

2 Hauptteil – Eigene Arbeiten

2.1 Inhibitoren der Apoptose: Molekulare und zellbiologische Funktion

2.1.1: Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), bax, caspases, and anticancer drugs. *Canc Res* 58:5315-5320 (95)

2.1.2: Tamm I, Schriever F, Dörken B (2001) Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2:33-42 (5)

2.1.3: Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, Reed JC (1998) A single BIR Domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *JBC* 273:7787-7790 (50)

2.1.4: Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed JC (2003) HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 22:2729-2740 (77)

Die IAPs stellen eine während der Evolution stark konservierte Familie homologer Proteine dar, die verschiedene Apoptosestimuli blockieren kann. Die antapoptotische Funktion der IAPs wird im Wesentlichen durch direkte Bindung und Blockierung spezifischer Caspasen, Cystein-abhängigen Proteasen, bedingt. Die IAPs enthalten alle eine bis drei BIR-Domänen als gemeinsames strukturelles Merkmal.⁵ Die strukturellen Ähnlichkeiten innerhalb der Proteinfamilie der IAPs veranlassten uns zur Frage, welche Domäne von XIAP minimal notwendig ist, um Caspaseaktivität zu blockieren.⁵⁰ Die BIR-Domänen sind trotz ihrer ausgeprägten Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz nicht funktionell gleichwertig. Verschiedene Deletions-Mutanten des XIAP Proteins, die entweder die BIR-Domänen oder den Ring-Finger in verschiedenen Kombinationen enthielten, fanden Verwendung, um die Effekte der verschiedenen Mutanten auf die durch die Caspasen-3 und -7 vermittelte Prozessierung eines fluorogenen Tetrapeptides als Substrat (DEVD-AFC) *in vitro* zu untersuchen. Es zeigte sich, dass BIR2 enthaltende Fragmente die Hydrolyse des Caspasen-Substrates DEVD-AFC verhinderten.⁵⁰ Durch Immunpräzipitation wurde die Bindungsfähigkeit der mutanten Proteine an die Caspasen-3 und -7 überprüft. Alle BIR2 enthaltenden Fragmente von XIAP banden an immobilisierte Caspase-3 und -7, während die restlichen Mutanten nicht banden. Danach wurde die Wirkung der XIAP-Mutanten in Zellen untersucht. 293-Zellen wurden mit Fas-Plasmiden und den verschiedenen XIAP-Mutanten-Plasmiden transfiziert. Die transiente Fas-Transfektion resultierte in der Apoptose von 70% der Zellen. Die Kotransfektion von

Plasmiden, die XIAP, BIR1-3 oder nur BIR2 exprimierten, blockierte die Zahl der apoptotischen Zellen deutlich, während die nicht BIR2 enthaltenden Mutanten keinen anti-apoptotischen Effekt aufwiesen. Zusammengefasst sprechen die präsentierten Ergebnisse dafür, daß die BIR2-Region von XIAP notwendig und hinreichend für die Inhibition der Apoptose durch Bindung an die Caspasen-3 und -7 ist. Bei XIAP scheint nur BIR2 die aktiven Caspasen-3 und -7 binden und inhibieren zu können. Trotz der ausgedehnten Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz inhibierten die BIR1- und BIR3-Domänen von XIAP die Effektorcaspasen nicht.

Survivin ist ein anderes Mitglied der IAP-Familie, es besteht nur aus einer BIR-Domäne. Schon in der erstbeschreibenden Publikation fiel das ungewöhnliche Expressionsmuster von Survivin auf: Survivin findet sich während der gesunden fetalen Entwicklung in vielen Geweben, es ist aber im normalen adulten Gewebe praktisch nicht exprimiert.⁶² Hingegen findet sich eine Überexpression von Survivin in vielen malignen Entitäten, sowohl bei soliden Karzinomen wie Magen- oder Bronchialkarzinomen als auch bei hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen und akuten Leukämien.⁵

