der 22. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) unter dem Titel „*Rapid Quantification Of Telomerase Activity In Liver Tissue Samples To Detect Human Hepatocellular Carcinoma*“ als Poster veröffentlicht.

Das Abstract hierzu wurde in der „Zeitschrift für Gastroenterologie“ 2006; 44 publiziert.

10. Anhang

10.1 Patienteneinwilligung in die Probenverwertung zu Forschungszwecken

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Martinistraße 52
20246 Hamburg
www.uke.uni-hamburg.de

Patienteninformation zur Einwilligung

in die Verwendung von Probenresten (die zu Behandlungszwecken entnommen wurden) zu wissenschaftlichen Forschungszwecken

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

soweit es für Ihre Behandlung erforderlich ist, werden mit Ihrer Einwilligung Blut- und häufig auch Gewebeproben entnommen. Diese Proben werden den Erfordernissen Ihrer Behandlung entsprechend aufbewahrt und verwendet. Für Ihre Behandlung nicht mehr benötigte Probenreste möchten wir gern zusammen mit Ihren medizinischen und persönlichen Angaben zu Forschungszwecken sammeln und verwenden. Bei den medizinischen und persönlichen Angaben handelt es sich z.B. um Art und Verlauf der Erkrankung, Behandlungsart, sowie Alter und Geschlecht der Patienten.

Ziel der Forschung mit Probenresten ist neben der Verbesserung der medizinischen Diagnostik und Therapie die Krankheitsverhinderung sowie die Verbesserung der Lebensqualität während der Behandlung.

Ihre Probenreste sowie die medizinischen und persönlichen Angaben werden vor der Weitergabe für wissenschaftliche Zwecke in Forschungslabors des UKE von medizinischem Fachpersonal in den behandelnden Krankenhauseinheiten pseudonymisiert. Dies bedeutet, dass alle Ihre Identifikationsmerkmale, wie z.B. Ihr Name, durch einen Code ersetzt werden. Vor einer Weitergabe von Probenresten an Dritte wird die Zuordnungsmöglichkeit der Probenreste entweder ganz aufgehoben (sog. Anonymisierung) oder es wird - wenn der Forschungszweck bei einer Anonymisierung nicht zu erreichen wäre - eine weitere Pseudonymisierung vorgenommen. Damit ist sichergestellt, dass die mit Ihren Probenresten Forschenden keinen Bezug zu Ihnen herstellen können.

Eine Re-Identifizierung Ihrer Person erfolgt nur, wenn davon auszugehen ist, dass durch die Forschungserkenntnisse Ihr Behandlungsverlauf positiv beeinflusst werden könnte.

Die pseudonymisierten Probenreste werden unter Berücksichtigung der gesetzlichen Bestimmungen über einen Zeitraum von maximal 30 Jahren aufbewahrt. Über den gleichen Zeitraum werden auch die pseudonymisierten medizinischen und persönlichen Patientendaten gespeichert.

Einwilligungserklärung

Vor- und Nachname der Patientin/des Patienten: _____

Geb.-Datum:_____ Anschrift: _____

Ich bin damit einverstanden, dass Reste der mir im Zusammenhang mit meiner Behandlung entnommenen Blut- und Gewebeproben, so wie es in der vorstehenden Patienteninformation beschrieben wird, in pseudonymisierter Form zu allgemeinen wissenschaftlichen Forschungszwecken gesammelt sowie verwendet werden und zu diesem Zweck meine medizinischen und persönlichen Daten in pseudonymisierter Form verarbeitet werden.

Meine Einwilligung umfaßt nur die Verwendung der Reste von Proben, deren Entnahme im Zusammenhang mit meiner Behandlung erforderlich ist. Jede Entnahme von Proben zum ausschließlichen Zweck der Forschung bedarf meiner zusätzlichen schriftlichen Zustimmung nach ausführlicher Information und Aufklärung.

Mir ist bekannt, dass meine Einwilligung freiwillig ist und mir durch eine Verweigerung keine Nachteile für meine Behandlung entstehen. Ich habe das Recht, meine Einwilligung jederzeit gegenüber der Klinikleitung mit Wirkung für die Zukunft zu widerrufen und nach meiner Wahl zu bestimmen, ob die Probenreste und meine Daten vernichtet bzw. gelöscht oder anonymisiert werden sollen.

Hamburg, den _____ _____

(Unterschrift der Patientin/des Patienten)

_____

(Bei minderjährigen Patienten Name - in Druckbuchstaben - und Unterschrift des/der Sorgeberechtigten)