Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

der Philipps-Universität Marburg

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Arnold

Klinik für Innere Medizin

Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie

Direktor: Prof. Dr. med. Neubauer

Diagnostische Bedeutung von Telomerase-Aktivität in Perikardergüssen

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER GESAMTEN MEDIZIN

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

TEJA KARSTEN WITTSTOCK

aus Berlin

Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 09.09.2004
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Dekan: Prof. Dr. Maisch
Referent: Prof. Dr. Schuermann
Korreferent: Prof. Dr. Grimm

Inhaltsverzeichnis

1 **Einleitung** 6

1.1 Perikardergüsse 7

1.1.1 Ätiologie von Perikardergüssen 7

1.1.2 Neoplasien des Herzens bzw. des Perikards 9

1.1.2.1 Maligne Beteiligung des Perikards 9

1.1.2.2 Der diagnostische Wert der zytologischen Untersuchung von Perikardergüssen 12

1.1.2.3 Erweiterte Diagnostik 13

1.1.3 Therapie von Perikardergüssen 14

1.2 Telomere und Telomerase 14

1.2.1 Vorbemerkungen 14

1.2.2 Telomere 16

1.2.2.1 Funktion der Telomere 16

1.2.2.2 Struktur der Telomere 17

1.2.3 Telomerase 18

1.2.3.1 Die RNA-Komponente - hTR 18

1.2.3.2 Die reverse Transkritpase-Einheit - hTERT 19

1.2.3.3 Bedeutung der Telomerase 20

1.2.3.4 Telomerase-Aktivitätsmessung 21

1.3 Bisherige Studien 22

1.4 Ziele der Arbeit 23

2 **Material und Methoden** 24

2.1 Material 24

2.1.1 Chemikalien 24

2.1.2 Enzyme, Fertigpuffer und Nucleinsäuren 25

2.1.3 Kits und Sonstiges 26

2.1.4 Puffer und Lösungen 27

2.1.5 Geräte und Zubehör 29

2.1.6 Oligonucleotide 31

2.1.7 Zelllinien 31

2.1.7.1 NCI-H69-Zellen 32

2.1.7.2 $CD34^+$-Progenitorzellen und mononukleäre Zellen 32

2.1.7.2.1 Isolierung der mononukleären Zellen 32

2.1.7.2.2 Isolierung der $CD34^+$-Zellen 33

2.1.7.2.2.1 Magnetische Markierung der $CD34^+$-Progenitorzellen 34

2.1.7.2.2.2 Magnetische Auftrennung der gebundenen mononukleären Zellen ..34

2.1.7.2.3 $CD34^+$-Kultur und Aktivierung 35

2.1.7.2.4 Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut 35

2.1.7.3 MS-5-Zelllinie (Mausfibroblasten) 35

2.1.8 Patientenmaterial (zytologische Proben) 36

2.2 Methoden 36

2.2.1 Proteinextraktion 37

2.2.1.1 Proteinextraktion aus Zelllinien 37

2.2.1.2 Proteinextraktion aus Perikardergüssen 38

2.2.2 Proteinkonzentrationsmessung 39

2.2.3 Telomerase-Aktivitätsmessung 40

2.2.3.1 Der TRAP-Assay (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*) 40

2.2.3.1.1 Telomerase-Extensionsschritt 41

2.2.3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 41

2.2.3.2 Durchführung des TRAP-Assays 43

2.2.3.2.1 Radioaktive Markierung des TS-Primers 43

2.2.3.2.2 Primer-Elongation und PCR-Ansatz 44

2.2.4 Gelelektrophorese 46

2.2.4.1 Nichtdenaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese: Auftrennung der Produkte des konventionellen TRAP-Assays 48

2.2.4.2 Kinasierung des Längenstandards 49

2.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamidelektrophorese: Analyse von F-TRAP-Produkten mit dem GeneScanner 50

2.2.5 Qualitätskontrolle der Proteinextrakte 52

3 **Ergebnisse** 54

3.1 Proteinkonzentrationen 54

3.2 Alkalische Phosphatase-Aktivität 55

3.3 Klinisch-pathologische Daten 56

3.4 Radioaktiver TRAP-Assay 61

3.4.1 Kriterien für Telomerase-Aktivität 61

3.4.2 Telomerase-Aktivität in Perikardzytomaterial 62

3.4.3 Beispiele anhand von Perikardzytomaterial 63

3.5 Fluoreszenz-basierter TRAP-Assay 64

3.5.1 Standardisierung anhand einer Verdünnungsreihe von NCI-H69-Zellen 65

3.5.1.1 Reproduzierbarkeit der Analyse eines Amplifikats auf verschiedenen Gelen 67

3.5.1.2 Reproduzierbarkeit der Analyse von Amplifikaten aus unterschiedlichen Verdünnungsreihen 69

3.5.1.3 Probenelongation mittels Telomerase 72

3.5.2 Verdünnungsreihen von $CD34^+$- und mononukleären Zellen aus peripherem Blut 74

3.5.3 Ergebnisse anhand von Perikardzytomaterial 78

3.5.4 Bestimmung eines „Cut-off"-Wertes unter Betrachtung der Veränderung der Sensitivität und Spezifität 81

4 **Diskussion** 83

4.1 Telomerase-Aktivität als Tumormarker 83

4.2 Korrelation zwischen der Zytologie und dem TRAP-Assay 85

4.3 Ergebnisse des TRAP-Assays bei Perikardergüssen im Kontext der Patientengeschichten 89

4.4 Problemstellung bei der Quantifizierung von Telomerase-Aktivität 93

4.5 Reproduzierbarkeit des fluoreszenz-basierten TRAP-Assays 95

4.6 Hintergrundaktivität und Bestimmung des „Cut-off"-Wertes 97

4.7 Methodische Diskussion 101

5 **Zusammenfassung** 107

6 **Abkürzungsverzeichnis** 109

7 **Literaturverzeichnis** 112

8 **Akademische Lehrer** 122

9 **Danksagung** 123

10 **Lebenslauf** 124

11 **Erklärung** 126

1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen die häufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauferkrankungen dar. Bei malignen Tumoren ist der Zeitpunkt der Erkennung entscheidend für die Therapie und die Prognose der Erkrankung. Daher befindet sich die medizinische Forschung auf der ständigen Suche, die Methoden zur Früherkennung von malignen Erkrankungen zu verbessern sowie Marker zu finden, die auf das Vorhandensein von Krebszellen hinweisen.

Ein Marker, dem diese Fähigkeit zugesprochen wird, ist das sogenannte Telomerase-Enzym. In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Tumorzellen und der Detektion von Telomerase-Aktivität besteht. Da in 90 % aller primären Tumoren die Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden konnte (KIM et al. 1994, SHAY & BACCHETTI 1997), besteht die Vermutung und Hoffnung, dass die Detektion von Telomerase-Aktivität das Potential hat, auf Krebszellen hinzuweisen und damit einen Fortschritt in der Früherkennung von Tumoren zu liefern (POREMBA et al. 1998). Der enge Zusammenhang zwischen der Telomerase-Aktivität und dem Vorhandensein der Tumorzellen variiert jedoch stark, wenn unterschiedliche Gewebe auf das Enzym untersucht werden. Als Gründe hierfür können z.B. Schwierigkeiten bei der Verarbeitung des jeweiligen Gewebes in Betracht kommen, es sind jedoch auch andere Einflusskomponenten denkbar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von Perikardergüssen auf Telomerase-Aktivität und vergleicht die Ergebnisse mit der zytologischen Diagnostik. Zusätzlich wird untersucht, ob durch eine Quantifizierung der Telomerase-Aktivität eine noch zuverlässigere Aussage über die Bewertung der erzielten Ergebnisse gewonnen werden kann.

Die Untersuchung der Perikardergüsse erfolgt mit dem „*Telomeric Repeat Amplification Protocol*“, nachfolgend als TRAP bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Polymerasekettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction). Es wird dabei zum einen der konventionelle radioaktive TRAP-Assay verwendet, zum anderen

die fluoreszenz-basierte Fragmentlängenanalyse mit Hilfe der GeneScan-Technik, die eine Quantifizierung der Ergebnisse zulässt. Als Vorbedingung zum experimentellen Aufbau werden auch diverse Zellarten auf Telomerase-Aktivität überprüft, darunter die Lungentumorzelllinie NCI-H69 und hämatopoetische Progenitorzellen $CD34^+$, welche über periphere Leukozytenapherese von Stammzellspendern zur Verfügung standen.

Neben der Darstellung der Untersuchungsergebnisse wird die Verwendbarkeit der Methoden diskutiert. Darüber hinaus soll die Arbeit einen Überblick über die Grundlagen und Voraussetzungen der Telomeraseforschung geben, sowie Ähnlichkeiten oder Abweichungen zu bereits vorhandenen Studien aufzeigen.

1.1 Perikardergüsse

1.1.1 Ätiologie von Perikardergüssen

Ein Perikarderguss wird hervorgerufen durch die Extravasation von Flüssigkeit aus den serösen Kapillaren unter diversen pathologischen Bedingungen (MALAMOU-MITSI et al. 1996). Die Ursachen hierfür sind unterschiedlichster Art, wie nachfolgend erläutert:

Eine häufige Ursache eines Perikardergusses ist die benigne Perikarditis, auch idiopathische benigne Perikarditis genannt, deren Ätiologie unklar ist. Es wird diskutiert, dass viele dieser idiopathischen Fälle auf virale Infektionen oder autoreaktive Vorgänge zurückgehen (MAISCH et al. I 2002). Ein Erguss des Perikards kann die Folgeerscheinung einer Vielzahl von internistischen und chirurgischen Erkrankungen sein. Dabei umfasst die Ätiologie der Perikardergüsse sowohl entzündliche als auch nichtentzündliche gutartige Zustände sowie verschiedene maligne Erkrankungen (WIENER et al. 1991).

Beim entzündlichen Perikarderguss spielen Infektionen viraler und bakterieller Genese eine große Rolle. Während bei den viral induzierten Entzündungen als Erreger insbesondere Coxsackie-Viren der Gruppe A und B zu nennen sind, wird das Spektrum der bakteriellen Infektionen durch die Tuberkulose geprägt. Eher selten kommen Pilzinfektionen als Ursache von Perikardergüssen in Betracht.

Ebenfalls können Stoffwechselerkrankungen zu Perikardergüssen führen, wobei in dieser Kategorie insbesondere die urämische Perikarditis bei chronischem Nierenversagen (GUNUKULA & SPODICK 2001) sowie die Hypothyreose (POSNER et al. 1981) wichtig sind. Ferner werden auch einige Autoimmunerkrankungen für das Bild einer Perikarditis mit Perikarderguss verantwortlich gemacht. Zu ihnen zählen z.B. das Postmyoinfarktsyndrom und Postkardiotomiesyndrom, akutes rheumatisches Fieber und der systemische Lupus erythematodes (FLESCH & ERDMANN 1998). Zu nennen sind weiterhin kardiale Ursachen wie ein Myokardinfarkt oder eine Myokarditis (SAGRISTÀ-SAULEDA et al. 2000). Nicht selten ist ein Perikarderguss iatrogen verursacht. Dies kommt bei diagnostischen oder therapeutischen Eingriffen mit kardialer Perforation vor, wie beispielsweise bei Sondenpenetration nach einer Schrittmacherimplantation (FLESCH & ERDMANN 1998).

Die häufigste Ursache für Perikardergüsse ist die neoplastische Herz- bzw. Perikardbeteiligung, die im folgenden Abschnitt näher erläutert wird.

In der Tabelle 1-1 sind die wichtigsten Ursachen von Perikardergüssen mit ihrer relativen Häufigkeit zur Übersicht angegeben:

Grunderkrankung	**Häufigkeit in %**
Neoplasien	32
Idiopathische Perikarditis	14
Urämie	9
Iatrogen durch kardiale Perforation	7,5
Bakterielle Infektionen	7,5
Tuberkulose	5
Postkardiotomiesyndrom	2
Systemischer Lupus erythomatodes	2

Tab. 1-1: Ursachen von Perikardergüssen mit ihrer relativen Häufigkeit, modifiziert nach FLESCH & ERDMANN 1998 und GUBERMAN et al. 1981

1.1.2 Neoplasien des Herzens bzw. des Perikards

Die Beteiligung des Herzens an malignen, neoplastischen Erkrankungen stellt eine wichtige und sehr häufige Ursache von Perikardergüssen dar. Die allgemein vorzufindende Meinung, dass maligne Prozesse am Herzen eher selten auftreten, wird durch die im folgenden beschriebenen Ergebnisse widerlegt:

Verschiedene Studien zeigten, dass eine metastatische Herzbeteiligung in 3,4 bis 6,5 % aller Autopsien (vgl. u.a. KRALSTEIN & FRISHMAN 1987) und in 10,9 bis 21 % der Autopsien von Patienten mit maligner Grunderkrankung gefunden wird (KRALSTEIN & FRISHMAN 1987, PRESS & LIVINGSTON 1987, HANCOCK 1990, WIENER et al. 1991, SCOTT & GARVIN 1939, BISEL et al. 1953, POSNER et al. 1981). Dabei konnte in 69,2 bis 85 % dieser Fälle eine Perikardbeteiligung nachgewiesen werden (KRALSTEIN & FRISHMAN 1987). Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass zum Zeitpunkt der Autopsie Endzustände der Krebserkrankung vorliegen mit häufig anzutreffender disseminierter Metastasierung.

Bei der zytologischen Untersuchung von Perikardergüssen wurden in 30 % aller Ergüsse maligne Zellen gefunden (KING & NIEBERG 1979, ZIPF & JOHNSTON 1972).

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass malignen Prozessen des Herzen bei der Genese von Perikardergüssen eine große Bedeutung zukommt und der Diagnose besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte, und zum anderen, dass eine maligne Beteiligung von Perikarden häufiger auftritt als allgemein angenommen wird.

1.1.2.1 Maligne Beteiligung des Perikards

Grundsätzlich lassen sich zwei Möglichkeiten einer Tumor-assoziierten und einer nicht-Tumor-assoziierten Herz-/Perikardbeteiligung im Rahmen einer malignen Erkrankung unterscheiden:

(1) **Tumor-assoziierte Beteiligung des Herzens/Perikards**

Eine direkt tumorige Infiltration kann durch primäre Tumoren des Herzens oder sekundär im Rahmen metastatischer Neoplasmen auftreten.

a) *Primäre* Tumoren des Herzens bzw. des Perikards treten äußerst selten auf. Zu ihnen gehören die hochmalignen Perikardmesotheliome und Angiosarkome sowie die histologisch benignen Teratome, die man gewöhnlich nur bei Kindern diagnostiziert (HANCOCK 1990).

b) *Sekundäre* Tumoren: Die meisten malignen Erkrankungen des Herzens oder des Perikards sind das Ergebnis metastatischer Streuung von Primärtumoren eines anderen Entstehungsortes.

Die Ausbreitung der Krebszellen kann hämatogen, lymphogen oder direkt infiltrierend durch nahegelegenes Tumorwachstum erfolgen (WARREN 2000). Der häufigste Weg der Metastasierung ist der Befall von Lymphknoten des Mediastinum mit retrograder Infiltration durch Lymphbahnen des Herzens. Die Verlegung von Lymphbahnen durch Tumorzellen führt zu einem Lymphstau, der pathogenetisch für die Ursache des Perikardergusses gehalten wird. Der entstehende Druck führt zu einer Schädigung des Epithels des Perikards. Dadurch können Flüssigkeit oder bei größerer Schädigung Zellen ins Perikard übertreten. Durch ihre Nähe zum Mediastinum sind insbesondere Lungen- und Brustkrebs prädestiniert über diesen Verbreitungsmechanismus in das Perikard zu metastasieren.

Lungenkrebsmetastasen stellen die häufigste maligne Erkrankung des Perikards dar, an zweiter Stelle rangieren Metastasen von Mammakarzinomen.

Die dritte große Gruppe von malignen Erkrankungen des Perikards wird gebildet von hämatologischen Neoplasien. Dazu gehören Leukämie, das Hodgkin- und das Non-Hodgkin-Lymphom (HANCOCK 1990). Ihr Metastasierungsweg ins Perikard ist hämatogen.

Das Melanom gehört noch zu den etwas häufiger in Perikardergüssen auftretenden Tumoren. Dagegen wird das Perikard seltener von Tumorarten befallen, die vom Gastro-Intestinal-Trakt, von oro- und nasopharyngealen, Prostata- oder Ovarialkarzinomen ausgehen (KRALSTEIN & FRISHMAN 1987).

In der folgenden Tabelle 1-2 sind diejenigen Tumoren zusammengefasst, die den größten Anteil an der Infiltration des Perikards durch Tumorzellen haben. Darin sind auch die bisher nicht explizit genannten Tumoren berücksichtigt.

Art des Tumors	**Anteil der Metastasierung ins Perikard**
Lungenkrebs	30 bis 36,5 %
Brustkrebs	22,3 bis 30 %
Hämatologische Neoplasien	15 bis 17,3 %
Sarkome	3,5 %
Melanome	2,7 %
Magenkarzinome	2,0 %
Renale Tumoren	1,9 %
Gynäkologische Tumoren	1,6 %
Kolorektale Tumoren	1,1 %

Tab. 1-2: Übersicht über die relative Häufigkeit von Primärtumoren verantwortlich für neoplastische Perikardinfiltration (PRESS & LIVINGSTON 1987, KRALSTEIN & FRISHMAN 1987, HANCOCK 1990, SHEPARD et al. 1987)

Wirft man einen Blick auf die Häufigkeiten der Metastasierungsfrequenz einzelner Primärtumoren ins Perikard, wird die Bedeutung dieses Metastasierungsweges ersichtlich: So metastasieren z.B. 10 % der Karzinome, die von der Brust oder Lunge ausgehen, ins Perikard (KRALSTEIN & FRISHMAN 1987). Bei malignen hämatologischen Erkrankungen wird das Perikard sogar in 24 % der Fälle von Metastasen befallen (ROBERTS et al. 1968).

(2) Nicht-Tumor-assozierte Beteiligung des Herzens/Perikards

Für nicht-Tumor-assoziierte Perikardergüsse kommen im Rahmen einer malignen Erkrankung generell alle diejenigen Ursachen in Betracht, die auch für Patienten ohne maligne Grunderkrankung gelten, wie z.B. die idiopathische Perikarditis, stoffwechselinduzierte Perikarditis oder die Perikarditis im Rahmen einer Hypothyreose. Des Weiteren sind aber auch Folgeerscheinungen der malignen Erkrankung für einen Perikarderguss bzw. die kardiale Beteiligung verantwortlich. Eine Strahlentherapie kann Perikardergüsse ebenso provozieren wie die Behandlung mit toxischen Chemotherapeutika, die systemisch oder lokal infundiert werden (KRALSTEIN & FRISHMAN 1987).

Zu beachten ist allerdings auch, dass in der Hälfte bis zwei Drittel der Patienten mit maligner neoplastischer Grunderkrankung der Perikarderguss nicht unmittelbar durch die Tumorerkrankung entstanden ist (KRALSTEIN & FRISHMAN 1987 und WIENER et al. 1991).

1.1.2.2 Der diagnostische Wert der zytologischen Untersuchung von Perikardergüssen

Der diagnostische Wert einer zytologischen Untersuchung von Perikardergüssen wird noch immer kontrovers diskutiert (MAISCH et al. 2000, GARCIA et al. 1994). In einigen Studien wird eine erfolgreiche Diagnose durch die Zytologie nur relativ selten festgestellt, nämlich in lediglich 24 bis 26 % der Fälle (KRIKORIAN & HANCOCK 1978, COREY et al. 1993). Andere Studien (wie z.B. MEYERS et al. 1997) ermitteln hingegen eine Erfolgsquote von 87 % richtiger Diagnosestellung durch die zytologische Untersuchung.

Bei der alleinigen Beurteilung von Zellen in Perikardergüssen hinsichtlich ihrer Malignität gilt die zytologische Diagnostik als Goldstandard. Dennoch kommt es vor, dass ein maligner Befall nicht durch die Zytologie erkannt wird. Bei einem Vergleich mit operativ gewonnenen Biopsiematerial oder Ergebnissen von Autopsien liegt die Sensitivität der Zytologie in den meisten Studien zwischen 67 und 85 % (SZTURMOWICZ

et al. 1997, KING & NIEBERG 1979, POSNER et al. 1981, ZIPF & JOHNSTON 1972, HANCOCK 1990, PRESS & LIVINGSTON 1987), lediglich in einer Studie wird ein Wert von 90 % angegeben (MEYERS & BOUSKA 1989). Definiert wird die Sensitivität als Proportion von erkrankten Patienten, die durch einen diagnostischen Test (wie z.B. die zytologische Untersuchung) positiv determiniert, also richtig erkannt werden. Die Ergebnisse bedeuten daher, dass bei der zytologischen Untersuchung regelmäßig tatsächlich vorhandene Tumorzellen übersehen werden, besonders häufig sei dies bei Mesotheliomen und Lymphomen der Fall (SZTURMOWICZ et al. 1997, PRESS & LIVINGSTON 1987, POSNER et al. 1981). Ähnlich der Sensitivität gilt die Spezifität als Beurteilungsmaß für diagnostische Methoden. Sie ist definiert als die Proportion wahrer negativer Resultate bei gesichertem Fehlen der Krankheit, sie dient also als Wahrscheinlichkeitsmaß für die richtige Erfassung von Gesunden (HARMS 1998). Die Werte für die Spezifität der zytologischen Untersuchung werden in den meisten der o.g. Studien mit annähernd 100 % beziffert.

1.1.2.3 Erweiterte Diagnostik

Um eine zuverlässigere Aussage über die Genese der Perikardergüsse treffen zu können, wird die zytologische Untersuchung um eine Reihe von serologischen und immunozytologischen Untersuchungen ergänzt. So werden z.B. FACS-T-Zell-Analysen durchgeführt oder Zytokine bestimmt. Ebenfalls werden Entzündungsmarker gemessen, Tumormarker gesucht oder Faktoren der Angiogenese bestimmt, mit deren Hilfe zusätzliche Erkenntnisse über die Genese und klinisch assoziierte Krankheitsbilder gewonnen werden sollen.

Das größte Problem der zytologischen Begutachtung liegt in der Differenzierung zwischen Entzündungszellen und malignen Tumoren. Dies gilt insbesondere, wenn der Erguss zytologisch zellreich ist und z.B. reaktive mesotheliale Zellen und Adenokarzinomzellen beteiligt sind (MAISCH et al. 2000). Die vorliegende Arbeit soll insbesondere zur Beantwortung dieser Fragestellung einen Beitrag leisten.

1.1.3 Therapie von Perikardergüssen

Die Art der Behandlung von Perikardergüssen richtet sich nach der Ursache ihrer Genese. Therapievarianten von benignen Perikardergüssen umfassen z.B. die Perikardiozentese, die Perikardiotomie und die Perikardfensterung. Akute Perikarditiden können antiphlogistisch therapiert werden (FLESCH & ERDMANN 1998). So zeigt z.B. die ein großes Patientenkollektiv umfassende Studie von MAISCH et al. I (2002) die erfolgreiche Therapie von autoreaktiven Perikarditiden durch intraperikardiale Instillation von Triamcinilon.

Für die Therapie von malignen Perikardergüssen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wie z.B. die Obliteration des Perikardspaltes durch chemotherapeutische Agenzien, die Bestrahlung der perikardialen Strukturen oder die chirurgische Intervention (MAISCH et al. 2000, MARTINONI et al. 2000, VAITKUS et al. 1994, KAWASHIMA et al. 1999). Als chemotherapeutisches Agenz für die intraperikardiale Instillation wird z.B. Cisplatin verwendet, das erfolgreich Rezidive von Perikardergüssen oder anderen Symptomen im Rahmen einer malignen kardialen Beteiligung verhindern kann (MAISCH et al. II 2002).

Entscheidend ist jedoch, dass sich die Art der Therapie individuell nach der Grundkrankheit des Patienten richtet. Hierbei stellt die Zytologie ein wichtiges Entscheidungskriterium dar.

1.2 Telomere und Telomerase

1.2.1 Vorbemerkungen

In menschlichen Zellen ist das genetische Material auf 46 Chromosomen verteilt. Wie in anderen eukaryotischen Zellen sind die menschlichen Chromosomen linear, im Gegensatz zu Prokaryonten, deren Chromosomen in Ringform strukturiert sind. Lineare Chromosomen bieten einen großen Selektionsvorteil in der Evolution, weil durch einen

vereinfachten genetischen Austausch eine erhöhte Möglichkeit der Rekombination besteht.

Was für die Evolution einen großen Vorteil bedeutet, bringt für die Stabilität der Chromosomen den Nachteil mit sich, dass die freien Enden der DNA eine gute Angriffsfläche für Nucleasen bieten. Des Weiteren besteht die Gefahr der Fusion mit anderen freien Chromosomenenden (MEYERSON 2000).

Ein ganz entscheidender Nachteil des linearen Aufbaus ist der Verlust von mehreren hundert Basenpaaren am Ende eines Chromosoms bei jeder Zellteilung. Dieses als End-Replikationsproblem bekannte Phänomen kommt durch den inkompletten Verschluss der durch Ablösung der RNA-Primer entstehenden Lücken zustande, so dass mit jeder Zellteilung die Chromosomenenden um mehrere Nucleotide verkürzt werden (WATSON 1972). HARLEY et al. konnten 1990 beweisen, dass bei jeder Zellteilung tatsächlich 25 - 200 Basenpaare (bp) verloren gehen (HARLEY 1990, vgl. auch HASTIE et al. 1990). Dieser Verbrauch der chromosomalen Endgene verursacht den Zustand der „replikativen Seneszenz“: Zellen besitzen eine limitierte proliferative Lebensspanne, die von der steigenden Anzahl von Populationsverdoppelungen abhängig ist. Am Ende dieses Prozesses sterben die Zellen zwar nicht, ihre Fähigkeit zur Zellteilung ist jedoch aufgehoben (HAYFLICK & MOOREHEAD 1961, OLOVNIKOV 1973). Seit den frühen 90er Jahren wird dieser Verlust und die dadurch resultierende eingeschränkte Proliferationsfähigkeit als „*mitotic clock*“ bezeichnet (ALLSOPP et al. 1992).

Die besondere Bedeutung der Chromosomenenden erkannte man schon in frühen zytologischen und genetischen Studien (MÜLLER 1938, MCCLINTOCK 1941), die gezeigt haben, dass Chromosomen, deren DNA-Enden abgebrochen sind, instabil werden. Die abgebrochenen Chromosomenenden fusionieren und es entstehen aberrante Chromosomenformen wie dizentrische oder Ringchromosomen (ZAKIAN 1989, BLACKBURN et al. 1989).

Neben dem Schutz vor aberranter Rekombination bewahren intakte Chromosomenenden die DNA vor exonukleolytischer Degradation. Auch wird die korrekte Trennung

der Schwesterchromatiden in der Mitose und Meiose von den chromosomalen Endabschnitten kontrolliert (LAVELLE et al. 2000, DHAENE et al. 2000).

Hieraus stellt sich die Frage, warum die eigentlich anfällige lineare Struktur trotz der genannten Phänomene stabil bleibt und relativ gut geschützt ist. Die Antwort ergibt sich aus der besonderen Organisation der terminalen Chromosomenabschnitte. Eine spezialisierte Struktur am Ende der Chromosomen – ein DNA-Protein-Komplex – sorgt für die Aufrechterhaltung der Stabilität der DNA.

Die Enden der Chromosomen werden Telomere genannt (*telos* = Ende, *mere* = Teil). Sie zeichnen sich aus durch einen besonderen Aufbau, der im folgenden Kapitel näher beschrieben werden soll. Telomere bilden mit dem Enzym Telomerase eine funktionelle Einheit. Beide haben zusammen eine besondere Bedeutung, die u.a. dem oben erwähnten Verlust von Basenpaaren während einer Zellteilung entgegenwirken.

1.2.2 Telomere

1.2.2.1 Funktion der Telomere

Mit dem Begriff Telomere werden die spezialisierten Strukturen an den Chromosomenenden bezeichnet, die für die Aufrechterhaltung der Stabilität verantwortlich sind. Dabei bilden die Telomere nicht nur mit dem Enzym Telomerase sondern auch zusammen mit einer Vielzahl von anderen Proteinen eine funktionelle Einheit.

Telomere besitzen dabei insbesondere eine Hemm-, eine Kontroll- und eine Schutzfunktion:

a) *Hemmfunktion*: Sie verhindern aberrante Chromosomen-Fusion und damit aberrante Rekombination.

b) *Kontrollfunktion*: Sie kontrollieren die korrekte mitotische und meiotische Trennung der Schwesterchromatiden (NIMMO et al. 1998, COOPER et al. 1998).

c) *Schutzfunktion*: Sie schützen die DNA vor exonukleolytischer Degradation (MÜLLER 1938, MCCLINTOCK 1941).

Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der Telomerase zu. Sie erlaubt die Replikation der Enden der linearen DNA ohne den Verlust der terminalen Basen am 5´-Ende eines jeden einzelnen DNA-Stranges. Die Telomerase wird in Abschnitt 1.2.3 ausführlich beschrieben.

1.2.2.2 Struktur der Telomere

In den meisten Organismen bestehen die Telomere aus einer Guanin-reichen Basensequenz. Erstmalig konnte sie bei dem Wimperntierchen Tetrahymena identifiziert werden (BLACKBURN & GALL 1978). Für Menschen und andere Vertebraten lautet die telomerische Sequenz 5´-TTAGGG-3´ (ZAKIAN 1989, MAKAROV et al. 1997). Diese Sequenz wiederholt sich fortlaufend, ungefähr 1000 - 2000 Mal. Ursprünglich hielt man die Telomere für funktionslos, da sie mit ihrer Sequenz keinerlei Genprodukte kodieren (PARDUE 1994). Die Länge der menschlichen Telomere wird durch die Größe der terminalen Restriktionsfragmente bestimmt. Sie variiert zwischen 7 und 13 kilo-Basenpaaren (kb) in normalen Zellen (MOYZIS et al. 1988, CROSS et al. 1989, ALLSHIRE et al. 1989). Die telomerische DNA ist prinzipiell doppelsträngig, allein das äußerste Endstück wird aus einem ca. 200 Nukleotiden langem Einzelstrang gebildet (WRIGHT et al. 1997, LAVELLE et al. 2000, HARLEY et al. 1990, HASTIE et al. 1990).

Zu den Telomeren gehören auch verschiedene Proteine, die zusammen mit dem Telomer bzw. der Telomerase eine funktionelle Einheit bilden. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang z.B. die Proteine TLP1, TRF1, TRF2, Tankyrase und Ku80/Ku70 (LABRANCHE et al. 1998, CHONG et al. 1995, SMITH & DE LANGE 1997. BIANCHI et al. 1997, BROCCOLI et al. 1997, BILAUD et al. 1997, SMITH et al. 1998).

Die Telomerase als Tumor-assoziiertes Enzym wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

1.2.3 Telomerase

Telomerase ist ein Ribonucleoprotein mit vielen Untereinheiten. Ihr Hauptteil wird von zwei Komponenten gebildet: zum einen von der RNA-Komponente und zum anderen von der reversen Transkriptase-Einheit. Dazu kommen noch eine Reihe von anderen Regulations-Proteinen, die nicht näher erläutert werden. In menschlichen Zellen wurde die Telomerase zuerst in HeLa-Zellextrakten gefunden; dies war gleichzeitig der erste Hinweis auf Telomerase-Aktivität in Eukaryoten (MORIN 1989).

1.2.3.1 Die RNA-Komponente - hTR

Ähnlich wie bei der Struktur der Telomere wurde die RNA-Komponente der Telomerase zuerst in Tetrahymena identifiziert (GREIDER & BLACKBURN 1989). Die RNA menschlicher Telomerase (hTR = "human telomerase RNA") besteht aus 445 Nucleotiden, von denen eine kleine Sequenz in den Proteinkomplex so eingebunden ist, dass sie als Template für die Polymerisierung durch die telomerische reverse Transkriptase dient. Anhand dieser Vorlage wird die telomerische DNA synthetisiert. Sie enthält die Sequenz 5´-CUAACCCUAAC-3´ (FENG et al. 1995). Diese verhält sich komplementär zu den telomerischen Repeats. Die RNA-Untereinheit bindet sich an die äußersten telomerischen DNA-Sequenzen. An dessen 3´-Ende werden dann Desoxynukleotide synthetisiert und das RNA-Templat rückt nun weiter an das neue äußerste Ende (MEYERSON 2000). Der beschriebene Vorgang wird als Elongation bezeichnet. Eine Darstellung des Prozesses befindet sich in Abbildung 1-1.

Die RNA-Einheit der Telomerase hat jedoch nicht nur die Funktion, das Templat bereitzustellen, sondern hat auch Einfluss auf die Regulation der Enzymaktivität durch Interaktion mit anderen Proteinuntereinheiten der Telomerase (ROY et al. 1998).

