

3. Zusammenfassende Diskussion

Die Apoptoseresistenz ist eine entscheidende Eigenschaft maligner Zellen, die u. a. auf eine erhöhte Expression antiapoptotischer Gene zurückzuführen ist [Thompson 1995; Igney and Kramer 2002]. Die Inhibitoren der Apoptose (engl. inhibitors of apoptosis; IAP) gehören zu den wichtigsten Apoptoseregulatoren, und für einige Vertreter dieser Proteinfamilie wird eine Schlüsselrolle bei der Initiierung und Progression von malignen Tumoren beschrieben [Reed 1999]. Survivin nimmt innerhalb der Gruppe der IAPs eine Sonderstellung ein. Es ist in Krebszellen selektiv überexprimiert und andererseits in normal differenzierten Geweben nicht nachweisbar [Ambrosini et al. 1997]. Die Vorstellung, dass es sich um ein krebsspezifisch exprimiertes Protein handelt, triggerte eine Vielzahl von Untersuchungen zur Eignung von Survivin als diagnostischer bzw. prognostischer Marker von Krebserkrankungen. Erste Versuche zur selektiven Ausschaltung oder Hemmung dieses Proteins und potenziellen therapeutischen Effekten folgten unter der Annahme, dass es ein Zielgen für neuartige Formen der Krebstherapie darstellt [Zaffaroni et al. 2002; Altieri 2003b].

Die hier zusammengefassten Arbeiten beschreiben Survivin als Tumormarker des Harnblasenkarzinoms und charakterisieren das Expressionsmuster dieses IAPs in malignen Keimzelltumoren des Hodens. Außerdem werden Korrelationen der Survivinexpression mit der Spermatogenesefunktion aufgezeigt und erstmals eine Expression in normalem Hodengewebe nachgewiesen.

3. 1. Survivin - ein Tumormarker des Harnblasenkarzinoms?

Entsprechend unseren quantitativen Analysen ist Survivin in Harnblasentumoren ubiquitär exprimiert, wohingegen eine Expression auf mRNA-Ebene in normaler Mukosa nicht nachweisbar war. Auch in anderen Studien ließ sich eine Expression von Survivin immunhistochemisch [Swana et al. 1999; Lehner et al. 2002; Ku et al. 2004] oder mittels RT-PCR [Gazzaniga et al. 2003; Schultz et al. 2003] in der Mehrzahl der untersuchten Tumorproben nachweisen. Widersprüchliche Befunde wurden allerdings zur Korrelation der Survivinexpression mit dem Malignitätsgrad (Tumorgrading) vorgestellt [Swana et al. 1999; Gazzaniga et al. 2003; Schultz et al. 2003]. So konnten nicht alle Arbeitsgruppen eine ubiquitäre Survivinexpression in allen Harnblasentumoren nachweisen und charakterisierten insbesondere Tumoren mit niedrigem Malignitätsgrad (G1 Tumoren) als Survivin-negativ [Gazzaniga et al. 2003]. Allerdings könnten diese Ergebnisse methodenabhängig sein. Gerade bei Einsatz hochsensitiver semiquantitativer oder quantitativer Nachweismethoden gelang eine Detektierung von Survivin auch in G1-Tumoren, wobei das Expressionsniveau im Vergleich zu Tumoren höherer Malignität deutlich erniedrigt war. Unsere Ergebnisse (Publikation 5) können leider wenig zu Klärung dieser Frage beitragen, da in unserer Stichprobe G1-Tumoren „unterrepräsentiert“ sind. Jedoch konnten wir eine ansteigende Expression mit zunehmendem Malignitätsgrad und pathologischem Tumorstadium nachweisen. Ähnliche Ergebnisse hatten Schultz et al. publiziert [Schultz et al. 2003]. Dennoch sind die bisher vorgestellten Daten zur Survivinexpression in Abhängigkeit von pathologischen Tumormerkmalen, wie Stadium und Malignitätsgrad, uneinheitlich. Allerdings dürften durch den Einsatz hochsensitiver quantitativer Verfahren, wie der RT-PCR, potenzielle Expressionsunterschiede zuverlässiger nachweisbar sein. Entsprechend unserer Daten kann interessanterweise eine höhere Survivinexpression in invasiven Tumorformen im Vergleich zum nicht-invasiven Phänotyp nachgewiesen werden. Somit kann ein Einfluß von Survivin auf das maligne Potential transformierter Urothelzellen angenommen werden, was die potenzielle Bedeutung dieses IAPs für die Progression des Harnblasenkarzinoms

unterstreicht. Übereinstimmend mit dieser Hypothese wird Survivin vorrangig eine Rolle bei der Tumorprogression zugewiesen, während ein Einfluss auf die onkogenetische Transformation der Zelle eher bezweifelt wird [Altieri 2003a]. Kürzlich konnten überzeugende Hinweise für die Effekte einer Survivinüberexpression auf die beschleunigte Tumorprogression des Urothels vorgelegt werden [Salz et al. 2005]. Die Autoren konnten zeigen, dass eine Überexpression von Survivin im Urothel mit Störungen der extrazellulären Matrix und einer veränderten Expression inflammatorischer Gene einhergeht. Diese Phänomene waren von einem beschleunigten Auftreten hochaggressiver Harnblasenkarzinome nach Einwirkung karzinogener Substanzen gefolgt.

