

4 Ergebnisse

4.1 Diagnostische Aspekte der Telomerase beim Nierenkarzinom

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen der bisher bekannten Bestandteile der Telomerase in Nierentumor- und Nierennormalgeweben, sowie in Nierenkarzinomzelllinien. Zuerst wurde die Telomeraseaktivität in den Gewebeproben und Zellen analysiert. Weiterhin wurden Bestimmungen der Expression der katalytischen Untereinheit hTERT und der RNA-Komponente hTR der Telomerase durchgeführt. In einigen Zelllinien und Gewebeproben wurde außerdem die Länge der Telomere bestimmt.

4.1.1 Telomeraseaktivität, Expression von hTERT und hTR in Nierenkarzinomzelllinien

Untersuchte Nierenkarzinomzelllinien waren die humanen Zelllinien Caki-1, Caki-2, SN12L1, A 498, A 407 und ACHN. Die Tabelle 4-1 stellt den Ursprung der Zelllinien und ihre Telomeraseaktivität zum Vergleich zusammen.

Tabelle 4-1 Humane Nierenkarzinomzelllinien und ihre Telomeraseaktivität

Zelllinie	Ursprung	Telomerase-Aktivität in % bezogen auf Caki-1 Zellen
Caki-1	humanes klarzelliges und metastasierendes Nierenkarzinom	100,0
ACHN	humanes Nierenadenokarzinom	94,5
Caki-2	humanes klarzelliges und primäres Nierenkarzinom	71,2
A 498	humanes papillär epidermoides Nierenkarzinom oder Adenokarzinom	61,8
A 704	humanes Nierenadenokarzinom	61,6
SN12L1	humanes Nierenadenokarzinom	45,2

Die Telomeraseaktivität wurde für alle Zelllinien mit dem TRAP-Assay unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern bei 3 µg und 0,3 µg Protein analysiert. Die relative Telomeraseaktivität (RTA) wurde berechnet, wie in Punkt 3.2.1.3 beschrieben. Aus drei verschiedenen Messungen ist der Mittelwert bestimmt worden. Die quantitativen Werte wurden miteinander verglichen, indem der höchste Wert der Telomeraseaktivität in Caki-1 Zellen 100 % gesetzt wurde. Alle Zelllinien können als telomerase-positiv angesehen werden. Die Zelllinien Caki-1 und ACHN zeigen eine doppelt so hohe Telomeraseaktivität wie SN12L1. Die Zelllinien Caki-2, A 704 und A 498 besitzen eine mittlere Telomeraseaktivität. In Abbildung 4-1 ist die relative Telomeraseaktivität der Zelllinien in absoluten Zahlen dargestellt.

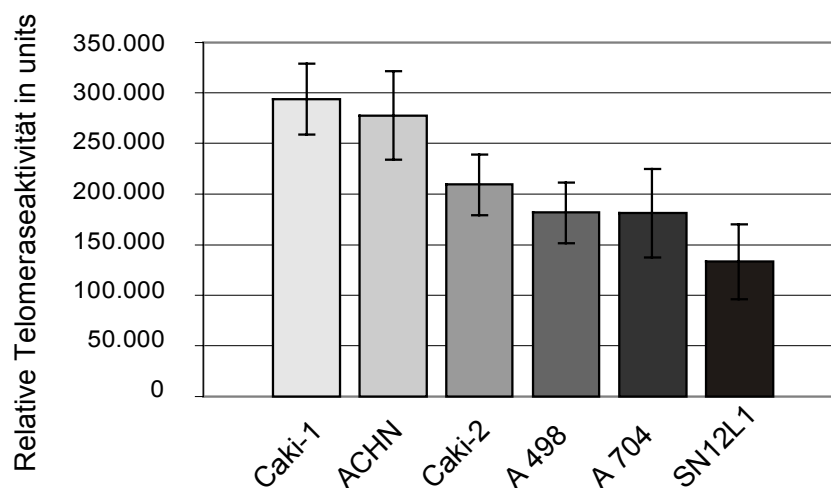


Abbildung 4-1 Relative Telomeraseaktivität der Nierenkarzinomzelllinien bei 0,3 µg eingesetzter Proteinmenge

Zur weiteren Charakterisierung der Nierenkarzinomzelllinien wurde die Expression der Telomeraseuntereinheiten hTR und hTERT mit den RT-PCR-ELISA Kits bestimmt (Tabelle 4-2). Die Expression in den verschiedenen Zelllinien wurde verglichen, indem die Proben mit der höchsten Absorption auf 100 % gesetzt wurden. Hierbei zeigt sich eine sehr hohe Expression von hTR in den Zelllinien ACHN, Caki-2 und SN12L1 und eine mittlere Expression in A 704 und Caki-1. Die hTERT-Expression in den Zelllinien erweist sich als sehr unterschiedlich, eine starke Expression wurde in Caki-1 und Caki-2 ermittelt, die Expression in A 704 ist zur Hälfte geringer. Sehr gering waren die Expressionsraten in ACHN, SN12L1 und A 498.

Tabelle 4-2 Humane Nierenkarzinomzelllinien und ihre relative hTR- und hTERT-Expression bestimmt mit dem RT-PCR ELISA

Zelllinie	hTR	hTR in %	hTERT	hTERT in %
Caki-2	3,500	100	2,854	94,0
ACHN	3,500	100	0,264	8,7
SN12L1	3,500	100	0,447	14,7
A 704	1,980	56,7	1,299	42,8
Caki-1	1,448	41,4	3,034	100
A 498	0,143	4,1	0,534	17,6

Parallel zu der Messung mit den RT-PCR ELISAs wurde die hTERT-Expression in den Nierenzellkarzinomen mit dem LightCycler Telo TAGGG hTERT Quantification Kit analysiert. Hier wurden ähnlich wie im hTERT RT-PCR ELISA für die Zelllinien Caki-1 und Caki-2 die höchsten Expressionen von 271,6 und 523,2 Expressionseinheiten bestimmt. Die anderen Zelllinien A 704, ACHN, SN12L1 und A 498 zeigen dagegen eine nur sehr geringe Expression von hTERT mit Werten unter 20 Expressionseinheiten (zur Auswertung siehe auch 4.1.2.2).

