

2. Zusammenfassung der Ergebnisse

2. 1. Methodische Grundlagen

Die Expressionsanalyse für Survivin auf mRNA-Ebene erfolgte initial über ein qualitatives RT-PCR-Assay. Durch dieses Vorgehen konnte zunächst geklärt werden, ob eine Survivinexpression in den ausgewählten Gewebe- und Urinproben überhaupt nachweisbar ist. Die Methodik ist in Publikation 1 für die Expressionsanalyse in Hodenbiopsien beschrieben. Ein Testlauf wurde auch für Blasentumorproben und Urinproben durchgeführt, wobei Survivin auf mRNA-Ebene in der Mehrzahl der Proben nachweisbar war. Es erfolgte dann ohne nähere Auswertung die Etablierung eines quantitativen Echtzeit-RT-PCR Verfahrens auf der Basis der LightCycler®-Technologie.

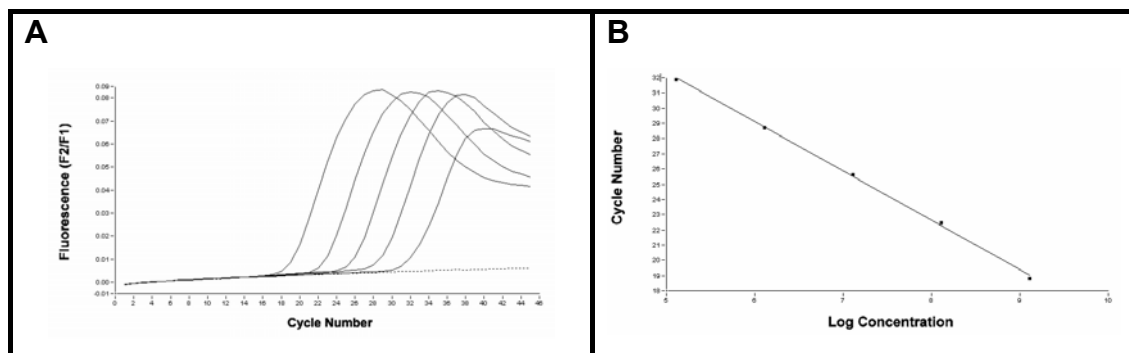


Abbildung 2: Analyse des Survivin-Standards auf dem LightCycler. Messung einer Verdünnungsreihe der Survivin-cRNA (A); die dargestellten Kurven korrespondieren zu 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , und 10^9 Survivin-cRNA-Kopien sowie einer Wasserkontrolle (negativ). Die Zahl der Amplifikationszyklen zeigt eine lineare Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der Konzentration des Standards (B). Der Regressionskoeffizient wurde dabei mit -1 bestimmt und weist auf die Zuverlässigkeit des RT-PCR-Assays hin. Die Zahl der PCR-Zyklen wird mit Hilfe der so genannten „second derivative maximum“ Methode berechnet (LightCycler Manual on Relative Quantification; Roche Applied Science).

Im ersten Schritt wurde zunächst ein Survivin-Standard generiert. Die Details dazu können Publikation 2 entnommen werden. In der Anfangsphase erfolgten die Messungen auf Basis eines cRNA-Standards. Dies wurde später aufgrund der begrenzten Stabilität auf einen cDNA-Standard umgestellt. Mithilfe dieses Standards konnte die Zuverlässigkeit, Messgenauigkeit und Sensitivität der Methode überprüft werden. Unter Verwendung einer Spezial-Software wurden verschiedene Primer ausgewählt und anhand des Standards überprüft. Dabei wurde folgendes Primerpaar als zuverlässig festgestellt: sense 5'-AAA GAG CCA AGA ACA AAA TTG C-3' und antisense 5'-GAG AGA GAA GCA GCC ACT GTT AC-3'. Die Hybridisierungs sonden wurden wie folgt gewählt: FL probe: TGC TCT TGT TTT GTC TTG AAA GTG GC--FL und LC Red640-probe: CCA GAG GTG CTT CTG CCT GTG C--PH. Die Berechnung der Standardkurve zeigte dann die Zuverlässigkeit und Genauigkeit des Assays (Abb. 2). Die maximale Sensitivität wurde mit 1000 Kopien Survivin mRNA bestimmt.

