

1. Einleitung

1.1. Apoptoseregulation: Bedeutung der „Inhibitors-of-apoptosis“ (IAP)

Apoptose bezeichnet den physiologischen Mechanismus des programmierten Zelltodes, der der Eliminierung überflüssiger, alternder oder krankhaft veränderter Zellen dient und somit entscheidend zur Aufrechterhaltung der normalen Gewebemöostase beiträgt [Thompson 1995; Reed 1999]. Der Prozess der Apoptose schließt eine Reihe von Signalkaskaden ein, die durch mehrere Genfamilien determiniert sind und schließlich mit der Aktivierung von zellulären Proteasen, den so genannten Caspasen, den Zelluntergang auslösen. Dabei können hauptsächlich zwei Signalwege besprochen werden. Der extrinsische Weg wird über bestimmte Rezeptoren, so genannte „death receptors“, an der Zelloberfläche aktiviert, während der intrinsische Weg durch eine intrazellulär in Gang gesetzte Störung der Mitochondrienfunktion charakterisiert ist. Die Signalkaskaden des Apoptoseprozesses sind normalerweise einer stringenten Kontrolle unterworfen. Eine Fehlregulation der Apoptose wird als wesentlicher pathogenetischer Mechanismus bei einer Reihe von Erkrankungen, wie Malignomen, Autoimmunerkrankungen, Reperfusionsschäden und neurodegenerativen Veränderungen, aufgefasst [Thompson 1995]. Die zentrale Bedeutung für die Karzinogenese wird damit begründet, dass Störungen des programmierten Zelltodes zu einer abnormen Verlängerung des Zellüberlebens führen, die genetische Instabilität und Akkumulation von Mutationen fördern, die Immunsurveillance behindern und eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika oder radiogener Zellschädigung vermitteln [Reed 1999; Lowe and Lin 2000; Igney and Kramer 2002]. Der fehlgesteuerten Expression von Apoptoseregulatoren wird dabei eine Schlüsselrolle zugewiesen [Adida et al. 1998; Jaattela 1999; Reed 1999].