Entsprechend unserer Ergebnisse ist eine hohe Gewebeexpression mit pathohistologischen Kriterien assoziiert, die ein hohes Malignitätspotential und eine schlechtere Prognose anzeigen. Es erscheint also nahe liegend, dass die Expressionshöhe dieses IAP von prognostischer Relevanz für Patienten mit Harnblasenkarzinomen ist. Bei einer Reihe anderer Malignome ist Survivin bereits als prognostischer Marker vorgeschlagen worden (zur Übersicht s. [Altieri 2003a]). Gerade bei Harnblasentumoren ist die Identifikation von Prognosefaktoren von hoher klinischer Relevanz, da biologisches Potential und Rezidivrisiko durch die pathohistologischen Kriterien bisher unzureichend abgebildet werden. Insbesondere die Gruppe papillärer Harnblasenkarzinome umfasst Tumoren mit einem sehr variablen biologischen Potenzial, wobei der Entwicklung bestimmter pathologischer Phänotypen auch spezifische molekulare Veränderungen zugewiesen werden können [Helppap et al. 2003; van Rhijn et al. 2004]. Für die Gruppe der papillären nicht-invasiven Tumoren konnten wir vorläufige Daten zur potenziellen prognostischen Bedeutung des Survivin-Expressionsniveaus vorstellen (Publikation 5). Die Höhe der Survivinexpression korrelierte dabei mit dem rezidivfreien Intervall. Allerdings war der Schwellenwert für eine hohe vs. niedrige Expression nur retrospektiv festzulegen. Die Eignung von Survivin für die Vorhersage des Rezidivrisikos von Patienten mit papillären Harnblasentumoren muss deshalb prospektiv an einer größeren Nachbeobachtungspopulation bestätigt werden. Derartige Untersuchungen führen wir derzeit durch. Sollte sich die prognostische Relevanz der Gewebeexpression bestätigen, eröffnen sich Möglichkeiten,

postoperative Instillationsmaßnahmen, wie z.B. BCG-Instillationen, noch gezielter einzusetzen. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen hatte bereits eine frühere Studie eine prognostische Relevanz der Survivinexpression in niedrig-malignen (G1) Tumoren, die im Allgemeinen nicht-invasiv sind, nachweisen können [Swana et al. 1999]. Dennoch wird die Eignung von Survivin als prognostischer Faktor bei Harnblasenkarzinomen kontrovers diskutiert [Gazzaniga et al. 2003; Schultz et al. 2003; Ku et al. 2004]. Die unsererseits publizierten Daten deuten sogar eine Korrelation der Survivinexpression mit dem Metastasierungsrisiko nach radikaler Zystektomie an. Auch diesbezüglich ist die Zahl der untersuchten Patienten zu niedrig, um abschließende Schlussfolgerungen zuzulassen.

Eine Beeinflussung des Malignitätspotentials von Karzinomen der Harnblaseen erscheint aus molekularbiologischer Sicht nachvollziehbar. Für Survivin sind vielfältige Interaktionen mit der p53-abhängigen Signaltransduktionskaskade beschrieben. So wird die Survivinexpression durch Wildtyp-p53 inhibiert [Hoffman et al. 2002]. Survivin ist damit eines der wenigen Gene, deren Transkription durch p53 reprimiert wird. Der Verlust der Survivinexpression geht gleichzeitig mit einer Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose einher [Mirza et al. 2002]. Darüber hinaus gelang Wang et al. kürzlich der Nachweis regulatorischer Interaktionen dieses IAP mit der Genfamilie der p53-Tumorsuppressoren auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene [Wang et al. 2004c]. Diese Autoren konnten zeigen, dass Survivin sowohl die p53-Transkription reguliert als auch den Abbau dieses Tumorsuppressors über die Caspase-3/Mdm3 Achse modifiziert. Es wird allgemein angenommen, dass gerade Veränderungen des p53-Signalweges von entscheidender Bedeutung für das biologische Verhalten von Harnblasenkarzinomen sind und die Prognose dieser Tumoren beeinflussen [Lu et al. 2002; Chatterjee et al. 2004]. Aufgrund der vielfältigen Interaktionen zwischen Survivin- und p53-abhängigen Signalketten erscheint eine Bedeutung von Survivin für die Progression von Urothelkarzinomen der Harnblase nachvollziehbar. Dies unterstreicht gleichzeitig eine potenzielle Eignung als prognostischer Marker.

Eine Korrelation der Gewebeexpression von Survivin mit dem Expressionsniveau in abgeschilferten Zellen in Urinproben des entsprechenden

Patienten konnte unsererseits nicht nachgewiesen. Ebenfalls ließen sich keine Zusammenhänge zwischen der Urinexpression und pathohistologischen Merkmalen oder dem Verlauf der Tumorerkrankung nachweisen. In Übereinstimmung mit anderen Gruppen [Wang et al. 2004a] konnten wir den Survivin-mRNA-Nachweis als hochspezifischen Biomarker des Harnblasenkarzinoms charakterisieren. Ähnliche Ergebnisse waren für die Anwendung proteinbasierter Detektionsassays berichtet worden [Smith et al. 2001; Hausladen et al. 2003; Shariat et al. 2004]. Unsere Studien zielten auf eine Quantifizierung der Expression in Urinzellen aus Mittelstrahlurin ab. Allerdings brachte die Quantifizierung offensichtlich keinen Vorteil gegenüber rein qualitativen Nachweisverfahren [Wang et al. 2004a], da die Expressionshöhe in vielen Proben nahe dem Nachweislimit der RT-PCR lag. Aufgrund der ausgezeichneten Spezifität des Survivin-mRNA-Nachweises im Urin für das Harnblasenkarzinom eröffnen sich Möglichkeiten für eine weitere Optimierung des Assays durch Senkung der Nachweisgrenze.