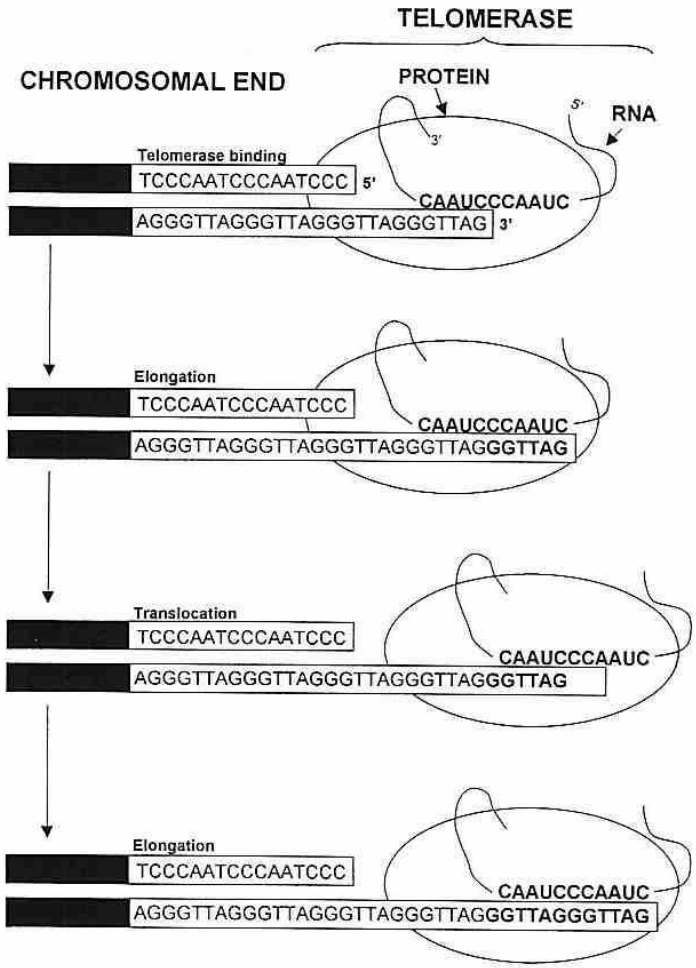

Abb. 1-1: Vorgang der Elongation durch Telomerase (ROY 1998)

1.2.3.2 Die reverse Transkritpase-Einheit - hTERT

Die reverse Transkriptase-Einheit, im Folgenden hTERT (= "human telomerase reverse transcriptase") genannt, katalysiert die Synthese von neuen telomerischen DNA-Sequenzen an das Ende der Chromosomen (NAKAMURA et al. 1997, HARRINGTON et al. 1997, KILIAN et al. 1997, NAKAYMA et al. 1998). Dabei ist das Enzym eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Für die Synthese der telomerischen Sequenzen wird eine RNA-Sequenz benötigt, die von hTR bereitgestellt wird. hTERT kann hTR ohne zusätzliche Proteine binden und revers transkribieren (WEINRICH et al. 1997, BEATTIE et al. 1998, GREENBERG et al. 1998).

Beide Untereinheiten hTR und hTERT sind für die Telomerase-Aktivität unverzichtbar und reichen alleine aus, telomerische Repeats revers zu transkribieren (BLACKBURN 1991, WEINREICH 1997, BEATTIE 1998, GREENBERG 1998).

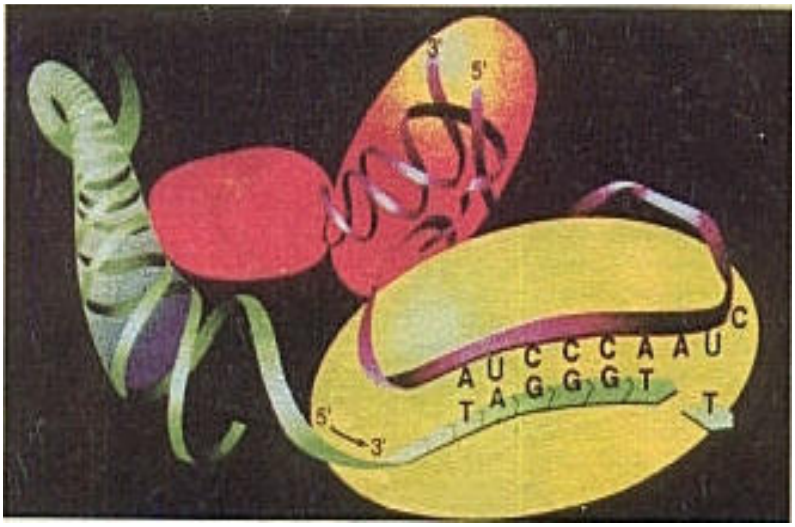

Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Telomerase mit ihren wichtigsten Untereinheiten (Geron Corp.)

1.2.3.3 Bedeutung der Telomerase

Der telomerstabilisierende Effekt der Telomerase resultiert aus dem Ausgleich des DNA-Verlusts bei der Replikation der Zellen durch Verlängerung der Telomeren. Der in Abschnitt 1.2.1 beschriebene Status der Seneszenz, in dem eine Zelle nicht mehr teilungsfähig ist, wird dadurch nicht bzw. erst später erreicht. Telomerase-Aktivität führt also zu einer Verlängerung der Proliferationsfähigkeit und stellt einen entscheidenden Faktor bei der Immortalisierung von Zellen dar, wie sie bei Tumorzellen eintritt (KIYONO et al. 1998, BODNAR et al. 1998). Allerdings bedeutet die Aktivierung der Telomerase nicht gleichzeitig die maligne Transformation von Zellen (MORALES et al. 1998). Dazu gehören neben der Immortalisierung auch die Aufhebung von Zell-Zell-Kontaktinhibitionen als Grundlage für ungehemmte Proliferation und verdrängendes Wachstum. Genetische Veränderungen wie die Aktivierung von Onkogenen oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen spielen dabei eine Rolle. Telomerase-Aktivität ist

zwar keine zwingende Voraussetzung für malignes Zellwachstum, sie scheint jedoch einen gewissen Einfluss zu haben; so kann z.B. die Inhibition von Telomerase-Aktivität sogar das Wachstum von Tumorzellen hemmen (HAHN et al. I & II 1999, HERBERT et al. 1999, ROWLEY & TABLER 2000). Dass Telomerase-Aktivität nicht stets mit einer malignen Transformation einhergeht, zeigt auch ihr Vorkommen in wenigen benignen Geweben wie Stammzellen oder embryonalen Zellen (WRIGHT et al. 1996). Diese zeichnen sich durch eine hohe Proliferationskapazität und Differenzierungsfähigkeit aus. Telomerase-Aktivität ist befähigt, die Proliferation und Teilungsfähigkeit dieser Zellen aufrecht zu erhalten.

1.2.3.4 Telomerase-Aktivitätsmessung

Eine Methode, mit der die Aktivität der Telomerase gemessen werden kann, ist der sogenannte TRAP-Assay. Sein Name leitet sich ab von "**T**elomerase-**R**epeat **A**mplification **P**rotocol". Dieses Protokoll wurde von KIM et al. (1994) entwickelt und entspricht einer Weiterentwicklung des ursprünglichen Primerextensionsassays von GREIDER & BLACKBURN (1985). Es handelt sich um eine modifizierte PCR, bei der telomerähnliche Oligonucleotide von hTERT um ein Vielfaches der telomerischen Repeat-Sequenzen elongiert und deren Produkte dann wie bei einer herkömmlichen PCR amplifiziert werden (GREIDER & BLACKBURN 1985 & 1989). Die Produkte der PCR können auf unterschiedliche Art und Weise dargestellt werden. Dabei unterscheidet man bislang zwei methodisch unterschiedliche Bestimmungsarten des TRAP-Assays: (a) die klassische Bestimmung über inkorporierte Radionucleotide mit nachfolgender Autoradiographie (TRAP) sowie (b) die über Anlagerung fluoreszenz-markierter Primeroligonucleotide mögliche direkte Detektion der markierten Gelfragmente über Laserdetektion (GeneScan oder F-TRAP bezeichnet). Der letztgenannte fluoreszenzbasierte Assay lässt eine quantitative Aussage über die Telomerase-Aktivität zu (OHYASHIKI et al. 1996).

Beide Assays kommen in dieser Arbeit zur Anwendung und werden im Kapitel Methoden näher beschrieben.

1.3 Bisherige Studien

Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien über Telomerase-Aktivität als proliferativer Marker in Geweben. Generell konnte in den Studien gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen der detektierten Telomerase-Aktivität und den gefundenen malignen Zellen besteht. Allerdings zeigen die bisherigen Studien auch, dass falsch-positive Ergebnisse häufig auftreten und ebenso falsch-negative Ergebnisse vorkommen.

Einen umfassenden Überblick über bisherige Studien findet man bei DHAENE et al. (2000). Je nach Gewebe und Tumorart zeigen sich große Unterschiede in der Zuverlässigkeit des Telomerase-Enzyms, eine Aussage über maligne Zellen treffen zu können. So wurden z.B. in endometrischen Karzinomen in 89 % der Fälle Telomerase-Aktivität nachgewiesen, in Hodgkin-Lymphomen jedoch nur bis zu 34 %. Besondere Schwierigkeiten können sich bei der Untersuchung von Körperflüssigkeiten ergeben. CHENG et al. (2000) ermittelten z.B. bei Patienten mit Blasenkrebs in 88 % der Fälle Telomerase-Aktivität im Urin, wogegen der Telomerase-Nachweis in den exsudatreichen Pleuraergüssen schwierig ist.

Die Ursachen für diese Varianz sind vielfältig. Es zeigt sich, dass sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des TRAP-Assays zwischen den unterschiedlichen Geweben stark variieren, so dass die Telomerase-Aktivitätsmessung nicht ubiquitär angewendet werden kann. Zu den Faktoren, die das Ergebnis der Messung und damit ihre Anwendbarkeit beeinflussen, gehören z.B. das Vorhandensein von Entzündungszellen, die eine basale Telomerase-Aktivität besitzen können oder das Vorkommen von Inhibitoren der PCR wie RNAsen, Proteasen oder Hämoglobin in hämorrhagischen Ergüssen, die ebenfalls das Ergebnis negativ beeinflussen können.

Aufgrund der Ergebnisse aus den bisherigen Studien soll deshalb untersucht werden, ob Perikardergüsse ein geeignetes Gewebe sind, bei dem die Telomerase-Messung Aufschluss über das Vorhandensein von Krebszellen geben kann.

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit werden verschiedene Ziele verfolgt, wobei der Schwerpunkt der Untersuchung bei der Beantwortung der folgenden Fragen liegt:

1. Korreliert Telomerase-Aktivität mit zytologisch nachgewiesenen Krebszellen in Perikardergüssen?

2. Kann Telomerase-Aktivität mit einem fluoreszenz-basierten „online"-Detektionsverfahren quantifiziert werden?

Die Korrelation zwischen der Telomerase-Aktivität und dem Vorhandensein von Krebszellen in Perikardergüssen sollte zeigen, ob Telomerase ein geeigneter Marker ist, um die Diagnose der Zytologie zu unterstützen.

Zwar konnten andere Studien bereits zeigen, dass Telomerase-Aktivität grundsätzlich für diesen Zweck geeignet ist. Aufgrund der Varianz der Ergebnisse in den Telomerase-Studien ist dies jedoch nicht ohne weiteres auf das Kompartiment Perikarderguss zu übertragen. Um die Eignung der Telomerase-Messung zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit 31 Perikardergüsse von nicht ausgewählten Patienten gesammelt und auf Telomerase-Aktivität untersucht.

Aufgrund der fehlenden Spezifität von Telomerase – das Enzym kommt nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in einigen somatischen Geweben oder Stammzellen vor – wurde versucht, Telomerase-Aktivität durch einen fluoreszenz-basierten Assay zu quantifizieren. Es wurde dabei zusätzlich überprüft, ob die Höhe der Enzymaktivität ein weiteres Entscheidungskriterium bei der Diskriminierung zwischen benignen und malignen Perikardergüssen liefern kann. In diesem Rahmen wurden Zelllinien in die Untersuchung einbezogen, die zum einen als Standard für unterschiedlich hohe Telomerase-Aktivität dienten und zum anderen die Situation eines Perikardergusses simulieren sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle hier aufgeführten Chemikalien wurden in p.a. Qualität bezogen.

Acrylamid 30 %	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, USA
AmpliWAX™ PCR Gem 100	Perkin, Elmer, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, USA
Bromphenolblau	Sigma, USA
Count Off® (Radioactive Decontaminant Aerosol Spray Surface Cleaner)	DuPont, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, USA
EDTA (Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure)	Sigma, USA
EGTA (Ethylenglycol-Bis-Tetra-Essigäure)	Sigma, USA
Ethanol, absolut	J.T. Baker, Holland
Ethanol, 70 % vergällt	Apotheke des Klinikums der Philipps-Universität, Marburg
Fetales Kälber Serum (FKS)	GibcoBRL, UK
Ficoll	Sigma, USA
Formamid	Bethesda Research Laboratories, USA
H_2O LiChrosolv®	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
$MgCl_2 \bullet 6\ H_2O$	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
$NaH_2PO_4 \bullet H_2O$	Merck, Darmstadt
$NaHPO_4 \bullet 2\ H_2O$	Merck, Darmstadt
$Na_2HPO_4 \bullet 12\ H_2O$	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxidplätzchen	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, USA
TEMED (N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, USA
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)	Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat)	Pharmacia Biotech, Schweden
Xylencyanol	Sigma, USA

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien stammen ausschließlich von folgenden Firmen:

- Gibco BRL (UK)
- Merck (Darmstadt)
- Riedel-de-Haen (Seelze)
- Roth (Karlsruhe) und
- Sigma (USA).

2.1.2 Enzyme, Fertigpuffer und Nucleinsäuren

Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Blue Dextran Loading Buffer	Perkin Elmer, USA

Desoxynucleotide	Pharmacia Biotech, Schweden
DNA-Polymerisationsmix (20 mM)	
DNA-Längenstandards	
PBR 322 DNA / *Bsu*RI Marker, 5	MBI-Fermentas
GS 350 ROX^{TM} Size Standard	Perkin Elmer, USA
Long Ranger Stock Solution 50 %	Mandel Scientific Company, USA
Nucleotide	
[γ^{33}P] ATP (3000 Ci/mmol)	ICN Pharmaceuticals, USA
Oligonucleotide (Primer)	
TS-Primer	TIB Molbiol, Berlin
ACX-Primer	TIB Molbiol, Berlin
FAM-TS-Primer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Phosphat-Puffer-Konzentrat	Behring, Marburg
pNPP (p-Nitrophenylphosphat)	Vector Laboratories, USA
RNAse A (10 mg/ml)	Sigma, USA
RNAse Inhibitor (40 U/µl)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Medien für Zellkultur	
RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	GibcoBRL, UK
IMDM (mit L-Glutamin)	GibcoBRL, UK
α-MEM	GibcoBRL, UK
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
T4-Polynucleotidkinase	Gibco BRL
T4-Polynucleotidkinase Puffer	Gibco BRL
5 x Exchange Puffer	
5 x Forward Puffer	
Zytokine	
IL-3 (rekombinant human)	R & D Systems, Wiesbaden
SCF (rekombinant human)	R & D Systems, Wiesbaden

2.1.3 Kits und Sonstiges

BioRad DC Protein Assay	BioRad, USA

Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, USA
2 ml CD34 MicroBeads	
2 ml FcR Blocking Reagent	
QiaQuick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden

Die Zusammensetzung der Kits und der darin enthaltenen Lösungen ist allein dem Hersteller bekannt.

2.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen und Puffer werden, wenn nicht anders angegeben, mit entmineralisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert. Der pH-Wert wird mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

12 % Acrylamidlösung x ½ TBE	200 ml 30 % Acrylamidlösung
(für nicht-denaturierendes PAA-Gel)	170 ml H_2O
	30 ml 5 x TBE
8 % Acrylamidlösung	21 g Harnstoff auf
(für denaturierendes PAA-Gel)	16 ml H_2O
	8 ml Long Ranger 50 % Stock Solution
	5 ml 10 x TBE
10 % APS	1 g APS auf
	10 ml H_2O
Einfriermedium A	FKS
	7,5 % DMSO
Formamid Loading Solution	100 µl Blue Dexran Loading Solution
	500 µl Formamid
1 x Gelladepuffer I für PAA-Gel	95 % Formamid
	20mM EDTA, pH 7,6
	0,05 % Bromphenolblau
	0,05 % Xylencyanol
5 x hypertone Lösung, pH 7,4	80 g NaCl

	2 g KCl
	28,975 g Na_2HPO_4 • 12 H_2O
	2 g KH_2PO_4
	ad 1 l H_2O
Lysis Puffer 1 ml	991,7 µl CHAPS
	5 µl RNAse Inhibitor (200 U)
	3,3 µl PMSF (Endkonzentration 1 mM)
Natriumbicarbonat-Lösung, pH 10,0	100 mM Natriumbicarbonat
	Entspricht 0,84 g / 100 ml H_2O
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	1 Vol. Phosphat-Puffer-Konzentrat
	19 Vol. H_2O dest.
Puffer für CD34-Isolierung	PBS, pH 7,2
	0,5 % bovines Serum-Albumin
	2 mM EDTA
RCLB, pH 7,6 (Red Cell Lysis Buffer)	10 mM Tris • HCl
	10 mM NaCl
	5 mM $MgCl_2$, pH 7,6
1 x STE	100 mM NaCl
	20 mM Tris • HCl, pH 7,5
	10 mM EDTA
5 x TBE-Puffer	0,5 M Tris • HCl
	10 mM EDTA, pH 8,0
	0,5 M Borsäure
10 x TBE-Puffer	108 g Tris
	55 g Borsäure
	7,4 g Na_2EDTA
	ad 1 l H_2O
10 x TRAP-Puffer	200 mM Tris • HCl, pH 8,3
	15 mM $MgCl_2$ • 6 H_2O
	630 mM KCl
	0,5 % Tween 20
	10 mM EGTA

2.1.5 Geräte und Zubehör

Utensilien und Werkzeuge der Laborgrundausstattung (Bechergläser, Pinzetten, Spatel usw.) wurden über die Firma Kobe in Marburg bezogen.

Auffanggefäße für Patientenproben	
Plastik-Röhrchen, 10 ml	Greiner
Plastik-Becher mit Schraubverschluss	Greiner
Autoklav	Gössner, Hamburg
Aqua dest. Anlage	
Research Grade UF/Polishing System	ModuLab Bioscience, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
ELISA Reader Multiscan RC	Labsystems, USA
ELISA Auswertungssoftware	
Genesis Lite®, Vers. 3.0	Life Sciences, UK
Geltrockenanlage	
Model 583 Gel Dryer	BioRad, USA
Hydro Tech Vacuum Pump	BioRad, USA
GeneScanner 377 mit Software:	Applied Biosystems, USA
GeneScan 377	Applied Biosystems, USA
Hybridisierungsofen	Memmert
Kimwipes Lite 200	Kimberly Clark
Kühlschränke/Freezer	
4 ° Celsius	Liebherr
-20 ° Celsius	Liebherr
-80 ° Celcius Sepatech	Hereaus, Hanau
Küvetten für Photometer aus Plastik	
MACS Säulen Typ LS^+/VS^+	Milteny Biotec, USA
Magnetischer Zell Separator *MiniMACS*	Miltenyi Biotec, USA
Membranfilter RC58, 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Neubauer-Zählkammer *improved*	
Nylon-Filter (Pre Separation Filter)	Miltenyi Biotec
pH-Meter pH 537 Microprocessor	MAGV Laborbedarf, Rabenau

Photometer	Pharmacia Biotech, Schweden
Pipetten	
Eppendorf-Reference (0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-250 µl, 200-1000 µl)	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
serologische Pipetten	Greiner
Multipette	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Mehrfach-Pipette	Gilson
Pipettierhilfe Glasfirn pipump	Firma Kobe, Marburg
Pipettenspitzen	
0,5-10 µl 20 E	Art Mol Bio Products, USA
10-200 µl Filterspitzen	Brand Micro-Bio-Tech, USA
200-1000 µl Filtertips	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Plastikfolie Saran	Dow Chemicals
Reaktionsgefäße	
Falcon Tubes, 50 ml	Falcon, USA
Falcon Tubes 15 ml	Falcon, USA
Kryo Tubes (1 ml)	Greiner
MicroAmp® Reaction	Perkin Elmer, USA
MicroAmp® Reaction	Perkin Elmer, USA
MicroAmp® Reaction	Perkin Elmer, USA
Micro Test Tubes (2,0 ml)	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Micro Test Tubes (1,5 ml)	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Micro Test Tubes (0,5 ml)	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Reinigungssäulen (Sephadex-650)	
Röntgenfilme Biomax MR	Kodak, USA
Röntgenfilmentwickler	Agfa
Röntgenkassetten Cronex	DuPont, USA
Skalpell, steril No. 11	Feather, Japan
Spritzen, steril	
10 ml Luer-Lock	B.Braun, Melsungen
20 ml Luer-Lock	B.Braun, Melsungen

50 ml Luer-Lock	B.Braun, Melsungen
Sterilfilter	
Millex®-GS 0,22 µm	Millipore, Frankreich
Minisart® 0,2 µm	Sartorius, Goettingen
Thermocycler	
Gene E	Techne
PCR Cycler 2700	Perkin Elmer, USA
PCR Cycler 9700	Perkin Elmer, USA
Waagen	
PE 3600 Delta Range	Mettler
AE 50	Mettler
Whatman Papier	Whatman Lab Sales, USA
Zentrifugen	
Biofuge 15R	Hereaus, Hanau
Minifuge GL	Hereaus, Hanau
Table Top Centrifuge 5415C	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg

2.1.6 Oligonucleotide

In dieser Arbeit wurden Oligonucleotide mit folgender Sequenz verwendet:

TS-Primer: 5′- ATT CCG TCG AGC AGA GTT – 3′

ACX-Primer: 5′- GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC – 3′

2.1.7 Zelllinien

Als Kontrollzelllinien für Telomerase-Aktivität wurden zwei Zelllinien in Kultur gehalten:

a) die humane Lungentumorzelllinie NCI-H69 (SCLC) und

b) hämatopoetische Progenitorzellen (CD34-Antigen positiv).

Während die NCI-H69-Zellen über eine hohe basale Telomerase-Aktivität verfügen, weisen die hämatopoetischen Stammzellen dagegen nur einen niedrigen Spiegel der Aktivität auf. Die $CD34^+$-Progenitorzellen wurden ausgewählt, um Aufschluss über eine mögliche Hintergrundaktivität in den Ergüssen zu erhalten.

Zusätzlich wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut auf Telomerase-Aktivität untersucht. Sie sollten die Enzym-Aktivität – wenn überhaupt – nur auf sehr niedrigem Level zeigen.

2.1.7.1 NCI-H69-Zellen

Die humane kleinzellige Lungentumorzelllinie NCI-H69 wurde von Dr. Alison Kraus (Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe Prof. Schuermann) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FKS in Kultur gehalten und die jeweiligen Proben bei einer Zelldichte von ca. 2/3 der Kulturflaschen genommen.

2.1.7.2 $CD34^+$-Progenitorzellen und mononukleäre Zellen

Für die Isolierung der Zellen sind die folgenden Teilschritte erforderlich, die alle unter sterilen Bedingungen stattfinden:

1. Isolierung der mononukleären Zellen
2. Isolierung der $CD34^+$-Progenitorzellen
   a) magnetische Markierung
   b) magnetische Auftrennung.

2.1.7.2.1 Isolierung der mononukleären Zellen

Hämatopoetische Progenitorzellen stammten vom Knochenmark eines gesunden Spenders, der sich einer Stammzellapharese zur allogenen Transplantation unterzog, und wurden freundlicherweise von Dr. Andreas Burchert (Mitarbeiter der Arbeitsgruppe

Prof. Neubauer) zur Verfügung gestellt. Nachdem der Beutel mit dem Stammzellapharesat für den Empfänger verwendet worden war, wurden die nicht mehr für den Empfänger nutzbaren Reste wie folgt für die Untersuchung aufbereitet:

Die Beutel wurden mit probandeneigenem Plasma ausgespült und die hieraus entstehende Suspension aufgefangen. Sie enthielt eine kleine Menge von Stammzellen, die in weiteren Schritten verarbeitet wurden. Zunächst wurde die Suspension zweimal in PBS (und 2mM EDTA) gewaschen und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 17°C). Anschließend wurden die mononukleären Zellen über einen Ficoll-Gradienten von den anderen Zellen getrennt. Vorbereitet wurden dafür Falcon Tubes (50 ml), die mit 17 ml Ficoll gefüllt wurden. Vom Trennungszeitpunkt an fanden alle Schritte auf Eis statt.

Von den mit Plasma verdünnten Resten des Apharesats wurden 20 ml mit einer sterilen Pipette vorsichtig auf die Oberfläche des Ficolls gegeben, so dass die Plasma-Zell-Suspension eine Phase über dem Ficoll bildete. Im Anschluss hieran wurde ein Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm, 30 min, 17 °C durchgeführt. Nach Ablauf der 30 Minuten erfolgte ein passives Auslaufen der Zentrifuge ohne aktive Bremse, da sonst Verwirbelungen entstehen können mit der unerwünschten Folge einer wiedereinsetzenden Zellvermischung.

Durch die Zentrifugation setzen sich am Boden des Gefäßes die Erythrozyten ab und die mononukleären Zellen befinden sich in einer weißlichen, schillernden Interphase, die sich auf dem oberen Rand des Ficolls bildet. Diese Zellschicht wurde behutsam mit einer serologischen Pipette abdekantiert und in ein neues Falcon-Tube überführt. Nach Abnahme eines Aliquots zur Zellzählung wurde die Zellsuspension mit wenigen ml Puffer (PBS pH 7,2 versetzt mit 0,5 % BSA und 2mM EDTA) homogenisiert und durch Zentrifugation pelletiert (1500 rpm, 5 min, 17 °C).

2.1.7.2.2 Isolierung der $CD34^+$-Zellen

Nach der Trennung der mononukleären Zellen vom Leukapharese-Material folgte die eigentliche Isolierung der $CD34^+$-Zellen. Es wurde das „Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit“ von Miltenyi Biotec benutzt, wobei die Durchführung weitestgehend nach

Herstellerprotokoll erfolgte. Das Prinzip der $CD34^+$-Separation besteht aus der Bindung von Anti-CD34-Antikörpern, die über kovalente Bindung an Eisenpartikeln (Micro-Beads) einen magnetischen Anker erhalten. Durch Inkubation der Zellen mit den Antikörpern und anschließender Separation über einem magnetischen Feld konnten die CD34-positiven (nämlich markierten) Zellen aufgefangen werden.

Während der Zentrifugationszeit wurden bereits die Säulen (MACS columns type LS^+/VS^+) vorbereitet, auf die später die Zellen pipettiert werden sollten. Die Säulen wurden solange mit dem Puffer durchspült (ca. 3 ml), bis sie vollständig befeuchtet waren. Zusätzlich wurde auf die Säulen noch ein Nylon-Filter gesetzt, um eventuell vorhandene Zellklumpen zurückzuhalten. Der Filter wurde ebenfalls mit Puffer angefeuchtet. Danach wurden die Säulen vor einem MACS Separator, der das magnetische Feld enthielt, platziert.

2.1.7.2.2.1 Magnetische Markierung der $CD34^+$-Progenitorzellen

Im nächsten Schritt fand die Inkubation der Zellen mit den magnetisch gekoppelten Antikörpern (CD34 MicroBeads) statt. Dazu wurde das Pellet mit wenigen ml des Puffers versetzt. Für ein Zellvolumen von 10^8 Zellen wurden 100 µl der Anti-CD34-haltigen MicroBeads eingesetzt. Das gleiche Volumen an FcR Blocking Reagent wurde zu der Zellsuspension gegeben, um Bindungen der MicroBeads an unspezifische Epitope bzw. andere CD34-negative Zellen zu verhindern. Es folgte eine Inkubationsphase im Kühlschrank (6-12°C) für 30 Minuten.

2.1.7.2.2.2 Magnetische Auftrennung der gebundenen mononukleären Zellen

Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit Puffer homogenisiert (bis 10 ml) und danach pelletiert (1500 rpm, 5 min, 17°C). Hierzu wurden die Pellets erneut mit 4 ml Puffer versetzt und dann vorsichtig auf die Säulen pipettiert. Die mit Anti-CD34 MicroBeads behafteten $CD34^+$-Zellen blieben jetzt durch das magnetische Feld im Säulenbett haften, wogegen nicht-markierte Zellen durch die Säulen liefen und in einem Reaktionsgefäß als Eluat aufgefangen wurden. Anschließend wurden die Säulen mit

Puffer gewaschen (3 x 3 ml), um alle nicht markierten Zellen herauszuspülen. Danach wurden die Säulen von dem Separator entfernt. Nach Platzierung der Säulen über einem neuen, sterilen Reaktionsgefäß wurden 5 ml Puffer auf die Säule gegeben und dann mit einer Spritze mit Druck durch die Säule gepült. Die nun aus der Säule austretende Suspension enthielt die aufgereinigten $CD34^+$-Zellen. Die Reinheit des $CD34^+$-Anteils wurde mittels FACS-Analyse ermittelt (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Andreas Burchert).

2.1.7.2.3 $CD34^+$-Kultur und Aktivierung

Die $CD34^+$-Zellen wurden in IMDM-Medium (inkl. 5 % FKS und 10 % MS-5 konditioniertem Medium) bei 37 °C und 5 % CO_2 in Kultur gehalten. Dabei wurden initial 10^4 Zellen pro ml angesetzt. Aktiviert und stimuliert wurden die $CD34^+$-Zellen mit humanem rekombinanten IL-3 und humanem Stammzellfaktor (je 10 ng/ml).

2.1.7.2.4 Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

Für die Präparation von mononukleären Zellen wurde einem gesunden Mitarbeiter des Labors Blut in ein Heparin-Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde reichlich mit PBS verdünnt und nach obigem Protokoll über einen Ficoll-Gradienten aufgetrennt. Nach Aufnahme der Interphase und bereits beschriebener Aufreinigung wurde die Zellsuspension pelletiert.

2.1.7.3 MS-5-Zelllinie (Mausfibroblasten)

MS-5-Zellen haben die Eigenschaft, Zytokine zu sezernieren, die für die Aktivierung und Kultivierung der $CD34^+$-Zellen genutzt wurden. Die in der Studie gebrauchte Zelllinie MS-5 wurde von Dr. Andreas Burchert zur Verfügung gestellt. In Kultur gehalten wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 in α-MEM Medium und 10 % FKS. Nach einigen Tagen der Kultivierung wurde das alte (verbrauchte) Medium abpipettiert und durch einen sterilen Filter filtriert. Dieses „konditionierte“ Medium enthielt die gewünschten Zytokine und wurde dem Medium zur $CD34^+$-Kultur hinzugefügt.

2.1.8 Patientenmaterial (zytologische Proben)

Das in der Studie eingesetzte Patientenmaterial stammte von Patienten der Universitätsklinik Marburg, die einer diagnostischen oder therapeutischen Perikardpunktion unterzogen wurden. Über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr (Januar 2000 bis Februar 2001) konnten 31 Perikardergüsse von nicht ausgewählten Patienten gesammelt werden. Es handelte sich hierbei um 17 Frauen und 14 Männer, bei denen die Punktionen im Rahmen der täglichen Routine von Ärzten des Klinikums durchgeführt wurden. Sowohl die zytologische Untersuchung (durchgeführt von zwei Pathologen) und die Telomerase-Aktivitätsmessung wurden unabhängig voneinander „geblindet“ durchgeführt.

2.2 Methoden

In den folgenden Ausführungen wird die methodische Vorgehensweise der Telomerase-Messung beschrieben. Als Methode zur Telomerase-Aktivitätsmessung wurde in dieser Arbeit der TRAP-Assay (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*) verwendet.

Gemessen wurde die Telomerase-Aktivität in

- Perikardergüssen,
- NCI-H69-Zellen,
- $CD34^+$-Zellen und
- mononukleären Zellen aus peripherem Blut.

Die Durchführung der eigentlichen Messung erfordert bei allen vorgenannten Ausgangsmaterialien eine Reihe von Vorbereitungsmaßnahmen. Da die Telomerase ein RNA-Proteinkomplex ist, müssen zunächst die Proteine aus den Zellen extrahiert werden, um die Enzymaktivität messen zu können. Diese Vorbereitungsmaßnahmen umfassen deshalb die

a) Sammlung und Separierung der Zellen,

b) Proteinextraktion aus den Zellen und

c) Proteinkonzentrationsmessung.

Der unter b) genannte Proteinextrakt bildet das Ausgangsmaterial für die Durchführung des TRAP-Assays, der den elementaren Schritt bei der Telomerase-Aktivitätsmessung darstellt. Während des TRAP-Assays verlängert die im Proteinextrakt enthaltene Telomerase zunächst einen Primer um telomerische Repeats. Diese Extensionsprodukte werden dann in einer PCR amplifiziert. Anschließend werden die Produkte der PCR elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Art der Markierung des Primers können die Produkte durch Autoradiographie sichtbar gemacht oder mittels GeneScan automatisch analysiert werden.

2.2.1 Proteinextraktion

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde Telomerase-Aktivität in verschiedenen Ausgangsmaterialien gemessen. Es wurden Zelllinien, verschiedene Punktionsproben von Patienten sowie Blutproben untersucht. Für die Untersuchung auf das Telomerase-Enzym müssen aus dem entsprechenden Ausgangsmaterial zunächst die Zellen separiert werden. Nach der Trennung werden die Zellen durch Zugabe eines Puffers lysiert, wobei die Proteine durch das im Puffer enthaltene PMSF, einem Proteaseinhibitor, geschützt werden. Zur Aufrechterhaltung der RNA-Integrität wird ein RNAse-Inhibitor zugefügt. Die so gewonnenen Proteinextrakte dienen dann als Ausgangssubstanz für den TRAP-Assay.

2.2.1.1 Proteinextraktion aus Zelllinien

Die Proteinextraktion fand bei den NCI-H69-, $CD34^+$- sowie mononukleären Zellen unter keimarmen Bedingungen statt und wurde jeweils nach dem gleichen Protokoll vollzogen.

Zur Präparation eines Proteinextraktes wurden ca. 10 ml der in Suspension vorliegenden Zellen mit Hilfe einer sterilen serologischen Pipette aufgenommen und in ein 15 ml Falcon Tube überführt. Der bei der Zentrifugation (1500 rpm, 4 °C, 5 min) entstandene Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Danach wurde das Zellpellet mit 5 ml gekühltem 1 x PBS versetzt und homogenisiert. Aus dieser Suspension erfolgte die Abnahme eines Aliquots von 50 µl, anhand dessen die Anzahl der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter unveränderten Bedingungen. Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt.