In der Auswertung zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Messung mit dem RT-PCR ELISA oder der quantitativen LC RT-PCR.

4.1.2 Telomeraseaktivität, Expression von hTERT und hTR in Nierengeweben

Aufgrund der zeitlichen Abfolge wurden zwei Serien von Nierengeweben untersucht. Deren histopathologische Einordnung ist in der Tabelle 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3 Auflistung der beiden Serien von untersuchten Nierengeweben und ihre histopathologische Einordnung, vgl. hierzu auch WHO-Klassifikation (Tabelle 2-1)

Erste Serie

- 52 Nierentumorgewebe
 - 48 maligne Gewebe
 - 40 Nierenzellkarzinome (davon 33 Klarzellkarzinome)
 - 4 Urothelkarzinome
 - 4 Onkozytome
 - 4 benigne Gewebe
 - 4 Angiomyolipome
- 52 Normalnierengewebe

Zweite Serie

- 46 Nierentumorgewebe
 - 35 Klarzellkarzinome
- 46 Normalnierengewebe
 - 35 korrespondierende Normalgewebe

Zuerst wurde in allen Proben der ersten Serie der Nachweis der Telomeraseaktivität mit dem TRAP-Assay geführt. Von einigen Nierentumoren und Normalgeweben wurde außerdem die Länge der Telomere bestimmt. Nach den Ergebnissen der ersten Serie war es aufgrund von neuen Erkenntnissen zum Telomeraseproteinkomplex nötig eine neue Serie von Nierentumoren und ihren dazugehörigen Nierennormalgeweben zu sammeln, um in diesen Proben die Expression der Telomeraseuntereinheiten (hTR, hTERT) zu untersuchen. Von den Proben der zweiten Serie wurde deshalb in allen Proben mit der LightCycler RT-PCR und in ungefähr zwei Drittel der Proben mittels des RT-PCR ELISAs zusätzlich zur Telomeraseaktivität die hTERT und hTR-Expression bestimmt.

4.1.2.1 Telomeraseaktivität

In der **ersten Serie** wurden 52 Nierentumore, davon waren 40 histologisch gesicherte Nierenzellkarzinome, zur Analyse mit dem TRAP-Assay herangezogen (siehe Tabelle 4-3). Die Tumorstadien, Tumorgrading, histologische Subklassifikation, Metastasierung und Telomeraseaktivität der 40 Nierenzellkarzinome sind in Tabelle 4-4 wiedergegeben. In der Gruppe der Nierenzellkarzinome wurde in 63 % der Fälle Telomeraseaktivität nachgewiesen. Weiterhin wurde in allen 4 Urothelkarzinomen, jedoch in keinem der 4 Onkozytome, Telomeraseaktivität gefunden. In den 4 Angiomyolipome, die zu den benignen

Nierentumoren gezählt werden, wurde ebenfalls keine Telomeraseaktivität nachgewiesen. Die jeweils korrespondierenden Nierennormalgewebe zeigten in keinem Fall Telomeraseaktivität.

Tabelle 4-4 Histopathologische Klassifizierung (TNM-Klassifikation der UICC; 4. Auflage 1992) und Nachweis der Telomeraseaktivität mit dem TRAP-Assay in der ersten Serie von 40 Nierenzellkarzinomen.

(+ nachweisbare Telomeraseaktivität; - nicht nachweisbare Telomeraseaktivität)

	Staging	Grading	Metastasen	Subtyp	Telomerase-aktivität
1	pT3a	G3		klarzellig	-
2	pT2	G2		klarzellig	+
3	pT2	G2		chromophob	-
4	pT2	G2		klarzellig	-
5	pT3b	G3	N1	klarzellig	+
6	pT2	G2		klarzellig	-
7	pT2	G2		klarzellig	+
8	pT3a	G3		chromophob	-
9	pT1	G2		klarzellig	-
10	pT2	G2		klarzellig	-
11	pT3a	G3	N1	klarzellig	+
12	pT2	G2		klarzellig	+
13	pT2	G2		papillär	+
14	pT3a	G3		chromophil	-
15	pT2	G2		klarzellig	+
16	pT2	G3		klarzellig	-
17	pT3b	G3	M1 (Nebenniere)	klarzellig	+
18	pT3a	G3		klarzellig	+
19	pT1	G1		klarzellig	+
20	pT2	G2		klarzellig	+
21	pT3a	G1		klarzellig	+
22	pT2	G2		klarzellig	-
23	pT3a	G2	M1 (Pleura)	chromophil	+
24	pT3a	G3		klarzellig	+
25	pT3a	G3		klarzellig	+
26	pT2	G2		klarzellig	+
27	pT2	G2		klarzellig	+
28	pT2	G2		klarzellig	-
29	pT2	G2		klarzellig	+
30	pT2	G2		klarzellig	+
31	pT2	G2		klarzellig	-
32	pT3a	G3		klarzellig	-
33	pT2	G2		klarzellig	+
34	pT2	G2		klarzellig	-
35	pT3b	G2		chromophob	-
36	pT3b	G3		klarzellig	+
37	pT2	G2		klarzellig	+
38	pT3a	G2		klarzellig	+
39	pT2	G2		chromophob	+
40	pT3a	G2		klarzellig	+

Die Ergebnisse deuten auf eine Stadienabhängigkeit der Telomeraseaktivität hin (Tabelle 4-5), die jedoch nicht statistisch signifikant ist. Bei auf die Niere beschränkten Nierenzellkarzinomen (pT1 und pT2) wurde in 14 von 24 Fällen (58 %) Telomeraseaktivität

nachgewiesen. Bei organüberschreitendem Tumorwachstum (pT3) findet sich die Telomeraseaktivität in 11 von 16 Fällen (69 %).