Wir untersuchten daher die antiapoptotischen Mechanismen von Survivin sowie sein Expressionsmuster in sechzig humanen Tumorzelllinien.⁹⁵ Um zu identifizieren, in welche Apoptose-Signaltransduktionswege Survivin eingreift, wurden entweder Bax als Stimulus des mitochondrialen Apoptosewegs oder Fas als Stimulus des Todesrezeptorwegs zusammen mit Survivin oder XIAP als Kontrollprotein in 293-Zellen transient kotransfiziert. Die Transfektion von Bax führte zu einer ca. siebenfach verstärkten Apoptoserate nach 24 Stunden im Vergleich mit Zellen, die kontrolltransfiziert worden waren. Die Kotransfektion von Survivin konnte diese Apoptoserate um ca. 70% senken. Auch der durch Fas-induzierte Zelltod konnte partiell blockiert werden, während XIAP, ein anderes IAP-Familienmitglied, diesen Todesstimulus komplett blockierte. Durch Immunoblotanalysen der kotransfizierten Zellen wurde eine vergleichbare Expression der transfizierten Gene sichergestellt. Die Zugabe von Cytochrom c und dATP zu zytosolischen Extrakten aus 293-Zellen induzierte eine starke DEVD-spaltende (also im Wesentlichen Effektorcaspasen-) Aktivität. Diese Caspaseaktivität war in Lysaten von Zellen, die vorher mit Survivin oder XIAP transfiziert worden waren, substantiell reduziert. Daraus lässt sich schliessen, dass Survivin ähnlich wie XIAP den mitochondrialen Signaltransduktionsweg in Zellen blockiert. Ähnliche Daten konnten mit anderen den mitochondrialen Signalweg aktivierenden Stimuli wie Etoposid, das als Topoisomerase II Inhibitor zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt, beobachtet werden. Auch hier war die in hypotonen Extrakten gemessene Caspase-3-ähnliche Proteaseaktivität in Zellen, die entweder mit Survivin oder XIAP transfiziert worden waren, blockiert.⁹⁵ Survivin war in allen sechzig untersuchten Zelllinien im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert, die höchsten Spiegel an Protein wurden bei Mamma- und Bronchialkarzinomzelllinien, die

niedrigsten Spiegel bei Nierenzellkarzinomzelllinien beobachtet.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Survivin bei den häufigsten Malignomen überexprimiert ist und verschiedene proapoptotische Stimuli *in vitro* blockieren kann. Es zeigten sich aber auch deutliche Unterschiede in der antiapoptotischen Potenz im Vergleich zu anderen Familienmitgliedern, insbesondere XIAP, das einen wesentlich stärkeren antiapoptotischen Effekt aufwies.⁹⁵

In einer weiteren Arbeit zu diesem Thema wurden die Mechanismen näher untersucht, über die IAPs ihre proapoptotische Wirkung amplifizieren.⁷⁷ Survivin ist das IAP, das in den meisten soliden Tumoren überexprimiert ist. Hierfür haben wir mittels „yeast-two-hybrid“-Assay nach Bindungspartnern von Survivin gesucht. Wir konnten zeigen, dass Survivin Komplexe mit einem anderen Protein eingeht, nämlich Hepatitis B X-interacting Protein (HBXIP). HBXIP wurde ursprünglich als direkter Bindungspartner für das X-Protein des Hepatitis B-Virus identifiziert.⁹⁶ Der Komplex aus Survivin und HBXIP, aber nicht die beiden Proteine alleine, binden an Caspase-9. Hierdurch wird dessen Bindung an APAF-1 inhibiert, was zu einer selektiven Blockierung des mitochondrialen Signaltransduktionsweges der Apoptose führt.⁷⁷ Das virale HBX Protein interagiert ebenfalls mit dem HBXIP-Survivin-Komplex und supprimiert hierdurch die Caspasenaktivierung in einem Survivin-abhängigen Modus. Die Arbeit zeigt, dass HBXIP als Kofaktor für Survivin funktioniert. HBXIP stellt also eine Verbindung zwischen der zellulären Apoptosemaschinerie und einem Virus dar, der in der Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms beteiligt ist.⁷⁷ Die Arbeit zeigte auch erstmals, dass sich die antiapoptotische Funktion von Survivin von der anderer IAPs, insbesondere von XIAP, deutlich in zwei Dingen unterscheidet: Die antiapoptotische Wirkung von Survivin ist deutlich mehr auf die Blockierung der Initiatorcaspase des mitochondrialen Signalwegs, nämlich Caspase-9, bezogen, der Todesrezeptorsignalweg wird – wie schon in initialen Kotransfektionsexperimenten deutlich⁹⁵ – nicht so effektiv blockiert. Zweitens ist für die Caspase-9 blockierende Funktion von Survivin ein zusätzlicher Bindungspartner, nämlich HBXIP, erforderlich, während XIAP direkt Caspase-9 bindet und blockiert.