Die durch RT-PCR bestimmte Kopienzahl der Survivin mRNA wird zur Expressionshöhe eines so genannten „house-keeping“-Gens ins Verhältnis gesetzt (so genannte relative Quantifizierung, s. Publikationen 2 - 5) und so hinsichtlich der eingesetzten RNA-Menge, -Qualität und der RT-Effizienz normalisiert [Karge et al. 1998]. Dies erlaubt eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Proben hinsichtlich der Expressionshöhe von Survivin. Als „house-keeping“-Gen wählten wir die Porphobilinogen-Deaminase (PBGD), deren Expression mit Hilfe des kommerziell erhältlichen LightCycler h-PBGD Housekeeping Gene Sets (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) quantifiziert wurde. Weitere technische und analytische Details zur LightCycler-Technologie und ihrem Einsatz bei der quantitativen Expressionsanalyse, insbesondere die Charakterisierung mittels so genannter coefficient-of-variance (cv)-Werte, sind unter www.roche-applied-science.com zu finden. Die cv-Werte der Methode erlauben insgesamt eine vergleichsweise zuverlässige Quantifizierung. Allerdings kommt es bei Analysen im Bereich der Nachweisgrenze zu cv-Werten bis zu 20%. Bei der hier vorgestellten Arbeit ist dies für einige Analysen von Urinproben (Publikation 5) relevant.

Die Quantifizierung von Survivin erfolgte wie in den Publikationen 2 – 5 beschrieben. Es wurde dazu das Fluoreszenz-Protokoll der LightCycler-Technologie unter Zuhilfenahme entsprechend spezifischer Fluoreszenzsonden (s. o.) verwendet. Vor Analyse der Proben wurde eine Überprüfung der Sequenzidentität des Amplikons mit Eintrag AF077350 (Genbank Accession-Number) durchgeführt. Die Daten eines typischen Analyselaufes auf dem LightCycler sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die Charakterisierung der untersuchten Patientenpopulationen, die nähere Beschreibung der Proben und ihrer Verarbeitung (einschließlich der RNA-Präparation) sowie Informationen über die verwendeten Materialien sind in den angefügten Publikationen zu finden.

