„Nachweis der Telomeraseaktivität bei Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich“

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Jürgen Sonntag, geboren am 13.12.1972 in Stollberg / Sachsen

Gutachter:

1. Prof. Dr. **Uwe Claussen**, Jena
2. Prof. Dr. **Reinhard Wetzker**, Jena
3. Prof. Dr. **Hartwig Kosmehl**, Erfurt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.10.2007

Abkürzungsverzeichnis

ACC	adenocystoid carcinom, Adenozystisches Karzinom
ALT	alternative lenghtening of telomere
bp	Basenpaar(e)
aTA	absolute Telomeraseaktivität
beta-ME	beta-Mercaptoethanol
cDNA	copy-DNA
DCC-Gen	deleted in colon cancer-gen
DDW	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleidacid, Desoxyribonukleinsäure
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithiothreit
G	histopathologisches Grading
HAG	Hochaktivitätsgruppe
Hb	Hämoglobin
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma, Plattenepithelzellkarzinome im Kopf-Hals-Bereich
HP	Hypopharynx
HRT-18	human rectal tumor-18, humaner Rektumtumor-18 (Zellinie)
(h)TERC	(humane) Telomerase RNA-Komponente
(h)TERT	(humane) Telomerase Reverse Transkriptase
ISH	in-situ-Hybridisierung
kd	Kilodalton
kbp	Kilobasenpaare
L	Larynx
M	Grad der Metastasierung in der pTNM-Klassifikation
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
MW_{pos}	Mittelwert aller Werte größer Null
N	Lymphknotenkategorie in der pTNM-Klassifikation
(N0)	Lymphknoten frei von Tumorzellen
(N+)	Lymphknoten enthält Tumorzellen

NAG	Niedrigaktivitätsgruppe
NSCLC	non small cell lung cancer, nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
OC	oral cavity, Mundhöhle
OD	Optische Dichte
OP	Oropharynx
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PNA	peptide nucleic acid, Peptid-Nukleinsäuren
(R-)	telomerasenegative Resektionsränder
(R+)	telomerasepositive Resektionsränder
RB	Retinoblastom-Gen
RNA	Ribonucleidacid, Ribonukleinsäure
rTA	relative Telomeraseaktivität
RTQ-PCR	real-time quantitative PCR
SA	Standardabweichung
SCC	squamous cell carcinom, Plattenepithelzellkarzinom
siRNA	short-interfering RNA
T	Tumorkategorie in der pTNM-Klassifikation
TA	Telomeraseaktivität
(h)TEP 1	(humane) Telomerase-Protein-Komponente 1
TRAP	Telomeric-Repeat-Amplification-Protokoll
TRF	telomeric repeat binding faktor

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Zusammenfassung		1
1.	Einleitung	2
1.1	Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich	3
1.1.1	Epidemiologie	3
1.1.2	Ätiologie	4
1.1.3	Tumorklassifikation und Prognose von Kopf-Hals-Tumoren	5
1.2	Die Telomere	7
1.2.1	Struktur und Funktion	7
1.2.2	Rolle der Telomere in der Zellalterung, des Zelltodes, der Zellimmortalisation und der Onkogenese	10
1.3	Das Enzym Telomerase	11
1.3.1	Struktur und Funktion	11
1.3.2	Regulation der Telomerase, Rolle in der Zellalterung, des Zelltodes, der Zellimmortalisation und der Onkogenese	13
1.4	Nachweisverfahren der Telomeraseaktivität	18
1.5	Diagnostisches und prognostisches Potential des Nachweises von Telomeraseaktivität allgemein	19
1.6	Diagnostisches und prognostisches Potential des Nachweises von Telomeraseaktivität im Kopf-Hals-Bereich	23
1.7	Therapeutisches Potential der Telomeraseinhibierung	25
1.8	Eigene Arbeit	28
2.	Material und Methoden	29
2.1	Proteingewinnung aus den Gewebeproben	29
2.2	Telomerasereaktion	31
2.3	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.4	Gelelektrophorese	32
2.5	Positivkontrollen	33
2.5.1	Interner Standard	33

2.5.2	Externer Standard	34
2.6	Negativkontrolle	35
2.7	Zusätzliche Untersuchungen	35
2.7.1	RNAase-Behandlung	35
2.7.2	Untersuchung zum Verlust an Enzymaktivität	35
2.7.3	Messung der Hämoglobinkonzentration	36
2.8	Auswertung der Ergebnisse	37
3.	Ergebnisse	39
3.1	Positivkontrollen	43
3.1.1	Interner Standard	43
3.1.2	Externer Standard	45
3.2	Negativkontrolle	46
3.3	Zusätzliche Untersuchungen	47
3.3.1	RNAase-Behandlung	47
3.3.2	Untersuchung zum Verlust an Enzymaktivität	47
3.3.3	Messung der Hämoglobinkonzentration	48
3.4	Ergebnisse der Gewebeproben	51
3.4.1	Ergebnisse der Proben der Mundschleimhaut	51
3.4.2	Ergebnisse der Proben der Tumorgewebe	52
3.4.3	Ergebnisse der Proben der Resektionsränder	56
3.4.3.1	Fälle mit telomerasepositiven Resektionsrändern (R+)	59
3.4.3.2	Fälle mit telomerasenegativen Resektionsrändern (R-)	63
3.4.3.3	Vergleich zwischen Fällen mit telomerasepositiven und telomerasenegativen Resektionsrändern	66
3.4.3.4	Vergleich zwischen hoch- bzw. niedrigtelomerasepositiven Tumoren und den entsprechenden Resektionsrändern	68
3.4.4	Ergebnisse der Proben der Lymphknotengewebe	69
3.4.4.1	Fälle mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (N+)	71
3.4.4.2	Fälle ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen (N0)	75
3.4.4.3	Vergleich zwischen Fällen mit Lymphknotenmetastasen (N+) und ohne Lymphknotenmetastasen (N0)	80
3.4.5	Ergebnisse der Fälle nach dem Rezidivverhalten	82
3.4.5.1	Fälle mit Auftreten eines Rezidivs	82

3.4.5.2	Fälle ohne Auftreten eines Rezidivs	88
3.4.5.3	Vergleich zwischen Rezidivfällen und rezidivfreien Fällen	94
4.	Diskussion	97
4.1	Bewertung der Methodik	97
4.1.1	Das TRAP-Assay	97
4.1.2	Qualitätskontrollen	99
4.1.2.1	Interner Standard	99
4.1.2.2	Externer Standard	100
4.1.2.3	Negativkontrolle	100
4.1.3	Untersuchung zum Verlust an Enzymaktivität	101
4.1.4	Messung der Hämoglobinkonzentration	101
4.1.5	Quantifizierung der Telomeraseaktivität	101
4.2	Bewertung der Untersuchungsergebnisse	102
4.2.1	Mundschleimhaut	102
4.2.2	Tumoren	103
4.2.3	Resektionsränder	107
4.2.4	Lymphknoten	109
4.3	Rezidiv-Verhalten der Fälle	110
4.4	Diagnostisches und prognostisches Potential des Nachweises von Telomeraseaktivität im Kopf-Hals-Bereich	111
4.5	Ausblicke zum therapeutischen Potential der Telomeraseinhibierung	112
5.	Schlussfolgerungen	114
6.	Literatur	

Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Danksagung

Lebenslauf

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Telomeren und die Beschreibung des telomerstabilisierenden Enzyms, der Telomerase, in den 80er Jahren ließen eine wichtige Rolle der Telomerase in der Zellzykluskontrolle und damit auch der Tumorbiologie vermuten. Mit der Entwicklung des TRAP-Assays Anfang der 90er Jahre folgten u.a. umfangreiche Untersuchungen an verschiedensten Tumorarten des Menschen, um die Rolle der Telomerase im Prozess der Kanzerogenese zu verstehen.
In diesem Sinne war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit, an Gewebeproben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren den Nachweis von Telomeraseaktivität zu führen und zu prüfen, ob eine Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern des pTNM-Klassifikationssystems vorliegt. Untersucht wurden mit einem modifizierten Protokoll des TRAP-Assays 213 Gewebeproben von Tumoren, Lymphknoten, histopathologisch tumorzellfreien Resektionsrändern und Mundschleimhaut von 45 Patienten.

Im Ergebnis der eigenen Arbeit zeigt sich die Tendenz (ohne statistische Signifikanz) einer Assoziation der Telomeraseaktivität mit dem Tumorstadium und dem Grading, Signifikanz mit dem Krankheitsstadium im Sinne des Früh- und Spätstadiums, jedoch keine Assoziation mit dem Lymphknotenstatus. Der Befund vergleichsweise hoher Telomeraseaktivität in N0-Tumoren bei Rezidivfällen zusammen mit dem Befund eines höheren Anteils telomerasepositiver Tumoren in (N+)-Fällen kann möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass Tumoren mit hoher Telomeraseaktivität zu einer frühzeitigen, lymphogenen Metastasierung neigen, was in weiteren, gezielten Studien näher untersucht werden sollte. Der Telomerasenachweis in Resektionsrändern per se scheint jedoch keine prognostische Relevanz zu haben.

Unter dem Aspekt der Feldkanzerogenese sind Proben der Mundschleimhaut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren als Vergleichsgewebe ungeeignet. Außerdem erscheint aufgrund vielfältiger, negativer Einflussfaktoren das sehr sensitive TRAP-Assay für den Telomerasenachweis in Geweben vom Kopf-Hals-Bereich als wenig spezifisch und sollte durch quantitative und/oder in-situ-Verfahren zumindest ergänzt oder korreliert werden.

1. Einleitung

Die Prognose von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ist bei allen diagnostischen und therapeutischen Fortschritten in den letzten Jahren nach wie vor als relativ schlecht zu beurteilen (Weber und Tannapfel 2002). Außerdem weisen die Tumorerkrankungen in diesem Bereich trotz ähnlichen, klinisch-pathologischen Voraussetzungen häufig sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe auf.

Nicht immer erlauben die bisher bekannten und zur Risikostratifizierung herangezogenen klinischen und histopathologischen Faktoren, wie beispielsweise das pTNM-Klassifikationssystem, den Krankheitsverlauf genau einzuschätzen, weshalb man bis heute nicht dazu in der Lage ist, eine sichere, individuelle Prognose dieser Erkrankungen zu erstellen (Koscielny 2002). Dieser Umstand lässt nach Faktoren suchen, die es ermöglichen sollen, den Krankheitsverlauf und die Wahrscheinlichkeit hinsichtlich des Überlebens einer solchen Erkrankung und das Risiko eines Wiederauftretens in Form eines Regional- oder Lokalrezidivs im individuellen Fall genauer bestimmbar zu machen.

Forschungen auf den Gebieten der Molekularbiologie, der molekularen Tumorgenetik und der Molekularpathologie versuchen, den Prozess der Tumorentstehung und Tumorprogression auf molekularer Ebene zu verstehen und auf dieser Ebene Parameter zu etablieren, die in der klinischen Anwendung präzisere Aussagekraft in Form von diagnostischen bzw. prognostischen Markern oder als therapeutisches Target besitzen könnten. Unter diesem Gesichtspunkt wurde auch das erst in den letzten Jahren beschriebene Enzym Telomerase, dass Zellen unbegrenzte Teilungsfähigkeit ermöglicht, zum Gegenstand intensiver Forschungen.
Auch die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Bestimmung der Telomeraseaktivität bei Patienten mit Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich und untersucht ihre mögliche Korrelation zu den traditionellen, prognostischen Parametern des pTNM-Klassifikationssystems. Nach einer kurzen Charakterisierung von Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich erfolgen einleitend zum besseren Verständnis der Funktion der Telomerase und ihrer Rolle im Prozess der Tumorentstehung einige detaillierte Ausführungen zu einer speziellen Struktur der DNA, den Telomeren, sowie den eng damit verbundenen Themen der Zellalterung, des Zelltodes, der Zellzykluskontrolle und dem Phänomen der Zellimmortalisierung.

1.1 Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich

1.1.1 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit stellen die Kopf-Hals-Tumore die 6. häufigste Tumorentität der männlichen Bevölkerung dar (Boring et al. 1992). Über 95% der Kopf-Hals-Malignome gehen vom Plattenepithel der Mundhöhle, des Pharynx oder Larynx aus (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC), deren Prognose von der ursprünglichen Lokalisation des Tumors und verschiedenen klinisch-therapeutischen Charakteristiken abhängt (Strong et al. 1995). 50% der Patienten sterben innerhalb 5 Jahren nach Diagnosestellung. Damit zählt die 5-Jahres-Überlebensrate zu den niedrigsten unter den häufigeren Tumoren (Dahse und Koscielny 1996).

In Deutschland machen Kopf-Hals-Tumore nach der Statistik des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg von 1999 jährlich etwa 3% aller malignen Neubildungen aus. In einer Liste der 20 häufigsten Tumore liegen die Malignome der Mundhöhle und des Pharynx an Stelle 6 bei Männern bzw. 17 bei Frauen mit einem Anteil von 3,9% (Männer) bzw. 1,2% (Frauen) aller Tumorerkrankungen. Das Larynxkarzinom, das bei Frauen nicht zu den 20 häufigsten Karzinomen zählt, steht bei Männern mit einem Anteil von 1,4% an Stelle 14.

Wie der SEER-Report des National Cancer Institute in den USA in seinem Programm 2000 aufführt, stehen unter den 24 aufgelisteten Malignomen die Larynxkarzinome an Stelle 10 und die Malignome der Mundhöhle und des Pharynx an Stelle 14. Dabei beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Larynxtumoren 66% in der weißen gegenüber 54% der schwarzen Bevölkerung. Schlechter ist die Prognose der Mundhöhlen- und Pharynx-Malignome mit 56% bzw. 35%.

In Indien und den meisten Ländern Südostasiens ist das Mundhöhlenkarzinom die häufigste Neoplasie (Sankaranarayanan 1990).

1.1.2 Ätiologie

Slaughter und Mitarbeiter (1953) beobachteten, dass Patienten mit dysplastischen bzw. neoplastischen Erkrankungen der Mundhöhle mitunter multifokale Karzinome einerseits und Karzinome mit zusätzlichen, vom Karzinom jedoch lokal unabhängigen Dysplasien und multifokalen Läsionen mit unterschiedlichem, histologischem Charakter von milder Dysplasie bis zum invasiven Karzinom aufweisen konnten. Daraus schlussfolgerten sie ihr Konzept der Feldkanzerogenese, also durch die Einwirkung von Karzinogenen entstehende Neoplasien zeitgleich oder zu unterschiedlichen Zeiten, aber unabhängig voneinander an mehreren Orten eines Gewebes. Daneben entwickelte sich das Modell der Mehrschritt-Karzinogenese. Demnach akkumuliert eine Zelle bis zum Erreichen von Malignität statistisch etwa sechs bis zehn verschiedene, genetische Aberrationen, wobei beispielsweise die Aktivierung zellulärer Regulatorgene (Protoonkogene) und der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen von Bedeutung sind (Renan 1993). Das Konzept der Feldkanzerogenese und das Modell der Mehrschritt-Karzinogenese schließen einander nicht aus.

Auch genetische Läsionen wie eine 9p21 - Deletion, die in einer Arbeit in 85% der invasiven Karzinome der Mundhöhle bzw. des Oropharynx gefunden wurde (Lydiatt 1998), können eine Disposition für HNSCC darstellen.

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches entwickeln sich also als mehrstufiger Prozess aus histologisch definierten Vorstufen, die ihrerseits mit genetischen Veränderungen assoziiert sind. Die Tumorentstehung selbst wird als ein zeitabhängiger Prozess einer Akkumulation von genetischen Veränderungen verstanden (Weber und Tannapfel 2002). Dabei wirken Risikofaktoren (Noxen wie Alkohol, Tabakrauch) dosisabhängig toxisch auf das Plattenepithel, verursachen auf zellulärer Ebene eine Entzündung und auf molekularer Ebene DNA-Veränderungen. Die einsetzenden Regenerations- bzw. DNA-Reparaturvorgänge können sich bei fortsetzendem Einwirken der Noxen erschöpfen, wobei dann eine fehlerfreie Wiederherstellung des Gewebes nicht mehr gewährleistet werden kann. Bei Irreparabilität können genetische Schäden auf die Tochterzellen übergehen, dort fixiert und damit irreversibel werden. Über die Vorstufen der epithelialen Dysplasien kann so bei weiterer Noxenexposition ein Karzinom entstehen (Bartsch et al. 1998 und 2000).

1.1.3 Tumorklassifikation und Prognose von Kopf-Hals-Tumoren

Die Klassifikation und Stadieneinteilung der Tumoren nach dem TNM/pTNM-System der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (Sobin und Wittekind 1997) gilt auch für Patienten mit HNSCC als derzeitiger „Goldstandard“ für die Beurteilung der Prognose, wobei unterschieden wird zwischen TNM als klinische Klassifikation und pTNM als pathologische Klassifikation. Nach diesem System ist definiert:

T = die lokale Ausdehnung eines Tumors
N = Lymphknotenstatus; der Befall von Lymphknoten mit Tumorzellen unter Berücksichtigung der Lymphknotenstation
M = Metastasierung; das Vorhandensein von Fernmetastasen

Die detaillierte Klassifikation richtet sich nach der Tumorlokalisation. Allerdings lassen sich die T-Kategorien der einzelnen Tumorlokalisationen nicht miteinander vergleichen. So weist beispielsweise ein Glottiskarzinom der Kategorie T2 eine deutlich bessere Prognose auf als ein Hypopharynxkarzinom der gleichen T-Kategorie (Spiro et al. 1986).

In mehreren Studien wurde der Lymphknotenstatus (N-Kategorie) als wichtigster, unabhängiger Faktor zur Prognosebeurteilung ermittelt. Einzelne, kleine Lymphknoten mit einer Größe unter 3 cm haben nur einen geringen Effekt auf die Prognose, während größere wie auch kontralateral oder bilateral befallene Lymphknoten signifikant ungünstige Auswirkungen auf das Krankheitsüberleben haben. Extrakapsuläres Wachstum von Lymphknotenmetastasen ist ein prognostisch ungünstiger Faktor für das Auftreten eines lokoregionalen Rezidives (Strong et al. 1995).

Außerdem ist eine klinische Stadiengruppierung in vier Stufen gebräuchlich, die sich aus der T-, N- und M-Kategorie zusammensetzt. Zum Beispiel entsprechen zwei Mundhöhlenkarzinome in den Kategorien T1N1M0 und T3N0M0 jeweils der Stadiengruppierung 3.

Eine weitere Klassifikation ist das histopathologische Grading. Es beschreibt den Grad der histologischen Differenzierung eines Tumors, die Malignität. Ist ein Malignom zellmorphologisch gut ausdifferenziert, wird es als „niedrigmaligne“ bezeichnet, umgekehrt wird ein schlecht differenzierter Zelltyp als „hochmaligne“ definiert. Die Definitionen der G-Kategorie gelten für alle Kopf- und Halslokalisationen, ausgenommen die Schilddrüse.

GX = Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1 = gut differenziert
G2 = mäßig differenziert
G3 = schlecht differenziert
G4 = undifferenziert

Desweiteren beschreibt eine R-Klassifikation das Fehlen oder Vorhandensein von Residualtumor nach einer Behandlung.

RX = Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0 = Kein Residualtumor
R1 = Mikroskopischer Residualtumor
R2 = Makroskopischer Residualtumor

Die Prognose von Malignomen im Bereich der Mundhöhle ist von der tatsächlich befallenen, anatomischen Struktur abhängig. Mit 15% 5-Jahres-Überlebenszeit ist die Prognose dabei sehr schlecht. Nur wenig günstiger ist sie bei Zungenrandtumoren.
Ähnlich ist die Prognose des Hypopharynxkarzinoms. Es wird wegen uncharakteristischer Symptomatik oft erst spät erkannt und metastasiert in 70% der Fälle sehr früh. Die 5-Jahres-Überlebenszeit erreichen nur etwa 20% der Patienten.
Die Prognose des Oropharynxkarzinoms wird durch Übergreifen auf Gaumenbögen, weichen Gaumen und vor allem den Zungengrund erheblich verschlechtert.
Die Prognose des Larynxkarzinoms ist von seiner genauen, anatomischen Lokalisation abhängig und die 5-Jahres-Überlebenszeit kann beispielsweise beim Stimmlippenkarzinom 90%, beim supraglottischen Karzinom hingegen nur 60% betragen (Boenninghaus 1996).

1.2. Die Telomere

1.2.1 Struktur und Funktion

McClintock und Müller beobachteten bei ihren Experimenten in den 30er Jahren, dass die Endabschnitte von Chromosomen den Chromosomen Stabilität im Sinne von struktureller Integrität verleihen. Sie beobachteten bei Verlust dieser „Schutzkappen“ Strukturveränderungen der Chromosomen und unphysiologische Verbindungen der Chromosomen miteinander. Müller prägte für diesen Teil der Chromosomen den Begriff „Telomer“ (Greider 1996). Die genaue Struktur der Telomere wurde zunächst bei Wimperntierchen beschrieben (Blackburn und Gall 1978) und im Laufe weiterer Untersuchungen wurden sie für zahlreiche weitere Lebewesen charakterisiert und ihre Funktionen näher untersucht. Telomere bestehen aus einer Reihe sich wiederholender Oligonukleotidsequenzen. Länge und Basenfolge unterscheiden sich dabei zwischen den Spezies (Bacchetti 1996), wobei die Länge und Basenfolge humaner Telomere mit etwa $(TTAGGG)_{150\text{-}2000}$, also 0,9-12 kbp angegeben wird (Morin 1995). Das Längenspektrum der Telomere anderer Spezies reicht von weniger als 36 bp bei einigen Ziliaten bis zu mehr als 150 kbp bei Mäusen (Kalluri 1996). Die Telomere bewahren die Enden nativer Doppelstrang-DNA (ds-DNA) beispielsweise vor enzymatischer Degradation durch Nukleasen, terminaler Fusion von Chromosomen, irregulärer Rekombination mit chromosomeninterner DNA und dem Verlust der Funktion bei der strukturellen Organisation des Zellkerns (Blackburn 1991), wobei sie während der Zellteilung als Anheftungspunkte der Chromosomen an die Kernmatrix dienen (de Lange et al. 1990). Telomere spielen außerdem eine Rolle bei der korrekten Teilung der Chromatiden während der Replikation, bei der Steuerung der Genexpression und der Zellalterung (Greider und Blackburn 1996).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Telomeren in den 80er Jahren ließen die Existenz eines Enzyms vermuten, das in der Lage ist, die Telomerlänge je nach Zelltyp auf ungefähr konstanter Größe zu halten. Arbeiten wie die von Shampay et al (1984) bestätigten diese Hypothese und weitere, gezielte Untersuchungen führten zur Entdeckung dieses telomerstabilisierenden Enzyms - der Telomerterminal-Transferase oder Telomerase (Greider und Blackburn 1985). Der Nachweis der Telomerase in kultivierten, menschlichen Tumorzellen wurde 1989 erstmals von Morin beschrieben. Für die weitere Entwicklung der Forschung waren auch zwei andere Aspekte von wegweisender Bedeutung: Die bis dahin geltende Annahme,

Zellen könnten sich beliebig oft teilen, widerlegten Hayflick und Moorhead 1961 mit ihrer Arbeit an kultivierten, menschlichen Fibroblasten. Sie zeigten, dass nach etwa 50 Zellteilungen diese Zellen ihre weitere Vermehrung durch Teilung einstellten und einige Zeit nach der letzten Teilung die Zellen in der Kultur zugrunde gingen. Dieses Phänomen eines begrenzten Wachstumspotentials der Zellen, welches offenbar durch ihr Alter oder die Anzahl ihrer Teilungen wie eine „mitotische Uhr" limitiert wird, bezeichneten sie als „Zellalterung" (Zellseneszenz). In den 70er Jahren griff der sowjetische Wissenschaftler Olownikow diese These auf und brachte sie mit einem von Watson 1972 beschriebenen Phänomen bei der DNA-Replikation in Zusammenhang: Die für die DNA-Replikation in der DNA-Synthesephase verantwortliche DNA-Polymerase repliziert nur in 5'⇒3'-Richtung. Demzufolge wird einer der beiden DNA-Stränge, der „leading strand" (5'⇒3'), kontinuierlich, der andere DNA-Strang, der„lagging strand" (3'⇒5'), diskontinuierlich mit Hilfe von RNA-Primern repliziert. Nach Entfernung der Startsequenzen am 5'-Ende des jeweiligen Tochterstranges ist es der DNA-Polymerase nicht möglich, die so entstandene Lücke zu schließen, wobei es zu einem sich progredient verkürzenden 5'-Strang kommt. Die Telomere verlieren somit bei jeder Zellteilung einige DNA-Sequenzen. Dieses Phänomen wird heute als „End-Replikationsproblem" bezeichnet. Olownikow vermutete, dass somatische Zellen diese progrediente Telomerverkürzung nicht ausgleichen können und ab einem bestimmten, kritischen Grad der Telomerlänge diese Zellen ihre Teilung einstellen würden (Olownikow 1971 und 1973).

Weiterführende Untersuchungen zu diese Thesen wie die Arbeiten von Harley und Greider (1990) konnten zeigen, dass sich Telomere von Zellen in vitro verkürzen, während sich die Telomerlänge nicht verändert, wenn die Zellen nicht proliferierten und das Tumorzellen wie die des Kolonkarzinoms wesentlich kürzere Telomere aufwiesen als normales Gewebe (Hastie 1990). Die Ergebnisse dieser Arbeiten unterstützten die These zur progressiven Verkürzung der Telomere infolge von Zellteilungen, worin ein Schlüsselprozess der Zellalterung gesehen wird, der zum Verlust replikativer Kapazität führt, woraus sich die Telomerhypothese (Harley 1991, Harley et al. 1992) ableitete, während die Möglichkeit der Telomerstabilisierung einen Weg zur Zellimmortalisation darstellt, d.h. unbegrenztes Wachstum bzw. Teilungsvermögen durch unlimitiertes, replikatives Potential (Greider 1994, Schneider-Stock et al. 2002). Weitere Untersuchungen führten zur Entdeckung von spezifisch mit den Telomeren interagierenden Proteinen, den Telomer-assoziierten Proteinen, die Tabelle 1.1 aufzeigt.

Tab. 1.1 Komponenten der Telomer-assoziierten Proteine, Alternativnamen, Genlokus, Kurzbeschreibung der Funktion und Referenz (aus: Dahse und Mey 2001)

Humane Telomer-assoziierte Proteine	**Alternativenamen**	**Genlokus**	**Funktion**	**Referenz**
TRF (telomeric repeat binding faktor)	TRF1 (telomere repeat binding faktor-1)	8q13	Regulierung der Telomerlänge	Chong et al. 1995
TRF2 (telomeric repeat binding faktor 2)	-	16q22.1	Protektion der Chromosomen-enden	Broccoli et al. 1997 Bilaud et al. 1997
TIN2 (TRF1-interacting nuclear protein2)	-	-	an der Funktion von TRF1 beteiligt	Kim et al. 1999

Arbeiten wie die von van Steensel und de Lange (1997) charakterisierten die Telomer-assoziierten Proteine strukturell und funktionell näher. Dabei zeigte sich, dass die Überexpression des TRF1-Proteins zu einer kontinuierlichen Verkürzung der Telomere in HeLa-Zellkulturen führte, während es bei der dominant-negative Mutante hingegen, bei der die Bindung von endogenem TRF1 an das Telomer inhibiert ist, zu einer Verlängerung der Telomere kam. TRF1 beeinflusst die Telomerelongation im Sinne eines negativen Feedback-Signals: lange Telomere binden mehr TRF1, welches die Telomerase am Telomer inhibiert, wohingegen zunehmende Telomerverkürzung zu einer Abnahme von gebundenem TRF1 am Telomer führt, was die Inhibition aufhebt.

Wird eine dominant-negative Mutante des TRF2-Proteins exprimiert, so sind Fusionen der Chromosomenenden nachweisbar. Das TRF2-Protein verhindert demnach die Fusion der Chromosomenenden. Weiterführende Untersuchen lassen vermuten, dass die telomer-assoziierten Proteine mit weiteren, zwischengeschalteten Proteinen interagieren, die die Telomerlänge durch Modulation der Telomeraseprozessivität an den Chromosomenenden kontrollieren (van Steensel et al. 1998).

1.2.2 Rolle der Telomere in der Zellalterung, des Zelltodes, der Zellimmortalisation und der Onkogenese

Zellalterung (Zellseneszenz) und programmierter Zelltod (Apoptose) sind zwei fundamentale, biologische Mechanismen, die die Proliferationskapazität, das Überlebenspotential, Alter und Tod einer Zelle regulieren. Dabei stehen sich bei der Regulation des Zellzyklus' antiproliferative und proliferative Mechanismen gegenüber.

Um dem Zelltod zu entgehen, müssen sich entwickelnde Tumorzellen multiple „Proliferationsbarrieren" durch sukzessive, genetische Ereignisse überwinden, wobei jedes für sich eine klonale Ausweitung zum Malignom hin bedeutet. Zellen, die durch Umgehung der Apoptose faktisch unsterblich geworden sind, werden deshalb als Immortalzellen bezeichnet (Bacchetti 1996).

Ausgehend von der Telomerhypothese wurde ein Modell der Zellalterung und Immortalisierung vorgeschlagen, worin zwei als M1 und M2 bezeichnete Mortalitätsstadien beschrieben werden (Harley 1991). Es besagt, dass im Zuge der Teilungen somatischer Zellen es zum Verlust telomerischer DNA durch progressive Telomerverkürzung kommt, bis eine kritisch kurze Telomerlänge erreicht ist, die von der Zelle als Signal kritischer DNA-Schädigung erkannt wird und eine erster Regulierungsschritt des Zellzyklus auftritt: die Zellen stellen ihre Teilung ein, es kommt zur Zellzyklusarretierung entsprechend dem „Hayflick-Limit". Dies entspricht dem Mortalitätsstadium M1. Experimente wie die von Shay et al. 1991 und Hara et al. 1991 zeigten die Abhängigkeit der Induktion von M1 von den intakten Tumorsuppressorproteinen p53 und Rb. Weitere tumorsuppressive Signalkaskaden sind inzwischen bekannt (Wright und Shay 1995, Harley 1995).

Überwindet die Zelle dieses Stadium, ist eine limitierte, weitere Zellteilung bis zum Auftreten einer definitiv kritisch kurzen Telomerlänge möglich, nach der es zu einer Anhäufung chromosomaler Aberrationen und infolge dessen zu massiver, genomischer Instabilität kommt (Counter et al. 1992). Dieser Zustand entspricht dem Mortalitätsstadium M2. Immortalität kann jetzt nur erreicht werden, wenn die Verkürzung der Telomere durch telomerlängenstabilisierende Prozesse (telomere maintenance mechanism, TMM) zum Stillstand kommt, bevor sie ihre Funktion der Stabilisierung der Chromosomenenden verloren haben (Wynford-Thomas 1999).

Die Fähigkeit von sich transformierenden Zellen zur Aktivierung der Telomerase bedeutet die Überwindung dieser letzten Barriere der Wachstumskontrolle der Zelle

und kann nun zu unlimitiertem Wachstum, zur Immortalität derselben führen (Wright und Shay 1992). Es wird angenommen, dass etwa sechs essentielle, genomische Alterationen bis zu diesem Vollbild der malignen Entartung einer Zelle notwendig sind, die sich im Erwerb selbststimulierender Wachstumssignale, Verlust der Wachstumskontrolle, Apoptoseresistenz, unlimitiertem Wachstums- bzw. Teilungspotential, Möglichkeit der Angiogenese, der Gewebeinvasion und Metastasierung ausdrückt (Hanahan und Weinberg 2000).

Die Beziehungen zwischen Telomerlänge und Zellproliferation sind sehr komplex wie die derzeit vorliegenden Ergebnisse von Arbeiten an verschiedenen Organismen aufzeigen. Daher kann die Telomerlänge für sich allein betrachtet weder als ein Indikator für die Anzahl der Zellteilungen noch für das Alter eines Organismus herangezogen werden (Blackburn 2000, McEachern 2000).

1.3 Das Enzym Telomerase

1.3.1 Struktur und Funktion

Das Enzym Telomerase ist ein komplexes Ribonukleoprotein. Es katalysiert spezifisch an den Chromosomenenden mit einer enzymeigenen RNA-Komponente als Template die DNA-Synthese de novo in Form von hexameren Oligonukleotiden mit der Basenpaar-Sequenz TTAGGG (in humanen Zellen) an das 3'-Ende der Telomere (Morin 1989). Ihrer Funktion nach ist die Telomerase eine spezialisierte, RNA-abhängige DNA-Polymerase, also eine spezifische, reverse Transkriptase (Holt et al. 1997, Urquidi et al. 1998).

Untersuchungen an Zellen fötaler Gewebe und Keimzellen zeigten, dass während der embryonalen Entwicklung die Telomerase in den meisten Geweben aktiv ist (Wright et al. 1996), wohingegen sie nach der Neonatalperiode im Zuge der Ausdifferenzierung in den meisten, nicht jedoch in allen ausdifferenzierten Körperzellen abgeschaltet, in vielen Malignomen, Präkanzerosen und Dysplasien jedoch wieder aktiviert ist (Shay und Bacchetti 1997, Dhaene et al. 2000).

Tabelle 1.2 listet die drei Hauptkomponenten des etwa 1000 kDa großen Enzymkomplexes auf.

Tab. 1.2 Hauptkomponenten der Telomerase, Alternativnamen, Genlokus, Kurzbeschreibung der Funktion und Referenz (aus: Dahse und Mey 2001)

Humane Telomerase Komponente	Alternative Namen	Genlokus	Funktion	Referenz
TP1 (telomerase-associated protein 1)	hTEP1 (human telomerase protein component-1)	14q11.2	regulatorische Funktion	Harrington et al. 1997
hTRT (human telomerase reverse transcriptase), hEST2	TCS1 (telomerase catalytic subunit) hTERT (human telomerase reverse transcriptase)	5p15.33	katalytische Untereinheit	Nakamura et al. 1997 Meyerson et al. 1997
hTR (human telomerase RNA)	hTERC (human telomerase RNA-component)	3q21-q28	Template für die Anheftung der Nukleotid-sequenzen	Feng et al. 1995

Die RNA-Untereinheit (hTR) bindet spezifisch an die repetierenden Sequenzen der terminalen, telomeren DNA, es erfolgt die Addition der Nukleotide durch die Katalyse der Humanen Telomerase Reversen Transkriptase (hTRT) und die anschließende Translokation des Enzymkomplexes vom Telomer (Feng et al. 1995). Das telomerase-assoziierte Protein interagiert dabei spezifisch mit der RNA-Komponente der Telomerase (Harrington et al. 1997).

Zusätzlich interagieren funktionell mit dem Telomerase-Komplex die Chaperone p23, HSP 70 und HSP 90, wobei p23 und HSP 90 wahrscheinlich eine Rolle bei der korrekten Faltung des Telomerase-Moleküls spielen, ohne die die Neusynthese repetitiver Sequenzen am telomeraseinternen RNA-Template nicht möglich ist. HSP70 wird nach der Formierung des Telomerase-Enzymkomplexes unter ATP-Freisetzung wieder abgespalten (Holt 1999). Untersuchungen an HL60- und HT1080-Fibrosarkom-Zellkulturen zeigten im Ergebnis eine Halbwertzeit der Telomerase von 24 Stunden (Holt et al. 1996), jüngere Ergebnisse an Leukämiezellkulturen dagegen präzisieren auf 5 – 11 Stunden (Hou et al. 2001). Aktuell wird unter den telomerstabilisierenden Prozessen ein ganzer Komplex von Bindungsproteinen und Enzymen verstanden, in dem neben der Telomerase beispielsweise auch die Tankyrasen (ADP-ribose-Polymerasen) eine Rolle spielen, miteinander interagieren und die Telomeraseaktivität beeinflussen (Seimiya 2006).

Physiologisch telomeraseaktive Körperzellen stellen beispielsweise die teilungsaktiven Zellen der regenerativen und immunologischen Gewebe dar. Daher ist Telomeraseaktivität u.a. in folgenden Zellen bzw. Zellverbänden nachweisbar:

- Keimzellen und Fötalzellen (Wright et al. 1996)
- Endometrium (Kyo et al. 1997)
- Fibroblasten, Stratum germinativum der Epithelien und Endothelien (Härle-Bachor et al. 1996, Yasumoto et al. 1996)
- Hämatopoesezellen (Broccoli et al. 1995)
- aktivierte B- und T-Lymphozyten (Hiyama et al. 1995, Counter et al. 1995)

Telomeraseaktivierung kann auch Ausdruck reparativer Vorgänge zur Wiederherstellung der Integrität eines Zellverbandes sein. So ist beispielsweise in normaler Magenschleimhaut keine Telomeraseaktivität nachweisbar (Ahn et al. 1997). Bei Patienten mit Helicobacter-pylori-Infektionen hingegen zeigt sich ein paralleler Anstieg der Telomeraseaktivität mit der Schwere der Erkrankung. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen vermuten, dass diese Infektion, die mit zunehmender Entzündung und damit verbundener Induktion von regenerativen Prozessen einhergeht, zu hTR-Überexpression in Verbindung mit der Reaktivierung der Telomerase führen kann (Kuniyasu et al. 1997).