2.2 Inhibitoren der Apoptose: prognostische Bedeutung

2.2.1: Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, Karawajew L, Ludwig W-D, Wuchter C (2004) High expression levels of X-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Canc Res* 10: 3737-3744 (69)

2.2.2: Tamm I, Richter S, Scholz F, Schmelz K, Oltersdorf D, Karawajew L, Schoch C, Haferlach T, Ludwig W-D, Wuchter C (2004) XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *Hematol J* 5: 489-495 (98)

2.2.3: Tamm I, Segall H, Kitada S, Scudiero DA, Tudor G, Myers T, Monks A, Andreeff M, Reed JC (2000) Expression of IAP-family genes in human cancers and leukemias. *Clin Canc Res* 6:1796-1803 (97)

Das besondere Expressionsprofil der IAPs, insbesondere von Survivin – fehlende Expression im gesunden adulten Gewebe und Überexpression in verschiedenen soliden Malignomen aber auch hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen und akuten Leukämien – legt bereits nahe, IAPs als Prognosemarker bei malignen Erkrankungen intensiv zu untersuchen.

Wir analysierten deshalb in einer anderen Arbeit die Frage, ob die Expression von Survivin in Tumoren in der IAP-Familie einzigartig ist, oder ob auch die anderen Familienmitglieder in Tumoren exprimiert sind.⁹⁷ Wir analysierten in 60 Tumorzelllinien die Expression von XIAP, cIAP1, cIAP2, und NAIP auf der mRNA Ebene und von XIAP und Survivin auf der Proteinebene. Es zeigte sich, daß XIAP und cIAP1 in jeder Zelllinie exprimiert waren, während cIAP2 strikter reguliert und nur in 56% der Zelllinien nachweisbar war. Survivin fand sich erwartungsgemäß in jeder der analysierten Zelllinien, während NAIP nicht nachweisbar war. Auch in primären AML-, B-CLL- und ALL-Zellen fanden sich die IAPs in unterschiedlichen Prozentsätzen exprimiert. Die Expression von XIAP in primären AML-Zellen von 78 neu diagnostizierten Patienten wurde schließlich in einer Pilotstudie daraufhin analysiert, ob die Expressionshöhe von XIAP-Protein in den AML-Zellen vor Therapie prognostische Bedeutung aufweist. In der Tat wiesen – parallel zu bereits veröffentlichten Arbeiten über IAPs als prognostische Marker⁵ – Patienten mit niedrigen Expressionshöhen von XIAP ein signifikant längeres Gesamtüberleben (Median 133 versus 52,5 Wochen, $p = 0,05$) und eine tendenziell längere Remissionsdauer (Median 87 versus 52,5 Wochen, $p = 0,13$) auf als Patienten mit hohen XIAP-Spiegeln vor Therapiebeginn.

