

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Rolf Felix Maier
SP Pädiatrische Hämatologie / Onkologie: Prof. Dr. med. Holger Christiansen

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg

**Telomeraseaktivität beim Neuroblastom:
prognostische Bedeutung in Abhängigkeit von
MYCN-Amplifikation, Stadium, Alter bei
Diagnose, Histologie und Geschlecht**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Sibylle Schiel, geb. Dumke
aus Bottrop

Marburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg am 24.01.2008.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. H. Christiansen

Korreferent: Prof. Dr. A. Neubauer

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Neuroblastom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Stadieneinteilung	1
1.1.3	Lokalisation, Klinik und Verlauf	2
1.1.4	Genetik	4
1.1.5	Diagnose	6
1.1.6	Prognose	7
1.1.7	Screening	9
1.1.8	Therapie	11
1.2	MYCN-Amplifikation	13
1.3	Telomeraseaktivität	14
1.4	Ziel dieser Arbeit	16
2.	MATERIAL	17
2.1	Tumormaterial	17
2.2	Materialien für Telomerase PCR ELISA	17
2.3	Materialien zur Bestimmung der MYCN-Amplifikation	18
3.	METHODEN	20
3.1	allgemeine Methoden	20
3.1.1	PCR	20
3.1.2	ELISA	21
3.2	Telomerase PCR ELISA	23

3.3	Nachweis der MYCN-Amplifikation	27
4.	ERGEBNISSE	29
5.	DISKUSSION	38
6.	ZUSAMMENFASSUNG	42
7.	LITERATUR	44
8.	ANHANG	55
8.1	Abkürzungen	55
8.2	Verzeichnis der Akademischen Lehrer	57
8.3	Danksagung	58

1. EINLEITUNG

1.1 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein embryonaler Tumor, der seinen Ursprung in Zellen der Neuralleiste hat. Klinisch zeichnet er sich durch eine starke biologische Heterogenität aus, wobei das Spektrum von hochmalignen Tumoren über langsam progrediente Verläufe bis hin zu spontanen Regressionen reicht.

1.1.1 Epidemiologie

Das Neuroblastom ist mit einem Anteil von ca. 8% nach den Hirntumoren der zweithäufigste solide Tumor im Kindesalter. Die Inzidenz beträgt 1,2:100.000 Kinder unter 15 Jahren pro Jahr, sodass in Deutschland jedes Jahr mit ca. 150 neuen Patienten zu rechnen ist. 90% aller Erkrankungen werden in den ersten 5 Lebensjahren diagnostiziert, etwa 40% der Patienten sind jünger als ein Jahr alt. Nach dem 10. Lebensjahr ist die Diagnose selten. Das Verhältnis Jungen zu Mädchen beträgt 1,2:1.

1.1.2 Stadieneinteilung

Nach dem modifizierten „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS), das auf der Evans-Klassifikation von 1971 beruht und seit 1990 in Deutschland angewendet wird, werden fünf klinische Stadien unterschieden (Brodeur et al., 1993):

Im **Stadium 1** ist der Tumor auf seinen Ursprungsort begrenzt und makroskopisch vollständig zu entfernen. Lymphknoten sind nicht befallen.

Beim **Stadium 2a** handelt es sich um einen unilateralen Tumor mit lokaler Infiltration, also makroskopisch nicht komplett entfernbar, und ohne

Lymphknotenbefall, bei **2b** um einen unilateralen Tumor mit Befall ipsilateraler, nichtadhärenter Lymphknoten.

Im **Stadium 3** überschreitet der nichtresektable unilaterale Tumor die Mittellinie mit oder ohne regionalen Lymphknotenbefall,

oder es liegt ein unilateraler ipsilateraler Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall vor, oder ein nichtresektabler Mittellinientumor weist eine bilaterale Ausdehnung durch Infiltration oder durch Lymphknotenbefall vor.

Das **Stadium 4** ist durch Fernmetastasen in entfernten Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber und/oder anderen Organen gekennzeichnet.

Beim **Stadium 4S** handelt es sich um einen lokalisierten Primärtumor wie in Stadium 1 oder 2 mit Fernmetastasen ausschließlich in Leber, Haut oder Knochenmark, wobei der Knochenmarksbefall nur minimal sein darf.

Die Inzidenzraten betragen 25% für Stadium 1, 10% für Stadium 2, 15% für Stadium 3, 40% für Stadium 4 und 10% für Stadium 4S (NB2004).

1.1.3 Lokalisation, Klinik und Verlauf

Da das Neuroblastom an jeder Stelle des sympathischen Grenzstrangs im zervikalen, thorakalen und abdominalen Bereich sowie im Nebennierenmark seinen Ursprung nehmen kann, variieren die Lokalisationen der Primärtumoren zur Zeit der Diagnose und sind altersabhängig (Brodeur et al., 1997).

Die meisten Primärtumoren werden im Abdomen gefunden (65%), die Frequenz ist bei älteren Kindern höher als bei Säuglingen (40% und 25%). Bei Säuglingen kommen häufiger thorakale und zervikale Tumoren vor. In etwa 1% der Fälle lässt sich kein Primärtumor finden (Brodeur et al., 1997).

Die Symptome der Erkrankung sind abhängig von der Lokalisation und der eventuellen Metastasierung des Tumors. Erstsymptom bei intraabdomineller Lokalisation ist meist der sicht- oder tastbare Tumor, der häufig im Rahmen von Routineuntersuchungen auffällt und sekundär zu Ernährungsstörungen, Erbrechen oder Enteritis-ähnlichen Symptomen führen kann. Die vor allem bei Säuglingen auftretenden intrathorakalen oder mediastinale Tumoren manifestieren sich in Husten, dem Auftreten von Stridor und Dyspnoe bis hin

zur Entwicklung eines Querschnittssyndroms. Hinzu kommen Allgemeinsymptome wie Knochenschmerzen (sehr häufig), die zur Fehldiagnose einer rheumatischen Erkrankung oder Osteomyelitis führen können. Abgeschlagenheit und Fieber treten ebenfalls häufig auf.

Das Neuroblastom metastasiert lymphogen und hämatogen. Metastasen sind in Knochenmark (80%), Knochen (48%), Fernlymphknoten (16%) und der Leber (16%) zu beobachten; seltener kommt es zu intrakraniellen Absiedelungen (9%) oder Hautmetastasen (6%). Als Zeichen der Metastasierung des Knochenmarks zeigen sich Blässe, Müdigkeit und Blutungen. Charakteristisch für ein metastasiertes Neuroblastom kann außerdem ein Brillenhämatom sein; es wird hervorgerufen durch ein- oder beidseitige periorbitale Ekchymosen.

Bezüglich des Krankheitsverlaufs ist zu erwähnen, dass sich das Neuroblastom durch die höchste Spontanheilungsrate aller menschlichen Tumore auszeichnet. Diese spontane Regression kommt regelmäßig beim Stadium 4S vor, ist jedoch auch bei jüngeren Patienten mit lokalisiertem Tumorstadium anzutreffen.

Eine zunehmende Differenzierung des Tumors kann in vivo bei etwa 60% der Patienten unter Chemotherapie beobachtet werden und sogar eine komplette Maturation eines unreifen Neuroblastoms zu einem benignen Ganglioneurom zur Folge haben. Sie ist auch bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung regelmäßig anzutreffen.

Patienten im Stadium 4 oder mit MYCN-Amplifikation und anderen ungünstigen Prognosefaktoren weisen typischerweise eine rasche Progression und eine hohe Therapieresistenz auf.

Bei der normalen fetalen Entwicklung lassen sich ab der 7. Schwangerschaftswoche im Nebennierenmark Neuroblasten finden, die auch zum Zeitpunkt der Geburt bei 1 von 250 Neugeborenen noch vorhanden sind und erst jenseits des 3. Lebensmonats nicht mehr zu finden sind. Diesen Befund bezeichnet man als Neuroblastoma in situ (Beckwith et Perrin, 1963). Die Inzidenz des Neuroblastoma in situ ist 40x höher als die eines klinisch auffälligen Neuroblastoms, was ein weiterer Beweis für die hohe Regressionsrate dieses Tumors ist (Ikeda et al., 1981).

1.1.4 Genetik

Ploidie

Ein sehr großer Teil der Neuroblastome weist einen aneuploiden DNA-Gehalt auf. Während etwa 34% den normalen diploiden DNA-Gehalt zeigen, sind circa 65% der Tumore hyperploid und nur 1% hypoploid (Look et al., 1991).

Verlust genetischen Materials

Eine weitere molekulare Veränderung bei Neuroblastomen ist der Verlust genetischen Materials: die partielle Monosomie 1p mit Deletion von variablen Abschnitten des kurzen Armes von Chromosom 1 (Brodeur et al., 1977) zeigt sich meist im Bereich 1p36 (Fong et al., 1989). Molekularbiologisch stellt sich diese Aberration als Verlust der Heterozygotie, „Loss of Heterozygoty“ (LOH) dar. LOH wurde in 26% der Tumoren entdeckt (White et al., 1995). Es wird vermutet, dass ein Tumorsuppressorgen für das Neuroblastom im Bereich 1p36.2-36.3 liegt (White et al., 1995). Es besteht ein Zusammenhang zwischen Amplifikation des Onkogens MYCN und dem Ausmaß der Deletion 1p (Caron et al., 1995); Tumoren *ohne* Amplifikation von MYCN zeigen meist einen Verlust im Bereich 1p36.2-3, während solche *mit* Amplifikation die Deletion eines größeren Abschnitts aufweisen, von der Telomerregion bis mindestens 1p35-36.1. Die LOH im Bereich 1p36 könnte zusammen mit anderen genetischen Abweichungen zur Risikoabschätzung in der Therapie des Neuroblastoms beitragen (Christiansen et al., 1994).

Neben einem LOH im Bereich 1p36 kommen weitere chromosomale Deletionen vor, wie die Verluste der distalen Region von 14q in 20-50% der Neuroblastome (Suzuki et al., 1989; Srivatsan et al., 1993; Takita et al., 1995, Theobald et al., 1999). Auch für das Chromosom 4p wurde ein LOH beschrieben (Caron et al., 1996), ebenso für das Chromosom 11q (Srivatsan et al., 1991; Srivatsan et al., 1993). Genauere Untersuchungen ergaben eine Deletion an 11q23 und zeigten, dass diese genau gegensätzlich zur Amplifikation von MYCN erschien (Guo et al., 1999). Des Weiteren ließ sich eine Korrelation mit Alter > 1 Jahr bei Diagnose, Stadium 4, ungünstiger Histopathologie, Zuweisung zur Hochrisikogruppe, sowie, wie bereits oben beschrieben, eine gegensätzliche Korrelation zur Amplifikation von MYCN nachweisen (Guo et al., 2000).

Von allen Chromosomen haben folgende eine hohe Inzidenz (>20%) an LOH's: 1p (26%), 2q (30%), 9p (36%), 11q (24%), 14q (22%) und 18q (31%) (Takita et al., 1995; Takita et al., 1997). Eine andere Studie ergab eine Inzidenz von 22% für ein LOH an Chromosom 1p (Martinsson et al., 1997). Für das Chromosom 3 zeigte sich in 16% der Fälle eine LOH in der Region 3p (Hallstenson et al., 1997).

Verschiedene Studien zeigen, dass Deletionen von Chromosom 3p sowie 11q signifikant häufig miteinander assoziiert sind (Breen et al., 2000; Spitz et al., 2003), wobei die Untersuchung von Breen et al. keine statistisch signifikante Verbindung zwischen LOH's an 3p und 11q und klinisch aggressiveren Neuroblastomen ergibt, während die von Spitz et al. bei Tumoren mit Veränderungen an 3p und 11q von einer neuen Hochrisiko-Untergruppe der Neuroblastome ohne MYCN-Amplifikation in den Stadien 1 bis 3 und 4S ausgeht (Spitz et al., 2003).

Zugewinn genetischen Materials

Der Zugewinn genetischen Materials ließ sich in etwa 50% aller Neuroblastome am langen Arm des Chromosoms 17 nachweisen, was mit einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf einhergehen soll (Bown et al., 1999). Darüber hinaus wird zusätzliches genetisches Material für Regionen in 1p, 1q, 5 sowie 18q beschreiben.

Veränderung der Genexpression

Bisher konnte für ca. 200 Gene eine Korrelation ihres Expressionsniveaus mit Tumorstadium, zytogenetischen Markern oder ungünstigen Verläufen beschrieben werden. Neurotrophin-Rezeptoren wie Trk A spielen dabei eine wichtige Rolle in der physiologischen Entwicklung des sympathischen Nervensystems, indem sie Apoptose oder Ausdifferenzierung unreifer sympathischer Nervenzellen vermitteln. Die Expression dieser Moleküle in primären Tumoren ist daher besonders gut untersucht. So korreliert eine hohe Expression des Protoonkogens Trk A streng mit einer günstigen Prognose (Nakagawara et al., 1993). Bei hoher Expression von Trk A beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate 86%, bei niedriger Expression 14%. Eine fehlende Trk

A-Expression in Neuroblastomen ohne MYCN-Amplifikation ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert.

Weitere molekularbiologische Veränderungen in Neuroblastomen stellen die bereits oben erwähnte Amplifikation des Protoonkogens MYCN (siehe Kapitel 1.2) sowie die Telomeraseaktivität (siehe Kapitel 1.3) dar.