1.3.2 Regulation der Telomerase, Rolle in der Zellalterung, des Zelltodes, der Zellimmortalisation und der Onkogenese

Experimente, in denen man immortale Zellen mit normalen, humanen Fibroblasten kreuzte, zeigten, dass die entstandenen Hybriden nunmehr nur noch ein limitiertes Zellteilungsvermögen aufwiesen, sie hatten ihre Immortalität verloren (Pereira-Smith und Smith 1983). Wright et al. (1996) zeigten in ihren Untersuchungen, dass diese Veränderungen im Wachstumspotential auch mit dem Verlust der Telomeraseaktivität in diesen Hybridzellen verknüpft waren. Die Mortalität der Hybriden lässt die rezessive Natur zellulärer Immortalität vermuten, welche durch das Wiedereinsetzen der Telomerverkürzung erklärbar wird (Nowak und Chrapusta 1998). Andererseits zeigten die Ergebnisse in einem Experiment mit HL60-Zellen, bei dem man die Extrakte von telomerasepositiven Zellen mit ausdifferenzierten, telomerasenegativen Zellen mischte, dass es in den gemischten Zellextrakten nicht zu einer Abnahme der Telomeraseaktivität kommt, was zeigt, dass es offenbar in ausdifferenzierten Zellen kein diffusibles, direkt telomeraserepressives Molekül gibt (Sharma et al. 1995).

Obwohl in verschiedenen Arbeiten Telomeraseaktivität in allen Zellzyklusstadien nachgewiesen werden konnte, geht man nicht von einem kontinuierlichen Interagieren des Enzyms an den Telomeren während des gesamten Zellzykluses aus. Kontrollmechanismen wie beispielsweise posttranslationale Modifikationen der katalytischen Untereinheit oder anderer Komponenten des Enzymkomplexes wie auch Veränderungen der telomerbindenden Proteine können einen definierten Zeitpunkt der Telomerelongation durch die Telomerase bestimmen (Holt et al. 1997).
Die Tumoren, die im Erwachsenenalter auftreten oder eine höhere Zahl von Mutationen benötigen (beispielsweise das kolorektale Karzinom), zeigen überhäufig kurze Telomere und Telomeraseaktivierung in einem relativ frühen, klinischen Stadium. Tumoren des Kindesalters und solche, die mit weniger Mutationen assoziiert sind wie beispielsweise das Retinoblastom, bestehen im Gegensatz dazu oft aus Zellen mit längeren Telomeren und fehlender Telomeraseaktivität (Bacchetti 1996).
In benignen und prämalignen Läsionen wie beispielsweise dem Fibroadenom der Brust, der benignen Prostatahyperplasie, dem kolorektalen Adenom, dem anaplastischen Astrozytom, dem Meningeom oder dem Leiomyom, konnte größtenteils keine Telomeraseaktivität gefunden werden (Shay und Bacchetti 1997).
Die meisten malignen Tumoren reaktivieren jedoch die Telomerase zur Telomerstabilisierung (Kim 1994), allerdings konnten auch telomeraseunabhängige Wege (alternative lengthening of telomere, ALT) nachgewiesen werden (Bryan et al. 1995 und 1997, Dunham 2000). Dieser Mechanismus wurde sowohl für maligne Erkrankungen wie beispielsweise in einigen Formen von Leukämie (Counter et al. 1995) als auch physiologisch für sich regenerierende Parenchyme wie Leberzellen (Tahara et al. 1995) beschrieben. Man spricht heute vom ALT-Phänotyp, der als sehr häufig für Weichteiltumore, astrozytische Hirntumore und Osteosarkome beschrieben wird und dessen Charakteristika auf genregulatorischer Ebene die Instabilität spezifischer Mikrosatelliten und eine hohe Rate telomerischer Rekombination (Muntoni und Reddel 2005) als auch spezifische Hypoazetylierungen und Methylierungen an Histonen und Modulierungen am hTR-/hTERT-Promotor sind (Atkinson et al. 2005).
Charakteristisch für die Differenzierung somatischer Zellen ist die Repression der Telomerase. Werden die Zellen eines NT2-Teratokarzinoms, ein embryonaler Tumor neuronaler Vorläuferzellen, in einer Zellkultur in vitro mit Retinoinsäure behandelt, kommt es zur Induktion der Differenzierung dieser Zellen hin zu charakteristischen,

postmitotischen ZNS-Neuronen. Das Bild der Oberflächenmarker wandelt sich von der Expression neuroepithelialer Marker unreifer Vorläuferzellen hin zur Ausprägung eines charakteristischen Markerreliefs reifer Neurone. Dabei verlieren diese Zellen in diesem Differenzierungsprozess ihre Telomeraseaktivität (Pleasure et al. 1992, Kruk et al. 1996).

Die Regulation der Telomerase ist komplex und bisher noch nicht vollständig verstanden. Sie schließt Reaktionen wie beispielsweise Telomerase-Genexpression, posttranslationale Protein-Protein-Interaktionen und Protein-Phosphorylierung ein. Bei ihrer Betrachtung sind telomeraseinduzierende und telomeraserepressive Prozesse zu unterscheiden.

Überraschenderweise zeigten Untersuchungen zur RNA-Komponente (hTR), dass sie zwar in immortalen Malignomzellen in zwei bis siebenfach höherer Konzentration gegenüber mortalen Normalzellen vorlag, andererseits aber auch in nicht-telomeraseaktiven, benignen Geweben wie Nieren, Prostata und Leber gehäuft exprimiert wurde (Feng et al. 1995). Weiterführende Arbeiten bestätigten, dass dieser essentielle Baustein des Telomerase-Komplexes für sich allein ein vergleichsweise ungeeigneter Indikator für Telomeraseaktivität in Tumorgeweben ist (Bestilny et al. 1996, Avilion et al. 1996).

Auch die Expression des Telomerase-assoziierten Proteins (hTEP1) korreliert nicht mit der Aktivität des Enzyms und wird in normalen Körperzellen und Tumorgeweben, in mortalen und immortalen Zellen gleichermaßen transkribiert (Harrington et al. 1997, Nakamura et al. 1997, Nakayama et al. 1997). Es scheint sicher, dass eine Repression oder eine erhöhte Transkription der Gene für hTR und hTEP1 nicht ausreichen, um die Reaktivierung der Telomerase in Tumorzellen zu erklären (Schneider-Stock et al. 2002).

Im Gegensatz zu hTEP1 und hTR korreliert die mRNA-Expression von hTERT mit der Telomeraseaktivität. In verschiedenen Arbeiten wie denen von Ito et al. (1998), Kanaya et al. (1998) und Takakura (1998) u.a. fand sich eine sichere Korrelation zwischen hTERT-Expression und der Aktivierung der Telomerase für eine Reihe unterschiedlicher Tumorentitäten. Das Einbringen von hTERT-cDNA in normale Zellen verleiht diesen Zellen Telomeraseaktivität (Weinrich et al. 1997, Nakayama et al. 1998). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Korrelation der hTERT-Expression mit dem Nachweis der Telomeraseaktivität lassen vermuten, dass die Telomeraseaktivität eng an die Transkriptionskontrolle der hTERT gekoppelt ist und das die Aktivierung der hTERT-Transkription mit konsekutiver Telomeraseaktivierung

ein kritisches Ereignis in der Überwindung replikativer Seneszenz, Immortalisation und Karzinogenese darstellt (Takakura 1999). Die relative Quantifizierung der hTERT-mRNA stellt jedoch eher einen Surrogatmarker für Telomeraseaktivität dar, nicht aber den definitiven Beweis dafür (Luzar et al. 2003).

Die Beobachtung eines häufig deletierten, kurzen Armes von Chromosom 3 bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (Whang-Peng et al. 1982) und die Definition eines Tumorsuppressorgens auf dem Chromosom 3p (Killary et al. 1992, Daly et al. 1993) führte in Verbindung mit der Telomeraseforschung zu der näheren Verifizierung dieses Tumorsuppressorgens als ein Telomerase-Repressorgen, welches im Genmapping in der Region 3p21.1-3p21.3 vermutet wird (Ohmura et al. 1995, Newbold 1998). Signalketten, die zur Tumortransformation in Verbindung mit der Aktivierung der Telomerase führen, sind beispielsweise die Überexpression von H-ras-Onkogen (Hahn et al. 1999) und das SV40-large-T-Antigen, welches über eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene Rb/p53 die Zellzykluskontrolle inhibiert (Hahn et al. 1999, Shay et al. 1991). Für den Transkriptionsfakor c-Myc konnte in Verbindung mit dem Sp1-Protein, ebenfalls ein Transkriptionsfakor, eine Aktivierung der hTERT Genexpression gezeigt werden (Takakura et al. 1999, Kyo et al. 2000). Damit in Verbindung steht auch das Tumorsuppressor-Protein p53, dessen Funktion die Inhibierung der Tumortransformation durch Zellzyklusarretierung und/oder Triggerung der Apoptose ist. In ihrer Arbeit zeigten Xu et al. (2000), dass p53 die Sp1-Bindung an den hTERT-Promotor inhibiert.

Man geht heute bei p53 von einer ganzen Gruppe proapoptotischer Proteine aus, die neben vielen anderen Tumorsuppressoren an der Repression der hTERT-Expression beteiligt sind. Zu ihnen gehört auch p73. Es konnte gezeigt werden, dass die forcierte Expression von p73 in eine Downregulation der Telomerase resultiert. Andererseits induziert der siRNA-vermittelte Knockdown von p73 die hTERT-Expression ebenso wie eine Isoform von p73, der die Transaktivator-Domän fehlt (DeltaNp73). Diese aberante Form von p73 ist in Tumorzellen häufig überexprimiert und funktioniert in dieser Form vermutlich als Onkogen und für DeltaNp73 konnte gezeigt werden, dass es die repressiven Effekte der p53-ähnlichen Proteine zu antagonisieren vermag, was zur Induktion der hTERT-Expression in telomerasenegativen Zellen führt. Die Daten sprechen für eine wichtige Regulatorfunktion von p73 auf die Telomeraseaktivierung (Beitzinger et al. 2006, Racek et al. 2005). An Epithelzellen konnte in vitro gezeigt werden, dass die Inaktivierung der pRb/p16INK4a-Signalkaskade zur Aktivierung der Telomerase und zur Immortalisation dieser Zellen

führte (Kiyono et al. 1998). Die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene p16INK4A, p53 und Defekte am Retinoinsäure-Rezeptor-beta spielen bei der Immortalisation von Keratinozyten in humanen Epithelzellkarzinomen eine wesentliche Rolle (Loughran 1997).

Fiedler et al. (2002) wiesen an Kopf-Hals-Plattenepithelzellkarzinomen (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) ein gehäuftes Auftreten von Heterozygositätsverlust (loss of heterozygosity, LOH) in der Chromosomenregion 9p12-21 nach, die zum Funktionsverlust der dort lokalisierten Tumorsuppressorgene p16INK4A, p14ARF und p15INKB führen können. Soria et al. (2001) konnten in ihren Untersuchungen eine deutliche Assoziation zwischen Telomeraseaktivierung, Überexpression von cyclinD1 und Ki67 und p16-Expression demonstrieren.

Eine andere, vergleichende Untersuchung zu Apoptose-Mechanismen und der Aktivität proliferationsinduzierender Enzyme in HNSCC konnte ein gemeinsames Auftreten von Telomeraseaktivität und Überexpression von apoptoseinhibierenden Proteinen der Bcl-2-Familie und Survivin zeigen (Sharma et al. 2004).

In hormonabhängigen Zellen vermag auch das Steroidhormon Estrogen die Telomerase über direkte und indirekte Effekte am hTERT-Promotor zu aktivieren (Kyo et al. 1999).

Mit den Arbeiten von Blasco et al. (1997) und Zakian (1997) an mTR-Gen-deletierten Knockout-Mäusen, die dadurch nicht mehr in der Lage waren, die RNA-Komponente der Telomerase zu exprimieren und dennoch eine davon völlig unbeeinflusste Fähigkeit zu maligner Transformation und Tumorformation zeigten, wurde die Rolle der Telomerase in der Krebsentstehung kritisch hinterfragt. Allerdings sind wegen grundsätzlich unterschiedlicher, genomischer Organisation bei Mäusen, auch die der telomerischen DNA, die Ergebnisse genomischer Untersuchungen aus diesen Tiermodellen nicht ohne weiteres auf menschliche Zellen übertragbar (Kipling 1997).

Die Schlüsselrolle der Telomerase im Prozess der Immortalisation ist in der Stabilisierung der Telomerlänge, nicht zwangsläufig in ihrer Verlängerung zu sehen (Wright 2001).

In einem Minireview fassen Sung et al. (2005) die Befunde zu zytosolischen Vorkommens von TERT zusammen, welche speziell in Neuronen eine gut beschriebene, zellprotektive Rolle gegenüber zytotoxischem Stress wie Radikalbildung durch Modulation des zytosolisch-mitochondrialen Kalziumstoffwechsels zu spielen scheint.

1.4 Nachweisverfahren der Telomeraseaktivität

Der Nachweis der Telomerase kann über die Aktivität des Holoenzyms oder den Nachweis von dessen Komponenten auf mRNA- oder Protein-Ebene geführt werden. Grundlage vieler Untersuchungen bildete zunächst der Nachweis der Enzymaktivität mit dem von Kim (1994) beschriebenem TRAP-Assay (Telomeric Repeat Amplification Protocol, TRAP). Dieses besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

1. In einem Proteinextrakt wird ein zugegebener Primer bei Anwesenheit von Telomerase spezifisch um jeweils 6 Basenpaare verlängert.
2. In der anschließenden PCR unter Zugabe des komplementären Primers und einer DNA-Polymerase werden die in Schritt 1 entstandenen Syntheseprodukte vervielfältigt.
3. In einer gelelektrophoretischen Auftrennung werden die PCR-Produkte dargestellt. Der Abstand von jeweils 6 Basenpaaren lässt ein typisches, leiterartiges Bild entstehen.

Modifikationen des Original-Protokolls verbesserten Sensitivität und Reliabilität. Varianten mit radioaktiv markierten Nukleotiden, fluoreszenzmarkierten Primern oder die Färbung von unmarkierten Amplifikationsprodukten mit Silber, SYBR-Green-I, oder Ethidiumbromid sind beschrieben (Aldous et al. 1997, Wen et al. 1998, Gang et al. 2000, Fong et al. 1997) und Test-Kits sind kommerziell erhältlich.
Schwächen der Methode sind allerdings vielfältige, störende Einflüsse auf die Reaktionen wie beispielsweise die Möglichkeit der Bildung von Primer-Artefakten (Krupp et al. 1997), die Anwesenheit von Inhibitoren der Telomerase wie RNAase aus Ribonuklease-haltigen Zellen (Norrback et al. 1998), inhibitorisch auf die DNA-Polymerase wirkende Substanzen wie Hämoglobin (Qiagen-Informationsblätter 1997), die Verdünnung des Untersuchungssubstrates mit nicht-telomerasehaltigen Zellen oder die Kontamination mit telomerasehaltigen Zellen wie aktivierten Lymphozyten. All diese Einflüsse machen die Verwendung von verschiedenen internen und externen Kontrollen des Experimentes bzw. Amplifikationsstandards notwendig.

Im Gegensatz zum in-vitro-TRAP-Assay arbeiten TRAP-basierende Techniken in-situ beispielsweise mit einer in-situ PCR mit FITC-markierten Telomerase-Produkten (Ohyashiki et al. 1997) oder kombinieren Verfahren wie der PCR-ELISA-Kit (Lu et al. 1999). Eine weitere Modifikation des TRAP mittels real-time-PCR ist das RTQ-TRAP-Assay (real-time quantitative, RTQ). Hier ist es möglich, die qualitativen Ergebnisse des TRAP zu quantifizieren (Heid et al. 1996, Hou et al. 2001). Das real-time-TRAP-Assay wird nach Untersuchungen von Ohuchida et al. (2005) als 1000fach sensitiver als das konventionelle TRAP angesehen. Im Sinne einer besseren Quantifizierbarkeit zu differentialdiagnostischen Zwecken ist eine Verbesserung der Sensitivität des TRAP-Assay auch in der Kombination mit einem Hybridization Protection Assay (TRAP/HPA) zu erreichen (Takaishi 2000).
Mittels RTQ-PCR, in-situ-Hybridisierung (ISH), Western-Blott und Immunhistochemie lässt sich der hTERT-Nachweis führen, wobei immunhistochemische Verfahren mittels polyklonalen hTERT-Antikörpern zu unbefriedigenden Ergebnissen führen (Krupp et al. 2000). Hochspezifische, monoklonale anti-hTERT-Antikörper sind deshalb für Analysen an Gefrier- und Paraffinschnitten vorzuziehen.

1.5 Diagnostisches und prognostisches Potential des Nachweises von Telomeraseaktivität allgemein

Bisher existiert noch keine einheitliche und allgemein akzeptierte Definition eines Tumormarkers. Im molekularpathologischen Sinne wird eine Definition bevorzugt, die darunter einen biologischen Marker versteht, der in Geweben oder Körperflüssigkeiten nachweisbar ist und in irgendeiner Weise eine Beziehung zum Vorhandensein von Malignität zeigt (Tannapfel und Weber 2001).
Speziell zur Telomerase als diagnostischer und prognostischer Marker stellen sich noch Fragen wie: Welches ist der akzeptable Grenzwert für Spezifität, Sensitivität und Genauigkeit des Assays? Kann das Telomeraseaktivitätsniveau zwischen aggressiven und nicht-aggressiven Tumorformen unterscheiden? Kann man über die Telomerase die Prognose von Patienten abschätzen? (Schneider-Stock et al. 2002).

Tab. 1.3 zeigt die Vorhersagekraft des Nachweises der Telomeraseaktivität mit dem TRAP-Assay als diagnostischer Marker für Malignität, wie sie anhand von Untersuchungen an 895 verschiedenen Malignomen und 646 nichtmalignen Geweben durch Kim (1997) eingeschätzt wurde.

Tab. 1.3 Einschätzung der Vorhersagekraft des Nachweises der Telomeraseaktivität für Malignität mittels des TRAP-Assays (Kim 1997)

	in Prozent (%)
Spezifität	91
Sensitivität	85
positiver Vorhersagewert	93
negativer Vorhersagewert	81

Untersuchungen zur Telomeraseaktivität wurden bisher an einer großen Zahl von Körpergeweben und Neoplasien durchgeführt. Eine sehr umfassende Übersicht dazu findet sich bei Dhaene et al. (2000). Die folgenden Ausführungen sollen nur eine Auswahl sein.

Ein klassisches Beispiel der prognostischen Aussagekraft des Nachweises von Telomeraseaktivität ist das 4s-Neuroblastom des Kindesalters. In dem besonders aggressiven Tumorstadium 4 lässt sich ein hoher Gehalt an Telomeraseaktivität nachweisen. Eine Sonderform des Stadium-4- Neuroblastoms ist das Stadium 4s. Es weist im Gegensatz zum Stadium 4 eine sehr geringe bis keine nachweisbare Telomeraseaktivität und sehr kurze Telomere auf und zeichnet sich durch eine sehr gute Prognose infolge einer hohen Rate an spontanen Regressionen aus, deren Ursache möglicherweise eine progrediente Telomerverkürzung durch insuffiziente Telomeraseaktivierung ist. Der Nachweis der Telomeraseaktivität stellt hier einen exzellenten Prognoseparameter dar (Hiyama et al. 1995). Desweiteren ist die Rezidivneigung von Meningeomen bekannt und eine Studie zeigte, dass in den Rezidivfällen Telomeraseaktivität nachweisbar war, in den rezidivfreien Fällen hingegen nicht (Langford et al. 1997). Die Glioblastome hingegen gehören zu den Tumorentitäten, die keine Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad des Tumors und der Telomeraseaktivität zeigen. Mittels konventionellem TRAP fanden sich große, quantitative Unterschiede der Telomeraseaktivität sowohl zwischen gleichen Tumorstadien verschiedener Patienten, als auch innerhalb des Tumors der jeweiligen, einzelnen Patienten (Kleinschmidt-Demasters et al. 2000).

Sugino et al. (1996) schlussfolgern in ihrer Arbeit, dass der Nachweis der Telomeraseaktivität die Brustkrebsdiagnostik in Feinnadelpunktionen und Abstrichen verbessern kann und geben die Sensitivität mit 67%, die Spezifität mit 90% und die Voraussagewahrscheinlichkeit mit 77% an. Zur Unterscheidung maligner Karzinome der Mamma von benignen Fibroadenomen untersuchten auch Poremba et al. (1999) 172 Feinnadelaspirate unter Einschluss des Nachweises von Telomeraseaktivität. Im Ergebnis wurde für den Nachweis von Malignität hier eine Sensitivität des

Telomerse-Nachweises von 92% und die Spezifität mit 94% angegeben und die Telomerase als hochspezifischer und hochsensitiver Marker und als geeignetes Zusatzdiagnostikum zur Feststellung von Malignität bei Neubildungen der Mamma beschrieben. Zudem ist in Mammatumoren (wie auch bei Lungentumoren und dem kolorektalen Karzinom) Telomeraseaktivität schon in präinvasiven Läsionen nachweisbar (Sugino et al. 1996, Shay und Gazdar 1997, Tahara et al. 1995). Der kombinierte Nachweis von hTERT bzw. hTERT-mRNA erscheint besonders in Fällen fraglicher Ergebnisse des Telomeraseaktivitätsnachweises sinnvoll. So konnte eine Untersuchung mittels Nachweis von hTERT-Expression an Mammakarzinomen zeigen, dass der positive hTERT-Nachweis verbunden war mit signifikant kürzerer, rezidivfreier Überlebenszeit verglichen mit negativem hTERT-Nachweis (Bieche et al. 2000). Eine andere Untersuchung jedoch mit quantitativer Messung der Telomeraseaktivität allein an Mammakarzinomen zeigte keine Assoziation mit dem rezidivfreien Überleben (Carey et al. 1999). Die hTERT-Expression und die Telomeraseaktivität scheinen auch geeignet zur Charakterisierung zervikaler, intraepithelialer Neoplasien (CIN), da gezeigt werden konnte, dass die Expression beider Marker mit der Progression von leichten Läsionen (CIN I) über schwere Dysplasien (CIN III) bis hin zum Zervixkarzinom zunimmt (Reedy et al. 2001).

Quantitative hTR- bzw. hTERT-Analysen im Urin zum nichtinvasiven Nachweis von Blasenkarzinomen, nach der Determinierung eines optimalen cutt-offs, werden in der Arbeit von Weikert et al. (2005) mit einer Sensitivität von 77% bzw. 55,2% angegeben, wobei beide Parameter zusammen eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber der Zytologie erreichten. Die Spezifität von hTR, hTERT und Zytologie wird in der Gesamt-Studienpopulation mit 72,1%, 85% und 92,7% gegenüber 96,9%, 89,2% und 100% bei gesunden Probanden angegeben. Schließt man Leukozyten als Kontaminanten im Urin aus, so erreicht die Spezifität von hTR in der Gesamt-Studienpopulation 85% und die Autoren der Studie schlussfolgern, dass der quantitative hTR-Nachweis gegenüber der Zytologie der potentiell aussagekräftigere Test in Bezug auf Diagnosestellung von Malignität und follow-up bei Blasenkarzinomen sein kann. An Wilms-Tumoren konnten Dome et al. (1999) zeigen, dass die Expression der hTERT, nicht aber die Telomeraseaktivität, signifikant mit dem Rezidivverhalten korreliert. Beim Pankreaskarzinom wurden von Hiyama et al. (1997) Telomeraseaktivität in 90-95% der Karzinomfrühstadien, nie aber in Präneoplasien gefunden. Auch Ohuchida et al. (2005) sehen im kombinierten,

quantitativen Nachweis von Telomeraseaktivität und hTERT-mRNA einen nützlichen Marker zur Diagnose von Malignität bei Pankreaskarzinomen.

Takaishi et al. (2000) zeigten in einem quantitativen Assay zur Differentialdiagnostik der Dignität von Rundherden der Leber steigende Telomeraseaktivität mit zunehmendem Malignitätsgrad und schlugen vor, prämaligne Läsionen der Leber mit einer Telomeraseaktivität über dem Cutt-Off-Level als Malignome anzusehen. Auch Hisatomi et al. (1999) beschreiben in ihrer Arbeit an Leberzellgeweben mittels quantitativer Untersuchungen die dadurch gegebene Möglichkeit, nach Festlegung einer Cut-off-Konzentration zwischen malignen und benignen Läsionen zu unterscheiden.

Miura et al. (2005) zeigten in ihrer Arbeit für den Nachweis von hTERT-mRNA ein besseres Diskriminationsvermögen zwischen malignen und nichtmalignen Lebererkrankungen gegenüber alpha-Fetoprotein (AFP). Sensitivität und Spezifität waren für hTERT-mRNA mit 88,2% und 70,0% besser als bei AFP mit 71,6% und 67,5%. hTERT-mRNA scheint den konventionellen Markern für Malignität bei Leberzellkarzinomen überlegen und ihr wird deshalb im Ergebnis dieser Studie eine möglicherweise diagnostische Bedeutung beigemessen.

An Rektumkarzinomen konnte gezeigt werden, dass hTERT-Protein nicht mit klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Geschlecht, klinisches und pathologisches T-Stadium, Histologie und intravasaler Invasion korreliert, jedoch mit zunehmender Expression von hTERT-Protein die Strahlensensitivität im Rahmen der neoadjuvanten Therapie abnahm, was sich auch in einem Zusammenhang zwischen der Ausprägung der hTERT-Expression und dem Krankheitsüberleben zeigte. In einer multivarianten Analyse stellten sich das histopathologische Grading und hTERT-Expression, nicht aber das pTNM-Stadium, als signifikante, prognostische Variablen für das krankheitsfreie Überleben heraus, woraus die Autoren schlussfolgern, dass die hTERT-Expression bei Rektumkarzinomen einen prädiktiven Marker für das Krankheitsüberleben darstellt und bei der Auswahl der Patienten wertvoll ist, die von einer neoadjuvanten Therapie profitieren könnten (Komuro et al 2005).

In einer Studie zum Stellenwert der Telomeraseaktivität als prognostisches Kriterium bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) wurden in 82,5% der Malignome Telomeraseaktivität gefunden, wobei der Prozentsatz höher lag in der Gruppe mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf und in der Gruppe mit Tumoren niedrigen Differenzierungsgrades. Es konnte statistisch eine signifikant kürzere

Überlebenszeit von Patienten mit telomerasepositiven Tumoren gegenüber Patienten mit telomerasenegativen Tumoren gezeigt werden (p=0,0058). In einer multivarianten Analyse stellte sich auch hier die Telomeraseaktivität als unabhängiger prognostischer Faktor heraus (RR=8,62, p=0,035). Die Studie kam zu dem Ergebnis, Telomeraseaktivität könne der wichtigste Prognosefaktor bei Patienten mit NSCLC sein, wobei die potentielle, prognostische Bedeutung dabei unabhängig vom jeweiligen Tumorstadium ist (Taga et al. 1999).

An Melanozyten ließ sich bei zunehmender Telomeraseaktivität von benignen Melanozytennaevi über atypische Naevi bis hin zu malignen Melanomen und metastasierenden Melanomzellen zeigen, dass eine positive Korrelation zwischen Telomeraseaktivität, Tumorprogression und schlechter Prognose besteht und Telomeraseaktivität verbunden ist mit zunehmender Ausprägung der Malignität (Glaessl et al. 1999). In ihren Untersuchungen an Basalzellkarzinomen wiesen Fabricius et al. (2003) Telomeraseaktivität in histopathologisch tumorfrei klassifizierten Resektionsrändern in 32% der Fälle nach. Zudem zeigte sich, dass Patienten mit positivem Telomerasenachweis in den Resektionsrändern ein statistisch signifikant kürzeres krankheitsfreies Intervall zeigten gegenüber Patienten ohne Nachweis von Telomeraseaktivität in den Resektionsrändern.

Möglicherweise besitzt die Telomeraseaktivität prognostische Aussagekraft bei leukämischen Erkrankungen. So verringerte sich die Telomeraseaktivität bei Remission einer akuten, myeloischen Leukämie (AML) um ein vielfaches, in der Relapse-Phase hingegen erreicht sie wieder prätherapeutisches Niveau (Breslow et al. 1997).

Schneider-Stock et al. (2002) bewerten die Telomeraseaktivität als ein geeignetes Target für Diagnose, Prognoseabschätzung und Therapie von Tumoren. Als Biomarker zur Krebsfrüherkennung sollten in einem molekularen Staging jedoch weitere genetische Marker berücksichtigt werden.

1.6 Diagnostisches und prognostisches Potential des Nachweises von Telomeraseaktivität im Kopf-Hals-Bereich

Untersuchungen mit dem TRAP-Assay führten in durchschnittlich 86% der Malignome im Kopf-Hals-Bereich zu einem Nachweis von Telomeraseaktivität (Kim et al. 1994, Hohaus et al. 1996, Califano et al. 1996, Mao et al. 1996, Mutirangura et al. 1996).

Bei Nasopharyngealkarzinomen fand sich in 85% der Primärtumoren und in 100% der Tumorrezidive Telomeraseaktivität. Dabei war der Ausprägungsgrad der Aktivierung in Fällen ohne Lymphknotenbeteiligung signifikant geringer ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Fällen mit Lymphknotenbeteiligung, was die Telomeraseaktivierung als ein frühes Ereignis in der Tumorprogression erscheinen lässt (Cheng et al. 1998). Curran et al. (1998) fanden in 90% der untersuchten HNSCC Telomeraseaktivität, wobei sich der Ausprägungsgrad zwischen T1/T2-Tumoren verglichen mit T4-, jedoch nicht mit T3-Tumoren, statistisch signifikant unterschied. In einer in Indien durchgeführten Studie an prämalignen und malignen Läsionen der Mundschleimhaut konnte ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Zelldifferenzierung und dem semiquantitativen Niveau der Telomeraseaktivität gezeigt werden. Auch korrelierte hier gut das Ansprechen auf eine Radiotherapie mit der Ausprägung der Telomeraseaktivität. Im Ergebnis der Studie werten die Autoren die Telomeraseaktivität als ein Zusatzkriterium in der Erfolgsbewertung einer Therapie mit prognostischer Aussagekraft. Jedoch scheint sie aufgrund des häufigen Auftretens in der normalen Mundschleimhaut und in oralen Leukoplakien nicht zur Früherkennung von Malignität geeignet (Kannan et al. 1997).

Die Arbeit von Liao et al. (2004) an HNSCC zeigte, dass die Telomeraseaktivität signifikant korreliert mit dem Auftreten von extrakapsulärem Wachstum der Lymphknotenmetastasen ($p=0,005$) und befanden die Telomeraseaktivität als einen unabhängigen, prognostischen Faktor und die Telomerase als einen potentiellen, molekularen Ansatzpunkt in der Krebstherapie.

Der Nachweis von hTERT-mRNA korreliert positiv mit klinisch-pathologischen Parametern und wird in der Diagnostik oraler Läsionen als sensitiver gegenüber dem Telomerasenachweis mittels TRAP-Assay angesehen (Sumida et al. 1999). In einem quantitativen hTERT-mRNA-Nachweis an normalen, atypischen und malignen Larynxepithelien konnte steigende Telomeraseaktivität mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung der Epithelien gezeigt werden. Von keiner bis moderater Aktivität in normalen bis gering hyperplastischen Gewebe folgte ein signifikanter Anstieg der Aktivität in atypischen Hyperplasien ($p<0,001$). In 85% der Larynxepithelzellkarzinome konnte Telomeraseaktivität gefunden werden und sie zeigte quantitativ hier die höchste Aktivität (ohne statistische Signifikanz gegenüber atypischen Hyperplasien). Den signifikanten Anstieg der Telomeraseaktivität in den atypischen Hyperplasien, die noch zu den nichtmalignen Formen der Epithelveränderungen gehört, werten die Autoren dahingehend, dass die Aktivierung

der Telomerase ein frühes Ereignis im Prozess der Karzinogenese des Larynxepithels darstellt (Luzar et al. 2003).

Interessanterweise zeigte die Arbeit von Fabricius und Mitarbeitern (2002) im Ergebnis ihrer Untersuchungen zum Nachweis von Telomeraseaktivität an Kopf-Hals-Tumoren, einen unerwartet besseren Krankheitsverlauf von Patienten mit positivem Nachweis von Telomeraseaktivität in tumorangrenzendem Gewebe. Der Zusammenhang ist jedoch statistisch nicht signifikant. Die Autoren werten das Ergebnis dahingehend, dass es in kritischer Zusammenschau aller beeinflussenden Faktoren gegen eine systemische Anti-Telomerase-Therapie sprechen könnte, was in ausgedehnteren, prospektiven Untersuchungen mit größerer Patientenzahl konkretisiert werden sollte.

Die Identifikation genetischer Veränderungen in der Karzinogenese der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches ist in ihrer prognostischen Bedeutung noch unklar. Die damit verbundenen molekularen Veränderungen dienen bisher lediglich dem besseren Verständnis der Tumorbiologie und können gegenwärtig weder zu einer sicheren Therapieentscheidung noch zur Prognoseabschätzung im Individualfall herangezogen werden. Der entscheidende, derzeit als gesichert geltende prognostische Parameter ist das Tumorstadium nach UICC (Weber und Tannapfel 2002). Unter Berücksichtigung der gegenwärtigen Daten wird die Telomerase zusammenfassend jedoch als ein sinnvoller, wenngleich auch nicht universaler Tumormarker in einer Reihe von Tumorentitäten betrachtet, deren quantitativer Nachweis ein hohes Potential zur Unterscheidung zwischen Benignität und Malignität besitzt. Allerdings ist es dabei im Moment meist noch nicht möglich, verlässliche Aussagen hinsichtlich diagnostischer bzw. prognostischer Relevanz zu geben. Möglicherweise können zukünftige Untersuchungen zur Telomerase in Zusammenschau mit Ergebnissen zu genetischen Veränderungen und konventionellen, diagnostischen Markern zu einem effizienteren invasiven und nichtinvasiven Tumorscreening führen (Dahse und Mey 2001).

1.7 Therapeutisches Potential der Telomeraseinhibierung

Therapeutische Inhibition der Telomerase kann zum einen durch direkte Inhibierung des Telomeraseproteins, Antisense entweder der RNA-Komponente oder der Proteinkomponenten (Rossi 1995) bewirkt werden oder durch Induktion der Enddifferenzierung der Zellen (Sharma et al. 1995 und 1997).

Die funktionellen Untereinheiten des Telomerase-Enzymkomplexes stellen mögliche Angriffspunkte für Telomeraseinhibitoren dar (Hamilton und Corey 1996):

1. das RNA-Template
2. die Primer-Bindungsstelle
3. das katalytisches Zentrum
4. die RNA-Protein-Bindungsstellen

Peptid-Nukleinsäuren (peptide nucleic acid, PNA), die modifizierte Oligonukleotide darstellen, zeigen durch ihre Sequenzspezifität mit höherer Affinität zu RNA versus DNA eine effektive Möglichkeit zur Telomeraseinhibition. Sie greifen am RNA-Template der Telomerase an und sind stabil gegenüber Nukleasen und Proteasen (Norton et al. 1996, Holt et al. 1997, Harrison et al. 1999).

Dass synthetische, telomereähnliche Phosphorothioat-Oligodeoxynukleotide Apoptose induzieren, Telomerase und Zellwachstum inhibieren können, wurden von Saeki et al. (1999) für Tumorzellinien und im Xenograft-(Mensch-Nacktmaus) Modell von Mata et al. (1997) beschrieben. Acridin-Derivate inhibieren Telomerase auf der Grundlage einer Stabilisierung von G-Quadruplexstrukturen, die durch Zusammenfaltung der Telomer-DNA entstehen (Harrison et al. 1999). Eine ebenfalls G-quadruplex-interaktive Wirkung haben die von Perry et al. (1999) beschriebenen, disubstituierten Amidofluorenone. Penclomedin, ein synthetisches Pyridin, führte in Versuchen an Zellkulturen zur Abnahme der Telomeraseaktivität in Korrelation zu Parametern für genomische Instabilität wie Abnahme des Mitose-Indexes und Telomerfusionen. Dabei wurden telomerasepositive Zellen deutlicher affektiert als telomerasenegative (Pandita et al. 1997).