Der Einsatz vieler urinbasierter Tumormarker ist durch den hohen Anteil positiver Befunde bei Patienten mit benignen Erkrankungen limitiert [Simon et al. 2003]. Die vorläufigen Daten belegen für den Survivinnachweis gerade bei diesen Patienten eine maximale Spezifität. Die anhand unserer Untersuchungen berechnete Sensitivität ist niedriger als initial berichtet [Smith et al. 2001], aber in guter Übereinstimmung mit einer kürzlich publizierten umfassenden Studie [Shariat et al. 2004]. Dabei sollten sowohl mRNA-basierte Nachweisverfahren als auch die Proteindetektion vergleichbare Ergebnisse erbringen, da Survivin ein kurzlebigen und nicht-sezerniertes Protein ist [Zhao et al. 2000; Altieri 2003a] und somit der Nachweis an die Präsenz von abgeschilferten Tumorzellen im Urin gebunden ist. Eine gute Korrelation zwischen Survivin mRNA und Protein kann anhand der bisher von anderen Arbeitsgruppen vorgestellten Ergebnisse angenommen werden [Li and Altieri 1999; Kappler et al. 2001; Bao et al. 2002; Kappler et al. 2003]. Die hier vorgestellten Daten weisen im Vergleich zur Gewebeexpression auf eine ca. zehnfach erhöhte relative Survivinexpression in Urinzellen hin. Dies könnte durch Artefakte, z.B. einem überproportional starken Abbau des „house-keeping“-Gens im Urin, hervorgerufen sein. Allerdings ist es auch denkbar,

dass abgeschilferte Tumorzellen eher einer aggressiven Zellpopulation entstammen, während die entnommenen Tumorproben heterogener zusammengesetzt sind. Die Survivinexpression in Urinzellen von Tumorpatienten ist bisher noch nicht immunzytochemisch untersucht, könnte aber, falls praktikabel, die zytologische Diagnostik unterstützen.

Die konventionelle Urinzytologie erreichte im Vergleich zu Survivin eine deutlich niedrigere Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität (Publikation 5). Allerdings basieren unsere Daten auf einer sehr begrenzten Stichprobe. Im Rahmen einer größeren Studie zum Nachweis von Telomerase-Untereinheiten im Urin von Patienten mit Harnblasentumoren hat unsere Arbeitsgruppe auch die diagnostischen Möglichkeiten der Urinzytologie umfassender untersucht [Weikert et al. 2005b]. Dabei wurde eine relativ niedrige Sensitivität der zytologischen Diagnostik bestätigt. Die Urinzytologie wird immer noch als das Standardverfahren der nicht-invasiven Harnblasentumordiagnostik aufgefasst. Retrospektive Analysen dieser Methode hatten auch eine annehmbare diagnostische Genauigkeit erbracht [Koss et al. 1985; Wiener et al. 1993; Bastacky et al. 1999; Malik and Murphy 1999]. Allerdings basieren diese Daten auf Studien, in denen oft multiple Urinproben von jedem einzelnen Patienten und ein großer Anteil von Blasenspülungen untersucht worden waren. Dabei ist anzunehmen, dass bei der bekanntermaßen ausgezeichneten Spezifität der Zytologie die Sensitivität durch Einsatz von multiplen Proben und Erhöhung der Zellzahl (Blasenspülung) verbessert werden kann. Generell wird von einer suffizienten Sensitivität der Zytologie für Tumoren hohen Malignitätsgrades (G3) und für das Carcinoma in situ ausgegangen. Jedoch war die in unserer Studie beobachtete Sensitivität der Zytologie auch für diese Tumortypen unzureichend. Natürlich könnte hier auch eine fehlerhafte Interpretation durch den Zytopathologen unserer Abteilung vorliegen. Andererseits wiederum dürften unsere Ergebnisse die allgemeine Praxis besser widerspiegeln als die Publikationen hoch spezialisierter uropathologischer Arbeitsgruppen. Kürzlich konnte dementsprechend auch eine umfassende Metaanalyse eine durchschnittliche Sensitivität der Zytologie von nur 34% nachweisen [Lotan and Roehrborn 2003]. Für G3-Karzinome lag diese auch nur bei 64%. Zu

ähnlichen Ergebnissen kommen auch die wenigen, bisher vorliegenden prospektiven Studien [Schmetter et al. 1997; Thomas et al. 1999].