Die Zuordnung der molekularen Parameter zum klinischen Verlauf führte zur Einteilung der Neuroblastome in drei verschiedene Subtypen (Brodeur, 1990; Brodeur, 1995): Der erste Typ weist einen hyperdiploiden oder hypotriploiden DNA-Gehalt auf, ein LOH im Bereich 1p und Amplifikation von MYCN fehlen, und die Expression von Trk A ist hoch. Bei den Patienten handelt es sich meist um Säuglinge in einem frühen Stadium der Erkrankung (1, 2 oder 4S), ihre Prognose ist sehr gut (3-Jahres-Überlebensrate: >90%). Die zweite Gruppe besteht aus Tumoren mit hypodiploidem oder hypotetraploidem DNA-Gehalt, die manchmal LOH's in den Bereichen 1p oder 14q zeigen und keine Amplifikation von MYCN aufweisen. Die Expression von Trk A ist meistens niedrig. Die Patienten dieser Gruppe sind älter als 1 Jahr und haben Tumoren in den Stadien 3 oder 4. Die 3-Jahres-Überlebensrate liegt bei 25-50%. Der dritte Typ ist charakterisiert durch Tumoren mit Amplifikation von MYCN und einem LOH im Bereich von 1p. Ein LOH von 14q fehlt, die Expression von Trk A ist niedrig oder fehlt ebenfalls. Die Tumoren haben einen hypodiploiden oder hypotetraploiden DNA-Gehalt. Die Patienten sind zwischen 1 und 5 Jahre alt, ihre Erkrankung ist in einem fortgeschrittenen Stadium (3 oder 4), und die Prognose ist sehr schlecht (3-Jahres-Überlebensrate von unter 5%).

1.1.5 Diagnose

Nach der „International Neuroblastoma Working Group“ ist die Diagnose Neuroblastom zu stellen, wenn folgende Kriterien erfüllt sind (Brodeur, 1993): entweder ein eindeutiger histologischer Nachweis des Tumorgewebes in der Lichtmikroskopie **oder** aber der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark **und** erhöhte Serum- oder Urinwerte für Katecholamine und deren Metabolite.

Neuroblastomzellen produzieren in 90% der Fälle Katecholamine. Ihre Metabolite Vanillinmandelsäure und Homovanillinmandelsäure lassen sich im Harn nachweisen und stellen einen wichtigen Tumormarker für die Diagnostik und Therapiekontrolle sowie für das Screening im Säuglingsalter (siehe Kapitel 1.1.7) dar (Kleihauer, 1997).

Im Rahmen der Neuroblastomstudie (NB 97) wird neben ausreichendem Tumormaterial für die Histologie zusätzlich Gewebe für weitere Untersuchungen wie die Bestimmung der MYCN-Amplifikation, der 1p-Deletion sowie der Telomeraseaktivität gefordert.

Eine rein klinische Diagnose wird lediglich für Patienten im Stadium 4S zugelassen, da eine Biopsie für die zum Teil kritisch kranken Säuglinge eine zu starke Belastung bedeuten würde (NB 97).

Die bildgebende Diagnostik beinhaltet neben Sonographie, MRT bzw. CT die Szintigraphie mittels Metajodbenzylguanidin (mIBG ist in seiner chemischen Struktur den körpereigenen Katecholaminen verwandt und reichert sich typischerweise in Tumoren an, die Katecholamine produzieren können, wie zum Beispiel das Neuroblastom und das Phäochromozytom sowie deren Metastasen).

1.1.6 Prognose

a) Stadium, Alter und Primärtumorlokalisation

Als wichtigste klinische Variablen gelten das Stadium des Tumors, das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose und die Lokalisation des Primärtumors. Die 5-Jahres-Überlebensrate der Einzelstadien beträgt 98% im Stadium 1, 90% im Stadium 2, 83% im Stadium 3, 51% im Stadium 4 und 80% im Stadium 4S (NB 90). Berücksichtigt man das Alter der Patienten, so zeigt sich, dass die Prognose sowohl bei lokalisierter (Stadien 1-3) als auch bei metastasierter (Stadium 4) Erkrankung bei Säuglingen besser ist als bei älteren Kindern: für die Stadien 1-3 betrug die 5-Jahres-Überlebensrate bei Säuglingen 95% gegenüber 80% bei Kindern ≥ 1 Jahr (NB 97). Bei den Kindern unter einem Jahr kommt es besonders im Stadium 4S zur spontanen Regression des

Tumors (Evans et al., 1981), die Prognose ist in diesem Fall sehr gut (90% Überlebensrate) (Jereb et al., 1984). Letale Verläufe in der initialen Phase der Erkrankung im Stadium 4S sind meist Folge der durch Metastasierungen hervorgerufenen erheblichen Lebervergrößerung, die zu pulmonalen Komplikationen führt (Evans et al., 1981; Nakagawara et al., 1990).

Grundsätzlich haben also Säuglinge eine weitaus bessere Prognose als Kinder jenseits des ersten Lebensjahres. Korreliert man die Stadienverteilung mit dem Alter der Patienten, so zeigt sich, dass im Säuglingsalter die prognostisch günstigen Stadien (1, 2, 3, 4S) mit 87% überwiegen, während bei der Mehrzahl (55%) der Kinder über 1 Jahr das prognostisch ungünstige Stadium 4 vorkommt (NB 97). Patienten mit Sitz des Primärtumors in der Nebenniere haben eine schlechtere Prognose als solche mit einer anderen Tumorlokalisierung, allerdings hat dieser Faktor keinen Einfluss auf die prognostischen Variablen Alter und Stadium (Coldman et al., 1980).

b) MYCN-Amplifikation

Große Bedeutung für die Prognose beim Neuroblastom hat die Amplifikation des Onkogens MYCN (siehe Kapitel 1.2). Es besteht eine starke Korrelation zwischen Amplifikation von MYCN und fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung (Brodeur et al., 1984) sowie rascher Tumorprogression (Seeger et al., 1985), beides Anzeichen für eine schlechte Prognose. 30 bis 40% der Patienten in fortgeschrittenen Stadien (3 und 4) der Erkrankung weisen Amplifikation von MYCN auf, und sie haben eine schlechte Prognose. Von den Patienten mit frühem Stadium (1 und 2) und Stadium 4S zeigen nur etwa 5-10% der Tumoren Amplifikation des Onkogens, und diese Tumoren wachsen später ebenfalls rasch und haben eine schlechte Prognose unabhängig von ihrem Stadium (Brodeur et al., 1992).

c) Deletion 1p und 11q

Das Vorhandensein einer partiellen Monosomie 1p lässt auf eine schlechte Prognose schließen (Franke et al., 1986; Christiansen et Lampert, 1989; Fong et al., 1989). Patienten *ohne* Aberration im Bereich von Chromosom 1p haben

eine 90%ige Überlebenschance, während die Chancen bei Patienten *mit* dieser Aberration bei unter 10% liegen (Christiansen et Lampert, 1988). Während Polysomien von strukturell normalen Chromosomen 1 vorwiegend in Tumoren mit guter Prognose gesehen werden, ist die Deletion von 1p fast ausschließlich auf progressive Tumoren beschränkt (Christiansen et al., 1992). Die LOH's an 11q und 1p36 sind unabhängig voneinander mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Attiyeh et al., 2005).

d) DNA-Gehalt

Der DNA-Gehalt der Neuroblastomzellen beeinflusst ebenfalls die Prognose des Neuroblastoms; Tumoren mit hyperdiploider oder hypotriploider Chromosomenzahl haben eine bessere Prognose als solche mit hypodiploidem oder hypotetraploidem DNA-Gehalt (Brodeur et al., 1995).

e) Telomeraseaktivität

Die meisten Tumoren mit hoher Telomeraseaktivität (siehe Kapitel 1.3) zeigen weitere genetische Veränderungen wie Amplifikation von MYCN sowie ein LOH im Bereich von 1p und scheinen unabhängig vom Stadium der Erkrankung einen ungünstigen Verlauf zu nehmen, wohingegen die Tumoren mit niedriger Telomeraseaktivität keine dieser Veränderungen, dafür aber eine gute Prognose aufweisen sollen (Hiyama et al., 1995; Hiyama et al., 1997). Die Telomeraseaktivität scheint somit ein unabhängiger prognostischer Marker für das Neuroblastom zu sein und erweist sich in Kombination mit anderen Markern wie zum Beispiel MYCN als sehr hilfreich dabei, die Prognose eines Patienten zu ermitteln (Poremba et al., 1999).

1.1.7 Screening

Trotz ständiger Fortschritte in der Therapie der Patienten mit einem Neuroblastom lässt sich keine Verbesserung der Prognose erzielen. Neuroblastome, die innerhalb des ersten Lebensjahres und in den Stadien 1, 2

oder 4S diagnostiziert werden, scheinen die besten Überlebenschancen zu haben. Aus diesem Grund wurde 1974 in Japan das erste Massenscreening für Kinder im Alter von sechs bis sieben Monaten eingeführt, um eine eventuelle Neuroblastomerkrankung möglichst früh zu erkennen. Als Parameter wurde der Urin der Säuglinge auf erhöhte Werte für Vanillinmandelsäure untersucht. Eine japanische Studie aus dem Jahre 1984 kommt zu dem Schluss, dass es durch das Screening zu einer definitiven Verbesserung der Prognose der erkrankten Patienten gekommen ist und dass die Zahl der geheilten Patienten zugenommen hat (Sawada et al., 1984). Eine andere Studie liefert dasselbe Ergebnis (Takeda et al., 1989).

Eine andere Theorie besagt, dass es zwei verschiedene Typen von Neuroblastomen gibt: einen gutartigen Typ, der früh im Leben auftritt, und einen bösartigen Typ, der erst später zu finden ist. Somit würde das Screening in erster Linie nur solche Tumoren erkennen, die sich symptomfrei entwickeln und, ohne entdeckt zu werden, spontan regredieren (Pastore et al., 1984; Mauer, 1988). Der größte Teil der per Screening entdeckten Neuroblastome haben einen triploiden oder hypotriploiden DNA-Gehalt und weisen keinerlei chromosomale Abnormalitäten auf, was für eine gute Prognose der Tumoren spricht. Außerdem zeigte nahezu kein Tumor Amplifikation des Onkogens MYCN, des wichtigsten prognostischen Markers des Neuroblastoms. Dieses Ergebnis spricht für die Theorie, dass durch das Screening ein Typ von Neuroblastom entdeckt wird, der sonst nicht bemerkt worden wäre, und weniger für die These, dass das Screening dazu beiträgt, Tumoren früh zu diagnostizieren, die erst später im Leben klinisch auffällig geworden wären (Bessho et al., 1991). Man spricht hier von einer screeningbedingten Überdiagnose. Auch ein Screeningprojekt in Quebec/Kanada, das von 1989 bis 1994 bei Säuglingen im Alter von 3 Wochen sowie 6 Monaten durchgeführt wurde, zeigt ein vergleichbares Resultat. Hierbei ergab sich, dass durch das Screening nahezu ausschließlich solche Tumoren entdeckt wurden, die günstige biologische Merkmale aufwiesen und sich vermutlich zum größten Teil spontan zurückgebildet hätten (Brodeur et al., 2001), so dass von einer Weiterführung des Screenings abgeraten wurde.

1.1.8 Therapie

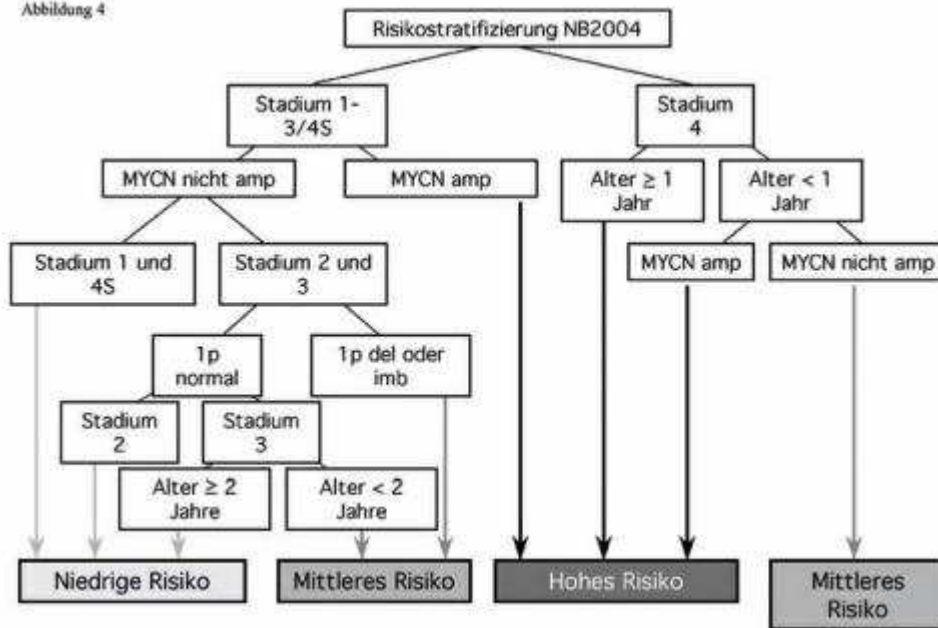
Die Behandlung des Neuroblastoms erfolgt risikoadaptiert (Neuroblastomstudie NB 97). Das Risiko wird durch die Faktoren Amplifikation von MYCN, Alter, Stadium, das Vorhandensein einer bedrohlichen Symptomatik und das Volumen des in situ belassenen Tumorrestes beschrieben. Die Patienten werden je nach Vorliegen der oben genannten Parameter in eine Beobachtungs-, eine Standardrisiko- und eine Hochrisikogruppe eingeteilt.

