

**Molekulare Charakterisierung  
des IAP Survivin in Weichteilsarkomen -  
Bedeutung für Prognose und  
Etablierung neuer Therapiestrategien**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Matthias Kappler  
geboren am 06. Januar 1975 in Staßfurt (Sachsen-Anhalt)

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. rer. nat. G. Moritz
2. Herr PD Dr. rer. nat. H. Taubert
3. Frau Prof. Dr. rer. nat. A. Wobus

Halle (Saale), 9. März 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008147**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008147>]

### Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Ampr	Ampicillinresistenz
amol	attomol
Apaf-1	„apoptotic protease-activating factor-1“
APC	„adenomatous polyposis coli“-Gen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
AS	antisense
ATCC	„American Type Culture Collection“, Amerikanische Zell- und Stammsammlung
Bcl-2	„b cell lymphoma/leukemia-2“
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bidest	bidestilliertes Wasser
BIR	„baculovirus IAP repeats“
bp	Basenpaar
BSA	„bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CARD	„caspase recruitment domaine“
CDE	„cell-cycle-dependent element“
CDK	„cycline-dependent kinase“
cDNA	komplementäre DNA
CHR	„cell-cycle gene homology region“
CMV	„early cytomegalie virus“, Cytomegalivirus
dATP	2'-Desoxyadenosine 5'-Triphosphat
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“, künstlich verstärkte GFP-Protein-Variante
ELISA	„enzyme-linked immunoabsorbent assay“, Enzymimmuntest
EPR-1	„effector cell protease receptor-1“
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
Fadd	„Fas-associated death domaine protein“
Fas	„fibroblast-associated antigene“
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFP	„green fluorescent protein“, grünfluoreszierendes Protein
HBXIP	„hepatitis B X-interacting protein“
HE	Haematoxylin-Eosin (-Färbung)
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
IAP	„inhibitor of apoptosis“, Inhibitor(en) der Apoptose
IgG	Immunglobulin G
kanr	Kanamycinresistenz
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth - Bakteriennährmedium

## Abkürzungen

---

LMS	Leiomyosarkom
LS	Liposarkom
M	Mol
mdm2	„murine double minute gene 2“
MFH	malignes fibröses Histiocytom
mRNA	„messenger RNA“, Boten-Ribonukleinsäure
MPNST	maligner peripherer Nervenscheidentumor
m	milli
mt	Mutanten- oder mutiert
n	nano
NF	Neurofibromatose-Gen
n.b.	nicht bestimmt
Nb	Neuroblastom
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ODN	Oligodesoxyribonukleinsäurefragmente
OS	Osteosarkom
PAA	Polyacrylamid
PBGH	Porphobilinogen Deaminase
PBS	„phosphate buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PT	Primärtumor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RB-1	Retinoblastom-1-Gen
Rez	Rezidiv
RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rotations per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
siRNA	„small interfering RNA“
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SE	„sense“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TSG	Tumorsuppressor-Gen
U	Unit(s)
US	undifferenziertes Sarkom
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor
w	Gewicht
WB	„western blot“
wt	Wild-Typ
WTS	Weichteilsarkom
zmol	zeptomol

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Tumorentstehung und Zelltodkontrolle	1
1.2 Weichteilsarkome - eine Charakterisierung	2
1.3 Die Apoptose - ein essentieller Mechanismus	5
1.4 Beschreibung der IAP	8
1.5 Der IAP Survivin	10
1.5.1 Genomische Struktur und Expression von Survivin	10
1.5.2 Survivin - ein Bindeglied zwischen Zellzyklus und Apoptose	11
1.5.3 Survivinexpression von normalen und transformierten Geweben	14
1.6 Zielstellung	16
<b>2 Material</b>	<b>17</b>
2.1 Tumormaterial	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Patientengut	17
2.2 Geräte und Verbrauchsmittel	18
2.3 Chemikalien	19
2.3.1 Molekularbiologische Kits	20
2.4 Antikörper und Enzyme	20
2.5 DNA-Konstrukte, Oligodesoxynukleotide und siRNAs	21
2.6 Plasmide	22
2.7 Bakterienstämme	23
2.8 Puffer und Lösungen	23
<b>3 Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Isolierung und Vermessung von Nucleinsäuren	24
3.1.1 Isolation von Gesamt-RNA	24
3.1.2 Isolation von Plasmid-DNA	24
3.1.3 Photometrische Bestimmung der Nucleinsäurekonzentration	24
3.2 Reverse Transkription, Polymerasekettenreaktion, Reinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten	24
3.2.1 Reverse Transkription (RT)	24
3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	25

3.2.3	Aufreinigung und Isolierung von PCR-Produkten	26
3.2.4	DNA-Sequenzierung und Reinigung der Produkte	26
3.3	Klonierung, Verdau und Ligation von DNA-Fragmenten	27
3.3.1	Verdau von cDNA mit Endonukleasen	27
3.3.2	Ligation von DNA-Konstrukten	27
3.3.3	Transformation von <i>E.coli</i> -Bakterien und Kulturansätze	27
3.4	Hybridisierung der siRNA	28
3.5	Western-Hybridisierung	28
3.5.1	Proteinisolierung aus Patientenmaterial	28
3.5.2	Proteinisolierung aus humanen Zelllinien	28
3.5.3	Westernblot-Analyse	29
3.5.4	Waschen von PVDF-Membranen	31
3.6	Survivin-ELISA	31
3.7	Immunhistochemie	31
3.8	Zellkultivierungstechniken	32
3.9	Nichtvirale DNA-Transfektion	33
3.9.1	Plasmid-Transfektion	33
3.9.2	Transfektionsprotokoll für DNAsyme und siRNA's <i>in vitro</i>	33
3.10	Anreicherung mittels Vitalzellsortierung (FACSVANTAGE)	33
3.11	Zellkoloniebildungstest	34
3.12	Zellzyklus-Analysen	34
3.13	Bestrahlung	35
3.14	Apoptose-Nachweismethoden	35
3.14.1	Kaspase-Assay	35
3.14.2	Apoptose-Nachweismethode (DAPI-Färbung)	36
3.15	Statistik	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
4.1	Survivin-mRNA-Expressionsanalyse an humanen WTS-Geweben	37
4.1.1	Qualitative mRNA-Expressionsstudien	37
4.1.2	Quantitative mRNA-Expressionsstudien	38
4.1.3	Korrelation der Survivin-mRNA-Expression mit klinischen Daten von WTS-Patienten	39
4.2	mRNA-Expressionsanalyse der humanen Telomerase (hTERT) an Tumoren von WTS-Patienten	41
4.2.1	Korrelation der hTERT-Expression mit klinischen Daten	42

4.3	Kombination der Expression der Survivin- und hTERT-mRNA und Korrelation mit den klinischen Daten von WTS-Patienten	43
4.4	Survivin-Protein-Expressionsstudien an WTS	44
4.4.1	Korrelation der Survivin-Proteinexpression mit klinischen Daten von WTS-Patienten	46
4.5	Transfektion von Survivin-GFP-Plasmide in humane Sarkomzelllinien	48
4.6	Inhibierung der Survivinexpression	51
4.6.1	Austestung unterschiedlicher Nukleinsäureoligomere (DNAzyme, siRNA) zur Inhibierung der Survivinexpression an Sarkomzelllinien	51
4.6.2	Effektivität der siRNA- Konstrukte in Abhängigkeit von der Konzentration	52
4.7	Inhibierung von Survivin durch siRNA-Applikation in fünf Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus	53
4.7.1	Analyse der Survivin-Expression und des klonogenen Zellüberlebens nach Applikation von siRNAs gegen Survivin	53
4.7.2	Analyse der Apoptose und des Zellzyklus nach siRNA-Applikation gegen Survivin	55
4.8	Zell- und Strahlenbiologische Effekte der Inhibierung von Survivin in Kombination mit Röntgenbestrahlung an zwei Sarkomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus	58
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
5.1	Einführung zu den Untersuchungen von Survivin in WTS	64
5.2	mRNA-Expression von Survivin und seiner Transkripte in Tumor- und Normalgewebe	64
5.2.1	Qualitative Analyse der Survivin-mRNA mittels RT-PCR	64
5.2.2	Quantitative Analyse der Survivin-mRNA an WTS	66
5.2.3	hTERT und Survivin - zwei „embryonale“ Gene aktiv in WTS	68
5.2.4	Prognostische Bedeutung der Expression von Survivinprotein für WTS	70
5.3	Funktionelle Untersuchung von Survivin für WTS-Zelllinien	71
5.3.1	Induktion der Survivinexpression durch den Einsatz von Survivin-GFP-Konstrukten	71
5.3.2	siRNA-spezifische Inhibierung von Survivin in WTS-Zelllinien	74
5.3.3	Inhibierung von Survivin in Kombination mit Bestrahlung	77
5.4	Therapeutische Optionen in Bezug auf Survivin	80
5.5	Ausblick	82

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>102</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Tumorentstehung und Zelltodkontrolle

In allen Zellen des Organismus haben verschiedene Proteine die wichtige Funktion, die Integrität und die Homöostase der Gewebe und Organe aufrechtzuerhalten. Jedoch wird die Lebensdauer von diploid-eukaryontischen Zellen durch den Zelltod, der sogenannten Apoptose, begrenzt (Kerr et al. 1972).

Zwei Zelltypen, die Stammzellen und die neoplastischen Zellen, können sich diesem Apoptosemechanismus entziehen. Beide Zelltypen sind infolgedessen potentiell unsterblich. Die Gleichartigkeit vieler Fähigkeiten und Eigenschaften der Stammzellen und der Neoplasien ist dabei nicht zufällig, sondern mit der Entstehung und dem „autarken“ Charakter beider Zelltypen zu begründen. Jedoch ist die Konsequenz des Vorhandenseins dieser Zelltypen im Körper eine jeweils fundamental andere. Die Stammzellen sind die physiologischen Garanten für die Erneuerung und den Erhalt des Lebens. Die unphysiologischen Neoplasien (Tumoren) sind dagegen Zellen, die nicht mehr in einem homöostatischen Gleichgewicht existieren. Tumoren sind vielmehr „entgleitete“ Zellen des Körpers, die sein Leben gefährden. Sie haben sich aus dem normalen Ablauf von Zellteilung, Differenzierung und Apoptose losgelöst (Vogelstein und Kinzler 1993). Ihr Proliferationsprogramm ist anders als das der Stammzellen ohne Kontrolle aktiviert.

Charakteristisch für die autonome, progressive und invasive Proliferation der Tumorzellen ist eine abnorme Vergrößerung des Gewebes. Diese kann durch benigne oder maligne Tumoren verursacht sein. Maligne Tumorzellen können im Verlauf der Progression zur Angiogenese, zum invasiven Wachstum und letztendlich zur Metastasierung befähigt sein.

Die Transformation erfolgt in der Regel klonal, d.h. ein Tumor entsteht aus einer einzelnen, maligne veränderten Zelle. Die Theorie der Mehrschritt-Kanzerogenese geht davon aus, dass mehrere mutative Veränderungen (Mutationen, Rekombinationen, Chromosomendeletionen, Ploidisierungen der DNA) in Stoffwechselwegen und in Kontrollpunkten der Zelle (Wachstums-, Stoffwechsel-, Organotropismuskontrolle, Reparatur) notwendig sind, um eine Tumorentstehung auszulösen (Bishop 1987). Einige Mutationen könnten zum immortalisierten Wachstum führen und verursachen so einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen. Beispielhaft konnte eine Transformation an Mutationen von tumorassoziierten Genen im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese vom Adenom zum Karzinom dargestellt werden (Fearon und Vogelstein 1990). Einen indirekten Hinweis für die Beteiligung mehrerer mutativer Ereignisse an der Entstehung menschlicher Tumoren liefern ferner Alters-Inzidenzkurven (Wagener 2001).



Menschliche Tumoren können sowohl durch die Aktivierung als auch durch eine Inaktivierung wichtiger Gene verursacht werden. Das primäre Ereignis bei der Karzinogenese ist die Aktivierung dominanter Onkogene oder die Deletion bzw. eine zum Funktionsverlust führende Mutation von Tumorsuppressorgenen (TSG) (Weinberg 1989). Die Protoonkogene kodieren für Proteine, die eine wesentliche Funktion in der Zellproliferation besitzen. Sie sind Wachstumsfaktoren oder dessen Rezeptoren, Elemente der Signaltransduktion, der Reparatur oder Transkriptionsfaktoren (Cantley et al. 1991). Einige der Onkogene werden verstärkt bzw. am falschen Ort oder zur falschen Zeit exprimiert (Wagener 2001). TSG sind Proteine mit wachstumshemmender und differenzierungsinduzierender Funktion, welche oft als Transkriptionsfaktoren wirken. Bedingt durch eine hohe Mutationsrate und einer geringeren Reparaturfähigkeit der transformierten Zelle führt die Aktivierung eines Onkogens als auch die Inaktivierung von TSG zu einer Signalkaskade und zu einer Veränderung des Genexpressionsmusters.

Im Verlauf des Tumorwachstums wird das Genom zunehmend instabil (Loeb und Loeb 2000). Dies kann weitere Chromosomenanomalien nach sich ziehen, die zur Tumorprogression beitragen. Zu nennen sind dabei z.B. Chromosomendeletionen, Ploidisierungen, Translokationen, Amplifikationen und Punktmutationen. Am Ende dieser Entwicklungen steht die Metastasierung des Primärtumors. Diese erfolgt nach Invasion durch die subendotheliale Basalmembran und Infiltration in andere Gewebe. Schließlich führt das maßlose und unregulierte Wachstum des Tumors zum Tod des Wirtsorganismus, aus dem die transformierten Zellen selbst hervorgegangen sind.

## **1.2 Weichteilsarkome - eine Charakterisierung**

Als Weichteilsarkom (WTS) sind alle malignen Tumoren des nichtepithelialen und extraskelletalen Gewebes, mit Ausnahme des retikuloendothelialen Systems, sowie der Glia und des Stützgewebes parenchymatöser Organe zusammengefasst. Zu den WTS zählt man des Weiteren alle neuroektodermalen Tumoren des peripheren und autonomen Nervensystems (Enzinger und Weiss 2001).

Es wird angenommen, dass WTS aus einer multipotenten mesenchymalen Stammzelle entstehen (Katenkamp und Kosmehl 1995). Somit ist für diese Tumoren eine Beziehung zwischen Stammzellen und Tumoren postuliert worden.

Etwa 0,7 - 1 % aller malignen Tumoren sind WTS. Bei Kindern unter 15 Jahren machen WTS >6 % aller bösartigen Geschwülste aus (Noltenius 1987). Die Inzidenzrate wurde weltweit mit 1-2 Erkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr bestimmt (Waterhouse et al. 1982). Das Durchschnittsalter der Patienten aller Entitäten beträgt mit Ausnahme der juvenilen Rhabdomyosarkome 64 Jahre (Enzinger und Weiss 2001).

Etwa 50 – 60 % der WTS treten im Bereich der Extremitäten auf, davon ca. 10 – 15 % an den oberen und 40 – 45 % an den unteren Extremitäten, ca. 10 – 15 % finden sich in der Kopf-Hals-Region, ca. 30 % im Bereich des Körperstamms, davon etwa 40 % im Retroperitoneum.

Die Benennung des Tumors folgt nicht der bis dato weitgehend ungeklärten Histogenese, sondern dem Phänotyp, der durch die Differenzierung erreicht wird (Katenkamp und Kosmehl 1995). Dabei ist das histologische Erscheinungsbild der WTS außerordentlich variabel. Bisher wurden mehr als 20 Sarkomentitäten mit 150 Subtypen beschrieben (Schütte und Stuschke 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene WTS-Entitäten molekularbiologisch untersucht, die in der Tabelle 1.1 kurz charakterisiert werden.

Tabelle 1.1 Überblick zu den häufigsten WTS-Entitäten

<b>WTS-Entität</b> (relative Häufigkeit) <sup>a</sup>	<b>Beschreibung</b>
malignes fibröses Histiozytom (25%)	wahrscheinlich von Histiozyten oder primitivem Mesenchym abzuleitender Tumor
Liposarkom (12%)	zeigt Differenzierungsmerkmale des Fettgewebes; v.a. in tieferen Gewebsschichten der unteren Gliedmaßen und im Retroperitoneum
Rhabdomyosarkom (10%)	Myosarkom, das eine quergestreifte Muskulatur imitiert
Leiomyosarkom (9%)	ähnelt der glatten Muskulatur
Synovialzellsarkom (7%)	ähnelt Zellen der Membrana synovialis
Malignes Schwannom (MPNST) oder Neurofibrosarkom (6%)	ein von Schwann-Zellen oder ektodermalen Zellen der Schwannschen Scheide ausgehendes Malignom des peripheren Nervensystems
Fibrosarkom (5%)	ein den Bau fibrösen Bindegewebes nachahmendes Sarkom
Angiosarkom (3%)	meist ein Tumor der mit dem Blut- oder Lymphgefäßendothel Ähnlichkeit hat

<sup>a</sup>-nach Hashimoto et al. 1992

Die Klassifizierung der WTS erfolgt nach dem TNM-System (UICC) der WHO. Bei dieser Charakterisierung wird die Größe des Primärtumors, die Präsenz und die Ausdehnung von

Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen bestimmt. Diese Faktoren sind für die Prognose von entscheidender Bedeutung. Auch bei WTS, umfasst das histopathologische Grading weitere Kriterien, so die Bestimmung des Zellreichtums, die Zellpleomorphie, die mitotische Aktivität, Nekrosen und den Differenzierungsgrad des Primärtumors (Hermanek et al. 2000, Enzinger und Weiss 2001). Das Grading besitzt die beste Korrelation zur Prognose (Van Unnik et al. 1993, Coindre et al. 1996). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass es bis heute kein weltweit akzeptiertes Grading-System für WTS gibt (Rath und Schönfelder 2002). Die klinisch-pathologische Einteilung nach Tumorstadien berücksichtigt das Grading, die Tumorgöße, die Tumortiefe und das Vorhandensein von Lymphknoten oder von Fernmetastasen (Enzinger und Weiss 2001). Als Prognosefaktoren werden aktuell die Tumorentität, -lokalisation, -größe und -tiefe, die Radikalität der chirurgischen Therapie, sowie die Realisierung eines multimodalen Therapiekonzeptes anerkannt und in der klinischen Praxis berücksichtigt (Brennan et al. 1991, Brennan 1996, Singer et al. 1995, Coindre et al. 1996). Diese aus der Klassifikation des Tumors ermittelte prognostische Aussage ist jedoch für den Einzelfall kaum verwertbar, da statistisch unkonkret (Rath und Schönfelder 2002).

Aufgrund ihrer Lokalisation, dem beschwerdearmen Wachstum und ihrer geringen Inzidenz, sowie wegen des Fehlens einer Paraneoplasie werden WTS oft spät diagnostiziert (Schütte und Stuschke 1997). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weisen bereits ca. 10 - 25 % aller Patienten hämatogene Fernmetastasen auf, meist in Lunge (33 %), Knochen (23 %) oder Leber (15 %) (Enzinger und Weiss 2001). Innerhalb von 2 Jahren nach lokaler Primärtherapie treten bei 70 – 80 % der Patienten mit hochmalignen WTS Lokalrezidive auf (Schütte und Stuschke 1997).

Aus dem oft fortgeschrittenen Tumorstadium und der relativen Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie, der häufigen Rezidivbildung und der schwierigen Charakterisierung der WTS ist ein abschließender Erfolg der Behandlung oft schwer prognostizierbar. Die Früherkennung ist bis heute nahezu die einzige Möglichkeit einer Mortalitätssenkung (Rath und Schönfelder 2002).

WTS haben eine relativ ungünstige Prognose. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit 55 % (Pollock et al. 1996) und die 10-Jahres-Überlebensrate mit 38 % (Jensen et al. 1991) angegeben. Dabei ergibt sich je nach Tumorstadium ein differenziertes Bild. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate im Stadium 1 bei > 90 %, im Stadium 2 bei 60 %, im Stadium 3 bei ca. 25 % und im Stadium 4 nur noch bei 2-5 % (Enzinger und Weiss 2001).

Die Tumorresektion weit im Gesunden ist der wichtigste Bestandteil der kurativen Therapie der WTS des Erwachsenen. Dies betrifft den Primärtumor, das Lokalrezidiv und häufig auch solitäre Fernmetastasen (Schütte und Stuschke 1997). Des Weiteren kommen als Palliativmaßnahmen für die Behandlung von WTS-Patienten die Chemotherapie, eine

Hyperthermie und eine Strahlentherapie in Frage. Insbesondere bei extremitätenerhaltenden Eingriffen konnte mit Hilfe der adjuvanten Strahlentherapie das Lokalrezidivrisiko gesenkt werden (Shiu et al. 1991).

Die molekularen Ursachen der WTS-Entstehung liegen noch weitgehend im Dunkeln. Bekannt ist, dass bei einigen WTS-Formen gehäuft Keimbahn-Alterationen beobachtet werden: wie hereditäre p53-Genmutationen (Li-Fraumeni-Syndrom, tuberöse Sklerose, intestinaler Polyposis, Gardner-Syndrom), NFI/II-Gen Dysfunktionen (Neurofibromatose Typ I von Recklinghausen) und Veränderungen des Rb-1-Gen (Retinoblastom) (Schütte und Stuschke 1997). Als ursächlich für die Transformation werden Mutagene, wie polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Asbest und Dioxin, radioaktive Strahlung oder Traumen vermutet (Taubert 1999).

Molekulare Alterationen in Sarkomen wurden vor allem für die TSG p53 (Bartkova et al. 1991, Cordon-Cardo et al. 1994a, Taubert et al. 1996, Taubert et al. 1998) und Rb-1 (Cordon-Cardo und Richon 1994b, Reissmann et al. 1989) sowie für das Protoonkogene mdm2 (Würl et al. 1998, Taubert et al. 2000) beschrieben.

Um die Heilungsraten von WTS-Patienten zu verbessern und die WTS-Genese zu verstehen, ist die Suche nach neuen molekularen Faktoren mit prognostischer Aussagekraft und Therapierelevanz notwendig. Prognosemarker die eine individuelle Abschätzung der Wirkung einer Chemo- oder Strahlentherapie eines Tumorpatienten ermöglichen, wären eine große Hilfe für die Therapieentscheidung. Solch ein potentiell neuer Marker könnte der Inhibitor der Apoptose, das Survivin-Gen-Produkt sein (siehe Kap.1.5), das in dieser Arbeit untersucht wurde.

### **1.3 Die Apoptose – ein essentieller Mechanismus**

Der Abbau von nutzlosen oder schädlichen Zellen, der als ein geregelter physiologischer Mechanismus abläuft, wird als Apoptose bezeichnet (Kerr et al. 1972). Dieser Prozess ist von der Embryonalentwicklung, der Differenzierung, der Immunreaktionen bis hin zur Seneszenz beteiligt und durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet.

Während der Apoptose verändern sich sowohl die Plasma- als auch die Kernmembran. Es kommt zum Schrumpfen der Zelle, zur Kondensierung und Fragmentierung der DNA (50-300 kb) und schließlich zur Bildung der sogenannten „apoptotic bodies“. Biochemisch lassen sich verschiedene Proteasen und Endonukleasen nachweisen. Die abgestorbenen Zellen werden schließlich von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert. Im Gegensatz zur Nekrose werden bei der Apoptose die Nachbarzellen nicht geschädigt (Wagener 2001). In letzter Zeit werden alternativ zu der klassischen Form der Apoptose andere Zelltod-

„Pathways“ beschrieben, wie z.B. autophagische und nekrotische Formen, die ebenfalls programmiert ablaufen (Assuncao und Linden 2004).

Die klassische Form der Apoptose beginnt mit der Verarbeitung von exogenen oder endogenen apoptotischen Signalen durch die Zelle. Diese Signale können durch DNA-Schädigungen (durch chemische Substanzen oder  $\gamma$ -Strahlen), Hormone, Hypoxie oder extrazelluläre Matrixfaktoren ausgelöst werden. Dadurch kann die Apoptosekaskade mittels verschiedener Signalwege, etwa über TNF, CD 95/Fas oder p53 aktiviert werden. Schließlich folgen die Phagozytose und die Metabolisierung der Zellbestandteile (Wagener 2001).

An der Apoptose sind maßgeblich die Kaspasen (Zystein-reiche Aspartatproteasen) beteiligt. Diese intrazellulären Zystein-Proteasen, die substratspezifisch hinter einem Aspartatrest (CASPase) Proteine spalten, werden als Proenzyme (Zymogene) synthetisiert und erst nach einer Prozessierung aktiviert. Die Kaspasekaskade wird durch eine Initiator-kaspase ausgelöst, setzt sich über die Effektor-kaspasen fort, welche wiederum kritische Proteinsubstrate zum Ziel haben (Thornberry 1998). Die Substrate der Kaspasen sind u.a. Aktin, Lamine, Desoxyribonukleasen, BCL-2, MDM2, RB, Kontaktstellen der extrazellulären Matrix, Proteine der DNA-Replikation und Reparatur sowie Proteine, die am Spleißen der mRNA beteiligt sind (Wagener 2001).

Die extrinsischen Apoptosesignalwege werden über die membranständigen Apoptoserezeptoren wie CD 95 (Fas) oder den TNF-Rezeptor 1 ausgelöst. Das FADD-Protein (Fas assoziierte Todesdomäne) aktiviert im weiteren Verlauf der Kaskade die Kaspase-8 (Dhein et al. 1995).

Die intrinsischen Apoptosestimuli können nach der Schädigung der Mitochondrien den Zelltod auslösen. Nach dem Verlust der Integrität der Mitochondrien setzen diese Zytochrom-C und dATP frei. Durch die Bindung von Zytochrom-C an das zytoplasmatische Protein Apaf-1 (Apoptose Aktivierungsfaktor 1) wird dieses in seiner Konformation geändert. Dadurch wird die CARD-Domäne („caspase recruiting domain“) des Apaf-1 aktiviert, wodurch Apaf-1 seinerseits die Prokaspase-9 bindet und aktiviert (Übersicht in Green und Reed 1998). Die Initiator-kaspase-9 kann dann die Effektor-kaspasen -3, -6, -7 aktivieren. Der Komplex aus Apaf-1, Zytochrom-C und Kaspase-9 wird als Apoptosom bezeichnet.

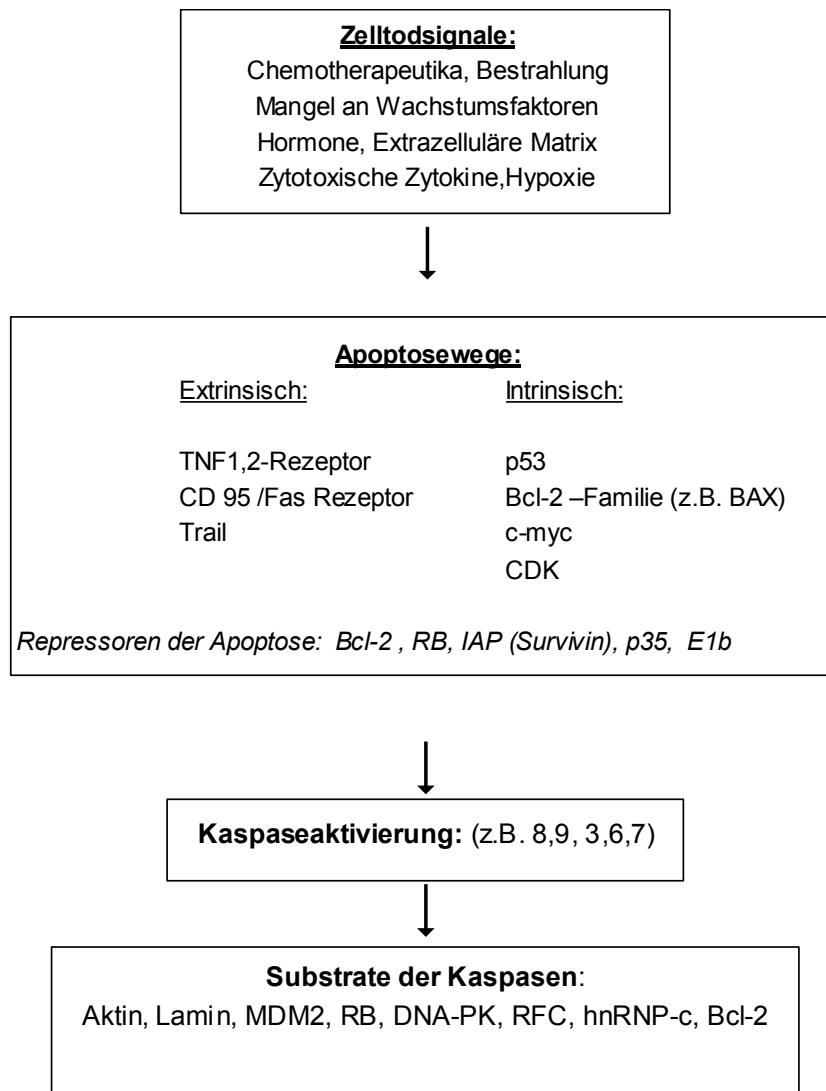


Abbildung 1.1 Schema der Apoptose (modifiziert nach Rath und Schönfelder 2002)

Die Entscheidung, ob eine Zelle apoptotisch wird, hängt von der post-mitochondrialen Kaspase-Aktivität ab (Übersicht in Vaux und Silke 2003). Interessant ist, dass zahlreiche Tumoren sensitiv gegenüber einer Apoptoseinduktion durch Chemotherapeutika sind, die nach der Mitochondrienschädigung den Kaspase-9-„Pathway“ beeinflussen (Reed 1997, Übersicht in Debatin und Kramer 2004). Nach Röntgenbestrahlung bzw. Chemotherapie könnten für WTS nur geringe Apoptoseraten detektiert werden (Bache et al. 1999, Stuschke et al. 1993, Budach et al. 1997). Die Ursache für die geringe Apoptoserate in WTS ist bisher nicht bekannt.

Die Antagonisten des Zelltodmechanismus sind z.B. Bcl-2 und andere Proteine der Bcl-Genfamilie, welche die Cytochrom-C-Freisetzung aus den Mitochondrien verhindern und so die Apoptosekaskade inhibieren (Adams und Cory 1998). Eine weitere Gruppe von Proteinen

die den Zelltod verhindern können, sind die Inhibitoren der Apoptose (IAP) (vgl. Kap. 1.4). Diese Apoptoseantagonisten können für das Überleben von Tumoren wichtig sein.

#### 1.4 Beschreibung der IAP

Die IAP (Übersicht in LeBlanc 2003, Deveraux und Reed 1999) wurden zuerst in einem Bakulovirus-Genom [*Cydia pomonella-Granulose-Virus* (CpGV) und *Orgyia Pseudotsugata Polyhedrose Virus* (OpMNPV)] entdeckt, welche den Verlust des Kaspaseinhibitors p35 in mutierten Viren kompensieren konnten (Birnbaum et al. 1994, Crook et al. 1993). Entscheidend bei der Blockade der Apoptose war eine sich wiederholende „Tandem-repeat-domain“ (1-3 Kopien) von 70 Aminosäuren, welche als BIR-Domäne („baculovirus IAP repeats“) bezeichnet wurde (Crook et al. 1993, Clem und Miller 1994). Die BIR-Domäne faltet sich zu einer stark-hydrophoben Tasche, die ein Zinkion einschließen kann (Hinds et al. 1999). Diese Domäne soll zu Protein-Protein-Wechselwirkungen befähigt sein und beinhaltet die antiapoptotische Funktion (Vucic et al. 1998). Viele IAP besitzen ferner eine C-terminal Ring-Finger-Domäne („really interesting new gene“) und eine CARD-Domäne („caspase-recruitment domain“). Die Ring-Finger-Domäne, in deren Zentrum 2 Zinkionen sitzen, ist eine Zwei-Schleifen-Domäne, die in die Degradation von Proteinen [Ubiquitylierung über die Ligase (E3)] involviert ist bzw. die für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich gemacht wird (Joazeiro und Weissman 2000, Übersicht in Salvesen et al. 2002).

Zelluläre Homologe zu IAP wurden in vielen eukaryontischen Organismen von Hefen über Insekten bis hin zu Säugetieren nachgewiesen (Übersicht in LaCasse et al. 1998).