Die bisher publizierten Untersuchungen charakterisieren Survivin als spezifischen Tumormarker des Harnblasenkarzinoms. Bei Anwendung sensitiver Detektionsmethoden scheint Survivin in den meisten, vielleicht sogar allen Harnblasenkarzinomen nachweisbar zu sein, wobei die angenommene Korrelation der Expressionshöhe mit klinisch-pathologischen Charakteristika der Harnblasentumoren in größeren Serien bestätigt werden muss. Die Evidenz für eine prognostische Bedeutung im Hinblick auf das Rezidivrisiko papillärer nicht-invasiver Neoplasien des Urothels ist vorerst sehr begrenzt. Allerdings sind die bisher vorgestellten Daten aufgrund der vielfach übereinstimmenden Befunde viel versprechend. Neuere Untersuchungen unterstreichen die biologische Plausibilität einer prognostischen Bedeutung der Survivinexpression [Salz et al. 2005].

3.2 Expressionsprofil von Survivin bei Spermatogenesestörungen und in Keimzelltumoren

Das apoptotische Absterben von Keimzellen ist ein wesentlicher Mechanismus für die Aufrechterhaltung einer zellulären Homöostase des Keimepithels, wobei eine stringente Apoptoseregulation entscheidende Voraussetzung für eine normale Keimzellproliferation und die gezielte Entfernung überflüssiger oder fehlentwickelter Keimzellen ist [Print and Loveland 2000; Huynh et al. 2002]. Das Keimepithel des Hodens gehört zu den Geweben mit der höchsten Proliferationsrate, wobei gleichzeitig die Keimzellapoptose ein weit verbreitetes Phänomen darstellt und nur wenige Keimzellen auch zu reifen Spermien heranreifen [Huckins 1978; Print and Loveland 2000; Matzuk and Lamb 2002]. Über die Regulation der Keimzellapoptose unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen ist aber bisher nur wenig bekannt. Eine fehlerhafte Expression von Genen der Apoptosekaskade verbunden mit einer erhöhten Apoptoseaktivität wird als grundlegende Störung bei vielen bisher als idiopathisch bezeichneten männlichen Fertilitätsstörungen vermutet [Lin et al. 1997; Tesarik et al. 1998; Takagi et al. 2001; Huynh et al. 2002; Matzuk and Lamb 2002]. Darüber hinaus begünstigt die Überexpression antiapoptotischer Gene allgemein die Entstehung und Progression von Malignomen [Thompson 1995] und stellt einen wichtigen Mechanismus bei der malignen Transformation von Keimzellen dar [Chaganti and Houldsworth 2000]. Obwohl der zuverlässigen Steuerung der Apoptose gerade bei der Spermatogenese eine zentrale Rolle zukommt, ist die Relevanz der IAPs als wichtige Apoptoseregulatoren in diesem Kontext bisher kaum erforscht. Dies gilt auch für Survivin, dessen duale Funktion als Regulator des Zellzyklus und Apoptoseinhibitor zwar in Krebszellen intensiv untersucht, aber in normalen Zellen mit Stammzeleigenschaften oder hoher proliferativer Aktivität nur in vereinzelten Studien adressiert worden ist [O'Connor et al. 2000b; Fukuda and Pelus 2001; Fukuda et al. 2002; Shiozaki et al. 2003; Wang et al. 2004b]. Im Rahmen der hier vorgestellten Forschungsarbeit hatten wir die Expression von Survivin auf mRNA-Ebene zunächst in normalem Hodengewebe nachweisen können, wobei eine fehlende Expression mit schweren

Spermatogenesestörungen assoziiert war (Publikation 1). Darüber hinaus gelang der Survivinnachweis in malignen Keimzelltumoren, wobei Tumoren mit hohem Differenzierungsgrad (Teratome) Survivin-negativ waren (Publikation 2). Umfassendere Arbeiten zur Quantifizierung der Expression konnten dann ein vergleichsweise hohes Expressionsniveau in Hodengewebe mit normaler Spermatogenese und eine inverse Assoziation der Expressionshöhe mit dem Schweregrad von Spermatogenesestörungen nachweisen (Publikationen 3 u. 4). In malignen Keimzelltumoren wurde eine etwas niedrigere Expression nachgewiesen als in normalem Hodengewebe (Publikation 4). Bei prämeiotischem Maturationsarrest und Sertoli-cell-only-Syndrom wurde zumeist eine fehlende Survivinexpression festgestellt (Publikationen 1, 3 u. 4).

Das hohe testikuläre Expressionsniveau von Survivin, dessen Expression in normal differenzierten adulten Geweben üblicherweise reprimiert ist [Ambrosini et al. 1997], und die bisher bekannten Eigenschaften dieses IAP [Altieri 2001] unterstreichen eine mögliche Bedeutung bei der Regulation der Spermatogenese. Dies wird durch die Daten zur Survivinexpression in Hodengewebe von Nagern bestätigt [Kobayashi et al. 1999; Wang et al. 2004b]. Interessanterweise konnte bei in vitro Experimenten mit Tubuli seminiferi der Ratte eine Stimulation der Survivinexpression durch den so genannten Stammzellfaktor (engl. stem-cell factor, SCF) nachgewiesen werden [Wang et al. 2004b]. SCF reguliert bekanntermaßen die Proliferation und Apoptose von Keimzellen im Hoden [Pesce et al. 1993; Yan et al. 2000]. Dies sind weitere Indizien dafür, dass Survivin Einfluss auf die Apoptoseregulation von Keimzellen nehmen könnte.