Bei den Beobachtungspatienten (Säuglinge in den Stadien 1-3 und 4S sowie Kinder > 1 Jahr in den Stadien 1 und 2 ohne MYCN-Amplifikation) wird die spontane Tumorregression engmaschig beobachtet. Eine Behandlung erfolgt, wenn Amplifikation von MYCN festgestellt wird, eine bedrohliche Symptomatik vorliegt oder die erwartete Regression nach 6-12 Monaten unvollständig bleibt.

Standardrisikopatienten (Säuglinge in den Stadien 2, 3 und 4S mit ernsthaften tumorindizierten Symptomen sowie Kinder > 1 Jahr in den Stadien 2 und 3 ohne MYCN-Amplifikation) erhalten postoperativ 4 Blöcke Chemotherapie und ggf. einen zweiten operativen Eingriff zur vollständigen Entfernung des Primärtumors.

Hochrisikopatienten (Patienten im Stadium 4 sowie Amplifikation von MYCN) werden mit allen derzeit als wirksam beurteilten Therapiemöglichkeiten behandelt. Dazu zählen Operation und Zweitoperation, sechs Blöcke Chemotherapie in hoher Therapieintensitätsdichte und lokale Strahlenbehandlung des Primärtumors, falls ein aktiver Tumorrest nachweisbar ist. Zur Konsolidierung erfolgt randomisiert entweder eine Erhaltungskemotherapie oder eine Megatherapie mit Stammzellsupport. Danach schließt sich für alle eine einjährige Immuntherapie in sechs Blöcken an (Berthold 2000).

Abbildung 4



Übersicht der Risikostratifizierung der aktuellen Neuroblastomstudie NB2004 der GPOH (aus: Oberthür A, Hero B. Molekulargenetische Veränderungen beim Neuroblastom - wegweisend für Prognose und Therapie? Journal Onkologie 2004, Ausgabe 08-04)

1.2 MYCN-Amplifikation

MYCN ist ein Protoonkogen, welches auf dem distalen kurzen Arm des Chromosoms 2 (2p23-24) lokalisiert ist (Schwab et al., 1984). Protoonkogene sind Gensequenzen, die durch Mutation oder Überexpression eine maligne Transformation von Zellen und somit die Bildung von Tumoren bewirken können. MYCN wirkt vor allem dadurch, dass es die Aktivität anderer Gene reguliert. Das Genprodukt des MYCN-Gens kodiert für ein nukleäres Protein, welches die Transkription von Genen steuert, die wiederum die Zellproliferation beeinflussen (z. B. Inhibierung wachstumshemmender Gene). Zur Aktivierung eines Onkogens kann es beispielsweise durch Amplifikation kommen. In etwa 25% der Neuroblastome wird das Onkogen in den Tumorzellen bis zu 300fach amplifiziert (Brodeur et al., 1984; Seeger et al., 1985). Die Ermittlung des Amplifikationsstatus von MYCN gehört zu den Untersuchungen, die bei Verdacht auf eine Neuroblastomerkrankung anhand einer Biopsie oder Punktion durchgeführt werden. Untersuchungen ergaben, dass die Anzahl der Kopien von MYCN in verschiedenen Tumorproben eines Patienten immer gleich ist, sowohl bei Proben von verschiedenen Tumorlokalisationen als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten in vivo. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Amplifikation des Onkogens eine intrinsische biologische Eigenschaft eines Neuroblastoms darstellt, und dass, falls MYCN in einem Tumor amplifiziert wird, dies schon zum Zeitpunkt der Diagnose geschieht (Brodeur et al., 1987). Es besteht eine starke Korrelation zwischen Amplifikation von MYCN und fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung (Brodeur et al., 1984) sowie rascher Tumorprogression (Seeger et al., 1985), beides Anzeichen für eine schlechte Prognose. Ebenfalls eine starke Korrelation besteht zwischen der Amplifikation von MYCN und der partiellen Monosomie 1p (Fong et al., 1989; Fong et al., 1992). Beide Parameter sind mit einer schlechten Prognose verbunden. Bei Tumoren ohne Amplifikation liegt die Deletion bei 1p36.2-3, während die Tumoren mit Amplifikation eine größere Deletion aufweisen, bis mindestens 1p35-36.1 (Caron et al., 1995). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass verschiedene Tumorsuppressorgene auf dem Chromosom 1p in diesen zwei Neuroblastomtypen inaktiviert werden (Caron et al., 1995).

Unklarheit herrscht über die Aussagekraft der Expression von MYCN bezüglich der Prognose des Neuroblastoms (Hiyama et al., 1991). Bei Tumoren mit

Amplifikation von MYCN besteht ebenfalls eine starke Expression des Onkogens (Nisen et al., 1988; Hiyama et al., 1991). Allerdings haben auch einige Tumoren ohne Amplifikation eine erhöhte Expression, was nicht mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet ist (Nisen et al., 1988; Slavic et al., 1990; Cohn et al., 2000). Andere Studien sehen einen Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von MYCN und schlechter Prognose (Grady-Leopardi et al., 1986; Hiyama et al., 1991; Christiansen et al., 1993). Die Expression des Protoonkogens Trk, die mit prognostisch günstigen Stadien und jungem Alter der Patienten einhergeht, scheint genau gegensätzlich zur Amplifikation von MYCN zu sein. Tumoren mit Amplifikation weisen niedrige oder keine Expression von Trk auf, während in Tumoren mit Expression von Trk das Onkogen MYCN nicht amplifiziert wird (Nakagawara et al., 1992).

1.3 Telomeraseaktivität

Telomere sind die natürlichen einzelsträngigen Enden der linearen Chromosomen bei Eukaryonten, also Lebewesen mit Zellkern und Zellmembran. Die Telomere setzen sich aus DNA und verschiedenen Strukturproteinen, die an diese binden, zusammen. Die DNA-Komponente besteht aus einer charakteristischen Basensequenz, die sich vielfach wiederholt (so genannte „tandem-repeats“), jedoch für kein transkribierbares Gen kodiert. Bei allen Wirbeltieren findet man zum Beispiel die sechs Nukleotide TTAGGG mehr als 3000-mal. In humanen Chromosomen haben die Telomere eine Länge von 5-15 kbp (Moyzis et al., 1988; Morin, 1989). Die Telomere haben zwei wichtige Funktionen: zum einen stabilisieren sie die Chromosomenenden, indem sie diese vor Rekombination und Degradation schützen. Zum anderen spielen Telomere eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation. Sie verhindern ihren Abbau sowie Ereignisse wie End-zu-End-Fusionen, Translokationen, chromosomale Verluste etc. (Rhyu, 1995). Mit jeder Zellteilung werden die Telomere um etwa 50-200 bp verkürzt, da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, die Enden der Chromosomen vollständig zu replizieren (Harley et al., 1990). Unterschreitet die Telomerlänge ein kritisches Minimum von circa 4 kbp, kann sich die Zelle nicht mehr weiter teilen. Oft tritt dann der programmierte

Zelltod (Apoptose) oder ein permanenter Wachstumsstopp (Seneszenz) ein. Immortale Zellen, Stamm- und Keimzellen dagegen besitzen einen Mechanismus, der der Verkürzung der Chromosomen entgegenwirkt. Diesen Zellen ist es möglich, mit der Aktivität des Enzyms Telomerase die Telomerlänge konstant zu halten. Die Telomerase (ein RNA-Protein-Komplex mit einer Reverse-Transkriptase-Aktivität) gibt der Zelle die Möglichkeit, die Telomerverkürzung und damit den Proliferationsstopp aufzuhalten, indem es neue tandem-repeats synthetisiert und anhängt (Bestilny et al., 1996). Die Rekonstruktion der Telomere ermöglicht diesen Zellen somit ein unbegrenztes Wachstum.

Telomeraseaktivität (TA) findet sich in humanen Keimzellen, in den meisten immortalen Zelllinien und in Tumorzellen, jedoch nicht in normalen somatischen Zellen. Telomerase-Reaktivierung könnte eine Voraussetzung für die Entwicklung maligner Tumorzellen aus somatischen Zellen sein (Kim et al., 1994). 94% der Neuroblastome weisen Telomeraseaktivität auf (Hiyama et al., 1995), somit scheint das Enzym eine wichtige Rolle in der Entwicklung dieses Tumors zu spielen. Die meisten Neuroblastome mit hoher Aktivität zeigen andere genetische Veränderungen wie Amplifikation von MYCN und ein LOH im Bereich von 1p und nehmen unabhängig vom Stadium der Erkrankung einen ungünstigen Verlauf, wohingegen die Tumoren mit niedriger TA keine dieser Veränderungen, dafür aber eine gute Prognose aufweisen (Hiyama et al., 1995; Hiyama et al., 1997). Die Telomeraseaktivität scheint ein unabhängiger prognostischer Marker für das Neuroblastom zu sein und erweist sich in Kombination mit anderen Markern wie zum Beispiel MYCN als sehr hilfreich dabei, die Prognose eines Patienten zu ermitteln (Poremba et al., 1999). Zwei Untereinheiten der humanen Telomerase wurden bisher isoliert, hTR und hTERT. Die hTR ist die RNA-Komponente der Telomerase. Die Frequenz der Expression von hTR nimmt mit dem Stadium der Erkrankung zu. Somit scheint hTR in die Progression des Tumors involviert zu sein (Reynolds et al., 1997). Starke Expression von hTR korreliert mit aggressivem Verhalten von Neuroblastomen und ist daher ein guter prognostischer Marker für diesen Tumor (Maitra et al., 1999). Die hTERT, die humane Telomerase Reverse Transkriptase, ist die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase und reguliert die Telomeraseaktivität (Ulaner et al., 1998). Die Expression von

hTERT wiederum wird direkt induziert durch C-myc, ein mit MYCN verwandtes Onkogen (Wu et al., 1999). Die Expression von hTERT korreliert signifikant mit der Telomeraseaktivität (Hiyama et al., 1999; de Kok et al., 1999). Poremba et al. beschrieben 2000, dass die An- oder Abwesenheit der Telomeraseaktivität im Neuroblastom stark mit dem Expressionsgrad sowohl der katalytischen Untereinheit hTERT als auch der RNA-Komponente hTR korreliert.

Da fast alle menschlichen Tumoren Telomeraseaktivität aufweisen, könnte eine Hemmung der Telomerase in einer sukzessiven Beeinträchtigung und letztentlichem Stillstand der Zellproliferation oder Induktion der Apoptose resultieren. Von daher könnte die Telomerase ein viel versprechendes Ziel der Krebsforschung und -therapie sein (Shay et Wright, 2001).

1.4 Ziel dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die prognostische Bedeutung der Telomeraseaktivität beim Neuroblastom begutachtet werden. Hierzu wurden bei einem umfangreichen Kollektiv von 304 Tumoren die Telomeraseaktivität sowie die Amplifikation des Onkogens MYCN untersucht. Mit Hilfe von Überlebenszeitanalysen (Cox-Regression, Kaplan-Meier-Methode) wurden diese beiden Parameter sowie die Variablen Stadium, Alter bei Diagnose, Histologie und Geschlecht auf ihre prognostische Bedeutung sowie eventuelle Abhängigkeit der Faktoren untereinander überprüft.

2. MATERIALIEN

2.1 Tumormaterial:

In der Bundesrepublik Deutschland werden alle Patienten, bei denen der Verdacht auf eine Neuroblastomerkrankung besteht, nach Richtlinien der Neuroblastomstudie (NB 2004, Fassung vom 01.09.2004) der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) diagnostiziert und behandelt. Das durch komplette operative Entfernung, Biopsie oder Punktion gewonnene Tumormaterial wird nach histologischer Beurteilung und Bestätigung der Diagnose sofort in gekühltem Zustand zur Aufarbeitung in die Kinderklinik des Universitätsklinikums Marburg versandt und dort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Alle Angaben zu den klinischen Daten stammen aus den zuweisenden Kliniken.

Die seit 1980 durch Prof. Dr. Holger Christiansen etablierte Tumordatenbank stellt hinsichtlich der Variablen eine annähernd repräsentative Gruppe der Neuroblastome der Bundesrepublik Deutschland dar.