Andere Versuche mit telomeraseinhibierenden Substanzen wie u.a. Diazaphilonsäure (Tabata et al. 1999) oder 7-deaza-Deoxynukleotide (7-deaza-dGTP, 7-deaza-dATP) sind beschrieben (Fletcher et al. 1996). Außerdem konnte auf die Proliferation von Transitionalzellkarzinomen ein inhibitorischer Effekt durch die beiden Antibiotika Ofloxacin und Levofloxacin in hoher Dosierung (>200 µg/ml) mit Verminderung der Telomeraseaktivität nach einem noch unbekannten Mechanismus gezeigt werden (Yamakuchi et al. 1997). Eine Inhibition der Telomeraseaktivität konnte auch für Cisplatin an Zellen von Hodenkrebs, nicht aber für andere Zytostatika, beschrieben werden (Burger et al. 1997).

Da die Telomerase zu den reversen Transkriptasen gehört, sind reverse Transkriptasehemmer wie bsp. Azidothymidin in der Lage in In-vitro-Modellen Telomeraseaktivität zu hemmen und progressive Telomerverkürzung zu bewirken

(Sharma et al. 1997). In diese Gruppe lässt sich auch BIBR 1532 einordnen, die eine neue, synthetische Substanz darstellt und Ähnlichkeiten mit den aus der HIV-Therapie bekannten, nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Hemmern zeigt. Sie hemmt spezifisch und nicht-kompetitiv die Telomerase, was sie von den kompetitiv hemmenden Mechanismen nukleosidischer Wirkstoffe oder Antisense-Oligonukleotiden deutlich unterscheidet (Damm et al. 2001, Pascolo et al. 2002). Diese Substanz wird als sehr viel versprechend in der Entwicklung von Telomeraseinhibitoren angesehen (McCaul et al. 2002, Kelland 2001 und 2005) und Ergebnisse von In-vitro-Untersuchungen dieser Substanz an Leukämiezellen (El-Daly et al. 2005) und Lungenkrebszellen (Pantic et al. 2005) liegen vor.

Andere Strategien sind die Transfektion von Antisense-Expressionsvektoren gegen das RNA-Template. So führte ein exprimiertes Antisense-hTR-Konstrukt zum Verlust telomerer DNA und zum Zelltod von HeLa-Zellinien in-vitro (Feng et al. 1995). Peptidnukleinsäuren (PNA) erkennen die RNA-Komponente der Telomerase spezifisch, sind zur Telomerase-RNA invers-komplementär und hemmen die Telomeraseaktivität effektiv in schon sehr kleinen Konzentrationen. Ihre geringe Membranpermeabilität und damit unsicherer intrazellulärer up-take stellen allerdings ein Problem dar (Herbert et al. 1999, Shammas et al. 1999). G-quartett-interaktive Substanzen greifen an der Struktur der Telomere an, an der die Telomerase die Neusynthese der telomerspezifischen Sequenzen vornimmt (Kelland 2001, Schneider-Stock et al. 2002).

Die nichtsteroidalen Antirheumatika Ibuprofen und Indomethacin wirken dosisabhängig im nicht-toxischen Bereich (1 mM) hemmend auf die Wachstumsrate und Telomeraseaktivität von HNSCC-Zellkulturen, deren antiproliferativer Effekt sich möglicherweise über die Hemmung der Cyclooxygenase erklärt, deren Isoform Cox-2 sich in HNSCC's überexprimiert findet (Thurner et al. 2001).

Da zytotoxische T-Lymphozyten in der Lage sind, hTERT-Peptide zu erkennen und hTERT-positive Zellen angreifen können, ergeben sich auch Wege im Rahmen einer Immuntherapie (Nair et al. 2000, Vonderheide RH. 2002).

Die Attraktivität von Telomeraseinhibitoren könnte in ihrem kombinierten Einsatz mit Chemo- bzw. Strahlentherapie gemeinsam liegen. So reagieren transformierte, telomerasenegative Zellkulturen empfindlich auf die Wirkungen von Medikamenten, die im Genom Doppelstrangbrüche induzieren wie beispielsweise Doxorubicin, Daunorubicin oder Dactinomycin, nicht aber auf über andere Mechanismen wirkende

Zytostatika wie beispielsweise Etoposide, Cisplatin oder Fluorouracil (Lee et al. 2001).

Telomerasedefiziente Mäuse weisen in der 5. Generation 40% kürzere Telomere gegenüber dem Wildtyp auf und reagierten ausgesprochen empfindlich auf Bestrahlung. Die Rate an Chromosomenbrüchen und apoptotischen Zellen in den bestrahlten Tieren war entsprechend höher gegenüber einer vergleichsweise unaffektierten Kontrolltiergruppe (Goytisolo 2000). Das lässt vermuten, dass eine Anti-Telomerase-Therapie initial durch eine progressive Telomerverkürzung eine größere, genetische Vulnerabilität des Tumors bedingt, wodurch dessen Strahlenempfindlichkeit steigt und damit sich die Erfolgsaussichten der Tumorbekämpfung verbessern. Eine größere Strahlenempfindlichkeit bietet auch die Möglichkeit der Applikation einer geringeren Strahlendosis mit entsprechend niedrigerem Nebenwirkungsprofil. Beachtet werden muss jedoch, wenn nach therapeutisch herbeigeführter, kritischer Telomerverkürzung durch Telomeraseinhibitoren die Apoptoseinduktion durch gleichzeitig vorliegende, deletierte Tumorsuppressor-Kaskaden, besonders p53, erschwert ist, was gerade in HNSCC's mit hoher Telomeraseaktivität häufig ist (Loughran 1997, McCaul 2002).

1.8 Eigene Arbeit

Im Rahmen eines Projektes der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde und dem Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, dass sich mit molekulargenetischen Untersuchungen an Kopf-Hals-Tumoren befasste, war es primäre Aufgabe der vorliegenden Arbeit, in Tumoren, Lymphknoten, histopathologisch tumorzellfreien Resektionsrändern und Proben der Mundschleimhaut einer Anzahl Patienten den qualitativen Nachweis der Telomeraseaktivität durchzuführen und zu prüfen, ob eine Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern des pTNM-Klassifikationssystems vorliegt.

Nach Abschluss der Arbeit wurde versucht, die qualitativen Daten in semiquantitative Daten zu überführen und die davon abgeleiteten Ergebnisse mit Arbeiten aus der Literatur zu vergleichen.

Die erbrachten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren Bestandteil von Veröffentlichungen im Rahmen dieses Projektes (Dahse et al. 1997, Koscielny et al. 1998, 2000 und 2004).

2. Material und Methoden

Untersucht wurden Gewebeproben von 45 Patienten, die 1996-1997 an einem Malignom im Kopf-Hals-Bereich an der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena operiert wurden.
In der Mehrzahl der Fälle lagen pro Patient in unterschiedlicher Anzahl jeweils Proben des Tumors, der Mundschleimhaut, des Resektionsrandes und von Lymphknoten vor. Sie wurden intraoperativ entnommen und in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Die Proben wurden nach dem pTNM-System klassifiziert und das histopathologische Grading bestimmt. Alle Fälle waren histologisch frei von verbliebenem Tumorgewebe im Tumorresektionsrand (R0-Resektion) und ohne nachweisbare Fernmetastasen (M0).

Der Nachweis der Telomerase erfolgte mit dem TRAP-Assay nach Kim et al. (1994) mit den Modifikationen von Fiedler et al. (1996) als nichtradioaktives Verfahren.
Prinzipielles Vorgehen:

1. Präparation eine Proteinextraktes (S100-Fraktion) aus etwa 50 mg Gewebe durch chemische und mechanische Lyse in einer stabilisierenden Pufferlösung (Proteingewinnung).
2. Inkubation dieses Lysates mit einem spezifischen Primer und Nukleotiden. Im Falle der Anwesenheit von Telomerase in diesem Schritt Elongation des Primers durch die Telomerase (Telomerasereaktion).
3. Amplifikation der Telomeraseprodukte mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).
4. Nachweis der Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese.

2.1 Proteingewinnung aus den Gewebeproben

Von den tiefgefrorenen Gewebeproben wird unter sterilen Bedingungen zum Ausschluss von Kontaminationen mittels Präzisionswaage eine Gewebemenge von etwa 50 mg abgetrennt und diese zunächst in 1 ml eiskalten Waschpuffers (bestehend aus: HEPES-KOH 0,01 M; $MgCl_2$ 0,0015 M; KCl 0,01 M; DDT (Firma Boehringer) 0,001M in doppelt destilliertem Wasser) in Plastreaktionsgefäßen mit passgenau eingeschliffenen Plastikmörsern (pellet pestle disp W, Scientific

Glassware/Instruments, Vineland/New Yersey) auf Eis gelagert. Zweimaliges Waschen in eiskaltem Waschpuffer. Der überstehende Waschpuffer wird verworfen und auf das Gewebe der Lysepuffer (bestehend aus: TRIS-HCl 0,01 M; $MgCl_2$ 0,001 M; EGTA 0,001 M; PMSF (Firma Boehringer) 0,1 M; Beta-Mercaptoethanol (Firma Merck) 0,005 M; CHAPS (Firma Merck) 0,5 %; Glycerol 10 % in doppelt destilliertem Wasser) gegeben. Mittels Mörser wird eine mechanische Homogenisierung durchgeführt und anschließend erfolgt eine Inkubation zur chemischen Zellyse auf Eis über 30 min. Dieser Zellaufschluss überführt die eventuell vorhandene Telomerase als Zellkernprotein in eine stabilisierende Pufferlösung. Um eine zu starke Verdünnung der Proteine durch den Lysepuffer zu vermeiden, wurde dieser wie folgt dosiert:

Gewebeportion:	< 10 mg:	50 µl Lysepuffer
	10 mg-50 mg:	100 µl Lysepuffer
	> 50 mg:	150 µl Lysepuffer

Mit Ablauf der Inkubationszeit wurden die verschlossenen Gefäße in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge (Universal 30RF, Firma HETTICH) bei 15.000 U/min für 30 min abzentrifugiert. Von dem so gewonnenen Lysat werden 5 µl zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet und die verbleibende Menge zur späteren Untersuchung wieder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels UV-Absorptionsphotometer (Photometer: Uvikon 930, Firma KONTRON-INSTRUMENTS) nach der Methode von Warburg und Christian (1941). Dazu werden 5 µl des gewonnenen Lysates zu 745 µl doppelt destilliertem, sterilem Wasser in eine Meßküvette pipettiert (Firma GILSON-Pipetten). Der Abgleich erfolgt gegen eine Verdünnung aus 745 µl DDW und 5 µl Lysepuffer. Ablauf der Bestimmung der Proteinkonzentration:

1. Bestimmung der Optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm
2. Berechnung des Quotienten aus OD 280 / OD 260
3. Aus der Tabelle der Arbeit von Warburg und Christian wird der Berechnungsfaktor F ermitteln, der dem Quotienten aus OD 280 / OD 260 entspricht
4. Faktor F, Schichtdicke d der Küvette und die OD bei 280 nm ergibt die Proteinkonzentration mit der Formel: F x 1 / d x OD 280 [mg/ml]

2.2 Telomerasereaktion

In diesem Schritt synthetisiert die eventuell in den Proben vorhandene Telomerase mit Hilfe der zugegebenen Nukleotide (dNTP) und des initialen Primers (TS-upstream-Primer; 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3'; markiert mit Infrarot-Farbstoff IRD 800, Firma MWG-BIOTECH, Deutschland) Oligonukleotide, die den Telomereinheiten als spezifisches Syntheseprodukt der Telomerase entsprechen.
Es werden pro zu untersuchenden Fall und einzelner Probe zwei Verdünnungsstufen mit einmal 3 µg und einmal mit 1,5 µg Protein vorbereitet, um für die Nachweisreaktion die standardisierte Menge von 3 µg und 1,5 µg Protein je Probe zu erhalten. Dafür wird ein Verdünnungsansatz hergestellt, der auf 1,5 µg Protein/µl eingestellt ist. Der ersten Probe wird ein Volumen von 2 µl mit der Konzentration von 3 µg Protein/2 µl zugesetzt. Durch eine weitere 1:1-Verdünnung des Verdünnungsansatzes wird der zweiten Probe ein Volumen von ebenfalls 2 µl mit der Konzentration von 1,5 µg Protein/2 µl zupipettiert. Die Proben werden für 15 min bei 23 °C inkubiert. Sie enthalten bereits bis auf den komplementären CX-downstream-Primer, den internen Standard und der Polymerase alle Komponenten für die anschließend stattfindende Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Proteinlysat (3 bzw. 1,5 µg)	→	2 µl
Aqua ad injectabila	→	16,7 µl
Polymerase Puffer [10 fach]	→	2,5 µl (=1 fach)
Magnesiumchlorid [25 mM]	→	1,5 µl (=1,5 mM)
Nukleotide [2,5 mM]	→	0,5 µl (=50 µM)
TS-upstream-Primer [0,1 µg/µl]	→	0,5 µl (=0,05 µg)
T4g32-Protein [4,9 µg/µl]	→	0,104 µl (=0,51 µg)

(Polymerase Puffer und Magnesiumchlorid: Firma EUROGENTECH, T4g32-Protein: Firma PHARMACIA BIOTECH).
Die Testreihe eines Falles besteht neben den beiden Verdünnungsstufen der jeweiligen Gewebeproben von 3 µg Protein und 1,5 µg Protein noch aus der Negativkontrolle, in der die 2 µl Proteinverdünnung durch Lysepuffer ersetzt wird, und der Positivkontrolle (HRT-18-Zellinie), die in ebenfalls zwei Verdünnungsstufen zu 3 µg und 1,5 µg Protein mitgeführt wird.

2.3 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach der Telomerasereaktion werden alle Proben in einem auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler (Thermocycler 60, Firma BIO-MED) für 2 min inkubiert, wobei die u.U. vorhandene Telomerase inaktiviert und damit die Telomerasereaktion abgebrochen wird. Anschließend werden der CX-downstream-Primer (5'-CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TAA-3'; Firma MWG-BIOTECH, Deutschland), der interne Standard und die Taq-Polymerase (Goldstar-DNA-Polymerase, Firma EUROGENTECH) zugegeben:

interner Standard [0,03 µg]	→	0,5 µl (0,015 µg)
CX-downstream-Primer [0,1 µg/µl]	→	0,5 µl (0,05 µg)
Taq-Polymerase [5 U/µl]	→	0,2 µl (1 U)

Das Gesamtreaktionsvolumen beträgt 25 µl. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

initiale Denaturierung:		95 °C, 2 min
anschließend folgender Zyklus:	Annealing	54 °C, 30 s
	Denaturierung	95 °C, 30 s
	Elongation	72 °C, 30 s
Anzahl der Zyklen:		31

2.4 Gelelektrophorese

Die in der Telomerasereaktion möglicherweise entstandenen und in der PCR vervielfältigten Oligonukleotide wurden mittels Gelelektrophorese analysiert und dafür in einem 6 % denaturierenden Polyacrylamid-Gel (Sequagel-XR, Firma NATIONAL DIAGNOSTIK, Atlanta, USA) elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem computergestützten Laser-Detektionssystem (LICOR-DNA-Sequenzer, Firma MWG-BIOTECH) erfasst. Dazu wurde zwischen zwei gereinigte Glasplatten ein 4 mm starkes Polyacrylamid-Gel (6%) entsprechend der Herstellervorschrift gegossen und mittels Ammoniumperoxidisulfat (APS) polymerisiert. Die Polymerisationsdauer betrug 45 min.

Ein Elektrophoresepuffer (bestehend aus Trisbase 162 g, Borsäure 27,5 g, EDTA 9,3 g in 1000 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst, pH 8,3 – 8,7 bei 50 °C) wird hergestellt und beide Pufferbehälter des Systems des LICOR-System mit diesem gefüllt. Die PCR-Produkte wurden mit einem Trägermedium (enthält Formaldehyd 95 %, EDTA 20 mM, Bromphenolblau 0,05 %, Xylencyanol 0,05 %) im Verhältnis 2:1 vermischt, bei 80 °C für 2 min zu Einzelstrang-DNA-Fragmenten denaturiert und im Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit folgender Einstellung des LICOR-Systems:

Spannung:	1500 V
Stromstärke:	35 mA
Leistung:	18 W
Temperatur:	50 °C
Laufzeit:	etwa 2 Stunden

Das Signal der IRD-markierten TS-upstream-Primer wird von einem automatischen Laser-Scannsystem beim Durchwandern der PCR-Amplifikationsprodukte durch das Gel erfasst und über eine transformierende Software (BaseImagIR) bildlich dargestellt. Je nach Prozessivität der Telomerase wird ein jeweils um 6 bp fortschreitendes, leiterartiges Bild der Amplifikationsprodukte (entsprechend den synthetisierten Telomereinheiten aus der Telomerasereaktion) sichtbar.

2.5 Positivkontrollen

2.5.1 Interner Standard

Zur Kontrolle der Prozessivität der Taq-Polymerase wurde ein nach dem Protokoll von Wright et al. (1995) beschriebener Amplifikationsstandard verwendet. Dabei handelt es sich um ein Oligonukleotid aus TS-/CX-Primern, welches mit einer assoziierten copy-DNA- (cDNA) Sequenz von Rattenmyogenin überlappt. Der Standard wurde in einer säulenchromatographisch aufgereinigten Größe von 150 bp verwendet. Die Lagerung erfolgte in TE^{-4}-Puffer (bestehend aus TRIS-HCl 1 mM, EGTA 0,1 mM in doppelt destilliertem Wasser) bei 4 °C. Ein entsprechender Volumenanteil des Amplifikationsstandards wurde jeder Probe wie unter 3.3 beschrieben am Ende der Inkubation der Telomerasereaktion und vor Beginn der PCR als positiver, interner Standard zupipettiert.

2.5.2 Externer Standard

Um die durch äußere Einflüsse auf die Reaktionsbedingungen entstehenden quantitativen Schwankungen der Reaktion verifizieren zu können, wurde bei jeder Untersuchung eine bekannte, telomerasepositive Zellinie als positiver, externer Standard mitgeführt. Verwendet wurde dafür die Zellinie eines humanen Adenokarzinoms, dem „human rectal tumor-18“ (HRT-18), deren Telomeraseaktivität quantitativ untersucht wurde. Die Zellinie entstammte den Beständen des Institutes für Humangenetik und Anthropologie. Die Kultivierung erfolgte nach den Beschreibungen von Tompkins et al. (1974) mit Modifikationen nach Patel et al. (1984) und Dea et al. (1989). Eine 50 ml-Gewebekulturflasche (Firma GREINER-Labortechnik) wird mit 7 ml Zellkulturmedium gefüllt, (bestehend aus RPMI 1640 (Firma GIBCO), supplementiert mit 100 I.E Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml, 0,075 % $NaHCO_3$, 30 % fetales Kälberserum (Firma SEROMED), 10 µM HEPES, 10 µM Tricine), die HRT-18-Zellen darin suspendiert und bei 5 % CO_2 und 37 °C inkubiert. Die Anzuchtzeit bis zur Ausbildung eines Zellrasens betrug 5 Tage. Der Wechsel des Mediums erfolgte nach etwa 1-2 Tagen. Zur Ernte der Zellen und anschließender Proteingewinnung werden Zellkulturmedium und Trypsin (Firma SEROMED) auf Raumtemperatur angeglichen, Phosphatpufferlösung (PBS, Firma GIBCO), Lysepuffer (Zusammensetzung wie unter 2.1) und Waschpuffer (Zusammensetzung wie unter 2.1) auf Eis kaltgestellt und die Zentrifuge auf 4 °C vorgekühlt. 3 ml Trypsin werden der Kulturflasche zugegeben und damit der angewachsene Zellrasen gelöst, nach etwa 5 min der Inhalt der Kulturflasche in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und anschließend bei 1500 U/min, 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, dem Pellet 2 ml PBS zugesetzt, das Pellet resuspendiert und anschließend wieder bei 1500 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschritt wird noch einmal wiederholt. 3 µl der Resuspension werden mit 3 µl Türk-Lösung (Firma SIGMAL-ALDRICH) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgt mit 20 µl Lysepuffer pro 10^6 Zellen der Zellaufschluss für 30 min auf Eis. Nach dem Abzentrifugieren mit 15.000 U/min bei 4 °C für 30 min wird im Überstand die Proteinfraktion abpipettiert. Mittels photometrischer Bestimmung, wie unter 2.1 beschrieben, wird die Proteinkonzentration bestimmt. Das Lysat wird portioniert, in Flüssigstickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Ein Teil der vitalen Zellen wurde in Einfriermedium (bestehend aus 10 % Glycerin, 50 % fetales Kälberserum, 40 %

RPMI) wieder dem Bestand zurückgeführt und bei -80 °C gelagert. Jeweils eine Probe mit 3 µg und 1,5 µg Protein aus HRT-18 wurde bei jedem Patienten als externe, positive Kontrolle eingesetzt.

2.6 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurde eine Probe mitgeführt, die alle Versuchssubstanzen bis auf das Proteinlysat enthält und alle Versuchsschritte mit durchläuft. Im gelelektrophoretischen Bild ist neben der initialen Primerwolke und der Bande des internen Standards dann lediglich das Bild einer leeren Spur zu erwarten.

2.7 Zusätzliche Untersuchungen

2.7.1 RNAase-Behandlung

Als sichere Differenzierung der Telomeraseprozessivität von nichttelomeraseabhängigen Artefakten wird u.a. die RNAase-Sensitivität beschrieben (Norrback et al. 1998). Im Verlauf der Versuche wurden in den Fällen, in denen die Aktivität der Telomerase, speziell im Normalgewebe, weit über dem Durchschnitt lag, die entsprechenden Proben auf RNAase-Sensitivität nachuntersucht. Es war zu erwarten, dass im Falle einer regelrechten Prozessivität durch Telomerase die Signalgebung im Kontrollexperiment ausblieb. Die entsprechenden Proben wurden mit 0,25 µg RNAase pro 30 µg Protein versetzt, bei 23 °C für 15 min inkubiert und anschließend unter regulären Versuchsbedingungen noch einmal untersucht.

2.7.2 Untersuchung zum Verlust an Enzymaktivität

Um falsch-niedrige bzw. falsch-negative Ergebnisse durch einen Verlust an Enzymaktivität der Telomerase während der Untersuchungszeit auszuschließen, die durch Temperaturschwankungen bei der Verarbeitung der Gewebeproben bedingt sein kann, wurde in drei exemplarische Fällen untersucht, inwieweit die Telomerase Raumtemperatur toleriert. Die jeweiligen Fälle wurden unter den normalen Bedingungen des Versuchsprotokolls untersucht und parallel dazu je eine Portion des Lysates 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend unter den regulären Bedingungen des Versuchsprotokolls weiter untersucht und die quantitativen Unterschiede beider Versuchsreihen verglichen.

2.7.3 Messung der Hämoglobinkonzentration

Freies Hämoglobin ist als Inhibitor der Taq-Polymerase bekannt (Higuchi 1989, Wink et al. 1994, Mehle et al. 1996). Die für die PCR inhibitorische Konzentration an Hämoglobin wird mit >100 mg/dl angegeben (Qiagen-Informationsblätter 1997), was mit 0,062 mmol/l weniger als einem Hundertstel der physiologisch im Körper vorkommenden Hämoglobinkonzentration entspricht. Die Verwendung nativer Gewebe aus einem gut durchbluteten Operationssitus wie im Kopf-Hals-Bereich macht die Kontamination mit Blut während der Proteingewinnung praktisch unvermeidbar. Deshalb wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Hämoglobinkonzentration in den hämolytischen Lysaten und einer Nichtamplifikation des internen Standards als Indikator einer Störung der Polymerasereaktion gibt. Der Nachweis von freiem Hämoglobin in den Proben erfolgte mittels Photometrie. Hämoproteine zeigen ein typisches Lichtabsorptionsverhalten, deren Spektrum durch drei Absorptionsbanden charakterisiert ist. Für die Identifizierung dient vor allem die SORET-Bande zwischen 400-415 nm (Zetkin und Schaldach 1987, Meyer 1990).
Für die Nachweisreaktion wurden 7 µl des Gewebelysates zu 700 µl $NaCO_3$-gepufferter Lösung (0,01 %) gegeben, die Verdünnung sorgfältig vermischt und photometrisch bei einer Extinktion (E) von 380 nm, 415 nm und 450 nm gegen die Pufferlösung gemessen. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm. Die Berechnung der Konzentration des freien Hämoglobins erfolgte über die Formel:

$$\mathbf{2 * E_{415} - (E_{450} + E_{380}) * F_{1:100} = [mg\ HbO_2/dl]}$$

(F = Korrekturfaktor, der bei der hier verwendeten Verdünnung von 1:100 = 768 beträgt.)

2.8 Auswertung der Ergebnisse

Zunächst erfolgen die qualitative Erfassung der Messergebnisse und die Erhebung der Größen:

1. Fallzahl
2. Teilmengen telomerasepositive und telomerasenegative Fälle
3. Spannweite der Telomeraseaktivität
4. Mittelwerte der Telomeraseaktivität, wobei festgelegt wird: Mittelwert aller Proben = MW und Mittelwert aller telomerasepositiven Proben = MW_{pos}
5. Median der Telomeraseaktivität
6. Standardabweichung

Die Messwerte der einzelnen Proben werden wie folgt quantifiziert:

1. Bestimmung der *absoluten Telomeraseaktivität* (aTA) durch Addition der Signale im gelelektrophoretischen Bild und zwar als Summe der Signale aus beiden Verdünnungsstufen einer Probe.
2. Die absolute Telomeraseaktivität der Proben einer Versuchsreihe wird mit der absoluten Telomeraseaktivität des entsprechenden, externen Standards dieser Versuchsreihe ins prozentuale Verhältnis gesetzt und der Betrag des Prozentsatzes stellt die *relative Telomeraseaktivität* (rTA) dar.
3. Das *Telomeraseaktivitätsniveau* wurde wie folgt festgelegt:

   jede rTA kleiner dem Mittelwert aller Normalgewebe (MW)
   = niedrige Aktivität (low = l)
   jede rTA zwischen dem Mittelwert MW aller und dem der telomerasepositiven Normalgewebe (MW_{pos}):
   = mittlere Aktivität (middle = m)
   jede rTA größer dem Mittelwert telomerasepositiver Normalgewebe (MW_{pos}) der Normalgewebe:
   = hohe Aktivität (high = h)
   keine eindeutige Signalgebung:
   = keine Aktivität (non = n)

Dabei wurde festgelegt, dass für die Proben der Resektionsränder und Lymphknoten mit mehr als einer Probe je Fall jeweils nur der Maximalwert der rTA dieser Wertepaare in die weiteren Berechnungen eingeht (Beispiel: für die Werte 20 und 30 eines Falles der Wert 30, für die Werte 0 und 20 eines Falles der Wert 20, für die Werte 0 und 0 eines Falles der Wert 0).

Zusätzlich zum Nachweis der Telomeraseaktivität wurden die Zusammenhänge zwischen der relativen Telomeraseaktivität und den Kriterien der pTNM-Klassifizierung (T-/N-Stadium), den Gradingstufen, den Tumorlokalisationen Larynx (La), Oropharynx (OP), Hypopharynx (HP) und Mundhöhle (OC), den Krankheitsstadien und dem Auftreten eines Rezidivs untersucht. Der Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und dem Krankheitsüberleben war nicht Aufgabe der Arbeit und wurde nicht untersucht.

Für bestimmte Fälle werden Parametergruppierungen zusammengestellt:
In Fällen einer für einen Vergleich zu geringen Anzahl von Proben wurden die Telomeraseaktivitätsgrade „hoch“ und „mittel“ als „Hochaktivitätsgruppe“ und die Aktivitätsgrade „niedrig“ und „keine Aktivität“ als „Niedrigaktivitätsgruppe“ zusammengefasst. Zudem werden als „Frühstadium“ die Stadien S1 und S2, und als Spätstadium die Stadien S3 und S4 zusammengefasst.

Der Vergleich zwischen den relativen Häufigkeiten in der Verteilung der Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe und den Parametern bzw. Parametergruppierungen erfolgt mit dem Vierfelder-χ^2-Test. Zusätzlich wird versucht, Unterschiede im Mittelwert der relativen Telomeraseaktivität zwischen den Parametern bzw. Parametergruppierungen zu finden. Der Mittelwertvergleich wird nur angegeben, wenn Normalverteilung der Werte angenommen werden kann, d.h. die Standardabweichung kleiner ist als der Mittelwert. Nach einer anschließenden Prüfung auf Varianzenhomogenität bzw. Varianzeninhomogenität mit dem F-Test (Varianzenquotiententest) wird im ersten Fall der t-Test und im zweiten Fall der Welch-Test angewandt (Lorenz 1992, Grimm und Recknagel 1985).

Als statistisch signifikant werden Testergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha < 0.05$ gewertet.

3. Ergebnisse

Es wurden Gewebeproben von insgesamt 45 Patienten untersucht. Ein Tumorfall war ein adenoidzystisches Karzinom, für den keine Einstufung des Grading vorgenommen wurde. Proben der Mundschleimhaut als Normalgewebe lagen in 43/45 der Fälle, von Tumorgewebe in 46/45, von Resektionsrändern in 69/45 und von Lymphknoten in 55/45 der Fälle vor. Die Gesamtzahl der zu untersuchenden Proben betrug 213. Mehrfach pro Fall vorliegende Proben eines Gewebes wurden bei den statistischen Berechnungen wie unter 3.8 beschrieben zusammengefasst. Bis zum Jahr 2000 erlitten 10 der untersuchten Patienten ein Rezidiv ihrer Erkrankung.

In drei Fällen enthielten die zu untersuchenden Proben der Tumorgewebe bei der histopathologischen Untersuchung kein Tumorgewebe. In diesen drei Proben konnte auch keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, weshalb diese drei Tumorproben in die statistischen Berechnungen nicht mit einflossen.

Die Proben waren z.T. von sehr geringer Gewebemasse (teilweise < 10 mg). Da das Versuchsprotokoll auf eine Masse von 50-100 mg eingestellt war, musste wie unter 2.1 beschrieben die Proteingewinnung modifiziert werden. Unabhängig von der Gewebemasse fiel auf, dass viele der Proben, ausgenommen die Proben der Lymphknoten, nach der Proteingewinnung trotz Waschprozedur deutlich hämolytisch waren. Die Proteinlysate der Lymphknoten wiesen nur wenig bis meist keine sichtbare, hämolytische Färbung auf.

Tabelle 3.1 zeigt in einer Gesamtübersicht die untersuchten Fälle mit der jeweiligen histopathologischen Diagnose des Tumors, der Tumorlokalisation, der pTNM-Klassifikation (Staging), dem Grading und der Einstufung zum Stadium der Tumorerkrankung. Angemerkt werden zusätzliche Kriterien wie das Überleben des Patienten (Stand: 2001), Auftreten von Rezidiven, Vorbestrahlung und Besonderheiten bei der histopathologischen Untersuchung.

Tab. 3.1 Übersicht zu Fallzahl, Tumordiagnose, Lokalisation, pTNM-Klassifikation, Grading und klinisches Stadium

Fall-Nr.	Diagnose	Lokalisation	staging	grading	klin. Stadium	Bemerkung
1	SCC	HP	pT4pN0	G3	4	
2	SCC	La	pT2pN0	G3	2	
3	SCC	OP	pT2pN2	G3	4	T-
4	SCC	OP	pT4pN0	G3	4	
5	SCC	OP	pT2pN0	G2	2	
6	SCC	La	pT2pN0	G2	2	
7	SCC	La	pT3pN0	G2	3	T+
8	SCC	La	pT3pN2c	G2	4	T+
9	SCC	OP	pT2pN2b	G3	4	
10	SCC	OP	pT4pN2c	G3	4	T+, mikroskop. keine Tumorzellen
11	SCC	La	pT4pN0	G3	4	T+, vorbestrahlt
12	SCC	OP	pT3pN2	G3	4	T-
13	SCC	OP	pT3pN2b	G2	4	
14	SCC	OC	pT2pN0	G2	2	R, T+
15	SCC	OP	pT3pN2a	G1	4	
16	SCC	La	pT1pN0	G2	1	
17	SCC	La	pT3pN0	G3	3	T+
18	SCC	OP	pT3pN2	G1	4	T+
19	SCC	OP	pT4pN0	G3	4	
20	SCC	OP	pT4pN3	G3	4	T-, ZT
21	SCC	La	pT3pN0	G2	3	
22	SCC	La	pT4pN0	G2	4	
23	SCC	La	pT2pN2	G2	4	
24	SCC	La	pT4pN0	G2	4	R, T+
25	SCC	OP	pT3pN2	G2	4	
26	SCC	OP	pT2pN0	G2	2	T-, ZT, mikroskop. keine Tumorzellen
27	SCC	HP	pT4pN0	G3	4	T+, mikroskop. keine Tumorzellen
28	SCC	HP	pT2pN2	G3	4	
29	SCC	OP	pT2pN0	G2	2	
30	SCC	OC	pT1pN0	G1	1	
31	SCC	OC	pT3pN2	G2	4	
32	SCC	HP	pT2pN2	G2	4	
33	SCC	La	pT2pN0	G3	2	
34	SCC	OC	pT4pN0	G2	4	
35	SCC	OP	pT3pN2	G3	4	R, T+
36	SCC	La	pT1pN0	G1	1	
37	SCC	La	pT3pN0	G1	3	
38	SCC	HP	pT3pN2	G2	4	T-
39	SCC	OP	pT4pN2	G2	4	
40	ACC	HP	pT4pN3	n.d.	4	
41	SCC	OC	pT2pN0	G2	2	
42	SCC	La	pT4pN0	G2	4	
43	SCC	La	pT1pN0	G2	1	
44	SCC	OC	pT4pN1	G3	4	R, T+
45	SCC	La	pT4pN0	G3	4	T-, ZT

(R = Rezidiv, (T-) = Tod, tumorunabhängig; (T+) = Tod, tumorabhängig; n.d. = nicht durchgeführt, ZT = Zweittumor)

Nachstehende Tabellen zeigen jeweils die Anzahl und die Verteilung der Tumor- und Lymphknotenstadien, Grading und Krankheitsstadium nach den Tumorlokalisationen.

Tab. 3.2 Anzahl und Verteilung der Tumorstadien nach Lokalisation

	T 1	**T 2**	**T3**	**T4**	Gesamt
Mundhöhle	1	2	1	2	6
Oropharynx	-	5	6	5	16
Hypopharynx	-	2	1	3	6
Larynx	3	4	5	5	17
Gesamt	4	13	13	15	45

Tab. 3.3 Anzahl und Verteilung der Lymphknotenstadien nach Lokalisation

	N 0	**N 1**	**N 2**	**N 3**	Gesamt
Mundhöhle	4	1	1	-	6
Oropharynx	5	-	10	1	16
Hypopharynx	2	-	3	1	6
Larynx	15	-	2	-	17
Gesamt	26	1	16	2	45

Tab. 3.4 Anzahl und Verteilung des Grading nach Lokalisation

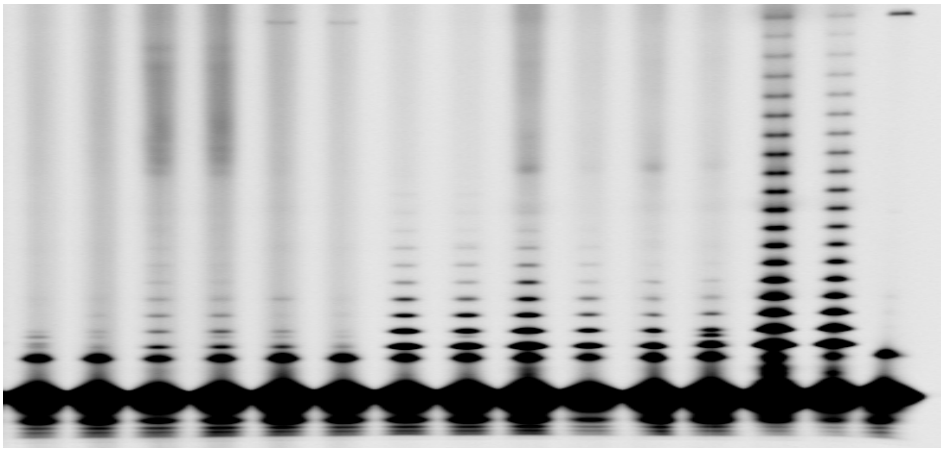
	G 1	**G 2**	**G 3**	Gesamt
Mundhöhle	1	4	1	6
Oropharynx	2	6	8	16
Hypopharynx	-	2	3	5
Larynx	2	10	5	17
Gesamt	5	22	17	44

Tab. 3.5 Anzahl und Verteilung der Krankheitsstadien nach Lokalisation

	Stadium 1	**Stadium 2**	**Stadium 3**	**Stadium 4**	**Gesamt**
Mundhöhle	1	2	-	3	6
Oropharynx	-	3	-	13	16
Hypopharynx	-	-	-	6	6
Larynx	3	3	4	7	17
Gesamt	4	8	4	29	45

Die Abbildung 3.1 zeigt die Untersuchungsergebnisse eines Beispielfalls nach der Gelelektrophorese. In den zwei Verdünnungsstufen wurden jeweils von links nach rechts die Proben der Mundschleimhaut (M), des Tumors (T), der Resektionsränder (R), der Lymphknoten (L), des externen Standards (eS) und der Negativkontrolle (N) aufgetragen. Die Abbildung 3.1 zeigt demnach einen Beispielfall mit telomerasenegativer Mundschleimhaut, einem telomerasepositiven Tumor, einem schwach telomerasepositiven und einem stark telomerasepositiven Resektionsrand, zwei telomerasepositiven Lymphknoten, dem stark telomerasepositiven, externen Standard und der Negativkontrolle. Auffallend ist die geringe Signalstärke des internen Standards.