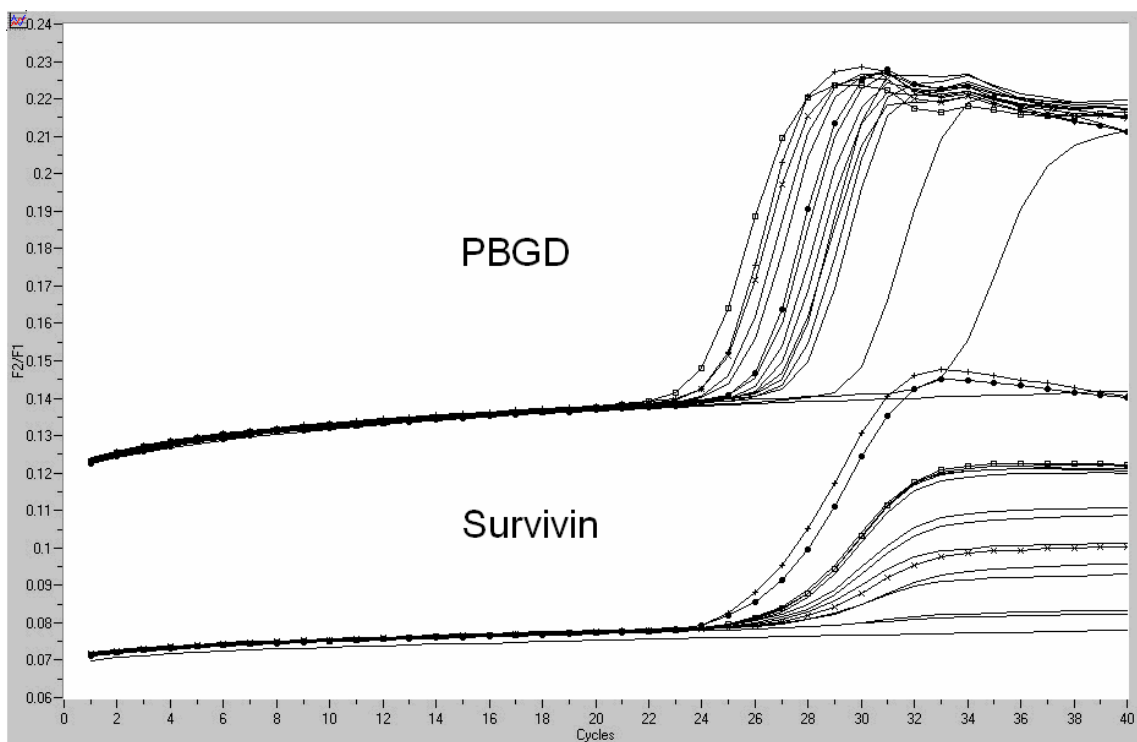


Abbildung 3: Analyse der Survivin- und PBGD-mRNA-Expression auf dem LightCycler. Darstellung eines Analyselaufes mit 14 Proben sowie je einem Standard und einer Wasserkontrolle für Survivin und PBGD. Im Diagramm ist die Fluoreszenzintensität (Ordinate) abhängig von der Zahl der PCR-Zyklen (Abszisse) abgetragen. Die Kurven zeigen unterschiedliche Expressionsniveaus für Survivin bei vergleichsweise konstanter PBGD-Expression. Zum Vergleich sind korrespondierende Kurven für einzelne Proben hervorgehoben.

2. 2. Survivin-mRNA-Expression bei Spermatogenesestörungen und testikulären Keimzelltumoren

2. 2. 1. *Qualitativer Survivin-mRNA-Nachweis*

Die ersten vorläufigen Ergebnisse zur Survivinexpression in Hodenbiopsien von Patienten mit Azoospermie und unterschiedlicher Spermatogenesefunktion wurden in Publikation 1 veröffentlicht. Die histopathologische Aufarbeitung des Biopsiematerials erfolgte grundsätzlich, d.h. auch in den Folgearbeiten (Publikation 2 – 4) nach einem modifizierten Johnsen-Score [Johnsen 1970; Schulze et al. 1999; Holstein et al. 2003]. Proben mit normaler Spermatogenese (Johnsen score $\geq 8 - 10$), solche mit Maturationsarrest als auch Proben von Patienten mit einem Sertoli-cell-only-Syndrom (SCOS) wurden im Rahmen unserer Studien untersucht. Die PCR-Analyse zeigte erstmals eine Expression der Survivin-mRNA in humanem Hodengewebe mit normaler Spermatogenese. Darüber hinaus war Survivin auch in Proben mit postmeiotischem Maturationsarrest detektierbar. Im Gegensatz dazu war das IAP bei prämeiotischem Arrest bzw. Keimzellaplasie (SCOS) nicht nachweisbar (Tab. 1). Die Survivinexpression schien demnach im Hoden an die Präsenz von Keimzellen, möglicherweise sogar haploiden Keimzellen, gebunden zu sein. Da in anderen Geweben eine differenzielle Expression von Survivin mit Nachweis in Malignomen, jedoch nicht in korrespondierendem Normalgewebe beschrieben worden war, überprüften wir die qualitative Survivinexpression in Keimzelltumoren. Dabei wurde eine Reihe von seminomatösen als auch nicht-seminomatösen Hodentumoren verschiedener Differenzierungsgrade untersucht, Die detaillierten Daten sind in Publikation 2 zu finden. Hier soll lediglich ein Überblick gegeben werden (Tab. 1).

Tabelle 1: Survivin-mRNA-Nachweis in Hodengewebe und testikulären Keimzelltumoren

Histologie	N¹ untersucht	N Survivin-positive
Benignes Gewebe		
Normalhoden	19	19
Maturationsarrest	12	9
SCOS ²	10	0
Tumoren		
Seminome	12	12
Nichtseminome	10	9
Reife Teratome	4	0
Gemischte Tumoren	2	2

¹ N = Anzahl der Proben

² SCOS = Sertoli-cell-only-Syndrom

2. 2. 2. Quantifizierung der Survivin-mRNA-Expression

Die Untersuchungen wurden dann ausgeweitet und eine Quantifizierung der Survivin-mRNA-Expression in Gewebeproben des Hodens und aus Keimzelltumoren durchgeführt. Dabei wurde ein vergleichsweise hohes Expressionsniveau in Seminomen und undifferenzierten aggressiven Nicht-Seminomen gemessen. Demgegenüber konnte für Teratokarzinome eine relativ niedrige und für reife Teratome eine fehlende Expression nachgewiesen werden (Publikation 2). Aufgrund der limitierten Probenzahl können Aussagen über Unterschiede zwischen Subtypen von Keimzelltumoren nur begrenzt getroffen werden.