Einige IAP sind in die Zytokinese und die Mitosespindelfunktion während der Zellteilung involviert, so etwa Survivin und BIR-1. Die IAP der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und von *Caenorhabditis elegans* sind ausschließlich für den Ablauf der Zellteilung und der Chromosomensegregation verantwortlich (Fraser et al. 1999, Uren et al. 1999, Yoon und Carbon 1999, Speliotos et al. 2000). Ein „knock out“ dieser IAP induziert die Letalität der Zellen bzw. von Embryonen, die nach fehlerhafter bzw. fehlender Zytokinese durch die Induktion einer Polyploidie hervorgerufen wird (Fraser et al. 1999, Uren et al. 1999). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die BIR-Domänen ursprünglich in Prozesse der Chromosomensegregation und der Zellteilung integriert waren. Lediglich ein IAP in Säugetieren ist bekannt, der diese Funktion nicht verloren hat (Übersicht in Miller 1999). Dabei handelt es sich um Survivin, welches folgerichtig die Zytokinesedefekte eines BIR-1-„knock out“ in *Caenorhabditis elegans* partiell kompensieren kann (Fraser et al. 1999, Speliotos et al. 2000).

Die IAP der Säugetiere inhibieren das Prozessieren und die Aktivierung der Kaspasen (Seshagiri und Miller 1997). Im Menschen wurden bisher acht IAP entdeckt. Die IAP XIAP, c-

IAP-1, c-IAP-2 inhibieren direkt die Kaspasen-3, -7 und die Prokaspase-9 (Rothe et al. 1995, Deveraux et al. 1997, Übersicht in Verhagen et al. 2001). Survivin soll die Kaspasen-3 und -7 und auch die Kaspase-9 inhibieren (Tamm et al. 1998, Li et al. 1998, Banks et al. 2000, Verdecia et al. 2000, Shin et al. 2001, Griffith et al. 2002). Die IAP c-IAP-1, c-IAP-2 sind außerdem in der Signaltransduktion von membranständigen Rezeptoren involviert, wie etwa in den TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) Komplex (Rothe et al. 1995).

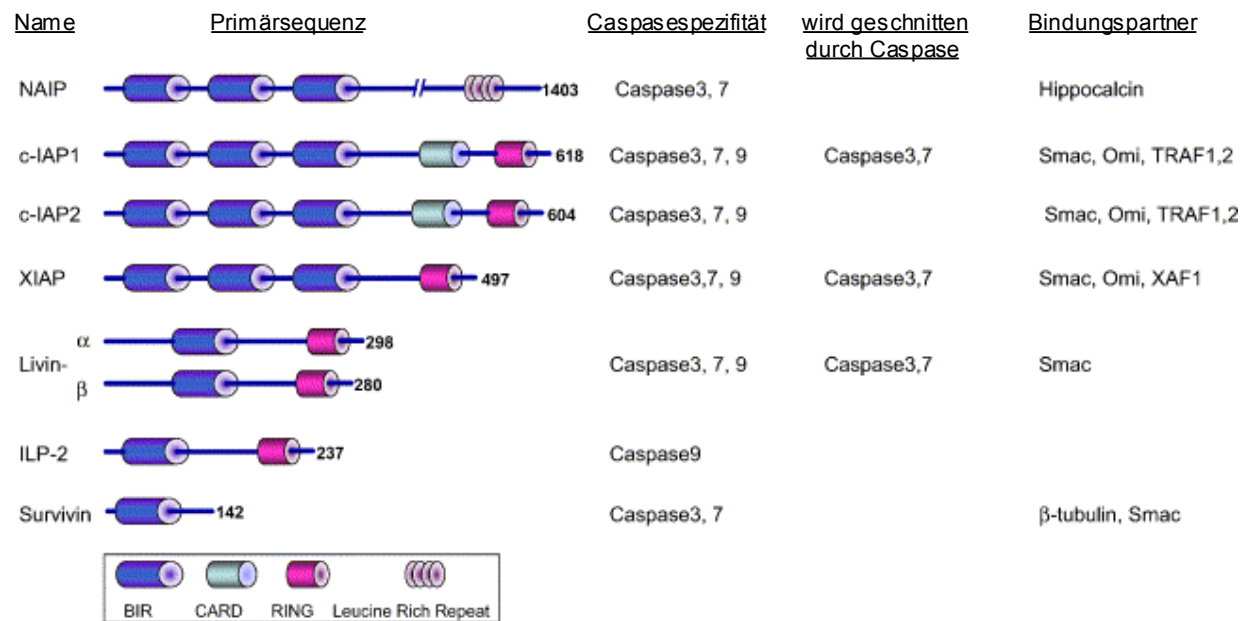


Abbildung 1.2 IAP der Säugetiere (modifiziert nach Nachmias et al. 2004)

Einige IAP sind Mediatoren und Regulatoren der anti-apoptischen Proteine  $\nu$ -Rel und NF- $\kappa$ B (Übersicht in LaCasse et al. 1998). Die IAP c-IAP-1, c-IAP2, XIAP können durch NF- $\kappa$ B induziert werden. Die IAP: c-IAP-1, c-IAP2 sowie unter besonderen Umständen auch XIAP können wiederum NF- $\kappa$ B aktivieren (LaCasse et al. 1998).

Jedoch werden nur Survivin (vgl. Kap. 1.5) und ML-IAP/Livin in transformierten Zellen anders als in Normalgewebzellen exprimiert (Vucic et al. 2000, Li 2003). Interessant ist der Befund, dass ML-IAP/Livin in vielen Melanom-Zelllinien exprimiert wird und für Blasenkarzinompatienten mit einem früheren Auftreten von Rezidiven korreliert ist (Vucic et al. 2000, Gazzaniga et al. 2003).

Die Antagonisten der IAP, welche aus den Mitochondrien freigesetzt werden können, sind die proapoptischen Proteine Smac/Diablo und Omi/HtrA2 (Verhagen et al. 2000, Martins et al. 2002, Du et al. 2000). Beide Peptide binden und inaktivieren Proteine die eine BIR-Domäne besitzen (Übersicht in Vaux und Silke 2003).



Durch die Inhibierung der Apoptose steigern Tumorzellen ihre Vitalität und werden gegenüber immunologischen und zytotoxischen Therapien resistent. Ein Fehlen der Kaspaseaktivität führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber der Apoptoseinduktion. Die IAP, die diese Resistenzmechanismen mit verursachen, können, wenn sie dereguliert sind, eine onkogene Rolle spielen und zur Transformation eines Tumors beitragen (Übersicht in LaCasse et al. 1998). Survivin ist der am häufigsten tumorspezifisch exprimierte IAP, was es zum interessantesten Mitglied dieser Proteinfamilie und zu einem wichtigen Untersuchungsobjekt der Onkologie macht (Altieri 2001, Altieri 2003a).

## 1.5 Der IAP Survivin

### 1.5.1 Genomische Struktur und Expression von Survivin

Der IAP Survivin wurde mittels Hybridisierungsscreening einer humanen Genbank mit der cDNA des Faktor-Xa-Rezeptors EPR-1 („effector cell protease receptor-1“) erstmals nachgewiesen (Ambrosini et al. 1997). Die Expression des Survivins verläuft diametral zur Expression des kolokalisierten Gens EPR-1, das auf dem antikodogenen DNA-Strang liegt. EPR-1-RNA könnte somit als ein natürlicher antisense-Regulator fungieren und wird dann im Gewebe nachgewiesen, wenn Survivin nicht exprimiert ist (Ambrosini et al. 1998). Daten von Zaman et al. deuten jedoch darauf hin, dass das EPR-1 nur in einigen Geweben exprimiert wird bzw. gar nicht existiert (Zaman und Conway 2000)

Das 14,7 kb große Survivin-Gen liegt auf dem Chromosom 17q25 (Ambrosini et al. 1998, Ambrosini et al. 1998) und kodiert ein 16,5 kDa Genprodukt. Survivin besitzt im Unterschied zu anderen IAP nur ein „baculovirus IAP repeat“ und hat anstelle einer karboxyterminalen Ringfinger-Domäne eine  $\alpha$ -helikale „coiled-coil-domain“ (Ambrosini et al. 1997). Diese C-terminale Domäne soll mit polymerisiertem Mikrotubulin interagieren können (Ambrosini et al. 1998, Li und Altieri 1999).

Bisher sind vier alternative Survivin-Spleißvarianten bekannt (Abb. 1.3), wobei das wt-Survivin (142 AS) 4 Exone enthält. Die Survivin-2B Variante (165 AS) entsteht durch Insertion eines alternativen Exons 2. Die Survivin- $\Delta$ 3 Variante (137 AS), die eine BH2-Bindedomäne enthält (Bcl-2-Bindedomäne), wird nach der Deletion des Exons 3 gebildet. Dabei tritt eine Leserasterverschiebung auf (Mahotka et al. 1999). Die erst kürzlich entdeckte Variante Survivin-3B entsteht durch die Verwendung eines alternativen Exons 3 (Badran et al. 2004).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Varianten Survivin- $\Delta$ 3, Survivin-2B als auch wt-Survivin in epithelialen Tumoren und Leukämien anders als im Normalgewebe exprimiert werden (Krieg et al. 2002, Mahotka et al. 2002a, Mahotka et

al. 2002b, Hirohashi et al. 2002). Es wird vermutet, dass die Survivinvariante Survivin-2B als ein negativer Regulator von wt-Survivin wirkt (Mahotka et al. 1999). In Magentumoren wurde eine stadiumabhängige Expression von Survivin-2B festgestellt, während wt-Survivin und Survivin- $\Delta$ 3 in ihrer Expression unverändert blieben (Krieg et al. 2002). Untersuchungen zu den Spleißvarianten lagen mit Ausnahme für die Survivin-2B-Variante in Neuroblastomen (Adida et al. 1998a, Islam et al. 2000a) für WTS noch nicht vor.

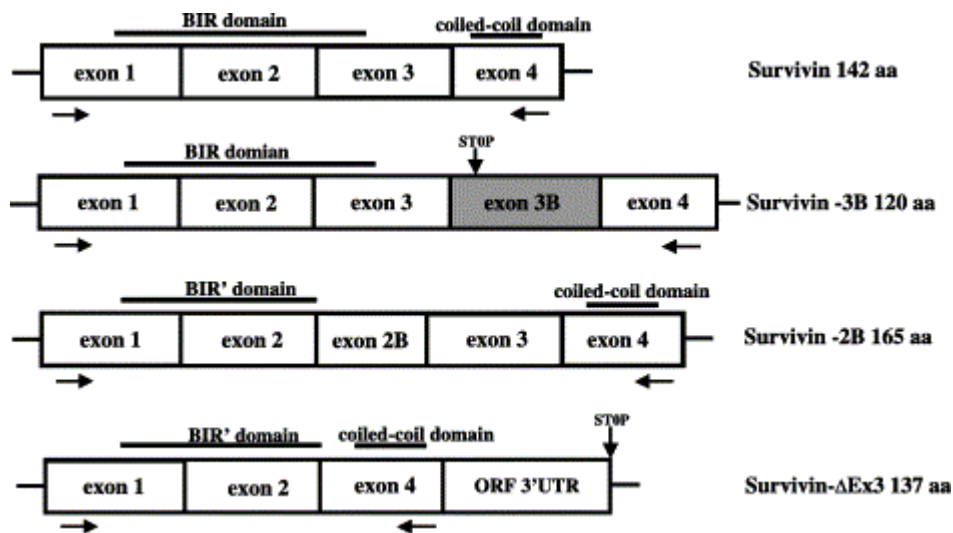


Abbildung 1.3 wt-Survivin und seine Varianten (aus Badran et al. 2004)

Abkürzungen: aa-Aminosäuren; BIR- „baculovirus IAP repeats“;  
ORF-„open reading frame“

### 1.5.2 Survivin - ein Bindeglied zwischen Zellzyklus und Apoptose

Survivin wird Zellzyklus-abhängig exprimiert und im Wesentlichen während der G2/M-Phase detektierbar. Es kann in der G2/M-Phase bis zu 40-fach stärker als in der G1-Phase exprimiert sein (Li et al. 1998). Die transkriptionelle Kontrolle der Expression erfolgt über „CDE/CHR-boxes“ („cell-cycle-dependent element/cell-cycle gene homology region“), die dem Survivinpromotor vorgelagert sind und das Gen Zellzyklus-abhängig regulieren (Li und Altieri 1999).

Mittels röntgenkristallographischer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Survivin als ein Homodimer vorliegt (Chantalat et al. 2000, Verdecia et al. 2000, Muchmore et al. 2000). Die Halbwertszeit des Survivinproteins beträgt 30 min und die Zellzyklus-abhängige proteasomale Polyubiquitylierung führt dazu, dass in der Interphase sehr niedrige Survivinkonzentrationen vorliegen (Zhao et al. 2000). Ähnlich wie die mRNA Zellzyklus-abhängig exprimiert wird, kann auch das Protein abhängig von der Zellzyklusphase modifiziert werden. Dies geschieht durch die Phosphorylierung des Threonin 34 (Thr 34)

durch das p34<sup>cdc2</sup>-Cyclin B1. Dadurch wird Survivin während der Mitose stabilisiert (O'Connor et al. 2000a, O'Connor et al. 2002). Ohne diese Phosphorylierung würde der gebildete endogene Survivin-Kaspase-9 Komplex, der am Mitoseapparat lokalisiert ist, gespalten und eine Kaspase-9 abhängige Apoptose ausgelöst werden (O'Connor et al. 2000a).

Survivin ist mit  $\gamma$ -Tubulin an den Spindel-Zentriolen kolokalisiert, bindet an den Zentrosomen und an die Kinetochoren von Metaphasenchromosomen. Ab der Metaphase ist es an den Mitosespindeln und in der späten Telophase auch in den „midbodies“ („midzone microtubule bundling structure“) nachweisbar (Li et al. 1998, Skoufias et al. 2000, Wheatley et al. 2001, Fortugno et al. 2002). An diesen Strukturen sind auch die Kaspase-3 und der Zyklin-abhängige-Kinase (CDK)-Inhibitor p21<sup>waf</sup> lokalisiert, die wahrscheinlich ebenfalls mit Survivin wechselwirken (Li et al. 1998, Suzuki et al. 2000b). Survivin interagiert auch mit anderen Zellzyklusproteinen, wie etwa mit Cdk4 und RB (Suzuki et al. 2000a).

Es wird spekuliert, dass zwei unterschiedlich regulierte wt-Survivin-Subtypen in der Zelle exprimiert werden. Der eine Subtyp ist Mikrotubuli- und der andere Kinetochore-assoziiert (Fortugno et al. 2002). Dabei könnte es sich einmal um das im Kern- bzw. im Zytoplasma lokalisierte Survivin handeln (Fortugno et al. 2002). Vielleicht stellt das im Kern nachweisbare Survivin ein Heterodimer aus wt-Survivin und Survivin- $\Delta$ 3 dar (Li 2003). Auf diese Weise würden die Survivin-Isoformen, z.B. nach einer Heterodimerisierung mit wt-Survivin, einen wesentlichen Einfluss auf die normale Funktion des wt-Survivins ausüben (Mahotka et al. 1999).

Die Funktion und die Wirkung von Survivin in der Mitose könnte so aussehen: in der Metaphase bindet Survivin an die mitotischen Spindelfasern, wobei es von p34<sup>cdc2</sup> phosphoryliert wird. Dadurch kann Survivin die Prokaspase-9 binden und stabilisieren. Wenn Apoptosesignale Survivin inhibieren, kann die Kaspase-9 freigesetzt werden. Survivin befindet sich somit an einem wichtigen Kontrollpunkt der Integrität des Genoms und der Mitoseregulation. In der Prometaphase und Metaphase binden Survivin (wahrscheinlich auch Survivin- $\Delta$ 3), die Aurora B Kinase und INCENP am Kinetochor der Chromosomen und bilden den Kinetochorkomplex (Speliotes et al. 2000, Wheatley et al. 2001, Bolton et al. 2002). INCENP und Survivin wurden deshalb als Teil eines „passanger protein complex“ beschrieben, der die Chromosomensegregation mit der Zytokinese verbindet (Skoufias et al. 2000, Terada 2001, Wheatley et al. 2001). Survivin verstärkt auch die Aktivität der Aurora B Kinase (Bolton et al. 2002). Gleichzeitig organisiert das an den Mitosespindeln vorhandene Survivin die Segregation der Chromosomen durch seine Interaktion mit Tubulin und einigen Kinasen (z.B. Aurora-2). Während der Anaphase wandern die Chromosomen zu den Polen, der Kinetochorkomplex verbleibt an der Äquatorialzone. Dieser Komplex assoziiert in der Telophase mit dem „midbody“ („midzone microtubule bundling structure“) und wird degradiert (Li 2003).

Eine wesentliche Rolle des Survivins während der Mitose konnte durch den funktionellen Ausfall des Proteins gezeigt werden. So führt eine Behandlung mit ODN gegen Survivin, eine Mikroinjektion von Survivin-spezifischen Antikörpern oder die Expression einer dominant-negativen Survivin-Mutante zu schweren Störungen der Mitose von humanen Zellen. Nach einer fehlerhaften Zytokinese entstehen überzählige Zentrosomen und multipolare Mitosespindeln. Dies führt letztlich zur Induktion einer Polyploidie (Li und Altieri 1999, Chen et al. 2000, Kallio et al. 2001). Ähnliche Defekte in der Zytokinese wurden nach der Inhibition des Survivin-homologen Proteins in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Uren et al. 1999) oder *Caenorhabditis elegans* (Fraser et al. 1999) beobachtet. Ein „knock out“ des Survivins führt nach 3,5 bis 4,5 Tagen zum Absterben von Mäuseembryonen, weil sich keine funktionellen Mitosespindeln ausbilden. Nach einer unvollständigen Zytokinese bilden sich mehrkernige Zellen (Uren et al. 2000, Conway et al. 2002). Survivin ist ein für die späte Mitose und besonders für die Zytokinese essentielles Protein (Uren et al. 2000, Adams et al. 2001). Interessant ist, dass der „knock down“ eines funktionellen Partners von Survivin, INCENP, die gleichen funktionellen Störungen der Mitose verursacht. Es wird eine essentielle Rolle beider Proteine für die Mitose beschrieben (Uren et al. 2000, Wheatley et al. 2001).

Eine zweite Funktion von Survivin ist die eines IAP. Es reguliert den programmierten Zelltod durch die Inhibierung der Apoptosekaskade im Bereich der Kaspasen (Tamm et al. 1998, Shankar et al. 2001, Conway et al. 2002, Shin et al. 2001, Marusawa et al. 2003). Weiterhin könnte Survivin auch einen kaspaseunabhängigen Zelltod inhibieren (Shankar et al. 2001).

Obwohl einige Autoren eine direkte physische Interaktion der Effektor-kaspasen-3 bzw. -7 zeigten (Conway et al. 2000, Tamm et al. 1998, Shin et al. 2001) widersprechen dem die Befunde anderer Autoren (Banks et al. 2000, Verdecia et al. 2000, Marusawa et al. 2003). In Röntgenkristallstrukturanalysen wurde nachgewiesen, dass Survivin die notwendigen Kaspasebindungsdomänen anderer IAP nicht aufweist (Verdecia et al. 2000, Shi 2000).

Survivin inhibiert eher eine mitochondriale Apoptose als einen Rezeptor-vermittelten Zelltod. So verursacht eine Survivinreduktion bei heterozygoten „Survivin +/- Mäusen“ oder der Einsatz einer dominant-negativen Survivinmutante eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer mitochondrial-bedingten Apoptose (Conway et al. 2002, Blanc-Brude et al. 2003). Dies ist mit einer Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien und der Aktivierung der Kaspase-9 (Mesri et al. 2001, O'Connor et al. 2000a) assoziiert. Schließlich führt dies zur Entstehung des Apoptosoms unter Einbeziehung von Apaf-1 und der Induktion der Apoptose (Blanc-Brude et al. 2003).

Survivin wird ferner durch das TSG p53 reguliert (Hoffman et al. 2002, Mirza et al. 2002, Zhou et al. 2002). Das Survivin-Gen zeigt eine p53-Bindedomäne. Wenn p53 bindet, wird die Transkriptionseffizienz des IAP verringert (Hoffman et al. 2002). Mutiertes p53 verliert

dagegen die Fähigkeit, Survivin zu regulieren (Mirza et al. 2002). Insgesamt ist die Wechselwirkung von p53 und Survivin in Tumoren noch nicht umfassend untersucht.

Auch in die Angiogenese ist das Survivinprotein involviert. In normalen Endothelzellen ist Survivin kaum nachweisbar, wenn aber VEGF (vaskulärer-endothelialer Wachstumsfaktor) oder bFGF (basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor) appliziert wird, erhöht sich die Survivinexpression um das 10 bis 20-fache (Tran et al. 1999, O'Connor et al. 2000b). Die Survivinexpression, die durch VEGF/ bFGF induziert wird, kann somit das Zellüberleben der Endothelzellen gegenüber Chemotherapeutika verbessern und die Apoptose dieser Zellen verhindern (Tran et al. 2002).

Die Survivinexpression kann durch NF- $\kappa$ B- und PI3-Kinaseinhibitoren (Zhu et al. 2001) inhibiert oder durch Interleukin-11 sowie Hypoxie induziert werden (Mahboubi et al. 2001, Conway et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Survivin sehr komplex reguliert wird. Es ist in verschiedene Steuerungsprozesse der Zelle involviert und stellt somit einen „Knotenpunkt“ verschiedener zellphysiologischer Wege dar.

### 1.5.3 Survivin-Expression von normalen und transformierten Geweben

Survivin wird in verschiedenen Geweben während der fötalen Entwicklung sowie in Stammzellschichten der Epidermis, der endokrinen Pankreas und des Thymus gefunden (Adida et al. 1998b).

Es ist aber auch in einer Vielzahl von humanen Tumoren nachweisbar, wird jedoch nicht in terminal differenzierten Normalgewebezellen exprimiert (Ambrosini et al. 1997, Adida et al. 1998b, Velculescu et al. 1999, Übersicht in Altieri 2003a). Eine Überexpression von Survivin wurde z.B. in Tumoren der Lunge (Monzo et al. 1999), der Mamma (Tanaka et al. 2000), des Darms (Kawasaki et al. 1998), des Magens (Lu et al. 1998), der Pankreas (Satoh et al. 2001), der Blase (Swana et al. 1999, Smith et al. 2001), der Leber (Ikeguchi et al. 2002b), der Ovarien (Yoshida et al. 2001), bei Leukämien (Adida et al. 2000b, Adida et al. 2000a, Kamihira et al. 2001), Neuroblastomen (Adida et al. 1998a, Islam et al. 2000b), in Hirntumoren (Chakravarti et al. 2002, Kajiwara et al. 2003) sowie Melanomen (Grossman und Altieri 2001, Gradilone et al. 2003) beschrieben.

Für einige Tumoren konnte die Überexpression von Survivin als ein negativer Prognosemarker für die betroffenen Patienten identifiziert werden (Übersicht in Altieri 2003b).

So zeigen auch Oligonukleotid-Studien, dass die Survivinüberexpression ein negativer Prognosemarker u.a. für Hodgkin's Lymphome und Kolorektalkarzinome ist (Kuttler et al. 2002, Williams et al. 2003).

Immunhistochemische Untersuchungen belegen, dass die Lokalisation des Proteins unterschiedlich prognostisch bewertet wird. So wurde die Kernlokalisierung des Survivinproteins mit einem längeren krankheitsfreien Intervall für Patienten mit Blasen Tumoren nachgewiesen (Lehner et al. 2002). Eine andere Studie beschreibt, dass die Kernlokalisierung von Survivin mit einer guten Prognose verbunden ist und die zytosolische Lokalisation keine Korrelation zur Prognose von Magentumorpatienten hat (Okada et al. 2001). Eine positive Relation zum Gesamtüberleben wurde bei einer Kernexpression von Survivin bei Mammakarzinom-Patienten nachgewiesen (Kennedy et al. 2003). Demgegenüber konnte bei Klarzellkarzinomen, Adenokarzinomen des Ovars und Speiseröhren-Plattenepithelkarzinomen die Kernlokalisierung von Survivin mit einem kürzeren krankheitsfreien Intervall assoziiert werden (Yoshida et al. 2001, Grabowski et al. 2003). Eine weitere Studie zeigt, dass die Kernlokalisierung von Survivin mit einem höheren Proliferationsindex bei Leberzellkarzinomen verbunden ist (Ito et al. 2000). In Lymphomen wird Survivin nur im Zellkern nachgewiesen. Eine erhöhte Survivinexpression ist mit einem höheren Proliferationsindex und mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Patienten korreliert (Martinez et al. 2004).

Die Ursachen der Überexpression von Survivin sind vielfältiger Natur und ursächlich in der deregulierten Natur der Tumorzellen zu suchen. So liegt das Survivin-Gen in Neuroblastomen gehäuft amplifiziert vor (Islam et al. 2000b). In Ovarialtumoren ist die Gensequenz des Exon 1 im Gegensatz zum Normalgewebe demethyliert (Hattori et al. 2001) und in Tumorzelllinien scheint die Promotoraktivität generell erhöht zu sein (Li et al. 1998). Die Möglichkeit, dass das Mitose-assoziierte und -exprimierte Survivin deshalb in Tumoren überexprimiert ist, weil sich diese Zellen häufiger als Normalgewebezellen teilen, konnte widerlegt werden (Grossman et al. 1999). Survivin ist in Tumoren generell dereguliert und ist in diesen Zellen in allen Zellzyklusphasen zu finden (Altieri 2003b).

Wesentlich ist ebenso die negative Regulation der Survivinexpression durch wt-p53 (Hoffman et al. 2002, Mirza et al. 2002, Zhou et al. 2002). Weil viele Tumoren mutiertes p53 exprimieren (O'Connor et al. 1997), könnte diese Regulation von Survivin in Tumoren erheblich gestört sein. Interessant ist weiterhin die Tatsache, dass in vielen Tumoren der entwicklungspezifische Wnt/TCF-„Pathway“ gestört ist. Via wt-APC („adenomatous polyposis coli“-Gen) wird Survivin normalerweise negativ reguliert (Zhang et al. 2001). Für Kolorektalkarzinome, die teils APC-Mutationen aufweisen, wurde gezeigt, dass dieses Regulationsdefizit zu einer erhöhten Survivinexpression führt, was eine Inhibierung der Apoptose verursacht (Zhang et al. 2001). Es wurde postuliert, dass die so erhöhte Survivinexpression zu einer verstärkten Produktion proliferativer Stammzellen und zur Initiation der Tumorgenese führt (Zhang et al. 2001).

## 1.6 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des Apoptoseinhibitors Survivin für humane Weichteilsarkome (WTS) analysiert werden.

Weil für Leukämien und maligne epitheliale Tumoren Survivin zum Teil als ein prognostischer Faktor beschrieben wurde, interessierte mich, ob die Survivinexpression auch für WTS eine prognostische Aussagekraft besitzt. Zur Klärung dieser Frage musste die mRNA-, und gegebenenfalls auch die Proteinexpression von Survivin unter Verwendung der klinischen Daten der WTS-Patienten statistisch ausgewertet werden.

Sowohl die prognostische Bedeutung der Expression von Gesamtsurvivin, als auch die Expression der Survivin-Varianten sollten analysiert werden. Ferner war die Frage zu beantworten, ob Survivin auch im Normalgewebe nachweisbar ist.

In zellbiologischen Experimenten wollte ich unterschiedliche Survivin-Konstrukte in Tumorzellen exprimieren, um die Überexpression von Survivin zu visualisieren.

Als therapeutisches „Anti-Tumor-Target“ wurde Survivin ausgewählt, weil es verstärkt in zahlreichen Tumoren, aber nur schwach bzw. gar nicht in normalem Gewebe exprimiert wird. Dabei wurde versucht, die Survivinexpression in WTS-Zelllinien zu hemmen. Die zellbiologischen Effekte dieser Inhibition von Survivin sollten durch die Analyse der Apoptoserate, der möglichen Veränderungen des Zellzyklus und des klonogenen Zellüberlebens dargestellt werden.

Ferner sollten die Effekte einer Bestrahlung in Kombination mit einer Survivininhibierung an WTS-Zelllinien zellbiologisch untersucht werden.

Letztlich war die Frage zu klären, ob Survivin ein prognostischer und therapeutischer Marker für WTS-Patienten ist.

## 2 Material

### 2.1 Tumormaterial

#### 2.1.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien wurden aus Tumoren angelegt (Tab 2.1). Die verwendeten ATCC-Zelllinien (Rockville, MD, USA) bezog unser Labor von der Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (DSM Braunschweig). Die humanen Sarkom-Zelllinien US 8-93, LMS 6-93 und die Fibroblastenzelllinie sind im Labor von Herrn PD Dr. Taubert etabliert worden.

Tabelle 2.1 Verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Entität	p53-Gen-Status	ATCC	Referenzen
A-204	RMS	wt/wt	HTB-82	Giard et al. 1973 Bache et al. 1997
RD	RMS	mt/-	CCL-136	McAllister et al. 1969 Stratton et al. 1990
SAOS-2	OS	-/-	HTB-85	Fogh 1975, Masuda et al. 1987
SKLMS-1	LMS	mt/-	HTB 88	Fogh 1975
US 8-93	US	mt/wt		Taubert et al. 1997, Bache et al. 1999
LMS 6-93	LMS	mt/wt		Meye et al. 1998, Bache et al. 1999
Fibroblasten		n.b.		-

Abkürzungen: n.b. –nicht bestimmt, LMS-Leiomyosarkom, OS-Osteosarkom,

RMS-Rhabdomyosarkom, mt-Mutation, wt-Wildtyp, US-undifferenziertes Sarkom

#### 2.1.2 Patientengut

Das verwendete Tumormaterial bzw. das nicht-transformierte Normalgewebe stellte die Klinik für Allgemein Chirurgie der Universität Halle-Wittenberg und die Chirurgische Klinik 1 der Universität Leipzig (Herrn PD Dr. med. Peter Würll) zur Verfügung. Das Frischmaterial wurde zeitnah nach der Tumorsektion in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Tumorproben wurden anonymisiert und mit den klinischen Daten in einer Tumordatenbank aufgenommen



(vgl. Tab. 8.7, Anhang). Die histologische Charakterisierung und Reklassifizierung des Patientenmaterials erfolgte durch erfahrene Pathologen unseres Institutes und folgte der gültigen WHO-Klassifikation von 1993 (Enzinger und Weiss 2001).

Blutproben von gesunden Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg wurden als nicht transformiertes Referenzmaterial genutzt.