Abb. 3.1 Beispielfall



M T R1 R2 L1 L2 eS N

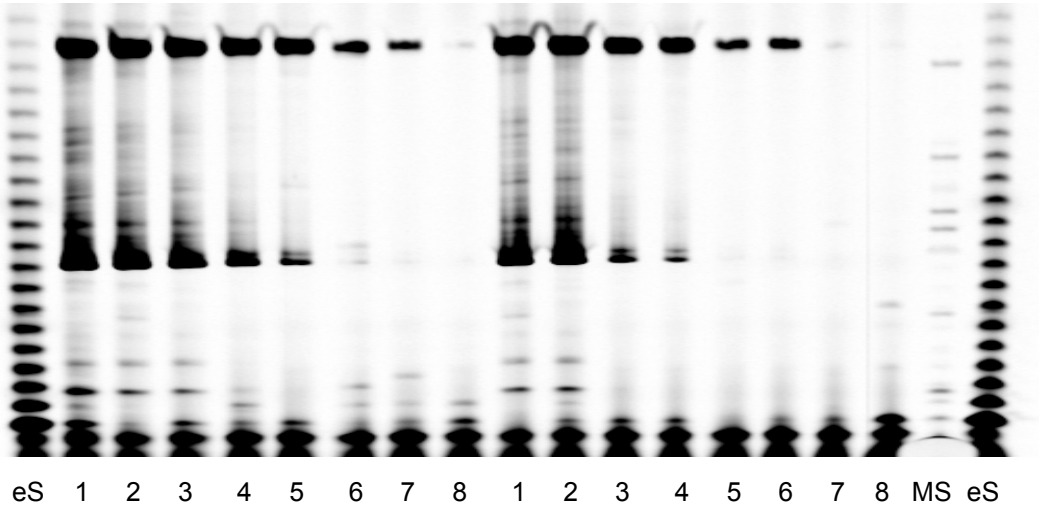
(M = Mundschleimhaut, T = Tumor, R = Resektionsrand, L = Lymphknoten, eS = externer Standard, N = Negativkontrolle)

3.1 Positivkontrollen

3.1.1 Interner Standard

Die Abbildungen 3.2 bis 3.6 zeigen die Verdünnungsreihen des Amplifikationsstandards, bis eine geeignete Konzentration gefunden werden konnte.

Abb. 3.2 Erste Verdünnungsreihe des Amplifikationsstandards



eS = externer Standard (HRT-18)

MS = Massenstandard der Firma MWG-Biotech; die letzte, sichtbare Marke entspricht 145 bp

1 = 10^{-5} g

2 = $5x10^{-6}$ g

3 = 10^{-6} g

4 = $5x10^{-7}$ g

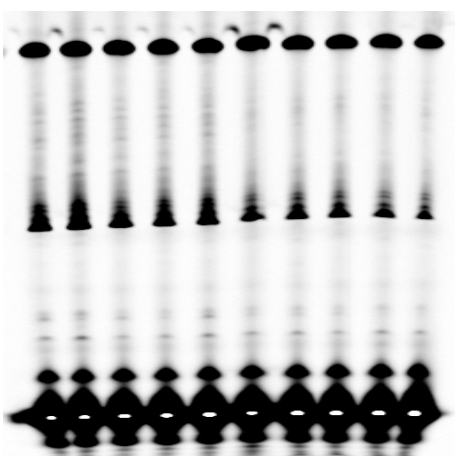
5 = 10^{-7} g

6 = $5x10^{-8}$ g

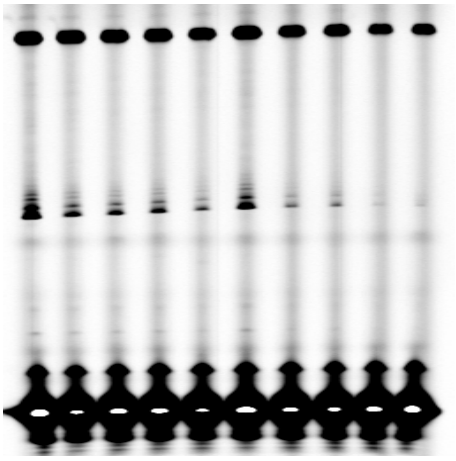
7 = 10^{-8} g

8 = 10^{-9} g

Abb. 3.3 und Abb. 3.4 Zweite Verdünnungsreihe des Amplifikationsstandards

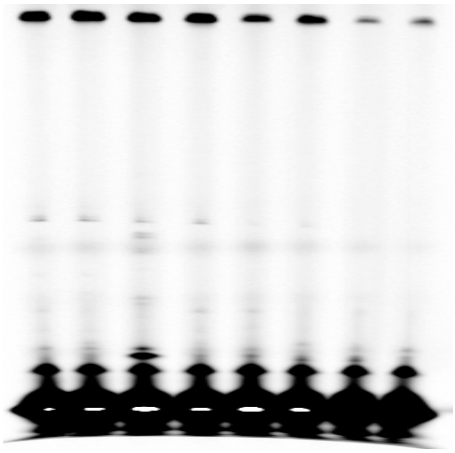


$5x10^{-7}$ $4x10^{-7}$ $3x10^{-7}$ $2x10^{-7}$ $1x10^{-7}$



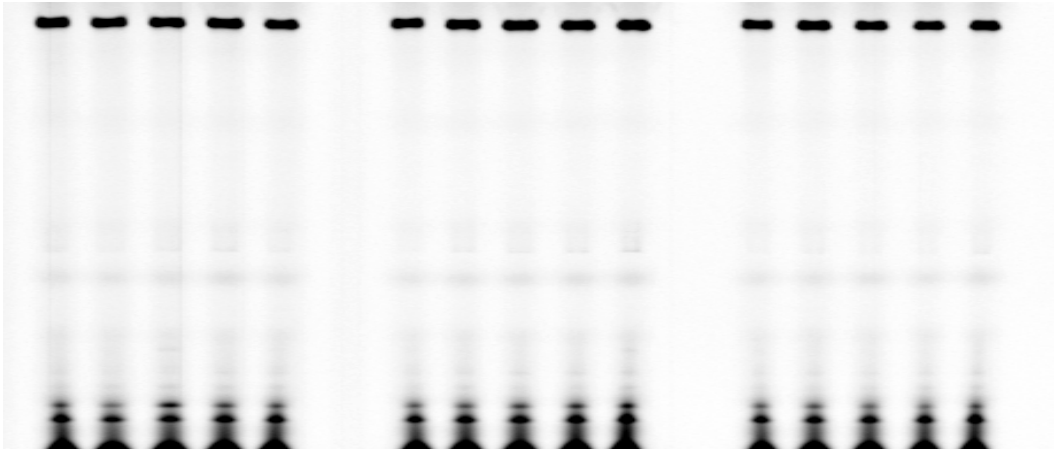
$9x10^{-8}$ $8x10^{-8}$ $7x10^{-8}$ $6x10^{-8}$ $5x10^{-8}$

Abb. 3.5 Dritte Verdünnungsreihe des Amplifikationsstandards



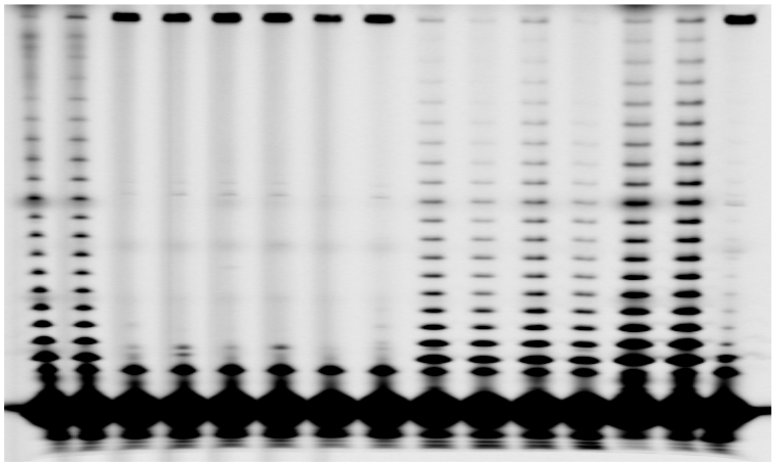
$4x10^{-8}$ $3x10^{-8}$ $2x10^{-8}$ $1x10^{-8}$

Abb. 3.6 Valididierung des Amplifikationsstandards mit $2x10^{-8}$ g



Das Oligonukleotid wurde in den Untersuchungen mit einer Konzentration von 20 Nanogramm ($2x10^{-8}$ g) pro 25 µl Probenvolumen eingesetzt.

Abb. 3.7 Anwendung des Amplifikationsstandards

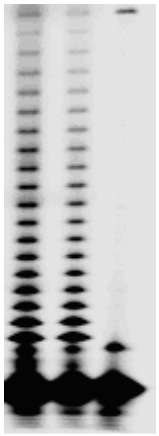


Der interne Standard wurde bei geringer bzw. fehlender Telomeraseaktivität sehr stark, bei hoher Telomeraseaktivität allerdings regelmäßig nur sehr schwach amplifiziert. Eine fehlende Amplifikation des internen Standards trat in 91/213 (43%) der Proben auf.

3.1.2 Externer Standard

Die Abbildung 3.8 zeigt das Bild der Telomeraseaktivität von HRT-18 als externer Standard. Die Amplifikation zeigte bei allen Versuchen ein konstantes Niveau der Telomeraseaktivität, was Tabelle 3.1 veranschaulicht.

Abb. 3.8 Amplifikation des externen Standards



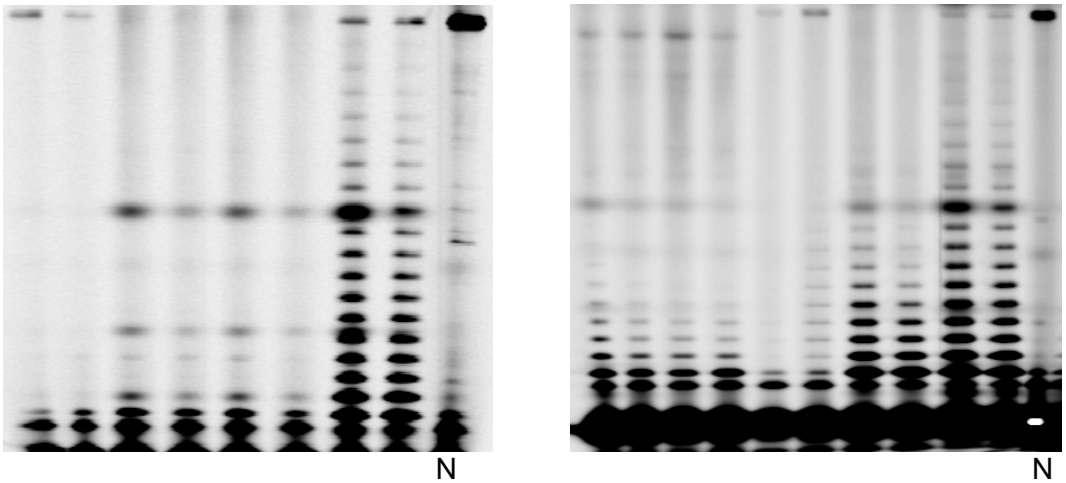
Tab. 3.1 Ergebnisse der Amplifikation des externen Standards

Externer Standard / Zellinie HRT-18	
Anzahl:	45
davon telomerasepositiv:	45 (100%)
davon telomerasenegativ:	-
Spannweite:	8
Median:	100
Mittelwert:	95
Mittelwert aller positiven Proben:	95
Standardabweichung:	8

3.2 Negativkontrolle

In den meisten Fällen findet sich nach der Gelelektrophorese in der Spur der Negativkontrolle (N) keine Telomeraseaktivität. Nur wenige Fälle weisen eine diskrete Signalgebung auf, die in ihrer Intensität jedoch eindeutig von den Signalen telomerasepositiver Proben unterschieden werden können und als Artefakte zu diskutieren sind. Die Abbildung 3.9 zeigt zwei Beispiele von Artefakten der Negativkontrollen.

Abb. 3.9 Artefakte bei Negativkontrollen

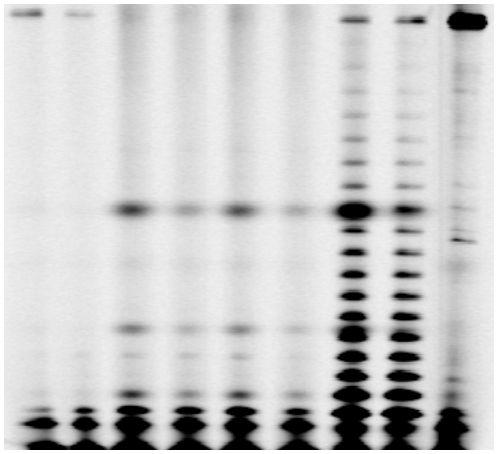


3.3 Zusätzliche Untersuchungen

3.3.1 RNAase-Behandlung

Auf RNAase-Sensitivität wurden die Normalgewebe der Fälle 2, 11 und 44 mit überdurchschnittlich hoher Telomeraseaktivität untersucht. Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis der drei Proben der Mundschleimhaut mit sistierter Signalgebung nach der Behandlung mit RNAase (eS = externer Standard, N = Negativkontrolle).

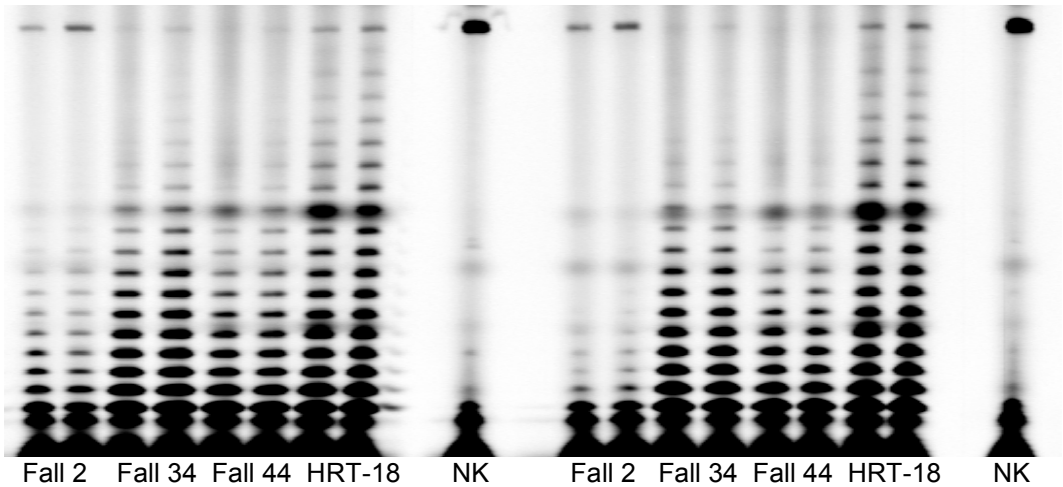
Abb. 3.10 Telomerasenegative Proben von Mundschleimhaut nach RNAase-Behandlung



3.3.2 Untersuchung zum Verlust an Enzymaktivität

Untersucht wurden 3 Tumorgewebe mit hoher Telomeraseaktivität. Die Änderung der Telomeraseaktivität nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur zeigen die Abbildung 3.11 und die folgenden Tabellen.

Abb. 3.11 Änderung der Telomeraseaktivität nach Inkubation bei Raumtemperatur



Tab. 3.2 Änderung der relativen Telomeraseaktivität nach Inkubation bei Raumtemperatur

	Fall 1	Fall 2	Fall 3
Telomeraseaktivität	56	78	72
> 2 Stunden	39	72	67
Δ Telomeraseaktivität	- 17	- 6	- 5

Im Ergebnis zeigen sich Veränderungen, die jeweils innerhalb einer Standardabweichung für Tumorgewebe (19) liegen. In keinem Fall änderte sich das Niveau der relativen Telomeraseaktivität.

3.3.3 Messung der Hämoglobinkonzentration

Tabelle 3.3 zeigt den Anteil der Proben, die jeweils unter oder über dem für Taq-Polymerasen kritischen Wert der Hämoglobinkonzentration liegen.

Tab. 3.3 Statistische Größen zum Hämoglobin- (Hb) Gehalt aller Proben (n)

Hb-Werte / alle Proben	
n	213
davon >100 mg/dl	72 (34%)
davon <100 mg/dl	141 (66%)
Spannweite	1-559
Mittelwert	98
Median	68
Standardabweichung	97

Es liegen deutlich mehr Proben (66%) unter der kritischen Hämoglobin-Konzentration, als darüber (34%). Tabelle 3.4. zeigt die Verteilung der Proben über und unter der kritischen Hämoglobinkonzentration von 100 mg/dl nach positiver und fehlender Amplifikation des internen Standards.

Tab. 3.4 Verteilung Amplifikation des internen Standards und der Hämoglobinkonzentration

Hämoglobinkonz.	$standard_{pos}$	$standard_{neg}$	Anzahl
< 100 mg/dl	56	85	141
> 100 mg/dl	35	37	72
Anzahl	91	122	213

Insgesamt finden sich weniger Proben mit positiver Amplifikation des Internen Standards (91/213, 43%), als mit fehlender (122/213, 57%). In der Gruppe mit Hämoglobinkonzentrationen über dem kritischen Wert findet sich eine annähernde Gleichverteilung der Proben zwischen positiver und fehlender Amplifikation (35/72, 49% versus 37/72, 51%). Die Proben mit Hämoglobinkonzentrationen unter dem kritischen Wert weisen einen höheren Anteil Fälle mit fehlender Amplifikation (85/141, 60%), als mit positiver Amplifikation (56/141, 40%) auf. Zwischen den beiden Gruppen mit einer Hämoglobinkonzentration über bzw. unter dem kritischen Wert gibt es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Verteilung der Fälle.
Tabelle 3.5 zeigt die Gewebe und die entsprechenden Mittelwerte der Hämoglobinkonzentration.

Tab. 3.5 Mittlere Hämoglobinkonzentration und Amplifikation des internen Standards nach Gewebetyp

Gewebe	Mittelwert der Hämoglobinkonz. [mg/dl]	Anteil Proben mit fehlender Amplifikation des internen Standards
Mundschleimhaut	104	24/43 (56%)
Tumorgewebe	68	30/46 (65%)
Resektionsränder	121	25/69 (36%)
Lymphknotengewebe	89	44/55 (80%)

Es zeigt sich, dass im Durchschnitt die Hämoglobinkonzentrationen der Proben der Mundschleimhaut wenig, die der Resektionsränder deutlicher über dem kritischen Wert liegen. Tumorgewebe und Lymphknotengewebe liegen jeweils unter diesem Wert. Genau invers dazu verhalten sich die Prozentsätze der Proben mit fehlender Amplifikation des internen Standards: Die Gewebeproben mit hohen Hämoglobinkonzentrationen (Mundschleimhaut und Resektionsränder) zeigen einen

vergleichsweise niedrigeren Prozentsatz an Fällen mit fehlender Amplifikation des internen Standards als die Gewebeproben mit niedrigen Hämoglobinkonzentrationen (Tumorgewebe und Lymphknoten), bei denen sich jeweils ein höherer Prozentsatz an Fällen mit fehlender Standard-Amplifikation findet.
Von den Proben mit fehlender Amplifikation des internen Standards waren jedoch in den meisten Fällen die entsprechenden Gewebeproben telomerasepositiv. War das nicht der Fall, wurden in einem Kontrollexperiment die Proben verdünnt und erneut die Amplifikation des Standards überprüft. Nur in 11 Fällen zeigte sich auch hier weder Telomeraseaktivität der Gewebe noch eine Amplifikation des internen Standards, so dass man hier eventuell falsch-negative Ergebnisse vorliegen können.

Tabelle 3.6 zeigt die Verteilung dieser möglicherweise falsch-negativen Fälle auf die jeweiligen Gewebe.

Tab. 3.6 Gewebetyp und Anzahl möglicher, falsch-negativer Proben

Gewebe	Ergebnis möglicherweise falsch-negativ
Mundschleimhaut	5
Tumorgewebe	3
Resektionsränder	2
Lymphknotengewebe	1
Anzahl	11

Da es sich in 5 Fällen um Proben der Mundschleimhaut handelt, verbleiben von den relevanten Geweben Tumorgewebe, Resektionsränder und Lymphknoten insgesamt 6 der 213 (3%) Proben mit einem möglicherweise falsch-negativen Ergebnis, d.h. nicht amplifizierter, interner Standard und fehlende Telomeraseaktivität der Gewebe.

3.4 Ergebnisse der Gewebeproben

3.4.1 Ergebnisse der Proben der Mundschleimhaut

Bei den Proben der Mundschleimhaut („Normalgewebe“) wurden in 43/45 der Fälle jeweils eine Gewebeprobe je Fall untersucht. Die Grafik in Abb. 3.12 zeigt die Verteilung der relativen Telomeraseaktivität der Mundschleimhaut je Fall.

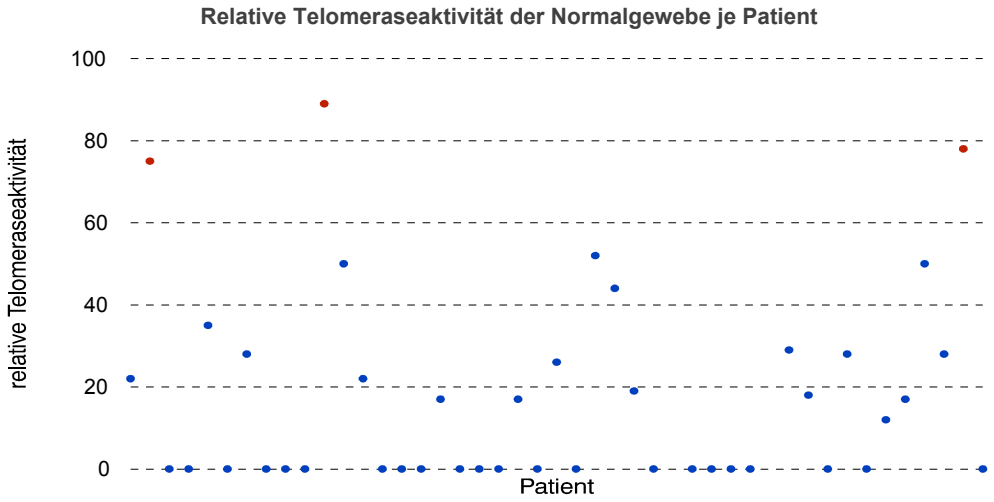


Abb. 3.12 Relative Telomeraseaktivität der Mundschleimhautgewebe je Fall

Die drei Fälle mit extrem hoher Telomeraseaktivität fließen nicht in die statistischen Berechnungen ein, so dass insgesamt 40 Gewebeproben ausgewertet wurden.

Tab. 3.7 Ergebnisse der Mundschleimhaut

n	40
davon telomerasepositiv:	18 (45%)
davon telomerasenegativ:	22 (55%)
Spannweite:	52
Median:	0
MW:	13
MW_{pos}:	29
Standardabweichung:	17

3.4.2 Ergebnisse der Proben der Tumorgewebe

Bei einem Patient lagen 2 Gewebeproben eines identischen Tumors vor. In den statistischen Auswertungen wird nur der Maximalwert dieser beiden Proben des Patienten berücksichtigt. In 3 Fällen der telomerasenegativen Tumoren fand sich mikroskopisch in den untersuchten Geweben kein Tumorgewebe, so dass diese nicht in die Auswertungen für Tumorproben eingingen. Die Verteilung der relativen Telomeraseaktivität der Tumorgewebe zeigt die Grafik in Abbildung 3.13.

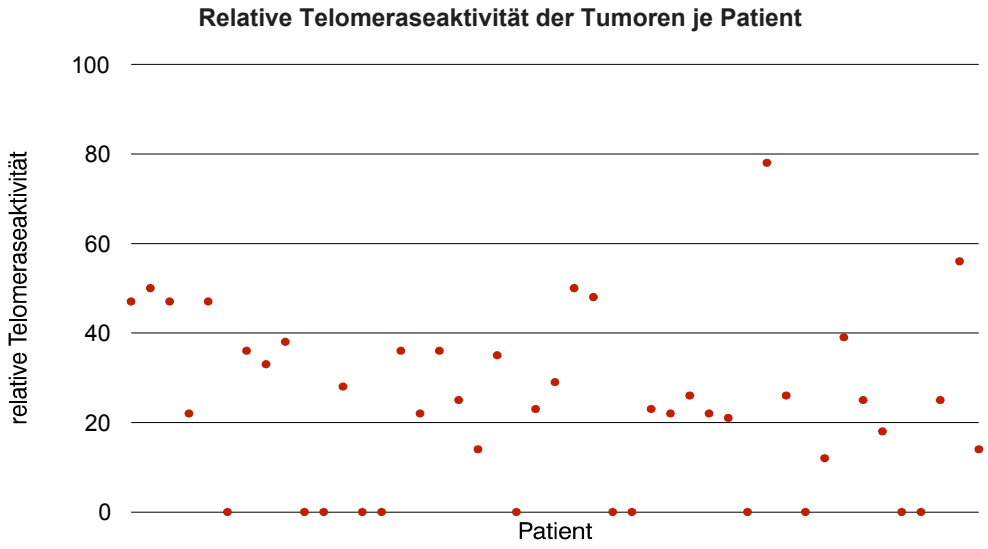


Abb. 3.13 Relative Telomeraseaktivität der Tumorgewebe je Fall

Tab. 3.8 Ergebnisse der Tumorgewebe

n	42
davon telomerasepositiv:	33 (79%)
davon telomerasenegativ:	9 (21%)
Spannweite:	78
Median:	25
MW:	25,55
MW_{pos}:	33
Standardabweichung:	18,51

Tab. 3.9 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Tumorgewebe nach pTNM-Kriterien und der Stadiengruppierung

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	12 (92%)	1 (8%)	31,31	21,2	13
T3	10 (77%)	3 (23%)	26,23	14,64	13
T2	8 (67%)	4 (33%)	23,08	19,69	12
T1	2 (50%)	2 (50%)	12,0	13,95	4
N3	2	-	26,5	12,02	2
N2	14	1	29,33	11,84	15
N1	1	-	25	-	1
N0	15	9	23,15	22,45	24
G3	13 (87%)	2 (13%)	27,0	15,67	15
G2	15 (71%)	6 (29%)	26,24	21,87	21
G1	3 (60%)	2 (40%)	19,8	13,97	5
La	10	7	21,24	19,91	17
OP	13	1	29,5	13,52	14
HP	5	-	29,6	12,68	5
OC	4	2	25,17	28,53	6
Stadium 1	2	2	12,0	13,95	4
Stadium 2	3	4	17,0	22,99	7
Stadium 3	2	2	21,0	18,0	4
Stadium 4	25	2	30,44	16,81	27
Frühstadium	5	6	15,18	19,54	11
Spätstadium	27	4	29,23	16,96	31

Tab. 3.9 zeigt für die **Tumorkategorien** eine Zunahme der Fälle in der Hochaktivitätsgruppe mit steigender Tumorkategorie, während die Anzahl der Fälle in der Niedrigaktivitätsgruppe mit steigender Tumorkategorie abnimmt. Deutlicher wird dieser Zusammenhang, wenn man die Prozentsätze zwischen Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe je Tumorkategorie vergleicht. Der Zusammenhang ist im χ^2 - Test jedoch nicht signifikant ($\alpha > 0.05$). Auch der Mittelwert der Telomeraseaktivität nimmt mit steigender Tumorkategorie zu. Dieser Unterschied ist im Mittelwertvergleich zwischen T2 bis T4 nach dem χ^2 - Test jedoch nicht signifikant ($\alpha > 0.05$).

In den **Lymphknotenkategorien** erreicht die mittlere Telomeraseaktivität maximale Werte in N2 vor N3, N1 und N0. Der Mittelwertvergleich ist für N0, N2 und N3 nicht signifikant ($\alpha > 0.05$). Fasst man die Verteilung der Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe zusammen und vergleicht N1, N2 und N3 mit N0, zeigt sich ein signifikanter Unterschied, ebenso für N0/N1 gegenüber N2/N3 für $\alpha = 0.05$, nicht aber für N0/N1/N2 gegenüber N3 ($\alpha > 0.05$). Der Mittelwertvergleich zwischen den Lymphknotenkategorie in diesen ist jedoch jeweils nicht signifikant.

Ähnlich wie in den Tumorkategorie findet sich auch in den **Gradingstufen** eine zunehmende Anzahl der Fälle in der Hochaktivitätsgruppe mit steigender Gradingstufe, entsprechend verhält es sich in der Niedrigaktivitätsgruppe umgekehrt. Der Zusammenhang ist allerdings nicht signifikant. Auch der Mittelwert der Telomeraseaktivität steigt mit zunehmender Gradingstufe an, im Mittelwertvergleich ist der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Bei den **Tumorlokalisationen** ist nur der Unterschied zwischen Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe für die Larynx- und Oropharynxtumoren signifikant für $\alpha = 0.05$, der Unterschied im Mittelwertvergleich der Telomeraseaktivität jedoch nicht.

Zwischen den **Krankheitsstadien** ist ein Mittelwertvergleich nur für Stadium 3 und 4 möglich, der Unterschied ist nicht signifikant. Zwischen Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe findet sich im Vergleich Stadium 1 gegen Stadium 2,3,4 kein signifikanter Unterschied. Vergleicht man die Stadien1 und 2 (Frühstadium) mit den Stadien 3 und 4 (Spätstadium), ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0.01$). Auch zwischen den Stadien 1,2,3 und dem Stadium 4 ist der Unterschied signifikant ($\alpha = 0.01$). Legt man für die Hochaktivitätsgruppe eine höhere, relative Telomeraseaktivität größer/gleich 26 fest (= MW_{pos} der Gesamttumoren), findet sich in den beiden Parametergruppierungen jedoch kein Unterschied mehr.

In Tabelle 3.10 werden die 8/9 der Fälle mit telomerasenegativen Tumoren betrachtet, die im Lymphknotenstatus N0 eingestuft wurden, inwieweit hier der Nachweis von Telomeraseaktivität in den Resektionsrändern mit dem Rezidivverhalten zusammenhängt.

Tab. 3.10 Übersicht zu Rezidivverhalten bei telomerasenegativen N0-Tumoren, Telomeraseaktivität der Resektionsränder, Lokalisation und Stadieneinteilung

Fall-Nr./ Jahr der Erkrankung	1=Rezidiv 0=rezidiv-frei	Telomerase aktivität der Resektions-Ränder	Telomerase aktivität der Lymph-Knoten	Lokalisation T/N/G	Krankheits-Stadium
6/96	0	0	-	La 2/0/2	2
11/96	1	0	86	La 4/0/3	4
14/97	1	0	-	OC 2/0/2	2
21/97	0	67	86	OC 3/0/2	3
33/97	0	-	0	La 2/0/3	2
36/97	0	-	65	La 1/0/1	1
41/97	0	17	19	OC 2/0/2	2
42/97	0	0	-	La 1/0/2	1

(T = Tumorkategorie, N = Lymphknotenkategorie, G = histopathologisches Grading)

Zwei der 4 Patienten mit telomerasenegativen Resektionsrändern verstarben bis 2000, wobei in einem Fall eine überdurchschnittlich hohe Telomeraseaktivität für Lymphknoten vorlag. Die anderen beiden Patienten mit telomerasenegativen Resektionsrändern lebten Ende 2000 noch. Hier waren keine Lymphknoten zur Untersuchung verfügbar. In diesen Fällen lagen Krankheitsstadien 1 und 2 vor.
Die beiden Patienten mit telomerasepositiven Resektionsrändern lebten zum Ende des Jahres 2000 noch. In einem Fall lag niedrige Telomeraseaktivität sowohl im Resektionsrand wie auch im Lymphknoten vor. Der andere Fall weist jedoch eine überdurchschnittlich hohe Telomeraseaktivität im Resektionsrand und im Lymphknoten auf.

3.4.3 Ergebnisse der Proben der Resektionsränder

In 40 Fällen wurden Resektionsränder untersucht, wobei 69 Proben untersucht wurden. Die Verteilung der relativen Telomeraseaktivität der Resektionsränder zeigt die Grafik in Abbildung 3.14.

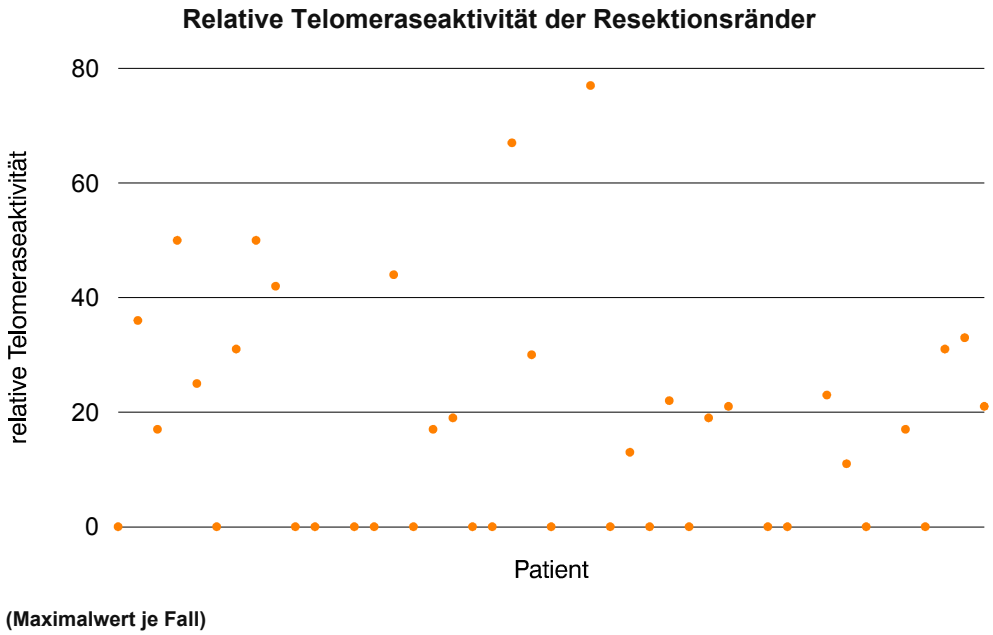


Abb. 3.14 Relative Telomeraseaktivität der Resektionsränder je Fall

Tab. 3.11 Ergebnisse der Resektionsränder

n	40
davon telomerasepositiv (R+):	23 (58%)
davon telomerasenegativ (R-):	17 (42%)
Spannweite:	77
Median:	17
MW:	17,9
MW_{pos}:	31
Standardabweichung:	20,20

Der Prozentsatz telomerasepositiver Resektionsränder (58%) liegt niedriger als der der telomerasepositiven Tumorgewebe (79%). Die Spannweite der Werte liegt mit dem Maximalwert der Resektionsränder (77) über dem Maximalwert der Gewebe der Mundschleimhaut (52) und entspricht etwa dem Maximalwert der Tumorgewebe (78). Der Median der Resektionsränder allerdings liegt wie bei den Geweben der Mundschleimhaut bei 0 im Vergleich zu den Tumoren mit Median = 25. Der Gesamt-Mittelwert (MW) aller Resektionsränder liegt mit 18 zwischen dem der Mundschleimhaut (13) und dem der Tumorgewebe (26). Der Gesamt-Mittelwert aller telomerasepositiven Proben (MW_{pos}) liegt ebenfalls mit 31 zwischen dem der der Proben der Mundschleimhaut mit 29 und den Tumoren mit 33.

Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Anteilen telomerasepositiver und telomerasenegativer Resektionsränder im Vergleich zu den Proben der Mundschleimhaut ($\alpha > 0.05$).
Bei 23/40 (58%) der Patienten war mindestens 1 Probe der Resektionsränder telomerasepositiv (R+). In 20/23 (87%) dieser Fälle war auch das entsprechende Tumorgewebe telomerasepositiv, entsprechend waren 3/23 (13%) der Tumorgewebe telomerasenegativ. Bei den anderen 17/40 (42%) der Patienten war keine Telomeraseaktivität in den Resektionsrändern messbar (R-). In zwei Fällen davon war kein Tumorgewebe verfügbar. In 10 der verbleibenden 15 Fälle (67%) waren die entsprechenden Tumorgewebe telomerasepositiv und 5/15 Fälle (23%) zeigten keine Telomeraseaktivität in den Tumorgeweben. Der höhere Anteil telomerasepositiver Tumoren bei Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern ist nicht signifikant ($\alpha > 0.05$).