2.2 Materialien für Telomerase PCR ELISA:

Telomerase PCR ELISA- Kit (Boehringer Mannheim)

1. Lyse-Reagenz
2. Reaktionsmischung: beinhaltet Telomerase-Substrat, Primer, Nukleotide sowie die Taq-Polymerase.
3. Denaturierungsreagenz
4. Hybridisierungspuffer: enthält Telomerase-spezifische DIG-markierte Sonde
5. Waschpuffer
6. Anti-DIG-POD
7. Konjugat-Dilutionspuffer
8. TMB-Substratlösung: enthält das Peroxidasesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin

9. Stop-Reagenz
10. Positivkontrolle
11. Mikrotiterplatte: Streptavidin-beschichtet
12. Schutzfolie

Zusätzliche Materialien:

- PCR-Cups (200 µl)
- sterile Aerosol-freie Pipettenspitzen
- Pipetten für Einmal-Pipettenspitzen
- Sterile Eppendorf-Cups (1,5 ml)
- Steriles autoklaviertes Wasser (Braun)
- Mörser/Skalpell/Petrischale

Geräte:

- Mikrozentrifuge (Centrifuge 5402 Eppendorf)
- PCR-Thermo-Cycler (Perkin-Elmer Gene Amp TM 2400)
- Mikrotiterplatten-Schüttler
- Mikrotiterplatten-Lesegerät (DYNEX MRX II)
- Vortex Genie 2TM

2.3 Materialien zur Bestimmung der MYCN-Amplifikation

Qiagen DNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

PCR-Ansatz:

2 µl Plasmid

17,5 µl H₂O

2,5 µl Puffer

je 0,5 µl dATP, dTTP, dGTP, dCTP

je 0,5 µl Primer (MYCN 1, MYCN 2, InbBB1, InbBB2)

0,05 µl MoBi-Taq-Polymerase

Primer :

1	MYCN 1 (P12)	CAT CCA CCA GCA GCA CAA CTA TG
2	MYCN 2 (P8)	CCA GAG GCT CCC AAC CGT CAC
3	InbBB1	CAT TGC CTT GTG TTC TCC TT
4	InbBB2	GAA TGC GGT GCC TGC TGT C

Material für die Gelelektrophorese:

Agarosegel: 1g Agarose 3:1 (NuSieve)
50 ml TBE-Puffer (Sigma)

Loading-Buffer: 0,0625g Bromphenolblau (Merck)
28,7 ml Glycerol 87% (Merck)
0,25g SDS (Serva)
5,0 ml 0,5M EDTA pH 8,0 (Sigma)
16,3 ml Aqua dest. steril (Braun)

100 bp Ladder (Basenpaarleiter) (GibcoBRL)
Ethidiumbromid-Lösung (Sigma)

3. METHODEN

3.1 Allgemeine Methoden:

3.1.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion):

Die PCR ist eine Technik zur Vervielfältigung sehr kleiner Mengen von DNA-Sequenzen. Sie basiert auf dem Prinzip der Aneinanderreihung immer wiederkehrender Einzelschritte. Man benötigt dazu neben der DNA-Matrize zwei Oligonukleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Stücks hybridisieren und somit den Startpunkt der Synthese festlegen. Darüber hinaus braucht man eine hitzebeständige DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase), um den durch die Primer festgelegten Abschnitt zu replizieren, ausreichende Mengen an Nukleotiden (Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin als Desoxynukleotide dGTP, dATP, dCTP, dTTP) als Bausteine sowie Pufferlösungen, um eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherzustellen. Die PCR findet in einem Thermocycler statt, der die für die jeweiligen Schritte benötigte Temperatur gewährleistet. Es werden in der Regel 25-30 Zyklen durchgeführt.

1. Denaturierung der DNA:

Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94-96 °C erhitzt, um sie in die Einzelstränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.

2. Hybridisierung (Anlagerung):

Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Von diesen

Primern ausgehend werden nun in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2-3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65 °C. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann dies dazu führen, dass die Primer sich nicht (Temperatur zu hoch) oder an falschen Stellen (Temperatur zu niedrig) an der Ausgangs-DNA anlagern.

3. Polymerisation (Verlängerung):

Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt nun von der verwendeten DNA-Polymerase ab (zwischen 68 und 72 °C); auch die Zeit, die dieser Schritt benötigt, ist von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll, abhängig. Das PCR-Produkt kann mittels einer Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden, einem Verfahren, bei der DNA in ein Agarose-Gel eingebracht wird und anschließend eine Spannung angelegt wird. Die kürzeren DNA-Stränge bewegen sich schneller als die längeren auf den Pluspol zu. Die Menge des PCR-Produkts kann durch einen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden.

3.1.2 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):

Immunoassay

Das Grundprinzip des Immunoassays ist die Erkennung und der Nachweis eines zu analysierenden Stoffes (in einer flüssigen Phase) durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper. Je nach Konfiguration des Assays können sowohl Antigen als auch Antikörper der nachzuweisende Stoff sein. Bei der

Durchführung von Immunoassays wird die hohe Spezifität und Bindungsstärke der Bindung zwischen Antigenen und Antikörpern genutzt.

ELISA

Mit Hilfe des ELISA können Proteine und Viren sowie niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, Urin, etc.) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Radioimmunoassay (RIA) basiert das ELISA nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbreaktion. Soll zum Beispiel ein bestimmtes Protein nachgewiesen werden, müssen die dazu passenden Antikörper bekannt sein und zuvor mit verschiedenen gentechnischen oder zellbiologischen Verfahren hergestellt worden sein, wobei sie mit einem Enzym markiert werden. Ist dann in einer Probe das gesuchte Protein vorhanden, wird es durch die auf ein Trägermedium aufgebrachten Antikörper herausgefischt. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion führt zu einem sichtbaren Farbniederschlag und dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens.

1. Schritt:

Das hybridisierte PCR-Produkt wird durch Bindung an eine Festphase immobilisiert. Hierzu wird eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte verwendet. Streptavidin ist ein Protein, das in der Lage ist, Biotin über Wechselwirkungen mit seinen Aminosäureresten extrem stark zu binden. Daher ist für die Anlagerung an die Beschichtung eine vorherige Markierung des gewünschten Moleküls mit Biotin notwendig, was den Einsatz eines Biotin-markierten Primers bei der PCR erklärt.

2. Schritt:

Das immobilisierte PCR-Produkt wird über einen an Peroxidase konjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörper (Anti-DIG-POD) nachgewiesen.

3. Schritt:

Zuletzt wird das Produkt durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) sichtbar gemacht. Das TMB dient der Peroxidase als Substrat und wird von ihr zu einem blauen Reaktionsprodukt umgesetzt.

Nach Abstoppen dieser Enzymreaktion mit einem geeigneten Reagenz kann die Farbintensität des Reaktionsproduktes an einem Mehrkanalphotometer (photometrische Messung) gemessen werden, die einen Rückschluss auf die Telomeraseaktivität zulässt.

3.2 Telomerase PCR ELISA

Der TRAP-Assay wurde 1994 von Kim et al. veröffentlicht. Es handelt sich um eine hochsensitive Methode zum Nachweis von Telomeraseaktivität in einem Zellextrakt mit minimal 0,01% Telomerase-exprimierenden Zellen. Der TRAP-Assay verbindet biochemische Merkmale der Telomerase mit einer Nukleinsäureamplifikation wie der PCR (Kim et al., 1994)

TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol):

Im ersten Schritt heftet die Telomerase die für sie charakteristische Nukleotidsequenz TTAGGG an das 3'-Ende des Biotin-markierten P1-TS-Primers. Nach der Primerverlängerung wird die Telomerase durch Erhitzen denaturiert. Es liegt nun ein einsträngiger DNA-Abschnitt vor, der aus dem P1-TS-Primer und zahlreichen Wiederholungen der typischen Telomerasesequenz besteht. Hier lagert sich der zweite Primer P2 an, der komplementär zu dieser Sequenz ist. Von diesem Primer aus baut die Taq-Polymerase den komplementären Strang, wodurch ein Doppelstrang entsteht.

Vorbereitung der Reagenzlösungen:

Das Kit wird bei -20°C aufbewahrt. Die für die TRAP-Reaktion benötigten Lösungen werden auf Eis gelagert, die Lösungen für die Hybridisierung und die ELISA werden vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur vorgewärmt.

1. Lyse-Reagenz: Fertiglösung; zerstört Tumorzellen, wodurch Plasmabestandteile inkl. Telomerase in Lösung gelangen
2. Reaktionsmischung: zweifach konzentrierte Mischung, die auf Eis aufgetaut und in kleinere Portionen aufgeteilt wird, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden. Die Mischung beinhaltet Telomerase-Substrat, Primer, Nukleotide sowie die Taq-Polymerase.
3. Denaturierungsreagenz: Fertiglösung
4. Hybridisierungspuffer: Fertiglösung, die auf Eis aufgetaut und in kleinere Portionen aufgeteilt wird, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden. Enthält Telomerase-spezifische DIG-markierte Sonde
5. Waschpuffer: zehnfach konzentrierte Lösung, die nach dem Auftauen mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt wird.
6. Anti-DIG-POD: wird in 240 µl destilliertem Wasser aufgelöst
7. Konjugat-Dilutionspuffer: Fertiglösung
8. TMB-Substratlösung: Fertiglösung; enthält das Peroxidasesubstrat 3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin
9. Stop-Reagenz: Fertiglösung
10. Positivkontrolle

Präparation des Gewebes:

30-60 mg des schockgefrorenen Tumorgewebes werden mit 200 µl eiskaltem Lyse-Reagenz in ein Eppendorfgefäß gegeben, mit dem Mörser gut zerkleinert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wird das Lysat für 20 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert, wodurch sich die Zelltrümmer am Gefäßboden absetzen, und anschließend 175 µl des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

Vorbereitung der Kontrollen:

Bei jedem PCR-Ansatz werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

Positivkontrolle:

gefriergetrockneter Zellextrakt aus Telomerase-exprimierenden menschlichen Nierenzellen; wird in 20 µl destilliertem Wasser aufgelöst, wodurch eine Konzentration von 10^3 Zelläquivalenten pro µl entsteht.

Negativkontrolle:

Hierfür werden etwa 20 µl einer beliebigen aufbereiteten Probe mind. 10 min bei 68°C hitzebehandelt, wodurch es zur Inaktivierung der Telomerase kommt.

Telomeric repeat amplification protocol (TRAP-Reaktion):

5 µl jeder Probe werden mit 25 µl Reaktionsmischung und 20 µl destilliertem Wasser in ein PCR-Gefäß gegeben. 1 µl der vorbereiteten Positivkontrolle gibt man mit 25 µl Reaktionsmischung und 24 µl destilliertem Wasser in ein Gefäß. Von der Negativkontrolle werden 5 µl zusammen mit 25 µl Reaktionsmischung und 20 µl destilliertem Wasser in ein Gefäß gegeben. Die Proben können jetzt im Thermo-Cycler die Polymerase-Kettenreaktion nach folgendem Programm durchlaufen:

Primer- Elongation:	20 min bei 25°C	(Zyklus 1)
Telomerase-Inaktivierung:	5 min bei 94°C	(Zyklus 2)
Amplifikation:		(Zyklus 3-32)
-Denaturierung:	30 sec bei 94°C	
-Hybridisierung:	30 sec bei 50°C	
-Polymerisation:	90 sec bei 72°C	
	10 min bei 72°C	(Zyklus 33)
Hold:	4°C	

Hybridisierung und ELISA:

Pro Probe werden 20 µl des Denaturierungsreagenzes in ein Eppendorfgefäß gegeben. 5 µl des PCR-Produktes werden hinzugefügt und die Proben für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun gibt man 225 µl des Hybridisierungspuffers dazu und schüttelt die Proben kurz. Von jeder Probe werden 100 µl auf die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte in die vorgesehenen Wells überführt (zwei Wells pro Probe zur Doppelbestimmung) und die Platte mit Folie bedeckt, um die Proben vor Verdunstung zu schützen. Die Mikrotiterplatte wird für 3 h im Wasserbad bei 37°C auf einem Schüttler geschüttelt (300 rpm) und somit die Proben inkubiert. Danach entfernt man die Hybridisierungslösung und wäscht jedes Well dreimal mit 250 µl Waschpuffer für je 30 sec. Wieder wird die Lösung abgegossen. Anschließend gibt man 100 µl der Anti-DIG-POD-Lösung in jedes Well, bedeckt die Platte wieder mit Folie und inkubiert für weitere 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (300 rpm). Die Lösung wird erneut abgegossen. Wieder wäscht man jedes Well mit 250 µl Waschpuffer fünf Mal für 30 sec und gießt die Lösung ab. Je 100 µl TMB-Substratlösung werden in die Wells gegeben, die Platte wieder mit Folie bedeckt und für 10-20 min bei Raumtemperatur zur Farbentwicklung geschüttelt. In jedes Well werden dann 100 µl Stop-Reagenz gegeben, um die Farbentwicklung zu stoppen. Der blaue Farbstoff wird nun in einen gelben, spektroskopisch nachweisbaren Farbstoff umgewandelt. Anschließend misst man mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät die Absorption der Proben bei 450 nm Wellenlänge und etwa 690 nm als Referenz. Dies sollte innerhalb von 30 min nach Abstoppen der Farbentwicklung durchgeführt werden.

Mikrotiterplatte:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	pos.		P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33
B			P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34
C			P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
D	pos.		P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
E			P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37
F			P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38
G	neg.		P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39
H	neg.		P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	P40	P40

Auswertung der Ergebnisse:

Die Extinktion der Proben wird in OD (optische Dichte) gemessen. Von dem OD-Wert jeder Probe wird der Wert der Negativkontrolle abgezogen. Die Positivkontrolle gilt als Referenzwert und stellt 100% dar, so dass sich daraus die Werte für die Proben in Prozent ergeben. Daraus erklärt sich, dass Werte von >100% entstehen können. Ab einem Wert von 20% gilt die Probe als Telomerase-positiv.