## 2.2 Geräte und Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
8-well Objektträger	Lab-Tek (Naperville, USA)
Axiophot/Axioplan/Axiocvert 25 (Fluoreszenzmikroskop)	Zeiss (Göttingen, Jena)
Bechergläser	VWR (Darmstadt)
Biocenter 2001 (Brutschrank),	Biometra (Göttingen)
Kodak Elite II 400 (Röntgenfilme)	Kodak (Stuttgart)
Blott-papier	Biometra (Göttingen)
Digital Kamera Power Shot G2	Canon (Tokyo, Japan)
Einweg-Plastikartikel für Zellkultur (Petrischalen, Gewebekulturflaschen, Pipettenspitzen; Pipetten, Gewebekulturplatten, 6-, 12-well-Platten)	Greiner (Frickenhausen)
Einweg-Plastikartikel für Zellkultur (Zentrifugenröhrchen, Gewebekulturflaschen)	Falcon (Heidelberg)
Einwegspritzen	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Elektrophorese-Gerät	BioPlex (Freiburg)
FACSscan	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Fast-Blotter (16x20 cm, ohne Kühlung)	Biometra (Göttingen)
Handschuhe	VWR (Darmstadt)
ImageMasterVBS	Pharmacia (Freiburg)
Isoton II (Puffer für Z1)	Coulter (Krefeld)
Kryokartons	Nunc (Wiesbaden-Biebrich)
Laminarbox,	Heraeus (Hanau)
Magnatrührer	IKA-Labortechnik (Staufen)
MediaKap2 (Filter)	Bioscience (Fernwald)
Meßzylinder	VWR (Darmstadt)
Mettler AM 100 (Analysewaage),	Mettler (Giessen)
Miniblotter, (16 Spuren, 6X9 cm Gelgröße)	Biometra (Göttingen)
OpitMEM I (Serum-freies Medium)	Life Technologies (Gibco) (Eggenstein-Leopoldshafen)
Parafilm	VWR (Darmstadt)
Pasteurpipetten	Nunc (Wiesbaden-Biebrich)
pH-Meter CG 840	Schott (Hofsheim)
„Pipetboy“ (automatische Pipette),	Bioscience (Fernwald)
Pipetten	Nunc (Wiesbaden-Biebrich)
Plattenreader GENios	Tecan (Grödig, Österreich)
PVDF-Membran (0,45 µm, Westernblotanalyse)	Millipore (Eschborn)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Trio-Thermoblock TB1	Biometra (Göttingen)
Ultraspec III (UV/VIS Spektrophotometer),	Pharmacia (Freiburg)
Ultraturrax T8	IKA-Labortechnik (Staufen)
Universal-30 RF (Zentrifuge)	Hettich (Tuttlingen)

Westernblot-Elektrophorese Mini-Gelkammer-Systeme	Biometra (Göttingen)
Vortex-Schüttler VF2	IKA-Labortechnik (Staufen)
Wasserbad	Julaba Labortechnik (Seelbach)
Wilovert (Umkehrmikroskop),	Hund (Wetzlar)
Z1 (Zellzählgerät)	Coulter (Krefeld)

## 2.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
ACE-Substrat	Biocare Medical (Walnut Creek, Ca. USA)
Aceton	Fluka(Neu-Ulm)
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	Serva (Heidelberg)
Acrylamid-Fertiggele	Biowhittaker (Heidelberg)
Avidin-Biotinylierter Enzym-Komplex	Vector Laboratories (Burlington, Ontario, Kanada)
Agar	Life Technologies (Eggenstein)
Agarose	Serva (Heidelberg)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
„Cell-Cycle-Test“ (DNS-Reagenzkit),	Becton Dickinson (San Jose, USA)
Coomassie	Pharmacia (Freiburg)
Dithiothreitol	VWR (Darmstadt)
Desoxynukleotid Mix (100mM)	Promega (Heidelberg)
DEPC	Serva (Heidelberg)
100 bp-Leiter (DNA-Standard)	Life Technologies (Eggenstein)
Effectene Transfektion Reagenz	Qiagen (Hilden)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	VWR (Darmstadt)
Ethanol (96%)	VWR (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Fötale Kälberserum	Biowhittaker (Heidelberg)
Formaldehyd	VWR (Darmstadt)
G-418 Sulphate (Neomycin)	Life Technologies (Eggenstein)
Giemsa-Lösung	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Glucose	Serva (Heidelberg)
Glycin (99,7%ig)	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid,	Serva (Heidelberg)
Kanamycin	Serva (Heidelberg)
„LB Broth Base“ (Bakterien-Kulturmedium)	Life Technologies (Eggenstein)
Lipofectamin	Life Technologies (Eggenstein)
Magermilchpulver	Humana (Herford)
Magnesiumchlorid	Serva (Heidelberg)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Serva (Heidelberg)
Natriumpyruvat	Biowhittaker (Heidelberg)
2-Mercaptoethanol	VWR(Darmstadt)
PAA-Fertiggele	Biozym (Oldendorf)
Penicillin-Streptomycin Mixtur	Serva (Heidelberg)
Propidiumjodid	Becton Dickinson (San Jose, USA)

Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Protein-Marker für SDS-PAA-Gele	Life Technologies (Eggenstein)
Oligofectamin	Life Technologies (Eggenstein)
Opti-MEMI-Medium (Transfektionreagenz)	Life Technologies (Eggenstein)
Random Primer	Life Technologies (Eggenstein)
RPMI 1640 (Zellkulturmedium)	Biowhittaker (Heidelberg)
Salzsäure (37 % ig)	VWR(Darmstadt)
SDS	Serva (Heidelberg)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Tetracyclin	Serva (Heidelberg)
Tris-HCl	Roth (Karlsruhe)
Trypsin	Serva (Heidelberg)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)

### 2.3.1 Molekularbiologische Kits

Produkt	Hersteller
APO-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega (Heidelberg)
CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit	Becton Dickinson (San Jose, USA)
DuoSet Survivin ELISA Kit	RD
ECL-Western Blotting Reagenz	Amersham, Freiburg
Mycoplasmen-Detektions Kit	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Protein-Assay -Kit	BioRad (Richmond, CA, USA)
Protein-Assay-Kit	Sigma (St. Louis, MO, USA)
QIAamp RNA Blut Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen (Hilden)
QIAshredder Kit	Qiagen (Hilden)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
LightCycler TeloTAGGG hTERT Quantifikation Kit	Roche (Mannheim)
ThermoSequenase Sequencing Kit	Amersham Biosciences (Piscataway, USA)
TOPO-TA Klonierungskit	Life Technologies (Eggenstein)

## 2.4. Antikörper und Enzyme

Tabelle 2.2 Primäre und sekundäre Antikörper

Antigen	Bezeichnung	Hersteller	Ursprungsspezies	eingesetzte Konz.
Actin	Ac15	Sigma	Maus	1:1000
Survivin	AF886	R&D systems	Kaninchen	1:2000
P53	Do-7	Novocastra	Maus	1:100
GFP	-	Clontech	Maus	1:500
Anti-Kaninchen-IgG*	P0446 Sek. Ak.	DAKO	Ziege	1:2000
Anti-Maus IgM*	P0206 Sek. Ak	DAKO	Kaninchen	1:1000
Biotinylierter Anti-Kaninchen	für Immun-histochemie	Vector Laboratories	Kaninchen	1:100

Abkürzungen: sek. Ak-sekundärer AntiKörper, \*-HRP-konjugiert

Tabelle 2.3 Enzyme

Enzyme	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Polymerase	Ampli taq	Applied Biosystems (Weiterstadt)
DNA-Polymerase	Pfu	Stratagen (Heidelberg)
DNA-Polymerase	Hot Star Taq	Qiagen (Hilden)
Endonuklease	SacI, BamHI	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ligase	T4 Ligase	New England BioLabs (Schwabach)
Reverse Transkriptase	SuperScript™II RnaseH <sup>-</sup>	Life Technologies (Eggenstein)

## 2.5 DNA-Konstrukte, Oligodesoxynukleotide und siRNAs

Tabelle 2.4 Oligonukleotide für die RT, PCR und Sequenzierung

Gen	Primer	Sequenz (5'→3') <sup>b</sup>	Lokalisation
Survivin <sup>a</sup>	3C <sup>1*</sup>	TTCCTCCCTCACTTCTCACC	779-760
	4N (SE) <sup>1</sup>	ATGGGTGCCCGACGTTGCCCCCT	50-71
	5C (AS) <sup>1</sup>	TCAATCCATGGCAGCCAGCTGCTC	478-455
	SUR-SacI (SE) <sup>1</sup>	<u>GAGCTC</u> CGCCAGATTTGAATCGC	1-23
	SUR-BamHI (AS) <sup>1</sup>	<u>GGATCC</u> CAATCCATGGCAGCC	477-462
	SVV-1 (SE) <sup>2</sup>	CCGCCAGATTTGAATCGCGGG	1-21
	SVV-475-1 (AS) <sup>2</sup>	TATCCATGGCAGCCAGCTGCTC	475-455
	SUR-12 (SE) <sup>2</sup>	GGCGGCGGCGGCATGGGTGCCCGACGT TGCCCCCT	38-73
	SUR5c-EGA (AS) <sup>2</sup>	ATCCATGGCGGCCAGCTGCTC	475-455
	TM_SURF1 (SE)	CAAGGACCACCGCATCTCT	91-109
	TM_SURR 1 (AS)	TCGGCCATCCGCTCC	168-154
GFP	TaqMan Sonde	TGGAGGGCTGCGCCTGCAC	132-150
	GFP-P <sup>1</sup>	CCCCGGTGAACAGTTCTTCGC	n. Seq.
T7	T7-P <sup>2</sup>	TAATACGACTCACTATAGGG	

Abkürzungen: AS- Antisenseprimer, n.Seq.- nach Sequenzierung bestimmte Primer, \* -RT-Primer, SE-Senseprimer; <sup>a</sup> -NCBI-Genbank Zugriffsnummer für Survivin (NM\_001168), <sup>b</sup> - in die Primersequenz eingefügte Restriktionsschnittpunkte sind unterstrichen

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen TIB-MOL<sup>1</sup>, Amersham Pharmacia<sup>2</sup>, Dharmacon<sup>3</sup>, bzw. MWG<sup>4</sup> als gereinigtes Lyophilisat bezogen.

Tabelle 2.5 Antisense-, DNAzym-, und siRNA-Oligonukleotide

Gen	DNAzyme und siRNA	Sequenz (5'→3') <sup>b</sup>	bp-Lokalisation
Survivin <sup>a</sup>	OLIGO 1 <sup>1</sup>	GGGCACCCAGGCTAGCTACAACGAGCCGCCG CC	59-41
	OLIGO Inaktive <sup>1</sup>	GGGCACCCAGGCTAGCTACAACCAGCCGCCG CC	59-41
	OLIGO 2 <sup>1</sup>	AGATGCGGGGCTAGCTACAACGAGGTCCTTG	108-92
	OLIGO 3 <sup>1</sup>	AGGCGCAGGGCTAGCTACAACGACCTCCAAG	147-131
	OLIGO 4 <sup>1</sup>	CTCGGCCAGGCTAGCTACAACGACCGCTCCG	170-154

	siRNA-Oligo 1 <sup>3</sup> (SE)	GGACCACCGCAUCUCUACAdTdT	94-112
	siRNA-Oligo, 2 <sup>3</sup> (AS)	UGUAGAGAUGCGGUGGUCCdTdT	112-95
Nicht-Sinn- Kontrolle	siRNA-Oligo, 3 <sup>3</sup> (SE)	ACAUCUCUACGCCACCAGGdTdT	Nicht-Sinn
Nicht-Sinn- Kontrolle	siRNA-Oligo, 4 <sup>3</sup> (AS)	CCUGGUGGCGUAGAGAUGUdTdT	Nicht-Sinn
Luziferase	Luciferase GL2 siRNA duplex <sup>4</sup>	CGTACGCGGAATACTTCGA	Keine Zielsequenz im humanen Genom 1368-1352
Survivin	1344 <sup>2</sup> ODN Antisense	AGCAGCCCAGCCAGTCC	

<sup>a</sup>-NCBI-Genbank Zugriffsnummer für Survivin (NM\_001168)

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen TIB-MOL<sup>1</sup>, Amersham Pharmacia<sup>2</sup>, Dharmacon<sup>3</sup>, bzw. MWG<sup>4</sup> als gereinigtes Lyophilisat bezogen (entsalzt und entschützt).

## 2.6 Plasmide

Plasmid	Plasmideigenschaften	Hersteller
EGFP	pEGFP-N1 (4,7 kb) CMV Promotor, Kan <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	Clontec
GFP	pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (6,2 kb), CMV-Promotor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	Invitrogen
PEGFP-N3	PEGFP, 50-470 bp kloniertes Survivin (Schnittstellen KPNI/BamHI)	<sup>a</sup>

<sup>a</sup>-Labor Prof. Dr. C. G. Gerharz (Universität Düsseldorf)

Tabelle 2.6 Konstruierte Plasmide

Plasmidbe- zeichnung	Benutzer Vektor	Insert	Restriktions- schnittstellen
pSurvivin GFP	pcDNA3.1/CT-GFP- TOPO ,pEGFP-N1'	Survivin cDNA (429 bp) 50-478	SacI/BamHI
pΔEx3-EGFP	pcDNA3.1/CT-GFP- TOPO ,pEGFP-N1'	Survivin-ΔEx3 cDNA (311 bp) 50 –478 – Exon 3 (118 bp)	SacI/BamHI
P2B-EGFP	pcDNA3.1/CT-GFP- TOPO ,pEGFP-N1'	Survivin 2B cDNA (498 bp) 30-470 +69 bp Exon 2B	SacI/BamHI

## 2.7 Bakterienstämme

Top10 (Invitrogen) f-mrcA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mrcBC) $\Phi$ 80LacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR  
recA1 raD139  $\Delta$ (araA<sub>leu</sub>)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

## 2.8 Puffer und Lösungen

Alle nachfolgend aufgeführten Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Standardmethoden angefertigt und angewendet (Sambrook et al. 1989). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) erfolgte durch das Routinelabor des Institutes für Pathologie.

### 3 Methoden

#### 3.1 Isolierung und Vermessung von Nukleinsäuren

##### 3.1.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy RNA-Isolations-Kit (Qiagen) nach dem Herstellerprotokoll isoliert und in DEPC-Wasser (0,01%) gelöst. Die verwendeten Zellen, Gewebe oder Blutproben konnten mit dem Qiagen-QIAshredder Kit homogenisiert und nachfolgend auf einer RNeasy-Säule gereinigt werden. Nach der Zentrifugation der Proben und einigen Waschschritten, wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur späteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

##### 3.1.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die verwendeten Plasmide (vgl. Tab. 2.6 und Kap. 3.3.3) wurden den Angaben des Herstellers entsprechend isoliert und gereinigt (Plasmid Mini und Maxi Kit, Qiagen). Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Mittels Sequenzierung mit T7-Primer konnten die klonierten Plasmidkonstrukte auf ihre richtige Orientierung und auf Mutationen hin überprüft werden.

##### 3.1.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte spektrophotometrisch. Dabei wurden die Extinktionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration und der Reinheit der Nukleinsäuren kamen folgende Formeln zur Anwendung:

$$K(\text{RNA}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 40 \quad [\text{in } \mu\text{l/ml}]$$

$$K(\text{DNA}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 50 \quad [\text{in } \mu\text{l/ml}]$$

Die Reinheit der Nukleinsäuren errechnet sich als Quotient der  $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ .

#### 3.2 Reverse Transkription, Polymerasekettenreaktion, Reinigung und Sequenzierung von PCR-Produkten

##### 3.2.1 Reverse Transkription (RT)

Die mRNA ließ sich mittels reverser Transkription in cDNA umschreiben. Für einen 20 $\mu\text{l}$  Ansatz wurden 1 $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA und Zufallsprimer (Random oder Survivin-spezifischer

Primer 3C) in 11µl Wasser für 2 min auf 70°C erwärmt und dann auf 0°C abgekühlt. Der Ansatz musste durch Zugabe eines Mastermixes komplementiert werden (vgl. Tab. 3.1). Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (TrioTermoblock, Biometra), wobei das Gerät je nach verwendeten Primern verschiedene RT-Programme ausführte (vgl. Tab. 3.1). Der Ansatz wurde für 5 min bei 72 °C denaturiert und die cDNA bei –80 °C gelagert.

Tabelle 3.1 Ansätze für die Reverse Transkription

Reagenzien	Survivin- spezifische RT	unspezifische RT
RT-Puffer *	1X	1X
jedes dNTP *	25 µM	25 µM
Primer	10 pmol (3C)	3 µg Random Primer
Polymerase*	12 u MLV-RT	200 u SuperScript™II RnaseH
Dithiothreitol *		10 mM
Bedingungen	1 Stunde bei 37°C	75 min bei 42°C

\*- Bestandteile des Mastermixes

### 3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In der PCR ließen sich 2 µl (ca. 100 ng) cDNA in folgendem Standard-Ansatz (25 µl Volumen) amplifizieren (vgl. Tab. 3.2).

Tabelle 3.2 Ansätze für die PCR

Reagenzien	Ansatz mit den Primern 4N und 5C*	Ansatz mit Primern TM_SURF1 und TM_SURR1 <sup>#</sup>	Ansatz mit allen anderen Primern
PCR-Puffer	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	4 mM	3 mM
dNTPs	50 µM	200 µM	50 µM
Primer (AS)	25 pmol	100 ng	10 pmol
Primer (SE)	25 pmol	100 ng	10 pmol
Polymerase	0,8 U Ampli Taq, 0,04 U Pfu	1 U Taq-Polymerase	4 U Hot Star Taq
Q-Solution			8 µl
PCR-Bedingungen	1X 95°C, 5 min 35X 95°C, 1 min 35X 60°C, 1 min 35X 72°C, 2 min 1X 72°C, 5 min	1X 95°C, 15 min 35X 95°C, 1 min 35X 59°C, 1 min 35X 72°C, 2 min 1X 72°C, 10 min	1X 95°C, 15 min 35X 95°C, 1 min 35X 56-63°C, 1 min 35X 72°C, 2 min 1X 72°C, 10 min

\*- nach einem Protokoll von Dr. Diestelkötter (Institut für Immunologie, Universität Dresden) , <sup>#</sup>- nach einem Protokoll von Dr. Köhler (Roboscreen GmbH, Leipzig)



Jeder Ansatz beinhaltete jeweils eine Negativ- (Wasserkontrolle) und eine Positivkontrolle. Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben bis zur elektrophoretischen Auftrennung (vgl. Kap. 3.2.3) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die für Klonierungsexperimente amplifizierten PCR-Produkte mussten auf Mutationen hin kontrolliert (sequenziert) werden.

### 3.2.3 Aufreinigung und Isolierung von PCR-Produkten

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 1,5-2%igem Agarose-Gel, unter Verwendung von 10X Bromphenolblau-Puffer. Die Auftrennung ließ sich in einer Gelkammer bei etwa 10 V/cm durchführen. Die PCR-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, gereinigt (Qiaquick Gel Extraktionskit) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein verwendeter Längenstandard diente zur Abschätzung der Größe der erhaltenen PCR-Fragmente.

Lösungen:

TBE (10 X) (pH 8,0)

108 g/l Tris-HCl  
55 g/l Borsäure  
40 ml 0,5 M EDTA  
aufbewahren bei  $4^{\circ}\text{C}$ ,  
vor der Verwendung  
[100 ml 0,5X TBE-Puffer mit  
5  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidlösung versetzen (10mg/l)].

10X Bromphenolblau: 20% Ficoll 400  
0,05 M EDTA  
0,25 % Bromphenolblau  
5,7 % Eisessig

### 3.2.4 DNA-Sequenzierung und Reinigung der Sequenzierprodukte

Die Sequenzierung der gereinigten PCR-Fragmente ( $< 1\mu\text{g}$ ) erfolgte unter Verwendung von 3 pmol Primern, 6  $\mu\text{l}$  Sequenziermix in 20  $\mu\text{l}$  Endvolumen, mittels des „Thermo Sequenase II dye terminator cycle sequencing kit“. Dabei wurde folgendes Programm verwendet: 35 Zyklen bei  $96^{\circ}\text{C}$  für 30 s (Denaturierung),  $52^{\circ}\text{C}$  für 50 s (Primeranlagerung),  $60^{\circ}\text{C}$  für 3 min (Syntheseschritt). Anschließend wurde das Sequenzierprodukt in 60  $\mu\text{l}$  95%igem Ethanol und 2  $\mu\text{l}$  3M Natriumacetat gefällt und 20 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstands musste das Präzipitat mit 500 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 4  $\mu\text{l}$  Formamid-Puffer gelöst werden. Die Sequenzierung erfolgte im ZMG (Medizinische Fakultät Martin-Luther-Universität) mit dem ABI373 Prism DNA-Sequencers (Perkin Elmer). Die Sequenziererergebnisse wurden computergestützt

ausgewertet und mit den Wildtyp-Survivin-Sequenzen der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) verglichen.

### 3.3 Klonierung, Verdau und Ligation von DNA-Fragmenten

#### 3.3.1 Verdau von cDNA mit Endonukleasen

Die Spaltung von modifizierten bzw. in Plasmide klonierten DNA-Konstrukten erfolgte mit den Restriktionsenzymen SacI und BamHI (vgl. Tab. 2.3), den Angaben des Herstellers entsprechend. 20 µl Konstrukt konnten mit jeweils 10 U beider Endonukleasen für 3 Stunden geschnitten werden. Anschließend ließ sich das geschnittene Konstrukt auf einem 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch auftrennen, ausschneiden, reinigen und für eine Ligation verwenden (vgl. Kap. 3.2.3).

#### 3.3.2 Ligation von DNA-Konstrukten

Für die direkte Klonierung von PCR-Produkten wurde der pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO Kit (Life Technologies, Eggenstein) den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Um mit Restriktionsenzymen geschnittene Konstrukte zu ligieren, wurden 2,5 µg DNA-Konstrukt und 3,5 µg geöffneter Plasmidvektor in 20 µl TE-Puffer (pH=8,9) aufgenommen, 5 min auf 45 °C erhitzt und dann auf 0 °C abgekühlt. Anschließend konnte der Ansatz mit 2 µl Ligasepuffer und 5 U T4-Ligase für 4 h bei 16 °C inkubiert werden.

#### 3.3.3 Transformation von *E.coli*-Bakterien und Kulturansätze

Um kompetente *E.coli*-Bakterien mit den gereinigten Plasmiden zu transformieren, wurde auf die gefrorenen Bakterien 6 µl Ligationsansatz gegeben und dann 15 min auf Eis inkubiert. Nach 1 min bei 42 °C musste der Ansatz für 5 min auf 0 °C gekühlt und dann mit 250 µl Soc-Medium für 1 h bei 37 °C kultiviert werden. Schließlich wurden 50 bzw. 200 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten (Ampicillin bei pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO, Kanamycin bei pEGFP-N1) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Kultivierung der auf Agarplatten gewachsenen Kolonien erfolgte über Nacht bei 37 °C in 5 ml bzw. 100 ml LB-Medium, welches mit Antibiotika versetzt war (Sambrook et al. 1989). Aus den Übernachtskulturen konnten die Plasmide isoliert werden (vgl. Kap. 3.1.2).

### 3.4 Hybridisierung der siRNA

Die komplementären einzelsträngigen RNA-Oligonukleotide wurden nach Zusatz eines „annealing“-Puffers und entsprechend der Herstellerangaben für 1 min bei 90 °C denaturiert und bei 37 °C für eine Stunde hybridisiert. Die siRNA wurden als definierte Stammlösung (20µM) verdünnt und bei –20 °C gelagert.

### 3.5 Western-Hybridisierung

#### 3.5.1 Proteinisolierung aus Patientenmaterial

Das aus Gefrierschnitten (3-5 Schnitte a 5 µM) gewonnene Tumormaterial wurde in 20-50 µl Laemmli-Puffer aufgelöst (Sambrook et al. 1989), anschließend 10 min auf 95 °C erwärmt und mit Ultraschall homogenisiert (5-10 s). Das Gesamtprotein musste durch Zentrifugation (10 min, 12.000 rpm) von Zelltrümmern (DNA) gereinigt werden, dann ließ sich der Proteingehalt im Überstand mit dem Protein-Assay-Kit (Sigma) bestimmen. Die Proteinextrakte wurden bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei –20 °C gelagert.

#### 3.5.2 Proteinisolierung aus humanen Zelllinien

Die trypsinierten Zellen wurden (vgl. Kap. 3.8), nach einem Waschschrift mit PBS, für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und bei –80 °C schockgefroren. Die Isolierung der Proteine erfolgte nach Inkubation der Zellen mit 100 µl Lysepuffer. Dann folgte ein 3-maliger Zyklus, indem das Zellysate jeweils für 3 min auf 37 °C erhitzt und erneut bei –80 °C gefroren wurde. Nach Zentrifugation (10 min, 12.000 rpm) wurde die Konzentration der löslichen Proteine im Überstand mit dem Protein-Assay-Kit (Bio-RAD) ermittelt.

Lösungen:

Lysepuffer für Zellkulturen:

50 mM Tris pH 8,0  
0,3 M NaCl  
1 mM EDTA  
0,5 mM DTT  
0,1% NP 40  
auf 30 ml mit Aqua bidest. auffüllen  
aufbewahren bei 4 °C,  
kurz vor Gebrauch wurde 1/100 Teil  
Protease Inhibitor Cocktail hinzugegeben

## 3.5.3 Westernblot-Analyse

Die gelelektrophoretische Auftrennung von 20-50 µg Gesamtprotein erfolgte unter Zusatz von Bromphenolblau in 10%igen oder 12%igen PAA-Gelen (Biozym Diagnostic bzw. selbst hergestellt) bei 25-30 mA für ca. 1 h. Nach Beendigung der Gelelektrophorese und nach Aktivierung der PVDF-Membran (0,45 µm, Milipore) mittels Methanol, wurden die aufgetrennten Proteine in einer „Fastblot“ Transferkammer unter Verwendung von Transferpuffer auf die PVDF-Membran geblottet (Fastblot, „Halb-Trocken-Blot-Methode“, Biometra bei 460-480 mA/cm<sup>2</sup>; 1,0 bis 1,5 h). Zum Blotten wurden 5 Lagen Blotpapier, die PVDF-Membran, das PAA-Gel und nochmals 5 Lagen Blotpapier in die Apparatur geschichtet. Die Färbung der Proteine erfolgte mit einer 0,1%igen Coomassie-Lösung. Nach der Entfärbung konnte die Membran mit PBS gespült und über Nacht mit Blockierungslösung inkubiert werden. Dann erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern (vgl. Tab. 2.2) für 1-2 h in Antikörperlösung. Nach 3-maligem Waschen (5 min) mit PBS wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugiert) für 1 h inkubiert. Wiederum nach 3-maligem Spülen mit PBS (10 min) wurde die Membran mit ECL-Reagenz (Amersham, Pharmacia) benetzt und die Lumineszenz durch einen Röntgenfilm detektiert (0,5-10 min). Für die Bestimmung der Survivinexpression mussten die Bandenintensitäten der auf einem Röntgenfilm exponierten Survivin- sowie der β-Aktin-Banden densitometrisch mit dem ImaGEMaster 3.0 (Amersham) analysiert werden. Die relative Survivinexpression wurde nach der jeweiligen β-Aktinexpression normalisiert.

## Lösungen:

Trenngel-Lösung (10%ig) 6 ml  
je Gel (Sammelgel:5%ig)

2 ml 30 % Acrylamid, 0,8 % Biacrylamid  
1,2 ml 1,88 M Tris/HCl (pH 8,8)  
1,2 ml 0,5 % SDS  
1,6 ml bidest. H<sub>2</sub>O  
5 µl TEMED  
30 µl APS, 10 % ig

Laufpuffer (pH 8,3) (für 5 l)

15,1 g Tris-Base  
72,0 g Glycin  
5,0 g SDS  
aufbewahren bei RT,

## 2xSDS-Ladungspuffer (Laemmli-Puffer) (pH 7,5)

2 ml 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
8 ml 100 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$   
5 g SDS  
10 g Glycerol  
200 mM DTE  
0,2 % Bromphenolblau  
auf 100 ml mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen  
aufbewahren bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ,

## Transfer-Puffer

25 mM Tris-HCl  
150 mM Glycin  
10 % Methanol  
frisch herstellen,

## PBS für Westernblot (pH 7,2)

8 g/l NaCl  
0,2 g/l KCl  
1,5 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,2 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
aufbewahren bei RT,

## Coomassieblau-Lösung

0,1 % Coomassie  
5 % Essigsäure  
50 % Methanol  
45 % bidest.  $\text{H}_2\text{O}$   
aufbewahren bei RT,

## Entfärbe-Lösung

45 % Ethanol  
10 % Essigsäure  
75 % bidest.  $\text{H}_2\text{O}$   
aufbewahren bei RT,

## Wasch-Lösung

0,05 % Tween-20 /PBS  
frisch herstellen,

## Blockierungsreagenz

Wasch-Lösung  
5% Milchpulver  
frisch herstellen,

## Antikörperlösung

Wasch-Lösung  
2% Milchpulver  
frisch herstellen,

#### 3.5.4 Waschen von PVDF-Membranen

Die gebundenen Antikörper auf bereits verwendeten Membranen konnten mit einer Waschlösung (5 ml 0,625 M Tris HCL (pH 6,7), 5 ml 20%ige SDS-Lösung und 350 µl Mercaptoethanol mit Aqua bidest. auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt) entfernt werden. Die Membran wurde dazu für 30 min bei 55 °C in einem Wasserbad bewegt, schließlich 2 x 10 min mit PBS-Tween gewaschen und mit neuen Antikörpern inkubiert.

### 3.6 Survivin-ELISA

Die Konzentration des Survivin-Antigens im Gesamtprotein (vgl. Kap.3.5.1, 3.5.2) ließ sich mittels des ELISA-Kit (DuoSet ELISA/Assay Development Kit Survivin, RD Systems) bestimmen. Die Untersuchungen wurden im Labor von Dr. Kotzsch (Institut für Pathologie, Universität Dresden) durchgeführt. Es musste jeder well einer 96 well-Platte mit 100 µl Anti-Survivin-Antikörper (0,4 µg/ml RD System) beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert werden. Dann wurde für 2 h in jeden well 100 µl Probenmaterial gegeben, anschließend für 2 h bei RT mit 100µl (100 ng/ml) biotinyliertem Anti-Survivin-Antikörper inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe einer Streptavidin-konjugierten Meerrettich-Peroxidase für 20 min. Die Reaktion wurde durch 100 µl/well 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (KP Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) gestartet und nach 30 min mit 50 µl einer 0,5 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Proteinbestimmung erfolgte über die Messung der Lumineszenz durch einen Plattenreader bei 450 nm (Titertek MS2, ICN, Eschwege). Die relative Proteinmenge der Proben wurde in ng Survivin je mg Gesamtprotein unter Verwendung einer Standardkurve bestimmt.

### 3.7 Immunhistochemie

Der immunhistochemische Nachweis von Survivin wurde mittels polyklonalen Antikörpers AF886 (vgl. Tab. 2.2) durchgeführt. Nach 3 Tagen Kultivierung der Zellen in Flasketten musste das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gespült werden. Nachfolgend konnten die Zellen mit 3%iger PBS-gepufferter Formalinlösung fixiert, dreimalig mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem Kaninchen-Anti-Survivin Antikörper (vgl. Tab. 2.2) inkubiert werden (Verdünnung 1:100). Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte für 30 min die Inkubation mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen-Antikörper (vgl. Tab. 2.2). Nach einem Waschschrift mit PBS konnten die Zellen mit einem Avidin-Biotinylierten Enzymkomplex behandelt und nochmals mit PBS gewaschen werden. Für 10 min erfolgte eine Inkubation mit AEC-Substrat, ein Waschschrift mit bidestilliertem Wasser und die Gegenfärbung mit Hämalaun.

Die immunhistochemische Färbung führte freundlicherweise Frau Beer (Immunhistochemisches Routinelabor, Institut für Pathologie, Halle) durch.

### 3.8 Zellkultivierungstechniken

Für die Zellkultivierung (vgl. Tab. 2.1) wurden Standardprotokolle unserer Abteilung Zell- und Gewebezüchtung genutzt.

Die Zelllinien konnten in Kulturmedium RPMI 1640 mit 15 % FCS, 1 % Natriumpyruvat, 185 U/ml Penicillin, 185 µg/ml Streptomycin bei 37 °C unter 3 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre als adhärente „Monolayer“ kultiviert werden. Hinzu wurden sterile Kulturflaschen (12,5 , 25, 50 ml), 6- oder 24 Loch-Mikrotiterplatten und Flasketten verwendet.

Erreichten die Zellen Subkonfluenz, wurden sie in mehrere Flaschen umgesetzt. Hinzu musste der Überstand entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen werden. Danach erfolgte für ca. 3 min bei 37 °C eine Inkubation mit einer 0,05%ige Trypsin-Lösung, die durch 3 ml RPMI-PBS abgestoppt wurde. Die abgelösten Zellen konnten für 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert werden. Die Zellen wurden in der Regel nach 2-3 Tagen mit frischem Kulturmedium versorgt und in regelmäßigen Abständen mittels DAPI-Färbung auf Mykoplasmen kontrolliert.

Lösungen:

PBS (pH 7,5)

0,4 g KCl  
8,0 g NaCl  
0,3 g NaHCO<sub>3</sub>  
1,0 g D-Glucose  
0,2 g EDTA  
in 1 l dest. H<sub>2</sub>O lösen  
sterilfiltrieren und aufbewahren bei 4 °C,

Kulturmedium

500 ml RPMI-1640 mit HEPES und L-Gln  
80 ml FCS  
10 ml Penicillin/Streptomycin  
5 ml Pyruvat  
aufbewahren bei 4 °C,

RPMI-PBS

100 ml FCS  
10 g/l RPMI-PBS  
in 1 l Aqua dest. lösen und sterilfiltrieren  
aufbewahren bei 4 °C,

Trypsin-Lösung

0,5 g Trypsin  
100 ml PBS  
aufbewahren bei 4 °C

### 3.9 Nichtvirale DNA-Transfektion

#### 3.9.1 Plasmid-Transfektion

Die Transfektion erfolgte in Flasketten oder 6-well Mikrotiterplatten, wofür eine definierte Anzahl von ausplattierten Zellen über 1-2 Tage in RPMI-1640-Komplettmedium bis zu einer 60-80%igen Wachstumsdichte kultiviert wurde. Das Transfektionsprotokoll folgte den Angaben der Hersteller. Für den Transfektionsansatz konnten 0,5-1 µg Plasmid-DNA mit Puffer gemischt und nach Zugabe von „Effectene“ und „Enhancer“ (Qiagen) fertiggestellt werden. Nach Zugabe von Medium wurde das Transfektionsgemisch nach 2-4 Stunden Inkubation durch RPMI-1640-Komplettmedium (mit Zusatz von 300 µg/ml Neomycin) ersetzt.