Tab. 3.12 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Resektionsränder nach pTNM-Kriterien und der Stadiengruppierung

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	5	8	13,69	17,38	13
T3	9	3	29,83	24,86	12
T2	7	5	15,0	15,04	12
T1	-	3	0	0	3
N3	-	1	0	0	1
N2	8	7	20,0	23,46	15
N1	1	-	31	-	1
N0	12	11	16,74	18,61	23
G3	7	8	15,13	17,47	15
G2	11	10	19,19	22,86	21
G1	3	1	21,5	18,05	4
La	9	5	22,0	20,97	14
OP	8	7	19,73	23,97	15
HP	1	4	9,0	9,02	5
OC	3	3	11,17	13,14	6
Stadium 1	-	3	0	0	3
Stadium 2	4	3	14,29	14,52	7
Stadium 3	4	-	34,5	22,41	4
Stadium 4	14	12	18,38	20,95	26
Frühstadium	4	6	10,0	13,72	10
Spätstadium	18	12	20,53	21,48	30

Es finden sich im χ^2 - Test keine signifikanten Unterschiede der Parameter (α > 0.05). Ein Mittelwertvergleich wurde nicht durchgeführt (Mittelwerte meist kleiner als Standardabweichung).

3.4.3.1 Fälle mit telomerasepositiven Resektionsrändern (R+)

Tab. 3.13 Ergebnisse der Tumoren von Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern

n	22
davon telomerasepositiv:	20 (91%)
davon telomerasenegativ:	2 (9%)
Spannweite:	56
Median:	29
MW:	29,64
MW_{pos}:	33
Standardabweichung:	15,41

Tab. 3.14 Ergebnisse der Lymphknoten von Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern

n	17
davon telomerasepositiv:	16 (94%)
davon telomerasenegativ	1 (6%)
Spannweite:	86
Median:	56
MW:	51,47
MW_{pos}:	55
Standardabweichung:	23,69

Gegenüber den Proben der Mundschleimhaut finden sich sowohl bei den Tumoren als auch bei den Lymphknoten der Fälle mit telomerasepositiven Resektionsrändern signifikant mehr telomerasepositive Fälle (jeweils α = 0.01). Der Unterschied zwischen der mittleren Telomeraseaktivität der Tumoren und der mittleren Telomeraseaktivität der Lymphknoten ist signifikant (α = 0.01).

Tab. 3.15 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Tumorgewebe in Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern nach pTNM-Kriterien und der Stadiengruppierung

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	5	-	28,0	16,20	5
T3	8	2	28,70	14,21	10
T2	6	1	32,14	18,51	7
T1	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-
N2	9	-	34,33	10,03	9
N1	1	-	31,0	-	1
N0	9	3	26,5	18,70	12
G3	7	-	33,14	13,32	7
G2	10	2	28,92	17,73	12
G1	2	1	24,33	12,01	3
La	7	2	28,89	18,29	9
OP	8	-	35,63	11,35	8
HP	2	-	30,0	12,73	2
OC	2	1	15,67	13,65	3
Stadium 1	-	-	-	-	-
Stadium 2	3	1	29,75	23,47	4
Stadium 3	2	2	21,0	18,0	4
Stadium 4	13	1	32,07	12,35	14
Frühstadium	3 (75%)	1 (25%)	29,75	23,47	4
Spätstadium	15 (83%)	3 (17%)	29,61	14,01	18

Die Unterschiede in der Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe sind nicht signifikant.

Tab. 3.16 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Lymphknoten in Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern nach pTNM-Kriterien und der Stadiengruppierung

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	2	-	67,0	15,56	2
T3	9	1	47,8	27,21	10
T2	5	-	52,6	19,06	5
T1	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-
N2	7	1	40,25	21,19	8
N1	1	-	56,0	-	1
N0	8	-	62,13	23,61	8
G3	4	-	70,5	12,29	4
G2	10	-	51,3	21,5	10
G1	2	1	26,67	23,18	3
La	5	-	65,2	22,55	5
OP	6	1	47,86	25,96	7
HP	2	-	57,0	5,66	2
OC	3	-	33,33	19,86	3
Stadium 1	-	-	-	-	-
Stadium 2	3	-	45,67	23,29	3
Stadium 3	4	-	70,5	22,16	4
Stadium 4	9	1	45,6	22,44	10
Frühstadium	3 (100%)	-	45,67	23,29	3
Spätstadium	13 (93%)	1 (7%)	52,6	23,57	14

In der Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe findet sich zwischen den Parametern und den Parametergruppierungen der Lymphknoten telomerasepositiver Resektionsränder ein fraglicher, signifikanter Unterschied in der Parametergruppierung G1 versus G2,3. Legt man in diesem Fall für die Hochaktivitätsgruppe Werte größer/gleich dem MW_{pos} aller Lymphknoten (47) fest, ergibt sich für die Parametergruppierung G3 : G2 : G1 folgender Unterschied:

	HAG	NAG	Signifikanz
G3	0	3	$\alpha = 0.05$
G2	6	4	
G1	4	0	

Für die Parametergruppierung G2, 3 : G1 ergibt sich:

	HAG	NAG	Signifikanz
G2, 3	6	7	$\alpha = 0.05$
G1	4	0	

Der Unterschied der mittleren Telomeraseaktivität im Mittelwertvergleich für die Parametergruppierung G1 : G2, 3 (MW 27 versus 57) ist signifikant für $\alpha = 0.05$.
Alle übrigen, vergleichbaren Parameter und Parametergruppierungen sind ohne signifikante Unterschiede.

3.4.3.2 Fälle mit telomerasenegativen Resektionsrändern (R-)

Tab. 3.17 Ergebnisse der Tumoren von Fällen mit telomerasenegativen Resektionsrändern

n	15
davon telomerasepositiv:	10 (67%)
davon telomerasenegativ:	5 (33%)
Spannweite:	78
Median:	23
MW:	21,67
MW_{pos}:	33
Standardabweichung:	21,55

Tab. 3.18 Ergebnisse der Lymphknoten von Fällen mit telomerasenegativen Resektionsrändern

n	11
davon telomerasepositiv:	9 (82%)
davon telomerasenegativ:	2 (18%)
Spannweite:	86
Median:	47
MW:	46,27
MW_{pos}:	57
Standardabweichung:	29,87

Gegenüber den Proben der Mundschleimhaut findet sich bei den Lymphknoten der Fälle mit telomerasenegativen Resektionsrändern ein höherer Anteil telomerasepositiver Fälle (α = 0.05), kein signifikanter Unterschied dagegen bei den Tumoren. Der Unterschied zwischen den Mittelwerten der Tumoren und Lymphknoten ist signifikant für α = 0.05.

Tab. 3.19 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Tumoren in Fällen mit telomerasenegativen Resektionsrändern nach pTNM-Kriterien und der Stadiengruppierung

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	5	1	33,17	27,35	6
T3	1	1	13,0	18,39	2
T2	2	2	13,0	15,21	4
T1	2	1	16,0	14,0	3
N3	1	-	35	-	1
N2	4	1	20,6	11,72	5
N1	-	-	-	-	-
N0	5	4	20,78	26,84	9
G3	5	1	24,17	16,32	6
G2	4	4	19,25	26,91	8
G1	1	-	26,0	-	1
La	2	3	10,2	14,18	5
OP	4	1	20,0	13,44	5
HP	2	-	35,0	16,97	2
OC	2	1	34,67	39,72	3
Stadium 1	2	1	16,0	14,0	3
Stadium 2	-	2	0	0	2
Stadium 3	-	-	-	-	-
Stadium 4	8	2	27,7	22,88	10
Frühstadium	2 (40%)	3 (60%)	9,6	13,22	5
Spätstadium	8 (80%)	2 (20%)	28,1	22,37	10

Die Unterschiede in der Verteilung sind nicht signifikant. Ein Mittelwertvergleich wurde nicht durchgeführt.

Tab. 3.20 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Lymphknoten in Fällen mit telomerasenegativen Resektionsrändern nach pTNM-Kriterien und der Stadiengruppierung

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	3	2	34,0	37,2	5
T3	1	-	47,0	-	1
T2	3	-	61,67	26,41	2
T1	2	-	53,5	20,51	2
N3	1	-	56,0	-	1
N2	3	2	33,0	35,63	5
N1	-	-	-	-	-
N0	5	-	57,6	23,59	5
G3	4	1	40,6	32,26	5
G2	4	1	47,6	32,07	5
G1	1	-	68,0	-	1
La	3	-	70,0	26,85	3
OP	4	2	33,0	28,58	6
HP	1	-	33,0	-	1
OC	1	-	68,0	-	1
Stadium 1	2	-	53,5	20,51	2
Stadium 2	1	-	67,0	-	1
Stadium 3	-	-	-	-	-
Stadium 4	6	2	41,88	33,40	8
Frühstadium	3 (100%)	-	58,0	16,46	3
Spätstadium	6 (75%)	2 (25%)	41,88	33,40	8

Die Unterschiede in der Verteilung sind nicht signifikant. Ein Mittelwertvergleich wurde nicht durchgeführt.

3.4.3.3 Vergleich zwischen Fällen mit telomerasepositiven und telomerasenegativen Resektionsrändern

Es zeigt sich gegenüber den Fällen mit telomerasenegativen Resektionsrändern eine erhöhte, mittlere Telomeraseaktivität der Tumoren und Lymphknoten in den Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern. Ausgenommen T4 und G1 zeigen die Fälle mit telomerasepositiven Resektionsrändern in den Parametern Tumorkategorie, Lymphknotenkategorie, Grading und Krankheitsstadium eine höhere, mittlere Telomeraseaktivität gegenüber den Fällen mit telomerasenegativen Resektionsrändern. In den Tumorlokalisationen finden sich für La und OP höhere Werte in (R+), für HP und OC dagegen höhere Werte in (R-).

Während bei den Tumoren im Spätstadium die Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe zwischen (R+) und (R-) nahezu gleichverteilt sind, überwiegt im Frühstadium in (R+) deutlich der prozentuale Anteil von Fällen in der Hochaktivitätsgruppe gegenüber (R-) mit einem Überwiegen der Fälle in der Niedrigaktivitätsgruppe. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($\alpha > 0.05$). Ein Mittelwertvergleich der Parameter und Parametergruppierungen ist nur möglich in Tumorkategorie T4 (nicht signifikant), dem Grading G3 (nicht signifikant), in der Stadiengruppierung für S4 (nicht signifikant), den Lokalisationen für HP (nicht signifikant) und OP (signifikant für $\alpha = 0.05$). In der Lymphknotenkategorie ist nur ein Vergleich zwischen N2 möglich. Auch hier liegen signifikant höhere Werte in Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern für $\alpha = 0.05$ vor.

Anders als bei den Tumoren liegen bei den Lymphknoten im Frühstadium sowohl in (R+) als auch in (R-) alle Fälle in der Hochaktivitätsgruppe. Dagegen finden sich im Spätstadium in (R+) gegenüber (R-) prozentual mehr Fälle in der Hochaktivitätsgruppe. Auch hier ist der Unterschied nicht signifikant ($\alpha > 0.05$). Die (R+)-Fälle zeigen in den Tumorkategorien nur für T4 und T3, in den Lymphknotenkategorien für N2 und N0, im Grading für G3 und G2, in den Tumorlokalisationen für OP und HP und im Krankheitsstadium für S4 erhöhte Werte der mittleren Telomeraseaktivität (ohne Signifikanz). Im Mittelwertvergleich, soweit möglich, zeigt lediglich die Parametergruppierung G1 zu G2, 3 signifikant höhere Werte in G2, 3 für $\alpha = 0.05$.

Tab. 3.21 Verteilung der Tumorkategorien T in den Fällen mit telomerasepositiven (R+) und telomerasenegativen Resektionsrändern (R-)

	T1	**T2**	**T3**	**T4**	**Summe**
R+	-	7 (30%)	10 (44%)	6 (26%)	23
R-	3 (18%)	5 (29%)	2 (12%)	7 (41%)	17

Tab. 3.22 Verteilung der Lymphknotenkategorien N in den Fällen mit telomerasepositiven (R+) und telomerasenegativen Resektionsrändern (R-)

	N0	**N1**	**N2**	**N3**	**Summe**
R+	13 (57%)	1 (4%)	9 (39%)	-	23
R-	10 (59%)	-	6 (35%)	1 (6%)	17

Tab. 3.23 Verteilung der Gradingstufen G in den Fällen mit telomerasepositiven (R+) und telomerasenegativen Resektionsrändern (R-)

	G1	**G2**	**G3**	**Summe**
R+	3 (13%)	12 (52%)	8 (35%)	23
R-	1 (6%)	9 (53%)	7 (41%)	17

Tab. 3.24 Verteilung der Krankheitsstadien S in den Fällen mit telomerasepositiven (R+) und telomerasenegativen Resektionsrändern (R-)

	S1	**S2**	**S3**	**S4**	**Summe**
R+	-	4 (17%)	4 (17%)	15 (66%)	23
R-	3 (18%)	3 (18%)	-	11 (64%)	17

Lediglich für die Tumorkategorien findet sich im Einzelvergleich für T4 ein signifikant höherer Anteil Fälle in (R-) gegenüber (R+) für α = 0.05. Dagegen in T3 verhältnismäßig mehr Fälle in (R+) als in (R-). Der in der Parametergruppierung T1, 2 gegenüber T3, 4 verhältnismäßig höhere Anteil Fälle für T3, 4 in den (R+)-Fällen gegenüber den (R-)-Fällen ist nicht signifikant. Alle übrigen Parameter und Parametergruppierungen zeigen hinsichtlich der Verteilung nach (R+) und (R-) ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

3.4.3.4 Vergleich zwischen hoch- bzw. niedrigtelomerasepositiven Tumoren und den entsprechenden Resektionsrändern

Tabelle 3.25 zeigt den Vergleich der Verteilung und der mittleren Telomeraseaktivität (MW) zwischen Tumoren mit hoher Telomeraseaktivität (Hochaktivitätsgruppe, T-HAG) bzw. niedriger Telomeraseaktivität (Niedrigaktivitätsgruppe, T-NAG) und der Verteilung und mittleren Telomeraseaktivität von Resektionsrändern mit hoher Telomeraseaktivität (R-HAG) bzw. niedriger Telomeraseaktivität (R-NAG).

Tab.3.25 Telomeraseaktivität der Resektionsränder nach den Kriterien TA-T↑ und TA-T↓

Kriterium	R-HAG	R-NAG	MW	SA	Summe
T-HAG	10 (71%)	4 (29%)	27,36	22,05	14
T-NAG	11 (48%)	12 (52%)	13,91	18,23	23

Insgesamt überwiegen die Fälle der T-NAG-Gruppe. In der T-HAG-Gruppe finden sich prozentual mehr Resektionsränder (71%) mit hoher Telomeraseaktivität, in der T-NAG-Gruppe dagegen ein geringerer Anteil (48%). Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($\alpha > 0.05$). Es findet sich bei der Betrachtung der mittleren Telomeraseaktivität der Resektionsränder in der T-HAG-Gruppe ein höherer Wert gegenüber der T-NAG-Gruppe. Ein Mittelwertvergleich ist jedoch nicht möglich (Mittelwert in der T-NAG-Gruppe kleiner als Standardabweichung SA).

3.4.4 Ergebnisse der Proben der Lymphknotengewebe

In 31 Fällen wurden Lymphknotengewebe untersucht, wobei in diesen Fällen 55 Proben untersucht wurden. Pro Fall wurde nur jeweils der Maximalwert für alle weiteren Berechnungen berücksichtigt. Abbildung 3.15 zeigt die Verteilung der Werte als Punktwolke.

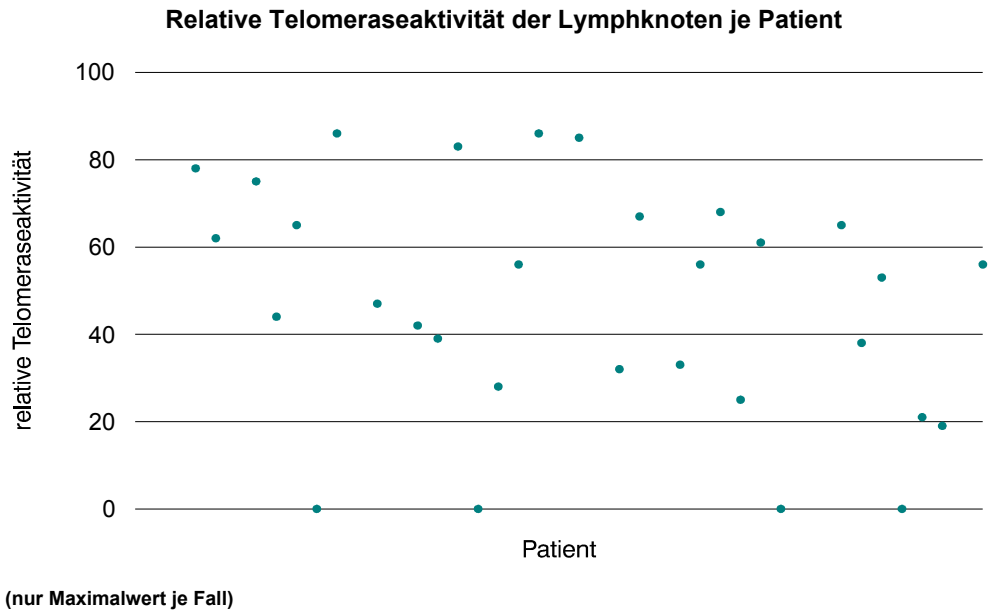


Abb. 3.15 Relative Telomeraseaktivität der Lymphknoten je Fall

Tab. 3.26 Ergebnisse der Lymphknoten

n	31
davon telomerasepositiv:	27 (87%)
davon telomerasenegativ:	4 (13%)
Spannweite:	86
Median:	53
MW:	47,42
MW_{pos}:	54
Standardabweichung:	26,74

Der Anteil telomerasepositiver Fälle ist hier signifikant höher als bei den Geweben der Mundschleimhaut (α = 0.01), Resektionsrändern (α = 0.01) und Tumorgeweben (nicht signifikant). Im Mittelwertvergleich höhere, mittlere Telomeraseaktivität der

Lymphknoten gegenüber den Tumoren (α = 0.01). Der Median ist mit 53 versus 25 (Tumoren) und 0 (Resektionsränder) wie auch die Spannweite von 86 gegenüber 78 (Tumorgewebe) und 77 (Resektionsränder) höher.

Tab. 4.27 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Lymphknoten nach pTNM-Kriterien und der Stadiengruppierung

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	6	2	40,63	33,32	8
T3	10	1	47,73	25,82	11
T2	8	1	49,78	26,90	9
T1	3	-	57,33	15,95	3
N3	2	-	38,5	24,75	2
N2	10	3	37,46	26,43	13
N1	1	-	56	-	1
N0	14	1	56,67	26,26	15
G3	8	2	48,5	32,00	10
G2	14	1	50,07	24,38	15
G1	4	1	42,6	27,31	5
La	9	1	60,1	28,94	10
OP	10	3	41,0	27,14	13
HP	4	-	42,0	18,29	4
OC	4	-	42,0	23,73	4
Stadium 1	3	-	57,33	15,95	3
Stadium 2	5	1	40,8	29,61	5
Stadium 3	4	-	70,5	22,16	4
Stadium 4	15	3	42,74	26,77	19
Frühstadium	8	1	47,0	25,43	8
Spätstadium	19	3	47,57	27,73	23

Die Lymphknoten zeigen für alle Parameter und Parametergruppierungen in der Verteilung der Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe keine signifikanten Unterschiede. In der Betrachtung der Mittelwerte fallen zunächst abnehmende Telomeraseaktivität mit zunehmender Tumorkategorie, höhere Mittelwerte in N0, N1 gegenüber N2, N3, fehlende Zusammenhänge zum Grading und Krankheitsstadium und annähernd gleichende, mittlere Telomeraseaktivität von Lymphknoten in OP/HP/OC gegenüber höherer, mittlerer Telomeraseaktivität in La. Der Unterschied ist im Mittelwertvergleich nicht signifikant. Gegenüber den Gewebe der Mundschleimhaut und den Resektionsrändern finden sich signifikant mehr Fälle in der Hochaktivitätsgruppe (jeweils α = 0.01), gegenüber den Tumoren jedoch kein signifikanter Unterschied.

3.4.4.1 Fälle mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (N+)

In 19 der 45 (42%) Fälle wurden histopathologisch Lymphknotenmetastasen gefunden. In einem Fall der 19 Fälle mit N(+)-Status konnte in der Tumorprobe mikroskopisch kein Tumorgewebe nachgewiesen werden und daher wurden nur 18 der Tumorproben berücksichtigt, von denen 17 (94%) telomerasepositiv waren. Lymphknoten konnten in 16 der 19 Fälle mit N(+)-Status untersucht werden.
13 dieser 16 Lymphknoten (81%) wiesen Telomeraseaktivität auf. Von den 19 N(+)-Fällen wurden in 17 Fällen Proben von Resektionsrändern untersucht, wovon sich in 10/17 (59%) der Fälle Telomeraseaktivität nachweisen ließ.

Tab. 3.28 Ergebnisse der Tumoren von Fällen mit Lymphknotenmetastasen

n	18
davon telomerasepositiv :	17 (94%)
davon telomerasenegativ	1 (6%)
Spannweite:	48
Median:	27
MW:	28,78
MW_{pos}:	30,47
Standardabweichung:	11,21

Tab. 3.29 Ergebnisse der Resektionsränder von Fällen mit Lymphknotenmetastasen

n	17
davon telomerasepositiv:	10 (59%)
davon telomerasenegativ:	7 (41%)
Spannweite:	77
Median:	17
MW:	19,47
MW_{pos}:	33,1
Standardabweichung:	22,66

Tab. 3.30 Ergebnisse der Lymphknoten von Fällen mit Lymphknotenmetastasen

n	16
davon telomerasepositiv:	13 (81%)
davon telomerasenegativ:	3 (19%)
Spannweite:	85
Median:	39
MW:	36,94
MW_{pos}:	47,69
Standardabweichung:	24,24

Der Anteil telomerasepositiver Tumorenproben der (N+)-Fälle ist gegenüber dem Anteil telomerasepositiver Proben der Mundschleimhaut signifikant höher ($\alpha < 0.01$). Auch der Anteil telomerasepositiver Lymphknoten ist gegenüber dem Anteil telomerasepositiver Proben der Mundschleimhaut signifikant erhöht für $\alpha = 0.05$.
Die Anteile telomerasepositiver Resektionsränder sind gegenüber dem Anteil telomerasepositiver Proben der Mundschleimhaut ohne signifikanten Unterschied.

Tab. 3.31 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Tumorgewebe der Fälle mit Lymphknotenmetastasen (N+) nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	4	-	25,75	6,99	4
T3	8	1	28,56	13,42	9
T2	5	-	31,6	10,85	5
T1	-	-	-	-	-
G3	7	-	31,71	8,67	7
G2	7	1	27,13	14,24	8
G1	2	-	30,5	7,78	2
La	2	-	31,0	2,83	2
OP	9	1	30,8	13,75	10
HP	4	-	25,25	9,39	4
OC	2	-	23,5	2,12	2

Bei fehlenden Fällen für die Tumorkategorie T1 finden sich zwischen T2 bis T4 keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe. Die mittlere Telomeraseaktivität nimmt mit steigender Tumorkategorie ab. Der Unterschied ist im Mittelwertvergleich nicht signifikant. Für das Grading und die Tumorlokalisationen finden sich weder in der Verteilung der Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe noch im Vergleich der Mittelwerte signifikante Unterschiede.

Tab. 3.32 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Resektionsränder der Fälle mit Lymphknotenmetastasen (N+) nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	1	3	7,75	15,5	4
T3	5	3	27,5	27,15	8
T2	3	2	16	17,42	5
T1	-	-	-	-	-
G3	3	4	12,86	17,59	7
G2	4	4	22,25	27,75	8
G1	2	-	31,5	17,68	2
La	2	-	25	35,36	2
OP	5	3	19,9	26,50	8
HP	4	-	10,67	10,50	4
OC	2	-	25	8,49	2

Die Resektionsränder der (N+)-Fälle lassen weder zwischen den Parametern noch den Parametergruppierungen signifikante Unterschiede in der Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe erkennen. Bei der Betrachtung der Mittelwerte ist für die Tumorkategorien keine Assoziation erkennbar, ein Mittelwertvergleich nicht möglich. Im Grading scheint die mittlere Telomeraseaktivität mit steigendem Grading abzunehmen, jedoch ist auch hier kein Mittelwertvergleich möglich. In den Tumorlokalisationen lassen sich nur HP und OC vergleichen. Die höhere, mittlere Telomeraseaktivität der OC gegenüber den HP im Mittelwertvergleich jedoch nicht signifikant.

Tab. 3.33 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Lymphknoten der Fälle mit Lymphknotenmetastasen (N+) nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	3	2	26,6	28,17	5
T3	6	1	34,71	17,94	7
T2	4	-	53,75	25,86	4
T1	-	-	-	-	-
G3	5	1	42	26,30	6
G2	7	1	39,75	24,53	8
G1	1	1	21	29,70	2
La	2	-	64,5	28,99	2
OP	5	3	30,25	26,83	8
HP	4	-	34,75	13,33	4
OC	2		40,5	21,92	2

Die Lymphknoten der (N+)-Fälle lassen in der Verteilung der Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe signifikante Unterschiede erkennen. Bei der Betrachtung der Mittelwerte ist eine scheinbare Assoziation fallender, mittlerer Telomeraseaktivität mit steigender Tumorkategorie und steigender, mittlerer Telomeraseaktivität mit steigendem Grading erkennbar, die Unterschiede sind im Mittelwertvergleich jedoch nicht signifikant. Ebenso sind die Unterschiede der mittleren Telomeraseaktivität der Tumorlokalisationen im Mittelwertvergleich nicht signifikant.

3.4.4.2 Fälle ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen (N0)

In zwei der 26 Fälle mit N0-Status waren die Tumorproben ohne mikroskopischen Nachweis von Tumorgewebe. Es wurden daher nur 24 Tumorproben berücksichtigt. Es wurden in 23 Fällen Proben von Resektionsrändern untersucht und 13/23 dieser Fälle (57%) waren telomerasepositiv. In 15 Fällen konnten Lymphknoten untersucht werden und 14 dieser 15 Lymphknoten (93%) waren telomerasepositiv.

Tab. 3.34 Ergebnisse der Tumoren von Fällen ohne Lymphknotenmetastasen

n	24
davon telomerasepositiv:	16 (67%)
davon telomerasenegativ:	8 (33%)
Spannweite:	78
Median:	22
MW:	23,13
MW_{pos}:	34,68
Standardabweichung:	22,45

Tab. 3.35 Ergebnisse der Resektionsränder von Fällen ohne Lymphknotenmetastasen

n	23
davon telomerasepositiv:	13 (57%)
davon telomerasenegativ:	10 (43%)
Spannweite:	67
Median:	17
MW:	16,74
MW_{pos}:	29,61
Standardabweichung:	18,61

Tab. 3.36 Ergebnisse der Lymphknoten von Fällen ohne Lymphknotenmetastasen

n	15
davon telomerasepositiv:	14 (93%)
davon telomerasenegativ:	1 (7%)
Spannweite:	86
Median:	65
MW:	56,67
MW_{pos}:	60,71
Standardabweichung:	26,26

Im Vergleich zu den telomerasepositiven Proben der Mundschleimhaut findet sich in den Fällen ohne Lymphknotenmetastasen ein signifikant höherer Anteil telomerasepositiver Fälle nur bei den Lymphknoten (α = 0,01). Die Tumoren und auch die Resektionsränder zeigen keinen signifikant höheren Anteil telomerasepositiver Fälle gegenüber den Proben der Mundschleimhaut.

Tab. 3.37 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Tumorgewebe der Fälle ohne Lymphknotenmetastasen (N0) nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	8	1	33,78	25,16	9
T3	2	2	21	18	4
T2	3	4	17	22,99	7
T1	2	2	12	13,95	4
G3	6	2	22,88	19,62	8
G2	8	5	25,69	26,04	13
G1	1	2	12,67	13,01	3
La	8	7	19,93	20,91	15
OP	4	-	26,25	14,34	4
HP	1	-	47	-	1
OC	2	2	26	36,77	4

Die Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe bei den Tumoren der Fälle ohne Lymphknotenmetastasen zeigt im Vergleich zwischen den einzelnen Parametern keine signifikanten Unterschiede. Für die Parametergruppierungen T1, 2, 3 zu T4 findet sich ein signifikanter Unterschied für:

	HAG	NAG	Signifikanz
T1, 2, 3	7	8	$\alpha = 0,05$
T4	8	1	

Im Mittelwertvergleich zwischen T3 und T4 findet sich kein signifikanter Unterschied. Für die übrigen Parameter und Parametergruppierungen wird kein Mittelwertvergleiche durchgeführt, da die Standardabweichung größer als der Mittelwert ist.

Tab. 3.38 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Resektionsränder der Fälle ohne Lymphknotenmetastasen (N0) nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	4	5	16,33	18,36	9
T3	4	-	34,5	22,41	4
T2	4	3	14,29	14,52	7
T1	-	3	-	-	3
G3	4	4	17,13	18,32	8
G2	7	6	17,31	20,30	13
G1	1	1	11,5	16,26	2
La	8	4	21,5	20,11	12
OP	3	2	19,4	20,78	5
HP	-	2	6,5	9,19	2
OC	1	3	4,25	8,5	4

Für die Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe ist im Vergleich zwischen den Parametern und Parametergruppierungen kein signifikanter Unterschied für die Resektionsränder der Fälle ohne Lymphknotenmetastasen darstellbar.

Bei der Betrachtung der mittleren Telomeraseaktivität liegt keine Assoziation zu den Tumorkategorien vor. Im Grading finden sich in G3 und G2 nahezu gleiche, mittlere Telomeraseaktivität, die gegenüber G1 erhöht ist. In den Tumorlokalisationen findet sich eine nahezu gleiche Aktivität in La und OP und diese weist gegenüber HP und OC einen höheren Wert auf. Mittelwertvergleiche wurden nicht durchgeführt.

Tab. 3.39 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Lymphknoten der Fälle ohne Lymphknotenmetastasen (N0) nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	3	-	64	31,43	3
T3	4	-	70,5	22,16	4
T2	4	1	40,8	29,61	5
T1	3	-	57,33	15,95	3
G3	4	1	55	38,82	5
G2	7	-	57,71	22,57	7
G1	3	-	57	16,52	3
La	7	1	59	30,82	8
OP	5	-	58,2	18,71	5
HP	-	-	-	-	-
OC	2	-	43,5	34,65	2

In der Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parametern und Parametergruppierungen für die Fälle ohne Lymphknotenmetastasen.

Bei der Betrachtung der mittleren Telomeraseaktivität ist keine Assoziation zu den Tumorkategorien erkennbar, allerdings fallen gegenüber T1 und T2 höhere Werte in T3 und T4 auf. Im Grading finden sich nahezu identische Werte. In den Tumorlokalisationen fallen bei fehlenden Fällen für HP eine nahezu identische Aktivität in La und OP auf und demgegenüber eine verminderte Aktivität in OC.
Im Mittelwertvergleich zwischen den Parametern und Parametergruppierungen finden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

3.4.4.3 Vergleich zwischen Fällen mit Lymphknotenmetastasen (N+) und ohne Lymphknotenmetastasen (N0)

Gegenüber den (N0)-Fällen findet sich in den (N+)-Fällen ein signifikant (α = 0,05) höherer Anteil telomerasepositiver Tumoren (n = 16/24, 67% versus n = 17/18, 94%). Dagegen findet sich für die Resektionsränder kein signifikanter Unterschied zwischen (N+)- und (N0)-Fällen. Der Anteil telomerasepositiver Lymphknoten ist in den (N0)-Fällen gegenüber den (N+) - Fällen zwar höher (93% versus 81%), der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Die Spannweite der Tumoren der (N+)-Fälle ist im Vergleich zu den (N0)-Fällen kleiner (48 versus 78), der Median allerdings höher (27 versus 22). Die Spannweite der Resektionsränder der (N+)-Fälle ist größer (77 versus 67) als die der (N0)-Fälle, der Median jedoch gleich (jeweils 17). Die Spannweite der Lymphknoten der (N+)-Fälle und (N0)-Fälle ist nahezu gleich (85 versus 86), der Median allerdings in (N+) deutlich kleiner (39 versus 65).

Der Mittelwert (MW) der (N+)-Fälle gegenüber den (N0)-Fällen ist bei den Tumoren höher (29 versus 23), bei den Resektionsrändern findet sich nur ein geringer Unterschied (19 versus 17) und bei den Lymphknoten ist die mittlere Telomeraseaktivität der (N+)-Fälle kleiner als in den (N0)-Fällen (37 versus 57). Die Unterschiede sind im Mittelwertvergleich nur für die Lymphknoten signifikant (α = 0,05). Für die Tumoren findet sich kein signifikanter Unterschied. Ein Mittelwertvergleich für die Resektionsränder wurde nicht durchgeführt (Standardabweichung größer als Mittelwerte). Der Mittelwert telomerasepositiver Tumoren und Lymphknoten (MW_{pos}) ist bei den (N+)-Fällen kleiner, bei den Resektionsrändern dagegen größer als bei den (N0)-Fällen. Im Mittelwertvergleich ist der Unterschied nicht signifikant.

Insgesamt scheint bei fehlenden Fällen für T1 in (N+) die mittlere Telomeraseaktivität der **Tumoren** mit steigender Tumorkategorie abzunehmen, in (N0) hingegen zuzunehmen. Ein Mittelwertvergleich für die Parameter ist hier aber nur für T3 und T4 möglich und zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den (N+)- und (N0)-Fällen. Die Verteilung der Fälle nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe zeigt für den Parameter Tumorkategorie zwischen den (N+)- und (N0)-Fällen in T4 und T3 keinen signifikanten Unterschied, jedoch in T2 für α = 0,05 signifikant mehr Fälle in der Hochaktivitätsgruppe in (N+) gegenüber (N0). Folgende Aufstellung zeigt die Unterschiede in den Parametergruppierungen für die Tumorkategorie:

		HAG	NAG	Signifikanz
T1,2	(N+)	5	0	α = 0,05
	(N0)	5	6	
T3,4	(N+)	12	1	keine
	(N0)	10	3	
T1,2,3	(N+)	13	1	α = 0,01
	(N0)	7	8	
T2,3,4	(N+)	17	1	α = 0,05
	(N0)	13	7	

Im Grading zeigt G2 in (N+) die kleinste, in (N0) dagegen die größte mittlere Telomeraseaktivität, insgesamt aber ist zwischen beiden Gruppen kein Zusammenhang erkennbar. Ein Mittelwertvergleich ist nur für G3 möglich und zeigt keinen signifikanten Unterschied. Während in den Tumorlokalisationen in (N+) die La die höchste, mittlere Telomeraseaktivität aufweisen, ist diese in den La der (N0)-Fälle am kleinsten. Ein Mittelwertvergleich ist hier aber nicht möglich. Dieser lässt sich nur für OP durchführen und zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Die **Resektionsränder** von T3-Tumoren zeigen sowohl in (N+) wie auch in (N0) die größte mittlere Telomeraseaktivität, insgesamt ist jedoch zwischen (N+) und (N0) kein Zusammenhang zwischen der mittleren Telomeraseaktivität und den Tumorkategorien erkennbar. In den Gradingstufen findet sich für (N+) die Tendenz fallender Werte mit steigendem Grading, in (N0) eher die Tendenz steigender mittlerer Telomeraseaktivität mit steigendem Grading. Die Unterschiede sind im Mittelwertvergleich jedoch nicht prüfbar (Mittelwerte meist kleiner als Standardabweichung). In den Tumorlokalisationen nimmt die höchste, mittlere Telomeraseaktivität in (N+) im Sinne La = OC > OP > HP ab. In (N0) fallende Werte im Sinne La > OP > HP > OC. Insgesamt lassen sich die meisten Mittelwerte nicht vergleichen (Mittelwerte meist kleiner als Standardabweichung). Auch scheint keine Beziehung zwischen Tumoren und Resektionsrändern zum Grad der Ausprägung der Telomeraseaktivität und den jeweiligen Parametern und Parametergruppierungen zu bestehen.