Eine gestörte Apoptoseregulation wird als ein wesentlicher Faktor bei der Entwicklung von Spermatogenesestörungen gesehen. Gerade eine abnorm niedrige oder fehlende Expression antiapoptotischer Gene dürfte zur Pathogenese solcher Störungen beitragen, stellt doch ein erhöhtes Absterben von Keimzellen durch Apoptose ein wesentliches Charakteristikum der krankhaften Spermatogenese beim Menschen dar [Lin et al. 1997; Tesarik et al. 1998; Takagi et al. 2001]. Die Relevanz von IAPs bzw. deren Fehlexpression im Rahmen dieser Prozesse ist bisher ungeklärt. Erste Daten zu

Expressionsveränderungen von Survivin im Zusammenhang mit humanen Spermatogenesestörungen wurden durch unsere Forschungsarbeiten vorgestellt. Demnach korreliert die Expressionshöhe von Survivin auf mRNA-Ebene mit der Spermatogenesefunktion. Ein hohes Expressionsniveau ist mit einer normalen Keimzellproduktion assoziiert, während ein Maturationsarrest mit einer Absenkung der Survivinexpression einhergeht. Obwohl alle bisher untersuchten Biopsien von Patienten mit SCOS und die überwiegende Mehrzahl der Proben mit prämeiotischem Maturationsarrest keine detektierbare Survivinexpression aufwies, bleibt die molekularpathologische Bedeutung dieser Befunde unklar. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um aufzuklären, ob die abgesenkte oder fehlende Expression als kausaler Faktor bei der Entwicklung von Spermatogenesestörungen wirksam ist, oder nur ein assoziiertes Phänomen darstellt. Theoretisch ist es denkbar, dass allein der Keimzellverlust bei diesen Störungen das abgesenkte Expressionsniveau erklärt. Da wir allerdings die Quantifizierung relativ zur „house-keeping“-Genexpression vorgenommen haben, erscheint diese Hypothese unwahrscheinlich.

Ein indirektes Indiz für eine relevante Funktion von Survivin bei der Spermatogenese stellen die Daten zur Bedeutung von Survivin für die Aufrechterhaltung einer normalen Hämatopoese dar. Beide Prozesse sind hinsichtlich wichtiger Eigenschaften vergleichbar. Survivin reguliert das Überleben hämatopoetischer Stammzellpopulationen und ist an der Zellzyklusregulation wichtiger Vorläuferzellstadien beteiligt [Fukuda and Pelus 2001; Fukuda et al. 2002]. Ob Survivin ähnliche Funktionen bei der Spermatogenese zugewiesen werden können, bleibt abzuwarten. Für eine andere Gruppe Apoptose-regulierender Gene, die Bcl-2-Gruppe, ist bereits eine Rolle bei der Pathogenese von Spermatogenesestörungen nachgewiesen worden, zumindest in Mausmodellen (zur Übersicht s. [Print and Loveland 2000; Huynh et al. 2002]). Mutationen dieser Gene verursachen eine Imbalance pro- und antiapoptotischer Signale, die in eine unvollständige oder fehlende Spermatogenese mündet [Knudson et al. 1995; Furuchi et al. 1996; Print et al. 1998; Yan et al. 2003]. Da im menschlichen Organismus bisher nur zwei wesentliche Gruppen von Apoptoseregulatoren bekannt sind [Altieri

2003b], Bcl-2 und IAP, kann von einer Beteiligung der IAPs an der Spermatogenesesteuerung ausgegangen werden. Dies eröffnet ein bisher weitgehend unbeachtetes Feld für die weitere Forschung.

In testikulärem Gewebe mit Keimzellaplasie war keine Survivinexpression nachweisbar. Dies ist zwar ein Hinweis für eine keimzellspezifische Survivinexpression, jedoch lässt sich vorerst nicht mit letzter Sicherheit sagen, ob nicht auch andere somatische Zelltypen im Hodengewebe, wie z. B. Sertoli-Zellen, eine Expression dieses IAP aufweisen. Es ist durchaus denkbar, dass die angewandte RT-PCR nicht sensitiv genug ist, um geringe Expressionsmengen zu detektieren. In der Tat wurde eine Survivinexpression auf allerdings sehr niedrigem Niveau in Leydig-Zellen des Rattenhodens nachgewiesen [Wang et al. 2004b]. Unsere Untersuchungen lassen jedenfalls Rückschlüsse auf das zelltypspezifische Expressionsmuster nur bedingt zu. Wir haben im Wesentlichen keine Expression in Proben mit Maturationsstop im Stadium der Spermatogonien oder primären Spermatozyten feststellen können. Unter Beachtung der vorgenannten Einschränkungen lässt sich daraus ableiten, dass die Survivinexpression an die Präsenz sich meiotisch teilender oder postmeiotisch differenzierter Keimzelltypen gebunden ist. Diese Befunde stimmen mit den Expressionsdaten im Ratten- und Maushoden überein, die auf eine vorrangige Expression des Proteins während der meiotischen Teilung von Spermatozyten hinweisen [Kobayashi et al. 1999; Wang et al. 2004b]. Die Autoren dieser Studien vermuten neben der Funktion von Survivin bei der Regulation des mitotischen Zellzyklus auch eine entscheidende Rolle bei der Meiose. Die von uns in humanem Gewebe beschriebenen Expressionsmuster unterstützen diese Annahme. Unsere Daten müssen allerdings noch auf der Ebene der Proteinexpression bestätigt werden. Außerdem muss eine Aufklärung der zelltypspezifischen Expression im menschlichen Hoden, beispielsweise durch Immunzytochemie, folgen. Erste Vorversuche sind in Kooperation mit dem Dresdner Urologischen Forschungslabor bereits erfolgt. Aufgrund der testikulären Gewebestruktur gestalten sich diese sehr aufwendig.