#### 3.9.2 Transfektionsprotokoll für DNAzyme und siRNA's *in vitro*

Eine definierte Anzahl von ausplattierten Zellen wurden über 2-3 Tage in RPMI-1640-Komplettmedium bis zu einer 60-80%-igen Wachstumsdichte kultiviert. Mindestens 4 h vor dem Transfektionsstart erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS die Inkubation der Zellen in OptiMEM-Medium.

Die DNAzyme (500 nM) und das 4-fache Massenäquivalent Lipofektamin mussten jeweils definiert in OptiMEM-I-Medium für 30 min inkubiert werden, bevor beide Ansätze vermischt wurden. Die Zellen konnten bei 37 °C für 6 Stunden mit dem Reagenzgemisch behandelt werden. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült und bis zur Aufarbeitung (24 h, 48 h und 72 h) in RPMI-1640-Komplettmedium kultiviert.

Für die Transfektion mit siRNA (300 nM) wurde folgendes Protokoll verwendet (für 12,5 ml Kulturflasche): Im ersten Ansatz ließen sich 30 µl siRNA (20 µM) in 490 µl OptiMEM-I-Medium und in einem zweiten Ansatz 30 µl Oligofectamin in 114 µl OptiMEM-I-Medium für 7 min inkubieren. Beide Ansätze wurden vermischt und mit 336 µl OptiMEM-I-Medium 20 min bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen für 6 h mit dem Reagenzgemisch behandelt wurden, musste der Ansatz entfernt und die Zellen mit PBS gespült werden. Die Aufarbeitung erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h. Bis dahin wurden die Zellen in RPMI-1640-Komplettmedium kultiviert.

### 3.10 Anreicherung mittels Vitalzellsortierung (FACSVANTAGE)

Eine PBS-Zellsortierung (FACSVANTAGE, Becton Dickinson) wurde zur Anreicherung GFP-positiver Zellen (>5 % der unsortierten Fraktion) nach Transfektion und mehrwöchiger Kultivierung verwendet. Nach der Transfektion waren etwa drei Anreicherungsstufen



notwendig um ca. 50 % positive Zellen zu erhalten. Die Anreicherung wurde freundlicherweise von Frau OÄ Dr. med. Dagmar Riemann (Institut für Medizinische Immunologie, Halle) durchgeführt.

### 3.11 Zellkoloniebildungstest

Der Zellkoloniebildungstest ist eine Endpunktmessung. Es wird ermittelt, wieviele Einzelzellen teilungsfähig sind und Zellkolonien bilden können. Die Anzahl der Kolonien, die von behandelten Zellen gebildet werden konnte (absolute Plattiereffizienz), wurde mit einer Kontrolle (z.B. Nicht-Sinn-Kontrolle, unbestrahlte Kontrolle) verglichen. Die daraus ermittelte relative Plattiereffizienz dokumentiert den Effekt einer Gentherapie (etwa mit DNAzymen oder siRNA) oder einer Bestrahlung auf die Zellen. Jedes Experiment wurde jeweils als unabhängiger Zweifachansatz durchgeführt.

Für jede untersuchte Zelllinie musste die optimale Plattiereffizienz ermittelt werden, so dass je Test zwischen 300 und 8000 Zellen pro 25 ml Kulturflasche eingestreut werden mussten.

Der Zellkoloniebildungstest wurde wie folgt durchgeführt: Die Trypsin-Behandlung führte zur Ablösung der Zellen, deren Anzahl nachfolgend bestimmt wurde (Coulter, Partikelzählung  $>10 \mu\text{m}$ ). Die Zellen konnten dann definiert in 25 ml Kulturflaschen (Greiner, geschlossener Deckel ohne Filter) eingestreut und bei  $37^\circ\text{C}$  kultiviert werden. Nach 5 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel.

Nach 10-14 Tagen Wachstum wurden die Zellen, nach einem Waschschrift mit PBS, mit 4%iger Formalin-Lösung für 20 min fixiert. Nach dem Waschen mit PBS ließen sich die Zellkolonien mit einer Giemsa-Lösung für 8-10 min anfärben. Abschließend wurden die Zellen dreimalig mit Aqua bidest. gewaschen und luftgetrocknet. Die sichtbaren blauen Kolonien (ab einer Anzahl von ca. 20 Zellen) konnten makroskopisch ausgezählt werden.

### 3.12 Zellzyklus-Analysen

Die Zellzyklus-Analyse detektiert den DNA-Gehalt der Zellen anhand des Einbaus von Propidiumjodid, wodurch eine prozentuale Verteilung der Zellen in der G1-, S- und G2/M-Phase möglich ist. Die Messungen wurden mit dem „CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit“ entsprechend der Angaben des Herstellers am Flowzytometer durchgeführt. Die Zellen wurden trypsiniert und mit dem Überstand vereinigt, für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Mindestens  $5 \times 10^5$  Zellen mussten in 1 ml PBS resuspendiert und dann in 5 ml 80%igem Alkohol fixiert werden. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1500 rpm für 5 min wurde der Überstand entfernt und für 10 min 350  $\mu\text{l}$  RNase-Lösung auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 400  $\mu\text{l}$  Propidiumjodid. Dieser

Ansatz wurde für 10 min und bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, bevor die flowzytometrische Auswertung mit dem CellFit-Programm (Vers 2.0) begann.

### 3.13 Bestrahlung

Die Zellen konnten mit einem Röntgentiefenstrahlengerät Phillips RT 250 (200kV / 0,5 mm Cu, Dosisleistung 2,0 Gy/min) bestrahlt werden (Klinik für Strahlentherapie, Universität Halle). Es wurden 3 bis  $5 \times 10^5$  Zellen je 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche eingestreut und bis zum Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase kultiviert (24-48 h). Nach einer Strahlendosen von 2-10 Gy wurde 0-96 h nach der Bestrahlung die Zellzahl bestimmt und die Zellen analysiert (Bestimmung der RNA-, Protein-Konzentration, Zellkoloniebildungstest, Dapi-Färbung, Kaspase-Assay und Zellzyklusanalysen). Es wurde stets eine unbestrahlte Referenz mitgeführt, welche für die Normierung der Experimente notwendig war.

Die Überlebensfraktion nach einer Röntgenbestrahlung mit 2, 4 oder 8 Gy (bezeichnet als SF2, SF4, SF8) wird als der Quotient aus der Anzahl der Zellkolonien (vgl. Kap 3.11), die bestrahlt wurden, zu der Anzahl der Zellkolonien, die nicht bestrahlt wurden (Kontrollzellen), berechnet.

In Abhängigkeit von der Strahlendosis wurde der Verstärkungsfaktor bestimmt. Dieser ist der Quotient der Überlebensfraktion (SF) einer Survivin-spezifischen-siRNA-Behandlung und der Überlebensfraktion der dazugehörigen Kontrolle (Luziferase-siRNA-Behandlung). Beide Ansätze wurden mit der gleichen Strahlendosis behandelt. Durch diese Berechnung kann der Einfluss der Behandlung auf den Strahleneffekt bestimmt werden.

### 3.14 Apoptose-Nachweismethoden

#### 3.14.1 Kaspase –Assay

Zur Bestimmung der Apoptose-spezifischen Proteasen Kaspase-3 und Kaspase-7 wurde der Apo-ONE Caspase-3/7 Assay (Promega) benutzt. Dafür wurden in einem einheitlichen Volumen RPMI-1640-Komplettmedium, eine je Experiment definierte Zellzahl mit dem jeweils gleichen Volumen eines Puffer/Substrat-Gemisches aufgefüllt und nach mehrmaligem Durchmischen für 0,5-18 Stunden inkubiert. Der Ansatz musste in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt werden, um in einem „Plattenreader“ densitometrisch (Tecan Grödig, Österreich) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm (Emissionsquanten bei 530 nm) vermessen zu werden. Bei jeder Messung wurde eine kaspasefreie Kontrolle, sowie eine nicht behandelte Kontrolle mitgeführt, welche zur Normalisierung des Experimentes genutzt wurden.

### 3.14.2 Apoptose-Nachweismethode (DAPI-Färbung)

Um die Effekte eines Experimentes auf die Apoptoserate zu untersuchen, sind morphologische Analysen des Zellkerns durch eine Anfärbung mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindole) möglich. DAPI interkaliert in die AT-reichen Regionen der DNA.

Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie werden apoptotische Zellen basierend auf charakteristische Morphologien, wie Kernpyknose, Kernfragmentierung und Zellgröße hin analysiert. Dazu wird der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen zur Gesamtzellzahl (es wurden stets 500 Zellen analysiert) ermittelt.

Hierfür mussten die Zellen mit Trypsin behandelt, mit dem Überstand vereinigt, 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und in 80%igem Ethanol fixiert werden. Nach der Fixierung wurden 2,5 bis  $5 \times 10^4$  Zellen 5 min bei 1500 rpm auf einen Objektträger zentrifugiert, der Überstand entfernt und diese Zellen an der Luft getrocknet. Anschließend erfolgte für 5 min die Anfärbung der Zellen mit DAPI (0,1 µg/ml PBS) und ein Waschschrift mit PBS.

### 3.15 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm SPSS 9.0-11.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA). Als signifikant wurden alle Werte, die innerhalb des Wahrscheinlichkeitsintervall von 5 % lagen, eingestuft.

Die statistischen Analysen beinhalteten Überlebensanalysen (Kaplan-Meier-Analysen, multivariate Cox-Regressionsanalysen), T-Tests, Pearson-Test, McNemar-Test, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-Test, Kreuztabellen und Regressionsanalysen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Survivin-mRNA-Expressionsanalyse an humanen WTS-Geweben

Der Apoptoseinhibitor Survivin wurde erstmals 1997 beschrieben (Ambrosini et al. 1997). Sein Nachweis gelang in einigen embryonalen Geweben und in zahlreichen Tumorgeweben (vgl. Kap. 1.5.3). Survivin konnte ferner für verschiedene Karzinome und Leukämien als prognoserelevanter Tumormarker identifiziert werden (Übersicht in Altieri 2003b). Für Weichteilsarkome (WTS) lagen zu Beginn der Arbeit, mit Ausnahme von Neuroblastomen (Adida et al. 1998, Islam et al. 2000), keine Untersuchungen zum Survivin vor. Eine Analyse dieses IAP für WTS erfolgte erstmals in dieser Arbeit. Dazu wurden qualitative und quantitative Analysen der Survivinexpression auf Transkript- bzw. Proteinebene für humane WTS durchgeführt. Mit diesen Ergebnissen wurden anschließend Aussagen zur prognostischen Relevanz der Survivinexpression von WTS-Patienten abgeleitet (Tab. 8.1, Anhang).

#### 4.1.1 Qualitative mRNA-Expressionsstudien

Aus Tumoren von WTS-Patienten gewonnene Gesamt-RNA wurde mit Survivin-spezifischen Primern mittels einer Reversen Transkription (RT) in cDNA (vgl. Kap. 3.2.1) umgeschrieben und durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (vgl. Kap. 3.2.2) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 4.1).

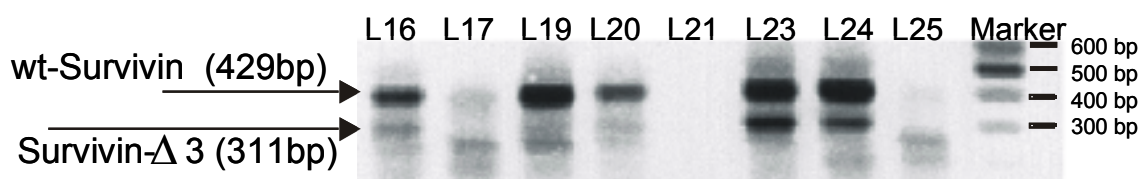


Abbildung 4.1: Nachweis der mRNA von wt-Survivin und der Survivin-Δ3

Nach einer Survivin-spezifischen RT-PCR wurden exemplarisch die Proben L16-L25 (mit Ausnahme der Proben L18, L22) im Vergleich zu einem Größenstandard (100 bp Marker) auf einem Agarose-Gel aufgetragen. Die Expression von zwei Survivinvarianten ließ sich für die Proben L16, L17, L19, L20, L23 und L24 nachweisen. (L=LZ in Tab. 8.7, Anhang)

Die qualitative PCR-Analyse der Survivin-mRNA aller 56 untersuchten Patientenproben detektierte in 36 (64%) Proben wt-Survivin und in 15 (27%) zusätzlich die Survivin-Δ3 (Tab. 8.1, Anhang). In allen 56 Proben konnte eine β-Aktin-spezifische Bande nachweisen werden. Das zeigt, dass die Qualität der untersuchten mRNA ausreichend war. Die Identität der Survivinvarianten wurde durch Sequenzierung (Kap. 3.2.4) sichergestellt. Obgleich Survivin

in einer Reihe von Proben nachweisbar war, ließen sich aus diesen Daten keine prognoserelevanten Aussagen ableiten.

Interessanterweise konnte in 6 (23%) mesenchymalen Normalgewebeproben (z.B. Muskelgewebe) wt-Survivin nachgewiesen werden. Dieser Befund war bis dahin selten beschrieben worden. Vielmehr konnte Survivin oft in Tumormaterial und nicht in Normalgewebe detektiert werden (Überblick in Altieri 2001).

#### 4.1.2 Quantitative mRNA-Expressionsstudien

Der quantitative Nachweis der Expression von Gesamt-Survivin-mRNA wurde mit einem neu etablierten TaqMan-Assay realisiert (in Zusammenarbeit mit der Firma Roboscreen, vgl. Kap. 3.2.2). Zur Analyse musste Gesamt-RNA von 94 WTS-Patienten mit Zufallsprimern in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben werden. Unter Verwendung von PCR-Primern und einer TaqMan-Sonde, die alle Survivinvarianten detektiert, ließ sich die Gesamt-Survivin-mRNA nachweisen. Um nicht das auf dem antikodogenen Survivinstrang kodierte EPR-1 zu amplifizieren, hatten die Primer ihre Konsensussequenz im Exon 1 des Survivingens, da dieses Exon nicht im EPR-1-Gen enthalten ist.

Die Quantifizierung der Survivin-Expression erfolgte mittels geeichter DNA-Standards. Die absolute Survivinmenge ließ sich durch die Messung der GAPDH-mRNA normalisieren. Die relative Survivinexpression wurde als zeptomol Survivin ( $10^{-21}$  mol) je attomol GAPDH ( $10^{-18}$  mol) angegeben.

Mittels dieser sensitiven Nachweismethode waren für 77 (82%) von 94 WTS-Patientenproben Survivin-mRNA nachweisbar. Die Survivinexpressionsdaten von 98 Proben der 94 WTS-Patienten, 22 Normalgewebeproben, drei Lymphozytenproben und vier Sarkomzelllinien sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst. Wurden mehrere Tumoren eines Patienten untersucht, erfolgte die Auswertung unter Berücksichtigung der Daten des Primärtumors.

Tabelle 4.1: Survivin-mRNA-Expression der untersuchten Gewebe

Proben	detektierbare Expression	Mittelwert <sup>a</sup>	Median <sup>a</sup>	Expressionsbereich <sup>a</sup>
WTS-Gewebe (n=98)	81 Proben	9,4	1,8	0-102
Sarkom-Zelllinien (n=4)	4 Proben	9,7	8,9	4,5-16,1
Normalgewebe (n=22)	10 Proben	0,5	0	0-3,8
Lymphozyten (n=3)	3 Proben	1,0	0,9	0,9-1,1

Abkürzungen: <sup>a</sup> - zeptomol Survivin je attomol GAPDH, WTS- Weichteilsarkom

Diese Analysen zeigen, dass die durchschnittliche Survivinexpression in tumorfreien Geweben (Normalgewebe, Lymphozyten) deutlich niedriger als in Tumorgewebe ist (Tab. 4.1). Als Auswertungsparameter für eine Überlebensanalyse wurde deshalb die relative Survivin-Transkriptmenge verwendet.

#### 4.1.3 Korrelation der Survivin-mRNA-Expression mit klinischen Daten von WTS-Patienten

Für die statistische Auswertung wurde ein Grenzwert für die Gesamt-Survivin-mRNA-Expression in den Tumorproben anhand des untersuchten Datenmaterials definiert. Dieser Grenzwert lag, mit Ausnahme von zwei Normalgewebeproben, über den Survivin-Expressionswerten des analysierten Normalgewebes (n=22) und wurde mit 2 zeptomol Survivin / attomol GAPDH festgelegt. Die relative kategorisierte Survivinexpression der Proben konnte mit den Überlebensdaten der WTS-Patienten korreliert werden.

Mittels Kaplan-Meier-Analyse wurde geprüft, ob die intratumorale Survivin-mRNA-Expression mit der Prognose assoziiert ist. In einer ersten Analyse wurden Patienten ohne Rezidiv (57/94) analysiert. Patienten, deren Tumoren >2 zmol Survivin / amol GAPDH exprimierten (n=29), überlebten durchschnittlich 20 Monate (p=0.025) seit der Diagnosestellung. Demgegenüber überlebten Patienten, deren Tumoren  $\leq$ 2 zmol Survivin / amol GAPDH aufweisen, durchschnittlich 49 Monate.

In den weiteren Analysen wurden auch WTS mit einbezogen, die Rezidive entwickelten.

Die als relativ aggressiv eingestuftes Sarkomentitäten LMS und MFH weisen in 70% bzw. 59% der jeweiligen Patientenproben eine Gesamt-Survivin-Expression oberhalb des Grenzwertes auf (Tab. 8.1, Anhang). Im Vergleich dazu war bei lediglich 38% der als weniger aggressiv eingestuftes Liposarkome eine Überexpression nachweisbar (Abb. 4.2).

Für zwei Patienten konnte gezeigt werden, dass in den auftretenden Rezidiven sukzessive eine höhere Survivinexpression nachweisbar war. Ein Patient entwickelte 12, 14 und 20 Jahre nach der Entfernung eines Fibrosarkoms Rezidive mit einer jeweiligen Survivin-mRNA-Expression von 1,7 , 3,6 und 29,0 zmol Survivin / amol GAPDH. Ein zweiter Patient, welcher an einem malignen peripheren Nervenscheidentumor (Survivinexpression von 29,6 zmol Survivin / amol GAPDH) erkrankte, entwickelte innerhalb eines Jahres Rezidive mit einem Expressionsniveau von 0,1 bzw. 102 zmol Survivin / amol GAPDH. Dieser Patient verstarb 3 Monate nach der Entfernung des letzten Rezidivs.

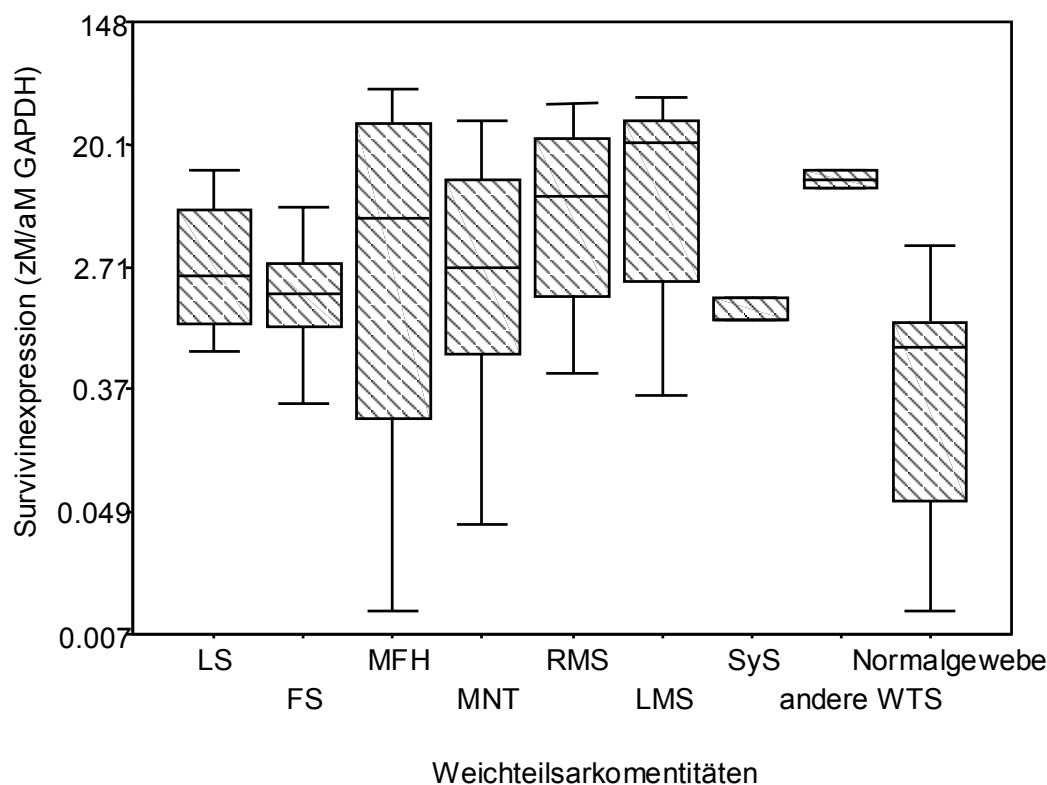


Abbildung 4.2: Boxplot der quantitativen Analyse der Gesamt-Survivin-Expression

Der Plot für das Normalgewebe (22 Proben, 3 Lymphozytenproben) zeigt eine niedrigere durchschnittliche Survivinexpression als die Plots der verschiedenen Sarkomentitäten.

Abkürzungen: FS-Fibrosarkom, LMS- Leiomyosarkom, LS-Liposarkom, MFH-malignes fibröses Histiocytom, MNT- maligner neuraler Tumor, RMS-Rhabdomyosarkom, SyS-synoviales Sarkom, WTS - Weichteilsarkom

In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse, die nach den Parametern Tumorstadium, -entität, -lokalisation und Art der Tumorresektion adjustiert wurde, konnte eine Überlebensfunktion mit einer Risikoabschätzung unter Berücksichtigung der Survivin-mRNA-Expression ermittelt werden. Für die Patientengruppe ( $n=38$ ), deren Tumoren  $>2$  zmol Survivin / amol GAPDH exprimierten, ergab sich ein signifikant erhöhtes Risiko von  $RR=2,7$  ( $p=0,009$ ), an einem WTS zu versterben. Als Referenzgruppe ( $n=41$ ) dienten Patienten deren Tumoren  $\leq 2$  zmol Survivin / amol GAPDH exprimierten (Abb. 4.3). In der Berechnung wurden 79 Patienten mit den Tumorstadien 2-4 berücksichtigt, da aus mathematischen Gründen die Einbeziehung der Patienten mit Tumoren des Stadiums 1 nicht sinnvoll ist (alle Patienten mit Tumoren des Stadiums 1 lebten).

Zusammenfassend ist feststellbar, dass eine Survivin-mRNA-Expression  $>2$  zmol Survivin / amol GAPDH in WTS signifikant mit einem schlechteren Überleben der betroffenen Patienten korreliert. Die Survivin-mRNA-Expression ist ein unabhängiger Prognosemarker für WTS.

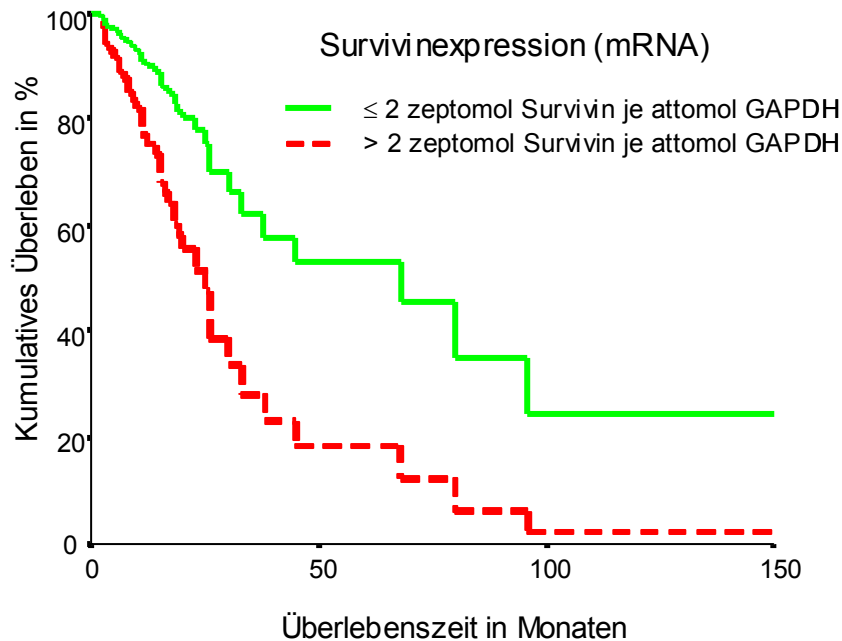


Abbildung 4.3: Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Einfluss der Survivin-mRNA-Expression auf das Gesamtüberleben von WTS-Patienten

Eine Survivin-mRNA-Expression > 2 zmol Survivin / amol GAPDH ist für WTS-Patienten ein negativer Prognosemarker für das Gesamtüberleben (RR=2,7 ; p=0,009).

#### 4.2 mRNA-Expressionsanalyse der humanen Telomerase (hTERT) in Tumoren von WTS-Patienten

Neben Survivin wurde die Expression eines weiteren Gens, das ebenfalls in Tumoren und in embryonalen Geweben nachweisbar ist, untersucht. Dabei handelte es sich um die katalytische Untereinheit des Telomerase-Komplexes (hTERT). Die Bestimmung der Expression der hTERT-mRNA wurde mit einem „LightCycler TeloTAGGG hTERT Quantification Kit“ durchgeführt (Kap. 2.3.1). Dabei wurde die hTERT-Expression zu der Expression von PBGH normalisiert.

Die hTERT-Expressionswerte von 89 untersuchten WTS-Patientenproben und 7 Normalgewebeproben sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. In 2 von 7 Normalgewebeproben war eine hTERT-mRNA-Expression nachweisbar (LZ 4 bzw. LZ 7 mit 0,8 bzw. 5,3 mRNA Kopien hTERT / mRNA Kopie PBGD), obwohl für differenziertes mesenchymales Normalgewebe in der Literatur keine hTERT-Expression beschrieben wird (Terasaki et al. 2004). Für die nachfolgenden Analysen wurde eine hTERT-Expression > 0,8  $\times 10^{-3}$  mRNA Kopien hTERT / mRNA Kopie PBGD als Überexpression festgelegt.



Tabelle 4.2 hTERT-mRNA-Expressionsniveau der untersuchten Gewebe

Proben	detektierbare Expression	Mittelwert <sup>a</sup>	Median <sup>a</sup>	Expressionsbereich <sup>a</sup>
WTS-Gewebe (n=89)	59 Proben	23,9	2,4	0-400
Normalgewebe (n=7)	2 Proben	0,9	0	0-5,3

Abkürzungen: <sup>a</sup> -  $10^{-3}$  mRNA Kopien hTERT / mRNA Kopie PBGD, WTS- Weichteilsarkom

#### 4.2.1 Korrelation der hTERT-Expression mit den klinischen Daten

In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse (adjustiert nach Tumorstadium, -entität, -lokalisierung und Art der Resektion) wurde geprüft, ob die hTERT-mRNA-Expression mit dem Überleben der WTS-Patienten korreliert ist. Patienten (n= 49), deren Tumoren  $> 0,8 \times 10^{-3}$  mRNA Kopien hTERT / mRNA Kopie PBGD aufweisen, hatten ein 4,5fach höheres relatives Risiko ( $p=0,002$ ), an einem WTS zu versterben. Verglichen wurde diese Patientengruppe mit den Patienten (n=26), deren Tumoren eine niedrigere hTERT-Expression aufwiesen (Abb. 4.4). Bei dieser Berechnung wurden 75 Patienten der Tumorstadien 2-4 berücksichtigt (vgl. Kap. 4.1.3).

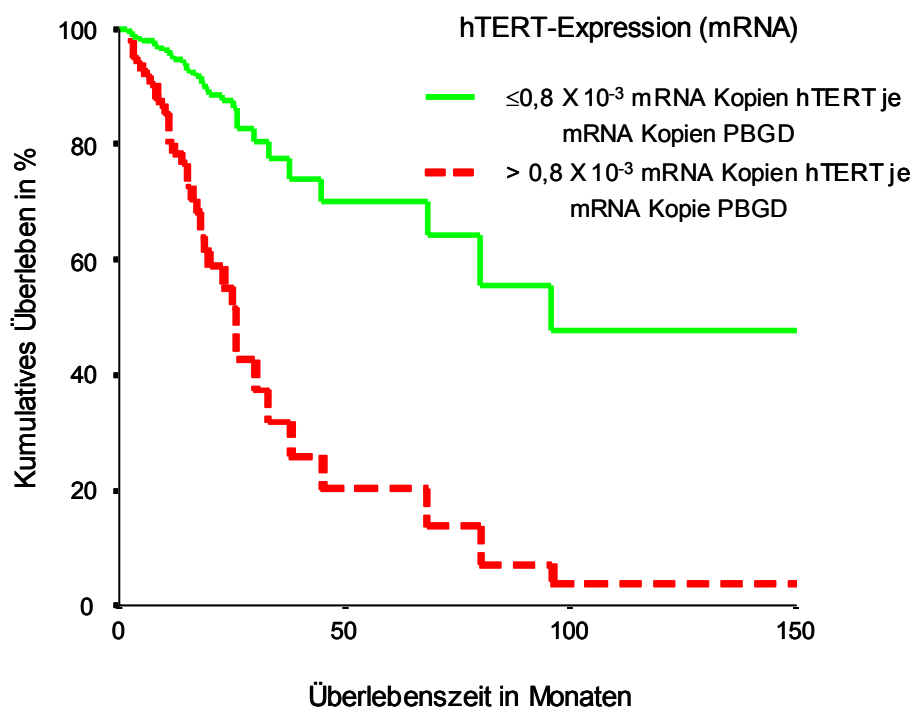


Abbildung 4.4: Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Einfluss einer hTERT-mRNA-Expression auf das Gesamtüberleben von WTS-Patienten.

Eine hTERT-Expression  $> 0,8 \times 10^{-3}$  mRNA Kopien hTERT / mRNA Kopie PBGD ist für WTS-Patienten ein negativer Prognosemarker für das Gesamtüberleben (RR=4,5;  $p=0,002$ ).

### 4.3 Kombination der Expression der Survivin- und hTERT-mRNA und Korrelation mit den klinischen Daten von WTS-Patienten

Die Ergebnisse der Survivin- und der hTERT-mRNA-Expression konnten kombiniert und zur Berechnung einer Überlebensanalyse verwendet werden. Hierzu wurden wiederum die Grenzwerte für die Survivinexpression ( $> 2 \text{ zmol Survivin} / \text{amol GAPDH}$ ) und die hTERT-Expression ( $> 0,8 \times 10^{-3} \text{ mRNA Kopien hTERT} / \text{mRNA Kopie PBGD}$ ) verwendet. Für die Berechnung einer Kaplan-Meier- bzw. einer Cox-Überlebensanalyse konnten vier Gruppen kombinatorisch ermittelt werden:

1. Gruppe: 19 Patientenproben, die weder Survivin noch hTERT über dem jeweiligen Grenzwert exprimierten
2. Gruppe: 26 Patientenproben, die nur hTERT überexprimierten
3. Gruppe: 18 Patientenproben, die nur Survivin überexprimierten
4. Gruppe: 26 Patientenproben, die jeweils beide Gene überexprimierten (Tab. 8.2, Anhang).

Aus der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ergab sich, dass die durchschnittliche Überlebenszeit bei Patienten, deren Tumoren keines der beiden untersuchten Gene überexprimierten (1. Gruppe), bei 124 Monaten lag. Demgegenüber verstarben die Patienten (4. Gruppe), deren Tumoren hTERT und Survivin überexprimierten, im Durchschnitt schon nach 17 Monaten ( $p < 0,0001$ ). Wenn in den Tumoren nur hTERT überexprimiert wurde (2. Gruppe) lag die durchschnittliche Überlebenszeit bei 90 Monaten, bzw. wenn nur Survivin über dem Grenzwert exprimiert wurde (3. Gruppe), bei 74 Monaten (Daten nicht gezeigt).