3.3 Nachweis der MYCN-Amplifikation

1. DNA-Extraktion aus Tumorgewebe:

Qiagen DNA Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

50 mg Tumorgewebe

2. PCR-DNA-Amplifikation:

Die Ermittlung des Amplifikationsstatus von MYCN erfolgt per PCR. Als Referenzgen wird das nicht amplifizierte Single-copy-Gen Inhibin-beta-b auf Chromosom 2q13 eingesetzt. Die Primer für MYCN sowie Inhibin-beta-b wurden mit dem Software-Programm OLIGO 6.0 (MedProbe, Oslo, Norway) entwickelt. Die Proben durchlaufen im Thermo-Cycler die Polymerase-Kettenreaktion nach folgendem Programm:

Initialisierung: 3 min bei 95°C

Amplifikation (26 Zyklen):

-Denaturierung: 30 sec bei 95°C

-Hybridisierung 45 sec bei 64°C

-Polymerisation: 90 sec bei 72°C

7 min bei 72°C

Anschließend erfolgt die Auftrennung der Fragmente in einer Gelelektrophorese.

3. Gelelektrophorese:

Die Gelelektrophorese ermöglicht es, unterschiedlich lange DNA-Fragmente untereinander sichtbar aufzutrennen. Hierzu wird die mittels PCR amplifizierte DNA mit einem Loading-Buffer versetzt (5µl Buffer auf 10µl Probe), um erstens die Proben durch das Bromphenolblau sichtbar zu machen und zweitens die DNA durch die so angehobene Dichte an ihrem Platz zu halten.

Zur Herstellung des Gels wird die Agarose in TBE-Puffer bis zur Blasenbildung aufgekocht und nach Abkühlung möglichst luftblasenfrei in einen abgedichteten Schlitten gegossen, der mit einem passenden Kamm entsprechend der Anzahl der Proben versehen ist. Danach lässt man das Gel für ca. 30 min bei Raumtemperatur polymerisieren und lagert es anschließend für weitere 30 min bei 4°C, um den Polymerisierungsgrad noch zu verbessern. Der Schlitten wird in die Gelkammer eingesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Die verschiedenen Proben sowie die Basenleiter werden nun auf das Agarosegel aufgetragen. Man legt ein elektrisches Feld an die Gelkammer, wodurch sich die kationischen DNA-Fragmente zur Anode hin bewegen. Kürzere Fragmente wandern schneller durch das Gel als längere. Je niedriger die angelegte Spannung ist, desto gleichmäßiger ist die Lauffront und desto klarer ist die Auftrennung der DNA-Fragmente. Eine gute Auftrennung erreicht man bei einer Spannung von 60V.

Nach Erreichen des Gelendes, also der Anode, nimmt man das Gel aus der Kammer und legt es zur Färbung für etwa 15 min in die Ethidiumbromid-Lösung, damit sich das Ethidiumbromid zwischen den Basenpaaren anlagern kann. Nach 10 min Wässerung zum Entfernen der Färbesubstanz aus den übrigen Bereichen des Gels kann man die Bandenintensität anhand des Geldokumentationsgerätes (Image Master VDS von Pharmacia Biotech) auswerten. Der Amplifikationsstatus wird ausgedrückt als relative Bandenintensitäten des MYCN-Gens auf Chromosom 2p24-25 im Vergleich zur Bandenintensität des nicht amplifizierten Referenzgens Inhibin-beta-b auf Chromosom 2q.

4. ERGEBNISSE:

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine qualitative Untersuchung von 304 Neuroblastomen verschiedener Stadien, bei denen die Telomeraseaktivität sowie die MYCN-Amplifikation analysiert wurden. Von den 304 untersuchten Tumoren befanden sich 69 im ersten Stadium (23%), 44 im zweiten Stadium (15%) sowie 56 im dritten Stadium (18%). Im Stadium 4 waren 37% (n=113) der Neuroblastome, 7% (n=22) wiesen das Stadium 4S auf. Der Median des Alters bei Erstdiagnose aller Patienten lag bei 18,5 Monaten, die Spanne betrug 0,13 bis 159 Monate. Errechnet man den Mittelwert, so ergibt sich ein Wert von 28,8 Monaten. Die Geschlechtsverteilung der untersuchten Patienten war relativ ausgeglichen: 162 der Patienten waren männlich (53%), 142 waren weiblich (47%). Von den untersuchten Tumoren waren 113 (37%) histologisch differenziert, 172 (57%) waren undifferenziert. Bei 19 Tumoren (6%) lagen bezüglich der Differenzierung keine eindeutigen Aussagen vor. Die Telomeraseaktivität reichte von 0,8 bis 127,1% bei einem Median von 5,7% sowie einem Mittelwert von 13,6%. Bei 51 der untersuchten Tumoren konnte eine Amplifikation von MYCN nachgewiesen werden (17%), 253 zeigten keine MYCN-Amplifikation (83%).

	Alle Patienten (n=304)	
	zensiert (n=204)	tot (n=100)
Geschlecht		
weiblich	98	44
männlich	106	56
Alter bei Diagnose [Monate]		
Median	15.4	35.0
oberes Quartil	32.2	47.4
unteres Quartil	11.5	18.9
Tumorstadium		
I.	67	2
II.	40	4
III.	44	12
IV.	35	78
IVS.	18	4
Histologie*		
differenziert	74	39
undifferenziert	115	57
MYCN- Amplifikation		
negativ	188	65
positiv	16	35
Telomeraseaktivität [%]		
Median	6.0	5.4
oberes Quartil	10.7	22.5
unteres Quartil	2.7	3.1

* 19 Werte fehlen

Tabelle 1: Charakteristika der 304 untersuchten Patienten

Prädiktor und Kovariablen	Univariate Analyse		Multivariate Analyse			
	Hazard-Ratio [95% CI]	p	initial		endgültig, stratifiziert	
			Hazard-Ratio [95% CI]	p	Hazard-Ratio [95% CI]	p
In(Telomerase-aktivität [%])	1.21 [1.03...1.44]	0.024	1.33 [1.11...1.59]	0.0019	1.33 [1.12...1.59]	0.001
Geschlecht						
weiblich	1	-				
männlich	1.14 [0.77...1.69]	0.526	1.09 [0.70...1.70]	0.700		
Alter bei Diagnose [Jahre]	1.13 [1.06...1.20]	<0.001	1.09 [1.00...1.19]	0.052		-----
Tumorstadium						
I./II./III./IVS.	1	-	1	-		-----
IV.	8.72 [5.41...14.0]	<0.0001	8.48 [4.68...15.39]	<0.0001		
Histologie						
differenziert	1	-	1	-		
undifferenziert	0.93 [0.62...1.40]	0.727	0.95 [0.59...1.53]	0.820		
MYCN-Amplifikation						
negativ	1	-				
positiv	3.83 [2.53...5.80]	<0.0001	1.76 [1.04...2.98]	0.035	1.83 [1.12...3.01]	0.017

Tabelle 2: Univariate and multivariate Cox-Analysen inklusive Hazard-Ratio und 95%-Konfidenzintervallen (CI) sowie p-Werten

			n	Maximum	75. Perzentil	Median	25. Perzentil	Minimum
Tumor-stadium	I	TA	69	82.92	10.36	6.15	3.08	0.89
		InTA	69	4.42	2.34	1.82	1.12	-0.12
	II	TA	44	74.90	15.49	9.06	4.87	1.49
		InTA	44	4.32	2.74	2.20	1.58	0.40
	III	TA	56	96.21	12.70	5.99	3.06	0.81
		InTA	56	4.57	2.54	1.79	1.12	-0.21
	IV	TA	113	127.11	11.94	4.47	2.81	0.77
		InTA	113	4.85	2.48	1.50	1.03	-0.26
	IVS	TA	22	38.37	14.67	3.59	2.24	0.81
		InTA	22	3.65	2.68	1.26	0.80	-0.21
Histologie	differenziert	TA	113	127.11	10.35	4.92	2.76	0.77
		InTA	113	4.85	2.34	1.59	1.01	-0.26
	undifferenziert	TA	172	107.61	12.96	5.94	3.01	0.77
		InTA	172	4.68	2.56	1.78	1.10	-0.26
Alter bei Diagnose	<15 Monate	TA	112	65.89	11.38	5.89	2.93	0.81
		InTA	112	4.19	2.43	1.77	1.08	-0.21
	15-33 Monate	TA	88	107.61	11.68	6.47	3.35	0.89
		InTA	88	4.68	2.46	1.87	1.21	-0.12
	>=33 Monate	TA	104	127.11	13.36	4.26	2.39	0.77
		InTA	104	4.85	2.59	1.45	0.87	-0.26
MYCN	negativ	TA	253	100.89	10.50	5.29	2.89	0.77
		InTA	253	4.61	2.35	1.67	1.06	-0.26
	positiv	TA	51	127.11	46.68	7.93	2.91	0.77
		InTA	51	4.85	3.84	2.07	1.07	-0.26

Tabelle 3: Telomeraseaktivität in Prozent und logarithmiert in Bezug auf Tumorstadium, Histologie, Alter bei Diagnose und MYCN-Amplifikation

Statistische Auswertung der Ergebnisse:

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software SAS Version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) und R (Version 2.3.1).

Es wurden univariate sowie multivariate Cox-Regressions-Analysen angewendet, um den Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit sowie dem Prädiktor „Telomeraseaktivität“ und anderen Kovariablen (MYCN-Amplifikation, Tumorstadium, Alter bei Diagnose, Histologie sowie Geschlecht der Patienten) zu ermitteln. Die multivariate Analyse erfolgte in mehreren Schritten. Im initialen multivariaten Modell wurden die Effekte aller Variablen gleichzeitig betrachtet (siehe Tabelle 2). Danach wurde ein auf diejenigen Prädiktoren beschränktes Modell erstellt, welche in der univariaten oder der multivariaten Analyse einen p-Wert $\leq 0,15$ aufwiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). Aufgrund von Verletzungen der Proportional-Hazard-Annahme durch die Variablen „Tumorstadium“ und „Alter bei Diagnose“ wurde ein endgültiges, stratifiziertes Modell ohne diese Variablen erstellt. Wegen einer Verletzung der Linearitätsannahme durch die Telomeraseaktivität wurden die Werte logarithmiert. Wichtig ist, dass die verschiedenen Schritte einen nur geringen bis keinerlei Einfluss auf die Schätzung des Zusammenhangs zwischen Telomeraseaktivität und Überlebenszeit hatten. Zuletzt wurde in einer vierten Analyse die Interaktion zwischen Telomeraseaktivität und MYCN-Amplifikation untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Die graphische Darstellung erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode.

Testergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Ergebnisse:

Telomeraseaktivität des Neuroblastoms

Die Telomeraseaktivität im Tumormaterial derjenigen Patienten, die die Erkrankung überlebten, wies einen Median von 6,0% auf (Spannweite vom unteren Quartil 2,7% bis oberen Quartil 10,7%), während der Median in der

Gruppe der verstorbenen Patienten 5,4% betrug (Spannweite vom unteren Quartil 3,1% bis oberen Quartil 22,5%) (Abb. 1F; s. a. Tabelle 1).

Der Median der Telomeraseaktivität lag im Stadium 1 bei 6,15% (Spannweite 0,89% bis 82,92%), im Stadium 2 bei 9,06% (1,49% bis 74,90%), im Stadium 3 bei 5,99% (0,81% bis 96,21%), im 4. Stadium bei 4,47% (0,77% bis 127,11%) und bei Tumorproben des Stadiums 4S bei 3,59% (0,81% bis 38,37%) (Abb. 1C).

Bei den Tumoren mit einer differenzierten Histologie betrug der Median der Telomeraseaktivität 4,92% (0,77% bis 127,11%), bei denen mit einer undifferenzierten Histologie 5,94% (0,77% bis 107,61%) (Abb. 1D).

Die Tumoren jüngerer Patienten (Alter bei Diagnose <15 Monate) wies die Telomeraseaktivität einen Median von 5,89% auf (0,81% bis 65,89%). Bei Tumoren älterer Patienten hingegen (Alter bei Diagnose >33 Monate) betrug er 4,26% (0,77% bis 127,11%) (s. Tabelle 3). In einem zweiten Ansatz teilten wir nach Alter bei Diagnose jünger bzw. älter als 24 Monate. Der Median der Telomeraseaktivität bei Tumoren der ersten Gruppe ergab 6,28%, während er in der zweiten Gruppe 4,73% betrug (Abb. 1B).

Der Median der Telomeraseaktivität lag bei Tumoren mit Amplifikation des MYCN-Gens bei 7,93% (0,77% bis 127,11%), wohingegen er bei Tumoren ohne MYCN-Amplifikation 5,29% ergab (0,77% bis 100,89%) (Abb. 1E).

Zusammenfassend korreliert der Median der Telomeraseaktivität nicht mit den Parametern Histologie, Alter bei Diagnose, Gesamtüberlebenszeit und MYCN-Status. Allerdings ließen sich signifikant höhere Telomeraseaktivität -Levels bei Tumoren im Stadium 2 im Vergleich zu Stadium 4S und 1 oder 3 und 4 nachweisen.