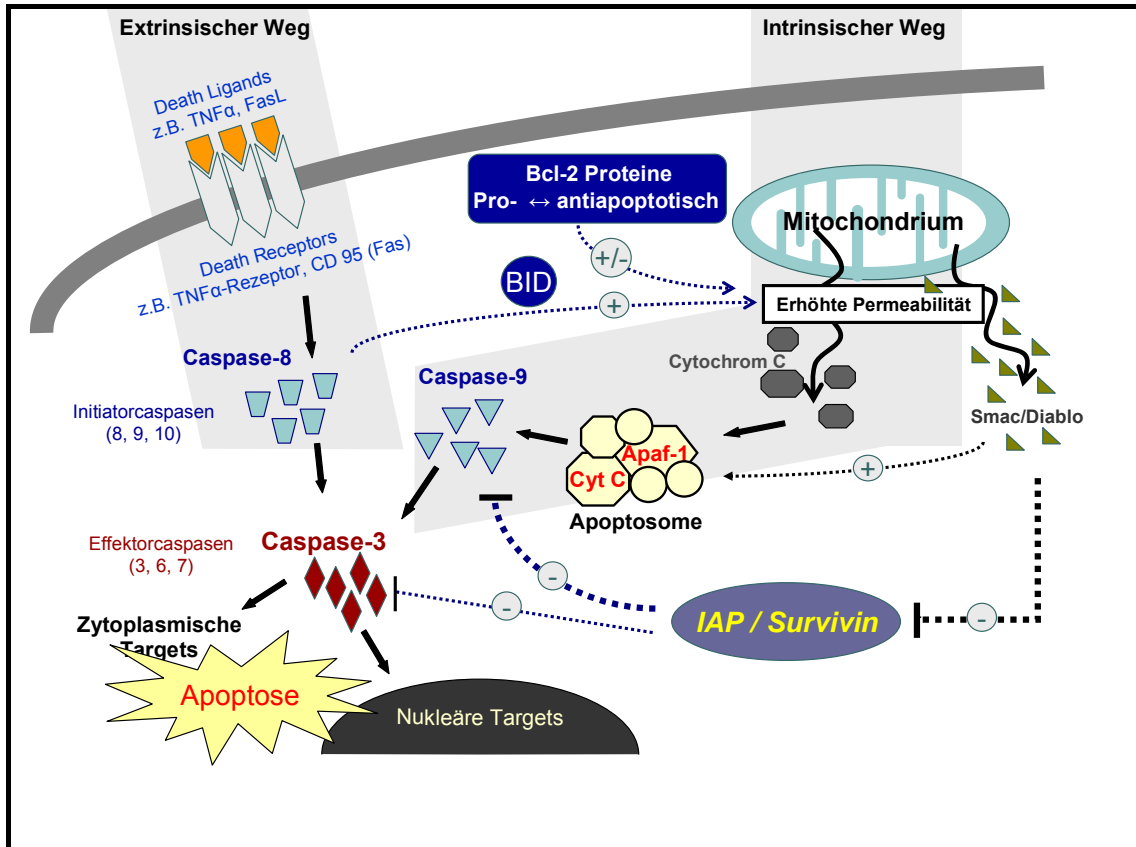


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Apoptosekaskaden und wichtiger Regulatoren (modifiziert nach [Altieri 2003b; Chiou et al. 2003; Schimmer 2004]). Der extrinsische Weg wird über eine Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Gruppe (death receptors) initiiert, die über eine Initiatorcaspase (Caspase-8) die weitere Apoptosekaskade auslösen. Ausgangspunkt für den intrinsischen Weg ist eine erhöhte Permeabilität der mitochondrialen Membran – ausgelöst beispielsweise durch Chemotherapeutika oder UV-Strahlung. Das freigesetzte Cytochrom C bildet mit dem Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1 (Apaf-1) u. a. Faktoren einen Caspase-aktivierenden Komplex, das so genannte Apoptosom, welches die Initiatorcaspase-9 in die aktive Form überführt. Beide Apoptosewege münden schließlich in der Aktivierung von Effektorcaspasen (Caspase-3), die durch Zerstörung wichtiger Zellbestandteile und Enzyme den Zelltod auslösen.

Die Apoptoseregulatoren der Bcl-2-Gruppe können hemmend (Bcl-2 und Bcl-X_L) oder fördernd (BAX, BID und Bcl-X_S) auf die Freisetzung von Cytochrom-C einwirken, so dass die Permeabilität vermutlich über eine Balance dieser pro- bzw. anti-apoptotischen Faktoren reguliert wird. Die Inhibitoren der Apoptose (IAP) wirken durch eine Hemmung der Caspase-9 bzw. Caspase-3 antiapoptotisch. Ein aus den Mitochondrien freigesetzter Faktor, Smac/Diablo (second mitochondrial derived activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI) unterstützt die Aktivierung von Caspase-9 und hemmt die IAP-Funktion. Für Survivin sind bisher die fett markierten Regulationseinflüsse nachgewiesen worden; im Gegensatz zu anderen IAPs sprechen die bisherigen Daten gegen einen direkten Effekt auf die Caspase-3.