Anschließend wurde das Zellpellet mit einem frisch angesetzten CHAPS Lysispuffer versetzt. Pro 10^6 Zellen wurden 100 µl Lysispuffer eingesetzt, so dass eine Konzentration von 10^4 Zellen pro µl entstand. Das Zellpellet wurde sorgfältig mit dem Lysispuffer homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurde die Suspension in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Mikroultrazentrifuge zentrifugiert (15000 rpm, 4 °C, 20 min). Der Überstand, der jetzt die Proteine beinhaltete, wurde aliquotiert, auf Trockeneis gefroren und bei –80 °C gelagert.

2.2.1.2 Proteinextraktion aus Perikardergüssen

Die durch Perikardpunktionen gewonnen Proben wurden nach Abführen der für die zytologischen und diagnostischen Untersuchungen benötigten Menge in Heparin-Röhrchen überführt und unverzüglich auf Eis gelagert. Aufbereitet wurden die Punktate freundlicherweise vom Labor Dr. Sabine Pankuweit und von dort für die Analysen zur Verfügung gestellt. Die im Erguss enthaltenen Zellen wurden mittels eines Zentrifugationsschrittes (1500 rpm, 4 °C, 5 min) gesammelt. Der Überstand wurde verworfen.

Zum Teil waren die Zellpellets blutig kontaminiert. Da das im Blut enthaltene Hämoglobin die im TRAP-Assay eingesetzte Taq-Polymerase hemmen könnte (Wu et al. 2000, Mu et al. 1999), musste der eigentlichen Proteinextraktion ein Reinigungsschritt vorausgehen. Für den Waschschritt, der das Zellpellet von den Erythrozyten befreien sollte, wurde RCLB (Red Cell Lysis Buffer) verwendet.

Das Pellet wurde mit 1 Vol. RCLB versetzt und homogenisiert. Es folgte eine 5 min dauernde Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 0,3 Vol. 1 x hypertone Lösung wurde das Gemisch erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde so lange wiederholt, bis ein sauberes, Erythrozyten-freies Zellpellet entstanden war. Anschließend wurden die Pellets dann auf Trockeneis gefroren und bei -80 °C gelagert.

Die eigentliche Proteinextraktion erfolgte unter Beachtung des zuvor beschriebenen Protokolls. Um einen unnötigen Zellverlust der z.T. sehr kleinen Zellpellets zu vermeiden, wurde auf eine Zellzählung verzichtet. Die eingesetzte Menge des CHAPS Lysispuffers richtete sich nach dem Volumen des Pellets, jeweils 10 - 20 µl gefrorene Zellen wurden mit 200 µl CHAPS Lysispuffer lysiert.

2.2.2 Proteinkonzentrationsmessung

In den TRAP-Assay muss eine definierte Menge Protein eingesetzt werden, um die Standardisierung der Messung der Telomerase-Aktivität zu gewährleisten. Es wurde daher zunächst die Proteinkonzentration der Extrakte photometrisch gemessen. Ihre Bestimmung erfolgte mit dem BioRad DC Protein Assay-Kit unter leichter Abwandlung des Herstellerprotokolls.

Zunächst wurde eine aufsteigende Konzentrationsreihe einer Standardproteinlösung (BSA) mit bekannter Konzentration (1,9 µg/µl) einschließlich eines Nullwertes in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die Proteinextrakte wurden zweifach (5 und 10 µl) angesetzt. Die Standardproteinreihe und die Proteinextrakte wurden jeweils bis 200 µl mit H_20 (Merck LiChrosolv H_20) aufgefüllt. Danach wurden zu jedem Reaktionsgefäß 100 µl der Reagenz A´ (bestehend aus 1000 µl Lösung A + 20 µl Lösung S des BioRad Kits) und 800 µl der Reagenz B hinzugefügt. Jede Probe wurde gründlich gevortext und dann in Dunkelheit 15 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablaufen der Inkubationszeit wurde der Nullwert kalibriert und jeder Ansatz bei 750 nm in einer 0,5 mm Einwegküvette mit einem digitalen Photometer gemessen. Durch Vergleich der

Absorptionen der Proben mit der Standardmessgeraden des BSA-Standard konnte schließlich die Proteinkonzentration der Extrakte berechnet werden.

2.2.3 Telomerase-Aktivitätsmessung

Als Methode zur Telomerase-Aktivitätsmessung wurde in dieser Studie der TRAP-Assay angewendet. Hierbei handelt es sich um eine 1994 von der Arbeitsgruppe Kim et al. entwickelte modifizierte PCR. In der vorliegenden Arbeit kamen zwei Varianten des TRAP-Assays zum Einsatz:

a) der konventionelle TRAP-Assay (Methode nach KIM et al. 1994) und

b) der fluoreszenz-basierte Assay (Methode nach OHYASHIKI et al. 1996).

Bei der ersten Variante wurde der konventionelle TRAP-Assay basierend auf der Methode nach Kim et al. 1994 verwendet. In ihm sind die PCR-Produkte radioaktiv markiert, so dass sie im Anschluss an eine gelelektrographische Auftrennung durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden können. Die zweite Variante ist ein fluoreszenz-basierter Assay nach OHYASHIKI et al. 1996. Bei diesem sogenannten F-TRAP-Assay werden die Produkte während der Gelelektrophorese automatisch von einem GeneScanner detektiert und analysiert. Diese Methode bietet insbesondere den Vorteil, dass zusätzliche Informationen über die Intensität der PCR-Banden gewonnen werden.

2.2.3.1 Der TRAP-Assay (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*)

Die Besonderheit des klassischen TRAP-Assays (KIM et al. 1994) liegt im Nachweis der Telomeraseaktivität in nur einem Reaktionsgefäß. Der in dieser Arbeit verwendete Assay bedient sich dieser ursprünglichen Methode, die jedoch aus Gründen der Sensitivität und Spezifität in einigen Komponenten verändert wurde. Das hierbei benutzte Protokoll wurde von Susanne Meyer-Neumühlen entwickelt (zum damaligen Zeitpunkt ebenfalls Doktorandin der Arbeitsgruppe Prof. Schuermann).

Während des TRAP-Assays laufen in den Reaktionsgefäßen zwei Reaktionsphasen hintereinander ab:

- *Phase 1*: Telomerase-Extension des TS-Primers

- *Phase 2*: Amplifikation der Extensionsprodukte.

In der ersten Phase findet die Telomerase-Extension des TS-Primers statt. Die zweite Phase besteht aus der eigentlichen PCR, in der die Telomerase-Extensionsprodukte amplifiziert werden.

2.2.3.1.1 Telomerase-Extensionsschritt

In der ersten Phase des TRAP-Assays findet die Extension des in der PCR eingesetzten Primers (s.u.) statt. Bei optimalen Reaktionsbedingungen von 37 °C hybridisiert die in dem Proteinextrakt (s.u.) enthaltene Telomerase mit dem Ende ihrer RNA-Untereinheit an den TS-Primer. Der TS-Primer ist ein 18 bp langes Oligonucleotid, das von der Telomerase um die typische Sequenz eines telomerischen Repeats (TTAGGG) verlängert wird. Im Anschluss löst sich die RNA-Untereinheit ab, rückt in 3´-Richtung entlang des neu synthetisierten Abschnitts weiter und es wird die nächste Sequenz an das neu entstandene Ende hybridisiert. Das TS-Oligonucleotid wird dadurch um ein Vielfaches der telomerischen Sequenz verlängert, so dass unterschiedlich lange Produkte und zwar mit der Länge (18+6n) bp entstehen. Diese Extensionsprodukte werden dann in der folgenden Polymerasekettenreaktion amplifiziert.

2.2.3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerasekettenreaktion wird die Amplifikation von DNA-Abschnitten *in vitro* ermöglicht. Hauptbestandteile einer PCR sind zwei Oligonucleotide, die die Funktion eines Primers übernehmen. Sie hybridisieren mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Dazu werden eine ausreichende Menge der vier Desoxynucleosidtriphosphaten gegeben sowie eine hitze-beständige

DNA-Polymerase, die die Verknüpfung der Desoxynucleosidtriphosphate katalysiert (MULLIS & FALOONA 1985, SAIKI et al. 1988).

Durch Erhitzung wird die DNA denaturiert, d.h. die Doppelstränge werden voneinander in Einzelstränge getrennt, so dass sich bei anschließender Abkühlung auf 55 - 65 °C die Primer anlagern können. Bei 72 °C erfolgt die durch die Polymerase in 5´-3´-Richtung katalysierte Synthese eines jeweils komplementären DNA-Stranges. Es folgen mehrere Zyklen der Denaturierung, Primer-Anlagerung („*Annealing*“) und Elongation, insgesamt 25 - 35 mal, wobei die neu synthetisierten DNA-Abschnitte selbst ebenfalls als Matrize im nächsten Durchgang dienen. Da sich die Menge der DNA-Abschnitte bei jedem Zyklus verdoppelt, entstehen nach n Zyklen theoretisch 2^n DNA-Moleküle. Anschließend werden die amplifizierten DNA-Abschnitte elektrophoretisch auf einem Gel aufgetrennt. Die aufgetrennten PCR-Produkte können dann entweder mit Silber oder Ethidium angefärbt oder durch Spezialmethoden bei zuvor erfolgter radioaktiver oder fluoreszenter Markierung sichtbar gemacht werden.

Der TRAP-Assay stellt eine besondere Form der PCR dar. Während bei der konventionellen Polymerasenkettenreaktion ein natürlicher DNA-Strang zur Amplifikation vorgelegt wird, bildet bei der PCR im TRAP-Assay das TS-Oligonucleotid die Vorlage für die Amplifikation. Dieser DNA-Abschnitt ist in der vorgeschalteten Telomerase-Extensionsphase bereits um die telomerischen Repeats verlängert worden. Je nach Höhe der Aktivität der Telomerase werden unterschiedlich viele TTAGGG-Repeats an das Oligonucleotid angehängt, so dass mehrere DNA-Abschnitte unterschiedlicher Länge (18+6n bp) als DNA-Matrize für die Amplifikation zur Verfügung stehen.

Gleichzeitig dient das Oligonucleotid als *forward*-Primer, während als *reverse*-Primer ein ACX-Oligonucleotid verwendet wird (vgl. Abschnitt 2.2.3.2.2).

Als Ergebnis der PCR ist also nicht nur eine DNA-Bande am Ende der Elektrophorese sichtbar, sondern eine Reihe von definierten DNA-Abschnitten im Abstand von 6 Nucleotiden. Diese bilden die sogenannte Telomerase-Leiter.

2.2.3.2 Durchführung des TRAP-Assays

Im Folgenden wird die Durchführung des TRAP-Assays beschrieben. Sie ist bei der konventionellen und der fluoreszenz-basierten Methode prinzipiell gleich und unterscheidet sich lediglich durch den Einsatz unterschiedlich markierter TS-Primer. Für den konventionellen Assay wurde der TS-Primer mit einem Radionuklid markiert, bei der zweiten Methode wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markierter Primer verwendet. Das folgende Kapitel beschreibt die radioaktive Markierung des TS-Primers.

2.2.3.2.1 Radioaktive Markierung des TS-Primers

Die Produkte des konventionellen (radioaktiven) TRAP-Assays werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Hierfür ist es erforderlich, den TS-Primer zunächst mit dem Isotop ^{33}P radioaktiv zu markieren. Bei dem Isotop ^{33}Phosphat handelt es sich um einen β-Strahler mit einer Halbwertzeit von circa 28 Tagen.

Der TS-Primer bietet sich deshalb als Träger dieser Markierung an, weil er sowohl Primer in der PCR als auch Teil des Endprodukts der PCR ist und sich nicht von dem amplifizierten DNA-Strang ablöst.

Die Markierung des TS-Primers erfolgte mittels einer Kinasierungsreaktion, in der von [γ^{33}P]-ATP der radioaktive Phosphatrest vom C_5-Atom auf das TS-Oligonucleotid unter Zusatz von einer T_4-Polynucleotidkinase übertragen wurde. Den Kinasierungsansatz gibt Tabelle 2-1 wider:

Substanzen	**Menge**
[γ-^{33}P]-ATP	4 µl
TS-Primer	1,2 µg
5 x Forward Kinase Puffer	3 µl
T_4-Polynukleotidkinase	5 U
H_20	ad 15 µl
Gesamt-Volumen	**15 µl**

Tab. 2-1: Kinasierungsansatz (10fache Menge)

2.2.3.2.2 Primer-Elongation und PCR-Ansatz

Die beschriebenen Teilreaktionen des TRAP-Assays finden in einem Reaktionsgefäß statt. Sie müssen zeitlich voneinander getrennt ablaufen, da sonst eine Vielzahl an Primer-Dimeren entstehen würde, die die Spezifität der Methode negativ beeinflussen könnten.

Um zeitlich nacheinander geschaltete Reaktionen zu erreichen, wurde der Einsatz einer Wachsschicht als Hilfskonstruktion gewählt, durch die der ACX-Primer (Reaktionsansatz 1) von den restlichen Reagenzien der PCR (Reaktionsansatz 2) getrennt wurde. Zunächst wurde hierdurch die Extension des TS-Primers ohne störende Nebenbedingungen ermöglicht. Im Anschluss an diese Primer-Elongation (Thermocycler 30 °C, 5 min) wurde die Wachsschicht geschmolzen, damit sich der ACX-Primer mit den anderen Reagenzien vermischte. Im Ergebnis bewirkte die Wachsschmelze also den Start der PCR.

Im ersten Schritt wurden die Reaktionsansätze 1 und 2 pipettiert. Reaktionsansatz 1 enthielt den ACX-Primer, den *reverse*-Primer der PCR-Reaktion, und die Taq-Polymerase sowie einige Puffer. Reaktionsansatz 2 enthielt die für die Telomerase-Extension notwendigen Substanzen, also im Wesentlichen den TS-Primer, einen Mix von allen Desoxynukleosidtriphosphaten sowie Puffer und Inhibitoren. Ihm wurde auch der

Proteinextrakt zugefügt, der auf die Telomerase-Aktivität untersucht werden sollte. Die jeweilige Zusammensetzung der beiden Ansätze kann den folgenden Tabellen entnommen werden.

Substanzen	**Menge**
10 x TRAP-Puffer	0,5 µl
ACX-Primer	12 pmol
Taq-Polymerase	2 U
H_2O	ad 5 µl
Gesamt-Volumen	**5 µl**

Tab. 2-2: Zusammensetzung Reaktionsansatz 1

Substanzen	**Menge**
Proteinextrakt - Perikardproben - Zelläquivalente	1 µg 1 µl
10 x TRAP-Puffer	4,5 µl
RNAse Inhibitor	8 U
dNTP-Mix[1]	0,125 µl
TS-Primer - γ^{33}P-markiert - FAM-markiert	1,5 µl
H_2O	ad 45 µl
Gesamt-Volumen	**45 µl**

Tab. 2-3: Zusammensetzung Reaktionsansatz 2

[1]äquimolarer Mix aus dATP, dCTP, dTTP, dGTP

Die PCR fand in MicroAmp® Reaktionsgefäßen statt. Pro Ansatz wurden 5 µl von Reaktionsansatz 1 in das Gefäß pipettiert. Auf den Mix wurde mit einem sterilen Skal-

pell vorsichtig ein Wachskügelchen gelegt. Es folgte eine Phase im Thermocycler für 5 min bei 80 °C. In dieser Phase schmolz das Wachskügelchen. Nach der Abkühlung (1 min bei 25 °C) erhärtete die Wachsschicht und setzte sich über dem Mix 1 ab. Anschließend wurde der während der Wachsschmelze aufgetaute Proteinextrakt (für Perikardproben 1 µg, für Zelllinien das entsprechende Zelläquivalent) vorsichtig auf die Wachsschicht pipettiert, ohne diese zu durchstoßen. Danach wurde der Rest des Reaktionsansatz 2 in das Reaktionsgefäß gegeben (45 µl). Es folgten Thermocyclerphasen, in denen zuerst die Telomerase-Extension und danach die PCR stattfand. Eine Übersicht über die Reaktionsbedingungen findet sich in nachfolgender Tabelle 2-4:

Anzahl der Zyklen	**Temperatur**	**Zeit**	**Phase**
1 Zyklus	30 °C	20 min	Extension des TS-Primers
1 Zyklus	94 °C	30 sec	Einleitung der PCR
29 Zyklen	94 °C	30 sec	Denaturierung der DNA-Stränge
	58 °C	30 sec	Annealing der Primer
	72 °C	30 sec	Elongation
1 Zyklus	72 °C	30 sec	Ausleitung der PCR
	4 °C	∞	Abkühlung

Tab. 2-4: Reaktionsbedingungen des TRAP-Assays

2.2.4 Gelelektrophorese

DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge lassen sich durch die Gelelektrophorese, also durch Wanderung in einem elektrischen Feld auftrennen. Die Phosphatreste an der Seite

eines DNA-Strangs verleihen den DNA-Molekülen bei neutralem pH eine negative Ladung. Wird nun eine elektrische Spannung über einem Feld angelegt, so wandern die Moleküle ihrer Ladung entsprechend zur Anode. Dabei hängt die Geschwindigkeit von der Größe der Fragmente, der Gesamtladung der Moleküle und auch der angelegten Spannung ab. Träger der Elektrophorese können Agarose- oder Polyacrylamidgele sein. Während Polyacrylamidgele der Auftrennung von Fragmenten bis zu 1000 bp dienen, können mit den weitmaschigeren Agarosegelen längere Fragmente bis zu 40 kb aufgetrennt werden.

Die Länge der in dieser Arbeit erwarteten Fragmente (die Produkte der Telomerase-Elongation) lag zwischen 50 und 400 bp, so dass ausschließlich Polyacrylamidgele verwendet wurden.

Vor dem Auftragen auf ein Gel wurden die PCR-Produkte mit einem Ladepuffer aus Formamid und sowie den Farbstoffen Bromphenol und Xylencyanol versetzt. Das Formamid erhöhte die Dichte der Proben. Dies erleichtert das Auftragen, weil so die Proben in den Geltaschen nach unten sinken können. Der Vorteil in der Verwendung der Farbstoffe liegt darin, dass durch ihre definierte Laufgeschwindigkeit die Länge des Gellaufs besser vorhergesagt werden kann (SAMBROOK et al. 1989).

Zur Abschätzung der Größe der aufgetrennten Fragmente dient ein Standard (mit Fragmenten exakt definierter Länge), anhand dessen die aus den Proben aufgetrennten Fragmente der Proben beurteilt werden können.

Polyacrylamidgele entstehen durch die Polymerisierung von Acrylamid und N,N´-Methylenbisacrylamid. Induziert wird die Polymerisierung durch freie Radikale, die aus dem chemischen Zerfall von Ammoniumpersulfat entstehen. Dabei wird TEMED als Stabilisator der freien Radikale zugesetzt.

Es lassen sich denaturierende und nicht-denaturierende Gele unterscheiden. Die nicht-denaturierenden Gele werden für die Auftrennung der Produkte des konventionellen Assays mit dem radioaktiv gelabelten Primer verwendet. Denaturierende Polyacrylamidgele unterscheiden sich durch die Zugabe von Harnstoff. In dieser Arbeit wurden

sie für die Analyse derjenigen PCR-Produkte eingesetzt, die den fluoreszenzmarkierten Primer enthielten und mit der GeneScan Methode analysiert wurden.

2.2.4.1 Nichtdenaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese: Auftrennung der Produkte des konventionellen TRAP-Assays

Zu Beginn der Herstellung des Polyacrylamidgels wurden die Glasplatten gereinigt und zusammengeklammert. Als Abstandhalter zwischen den Platten dienten zwei sogenannte „Spacer“ (0,5 mm) und ein Silikonschlauch. Der Acrylamidlösung (12 % x 0,5 TBE) wurden APS und TEMED hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurde die Lösung in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten gegossen. In die obere Gelkante wurde ein Kamm mit 16 Taschen für je 30 µl Probenvolumen eingeschoben.

Nach der Polymerisierungszeit des Gels von etwa einer Stunde konnte der Kamm sowie der Silikonschlauch entfernt werden. Die Platten mit dem polymerisierten Gel wurden in eine mit 0,5 x TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt und die Taschen im Gel ebenfalls mit dem Puffer gefüllt. Danach konnten die TRAP-Produkte aufgetragen werden. Dazu wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 4 µl des vorbereiteten Gelladepuffers versetzt und in eine Geltasche pipettiert.

Bei jedem Gel wurde ein mit γ^{33}P-markierter Längenstandard (*Bsu*Ri gespaltene pBR322 DNA) in eine Tasche aufgetragen (vgl. Abschnitt 2.2.4.2).

Nach dem Auftragen aller Produkte konnte die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 130 V gestartet werden. Sie dauerte ca. 4 Stunden, und zwar so lange, bis das im Gelladepuffer enthaltene Bromphenolblau vollständig aus dem Gel gewandert war.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen und in einem Vakuumtrockner etwa eine Stunde lang getrocknet.

Im Anschluss daran wurden die TRAP-Produkte durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Hierfür wurde das getrocknete Gel zusammen mit einem Röntgenfilm in eine

Röntgenkassette gelegt. Je nach Stärke der Radioaktivität wurde der Film für ein bis zwei Tage exponiert und anschließend entwickelt.

2.2.4.2 Kinasierung des Längenstandards

Ein Längenstandard enthält DNA-Fragmente mit exakt definierten Längen. Er wird bei der Elektrophorese als zusätzliche Spur auf ein Gel aufgetragen, um die Länge der PCR-Produkte vergleichen und abschätzen zu können. Die Fragmente kommen durch den Restriktionsverdau von Bakterien-DNA zustande. Der in dieser Arbeit verwendete Längenstandard entstand durch *Bsu*RI Verdau von pBR322-DNA.

Bevor dieser Längenstandard in der oben beschriebenen Methode eingesetzt werden konnte, musste er radioaktiv markiert werden (ähnlich der Kinasierungsreaktion des TS-Primers), damit er im Anschluss an die Elektrophorese auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden konnte.

Die Bedingungen der Kinasierungsreaktion und deren Zusammensetzung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Substanzen	**Menge**	**Reaktionsbedingungen im Thermocycler**
DNA-Längenstandard	10 µg	Inkubation:
5 x Exchange Puffer	5 µl	30 min bei 37 °C
[γ-^{33}P]-ATP	5 µl	
T_4-Polynucleotidkinase	5 U	Denaturierung:
H_2O	ad 25 µl	5 min bei 85 °C
Gesamt-Volumen	**25 µl**	

Tab. 2-5: Kinasierungsansatz und Reaktionsbedingungen

Nach der Kinasierungsreaktion wurde eine Filterung durchgeführt, um das Gemisch von freien Nucleotiden zu reinigen. Während der Inkubationszeit im Thermocycler wurde

bereits die Filtereinrichtung vorbereitet. Für die Filterung wurde eine Reinigungssäule solange mit 1 x STE versetzt, bis der Filter vollkommen gesättigt war und die ersten Tropfen unten aus der Säule austraten.

Nach Ablauf der Kinasierungsreaktion wurde das Reaktionsgemisch auf die Säule gegeben, die zuvor erneut mit 45 µl STE-Puffer versetzt worden war. Mit Hilfe einer Spritze wurde nun die Lösung durch den Filter gedrückt, wobei das zuerst aus der Säule austretende Volumen verworfen wurde. Anschließend wurde die Reinigungssäule erneut mit 70 µl versetzt und erneut mit der Spritze durch den Filter gedrückt. Die dabei austretende Lösung enthielt den aufgereinigten, kinasierten Längenstandard. Zur Erhöhung der Ausbeute konnte die Säule noch einmal mit Puffer durchspült werden, wobei die im zweiten Durchgang erzielte Menge den Marker in einer geringeren Konzentration enthielt.

2.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamidelektrophorese: Analyse von F-TRAP-Produkten mit dem GeneScanner

Um die Produkte des F-TRAP-Assays zu analysieren, wurde ein GeneScanner eingesetzt. Bei dem GeneScanner handelt es sich um ein automatisches DNA-Fragment-Analysegerät, mit dem sich fluoreszenzmarkierte Produkte bestimmen lassen (Ziegle et al. 1992). Grob skizziert arbeitet der GeneScanner wie folgt: Ein Argonlaser scannt in konstanten Abständen über das Gel und regt die Floureszenzfarbstoffe an, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Während die zu analysierenden F-TRAP-Produkte den FAM-markierten TS-Primer (im Filterset blau dargestellt) enthalten, ist der Längenstandard mit dem Fluoreszenzfarbstoff ROX markiert (rot). Die jeweiligen Wellenlängen werden gemessen und als Daten digital auf einen MacIntosh-Rechner übertragen. Auf dem Bildschirm des GeneScanners wird das Gelbild der elektrophoretisch getrennten PCR-Produkte angezeigt, wobei die Möglichkeit besteht, die Gelspuren-Analyse manuell - falls nötig - nachzukorrigieren. In einer Spur, in der nur der Längenstandard ohne PCR-Produkt gelaufen ist, wird die Länge der einzelnen Banden eingegeben. Anhand dieser vorgegebenen Längen errechnet GeneScan die Bandenlänge der PCR-Produkte. Des Weiteren wird die Fluoreszenzintensität der einzelnen

Banden gemessen und als Peak dargestellt. Die Fläche unterhalb des Peaks wird automatisch berechnet und bildet die „Peak area“ (= Fläche unter der Kurve). Alle aus dem Lauf gewonnen Daten werden auf Optical Disc gespeichert.

Um den F-TRAP-Assay mit Hilfe des GeneScanners durchzuführen, wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Sie unterscheiden sich von den nicht-denaturierenden durch die Zugabe von Harnstoff. Zur Herstellung des denaturierenden Polyacrylamidgels wurden 21 g Harnstoff abgewogen und mit H_2O sowie 10 x TBE gelöst. Dieser Lösung wurde Polyacrylamid in Form einer „Long Ranger Lösung 50 %“ beigefügt, so dass ein 8 %iges Polyacrylamidgel entstand. Nach kompletter Auflösung des Harnstoffs (ca. 30 min mit einem Rührfisch gerührt) wurde die Lösung gefiltert und entgast. Danach wurde frisch angesetztes 10 %iges APS sowie TEMED zum Start der Polymerisation und Vernetzung hinzugegeben und das Gelgemisch zwischen die vorbereiteten und äußerst sorgfältig gesäuberten Spezialplatten gegossen. Hierbei handelte es sich um Spezialplatten, die an beiden Seiten durch einen Spacer mit der Größe 0,2 mm Abstand auseinander gehalten wurden. Die Gelplatten wurden durch mehrere Klammern fest untereinander verbunden. Oben wurde zwischen die Platten ein glatter Oberkantenspacer eingesetzt.

Das Gel musste mindestens anderthalb, höchstens aber zwei Stunden austariert in waagerechter Position polymerisieren. Nach einer gründlichen Reinigung der Plattenaußenseiten wurden die Platten in die Haltevorrichtung des GeneScanners eingesetzt, wobei der Laserlesebereich zuvor mit Propanol abgewischt worden war. Der Oberkantenspacer wurde nun durch einen Sägezahnkamm (mit 36 Taschen à 5 µl) ersetzt, der ca. 1 - 2 mm in die obere Gelkante geschoben wurde. Danach konnten die Gelplatten mitsamt der Haltevorrichtung in den Elektrophoreseapparat des GeneScanners eingesetzt und der automatische „*Plate Check*“ gestartet werden, durch den die Lesefläche auf Sauberkeit und Hintergrundartefakte überprüft wurde. Im Anschluss an die erfolgreiche Sauberkeits-Kontrolle erfolgte die Zugabe des Laufpuffers (1 x TBE) in die Kammern und es wurde eine Heizplatte angeschlossen. Nach einem Vorlauf (30 min bei 30 W) wurde der ausgetretene Harnstoff aus den Taschen gespült und die F-TRAP-Produkte konnten nun geladen werden.

Während des Vorlaufs wurden die Proben vorbereitet. Hierzu wurden 4 µl des PCR-Produktes mit 5 µl des „MasterMix“ (bestehend aus 5 µl Formamid-Loading und 0,6 µl des GeneScan-350 [ROX markierten]-Größenstandards) versetzt.

Nach der thermischen Denaturierung (2 min bei 95 C) wurden hiervon 1,5 µl auf das Gel geladen. Der Gellauf dauerte ungefähr 6 Stunden.

2.2.5 Qualitätskontrolle der Proteinextrakte

Um das Vorhandensein von allgemeiner Enzym-Aktivität in den Proteinextrakten nachzuweisen, wurden die Proben auf Alkalische Phosphatase-Aktivität untersucht.

Da die Alkalische Phosphatase ein Enzym ist, das ubiquitär in allen Zellen vorkommt, eignet es sich sehr gut als Referenzenzym (WRIGHT et al. 1995, HEINE et al. 1998). Um die Aktivität der Proben vergleichen zu können, wurde die Aktivität des Enzyms in den Proteinextrakten gemessen und dann mittels einer Standardreihe mit bekannter Alkalischer Phosphatase-Menge in relative Einheiten umgerechnet. Das Prinzip der Messung der Alkalischen Phosphatase besteht aus der Registrierung eines Farbumschlags, der bei der Spaltung von p-Nitrophenylphosphat (pNPP) stattfindet. Der Farbumschlag kann photometrisch mit dem ELISA-Reader gemessen und quantifiziert werden (GREILING & GRESSNER 1995).

Im einzelnen wurden für die Qualitätskontrolle folgende Schritte durchgeführt: In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde zunächst eine Standardreihe mit reiner Alkalischen Phosphatase in den Verdünnungen 1:100.000, 1:10.000, 1:1.000 und 1:100 sowie ein Nullwert pipettiert. Von den Proteinextrakten wurden je 2 und 5 µl vorgelegt. Jedes Well wurde bis 10 µl mit H_2O aufgefüllt. Auf 2 ml des 100 mM Na-Bicarbonat Puffers (pH 10,0) wurden in einem separaten Reaktionsgefäß 100 µl pNPP gegeben. Mit Hilfe einer Multipette wurden von diesem Substratgemisch 100 µl in jedes Well pipettiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von pNPP fanden alle weiteren Schritte lichtgeschützt statt. Die Well-Platte wurde zur Inkubation in einen Hybridisierungsofen (37 °C, 20 min) gestellt. Danach wurde die Reaktion in einem zweiten Ofen bei 85 Grad nach

5 min gestoppt. Der Farbumschlag konnte nun von einem Elisa-Reader photometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Die gemessenen Werte wurden von der Software „Labsystems Genesis 3.0“ nach Herstellerangabe ausgewertet, auf die Proteinmenge umgerechnet und auf die mittlere Aktivität der Standardreihe bezogen, so dass relative Einheiten für die Proteinextrakte entstanden.

3 Ergebnisse

Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand zunächst in der Untersuchung von Telomerase-Aktivität in zytologischen Ergüssen, insbesondere in Perikardergüssen. Untersucht wurde durch Anwendung von radioaktiven TRAP-Assays, ob und welcher Zusammenhang zwischen der Telomerase-Aktivität in den Ergüssen und der in der Zytologie festgestellten Malignität besteht. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde ein fluoreszenzbasierter Assay über Verdünnungsreihen mit Zellen unterschiedlicher Telomerase-Aktivität etabliert, um eine genauere Aussage über die Höhe der Telomerase-Aktivität treffen zu können und dadurch präzisere Rückschlüsse auf das Vorhandensein maligner Zellen zu erhalten. Sämtliche Perikardergüsse wurden zusätzlich mit dem fluoreszenz-basierten Assay gemessen. In diesem Zusammenhang wurde auch nach einem Trennwert (dem sogenannten „Cut-off"–Wert) gesucht, um zwischen malignen und benignen Ergüssen differenzieren zu können. Letztlich wurden die Ergebnisse aus beiden Varianten der TRAP-Assays miteinander verglichen.

3.1 Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentrationsmessung diente unter anderem der Qualitätskontrolle der Proteinextraktion und allen damit verbundenen Schritten. Im Fall von verwendeten Zelllinien wurden auf der Basis von Verdünnungsreihen Zelläquivalente berechnet und in die TRAP-Assays eingesetzt. Dies war bei den Proteinextrakten der Perikardergüsse jedoch nicht möglich (vgl. Abschnitt 2.2.1.2), so dass hier die Proteinkonzentration primär zur Errechnung des Probenvolumens benötigt wurde, das in den TRAP-Assay eingesetzt werden sollte. Neben der Qualitätssicherung erfüllte die Proteinkonzentrationsmessung somit die Funktion der Standardisierung der TRAP-Assays und damit der Vergleichbarkeit der Proben.

Sämtliche gemessenen Absorptionen lagen im linearen Bereich der Standardproteinreihe. Die Proben umfassten dabei einen Konzentrationsbereich 0,5 – 2 µg/µl. In jeden TRAP-Assay wurden 1 µg Protein eingesetzt.

3.2 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (HEINE et al. 1998) diente ähnlich wie die Proteinkonzentrationsmessung der Qualitätssicherung. Dabei deutet der Nachweis der Alkalischen Phosphatase im Proteinextrakt auf die Integrität der Proteine hin. Eine Enzymaktivität kann nämlich nur nachgewiesen werden, wenn die Proteine im Extrakt funktionsfähig sind.

Die Stabilität der Alkalischen Phosphatase ist vergleichbar mit der Stabilität der Telomerase (ENGELHARDT et al. 1997, ALLSOPP et al. 1992). Ausgehend von einer detektierbaren Alkalischen Phosphatase-Aktivität in einer Probe, sollte in dieser Probe auch Telomerase-Aktivität nachweisbar sein, sofern sie tatsächlich vorhanden ist.

Die Messung erfolgte daher, um zu beweisen, dass eine mögliche negative Telomerase-Aktivität ursächlich in der Protein-Degradation zu suchen ist, also einem Proteinverlust während der Aufarbeitungen wie bei der Proteinextraktion. Bei einer schlechten Aufbereitung mit einhergehendem Verlust der Protein-Funktion würde sich keine Alkalische Phosphatase-Aktivität messen lassen.