In einer Cox-Regressionsanalyse (Abb. 4.5), adjustiert nach Tumorstadium, -entität, -lokalisierung und Art der Tumorresektion, konnte für WTS-Patienten, deren Tumoren sowohl hTERT als auch Survivin über den Grenzwerten exprimierten (4. Gruppe,  $n=26$ ), ein relatives Risiko, am WTS zu versterben, von 20,1 ( $p=0,0004$ ) errechnet werden. Für Patienten deren Tumoren nur hTERT (2. Gruppe,  $n=26$ ) bzw. nur Survivin (3. Gruppe,  $n=18$ ) überexprimierten, lag das relative Risiko bei 5,8 ( $p=0,034$ ) bzw. 4,4 ( $p=0,097$ ). Als Bezugsgröße diente die Gruppe 1, welche die Tumoren umfasst, die weder hTERT noch Survivin überexprimierten ( $n=19$ ). Bei dieser Berechnung konnten 75 Patienten der Tumorstadien 2-4 berücksichtigt werden (vgl. Kap. 4.1.3).

Es zeigte sich, dass sowohl die Survivin- als auch die hTERT-mRNA-Expression unabhängige Prognosefaktoren für WTS-Patienten sind. Durch die Kombination dieser beiden Tumorparameter kommt es zu einem super-additiven Effekt für die Prognoseberechnung der WTS-Patienten.

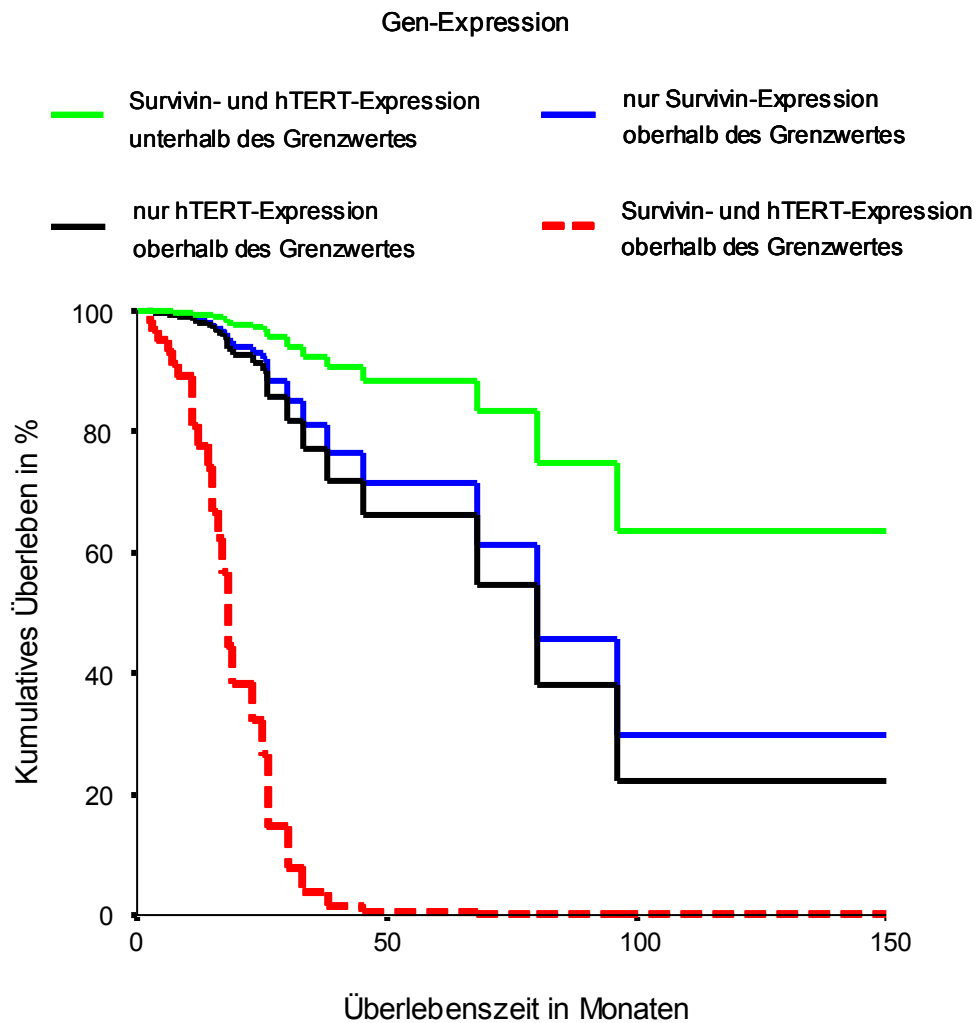


Abbildung 4.5: Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Kombination der Survivin- und hTERT-mRNA-Expression. Wenn sowohl hTERT als auch Survivin jeweils über den Grenzwerten exprimiert wurden, ergab sich für WTS-Patienten ein 20,1fach erhöhtes Risiko ( $p=0,0004$ ), am Tumor zu versterben.

#### 4.4 Survivin-Protein-Expressionsstudien an WTS

Es wurden von 63 WTS-Patienten Proteinproben mittels Westernblot-Analyse (WB) (vgl. Kap. 3.5) und ELISA untersucht (vgl. Kap. 3.6). Ferner konnten 6 Sarkomzelllinien, eine Fibroblastenzelllinie, 10 Normalgewebe- und 4 Lymphozytenproben analysiert werden (Tab. 8.3, Anhang).

Die WB-Analyse von 63 Patientenproben ergab eine durchschnittliche Survivin-Proteinexpression von 1,2 Survivin Einheiten /  $\beta$ -Aktin Einheiten (Tab. 4.3, Abb. 4.6, vgl. Kap. 3.5.3).

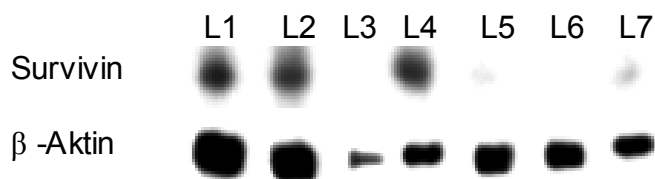


Abbildung 4.6: Exemplarischer WB für die Proben L1-L7.

Dargestellt sind die Signalbanden für Survivin und  $\beta$ -Aktin. Hierbei zeigten die Proben L1, 2, 4 eine starke, die Proben L5, 7 eine schwache und die Proben L3, 6 keine Survivinproteinexpression. Die Auswertung des WB erfolgte wie in Kap. 3.5.3 beschrieben. (L=LZ in Tab. 8.7, Anhang)

Mittels ELISA wurde eine durchschnittliche Survivinexpression von 3,6 ng Survivin/mg Gesamtprotein für die 63 WTS-Patientengewebe ermittelt (Tab. 4.3).

Nach der Analyse von Lymphozytenmaterial und Normalgewebe (Muskelgewebe) (Tab. 8.3, Anhang) wurde ein Grenzwert für die Proteinexpression bestimmt, der über der Proteinexpression des Normalgewebes (ausgenommen zwei Proben) lag. Dies waren Proben aus tumorfreiem Magen- und Milzgewebe (Tab. 8.3, Anhang). Die anderen Normalgewebe- (n=8) und Lymphozytenproben (n=4) exprimierten kein Survivinprotein (Tab. 8.3, Anhang). Ferner wurde in allen WTS-Zelllinien, aber in keiner untersuchten Fibroblasten-Zelllinie Survivinprotein, detektiert (Tab. 8.3, Anhang).

Der Grenzwert der WB-Analyse wurde mit 0,1 relativen Survivin-Einheiten /  $\beta$ -Aktin-Einheit und des ELISA bei 0,5 ng Survivin je mg Gesamtprotein festgelegt.

Tabelle 4.3: Survivinprotein-Expressionsanalyse der WTS-Proben

Proben (n=63)	detektierbare Expression	Mittelwert	Median	Expressionsbereich
Nachweis durch ELISA <sup>a</sup>	WTS-Proben (n=49)	3,6	1,9	0-18,4
Nachweis durch WB <sup>b</sup>	WTS-Proben (n=39)	1,2	0,2	0-8,4

Abkürzungen: <sup>a</sup> - in ng Survivin je mg Gesamtprotein, <sup>b</sup> - in relativen Survivin-Einheiten /  $\beta$ -Aktin-

Die Auswertung der 63 Patientenproben ergab, dass mittels der WB-Analyse 39 (61%) und mit dem ELISA 48 (76%) Proben eine Survivinexpression oberhalb des Grenzwertes aufwiesen. Der statistische Vergleich beider Ergebnisse mit dem Pearson-Test belegt, dass die metrischen Datenreihen der WB-Analyse und des ELISA signifikant korrelierten ( $p=0,013$ ). Jedoch ist der ELISA-Test signifikant sensitiver ( $p=0,022$ ) als der Nachweis einer Survivinproteinexpression mittels WB-Analyse (McNemar-Test, Tab. 8.4, Anhang). Die

Survivinexpression von zwei Proben lag über dem WB-Grenzwert, aber unter dem ELISA-Grenzwert. Hingegen konnten noch 11 Proben durch den ELISA mit einer Survivin-Proteinexpression oberhalb des Grenzwertes identifiziert werden, die im WB kein Survivinsignal aufwiesen.

Die Korrelation zwischen den metrischen Daten der mRNA-Expressionsanalyse und der Survivinproteinexpression mittels der WB-Analyse ergab keinen signifikanten Zusammenhang ( $p=0,41$ ). Dagegen zeigte sich, dass die metrischen Expressionsdaten, die mit dem ELISA ermittelt wurden, eine Grenzwertsignifikanz mit den metrischen Daten der mRNA-Expressionsanalyse ( $p=0,05$ ) aufwiesen. Dieser Fakt könnte mit der Sensitivität beider Tests erklärt werden.

#### 4.4.1 Korrelation der Survivin-Proteinexpression mit klinischen Daten von WTS-Patienten

Die für die WB-Analyse und den ELISA ermittelten Daten konnten durch den festgesetzten Grenzwert kategorisiert werden. Die WB-Expressionswerte wiesen keine signifikante Korrelation zu klinischen Daten auf (vgl. Tab. 8.5, Anhang). Demgegenüber konnte mittels Kruskal-Wallis-Test eine signifikante Korrelation zwischen den ELISA-Expressionsdaten und dem Tumorstadium ( $p=0,03$ ) bzw. dem Tumorgrad ( $p=0,004$ ) ermittelt werden. Ferner zeigte sich, dass aggressive Sarkomentitäten mehr Survivinprotein (ELISA-Daten) exprimierten. So wiesen die weniger aggressiven Liposarkome gegenüber Rhabdomyosarkomen und Leiomyosarkomen ( $p=0,012$ , Mann-Whitney-Test) bzw. maligne fibröse Histiozytomen und Fibrosarkomen ( $p=0,02$ ) signifikant weniger Survivinprotein auf.

Die Cox-Regressionsanalysen zeigten, dass der Nachweis von Survivinprotein sowohl mittels der WB-Analyse als auch mittels ELISA für WTS mit einem höheren relativen Risiko, am Tumor zu versterben, verbunden ist. In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse, adjustiert nach Tumorstadium, -entität, -lokalisierung und Art der Tumorsektion, wurde für 63 WTS-Patienten die Korrelation zwischen Survivin-Proteinexpression und dem Überleben berechnet. Es konnte ein signifikant erhöhtes Risiko von 5,1 ( $p=0,004$ ) bei einem Nachweis von Survivin mittels WB-Analyse ( $n=34$  vs.  $n=19$ ) (Abb. 4.7) und ein 19,8fach erhöhtes Risiko ( $p=0,001$ ) für den Nachweis von Survivin mittels ELISA ( $n=44$  vs.  $n=9$ ) ermittelt werden (Abb. 4.8). Bei dieser Berechnung konnten nur 53 Patienten der Tumorstadien 2-4 berücksichtigt werden (vgl. 4.1.3). Die Ergebnisse der Cox-Regressionsanalysen belegen, dass eine Survivin-Protein-Überexpression, wie schon eine mRNA-Überexpression für WTS-Patienten mit einem erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben, korreliert ist. Die Überexpression von Survivinprotein ist für WTS ein unabhängiger negativer Prognosemarker.

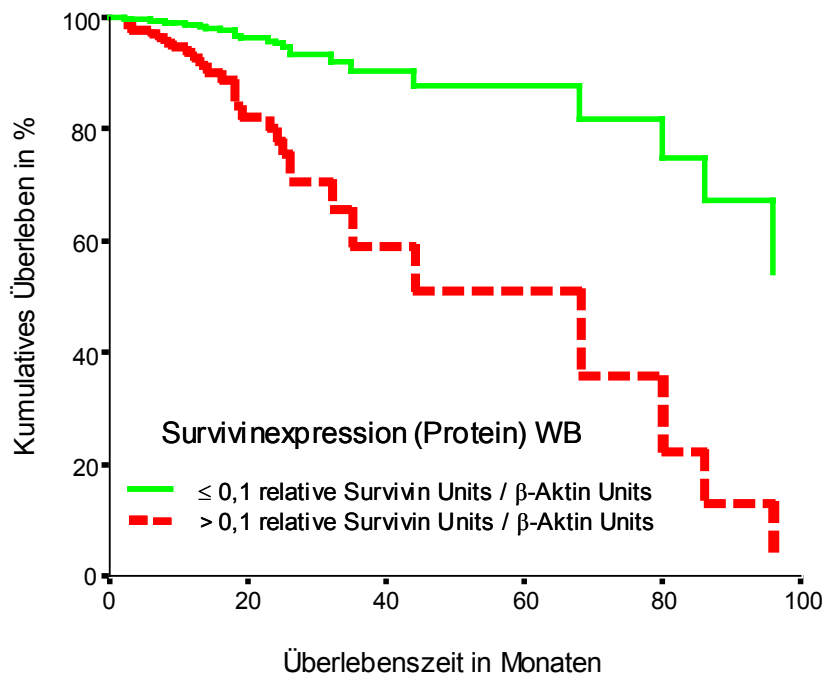


Abbildung 4.7: Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Nachweis von Survivinprotein mittels WB-Analyse. Es zeigte sich, dass ein signifikant erhöhtes Risiko von 5,1 ( $p=0,004$ ), an einem WTS zu versterben, besteht, wenn die Survivinproteinexpression  $> 0,1$  relative Survivin Einheiten /  $\beta$ -Aktin-Einheit ist.

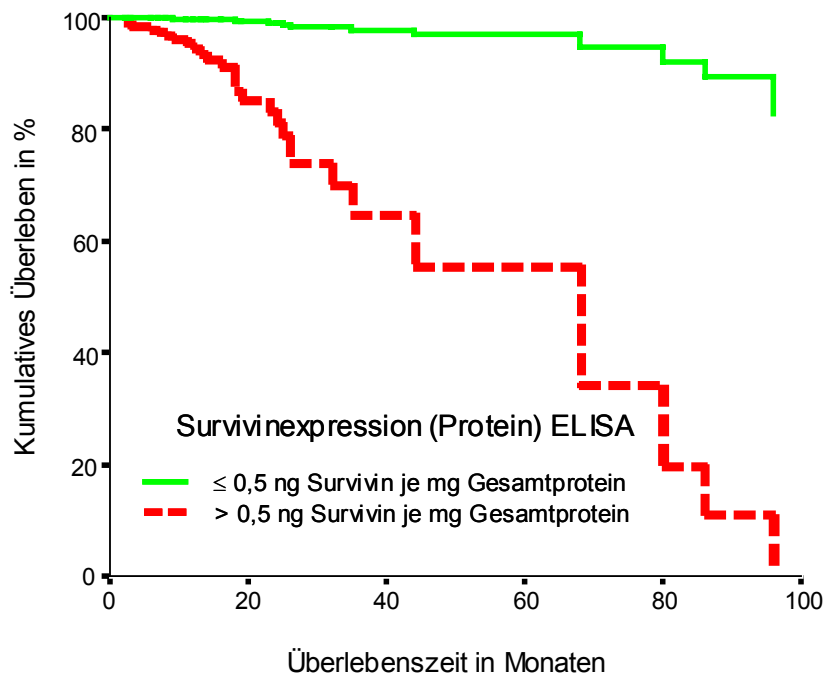


Abbildung 4.8: Multivariate Cox-Regressionsanalyse

Nachweis von Survivinprotein mittels ELISA. Es wurde ein 19,8fach ( $p=0,001$ ) erhöhtes Risiko, an einem WTS zu versterben, bestimmt, wenn die Survivinproteinexpression  $> 0,5$  ng Survivin / mg Gesamtprotein im Tumor war.

#### 4.5 Transfektion von Survivin-GFP-Plasmide in humane Sarkomzelllinien

Um die biologische Survivin-Funktion in Sarkomzelllinien detailliert zu analysieren und die Reprimierung von Survivin in vitalen Zellen direkt nachzuweisen, wurden Survivin-GFP-Plasmide zur Visualisierung des Proteins hergestellt. Die aus peripheren Blutlymphozyten gewonnenen Varianten (wt-Survivin, Survivin-2B, Survivin- $\Delta$ 3) mussten sequenziert werden und konnten dann in einen pEGFP-N1-Vektor (Clontech) kloniert werden (Kap. 3.3.2). Die Transfektion der Plasmide in die Zelllinie US 8-93 (Tab. 2.6) erfolgte wie in Kap. 3.9.1 beschrieben.

Die Transfektionsraten der Plasmide für die Spleißvarianten Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ 3 waren im Vergleich zur GFP-Kontrolle, dem wt-Survivin und einem mt-Survivin-Konstrukt wesentlich niedriger. Wenige Tage nach der Transfektion waren nur noch wenige Zellen, die mit den Survivin-2B oder Survivin- $\Delta$ 3-Plasmiden transfiziert wurden, vital. Mit wt-Survivin oder dem GFP-Kontrollplasmid transfizierte Zellen konnten mittels FACS-Vitalsorter (FACSVANTAGE) von <5% auf bis zu 73% angereichert werden.

Die mit dem wt-Survivin-GFP-Plasmid transfizierte Zelllinie US 8-93 erhielt die Bezeichnung US 8-93 G (Abb. 4.9, Abb. 5.1). Die mit dem GFP-Kontroll-Plasmid transfizierte Zelllinie wurde als US 8-93 K (Abb. 4.10) bezeichnet. Die Wachstumsrate der US 8-93 G unterschied sich nicht von der Kontrollzelllinie US 8-93 K (Abb. 4.12). Die Lokalisation der Fluoreszenz beider Zelllinien zeigte dagegen deutliche Abweichungen. Die Zelllinie US 8-93 G fluoresziert hauptsächlich im Zytoplasma, die Kontrollzelllinie US 8-93 K dagegen auch im Kern (Abb. 4.9, 4.10). Die mit Survivin- $\Delta$ 3-GFP-Plasmiden transfizierten Zelllinien fluoreszierten hauptsächlich im Zellkern. Die Survivin-2B-GFP-Zelllinien fluoreszierten im Kern und im Zytoplasma (Daten nicht gezeigt).

Die Etablierung einer stabil mit Survivin-GFP-Plasmiden transfizierten Zelllinie (US 8-93 G) war nicht möglich. Der Anteil der positiv transfizierten Zellen nahm – obwohl das Selektionsantibiotikum Neomycin verwendet wurde - mit zunehmender Passagierung stetig ab. Nach einem Monat Kultivierung sank die Rate der fluoreszierenden Zellen in der US 8-93 G von 34,4 % auf 16,9 % (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 5.2). Demgegenüber blieben die mit dem Kontrollplasmid transfizierten und angereicherten Zellen der Zelllinie US-8-93 K mit ca. 60% grün-fluoreszierenden Zellen relativ stabil. Ähnliche Beobachtungen konnten bei zwei weiteren Sarkomzelllinien gemacht werden (A 204, RD), die ebenfalls mit den verschiedenen Survivin-GFP-Plasmiden transfiziert wurden.

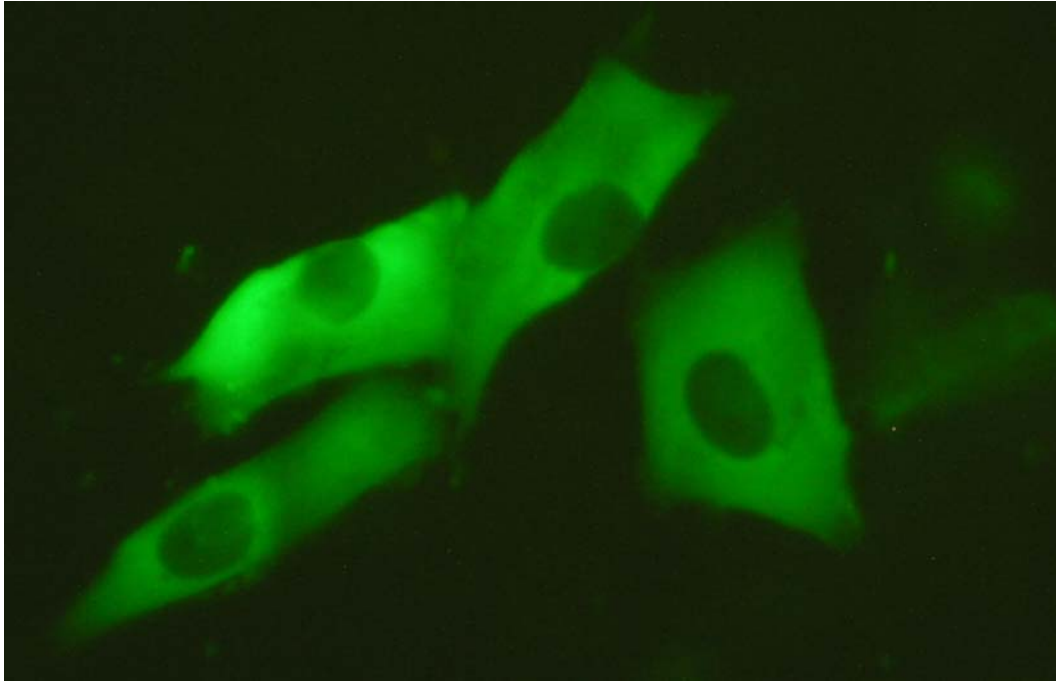


Abbildung 4.9 Mit Survivin-GFP-Plasmid transfizierte grün fluoreszierende Zellen (US 8-93 G). Das Zytoplasma fluoresziert grün, der Zellkern fluoresziert nicht. Inverses Fluoreszenzmikroskop 400x.

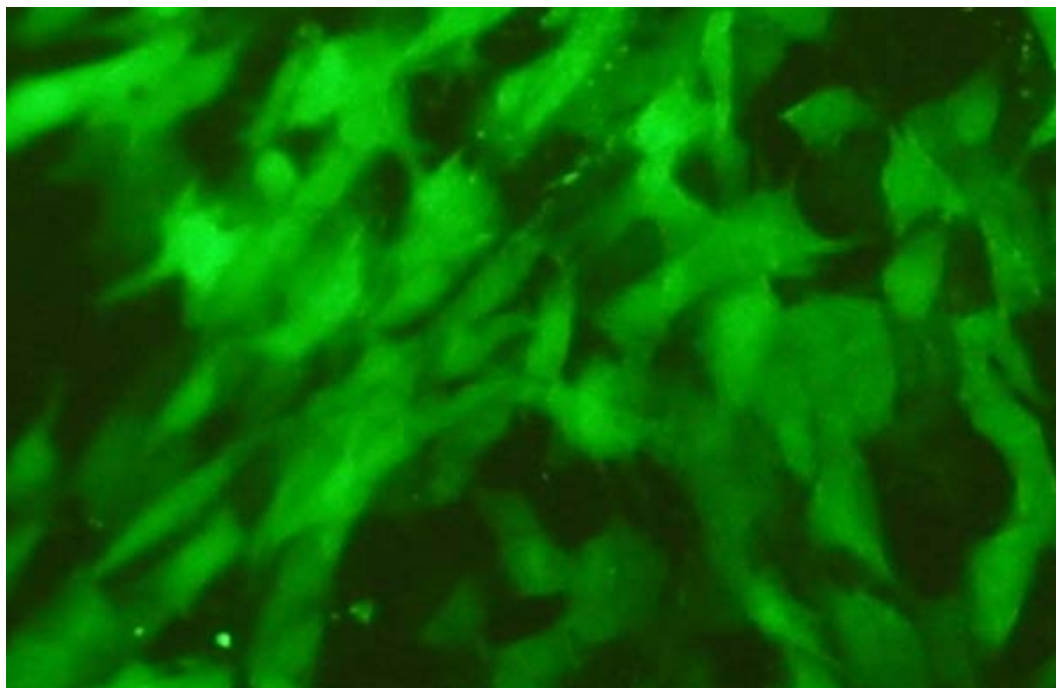


Abbildung 4.10 Mit GFP-Plasmid transfizierte grün fluoreszierende Zellen (US 8-93 K). Die gesamte Zelle fluoresziert grün. Inverses Fluoreszenzmikroskop 200x.



Nach der Anreicherung der transfizierten Zellen wurde die Zellzahl sowie die Survivin-Expression bestimmt (Tab. 4.4, Abb. 4.11, 4.12). Die Survivin-mRNA-Expression in der US 8-93 K (Abb. 4.12) (transfiziert mit einem „leeren“ GFP-Plasmid) und in der US 8-93 (unbehandelte Zelllinie, Abb. 4.11) verringerte sich mit fortschreitender Kultivierungszeit. Nach 7 Wachstumstagen war die Survivin-mRNA-Expression auf ein Zehntel des Ausgangswertes reduziert. Es scheint ein Zusammenhang zwischen der Survivin-mRNA-Expression und der Wachstumsdichte zu bestehen.

Tabelle 4.4 Expressionsniveau von Survivin (mRNA, Protein) 2 Tage nach dem Einstreuen der Zellen (übrige Daten nicht gezeigt)

Zelllinie	mRNA Expression <sup>a</sup>	Proteinexpression <sup>b</sup>
US 8-93 G	69,9	12,4
US 8-93 K	11,1	5,2
US 8-93	9,4	4,6

Abkürzungen: a-zeptomol Survivin je attomol GAPDH, b- ng Survivin je mg Gesamtprotein

In der mit dem Survivin-GFP-Konstrukt transfizierten Zelllinie US 8-93 G blieb die mRNA-Expression über 7 Tage annähernd konstant (Abb. 4.12).

Die Survivinproteinmenge blieb in allen 3 Zelllinien (US 8-93, US 8-93 K und US 8-93 G) in einem Beobachtungszeitraum von 7 Tagen nahezu unverändert (Daten nicht gezeigt).

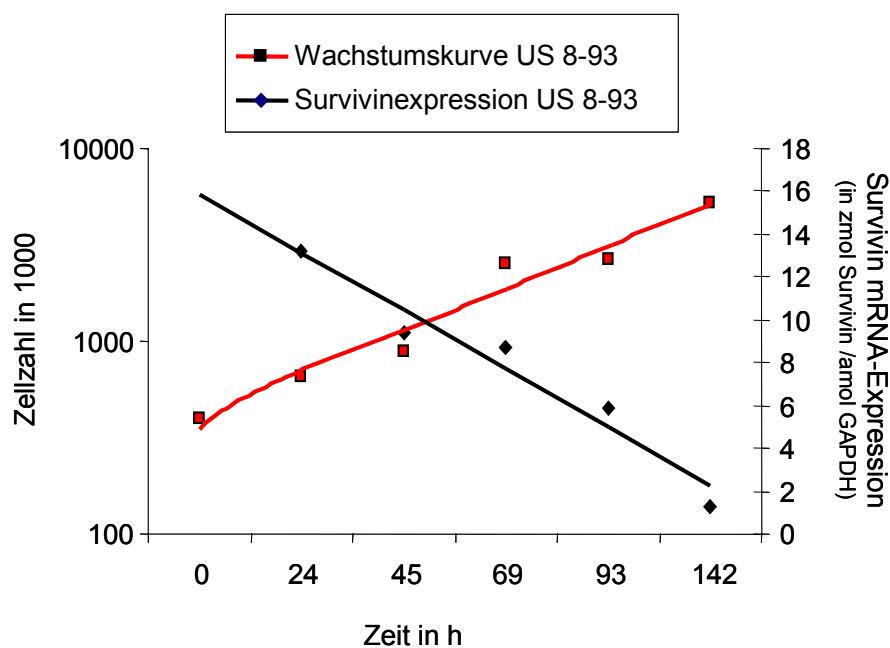


Abbildung 4.11 Abhängigkeit der Survivin-mRNA-Konzentration von der Wachstumsdichte in der nicht transfizierten Zelllinie US 8-93

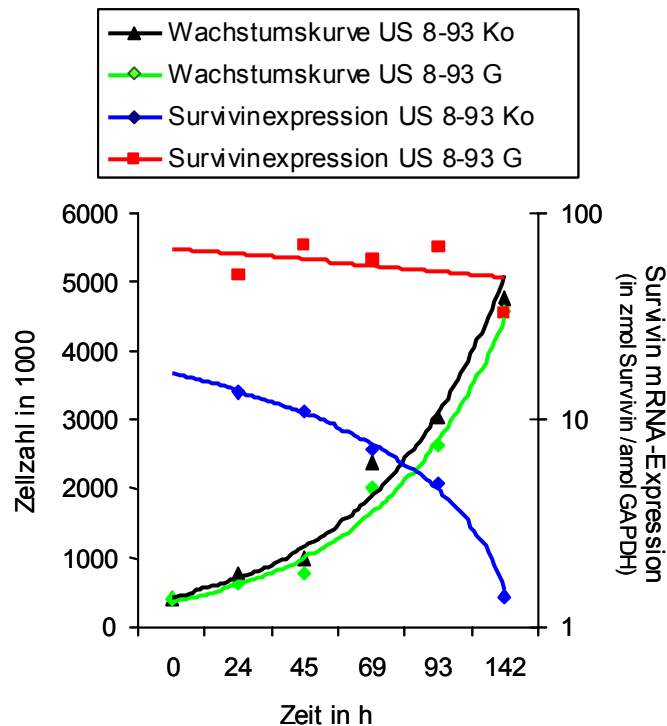


Abb. 4.12 Vergleich der Survivin-mRNA-Konzentration und der Anzahl der Zellen je Zellkulturflasche (Zelldichte) in den transfizierten Zelllinien US 8-93 G und US 8-93 K.

## 4.6 Inhibierung der Survivinexpression

4.6.1 Austestung unterschiedlicher Nukleinsäureoligomere (DNAzyme, siRNA) zur Inhibierung der Survivinexpression in den Sarkomzelllinien

Um die Survivin-Expression effektiv und selektiv zu inhibieren, wurden die Zelllinien US 8-93, US 8-93 K, US 8-93 G, sowie die A 204 und Saos-2 mit fünf DNAzymen und einem siRNA-Konstrukt gegen Survivin behandelt (vgl. Tab. 2.5, Kap. 3.9.2). Nach liposomaler Transfektion der Oligonukleotide wurde die Survivin-Expression der Zelllinien in einem Zeitraum von 6 h - 72 h quantifiziert.

Die Behandlung der Zellen mit DNAzymen bewirkte keine Veränderung der Survivin-mRNA bzw. -Proteinexpression (Daten nicht gezeigt). Demgegenüber führte die Behandlung mit siRNA gegen Gesamt-Survivin (Tab. 2.5) zu einer deutlichen Reduktion der Survivin-Expression (vgl. Kap. 4.7).

## 4.6.2 Effektivität des siRNA-Konstrukts in Abhängigkeit von der Konzentration

An der Zelllinie RD (vgl. Tab. 2.1) wurde der Langzeiteffekt einer konzentrationsabhängigen siRNA-Behandlung analysiert. Dazu wurde 3 Tage nach der siRNA-Transfektion die Wirkung auf das Zellwachstum (Daten nicht gezeigt) und auf die Survivin-mRNA-Expression untersucht (Abb. 4.13).

Die Applikation von Survivin-spezifischen siRNA führte zu einer deutlichen Verringerung der Zellzahl, im Vergleich zu den mit Nicht-Sinn-siRNA behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Die quantitative Analyse der Survivin-mRNA zeigte einen konzentrationsabhängigen Effekt der siRNA-Applikation. Die Verwendung von Nicht-Sinn-siRNA als Kontroll-Konstrukt führte dagegen nicht zu einer wesentlichen Verringerung der Survivin-mRNA (Abb. 4.13). Für die weiteren Experimente wurde eine siRNA Konzentration von 300 nM verwendet.