Unsere vorläufigen Daten zur Survivinexpression in Keimzelltumoren des Hodens zeigen ein relativ hohes Expressionsniveau in Seminomen und bestimmten hochaggressiven nicht-seminomatösen Tumortypen, z. B.

Embryonalkarzinomen. Eine zunehmende somatische Differenzierung in Teratomen scheint mit einer Absenkung der Expressionhöhe einherzugehen. In reifen Teratomen, die Eigenschaften adulter ausdifferenzierter Gewebe besitzen, war kein Survivin nachweisbar. Dieses Expressionsprofil weist Parallelen mit dem globalen Muster einer Überexpression in malignen Geweben und einer Abschaltung des Genes in adulten differenzierten Referenzgeweben auf. Seminome behalten wesentliche Merkmale der Keimzellen bei, während Nicht-Seminome sich durch primitive zygotische bis hin zu embryonal-somatischen Differenzierungsmustern auszeichnen.

Es erscheint durchaus nachvollziehbar, dass gerade Seminome ein hohes Expressionsniveau aufweisen, während bestimmte somatische Differenzierungswege mit einem Verlust dieser Expression einhergehen. Bisher konnten wir lediglich Unterschiede zwischen Teratomen und allen anderen untersuchten Hodentumortypen nachweisen. Die Daten sind insgesamt zu limitiert, um verlässliche Schlussfolgerungen abzuleiten. In Anbetracht der vergleichsweise hohen, vermutlich keimzellspezifischen Survivinexpression in normalem Hodengewebe wäre es interessant, in einer größeren Serie nach Unterschieden in der Expression zwischen Seminomen und Nicht-Seminomen zu suchen, sind doch letztere im Gegensatz zu Seminomen durch einen Verlust des Keimzellphänotyps charakterisiert [Rajpert-De Meyts and Skakkebaek 1994; Chaganti and Houldsworth 2000].

Normales Hodengewebe zeigte tendenziell sogar ein höheres Expressionsniveau als Keimzelltumoren. Somit besteht im adulten Hoden offensichtlich ein von anderen Geweben abweichendes Expressionsprofil, das nicht der sonst typischen malignomspezifischen Expression entspricht. Parallelen finden sich mit dem hämatopoetischen System, wo Survivin in normalen hämatopoetischen Zellen [Fukuda and Pelus 2001] und Leukämiezellen [Carter et al. 2001] nachweisbar ist, jedoch nicht von niedrig-malignen Lymphomen exprimiert wird [Ambrosini et al. 1997]. Ähnlich wie Teratome weisen diese Lymphomtypen nur einen sehr geringen Anteil proliferierender Zellen auf. Die Expression von Survivin in sowohl normalem Hodengewebe als auch Keimzelltumoren lässt eine Beteiligung dieses IAP an der Pathogenese von Hodentumoren fraglich erscheinen. Allerdings bleibt

unentschieden, ob die Expression in Keimzellen streng reguliert und an bestimmte Phasen der meiotischen Teilung gebunden auftritt, während maligne Keimzelltumoren, wie viele andere Malignome [Altieri 2003a], eine deregulierte und zellzyklusunabhängige Expression zeigen.

Entsprechend der Hypothese von Chaganti und Houldsworth könnten Keimzelltumoren im Stadium der zygoten-pachytenen Spermatozyte (In diesem Stadium wird der Zellzyklus verzögert, um eine ausreichende Rekombination sicherzustellen.) durch fehlerhaften Chromatid austausch und Überwinden des Rekombinations-Checkpoints entstehen [Chaganti and Houldsworth 2000]. Die Resistenz gegen eine dann normalerweise ausgelöste Apoptose ist hier entscheidende Voraussetzung für die Tumorentstehung. Survivin stellt sicher aufgrund seiner Eigenschaften einen interessanten Kandidaten für diese Funktion dar. Nach anderer weit verbreiteter Theorie entwickeln sich Vorläufer der Keimzelltumoren bereits aus primordialen Keimzellen, d.h. während der Embryonalentwicklung [Grigor 1993; Skotheim and Lothe 2003; Oosterhuis and Looijenga 2005]. Auch in dieser Phase kann eine Survivinexpression nachgewiesen werden [Adida et al. 1998; Kawamura et al. 2003]. Unabhängig von Theorien der Keimzellentartung ist bisher nicht geklärt, ob die Expression von Survivin funktionell relevant ist oder nur ein Epiphänomen darstellt.