In sämtlichen Ergüssen bzw. Zellproben konnte die Aktivität nachgewiesen und somit der Beweis erbracht werden, dass eine negative Telomerase-Aktivität nicht auf einen Funktionsverlust der enzymatischen Proteine zurückzuführen ist. Gleichzeitig sicherte dies die Vergleichbarkeit der Telomerase-positiven und -negativen Proben im F-TRAP-Assay.

In der nachfolgenden Tabelle 3-1 sind einige ausgewählte Beispiele für die gemessene Alkalische Phosphatase-Aktivität in Perikardzytomaterial angeführt. Die Ergebnisse sind in relativen Einheiten bezogen auf die Aktivität der Standard-Alkalischen-Phosphatase pro µl angegeben. Der Mittelwert X beträgt 0,149 rel. Einheiten, die Standardabweichung 0,029 rel. Einheiten.

Fall	**Alkalische Phosphatase-Aktivität** (in rel. Einheiten)
3	0,17
12	0,10
16	0,15
24	0,13
31	0,14

Tab. 3-1: Beispiele für gemessene Alkalische Phosphatase-Aktivität in Perikardzytomaterial

3.3 Klinisch-pathologische Daten

In der zytologischen Begutachtung der Perikardergüsse lag in 7 von 31 Fällen ein maligner Zellbefund vor. Unter den 7 malignen Ergüssen befanden sich 4 Adenokarzinome der Mamma (2 invasiv duktal, 2 unbekannt), ein Burkitt-Lymphom, ein hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom und ein Adenokarzinom des Kolons. Von den 24 als gutartig eingestuften Perikardergüssen zeigten 14 reaktive und entzündliche Veränderungen wie z.B. Lymphozyten, Granulozyten und Mesothelzellen, zwei waren ausgeprägt hämorrhagisch, die anderen 8 Ergüsse zeigten keine Veränderungen und waren zytologisch unauffällig.

In 10 Fällen ging der Perikarderguss auf eine maligne Tumor-Grunderkrankung zurück. Neben den 7 zytologisch bestätigten malignen Tumorerkrankungen konnte in 3 Fällen histologisch ein Bronchialkarzinom vom plattenepithelialen Typ (Fall 3), eine Lymphangiosis Carcinomatosa (Fall 14) und ein Osteosarkom mit pulmonalen Filiae (Fall 27) gesichert werden. In 11 Fällen war die Genese der Perikarditiden mit Ergüssen unklar, die wahrscheinlichste Erklärung dieser idiopathischen Perikardergüsse war eine Entzündung viraler Genese. In einem Fall (Fall 21) konnte eine stattgehabte Infektion mit Parvovirus B19 nachgewiesen werden. Bei zwei Fällen standen kardiale Faktoren im Vordergrund für die Entstehung der Perikardergüsse (Fall 9 und 18). Weitere

Ursachen für die Perikardergüsse bildeten eine urämische Perikarditis bei Niereninsuffizienz (Fall 5), eine Perikarditis bei Z.n. Radiatio und in einem Fall ein traumatisches Ereignis bei der Implantation eines Schrittmachers. In 4 Fällen war eine multifaktorielle Genese wahrscheinlich (Fall 8, 10, 15 und 23).

Im folgenden sind einige Beispiele für die Zytologie der Perikardergüsse dargestellt:

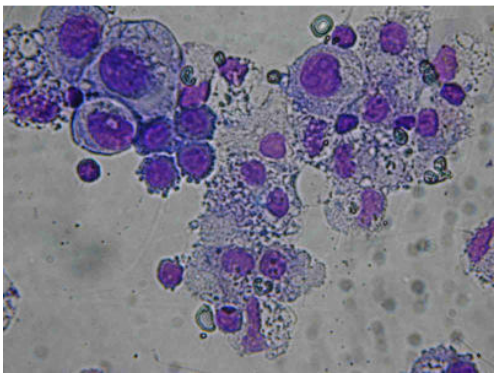

Abb. 3-1: Fall 1, maligne Zellen, Adenokarzinom der Mamma

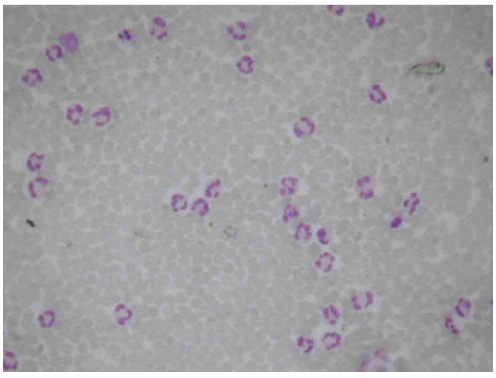

Abb. 3-2: Fall 8, entzündlicher Erguss, neutrophile Granulozyten

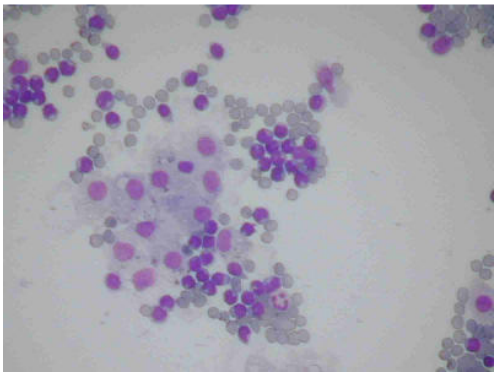

Abb. 3-3: Fall 11, Mesothelzellen, entzündlicher Erguss

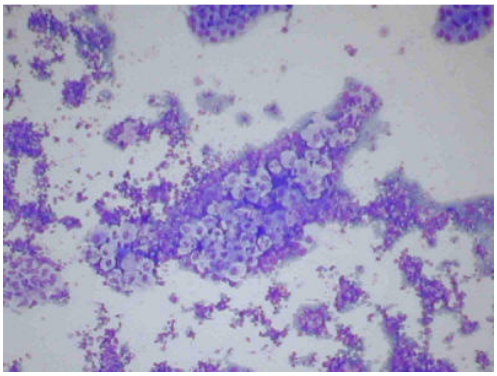

Abb. 3-4: Fall 16, maligner Erguss, Burkitt-Lymphom

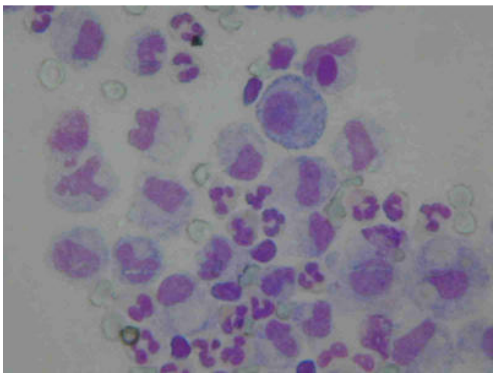

Abb. 3-5: Fall 24, entzündlicher Erguss, Myokarditis

Eine Übersicht der Patientendaten ist der nachfolgenden Tabelle 3-1 zu entnehmen. Sie zeigt auch die gemessenen Telomerase-Aktivitäten des konventionellen und des fluoreszenz-basierten TRAP-Assays.

Fall	Alter/ Geschl.	Grunderkrankung	Histologie	Zytologie	TRAP-Assay	Peak area GeneScan
1	50/w	Mamma-Ca mit Perikard-karzinose, G3 pT3 pN1	invasiv duktales Adenokarzinom	positiv	positiv	46.178
2	57/m	hochmalignes NHL		positiv	positiv	1.137.632
3	71/m	Bronchialkarzinom, Autoimmunthyreoditis, Diabetes mellitus	Plattenepithel-karzinom	entzündlich	negativ	0
4	56/w	chron. Perikarditis		negativ	negativ	0
5	64/w	urämische Perikarditis bei terminaler Niereninsuffizienz		negativ	negativ	0
6	56/w	chron. Perikarditis		entzündlich	negativ	9.131
7	36/w	Mamma-Ca mit Perikard-karzinose, G3, pT4 pN2	invasiv duktales Adenokarzinom	positiv	positiv	33.993
8	71/w	chron. Perikarditis, Pneu-monie, eingeschränkte Nierenfunktion, Pericarditis constructiva bei Arrythmia absoluta		entzündlich	negativ	0
9	47/m	schwere 3-Gefäß-KHK, hypertensive Krise Hypercholesterinämie, Perikarditis nach Sinusitis		negativ	positiv	0
10	69/m	KHK mit Vorhofflimmern, Niereninsuffizienz, Z.n. Tuberkulose (vor 50 Jahren)		entzündlich	negativ	0
11	53/m	chron. Perimyokarditis		Mesothelzellen	negativ	0
12	39/w	chron. Perimyokarditis		negativ	negativ	0
13	47/m	chron. Perimyokarditis		hämorrhagisch	negativ	0
14	61/m	Perikarditis, Z.n. transurethraler Prostataresektion	Lymphangitis carcinomatosa	negativ	negativ	0

15	75/w	chron. Perikardergüsse bei Borderlinemyokarditis, Evans-Syndrom mit hämolyt. Anämie, Hepatitis A		negativ	negativ	0
16	21/m	Burkitt-Lymphom		positiv	positiv	221.367
17	71/m	chron. Perikarditis		entzündlich, Mesothelzellen	negativ	0
18	72/w	kardiogener Schock nach Vorderwandinfarkt		entzündlich, Mesothelzellen	negativ	0
19	82/w	Z.n. Mamma-Ca. (vor 30 Jahren), Z.n. Radiatio, unauffälliger Verlauf		negativ	negativ	0
20	64/w	Mamma-Ca	Adenokarzinom	positiv	positiv	41.988
21	40/w	chron. rez. Perimyokarditis, virale	Parvovirus B 19	Mesothelzellen	negativ	0
22	33/m	chron. Perimyokarditis		entzündlich	negativ	0
23	50/m	Pneumonie, Infarkt, parainfektiöser Erguss		entzündlich	negativ	0
24	58/m	schwerste akute Myokarditis		entzündlich	negativ	0
25	57/m	Empyem im Thorax unklarer Genese		entzündlich	negativ	0
26	54/w	chron. Ergüsse bei Perimyokarditis, Asthma, Hyperthyreose		Mesothelzellen	negativ	13.925
27	55/w	Osteosarkom mit pulmonalen Filiae		negativ	positiv	39.330
28	72/w	Perikarderguss, Z.n. Schrittmacherimplantation		hämorrhagisch	negativ	0
29	65/m	Kolon-Ca mit Perionealkarzinose	Adenokarzinom	positiv	positiv	253.034
30	34/w	chron. Perimyokarditis		Mesothelzellen	negativ	0
31	48/w	Mamma-Ca, pleural metastasiert, Wirbelsäulen-metastasen, Oberbauchtumor mit Peritonealkarzinose	Adenokarzinom	positiv	positiv	438.904

Tab. 3-2: Patientendaten, Zytolgie und Ergebnisse der TRAP-Assays

3.4 Radioaktiver TRAP-Assay

3.4.1 Kriterien für Telomerase-Aktivität

Zunächst soll definiert werden, wann eine Probe für die Telomerase-Aktivität als positiv bzw. negativ gewertet wurde. Für diese Entscheidung wurden die folgenden Kriterien herangezogen:

1) Sollte eine Probe als Telomerase-positiv gewertet werden, so musste sie im TRAP-Assay das typische Muster der Telomerase-Leiter zeigen. Die einzelnen Banden der Leiter sollten sich dabei in ihrer Länge um je 6 Nucleotide unterscheiden, da dieser Abstand den telomerischen Repeats entspricht. Erst ab zwei Banden dieser Telomerase-Leiter wurde die Probe als positiv gewertet.

2) Um die Telomerase-Leiter von Primer-Artefakten zu unterscheiden, wurde auf jedes Gel eine Positiv-Kontrolle aufgetragen. Sie bestand aus einem Proteinextrakt von NCI-H69-Zellen, an deren Leiter die Proben verglichen wurden.

3) Jede Probe wurde auch unter Zusatz von RNAse gemessen, wodurch die in den Proben enthaltene RNA inaktiviert werden sollten. Da Telomerase-Aktivität RNA-Integrität voraussetzt, sollte unter RNAse-Zusatz keine Elongation im Sinne einer Leiter erfolgen.

4) Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde bei jedem durchgeführten TRAP-Assay ein Leerwert mitgemessen. Beim Leerwert wurde anstelle des Proteinextrakts Wasser in den Assay gegeben. In allen Assays zeigte der Leerwert eine einzelne Bande in der Größe von 50 Basenpaaren, die jedoch kein Zeichen von Kontamination darstellt. Die Ursache dieses Artefakts ist noch nicht sicher geklärt, man führt sie jedoch auf eine Dimerisierung der beiden Primer zurück (WU et al. 2000). Alle Telomerase-negativen Proben zeigten diese Bande ebenfalls.

Für den F-TRAP-Assay gelten zwar die gleichen allgemeinen Voraussetzungen wie für den oben beschriebenen konventionellen Assay, die Bewertung an sich muss jedoch noch geklärt werden (s. Abschnitt 3.5).

3.4.2 Telomerase-Aktivität in Perikardzytomaterial

In jedem der 7 malignen Perikardergüsse konnte Telomerase-Aktivität mit dem konventionellen TRAP-Assay nachgewiesen werden, jedoch zeigten auch zwei der zytologisch benigne eingestuften Ergüsse Telomerase-Aktivität (Fall 9 und 27). Interessanterweise findet sich in der Krankengeschichte des letztgenannten Patienten eine maligne Grunderkrankung. 22 von 24 Proben, die in der zytologischen Untersuchung keine malignen Zellen aufgewiesen haben, zeigten keine Telomerase-Aktivität im radioaktiven TRAP-Assay.

n=31	**Zyto pos.**	**Zyto neg.**
Telomerase pos.	7	2
Telomerase neg.	0	22

Tab. 3-3: Vierfeldertafel Perikardergüsse im konventionellen TRAP-Assay

Die Vierfeldertafel zeigt den Zusammenhang zwischen positivem bzw. negativem zytologischen Untersuchungsbefund und der gemessenen Telomerase-Aktivität. Maßstab für die Bewertung der zytologischen Untersuchung war der Befund zweier Pathologen, die jeweils unabhängig voneinander die diagnostische Untersuchung durchgeführt haben. Bei mikroskopisch bestätigtem Vorhandensein von malignen Zellen wurde die Zytologie als positiv erachtet. Alle anderen Proben galten als negativ.

Die Vierfeldertafel dient als Grundlage der Berechnung von Sensitivität und Spezifität. Daraus ergibt sich für den radioaktiven Assay eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 91,7 %.

3.4.3 Beispiele anhand von Perikardzytomaterial

Die nachfolgenden Abbildungen enthalten Beispiele für einige Gele des konventionellen TRAP-Assays:

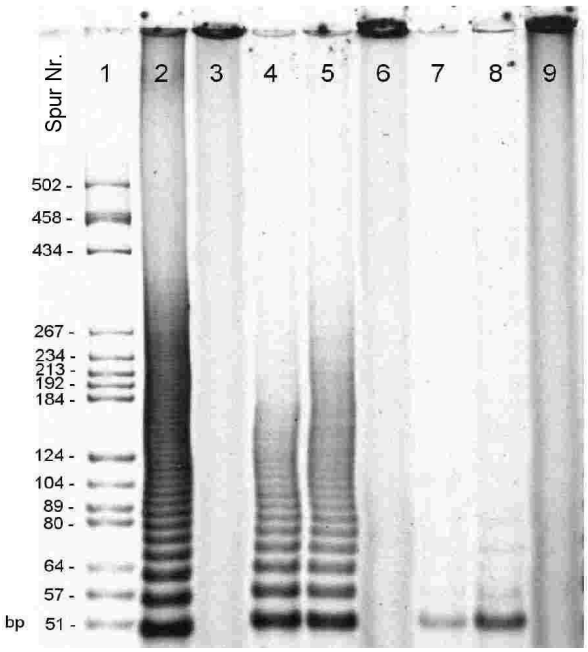

Abb. 3-6: Konventioneller TRAP-Assay von Perikardergüssen a): Spuren wie folgt:

1 DNA Längenstandard

2-3 NCI-H69 pos. Kontrolle

4-6 hochmalignes Non-Hodgkin-Lymphom (Fall 2)

7-9 Perikarditis (Fall 4)

3/6/9 inaktiviert mit RNAse

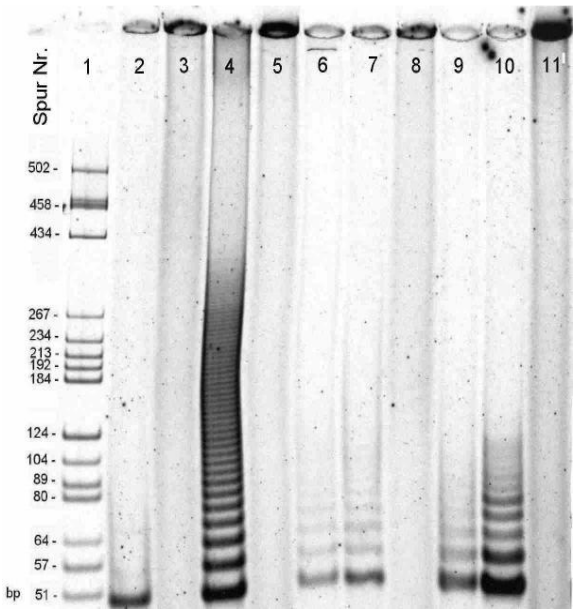

Abb. 3-7: Konventioneller TRAP-Assay von Perikardergüssen b): Spuren wie folgt:

1 DNA Längenstandard

2-3 Leerwert

4-5 NCI-H69 pos. Kontrolle

6-8 Adenokarzinom der Mamma (Fall 20)

9-11 Burkitt-Lymphom (Fall 16)

3/5/8/11 inaktiviert mit RNAse

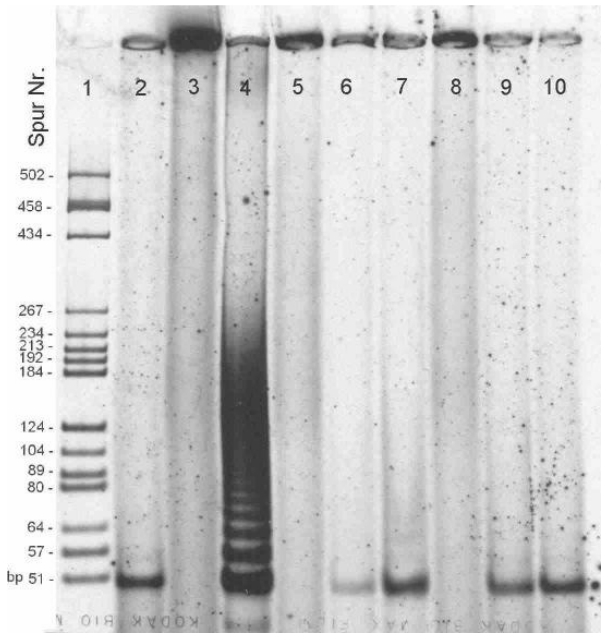

Abb. 3-8: Konventioneller TRAP-Assay von Perikardergüssen c): Spuren wie folgt:

1 DNA Längenstandard

2 Leerwert

3-4 NCI-H69 pos. Kontrolle

5-7 Myokardinfarkt (Fall 18)

8-10 chron. Perikarditis (Fall 17)

3/5/8 inaktiviert mit RNAse

3.5 Fluoreszenz-basierter TRAP-Assay

Grundsätzlich gilt für die Bewertung der fluoreszenz-gemessenen Telomerase-Aktivitäten die gleiche Beurteilungsgrundlage wie beim konventionellen Assay, d.h. es wird ein reiner Leerwert ebenso gefordert wie eine erfolgreiche RNAase-Inaktivierung. Der Vorteil der automatischen Analyse der Fragmentlängen liegt in der eindeutigen Identifizierung der Telomerase-Leiter, deren Banden den 6-Nucleotid-Abstand aufweisen, so dass ein Vergleich zur Positiv-Kontrolle entfallen kann.

Bei den Verdünnungsreihen für die Quantifizierungsversuche spielte die qualitative Aussage „Telomerase-Aktivität vorhanden/nicht-vorhanden“ keine Rolle. Vielmehr sollten die absoluten Werte der Telomerase-Aktivität in Form der „Peak areas“ notiert

werden. Dabei wurden die „Peak areas“ aller Banden, die telomerische Repeats darstellten und Teil der Telomerase-Leiter waren, addiert. Die erste Bande, die artefiziell durch Primer-Dimerisierung entstanden war und auch beim Leerwert auftauchte, wurde nicht mitberechnet. Die Summe ergab die totale „Peak area“ und bildete die relative Einheit der Telomerase-Aktivität in einem Proteinextrakt.

Erst bei der Untersuchung der Perikardergüsse mit der F-TRAP Methode sollte auch die Entscheidung zwischen positiver und negativer Telomerase-Aktivität getroffen werden. Dabei galt eine Probe nur dann als positiv für Telomerase-Aktivität, wenn ein bestimmter „Cut-off“-Wert der „Peak area“ überschritten wurde und zwar unabhängig davon, ob Telomerase-Aktivität detektierbar war oder nicht. Eine Probe, bei der Telomerase-Aktivität zwar in geringem Maße detektiert worden war, jedoch unterhalb des „Cut-off“-Wertes lag, wurde als Telomerase-negativ gewertet. Der „Cut-off“-Wert wurde durch die Verdünnungsreihen bestimmt, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt zusammengefasst worden sind.

3.5.1 Standardisierung anhand einer Verdünnungsreihe von NCI-H69-Zellen

Die Tauglichkeit der Methode zur Quantifizierung von Telomerase-Aktivität wurde mit einer Serie von NCI-H69-Verdünnungsreihen untersucht. Hierfür ist die humane kleinzellige Lungenkrebslinie NCI-H69 geeignet, da sie über ein hohes Maß an Telomerase-Aktivität verfügt (HIYAMA et al. 1995). Sie sollte die Tumorzellen *in vivo* imitieren und diente für den ersten Verdünnungsversuch als Grundlage, um die Tauglichkeit der F-TRAP Methode festzustellen.

Zunächst wurde eine einzelne Verdünnungsreihe von NCI-H69–Zellen angesetzt. Zu beachten war, dass eine Proteinextraktion aus 10 oder 100 einzelnen Tumorzellen bei der Verarbeitung zu einem großen Zellverlust führen und dadurch ungenauere Ergebnisse erzielt werden können. Aus diesem Grund erfolgte die Proteinextraktion aus einer definierten Anzahl von Tumorzellen ausreichender Menge (ca. 1 Million). Dabei wurde die Menge des Lyse-Puffers so gewählt, dass eine Konzentration von 10.000 Zellen pro µl entstand. Da es sich um einen Proteinextrakt handelte, wird weiterhin von Zelläquivalenten anstelle von absoluten Zellzahlen gesprochen. Die Konzentration von 10.000

Zelläquivalenten wurde durch Verdünnung so eingestellt, dass Äquivalente von 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 und 10.000 Zellen pro µl entstanden.

Die gemessenen „Peak areas“ für die einzelnen Zelläquivalente zeigten einen konstanten Anstieg in Abhängigkeit von ihrer Zellzahl. Bei den TRAP-Produkten wurde bei jedem Zelläquivalent die typische Abfolge der telomerischen Repeats im Abstand von je 6 Nucleotiden festgestellt.

Der Leerwert wies ebenso wie in dem konventionellen TRAP-Assay eine Bande im Bereich von 50 bp auf. Auffallend war bereits zu diesem Zeitpunkt, dass beim F-TRAP speziell im Bereich niedriger Zellzahlen deutlich mehr Banden identifiziert wurden. Die längeren Telomerase-Leiter entsprechen länger elongierten TS-Primern, woraus sich die Schlussfolgerung ziehen lässt, dass der F-TRAP eine sensitivere Methode darstellt als der konventionelle Assay.

Ein wichtiges Kriterium für die Tauglichkeit einer Methode (insbesondere für eine Quantifizierung) ist die Reliabilität der Messwerte. Dies bedeutet, dass bei wiederholten Messungen im Idealfall dieselben, jedoch zumindest nicht größere Abweichungen der Messwerte aufgezeichnet werden sollten. Die nachfolgend beschriebenen Versuche dienten der Untersuchung, ob die F-TRAP-Methode diesem Anspruch der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse genügt. Die Messung erfolgte in drei Stufen zur Überprüfung der Validität verschiedener Teilabschnitte des TRAP-Assays:

(1) Reproduzierbarkeit der Analyse eines Amplifikats auf verschiedenen Gelen (Abschnitt 3.5.1.1). Prinzipielle Eignung der Methode und Testung des Gellaufs.

(2) Reproduzierbarkeit der Analyse der Amplifikate aus unterschiedlichen Verdünnungsreihen (Abschnitt 3.5.1.2). Prinzipielle Wiederholbarkeit der Versuche, Überprüfung der Stabilität hergestellter Proteinextrakte. Standard-NCI-H69-Verdünnungsreihe.

(3) Probenelongation mittels Telomerase. Prinzipielle Vergleichbarkeit verschiedener Elongationsansätze (Abschnitt 3.5.1.3).

Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

3.5.1.1 Reproduzierbarkeit der Analyse eines Amplifikats auf verschiedenen Gelen

In dem ersten Versuch wurden die Produkte eines F-TRAP-Assays auf verschiedene Gele aufgetragen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Aufgrund der Automatisierung des Gellaufs mit Hilfe der GeneScan-Technik, waren in diesem Versuchsabschnitt keine großen Abweichungen zu erwarten.

Den Ausgangspunkt der Untersuchung bildeten die F-TRAP Produkte der NCI-H69-Verdünnungsreihe, die in Abschnitt 3.5.1 beschrieben wurde. Insgesamt wurden dieselben F-TRAP-Produkte viermal auf neue Gele aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Analyse der Bandenintensität erfolgte wie bereits beschrieben automatisch durch die GeneScan-Software.

Für die Auswertung der Verdünnungsreihe wurde für jedes Zelläquivalent der Mittelwert der gemessenen „Peak areas“ gebildet. Um die Variabilität der Messung zu quantifizieren, wurde die Standardabweichung der „Peak areas“ pro Zelläquivalent errechnet (Graph Pad Software 1991-1999). In der Abb. 3-9 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Der Graph zeigt auf der x-Achse die NCI-H69-Zelläquivalente in ansteigender Konzentration (doppellogarithmisch aufgetragen gegen die gemessene „Peak area“).

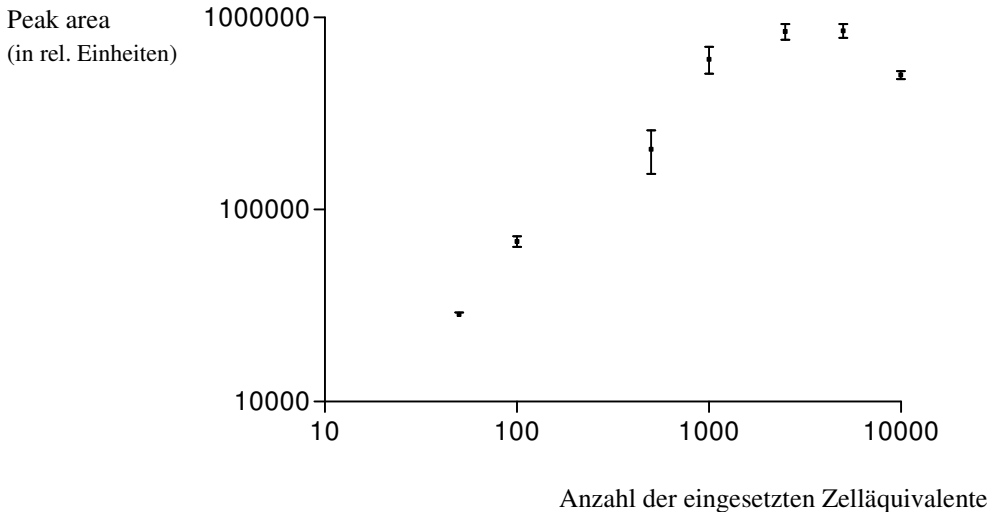

Abb. 3-9: Messwerte der NCI-H69-Verdünnungsreihe bei verschiedenen Gelen
(mit Mittelwerten und Standardabweichungen)

Nachfolgend werden zunächst die Ergebnisse für die Mittelwerte der „Peak areas“ der NCI-H69-Verdünnungsreihe beschrieben:

Sie zeigen einen konstanten Anstieg der Telomerase-Aktivität bei steigender Zellzahl bis ein Sättigungsniveau bei 2.500 Zelläquivalenten erreicht wird. Dabei beträgt die durchschnittliche Enzymaktivität (also die totale „Peak area“ der Telomerase-Leiter) bei 50 Zelläquivalenten ca. 29.000 rel. Einheiten. Diese Aktivität steigt auf 206.000 bei 500 Zelläquivalenten an. Zu Beginn des Sättigungsniveaus beträgt die gemessene „Peak area“ 845.000 rel. Einheiten.

Bei allen Zelläquivalenten über 2.500 Zellen konnte trotz einer Konzentrationssteigerung kein Anstieg der Enzymaktivität gemessen werden. Bei der höchsten gewählten Konzentration von 10.000 Zelläquivalenten ging die Telomerase-Aktivität sogar auf 502.000 rel. Einheiten im Durchschnitt zurück.

Die Standardabweichungen der „Peak areas“ von den Mittelwerten der einzelnen Zelläquivalente sind für alle Konzentrationen gering. Die gemessenen „Peak areas“ liegen also in einem relativ engen Bereich und erfüllen damit eine wichtige Voraussetzung für eine hinreichende, reliable Quantifizierung.

Lediglich die Messwerte der 500er Zelläquivalente weichen stärker voneinander ab: die „Peak areas“ für diesen Wert reichen von 132.000 bis 360.000 rel. Einheiten. Im Vergleich hierzu reichen die Werte bei 50 oder 100 Zelläquivalenten nur 2.400 bzw. 17.000 rel. Einheiten auseinander.

3.5.1.2 Reproduzierbarkeit der Analyse von Amplifikaten aus unterschiedlichen Verdünnungsreihen

Mit einer weiteren Verdünnungsreihe sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse auch dann reproduzierbar sind, wenn die NCI-H69 Zelläquivalente in zeitlich voneinander getrennten TRAP-Assays eingesetzt werden. Es wurden 10 Verdünnungsreihen vom selben Proteinextrakt in 10 TRAP-Assays eingesetzt und an unterschiedlichen Tagen elongiert und amplifiziert. Die Produkte wurden (wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben) auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit dem GeneScanner analysiert. In der folgenden Abbildung 3-10 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Ebenso wie im ersten Versuch ist die „Peak area“ doppel-logarithmisch gegen die Zelläquivalente aufgetragen.

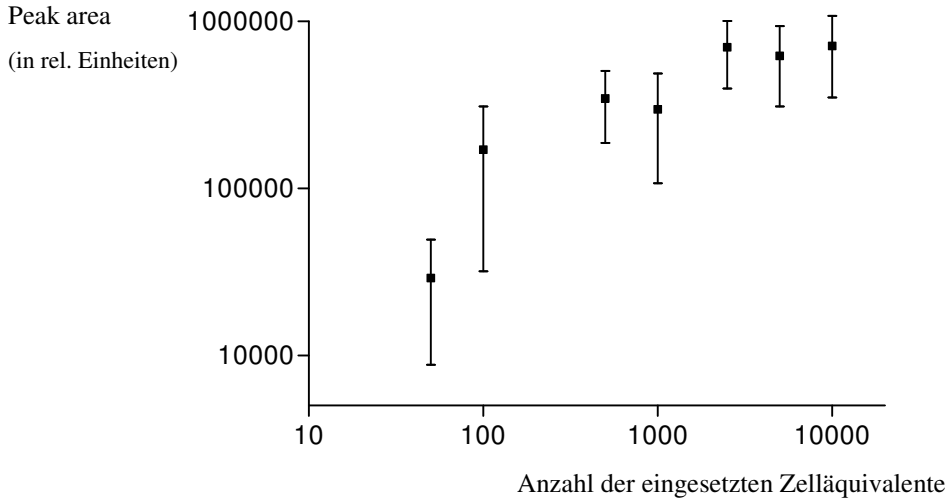

Abb. 3-10: Standard-NCI-H69-Verdünnungsreihe bei unterschiedlichen TRAP-Assays (mit Mittelwerten und Standardabweichungen)

Die Durchschnittswerte der „Peak areas“ (stellvertretend für die Telomerase-Aktivität) der NCI-H69-Verdünnungsreihe aus unterschiedlichen TRAP-Assays zeigen ähnlich wie bei dem vorangegangenen Versuch einen konstanten Anstieg der Telomerase-Aktivität mit zunehmender Zellzahl. Bei 2.500 Zelläquivalenten erreicht die Enzym-

aktivität einen Sättigungspunkt. Eine Erhöhung der Zelläquivalente bewirkte keine Steigerung der gemessenen „Peak area“, d.h. der Sensitivität.

Für 50 eingesetzte Zelläquivalente wurde eine durchschnittliche Telomerase-Aktivität von 32.000 rel. Einheiten gemessen, 10.000 Zellen hatten einen Durchschnitt von 720.000 rel. Einheiten. Lediglich die durchschnittliche „Peak area“ für 500 bzw. 1.000 Zelläquivalente fällt aus dem Rahmen der linearen Kurve heraus: der Durchschnittswert für 1.000 Zelläquivalente (298.000 rel. Einheiten) liegt unter dem von 500 Zelläquivalenten (346.000 rel. Einheiten).