Beim Menschen sind bisher zwei wesentliche Genfamilien von Apoptoseregulatoren identifiziert worden: die Gruppe der BCL-2-Proteine (zur Übersicht s. [Cory and Adams 2002]) und die „inhibitors-of-apoptosis“ (IAP)-Proteinfamilie [Deveraux and Reed 1999]. Es sind bisher 8 IAPs bekannt: XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, MLIAP, NAIP, BRUCE und Survivin [Deveraux and Reed 1999; Schimmer 2004]. Alle diese Proteine sind durch eine so genannte „baculovirus IAP repeat (BIR)-Domaine“ charakterisiert und die meisten inhibieren sowohl die extrinsische als auch die intrinsische Apoptose-Signalkaskade. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der Apoptoseinhibition durch IAPs nicht vollständig aufgeklärt. Die Apoptosekaskaden und wesentliche Regulatoren sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Die vorliegende Forschungsarbeit beschäftigt sich mit dem IAP Survivin (Synonyme: BIRC5; API4). Survivin gehört zu den Klasse 3 IAPs, die anders als IAPs der Klassen 1 und 2 nur eine der für die anti-apoptische Funktion essenziellen BIR-Domänen aufweisen [Deveraux and Reed 1999; Schimmer 2004]. Das Gen ist auf dem Chromosom 17q25 lokalisiert. Das Protein wurde erstmals 1997 von Ambrosini et al. [Ambrosini et al. 1997] in verschiedenen malignen Zelllinien, niedrig-differenzierten Lymphomen und einer Reihe von fetalen Geweben identifiziert. Im Gegensatz zu den meisten anderen IAPs wurde jedoch mit Ausnahme von Thymus und Plazenta keine Expression in normal differenzierten adulten Geweben gefunden [Ambrosini et al. 1997]. Neben der differenziellen Überexpression in Malignomen gehört die duale Funktion als Apoptose-Inhibitor einerseits und Zellzyklusregulator andererseits zu den Eigenschaften, die Survivin innerhalb der Gruppe der IAPs eine Sonderrolle einnehmen lassen [Altieri 2003a]. Zellzykluskontrolle und Apoptoseregulation sind eng miteinander verknüpfte Prozesse, die wesentlich an der Aufrechterhaltung einer normalen zellulären Homöostase in proliferierenden Geweben und an der Embryogenese beteiligt sind. So wird Survivin eine wichtige Rolle beim Überleben embryonaler Stammzellen als auch bei der Proliferation transformierter Zellen zugewiesen [Adida et al. 1998; Kobayashi et al. 1999; Uren et al. 2000; Altieri 2003a]. In normalen

proliferierenden Geweben ist Survivin zellzyklusabhängig in der G2/M Phase exprimiert und wird mit der Spindelformation, der Separation der Chromatiden und der Zytokinese in Verbindung gebracht [Li et al. 1998; Li and Altieri 1999; O'Connor et al. 2000a; Adams et al. 2001; Altieri 2001; Chen et al. 2003]. Die Mechanismen der anti-apoptotischen Funktion von Survivin, die besonders in Krebszellen von Interesse sind, konnten bisher nicht ausreichend aufgeklärt werden. Entsprechend neuerer Untersuchungen soll Survivin den Mitochondrien-abhängigen, so genannten intrinsischen Apoptoseweg, antagonisieren [Grossman et al. 2001; Conway et al. 2002]. Dabei scheint die hemmende Wirkung von Survivin auf die Apoptosekaskade über eine Inaktivierung der Zelltodprotease Caspase-9 vermittelt (Abb. 1) und von einem Kofaktor (HBXIP) abhängig zu sein [Marusawa et al. 2003].

Im Hinblick auf die differenzielle Expression von Survivin in Malignomen, jedoch nicht in Normalgeweben, und der Bedeutung für die Apoptoseregulation in transformierten Zellen wurde dieses IAP frühzeitig als potenzieller Biomarker für die Diagnostik und Prognose von Krebserkrankungen sowie als viel versprechendes Target für neue Therapieansätze vorgeschlagen [Altieri 2003b; Schimmer 2004]. In der Tat konnte in retrospektiven Analysen gezeigt werden, dass eine Survivin-Überexpression in bestimmten Malignomen, wie z.B. Weichteilsarkomen [Wurl et al. 2002], Bronchial- [Monzo et al. 1999], Mamma- [Tanaka et al. 2000], kolorektalen [Kawasaki et al. 1998] und Ösophaguskarzinomen [Kato et al. 2001], mit einem verkürzten Gesamtüberleben der betroffenen Patienten assoziiert ist. Außerdem könnte eine Überexpression des Proteins für die erhöhte Therapieresistenz bestimmter Tumoren verantwortlich sein [Kato et al. 2001; Tran et al. 2002; Zaffaroni et al. 2002].