Die **Lymphknoten** weisen nahezu durchgängig eine relativ hohe Telomeraseaktivität auf, weshalb der Anteil der Fälle in der Hochaktivitätsgruppe sowohl in (N+) wie auch (N0) gleichermaßen hoch ist und sich entsprechend kein Unterschied in der Verteilung der Fälle zwischen (N+) und (N0) findet. Bei der Betrachtung der Mittelwerte scheint in (N+) die mittlere Telomeraseaktivität mit steigender Tumorkategorie abzunehmen, wobei sich die Unterschiede nur zwischen den Kategorien T2 und T3 vergleichen lassen und nicht signifikant sind. In (N0) scheinbar keine Beziehung zu den Tumorkategorien. In T2 findet sich in (N+) gegenüber (N0) eine höhere, mittlere Telomeraseaktivität, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. In T3 hingegen ist in (N+) gegenüber (N0) die Telomeraseaktivität deutlich geringer und dieser Unterschied ist für α = 0.05 signifikant. Betrachtet man die Parametergruppierung (T3, 4), zeigt sich in (N+) eine signifikant (α = 0.01) geringere, mittlere Telomeraseaktivität als in (N0). Es zeigt sich in (N+) gegenüber (N0) die Tendenz zu höherer Telomeraseaktivität in den frühen Tumorkategorien (T1 und T2), dagegen die Tendenz zu niedrigerer Telomeraseaktivität in den späten Tumorkategorien (T3 und T4) in (N+) gegenüber (N0). Im Grading steigt in (N+) im Gegensatz zu den Tumorstadien die mittlere Telomeraseaktivität mit steigender Gradingstufe an, während die Telomeraseaktivität der Lymphknoten zwischen den entsprechenden Gradingstufen in (N0) keine wesentlichen Unterschiede aufweist. Insgesamt liegt die mittlere Telomeraseaktivität der (N0)-Fälle im Grading stets über der der (N+)-Fälle. Ein Mittelwertvergleich zwischen (N+) und (N0) ist nur für G2 und G3 möglich, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Auch im Vergleich der Parametergruppierungen, finden sich keine signifikanten Unterschiede.

3.4.5 Ergebnisse der Fälle nach dem Rezidivverhalten

3.4.5.1 Fälle mit Auftreten eines Rezidivs

Bis zum Jahr 2000 trat bei 10 der in dieser Arbeit untersuchten Patienten ein Tumorrezidiv auf. Das sind 22% der untersuchten Patienten innerhalb von 5 Jahren. Bei den statistischen Auswertungen der Tumorgewebe wurde ein Fall nicht berücksichtigt, da sich in der Tumorprobe mikroskopisch kein Tumorgewebe fand.

Tab. 3.40 Ergebnisse der Tumoren von Fällen mit Rezidiv

n	9
davon telomerasepositiv:	7 (78%)
davon telomerasenegativ:	2 (22%)
Spannweite:	78
Median:	26
MW:	31,11
MW_{pos}:	40,0
Standardabweichung:	24,57

Tab. 3.41 Ergebnisse der Resektionsränder von Fällen mit Rezidiv

n	10
davon telomerasepositiv:	4 (40%)
davon telomerasenegativ:	6 (60%)
Spannweite:	31
Median:	0
MW:	10,8
MW_{pos}:	27,0
Standardabweichung:	14,23

Tab. 3.42 Ergebnisse der Lymphknoten von Fällen mit Rezidiv

n	6
davon telomerasepositiv:	5 (83%)
davon telomerasenegativ	1 (17%)
Spannweite:	86
Median:	61,5
MW:	56,67
MW_{pos}:	68,0
Standardabweichung:	29,85

Tab. 3.43 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Tumorgewebe der Fälle mit Rezidiv nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	3	1	37,5	33,13	4
T3	2	-	31,0	7,07	2
T2	2	1	22,67	23,54	3
T1	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-
N2	2	-	23,5	3,54	2
N1	1	-	-	-	1
N0	4	2	34,67	30,29	6
G3	3	1	24,5	19,23	4
G2	4	1	36,4	29,18	5
G1	-	-	-	-	-
La	1	1	18,0	25,46	2
OP	2	-	36,5	14,85	2
HP	2	-	34,0	18,38	2
OC	2	1	34,33	39,83	3
Stadium 1	-	-	-	-	-
Stadium 2	1	1	23,5	33,23	2
Stadium 3	1	-	-	-	1
Stadium 4	5	1	32,83	26,71	6
Frühstadium	1	1	23,5	33,23	2
Spätstadium	6	1	33,29	24,41	7

Tab. 3.44 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Resektionsränder der Fälle mit Rezidiv nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	1	4	6,2	13,86	5
T3	1	1	15,5	21,92	2
T2	2	1	15,33	13,43	3
T1	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-
N2	1	2	7,0	12,12	3
N1	1	-	-	-	1
N0	2	4	9,33	14,58	6
G3	1	4	6,2	13,86	5
G2	3	2	15,4	14,50	5
G1	-	-	-	-	-
La	1	1	15,5	21,92	2
OP	1	2	8,33	14,43	3
HP	1	1	10,5	14,85	2
OC	1	2	10,33	17,90	3
Stadium 1	-	-	-	-	-
Stadium 2	1	1	12,5	17,68	2
Stadium 3	1	-	-	-	1
Stadium 4	2	5	7,43	13,01	7
Frühstadium	1	1	12,5	17,68	2
Spätstadium	3	5	10,38	14,65	8

Tab. 3.45 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Lymphknoten der Fälle mit Rezidiv nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	3	1	50,75	36,29	4
T3	1	-	-	-	1
T2	1	-	-	-	1
T1	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-
N2	1	1	30,5	43,13	2
N1	1	-	-	-	1
N0	3	-	74,33	12,01	3
G3	2	1	47,33	43,65	3
G2	3	-	66,0	7,81	3
G1	-	-	-	-	-
La	2	-	80,5	7,78	2
OP	1	1	31,0	43,84	2
HP	1	-	-	-	1
OC	1	-	-	-	1
Stadium 1	-	-	-	-	-
Stadium 2	1	-	-	-	1
Stadium 3	1	-	-	-	1
Stadium 4	3	1	30,75	36,29	4
Frühstadium	1	-	-	-	1
Spätstadium	4	1	55,6	33,25	5

Für die Verteilung der **Tumoren** nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe finden sich keine signifikanten Unterschiede. Die Unterschiede der Telomeraseaktivität sind in den möglichen Mittelwertvergleichen ebenfalls nicht signifikant.

Bei den **Resektionsrändern** finden sich für die Tumorkategorie in T4 überwiegend mehr Fälle der in der Niedrigaktivitätsgruppe. Demgegenüber findet sich in T2 ein höherer Anteil Fälle in der Hochaktivitätsgruppe. Die mittlere Telomeraseaktivität weist nahezu gleiche Werte in T2 und T3 auf, die größer sind als in T4.
Auch im Grading finden sich in G2 verhältnismäßig mehr Fälle in der Niedrigaktivitätsgruppe als in G3 mit einem überwiegenden Anteil der Fälle in der Hochaktivitätsgruppe. Die mittlere Telomeraseaktivität zeigt auch hier gegenüber G2 in G3 kleinere Werte.
Im Krankheitsstadium in S2 findet sich eine Gleichverteilung der Fälle zwischen Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe, in S4 hingegen überwiegen die Fälle in der Niedrigaktivitätsgruppe. Die mittlere Telomeraseaktivität ist in S2 höher als in S4.
Im Lymphknotenstatus finden sich verhältnismäßig gleiche Anteile der Fälle in Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe, auch die mittlere Telomeraseaktivität zeigt ein annähernd gleiches Niveau.
Eindeutige Verteilungsunterschied lassen sich in den Tumorlokalisationen nicht finden. Die mittlere Telomeraseaktivität verhält sich bei insgesamt niedrigen Niveau im Sinne La > HP = OC > OP. Alle vergleichbaren Unterschiede zwischen den Parametern und Parametergruppierungen sind nicht signifikant. Mittelwertvergleiche sind nicht möglich (Mittelwerte meist kleiner als Standardabweichung).

Bei den **Lymphknoten** liegen die meisten Fälle in der Hochaktivitätsgruppe vor. Aufgrund der sehr geringen Fallzahl lassen sich zumeist keine Mittelwertvergleiche durchführen. Die höhere, mittlere Telomeraseaktivität in N0 gegenüber N2, in G2 gegenüber G3 und La gegenüber OP ist nicht signifikant.

3.4.5.2 Fälle ohne Auftreten eines Rezidivs

Tab. 3.46 Ergebnisse der Tumoren von Fällen ohne Rezidiv

n	33
davon telomerasepositiv:	26 (79%)
davon telomerasenegativ:	7 (21%)
Spannweite:	56
Median:	23
MW:	24,03
MW_{pos}:	30,5
Standardabweichung:	16,65

Tab. 3.47 Ergebnisse der Resektionsränder von Fällen ohne Rezidiv

n	30
davon telomerasepositiv:	19 (63%)
davon telomerasenegativ:	11 (37%)
Spannweite:	77
Median:	17
MW:	20,27
MW_{pos}:	32,0
Standardabweichung:	21,51

Tab. 3.48 Ergebnisse der Lymphknoten von Fällen ohne Rezidiv

n	25
davon telomerasepositiv:	22 (88%)
davon telomerasenegativ	3 (12%)
Spannweite:	86
Median:	44
MW:	45,2
MW_{pos}:	51,36
Standardabweichung:	26,11

Tab. 3.49 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Tumorgewebe der Fälle ohne Rezidiv nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	9	-	28,56	15,31	9
T3	8	3	25,36	15,71	11
T2	6	3	23,22	19,85	9
T1	2	2	12,0	13,95	4
N3	2	0	26,5	12,02	2
N2	12	1	30,23	12,48	13
N1	-	-	-	-	-
N0	11	7	19,28	18,69	18
G3	10	1	27,91	15,15	11
G2	11	5	23,06	19,13	16
G1	3	2	19,8	13,97	5
La	9	6	21,67	20,13	15
OP	11	1	28,33	13,63	12
HP	3	-	26,67	10,97	3
OC	2	1	7,33	12,70	3
Stadium 1	2	2	12,0	13,95	4
Stadium 2	2	3	14,4	22,06	5
Stadium 3	1	2	16,0	18,33	3
Stadium 4	20	1	29,76	13,67	21
Frühstadium	4	4	13,33	17,83	8
Spätstadium	21	4	28,04	14,61	25

Tab. 3.50 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Resektionsränder der Fälle ohne Rezidiv nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	4	4	18,38	18,51	8
T3	8	2	32,7	25,43	10
T2	5	4	14,89	16,31	9
T1	-	3	-	-	3
N3	0	1	-	-	1
N2	7	5	23,25	24,82	12
N1	-	-	-	-	-
N0	10	7	19,35	19,54	17
G3	6	4	19,6	17,97	10
G2	8	8	20,38	25,19	16
G1	3	1	21,5	18,05	4
La	8	4	23,08	21,61	12
OP	7	5	22,58	25,48	12
HP	-	3	8,0	7,0	3
OC	2	1	12,0	10,44	3
Stadium 1	-	3	-	-	3
Stadium 2	3	2	15,0	15,36	5
Stadium 3	3	-	35,67	27,30	3
Stadium 4	11	8	23,1	21,74	19
Frühstadium	3	4	5,57	9,62	7
Spätstadium	14	9	24,74	22,24	23

Tab. 3.51 Ergebnisse der Telomeraseaktivität (Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe) der Lymphknoten der Fälle ohne Rezidiv nach pT-Kategorie, Grading und Lokalisation

Parameter	HAG	NAG	MW	SA	Anzahl
T4	4	1	36,6	30,61	5
T3	9	1	45,0	25,49	10
T2	6	1	46,43	30,10	7
T1	3	-	57,33	15,95	3
N3	2	0	38,5	24,75	2
N2	9	2	38,73	25,31	11
N1	-	-	-	-	-
N0	11	1	52,25	27,29	12
G3	6	1	49,0	30,0	7
G2	11	1	46,08	25,67	12
G1	4	1	42,6	27,31	5
La	7	1	55,0	30,32	8
OP	9	2	42,82	25,85	11
HP	3	-	35,67	16,17	3
OC	3	-	37,33	26,73	3
Stadium 1	3	-	57,33	15,95	3
Stadium 2	3	1	35,5	31,33	4
Stadium 3	3	-	69,0	26,89	3
Stadium 4	13	2	40,6	24,82	15
Frühstadium	6	1	44,86	26,68	7
Spätstadium	16	2	45,33	26,67	18

Bei den **Tumoren** der Fälle ohne Rezidiv zeigt sich für die Tumorkategorie eine verhältnismäßige Zunahme von Fällen in der Hochaktivitätsgruppe mit steigender Tumorkategorie. Im Einzelnen sind die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Lediglich für die Parametergruppierung T1, 2, 3 zu T4 findet sich in T4 gegenüber T1, 2, 3 ein signifikant höherer Anteil von Fällen in der Hochaktivitätsgruppe:

	HAG	NAG	Signifikanz
T1,2,3	16	8	$\alpha = 0,05$
T4	9	0	

Für die Parametergruppierungen T1,2 zu T3,4 und T1:T2,3,4 lässt sich kein signifikanter Unterschied finden. Die mittlere Telomeraseaktivität zeigt eine Zunahme der Werte mit steigender Tumorkategorie. Die Unterschiede sind aber nicht signifikant. Für den Lymphknotenstatus finden sich zwischen den Parametern im Einzelvergleich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung. Jedoch zeigt sich in der Parametergruppierung N0:N2, 3 ein signifikanter Unterschied:

	HAG	NAG	Signifikanz
N0	11	7	$\alpha = 0,05$
N2,3	14	1	

Die mittlere Telomeraseaktivität lässt keinen Zusammenhang erkennen und weist keine signifikanten Unterschiede auf. Im Grading findet sich wie für die Tumorkategorien auch ein verhältnismäßiges Zunehmen von Fällen in der Hochaktivitätsgruppe mit steigender Gradingstufe. Im Einzelvergleich wie auch zwischen den Parametergruppierungen ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Auch die mittlere Telomeraseaktivität steigt mit zunehmender Gradingstufe, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Die Tumorlokalisationen weisen im Einzelvergleich keine signifikanten Unterschiede der Verteilung auf. Die mittlere Telomeraseaktivität der OC scheint gegenüber den übrigen Lokalisationen vermindert zu sein, der Unterschied ist aber nicht signifikant. Für die Krankheitsstadien lassen sich im Einzelvergleich keine signifikanten Unterschiede finden. Lediglich die Parametergruppierung S1, 2, 3 zu S4 zeigt in S4 einen deutlich höheren Anteil von Fällen in der Hochaktivitätsgruppe:

	HAG	NAG	Signifikanz
S1, 2, 3	5	7	α = 0,01
S4	20	1	

Für die Parametergruppierungen S1, 2 zu S3, 4 und S1 zu S2, 3, 4 gibt es keine signifikanten Unterschiede.
Während die mittlere Telomeraseaktivität in S1 bis S3 ein verhältnismäßig gleiches Niveau hat, ist sie in S4 demgegenüber deutlich erhöht, der Unterschied ist nicht signifikant. Die mittlere Telomeraseaktivität der Parametergruppierung S1, 2, 3 zu S4 verhält sich wie folgt:

	mittlere Telomeraseaktivität	SA	Signifikanz
S1, 2, 3	15,27	17,37	n.d.
S4	28,41	14,78	

In allen vergleichbaren Parametern und Parametergruppierungen finden sich für die **Resektionsränder** der Fälle ohne Auftreten eines Rezidivs sowohl in den Verteilungen wie auch in den Mittelwertvergleichen der Telomeraseaktivität keine signifikanten Unterschiede.

Die **Lymphknoten** zeigen ein deutliches Überwiegen der Fälle in der Hochaktivitätsgruppe. In der Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe aller vergleichbaren Parameter und Parametergruppierungen finden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die mittlere Telomeraseaktivität weist in der Tumorkategorie wie tendenziell auch in der Lymphknotenkategorie kleinere Werte mit zunehmender Tumorkategorie auf. Im Grading dagegen finden sich höhere Werte mit zunehmender Gradingstufe. Für das Krankheitsstadium lässt sich kein Zusammenhang erkennen, in der Parametergruppierung S1, 2 zu S3, 4 nahezu gleiche Werte, für S1, 2, 3 zu S4 höherer Wert für S1, 2, 3 gegenüber S4. In den Tumorlokalisationen finden sich fallende Werte im Sinne La > OP > OC > HP. Die Unterschiede sind jedoch für alle vergleichbaren Parameter und Parametergruppierungen im Mittelwertvergleich nicht signifikant.

3.4.5.3 Vergleich zwischen Rezidivfällen und rezidivfreien Fällen

7/9 (78%) der untersuchten Tumoren der **Rezidivfälle** waren telomerasepositiv.
4/9 (45%) der Tumorproben der Rezidivfälle waren hoch telomeraseaktiv und alle vier zugleich überdurchschnittlich hoch (MW > 33). Drei Fälle (33%) wiesen eine mittelgradige Telomeraseaktivität auf. In 3/7 (43%) der Rezidivfälle mit telomerasepositiven Tumoren waren die entsprechenden Resektionsränder telomerasenegativ. In 2/9 (22%) der Rezidivfälle waren die Tumorproben wie auch die entsprechenden Resektionsränder telomerasenegativ. Insgesamt waren 6/10 (60%) der untersuchten Resektionsränder der Rezidivfälle telomerasenegativ, 2 Fälle (20%) zeigten eine mittelgradige Telomeraseaktivität und 2/10 (20%) der Fälle waren hoch telomerasepositiv. Die Lymphknoten der Rezidivfälle zeigen in 5/6 (83%) der Fälle eine hohe Telomeraseaktivität, die zugleich auch überdurchschnittlich hoch war (MW > 54). Ein Fall (17%) war telomerasenegativ. 6/10 (60%) der Rezidivfälle entsprachen einer (N0)-Lymphknotenkategorie, wobei 4/6 (67%) dieser Fälle hoch telomerasepositive Tumoren aufwiesen. 4/6 (67%) dieser Fälle zeigten telomerasenegative Resektionsränder und 2/6 (33%) der entsprechenden Resektionsränder waren telomerasepositiv, einer hochpositiv, der andere mit einem mittlerem Niveau der Telomeraseaktivität. In drei dieser 6 Fälle mit (N0)-Lymphknotenkategorie lagen Lymphknoten zur Untersuchung vor und waren alle hoch telomerasepositiv. Einer der Rezidivfälle entsprach einer (N1)-Lymphknotenkategorie. Der entsprechende Tumor zeigte eine mittlere, der Resektionsrand und der Lymphknoten eine hohe Telomeraseaktivität. Drei der Rezidivfälle wurden als (N2)- Lymphknotenkategorie klassifiziert. Es konnte dabei nur in zwei Fällen die Telomeraseaktivität der Tumoren untersucht werden und diese beiden Tumoren wiesen ein mittleres Niveau der Telomeraseaktivität auf. In 2/3 (67%) dieser Fälle konnte keine Telomeraseaktivität in den entsprechenden Resektionsrändern nachgewiesen werden, in einem Fall konnte ein mittleres Niveau der Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In den zwei zu diesen Fällen vorliegenden Lymphknoten fand sich einer hoch telomerasepositiv, der andere ohne Nachweis von Telomeraseaktivität, wobei hier auch in dem entsprechenden Resektionsrand dieses Falls keine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden konnte.

In den Tumorgeweben der **rezidivfreien Fällen** fanden sich mit 26/33 (79%) verhältnismäßig zwar etwa gleichviel telomerasepositive Tumoren wie in den Rezidivfällen (78%), doch liegen die Spannweite (78 versus 50), der Median der Telomeraseaktivität (26 versus 23) und die Mittelwerte MW und MW_{pos} der Telomeraseaktivität (31/40 versus 24/31) in den Rezidivfällen höher als in den rezidivfreien Fällen.
Der Anteil telomerasepositiver Resektionsränder liegt in den rezidivfreien Fällen mit 63% höher als bei den Rezidivfällen (40%) und auch der Anteil hoch telomerasepositiver Resektionsränder liegt hierbei mit 8/30 (27%) der Fälle gegenüber den Rezidivfällen mit 2/10 (20%) höher.
Die Lymphknoten der rezidivfreien Fälle waren in 3/25 (12%) der Fälle telomerasenegativ, in 4/25 (16%) von mittlerem Niveau der Telomeraseaktivität und 18/25 (72%) waren hoch telomerasepositiv, davon wiesen 11 der Fälle eine überdurchschnittlich hohe Telomeraseaktivität auf. Die Lymphknoten der Rezidivfälle weisen zwar eine etwas niedrigere Anzahl telomerasepositiver Fälle (83% versus 88%) und eine identische Spannweite (jeweils 86) auf, allerdings liegen hier der Median (62 versus 44) und die Mittelwerte MW und MW_{pos} (57/68 versus 45/51) höher als in den rezidivfreien Fällen. Anders die Verhältnisse bei den Resektionsrändern. Zwar finden sich bei den Rezidivfällen auch eine niedrigere Anzahl telomerasepositiver Fälle (40% versus 63%) und auch die Spannweite ist kleiner (31 versus 77), jedoch zeigen Median (0 versus 17) und die Mittelwerte MW und MW_{pos} (11/27 versus 20/32) hier deutlich niedrigere Werte gegenüber den rezidivfreien Fällen.

Insgesamt scheinen die Rezidivfälle gegenüber den Nicht-Rezidivfällen eine höhere Telomeraseaktivität in den Tumorgeweben und Lymphknoten, nicht aber in den Resektionsrändern aufzuweisen. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

Untersucht man die Parameter im Einzelnen, lässt sich bei den **Tumoren** in der Verteilung nach Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe zwischen Rezidiv- und rezidivfreien Fällen kein Unterschied erkennen. Es gibt aber Unterschiede in der Höhe der mittleren Telomeraseaktivität. Die Rezidivfälle zeigen in T4 und T3 höhere Werte, in T2 hingegen findet sich nur ein sehr geringer Unterschied zugunsten höherer Werte in den rezidivfreien Fällen. N0-Tumoren weisen in den Rezidivfällen, N2-Tumoren dagegen in den rezidivfreien Fällen eine höhere, mittlere

Telomeraseaktivität auf. G2-Tumoren weisen in den Rezidivfällen einen deutlich höheren Wert auf, G3-Tumoren dagegen in den rezidivfreien Fällen, wobei die Wertedifferenz bei letzterem geringer ist als bei den G2-Tumoren. Im Krankheitsstadium S2 und S4 ist die mittlere Telomeraseaktivität bei den Rezidivfällen am höchsten. Auch zeigen die Rezidivfälle im Spätstadium eine höhere, diejenigen im Frühstadium eine deutlich höhere, mittlere Telomeraseaktivität gegenüber der entsprechenden Stadiengruppierung in den rezidivfreien Fällen. Ein Mittelwertvergleich war nicht möglich (Mittelwerte teilweise kleiner als Standardabweichung). La-Tumoren zeigen in rezidivfreien Fällen eine höhere, mittlere Telomeraseaktivität, wobei die Wertedifferenz verhältnismäßig gering ist. Dagegen zeigen die OP-, HP- und OC-Tumoren in den Rezidivfällen eine höhere, mittlere Telomeraseaktivität. Die Wertedifferenz ist bei den OC-Tumoren sehr hoch, jedoch im Mittelwertvergleich nicht prüfbar. Soweit Mittelwertvergleiche möglich waren, sind die angeführten Unterschiede nicht signifikant.

In den rezidivfreien Fällen zeigen die **Resektionsränder** in allen Parametern ein deutliches Vorherrschen der Hochaktivitätsgruppe im Gegensatz zu den Rezidivfällen, bei denen sich ein höherer Anteil der Fälle in der Niedrigaktivitätsgruppe findet. Die Unterschiede in der Verteilung sind nicht signifikant. Die mittlere Telomeraseaktivität weist lediglich in den Rezidivfällen für T2, bei den HP-Tumoren und der Parametergruppierung S1,2 höhere Werte auf. Mittelwertvergleiche sind hier nicht möglich (Mittelwert kleiner als Standardabweichung).

Bei den **Lymphknoten** findet sich sowohl in den Rezidiv- als auch in den rezidivfreien Fällen eine deutliche Prävalenz der Hochaktivitätsgruppe, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Die mittlere Telomeraseaktivität zeigt ein ähnliches Verhalten zu den Parametern wie die Tumoren: Auch hier zeigen die Rezidivfälle in T4 die höchste Aktivität, in N2 kleinere, in N0 dagegen größere Werte. Auch in G3 kleinere, in G2 dagegen größere Werte und in der Parametergruppierung S3,4 höhere Werte in den Rezidivfällen. Abweichend davon die Tumorlokalisation mit höheren Werten für La und kleineren Werten für OP und das Krankheitsstadium S4 mit kleinerem Wert in den Rezidivfällen gegenüber den rezidivfreien Fällen. Die Unterschiede sind im Mittelwertvergleich nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1 Bewertung der Methodik

Die oft sehr geringen Gewebemengen waren für die Nachweisreaktionen selbst zwar ausreichend, jedoch war es nur in wenigen Fällen möglich, histologische Präparate herzustellen, um besonders im Fall der Tumorgewebe auf den tatsächlichen Gehalt an Tumorzellen im Untersuchungsmaterial hin zu untersuchen, um auf richtig-positive Ergebnisse schließen zu können. Daher kann für die 9 telomerasenegativen Tumorproben schon aus diesem Grund ein falsch-negatives Ergebnis nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.1.1 Das TRAP-Assay

Die meisten Tumorentitäten weisen einen mehr oder weniger unterschiedlich hohen Prozentsatz telomerasenegativer Fälle auf, wie er ungefähr 18% der Mammakarzinome (Carey et al. 1999), 50% der intermediär- bis hochmalignen Sarkome (Yan et al. 1999) und 100% der Chondrosarkome (Bovee et al. 2001) ausmacht. Erklärungen hierfür können sein:

1. Inhibitoren der Nachweisreaktionen (Telomerasereaktion oder der PCR).
2. Intratumorale Variationen der Telomeraseexpression, wie es für hochmaligne Astrozytome beschrieben ist (Kleinschmidt-Demasters 1998).
3. alternative Mechanismen der Telomerelongation (ALT). Allerdings gibt es für ALT bei Plattenepithelzellkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches keine Hinweise (Loughran et al. 1997).

In der Literatur wurden Artefakte des TRAP Assays beschrieben, die zu Fehlergebnissen führen können. Diese Fehler können in verschiedenen Phasen der Nachweisreaktion (Proteingewinnung, Telomerasereaktion und PCR) auftreten, wobei falsch-positive wie auch falsch-negative Ergebnisse möglich sind. So ist für quantitative Aussagen zur Telomeraseaktivität ist eine optimale Zellextraktion notwendig. Eine mögliche Ursache falsch-negativer Ergebnisse sind Defizite im Aufschluss der Zellen zur Proteingewinnung (Hummel et al. 1997). Der auf CHAPS basierende Lysepuffer extrahiert die Telomerase möglicherweise nur ineffizient. Eine Verbesserung der Extraktion ist mit einem Lysepuffer, basierend auf NP-40 und

Natriumdeoxycholat, zu erreichen (Norton et al. 1998). Falsch-positive Ergebnisse der Nachweisreaktion beispielsweise sind möglich, wenn das Proteinlysat Telomeraseaktivität von Zellen mit physiologischem Telomerasegehalt wie beispielsweise Immunzellen enthält, die sich im Rahmen der Auseinandersetzung des Körpers mit dem Malignom in der Prozessumgebung wie auch infiltrativ im Malignom selbst befinden können.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse ein starkes Variieren die Intensität der TRAP-Signale, was einerseits einen unterschiedlichen Gehalt an Enzym reflektieren kann oder weil andererseits möglicherweise gelöste Gewebefaktoren die Formation und Amplifikation der Telomerase-Reaktionsprodukte inhibieren. Besonders die Anwesenheit nicht verifizierbarer Inhibitoren kann die Telomerasereaktion beeinflussen, stellt aber auch ein inhärentes Problem der PCR dar. Das Untersuchungssubstrat, an welchem die Nachweisreaktionen durchgeführt werden, muss als sehr heterogen angesehen werden Unterschiedlichste Bestandteile aus den nativen, tiefgefrorenen Gewebeproben gelangen mit der Zellyse während der Proteingewinnung zwangsläufig mit in das Untersuchungssubstrat, wobei dann von nicht überschaubaren Einflüssen auf die anschließenden Reaktionen auszugehen ist. Beeinflussende Komponenten sind u.U. Nekrosematerial, nichtmaligne Zellen der Tumorumgebung, Blut- bzw. Immunzellen mit ihren Enzymen und Zytokinen, Plasma- und Gewebefaktoren (Sumida und Hamakawa 2001), Speichel, aber auch Medikamentenspuren wie bsp. Heparin, wobei beim Heparin nur die Amplifikation der Telomere, nicht aber die Amplifikation des internen Standards inhibiert zu werden scheint (Fabricius et al. 2002). Auch Hämoproteine wie Myoglobin oder auch durch Hämolyse freiwerdendes Hämoglobin können die Polymerase in der PCR inhibieren (Qiagen-Informationsblätter. 1997). Der Einfluss von PCR-Inhibitoren wird in den Arbeiten von Ohuchida et al. (2004) Takaishi et al. (2000) mit der Verwendung von kleinen Gehalten an Proteinmenge (< 1 µg) als weitgehend vermeidbar beschrieben. Der RNAase-Gehalt des Speichels kann signifikant die Enzymaktivität der RNAase-sensitiven Telomerase durch Angriff am RNA-Template der Telomerase mindern (Califano et al. 1996). Auch Versuchsschritte wie Einfrieren oder Präparation werden als mögliche Ursache von Telomeraseinaktivierung diskutiert (Tahara et al. 1995). Die Möglichkeiten falsch-negativer Ergebnisse, die durch das Fehlen von Tumorzellen im Untersuchungssubstrat bedingt ist, kann durch die Methode der Mikrodissektion vermieden werden (Carey et al. 1998, Pinzani et al. 2006).

Die Amplifikate der PCR-Reaktion korrelieren nicht immer mit der Größe der Produkte aus der Telomerasereaktion. Die molekulare Basis dieser Artefakte, die die Aussagekraft der Methode einschränken, wurden u.a. von Krupp et al. (1997) beschrieben. Spezifische Probleme der PCR sind Primerdimere und mismatch-annealing, also die Aneinanderlagerung inadäquater DNA-Einzelstränge. Der Einsatz modifizierter Primer, beispielsweise ein modifizierter, reverser CX-Primer, der durch drei zusätzliche 5'-terminale Basen mismatch-annealing limitiert, kann Artefakte wie Primerdimere signifikant reduzieren (Kim et Wu. 1997, Krupp et al. 1997).

Aufgrund vielfältiger Einflussmöglichkeiten sind die Ergebnisse der Arbeit mit der hier verwendete Methode der Proteingewinnung kritisch zu betrachten. Das TRAP-Assay wird der Lokalisation von Kopf-Hals-Tumoren und unter den besonderen Bedingungen wie beispielsweise der Feldkanzerogenese als nicht ausreichend tumorspezifisch angesehen (Gurr 2003). Entsprechend wird der Nachweis der zur Telomeraseaktivität korrelierenden Einzelkomponenten des Telomerase-Enzymkomplexes beispielsweise mit der hTERT-Immunhistochemie, die sich auch in-situ an Kryo- oder Paraffinschnitten durchführen lässt (Hiyama et al. 2001), als sensitiver gegenüber dem komplizierten und von vielen Faktoren beeinflussten Nachweis der Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay angesehen (Sumida et al. 1999). Daher sollten die Ergebnisse von Untersuchungen mit auf PCR-basierenden Nachweistechniken mit den Ergebnissen von in-situ-Untersuchungen verglichen und für die Routinediagnostik evaluiert werden (Fabricius et al. 2003).

4.1.2 Qualitätskontrollen

4.1.2.1 Interner Standard

Der interne Standard kontrolliert die Amplifikation im zweiten Schritt der Nachweisreaktion während der PCR, nicht aber den ersten Schritt der Nachweisreaktion, die Telomerasereaktion.
Es zeigt sich das Phänomen, dass bei hohem Niveau der Telomeraseaktivität nur ein schwaches oder gar fehlendes Signal des internen Standards und umgekehrt auftritt. Möglicherweise amplifiziert die Taq-Polymerase vorzugsweise die kürzeren Oligonukleotide aus der Telomerasereaktion, als die wesentlich längeren Oligonukleotide des internen Standards. Bei fehlender oder nur sehr schwacher Anwesenheit von Telomeraseaktivität und dementsprechend wenig

Reaktionsprodukten aus der Telomerasereaktion steht der Taq-Polymerase dann hauptsächlich der interne Standard als Substrat zur Verfügung, was dann wahrscheinlich zu einem sehr deutlichem Signal desselben führt.
Fabricius et al. (2002) testeten in ihren Untersuchungen die telomerasenegativen Proben sehr differenziert auf eine Inhibition der Taq-Polymerase zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse. So zeigten 5/39 der Normalgewebe von tumorfreien Patienten eine Inhibition des internen Standards in einem von drei Verdünnungsschritten, die in absteigender Verdünnung dann wieder positiv wurden. Hingegen zeigten alle der 51 Lysate der Tumorpatienten eine mehr oder weniger ausgeprägte Inhibition der Taq-Polymerase.

4.1.2.2 Externer Standard

Auch in aktuellen Untersuchungen mit dem TRAP-Assay wird eine Quantifizierung der Telomeraseaktivität u.a. dadurch erreicht, dass die gemessene Aktivität zu einer als externer, positiver Standard im Experiment mitgeführten Kontrolle in Relation gesetzt wird. So quantifizierten Ohuchida et al. (2005) in ihren Untersuchungen zum Nachweis von Telomeraseaktivität in Proben von Pankreassaft das Niveau der Telomeraseaktivität relativ zur Telomeraseaktivität einer Linie von kultivierten Pankreaskarzinomzellen, die als externer, positiver Standard mitgeführt wurde. Die Zellinie HRT-18 als externer Standard zeigt eine hohe Konstanz im quantitativen Niveau der Telomeraseaktivität und ein komplettes Fehlen telomerasenegativer Fälle. Aus diesem Grund wurde sie als Bezugsgröße gegenüber den anderen Geweben zur Quantifizierung der Telomeraseaktivität für die eigene Arbeit eingesetzt.

4.1.2.3 Negativkontrollen

Die Ursache der diskrete Signalgebung in den Negativkontrollen, die vergleichsweise nur wenige und schwache Signale aufweisen, nicht RNAase-sensitiv sind und außerdem nur die Fälle mit der zuletzt eingesetzten TS-Primer-Charge betrafen, konnte nicht genau geklärt werden. Es sind Primer-Artefakte anzunehmen, die telomeraseunabhängig auftreten können und als solche in der Literatur beschrieben sind (Krupp et al. 1997).

4.1.3 Untersuchung zum Verlust an Enzymaktivität

Der Verlust an Enzymaktivität der Telomerase bei Inkubation des Proteinlysates unter Raumtemperatur an drei exemplarischen Fällen war eher moderat und führte nicht zu einer Veränderung des Niveaus der Telomeraseaktivität. Die Inkubationsdauer war ausreichend lang gewählt, einem Zeitraum von zwei Stunden waren die Untersuchungssubstrate niemals ausgesetzt, zumal die Halbwertszeit des Enzyms derzeit auf 5 – 11 Stunden (Hou et al. 2001) eingeschätzt wird. Insofern wird der Verlust an Enzymaktivität der Telomerase durch Temperatureinflüsse während den Abläufen in der Versuchsanordnung als gering eingeschätzt.

4.1.4 Messung der Hämoglobinkonzentration

Hämoglobin ist nur eines der möglicherweise die PCR beeinflussenden Hämoproteine (Qiagen-Informationsblätter. 1997), zu denen auch noch Myoglobin und Oxidoreduktasen (Katalase, Peroxidase, Cytochrome) gerechnet werden (Zetkin und Schaldach 1987). Inwieweit diese Hämoproteine auf die Telomerase- bzw. Polymerasereaktion inhibitorisch Einfluss nahmen, wurde nicht untersucht. Die Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass die in dieser Arbeit bestimmten Hämoglobinkonzentrationen selbst wahrscheinlich keinen inhibitorischen Einfluss auf die verwendete Taq-Polymerase ausüben, da viele der Proben mit hoher Hämoglobinkonzentration positive Ergebnisse sowohl in der Telomerasereaktion als auch in der PCR zeigen.

4.1.5 Quantifizierung der Telomeraseaktivität

Das prozentuale Verhältnis der Telomeraseaktivität gegenüber einer Referenzzellinie zur Quantifizierung der Telomeraseaktivität wird häufig in der Literatur beschrieben (Broccoli et al. 1995, Ohyashiki et al. 1997, Hirose et al. 1997, Chun-Ta et al. 2004, Ohuchida et al. 2005). Die so gewonnenen Ergebnisse sind wie in der eigenen Arbeit semiquantitativ. Verfahren wie beispielsweise das Telomeric Repeat Liquid Scintillation Counting Protocol (Zhang et al. 2005), welches tritiummarkierte Telomerrepeats unter Umgehung einer Gelelektrophorese zählt, liefern direkt quantitative Ergebnisse, die beispielsweise bei Untersuchungen mit der Frage nach einem Cutt-Off-Level der Telomeraseaktivität notwendig werden können.