Auffallend sind die Fälle (Nr. 5, 11, 17, 23) mit organüberschreitenden Nierenzellkarzinomen; diese 4 Fälle zeigten zu 100 % Telomeraseaktivität. Keine Korrelation wurde zum Tumor-Grading bzw. zu histologischen Subtypen gefunden. Diese Ergebnisse wurden 1999 publiziert (Müller *et al.*, 1999).

Tabelle 4-5 Korrelation zwischen Telomeraseaktivität und Tumorstadium (TNM-Klassifikation der UICC, 4. Auflage von 1992) bei Nierenzellkarzinomen

Tumorstadium	Anzahl	Telomerase positiv	% Telomerase positiv
pT1	2	1	50 %
pT2	22	13	59 %
pT3	16	11	69 %
Summe	40	25	63 %

In der **zweiten Serie** (siehe Tabelle 4-3) von Nierentumoren wurden insbesondere die 35 klarzelligen Nierenzellkarzinome untersucht, da es sich hierbei um die Gruppe mit der häufigsten Inzidenz innerhalb der Nierenzellkarzinome handelt. In allen 35 klarzelligen Nierenzellkarzinomen und den dazugehörenden Normalgeweben wurde die Telomeraseaktivität mit dem TRAP-Assay unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern analysiert. Zusätzlich dazu wurden zum Vergleich der beiden Methoden in 26 der 35 korrespondierenden Gewebeproben die Telomeraseaktivität mit dem Telomerase-PCR-ELISA untersucht.

Unter Verwendung des TRAP-Assays mit fluoreszierenden Primern konnte in 16 von 35 der untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinomen Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, das entspricht 46 % der Tumoren (Tabelle 4-6). Auch in dieser Serie wurde keine Telomeraseaktivität in dem untersuchten Onkozytom und in dem benignen Angiomyolipom nachgewiesen. Keines der korrespondierenden Normalnierengewebe zeigte hier Telomeraseaktivität.

Tabelle 4-6 Histopathologische Klassifizierung (TNM-Klassifikation der UICC von 1997) und Nachweis der Telomeraseaktivität mit dem TRAP-Assay in den 35 klarzelligen Nierenzellkarzinomen der zweiten Serie. (NT - Nierentumor; + nachweisbare Telomeraseaktivität; - nicht nachweisbare Telomeraseaktivität)

	Nummer	Staging	Grading	Metastasen	Telomerase-aktivität NT
1	338	pT3a	G2		-
2	354	pT1	G2		+
3	359	pT3b	G3		+
4	366	pT2	G2		-
5	379	pT3b	G2		+
6	387	pT1	G2		+
7	388	pT2	G3		-
8	390	pT3b	G3		-
9	398	n.d.	n.d.		+
10	414	pT2	G3		+
11	415	pT1	G3		-
12	419	pT3	G3		+
13	420	pT2	G2		-
14	421	pT3a	G3		+
15	433	pT2	n.d.		+
16	434	pT1	G2		+
17	436	pT3a	G3		-
18	437	pT1	G1		+
19	439	pT2	G3		+
20	441	pT2	G2		-
21	442	pT3a	G3		+
22	447	pT1	G3		+
23	453	pT1	G2		-
24	472	pT3a	G2		-
25	473	pT1	G2		-
26	500	pT1	G2		-
27	501	pT3a	G2		+
28	503	pT1	G2		-
29	504	pT3b	G3	N2	-
30	507	pT1	G2		-
31	508	pT1	G3		-
32	509	pT1	G2		-
33	510	pT1	G2		-
34	512	pT1	G3		-
35	513	pT2	G3		+

Ein Beispiel für die Bestimmung der Telomeraseaktivität im Nierentumor 354 und des zugehörigen Normalgewebes im Vergleich zur Nierenkarzinomzelllinie RENCA ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Die Reaktionsprodukte wurden auf dem ABI 377 Sequenzer analysiert und mit dem GeneScan Analysis Programm ausgewertet. Der Tumor 354 und die RENCA-Zelllinie zeigen die, für die Telomeraseaktivität, typische Leiterkurve. Im Normalgewebe 354 wird keine Kurve generiert.

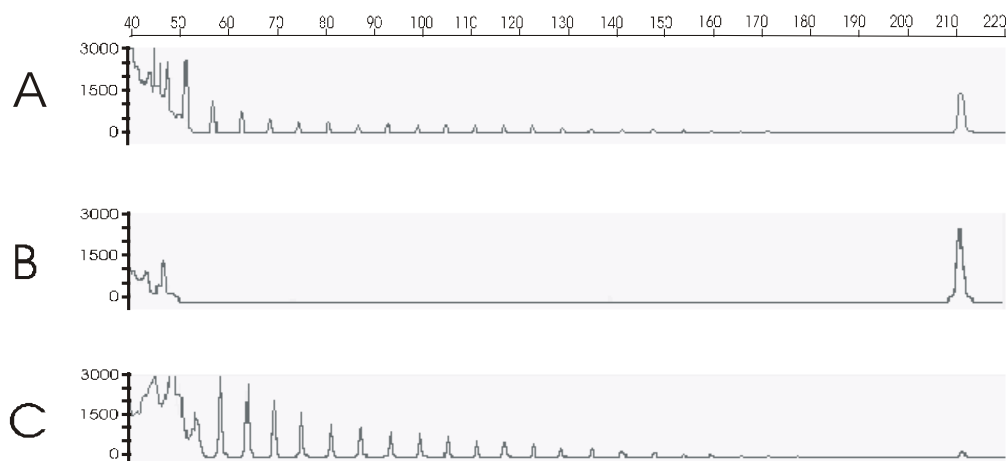


Abbildung 4-2 Darstellung der Telomeraseaktivität des Nierenzellkarzinoms und der Normalniere 354 bestimmt im TRAP-Assay und analysiert auf dem ABI 377 Sequenzer; (A) NT 354; (B) NN 354; (C) RENCA-Zelllinie. Der Peak bei 212 bp stellt den internen Standard dar.