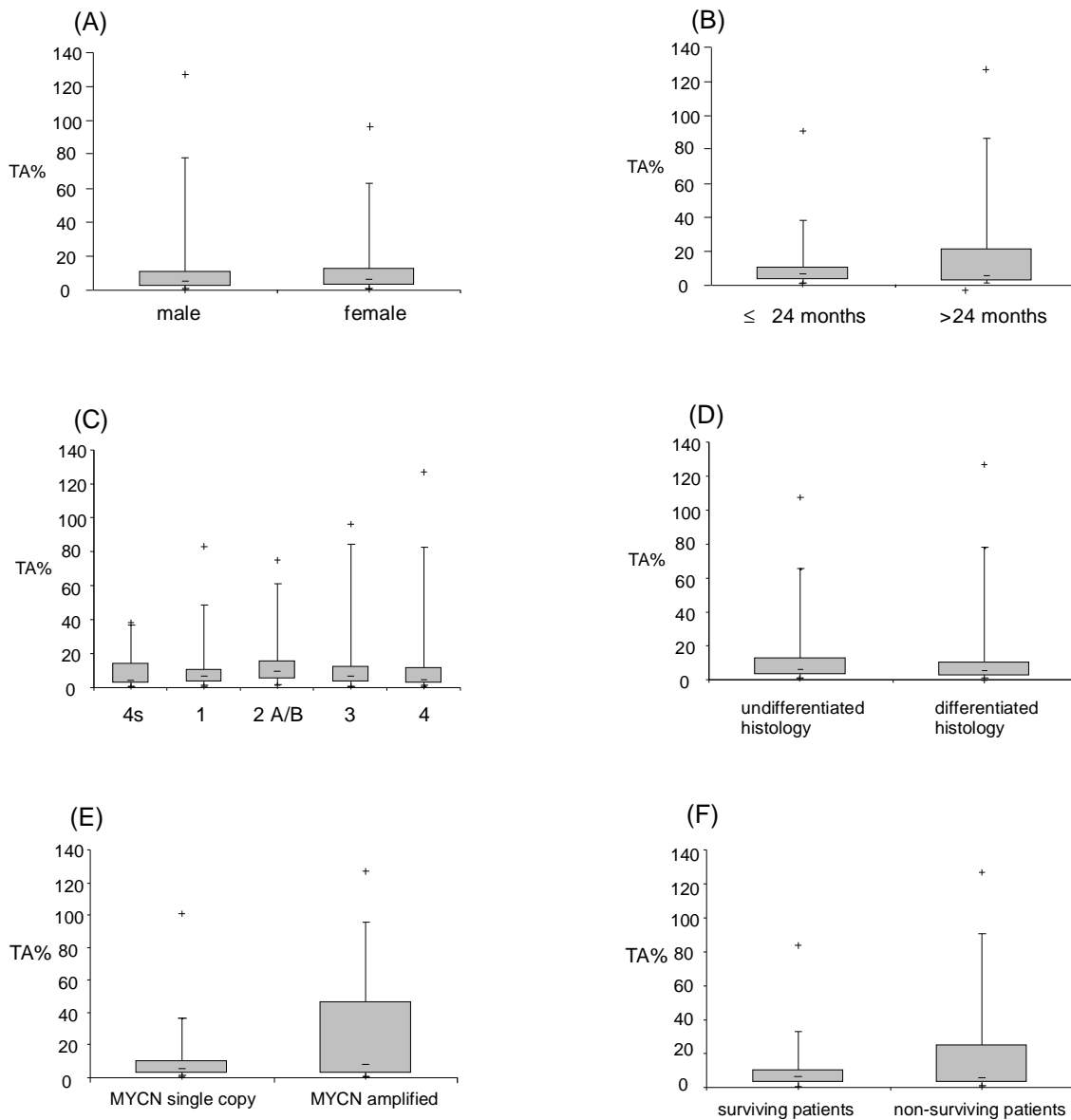


Abbildung 1:

Telomeraseaktivität (TA) in % in Bezug auf Geschlecht (A), Alter bei Diagnose (B), Tumorstadium (C), Histologie (D), Amplifikationsstatus von MYCN (E) sowie Überleben (F). Gezeigt sind der Median, die 25. und 75. Perzentile (unteres und oberes Quartil) angezeigt als Boxplot sowie die gesamte Spannweite der TA-Werte in den untersuchten Gruppen.

Univariate Analyse der Telomeraseaktivität

Für die Variablen Telomeraseaktivität, Geschlecht, Tumorstadium, Histologie MYCN-Amplifikation und Alter bei Diagnose wurden univariate Analysen durchgeführt. Wie erwartet, konnte das Geschlecht keine signifikanten Werte bezüglich Prognose erreichen (95% CI 0,77-1,69; $p=0,526$). Interessanterweise hatte die histopathologische Graduierung, also die Unterscheidung zwischen undifferenzierten und differenzierten Tumoren, ebenso wenig prognostische Aussagekraft (95% CI 0,62-1,40; $p=0,727$). Das Alter bei Diagnose hingegen konnte signifikant zwischen günstiger und ungünstiger Prognose unterscheiden (95% CI 1,06-1,20; $p<0,001$). Wie zu erwarten, zeigten sich das metastasierte Tumorstadium 4 sowie die Amplifikation von MYCN als hochsignifikante Prädiktoren für eine schlechte Prognose (95% CI 5,41-14,00; $p<0,0001$ und 95% CI 2,53-5,80; $p<0,0001$). Auch die Telomeraseaktivität konnte bei den untersuchten Neuroblastompatienten zwischen guter und schlechter Prognose unterscheiden (95% CI 1,03-1,44; $p=0,024$).

Multivariate Analyse der Telomeraseaktivität

Multivariate Analysen wurden für den Prädiktor Telomeraseaktivität sowie die Kovariablen Geschlecht, Tumorstadium, Histologie, MYCN-Amplifikation und Alter bei Diagnose durchgeführt. Geschlecht, Histologie und Alter bei Diagnose erreichten keine prognostische Signifikanz bezüglich der Überlebenszeit der untersuchten Patienten. Das metastasierte Tumorstadium 4 wiederum konnte signifikant zwischen günstiger und ungünstiger Prognose unterscheiden (95% CI 4,68-15,39; $p<0,0001$). Auch die Amplifikation von MYCN sowie die Telomeraseaktivität erreichten Signifikanz ($p=0,035$ und $p=0,0019$). Da die Proportional-Hazard-Annahme durch die beiden Variablen verletzt wurde, wurde ein stratifiziertes Modell erstellt, bei dem sowohl die MYCN-Amplifikation als auch die Telomeraseaktivität Signifikanz erreichten ($p=0,017$ und $p=0,001$).

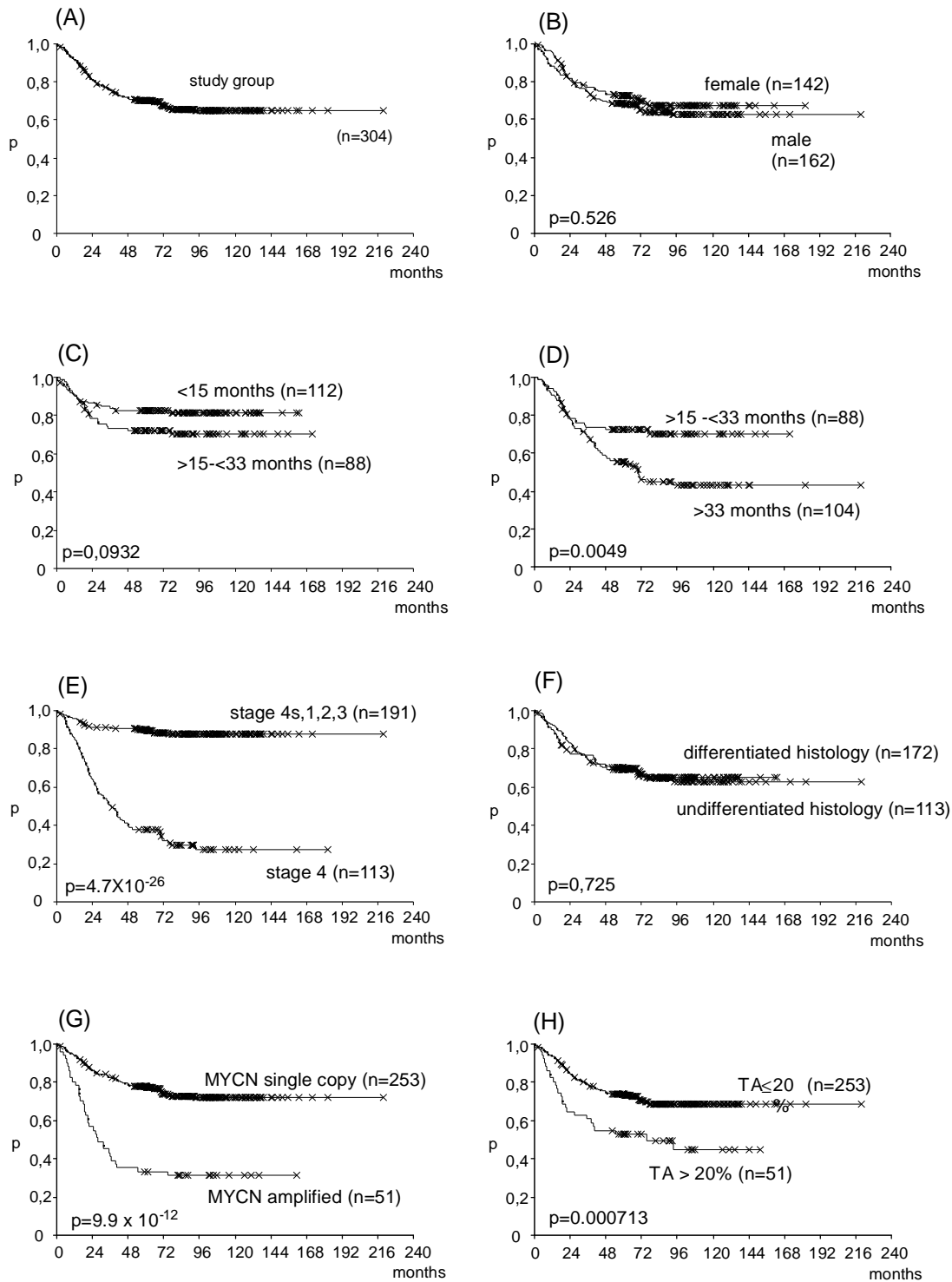


Abbildung 2:

Kaplan-Meier-Überlebenskurven aller Patienten (n=304) mit Neuroblastom (A), sowie für die Kovariablen Geschlecht (B), Alter bei Diagnose in zwei Gruppen (C) und (D), Tumorstadium (E), Histopathologie (F), Amplifikationsstatus von MYCN (G) und Telomeraseaktivität (H).

5. DISKUSSION

Das Neuroblastom ist der häufigste extrakranielle solide Tumor im Kindesalter. Es entsteht aus entarteten unreifen Zellen des sympathischen Nervensystems und geht vom Grenzstrang, vom Nebennierenmark oder von sonstigem sympathischen Gewebe aus. Seine Besonderheit besteht in den unterschiedlichen Verläufen, die von spontaner Tumorregression - hauptsächlich im Säuglingsalter - bis zu metastasierenden Neuroblastomen mit unaufhaltsamem Wachstum - bei älteren Patienten - reichen. Die neuesten Fortschritte im Verständnis der Biologie und Genetik des Neuroblastoms haben zur Einteilung in Gruppen mit geringem, mittelgroßem sowie hohem Risiko geführt. Dies ermöglicht es, eine dem jeweiligen Tumor angemessene Therapieintensität auszuwählen. So ist das Neuroblastom heutzutage einer der ersten Tumoren, bei dem genetische Tumormarker als wichtige Prädiktoren des biologischen Verhaltens dienen und unmittelbare Auswirkungen auf das klinisch-therapeutische Handeln haben. Hier reicht das Spektrum von reiner Beobachtung bis zur aggressiven multimodalen Therapie. Zukünftige Therapien werden zunehmend auf die Gene sowie die biologischen Wege fokussieren, welche zur malignen Transformation oder Progression führen.

In dieser Arbeit wurde die prognostische Bedeutung der Telomeraseaktivität beim Neuroblastom in Abhängigkeit von den Variablen MYCN-Amplifikation, Stadium der Erkrankung, Alter bei Diagnose, Histologie und Geschlecht untersucht.

Telomeraseaktivität und Prognose

Die Bedeutung der Telomeraseaktivität für die Prognose konnten Hiyama et al. bereits 1995 in einer Untersuchung an 100 Neuroblastomen nachweisen. Die Tumoren mit einer starken Telomeraseaktivität zeigten weitere genetische Veränderungen sowie eine ungünstige Prognose, während die mit niedriger Aktivität keine dieser Veränderungen aufwiesen und eine günstige Prognose hatten. Die Autoren vermuteten damals, dass zwei verschiedene Wege für die Entwicklung eines Neuroblastoms existieren könnten. Poremba et al.

beschrieben 1999 in einer Untersuchung an 67 Neuroblastomen in allen Tumorstadien eine starke Korrelation zwischen der Anwesenheit von Telomeraseaktivität und einer schlechten Prognose. Multivariate Analysen zeigten die TA als unabhängigen prognostischen Marker. 2001 konnten Poremba et al. erneut belegen, dass die TA zwischen guter und schlechter Prognose in allen Tumorstadien, auch in vermeintlich prognostisch günstigen klinischen oder biologischen Untergruppen des Neuroblastoms, unterscheiden kann. In allen Studien, die bislang zur Telomeraseaktivität in Neuroblastomen veröffentlicht wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die TA als negativer Prognosefaktor zu bewerten ist. Unsere Daten stützen diese Aussage; auch die vorliegende Untersuchung kommt zu dem Ergebnis, dass die Telomeraseaktivität einen unabhängigen prognostischen Marker für das Neuroblastom darstellt ($p=0,001$).