Bei der Variabilität der Messwerte innerhalb der einzelnen Zelläquivalente fällt auf den ersten Blick eine größere Abweichung der Messwerte vom Mittelwert auf als beim ersten Versuch. So lagen beispielsweise die Messwerte für die „Peak areas“ der Telomerase-Leiter bei dem Einsatz von 50 Zelläquivalenten zwischen 16.000 und 68.000 rel. Einheiten. Während sich im unteren Konzentrationsbereich nur geringe Schwankungen zeigten (bei 100 Zelläquivalenten belief sich die Standardabweichung auf 139.000 rel. Einheiten), wurde die Messbreite bei höheren Konzentrationen deutlich größer: die Standardabweichung bei 5.000 Zelläquivalenten betrug 313.000 Einheiten.

Die auf der Basis von NCI-H69-Zellen ermittelte Standardverdünnungsreihe wurde als Bezugsbasis für alle weiteren Ergebnisse gewählt.

Die festgestellten Abweichungen bedeuten zwar eine Einschränkung der Aussagefähigkeit der Quantifizierung durch den F-TRAP-Assay, jedoch scheint eine Trennung zwischen starker und schwacher Telomerase-Aktivität möglich zu sein. Eine ausführlichere Diskussion erfolgt in Kapitel 4.

Um die Ursachen für diese Schwankungen zu klären, wurde im weiteren Verlauf die erste Phase des TRAP-Assays, d.h. der Elongationsschritt, näher untersucht (s. Abschnitt 3.5.1.3).

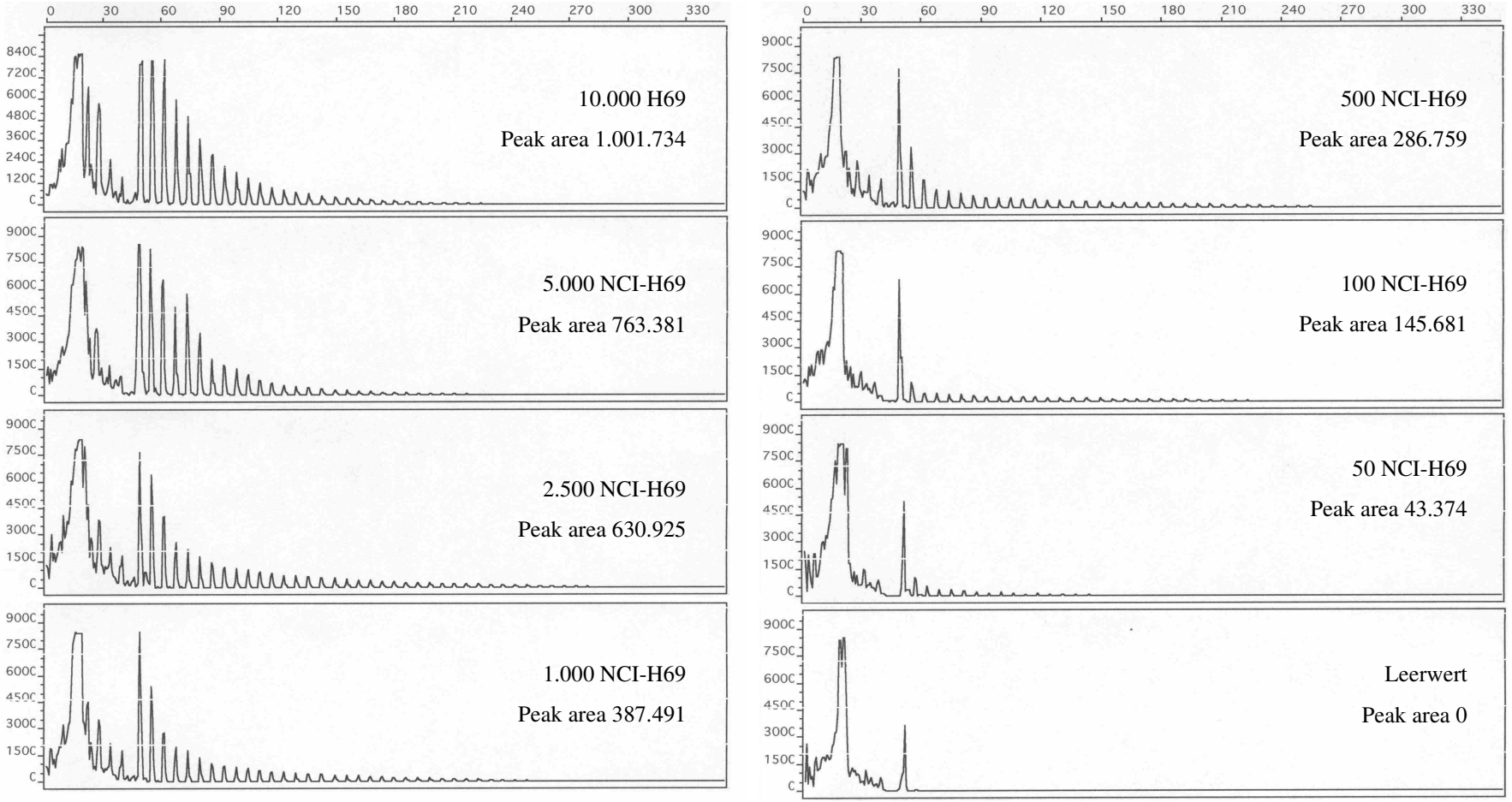

Abb. 3-11: NCI-H69-Verdünnungsreihe im F-TRAP-Assay: Telomerase-Aktivität und „Peak areas“ (in rel. Einheiten) **in Abhängigkeit von den eingesetzten Zelläquivalenten**

3.5.1.3 Probenelongation mittels Telomerase

Mit dem Elongationsversuch sollte eine Erklärung für die Schwankungen in der oben beschriebenen Verdünnungsreihe gefunden werden. Da ein Amplifikat bei wiederholter Gelelektrophorese ähnliche Ergebnisse liefert, war zu vermuten, dass die Abweichung bereits während des TRAP-Assays stattfindet. Prinzipiell könnte demnach sowohl die Telomerase-Extension als auch die nachfolgende Amplifikation über PCR zu der Abweichung führen. Auf einen internen Standard, der die Qualität der PCR überprüfen könnte, wurde jedoch aus Gründen der Sensitivität verzichtet (vgl. Abschnitt 4.7). Der Elongationsversuch diente insbesondere dazu, den Einfluss der Telomerase-Extension auf die Reliabilität des TRAP-Assays zu untersuchen.

Grundlage des Versuches bildete eine vereinfachte Verdünnungsreihe. In den TRAP-Assay wurden Zelläquivalente von 100 und 5.000 Zellen eingesetzt. Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Äquivalente wurden in zwei Ansätzen gemessen. Im ersten Ansatz fand der Elongationsschritt in einem Reaktionsgefäß statt - erst danach wurden die Proben aufgeteilt. Im zweiten Ansatz wurden die Zelläquivalente wie bei den herkömmlichen Verdünnungsreihen bereits vor der Elongation aufgeteilt.

Wie aus der Abb. 3-12 ersichtlich, liegen die bei der gemeinsamen Elongation gemessenen Werte deutlich enger zusammen als die Werte, die aus dem Ansatz stammen, in dem die Äquivalente schon vor der Elongation aufgetrennt wurden. In beiden Kurven sind die „Peak areas“ (linear) gegen die Zelläquivalente (logarithmisch) aufgetragen (n=8).

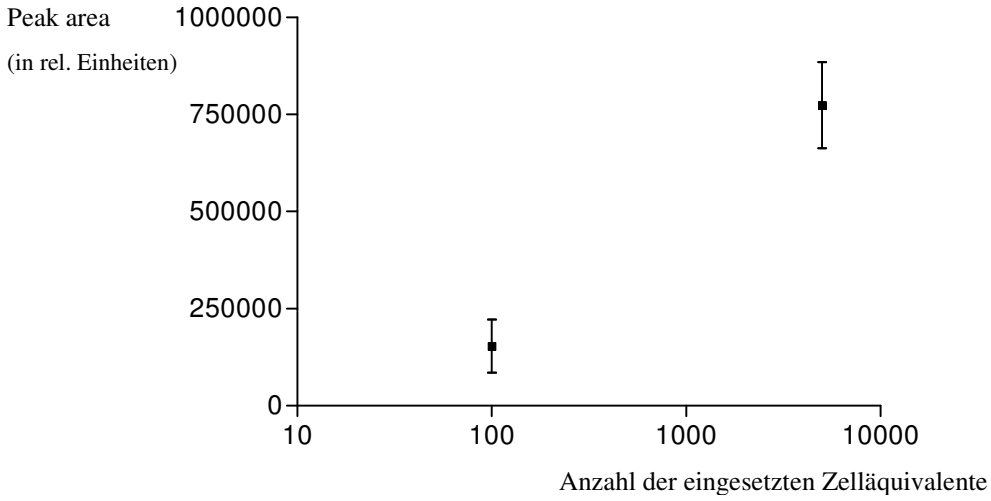

Abb. 3-12: *Getrennte* Elongation der Proben
(mit Mittelwerten und Standardabweichungen)

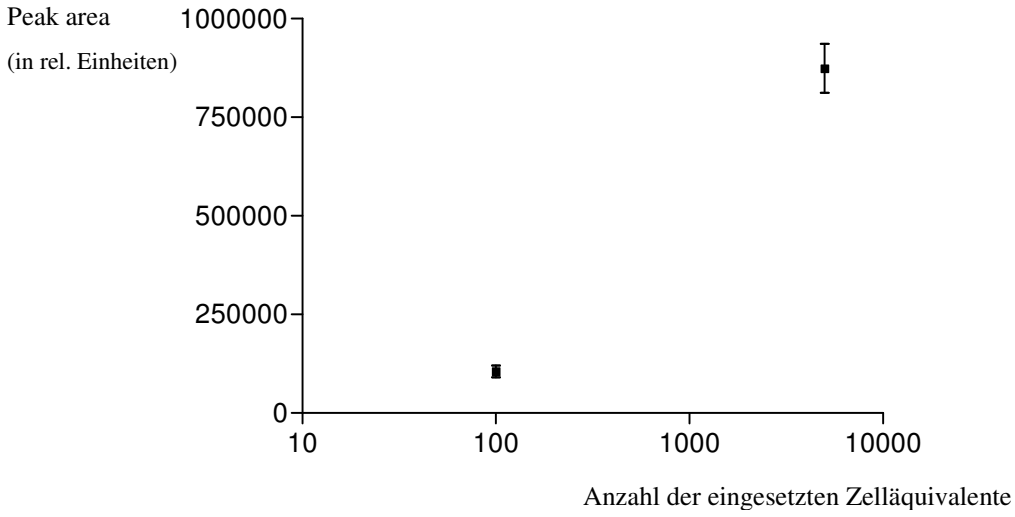

Abb. 3-13: *Gemeinsame* Elongation der Proben
(mit Mittelwerten und Standardabweichungen)

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Standardabweichungen einer Verdünnungsreihe bei simultaner Elongation im gleichen Reaktionsansatz geringer sind als die der zeitlich getrennten Versuchsansätze.

Die durchschnittliche „Peak area“ liegt bei der getrennten Elongation für 100 Zelläquivalente bei 154.000 rel. Einheiten und für 5.000 Zelläquivalente bei 774.000. Als Durchschnittswerte wurden für den F-TRAP-Assay mit gemeinsamer Elongation 105.000 Einheiten für 100 Zelläquivalente und 874.000 Einheiten für 5.000 Zelläquivalente ermittelt. Bei vergleichbar großen Mittelwerten variieren die Werte innerhalb eines Zelläquivalents bei der getrennten Elongation stärker als bei der gemeinsamen: die Standardabweichung beträgt bei 5.000 Zelläquivalenten 221.000 rel. Einheiten für die getrennte und nur 125.000 rel. Einheiten für die gemeinsame Elongation, bei 100 Zelläquivalenten beträgt sie 137.000 bzw. 29.000 rel. Einheiten.

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die Phase der Primer-Extension für die Abweichung verantwortlich ist. Die Elongation verläuft nicht linear und wenig konstant. Sie stellt in jedem Fall einen einschränkenden Faktor für die Quantifizierbarkeit der Telomerase-Aktivität dar.

3.5.2 Verdünnungsreihen von $CD34^+$- und mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die Verdünnungsreihen aus $CD34^+$-Zellen und aus proliferierenden benignen Zellen sollten Aufschluss geben über die Höhe von Telomerase-Aktivität in Zellen, die eine mögliche Hintergrundaktivität in entzündlichen Perikardergüssen verursachen könnten. In den TRAP-Assay wurde eine Verdünnungsreihe von Proteinextrakten aus CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen sowie aus mononukleären Zellen aus peripherem Blut eingesetzt. Die $CD34^+$-Zellen wurden FACS-analysiert (freundlicherweise durchgeführt von Dr. Andreas Burchert). Sie wiesen eine Reinheit von 96 % auf. Zum Zeitpunkt der Telomerase-Aktivitätsmessung befanden sich diese Zellen aufgrund einer Aktivierung mit Interleukinen und Stammzellfaktoren (vgl. Abschnitt 2.1.7.2.3) auf dem Höhepunkt ihrer Proliferationsrate.

Bei den $CD34^+$-Zellen konnte bis zu einer Verdünnung von 1.000 Zelläquivalenten (2.300 rel. Einheiten) keine Telomerase-Aktivität nachgewiesen werden. Die höchste Aktivität wurde in 10.000 Zelläquivalenten mit einer „Peak area“ von 28.000 rel. Einheiten gemessen. In den mononukleären Zellen war die Aktivität nur in geringem Maße

und nur in den beiden höchsten Konzentrationen von 5.000 bzw. 10.000 Zelläquivalenten messbar, sie betrug 1.500 bzw. 1.900 rel. Einheiten.

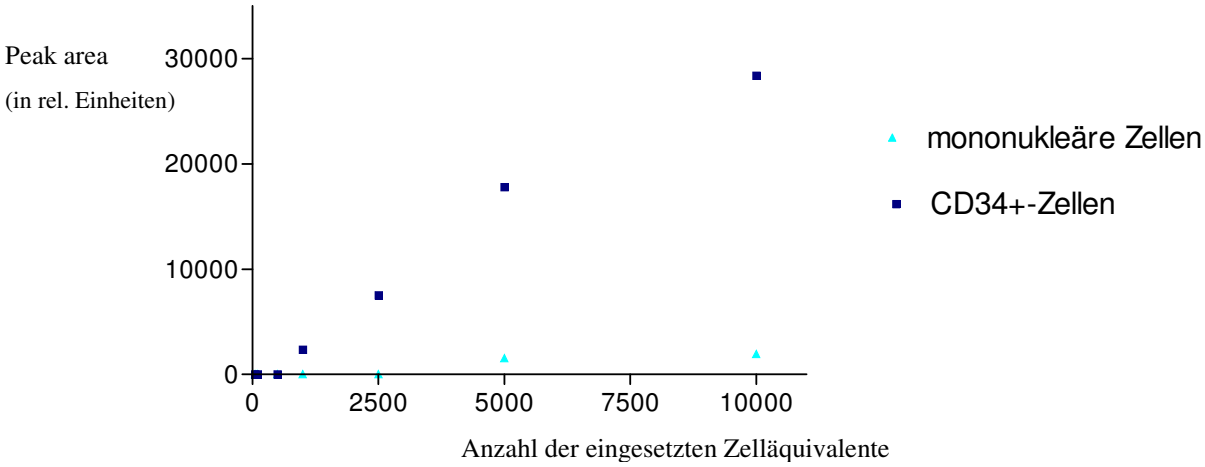

Abb. 3-14: Hintergrund-Telomerase-Aktivität

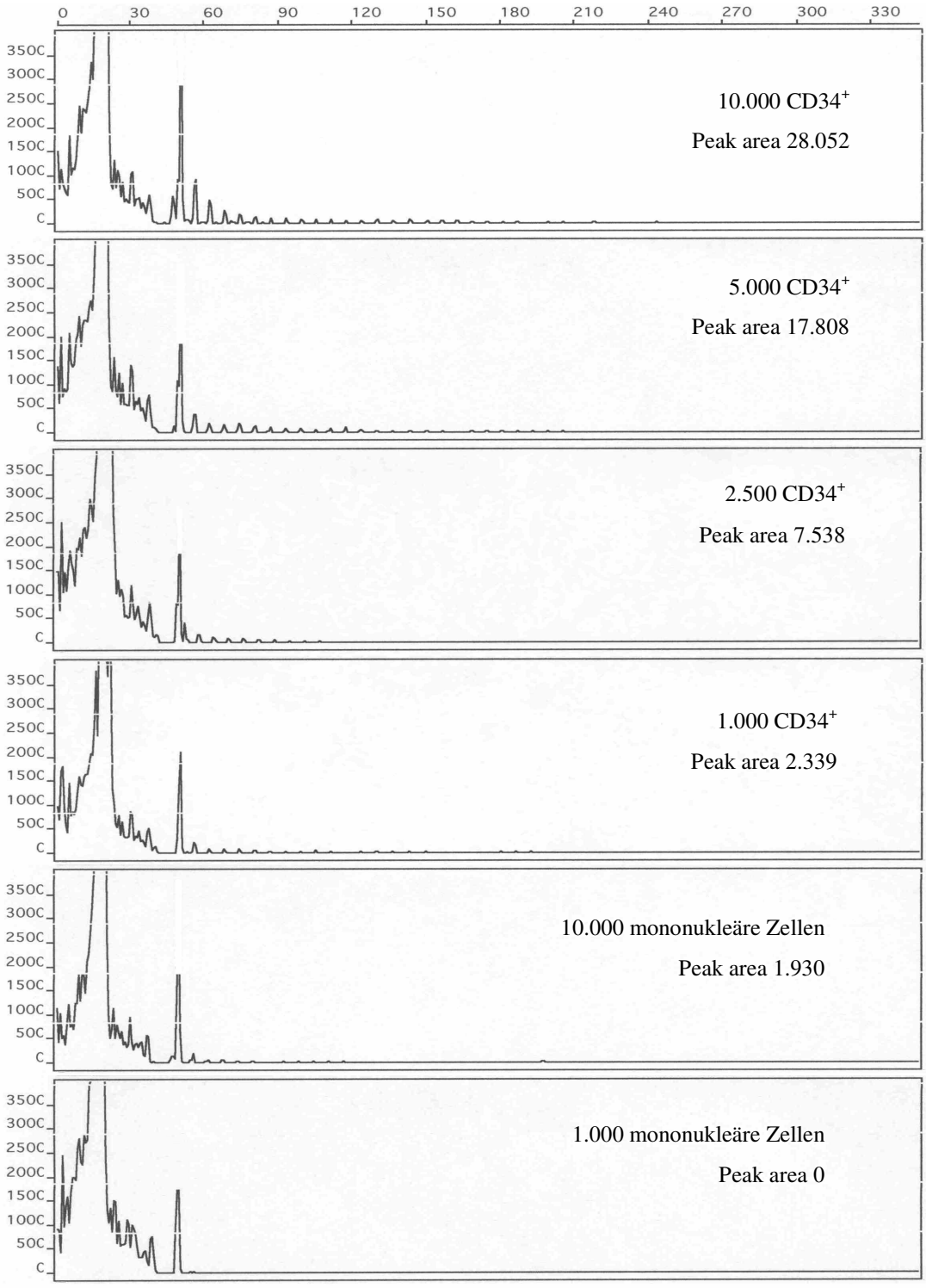

Abb. 3-15: CD34$^+$-Zellen und mononukleäre Zellen im F-TRAP-Assay: Telomerase-Aktivität und „Peak areas“ (in rel. Einheiten) **in Abhängigkeit von den eingesetzten Zelläquivalenten** (größerer Maßstab als in Abb. 3-11)

Perikardergüsse stellen ein Mischkompartiment dar, in dem Mesothelzellen, Entzündungszellen und gegebenenfalls auch Tumorzellen nebeneinander vorkommen können. Für die Quantifizierung ist daher auch wichtig, ob das Vorhandensein von Nicht-Tumorzellen die Messung der Telomerase-Aktivität beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurden Zelläquivalente der NCI-H69-Verdünnungsreihe mit Zelläquivalenten der $CD34^+$- bzw. mononukleären Zellen gemischt und mit Hilfe des F-TRAP-Assays untersucht.

Für diesen Versuch wurde stets ein Zelläquivalent von 10.000 Zellen in gemischter Zusammensetzung gemessen. Dabei wurde eine NCI-H69-Verdünnungsreihe in den üblichen Konzentrationsstufen untersucht, wobei die fehlende Zellzahl bis 10.000 entsprechend mit Äquivalenten von $CD34^+$- oder mononukleären Zellen aus peripherem Blut aufgefüllt wurde. Beispielsweise wurden 50 NCI-H69-Zelläquivalente mit 9.950 $CD34^+$-Zell-äquivalenten oder 2.500 NCI-H69-Zellen mit 7.500 mononukleären Zellen gemischt.

Die Ergebnisse der beiden Mischreihen (NCI-H69/$CD34^+$ und NCI-H69/mononukleäre Zellen) sind graphisch in der folgenden Abbildung 3-16 dargestellt, zum Vergleich sind auch die Mittelwerte der NCI-H69-Standardreihe (vgl. Abschnitt 3.5.1.2) eingetragen.

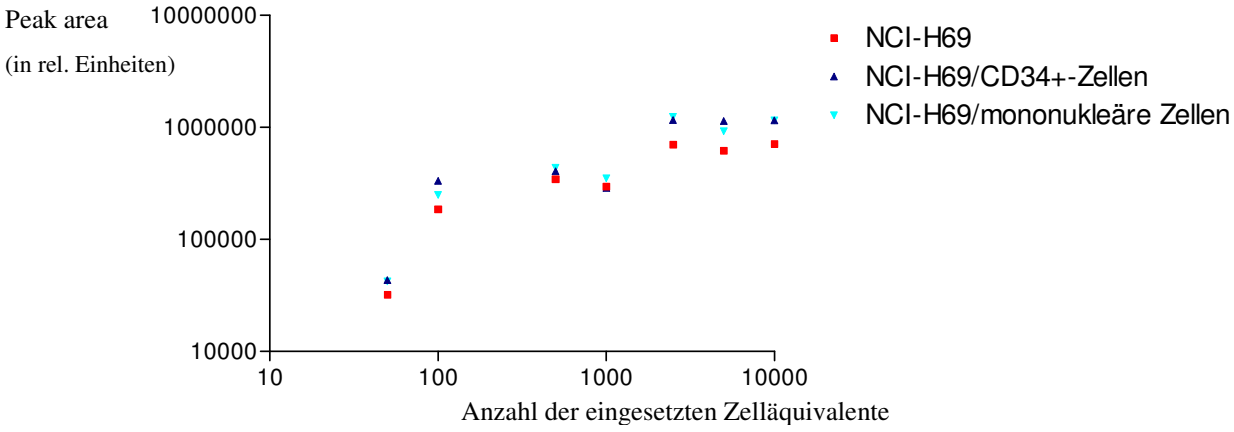

Abb. 3-16: Telomerase-Aktivität in einem Mischkompartiment

Zu erkennen ist, dass die Telomerase-Aktivität der NCI-H69-Zellen sowohl bei Zugabe von $CD34^+$- als auch von mononukleären Zell-Äquivalenten ähnlich große Aktivitäts-Level liefert wie die NCI-H69-Standardreihe. Dies gilt für alle Konzentrationsbereiche.

50 Zelläquivalente der NCI-H69-Reihe erreichten bei einer Beimischung von $CD34^+$-Zellen eine „Peak area“ von 43.000 rel. Einheiten bzw. 42.000 bei einer Vermengung mit mononukleären Zellen. Die Standardabweichung beträgt in beiden Fällen nur ca. 10.000 rel. Einheiten vom Mittelwert. Bei 500 NCI-H69-Äquivalenten wurde eine Abweichung zur Standardreihe von etwa 60.000 rel. Einheiten (mit $CD34^+$-Zellen) bzw. von 88.000 für die mononukleären Zellen ermittelt.

3.5.3 Ergebnisse anhand von Perikardzytomaterial

Bei den Punktionsproben wird die Telomerase-Aktivität im F-TRAP-Assay ebenfalls über die „Peak area“ bestimmt. Hierbei zeigten 10 Perikardergüsse die typische Telomerase-Leiter, dazu zählten auch alle 7 durch die Zytologie maligne eingestuften Er-

güsse. Die Werte für die „Peak areas“ reichten von ca. 9.000 bis ca. 1.100.000 rel. Einheiten.

Sämtliche Proben von Patienten mit zytologisch positivem malignen Befund zeigten Telomerase-Aktivität. Die „Peak areas“ reichten von ca. 34.000 bis ca. 1.100.000 rel. Einheiten. In drei zytologisch unauffälligen Patientenproben wurde ebenfalls Telomerase-Aktivität detektiert, allerdings mit geringeren „Peak areas“, nämlich von nur 9.000 bis 39.000 rel. Einheiten. In allen anderen 21 Ergüssen konnte keine Telomerase-Aktivität festgestellt werden. Aus den Ergebnissen errechnet sich eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 87,3 %. Unter Berücksichtigung eines „Cut-off“-Wertes (vgl. nächster Abschnitt) wurden alle diejenigen Proben als Telomerase-negativ gewertet, deren „Peak area“ der Telomerase-Leiter unter 30.000 Einheiten lag. Eine entsprechende Vierfeldertafel ist in der Tabelle 3-4 dargestellt. Bei gleicher Sensitivität (100 %) errechnet sich eine Spezifität von 95,8 % bei einem „Cut-off“-Wert von 30.000 rel. Einheiten.

n=31	**Zyto pos.**	**Zyto neg.**
Telomerase pos.	7	1
Telomerase neg.	0	23

Tab. 3-4: Vierfeldertafel Perikardergüsse im F-TRAP-Assay bei einem „Cut-off“-Wert von 30.000 rel. Einheiten

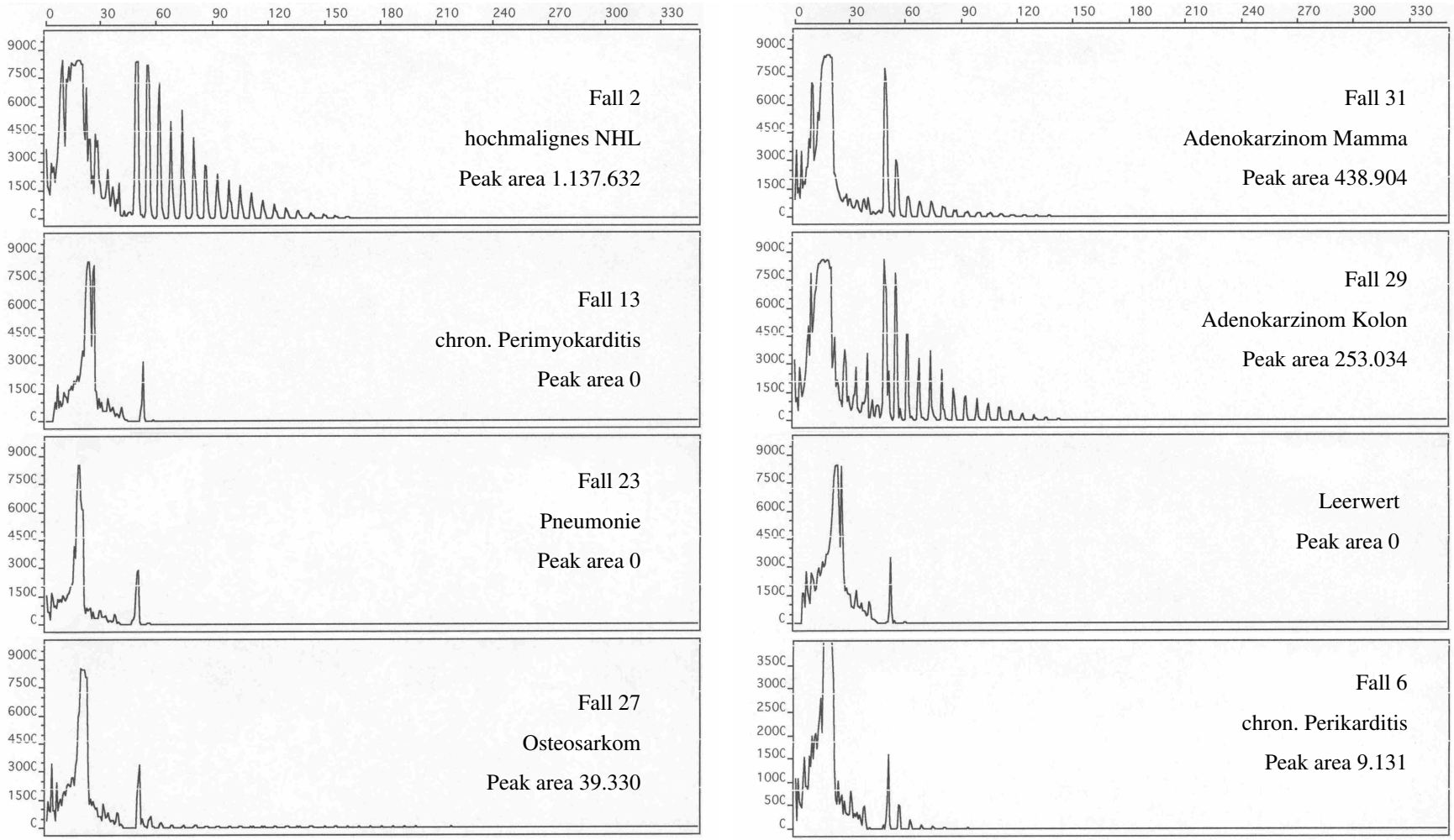

Abb. 3-17: Perikardergüsse im F-TRAP-Assay: Telomerase-Aktivität und „Peak areas“
(in rel. Einheiten)

3.5.4 Bestimmung eines „Cut-off"-Wertes unter Betrachtung der Veränderung der Sensitivität und Spezifität

Die Spezifität und Sensitivität der Methode verändern sich in Abhängigkeit von der Höhe des gewählten „Cut-off"-Wertes. In der folgenden Tabelle 3-5 sind diese Veränderungen noch einmal zusammengefasst und in der Abbildung 3-18 graphisch dargestellt.

„Cut-off"-Wert (in rel. Einheiten)	**Sensitivität** (in %)	**Spezifität** (in %)
0	100	87,3
10.000	100	91,7
20.000	100	95,8
30.000	100	95,8
40.000	85,7	100
50.000	57,1	100

Tab. 3-5: Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit vom „Cut-off"-Wert

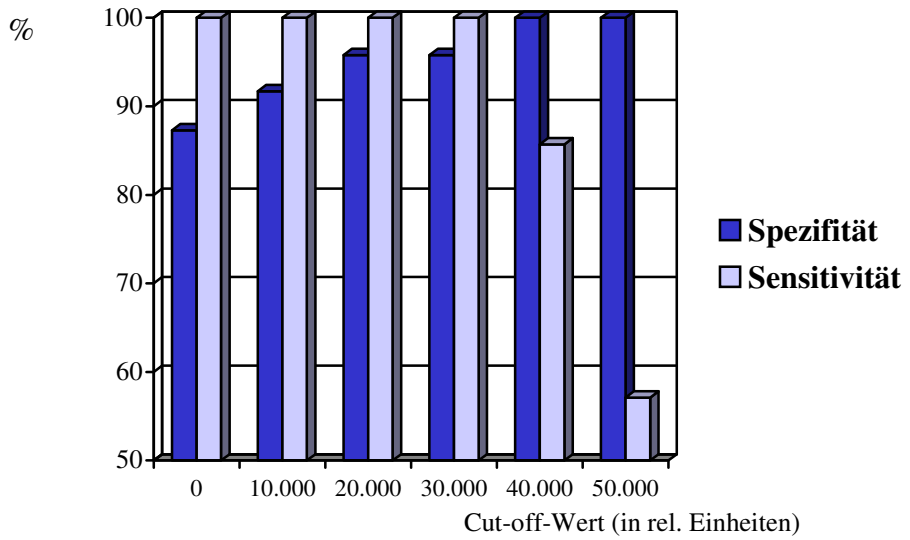

Abb. 3-18: Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit vom „Cut-off"-Wert

Die Balken stellen die Veränderung der Spezifität (dunkelblau) und Sensitivität (hellblau) unter Verschiebung des „Cut-off"-Wertes dar. In der vorliegenden Arbeit wurde der Wert von 30.000 rel. Einheiten als Grenzwert festgelegt, da er die beste Sensitivität (100 %) wie auch eine vertretbare Spezifität (95,8 %) garantiert und bei den Hintergrundaktivitätsversuchen weder von $CD34^+$-Zellen noch von mäßig proliferierenden mononukleären Zellen überschritten worden ist. Die Wahl des „Cut-off"-Wertes wird im nächsten Kapitel noch ausführlich diskutiert.

4 Diskussion

In der klinischen Praxis stellt die Beurteilung von malignen und nicht malignen Perikardergüssen ein ständiges, verbesserungswürdiges Problemfeld dar. Die Sensitivität der konventionellen Zytologie wird für die Erkennung von malignen Zellen als unbefriedigend eingestuft (MOTHERBY et al. 1999). Erkennbar wird dies insbesondere auch durch den häufigen Gebrauch von unbestimmten Formulierungen in zytopathologischen Befunden wie z.B. „verdächtig auf Tumorzellen“ oder „atypische Zellen“ (MOTHERBY et al. 1999). Seit vielen Jahren wird daher versucht, neben der zytologischen Begutachtung weitere objektivierbare Merkmale zu finden, um die Diagnosen bestätigen, vereinfachen oder sogar frühzeitiger ermöglichen zu können.

Ein Untersuchungsziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu überprüfen, inwieweit Telomerase-Aktivität in Zytozentrifugaten von Perikardergüssen mit dem zytopathologischen Nachweis von malignen Zellen korreliert, so dass ihre Bestimmung ähnlich der Bestimmung von Tumormarkern einen Beitrag zur Diagnose einer neoplastischen Infiltration herangezogen werden könnte.