Bei diesen Messungen konnte der Trend zur Stadienabhängigkeit der Telomeraseaktivität aus der ersten Serie nicht bestätigt werden. Ebenso wurde keine Abhängigkeit zum Tumorgrading gefunden (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7 Korrelation der Telomeraseaktivität der klarzelligen Nierenzellkarzinome zu Tumorstaging und -grading. (¹ ein Tumor nicht definiert, ² zwei Tumoren nicht definiert)

	pT1/2	pT3/4	Σ	G1	G2	G3	Σ
TA neg	13	6	19	0	12	7	19
In %	68 %	32 %			63 %	37 %	
TA pos	9	6	15 ¹	1	5	8	14 ²
In %	60 %	40 %		7 %	36 %	57 %	
Σ	22	12	34 ¹	1	17	15	33 ²
	64 %	35 %		3 %	51 %	45 %	

In 26 der 35 klarzelligen Nierenzellkarzinome wurde die Telomeraseaktivität auch mit dem Telomerase-PCR-ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst. Mit dieser Methode konnte in 11 von 26 Klarzellkarzinome keine Telomeraseaktivität und in 15 von 26 Fällen (58 %) Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In den untersuchten Nierennormalgeweben ist auch mit diesem Test keine Telomeraseaktivität nachweisbar. Der Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung der TRAP-Produkte zeigt mit einer Ausnahme eine sehr gute Korrelation der Ergebnisse. Im Tumor 339 wurde mit dem Telomerase-PCR-ELISA eine hohe Telomeraseaktivität nachgewiesen, mit dem TRAP-Assay konnte in zwei Wiederholungen keine Aktivität bestimmt werden.

Tabelle 4-8 Telomeraseaktivität von klarzelligen 26 Nierenzellkarzinomen analysiert mit dem Telomerase PCR ELISA. Eine Probe wird als Telomerase positiv angesehen, wenn die Absorption im ELISA-Nachweis größer als 0,2 beträgt. (NN- Normalnierengewebe, NT - Nierentumor, T.A. – Telomeraseaktivität)

	Nr.	NN A ₄₅₀₋₆₉₀ in units	NN T.A.	NT A ₄₅₀₋₆₉₀ in units	NT T.A.
1	338	0,036	-	0,058	-
2	339	0,015	-	2,920	+
3	354	0,049	-	1,391	+
4	359	0,047	-	0,459	+
5	366	0,025	-	0,091	-
6	379	0,099	-	0,829	+
7	387	0,029	-	0,398	+
8	388	0,089	-	0,044	-
9	390	0,188	-	0,131	-
10	398	0,089	-	1,412	+
11	414	0,065	-	2,533	+
12	415	0,095	-	0,198	-
13	419	0,059	-	0,338	+
14	420	0,049	-	0,063	-
15	421	0,014	-	0,273	+
16	433	0,010	-	0,317	+
17	434	0,045	-	1,065	+
18	436	0,024	-	0,166	-
19	437	0,066	-	0,307	+
20	439	0,028	-	0,472	+
21	441	0,063	-	0,094	-
22	442	0,017	-	0,231	+
23	447	0,041	-	0,280	+
24	453	0,007	-	0,034	-
25	472	0,020	-	0,102	-
26	473	0,078	-	0,138	-

4.1.2.2 Expression der hTR und der hTERT

Nach Veröffentlichung der RNA-Komponente hTR und der katalytischen Untereinheit hTERT des Telomerasekomplexes wurde es möglich zusätzlich zur Telomeraseaktivität, die Expression von hTR und hTERT mittels einer RT-PCR nachzuweisen. Dazu wurde in einer zweiten Serie Gesamt-RNA aus frischem Operationsmaterial von Nierentumor- und Nierennormalgewebe isoliert.

Zur Analyse der Expression von hTR und hTERT in den Nierenkarzinomen standen anfänglich Testkits der Firma Roche Diagnostics zur Verfügung, in welchen nach einer Einschritt-RT-PCR eine Detektion der PCR-Produkte mit dem ELISA-Verfahren durchgeführt wurde (siehe unter Methoden Abschnitt 3.2.3.2). Die Ergebnisse des hTR RT-PCR-ELISAs und des hTERT RT-

PCR-ELISAs von den 35 klarzelligen Nierenzellkarzinomen und den korrespondierenden Nierennormalgeweben sind in Tabelle 4-9 zusammengestellt.

Für die Auswertung wurde ein Schwellenwert von 0,2 $A_{450-690}$ units, analog dem Telomerase-PCR-ELISA, eingeführt. Bei Werten größer als 0,2 units wurde die Probe positiv für die Expression, bei Werten kleiner als 0,2 units als negativ für die Expression von hTR oder hTERT bezeichnet. Mit dem RT-PCR-ELISA sind 85 % der Nierennormalgewebe und alle Nierentumore für hTR positiv getestet worden. Für die Expression der hTERT liegt der Prozentsatz geringer, hier wurden in 14 % der Nierennormalgewebe und in 40 % der Nierenzellkarzinome hTERT nachgewiesen (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-9 Bestimmung der hTR und hTERT Expression mittels des RT-PCR-ELISAs in 35 klarzelligen Nierenzellkarzinomen. (NN – Normalnierengewebe, NT- Nierentumorgewebe)