MYCN-Amplifikation und Prognose

Die Amplifikation von MYCN hat laut unserer Untersuchung eine statistisch signifikante Aussagekraft bezüglich der Prognose des Neuroblastoms ($p=0,017$). Brodeur beschrieb bereits 1984, dass die Amplifikation von MYCN stark mit einem fortgeschrittenen Stadium korreliert, was wiederum mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Brodeur et al., 1984). Berthold et al. untersuchten die Daten von über 1000 Neuroblastompatienten. Sie postulierten, dass von den molekularen Faktoren insbesondere MYCN signifikant zur Risikoeinschätzung beisteuert und diese Faktoren in Verbindung mit klinischen Faktoren entscheidende Hilfsmittel sind, um Risikogruppen zu definieren (Berthold 1997).

Stadium der Erkrankung, Alter bei Diagnose, Histologie, Geschlecht und Prognose

Coldman et al. beschrieben 1980, dass die Überlebenschancen mit jungem Alter bei Diagnose, Tumorlokalisation außerhalb der Nebenniere und

niedrigem Tumorstadium assoziiert ist und diese Faktoren unabhängig voneinander sind. Das Geschlecht des Patienten hatte nach ihrer Untersuchung keinen Effekt auf die Prognose (Coldman et al., 1980).

In einer Studie an 60 Neuroblastomen von Carlsen et al. erwies sich das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose als einziger unabhängiger prognostischer Faktor (Carlsen et al., 1981). Eine spätere Auswertung Carlsens der Daten von 253 Neuroblastomen (1943 bis 1980) mittels multivariater Analysen zeigte, dass die Faktoren Stadium und Alter bei Diagnose unabhängige prognostische Variablen sind, während das Geschlecht des Patienten, das Jahr der Diagnosestellung sowie Tumorlokalisierung keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose hatten (Carlsen et al., 1986).

Eine Auswertung der Daten von 102 Neuroblastomen bei Neugeborenen aus den Jahren 1940 bis 1978 ergab, dass bei den betreffenden Patienten eine günstige Prognose nicht von den Faktoren Alter bei Diagnose oder Tumorlokalisierung, sondern ausschließlich vom Stadium des Tumors abhing (Castello et al., 1983). In einer ähnlichen Untersuchung von Thomas et al. an 119 Neuroblastomen aus den Jahren 1949 bis 1978 zeigten sich die Faktoren Stadium, Histologie und Alter bei Diagnose als unabhängige prognostische Variablen, wobei die genannte Reihenfolge der Stärke der Signifikanz entsprach. Das Geschlecht des Patienten hatte keine signifikante prognostische Aussagekraft (Thomas et al., 1984). In einer Studie von Kajanti und Holsti an 88 Tumoren aus den Jahren 1951 bis 1978 zeigte sich ebenfalls das Tumorstadium als stärkster prognostischer Faktor (Kajanti et Holsti, 1986). Cotterill et al. untersuchten über 1000 Neuroblastome und fanden in dieser Gruppe einen signifikanten Einfluss von Stadium und Alter auf die Prognose, nicht jedoch vom Geschlecht der Patienten (Cotterill et al., 2000).

In unserer Untersuchung wurde eine signifikante prognostische Aussagekraft des Tumorstadiums 4 ($p < 0,0001$) deutlich. In der univariaten Analyse ergab sich für das Alter bei Diagnose eine signifikante Bedeutung für die Prognose ($p < 0,001$), das Ergebnis hielt jedoch der multivariaten Analyse nicht stand; hier wird deutlich, dass das Alter keinen unabhängigen prognostischen Marker für das Neuroblastom darstellt ($p = 0,052$). Das Geschlecht der Patienten scheidet bereits in der univariaten Analyse als prognostischer Marker aus ($p = 0,700$), ebenso die Histologie ($p = 0,820$).

Das aktuelle Modell zum Verständnis des Neuroblastoms stammt von Garrett M. Brodeur. Er unterteilt die Tumoren je nach biologischen und genetischen Charakteristika in verschiedene Subtypen. Die erste Gruppe ist durch near-triploide Karyotypen mit komplettem Chromosom-Zugewinn charakterisiert und verfügt selten über strukturelle Chromosomenaberrationen, exprimiert jedoch üblicherweise den Trk A-Neurotrophin-Rezeptor. Die Patienten sind in der Regel unter einem Jahr alt, haben einen lokalisierten Tumor und eine gute Prognose. Die zweite Gruppe ist durch strukturelle Chromosomenaberrationen wie z. B. die Deletion von 1p oder 11q, segmentale Zugewinne des langen Arms von Chromosom 17 sowie Amplifikation von MYCN charakterisiert und exprimiert unter Umständen auch den Trk B-Neurotrophin-Rezeptor. Die Patienten sind in der Regel älter als ein Jahr, weisen fortgeschrittene Tumorstadien auf und haben auch bei aggressiver Therapie eine deutlich schlechtere Prognose (Brodeur, 2003).

Es fällt auf, dass in dem Modell von Brodeur die Telomeraseaktivität als prognostischer Marker keine Erwähnung findet, obwohl sie in der allgemeinen Kanzerogenese eine entscheidende Rolle spielt. Im Zellzyklus führt das Unterschreiten einer bestimmten Telomerlänge dazu, dass die Zelle sich nicht mehr weiter teilen kann. Oft tritt dann der programmierte Zelltod (Apoptose) oder ein permanenter Wachstumsstopp (Seneszenz) ein. Malignen Zellen ist es jedoch möglich, mit der Aktivität des Enzyms Telomerase die Telomerlänge konstant zu halten. Somit können diese Zellen unbegrenzt weiter wachsen und sich teilen. Die Erhaltung der Telomere ist somit eine entscheidende Voraussetzung für die Entwicklung von menschlichen Tumoren. Das Fehlen von Telomeraseaktivität in den meisten nicht-neoplastischen Geweben und somatischen Zellen sowie ihre Anwesenheit in nahezu allen malignen Tumoren macht die Telomerase zu einem diagnostischen Marker für Malignität. Die Reaktivierung der Telomerase könnte eine Voraussetzung für die Entwicklung maligner Tumorzellen aus somatischen Zellen sein.

Die Telomeraseaktivität ist auch in Neuroblastomzellen erhalten oder aber reaktiviert und kann daher als Prädiktor für die Prognose benutzt werden.

Entsprechend der Ergebnisse unserer Untersuchung sollte der Telomeraseaktivität bei der Einschätzung der Prognose des Neuroblastoms eine größere Bedeutung beigemessen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Neuroblastom als Tumor des frühen Kindesalters imponiert durch eine außergewöhnliche biologische Heterogenität, die sich in sehr unterschiedlichen klinischen Verläufen äußert. Das Spektrum reicht von spontanen Regressionen bereits metastasierter Tumoren bis hin zu unaufhaltsamer Progression der Neuroblastome, so dass es für eine möglichst optimale Therapie der Betroffenen entscheidend ist, das individuelle Risiko verlässlich zu bestimmen. Seit mehr als 20 Jahren ist der Einfluss der Amplifikation des MYCN-Onkogens auf die Prognose der Erkrankung bekannt. Seither hat sich das Verständnis der vielschichtigen Biologie des Neuroblastoms durch unermüdliche Erforschung weiterer molekulargenetischer Aberrationen der Tumorzellen entscheidend verbessert. Genetische Faktoren besitzen bei der Einschätzung des individuellen Risikos mittlerweile eine wichtige Bedeutung. So ist das Neuroblastom heutzutage einer der ersten Tumoren, bei dem genetische Tumormarker als wichtige Prädiktoren des biologischen Verhaltens dienen und unmittelbare Auswirkungen auf das klinisch-therapeutische Handeln haben (Oberthür et Hero, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Telomeraseaktivität für die Prognose des Neuroblastoms begutachtet. Neben der Telomeraseaktivität wurde außerdem die Amplifikation des Onkogens MYCN an 304 Tumoren untersucht. Mittels statistischer Verfahren wurden diese beiden Parameter sowie die Variablen Tumorstadium, Alter bei Diagnose, Histologie und Geschlecht der Patienten auf ihre prognostische Aussagekraft sowie eventuelle Abhängigkeit der Faktoren untereinander überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von Telomeraseaktivität in einem Neuroblastom ungeachtet der Faktoren MYCN-Amplifikation, Stadien- oder Altersverteilung eindeutig mit einer schlechten Prognose korreliert.

Zu demselben Ergebnis kamen wir bezüglich der Amplifikation des Onkogens MYCN sowie des Stadiums 4; auch diese Parameter stellen unabhängige prognostische Faktoren für das Neuroblastom dar.

Die Suppression der Telomeraseaktivität und die dadurch resultierende Hemmung der unbegrenzten Teilungsfähigkeit maligner Zellen ist ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung bösartiger Tumoren. Da fast alle menschlichen Tumoren Telomeraseaktivität aufweisen, könnte eine Hemmung der Telomerase in einer sukzessiven Beeinträchtigung und letztendlichem Stillstand der Zellproliferation oder Induktion der Apoptose resultieren (Shay et Wright, 2001). In den letzten Jahren haben Untersuchungen zur genauen Erforschung der Telomerase stark zugenommen, wobei verschiedenste Methoden zur Inhibierung der Aktivität des Enzyms erprobt wurden. Als mögliche Telomeraseinhibitoren wurden Antisense-Oligonukleotide näher untersucht. Sie erzielten durch gezielte Hemmung der RNA-Komponente der Telomerase (hTR) eine Inhibierung der Telomerase (Glukhov et al., 1998; Herbert et al., 1999). Auch eine Inhibition der katalytischen Untereinheit der Telomerase, hTERT, durch den Reverse-Transkriptase-Inhibitor Azidothymidin wurde erforscht. Hierbei konnte jedoch trotz Telomerverkürzung keine Induktion von Seneszenz oder Apoptose nachgewiesen werden (Gomez et al., 1998). Als weiterer möglicher Ansatzpunkt zur Telomeraseinhibierung wurde eine Hemmung der Interaktion zwischen den Telomeren und dem Enzym Telomerase geprüft. Hier erzielte der Naturstoff Telomestatin, isoliert aus dem Bakterium *Streptomyces anulatus*, gute Ergebnisse (Duan et al., 2001; Riou et al., 2002). Den wohl potentesten Telomeraseinhibitor stellt das Acridinderivat BRACO19 dar. Es zeigte bei nur geringer Zytotoxizität wachstumshemmende Effekte und Induktion von Seneszenz in humanen Zellkulturen sowie insbesondere Antitumoraktivität in vivo im Maus-Xenograft-Modell (Gowan et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Telomeraseaktivität bei der Therapie maligner Tumoren eine große Bedeutung beizumessen ist, da die daraus resultierenden Behandlungsansätze effizienter und weniger toxisch für die Patienten zu sein scheinen als die konventionellen Therapien. Aus diesem Grund erscheint eine offizielle Anerkennung der Telomeraseaktivität als prognostischer Marker für das Neuroblastom äußerst erstrebenswert und von großem Nutzen für die betroffenen Patienten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM, Children's Oncology Group. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med.* 2005, 353(21):2243-53.

Beckwith JB, Perrin EV. In situ neuroblastoma: a contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol* 1963, 43:1089-1104.

Berthold F, Sahin K, Hero B, Christiansen H, Gehring M, Harms D, Horz S, Lampert F, Schwab M, Terpe J. The current contribution of molecular factors to risk estimation in neuroblastoma patients. *Eur J Cancer* 1997, 33(12): 2092-97.

Berthold F, Hero B. Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* 2000, 59(6):1261-77.

Bessho F, Hashizume K, Nakajo T, Kamoshita S. Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. *J Pediatr* 1991, 119:237-41.

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

Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, et al. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med.* 1999, 24;340(25): 1954-61.

Breen CJ, O'Meara A, McDermott M, Mullarkey M, Stallings RL. Coordinate deletion of chromosome 3p and 11q in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000, 120:44-9.

Brodeur GM, Sekhon G, Goldstein MN. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer*. 1977, 40(5):2256-63.

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984, 224:1121-4.

Brodeur GM, Seeger RC. Gene amplification in human neuroblastomas: Basic mechanisms and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1986, 19:101-111.

Brodeur GM, Hayes FA, Green AA, Casper JT, et al. Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients. *Cancer Res* 1987, 47:4248-53.

Brodeur GM. Neuroblastoma – clinical applications of molecular parameters. *Brain Pathol* 1990, 1(1):47-54.

Brodeur GM, Azar C, Brother M, Hiemstra J, et al. Neuroblastoma. Effect of genetic factors on prognosis and treatment. *Cancer* 1992, 70:1685-94.

Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlson NL, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 1993, 11:1466-77.

Brodeur GM. Molecular basis for heterogeneity in human neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1995, 31A:505-10.

Brodeur GM, Castleberry RP. Neuroblastoma. In Pizzo PA, Poplack DG (eds). *Principles and practice of pediatric oncology*. Philadelphia: Lippincott - Raven, 1997:761.