Interessanterweise ergaben weitere Untersuchungen, dass das Expressionsniveau sowohl in undifferenzierten Keimzelltumoren als auch in normalem Hodengewebe relativ hoch ist, wobei die Gruppe der malignen Keimzelltumoren eine etwas niedrigere Expression als das Normalgewebe zeigte. Mit zunehmender somatischer Differenzierung in Hodentumoren, aber

auch bei Störungen der Spermatogenese, wurde dann eine nochmals deutlich niedrigere oder fehlende Expression beobachtet.

Weitere Untersuchungen galten der genaueren Charakterisierung der Survivin-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Spermatogenesefunktion. Es wurde dabei eine größere Serie von Patienten mit Azoospermie unterschiedlicher Ursache hinsichtlich ihrer testikulären Survivinexpression untersucht. Diese Arbeiten haben Eingang in Publikation 3 und 4 gefunden. Die Survivin-mRNA-Expression in Proben mit normaler Spermatogenese erwies sich als am höchsten. Mit zunehmender Schwere der Spermatogenesestörung wurde dann eine Abnahme der Expressionshöhe beobachtet. In Proben von Patienten mit schweren Störungen der Spermatogenese war in der Regel kein Survivin detektierbar (Publikation 3). Durch Ausweitung der Messserie konnte die quantitative Survivinexpression in Abhängigkeit von der Spermatogenesefunktion weiter charakterisiert und mit dem Expressionsniveau in Hodentumoren verglichen werden (Publikation 4). Beispielhaft ist in Tabelle 2 die deskriptive Statistik einer größeren Messserie dargestellt.

Tabelle 2: Quantitative Survivin-mRNA-Expression in Hodengewebe und malignen Keimzelltumoren des Hodens – Deskriptive Statistik

Histologie	N	Mittelwert (SD)	Median	25. / 75. Percentile	Spannweite
SCOS	12	0 (0)	0	-	-
MA ¹	18	28,5 (29,7)	20,8	0 / 54,2	0 – 79,6
prämeiotisch	8	9,7 (18,2)	0	0 / 24,8	0 – 44,4
postmeiotisch	10	43,6 (29,0)	53,3	8,4 / 67,1	0 – 79,6
NORMAL ²	22	115,0 (110,2)	64,6	50,6 / 117,5	22,4 – 388,9
OA ³	15	113,0 (108,5)	67,3	36,7 / 112,7	22,4 – 378,5
Vasektomie ⁴	7	119,5 (122,6)	60,5	50,7 / 132,1	50,3 – 388,9
TUMOREN	13	40,0 (30,3)	35,4	13,6 / 59,9	0 – 109,5

¹ MA = Maturationsarrest

² Normal = normale Spermatogenese

³ OA = Obstruktive Azoospermie

⁴ Vasektomie = Zustand nach Vasektomie

Eine verlässliche relative Quantifizierung ist an eine möglichst konstante Expression des house-keeping-Gens gebunden, wobei zwischen den analysierten Subgruppen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Expressionsniveaus bestehen sollten. Eine Analyse unserer Daten ergab keine signifikanten Unterschiede der PBGD-Expression, wenn alle analysierten Gruppen global auf Differenzen getestet wurden. Allerdings erbrachte der Einzelgruppenvergleich signifikante Unterschiede zwischen der Expressionshöhe in Proben mit SCOS verglichen mit normaler Spermatogenese, wobei erwartungsgemäß die Expression in SCOS-Proben niedriger war. Dies könnte auf die im Allgemeinen niedrigere Zellularität zurückzuführen sein. Diese Differenzen sollten weder unsere Analysen beeinflusst, noch unsere Schlussfolgerungen eingeschränkt haben, da alle SCOS-Proben ohnehin Survivin-negativ waren. Der paarweise Vergleich anderer Gruppen ergab keine Unterschiede.