		hTR ELISA		hTERT ELISA	
		NN $A_{450-690}$ in units	NT $A_{450-690}$ in units	NN $A_{450-690}$ in units	NT $A_{450-690}$ in units
1	338	3,500	3,500	0,000	1,923
2	354	3,500	3,500	1,736	2,07
3	359	3,500	3,500	0,000	2,055
4	366	3,500	3,500	0,002	1,485
5	379	3,500	3,500	0,004	1,972
6	387	1,517	3,500	0,022	2,007
7	388	3,500	3,500	0,001	1,598
8	390	3,500	3,500	0,002	2,002
9	398	0,869	3,500	0,000	0,027
10	414	3,500	3,500	0,000	0,087
11	415	2,935	3,500	0,000	0,294
12	419	2,981	3,500	0,000	0,726
13	420	3,500	3,500	0,003	0,003
14	421	3,104	3,500	0,003	0,015
15	433	0,454	3,500	0,002	0,145
16	434	0,346	3,500	0,010	0,358
17	436	0,051	2,413	0,007	0,007
18	437	0,005	3,500	0,007	0,018
19	439	3,500	2,427	0,005	0,074
20	441	0,082	1,965	0,009	0,040
21	442	3,500	3,500	0,006	0,022
22	447	0,036	3,500	0,003	0,009
23	453	0,419	3,500	0,005	0,009
24	472	3,500	2,241	0,006	0,005
25	473	3,500	3,500	0,005	0,011
26	500	1,892	2,978	0,005	0,017
27	501	3,500	3,500	0,497	0,001
28	503	3,285	3,500	0,113	0,922
29	504	3,500	3,500	1,418	1,528
30	507	3,500	3,500	0,153	0,069
31	508	3,500	3,088	0,003	0,003
32	509	2,354	1,583	0,000	0,002
33	510	1,923	1,927	0,000	0,001
34	512	3,500	3,500	0,313	0,004
35	513	0,198	1,240	0,376	2,5

Tabelle 4-10 Auswertung der Bestimmung der hTR- und hTERT-Expression in 35 klarzelligen Nierenzellkarzinomen mittels der RT-PCR-ELISAs. Positiv sind die Proben mit einer Absorption größer als 0,2 units. (NN – Normalnierengewebe, NT- Nierentumorgewebe)

Gewebe	hTR positiv		hTERT positiv	
	NN	30	85 %	5
NT	35	100 %	14	40 %

Nach den semiquantitativen Nachweisen per RT-PCR-ELISAs wurde mit den von Roche Diagnostics neu entwickelten Kits LightCycler Telo hTERT *TTAGGG* Quantifikation Kit und dem Telo hTR *TTAGGG* Quantifikation Kit für das LightCycler-PCR-System zusätzlich eine quantitative Bestimmung der Expression von hTR und hTERT durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls an den 35 klarzelligen Nierenkarzinomen und den korrespondierenden Nierennormalgeweben der zweiten Serie durchgeführt. Hierbei wurden die PCR-Produkte der hTR und hTERT nach einer Einschnitt-RT-PCR „On-line“ auf dem Lightcycler detektiert. Bei dieser quantitativen PCR wird die Anzahl der Transkripte in der vorliegenden RNA durch eine mitlaufende Standard-PCR mit bekannter Transkriptzahl bestimmt. Anschließend werden die gewonnenen Werte mit der Expression eines ubiquitär exprimierten Gens, in diesem Fall der Phosphobilinogen Deaminase (PBGD) normiert (siehe unter Methoden Abschnitt 3.2.4.1). Die Expressionseinheiten [E.E.] werden mit den Formeln $\text{hTR}_{\text{normalized}} \text{ in [E.E.] = (hTR Kopien mit RT - hTR Kopien ohne RT) / PBGD Kopien pro Probe}$ und $\text{hTERT}_{\text{normalized}} \text{ in [E.E.] = (hTERT Kopien/PBGD Kopien) x 1000}$ berechnet.

Die Expression der hTR in den Nierenkarzinomproben variiert zwischen 0 und 228 E.E., in den Nierennormalgeweben ist die Variation geringer, hier liegt sie zwischen 0 und 60 E.E.. Der Median der hTR Expressionseinheiten für die Tumorproben beträgt 50 E.E. und für die Nierennormalgewebe 22 E.E. (Abbildung 4-3). Ein Beispiel für die Analyse der hTR per LightCycler RT-PCR ist für die Tumorprobe 354 und dem korrespondierenden Normalgewebe in Abbildung 4-4 B zu sehen. Die hTR-Kopienanzahl in der Tumor und Normalprobe sind in der Abbildung ähnlich. In beiden Proben ist eine Amplifikation von hTR zwischen dem 24. und 26. PCR-Zyklus zu beobachten. Die Expression des Kontrollgens PBGD jedoch variiert zwischen Normal- und Tumorgewebe. Nach Normalisierung mit der PBGD-Expression errechnet sich für die Proben 354 eine unterschiedliche Expression, für NN 354 werden 3,2 E.E. und für NT 354 32,8 E.E. berechnet.

Wird die Expression unter Beachtung eines Schwellenwertes von 10 E.E. betrachtet, ergibt sich, dass 83 % der Nierenkarzinome und 56 % der Normalgewebe hTR positiv sind.

Die Expressionsuntersuchungen der hTERT in den Nierenkarzinomen zeigen ebenfalls eine starke Variation, man erhält eine Expression zwischen 0 und 1485 E.E.. Im Gegensatz dazu

ist die Variation in den Nierennormalgeweben zwischen 0 und 116 E.E. geringer. Der Median der hTERT-Expression in den Tumorproben ist 96 E.E. und in den Nierennormalgeweben 12 E.E. (Abbildung 4-3).

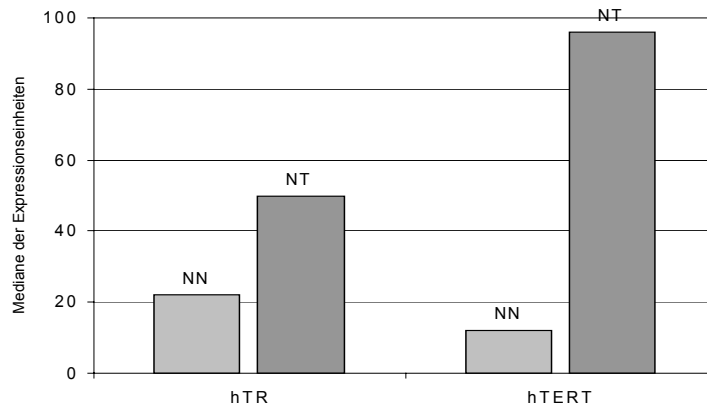


Abbildung 4-3 Mediane der Expressionseinheiten hTR und hTERT in Normalnierengewebe (NN) und Nierentumorgewebe (NT)

Ein Beispiel der hTERT-Analyse mit dem Kontrollgen PBGD und dem internen Standard ist für die Gewebeproben 354 in Abbildung 4-4 A dargestellt. Im Normalgewebe ist keine hTERT-Expression nachzuweisen. Die Expression des PBGDs variiert zwischen Tumor- und Normalgewebe; für das Tumorgewebe wurde eine hTERT-Expression von 33,7 E.E. bestimmt.