1.2. Survivin: Ein IAP mit besonderer Bedeutung für die urologische Forschung

Auch bei urologischen Malignomen wurde Survivin als potenzieller prognostischer und/oder diagnostischer Marker untersucht. Von besonderer klinischer Relevanz ist die Identifikation prognostischer Faktoren und diagnostischer Marker beim Harnblasenkarzinom. Eine besondere Eigenschaft dieser Tumorentität ist die hohe Rezidivquote von ca. 50% nach initialer transurethraler Resektion oberflächlicher Primärtumoren [Heney et al. 1983; Fitzpatrick et al. 1986]. Patienten mit rezidivierenden Blasentumoren, insbesondere wenn multifokale oder hochmaligne Tumorformen auftreten, haben ein klinisch relevantes Risiko für eine Stadienprogression mit entsprechend erhöhter krankheitsspezifischer Mortalität [Heney et al. 1983; Heney 1992; Herr 1997]. Entsprechend werden Patienten mit Harnblasenkarzinomen einer intensiven Nachbeobachtung unterzogen, die häufige und invasive Untersuchungen einschließt. Momentan werden histopathologische Kriterien für die Einschätzung des Rezidivpotentials und die Festlegung adjuvanter Therapiemaßnahmen herangezogen. Jedoch wurde gerade in den letzten Jahren intensiv nach molekularen Markern gesucht, die eine bessere Identifikation von Hochrisikopatienten erlauben und zur Vereinfachung des Nachbeobachtungsregimes bzw. zur Individualisierung adjuvanter Therapieschemata beitragen [Simon et al. 2003].

Swana et al. berichteten in einer präliminären Studie [Swana et al. 1999], dass die Bestimmung der Survivinexpression in Blasentumorgewebe helfen könnte, Patienten mit einem erhöhten Risiko für Tumorrezidive zu identifizieren. Die gleiche Arbeitsgruppe veröffentlichte später auch vorläufige Daten zum Survivinnachweis in Urinproben von Patienten mit Harnblasenkarzinomen und dem potenziellen Einsatz zur Diagnostik dieses Tumors [Smith et al. 2001]. Diese Untersuchungen initiierten eine Reihe von weiteren Studien zum diagnostischen und prognostischen Nutzen von Survivin beim Harnblasenkarzinom [Gazzaniga et al. 2003; Schultz et al. 2003; Ku et al. 2004; Shariat et al. 2004; Wang et al. 2004a]. Im Rahmen der nachfolgend vorgestellten Forschungsarbeit wurden Untersuchungen zur Relevanz von

Survivin als Tumormarker des Harnblasenkarzinoms durchgeführt (Publikation 5).

Intensive Untersuchungen zur Survivinexpression bei Nierenzellkarzinomen wurden von Mahotka et al. durchgeführt. In ihren Arbeiten zeigten diese Autoren, dass Survivin in Zelllinien [Mahotka et al. 1999] und Tumorproben des Nierenzellkarzinoms [Mahotka et al. 2002b] überexprimiert ist. Dabei ergaben sich Hinweise für eine unterschiedliche Bedeutung der bis dahin identifizierten Splice-Varianten von Survivin für die Progression und das klinische Verhalten von Nierenzellkarzinomen [Mahotka et al. 2002b]. Eine umfassende Studie zum Expressionsmuster von IAPs einschließlich Survivin in benignem Prostatagewebe und Prostatakarzinomen zeigte eine erhöhte IAP-Expression bereits bei präinvasiven Tumorformen (Prostatische intraepitheliale Neoplasie; PIN) und leitete daraus eine wichtige Rolle für IAPs bei der Pathogenese dieses Malignoms ab [Krajewska et al. 2003]. Allerdings konnte keine Assoziation der IAP-Expression mit der Prognose der Tumorerkrankung nachgewiesen werden. Ähnlich umfassende Expressionsanalysen der IAP-Gruppe in anderen urologischen Tumorerkrankungen fehlen weitgehend. Insbesondere für humanes Hodengewebe und Keimzelltumoren des Hodens sind bisher keine Daten zur Expression und möglichen Bedeutung von IAPs, wie z.B. Survivin, publiziert worden.

Gerade Hodengewebe nimmt hinsichtlich des Expressionsprofils vieler Gene eine Sonderstellung ein. Schon aufgrund der Stammzelleigenschaften früher Keimzellstadien erscheint es plausibel, dass im Hoden Gene exprimiert werden, die in normal differenzierten adulten Geweben abgeschaltet sind. Eine Reihe der zugehörigen Proteine sind auch während der embryonalen Entwicklung und in malignen Zellen nachweisbar. Eine bedeutende Gruppe derartig restriktiv exprimierter Gene ist die Familie der so genannten Cancer-Testis (CT)-Antigene, ein Begriff der von Chen et al. eingeführt wurde [Chen et al. 1997]. Diese Gene sind durch eine vorrangige Expression in testikulären Keimzellen und malignen Tumoren charakterisiert. Obwohl ein funktioneller Zusammenhang zwischen verschiedenen Mitgliedern dieser Genfamilie bisher nicht nachgewiesen werden konnte, wird doch eine Rolle bei der Regulation der Spermatogenese für viele dieser Gene vermutet [Kalejs and Erenpreisa