3.3. Parallelen zur Expression von Cancer/Testis Antigenen

Eine Expression von Survivin ist während der Embryonalentwicklung essenziell für das Stammzellüberleben [Adida et al. 1998; Kawamura et al. 2003]. In normal differenzierten adulten Geweben ist das Gen abgeschaltet und wird erst bei maligner Entartung reaktiviert. Allerdings ist eine Expression in der Plazenta [Shiozaki et al. 2003], in hämatopoetischen Stammzellen [Fukuda and Pelus 2001] und in adultem Hodengewebe nachweisbar. Dieses Expressionsprofil zeigt viele Gemeinsamkeiten mit der sehr heterogenen Gruppe der Cancer/Testis (CT)-Antigene [Chen et al. 1997]. Diese Gene weisen u. a. eine vorrangige Expression in testikulären Keimzellen und Malignomen auf, sind in normal differenzierten Geweben üblicherweise nicht exprimiert, gehören zu Multigen-Familien und besitzen antigene Eigenschaften bei Tumorpatienten [Tureci et al. 1998; Old 2001; Kalejs and Erenpreisa 2005]. Viele dieser CT-Antigene sind wie Survivin in der Plazenta exprimiert; für einige konnte ebenfalls eine Funktion während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden [Old 2001; Kalejs and Erenpreisa 2005]. Außerdem ist die Expressionsfrequenz in Seminomen deutlich höher als in Nicht-Seminomen – eine weitere Parallele zu Survivin. Die Charakterisierung eines Gens als CT-Antigen basiert nicht mehr ausschließlich auf der Identifizierung eines entsprechenden T-Zell-Epitopes, weswegen die Bezeichnung Cancer/Testis-assoziierte Genfamilie vorgeschlagen wurde [Kalejs and Erenpreisa 2005]. Ein T-Zell-Epitop konnte auch für Survivin beschrieben werden [Schmidt et al. 2003].

Kürzlich konnte die gezielte und keinesfalls nur zufällig auftretende Aktivierung bestimmter keimzellspezifischer Gene in Malignomen näher charakterisiert werden [Koslowski et al. 2004]. Außerdem wurde eine CT-Genexpression in anderen Stammzellpopulationen nachgewiesen [Cronwright et al. 2005]. Diese Daten implizieren eine Verbindung zwischen den zellulären Prozessen der Selbsterneuerung und der Tumorentstehung [Cronwright et al. 2005]. Übereinstimmende Eigenschaften zwischen Stammzellen und Krebszellen haben zu der Annahme geführt, dass „Krebsstammzellen“ existieren, aus denen sich letztlich maligne entartete Gewebe entwickeln [Reya et al. 2001;

Brickman and Burdon 2002; Cronwright et al. 2005]. So könnten CT-Gen-exprimierende Tumorzellen letztlich aus einer klonalen Proliferation von Krebsstammzellen hervorgegangen sein [Cronwright et al. 2005]. Das Expressionsmuster der CT-Gene lässt vermuten, dass Krebszellen eine Reaktivierung des genetischen Programms der Gametogenese nutzen [Simpson et al. 2005]. Eine Reaktivierung der Survivinexpression in Krebsstammzellen mit nachfolgend weitgehender Deregulierung der Expression ist demnach denkbar. Es bleibt abzuwarten, ob zukünftige Arbeiten weitere Hinweise für die noch spekulativen Annahmen erbringen werden.

3.4 Limitierungen und Ausblick

Zur richtigen Einordnung unserer Arbeiten müssen die Limitierungen unserer Ergebnisse beachtet werden. Wie bereits mehrfach erwähnt steht für viele Daten zur Expression die Bestätigung auf Proteinebene aus. Auch lassen die begrenzten Fallzahlen, besonders im Hinblick auf die Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung in Harnblasenkarzinomen und zum Expressionsmuster in Keimzelltumoren, keine abschließenden Schlussfolgerungen zu. Da es sich bei unseren Untersuchungen im Wesentlichen um deskriptive Studien handelt, kann eine funktionelle Relevanz der Befunde nicht suffizient beurteilt werden. Es könnte sich theoretisch auch um bloße Epiphänomene handeln.

Für das humane Survivingen sind 4 dominante (Exon 1 – 4) und 2 alternative, versteckte Exons (Exon 2B und 3B) beschrieben [Li 2005]. Durch alternatives „Splicing“ der Survivin prä-mRNA können verschiedene Survivin-Varianten, so genannte Splice-Varianten, entstehen [Mahotka et al. 1999; Li 2005]. Bisher sind neben der dominanten Survivin mRNA vier solcher Splice-Varianten bekannt: Survivin- Δ Ex3 (Verlust des Exon 3), Survivin-2B (Insertion des alternativen Exon 2B) [Mahotka et al. 1999], Survivin-3B (Insertion von Exon 3B) [Badran et al. 2004] und Survivin-2alpha (Exon 1 und 2 plus einem Abschnitt von Intron 2) [Caldas et al. 2005a]. Die differenzielle Expression dieser Survivinvarianten im Vergleich zum dominanten Survivin ist bei unseren Untersuchungen bisher nicht ausreichend berücksichtigt. Allerdings ist die funktionelle Relevanz der verschiedenen Splice-Varianten bisher nicht ausreichend geklärt [Li 2005; Zaffaroni et al. 2005]. Die vorläufigen Daten lassen vermuten, dass Survivin- Δ Ex3 und Survivin-2B sich in ihrer antiapoptotischen Aktivität unterscheiden [Mahotka et al. 1999; Mahotka et al. 2002a] und gegensätzliche Rollen bei der Apoptoseregulation und Tumorprogression spielen könnten [Meng et al. 2004; Zhu et al. 2004; Caldas et al. 2005b; Li 2005]. Dabei scheint eine unmittelbare Interaktion zwischen Survivin und Survivin- Δ Ex3 essenziell für die Hemmung des mitochondrialen Apoptoseweges zu sein [Caldas et al. 2005b]. Demgegenüber wird für

Survivin-2alpha eine Hemmung der anti-apoptotischen Aktivität von Survivin vermutet [Caldas et al. 2005a].