Wird zur Analyse der hTERT-Expression ein Schwellenwert eingeführt, so ergibt sich kein Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe. Mit 10 E.E. als Schwellenwert sind 12 von 35 Tumorproben (34 %) und 11 von 34 Normalgewebe (31 %) positiv für hTERT. Mit Erhöhung des Schwellenwertes auf 50 E.E. werden 1 von 34 Normalgeweben (3 %) und 4 von 35 Tumorgeweben (11 %) positiv für die hTERT-Expression.

Tabelle 4-11 Expression von hTR und hTERT in 35 klarzelligen Nierenkarzinomen (NT) und Nierennormalgeweben (NN) gemessen mit den LightCycler Telo TAGGG hTR und hTERT Quantification Kits. Die Werte stellen Expressionseinheiten [E.E.] dar. (n.d. - nicht definiert)

	Nr.	hTR NN in [E.E.]	hTR NT in [E.E.]	hTERT NN in [E.E.]	hTERT NT in [E.E.]
1	338	0.0	0.0	0.0	43.9
2	354	3.2	32.8	0.0	33.7
3	359	7.4	17.2	29.8	4.3
4	366	4.6	41.9	5.6	11.4
5	379	41.8	61.8	34.8	1485.3
6	387	6.9	55.2	116.6	3.6
7	388	38.6	0.0	0.0	1175.0
8	390	37.5	40.9	1.9	6.1
9	398	49.2	98.7	15.5	1.1
10	414	56.5	170.6	9.4	33.3
11	415	43.4	76.5	0.0	360.0
12	419	22.3	12.0	10.0	7.8
13	420	n.d.	13.2	23.8	1.3
14	421	47.4	81.4	1.4	0.2
15	433	4.8	26.6	36.0	18.0
16	434	5.2	46.5	0.0	32.4
17	436	17.5	227.9	0.0	0.0
18	437	7.6	46.9	2.0	46.0
19	439	32.3	4.7	6.2	27.8
20	441	3.1	11.4	48.0	22.0
21	442	59.8	200.8	0.0	0.5
22	447	3.9	59.4	4.0	7.0
23	453	7.7	19.3	1.0	7.0
24	472	1.2	0.5	0.2	2.0
25	473	0.8	3.2	0.3	0.6
26	500	1.4	58.2	0.0	0.0
27	501	59.5	77.6	0.0	1.0
28	503	20.1	55.5	13.0	4.0
29	504	51.5	19.3	0.0	2.0
30	507	24.1	31.8	1.0	1.0
31	508	28.3	9.6	0.0	1.0
32	509	14.7	23.9	0.0	0.0
33	510	15.4	35.3	0.0	2.0
34	512	23.5	82.4	0.0	0.0
35	513	3.1	16.7	26.0	63.0

Bei der Betrachtung einzelner Nierenkarzinome werden sehr verschiedene Expressionsmuster von hTR und hTERT, sowie der Telomeraseaktivität deutlich (Tabelle 4-12). In drei der 35 Nierenkarzinome NT 379, 388 und 415 wurde eine besonders hohe Expression von hTERT gemessen, jedoch sind die anderen Komponenten jeweils unterschiedlich ausgeprägt. Der NT 379 ist histopathologisch in das pT3b-Stadium eingeordnet wurden. Im NT 379 wurde eine hohe Expression von hTERT und hTR bestimmt, sowie Telomeraseaktivität nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde in dem pT3a Nierentumor 472 keine Telomeraseaktivität und keine

Expression von hTERT und hTR nachgewiesen. Die Tumoren 388 und 415 zeigen beide keine Telomeraseaktivität, aber eine hohe hTERT Expression. Der Tumor 388 ist hTR negativ, der Tumor 415 dagegen zeigt eine hTR-Expression.

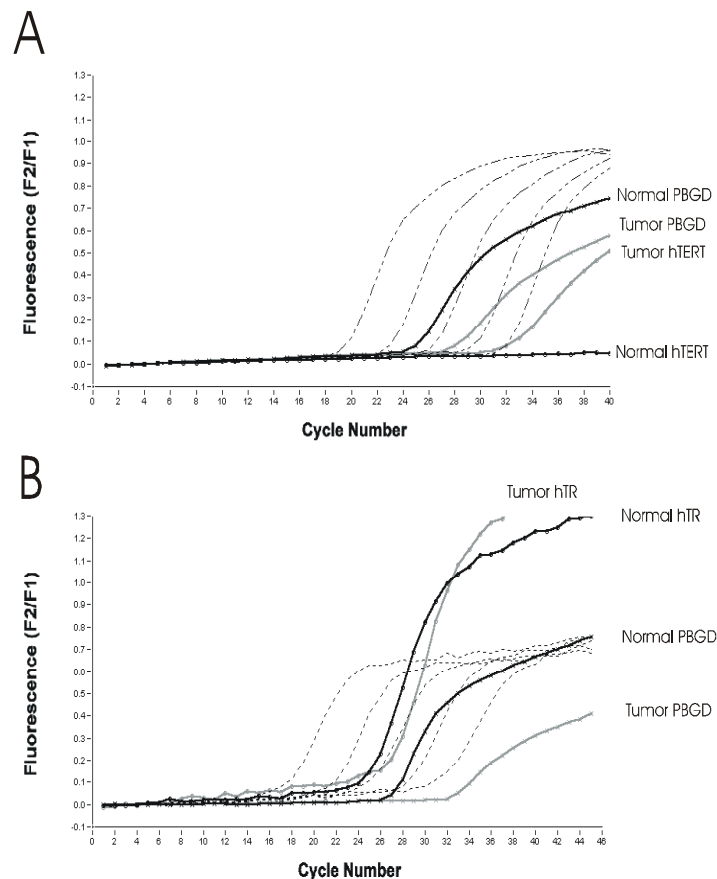


Abbildung 4-4 LightCycler-RT-PCR für hTERT (A) und hTR (B), sowie dem internen Kontrollgen PBGD für die Tumor- und Normalgewebeprobe 354. Die Kurve des internen Standards ist gepunktet dargestellt.