2005]. Für einzelne CT-Gene konnte dementsprechend auch eine Funktion bei der mitotischen bzw. meiotischen Teilung von Keimzellen beschrieben werden [Kalejs and Erenpreisa 2005]. Auch einigen klassischen Oncogenen, so z.B. c-myc und c-kit, wird eine Bedeutung bei der Gametogenese zugewiesen [Wolfes et al. 1989; Rossi et al. 2000; Kalejs and Erenpreisa 2005]. Allgemein sind Gene, die Zellteilung, Proliferation und Apoptose regulieren, bei der normalen Spermatogenese aktiviert, da hier eine feine Balance dieser Prozesse von entscheidender Bedeutung ist. Aufgrund seiner Eigenschaften als Apoptoseinhibitor und Zellzyklusregulator erscheint Survivin als interessanter Kandidat für ein regulatives Gen bei der Spermatogenese. In der Tat ist Survivin auch im adulten Organismus kein krebsspezifisches Protein. Seine Expression wurde in der Plazenta [Shiozaki et al. 2003] sowie in hämatopoetischen Stammzellen [Fukuda and Pelus 2001] nachgewiesen. Gerade zur Hämatopoese lassen sich für die Spermatogenese viele Parallelen ziehen. Beide Prozesse sind an Gewebe mit extensiver zelluärer Proliferation gebunden und erfordern eine den Zellpool fortwährend erneuernde Stammzellpopulation. Bereits geringe Störungen der Zellhomöostase führen zu Defekten bis hin zum Zusammenbruch dieser Prozesse. Interessanterweise konnte von Fukuda et al. gezeigt werden, dass Survivin an der Zellzyklusregulation während der Hämatopoese beteiligt ist und das Überleben hämatopoetischer Stammzellen sicherstellt [Fukuda and Pelus 2001; Fukuda et al. 2002]. Diese Daten unterstützen Überlegungen zu einer möglichen Bedeutung von Survivin bei der Spermatogenese. Weitere Argumente für diese Annahme ergeben sich aus der Untersuchung von Kobayashi et al., die Hinweise für eine spezifische Expression des Maus-Homologs des humanen Survivin, TIAP, in Spermatozyten erbrachte [Kobayashi et al. 1999].

Aufbauend auf den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe zur nicht-invasiven markerbasierten Frühdiagnostik des Blasenkarzinoms [Muller et al. 1998; Goessl et al. 2002] sowie der Biologie und Pathophysiologie von Spermatogenesestörungen [Schrader et al. 2000; Schrader et al. 2002] sollte im nachfolgend zusammengefassten Forschungsprojekt das Expressionsprofil und die mögliche Bedeutung von Survivin beim Harnblasenkarzinom, bei normaler als auch gestörter Spermatogenese sowie bei malignen Keimzelltumoren

untersucht werden. Grundlage für die Durchführung der vorgestellten Forschungsarbeit war einerseits die Frage nach einer möglichen Bedeutung von Survivin für die Diagnostik und Prognose des Harnblasenkarzinoms. Andererseits sollte im Hinblick auf die nachgewiesenen wichtigen Funktionen dieses IAP erstmals eine potenzielle Expression in humanem Hodengewebe sowie in Keimzelltumoren untersucht werden. Die Expressionsanalyse wurde dabei auf mRNA-Ebene unter Verwendung von konventionellen und Echtzeit- (real-time) Reverse-Transcriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)-Assays durchgeführt. Diese Technologie fand auch zur Detektierung von Survivin in Urinproben Anwendung und ergänzte damit die bereits frühzeitig publizierten, aber limitierten Daten zum Proteinnachweis [Smith et al. 2001].

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben Eingang in mehrere Publikationen gefunden, die dem Anhang beigefügt sind. Im Folgenden werden die methodischen Grundlagen kurz umrissen und die wesentlichen Daten zusammengefasst. Abschließend erfolgt eine Diskussion und kritische Bewertung der Ergebnisse.