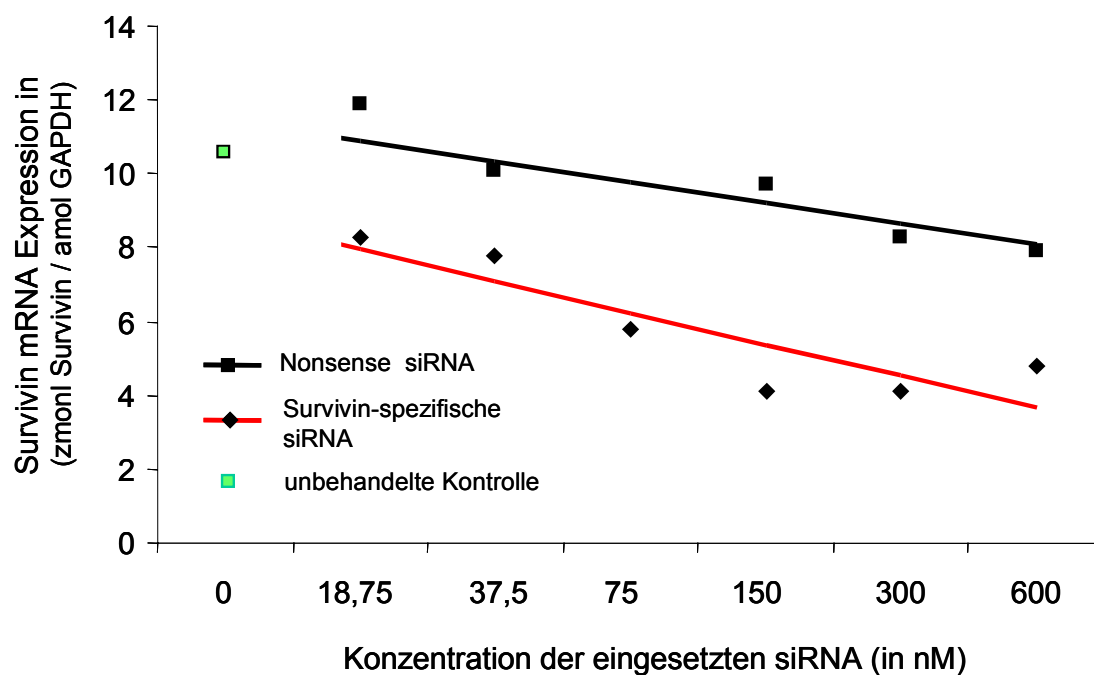


Abbildung 4.13 Survivin-mRNA-Expression in der Zelllinie RD 72 h nach Transfektion mit 0-600 nM siRNA

#### 4.7 Inhibierung von Survivin durch siRNA-Applikation in fünf Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus

##### 4.7.1 Analyse der Survivin-Expression und des klonogenen Zellüberlebens nach Applikation von siRNAs gegen Survivin

An fünf humanen Sarkomzelllinien (A 204, US 8-93, SK-LMS, RD, Saos 2) mit unterschiedlichem p53-Genstatus (Tab. 2.1) wurde die Wirkung von Survivin-spezifischen siRNA (Tab. 2.5) untersucht. Als Kontrolle wurden bei diesen Experimenten sowohl unbehandelte als auch mit Nicht-Sinn-siRNA (Nonsense-Kontrolle) behandelte Zellen parallel analysiert. Die quantitative Bestimmung der Survivin-mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR ergab (Kap. 3.2.2), dass die Survivin-mRNA, unabhängig vom p53-Genstatus, nach einer Survivin-spezifischen siRNA-Behandlung auf 12-27 % im Vergleich zur Nicht-Sinn-Kontrolle reduziert wird (Tab. 8.6, Anhang, Abb. 4.14).

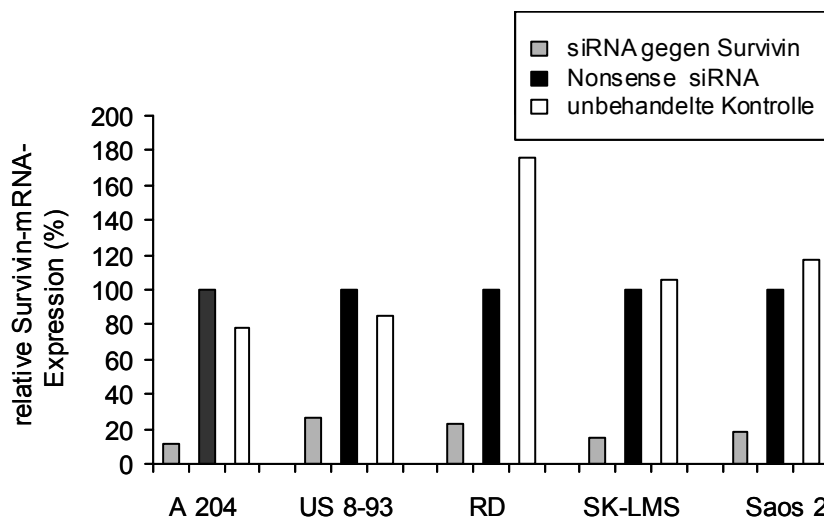


Abbildung 4.14 Survivin-mRNA-Expression von fünf Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus nach siRNA-Behandlung

(Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Versuchen 24 h nach siRNA-Behandlung. Die mit Nicht-Sinn-siRNA behandelten Zellen wurden jeweils auf 100 % normiert).

Das mittels ELISA (vgl. Kap. 3.6) quantifizierte Survivin-Protein wurde durch die Survivin-spezifische-siRNA-Applikation deutliche, auf 19–48 % im Vergleich zu der Nicht-Sinn-Kontrolle (Nonsense-Kontrolle), reduziert (Tab. 8.6, Anhang, Abb. 4.15). Die Reduktion des Survivinproteins konnte auch im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 4.16). Diese Ergebnisse dokumentieren die Survivin-Expressionsanalysen 24 h nach der siRNA-

Applikation. Die Analysen 48 h bzw. 72 h nach der siRNA-Behandlung zeigten ähnliche Effekte (Daten nicht gezeigt). Das weist auf eine lange zeitliche Wirksamkeit der siRNAs hin.

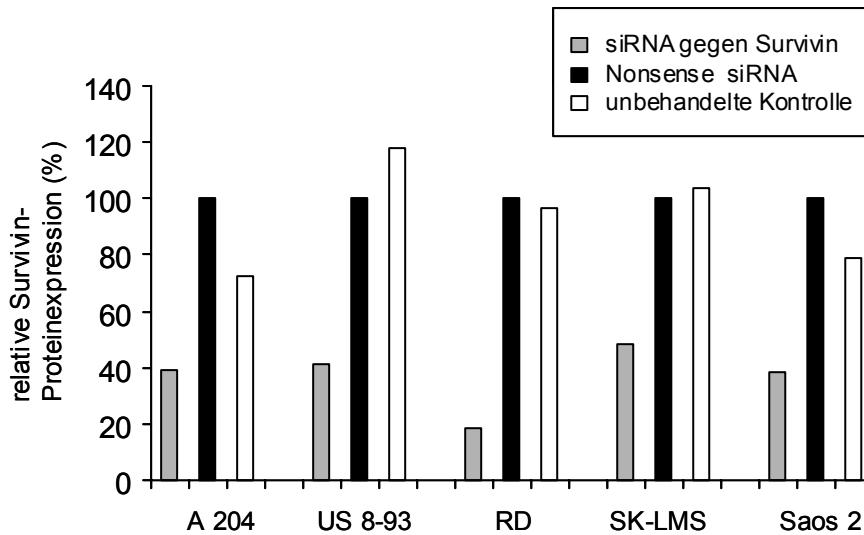


Abbildung 4.15 Survivin-Proteinexpression von fünf Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus nach siRNA-Behandlung (Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Versuchen 24 h nach der Behandlung mit siRNA gegen Survivin. Die mit Nicht-Sinn-siRNA (Nonsense-Kontrolle) behandelten Zellen wurden jeweils auf 100 % normiert).

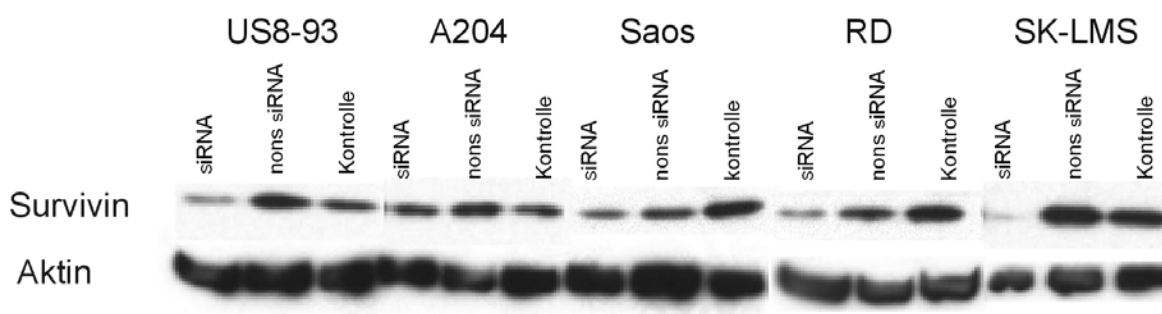


Abbildung 4.16 Westernblotanalyse von fünf Sarkom-Zelllinien nach siRNA-Behandlung Für die fünf Sarkom-Zelllinien wurden die beiden Proteine Survivin und Aktin im Westernblot nachgewiesen. Aufgetragen sind jeweils Proteinproben von Zellen, die mit Survivin-spezifischen siRNA und mit Nicht-Sinn-siRNA (Nonsense-Kontrolle) behandelt wurden bzw. Proben einer unbehandelten Kontrolle.

Nach Survivin-spezifischer siRNA-Behandlung war in den untersuchten Sarkomzelllinien eine Reduktion der Plattiereffizienz auf 14-35 % im Vergleich zu den mit Nicht-Sinn-siRNA behandelten Zellen nachweisbar (vgl. Tab. 8.6, Anhang; Abb. 4.17).

Es zeigte sich, dass dieser Effekt - unabhängig vom p53-Genstatus - in allen Sarkomzelllinien beobachtet werden konnte.

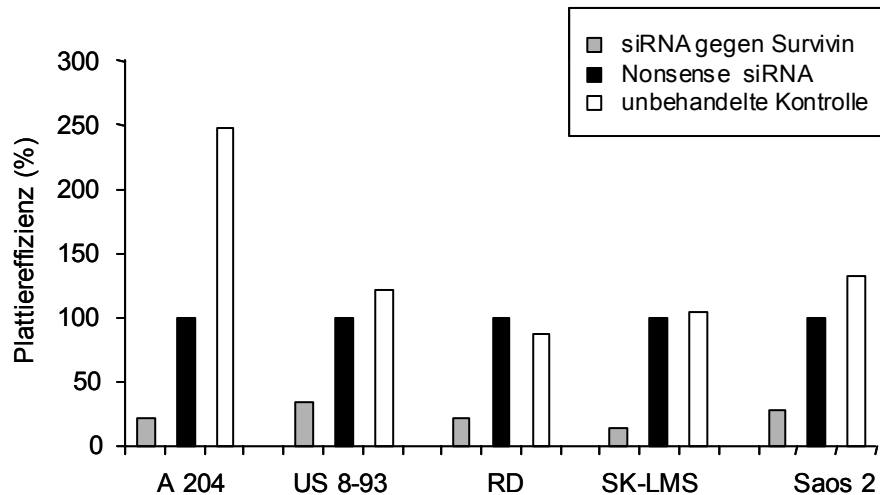


Abbildung 4.17 Analyse der Plattiereffizienz von fünf Sarkom-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus nach siRNA-Applikation (Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Die mit Nicht-Sinn-siRNA (Nonsense-Kontrolle) behandelten Zellen wurden jeweils auf 100 % normiert).

#### 4.7.2 Analyse der Apoptose und des Zellzyklus nach siRNA-Applikation gegen Survivin

In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, worauf die Inhibierung der Plattiereffizienz der untersuchten Sarkomzelllinien zurückzuführen ist. Dazu konnten die Apoptoseraten (Kap. 3.14.2) der Sarkomzelllinien bestimmt werden, und für die Zelllinie US 8-93 wurde exemplarisch eine Zellzyklusanalyse (vgl. Kap. 3.12) durchgeführt. Ein „knock out“ bzw. die Applikation von ODN sollten polyploide Zellen generieren bzw. Apoptose auslösen (Uren et al. 2000, Olie et al. 2000, Chen et al. 2000).

Unsere Analyse ergab, dass nach einem Survivin-„knock down“ mittels siRNA-Applikation die Apoptoserate nicht wesentlich anstieg (Abb. 4.18). So wies 72 h nach siRNA-Behandlung keine Sarkomzelllinie eine absolute Apoptoserate von mehr als 10% auf (Daten nicht gezeigt). Die mit Survivin-spezifischen siRNA behandelten Zellen zeigten eine nur geringfügig höhere Apoptoserate als die mit Nicht-Sinn-siRNA behandelten Kontrollen (Abb. 4.18).

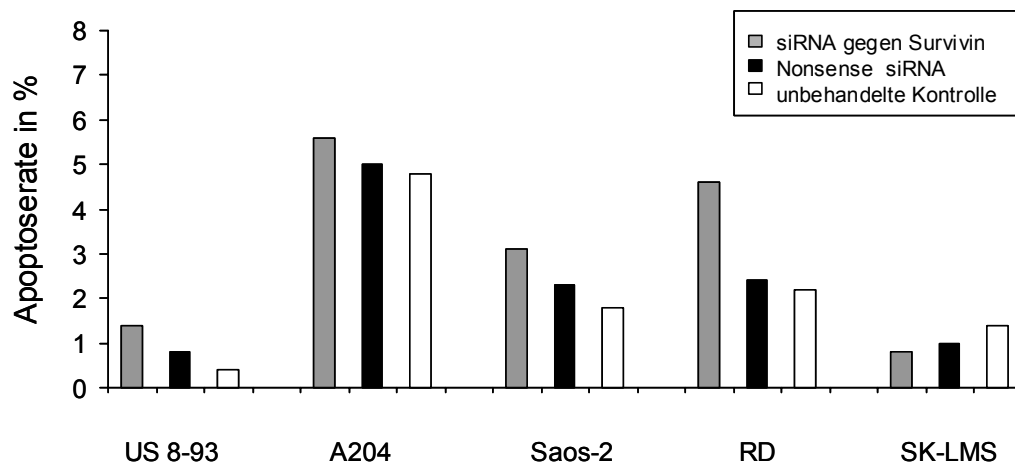


Abbildung 4.18 Absolute Apoptoserate nach siRNA-Applikation für fünf Sarkom-Zelllinien. Dargestellt sind die Apoptoseraten 24 h nach der Behandlung aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Die Zellzyklusanalyse der US 8-93 zeigte, dass 24 h nach einem „knock down“ des Survivin durch siRNA ein G2/M–Arrest induziert wird. Der Anteil der G2/M-Zellen stieg von 35% (1.Tag) bis auf 55% (2. Tag) nach der Inhibierung von Survivin an (Abb. 4.19). Demgegenüber war der Anteil der G2/M-Zellen in der mit Nicht-Sinn-siRNA behandelten Kontrolle niedriger (Abb. 4.19). In der Folge der Survivininhibierung wurden polyploide Zellen generiert. 48 h bzw. 72 h nach der siRNA-Behandlung gegen Survivin stieg der Anteil der polyploiden Zellen auf 8 bzw. 10% (Abb. 4.19). Polyploide Zellen waren in allen Sarkomzelllinien im Zellkoloniebildungstest 10 Tage nach Versuchsbeginn nachweisbar und vital, wenn Survivin inhibiert wurde (Abb. 4.20).

Es konnte nach siRNA-Applikation gegen Survivin eine G2/M-Arretierung und die Generierung von teilungsinaktiven polyploiden Zellen festgestellt werden. Polyploide Zellen wurden in allen untersuchten Sarkomzelllinien, mit unterschiedlichem p53-Genstatus, nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

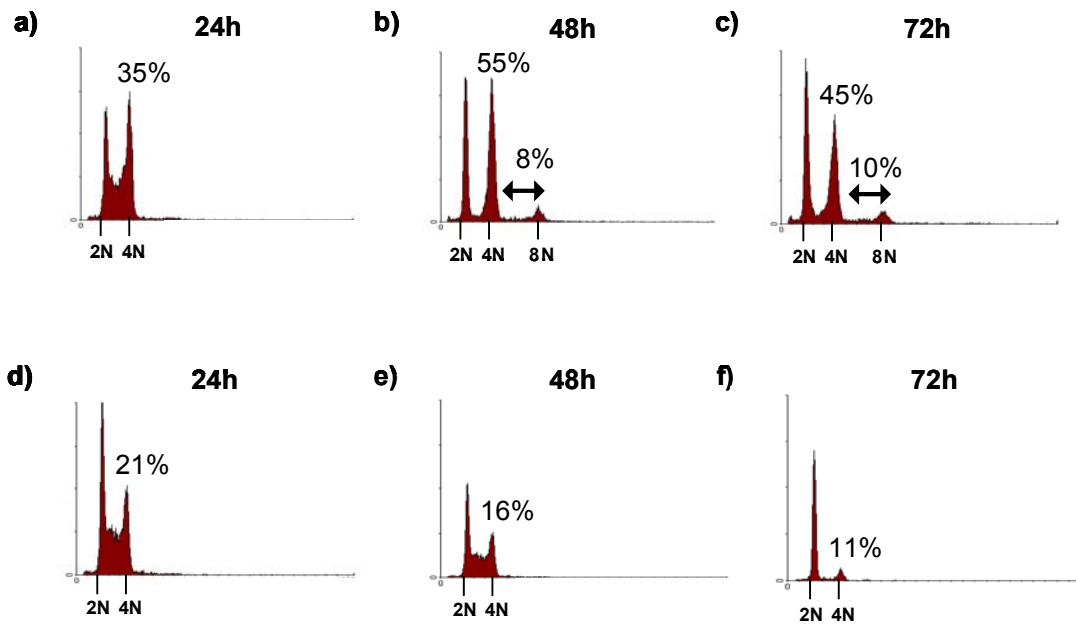


Abbildung 4.19 Zeitabhängiger Effekt einer Survivin-spezifischen siRNA-Applikation (a-c) nach einer Survivin-spezifischen siRNA-Applikation bzw. einer Applikation von Nicht-Sinn-siRNA (d-f) in der Zelllinie US 8-93. In den mit Survivin-spezifischen siRNA behandelten Zellen kommt es zu einer Akkumulation von G2/M-Zellen und zur Generierung polyploider Zellen (8N-oktaploider, 4N-tetraploider, 2N-diploider Chromosomensatz) 24h-72h nach der Behandlung.

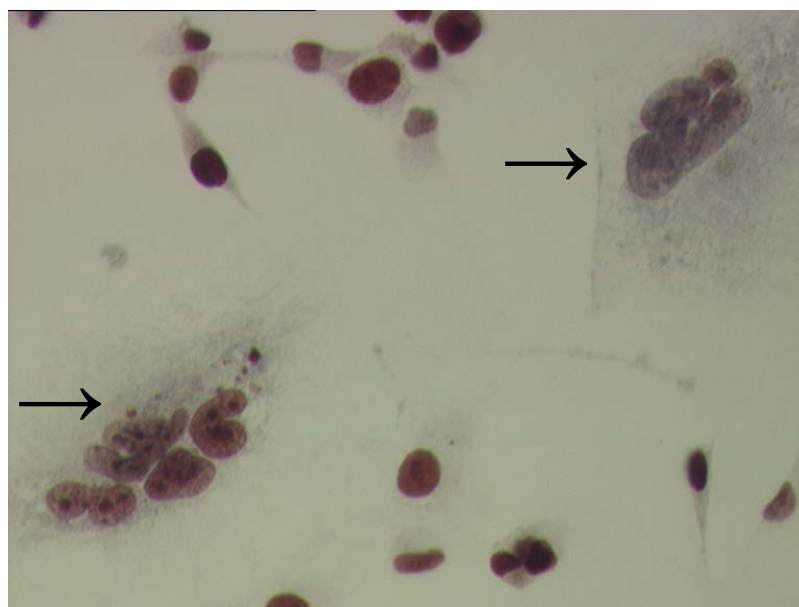


Abbildung 4.20 Immunhistochemische Survivin-Färbung der Zelllinie US 8-93. Durch Survivin-spezifische Antikörper wurde der Zellkern detektiert. Nach Applikation Survivin-spezifischer siRNA wurden Zellen generiert, die mehrere Kerne aufweisen. Polyploide Zellen sind mit Pfeilen markiert, daneben sind normale Zellen gezeigt. 200x



#### 4.8. Zell- und strahlenbiologische Effekte der Inhibierung von Survivin in Kombination mit Röntgenbestrahlung in zwei Sarkomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus

Die Behandlung der Sarkomzellen mit Survivin-spezifischen siRNA führte nicht zu einer massiven Induktion der Apoptose (Kap. 4.7.2). In weiteren Experimenten wurde ein Apoptose-Stimulus durch Röntgenstrahlung verwendet (Kap. 3.13). Damit sollte die Wirkung von Survivin als Inhibitor der Apoptose analysiert und festgestellt werden, ob der „knock down“ von Survivin den Effekt einer Bestrahlung verändert.

Die Untersuchung erfolgte an zwei WTS-Zelllinien (Tab. 2.1) mit unterschiedlichem p53-Genstatus [US 8-93 (mt-p53), A 204 (wt-p53)]. Die Applikation von Survivin-spezifischen siRNA bzw. Luziferase-siRNA (Kontrolle) erfolgte einen Tag vor der Bestrahlung (Kap. 3.9.2).

Durch die WB-Analyse wurde nachgewiesen, dass das Survivin-Protein in beiden untersuchten Zelllinien nach der Behandlung mit Survivin-spezifischen siRNA reprimiert wird (Abb. 4.21, 4.22). Auch Bestrahlung führt zu einer Reduktion von Survivin (3 h nach Bestrahlung). Dagegen wird Survivin in den bestrahlten Zellen 24 h nach Röntgenbestrahlung stärker exprimiert, als in den unbestrahlten Zellen (Daten nicht gezeigt). Ferner wird P53 nach einer Bestrahlung mit 8 Gy nur in der wt-p53-Zelllinie A 204 stärker exprimiert (Abb. 4.21). In der mt-p53 Zelllinie US 8-93 ist unabhängig von der Bestrahlung keine P53-Expression nachweisbar (vgl. Tab. 2.1, Abb. 4.22).

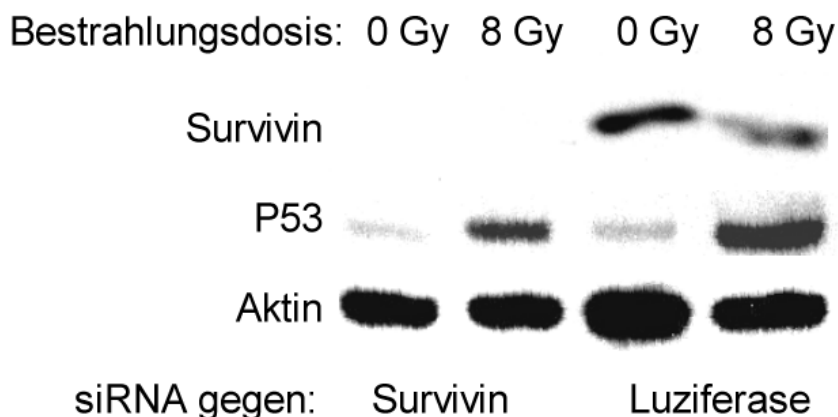


Abbildung 4.21 Westernblotanalyse der Zelllinie A 204 (wt-p53)

Dargestellt ist der Westernblot für die Proteine Survivin, P53 und Aktin 3 h nach Bestrahlung bzw. 24 h nach siRNA-Applikation.

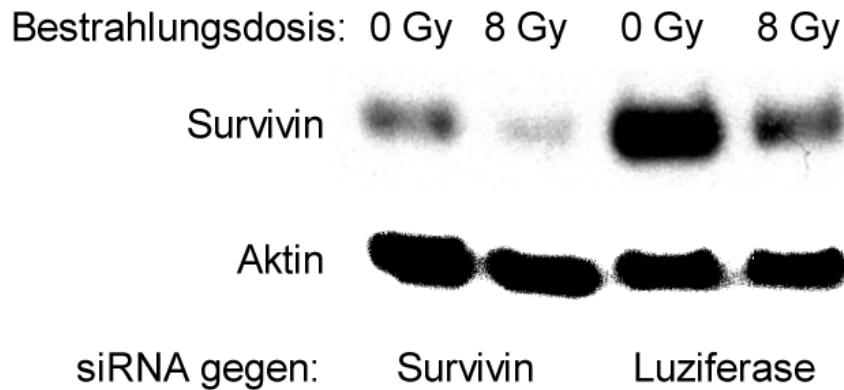


Abbildung 4.22 Westernblotanalyse der Zelllinie US 8-93 (mt-p53) für die Proteine Survivin und Aktin 3 h nach Bestrahlung bzw. 24 h nach siRNA-Applikation. P53 ist in dieser Zelllinie nicht nachweisbar.

Mittels Zellkoloniebildungstest zeigt sich, dass die Inhibierung von Survivin durch siRNA in beiden WTS-Zelllinien unabhängig vom p53-Genstatus zu einer Verringerung des klonogenen Überlebens um mehr als 50% führt (vgl. Tab. 4.5). Die Kombination des Survivin-„knock down“ und Bestrahlung verringert in beiden Zelllinien das klonogene Überleben in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis zelltypspezifisch weiter (vgl. Tab. 4.5). Die Zelllinie US 8-93 wies jeweils eine höhere Plattiereffizienz als die Zelllinie A-204 auf (vgl. Tab. 4.5). Ferner reduzierte sich die Plattiereffizienz nach der Bestrahlung in der Zelllinie A-204 deutlicher als in der Zelllinie US 8-93 (vgl. Tab. 4.5).

Die Kombination beider Behandlungstherapien bewirkt nur in der wt-p53-Zelllinie A-204 eine Strahlensensitivierung (Abb. 4.23). Nach der Berechnung der Überlebensfraktion (SF) (vgl. Tab. 4.6, Kap. 3.13) zeigte sich, dass der Verstärkungsfaktor (vgl. Tab. 4.6, Kap. 3.13) in der wt-p53 Zelllinie A-204 nach einer Strahlendosis von 2 Gy bei 1,8 ( $p=0,05$ ) und nach einer Dosis von 4 Gy bei 2,5 ( $p=0,02$ ) liegt.

Durch einen Survivin-„knock down“ erreicht man in der wt-p53-Zelllinie eine Wirkungsverstärkung (Kap. 3.13) der Bestrahlung (Abb. 4.23). In der mt-p53-Zelllinie US 8-93 ist dagegen keine Radiosensitivierung (Verstärkungsfaktor bei 2, 4, 8 Gy beträgt jeweils 1) zu beobachten (Abb. 4.24).

Tabelle 4.5 Effekte der Survivin-spezifischen siRNA Behandlung auf die Plattiereffizienz der behandelten Zellen

Zelllinien	Plattiereffizienz in %			
	0 Gy	2 Gy	4 Gy	8 Gy
A-204 (wt-p53)				
siRNA gegen Survivin	5,4±2,7	1,8±1,0	0,5±0,3	n.b.
siRNA gegen Luciferase	32,8±11,5	14,6±8,0	5,8±3,0	n.b.
unbehandelte Kontrolle	34,4±4,9	16,8±11,7	6,9±3,6	n.b.
Quotient: siRNA gegen Survivin/ siRNA gegen Luciferase	16	12	9	n.b.
US 8-93 (mt-p53)				
siRNA gegen Survivin	22,1±6,2	17,2±1,9	12,1±5,2	2,9
siRNA gegen Luciferase	44,6±3,3	36,7±5,4	22,9±7,1	5,9
unbehandelte Kontrolle	48,9±4,0	39,4±2,9	26,5±2,6	6,1
Quotient: siRNA gegen Survivin/ siRNA gegen Luciferase	50	47	53	49

Abkürzung: n.b.-nicht bestimmt

Tabelle 4.6 Effekte einer Survivin-spezifischen siRNA-Applikation auf die Strahlensensitivität

Zelllinie	SF (2 Gy)	SF (4 Gy)	SF (8 Gy)
A-204 (wt-p53)			
siRNA gegen Survivin	23,8±10,3	5,9±4,6	n.b.
siRNA gegen Luciferase	43,0±16,9	14,5±8,8	n.b.
Verstärkungsfaktor (T-Test)	1,8 (p=0,05)	2,5 (p=0,02)	
US 8-93 (mt-p53)			
siRNA gegen Survivin	82,4±21,9	53,6±14,2	12,5±8,2
siRNA gegen Luciferase	82,2±9,2	51,2±14,1	13,2±4,1
Verstärkungsfaktor T-Test	1,0	1,0	1,1

Abkürzungen: SF-Überlebensfraktion (Überlebensfraktion nach einer Röntgenbestrahlung mit 2, 4 oder 8 Gy (bezeichnet als SF2, SF4, SF8), (vgl. Kap. 3.13), n.b.-nicht bestimmt

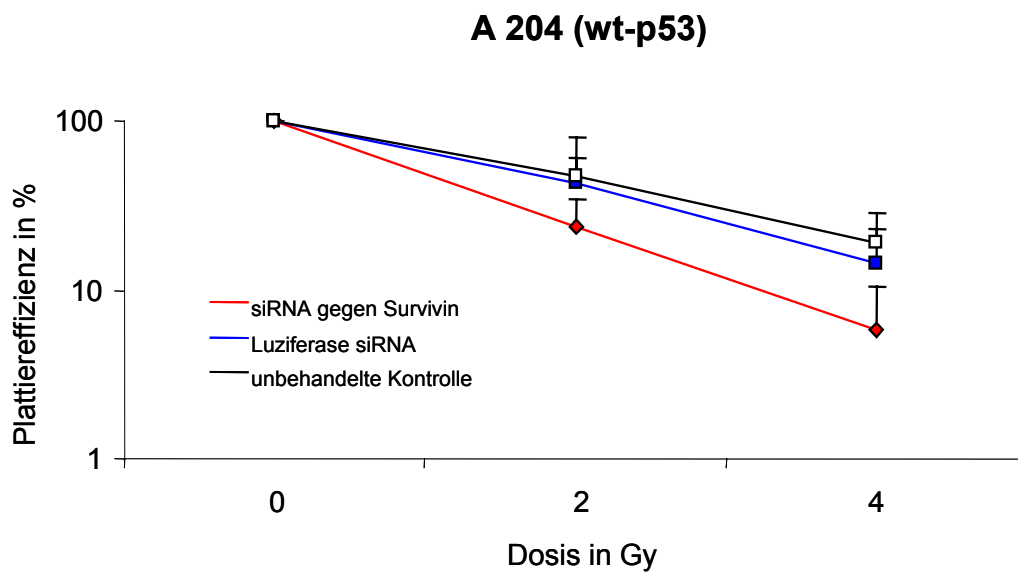


Abbildung 4.23 Plattiereffizienz der A 204 in Abhängigkeit von der Strahlendosis  
Die 0 Gy-Werte wurden auf 100 % normiert, so dass der Effekt der Transfektion herausgerechnet wurde (SF-Werte).