In Tabelle 4-12 werden die verschiedenen Analysemethoden anhand von 4 ausgewählten klarzelligem Nierenkarzinomen (Nr. 379, 388, 415 und 472) miteinander verglichen. Für die Bestimmung der Telomeraseaktivität zeigen der Telomerase-PCR-ELISA und der TRAP-Assay gleiche Ergebnisse. Auch für die Bestimmung der hTERT-Expression mit dem hTERT-PCR-ELISA und der LightCycler-RT-PCR ergeben sich vergleichbare Aussagen. Bei der Bestimmung der hTR-Expression gehen die verschiedenen Methoden nicht einher. Im hTR-PCR-ELISA sind alle vier Proben positiv, mit der hTR-RT-PCR auf dem LightCycler werden jedoch zwei Proben positiv und zwei Proben negativ getestet. Dies ist möglicherweise über die hTR-RNA erklärbar, welche auf einem intron-freien DNA-Abschnitt kodiert ist. Für eine RT-PCR der hTR-RNA sollte deshalb die RNA vollständig DNA-frei sein. Dies konnte für die Analysen mit dem RT-PCR-ELISA nicht vollständig gewährleistet werden. Erst für die

LightCycler-RT-PCR wurde eine zusätzliche DNase-Behandlung und eine nochmalige Reinigung der RNA durchgeführt.

Tabelle 4-12 Übersicht über die hTR- und hTERT-Expression, sowie die Telomeraseaktivität der klarzelligen Nierenkarzinome NT 379, NT 388, NT 415 und NT 472 unter Auflistung der verschiedenen Analysemethoden. (¹LightCycler-RT-PCR, ²TRAP-Assay mit GeneScan-Analyse über den Sequenzer, ³ELISA-Nachweisverfahren)

Nummer	Stadium	Analyse	hTR	hTERT	T.A.
379	pT3b	LC ¹ und GS ²	61,8	1485	+
		ELISA ³	+	+	+
388	pT2	LC und GS	0,0	1175	-
		ELISA	+	+	-
415	pT1	LC und GS	76,5	360	-
		ELISA	+	+	-
472	pT3a	LC und GS	0,5	2	-
		ELISA	+	-	-

Zum statistischen Vergleich der hTR-, hTERT-Expression und der Telomeraseaktivität wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen. Der Mann-Whitney-Test ist eine nichtparametrische statistische Methode zum Vergleich von Medianen unabhängiger Gruppen. Ist der mittlere Rankwert einer Gruppe höher als in der anderen Gruppe, so besteht eine signifikante Abhängigkeit.

Der mittlere Rankwert für die hTERT-Expression der telomerase-negativen Tumoren ist 14,61, für die telomerase-positiven Tumoren beträgt er 22,3. Für den Vergleich der Expression von hTR und hTERT, ausgehend von den 16 telomerase-positiven und 19 telomerase-negativen Tumoren, ergibt sich dadurch unter Anwendung des Mann-Whitney-Testes eine Korrelation zwischen hTERT und der Telomeraseaktivität ($p=0,031$). Dies zeigt somit in den untersuchten Klarzellkarzinomen eine signifikante Abhängigkeit der hTERT-Expression von der Telomeraseaktivität auf. Im Vergleich der Telomeraseaktivität und der hTR-Expression dagegen konnte mit dem Mann-Whitney-Test keine signifikante Korrelation berechnet werden ($p=0,071$) (Abbildung 4-5).

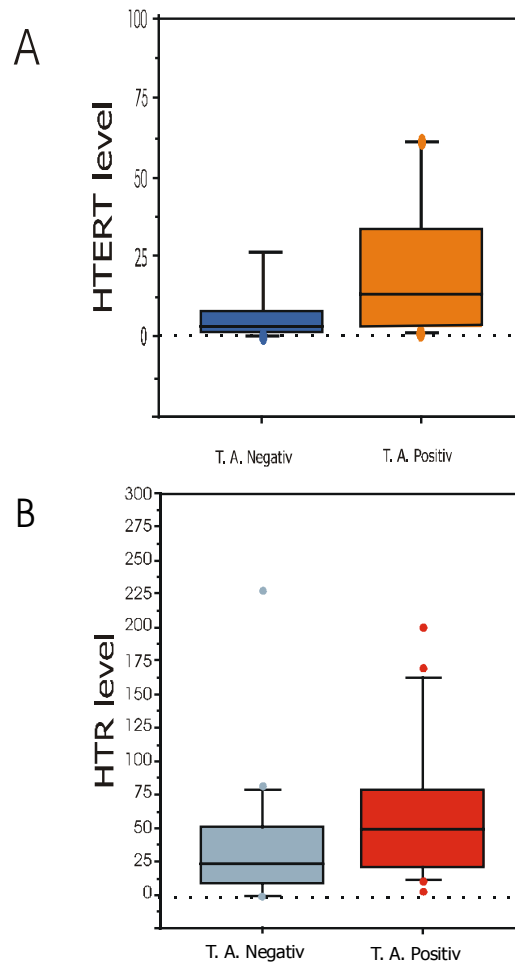


Abbildung 4-5 Statistische Analyse der hTERT mRNA und der hTR RNA-Expression in Abhängigkeit von der Telomeraseaktivität. Telomeraseaktivität (T.A.) positive oder negative klarzellige Nierenkarzinome wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. hTERT zeigt eine signifikante Abhängigkeit von der T.A. ($p=0,031$), hTR ist nicht signifikant abhängig von der T.A. ($p=0,071$).