Brodeur GM, Look AT, Shimada H, Hamilton VM, Maris JM, Hann HW, Leclerc JM, Bernstein M, Brisson LC, Brossard J, Lemieux B, Tuchman M, Woods WG.

Biological aspects of neuroblastomas identified by mass screening in Quebec. *Med Pediatr Oncol* 2001, 36:157-9.

Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:203-216.

Carlsen NL, Nielsen OH, Hertz H. Neuroblastoma. Evaluation of 60 cases. *Acta Paediatr Scand.* 1981, 70(1):61-6.

Carlsen NL, Christensen IJ, Schroeder H, Bro PV, et al. Prognostic factors in neuroblastomas treated from 1943 to 1980. A statistical estimate of prognosis based on 253 cases. *Cancer* 1986, 58(12):2726-35.

Caron H, Peter M, van Sluis P, Speleman F, et al. Evidence for two tumour suppressor loci on chromosomal bands 1p35-36 involved in neuroblastoma: one probably imprinted, another associated with N-myc amplification. *Hum Mol Genet* 1995, 4:535-9.

Caron H, van Sluis P, Buschman R, Pereira do Tanque R, Maes P, Beks L, de Kraker J, Voute PA, Vergnaud G, Westerveld A, Slater R, Versteeg R. Allelic loss of the short arm of chromosome 4 in neuroblastoma suggests a novel tumour suppressor gene locus. *Hum Genet* 1996, Jun;97(6):834-7.

Castello MA, Clerico A, Operamolla P, Cozzi F. Neonatal neuroblastoma: stage of disease influences survival. *Anticancer Res.* 1983, 3(5):311-2.

Christiansen H, Lampert F. Tumor karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br J Cancer* 1988, 57:121-126.

Christiansen H, Lampert F. Tumorzytogenetik und Prognose beim Neuroblastom. *Monatsschr Kinderheilkd* 1989, 137:666-671.

Christiansen H, Schestag J, Christiansen NM, Grzeschik KH, Lampert F. Clinical impact of chromosome 1 aberrations in neuroblastoma: a metaphase

and interphase cytogenetic study. *Genes Chromosomes Cancer* 1992, 5:141-149.

Christiansen NM, Christiansen H, Berthold F, Lampert F. Transcriptional activity of N-myc and ngf-r in 50 primary human neuroblastomas as predictor for clinical outcome. *Int J Oncol* 1993, 3:853-857.

Christiansen H, Fuchs S, Christiansen NM, Delattre O, Theobald M, Berthold F, Lampert F. Loss of the putative tumor suppressor-gene locus 1p36 as investigated by a PCR-assay and N-myc amplification in 48 neuroblastomas: Results of the German Neuroblastoma Study Group. *Prog Clin Biol Res* 1994, 385:19-25.

Cohn SL, London WB, Huang D, Katzenstein HM, Salwen HR, Reinhart T, Madafiglio J, Marshall GM, Norris MD, Haber M. MYCN expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified MYCN. *J Clin Oncol* 2000, 18:3604-3613.

Coldman AJ, Fryer CJ, Elwood JM, Sonley MJ. Neuroblastoma: influence of age at diagnosis, stage, tumor site, and sex on prognosis. *Cancer* 1980, 46:1896-1901.

Cotterill SJ, Pearson AD, Pritchard J, Foot AB, et al. Clinical prognostic factors in 1277 patients with neuroblastoma: results of the European Neuroblastoma Study Group "Survey" 1982-1992. *Eur J Cancer* 2000, 36(7):901-8.

De Kok JB, Zendman AJ, van de Locht LT, et al. Real-time hTERT quantification: a promising telomerase-associated tumor marker. *Lab Invest* 1999, 79:911-2.

Duan W, Rangan A, Yankayalapati H, Kim MY, Zeng Q, Sun D, Han H, Fedoroff OY, Nishioka D, Rha SY, Izbicka E, Von Hoff DD, Hurley LH. Design and synthesis of fluoroquinophenoxazines that interact with human telomeric G-quadruplexes and their biological effects. *Mol Cancer Ther* 2001, 1(2):103-20.

Evans AE, Baum E, Chard R. Do infants with stage IV-S neuroblastoma need treatment? *Arch Dis Child* 1981, 56:271-4.

Fong CT, Dracopoli NC, White PS, et al. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:3753-7.

Fong CT, White PS, Peterson K, Sapienza C, et al. Loss of heterozygosity for chromosomes 1 or 14 defines subsets of advanced neuroblastomas. *Cancer Res* 1992, 52:1780-5.

Franke F, Rudolph B, Christiansen H, Harbott J, Lampert F. Tumour karyotype may be important in the prognosis of human neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986, 111:266-72.

Glukhov AI, Zimnik OV, Gordeev SA, Severin SE. Inhibition of telomerase activity of melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248(2):368-71.

Gomez DE, Tejera AM, Olivero OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 246(1):107-10.

Grady-Leopardii EF, Schwab M, Ablin AR, Rosenau W. Detection of N-myc oncogene expression in human neuroblastoma by in situ hybridization and blot analysis: relationship to clinical outcome. *Cancer Res* 1986, 46:3196-9.

Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 1999, 18:4948-57.

Guo C, White PS, Hogarty MD, Brodeur GM, Gerbing R, Stram DO, Maris JM. Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 2000, 35:544-6.

Hallstensson K, Thulin S, Aburatani H, Hippo Y, Martinsson T. Representational difference analysis and loss of heterozygosity studies detect 3p deletions in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1997, 33:1966-70.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990, 345:458-60.

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, 96(25):14276-81.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Ishii T. Immunohistochemical analysis of N-myc protein expression in neuroblastoma: correlation with prognosis of patients. *J Pediatr Surg* 1991, 26:838-43.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, et al. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995, 1:249-55.

Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, et al. Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *Eur J Cancer* 1997, 33:1932-6.

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Fukuba I, et al. Rapid detection of MYCN gene amplification and telomerase expression in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 1999, 5:601-9.

Ikeda Y, Lister J, Bouton JM, Buyukpamukcu M. Congenital neuroblastoma, neuroblastoma in situ, and the normal fetal development of the adrenal. *J Pediatr Surg* 1981, 16:636-44.

Jereb B, Bretsky SS, Vogel R, Helson L. Age and prognosis in neuroblastoma. Review of 112 patients younger than 2 years. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1984, 6:233-43.

Kajanti M, Holsti P. Prognostic factors in neuroblastoma. *Ann Clin Res.* 1986, 18(3):129-33.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994, 266:2011-5.

Kleihauer E. Erkrankungen des Blutes und der blutbildenden Organe, bösartiger Tumoren. In Von Harnack GA, Koletzko B (Hrsg.) *Kinderheilkunde.* Springer 1997:309.

Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, et al. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer Res* 1993, 53:2044-50.

Kushner BH, Gilbert F, Helson L. Familial Neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer* 1986, 57:1887-93.

Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglas EC, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1991, 9:581-91.

Maitra A, Yashima K, Rathi A, Timmons CF, et al. The RNA component of telomerase as a marker of biologic potential and clinical outcome in childhood neuroblastic tumors. *Cancer* 1999, 85:741-9.

Martinsson T, Sjoberg RM, Hallstenson K, Nordling M, Hedborg F, Kogner P. Delimitation of a critical tumour suppressor region at distal 1p in neuroblastoma tumours. *Eur J Cancer* 1997, 33:1997-2001.

Mauer AM. Screening for neuroblastoma. *J Pediatr* 1988, 112:576-7.

Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989, 59:521-9.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:6622-6.

Nakagawara A, Sasazuki T, Akiyama H, et al. N-myc oncogene and stage IV-S neuroblastoma. Preliminary observations on ten cases. Cancer 1990, 65:1960-67.

Nakagawara A, Arima M, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Inverse relationship between trk expression and N-myc amplification in human neuroblastomas. Cancer Res 1992, 52:1364-8.

Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, et al. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. N Engl J Med 1993, 328:847-54.

NB90: Neuroblastomstudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 1990

NB97: Neuroblastomstudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 1997

NB2004: Neuroblastomstudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2004

Nisen PD, Waber PG, Rich MA, Pierce S, et al. N-myc oncogene RNA expression in neuroblastoma. J Natl Cancer Inst 1988, 80:1633-7.

Oberthür A, Hero B. Molekulargenetische Veränderungen beim Neuroblastom - wegweisend für Prognose und Therapie? Journal Onkologie 2004, Ausgabe 08-04

Pastore G, Merletti F, Magnani C. Screening for neuroblastoma. Lancet 1984, 2:752

Poremba C, Willenbring H, Hero B, Christiansen H, et al. Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Ann Oncol* 1999, 10:715-21.

Poremba C, Hero B, Heine B, Scheel C, Schaefer KL, Christiansen H, Berthold F, et al. Telomerase is a strong indicator for assessing the proneness to progression in neuroblastomas. *Med Pediatr Oncol* 2000, 35(6):651-655.

Poremba C, Hero B, Goertz HG, Scheel C, Wai D, Schaefer KL, Christiansen H, Berthold F, et al. Traditional and emerging molecular markers in neuroblastoma prognosis: The good, the bad and the ugly. *Klin Pädiatr* 2001, 213:186-190.

Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW, Wang H, et al. Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1997, 33:1929-31.

Rhyu MS. Telomeres, telomerase, and immortality. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:884-94.

Riou JF, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, Megnin-Chanet F, Helene C, Mergny JL. Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DANN ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(5):2672-7.

Sawada T, Kidowaki T, Sakamoto I, Hashida T, et al. Neuroblastoma. Mass screening for early detection and its prognosis. *Cancer* 1984, 53:2731-5.

Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983, 305:245-8.

Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, et al. Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 1984, 308:288-91.

Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 1985, 313:1111-6.

Shay JW, Wright, WE. Telomeres and telomerase: implications for cancer and aging. *Radiat Res* 2001, 155(1 Pt 2):188-193.

Slavc I, Ellenbogen R, Jung WH, Vawter GF, et al. Myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res* 1990, 50:1459-63.

Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2003, 9:52-8.

Srivatsan ES, Murali V, Seeger RC. Loss of heterozygosity for alleles on chromosomes 11q and 14q in neuroblastoma. *Prog Clin Biol Res* 1991;366:91-8.

Srivatsan ES, Ying KL, Seeger RC. Deletion of chromosome 11 and of 14q sequences in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1993, 7:32-7.

Suzuki T, Yokota J, Mugishima H, et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res* 1989, 49:1095-8.

Suzuki T, Bogenmann E, Shimada H, Stram D, Seeger RC. Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85:377-84.

Takeda T, Hatae Y, Nakadate H, Nishi M, et al. Japanese experience of screening. *Med Pediatr Oncol* 1989, 17:368-72.

Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, et al. Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene* 1995, 11:1829-34.

Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J. Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res.* 1997, Mar 1;57(5):907-12.

Theobald M, Christiansen H, Schmidt A, Melekian B, Wolkewitz N, Christiansen NM, Brinkschmidt C, Berthold F, Lampert F. Sublocalization of putative tumor suppressor gene loci on chromosome arm 14q in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999, 26:40-6.

Thomas PR, Lee JY, Fineberg BB, Razek AA, et al. An analysis of neuroblastoma at a single institution. *Cancer* 1984, 53(10):2079-82.

Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 1998, 58:4168-72.

White PS, Maris JM, Beltinger C, Sulman E, et al. A region of consistent deletion in neuroblastoma maps within human chromosome 1p36.2-36.3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92: 5520-4.

Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 1999, 21:220-4.

8. ANHANG

8.1 Abkürzungen

Anti-DIG-POD	Anti-Digoxigenin-Peroxidase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	base pair
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	complementary DNA
DM	double minute
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
HCl	Salzsäure
HSR	homogeniously staining region
hTERT	human telomerase reverse transkriptase
hTR	human telomerase RNA
INSS	International Neuroblastoma Staging System
kbp	kilo base pair
LOH	loss of heterozygosity
MTP	Mikrotiterplatte
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGF	nerve growth factor
NGFR	nerve growth factor receptor
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PVDF	polyvinylidene fluoride
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	reverse transkription- polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TA	Telomeraseaktivität
TBE	Tris Borate EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethyl-Benzidin
TRAP	telomerase repeat amplification protocol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

8.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Baumgaertel, Berger, Bien, Brilla, Christiansen, Czubayko, Daut, Duda, Elsässer, Fehmann, Feuser, Folz, Gemsa, Geus, Goerke, Görg, Gotzen, Grimm, Hasilik, Herzum, Hesse, Heufelder, Hoffmann, Höltermann, Junge, Kälble, Kern, Kim-Berger, Klose, Koolman, Kretschmer, Kroh, Kroll, Külkens, Lammel, Lang, Lemke, Lennartz, Leonhardt, Leppek, Lippert, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Oertel, Pfab, Radsak, Ramaswamy, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schreiber, Schulz, Seyberth, Steiniger, Sturm, Feddersen, Vohland, Voigt, Wagner, Weide, Weihe, Werner, Westermann, Wichert v., Zwioerek

8.3 Danksagung

Herrn Professor Dr. Holger Christiansen für die Überlassung des interessanten Themas

Herrn Dr. Eckhard Bergmann für die freundliche Betreuung sowie die Hilfe und Unterstützung bei der Abfassung meiner Arbeit

Herrn André Scherag vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie für die kompetente und geduldige Beratung in statistischen Fragen

Allen Mitarbeitern des Neuroblastomlabors für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit

Allen, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und immer wieder motiviert haben