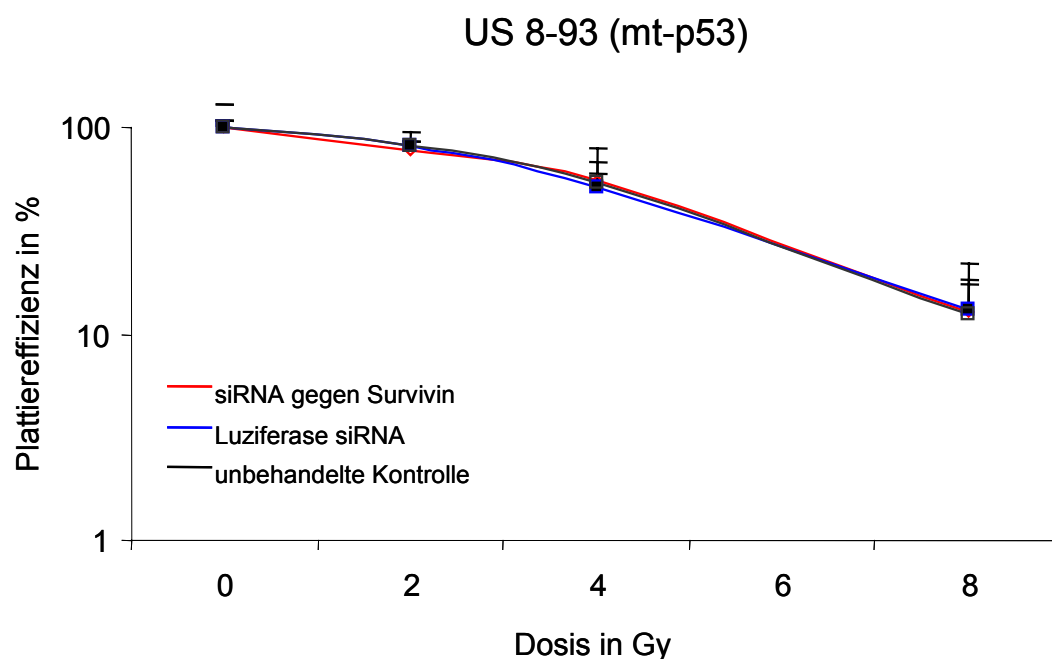


Abbildung 4.24 Plattiereffizienz der US 8-93 in Abhängigkeit von der Strahlendosis  
Die 0 Gy-Werte wurden auf 100 % normiert, so dass der Effekt der Transfektion herausgerechnet wurde (SF-Werte).

Nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlung wird u.a. p53 aktiviert. Die induzierte Apoptosekaskade führt zur Aktivierung der Kaspase-9, welche ihrerseits die Kaspasen-3 und -7 aktivieren kann. Mittels fluorimetrischer Bestimmung wurde die Aktivität der Kaspasen-3 und -7 analysiert (vgl. Kap. 3.14.1).

In der wt-p53-Zelllinie A-204 führte der alleinige „knock down“ von Survivin (24 h nach Bestrahlung) zu einem 2,5fachen Anstieg der Aktivität der Kaspasen-3 und -7 im Vergleich zur unbestrahlten Luziferase-Kontrolle (Abb. 4.25). Die Kombination eines Survivin „knock down“ und einer Bestrahlung mit Dosen von 4 bzw. 8 Gy verursacht (24 h nach der Bestrahlung) einen weiteren Anstieg der Aktivität der Kaspasen-3 und -7 auf das 5fache (Abb. 4.25). In der mt-p53-Zelllinie US 8-93 führt weder eine Survivin-spezifische siRNA-Applikation noch die Kombination mit Bestrahlung (24 h nach Bestrahlung) zu einem effizienten Anstieg der Aktivität der Kaspasen-3 und -7 (Abb. 4.26).

Funktionelles wt-p53 scheint in diesen Experimenten einen Einfluss auf die Aktivierung der Apoptosekaskade über die Kaspasen-3 und -7 zu haben.

Als weitere Apoptose-Nachweismethode wurde eine Dapi-Färbung (vgl. Kap. 3.14.2) durchgeführt. Die Kombination eines Survivin-„knock out“ und Bestrahlung veränderte die Rate der Apoptose nur in der wt-p53-Zelllinie. In der A-204 stieg die Rate der Apoptose 24 h nach Bestrahlung in den mit siRNA gegen Survivin behandelten Zellen auf das 1,5fache von 7,2 % (4 Gy) auf 10,9 % (4Gy ) an (Daten nicht gezeigt). Dagegen veränderte sich die Apoptoserate in der mt-p53-Zelllinie US 8-93 nach Survivin-inhibition 24 h nach Bestrahlung nicht [2,1 % (4 Gy) auf 2,2 % (4 Gy)]. Insgesamt ist aber feststellbar, dass nach der Kombination von siRNA-Behandlung gegen Survivin und Bestrahlung (4 Gy) die Apoptoseinduktion in den beiden Sarkomzelllinien in den ersten 48 h nach Bestrahlung relativ gering war.

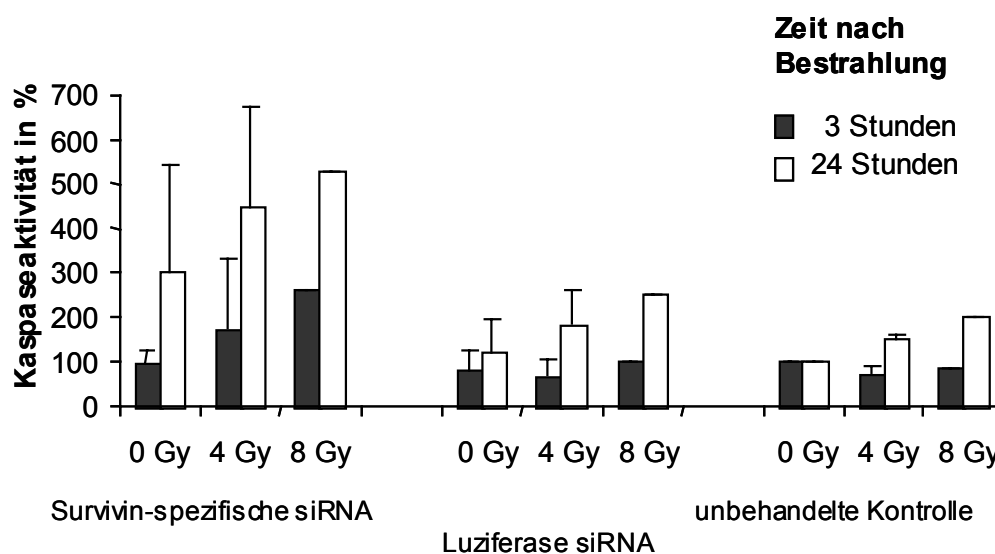


Abbildung 4.25 Aktivität der Kaspasen-3 und -7 in der Zelllinie A 204.

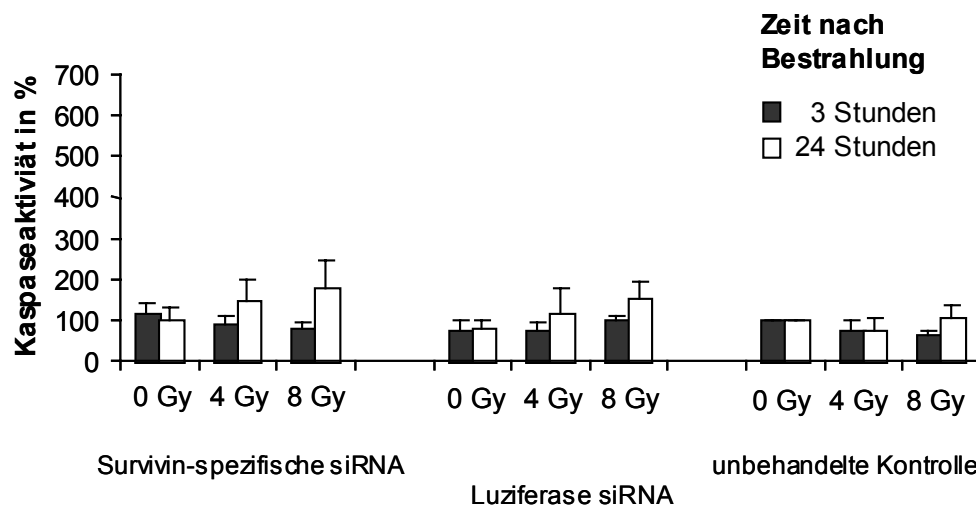


Abbildung 4.26 Aktivität der Kaspasen-3 und -7 in der Zelllinie US 8-93.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine siRNA-Applikation gegen Survivin in der wt-p53-Zelllinie eine strahlensensitivierende Wirkung hat und somit für zukünftige Strahlentherapien eine therapeutische Relevanz haben kann. Um solche Kombinationsbehandlungen durchführen zu können, sind jedoch erst *in vivo*-Versuche zu analysieren.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einführung zu den Untersuchungen von Survivin in WTS

Der IAP Survivin wurde erstmals nach dem Screening einer humanen Genbank mit der cDNA des Faktors Xa Rezeptor EPR-1 („effector cell protease receptor-1“) nachgewiesen (Ambrosini et al. 1997). Das Survivin-Gen ist 14,7 kb groß, auf dem Chromosom 17q25 lokalisiert und kodiert für ein 16,5 kDa-Protein (Ambrosini et al. 1997, Ambrosini et al. 1998). Survivin wird in verschiedenen fötalen Geweben, sowie in Stammzellschichten der Epidermis, der endokrinen Pankreas, des Thymus und der Plazenta exprimiert (Ambrosini et al. 1997, Adida et al. 1998b). Ferner wurde es in einer Vielzahl von humanen Karzinomen und Leukämien nachgewiesen (Übersicht in Altieri 2003b). In terminal differenziertem Normalgewebe ist es kaum oder gar nicht detektierbar (Ambrosini et al. 1997, Adida et al. 1998b).

Survivin ist ein essentielles Protein der Mitose, das als „passenger protein“ die Chromosomensegregation mit der Zytokinese verbindet (Skoufias et al. 2000, Terada 2001, Wheatley et al. 2001). Survivin inhibiert aber auch die Apoptosekaskade, indem es die Aktivierung der Kaspase-9 behindert (Conway et al. 2002, Marusawa et al. 2003). Somit ist es ein Verbindungsglied zwischen der Kontrolle der Zellintegrität/Apoptose und der Zellteilung.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen mit Ausnahme von Neuroblastomen keine Ergebnisse zur Expression von Survivin bei WTS vor (Adida et al. 1998a, Islam et al. 2000b).

In dieser Arbeit wurde qualitativ und quantitativ die mRNA-Expression und Proteinexpression von Survivin in WTS analysiert. Für prognostische Aussagen konnten die klinischen Daten von WTS-Patienten berücksichtigt werden. Da eine hohe Survivinexpression ein Schutzmechanismus der Tumorzelle vor der Apoptose sein könnte, wurden *in vitro* Inhibierungsexperimente durchgeführt. Die therapeutischen Effekte einer Survivin-spezifische-siRNA-Behandlung, teilweise in Kombination mit einer Bestrahlung, konnten an Sarkomzelllinien analysiert werden.

### 5.2 mRNA-Expression von Survivin und seiner Transkripte in Tumor- und Normalgewebe

#### 5.2.1 Qualitative Analyse der Survivin mRNA mittels RT-PCR

Mittlerweile sind 4 alternative Survivin-Spleiß-Varianten bekannt (vgl. Abb. 1.3, Kap. 1.5). wt-Survivin (142 AS) enthält 4 Exone (Li 1998). Die Survivin-2B-Variante (165 AS) entsteht

nach der Insertion eines alternativen Exons 2. Survivin- $\Delta$ 3 (137 AS) bildet sich nach der Deletion des 3. Exons, wodurch es zu einer Leserasterverschiebung kommt (Mahotka et al. 1999). Die erst kürzlich entdeckte Variante Survivin-3B weist zusätzlich ein alternatives Exon 3 auf (Badran et al. 2004).

Mittels qualitativer RT-PCR erfolgte die Analyse der mRNA-Expression von 56 WTS-Proben und 26 Normalgewebeproben (vgl. Kap. 4.1.1). Dabei konnte in 64 % der Tumor- als auch in 23% der Normalgewebeproben wt-Survivin und in den Tumorproben teilweise auch die Spleißvariante Survivin- $\Delta$ 3 nachgewiesen werden (vgl. Kap. 4.1.1). Dagegen war Survivin-2B mit dieser qualitativen RT-PCR nicht nachweisbar (Kappler et al. 2001).

O'Driscoll und Mitarbeiter erhielten ähnliche Ergebnisse mittels qualitativer RT-PCR bei der Analyse von 106 Mammakarzinomen (O'Driscoll et al. 2003). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass 68% der Tumoren wt-Survivin exprimierten. Survivin- $\Delta$ 3 konnte in 55% der Tumoren nachgewiesen werden, während Survivin-2B nur in 9,4% detektiert wurde. Der geringe Nachweis von Survivin-2B könnte auf die geringere Expression dieser Variante zurückzuführen sein und deshalb eine sensitivere PCR erfordern. Der Nachweis der Survivinvarianten gestaltete sich generell schwieriger als der von wt-Survivin (Mahotka et al. 1999, Conway et al. 2000).

Interessant ist, dass wt-Survivin auch in Normalgewebeproben nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund wurde bislang kontrovers diskutiert. In zahlreichen Untersuchungen konnte Survivin nur in malignen Tumoren von Lungen, Darm, Pankreas, Prostata und Mamma nachgewiesen werden. Dagegen war Survivin im Normalgewebe mit Ausnahme von Thymus- und Plazentagewebe und undifferenziertem Normalgewebe nicht detektierbar (Ambrosini et al. 1997, Übersicht in Altieri 2001).

Unsere Befunde zeigen, dass Survivin auch im Normalgewebe exprimiert wird. Andere Studien bestätigen diese Ergebnisse. So wurde Survivin auch in normalen nichttransformierten humanen Geweben, wie in Endometrium, Blutlymphozyten und nicht malignen Hautzellen nachgewiesen (Konno et al. 2000, Shinozawa et al. 2000, Chiodino et al. 1999). Weitere Studien detektierten Survivin mRNA ebenfalls in Normalgewebe von Magen, Dünndarm, Milz, Lunge, Leber, Nieren, Prostata, Pankreas, Herz, Hirn, Thymus und normalen Endothelzellen (Monzo et al. 1999, Conway et al. 2000, Hirohashi et al. 2002, Ignatova et al. 2002, Kania et al. 2003, Miyachi et al. 2003, Tran et al. 1999, Conway et al. 2003). Beispielsweise konnte Survivin in 47% des untersuchten esophagealen Normalgewebes und in 29 % des normalen Dickdarmgewebes detektiert werden (Kato et al. 2001, Sarela et al. 2000). Survivin konnte mittlerweile auch im Knochenmark nachgewiesen werden (Nakagawa et al. 2004).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die qualitative Analyse der mRNA nur bedingt geeignet ist, um Survivin und die Survivintranskriptvarianten zu detektieren.



Schließlich ist Survivin ein essentielles Protein der Zellteilung, denn sein „knock out“ verursacht Letalität (Uren et al. 2000). So müsste es während der Zellteilung nachweisbar sein und jedes Normalgewebe verfügt über einige proliferativ aktive Zellen. Dies sind beispielsweise die „adulten“ Stammzellen. Aus diesem Grunde könnte man Survivin als einen Stammzellmarker auffassen, der diese Zellen im Normalgewebe identifiziert. So dokumentiert eine Arbeit über das Kolon, dass Survivin nicht mehr in den differenzierten Zellen, wohl aber in den Stammzellen des Darms exprimiert wird (Zhang et al. 2001, Gianani et al. 2001, vgl. Kap. 5.2.3). Ferner konnte Survivin während der Hämatopoese in Blutzellen (z.B. CD34\* Stammzellen) und in neuralen Stammzellen nachgewiesen werden (Fukuda und Pelus 2001, Carter et al. 2001, Fukuda und Pelus 2002, Altura et al. 2003).

Um die Bedeutung von Survivin für WTS zu bestimmen, wurde deshalb in Kooperation mit Dr. Köhler (Roboscreen GmbH, Leipzig) ein quantitatives RT-PCR-System zur Bestimmung der Gesamt-Survivin-Expression entwickelt (vgl. Kap. 4.1.3, Kap. 5.2.2). Kürzlich erfolgte die Weiterentwicklung dieses Systems, dass nun sowohl wt-Survivin, Survivin- $\Delta$ 3 und Survivin-2B separat quantifizieren kann. Somit war es möglich, in beinahe allen untersuchten WTS-Proben und vielen Normalgewebeproben wt-Survivin, Survivin- $\Delta$ 3 und Survivin-2B nachzuweisen (Herr PD Dr. H. Taubert, Halle, persönliche Mitteilung; Taubert et al. im Druck). Der quantitative Nachweis der drei Survivin-Varianten erfolgte bereits in Hirntumoren, Knochenmarkzellen von Leukämiepatienten und Magentumoren (Hirohashi et al. 2002, Krieg et al. 2002, Nakagawa et al. 2004).

In den weiteren Analysen wurde das quantitative RT-PCR-System (Dr. Köhler, Roboscreen, Leipzig) zur Bestimmung der Gesamt-Survivin-Expression als Methode verwendet (Kap. 5.2.2).

### 5.2.2 Quantitatives RT-PCR Nachweissystem der Survivin-mRNA-Expression

Durch die quantitative RT-PCR konnte die Gesamt-Survivin-Expression in verschiedenen Geweben in Relation zu einem Expressionsstandard (GAPDH als „house keeping gene“) bestimmt werden. Survivin-mRNA wurde in Tumorgewebe und auch in Normalgewebe von WTS-Patienten, in allen Lymphozyten-Proben und in einem untersuchten Knochenmarkspunktat nachgewiesen (Kappler et al. 2001).

Die Quantifizierung von Tumor- und Normalgewebe von WTS-Patienten machte deutlich, dass die Survivin-mRNA-Expression im untersuchten Tumormaterial bzw. auch in Tumorzelllinien im Durchschnitt ca. 10fach höher als im Normalgewebe ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Survivin ein wichtiges tumorrelevantes Genprodukt ist, das in wesentlich höherer Konzentration in transformierten Geweben gefunden wird, aber auch im Normalgewebe nachgewiesen werden kann (vgl. Kap. 5.2.1).

Für eine prognostische Bewertung der Survivinexpression sollte deshalb der quantitative Nachweis von Survivin im Vergleich zum assoziierten Normalgewebe gleichen Ursprungs herangezogen werden.

In unseren Studien konnten wir zeigen, dass aggressive WTS-Entitäten, ihrer Prognose entsprechend, im Durchschnitt mehr Survivin exprimieren (vgl. Kap. 4.1.3).

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse dokumentierte, dass die Survivin-mRNA-Expression, über dem definierten Grenzwert, für das Überleben von WTS-Patienten ein unabhängiger negativer Prognosemarker (RR=2,7; p=0,009) ist (Kappler et al. 2001) (vgl. Kap. 4.1.3, Abb. 4.3).

Zahlreiche Untersuchungen, zur Survivinexpression auf mRNA-Niveau, an anderen Tumoren bestätigen diese Befunde. Für Patienten mit Magentumoren, Ösophaguskarzinomen, Astrozyten, Lymphomen und Kolorektalkarzinomen des Tumorstadiums 2 konnte eine erhöhte Survivinexpression im Tumor mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit assoziiert werden (Sarela et al. 2000, Kato et al. 2001, Miyachi et al. 2003, Kajiwara et al. 2003, Martinez et al. 2004). In Neuroblastomen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen wurde eine Survivinüberexpression als ein negativer Prognosefaktor identifiziert (Adida et al. 1998a, Islam et al. 2000b, Monzo et al. 1999). Ein erhöhter Proliferationsindex und eine hohe Survivinexpression wurde für Lymphome und Leberzellkarzinome dokumentiert (Ikeguchi et al. 2002b, Martinez et al. 2004). Für ein früheres Auftreten von Rezidiven bei Patienten mit Leberzellkarzinom, Blasenkarzinom bzw. Ösophaguskarzinom konnte eine hohe Survivinexpression ebenso nachgewiesen werden (Ikeguchi et al. 2002a,b, Schultz et al. 2003), während in einer anderen Studie ein solcher Zusammenhang für Blasenkarzinompatienten nicht gefunden werden konnte (Gazzaniga et al. 2003).

Ferner wurde für Neuroblastome beschrieben, dass das Verhältnis der Survivin-mRNA- und Fas-Expression (proapoptotischer Faktor) von Bedeutung ist. Das Survivin:Fas-Verhältnis war um so höher, wenn Patienten ein Rezidiv entwickelten (Sandler et al. 2002).

Survivin könnte deshalb in Tumoren eine wichtige Rolle haben, weil sich die Zellen häufig teilen und Survivin, das ein für die Mitose essentielles Protein ist, exprimieren müssen. Deshalb könnte Survivin, wie gezeigt, für einige Tumoren mit einem höheren Proliferationsindex assoziiert sein (Ikeguchi et al. 2002c) bzw. wird in dem sich kaum teilenden Normalgewebe nur selten nachgewiesen (vgl. Kap. 5.2.1). Für WTS ist eine hohe Survivin-mRNA-Expression signifikant positiv mit dem Mitoseindex korreliert.

Survivin wird über Zellzyklus-abhängige Elemente, die dem Survivinpromotor vorgelagert sind, Zellzyklus-abhängig exprimiert und kontrolliert (Li und Altieri 1999, Li et al. 1999). Dies erklärt, weshalb Survivin in HeLa-Zellen in bis zu 40fach höherer Konzentration in der G2/M-Phase als in der G1-Phase detektiert wird. Jedoch wurde nachgewiesen, dass eine hohe Survivinexpression auch in Tumoren verschiedener Mitoseindizes und damit unabhängige

von der Proliferation des Gewebes vorhanden ist (Grossman et al. 1999). Survivin ist auch in der MCF-7-Zelllinie unabhängig vom Zellzyklus in beinahe allen Zellen detektierbar, anders als z.B. der Proliferationsmarker Ki67 (Altieri 2003b). Die normale Zellzyklus-abhängig Expression von Survivin scheint in Tumorzellen verändert zu sein, wobei mehrere Ursachen in Frage kommen. In Neuroblastomen liegt das Survivingen gehäuft amplifiziert vor (Islam et al. 2000b) und in Ovarialtumoren war das Exon 1, anders als in Normalgewebe, unmethyliert (Hattori et al. 2001). Die Promotoraktivität scheint in Tumorzelllinien generell erhöht zu sein (Li et al. 1998). Etwa weil die Zellzyklus-abhängigen Elemente, die Survivin regulieren, mutiert sind (Xu et al. 2004). In Tumoren könnte die Polyubiquitinylierung von Survivin oder die Stabilisierung des Proteins nach Phosphorylierung wesentlich verändert sein (Zhao et al. 2000, O'Connor et al. 2002).

Die unregulierte Survivinexpression könnte einen Wachstumsvorteil für Tumorzellen begründen. Dieses Genprodukt würde somit einen onkogenen Charakter haben.

### 5.2.3 hTERT und Survivin – zwei „embryonale“ Gene aktiv in WTS

Survivin wird nicht nur in verschiedenen Tumoren und fötalen Geweben, sondern auch in Stammzellen exprimiert (vgl. Kap. 5.2.1) (Zhang et al. 2001, Fukuda und Pelus 2001, Fukuda und Pelus 2002, Carter et al. 2001, Altura et al. 2003).

Ein zweites Genprodukt, das ebenfalls in Tumoren und in embryonalen Geweben nachweisbar ist – ist hTERT (humane Telomerase Reverse Transkriptase). Das Protein ist die katalytische Telomerase-Untereinheit des Replikationsapparates, der zur Verlängerung der Telomerenden erforderlich ist. Die Verkürzung der Telomerenden nach jeder Zellteilung, deren Ursache das End-Replikationsproblem ist, wird von der hTERT als wesentlichem Bestandteil einer Proteinmaschinerie wieder hergestellt (Lingner und Cech 1998). In normal differenzierten Zellen geschieht dies nicht. Die Folge ist eine zellteilungsabhängige Verkürzung der Telomerenden in der Art einer „mitotic clock“, was schließlich zu einer genetischen Instabilität und zum programmierten Tod der Zelle führt (Reddel et al. 1997).

Differenzierte teilungsinaktive Normalgewebezellen sollten weder hTERT noch Survivin exprimieren (Terasaki et al. 2004, Kleideiter et al. 2003, Zhang et al. 2001).

In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse für 89 WTS-Patientenproben zeigte sich, dass die Überexpression von hTERT und Survivin-mRNA mit einem 20fach erhöhten Risiko, am Tumor zu versterben, assoziiert ist (vgl. Kap. 4.3, Abb. 4.5). Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten mit WTS, deren Tumoren beide Gene überexprimierten, betrug nur 17 Monate, im Vergleich zu 124 Monaten für Patienten, bei denen im WTS beide Gene nicht überexprimiert waren (Würl et al. 2002).

Ein solcher Zusammenhang, zwischen einer hohen Expression von hTERT und Survivin und einer schlechteren Prognose, konnte auch für Mammakarzinome gezeigt werden (Daidone et al. 2002). Für Kopf-Hals-Tumoren zeigte sich, dass die Expression von hTERT und Survivin mit einem Verlust der Differenzierung verbunden ist (Sharma et al. 2004).

Survivin und hTERT sind physiologisch in embryonalen Geweben sowie in Stammzellen exprimiert und können z.B. in WTS und Mammakarzinomen nachgewiesen werden. Die Histogenese von mesenchymalen Tumoren (WTS) ist unbekannt. Jedoch geht eine Hypothese davon aus, dass WTS aus mesenchymalen Stammzellen hervorgehen (Katenkamp und Kosmehl 1995, Rath und Schönfelder 2002). Als Bindeglied zwischen Zellzyklusprogression und Apoptoseinhibierung scheint Survivin in der Tumorgenese von zentraler Bedeutung zu sein. Eine Überexpression von Survivin bewirkt im Knochenmark von Mäusen eine Erhöhung der Koloniebildungsrate (Fukuda et al. 2002). Ein Vergleich von Knochenmark gesunder Spender mit dem von Leukämie-Patienten zeigt, dass Leukämie-Patienten Survivin signifikant stärker exprimieren (Nakagawa et al. 2004). Im Zusammenhang mit APC-Mutationen im Kolon wird Survivin mit der Tumorgenese aus Stammzellen in Verbindung gebracht (Zhang et al. 2001). Zudem lässt die Isolation von „Stammzell-ähnlichen“ Zellen mit differentieller Survivinexpression in humanen glialen Tumoren vermuten, dass Survivin für die Entstehung von Gliomen aus Stammzellen von entscheidender Bedeutung ist (Ignatova et al. 2002, Altura et al. 2003).

Neuere Befunde zeigen, dass immortalisierte mesenchymale Stammzellen nach hTERT-Transfektion und Kultivierung transformieren bzw. in der Maus Tumoren bilden (Serakinci et al. 2004, Keith 2004). Auch für Mammakarzinome wurde als Ursache der Transformation die Veränderung von epithelialen Stammzellen nachgewiesen (Herr Prof. Dr. Brabletz, Erlangen, persönliche Mitteilung). Für eine Stammzelle ist es viel einfacher, zu einer Tumorzelle zu transformieren, als für eine differenzierte Normalgewebezelle (persönliche Mitteilung T. Müller ZAMED, Halle). Diese Daten unterstützen die Stammzellhypothese der Tumorentstehung, -entwicklung. Tumorzellen nutzen Mechanismen und Proteine der „autarken“ Stammzellen. Ohne die notwendige Regulation führt dies zur Transformation von Zellen, die zur Destruktion des Organismus befähigt sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Überexpression von zwei primär in Stammzellen exprimierten Genen, wie hTERT und Survivin in WTS mit einer sehr schlechten Prognose korreliert ist. Diese Befunde deuten auf eine Therapierelevanz der Survivin-Expressionen hin, die im Kapitel 5.4 ausführlich diskutiert wird.

#### 5.2.4 Prognostische Bedeutung der Expression von Survivinprotein für WTS

Mittels zweier Nachweismethoden, der Westernblot-Analyse (WB) und ELISA, wurde die Proteinexpression von Survivin für 63 WTS bestimmt und mit Berücksichtigung der klinischen Daten der Patienten ausgewertet (vgl. Kap. 4.4, Tab. 8.5, Anhang). Ferner erfolgte die Analyse von 14 Normalgewebeproben, 6 humanen Sarkom-Zelllinien und einer Fibroblasten-Zelllinie (Tab. 8.3, Anhang).

Mittels multivariater Cox-Regressionsanalyse erwies sich, dass die Überexpression von Survivinprotein mit einer schlechten Prognose für WTS-Patienten assoziiert ist. Für die WB-Analyse wurde ein 5,1fach ( $p=0,004$ ), für den ELISA ein 19,8fach ( $p=0,001$ ) erhöhtes Risiko, an einem WTS zu versterben, ermittelt (vgl. Abb. 4.7, 4.8) (Kappler et al. 2003).

Der ELISA war die sensitivere Nachweismethode einer Survivinexpression (gezeigt durch den McNemar-Test,  $p=0,022$ , Abb. 8.4, Anhang), obwohl die metrischen Daten der WB-Analyse und des ELISA korrelierten (Pearson-Test  $p=0,013$ ) (vgl. Kap. 4.4). Die metrischen Daten der mRNA-Expressionsanalyse für Survivin und der Survivinprotein-Expression mittels ELISA zeigten eine gute Übereinstimmung (Pearson-Test,  $p=0,05$ ). Die gute Übereinstimmung der Daten der mRNA-Analyse und des ELISA ist mit der hohen Sensitivität beider Tests zu erklären. Mit der WB-Analyse war eine Korrelation mit den mRNA-Daten nicht nachweisbar ( $p=0,41$ ).

Mittels des sensitiven ELISA konnte in Normalgewebe von Magen- und Milzgewebe Survivinprotein detektiert werden (Kappler et al. 2003). Dieser Befund deutet darauf hin, dass auch das Survivinprotein ubiquitär exprimiert wird und die Höhe der Expression entscheidend ist. Survivinprotein wurde auch in normalem Hirngewebe nachgewiesen (Altura et al. 2003). Generell wird jedoch beschrieben, dass Survivin selten in Normalgewebe nachgewiesen wird (Ambrosini et al. 1997, Übersicht in Altieri 2003b) (vgl. Kap. 5.2.2).

Die Expression von Survivinprotein wird generell als ein wichtiger Prognosemarker für verschiedene Tumoren bewertet (Übersicht in Altieri 2003b).

Mittels WB-Analyse konnte die Survivinexpression an humanen Gliomen und epithelialen Ovarialtumoren, als ein negativer prognostischer Marker identifiziert werden (Chakravarti et al. 2002, Sui et al. 2002).

Immunhistochemisch wurde u.a. gezeigt, dass eine Expression von Survivin ein negativer Prognosemarker für oberflächige Harnblasenkarzinome ( $p = 0,009$ ,  $RR= 3,17$ ), Endometriumkarzinome und Adenokarzinome der Lunge ist (Ku et al. 2004, Takai et al. 2002, Ikehara et al. 2002).

Eine Korrelation zwischen einem längeren krankheitsfreien Intervall und niedriger Survivinexpression wurde in Kolorektalkarzinomen gezeigt (Rödel et al. 2002). Immunhistochemisch ist Survivin in Tonsillar-Plattenepithelkarzinomen höher exprimiert als

im Normalgewebe und in Metastasen wiederum höher als im Primärtumor (Weinman et al. 2003).

Eine Korrelation zwischen einem nukleären Survivinnachweis und dem Tumorgrad, histologischen Typ und dem p53-Genstatus, nicht aber mit dem Gesamtüberleben ließ sich für Ovarialkarzinome feststellen (Cohen et al. 2003). In einer Studie über Leukämiepatienten wies die Survivinquantifizierung mittels der „real-time“-PCR eine klinische Relevanz auf. Mittels des ELISA konnte die Survivinexpression nicht als ein potentielles Markergen identifiziert werden (Sugahara et al. 2004).

Für Adenokarzinome der Prostata und Zellkarzinome des oberen Urogenitaltraktes konnte die Survivinexpression nicht mit der Prognose korreliert werden (Kaur et al. 2004, Nakanishi et al. 2002). Für Mammakarzinome korrelierte der Nachweis von Survivin in den Zellkernen demgegenüber mit einer guten Prognose (Kennedy et al. 2003).

Zusammenfassend ist feststellbar, dass sowohl die Survivin-mRNA-Expression als auch die Survivin-Proteinexpression als ein unabhängiger negativer Prognosemarker für WTS-Patienten identifiziert werden konnte. Dies entspricht vielen Befunden anderer Autoren für Leukämien und epitheliale Tumoren. Ferner erfolgte der Nachweis, dass die Survivinanalyse mittels quantitativer RT-PCR bzw. ELISA gegenüber einer qualitativen RT-PCR bzw. einer WB-Analyse sensitiver ist.