2. 3. Survivin als Tumormarker des Harnblasenkarzinoms

2. 3. 1. *Survivin-mRNA-Expression im Tumorgewebe*

Nach Etablierung eines RT-PCR-basierten Assays zur Quantifizierung von Survivin-mRNA wendeten wir dieses bei Untersuchungen der Survivinexpression in Tumorgeweben von Patienten mit Harnblasenkarzinom an. Zu diesem Zeitpunkt war bei dieser Tumorentität die Gewebeexpression von Survivin nur immunhistologisch charakterisiert worden [Swana et al. 1999]. Da aber bei anderen Tumoren bereits eine prognostische Bedeutung einer Survivin-Überexpression belegt worden war, erschien eine weitere quantitative Charakterisierung Erfolg versprechend. Inzwischen sind zusätzlich zu unseren Untersuchungen weitere Studien zur Bedeutung der Survivinexpression in Harnblasentumoren publiziert worden [Lehner et al. 2002; Gazzaniga et al. 2003; Schultz et al. 2003; Wang et al. 2004a].

Für die nachfolgend näher beschriebenen Analysen wählten wir eine Zufallsstichprobe aus einer Tumorgewebekbank. Die Gewebeproben waren im Rahmen einer prospektiven Studie zu diagnostischen und prognostischen Markern des Harnblasenkarzinoms zwischen 01.08.1999 und 31.07.2001 gewonnen worden [Weikert et al. 2005b]. Zum Zeitpunkt der Untersuchung lag bereits ein begrenzte Nachbeobachtung (Follow-up) der entsprechenden Patienten vor. Entsprechend des Studienprotokolls wurde eine suffiziente Verblindung der Gewebeproben vorgenommen. Die klinischen Charakteristiken der Patienten konnten erst bei der Auswertung nach Vorliegen der einzelnen Messergebnisse mit den Expressionsdaten zusammengeführt werden. Die Stichprobe umfasste Tumorgewebeproben von 53 Patienten mit histologisch gesichertem Harnblasenkarzinom und 14 Proben normaler Blasenschleimhaut von Patienten mit einer benignen urogenitalen Erkrankung, zumeist einer benignen Prostatahyperplasie. Hinsichtlich der weiteren Charakterisierung des Studienkollektives sei auf Publikation 5 verwiesen.

Eine Survivin mRNA Expression war in allen Tumorproben, jedoch nicht in Normalmucosa nachweisbar. Die durch RT-PCR bestimmte Kopienzahl der

Survivin-mRNA wird zur Expressionshöhe von PBGD ins Verhältnis gesetzt. In allen untersuchten Proben konnte eine suffiziente PBGD-Expression nachgewiesen werden. So kann von einer fehlenden Survivinexpression in normaler Mucosa bei nachweisbarer PBGD-Expression und somit suffizienter RNA-Qualität der Probe ausgegangen werden.