Weiterhin wurde die prognostische Bedeutung von XIAP und Survivin bei der AML in einer

anderen Arbeit untersucht: Bei Blut- und Knochenmarkproben von 92 Erwachsenen mit de novo AML, die im Rahmen einer bundesweiten Therapiestudie einheitlich behandelt wurden, wurde mittels Immunoblot und Durchflusszytometrie die Proteinexpression von IAPs (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP und Survivin), Bcl-2-Familienmitgliedern (Bcl-2, Bax, Bcl-XL) und Procaspase-3 analysiert.⁹⁸ Die Expression von XIAP korrelierte mit dem Vorliegen eines myelomonozytären French-American-British (FAB)-Subtyps (M4 und M5, $p < 0,05$) sowie mit der Expression monozytärer Oberflächenmarker auf den Leukämiezellen (CD 14 und CD 36; $p < 0,05$; CD 4 und HLA-DR; $p < 0,01$).⁹⁸ XIAP war stark in normalen Monozyten aber nicht in Granulozyten detektierbar. Die XIAP-Expression war signifikant niedriger bei Patienten mit günstiger oder intermediärer Zytogenetik als bei Patienten mit ungünstiger Zytogenetik ($p < 0,05$). 62 der eingeschlossenen Patienten wurden auch tatsächlich im Rahmen des Studienprotokolls behandelt. Bei diesen Patienten wurde die prognostische Bedeutung der untersuchten Proteine analysiert. Die Patienten mit einer niedrigen Expression von XIAP wiesen ein signifikant besseres Gesamtüberleben auf als solche mit hoher Expression (Mittelwert 9 versus 19 Monate; $p < 0,05$). Andere IAPs, insbesondere Survivin, wiesen keine prognostische Bedeutung auf.⁹⁸

Auch in dieser Studie war XIAP als negativer prognostischer Marker nachzuweisen, während alle anderen untersuchten Proteine wie Survivin oder Bcl-2 keine prognostische Bedeutung aufwiesen. Diese Studie bestätigt also die Ergebnisse der oben beschriebenen Pilotstudie. Die Ergebnisse sind umso wichtiger, da es sich um gut charakterisiertes Material aus einer bundesweiten Therapiestudie handelt. Die negative prognostische Bedeutung XIAPs erklärt sich aus seiner antiapoptotischen und anti-Caspase-Funktion. Neu ist hier die Assoziation von XIAP-Expression und monozytärer Differenzierung und Zytomorphologie der AML-Blasten. Da XIAP auch bei normalen Monozyten stärker als bei anderen myeloischen Zellen exprimiert war, deuten diese Ergebnisse eine Rolle für XIAP sowohl bei der normalen als auch bei der malignen monozytären Differenzierung an.⁹⁸ Diese Daten sind im Einklang mit XIAPs Bedeutung für die monozytäre Differenzierung Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)-behandelter myeloischer Zellen.⁹⁹

In einer weiteren Arbeit wurden 45 hochleukämische Blut- und Knochenmarkproben von Kindern mit de novo AML, die im Rahmen einer bundesweiten Therapiestudie behandelt wurden, auf die Expression und prognostische Bedeutung der IAPs XIAP, Survivin und cIAP1 sowie der Bcl-2 Familienmitglieder Bcl-2, Bax und Bcl-XL sowie Procaspase-3 mit Hilfe von Durchflusszytometrie und Immunoblot untersucht.⁶⁹ Ähnlich wie bei den Erwachsenen-AML war die Expression von XIAP signifikant niedriger bei Patienten mit günstiger Zytogenetik als bei Patienten mit intermediärer oder schlechter Zytogenetik ($p < 0,01$). Ein ähnlicher Effekt zeigte sich hier auch für Bcl-XL ($p < 0,01$). Ebenso wie in den

oben beschriebenen Erwachsenenstudien war bei einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 34 Monaten eine hohe Expression von XIAP mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben als bei niedriger Expression assoziiert (30 versus 41 Monate; $p < 0,05$). Anders als bei der Erwachsenenstudie korrelierte die XIAP-Expression in dieser Population kindlicher AML-Patienten mit einem unreifen FAB-Typ (M0 und M1). Insgesamt zeigt sich also auch bei dieser AML-Kinderstudie die negative prognostische Bedeutung von XIAP.⁶⁹