4.1 Telomerase-Aktivität als Tumormarker

Zu den Tumormarkern zählen Proteine, die von Tumorzellen gebildet oder durch sie in anderen Zellen induziert werden (KOOLMAN & RÖHM 1994). Eine heute gebräuchliche Art des Nachweises von Tumormarkern ist die immunocytochemische Untersuchung, bei der spezifische Antikörper an die Tumorantigene binden. Der Nachweis der gebundenen Antikörper lässt sich mit diversen Verfahren erbringen, z.B. mit dem Radioimmunoassay oder dem Enzym-Immunoassay (DALQUEN et al. 1993). Mit Hilfe solcher Antikörper können z.B. Zellen in maligne oder benigne unterteilt werden. Einige Antikörper geben Hinweise auf die Herkunft von Tumoren (z.B. mesothelial oder epithelial durch Ber-EP4- oder -Leu-M1-Antikörper). Etablierte Antikörper sind beispielsweise gegen das CEA (cytoplasmic carcinoembryonic antigen) oder das CA-125 (membrane highmolecular mucin) gerichtet (MOTHERBY et al. 1999, CASCINU et al.

1997). Andere Antikörper binden an das B72.3-Antigen, einem cytoplasmatisch tumor-assoziierten Glykoprotein.

Die besondere Schwierigkeit bei der zytologischen Beurteilung von Ergüssen führte dazu, eine Vielzahl von solchen Antikörpern zu testen, um die Detektion von malignen Zellen in Ergüssen zu vereinfachen. Dabei wurden die besten Resultate mit den zuvor genannten Antikörpern mit Ergebnissen von bis zu 98 % Sensitivität je nach eingesetzten Antikörpern erzielt (MOTHERBY et al. 1999, GUPTA et al. 2000, KOH et al. 1997, STURMOWICZ et al. 1999).

Eine andere Methode, die auf Tumorzellen hinweisen soll, ist die DNA-Cytometrie, bei der aneuploide Zellen gezählt werden. Aneuploidie liefert einen Hinweis auf häufige Mitosen, wie sie bei Tumorzellen mit gesteigerter Proliferationsrate vorkommen (MOTHERBY et al. 1998). Darüber hinaus gibt es noch zytogenetische Analysen und einige andere Methoden, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

Im Fall des Enzyms Telomerase sind o.g. Methoden mangels geeigneter Antikörper derzeit leider nicht einsetzbar. Die Telomerase gilt als Marker der Proliferation und kommt in den meisten Tumorzellarten vor. In 90 % aller Tumoren konnte ihre Aktivität nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft, eine hohe Korrelation zum Vorhandensein von Krebszellen zu besitzen, macht sie zu einer Art universellem Tumormarker (KIM et al. 1994, SHAY & BACCHETTI 1997). Sie könnte daher als eine Art Screening-Methode dienen mit der Möglichkeit, Zellen in einem Erguss oder einer Gewebsprobe in maligne/nicht-maligne zu differenzieren. Rückschluss auf die histologische Art des Tumors lässt die Bestimmung der Telomerase-Aktivität ohne Zytomorphologie mangels Tumorspezifität nicht zu, dies gilt allerdings auch für andere Tumormarker. Nachteilig im Fall der enzymatischen Bestimmung ist derzeit die fehlende Korrelation zur Zytomorphologie sowie die mögliche Hintergrundaktivität durch im Gewebe vorhandene Stammzellen und Zellen mit hohem Erneuerungs- bzw. Teilungspotential (WRIGHT et al. 1996).

Da sich die Telomerase-Aktivität in gesunden Zellen qualitativ nicht von der Aktivität in Tumorzellen unterscheiden lässt, besteht nur die Möglichkeit, durch eine sinnvolle

Quantifizierung der Aktivität Aufschluss über ihre Herkunft zu erlangen, wobei von der These ausgegangen wird, dass in Tumorzellen ein höheres Maß an Aktivität zu finden ist, während die anderen Zellen nur über ein geringeres Maß an Aktivität verfügen.

In der Literatur wird die Telomerase-Aktivität in Nicht-Tumorzellen (wie den oben genannten) mit 1-2 % der Aktivität von Tumorzellen beziffert (HIYAMA et al. 1995, COUNTER et al. 1995). Durch Stimulierung und Proliferationsanregung kann diese Aktivität jedoch noch zunehmen (BUCHKOVICH & GREIDER 1996). Um die niedrige basale Aktivität von den hohen Aktivitätsspiegeln in Tumorzellen unterscheiden zu können, muss eine Quantifizierbarkeit der Aktivität gegeben sein. Sie allein könnte den entscheidenden Hinweis auf die benigne oder maligne Genese der Telomerase-Aktivität geben.

4.2 Korrelation zwischen der Zytologie und dem TRAP-Assay

Die Ergebnisse der TRAP-Assays zeigen deutlich den engen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein maligner Zellen in der zytologischen Untersuchung und detektierbarer Telomerase-Aktivität in Perikardergüssen.

Bereits der konventionelle TRAP-Assay ergab eine Sensitivität von 100 % bei einer Spezifität von 91,7 %. Beim F-TRAP-Assay konnte die Spezifität durch die Einführung eines „Cut-off"-Wertes von 30.000 rel. Einheiten sogar auf 95,8 % gesteigert werden, ohne dabei einen Verlust von Sensitivität hinnehmen zu müssen.

Telomerase-Aktivität wurde schon in vielen verschiedenartigen Geweben untersucht und mit den Ergebnissen von histologischen oder zytologischen Untersuchungen verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Sensitivität und Spezifität je nach Gewebe deutlich unterscheiden. Dies kann entweder an der Art der Tumoren oder an der Zusammensetzung des jeweiligen Gewebes liegen. Jedes Gewebe unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung an Proteinen, Bindegewebs- oder Entzündungszellen, wobei jede dieser Komponenten die Messung der Telomerase-Aktivität in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen kann.

Äußerst schwierig gestaltet sich z.B. der Nachweis der Telomerase-Aktivität in Geweben mit einem hohen Anteil an Proteinasen oder RNAsen. In der Studie von DEJMEK et al. (2001) konnte in Pleuraergüssen Telomerase-Aktivität in nur 67 % der Fälle detektiert werden, obwohl maligne Zellen in der Zytologie nachweisbar vorhanden waren. Lohnender scheint die Untersuchung auf Telomerase-Aktivität dagegen für histologische Gewebsproben zu sein. TAGA et al. (1999) detektierten Telomerase-Aktivität in kleinzelligen Lungentumoren in 82,5 % der Fälle, bei Neoplasien der Gallenwege konnte die Enzym-Aktivität in 81,3 % der Fälle gemessen werden.

Bei Körperflüssigkeiten und Ergüssen scheint die Detektion durch einige Faktoren erschwert zu sein. Ein Beispiel wurde oben bereits erwähnt (DEJMEK et al. 2001). Eine Bestätigung dieser Aussage findet sich in der Studie von HEINE et al. (1998): Während in Gewebeproben von Blasenkarzinomen in 95 % Telomerase-Aktivität nachgewiesen wurde, konnte die Aktivität bei Blasenspülungen jedoch nur in 70 % der Fälle detektiert werden und Untersuchungen des Urins blieben sogar komplett negativ. Ursächlich dafür ist möglicherweise die größere Konzentration an Tumorzellen in den Gewebeproben. Jedoch kann auch das Vorhandensein von Inhibitoren für die PCR eine Rolle spielen, ebenso wie eine mögliche direkte Hemmung der Telomerase-Aktivität per se, z.B. aufgrund einer RNA-Inaktivierung im Urin durch bisher unbekannte Mechanismen (HEINE et al. 1998). Fraglich bleiben die Ergebnisse einer ähnlichen Studie, in der die Telomerase-Aktivitätsmessung bei Urinproben in 62 % der Fälle positiv waren (YOSHIDA et al. 1997 I).

Zwei Studien beschäftigen sich im Besonderen mit zytologischen Ergüssen, insbesondere mit Aszites- und Pleuraergüssen. Bei diesen wurde ein erhöhter Anteil an PCR-Inhibitoren festgestellt (MU et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen von BRAUNSCHWEIG et al. (2001), die bei Pleuraergüssen und Aszites insgesamt eine Sensitivität von 70 % erzielten. Sie stellten insbesondere schlechte RNA-Qualitäten fest, die für die Telomerase-Extension essentiell sind (vgl. auch MEID et al. 2001). Im Gegensatz hierzu wurde in einer anderen Studie bei Pleuraergüssen eine Sensitivität von 91,4 % (YANG et al. 1998) erreicht und bei Aszites immerhin noch in 76 % der Fälle (TANGKIJVANICH et al. 1999).

In weiteren Studien wurden folgende Resultate erzielt:

- duktale Pankreaskarzinome 75 % (SUEHARA et al. 1997)

- Bronchiallavagen 81,8 % (YAHATA et al. 1998)

- Darmspülungen 92 % (YOSHIDA et al. II 1997).

Regelmäßig kommen bei der Telomerase-Aktivitätsmessung auch falsch-positive Ergebnisse vor. Als Gründe hierfür kommen sowohl methodische Störfaktoren als auch die „Kontamination" des Gewebes durch Entzündungszellen in Betracht. Beide Möglichkeiten sollen hier nur angedeutet werden, da sie später ausführlicher zu diskutieren sind (vgl. Abschnitt 4.3).

An dieser Stelle ist aber bereits zu erwähnen, dass insbesondere die niedrige Telomerase-Aktivität in den Entzündungszellen zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. Ergüsse oder Gewebe, die häufiger oder in stärkerem Ausmaß von Entzündungen betroffen sind, sind daher grundsätzlich schlechter zur Telomerase-Aktivitätsmessung geeignet.

Die Rate an falsch-positiven Messungen wird durch die Spezifität beschrieben. In einigen der oben genannten Studien wurde eine Spezifität von 100 % erreicht (MÜLLER et al. 1999, TAGA et al. 1999, ITOI et al. 2000, HEINE et al. 1998, NIIYAMA et al. 1999). Bei der Studie von HEINE ist dies kaum verwunderlich, da selbst beim Vorhandensein von malignen Zellen im Urin keine Aktivität gemessen werden konnte. Die in den sonstigen Untersuchungen festgestellten Spezifitäten sind in tabellarischer Form (Tabelle 4-1) zusammengefasst:

Studie	**Spezifität in %**	**Material**
BRAUNSCHWEIG et al. 2001	73,0	Aszites und Pleura
YOSHIDA et al. 1997 II	86,0	Kolonspülung
MU et al. 1999	90,0	Aszites und Pleura
YANG et al. 1998	94,2	Pleura
HIYAMA et al. 1995	95,6	Lunge
TANGKIJVANICH et al. 1999	95,7	Aszites
YOSHIDA et al. 1997 I	96,4	Urin

Tab. 4-1: Spezifität in klinischen Telomerase-Studien

Die Ursachen für die aufgezeigten Varianzen sind vielfältig. Es zeigte sich, dass sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des TRAP-Assays bei unterschiedlichen Geweben stark variieren, so dass die Telomerase-Aktivitätsmessung nicht ubiquitär angewendet werden kann. Zu den Faktoren, die das Ergebnis der Messung und damit ihre Anwendbarkeit negativ beeinflussen, gehören sowohl störende Zellen (insbesondere Entzündungszellen) als auch Inhibitoren der PCR (darunter z.B. Hämoglobin, das die Taq-Polymerase hemmt).

Eingeschränkt wird die Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien allerdings insofern, als es keine Standard-Telomerasemessung gibt, die als Vergleichsmaßstab dienen könnte: Bei der häufigsten Art der Telomerase-Messung mit TRAP-Assays können bereits geringe Abwandlungen der Methode zu einer enormen Veränderung der Ergebnisse führen. Letztlich entscheiden die Details der Methode über das häufige Auftreten von falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen (WU et al. 2000). Ebenso besteht die Möglichkeit, die Ergebnisse durch Quantifizierungen zu verändern. So konnte in der vorliegenden Arbeit die Spezifität des konventionellen TRAP-Assays um etwa 5 % durch die Verwendung des quantitativen F-TRAP-Assays verbessert werden.

Da jedoch auch für die Quantifizierung keine Standardisierung existiert, sind die in den unterschiedlichen Studien genannten absoluten Werte für Telomerase-Aktivität nur schwer miteinander vergleichbar.

In der vorliegenden Arbeit belief sich die Sensitivität beider Telomerase-Assays in den Perikardergüssen auf 100 %. Wie aus der o.a. Tabelle 4-1 ersichtlich, handelt es sich hierbei im Vergleich zu anderen Geweben um einen unerwartet hohen Wert. Wenn also zytologisch maligne Zellen in einem Perikarderguss vorhanden waren, dann wurden sie durch die Telomerase-Messung stets erkannt.

Dieses Ergebnis ist möglicherweise als Indiz für eine besondere Eignung des Kompartiments Perikarderguss für Telomerase-Aktivitätsmessungen zu werten. Es scheint keine bzw. nur wenig störende Einflussfaktoren zu geben, die zu einem falsch-negativen Ergebnis führen könnten.

Neben der Sensitivität ist auch die Spezifität ein entscheidendes Kriterium für die Eignung der Enzym-Messung. Im F-TRAP-Assay ist die Spezifität mit 95,8 % zwar recht hoch, trotzdem stellt sich die Frage nach der Ursache für die – wenn auch nur wenigen – falsch-positiven Messungen. Dieser Fragestellung wird u.a. im nächsten Abschnitt nachgegangen, in dem die Ergebnisse im Zusammenhang mit den Krankengeschichten betrachtet werden.

4.3 Ergebnisse des TRAP-Assays bei Perikardergüssen im Kontext der Patientengeschichten

Bisher wurden die Ergebnisse der verschiedenen TRAP-Assays getrennt voneinander betrachtet. Vergleicht man die Ergebnisse der TRAP-Assays miteinander, so lassen sich weitere Aufschlüsse gewinnen, die nachfolgend beschrieben werden.

Zunächst soll der Blick auf die Perikardergüsse gerichtet werden, bei denen in der zytologischen Untersuchung maligne Zellen entdeckt worden sind. Beide Assays konnten Telomerase-Aktivität in diesen Proben (7 Fälle) detektieren. Dieses Ergebnis zeigt nicht nur, dass es grundsätzlich möglich ist, Telomerase-Aktivität in Tumorzellen, die

aus Perikardergüssen stammen, zu messen, sondern auch, dass eine vollständige Detektion bei malignen Zellen im Erguss erreicht werden kann. Dieses bemerkenswerte Ergebnis ist wahrscheinlich auch auf die gute Qualität der Proteinextrakte zurückzuführen. Für diese Annahme sprechen insbesondere die bereits in der Proteinkonzentrations- und in der Alkalischen Phosphatasemessung festgestellten Resultate (vgl. hierzu Abschnitt 4.4).

Ein weiterer Hinweis für die hohe Korrelation mit den Ergebnissen der Zytologie ist in der großen Anzahl derjenigen Perikardergüsse (20 Fälle) zu sehen, die sowohl in der Zytologie negativ für maligne Zellen als auch in beiden TRAP-Assays negativ für Telomerase-Aktivität waren.

Eine ausführliche Betrachtung ist für die vier abweichenden Fälle geboten. Insbesondere der Fall 9 war äußerst problematisch: Ein Patient mit schwerer 3-Gefäß-KHK und hypertensiver Krise, also mit eindeutig kardialer Genese des Ergusses ohne Hinweis auf eine maligne Grunderkrankung und ohne zytologisch detektierte maligne Zellen, war im konventionellen Assay positiv für Telomerase-Aktivität.

Die Ursachen für ein solches falsch-positives Ergebnis im TRAP-Assay sind nicht eindeutig zu erklären. In Betracht kommt z.B. eine methodisch bedingte Ursache: Beim sogenannten „*Staggered Annealing*“ entsteht bei Verwendung einer bestimmten Primer-Kombination eine Primer-Dimerisierung, die im Ergebnis einer Telomerase-Leiter ähnelt, da sie ebenfalls Banden im Abstand von 6 Basenpaaren zeigt (KIM et al. 1994, KRUPP et al. 1997). Zustande kommt dieser Artefakt, wenn sich ein CX-Primer während der PCR gestaffelt an den neu gebildeten DNA-Strang anlagert. Durch Verlängerung des Primers um einen DNA-Anker kann dieser Artefakt reduziert werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten ACX-Primer handelt es sich um einen solchen durch mehrere Basen verlängerten CX-Primer. Weiter reduziert wurde die Gefahr des „*Staggered Annealing*“ durch die Trennung der beiden Primer mit Hilfe einer Wachsschicht (vgl. Abschnitt 2.2.3.2.2). Durch diese räumliche Trennung wurden Interaktionen der beiden Primer weitestgehend verhindert. Trotzdem kann eine geringe Primer-Dimerisierung nicht gänzlich ausgeschlossen werden (KRUPP et al. 1997), so dass das „*Staggered Annealing*“ durchaus die Ursache für dieses falsch-positive Ergebnis sein könnte.

Eine andere Erklärung bietet sich für den Fall an, dass der Erguss Entzündungszellen enthielt, da diese insbesondere in ihrer aktivierten Form bei hoher Proliferationsrate ebenfalls Telomerase-Aktivität besitzen können. Sollten Entzündungszellen für die detektierte Aktivität verantwortlich gewesen sein, so hätte allerdings auch im F-TRAP-Assay ein falsch-positives Ergebnis eintreten müssen. Der F-TRAP-Assay wies jedoch keine Aktivität auf. Letztlich lässt sich in diesem Fall keine plausible Erklärung finden. Auf die mögliche Detektion der Telomerase-Aktivität durch Entzündungszellen wird bei den Ausführungen über die Quantifizierung noch intensiver eingegangen (vgl. Abschnitt 4.6).

Bei einem positiven Telomerase-Ergebnis ist weiterhin prinzipiell auch an eine Kontamination mit Tumorzellen während der Durchführung des TRAP-Assays zu denken. Im vorliegenden Fall wird dies jedoch für sehr unwahrscheinlich gehalten, da der Proteinextrakt für den F-TRAP-Assay aus dem gleichen Aliquot stammte. Dagegen spricht zusätzlich die durchgeführte Messung eines Leerwertes, der gerade solche Kontaminationen aufdecken sollte. Alle Proben wurden zudem zweifach gemessen, um möglicherweise auftretende Fehler wie z.B. Pipettierungenauigkeiten oder Verwechslungen zu vermeiden bzw. zu minimieren.

Eine andere Situation ergab sich bei den zwei Ergüssen (Fall 6 und 26), die in der Zytologie ebenfalls keine Tumorzellen erkennen ließen. Während die Telomerase-Aktivitätsmessung im konventionellen Assay negativ war, konnten im F-TRAP-Assay telomerische Repeats detektiert werden. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf die entzündliche Genese der Perikardergüsse (Perikarditis bzw. Perimyokarditis). Sowohl im Fall 6 als auch im Fall 26 zeigten die mikroskopischen Untersuchungen, dass entzündliche Zellen vorhanden waren. In beiden Proben lag die gemessene totale „Peak area“ noch deutlich unter dem gewählten „Cut-off“-Wert von 30.000. Insofern war die gemessene Telomerase-Aktivität als niedrig einzuschätzen und entsprach damit einer Hintergrundaktivität, die durch Entzündungszellen verursacht sein konnte.

Eine besondere Beachtung ist dem Fall 27 zu widmen, in dem zytologisch keine malignen Zellen im Perikarderguss entdeckt werden konnten, während jedoch der konventionelle Assay Telomerase-Aktivität zeigte. Bestätigt wurde dieses Ergebnis im F-TRAP-

Assay mit einer Telomerase-Aktivität von knapp 40.000 rel. Einheiten. Die Messung lag somit deutlich über dem „Cut-off"-Wert und wurde daher auch im F-TRAP als positiv gewertet. Die Probe stammte von einem Patienten, der zur Zeit der Perikardiozentese an einem Osteosarkom mit pulmonalen Filiae litt. Unter Berücksichtigung der eindeutigen Messwerte und der Krankheitsgeschichte mit malignem Grundleiden liegt die Vermutung nahe, dass die Tumorzellen bei der zytologischen Betrachtung nicht aufgefallen sind. Leider wurde dieser Patient nicht wiederholt punktiert, denn es wäre interessant gewesen zu erfahren, ob zu einem späteren Zeitpunkt auch in der zytologischen Untersuchung Tumorzellen im Erguss gefunden worden wären. Es bleibt daher nur die Spekulation, ob sich tatsächlich Krebszellen in dem zytologisch untersuchten Erguss befunden haben.

Der Fall 27 wirft jedoch die Frage auf, ob es sinnvoll ist, die Ergebnisse des TRAP-Assays am vermeintlichen Goldstandard, der zytologischen Untersuchung, zu messen oder ob die Methode möglicherweise gegenüber der Zytologie nicht sogar Vorteile bietet, die nur deshalb verborgen bleiben, weil es keinen unabhängigen, objektiven Maßstab gibt, anhand dessen geklärt werden kann, ob nun tatsächlich Tumorzellen im Perikarderguss vorhanden waren oder nicht.

Bei der Untersuchung von anderen als Perikardergüssen wird die Telomerase-Aktivität überwiegend am Standard der zytologischen Untersuchung gemessen (CHENG et al. 2000, BEDROSSIAN 1998, MEID et al. 2001, YANG et al. 1998, MOTHERBY et al. 1999). Auch bei den weiter oben erwähnten immunohistochemischen Untersuchungen bildete die Zytologie die Vergleichsgrundlage. Andere Studien vergleichen die Ergebnisse der Telomerase-Messung entweder mit der histologischen Untersuchung, aber auch mit klinischen Parametern oder mit der Grunderkrankung (MOTHERBY et al. 1999). Nachteilig ist bei allen hinzugenommenen Vergleichsobjekten, dass eine definitive Bestätigung über das Vorhandensein von malignen Zellen im Erguss ausbleibt. Letztlich muss festgestellt werden, dass es keine generelle Konvention gibt, anhand derer die diagnostische Genauigkeit solcher Spezialuntersuchungen wie die Telomerase-Aktivitätsmessung überprüft werden kann (MOTHERBY et al. 1999).

Durch die vorliegende Untersuchung kann nicht ohne weiteres die Aussage getroffen werden, dass die Telomerase-Messung sensitiver ist als die zytologische Untersuchung. Festgestellt werden konnte lediglich, dass in allen Fällen, in denen zytologisch maligne Zellen vorhanden waren, diese auch durch die Telomerase-Messung nachgewiesen wurden. Der Sensitivitätswert von 100 % bei der Telomerase-Aktivitätsmessung ist nur im zuvor beschriebenen Sinne zu interpretieren: er sagt zunächst lediglich aus, dass die Telomerase-Messung genauso sensitiv ist wie die zytologische Untersuchung. Damit wird jedoch nicht ausgeschlossen, dass sie möglicherweise eine höhere Sensitivität aufweist, d.h. die Fähigkeit besitzt, zytologisch nicht detektierte maligne Zellen aufzuzeigen. Dies gilt zumindest in den Fällen, in denen in der Zytologie (aus welchen Gründen auch immer) Fehler gemacht werden. Die F-TRAP Methode stellt somit zumindest eine Ergänzungsuntersuchung dar, die eine Bestätigung und eine Verbesserung für die Diagnose bringen kann.

4.4 Problemstellung bei der Quantifizierung von Telomerase-Aktivität

Die Quantifizierung der Aktivität des Enzyms Telomerase stellt aufgrund der komplexen Methode eine anspruchsvolle Aufgabe dar. Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die bei Quantifizierungen gegeben sein muss und im anschließenden Abschnitt näher erläutert wird, ist neben der exakten Standardisierung der Versuche die gute Qualität des Ausgangssubstrats, welches in den TRAP Assay eingesetzt wird – der Proteinextrakt.

Als notwendige Voraussetzung für die Standardisierung der Telomerase-Aktivitätsmessung ist daher die Qualitätsüberprüfung der Proteinextrakte zu nennen. Die konstante Aufarbeitung der Proben zum Proteinextrakt wurde sowohl mit der Proteinkonzentrationsmessung als auch mit der Alkalischen Phosphatasemessung nachgewiesen.

Aufgrund der konstanten Werte, die bei der Proteinkonzentrationsmessung anfielen, ergab sich der erste Hinweis auf die spätere erfolgreiche Verarbeitung der Produkte.

Sämtliche gemessenen Konzentrationen lagen im linearen Abschnitt der Standardproteinreihe. Kein Extrakt enthielt so wenig Proteinanteil, dass er nicht mehr messbar war. Hieraus ergab sich, dass in allen Fällen eine adäquate Menge an CHAPS Lysis Buffer zur Proteinextraktion eingesetzt worden war – dies war keineswegs selbstverständlich, da die jeweilige Menge abgeschätzt werden musste (vgl. Abschnitt 2.2.1.2). Ebenso wenig beeinträchtigten eine Kontamination durch Blut oder ähnliche Störfaktoren den Messbereich.

Von noch größerer Bedeutung für die Qualitätskontrolle und damit für die Standardisierung der Telomerase-Aktivitätsmessung ist die Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität. Ihr ubiquitäres Vorkommen in Zellen eignet sich hervorragend, um ihre Aktivität als Referenz für die Proteinintegrität heranzuziehen. Diese gilt allgemein als Standardparameter für die Funktionsfähigkeit von Enzymen (WRIGHT et al. 1995, HEINE et al. 1998). Ist ihre Aktivität nachweisbar, so ist regelmäßig davon auszugehen, dass sich die Zellproteine in einem funktionsfähigen Zustand befinden. Wird bei Telomerase-negativen Proben ein positiver Nachweis von Alkalischer Phosphatase-Aktivität gefunden, ist ein Verlust der Proteinfunktion während der Aufarbeitung als Ursache auszuschließen.

Die Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität ergab ein unerwartet gutes Resultat. In allen Proben war Enzym-Aktivität nachweisbar. Im Vergleich zur Bestimmung von anderem Ergussmaterial (Pleura und Aszites, vgl. Susanne Meyer-Neumühlen und eigene Erfahrungen) lag damit der Schluss nahe, dass die Proteinstabilität aus Perikardzytomaterial besonders geeignet ist.

Ursache dieses Phänomens könnte die vielleicht geringe Anwesenheit von Störfaktoren wie RNAsen oder Proteinasen sein. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in einer verminderten Sekretion von umgebenden Zellen. Schon bei der Aufbereitung der Ergüsse fiel – im Vergleich zu der Präparierung von Pleura- oder Aszites-Punktaten – eine leichtere Handhabung auf. Die Aufbereitung der zuletzt genannten Proben erfolgte lediglich, um die Durchführung des TRAP-Assays zu erlernen; ihre Ergebnisse sind nicht Bestandteil dieser Arbeit. Insbesondere die Pleuraergüsse enthielten Schleimanteile, die die Verarbeitung schwierig gestalteten. Zusätzlich war bei ihnen

regelmäßig von einem hohen Anteil an RNAsen und Proteinasen auszugehen, sezerniert von den Zellen im exsudatreichen Pleuraerguss. Zwar zeigten die Perikardergüsse häufig eine Beimengung von Blut, jedoch konnte die Blutbeimengung durch wiederholte Spülvorgänge mit RCLB problemlos eliminiert werden.

Die Entfernung des Blutes war aus zweierlei Gründen wichtig: Zum einen wird in der Literatur berichtet, dass Hämoglobin die Taq-Polymerase hemmt, die für eine Elongation in einer PCR essentiell ist (WU et al. 2000, ABU AL-SOUD & RADSTROM 1998, AL-SOUD et al. 2000). Zum anderen beeinflussen die bei der Proteinextraktion freigesetzten erythrozytären Proteine die Bestimmung der Proteinkonzentration: Die Konzentration des Telomerase-Proteins im Erguss sinkt relativ mit der Erhöhung an Proteinen aus Erythrozyten. Da stets eine konstante Menge des Proteinextrakts in den TRAP-Assay eingesetzt wurde, hätte sich aus der Erhöhung des Proteingehaltes eine Absenkung der gemessenen Telomerase-Aktivität ergeben.

4.5 Reproduzierbarkeit des fluoreszenz-basierten TRAP-Assays

Die Quantifizierung von Telomerase-Aktivität erfordert eine möglichst exakte Reproduzierbarkeit des Versuchsablaufs. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde die Methode (F-TRAP) in verschiedene Teilabschnitte „zerlegt“ und die zufälligen Abweichungen oder Schwankungen als Maß für die Reproduzierbarkeit des jeweiligen Teilabschnitts registriert.

Die Reproduzierbarkeit des Versuchsablaufs wurde auf drei Ebenen untersucht:

a) auf der Ebene der Gelelektrophorese und Detektion,

b) auf der Ebene der PCR-Amplifikation und

c) auf der Ebene des Elongationsschritts.

a) Reproduzierbarkeit auf der Ebene der Gelelektrophorese und Detektion der Fragmente

Das Ziel des ersten Teilversuches bestand darin, die Höhe der zufälligen Abweichungen der Messwerte während der Gelelektrophorese und der Phase der Detektion der PCR-Fragmente festzustellen. Alle während wiederholter Gelelektrophoresen ermittelten Abweichungen bei der Detektion eines PCR-Amplifikats waren von nur geringem Ausmaß, so dass die Reproduzierbarkeit dieses Teilbereichs als gut bewertet werden kann. Die PCR-Amplifikate lösten bei wiederholten Analysen durch GeneScan keine signifikanten Veränderungen der „Peak area“ aus.

Bereits in diesem Versuch wurde eine Standardreihe von H69-Zelläquivalenten eingesetzt, so dass zusätzlich erste Hinweise auf eine mögliche Quantifizierbarkeit der Telomerase-Aktivität gewonnen werden konnte. Die „Peak areas“ (als Maß für die Höhe der Telomerase-Aktivität) zeigen eine nahezu konstante lineare Steigerung bis zum Erreichen eines Sättigungsniveaus.

b) Reproduzierbarkeit auf der Ebene der PCR-Amplifikation

Mit dem zweiten Versuch wurde die Überprüfung auf die Ebene der PCR-Amplifikation ausgeweitet. Zusätzlich beinhaltete dieser Abschnitt auch die Phase der Primer-Elongation, die im „herkömmlichen“ Assay der PCR-Amplifikation direkt vorgeschaltet ist. Auffallend war, dass die Streuung der Messwerte deutlich zugenommen hatte. Betrachtet man die Mittelwerte der Verdünnungsreihe, so ist (ähnlich wie im ersten Versuch) eine Linearität der gemessenen Telomerase-Aktivität festzustellen. Man erkennt allerdings auch, dass sich die Standardabweichungen der „Peak areas“ von verschiedenen Zelläquivalenten überlagern. So reichen z.B. die Messwerte von 100 NCI-H69-Zelläquivalenten in den Bereich von 50 hinein. Dies bedeutet eine Einschränkung der Quantifizierbarkeit. Obwohl eine absolute Einordnung der Telomerase-Aktivität nicht möglich ist, kann insgesamt eine Abgrenzung zwischen hoher und niedriger Aktivität gemacht werden. Die Methode ist daher unter bestimmten Vorbehalten zur Quantifizierung der Telomerase-Aktivität verwendbar.

Das Erreichen des Sättigungsniveaus, das sich auch bei diesem Teilversuch einstellte, lässt sich mit dem Verbrauch an Reaktionssubstanzen während der PCR erklären: bei Verbrauch der Nucleotide (dNTPs) können keine weiteren DNA-Stränge mehr gebildet werden. Unklar ist, warum die Aktivität z.T. bei 10.000 Zelläquivalenten wieder zurückging. Ein ähnliches Problem ist auch bei WU et al. (2000) beschrieben worden, die einen hemmenden Einfluss von großen Zellzahlen auf Telomerase-Aktivität konstatieren.

c) Reproduzierbarkeit auf der Ebene des Elongationsschrittes

In einem dritten Teilschritt wurde die Reproduzierbarkeit des Versuchsablaufs auf der Ebene des Elongationsschrittes untersucht. Hierzu wurde das Telomerase-Enzym (in Form eines NCL-H69-Proteinextraktes von definierter Zellzahl) in mehrfacher Menge zur Elongation des TS-Oligonucleotids eingesetzt, wobei die Auftrennung entsprechend der Zelläquivalente erst unmittelbar vor der PCR-Amplifikation stattfand. Verglichen wurde dieser Ansatz mit dem gleichen Zelläquivalent, das wie gewöhnlich bereits vor der Elongationsphase in den Assay eingesetzt worden ist.

In letztgenannter Versuchsanordnung ergab sich eine deutlich höhere Abweichung als bei der gemeinsamen Elongation der Oligonucleotide. Dieser Versuchsaufbau zeigt, dass die Telomerase-vermittelte Elongation den eigentlich problematischen Schritt in der Quantifizierung darstellt, da sie erheblichen inter- und intraindividuellen Schwankungen unterliegt.

4.6 Hintergrundaktivität und Bestimmung des „Cut-off“-Wertes

Eine besondere Schwierigkeit der zytologischen Untersuchung liegt in der Differenzierung zwischen reaktiven Zellen und Tumorzellen (BEDROSSIAN 1998, MAISCH et al. 2000), insbesondere wenn zwischen reaktiven Mesothelzellen und Adenokarzinomzellen differenziert werden muss (MAISCH et al. 2000).

Pathogenetisch erfolgt auf eine Verletzung der Mesotheloberfläche eine sofortige vaskuläre Entzündungsantwort und kurz darauf eine Mesothel-Exfolation. Innerhalb weniger Stunden nach der Erguss-Akkumulation wird die verletzte Oberfläche durch Ablagerungen von Fibrinen und mononukleären Zellen besiedelt. Makrophagen wandern nach einem, Fibroblasten nach zwei bis drei Tagen ein. Bei längerwährender Verletzung antwortet das Mesothel mit einer Hyperplasie und möglicherweise auch Metaplasie (BEDROSSIAN 1998). Dies führt insgesamt zu einer heterogenen Ansammlung von Zellen, insbesondere proliferierenden Entzündungszellen, Erythrozyten, reaktiven Mesothelzellen und gegebenenfalls Tumorzellen.