4.1.3 Telomerlängen bei Nierentumoren, Normalgeweben und Zelllinien

Aus der Literatur ist bekannt, dass es in den Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu Nierennormalgeweben zu einer Verkürzung der Telomere kommt (Mehle *et al.*, 1994). Zusätzlich wurde eine sehr starke Verkürzung der Telomere besonders in telomerase-negativen Tumoren beschrieben, in denen es durch das Fehlen der Telomeraseaktivität zu keiner telomerase-abhängigen Stabilisierung der Telomere kommen konnte (Fiedler *et al.*, 1996; Mehle *et al.*, 1996).

Zur Bestimmung der Telomerlänge wurden 12 Nierentumore, davon 7 telomerase-positive und 5 telomerase-negative, und ihre korrespondierenden Normalgewebe ausgewählt. Die Telomerlängen wurden mit der Southernblot-Methode bestimmt. Anschließend sind die Hybridisierungen mit dem Programm SCANPACK[®] densitometrisch ausgewertet und die mittlere TRF errechnet worden (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-13 zusammengefasst.

Tabelle 4-13 Telomerlängen von telomerase-positiven und telomerase-negativen Nierenzellkarzinomen bestimmt über die Southernblot-Methode und densitometrisch ausgewertet.

(T.A. – Telomeraseaktivität; NN – Normalniere; NT – Nierentumor; bp – Basenpaare; n.d. – nicht definiert)

	Nr.	T.A.	NN-TRF in bp	NT-TRF in bp
1	115	-	18.066	n.d.
2	184	-	53.752	14.785
3	194	-	24.859	26.819
4	195	-	54.756	14.934
5	205	-	13.462	11.616
6	130	+	8.782	4.382
7	160	+	8.914	5.570
8	190	+	10.547	4.326
9	196	+	10.072	8.413
10	197	+	9.783	10.298
11	198	+	11.155	14.543
12	202	+	14.561	10.403

In der Abbildung 4-6 wurden die Mittelwerte der Telomerlängenbestimmung von Nierennormalgeweben mit den Telomerlängen der telomerase-positiven und der telomerase-negativen Tumoren gegeneinander aufgetragen. Das Diagramm zeigt, dass in den Nierennormalgeweben längere Telomere als in den Nierenzellkarzinomen nachgewiesen wurden. Dabei sind die Telomere der telomerase-positiven Tumoren nochmals kürzer gegenüber den telomerase-negativen Tumoren.

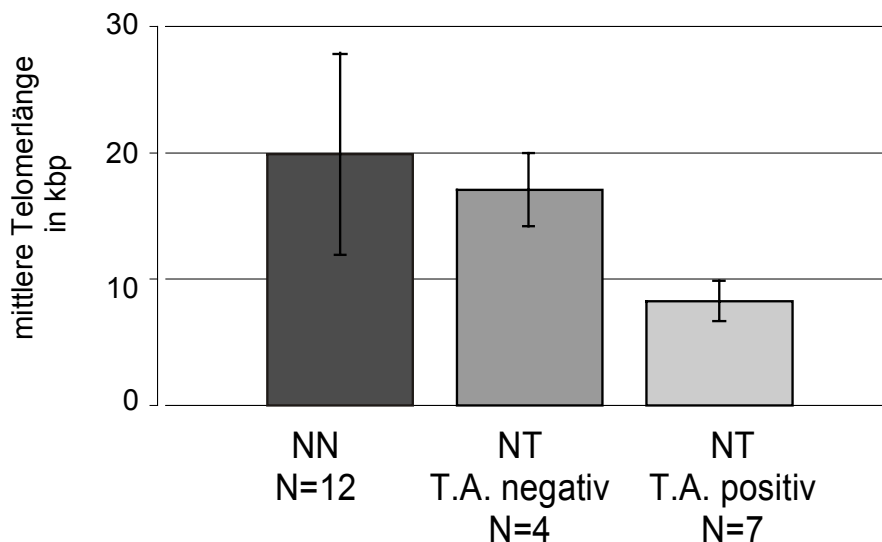


Abbildung 4-6 Telomerlängen von Nierennormalgeweben, telomerase-positiven und negativen Nierenzellkarzinomen

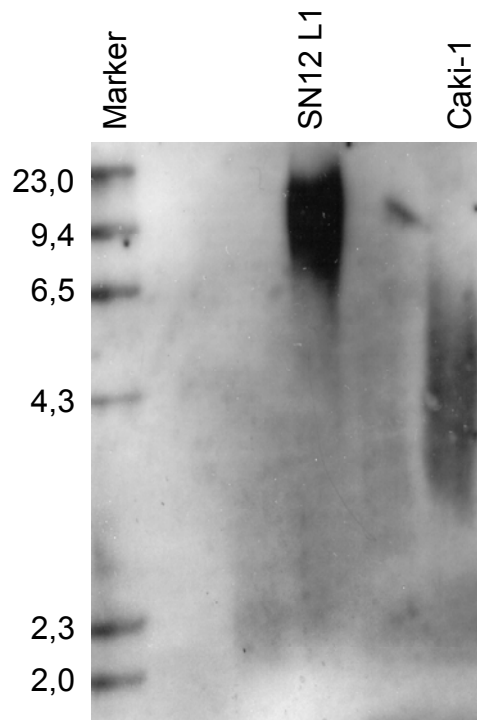


Abbildung 4-7 Bestimmung der Telomerlängen in den Nierenkarzinomzelllinien SN12L1 und Caki-1 mit der Southernblot-Methode

Zum Vergleich der Telomerlängen in den Nierenkarzinomzelllinien wurden außerdem die Telomerlängen in den Zelllinien SN12L1 und Caki-1 untersucht (siehe Abbildung 4-7). Für die Zelllinie SN12L1 wurde eine mittlere TRF von 22kb errechnet, Caki-1 dagegen besitzt nur eine mittlere TRF von 5,4kb. Interessant dabei ist, dass SN12L1, die untersuchte Zelllinie mit der geringsten Telomeraseaktivität ist und Caki-1, die mit der höchsten gemessenen Telomeraseaktivität in den Zelllinien.