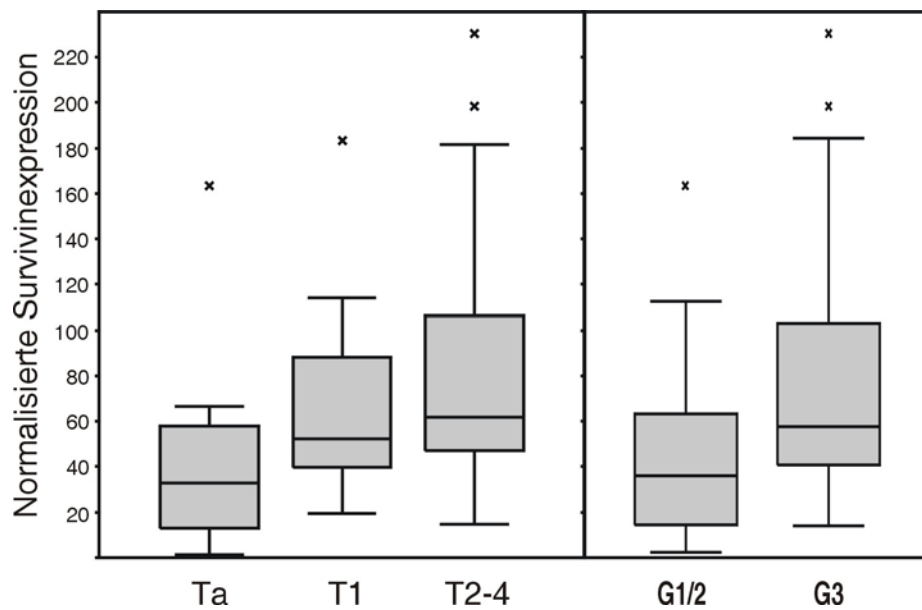


Abbildung 4: Survivin-mRNA-Expression in Gewebeproben von Urothelkarzinomen der Harnblase. Die Boxplots zeigen Median, 25. und 75. Perzentile, Spannweite und Extremwerte des normalisierten Expressionsniveaus in Abhängigkeit vom Tumorstadium bzw. Malignitätsgrad. Nicht-parametrische Testverfahren weisen signifikante Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den einzelnen Tumorstadien (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,002$) und zwischen Tumoren hohen und niedrigen Malignitätsgrades aus (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,004$).

Die normalisierte Survivin-mRNA-Expression wurde mit wichtigen Tumorcharakteristiken, wie Tumorstadium und Malignitätsgrad, korreliert (Abb. 4). Dabei zeigt sich eine signifikante Korrelation mit dem Tumorstadium, d.h. im Vergleich zu nicht-invasiven, papillären Harnblasentumoren wurden in invasiven Tumorstadien höhere Survivinwerte festgestellt. Darüber hinaus

wurde auch in hochgradig malignen Tumoren (G3) eine höhere Survivin-mRNA-Expression bestimmt als in Tumoren mit niedrigem Malignitätsgrad (G1/2). Somit konnte eine Assoziation eines hohen Survivin-Expressionsniveaus mit histopathologischen Parametern eines aggressiven Tumorverhaltens nachgewiesen werden. Die deskriptive Statistik der Survivin-mRNA-Expression in Blasentumorgewebe ist in Publikation 5 angegeben.

2. 3. 2. Survivin als potenzieller prognostischer Marker

Anhand dieser Daten zur Gewebeexpression stellt sich die Frage, ob eine Korrelation mit der Prognose, d. h. mit dem rezidivfreien Intervall oder dem Gesamtüberleben der untersuchten Patienten mit Harnblasenkarzinomen, nachgewiesen werden kann. Die Assoziation der Survivinwerte mit dem Zeitintervall bis zum ersten Rezidiv wurde bei den Patienten mit oberflächlichen Harnblasentumoren untersucht. Die mediane Survivin-mRNA-Expression in dieser Patientengruppe lag bei 41, so dass ein Referenzwert von 40 gewählt wurde, um Gruppen mit niedriger versus hoher Survivinexpression zu definieren. Ein tendenziell kürzeres rezidivfreies Intervall wurde bei Patienten mit hoher Gewebeexpression beobachtet (27,6 vs. 48,1 Monate); der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant (log-rank Test: $p = 0,066$). Bei der getrennten Analyse der Patienten mit nicht-invasiven Tumoren (Tumorstadium pTa) lag für Patienten mit niedriger Survivinexpression das mittlere Zeitintervall bis zum ersten Rezidiv bei 39,3 Monaten (95% Konfidenzintervall: 34,8 – 43,9 Monate), wohingegen ein deutlich kürzeres Intervall von 29,0 Monaten (95% Konfidenzintervall: 13,4 – 34,6 Monate) bei Patienten mit hoher Expression zu beobachten war ($p = 0,027$). Die entsprechenden Kaplan-Meier-Kurven sind in Abbildung 5 gezeigt. Nur 37% der Patienten mit hoher Survivinexpression waren nach 3 Jahren rezidivfrei, während dies für 67% derer mit niedrigem Expressionsniveau zutrifft. Der Einfluss des Malignitätsgrades (Tumorgrading) auf das Rezidivrisiko nicht-invasiver Tumoren ließ sich in unserer Stichprobe aufgrund der niedrigen Zahl von G3-Karzinomen nicht suffizient untersuchen.