Die reaktive Situation mit Auftreten von Mesothelzellen, Lymphozyten und Erythrozyten wird als „Hintergrund" eines Ergusses bezeichnet (YAZDI et al. 1979). Derartige Zellen erschweren nicht nur die zytologische Begutachtung, sondern können auch den Vorgang der Telomerase-Aktvitätsmessung empfindlich stören. Auf den Einfluss von Störfaktoren wie RNAsen und Proteinasen wurde bereits hingewiesen. Die Zellen können einerseits den Anteil der Tumorzellen verringern und dadurch die Telomerase-Aktivität relativ erniedrigen (WU et al. 2000). Andererseits kann die endogene Aktivität dieser Zellen zu erhöhten Telomerase-Aktivitäts-Spiegeln führen und dadurch ebenfalls Fehlinterpretationen im Sinne einer falsch-positiven Wertung verursachen.

Um eine mögliche reaktiv-proliferative Situation in einem chronischen Perikarderguss zu simulieren, wurden sowohl die hämatopoetischen Progenitorzellen $CD34^+$ als auch mononukleäre Zellen aus peripherem Blut untersucht. Dabei galt es zunächst herauszufinden, in welcher Höhe die Telomerase-Aktivität in diesen Zellen zu finden war. Als Stammzellen und selbsterneuerndes Gewebe sollten die $CD34^+$-Zellen eine niedrige basale Telomerase-Aktivität aufweisen, da dieses Ergebnis bereits in einigen Studien bestätigt werden konnte (ENGELHARDT et al. 1997, YUI 1998, HOHAUS et al. 1997). In allen genannten Studien konnte zudem durch die Zugabe von Stammzellfaktoren und Interleukinen die Aktivität in den Zellen noch erhöht werden (ENGELHARDT et al. 1997, YUI et al. 1998, CHAVES-DIAS et al. 2001). Über die Höhe von Telomerase-Aktivität in mononukleären Zellen aus peripherem Blut sind in der Literatur bisher keine Aussagen

zu finden, es konnte jedoch Telomerase-Aktivität in Lymphozyten detektiert werden, die aus peripherem Blut gewonnen wurden (COUNTER et al. 1995).

Des Weiteren sollte in einem „Mischversuch" überprüft werden, ob und welche beeinflussende Wirkung von diesen Zellarten ausgeht, wenn in der Probe gleichzeitig Tumorzellen vorhanden sind. So ist es zum einen durchaus möglich, dass die Telomerase-Aktivität durch eine Potenzierung oder Addition der Aktivität überlagert bzw. „versteckt" wird. Andererseits ist auch eine Hemmung der Enzymaktivität durch störende Interaktionen denkbar.

Die Ergebnisse des F-TRAP-Assays bestätigen die in der Literatur beschriebene Telomerase-Aktivität in den $CD34^+$-Zellen auf einem basalen, niedrigen Level. Ähnlich wie in den Arbeiten von ENGELHARDT und YUI waren die Zellen zuvor mit Interleukinen stimuliert worden.

Wie oben bereits beschrieben, haben selbsterneuernde Gewebe wie Stammzellen und Zellen mit erhöhter Teilungsaktivität Telomerase-Aktivität. $CD34^+$-Zellen haben als Progenitorzellen eine vorübergehende Teilungs- und Differenzierungsfähigkeit, die durch Interleukine induziert werden kann. Wie in den Studien beschrieben, steigt dadurch auch die Telomerase-Aktivität. Ebenfalls wurden in die Untersuchung mononukleäre Zellen einbezogen. Die Telomerase-Aktivität der Zellen war in hohen Zell-Konzentrationen detektierbar, jedoch nur auf sehr niedrigem Niveau. Die an diesen Kompartimenten vorgenommenen Messungen simulieren daher eine im Extremfall durch entzündlich-proliferative Veränderungen eines chronischen Perikardergusses induzierte Telomerase-Aktivität.

Entscheidend waren diese Versuche auch für die Wahl des „Cut-off"-Wertes. Selbst bei den $CD34^+$-Zellen in aktivierter und konzentrierter Form erreichte die Telomerase-Aktivität keinen höheren Wert als 28.000 rel. Einheiten. Mit der Festlegung des „Cut-off"-Wertes in Höhe von 30.000 rel. Einheiten besteht daher ein ausreichend großer Abstand, um die Telomerase-Aktivität in Perikardergüssen hinreichend sicher der Herkunft von Tumorzellen zuschreiben zu können. Die sinnvolle Wahl dieses „Cut-off"-Wertes bestätigte sich in dem besten Ergebnis von Sensitivität und Spezifität.

Im Zusammenhang mit der Hintergrundaktivität muss auch auf den Einfluss von Zell-Interaktionen eingegangen werden. WU et al. (2000) empfehlen, Mischpopulationen von Zellen für Telomerase-Aktivitätsmessungen zu vermeiden. Da aus der Zunahme des Anteils an normalen Zellen eine relative Verminderung der Tumorzellen resultiert, ergibt sich auch eine relative Absenkung der messbaren Telomerase-Aktivität. Außerdem könnten in einer heterogenen Mischpopulation Zell-Interaktionen mit hemmendem oder sogar förderndem Einfluss auf die Telomerase-Aktivität entstehen.

In der vorliegenden Arbeit konnten derartige Einflüsse *in vitro* durch den „Mischversuch" (vgl. Abschnitt 3.5.2) ausgeschlossen werden. Unerwünschte Effekte von Nicht-Tumorzellen auf die Messung der Telomerase-Aktvität in Tumorzellen wurden nicht festgestellt, eine „Kontamination" der NCI-H69-Zellen mit CD34+- und mit mononukleären Zellen aus peripherem Blut führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Messwerte.

4.7 Methodische Diskussion

In den nachfolgenden Ausführungen werden schwerpunktmäßig zwei Kernfragen behandelt: Zum einen wird der Frage nachgegangen, ob der Einsatz eines internen Standards eine geeignete und/oder notwendige Maßnahme für die Kontrolle der PCR-Amplifikation bildet und damit zur Verbesserung der Quantifizierungs-Methode F-TRAP beitragen kann. Zum anderen wird die besondere Problematik einer Standardisierung der Elongationsphase diskutiert. Im Anschluss daran sollen in der Literatur beschriebene Quantifizierungsmethoden im Hinblick auf o.a. Aspekte bewertet werden.

Bei herkömmlichen Untersuchungen von DNA-Abschnitten kann zwar die Länge der als Bande sichtbar gemachten PCR-Produkte anhand von Längenmarkern abgeschätzt, jedoch nicht exakt quantifiziert werden. Erst seit dem Einsatz eines DNA-Fragmentanalysegeräts, dem GeneScanner, besteht die Möglichkeit, PCR-Produkte als Peak zu messen und durch die automatisch ablaufende Analyse die „Peak area“ als Ausdruck der Bandenstärke exakt zu bestimmen und damit auch quantitativ zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Möglichkeit durch die Anwendung des F-TRAP-Assays für die Quantifizierung der Telomerase-Aktivität in Perikardergüssen genutzt. Mit Hilfe dieser Methode konnten die auf einem Gel aufgetrennten PCR-Banden über die Detektion der Fluoreszenz-Intensität quantitativ als Ausdruck der Telomerase-Aktivität gemessen werden. Hierbei erfolgte die Aktivitäts-Quantifizierung des Telomerase-Enzyms unter der Zielsetzung, eine zusätzliche Entscheidungshilfe bei der Differenzierung zwischen benignen Zellen mit niedriger Aktivität und malignen Tumorzellen mit hoher Aktivität zu gewinnen und damit die Erkennung eines malignen Zellgehalts von Perikardergüssen zu verbessern.

Der Einsatz des F-TRAP-Assays bietet zwar generell eine derartige Differenzierungsmöglichkeit, jedoch ergaben sich bei der Quantifizierung insofern Einschränkungen, als in den Reproduzierbarkeitsversuchen Schwankungen der Messwerte festgestellt wurden (vgl. Abschnitt 3.5.1). Um die Aussagefähigkeit der Quantifizierung zu erhöhen, müssten derartige Messschwankungen beseitigt bzw. minimiert werden. Prinzipielle

Maßnahmen zur Verbesserung der Reliabilität von Messwerten stellen z.B. die Standardisierung der Versuchsabläufe oder der Einbau von Kontrollfunktionen dar.

Ein interner Standard in einer PCR zeigt an, ob die Amplifikation von DNA-Abschnitten erfolgreich abgelaufen ist. Er erfüllt insofern eine Kontrollfunktion. Das Prinzip des internen Standards besteht in der Mitamplifikation eines DNA-Stranges von exakt definierter Länge, die nicht in den Bereich der zu erwartenden Fragmentgröße fällt. Wird die Bande des mitamplifizierten internen Standards im Anschluss an eine Gelelektrophorese sichtbar, kann von einer regelgerechten Amplifikation der DNA-Abschnitte ausgegangen werden. Insbesondere soll hiermit die Demaskierung von PCR-Inhibitoren erreicht werden. In dieser Funktion dient der interne Standard als *qualitativer* Indikator einer erfolgreichen PCR-Amplifikation.

Im Rahmen von Quantifizierungen der Telomerase-Aktivität wird der interne Standard zusätzlich als Maßstab für den *quantitativen* Ertrag der PCR eingesetzt. In diesem Zusammenhang wird er als Korrektur-Faktor verwendet, um die im Bereich der PCR-Amplifikation auftretenden Schwankungen rechnerisch auszugleichen. Hierzu wird zunächst die Intensität der Bande des internen Standards registriert und dadurch eine überschießende oder verminderte PCR-Amplifikation festgestellt. Im nächsten Schritt kann dann die gemessene Intensität der Telomerase-Leiter in Relation zur Intensität des Standards gesetzt werden.

Neben den angeführten Vorteilen sind für die Entscheidung, ob der Einsatz eines internen Standards eine sinnvolle oder notwendige Maßnahme zur Kontrolle der PCR-Amplifikation im Zusammenhang mit Perikardergüssen bildet, auch die eventuell hierbei entstehenden Nachteile zu berücksichtigen. In einer dieser Arbeit vorausgehenden Versuchsreihe hat Susanne Meyer-Neumühlen (zum damaligen Zeitpunkt Doktorandin der Arbeitsgruppe Prof. Schuermann) festgestellt, dass durch die Verwendung des internen Standards im konventionellen Assay die Nachweisgrenze für Tumorzellen deutlich nach oben verlagert wird. Für die Detektion von Telomerase-Aktivität ist also eine höherer Anteil an Tumorzellen erforderlich und bedeutet folglich den Verlust von Sensitivität im TRAP-Assay. Verantwortlich für den Sensitivitäts-Verlust könnte ein erhöhter Verbrauch an Reaktionssubstanzen sein, die für die Amplifikation des internen

Standards aufgewendet werden müssen und damit für die Amplifikation der telomerischen Abschnitte nicht weiter zur Verfügung stehen. Direkte Interferenzen wie unspezifische Bindungen sind dabei ebenfalls denkbar.

Da der interne Standard demnach nicht nur positive sondern auch negative Eigenschaften aufweist, hängt die Entscheidung für oder gegen seinen Einsatz von Nutzenüberlegungen ab. Unter Abwägung der Vor- und Nachteile wurde in dieser Arbeit auf den Einsatz des internen Standards aus folgenden Überlegungen verzichtet. Zwar erfordert der Anspruch an eine adäquate Quantifizierung eine bestmögliche Standardisierung und Kontrolle, die jedoch nicht zu Lasten der Sensitivität gehen sollte. Der Nutzen der Telomerase-Aktivitätsmessung liegt primär im zusätzlichen Informationsgewinn über die Wahrscheinlichkeit eines malignen Befalls des Perikards. Dieser ist jedoch gerade dann von Bedeutung, wenn Zweifel bei der Diagnose aufgrund der zytologischen Untersuchung bestehen, die speziell bei besonders niedrigen Tumorzellzahlen aufkommen können. Insofern ist die Beibehaltung einer niedrigen Nachweisgrenze von Tumorzellen wichtiger als die genaue Kontrolle der Schwankungen der an sich relativ stabilen PCR-Reaktionen.

Ein weiteres Argument dafür, den Standard als nicht erforderlich einzustufen, ergab sich durch die unerwartet gute Qualität der Proteinextrakte: Der Einfluss von Proteinasen oder anderen Störfaktoren scheint bei Perikardergüssen gering zu sein. Aufgrund der hohen Sensitivität des in dieser Arbeit verwendeten F-TRAP-Assays ist ein interner Standard ohnehin von geringerer Bedeutung, denn eine Telomerase-Leiter selbst weist bereits auf eine erfolgreiche PCR hin. Der qualitative Gesichtspunkt des internen Standards verliert insofern seine eigentliche Bedeutung.

Die vorliegende Untersuchung hat ergeben, dass für eine erfolgreiche quantitative Erfassung der Elongationsschritt entscheidend ist. Obwohl die Elongationsphase zwar einen Bestandteil des TRAP-Assays bildet, zählt sie genau genommen nicht zu der PCR-Phase, denn sie umfasst eigenständige Reaktionsabläufe, die nur unter bestimmten, speziell angepassten Bedingungen ablaufen können. Bei der Suche nach dem genauen Entstehungsort der in den Reproduzierbarkeitsversuchen aufgetretenen Abweichungen konnte durch einen speziellen Versuchsaufbau die Elongationsphase von der

PCR-Phase getrennt und dadurch der genaue Zeitpunkt für das Auftreten der Mess-Schwankungen bestimmt werden. Da die Elongationsphase somit als wahrscheinliche Hauptursache der registrierten Mess-Schwankungen ausgemacht werden konnte, erweist sich ihre Unabhängigkeit von der PCR-Phase als Nachteil: der Einsatz des oben beschriebenen internen Standards übt keinerlei Kontrollfunktion auf die Elongationsphase aus, da mit ihm lediglich die Amplifikation der zuvor elongierten Primer erfolgt. Aus dieser Erkenntnis ergeben sich unmittelbar folgende Fragen: Warum sind die Reaktionen der Elongation solchen Abweichungen unterworfen? Was führt zu einer gesteigerten bzw. verminderten Elongation bei gleicher Telomerase-Aktivität? Neben dieser Ursachenforschung ist auch die Suche nach einer geeigneten Kontrollmöglichkeit für die Elongation von Bedeutung: Wie kann das Ausmaß der Elongation kontrolliert werden? Gibt es einen Standard in der Art, wie er für die Reaktionen der PCR einsetzbar ist? Leider müssen diese Fragen vorerst unbeantwortet bleiben. Es bedarf weiterer (wahrscheinlich) aufwendiger Untersuchungen, um den Mechanismus für die Entstehung der auftretenden Schwankungen zu erkennen bzw. zu verstehen und daraufhin einen geeigneten Standard zu entwickeln. Im Hinblick auf den möglichen Nutzen einer uneingeschränkten Quantifizierbarkeit von Telomerase-Aktivität ist eine solche Kontrollmöglichkeit jedoch sehr wünschenswert. Falls ein solcher Standard gefunden werden könnte, wird sich auch hier die Frage nach einem möglichen Sensitivitätsverlust stellen.

Da die Quantifizierungs-Methoden bereits in früheren Untersuchungen angewendet worden sind, interessiert zum einen, wie in diesen Studien die o.a. Problematik der Standardisierung gelöst wurde und zum anderen, ob ein Hinweis darauf zu finden ist, dass die Elongationsphase eine besondere Problematik für die Quantifizierung darstellen könnte.

Beispiele für die Anwendung eines automatischen Detektionsverfahrens für die Quantifizierung von Telomerase-Aktivität zeigen die Studien von ITOI et al. (2000) und YAHATA et al. (1998). Beide Studien bedienen sich der Intensität des internen Standards zur Errechnung der Telomerase-Aktivität. ITOI et al. konnten damit in 81 % der untersuchten Gewebeproben aus Gallengangskarzinomen Telomerase-Aktivität nachweisen.

Möglicherweise ist die – im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit – verminderte Sensitivität auf die Verwendung des internen Standards zurückzuführen. Auch bei YAHATA et al., die Zellen aus Bronchiallavagen auf die Enzym-Aktivität überprüften und eine Sensitivität von 82 % erzielen konnten, ist diese Ursache als Erklärungsmöglichkeit zu nennen. Es ist jedoch ebenfalls nicht auszuschließen, dass in diesen Studien die Art der untersuchten Gewebe einen höheren Anteil von Proteinasen oder RNAasen enthielten und daher generell schlechter für Telomerase-Aktivitätsmessungen geeignet sind. In Frage zu stellen sind die Quantifizierungen beider Studien insbesondere auch wegen des Verzichts auf eine Etablierung einer Standardtumorreihe mit gesicherter Telomerase-Aktivität, anhand derer die Höhe der Telomerase-Aktivität definiert werden kann.

Die Studie von OHYASHIKI et al. 1996 beschäftigt sich intensiv mit der Frage, ob der Verzicht auf einen internen Standard zulässig ist. Bei dem Vergleich der Ergebnisse von Verdünnungsreihen aus leukämischen HL60-Zellextrakten mit und ohne Verwendung des internen Standards stellten sie lediglich geringe Unterschiede der Ergebnisse fest. Dies kann als Hinweis auf die relativ stabilen PCR-Bedingungen während des TRAP Assays gewertet werden und die Entscheidung unterstützen, auf den internen Standard zu verzichten. Allerdings muss kritisch angemerkt werden, dass OHYASHIKI et al. lediglich eine einzige Verdünnungsreihe überprüft haben, so dass keine zuverlässige Aussage über Schwankungen bei wiederholten Messungen getroffen werden kann. Im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit zeigt diese Studie eine ähnliche Entwicklung der Telomerase-Aktivität im Bereich der verschiedenen Zellkonzentrationen. Ähnlich den Ergebnissen der Verdünnungsreihe aus NCI-H69-Zellextrakten in der vorliegenden Arbeit ist bei OHYASHIKI im unteren Konzentrationsbereich ein annähernd linearer Verlauf der Telomerase-Aktivität zu erkennen; bei höheren Zellzahlen wird ebenfalls ein Sättigungsniveau erreicht.

In keiner der oben genannten Studien ist ein Einfluss der Elongation auf die Ergebnisse der Quantifizierung beschrieben worden. Soweit erkennbar fehlen in der Literatur allgemein Ausführungen über die Bedeutung der Elongationsphase für die Quantifizierung von Telomerase-Aktivität. Sie wird stets lediglich als Teil des TRAP-Assays betrachtet,

der mit dem internen Standard zur Kontrolle der PCR ebenfalls abgedeckt ist. Hinweise auf die Möglichkeit, dass die Elongationsphase ein kritischer Punkt für die Reliabilität der Quantifizierung und eine eigenständige Standardisierung notwendig ist, konnten nicht festgestellt werden.

Kritische Anmerkungen über die Aussagefähigkeit der Quantifizierbarkeit von Telomerase-Aktivität findet man lediglich in einer Studie von WU et al. (2000), die T24-Blasenkrebszellen zur quantitativen Bestimmung von Telomerase-Aktivität herangezogen haben. Sie ermittelten bei der Aktivitätsmessung in einer Verdünnungsreihe zwar einen linearen Bereich zwischen 250 bis 5.000 Zellen, jedoch wiesen z.B. 500 Zellen in mehreren Fällen höhere Aktivitäten als 1.000 Zellen auf. Außerdem stellten sie einen unerwarteten Rückgang der Telomerase-Aktivität beim Einsatz von besonders hohen Tumorzellzahlen fest. Die Abweichungen wurden in dieser Studie lediglich mit dem möglichen Vorhandensein von PCR-Inhibitoren begründet. Fraglich bleibt allerdings, ob diese Erklärung ausreicht, da einige Abweichungen innerhalb einer einzigen Verdünngsreihe auftraten, in der die Menge an Inhibitoren gleichmäßig vorhanden sein sollte. Die Möglichkeit einer Abweichung aufgrund einer ungleichmäßigen Elongation wurde von ihnen nicht in Betracht gezogen.

5 Zusammenfassung

Die Erkennung von malignen Zellen in Perikardergüssen ist ein bleibendes Problem in der klinischen Diagnostik. Als Goldstandard für die Detektion von Tumorzellen in Ergüssen gilt zur Zeit die Zytologie. Trotzdem werden bei dieser Untersuchung regelmäßig maligne Zellen übersehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Nutzen der Telomerase-Aktivitätsmessung für die Begutachtung von Perikardergüssen herauszufinden, um möglicherweise neben der Zytologie ein weiteres Entscheidungskriterium zur Beurteilung der Malignität von Ergüssen zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden 31 zytologisch kontrollierte Perikardergüsse auf erhöhte Telomerase-Aktivität mit Hilfe eines konventionellen und eines fluoreszenzbasierten sog. TRAP-Assays (Telomeric Repeat Amplification Protocol) untersucht.

Die Ergebnisse des konventionellen TRAP-Assays zeigen eine hohe Korrelation zwischen dem Telomerase-Aktivitätsnachweis und dem zytopathologisch bestätigten Nachweis von malignen Zellen: es konnte eine Sensitivität von 100 % bei einer Spezifität von 91,7 % erreicht werden.

Da niedrige Telomerase-Aktivität auch in Stammzellen oder aktivierten Entzündungszellen vorkommt und möglicherweise falsch-positive Ergebnisse provoziert, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit versucht, die Aktivität dieses Enzyms zu quantifizieren. Durch die Quantifizierung sollten Rückschlüsse über die Herkunft der Telomerase-Aktivität gewonnen werden. Dazu wurde der fluoreszenz-basierte F-TRAP-Assay etabliert und anhand eines Standards einer telomerase-positiven kleinzelligen Bronchialkarzinomlinie (NCI-H69) kalibriert.

Bei den Versuchen wurden nur geringfügige Mess-Schwankungen der Telomerase-Aktivität innerhalb der Verdünnungsreihen registriert. Dies bedeutet eine wenn auch eingeschränkte Quantifizierbarkeit der Telomerase-Aktivität. Daher wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, um die Ursache für diese Abweichungen zu ermitteln.

Es stellte sich heraus, dass die Schwankungen durch die Elongation und nicht durch die PCR-Amplifikation verursacht werden. Die Elongationsphase stellt damit das Kernproblem bei der Quantifizierung von Telomerase-Aktivität dar.

Des Weiteren wurde die Hintergrundaktivität im Perikarderguss anhand von $CD34^+$-Zellen und peripheren mononukleären Zellen aus peripherem Blut überprüft. Diese Untersuchung erfolgte zu dem Zweck, die mögliche Kontamination eines Perikardergusses durch proliferierende Entzündungszellen zu simulieren und gleichzeitig einen „Cut-off"-Wert für Hintergrundaktivität zu generieren. In beiden Zellarten wurde lediglich ein niedriger Level an Telomerase-Aktivität registriert. Aufgrund der Diskrepanz zwischen den Aktivitätsspiegeln benigner Entzündungszellen im Vergleich zu malignen Tumorzellen konnten Rückschlüsse auf die Herkunft der Telomerase-Aktivität gewonnen werden.

Obwohl eine absolute Quantifizierung von Telomerase-Aktivität nicht möglich war, konnte durch die Einführung des „Cut-off"-Wertes die Spezifität durch den F-TRAP-Assay auf 95,8 % gesteigert werden ohne einen Verlust an Sensitivität hinnehmen zu müssen. Die hohe Sensitivität beider Assays weist auf die besondere Eignung von Perikardzytomaterial für Telomerase-Aktivitätsmessungen hin. Hierzu hat möglicherweise auch eine gute Qualität der verwendeten Proteinextrakte mit einem vermutlich geringen Anteil an Proteinasen und RNAsen beigetragen.

Die Ergebnisse beider TRAP-Assays zeigen, dass die Bestimmung der Telomerase-Aktivität ein reliabler Indikator für das Vorhandensein von Tumorzellen in Perikardergüssen ist und damit eine sinnvolle Ergänzung zur zytologischen Untersuchung darstellt. Insbesondere in Zweifelsfällen könnte die Telomerase-Aktivitätsmessung aufschlussreiche Zusatzinformationen bieten. Die Untersuchung wird derzeit aufgrund des methodischen Aufwands jedoch noch Speziallabors vorbehalten sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

α-MEM	α-Minimum Essential Medium
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca	circa
Ca.	Karzinom
CEA	cytoplasmic carcinoembryonic antigen
CHAPS	Cholamidopropyl-Dimethyl-Ammonium-Propan-Sulfonat
chron.	chronisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FKS	fetales Kälber Serum
F-TRAP	fluorescence-based telomeric repeat amplification protocol
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
hTR	human telomerase RNA
IL-3	Interleukin 3
IMDM	Iscove´s Modified Dubelcco´s Medium
kb	Kilobasenpaare

KHK	koronare Herzkrankheit
min	Minute(n)
neg.	negativ
ºC	Grad Celsius
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
pos.	positiv
RCLB	red cell lysis buffer
rel.	relativ(e)
rez.	rezidivierend
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sec	Sekunde(n)
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SCF	Stammzellfaktor
SCLC	small cell lung cancer
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TLP	telomerase protein

TRAP	telomeric repeat amplification protocol
TRF	telomeric repeat binding factors
u.a.	unter anderem
UV	ultra violett
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
z.T.	zum Teil

7 Literaturverzeichnis

ABU AL-SOUD W, RADSTROM P. CAPACITY OF NINE THERMOSTABLE DNA POLYMERASES TO MEDIATE DNA AMPLIFICATION IN THE PRESENCE OF PCR-INHIBITING SAMPLES. APPL ENVIRON MICROBIOL. 1998 OCT;64(10):3748-53

ALLSHIRE RC, DEMPSTER M, HASTIE ND. HUMAN TELOMERES CONTAIN AT LEAST THREE TYPES OF G-RICH REPEAT DISTRIBUTED NON-RANDOMLY. NUCLEIC ACIDS RES. 1989 JUN 26;17(12):4611-27

ALLSOPP RC, VAZIRI H, PATTERSON C, GOLDSTEIN S, YOUNGLAI EV, FUTCHER AB, GREIDER CW, HARLEY CB. TELOMERE LENGTH PREDICTS REPLICATIVE CAPACITY OF HUMAN FIBROBLASTS. PROC NATL ACAD SCI U S A. 1992 NOV 1;89(21):10114-8

AL-SOUD WA, JONSSON LJ, RADSTROM P. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF IMMUNOGLOBULIN G IN BLOOD AS A MAJOR INHIBITOR OF DIAGNOSTIC PCR. J CLIN MICROBIOL. 2000 JAN;38(1):345-50

BEATTIE TL, ZHOU W, ROBINSON MO, HARRINGTON L. RECONSTITUTION OF HUMAN TELOMERASE ACTIVITY IN VITRO. CURR BIOL. 1998 JAN 29;8(3):177-80

BEDROSSIAN CW. DIAGNOSTIC PROBLEMS IN SEROUS EFFUSIONS. DIAGN CYTOPATHOL. 1998 AUG;19(2):131-7. REVIEW

BIANCHI A, SMITH S, CHONG L, ELIAS P, DE LANGE T. TRF1 IS A DIMER AND BENDS TELOMERIC DNA. EMBO J. 1997 APR 1;16(7):1785-94

BILAUD T, BRUN C, ANCELIN K, KOERING CE, LAROCHE T, GILSON E. TELOMERIC LOCALIZATION OF TRF2, A NOVEL HUMAN TELOBOX PROTEIN. NAT GENET. 1997 OCT;17(2):236-9

BISEL HF, WROBLEWSKI F, LADUE JS. INCIDENT AND CLINICAL MANIFESTATION OF CARDIAC METASTASES. JAMA 1953;(153):712-5

BLACKBURN EH, GALL JG. A TANDEMLY REPEATED SEQUENCE AT THE TERMINI OF THE EXTRACHROMOSOMAL RIBOSOMAL RNA GENES IN TETRAHYMENA. J MOL BIOL. 1978 MAR 25;120(1):33-53

BLACKBURN EH, GREIDER CW, HENDERSON E, LEE MS, SHAMPAY J, SHIPPEN-LENTZ D. RECOGNITION AND ELONGATION OF TELOMERES BY TELOMERASE. GENOME. 1989;31(2):553-60

BLACKBURN EH. STRUCTURE AND FUNCTION OF TELOMERES. NATURE. 1991 APR 18;350(6319):569-73. REVIEW

BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORIN GB, HARLEY CB, SHAY JW, LICHTSTEINER S, WRIGHT WE. EXTENSION OF LIFE-SPAN BY INTRODUCTION OF TELOMERASE INTO NORMAL HUMAN CELLS. SCIENCE. 1998 JAN 16;279(5349):349-52

BRAUNSCHWEIG R, YAN P, GUILLERET I, DELACRETAZ F, BOSMAN FT, MIHAESCU A, BENHATTAR J. DETECTION OF MALIGNANT EFFUSIONS: COMPARISON OF A TELOMERASE ASSAY AND CYTOLOGIC EXAMINATION. DIAGN CYTOPATHOL. 2001 MAR;24(3):174-80

BROCCOLI D, SMOGORZEWSKA A, CHONG L, DE LANGE T. HUMAN TELOMERES CONTAIN TWO DISTINCT MYB-RELATED PROTEINS, TRF1 AND TRF2. NAT GENET. 1997 OCT;17(2):231-5

BUCHKOVICH KJ, GREIDER CW. TELOMERASE REGULATION DURING ENTRY INTO THE CELL CYCLE IN NORMAL HUMAN T CELLS. MOL BIOL CELL. 1996 SEP;7(9):1443-54

CASCINU S, DEL FERRO E, BARBANTI I, LIGI M, FEDELI A, CATALANO G. TUMOR MARKERS IN THE DIAGNOSIS OF MALIGNANT SEROUS EFFUSIONS. AM J CLIN ONCOL. 1997 JUN;20(3):247-50

CHAVES-DIAS C, HUNDLEY TR, GILFILLAN AM, KIRSHENBAUM AS, CUNHA-MELO JR, METCALFE DD, BEAVEN MA. INDUCTION OF TELOMERASE ACTIVITY DURING DEVELOPMENT OF HUMAN MAST CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD CD34+ CELLS: COMPARISONS WITH TUMOR MAST-CELL LINES. J IMMUNOL. 2001 JUN 1;166(11):6647-56

CHENG CW, CHUEH SC, CHERN HD. DIAGNOSIS OF BLADDER CANCER USING TELOMERASE ACTIVITY IN VOIDED URINE. J FORMOS MED ASSOC. 2000 DEC;99(12):920-5

CHONG L, VAN STEENSEL B, BROCCOLI D, ERDJUMENT-BROMAGE H, HANISH J, TEMPST P, DE LANGE T. A HUMAN TELOMERIC PROTEIN. SCIENCE. 1995 DEC 8;270(5242):1663-7

COOPER JP, WATANABE Y, NURSE P. FISSION YEAST TAZ1 PROTEIN IS REQUIRED FOR MEIOTIC TELOMERE CLUSTERING AND RECOMBINATION. NATURE. 1998 APR 23;392(6678):828-31

COREY GR, CAMPBELL PT, VAN TRIGT P, KENNEY RT, O'CONNOR CM, SHEIKH KH, KISSLO JA, WALL TC. ETIOLOGY OF LARGE PERICARDIAL EFFUSIONS. AM J MED. 1993 AUG;95(2):209-13

COUNTER CM, GUPTA J, HARLEY CB, LEBER B, BACCHETTI S. TELOMERASE ACTIVITY IN NORMAL LEUKOCYTES AND IN HEMATOLOGIC MALIGNANCIES. BLOOD. 1995 MAY 1;85(9):2315-20

CROSS SH, ALLSHIRE RC, MCKAY SJ, MCGILL NI, COOKE HJ. CLONING OF HUMAN TELOMERES BY COMPLEMENTATION IN YEAST. NATURE. 1989 APR 27;338(6218):771-4

DALQUEN P, SAUTER G, EPPER R, KLEIBER B, FEICHTER G, GUDAT F. IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN DIAGNOSTIC CYTOLOGY. RECENT RESULTS CANCER RES. 1993;133:47-80

DEJMEK A, YAHATA N, OHYASHIKI K, EBIHARA Y, KAKIHANA M, HIRANO T, KAWATE N, KATO H. IN SITU TELOMERASE ACTIVITY IN PLEURAL EFFUSIONS: A PROMISING MARKER FOR MALIGNANCY. DIAGN CYTOPATHOL. 2001 JAN;24(1):11-5

DHAENE K, VAN MARCK E, PARWARESCH R. TELOMERES, TELOMERASE AND CANCER: AN UP-DATE. VIRCHOWS ARCH. 2000 JUL;437(1):1-16. REVIEW

ENGELHARDT M, KUMAR R, ALBANELL J, PETTENGELL R, HAN W, MOORE MA. TELOMERASE REGULATION, CELL CYCLE, AND TELOMERE STABILITY IN PRIMITIVE HEMATOPOIETIC CELLS. BLOOD. 1997 JUL 1;90(1):182-93

FENG J, FUNK WD, WANG SS, WEINRICH SL, AVILION AA, CHIU CP, ADAMS RR, CHANG E, ALLSOPP RC, YU J, ET AL. THE RNA COMPONENT OF HUMAN TELOMERASE. SCIENCE. 1995 SEP 1;269(5228):1236-41

FLESCH M, ERDMANN E. ETIOLOGIC DIAGNOSIS AND THERAPY OF PERICARDITIS AND PERICARDIAL EFFUSION. INTERNIST (BERL). 1998 DEC;39(12):1297-300

GARCIA LW, DUCATMAN BS, WANG HH. THE VALUE OF MULTIPLE FLUID SPECIMENS IN THE CYTOLOGICAL DIAGNOSIS OF MALIGNANCY. MOD PATHOL. 1994 AUG;7(6):665-8

GREENBERG RA, ALLSOPP RC, CHIN L, MORIN GB, DEPINHO RA. EXPRESSION OF MOUSE TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE DURING DEVELOPMENT, DIFFERENTIATION AND PROLIFERATION. ONCOGENE. 1998 APR 2;16(13):1723-30

GREIDER CW, BLACKBURN EH. A TELOMERIC SEQUENCE IN THE RNA OF TETRAHYMENA TELOMERASE REQUIRED FOR TELOMERE REPEAT SYNTHESIS. NATURE. 1989 JAN 26;337(6205):331-7

GREIDER CW, BLACKBURN EH. IDENTIFICATION OF A SPECIFIC TELOMERE TERMINAL TRANSFERASE ACTIVITY IN TETRAHYMENA EXTRACTS. CELL. 1985 DEC;43(2 PT 1):405-13

GREILING H, GESSNER AM. LEHRBUCH DER KLINISCHEN CHEMIE UND PATHOBIOCHEMIE. SCHATTAUER. STUTTGART, NEW YORK. 1995 3: 594

GUBERMAN BA, FOWLER NO, ENGEL PJ, GUERON M, ALLEN JM. CARDIAC TAMPONADE IN MEDICAL PATIENTS. CIRCULATION. 1981 SEP;64(3):633-40

GUNUKULA SR, SPODICK DH. PERICARDIAL DISEASE IN RENAL PATIENTS. SEMIN NEPHROL. 2001 JAN;21(1):52-6

GUPTA RK, KENWRIGHT DN, FAUCK R, LALLU S, NARAN S. THE USEFULNESS OF A PANEL OF IMMUNOSTAINS IN THE DIAGNOSIS AND DIFFERENTIATION OF METASTATIC MALIGNANCIES IN PERICARDIAL EFFUSIONS. CYTOPATHOLOGY. 2000 OCT;11(5):312-21

HAHN WC I, COUNTER CM, LUNDBERG AS, BEIJERSBERGEN RL, BROOKS MW, WEINBERG RA. CREATION OF HUMAN TUMOUR CELLS WITH DEFINED GENETIC ELEMENTS. NATURE. 1999 JUL 29;400(6743):464-8

HAHN WC II, STEWART SA, BROOKS MW, YORK SG, EATON E, KURACHI A, BEIJERSBERGEN RL, KNOLL JH, MEYERSON M, WEINBERG RA. INHIBITION OF TELOMERASE LIMITS THE GROWTH OF HUMAN CANCER CELLS. NAT MED. 1999 OCT;5(10):1164-70

HANCOCK EW. NEOPLASTIC PERICARDIAL DISEASE. CARDIOL CLIN. 1990 NOV;8(4):673-82. REVIEW

HARLEY CB, FUTCHER AB, GREIDER CW. TELOMERES SHORTEN DURING AGEING OF HUMAN FIBROBLASTS. NATURE. 1990 MAY 31;345(6274):458-60

HARMS, V. BIOMATHEMATIK STATISTIK UND DOKUMENTATION, 7. ÜBERARBEITETE AUFLAGE, HARMS VERLAG KIEL, 1998. S. 65 F, S. 155 F.