2.3 Inhibitoren der Apoptose: therapeutische Implikationen

2.3.1: Tamm I, Trepel M, Cardo-Vila M, Sun Y, Welsh K, Cabezas E, Swatterthwait A, Arap W, Reed JC, Pasqualini R (2003) Peptides targeting caspase inhibitors. *JBC* 278:14401-14405 (100)

2.3.2: Tamm I, Schumacher A, Karawajew L, Ruppert V, Arnold W, Nüssler AK, Neuhaus P, Dörken B, Wolff G (2002) Adenovirus-mediated gene transfer of p16INK4/CDKN2 into bax-negative colon cancer cells induces apoptosis and tumor regression in vivo. *Canc Gene Ther* 9:641-650 (113)

2.3.3: Tamm I, Dörken B, Hartmann (2001) Antisense therapy in oncology: new hopes for an old idea? *Lancet* 358:489-497 (18)

Zusammengenommen sprechen die beschriebenen Vorarbeiten dafür, daß die IAPs anti-apoptotische Funktionen durch Bindung an Caspasen ausüben und in unterschiedlichen Tumoren exprimiert und z. T. überexprimiert sind. Aufgrund ihrer negativen prognostischen Bedeutung bei verschiedenen malignen Entitäten - wie von uns bei der AML untersucht (s.o.) - sind sie als molekularer Angriffspunkt von Manipulationen zum Zwecke der Blockierung ihrer Caspasen-inhibierenden Funktion besonders geeignet. Hierfür bieten sich u.a. kleine spezifisch und affin bindende Peptide mit inhibierender Wirkung an.

Wir führten deshalb zwei "phage-library-screenings" mit rekombinantem XIAP als Zielprotein durch.¹⁰⁰ Wir sahen eine Anreicherung von bindenden Phagen im Laufe der Selektions-Runden im Vergleich zu verschiedenen Kontrollproteinen. Aus diesen Phagen wurde ein Konsensus-Motiv in unabhängigen Experimenten mit zwei verschiedenen Phagen-Bibliotheken isoliert. Die so gefundenen Peptide binden spezifisch an die BIR2-Domäne von XIAP, aber nicht an andere Kontrollproteine inklusive anderen IAPs wie Survivin und cIAP2. Die Bindung zwischen Phagenpeptid und XIAP kann durch das entsprechende synthetisierte Peptid blockiert werden, was für eine spezifische Bindung des Phagen an XIAP über das genannte Peptid-Motiv spricht. Die Bindungsaffinität zwischen dem Peptid und XIAP ist hoch (geschätzte Dissoziationskonstante 1,8 nM). Die Bindung zwischen Peptid und XIAP wurde durch rekombinante Caspase-3 oder -7 blockiert, so dass das Peptid wahrscheinlich in einer Region an XIAP bindet, die auch für die Interaktion zwischen Caspase und XIAP relevant ist. Um die potentielle therapeutische Bedeutung der Peptide für eine Reaktivierung von durch Überexpression von IAPs gestörten Apoptose-Signaltransduktionswegen zu analysieren, haben wir eine internalisierbare Version des Peptides durch Kopplung an ein Penetratin-Peptid

hergestellt. Wir konnten zeigen, dass das Peptid in AML-Zellen spezifisch Apoptose auslöst, andere Kontrollpeptide blieben ohne zellbiologischen Effekt. Diese mit XIAP interagierenden Peptide könnten als Prototypen für die Entwicklung von „low molecular weight“-Modulatoren der Apoptose in Leukämiezellen dienen.¹⁰⁰