In den von uns untersuchten Tumoren und Geweben sind das Expressionsprofil der Splice-Varianten und deren mögliche Rolle bisher nicht untersucht. Das von uns angewandte RT-PCR-Assay detektiert Survivin und Survivin-2B. Gerade im Hinblick auf die vermutete funktionelle Bedeutung der Survivinexpression in humanem Hodengewebe sollte zur besseren Einordnung unserer Ergebnisse die differenzielle Expression der Splice-Varianten bestimmt werden. Eine entsprechende Studie wird derzeit in unserem Urologischen Forschungslabor vorbereitet. Im Hinblick auf die vermuteten funktionellen Unterschiede der verschiedenen Splice-Varianten erscheint auch eine Fortführung unserer Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung der Gewebeexpression von Survivin und seiner Splice-Varianten bei Patienten mit Harnblasenkarzinomen sinnvoll.

Die anti-apoptotische Funktion von Survivin ist nach neueren Untersuchungen von einem Kofaktor, dem so genannten HBXIP, abhängig [Marusawa et al. 2003]. Außerdem kann die Hemmung der Apoptose durch IAPs, einschließlich Survivin, über bestimmte Faktoren, wie das Smac/Diablo [Du et al. 2000; Verhagen et al. 2000], antagonisiert werden. Von einer genaueren Untersuchung Survivin-abhängiger oder mit Survivin „verlinkter“ Signalkaskaden ist ein besseres Verständnis der Apotoseregulation in urogenitalen Malignomen und bei der Spermatogenese zu erwarten. Kürzlich wurde eine Interaktion zwischen Survivin und Telomerase in Zelllinien des Kolonkarzinoms beschrieben [Endoh et al. 2005]. Die Autoren vermuten, dass Survivin zusätzlich zu seiner antiapoptotischen Funktion über eine Hoch-Regulation der katalytischen Untereinheit der Telomerase, hTERT, eine Verlängerung des zellulären Überlebens vermittelt. Gerade bei Urothelkarzinomen, wo die Telomerase als wichtiger Tumormarker gilt, könnte eine solche funktionelle Verbindung von Bedeutung für das maligne Potential sein. Dazu liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Auch im Hodengewebe könnte eine funktionelle Interaktion von Survivin und Telomerase von Bedeutung sein. Erste Untersuchungen zur Koexpression von Survivin und Telomerase in Hodenbiopsien von Patienten mit Azoospermie

sind unsererseits bereits abgeschlossen. Eine Koexpression korreliert dabei mit normaler Spermatogenesefunktion, während bei schweren Spermatogenesestörungen zwar eine Telomeraseexpression auf niedrigem Niveau nachweisbar ist, jedoch eine Survivinexpression in der Regel fehlt [Weikert et al. 2005a].

Die Expression anderer IAPs ist in urogenitalen Tumoren bisher nur beim Prostatakarzinom umfassend charakterisiert [Krajewska et al. 2003]. Auch diesbezüglich ergeben sich Möglichkeiten für weitere interessante Studien zur IAP-Expression in anderen urogenitalen Tumoren. Darüber hinaus ist von Untersuchungen zur IAP-Expression in Hodenbiopsien mit unterschiedlicher Spermatogenesefunktion ein umfassenderes Verständnis der Apoptoseregulation von Keimzellen zu erwarten. Mit Ausnahme von Survivin und eines murinen Homologs des XIAP [Lagace et al. 2001] ist bisher zur Expression und Rolle der übrigen IAPs bei der Spermatogenese nichts bekannt. Survivin stellt sicher ein interessantes Target für neuartige Krebstherapien dar. Diese Annahme unterstützen auch die von uns vorgestellten Daten zur Survivinexpression in Harnblasentumoren. Erste viel versprechende Experimente zur therapeutischen Ausschaltung von Survivin sind bereits vorgestellt worden [Tyagi et al. 2003; Fuessel et al. 2004]. Dabei wurde allerdings bisher davon ausgegangen, dass eine tumorspezifische Expression von Survivin für therapeutische Ansätze ausgenutzt werden kann [Altieri 2003b; Zaffaroni et al. 2005]. Die Expression und vermutlich auch wichtige Funktion von Survivin während der Hämatopoese und der Spermatogenese lassen Wirkungen einer systemischen Ausschaltung von Survivin auf diese Prozesse vermuten. Erste klinische Versuche zur Wirkung von Survivin-Antisense-Nukleotiden sind bereits geplant [Zaffaroni et al. 2005]. Dabei wird abzuwarten sein, ob auch Effekte auf die Blutbildung und die Fertilität auftreten.