Eine statistisch nicht signifikante Erniedrigung des rezidivfreien Intervalls, hier definiert als Abwesenheit von Metastasen bzw. eines Lokalrezidivs, wurde auch bei Patienten mit muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen und hoher Survivinexpression beobachtet (13,6 vs. 32,3 Monate rezidivfreies Überleben nach radikaler Zystektomie; $p = 0,067$). Das Expressionsniveau von Survivin schien auch mit dem Gesamtüberleben korreliert zu sein, allerdings war dieser Effekt nach Berücksichtigung des Tumorstadiums nicht mehr nachweisbar. Bezüglich weiterer Daten zu möglichen Zusammenhängen zwischen der Survivin-Gewebeexpression und der Prognose der Patienten wird auf Publikation 5 verwiesen.

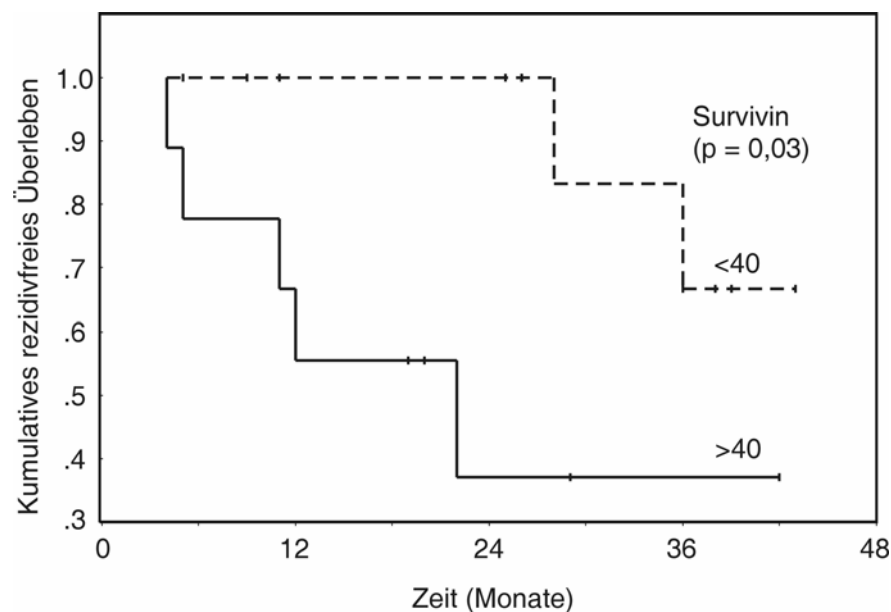


Abbildung 5: Kumulatives rezidivfreies Überleben von Patienten mit nicht-invasiven papillären Harnblasenkarzinomen (Tumorstadium pTa) stratifiziert nach hoher (>40) bzw. niedriger (<40) normalisierter Survivinexpression. Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen Unterschiede hinsichtlich der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen beiden Patientengruppen an (log-rank Test: $p = 0.027$).

2. 3. 3. *Survivinnachweis im Urin*

Ein wesentlicher Teil unserer Untersuchungen beschäftigte sich mit der Evaluierung von Survivin als potenzieller diagnostischer Marker des Harnblasenkarzinoms. Nachdem bereits erste Untersuchungen zum Proteinnachweis von Survivin in Urinproben von Blasentumorpatienten publiziert worden waren [Smith et al. 2001], galten unsere Analysen der Quantifizierung von Survivin mRNA in zellulären Bestandteilen des Urins. Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen einer kleinen eingebetteten Fall-Kontroll-Studie. Wiederum konnten wir auf prospektiv gesammeltes Probenmaterial zurückgreifen [Weikert et al. 2005b]. Dabei standen nur von einem Teil der bereits hinsichtlich der Gewebeexpression untersuchten Tumorpatienten Urinproben zur Verfügung. Zur Gruppe der Tumorpatienten wurde eine Kontrollgruppe bestehend aus gesunden Freiwilligen und Patienten mit benignen urogenitalen Erkrankungen zufällig, aber unter Berücksichtigung wichtiger Merkmale, wie Geschlecht und Alter, ausgewählt. Das Verhältnis von gesunden Individuen zu Patienten mit benignen Erkrankungen wurde dabei a priori mit 1:2 festgelegt. Insgesamt wurden 73 Urinproben von Karzinompatienten (n = 37) und Kontrollpersonen (n = 36) analysiert. Wegen fehlender PBGD-Expression mussten 5 Proben ausgeschlossen werden, so dass valide Messwerte zu 68 Probanden (35 Karzinompatienten; 33 Kontrollen) vorlagen.