Survivin ist auch in die Zellzyklusregulation eingebunden. So ist Survivin in HeLa-Zellen während der G1-Phase des Zellzyklus praktisch nicht detektierbar, die Expression steigt aber 5-40-fach während der S-Phase und der G2/M-Phase an, eine Bindung an cyclin-dependent-kinase 4 (cdk4) wurde beschrieben.⁷⁴ Über diesen Mechanismus könnte auch ein Teil der antiapoptotischen Funktion von Survivin erklärbar sein, da die adenovirale Überexpression von cdk4 blockierenden cdk inhibitor-Proteinen wie p16INK4/CDKN2 in Tumorzellen Apoptose auslöst.¹¹³

Ein weiterer Ansatz, die Aktivität eines Resistenzgens zu reduzieren, ist die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden (AS-ODN), um die mRNA-Menge und folglich die Proteinexpression zu minimieren. AS-ODN sind einzelsträngige DNS-Moleküle von meist 13-25 Nukleotiden Länge, die spezifisch an die entsprechende Ziel-RNA binden. Sie blockieren die mRNA Funktion auf verschiedene Weise, u.a. wird die korrekte Ribosomenfunktion und somit die Proteintranslation beeinträchtigt. Am wichtigsten ist aber die Rekrutierung endogener RNase H durch die AS-ODN, so dass die an das AS-ODN bindende mRNA gespalten und inaktiviert wird.¹⁸ Antisense-Konstrukte gegen andere antiapoptotische Proteine sind bereits in klinischer Prüfung, so sind zur Zeit mehrere Phase-III-Studien mit AS-ODN gegen Bcl-2 bei verschiedenen malignen Entitäten aktiv.¹⁸ Ebenso sind AS-ODN gegen verschiedene IAPs, aufgrund der Funktion und des Expressionsmusters insbesondere gegen XIAP und Survivin, entwickelt worden. Die Effektivität von AS-ODN gegen Survivin ist sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt worden. In vitro induzieren AS-ODN gegen Survivin zum Beispiel in Bronchialkarzinom- und Mesotheliomzelllinien Apoptose, während normale Zellen wie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, die Survivin nicht exprimieren, nicht betroffen sind.^{101,102} In vivo wurden Tumorzellen vor Implantation in Mäuse mit Plasmiden, die für Survivin-AS kodierten, transfiziert: Das Tumorwachstum war bei den mit dem AS-Plasmid transfizierten Xenograftmodellen sowohl bei Verwendung von Magenkarzinomzellen als auch bei malignen Lymphomen signifikant langsamer als bei Zellen, die mit einem Kontrollkonstrukt transfiziert worden waren.^{103,104} Darüberhinaus wurde der Einfluss eines Adenovirus, der zum Einbringen eines dominant-negativen Survivinkonstrukts in etablierte Xenografte eines Mammakarzinoms verwendet wurde, untersucht: Es liess sich ein Rückgang der Tumorgrosse um ca. 50% ohne messbare Toxizität für die Maus nachweisen.¹⁰⁵ Klinisch einsetzbare AS-ODN gegen Survivin sind gerade in präklinischer Prüfung und werden bald in Phase-I Studien an Patienten untersucht werden.

Ebenso wie für Survivin existieren für XIAP verschiedene Untersuchungen zu AS-ODN: in

in vitro können die Konstrukte direkt Apoptose auslösen, darüber hinaus sensitivieren sie die behandelten Zellen für verschiedene Apoptosestimuli und Bestrahlung.^{106,107} Bei einem Bronchialkarzinom-Xenograft Modell reduzierte XIAP-AS in Kombination mit Vinorelbin die Entwicklung von Tumoren.¹⁰⁸ Auch gegen XIAP sind AS-ODN in präklinischer Prüfung.