4.2 Bewertung der Untersuchungsergebnisse

4.2.1 Mundschleimhaut

Der Anteil telomerasepositiver Gewebe der Mundschleimhaut ist mit 45% gegenüber der Literatur (Curran et al. 1998 in 35%, Mao et al. 1996 in 38% und Califano et al. 1996 in 5% der Fälle) sehr hoch. Einen ähnlichen hohen Prozentsatz telomerasepositiver Proben der Mundschleimhaut (53%) fanden Patel et al. (2002) in ihrer Arbeit (eigene Arbeit: 45%). Fabricius et al. (2002) verwendeten in ihren Untersuchungen an Kopf-Hals-Tumoren als Vergleich zu den Tumorpatienten Normalgewebe (Haut und Schleimhaut) von tumorfreien Patienten. Auch in den Schleimhautproben dieser Patienten fand sich in 1/13 (8%) der Fälle Telomeraseaktivität.
Die Ergebnisse sind jedoch nach den Kriterien RNAase-Sensitivität, dem typischen Bild der leiterartigen PCR-Produkte und der Primerabhängigkeit der Reaktion nicht als Artefakt zu erklären (Tahara et al. 1995). Als Ursachen telomeraseaktiver Proben der Mundschleimhaut sind daher zu diskutieren:

1. Die Probe wird als Biopsie der Mundschleimhaut entnommen. Es ist anzunehmen, dass dabei die Basalschicht der Mukosa mit erfasst wird, die telomeraseaktive Zellen enthält (Härle-Bachor und Boukamp 1996).
2. Die Proben enthalten eventuell aktives, lymphatisches (Rachen- oder Gaumenmandelgewebe, Lymphknoten) oder entzündlich verändertes, lymphozytär infiltriertes Gewebe, wie im Rahmen eines Infektes oder infolge der Immunantwort im Rahmen der Auseinandersetzung des Körpers mit dem Malignom (Mutirangura et al. 1996, Califano et al. 1996, Igarashi und Sakaguchi 1997).
3. Bei den Geweben kann es sich histopathologisch um Hyperplasien, Hyperkeratosen oder geringgradigen Dysplasien ohne Malignität handeln (Mao et al. 1996).
4. Aufgrund der Theorie zur Feldkanzerogenese scheinen Proben der Mundschleimhaut von Rauchern oder Karzinompatienten, welche asymptomatische, prämaligne oder maligne Läsionen enthalten können, ungeeignet als Vergleichsgewebe bei der Quantifizierung der Telomeraseaktivität (Califano et al. 1996).

4.2.2 Tumoren

Die Anzahl telomerasepositiver Tumorgewebe liegt insgesamt mit 33/42 (79%) zwischen den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Ries et al. 2001: 49%, Fabricius et al. 2002: 50%, Kannan et al. 1997: 75%, Califano et al. 1996: 74%, Patel et al. 1999 und 2002: 80% bzw. 78%, Liao et al. 2000: 82%, Chang et al. 1999: 86%, Mutirangura et al. 1996: 88%, Mao et al. 1996 und Curran et al. 1998: 90%, Dhaene et al. 2000: 94% und Sumida et al. 1999: 100%). Der durchschnittliche Anteil telomerasepositiver Karzinome im Kopf-Hals-Bereich liegt bei etwa 80%. Für die Gesamtzahl ist zu berücksichtigen, dass in dieser Arbeit keine Karzinome des Nasopharynx zur Untersuchung gelangten, die in der Literatur mit einem Anteil telomerasepositiver Gewebe von 85% angegeben werden (Cheng et al. 1998). Der Anteil telomerasepositiver Larynxkarzinome dieser Arbeit liegt mit 11/17 (65%) der Fälle deutlich unter den Angaben der Literatur mit 89% (Hohaus et al. 1996).

Neben methodisch bedingter, inhibitorischer Beeinflussung der Nachweisreaktionen (Telomerasereaktion und PCR) können negative Nachweise von Telomeraseaktivität beispielhaft wie folgt interpretiert werden:

1. Tumormaterial ist nekrotisch bzw. das Untersuchungsmaterial enthält keine Tumorzellen. Dementsprechend ermöglicht das Verfahren der Mikrodissektion eine spezifische Materialgewinnung und wird in der Diskussion der Arbeit von Fabricius et al. (2002) als vorteilhaft bewertet, da beispielsweise in der Arbeit von Carey et al. (1999) an Brusttumoren der Anteil telomerasepositiver Proben mit dieser Methode von 78% auf 95% gesteigert werden konnte.

2. Die Tumorzellen sind möglicherweise nicht immortal (Morin 1995).

3. Die Tumorzellen besitzen nichttelomeraseabhängige Wege zur Telomerstabilisierung (ALT). Eine Möglichkeit ist die, dass scheinbar telomerasenegative Zellen ihre Telomerase anders als andere Zellen modulieren können. Einer Telomerelongation durch Telomerase könnte schließlich eine Downregulierung derselben folgen (Bryan et al. 1995).

Kannan et al. (1997) semiquantifizierten in ihrer Arbeit an prämalignen und malignen Läsionen der Mundschleimhaut die Telomeraseaktivität und verglichen diese neben den histopathologischen Parametern auch mit der klinischen Stadiengruppierung (nach UICC), allerdings gehen die Autoren nicht auf die Art und Weise der Quantifizierung der Telomeraseaktivität in ihrer Arbeit ein. Innerhalb der Stadiengruppierung wurden die Stadien S1 und S2 als Frühstadium und S3 und S4 als Spätstadium zusammengefasst. Kannan et al. beschreiben eine signifikante Korrelation der Telomeraseaktivität der Tumoren mit dem pathologischen Grading. Auch in der vorliegenden Arbeit lässt sich ein entsprechender Zusammenhang finden, allerdings ohne signifikanten Unterschied. Interessant ist dabei, dass in der Arbeit von Kannan der Hauptteil der Tumoren G1-klassifiziert wurde (34/41, 83%), während G2 (6/41, 15%) und G3 (1/41, 24%) nur eine untergeordnete Rolle spielten. Anders die Verhältnisse in der eigenen Arbeit mit einem Anteil in G1 (5/44, 11%), G2 (22/44, 50%) und G3 (17/44, 39%). In derselben Arbeit von Kannan finden sich 72% der Fälle im Spätstadium (eigene Arbeit: 74%) und 28% der Fälle im Frühstadium (eigene Arbeit: 26%), wobei sich kein signifikanter Unterschied in der Telomeraseaktivität zwischen beiden Stadiengruppierungen finden lässt. In der eigenen Arbeit gibt es einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Fälle zwischen Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe und dem Krankheitsstadium in der Parametergruppierung Früh- (S1 und 2) und Spätstadium (S3 und 4). Auch findet sich in der eigenen Arbeit im Vergleich im Spätstadium eine nahezu doppelt so hohe, mittlere Telomeraseaktivität als im Frühstadium. Eine Prüfung auf Signifikanz im Mittelwertvergleich ist jedoch nicht möglich.

Bei der Bewertung der Studie von Kannan et al. muss berücksichtigt werden, dass diese Studie an einer anderen, ethnischen Gruppe (Inder) durchgeführt wurde. Die Autoren weisen in ihrer Arbeit darauf hin, dass es Unterschiede in den genetischen Aberrationen zwischen oralen Malignomen der westlichen Welt und denen Südost-Asiens gibt und diese auf Unterschiede in der molekularen Ätiologie zurückzuführen sind. So findet sich in Indien eine höhere Rate an Malignomen mit Ras-Mutationen und weniger p53-Mutationen im Vergleich zu Westeuropäern, bei denen die Verhältnisse umgekehrt sind.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tumorkategorien T1, 2 und T4, der sich aber nicht zwischen T1, 2 und T3 findet, wird für HNSCC in der Arbeit von Curran et al. (1998) beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit findet sich ein

größerer Abstand der Werte der mittleren Telomeraseaktivität zwischen T1, 2 und T4 als zwischen T1, 2 und T3, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant.

Chun-Ta et al. (2004) untersuchten in ihrer Arbeit an Kopf-Hals-Tumoren die Assoziation der Telomeraseaktivität mit klinisch-pathologischen Parametern. Im Unterschied zu Kannan et al. ist die Verteilung der Fälle nach dem Grading bei Chun-Ta et al. nahezu identisch mit der Verteilung der Fälle in der eigenen Arbeit (G1: 39% vs 37%, G2: in beiden Arbeiten 51%, G3: 10% vs. 12%). Tabelle 4.1 zeigt ausgewählte Ergebnisse der Arbeit von Chun-Ta et al. und stellt sie den entsprechenden Ergebnisse der eigenen Arbeit gegenüber.

Tab. 4.1 Vergleich ausgewählter Ergebnisse der eigenen Arbeit mit der Arbeit von Chun-Ta et al. (2004)

	Niveau der Telomeraseaktivität			
Parameter	**Niedrig**	**Hoch**	**Niedrig**	**Hoch**
	Chun-Ta et al. (2004)		Eigene Arbeit	
T-Klassifikation				
T1 – T2	39	61	37	63
T3 T4	34	66	15	85
N-Klassifikation				
N0 – N1	39	61	36	64
N2 – N3	29	71	6	94
Krankheitsstadium				
S1 – S2	45	55	55	45
S3 – S4	32	68	13	87
Grading				
G1 – G2	35	65	31	69
G3	50	50	13	87
ECS				
Ja	22	**78**	6	**94**
Nein	42	58	38	62

(ECS = extracapsular spreading, Lymphknotenmetastasen)

Die Telomeraseaktivität wurde in der Arbeit von Chun-Ta et al. mit dem TRAP-Assay bestimmt und die PCR-Produkte mittels Enzymimmunoassay gemessen. Die Telomeraseaktivität wurde auch hier semiquantifiziert als prozentuales Verhältnis zu einer Referenzzellinie eines Mundhöhlenkarzinoms. Chun-Ta et al. fanden im Chi-Quadrat-Test für die Tumorkategorie keinen signifikanten Zusammenhang (eigene Arbeit: keine Signifikanz), für die Lymphknotenkategorien ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang (eigene Arbeit: signifikant für α = 0,05), für das Krankheitsstadium fanden Chun-Ta et al. in dieser Parametergruppierung (S1/2 versus S3/4) einen grenzwertig signifikanten Zusammenhang für p = 0.071 (eigene Arbeit: α = 0,01) und für das Grading konnte die Arbeit von Chun-Ta et al. wie auch die eigene Arbeit keine signifikante Assoziation zur Telomeraseaktivität finden. Für die Lymphknotenmetastasierung fanden Chun-Ta et al. einen signifikanten Zusammenhang zur Telomeraseaktivität für p = 0.005 (eigene Arbeit: höhere Telomeraseaktivität der Tumoren von (N+)-Fällen gegenüber (N-)-Fällen, jedoch keine Signifikanz) und bewerteten diesen Parameter wie auch die Lymphknotenkategorie nach dem Ergebnis der univarianten Analyse zum Krankheitsüberleben (nicht-signifikant nach der multivarianten Analyse) als prognostischen Faktor. Neben einer tendenziell guten Korrelation von Teilen dieser Arbeit mit den Ergebnissen der eigenen Arbeit können die bestehenden Unterschiede zum einen darin begründet liegen, dass in der Arbeit von Chun-Ta et al. asiatische Patienten untersucht wurden, in der eigenen Arbeit hingegen Westeuropäer und zum anderen erfolgte die Semiquantifizierung der Telomeraseaktivität bei Chun-Ta et al. nach einer anderen Methode (Standardisierung der Referenzzellinie, Low-Level-Aktivität definiert als Aktivität unterhalb eines festgelegten Cutt-Off-Levels, High-Level-Aktivität entsprechend darüber). Insgesamt befinden die Autoren in der Diskussion ihrer Arbeit die Telomeraseaktivität als einen unabhängigen, prognostischen Faktor bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches und assoziiert mit der Aggressivität dieser Tumoren.

Das Ergebnis der eigenen Arbeit zeigt insgesamt bei den Tumoren die Tendenz einer direkten Assoziation der Höhe der Telomeraseaktivität mit den Parametern Tumorkategorie, Grading und klinisches Krankheitsstadium, wobei sich eine Signifikanz allerdings nur bei letzterem im Vergleich der Parametergruppierung Früh- und Spätstadium findet. Keine Assoziationen sind für die Lymphknotenkategorie und die Tumorlokalisationen erkennbar.

4.2.3 Resektionsränder

Der Anteil telomerasepositiver Resektionsränder liegt mit 58% zwischen den in der Literatur angegebenen Ergebnissen von Fabricius et al. (2002) mit 30%, Ries et al. (2001) mit 33%, Curran et al. (1998) und Dhaene et al. (2000) mit 35%, Mao et al. (1996) mit 38% und Patel et al. (1999) 74%. Zwar lässt sich ein höherer Anteil telomerasepositiver Tumoren und höhere Telomeraseaktivität in den Lymphknoten in Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern verzeichnen, doch ist die praktische Relevanz dieses Befundes fraglich, zumal 6/17 (35%) der Patienten mit telomerasenegativen Resektionsrändern bisher verstarben und daher scheint von einem nicht näher differenzierten Nachweis von Telomeraseaktivität in Resektionsrändern keine eindeutige, prognostische Aussagekraft ableitbar.

Insgesamt ist bei den Resektionsrändern ohne weitere Unterscheidung keine Assoziation zwischen der Telomeraseaktivität und den klinisch-pathologischen Parametern erkennbar. Die Ergebnisse lassen zwar für die Tumoren und Lymphknoten in den Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern einen Trend zu höherer, mittlerer Telomeraseaktivität besonders in den höheren Stadien der einzelnen Parameter erkennen, dieser ist aber zumeist nicht auf Signifikanz prüfbar, ein sicherer Unterschied also nicht nachweisbar. Der Befund, dass es im Spätstadium zwischen Fällen mit telomerasepositiven und –negativen Resektionsrändern nahezu keinen Unterschied in der prozentualen Verteilung der Tumoren zwischen Hoch- und Niedrigaktivitätsgruppe gibt, während sich im Frühstadium ein prozentuales Überwiegen der Tumoren in der Hochaktivitätsgruppe bei (R+)-Fällen im Gegensatz zu einem Überwiegen der Tumoren in der Niedrigaktivitätsgruppe bei (R-)-Fällen zeigt, kann gegenwärtig nicht eindeutig beurteilt werden. Fabricius et al. (2003) konnten in ihrer Arbeit an Basalzellkarzinomen in Fällen mit telomerasepositiven Resektionsrändern häufiger – aber nicht signifikant häufiger - ein Rezidiv beobachtet werden. Nach den Autoren bleibt abzuwarten, inwieweit dieses Ergebnis als Prognosemarker und für die Routinediagnostik interpretiert werden kann.

Fabricius et al. (2003) beschreiben in ihrer Arbeit an Basalzellkarzinomen eine im Vergleich zu den Tumoren signifikant höhere und im Vergleich zum Normalgewebe signifikant niedrigere Telomeraseaktivität der Resektionsränder. Dieser Befund zeigt

sich auch in der eigenen Arbeit, wenn auch nicht signifikant. Weiter führen Fabricius et al. aus, dass die Inzidenz telomerasepositiver Resektionsränder ohne signifikante Beziehung zur histopathologischen Typisierung der Tumoren ist. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit zeigen auch ein diesem Befund ähnliches Ergebnis. Die Telomeraseaktivität in den Resektionsrändern wird von Fabricius et al. als möglicherweise von infiltrierenden lymphozytären oder inflammatorischen Zellen herrührend diskutiert, doch konnte in ihrer Arbeit gezeigt werden, dass weder der Ausprägungsgrad der Telomeraseaktivität noch die Rate an telomerasepositiven Fällen mit der Infiltration des Resektionsrandes mit mononukleären Zellen korreliert.
Auch in der Arbeit an Kopf-Hals-Tumoren fanden Fabricius et al. (2002) in 30% der Resektionsränder Telomeraseaktivität (eigene Arbeit: 58%). Verglichen mit den Proben von Normalgeweben von tumorfreien Patienten war auch hier der Anteil telomerasepositiver Proben von Tumorpatienten in dieser Arbeit, einschließlich von Resektionsrändern, signifikant höher. Interessanterweise stellte sich in dieser Arbeit eine, wenn auch nicht signifikante, Assoziation der Telomeraseaktivierung in den Resektionsrändern und im tumorentferntem Gebiet mit einem günstigeren Krankheitsverlauf heraus. Diese unerwartet bessere Prognose von Patienten mit telomerasepositiven, tumorangrenzendem Gewebe wird von den Autoren als ein mögliches Argument gegen eine systemische Anti-Telomerase-Therapie diskutiert, doch muss dieser Umstand noch weiter untersucht werden. Die Ergebnisse der eigenen Arbeit zeigen auch im Gegensatz zu den Tumoren und Lymphknoten einen höheren Anteil telomerasepositiver Resektionsränder in den rezidivfreien Fällen verglichen mit den Rezidivfällen (63% vs. 40%). Dieser Befund unterstützt möglicherweise die o.g. Ergebnisse von Fabricius et al. Ein Zusammenhang zwischen der Telomeraseaktivität und dem Krankheitsverlauf bzw. dem Krankheitsüberleben wurde in der eigenen Arbeit nicht untersucht, Koscielny et al. (2004) beschreiben in ihrer Arbeit allerdings, dass kein Zusammenhang zwischen der Reaktivierung der Telomerase und dem tumorabhängigen Überleben gefunden werden konnte.

4.2.4 Lymphknoten

In der Arbeit von Yashima et al. (1997) wurde mit einem semiquantitativen Test in befallenen Lymphknoten eine etwa 6fach höhere Telomeraseaktivität als in negativen Lymphknoten beschrieben. Auch Cheng et al. (1997) und Thurner et al. (1998) beschreiben in ihren Arbeiten eine in (N0)-Lymphknoten signifikant niedrigere Telomeraseaktivität als in (N+)-Lymphknoten. Dieses Ergebnis konnte die vorliegende Arbeit nicht bestätigen. In den (N0)-Fällen liegen sowohl der Anteil telomerasepositiver Lymphknoten deutlich höher und die mittlere Telomeraseaktivität signifikant höher (α = 0.05) als in den Lymphknoten der (N+)-Fälle. Allerdings weisen die Tumoren in (N+)-Fällen sowohl einen höheren Anteil telomerasepositiver Fälle als auch eine höhere Telomeraseaktivität gegenüber (N0)-Fällen auf, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Für die Resektionsränder lassen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen (N0)- und (N+)-Fällen finden.

Bei der Betrachtung von Ergebnissen zur Telomeraseaktivität in Lymphknoten muss berücksichtigt werden, dass Lymphknoten ein individuell unterschiedliches Maß an physiologischer wie auch pathologischer (beispielsweise im Rahmen aktivierte B- und T-Lymphozyten) Telomeraseaktivität aufweisen (Hiyama K et al. 1995, Broccoli et al. 1995, Counter et al. 1995). Physiologische von spezifisch-pathologischer (malignomassoziiert) und unspezifisch-pathologischer (entzündungsbedingt) Telomeraseaktivität zu trennen, erscheint daher problematisch. Vielmehr könnte bedeutender sein, in Fällen mit Lymphknotenmetastasen nach einer Assoziation der Telomeraseaktivität mit anderen Parametern zu suchen, die dann möglicherweise indirekt dazu verwendet werden können, auf das aggressive Verhalten eines Tumors zu schließen und seine Neigung zu lymphogener Metastasierung zu erkennen.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zwischen Fällen mit Lymphknotenmetastasen (N+) und ohne Lymphknotenmetastasen (N0) der Nachweis der Telomerase in den Resektionsrändern keine relevanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigt, kann der Befund vergleichsweise hoher Telomeraseaktivität in N0-Tumoren bei Rezidivfällen zusammen mit dem Befund eines höheren Anteils telomerasepositiver Tumoren in (N+)-Fällen ein Hinweis auf frühzeitige, lymphogene Metastasierung sein. Sollte sich das in weiteren Studien bestätigen und als relevant besonders im Hinblick auf das Krankheitsüberleben herausstellen, kann das bedeuten, solche Patienten trotz N0-Kategorie wie einen Fall mit höherer Lymphknotenkategorie zu therapieren.

4.3 Rezidiv-Verhalten der Fälle

Wie in der Ergebnistabelle 4.10. dargestellt, erlitten zwei Patienten mit N0-Kategorie und telomerasenegativen Tumoren und Resektionsrändern ein Rezidiv. Der Telomerasenachweis hatte in diesen beiden Fällen keine direkte, prognostische Aussagekraft. Während in der Arbeit von Chun-Ta et al. (2004) die Tumorkategorie und die Lymphknotenkategorie als signifikante, prognostische Faktoren für Kopf-Hals-Tumoren beschrieben wurden, kann die eigene Arbeit für das Rezidivverhalten keine sichere Assoziation der Telomeraseaktivität zu diesen Parametern darstellen. Zwar zeigen die Tumoren wie auch die Lymphknoten eine höhere Telomeraseaktivität in den Rezidivfällen gegenüber den rezidivfreien Fällen, doch der Anteil telomerasepositiver Tumoren und Lymphknoten zeigt kaum Unterschiede.
Der Befund vergleichsweise hoher Telomeraseaktivität in N0-Tumoren bei Rezidivfällen unterstützt aber möglicherweise die Ergebnisse von Chun-Ta et al. Möglicherweise ist dieses Ergebnis zusammen mit dem Befund eines höheren Anteils telomerasepositiver Tumoren in (N+)-Fällen ein Hinweis darauf, dass Tumoren mit hoher Telomeraseaktivität zu einer frühzeitigen, lymphogenen Metastasierung neigen. Sollte sich das in weiteren Studien bestätigen und als relevant besonders im Hinblick auf das Krankheitsüberleben herausstellen, kann das bedeuten, solche Patienten trotz N0-Kategorie wie einen Fall mit höherer Lymphknotenkategorie zu therapieren. Zwar zeigen auch die Tumoren in N2-Fällen eine vergleichsweise hohe Telomeraseaktivität, jedoch kann das radikalere, therapeutische Vorgehen bei „N2“ die geringere Inzidenz von Rezidiven erklären.

Bei den Resektionsrändern zeigen sich sowohl mehr telomerasepositive Resektionsränder als auch höhere Telomeraseaktivität in den rezidivfreien Fällen. Dieser Befund unterstützt möglicherweise eine Beobachtung von Fabricius et al. (2002), in deren Arbeit an Kopf-Hals-Tumoren sich eine, wenn auch nicht signifikante, Assoziation der Telomeraseaktivierung in den Resektionsrändern und im tumorentferntem Gebiet mit einem günstigeren Krankheitsverlauf herausstellte.

Einen sicheren, signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der Telomeraseaktivierung in Tumoren, Resektionsrändern und Lymphknoten und dem Rezidiv-Verhalten kann die eigene Arbeit jedoch nicht darstellen.

4.4 Diagnostisches und prognostisches Potential des Nachweises von Telomeraseaktivität im Kopf-Hals-Bereich

Die klinische Relevanz eines Nachweises der Telomeraseaktivität bei Malignomen im Kopf-Hals-Bereich wird gegenwärtig noch kontrovers beurteilt. So zeigen Ries und Mitarbeiter (2001) eine Korrelation der Telomeraseaktivität zu klinisch-pathologischen Parametern und auch Chun-Ta et al. (2004) diskutierten in ihrer Arbeit den Lymphknotenstatus und die extrakapsuläre Lymphknotenmetastasierung als einen prognostischen Faktor, während in anderen Arbeiten wie der von Lee et al. (2001) keine Assoziation der Telomeraseaktivität mit klinisch-pathologischen und prognostischen Parametern gefunden werden konnte und auch in der Arbeit von Fabricius et al. (2002) zeigte sich keine Korrelation zwischen den Telomeraseergebnissen und Tumorkategorie, Lymphknotenkategorie oder Tumorgrading.

Kim et al. (2001) dagegen sehen in ihrer Arbeit eine enge Assoziation zwischen der hTERT-Expression und dem Prozess der oralen Karzinogenese und Patel et al. (2002) bewerten die Telomeraseaktivität und die Telomerlänge als möglicherweise wichtige, klinische Größen für Einschätzung und Behandlung von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und als hilfreich für die Vorhersagbarkeit des Krankheitsverlaufes und zur Therapiespezifisierung.

Ogawa et al. (1998) gingen in ihrer Studie an 25 Patienten der Frage nach, wie sich die Telomeraseaktivität während einer Strahlentherapie von an fortgeschrittenen Plattenepithelzellkarzinomen (SCC) des Kopf-Hals-Bereiches Erkrankten ändert und ob die Ergebnisse mit dem klinischen Verlauf korrelieren. Sie konnten zeigen, dass persistierend hohe Telomeraseaktivität in mit 20 Gy bestrahltem Tumorgewebe in der Mehrzahl der Fälle mit einem schlechten Therapieeffekt und hoher Rückfallrate einherging, während das umgekehrt für den Großteil der Patienten mit niedrigem Aktivitätsniveau nicht der Fall war . Die Telomeraseaktivität scheint sich auch zum Monitoring einer Resistenz auf Chemotherapeutika bzw. als Marker für die Tumorzellvernichtung zu eignen, da in entsprechenden Untersuchungen im Falle einer Chemotherapeutika-Sensitivität es zu einer Abnahme der Telomeraseaktivität kam, bei einer Resistenz hingegen nicht (Faraoni et al. 1999).

Die Arbeit von Kannan et al. (1997) zeigte in 13/26 (50%) der Tumoren mit schlechtem Ansprechen auf eine Radatio einen Zusammenhang zu hoher Telomeraseaktivität. Im Vergleich dazu zeigten nur 3/11 (27%) der Fälle mit gutem

Ansprechen auf die Radatio eine hohe Telomeraseaktivität und die Autoren bewerten die Telomeraseaktivität als ein mögliches, zusätzliches Kriterium zur Prognoseabschätzung bzw. Einschätzung der Therapieansprechbarkeit. Andererseits wird die Telomeraseaktivität in dieser Arbeit wegen ihres häufigen Antreffens in Normalgeweben und benignen Läsionen wie Hyperplasien jedoch aufgrund der anatomischen Besonderheit von Plattenepithelien wie Desquamation und proliferative, physiologisch telomeraseaktive Basalzellschicht als nicht geeignet zur Karzinomen-Früherkennung angesehen.

In ihrer Studie an 80 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren fanden Koscielny et al. (2004) keine Korrelation der bekannten, klinischen Prognosefaktoren zur Expressionsrate der Telomeraseaktivität in Tumorgeweben. Auch das tumorabhängige Krankheitsüberleben, lokales und regionales Auftreten von Rezidiven wurde von reaktivierter Telomerase nicht beeinflusst und abschließend wurde die Telomerasereaktivierung als nicht prognostisch signifikant für diese Tumoren bewertet.

Der Nachweis von Telomeraseaktivität in Proben der Mundschleimhaut und der Resektionsränder erscheint für Patienten mit Malignomen im Kopf-Hals-Bereich eher ungeeignet. Allerdings werden Identifikationen prämaligner Läsionen in histopathologisch negativen Resektionsrändern (Brennan et al. 1995, Mao et al. 1996) beschrieben.

4.5 Ausblicke zum therapeutischen Potential der Telomeraseinhibierung

Zum einen wird im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie, die alle proliferierenden Zellen in Mitleidenschaft zieht, der therapeutische Gebrauch von Telomeraseinhibitoren als vergleichsweise spezifisch für Tumorzellen und weniger toxisch für telomeraseabhängige Gewebe angesehen (Shay 1995). Hämatopoetische Zellen, Keimzellen und solche von Regenerationsgeweben sollen im Zusammenhang mit einer Antitelomerasetherapie vermutlich weniger beeinträchtigt werden, da sie selbst nur einen vergleichsweise niedrigen Level an Telomeraseaktivität besitzen und ihre Telomere länger sind als die der meisten Malignomzellen, die im Falle ausgeprägter Telomeraseaktivität auch eine höhere Proliferationsrate bei kürzeren Telomeren (Holt et al. 1996 und 1997, Ohyashiki et al. 1996, Shay 1996) aufweisen.

Andererseits wird kritische bemerkt, dass Telomeraseaktivität auch oft in normalen, nichtneoplastischen wie beispielsweise hyperproliferativen Läsionen gefunden wird.

Die Frage danach, ob die Telomeraseaktivität nun tumorspezifisch sei oder nur assoziiert ist mit physiologischer Regeneration oder pathologischer, aber nichtmaligner Hyperproliferation, stellt sich und bedarf genauer Klärung (Shay und Bacchetti 1997, Rhode et al. 1998). Als therapeutische Möglichkeiten einer Telomeraseinhibition werden derzeit beispielsweise Peptid-Nukleinsäuren, siRNA, Nicht-Nukleosidische-Reverse-Transkriptasehemmern usw. diskutiert. Neben diesen pharmakologischen sind auch immuntherapeutische Ansätze beschrieben. Die Blockade des Zugangs zu den Telomeren als Ziel einer Telomeraseinhibierung kann auch indirekt über eine Tankyraseinhibierung erfolgen, was sogar einige Vorteile verspricht (Seimiya 2006). Telomeraseinhibition kann auch adjuvanten Charakter haben, beispielsweise, um durch Vorbehandlung eine verbesserte Empfindlichkeit auf eine Radiotherapie zu erreichen.

Bis es durch Telomeraseinhibition zu einem zellulären Effekt wie dem Erreichen von zelltodbedingender Chromosomeninstabilität kommt, sind schätzungsweise über 20 Zellverdopplungen über M1 hinaus notwendig, was einen verzögerten Wirkungseintritt von Telomeraseinhibitoren bedeuten kann (Kipling 1995). Außerdem würde sich ein zytotoxischer Effekt von Telomeraseinhibitoren auch nur auf jene Malignome mit kurzen Telomeren beschränken (Bacchetti 1996). Ein weiteres Problem kann eine primäre Resistenz von Tumorentitäten mit nichtimmortalen oder telomerasenegativen Tumorzellen auf telomeraseinhibierende Therapeutika darstellen. Als mögliche Ursachen einer solchen werden diskutiert:

1. Es handelt sich um Tumore mit zu weit elongierten Telomeren bzw. es kommt zur Abkopplung der kritisch verkürzten Telomere und ihrer Wirkung als Signal zur Einleitung zur Zellseneszenz oder das Therapeutikum weist einen starken Zellefflux auf (Parkinson 1996).
2. Die Zelle nutzt telomeraseunabhängige Wege zur Telomerstabilisierung (Bryan et al. 1997, Biessmann und Mason 1997, Muntoni und Reddel 2005).

Das Problem einer telomeraseinhibierenden Therapie ist ähnlich dem einer Zytostatikatherapie zu sehen: der Mitangriff von telomeraseaktiven Zellen der Regenerations- und Keimbahn-Gewebe sowie eine hämatologische und immunologische Toxizität (Schneider-Stock et al. 2002). Zudem ergibt sich die Frage nach dem biologischen Verhalten des jeweiligen Tumors im individuellen Falle: Handelt es sich um eine Entität mit telomeraseunabhängiger Telomerstabilisierung (ALT)? Besitzt der Tumor gegenüber seinem Ursprungsgewebe wirklich kürzere Telomere, oder sind sie von vergleichbarer Länge oder sogar verlängert? So weisen

Cheng et al. (1997) untersuchten in ihrer Arbeit die Inhibierung der Telomerase durch Induktion der Zelldifferenzierung an Hämatopoese-, Melanom- und Gliomzellkulturen, die im Ergebnis positiv für Hämatopoesezellen, jedoch negativ für Melanom- und Gliomzellen ausfiel. Die Autoren weisen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass zu unterscheiden ist, ob es sich um eine Tumorentität handelt, deren Ursache eine unvollständige Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen (z.B. bei embryonalen Tumoren und Malignomen der Hämatopoesezellen) mit erhalten gebliebener, primärer Telomeraseaktivität ist, oder ob es sich Malignome handelt, die durch Mutationen infolge genetischer Aberrationen sekundär wieder Telomeraseaktivität akquirierten, wie es bei vielen soliden Tumoren der Fall ist. In ersterem Falle kann eine pharmakologisch induzierte Zelldifferenzierung zu einer Downregulierung der Telomerase führen, während Tumoren mit durch Mutationen reaktivierter Telomerase möglicherweise auf diese „Differenzierungstherapie“ nicht ansprechen.
Aus diesem Grunde und infolge der Verflechtung der Telomeraseregulation mit Schlüsselmolekülen der Zellzykluskontrolle wie den Tumorsuppressorgenen ist die Effektivität einer telomeraseinhibierenden Therapie vom genetischen Profil einer Tumorerkrankung abhängig (Dhaene et al. 2000, Dahse und Mey 2001).

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Seit Beschreibung der humanen Telomere durch Morin vor etwas mehr als zehn Jahren setzte eine intensive Forschung zu telomer- und telomerase-assoziierten Fragestellungen ein, die bis heute anhält. Insbesondere interessant ist dabei die Frage, inwieweit die Telomerase ein diagnostisches, therapeutisches oder prognostisches Target in der Onkologie darstellen könnte. Im Verlauf dieser Forschung zeigte sich, dass an dem Vorgang der Telomerstabilisierung ein ganzer Komplex von Proteinen und Enzymen agiert, der vielfältigen Interaktionen und Regulationsvorgängen unterliegt. Die Telomerase selbst ist in diese komplexen Prozesse eingebettet und stellt dabei nur ein Instrument, wenn vielleicht auch ein wesentliches, in diesem Verbund dar. So wurde mittlerweile mit der Tankyrase ebenfalls ein Enzym beschrieben, welches eine positive Regulatorfunktion auf die telomerasevermittelte Telomerelongation ausübt. Obwohl man heute schon sehr detaillierte Vorstellungen und konkrete Ergebnisse zu Aufbau und Funktion der Telomerase besitzt, sind jedoch die genauen regulatorischen und interaktiven Vorgänge der Telomerase noch ungeklärt.

Neuere Ergebnisse zeigen für TERT eine zusätzliche Funktion unabhängig von der Telomerstabilisierung und von Telomeraseaktivität als Transkriptionsfaktor, der auf verschiedenartigste Weise die Expression wachstumsfördernder Gene orchestriert, deren genaue Mechanismen und Modi allerdings noch unklar sind. Der zytosolische Nachweis von TERT legt die Vermutung nahe, dass die Funktion der Telomerase über die Telomerstabilisierung hinausgeht und sie beispielsweise im Rahmen von Protein-Protein-Interaktionen an zellprotektiven Mechanismen beteiligt ist. So ist für Neurone beispielsweise beschrieben, dass TERT den zytosolisch-mitochondrialen Kalziumstoffwechsel zu modulieren vermag und damit die Sensitivität der Mitochondrien auf durch neurotoxischen Stress (beispielsweise freie Radikale) induzierte apoptotische Signale vermindert.

Nachweismethodisch haben sich neben dem traditionellen TRAP-Assay alternative bzw. modifizierte, zeitsparende und weniger störanfällige Verfahren etabliert, wie beispielsweise das RTQ-TRAP-Assay, ein TRAP-basierender, aber quantitativer Nachweis des Telomerase-Holoenzyms, oder die RTQ-PCR für den quantitativen hTERT-Nachweis. Gerade die Möglichkeit der Quantifizierung macht bei Fragestellungen, in denen die Definition eines Cut-Off-Levels notwendig ist, den wesentlichen Vorteil gegenüber dem TRAP-Assay aus.

Es wird beschrieben, dass durch den Telomerasenachweis eine deutliche Verbesserung der Spezifität und Sensitivität von traditionellen, diagnostischen Methoden wie beispielsweise der Feinnadelpunktion der Brust zu erreichen ist, was zu einem besseren Diskriminationsvermögen zwischen Malignität und Benignität beitragen kann. Für einige Tumorentitäten liegen vielversprechende Ergebnisse zur prognostischen Aussagekraft eines Telomerasenachweises bzw. seiner Komponenten vor, ganz besonders für das Neuroblastom 4s, aber auch beim Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinom, dem Wilms-Tumor (für hTERT) und leukämischen Erkrankungen.

Für die Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich ist die Telomerase wegen ihres häufigen Auftretens in der Mundschleimhaut infolge physiologischer und pathophysiologischer, nicht-maligner Vorgänge (Schleimhautrestitution, Inflammation, reversible, dysplastische Veränderungen etc.) wahrscheinlich nicht zur Früherkennung von Malignomen geeignet. Besonders hier ist der Nachweis mittels des TRAP-Assay, das ein funktionsfähiges Ribonukleoprotein voraussetzt, infolge des sehr heterogenen Milieus der Mundhöhle, dem ein nahezu unüberschaubares Inhibitorpotential (Proteininhibitoren, Proteasen, RNAasen etc.) zu unterstellen ist, sehr störanfällig, was den Nachweis erschwert und damit die Sensitivität verschlechtert.