HARRINGTON L, ZHOU W, MCPHAIL T, OULTON R, YEUNG DS, MAR V, BASS MB, ROBINSON MO. HUMAN TELOMERASE CONTAINS EVOLUTIONARILY CONSERVED CATALYTIC AND STRUCTURAL SUBUNITS. GENES DEV. 1997 DEC 1;11(23):3109-15

HASTIE ND, DEMPSTER M, DUNLOP MG, THOMPSON AM, GREEN DK, ALLSHIRE RC. TELOMERE REDUCTION IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA AND WITH AGEING. NATURE. 1990 AUG 30;346(6287):866-8

HAYFLICK L, MOOREHEAD PS. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID STRAINS. EXPERIMENTAL AGING RESEARCH. 1961 (25):585-621

HEINE B, HUMMEL M, MULLER M, HEICAPPELL R, MILLER K, STEIN H. NON-RADIOACTIVE MEASUREMENT OF TELOMERASE ACTIVITY IN HUMAN BLADDER CANCER, BLADDER WASHINGS, AND IN URINE. J PATHOL. 1998 JAN;184(1):71-6

HERBERT B, PITTS AE, BAKER SI, HAMILTON SE, WRIGHT WE, SHAY JW, COREY DR. INHIBITION OF HUMAN TELOMERASE IN IMMORTAL HUMAN CELLS LEADS TO PROGRESSIVE TELOMERE SHORTENING AND CELL DEATH. PROC NATL ACAD SCI U S A. 1999 DEC 7;96(25):14276-81

HIYAMA K, HIYAMA E, ISHIOKA S, YAMAKIDO M, INAI K, GAZDAR AF, PIATYSZEK MA, SHAY JW. TELOMERASE ACTIVITY IN SMALL-CELL AND NON-SMALL-CELL LUNG CANCERS. J NATL CANCER INST. 1995 JUN 21;87(12):895-902

HOHAUS S, VOSO MT, ORTA-LA BARBERA E, CAVALLO S, BELLACOSA A, RUTELLA S, RUMI C, GENUARDI M, NERI G, LEONE G. TELOMERASE ACTIVITY IN HUMAN HEMATOPOIETIC PROGENITOR CELLS. HAEMATOLOGICA. 1997 MAY-JUN;82(3):262-8

ITOI T, SHINOHARA Y, TAKEDA K, TAKEI K, OHNO H, OHYASHIKI K, YAHATA N, EBIHARA Y, SAITO T. DETECTION OF TELOMERASE ACTIVITY IN BIOPSY SPECIMENS FOR DIAGNOSIS OF BILIARY TRACT CANCERS. GASTROINTEST ENDOSC. 2000 SEP;52(3):380-6

KAWASHIMA O, KURIHARA T, KAMIYOSHIHARA M, SAKATA S, ISHIKAWA S, MORISHITA Y. MANAGEMENT OF MALIGNANT PERICARDIAL EFFUSION RESULTING FROM RECURRENT CANCER WITH LOCAL INSTILLATION OF ACLARUBICIN HYDROCHLORIDE. AM J CLIN ONCOL. 1999 AUG;22(4):396-8

KILIAN A, BOWTELL DD, ABUD HE, HIME GR, VENTER DJ, KEESE PK, DUNCAN EL, REDDEL RR, JEFFERSON RA. ISOLATION OF A CANDIDATE HUMAN TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT GENE, WHICH REVEALS COMPLEX SPLICING PATTERNS IN DIFFERENT CELL TYPES. HUM MOL GENET. 1997 NOV;6(12):2011-9

KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PL, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW. SPECIFIC ASSOCIATION OF HUMAN TELOMERASE ACTIVITY WITH IMMORTAL CELLS AND CANCER. SCIENCE. 1994 DEC 23;266(5193):2011-5

KING DT, NIEBERG RK. THE USE OF CYTOLOGY TO EVALUATE PERICARDIAL EFFUSIONS. ANN CLIN LAB SCI. 1979 JAN-FEB;9(1):18-23

KIYONO T, FOSTER SA, KOOP JI, MCDOUGALL JK, GALLOWAY DA, KLINGELHUTZ AJ. BOTH RB/P16INK4A INACTIVATION AND TELOMERASE ACTIVITY ARE REQUIRED TO IMMORTALIZE HUMAN EPITHELIAL CELLS. NATURE. 1998 NOV 5;396(6706):84-8

KOH KK, IN HH, LEE KH, KIM EJ, CHO CH, CHO SK, KIM SS, CHO SS, BAEK WK, JIN SH, JU YC, KIM JJ, PARK CS, NAM HS, LEE YH. NEW SCORING SYSTEM USING TUMOR MARKERS IN DIAGNOSING PATIENTS WITH MODERATE PERICARDIAL EFFUSIONS. INT J CARDIOL. 1997 AUG 29;61(1):5-13

KOOLMAN J, RÖHM KH, TASCHENATLAS DER BIOCHEMIE. THIEME. STUTTGART, NEW YORK. 1994: 360-1

KRALSTEIN J, FRISHMAN WH. MALIGNANT PERICARDIAL DISEASES: DIAGNOSIS AND TREATMENT. CARDIOL CLIN. 1987 NOV;5(4):583-9

KRIKORIAN JG, HANCOCK EW. PERICARDIOCENTESIS. AM J MED. 1978 NOV;65(5):808-14

KRUPP G, KUHNE K, TAMM S, KLAPPER W, HEIDORN K, ROTT A, PARWARESCH R. MOLECULAR BASIS OF ARTIFACTS IN THE DETECTION OF TELOMERASE ACTIVITY AND A MODIFIED PRIMER FOR A MORE ROBUST 'TRAP' ASSAY. NUCLEIC ACIDS RES. 1997 FEB 15;25(4):919-21

LABRANCHE H, DUPUIS S, BEN-DAVID Y, BANI MR, WELLINGER RJ, CHABOT B. TELOMERE ELONGATION BY HNRNP A1 AND A DERIVATIVE THAT INTERACTS WITH TELOMERIC REPEATS AND TELOMERASE. NAT GENET. 1998 JUN;19(2):199-202

LAVELLE F, RIOU JF, LAOUI A, MAILLIET P. TELOMERASE: A THERAPEUTIC TARGET FOR THE THIRD MILLENNIUM? CRIT REV ONCOL HEMATOL. 2000 MAY;34(2):111-26

MAISCH B, RISTIC AD, SEFEROVIC PM. NEW DIRECTIONS IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF PERICARDIAL DISEASE. A PROJECT OF THE TASKFORCE ON PERICARDIAL DISEASE OF THE WORLD HEART FEDERATION. HERZ. 2000 DEC;25(8):769-80

MAISCH B I, RISTIC AD, PANKUWEIT S. INTRAPERICARDIAL TREATMENT OF AUTOREACTIVE PERICARDIAL EFFUSION WITH TRIAMCINOLONE; THE WAY TO AVOID SIDE EFFECTS OF SYSTEMIC CORTICOSTEROID THERAPY. EUR HEART J. 2002 OCT;23(19):1503-8.

MAISCH B II, RISTIC AD, PANKUWEIT S, NEUBAUER A, MOLL R. NEOPLASTIC PERICARDIAL EFFUSION. EFFICACY AND SAFETY OF INTRAPERICARDIAL TREATMENT WITH CISPLATIN. EUR HEART J. 2002 OCT;23(20):1625-31.

MAKAROV VL, HIROSE Y, LANGMORE JP. LONG G TAILS AT BOTH ENDS OF HUMAN CHROMOSOMES SUGGEST A C STRAND DEGRADATION MECHANISM FOR TELOMERE SHORTENING. CELL. 1997 MAR 7;88(5):657-66

MALAMOU-MITSI VD, ZIOGA AP, AGNANTIS NJ. DIAGNOSTIC ACCURACY OF PERICARDIAL FLUID CYTOLOGY: AN ANALYSIS OF 53 SPECIMENS FROM 44 CONSECUTIVE PATIENTS. DIAGN CYTOPATHOL. 1996 SEP;15(3):197-204

MARTINONI A, CIPOLLA CM, CIVELLI M, CARDINALE D, LAMANTIA G, COLLEONI M, DEBRAUD F, SUSINI G, MARTINELLI G, GOLDHIRSH A, FIORENTINI C. INTRAPERICARDIAL TREATMENT OF NEOPLASTIC PERICARDIAL EFFUSIONS. HERZ. 2000 DEC;25(8):787-93

MCCLINTOCK, B., THE STABILITY OF BROKEN ENDS OF CHROMOSOMES IN ZEA MAYS. GENETICS. 1941. 26: 234-82

MEID FH, GYGI CM, LEISINGER HJ, BOSMAN FT, BENHATTAR J. THE USE OF TELOMERASE ACTIVITY FOR THE DETECTION OF PROSTATIC CANCER CELLS AFTER PROSTATIC MASSAGE. J UROL. 2001 MAY;165(5):1802-5

MEYERS DG, BOUSKA DJ. DIAGNOSTIC USEFULNESS OF PERICARDIAL FLUID CYTOLOGY. CHEST. 1989 MAY;95(5):1142-3

MEYERS DG, MEYERS RE, PRENDERGAST TW. THE USEFULNESS OF DIAGNOSTIC TESTS ON PERICARDIAL FLUID. CHEST. 1997 MAY;111(5):1213-21

MEYERSON M. ROLE OF TELOMERASE IN NORMAL AND CANCER CELLS. J CLIN ONCOL. 2000 JUL;18(13):2626-34

MORALES CP, LEE EL, SHAY JW. IN SITU HYBRIDIZATION FOR THE DETECTION OF TELOMERASE RNA IN THE PROGRESSION FROM BARRETT'S ESOPHAGUS TO ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA. CANCER. 1998 AUG 15;83(4):652-9

MORIN GB. THE HUMAN TELOMERE TERMINAL TRANSFERASE ENZYME IS A RIBONUCLEOPROTEIN THAT SYNTHESIZES TTAGGG REPEATS. CELL. 1989 NOV 3;59(3):521-9

MOTHERBY H, KUBE M, FRIEDRICHS N, NADJARI B, KNOPS K, DONNER A, BASCHIERA B, DALQUEN P, BOCKING A. IMMUNOCYTOCHEMISTRY AND DNA-IMAGE CYTOMETRY IN DIAGNOSTIC EFFUSION CYTOLOGY I. PREVALENCE OF MARKERS IN TUMOUR CELL POSITIVE AND NEGATIVE SMEARS. ANAL CELL PATHOL. 1999;19(1):7-20

MOTHERBY H, NADJARI B, REMMERBACH T, MARCY T, POMJANSKAJA N, MULLER W, KNOPS K, HAUSSINGER D, STRAUER BE, BOCKING A. STATIC DNA CYTOMETRY AS A DIAGNOSTIC AID IN EFFUSION CYTOLOGY: II. DNA ANEUPLOIDY FOR IDENTIFICATION OF NEOPLASTIC CELLS IN EQUIVOCAL EFFUSIONS. ANAL QUANT CYTOL HISTOL. 1998 JUN;20(3):162-8

MOYZIS RK, BUCKINGHAM JM, CRAM LS, DANI M, DEAVEN LL, JONES MD, MEYNE J, RATLIFF RL, WU JR. A HIGHLY CONSERVED REPETITIVE DNA SEQUENCE, (TTAGGG)N, PRESENT AT THE TELOMERES OF HUMAN CHROMOSOMES. PROC NATL ACAD SCI U S A. 1988 SEP;85(18):6622-6

MU XC, BRIEN TP, ROSS JS, LOWRY CV, MCKENNA BJ. TELOMERASE ACTIVITY IN BENIGN AND MALIGNANT CYTOLOGIC FLUIDS. CANCER. 1999 APR 25;87(2):93-9

MÜLLER HJ. THE REMAKING OF CHROMOSOMES. THE COLLECTING NET – WOODS HOLE. 1938. 13:181-95

MÜLLER M, HEICAPPELL R, KRAUSE H, SACHSINGER J, PORSCHE C, MILLER K. TELOMERASE ACTIVITY IN MALIGNANT AND BENIGN RENAL TUMORS. EUR UROL. 1999;35(3):249-55

MULLIS KB, FALOONA FA. SPECIFIC SYNTHESIS OF DNA IN VITRO VIA A POLYMERASE-CATALYZED CHAIN REACTION. METHODS ENZYMOL. 1987;155:335-50

NAKAMURA TM, MORIN GB, CHAPMAN KB, WEINRICH SL, ANDREWS WH, LINGNER J, HARLEY CB, CECH TR. TELOMERASE CATALYTIC SUBUNIT HOMOLOGS FROM FISSION YEAST AND HUMAN. SCIENCE. 1997 AUG 15;277(5328):955-9

NAKAYAMA J, TAHARA H, TAHARA E, SAITO M, ITO K, NAKAMURA H, NAKANISHI T, TAHARA E, IDE T, ISHIKAWA F. TELOMERASE ACTIVATION BY HTRT IN HUMAN NORMAL FIBROBLASTS AND HEPATOCELLULAR CARCINOMAS. NAT GENET. 1998 JAN;18(1):65-8

NIIYAMA H, MIZUMOTO K, KUSUMOTO M, OGAWA T, SUEHARA N, SHIMURA H, TANAKA M. ACTIVATION OF TELOMERASE AND ITS DIAGNOSTIC APPLICATION IN BIOPSY SPECIMENS FROM BILIARY TRACT NEOPLASMS. CANCER. 1999 MAY 15;85(10):2138-43

NIMMO ER, PIDOUX AL, PERRY PE, ALLSHIRE RC. DEFECTIVE MEIOSIS IN TELOMERE-SILENCING MUTANTS OF SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE. NATURE. 1998 APR 23;392(6678):825-8

OHYASHIKI JH, OHYASHIKI K, TOYAMA K, SHAY JW. A NONRADIOACTIVE, FLUORESCENCE-BASED TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL TO DETECT AND QUANTITATE TELOMERASE ACTIVITY. TIG 12(10): 395-6, 1996

OLOVNIKOV AM. A THEORY OF MARGINOTOMY. THE INCOMPLETE COPYING OF TEMPLATE MARGIN IN ENZYMIC SYNTHESIS OF POLYNUCLEOTIDES AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE PHENOMENON. J THEOR BIOL. 1973 SEP 14;41(1):181-90

PARDUE ML. THE ENDS AND THE MIDDLE: PUTTING CHROMOSOMES TOGETHER. CURR OPIN GENET DEV. 1994 DEC;4(6):845-50

POREMBA C, BOCKER W, WILLENBRING H, SCHAFER KL, OTTERBACH F, BURGER H, DIALLO R, DOCKHORN-DWORNICZAK B. TELOMERASE ACTIVITY IN HUMAN PROLIFERATIVE BREAST LESIONS. INT J ONCOL. 1998 MAR;12(3):641-8

POSNER MR, COHEN GI, SKARIN AT. PERICARDIAL DISEASE IN PATIENTS WITH CANCER. THE DIFFERENTIATION OF MALIGNANT FROM IDIOPATHIC AND RADIATION-INDUCED PERICARDITIS. AM J MED. 1981 SEP;71(3):407-13

PRESS OW, LIVINGSTON R. MANAGEMENT OF MALIGNANT PERICARDIAL EFFUSION AND TAMPONADE. JAMA. 1987 FEB 27;257(8):1088-92

ROBERTS WC, GLANCY DL, DEVITA VT JR. HEART IN MALIGNANT LYMPHOMA (HODGKIN'S DISEASE, LYMPHOSARCOMA, RETICULUM CELL SARCOMA AND

MYCOSIS FUNGOIDES). A STUDY OF 196 AUTOPSY CASES. AM J CARDIOL. 1968 JUL;22(1):85-107

ROWLEY PT, TABLER M. TELOMERASE INHIBITORS. ANTICANCER RES. 2000 NOV-DEC;20(6B):4419-29

ROY J, FULTON TB, BLACKBURN EH. SPECIFIC TELOMERASE RNA RESIDUES DISTANT FROM THE TEMPLATE ARE ESSENTIAL FOR TELOMERASE FUNCTION. GENES DEV. 1998 OCT 15;12(20):3286-300

SAGRISTA-SAULEDA J, MERCE J, PERMANYER-MIRALDA G, SOLER-SOLER J. CLINICAL CLUES TO THE CAUSES OF LARGE PERICARDIAL EFFUSIONS. AM J MED. 2000 AUG 1;109(2):95-101

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA. PRIMER-DIRECTED ENZYMATIC AMPLIFICATION OF DNA WITH A THERMOSTABLE DNA POLYMERASE. SCIENCE. 1988 JAN 29;239(4839):487-91

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, AND T. MANIATIS, MOLECULAR CLONING – A LABORATORY MANUAL. COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK. 1989

SCOTT RW, GARVIN CF. TUMORS OF THE HEART AND PERICARDIUM. AM HEART J 1939 (17):431-6

SHAY JW, BACCHETTI S. A SURVEY OF TELOMERASE ACTIVITY IN HUMAN CANCER. EUR J CANCER. 1997 APR;33(5):787-91

SHAY JW. AT THE END OF THE MILLENNIUM, A VIEW OF THE END. NAT GENET. 1999 DEC;23(4):382-3

SHEPARD FA, MORGAN CD, EVANS WK, ET AL. MEDICAL MANAGEMENT OF MALIGNANT PERICARDIAL EFFUSION BY TETRACYCLINE SCLEROSIS. AM J CARDIOL 1987 (60):1161

SMITH S, DE LANGE T. TRF1, A MAMMALIAN TELOMERIC PROTEIN. TRENDS GENET. 1997 JAN;13(1):21-6

SMITH S, GIRIAT I, SCHMITT A, DE LANGE T. TANKYRASE, A POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE AT HUMAN TELOMERES. SCIENCE. 1998 NOV 20;282(5393):1484-7

SUEHARA N, MIZUMOTO K, TANAKA M, NIIYAMA H, YOKOHATA K, TOMINAGA Y, SHIMURA H, MUTA T, HAMASAKI N. TELOMERASE ACTIVITY IN PANCREATIC JUICE DIFFERENTIATES DUCTAL CARCINOMA FROM ADENOMA AND PANCREATITIS. CLIN CANCER RES. 1997 DEC;3(12 PT 1):2479-83

SZTURMOWICZ M, TOMKOWSKI W, FIJALKOWSKA A, BURAKOWSKI J, SAKOWICZ A, FILIPECKI S. THE ROLE OF CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN (CEA) AND NEURON-SPECIFIC ENOLASE (NSE) EVALUATION IN PERICARDIAL FLUID FOR THE RECOGNITION OF MALIGNANT PERICARDITIS. INT J BIOL MARKERS. 1997 JUL-SEP;12(3):96-101

TAGA S, OSAKI T, OHGAMI A, IMOTO H, YASUMOTO K. PROGNOSTIC IMPACT OF TELOMERASE ACTIVITY IN NON-SMALL CELL LUNG CANCERS. ANN SURG. 1999 NOV;230(5):715-20

TANGKIJVANICH P, TRESUKOSOL D, SAMPATANUKUL P, SAKDIKUL S, VORAVUD N, MAHACHAI V, MUTIRANGURA A. TELOMERASE ASSAY FOR DIFFERENTIATING BETWEEN MALIGNANCY-RELATED AND NONMALIGNANT ASCITES. CLIN CANCER RES. 1999 SEP;5(9):2470-5

VAITKUS PT, HERRMANN HC, LEWINTER MM. TREATMENT OF MALIGNANT PERICARDIAL EFFUSION. JAMA. 1994 JUL 6;272(1):59-64

WARREN WH. MALIGNANCIES INVOLVING THE PERICARDIUM. SEMIN THORAC CARDIOVASC SURG. 2000 APR;12(2):119-29

WATSON JD. ORIGIN OF CONCATEMERIC T7 DNA. NAT NEW BIOL. 1972 OCT 18;239(94):197-201

WEINRICH SL, PRUZAN R, MA L, OUELLETTE M, TESMER VM, HOLT SE, BODNAR AG, LICHTSTEINER S, KIM NW, TRAGER JB, TAYLOR RD, CARLOS R, ANDREWS WH, WRIGHT WE, SHAY JW, HARLEY CB, MORIN GB. RECONSTITUTION OF HUMAN TELOMERASE WITH THE TEMPLATE RNA COMPONENT HTR AND THE CATALYTIC PROTEIN SUBUNIT HTRT. NAT GENET. 1997 DEC;17(4):498-502

WIENER HG, KRISTENSEN IB, HAUBEK A, KRISTENSEN B, BAANDRUP U. THE DIAGNOSTIC VALUE OF PERICARDIAL CYTOLOGY. AN ANALYSIS OF 95 CASES. ACTA CYTOL. 1991 MAR-APR;35(2):149-53

WRIGHT WE, PIATYSZEK MA, RAINEY WE, BYRD W, SHAY JW. TELOMERASE ACTIVITY IN HUMAN GERMLINE AND EMBRYONIC TISSUES AND CELLS. DEV GENET. 1996;18(2):173-9

WRIGHT WE, SHAY JW, PIATYSZEK MA. MODIFICATIONS OF A TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL (TRAP) RESULT IN INCREASED RELIABILITY, LINEARITY AND SENSITIVITY. NUCLEIC ACIDS RES. 1995 SEP 25;23(18):3794-5

WRIGHT WE, TESMER VM, HUFFMAN KE, LEVENE SD, SHAY JW. NORMAL HUMAN CHROMOSOMES HAVE LONG G-RICH TELOMERIC OVERHANGS AT ONE END. GENES DEV. 1997 NOV 1;11(21):2801-9

WU YY, HRUSZKEWYCZ AM, DELGADO RM, YANG A, VORTMEYER AO, MOON YW, WEIL RJ, ZHUANG Z, REMALEY AT. LIMITATIONS ON THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TELOMERASE ACTIVITY BY THE ELECTROPHORETIC AND ELISA BASED TRAP ASSAYS. CLIN CHIM ACTA. 2000 MAR;293(1-2):199-212

YAHATA N, OHYASHIKI K, OHYASHIKI JH, IWAMA H, HAYASHI S, ANDO K, HIRANO T, TSUCHIDA T, KATO H, SHAY JW, TOYAMA K. TELOMERASE ACTIVITY IN LUNG CANCER CELLS OBTAINED FROM BRONCHIAL WASHINGS. J NATL CANCER INST. 1998 MAY 6;90(9):684-90

YANG CT, LEE MH, LAN RS, CHEN JK. TELOMERASE ACTIVITY IN PLEURAL EFFUSIONS: DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE. J CLIN ONCOL. 1998 FEB;16(2):567-73

YAZDI HM, HAJDU SI, MELAMED MR. CYTOPATHOLOGY OF PERICARDIAL EFFUSIONS. ACTA CYTOL. 1980 SEP-OCT;24(5):401-12

YOSHIDA K I, SUGINO T, TAHARA H, WOODMAN A, BOLODEOKU J, NARGUND V, FELLOWS G, GOODISON S, TAHARA E, TARIN D. TELOMERASE ACTIVITY IN

BLADDER CARCINOMA AND ITS IMPLICATION FOR NONINVASIVE DIAGNOSIS BY DETECTION OF EXFOLIATED CANCER CELLS IN URINE. CANCER. 1997 JAN 15;79(2):362-9

YOSHIDA K II, SUGINO T, GOODISON S, WARREN BF, NOLAN D, WADSWORTH S, MORTENSEN NJ, TOGE T, TAHARA E, TARIN D. DETECTION OF TELOMERASE ACTIVITY IN EXFOLIATED CANCER CELLS IN COLONIC LUMINAL WASHINGS AND ITS RELATED CLINICAL IMPLICATIONS. BR J CANCER. 1997;75(4):548-53

YUI J, CHIU CP, LANSDORP PM. TELOMERASE ACTIVITY IN CANDIDATE STEM CELLS FROM FETAL LIVER AND ADULT BONE MARROW. BLOOD. 1998 MAY 1;91(9):3255-62

ZAKIAN VA. STRUCTURE AND FUNCTION OF TELOMERES. ANNU REV GENET. 1989;23:579-604. REVIEW

ZIEGLE JS, SU Y, CORCORAN KP, NIE L, MAYRAND PE, HOFF LB, MCBRIDE LJ, KRONICK MN, DIEHL SR. APPLICATION OF AUTOMATED DNA SIZING TECHNOLOGY FOR GENOTYPING MICROSATELLITE LOCI. GENOMICS. 1992 DEC;14(4):1026-31

ZIPF RE JR, JOHNSTON WW. THE ROLE OF CYTOLOGY IN THE EVALUATION OF PERICARDIAL EFFUSIONS. CHEST. 1972 NOV;62(5):593-6

8 Akademische Lehrer

in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Doss, Feuser, Giese, Gotzen, Griss, Happle, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Kretschmer, Krieg, Lennartz, Lippert, Moll, Mueller, Niessing, Oertel, Remschmidt, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Szcubayko, Vohland, Voigt, Weihe, Werner

in Siegen: Grond, Schött

in Johannesburg, Südafrika: Degiannis, Smith

9 Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Marcus Schuermann für die Möglichkeit der Promotion. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, sein stetiges Interesse an dieser Arbeit sowie seine wertvolle Unterstützung während des gesamten praktischen und schriftlichen Teils der Dissertation.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dipl. Humanbiol. Michael Kersting, ohne den die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Seine intensive Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft wusste ich immer zu schätzen. Als Ansprechpartner stand er mir jederzeit mit Ratschlägen und konstruktiver Kritik bei.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Alison Kraus, die meine Neugier auf wissenschaftliches Arbeiten und eine experimentelle Doktorarbeit entfacht und mir den Einstieg in die Techniken der Zellkultur ermöglicht hat. Meiner Vorgängerin Susanne Meyer-Neumühlen danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Methodik der Telomerase-Messungen.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Andreas Burchert für seine fachliche Unterstützung und engagierte Hilfe insbesondere bei Aufarbeitung und Kultur der CD34-Zellen sowie deren FACS-Analysen.

Den Medizinisch Technischen Assistenten der Abteilung Hämatologie, Onkologie und Immunologie gilt ein herzlicher Dank für die tatkräftige Unterstützung bei der Sammlung und Verarbeitung von Perikardergüssen.

Frau Dr. Sabine Pankuweit verdient besonderen Dank für die gute und angenehme Kooperation mit der Kardiologie. Ich danke der kardiologischen Abteilung für die Überlassung der Perikardergüsse und die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, die mich nicht nur finanziell unterstützt haben, sondern mir insbesondere bei nicht-medizinischen Dingen mit Rat und Tat zur Seite standen.

10 Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

- Name: Teja Karsten Wittstock
- Wohnort: Kabeler Str. 58a, 58099 Hagen
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Konfession: evangelisch
- Geburtsdatum: 14.11.1975
- Geburtsort:: Berlin-Wilmersdorf
- Eltern: Dr. Wilfried Wittstock, Dipl.-Kfm, Akademischer Oberrat FernUniversität Hagen
  Regine Wittstock, MA Sozialwissenschaften, Dozentin der VHS Schwerte

SCHULBILDUNG

- 1982 – 1986 Grundschule Hagen-Emst
- 1986 – 1995 Ricarda-Huch-Gymnasium Hagen
  Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDIENST

- Rettungsdienst beim Malteser-Hilfs-Dienst Hagen Aug. 1995 – Okt. 1996
- *Prüfungen* Rettungshelfer in Bonn Sept. 1995
  Rettungssanitäter in Herbstein Dez. 1995
- *Praktika* Ev. Krankenhaus Elsey Sept. – Okt. 1995
  Rettungswache ASB Dortmund Okt. – Nov. 1995

STUDIUM

- Philipps-Universität Marburg WS 1996/97 – WS 2002/03
- *Prüfungen*: Physikum SS 1998
  1. Staatsexamen SS 1999
  2. Staatsexamen WS 2001/02
  3. Staatsexamen WS 2002/03

- *Praktisches Jahr*: 1. Tertial Innere Medizin April – Aug. 2002
  - Kreiskrankenhaus Siegen
    (unter der Leitung von Prof. Dr. Schött)
  2. Tertial Chirurgie Aug. – Dez. 2002
  - Chris Hani Baragwanath Hospital Johannesburg,
    Südafrika (unter der Leitung von Prof. Dr. Smith)
  3. Tertial Neurologie Dez.– März 2003
  - Kreiskrankenhaus Siegen
    (unter der Leitung von Priv. Doz. Dr. Grond)
- *Famulaturen*: Innere Medizin St. Marien-Hospital Hagen März – April 1999
  Chirurgie Ev. Waldkrankenhaus Berlin-Spandau Sept. – Okt. 1999
  Allgemeinarztpraxis Dr. Moritz, Marburg Aug. – Sept. 2000
  Neurologie St. Johannes-Hospital Hagen Aug. – Sept. 2001
- *Praktikum*: Krankenpflege Intensivstation Feb. – März 1997
  St. Johannes-Hospital Hagen
- *Nebentätigkeiten*: Studentische Hilfskraft Philipps-Universität Marburg
  - Neuroanatomie-Kurs SS 1998
  - Präparier-Kurs WS 1998/99

  Pflegedienst im Krankenhaus
  - Allgemeines Krankenhaus Hagen (versch. Stationen)
  - Hochwaldkrankenhaus Bad Nauheim (Intensivstation)

  Rettungsdienst ASB Dortmund (ehrenamtlich)
- Seit Juli 2003 AiP in der Inneren Abteilung des St. Johannes-Hospital Hagen

DISSERTATION

- *Thema* Diagnostische Bedeutung von Telomerase-Aktivität in Perikardergüssen
- *Fachbereich* Klinik für Innere Medizin, Abteilung Hämatologie und Onkologie
- *Betreuer* Prof. Dr. Marcus Schuermann
- *Praktischer Teil* Nov. 1999 – April 2001
- *Veröffentlichungen* Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie in Mannheim Okt. 2001

  K. WITTSTOCK, S. MEYER-NEUMÜHLEN, M.KERSTING, S. PANKUWEIT, B. MAISCH, A. NEUBAUER, M. SCHUERMANN:
  Telomerase activity in pericardial effusions: diagnostic significance, in: Onkologie Int. Journal for Cancer Research and Treatment, Sonderheft 6, Vol. 24, S. 212

AUSLANDSAUFENTHALTE

- Buffalo, U.S.A.: High School Kenmore West Aug. – Dez. 1992
- Johannesburg, Südafrika: Chris Hani Baragwanath Hospital Aug. – Dez. 2002
- Montlucon, Frankreich (Schüleraustausch) Mai 1991
- San Diego, U.S.A (Schüleraustausch) März 1994

11 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Diagnostische Bedeutung von Telomerase-Aktivtät in Perikardergüssen“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Hämatologie, Onkologie und Immunologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Marcus Schuermann mit Unterstützung von Herrn Dipl. Humanbiol. Michael Kersting ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, 12. Dezember 2003