Die Analysen der Urinproben von Blasentumorpatienten erbrachten eine Survivinexpression in 24 der untersuchten 35 Proben. Das RT-PCR-Assay arbeitete bei vielen Proben an der Nachweisgrenze für sowohl PBGD als auch Survivin. Die deskriptive Statistik für die Survivin-mRNA-Expression in zellulären Bestandteilen des Urins ist in Abbildung 6 dargestellt. Auffällig war eine um den Faktor 10 höhere mittlere Survivinexpression in Urinproben verglichen mit den korrespondierenden Tumorgewebeproben. Dennoch war keine signifikante Korrelation zwischen dem Expressionsniveau in Geweben und den in Urinproben gemessenen Werten festzustellen. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen der Expressionshöhe von Survivin im Urin und dem

Tumorstadium oder dem Malignitätsgrad beobachtet werden. In keiner der Urinproben von Kontrollpatienten konnte eine Survivin-mRNA-Expression nachgewiesen werden, obwohl die analysierten Proben eine ausreichende Expression des house-keeping Genes aufwiesen.

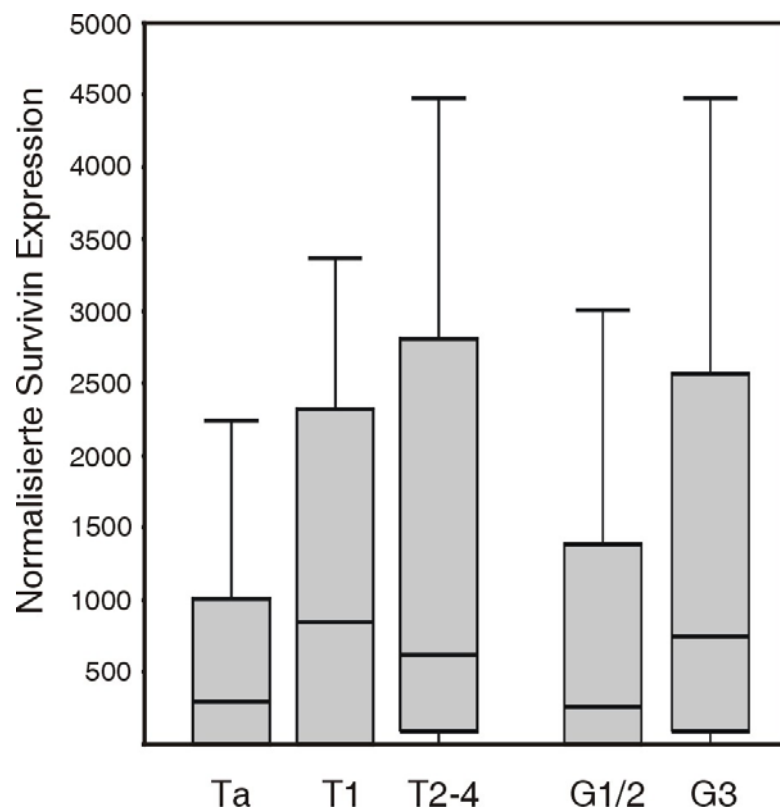


Abbildung 6: Survivin-mRNA-Expression in Urinproben von Patienten mit Urothelkarzinomen der Harnblase. Die Boxplots zeigen Median, 25. und 75. Perzentile und Spannweite (ohne Extremwerte) der normalisierten EXPressionsniveaus. Nicht-parametrische Testverfahren zeigen keine signifikante Unterschiede im Expressionsniveau zwischen einzelnen Tumorstadien oder Tumoren verschiedenen Malignitätsgrades.

Anhand dieser vorläufigen Ergebnisse lässt sich für den nicht-invasiven Nachweis des Harnblasenkarzinoms durch einmalige Survivin-mRNA-Analyse in Urinproben eine Sensitivität von 68,6% (95% Konfidenzintervall: 50,7% -

83,2%) und eine Spezifität von 100% (95% Konfidenzintervall: 90,3% - 100%) abschätzen. Diese Daten wurden zu den Ergebnissen der Urinzytologie ins Verhältnis gesetzt und weisen auf eine Überlegenheit des Survivinnachweises hin (Publikation 5).