Doch gibt es im Kopf-Hals-Bereich Hinweise darauf, dass der Nachweis von Telomeraseaktivität bzw. seiner korrelierenden Komponenten möglicherweise Aufschlüsse über das lymphogene Metastasierungsverhalten eines Malignoms geben kann, wovon sich unter Umständen therapeutische Konsequenzen abweichend von traditionellen Therapieregimen ableiten ließen. Dazu bedarf es jedoch noch weiterführender Untersuchungen mit dahingehender Fokussierung.

Der therapeutische Nutzen von Telomeraseinhibitoren im Rahmen einer Krebstherapie wird gegenwärtig positiv eingeschätzt. In welcher Form allerdings und unter welchen Bedingungen sowie an welchen, geeigneten Tumorentitäten müssen zukünftige Forschungen noch genauer klären. Als Möglichkeiten einer Telomeraseinhibition werden beispielsweise Peptid-Nukleinsäuren, siRNA, Nicht-Nukleosidische-Reverse-Transkriptasehemmer u.a. in der Literatur diskutiert. Neben diesen pharmakologischen sind auch immuntherapeutische Ansätze beschrieben. Die Blockade des Zugangs zu den Telomeren als Ziel einer Telomeraseinhibierung kann auch indirekt über eine Inhibierung telomer- bzw. telomeraseassoziierter Komponenten wie beispielsweise die Tankyrase erfolgen. Telomeraseinhibition kann auch adjuvanten Charakter in einer multimodalen Therapie haben, beispielsweise, um durch Vorbehandlung mit einem Telomeraseinhibitor bei geeigneter Tumorentität im Anschluss eine verbesserte Empfindlichkeit auf eine Radiotherapie zu erreichen.

Literaturverzeichnis

Ahn MJ, Noh YH, Lee YS et al. 1997. Telomerase activity and its clinicopathological significance in gastric cancer. European Journal of Cancer 33 (8): 1309-1313

Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J et al. 1996. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. Cancer Research 56: 645-650

Aldous WK, Grabill NR. 1997. A fluorescent method for detection of telomerase activity. Diagnostic Molecular Pathology 6: 102-110

Atkinson SP, Hoare SF, Glasspool RM, Keith WN. 2005. Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. Cancer Research 65 (17): 7585-7590

Bacchetti S. 1996: Telomere dynamics and telomerase activity in cell senescence and cancer. Seminars in Cell and Developmental Biology 7: 31-39

Bartsch H, Rojas M, Alexandrov K, Risch A. 1998. Impact of adduct determination on the assessment of cancer susceptibility. Resent Results in Cancer Research 154: 86-96

Bartsch H. 2000. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summery and challenge of 20 years of interdisciplinary research. Mutation Research 462: 255-279

Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Stiewe T. 2006. Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. Oncogene 25(6): 813-826

Bestilny LJ, Brown CB, Miura Y et al. 1996. Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines. Cancer Research 56: 3796-3802

Bieche I, Nogues C, Paradis V et al. 2000. Quantitation of hTERT gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay. Clinical Cancer Research 6: 452-459

Biessmann H, Mason JM. 1997. Telomere maintenance without telomerase. Chromosoma 106: 63-69

Blackburn EH, Gall JG. 1978. A tandemly repeated sequence at thetermini of the extrachromosomal RNA genes in Tetrahymena. Journal of Molecular Biology 120: 33-53

Blackburn EH. 1991. Structure and function of telomeres. Nature 350: 569-573

Blackburn EH. 2000. Telomere states and cell fates. Nature 408: 53-56

Blasco MA, Lee H-W, Handle MP et al. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cell lacking telomerase RNA. Cell 91: 25-34

Boenninghaus HG. 1996. Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. 10. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag

Bovee JVMG, van den Broeck LJCM, Cleton-Jansen AM, Hogendoom PCW. 2001. Chondrosarcoma is not characterized by detectable telomerase activity. Journal of Pathology 193: 354-360

Boring CC, Squires TS, Tong T.1992. Cancer statistics. CA: Cancer Journal for Clinicians 2: 19-38

Brennan JA, Mao L, Hruban RH et al. 1995. Molekular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of head and neck. New England Journal of Medicine 332: 429-435

Breslow RA, Shay JW, Gadzar AF et al. 1997. Telomerase and early detection of cancer: a National Cancer Institute workshop. Journal of the National Cancer Institute 89: 618-623

Broccoli D, Young JW, deLange T. 1995. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92: 9082-9086

Bryan TM, Englezou A, Gupta J et al. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. The EMBO Journal 14 (17): 4240-4248

Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S et al. 1997. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. Human Molecular Genetics 6: 921-926

Burger AM, Double JA, Newell DR. 1997. Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. European Journal of Cancer 33 (1): 638-644

Califano J, Ahrendt SA, Meininger G et al. 1996. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. Cancer Research 56: 5720-5722

Carey LA, Kim NW, Goodman S et al. 1999. Telomerase activity and prognosis in primary breast cancers. Journal of Clinical Oncology 17: 3075-3081

Carey LA, Hedican CA, Henderson GS et al. 1998. Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancers. Clinical Cancer Research 4: 435-440

Chang LY, Lin SC, Chang CS et al. 1999. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in oral carcinogenesis. Journal of Oral Pathology & Medicine 28: 389-396

Cheng AJ, Liao SK, Chow SE et al. 1997. Differential inhibition of telomerase activity during induction of differentiation in hematopoetic, melanoma, and glioma cells in culture. Biochemical and Biophysical Research Communications 237: 438-444

Cheng RY, Yuen PW, Nicholls JM et al. 1998. Telomerase activation in nasopharyngeal carcinomas. British Journal of Cancer 77 (3): 456-460

Chun-Ta L, Chang JTC, Hung-Ming W et al. 2004. Telomerase as an independent prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. Head & Neck 26: 504-512

Chung HK, Cheong C, Song J, Lee HW 2005: Extratelomeric functions of Telomerase. Current Molecular Medicine 5: 233-241

Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE et al 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. The EMBO Journal 11: 1921-1929

Counter CM, Gupta J, Harley CB et al 1995. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. Blood 85: 2315-2320

Curran AJ, St Denis K, Irish J et al. 1998. Telomerase activity in oral squamous cell carcinoma. Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery 124 (7): 784-788

Dhaene K, vanMarck E, Parwaresch R. 2000. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. Virchows Archiv 437: 1-16

Dahse R, Koscielny S. 1996. Zur Molekulargenetik von malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (head and neck). Ärzteblatt Thüringen 7: 611-614

Dahse R, Fiedler W, Koscielny S et al. 1997. Reactivation of the telomerase in the cancerogenesis of squamous cell carcinoma in the head and neck. International Journal of Molecular Medicine 75: B111-112

Daly MC, Xiang RH, Buchlagen D et al. 1993. A homozygous deletion on chromosome 3 in a small cell lung cancer cell line correlates with a region of tumor suppression activity. Oncogene 8: 1721-1729

Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P et al. 2001. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. The EMBO Journal 20: 6958-6968

Dea S, Garzon S, Strykowski H, Tijssen P. 1989. Ultrastructure and protein a-gold immunolabelling of HRT18 cells infected with turkey enteric coronavirus. Veterinary Microbiology 20: 21-33

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. 1999. Krebsatlas, Mortalitätsstatistik nach Organen. http://www.dkfz-heidelberg.de, 30. 05. 2001

Dome JS et al. 1999. High telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patients with favourable histology Wilms' tumor. Cancer Research 59: 4301-4307

Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL et al. 2000. Telomere maintenance by recombination in human cells. Nature Genetics 26: 447-450

El-Daly H, Kull M, Zimmermann S et al. 2005. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. Blood 105 (4):1742-1749

Fabricius EM, Gurr U, Wildner GP. 2002. Telomerase activity levels in the surgical margin and tumour distant tissue of the squamous cell carcinoma of the head-and-neck. Analytical Cellular Pathology 24: 25-39

Fabricius EM, Bezeluk A, Kruse-Boitschenko U et al. 2003. Clinical significance of telomerase activity in basal cell carcinomas and in tumor-free surgical margins. International Journal of Oncology 23: 1389-1399

Faraoni I, Graziani G, Turriziani M et al. 1999. Suppression of telomerase activity as an indicator of drug-induced cytotoxicity against cancer cells: in vitro studies with fresh human tumor samples. Laboratory Investigations 79 (8): 993-1005

Feng J. 1995. The RNA-component of human telomerase. Science 269: 1236-1241

Fiedler W, Dahse R, Junker K et al. 1996. Telomerase activity and telomere length in different area of renal cell carcinoma. International Journal of Oncology 9: 1227-1232

Fiedler W, Hoppe C, Schimmel B et al. 2002. Molecular characterization of head and neck tumors by analysis of telomerase activity and a panel of microsatellite markers. International Journal of Molecular Medicine 9 (4): 417-423

Fletcher TM, Salazar M, Chen SF. 1996. Human telomerase inhibition by 7-deaza-2´-deoxypurine nucleoside triphosphates. Biochemistry 35 (49): 15611-15617

Fong D, Burke JP, Chan MMY. 1997. Nonradioactive, agarose minigel procedure for telomeric repeat amplification protocol. Biotechniques 23: 1029-1032

Gang ZR, Wang XW, Yuan JH et al. 2000. Using a non-radioisotopic, quantitative TRAP-based method detecting telomerase activities in human hepatoma cells. Cell Research 10: 71-77

Glaessl A, Bosserhoff AK, Buettner R, Hohenleutner U et al. 1999. Increase in telomerase activity during progression of melanocytic cells from melanocytic naevi to malignant melanomas. Archives of Dermatological Research 291: 81-87

Goytisolo FA, Samper E, Martin-Caballero J et al. 2000. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. Journal of Experimental Medicine 192: 1625-1636

Greider CW. 1994. Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation shortening and stabilization. Current Opinion in Genetics and Development 4: 203-211

Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 43: 405-413

Greider CW, Blackburn EH. 1996. Telomeres, telomerase and cancer. Scientific American 274: 92-97

Greider CW, Blackburn EH. 1996. Telomere, Telomerase und Krebs. Spektrum der Wissenschaft 4: 30-36

Grimm H, Recknagel RD. 1985. Grundkurs Biostatistik. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag

Gurr, Ulrike. 2003. Der Nachweis der Telomeraseaktivierung in Tumorgeweben und dem Tumor benachbarten Geweben von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich [Dissertation]. Berlin: Humboldt-Universität

Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS et al. 1999. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. Nature 400: 464-468

Hamilton SE, Corey DR. 1996. Telomerase: anti-cancer target or just a fascinating enzyme? Chemistry and Biology 3: 863-867

Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. Cell 100: 57-70

Hara E, Tsurui H, Shinozaki A et al 1991. Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 on the extension of life span of human diploid fibroblasts, TGI-1. Biochemical and Biophysical Research Communications 179: 528-534

Härle-Bachor C, Boukamp P. 1996. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93: 6476-6481

Harley CB, Futcher AB, Greider W. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345: 458-460

Harley CB. 1991. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?
Mutation Research 256: 271-282

Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. Experimental Gerontology 27: 375-382

Harley CB, Villeponteau B. 1995. Telomeres and telomerase in aging and cancer.
Current Opinion in Genetics and Development 5: 249-255

Harrington L, McPhail T, Mar V et al. 1997. A mammalian telomerase-associated protein. Science 275: 973-977

Harrison JG, Frier C, Laurant R et al. 1999. Inhibition of human telomerase by PNA-cationic peptide conjugates. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 9 (9): 1273-1278

Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG et al 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. Nature 346: 866-868

Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid strains. Experimental Cell Research 25: 585-621

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research 6: 986-994

Herbert B, Pitts AE, Baker SI, et al. 1999. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96 (25): 14276-14281

Higuchi R. 1989. Rapid, efficient extraction for PCR from cells or blood. Amplification. A forum for PCR users 2: 1-3

Hisatomi H et al. 1999. Levels of telomerase catalytic subunit mRNA as a predictor of potential malignancy. International Journal of Oncology 14: 727-732

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T et al. 1995. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. Nature Medicine 1 (3): 249-255

Hiyama E, Kodama T, Shinbara K et al. 1997. Telomerase activity is detected in pancreatic but not in benign tumors. Cancer Research 57: 326-331

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. 2001. Immunhistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. Neoplasia 3: 17-26

Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S et al 1995. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells. The Journal of Immunology 155: 3711-37115

Hohaus S, Cavallo S, Bellacosa A et al. 1996. Telomerase in human laryngeal squamous cell carcinoma. Clinical Cancer Research 2: 1895-1900

Holt SE, Wright WE, Shay JW. 1996. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. Molecular and Cellular Biology 16 (6): 2932-2939

Holt SE, Shay JW, Wright WE. 1996. Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. Nature Biotechnology 14: 836-839

Holt SE, Wright WE, Shay JW. 1997. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. European Journal of Cancer 33 (5): 761-766

Holt SE, Aisner DL, Baur J et al. 1999. Functional requirement of p23 and HSP 90 in telomerase complexes. Genes and Development 13 (7): 817-826

Hou M, Xu D, Björkholm M, Gruber A. 2001. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay fort he detection of telomerase activity. Clinical Chemistry 47 (3): 519-524

Hummel M, Heine B, Demel G, Stein H. 1997. Telomerase as a tumor marker? Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 81: 312-317

Igarashi H, Sakaguchi N. 1997. Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. Blood 89: 1299-1307

Ito H, Kyo S, Kanaya T et al. 1998. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. Clinical Cancer Research 4: 1603-1608

Kalluri, R. 1996. Telomere (telomerase) hypothesis of aging and immortalization. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics 33: 88-92

Kanaya T, Kyo S, Takakura M et al. 1998. hTERT is a critical determinant of telomerase activity in renal cell carcinoma. International Journal of Cancer 78: 539-543

Kannan S, Tahara H, Yokozaki H et al. 1997. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 6(6): 413-420

Kelland LR. 2001. Telomerase: biology and phase I trials. The Lancet Oncology 2 (2): 95-102

Kelland LR. 2005. Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics--current status and future prospects. European Journal of Cancer 41 (7): 971-979

Killary AM, Wolf ME, Giambernardi TA, Naylor SL. 1992. Definition of a tumor suppressor locus within human chromosome 3p21-22. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 89: 10877-10881

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR et al. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 266: 2011-2015

Kim NW. 1997. Clinical implications of telomerase in cancer. European Journal of Cancer 33 (5): 781-786

Kim NW, Wu F. 1997. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). Nucleic Acids Research 25 (13): 2595-2597

Kim HR, Christensen R, Park NH et al. 2001. Elevated expression of hTERT is associated with dysplastic cell transformation during human oral carcinogenesis in situ. Clinical Cancer Research 7: 3079-3086

Kipling D. 1995. Telomerase: immortality enzyme or oncogene? Nature Genetics 9: 104-106

Kipling D. 1997. Mammalian telomerase: catalytic subunit and knockout mice. Human Molecular Genetics 6 (12): 1999-2004

Kiyono T, Foster SA, Koop JI et al. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. Nature 396: 84-88

Kleinschmidt-Demasters BK, Hashizumi TL, Sze CI et al. 1998. Telomerase expression shows differences across multiple regions of oligodendroglioma versus high grade astrozytomas but shows correlation with Mib-1 labeling. Journal of Clinical Pathology 51: 284-293

Kleinschmidt-Demasters BK, Evans LC, Bobak JB et al. 2000. Quantitative telomerase expression in glioblastomas shows regional variation and down-regulation with therapy but no correlation with patient outcome. Human Pathology 31: 905-913

Komuro Y, Watanabe T, Tsurita G et al. 2005. Expression pattern of telomerase reverse transcriptase in rectal carcinoma predicts tumor radiosensitivity, local recurrence and disease-free survival. Hepato-Gastroenterology 52: 985-989

Koscielny S, Fiedler W, Dahse R et al. 1998. Clinical implication of telomerase activity in head and neck cancers. 1st world congress on Head and Neck Oncology. Ed.: J. J. Alvarez. Vicent. Bologna, Monduzzi Editore S. p. A.: 1151-1154

Koscielny S, Fiedler W, Dahse R et al. 1998. Is telomerase activity a possible tumor marker for the metastasis of head and neck cancer? British Journal of Cancer 77: 51

Koscielny S, Dahse R, Sonntag J et al. 2000. Clinical implications of telomerase activity and inactivation of the tumor suppressor gene p16 (CDKN2A) in head and neck cancer. Otolaryngologia Polska 54 (3): 291-295

Koscielny S. 2002. Untersuchungen zur Bedeutung der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16, Reaktivierung der Telomerase und Mutation von p53 in der Karzinogenese von Kopf-Hals-Karzinomen. Laryngo-Rhino-Otologie 81:197-198

Koscielny S, Eggeling F, Dahse R, Fiedler W. 2004. The influence of reactivation of the telomerase in tumour tissue on the prognosis of squamous cell carcinomas in the head and neck. Journal of Oral Pathology & Medicine 33 (9): 538-542

Kruk PA, Balajee AS, Rao KS et al. 1996. Telomere reduction and telomerase inactivation during neuronal cell differentiation. Biochemical and Biophysical Research Communications 224: 487-492

Krupp G, Kühne K, Tamm S et al. 1997. Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay. Nucleic Acids Research 25 (4): 919-921

Krupp G, Klapper W, Parwaresch R. 2000. Cell proliferation, carcinigenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. Cellular and Molecular Life Sciences 57: 464-486

Kuniyasu H, Domen T, Hamamoto T et al 1997. Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis. Japanese Journal of Cancer Research 88: 103-107

Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. 1997. Telomerase activity in human endometrium. Cancer Research, 57: 610-614

Kyo S, Takakura M, Kanaya T et al. 1999. Estrogen activates telomerase. Cancer Research 59: 5917-5921

Kyo S, Takakura M, Taira T et al. 2000. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). Nucleic Acids Research 28: 669-677

de Lange T, Shiue L, Myers RM et al. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. Molecular and Cellular Biology 10 (2): 518-527

Langford LA, Piatyszek MA, Xu R et al. 1997. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. Human Pathology 28 (4): 416-420

Lee KH, Rudolph KL, Ju YJ et al. 2001. Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98: 3381-3386

Lee BK, Diebel E, Neukam FW et al. 2001. Diagnostic and prognostic relevance of expression of human telomerase subunits in oral cancer. International Journal of Oncology 19: 1063-1068

Liao J, Mitsuyasu K, Yamane K, Ohishi M. 2000. Telomerase activity in oral and maxillofacial tumors. Oral Oncology 36: 347-352

Liao CT, Chang JTC, Wang HM et al. 2004. Telomerase as an independent prognostic factor in head and neck squamous cell carcinoma. Head & Neck 26, 504-512

Lorenz RL. 1992. Biometrie - Grundbegriffe der Biometrie. Stuttgart, Jena: Gustav Fischer Verlag

Loughran O, Clark LJ, Bond J et al. 1997. Evidence for the inactivation of multiple replicative lifespan genes in immortal human squamous cell carcinoma keratinocytes. Oncogene 14: 1955-1964

Lu JP, Zhu SN, Song BP et al. 1999. Detection of telomerase activity and its clinical significance by PCR-ELISA. Acta Histochemica et Cytochemica 32: 477-480

Luzar B, Poljak M, Marin IJ, Gale N. 2003. Telomerase reactivation is an early event in laryngeal carcinogenesis. Modern Pathology 16 (9): 841-848

Lydiatt WM, Anderson PE, Bazzana T et al. 1998. Molecular support for field cancerization in the head and neck. Cancer 82: 1376-1380

Mao L, El-Naggar AK, Fan YH et al. 1996. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. Cancer Research 56 (24): 5600-5604

Mata JE, Joshi SS, Palen B et al. 1997. A hexameric phosphorothioate oligonucleotide telomerase inhibitor arrest growth of Burkitt's Lymphoma cells in vitro and in vivo. Toxicology and Applied Pharmacology 144: 189-197

McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK. 2002. Telomerase inhibition and the future management of head and-neck-cancer. The Lancet Oncology 3: 280-288

McClintock B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in Zea mays. Genetics 41: 234-282

McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. 2000. Telomeres and their control. Annual Review of Genetics 34: 331-358

Mehle C, Piatyszek MA, Ljungberg B et al. 1996. Telomerase activity in human renal cell carcinoma. Oncogene 13: 161-166

Meyer JG. 1990. Labormedizin. 4. Auflage, Köln: Deutscher Ärzteverlag

Meyerson M, Counter CM, Eaton EN et al. 1997. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumorcells and during immortalization. Cell 90: 785-795

Miura N, Maeda Y, Kanbe T et al. 2005. Serum human telomerase reverse transcriptase messenger RNA as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma. Clinical Cancer Research 11 (9): 3205-3209

Morin GB. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell 59: 521-529

Morin GB. 1995. Is telomerase a universal cancer target? Journal of the National Cancer Institute 87: 859-861

Müller HJ. 1938. The remaking of chromosomes. The Collecting Net - Woods Hole 13: 181-198

Muntoni A, Reddel RR. 2005. The first molecular details of ALT in human tumor cells. Human Molecular Genetics 14 (2): R191-R196

Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekapan S et al. 1996. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Research 56: 3530-3533

Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB et al. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science 277: 955-959

Nair SK, Heiser A, Boczkowski D et al. 2000. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. Nature Medicine 6: 1011-1017

Nakayama J, Saito M, Nakamura H et al. 1997. TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. Cell 88: 875-884

Nakayama J, Tahara H, Tahara E et al. 1998. Telomerase activation by hTRT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. Nature Genetics 18: 65-68

National Cancer Institute. 2000. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. Cancer 88 (10): 2398-2424

Newbold RF. 1998. Genetic control of telomerase and replikative senescence in human and rodent cells. Telomeres Telomerase 211: 177-189

Norrback KFG, Enblad M, Erlanson C et al. 1998. Telomerase aktivity in hodgkin's disease. Blood 92: 567-573

Norton JC, Piatyszek MA, Wright WE et al. 1996. Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. Nature Biotechnology 14 (5): 615-619

Norton JC, Holt SE, Wright WE, Shay JW. 1998. Enhanced detection of human telomerase activity. DNA and Cell Biology 17(3): 217-219.

Nowak R, Chrapusta SJ. 1998 Regulation of telomerase activity in normal and malignant human cells. The Cancer Journal from Scientific American 4(3): 148-154

Ogawa Y, Nishioka A, Hamada N et al. 1998. Changes in telomerase activity of advanced cancers of oral cavity and oropharynx during radiation therapy: correlation with clinical outcome. International Journal of Molecular Medicine 2 (3): 301-307

Ohmura H, Tahara H, Suzuki M et al. 1995. Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3. Japanese Journal of Cancer Research 86: 899-904

Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N et al. 2004. A highly sensitive and quantitative telomerase activity assay with pancreatic juice is useful for diagnosis of pancreatic carcinoma without problems due to polymerase chain reaction inhibitors. Cancer 101: 2309-2317

Ohuchida K, Mizumoto K, Ogura Y et al. 2005. Quantitative assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA levels in pancreatic juice samples for the diagnosis of pancreatic cancer. Clinical Cancer Research 11: 2285-2292

Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Toyama K. 1996. Technical improvement in determining telomerase activity in hematologic neoplasias: a possibility of single cell determination of telomerase activity. Human Cell 9(4): 295-300

Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nishimaki J et al. 1997. Cytological detection of telomerase activity using an in situ telomeric repeat amplification protocol assay. Cancer Research 57: 2100-2103

Olownikow AM. 1971. Principles of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. Doklady Akademii NAUK (UdSSR) 201: 1496-1499

Olownikow AM. 1973. A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. Journal of Theoretical Biology 41: 181-190

Pandita TK, Benvenuto JA, Shay JW et al. 1997. Effect of penclomedine (NSC-338720) on telomere fusions, chromatin blebbing, and cell viability with and without telomerase activity and abrogated p53 function. Biochemical Pharmacology 53: 409-415

Pantic M, Zimmermann S, Waller CF, Martens UM. 2005. The level of telomere dysfunction determines the efficacy of telomerase-based therapeutics in a lung cancer cell line. International Journal of Oncology 26 (5):1227-1232

Parkinson EK. 1996. Do telomerase antagonists represent a novel anti-cancer strategy? British Journal of Cancer 73 (1): 1-4

Pascolo E, Wenz C, Lingner J et al. 2002. Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. Journal of Biological Chemistry 277 (18):15566-15572

Patel JR, Daniel J, Mathan M, Mathan VI. 1984. Isolation and identification of enteroviruses from faecal samples in a diffentiated epithelial cell line (HRT-18) derived from human rectal carcinoma. Journal of Medical Virology 14: 255-261

Patel MM, Patel DD, Parekh LJ et al. 1999. Evaluation of telomerase activation in head and neck cancer. Oral Oncology 1999 35 (5): 510-515

Patel MM, Parekh LJ, Jha FP et al. 2002. Clinical usefulness of telomerase activation and telomere length in head and neck cancer. Head & Neck 24: 1060-1067

Pereira-Smith OM, Smith JR. 1983. Evidence for recessive nature of cellular immortality. Science 221: 964-966

Perry PJ, Gowan SM, Read MA et al. 1999. Design, synthesis and evaluation of human telomerase inhibitors based upon a tetracyclic structural motif. Anticancer Drug Design 14 (4): 373-382

Pleasure SJ, Page C, Lee VMY, 1992. Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. Journal of Neuroscience 12: 1802-1815

Poremba C, Shroyer KR, Frost M et al. 1999. Telomerase is a highly sensitive and specific molekular marker in fine-needle aspirates of breast lesions. Journal of Clinical Oncology 17 (7): 2020-2026

Qiagen-Informationsblätter. 1997. Issue No.1, Tab.1

Racek T, Mise N, Li Z, Stoll A, Putzer BM. 2005. C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. The Journal of Biological Chemistry 280 (49): 40402-40405

Reedy VG, Khauna N, Jain SK et al. 2001. Telomerase – a molecular marker for cervical screening. International Journal of Gynecological Cancer 11: 100-106

Renan MJ. 1993. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. Molecular Carcinogenesis 7: 139-146

Rhode V. et al. 1998. Telomerase in tumors: facts and perspectives. Urologe 37 (4): 386-394

Ries JC, Hassfurther E, Steininger H et al. 2001. Correlation of telomerase activity, clinical prognosis and therapy in oral carcinogenesis. Anticancer Research 21: 1057-1063

Rossi JJ. Therapeutic antisense and ribozymes. British Medical Bulletin 51 (1): 217-225.

Saeki T, Takashima S, Tachibana M et al. 1999. Inhibitory effect of telomere-mimic phosphorothioate oligodeoxy nucleotides (S-ODNS) on human tumor cell lines. Oncology 57 (2): 27-36

Sankaranarayanan R. 1990. Oral cancer in India: an epidemiologic and clinical review. Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology 69: 325-330

Schneider-Stock R, Boltze C, Roessner A. 2002. Telomerase und neue Aspekte in der Tumorbiologie. Pathologe 23: 177-182

Seimiya H. 2006. The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. British Journal of Cancer 94: 341 - 345

Shammas MA, Simmons CG, Corey DR, Shmookler-Reis RJ. 1999. Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells. Oncogene 18 (46): 6191-6200

Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH. 1984. DNA Sequences of Telomeres Maintained in Yeast. Nature 310 (5973): 154-157

Sharma HW, Sokolowski JA, Perez JR et al. 1995. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 92: 12343-12357

Sharma S, Raymond E, Soda H et al. 1997. Preclinical and clinical strategies for development of telomerase and telomere inhibitors. Annals of Oncology 8: 1063-1074

Sharma H, Sen S, Mathur M et al. 2004. Combined evaluation of expression of telomerase, surviving, and anti-apoptotic Bcl-2 family members in relation to loss of differentiation and apoptosis in human head and neck cancers. Head & Neck: 26 (8): 733-740

Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of humane cellular senescence. Experimental Cell Research 196: 33-39

Shay JW. 1995. Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection? Molecular Medicine Today 1(8): 378-384

Shay JW. 1996. Telomeres and telomerase in human leukemias. Leukemia 10: 1255-1261

Shay JW, Bacchetti S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. European Journal of Cancer 33 (5): 787-791

Shay JW, Gazdar AF. 1997. Telomerase in the early detection of cancer. Journal of Clinical Pathology 50: 106-109

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. 1953. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. Cancer 6: 963-968

Sobin LH, Wittekind CH (Eds.). 1997. UICC-TNM classification of malignant tumours. 5th edn., New York: Wiley Liss

Soria JC, Morat L, Commo F et al. 2001. Telomerase activation cooperates with inactivation of p16 in early head and neck tumorigenesis. British Journal of Cancer 84 (4): 504-511

Spiro RH, Huvos AG, Wong GY. 1986. Predictive value of tumor thickness in squamous carcinoma confined to the tongue and floor of mouth. The American Journal of Surgery 152: 345-350

Strong EW, Kasdorf H, Henk JM. 1995. Squamous cell carcinoma of the head and neck. In: Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH (Hrsg.). Prognostic factors in cancer. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 12-22

van Steensel B, de Lange T. 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. Nature 385: 740-743

van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. Cell 92(3): 401-413

Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku J et al. 1996. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. International Journal of Cancer 69: 301-306

Sumida T, Hamakawa H, Sogawa K et al. 1999. Telomerase components as a diagnostic tool in human oral lesions. International Journal of Cancer 80 (1): 1-4

Sumida T, Hamakawa H. 2001. Telomerase and oral cancer. Oral Oncology 37: 333-340

Sung YH, Choi YS, Cheong C, Lee HW. 2005. The pleiotropy ot telomerase against cell death. Mol. Cells 19 (3): 303 - 309

Tabata Y, Ikegami S, Yaguchi T et al. 1999. Diazaphilonic acid, a new azaphilone with telomerase inhibitory activity. The Journal of Antibiotics (Tokyo) 52 (4): 412-414

Taga S, Osaki T, Ohgami A et al. 1999. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. Annals of Surgery 230 (5): 715-720.

Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H et al. 1995. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. Clinical Cancer Research 1: 1245-1251

Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M et al. 1995. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. Cancer Research 55: 2734-2736

Takaishi H, Kitamoto M, Takahashi S et al. 2000. Precancerous hepatic nodules had significant levels of telomerase activity determined by sensitive quantitation using a hybridization protection assay. Cancer 88 (2): 312-317.

Takakura M, Kyo S, Kanaya T et al. 1998. Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. Cancer Research 58: 1558-1561

Takakura M, Kyo S, Kanaya T et al. 1999. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. Cancer Research 59: 551-557

Tannapfel A, Weber A. 2001. Tumor markers in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical effectiveness and prognostic value. European Archives of Otorhinolaryngology 258: 83-88

Thurner D, Knerer B, Formanek M, Kornfehl J. 1998. Non-radioactive semiquantitative testing for the expression levels of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinomas may be indicative for biological tumour behaviour. Acta Oto-Laryngologica 118 (3): 423-427

Thurner D, Bakroeva M, Formanek M et al. 2001. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit telomerase activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. Head & Neck 23: 1049-1055

Tompkins WAF, Watrach AM, Schmale JD et al. 1974. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. Journal of the National Cancer Institute 52 (4): 1101-1110

Urquidi V, Tarin D, Goodison S. 1998. Telomerase in cancer: clinical applications. Annals of Medicine 30: 419-430

Vonderheide RH. 2002. Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. Oncogene 21 (4): 674-679

Warburg O, Christian W. 1941. Proteinbestimmung mittels UV-Absorption. Biochemische Zeitschrift 310: 384

Watson JD. 1972. Origin of concatameric T4 DNA. Nature 239: 197-201

Weber A, Tannapfel A. 2002. Prognosefaktoren bei Kopf-Hals-Karzinomen. HNO 50: 35-42

Weikert S, Krause H, Wolff I et al. 2005. Quantitative evaluation of telomerase subunits in urine as biomarkers for noninvasive detection of bladder cancer. International Journal of Cancer 117 (2): 274-280

Weinrich SL, Pruzan R, Ma L et al. 1997. Reconstitution of humane telomerase with template RNA component hTERC and the catalytic protein subunit hTERT. Nature Genetics 17: 498-502

Wen JM, Sun LB, Zhang M, Zheng MH. 1998. A non-isotopic method fort he detection of telomerase activity in tumour tissues: TRAP-silver staining assay. Molecular Pathology 51: 110-112

Whang-Peng J, Kao-Shan CS, Lee EC et al. 1995. Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer: deletion 3p(14-23). Science 215: 181-182

Wink M, Wehrle H. 1994. PCR im medizinischen und biologischen Labor - Handbuch für den Praktiker. GIT-Verlag, 15

Wright WE, Shay JW. 1992. The 2-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. Experimental Gerontology 27: 383-389

Wright WE, Shay JW. 1995. Time, telomeres and tumours: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? Trends in Cell Biology 5: 293-297

Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA et al. 1995. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. Nucleic Acids Research 23 (18): 3794-3795

Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE et al. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. Developmental Genetics 18:173-179

Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek MA et al. 1996. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. EMBO Journal 15: 1734-1741

Wright WE, Shay JW. 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. Current Opinion in Genetics & Development 11: 98-103

Wynford-Thomas D. 1999. Cellular senescence and cancer. Journal of Pathology 187: 100-111

Xu D, Wang Q, Gruber A et al. 2000. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. Oncogene 19: 5123-5133

Yamakuchi M, Nakata M, Kawahara K et al. 1997. New quinolones, ofloxacin and levofloxacin, inhibit telomerase activity in transitional cell carcinoma cell lines. Cancer Letters 119 (2): 213-219

Yan P, Coindre JM, Benhattar J et al. 1999. Telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase mRNA expression in soft tissue tumors: correlation with grade, histology, and proliferative activity. Cancer Research 59: 3166-3170

Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM et al. 1997: Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. Journal of Clinical Pathology 50: 110-117

Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K et al. 1996. Telomerase activity in normal human epithelial cells. Oncogene, 13: 433-439

Zakian VA. 1997. Life and cancer without telomerase. Cell 91: 1-3

Zhang S, Dong M, Teng X, Chen T. 2005. Quantitative assay of telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and other tissues. Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery 127: 581-585

Zetkin M, Schaldach H. 1987. Wörterbuch der Medizin. 13. Auflage, Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. U. Claussen, Herr Dr. rer. nat. W. Fiedler, Herr OA Dr. med. G. Ernst, Herr PD Dr. rer. nat. F. v. Eggeling, Frau B. Schimmel, Herr Dipl.-Math. J. Thomser, Frau B. Wolter-Blank, Herr Dipl.-Med. V. Becker, Herr R. Zschiegner und Herr S. Arlt.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Chemnitz, den 18. Dezember 2006

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. U. Claussen, Direktor des Institutes für Humangenetik und Anthropologie in Jena, danke ich für das freundliche Überlassen des Promotionsthemas und die Möglichkeit zur Arbeit im Institut.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Dipl. Biol. W. Fiedler als meinen Betreuer bedanke ich mich für die wertvolle Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Arbeit.

Herrn OA Dr. med. G. Ernst und Herrn PD Dr. rer. nat. F. v. Eggeling möchte ich für ihre Bemühungen beim Lesen und Korrigieren des Manuskriptes und ihre wertvollen Hinweise danken.

Frau B. Schimmel, Fach-MTA am Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena, gebührt mein Dank für ihre geduldige Hilfe dabei, mich in den molekularbiologischen Arbeitstechniken und im Alltag des Labors zurechtzufinden.

Frau B. Wolter-Blank, Sekretariat des Institutes für Humangenetik und Anthropologie in Jena, sei herzlichst gedankt für die stets freundlichen und geduldigen Auskünfte und Beratungen während der Arbeit im Labor und bei der Erstellung des Manuskriptes.

Ebenso sei an dieser Stelle allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik und Anthropologie in Jena für ihre stets freundliche und kompetente Unterstützung gedankt.

Mein Dank gilt auch Herrn Dipl.-Math. J. Thomser, Cc Klinik-Verwaltungsgesellschaft Chemnitz mbH, für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Dipl.-Med. Volker Becker, Herrn Rajko Zschiegner und Herrn Stefan Arlt danke ich für ihre vielen Bemühungen und Unterstützung in computertechnischen Fragen bei der Erstellung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name	Sonntag
Vorname	Jürgen
Geburtsdatum	13.12.1972
Geburtsort	Stollberg / Sachsen
Familienstand	ledig, ein Kind

Schulbildung

1979 - 1989	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule
1989 - 1991	Erweiterte Oberschule
1991	Abitur

Hochschulausbildung / Berufliche Tätigkeit

1993 - 2000	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena und der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
2000	Staatsexamen
2000 - 2001	Arzt im Praktikum in der Klinik für Kinderchirurgie im Klinikum Chemnitz gGmbH
2002 – 2003	Arzt in Weiterbildung für Anaesthesie am Waldklinikum Gera gGmbH
2003 – jetzt	Arzt in Weiterbildung für Anaesthesie am Klinikum Chemnitz gGmbH

Chemnitz, den 18. Dezember 2006