### **5.3 Funktionelle Untersuchung von Survivin an WTS-Zelllinien**

#### **5.3.1 Induktion der Survivinexpression durch den Einsatz von Survivin-GFP-Konstrukten**

Für Lokalisationsexperimente bzw. um zellbiologische Veränderungen durch eine Überexpression von wt-Survivin bzw. Survivin- $\Delta 3$ , -2B zu analysieren, wurden unterschiedliche Survivin-GFP-Konstrukte konstruiert. Ferner erhielt ich ein wt-Survivin-GFP-Konstrukt von Prof. Gerharz (Universität Düsseldorf).

Die Plasmide konnten in Tumorzellen transfiziert und über einen konstitutiv exprimierenden CMV-Promotor transkribiert werden. Die generierten Fusionsproteine fluoreszierten durch das GFP (grün-leuchtendes Protein) unter UV-Licht (Abb. 5.1).

Die Transfektionseffizienz der drei Survivin-Varianten war mit weniger als 5% sehr gering bzw. nahm mit der Passagierung ab. Die Etablierung stabil transfizierter Zelllinien war nicht möglich. Obwohl eine Selektion auf Antibiotikaresistenz (Neomycin) durchgeführt wurde, stieg der Anteil der fluoreszierenden Zellen nicht. Nach mehrfacher Anreicherung der transfizierten Zellen mittels FACS-Sortierung auf bis zu 73 %, reduzierte sich der Anteil der Survivin-GFP positiven Zellen im Verlauf der Kultivierung wieder. Dies konnte im Zellkoloniebildungstest betätigt werden (Abb. 5.2).

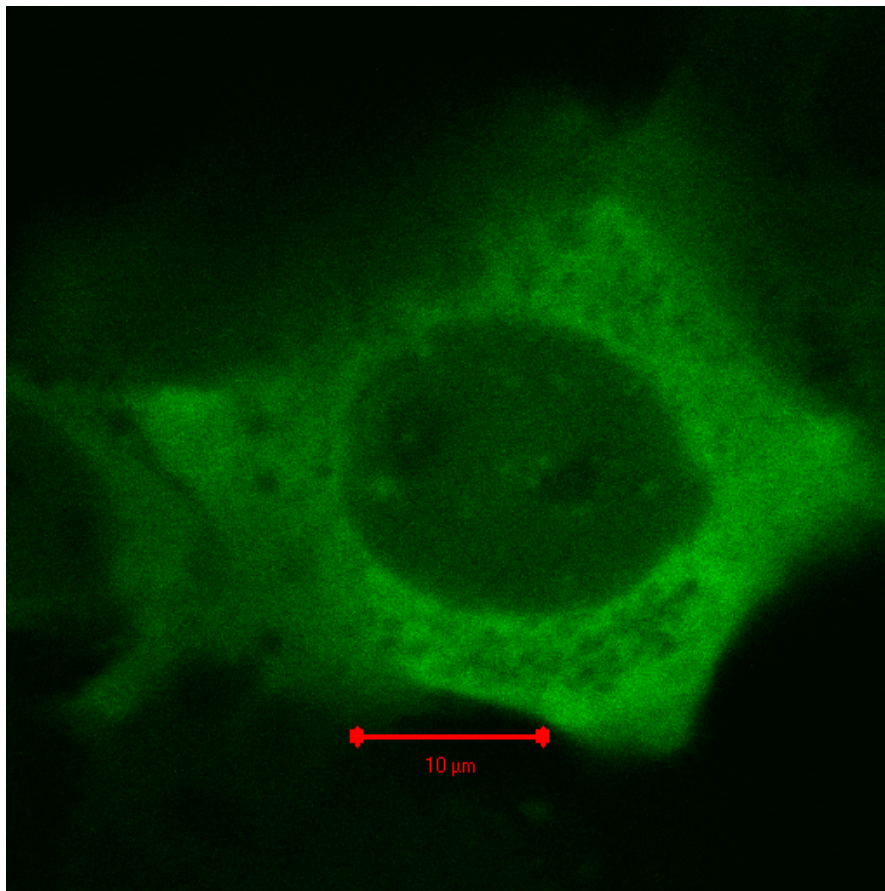


Abb. 5.1 Darstellung der Zelllinie US 8-93 G (transfiziert mit einem wt-Survivin-GFP-Plasmid (konfokales Laserscanning-Mikroskop, (Dr. Hause IPB, Halle)

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Survivin-GFP-Plasmide translatierten auch das GFP. Survivin-GFP-Konstrukte scheinen teils funktionell zu sein und sind in der Lage die Apoptose zu inhibieren (Wheatley et al. 2001, Mahotka et al. 2002b, Carvalho et al. 2003). Zellbiologische Experimente konnten auch mit den Survivinvarianten, die mit GFP fusioniert waren, durchgeführt werden (Mahotka et al. 2002b). GFP wird in der Literatur als für die Zellen unkritisch angesehen (Ikawa et al. 1999), obwohl einige Autoren nachweisen, dass es für manche Zellen toxisch sein kann (Martinez-Serrano et al. 2000).

Jedoch könnte der Zusammenschluss zweier kleiner Proteine (Survivin und GFP) die Struktur und Funktion des Fusionsproteins verändern und auch zu einem Wachstumsnachteil führen (Dr. Mahotka, Düsseldorf, persönliche Mitteilung). Dies würde den stetig sinkenden Anteil fluoreszierender Zellen dieser Arbeit erklären.

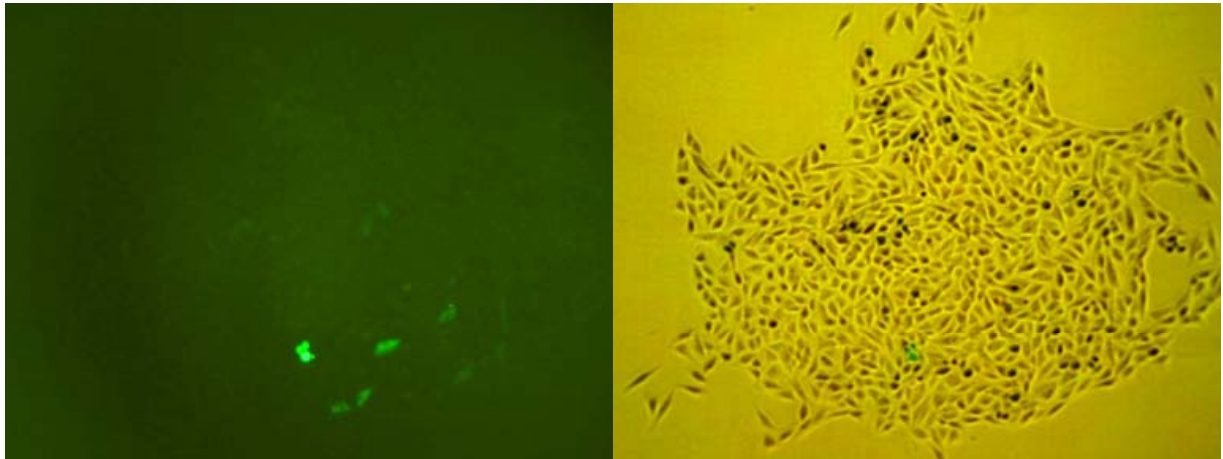


Abb. 5.2 Zellkoloniebildungstest von mit Survivin-GFP-positiv transfizierte Zellen (Zelllinie US 8-93 G) (mit UV bzw. Auflicht x40); viele der Zellen verlieren die GFP-Fluoreszenz

Die Lokalisationsexperimente dokumentieren, dass wt-Survivin-GFP-Protein im Wesentlichen im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 5.1). Erst in der Mitose ist es mit den Chromosomen assoziiert (Abb. 5.3) bzw. verbleibt nach der Zytokinese im Raum zwischen den sich teilenden Zellen (Abb. 5.4). Ähnliche Untersuchungen wurden auch in der Literatur beschrieben (Wheatley 2001).

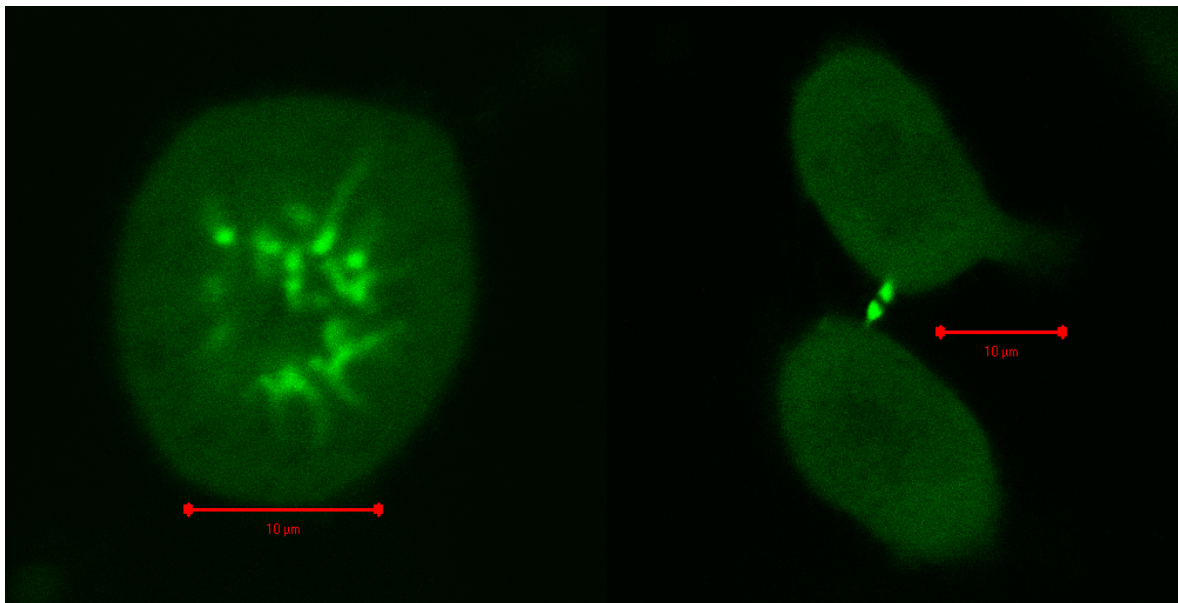


Abb. 5.3 Aufnahme von US 8-93G-Zellen während der Mitose

Survivin-GFP-Protein lagert sich an die Chromosomen an (beide Aufnahmen (Abb. 5.3, Abb. 5.4) mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop) (durch Dr. Hause IPB, Halle)

Abb. 5.4 Aufnahme von US 8-93 G-Zellen nach der Mitose

Survivin-GFP-Protein verlagert sich als Teil des sogenannten Flemming-Körpers (kleiner Pili) zur Verbindungsstelle der beiden Tochterzellen



Die mit Survivin- $\Delta$ 3-GFP-Plasmiden transfizierten Zelllinien fluoreszierten hauptsächlich im Zellkern, waren aber nur wenige Tage nach der Transfektion vital. Die Survivin-2B-GFP-Zelllinien fluoreszierten im Kern und im Zytoplasma und konnten angereichert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Bestrahlung der mit wt-Survivin-GFP-Plasmiden (US 8-93, vgl. Tab. 5.1) bzw. der mit GFP-Plasmiden (US 8-93 K) transfizierten Zelllinie ließ keine strahlenbiologischen Unterschiede beider Zelllinien erkennen (Daten nicht gezeigt). Der Grund dafür könnte in der hohen Strahlenresistenz dieser Sarkomzelllinie (US 8-93 G) bzw. in der Anreicherungsrate der US 8-93 G zu finden sein. Untersuchungen an Gliomazellen, die mit wt-Survivin transfiziert wurden, demonstrieren, dass zusätzliches Survivin diese Zellen gegenüber Bestrahlung resistenter macht (Chakravarti et al. 2004). Weitere Arbeiten zeigen, dass die Transfektion von wt-Survivin die strahleninduzierte Aktivierung der Kaspase-3 in Pankreas-Zelllinien bzw. HEK293 verhindert (Asanuma et al. 2002, Lu et al. 2004).

Die Arbeit mit Fusionsproteinen konnten die Funktion des untersuchten Proteins modifizieren. Somit scheinen Ergebnisse nur bedingt für die Interpretation geeignet zu sein.

### 5.3.2 siRNA-spezifische Inhibierung von Survivin in WTS-Zelllinien

Erste Versuche mit anti-Survivin-Oligonukleotiden (ODN) wurden an HeLa-Zellen (Li et al. 1999) in Lungentumor-Zelllinien (Olie et al. 2000) und verschiedenen anderen Tumorzelllinien durchgeführt (Chen et al. 2000, Kallio et al. 2001, Jiang et al. 2001, Zhou et al. 2002, Shankar et al. 2001).

In dieser Arbeit wurden mittels Survivin-spezifischer-DNAzyme bzw. -siRNA Sarkom-Zelllinien behandelt. Nur die siRNA reduzierten die Survivin-mRNA bzw. das Survivin-Protein effizient. Fünf Sarkom-Zelllinien, mit unterschiedlichem p53-Genstatus, wurden mit 300 nM Survivin-spezifischen- bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Die Folge der siRNA-Applikation gegen Survivin war eine Reduktion der Survivin-mRNA um 73-88% und des -Proteins um 52-81 %. Die Reduktion war unabhängig vom p53-Genstatus der Zelllinien (vgl. Kap. 4.7.1, Tab. 8.6). Die Plattiereffizienz der fünf behandelten Sarkomzelllinien wurde um 65-86 % verringert (Kappler et al. 2004).

Vergleichbare Ergebnisse wurden für andere Tumor-Zelllinien (HeLa, HCT116, HCT15, A549) nach der Behandlung mit Antisense-ODN gegen Survivin beschrieben. So führte die Behandlung mit ODN zur Reduktion der Survivin-mRNA um 70-90% (Chen et al. 2000, Olie et al. 2000) und des Proteins um 60-90 % (Chen et al. 2000, Li et al. 1999). Die Behandlung der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 mit einem anderen siRNA-Konstrukt bzw. der HeLa-Zelllinie mit ODN gegen Survivin führte ebenso zu einer Reduzierung des Survivin-Proteins und zu einer verringerten Plattiereffizienz (Chen et al. 2000, Williams et al. 2003). Die in

dieser Arbeit beobachtete Reduktion der Plattiereffizienz der fünf Sarkomzelllinien (vgl. Kap. 4.7.1), resultierte nicht aus einer starken Induktion der Apoptose infolge der siRNA-Applikation. Die Apoptoserate stieg in keiner der fünf Sarkomzelllinien über 10% (vgl. Kap. 4.7.2). Dies entspricht anderen Ergebnissen, die zeigten, dass die Apoptoseinduktion in diesen Sarkomzelllinien auch nach Bestrahlung mit 12 Gy maximal 7-18 % erreicht (Bache et al. 1999). Diese Zelllinien reagieren auf einen Apoptosestimulus nicht mit einer massiven Apoptoseinduktion.

Die Transfektion einer Fibroblastenzelllinie (NIH-3T3) und einer Osteosarkomzelllinie (U2OS) mit einem Plasmid, das eine stabile Survivin-spezifische siRNA-Applikation ermöglicht, induzierte ebenfalls keinen massiven Anstieg der Apoptose (Lens et al. 2003). Auch andere Tumorzellen (u.a. HeLa-Zellen, Melanom-Zelllinien), die mit ODN, Survivin-spezifischen Antikörpern oder Ribozymen gegen Survivin behandelt wurden, zeigten keine massive Apoptoseinduktion (Kallio et al. 2001, Pennati et al. 2003).

Die Applikation von siRNA in HeLa-Zellen und in die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 ergab eine schwache Erhöhung der Apoptoserate (< 16%) (Carvalho et al. 2003, Williams et al. 2003). Nach der Behandlung von HeLa-Zellen mit ODN gegen Survivin wurden bis zu 15 % der Zellen apoptotisch (Li et al. 1999). Für verschiedene Tumoren (u.a. HeLa, HUVEC, HCT-15) konnte nach ODN-Applikation gegen Survivin ein Anstieg der Apoptose um das 1,1-3fache nachgewiesen werden bzw. in Mesotheliom-Zellen um 26,3 % (Chen et al. 2000, Xia et al. 2002).

Nach einer Survivin-inhibierung mit siRNA wurden in dieser Arbeit in den fünf Sarkom-Zelllinien polyploide Zellen nachgewiesen. Mittels Zellkoloniebildungstest konnte festgestellt werden, dass die polyploiden Zellen auch noch ca. 12 Tage nach der siRNA-Behandlung vital waren. In der Zellzyklusanalyse zeigte sich, dass 24 h nach einer siRNA-Applikation gegen Survivin eine Arretierung der Zellen in der G2/M-Zellzyklusphase erfolgt (vgl. Kap. 4.7.2, Abb. 4.19). Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden 48 h bzw. 72 h nach siRNA-Applikation 8 % bzw. 10 % polyploide Zellen detektiert (Kappler et al. 2004).

Die Applikation von Survivin-spezifischen-siRNA führte in Kolonkarzinom-Zelllinien, HeLa-Zellen, Osteosarkom- und Fibroblastenzelllinien ebenfalls zur Generierung polyploider Zellen (Williams et al. 2003, Carvalho et al. 2003, Lens et al. 2003). Auch die Verwendung von ODN oder Ribozymen gegen Survivin führte in verschiedenen Tumorzelllinien (u.a. HeLa, HUVEC, Du145, Pc-3) dazu, dass polyploide Zellen entstanden (Chen et al. 2000, Li et al. 1999, Kallio et al. 2001), die teilweise abstarben (Chen et al. 2000, Pennati et al. 2004).

Die Untersuchungen zeigen, dass ein Survivin-„knock down“ zu einer drastischen Abnahme des klonogenen Zellüberlebens führt. In Abhängigkeit vom Zelltyp kann die Apoptose induziert werden, bzw. über eine G2/M-Akkumulation erfolgt die Generierung von polyploiden Zellen. Diese polyploiden Zellen werden entweder apoptotisch bzw. sind nicht mehr in der

Lage, die Zytokinese vollständig durchzuführen. Möglicherweise sind bestimmte Zelltypen, die per se auch im Körper polyploid werden (z.B. Osteoblasten, Muskelzellen, Leberzellen), nach einer induzierten Polyploidie vitaler und werden kaum apoptotisch, im Gegensatz zu Zellen, deren genetisches Programm dies nicht vorsieht.

Die Erklärung für die Effekte einer Survivin-Inhibierung liefern Survivin-„knock out“ Experimente. Survivin-defiziente Zellen teilten sich abnormal und nach einer inkompletten Zytokinese kam es zur Formation von polyploiden Zellen (Uren et al. 2000). Die Inhibierung des Survivins verursacht Fehler in der Zytokinese und des Mikrotubuliumaufbaus. Derartige Mauszellen waren 4,5 Tage nach der Befruchtung nicht mehr lebensfähig und wurden apoptotisch (Uren et al. 2000). Der IAP Survivin verbindet so die Apoptose mit der Zellteilung und wirkt als Kontrollinstanz in der Mitose bzw. Apoptose (Li 2003, Beltrami et al. 2004). Ähnliche Effekte zeigen sich, wenn der funktionelle Partner des Survivin incenp inhibiert wird. Beide Proteine sind essentiell für die Mitose (Uren et al. 2000, Wheatley et al. 2001) und Teil eines „passenger Proteinkomplexes“, welcher das Bindeglied zwischen chromosomaler Segregation und Zytokinese darstellt (Skoufias et al. 2000, Terada 2001).

Isogene Zelllinien (HCT-116) mit p53(-/-)-Genstatus, die mit siRNA gegen Survivin behandelt wurden, zeigten weniger eine mitotische Arretierung, sondern eine verstärkte Polyploidisierung (Beltrami et al. 2004). Die Hemmung der Survivinexpression mit siRNA verursacht eine verstärkte Expression von p53. Dies zeigt, dass Survivin eine Kontrollfunktion in der Mitose besitzt, die nach einer fehlerhaften Mitose eine p53-abhängige Antwort auslöst. Es sind weitere Versuche mit Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus erforderlich, um den Einfluss von p53 endgültig zu klären.

Survivin kann einer Aktivierung der Apoptosekaskade während der Mitose entgegenwirken, weil die auftretenden strukturellen Störungen des Mitoseapparates, durch eine hohe Survivinexpression „überdeckt“ werden (Reed und Reed 1999). Survivin und sein Bindungspartner Aurora B-Kinase haben offenkundig eine Kontrollfunktion in der Chromosomensegregation und des Spindelapparaufbaus von den frühen Phasen der Mitose bis hin zur Zytokinese (Shannon und Salmon 2002). Beide Proteine sind in Tumoren überexprimiert und könnten einen Überlebensmechanismus für Zellen mit Spindeldefekten darstellen bzw. zu den tumorassoziierten Aneuploidien beitragen (Ota et al. 2002, Altieri 2003a).

Es ist festzustellen, dass ein „knock down“ von Survivin nach siRNA-Applikation zu einer Verringerung des klonogenen Überlebens, zu einer G2/M-Akkumulation und zur Generierung von polyploiden Zellen führt. Letztlich erfolgt durch eine Survivin-Inhibierung eine Hemmung des für die Mitose essentiellen Proteins. Dadurch wird die Mitose gestört, was für eine Tumorthherapie eine sinnvolle Strategie darstellt.

## 5.3.3 Inhibierung von Survivin in Kombination mit Bestrahlung

Um die Apoptose zu induzieren und den therapeutischen Effekt der Hemmung von Survivin auf eine Radiotherapie zu untersuchen, wurden WTS-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus zusätzlich bestrahlt.

In einigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Survivinexpression und der Radiosensitivität von Tumorzellen festgestellt werden. Für Tumorzelllinien der Lunge und der Pankreas wurde gezeigt, dass die Überexpression von Survivin, nach Transfektion mit wt-Survivin, mit einer erhöhten Strahlenresistenz assoziiert ist (Asanuma et al. 2002, Lu et al. 2004). Ferner sind Pankreaskarzinom-Zelllinien, Kolorektalkarzinom-Zelllinien und Glioblastom-Zelllinien mit einer hohen Survivinexpression radioresistent (Asanuma et al. 2000, Rödel et al. 2003, Chakravarti et al. 2004). Für Rektumkarzinom-Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen der Survivinexpression, der Apoptoseinduktion und dem Ansprechen auf eine präoperative Radiochemotherapie festgestellt werden (Rödel et al. 2002).

Die Befunde dieser Arbeit für WTS-Zelllinien zeigen, dass die Strahlenresistenz nicht mit der Expression von Survivin korrelieren muss. So exprimiert die strahlensensitive p53-/- Zelllinie Saos-2 wesentlich mehr Survivin als die strahlenresistente mt-p53 Zelllinie US 8-93 (vgl. Tab. 5.1). Die Ursache für diesen Befund könnte der unterschiedliche p53-Genstatus der Zelllinien sein. Das TSG p53 reguliert Survivin transkriptionell negativ, so dass der p53-Genstatus einen wesentlichen Effekt auf die Survivinexpression hat (Hoffman et al. 2002, Zhou et al. 2002, Mirza et al. 2002, Lu et al. 2004). Das durch Bestrahlung aktivierte p53, hat dagegen keinen Effekt auf die Survivin-Expression. Auch die Promotoraktivität von Survivin wird in Tumorzellen (LLC, SW620, MDA-MB-231), im Gegensatz zu primären Endothelzellen, durch Bestrahlung nicht reduziert (Lu et al. 2004).

Tabelle 5.1 Survivin-mRNA, -Proteinkonzentration und strahlenbiologisches Überleben nach einer Strahlendosis von 2 Gy (SF2)

Zelllinie	A-204	US 8-93	SK-LMS	RD	Saos-2
P53-Genstatus	wt/wt	wt/mt	mt/-	mt/-	-/-
Survivin-mRNA <sup>1</sup>	17,6	3,5	15,6	16,5	29,9
Survivinprotein <sup>2</sup>	7,2	1,7	2,5	5,9	11,9
SF2-Wert in % <sup>3</sup>	34	79	63	46	28

<sup>1</sup>-in zmol Survivin-mRNA / amol GAPDH-mRNA; <sup>2</sup>-Survivinprotein (ng) / Gesamtprotein (mg);

<sup>3</sup>-Überlebensfraktion (aus Bache et al. 1999) (vgl. Kap. 3.13)

In dieser Arbeit wurden zwei WTS-Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus untersucht. Die Zellen wurden 24 h nach der Applikation mit Survivin-spezifischen siRNA mit Röntgenstrahlen (2-8 Gy) behandelt (vgl. Kap 3.9.2).

Die Inhibierung der Survivinexpression durch siRNA bewirkte, in beiden Zelllinien unabhängig vom p53-Genstatus, die Verringerung des Survivinproteins (vgl. Abb. 4.21, 4.22) und der Plattiereffizienz um mehr als 50% (vgl. Tab. 4.5). Durch Bestrahlung wurde die Reduktion der Plattiereffizienz in beiden Zelllinien dosisabhängig weiter verringert (vgl. Tab. 4.5). In der wt-p53-Zelllinie A-204 wurde p53 nach der Bestrahlung verstärkt exprimiert. Die Kombination von siRNA-Behandlung gegen Survivin und Bestrahlung führte nur in der wt-p53-Zelllinie A-204 zu einer Strahlensensitivierung (vgl. Tab. 4.6). Der Verstärkungsfaktor nach einer Bestrahlung von 4 Gy lag bei 2,5 ( $p=0,02$ ). Keine Radiosensitivierung wurde dagegen in der mt-p53-Zelllinie US 8-93 gefunden. Eine Survivinreprimierung nach siRNA-Behandlung kann somit die Wirkung einer Bestrahlung in der wt-p53-Zelllinie verbessern (Kappler et al. 2005).

Die Kombination aus der Survivininhibierung und Bestrahlung erhöht ferner die Apoptoserate in der wt-p53-Zelllinie A-204. Demgegenüber war die Apoptoserate in der mt-p53-Zelllinie US 8-93 nicht verändert (vgl. Kap. 4.8). Somit hat der p53-Genstatus nach Kombination von Survivininhibierung und Bestrahlung einen Einfluss auf das zellbiologische Verhalten der Zellen.

Eine Arbeit über Melanoma-Zelllinien dokumentiert eine strahlensensibilisierende Wirkung einer Survivininhibierung durch Ribozymbehandlung auch in mt-p53-Zelllinien (Pennati et al. 2003). Denkbar ist, dass in diesen mt-p53-Zelllinien die Apoptosekaskade von anderen Genen, die möglicherweise in der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinie US 8-93 ebenfalls gestört sind, aktiviert wird.

Nach Bestrahlung wird p53 phosphoryliert, und es kommt zur Freisetzung von Zytochrom-C aus den Mitochondrien, das zur Prozessierung der Initiator-kaspase-9 führt, die daraufhin die Effektor-kaspasen -3, -6, und -7 aktiviert (Pruschy et al. 2001).

Dieser Apoptose-„pathway“ wurde in dieser Arbeit für die zwei Sarkomzelllinien teilweise untersucht. So stieg die Aktivität der Kaspasen-3 und -7 in der wt-p53-Zelllinie A-204 in Abhängigkeit von der Dosis der Bestrahlung an. Die Kombination von siRNA- Behandlung gegen Survivin und Bestrahlung erhöht die Kaspaseaktivität um das 5fache im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (vgl. Abb 4.25). In der mt-p53-Zelllinie US 8-93 zeigte sich weder 3 h noch 24 h nach der Bestrahlung ein Einfluss eines Survivin-„knock down“ auf die Kaspaseaktivität, obgleich 24 h nach Bestrahlung ein leichter dosisabhängiger Anstieg der Kaspaseaktivität feststellbar war (vgl. Abb. 4.26). Dabei könnte es sich um einen p53-unabhängigen sekundären Effekt handeln, der nach der Schädigung von DNA und Proteinen zeitlich versetzte „Apoptose-pathways“ aktiviert. In der mt-p53-Zelllinie US 8-93 scheint ein

normaler Ablauf der Apoptose nach einer Bestrahlung gänzlich gestört zu sein (Kappler et al. 2005).

Die Inhibierung von Survivin mittels Ribozymen erhöhte die Kaspase-3-Aktivität in Melanom- bzw. Prostatakarzinom-Zelllinien bis zum 12fachen (Pennati et al. 2002, Pennati et al. 2004). Wenn Survivin in Pankreaskarzinom-Zelllinien überexprimiert wird, verringert sich dagegen die Aktivität der Kaspase-3 (Asanuma et al. 2002).

Mittlerweile ist bekannt, wie der IAP Survivin die Apoptosekaskade und speziell die Aktivität der Kaspase beeinflusst. Survivin inhibiert die Kaspase-9 bzw. ist assoziiert mit den Kaspasen-3 und -7 (O'Connor et al. 2000, Marusawa et al. 2003, Tamm et al. 1998, Conway et al. 2000, Shin et al. 2001). Dabei wird eine direkte inhibierende Wirkung von Survivin auf die Kaspase-3 kontrovers diskutiert (Banks et al. 2000, Verdecia et al. 2000, Reed 2001, Marusawa et al. 2003). Neuste Ergebnisse demonstrieren, dass Survivin an HBXIP („hepatitis B X-interacting protein“) bindet und dieser Komplex die Apaf-1-vermittelte Aktivierung und Prozessierung der Pro-Kaspase-9 verhindert. Dies beweist, dass Survivin selektiv die Kaspaseaktivierung, welche über den Zytocrom-C-Weg verläuft, inhibiert (Marusawa et al. 2003). Es zeigt sich hierbei, dass nur beide Proteine gemeinsam (HBXIP und Survivin) verhindern können, dass das freigesetzte Zytocrom-C und Apaf-1 die Prokaspase-9 bindet und aktiviert. Damit wäre die Apoptosekaskade unterbrochen (Marusawa et al. 2003). Weder der Komplex aus Survivin/HBXIP, noch Survivin für sich sind in der Lage, die Kaspasen-3 bzw. -7 oder andere Apoptosekaskaden wie etwa den Kaspase-8-„Pathway“ zu inhibieren (Marusawa et al. 2003).

Diese Fähigkeit von Survivin hängt dabei entscheidend vom Phosphorylierungsstatus des Proteins ab, welcher durch p34<sup>cdc2</sup>-Cyclin B1 bestimmt wird (O'Connor et al. 2000, O'Connor et al. 2002). Wenn Survivin dephosphoryliert ist, wird die Kaspase-9 aus dem Komplex mit Survivin gelöst und führt zu einer Kaspase-9-abhängigen Apoptose (O'Connor et al. 2000). In Versuchen mit HeLa-Zellen führte die Applikation der mutierten, nicht phosphorylierbaren (Threonin 34) Survivinmutante jedoch nicht zur Induktion der Apoptose (Temme et al. 2003). Der genaue Einfluss des Phosphorylierungsstatus auf die Aktivität von Survivin sollte noch genauer untersucht werden. Ferner sollten die Effekte einer Survivin Thr 34-Transfektion (vgl. Kap 5.4) auf das für die Mitose essentielle Protein Survivin berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit und in anderen wurde der Einfluss der Survivinexpression auf die Aktivität der Effektor-kaspasen-3 und -7 nachgewiesen. Dieser ist indirekt und über die Initiator-kaspase-9 zu erklären (Marusawa et al. 2003).

Es kann festgestellt werden, dass sich ein Survivin-„knock down“ auf die Mitose auswirkt, hingegen auf die Apoptose nur, wenn die Apoptose „Pathways“ intakt sind. Somit ist Survivin dann ein Radiosensitizer, wenn die bestrahlten Zellen noch über einen intakten, wahrscheinlich über die Kaspase-9 ablaufenden „Apoptose-Pathway“ verfügen.

#### 5.4 Therapeutische Optionen in Bezug auf Survivin

Der Befund, dass Survivin in vielen Tumoren, jedoch kaum in Normalgewebe exprimiert wird, macht es zu einem idealen therapeutischen „Target“ bei der Tumorbehandlung. Außerdem führt ein „knock out“ des Survivins zum Absterben von Mäusemryos in der Folge der Störung der Zytokinese (Uren et al. 2000).

Eine bereits beschriebene Möglichkeit, den IAP Survivin zu inhibieren, und dadurch der Apoptose in den Tumorzellen einen negativen Regulator zu entziehen bzw. die Zellteilung zu stören, ist die Applikation von molekularen Antagonisten wie ODN oder siRNA (vgl. Kap. 5.3.2).

Theoretisch könnte auch die Expression des natürlichen Antagonisten EPR-1 ein interessanter Therapieansatz sein (Yamamoto et al. 2002). Die Expression des Survivin und des EPR-1 erfolgt aus einem Gencluster, dabei fungiert das EPR-1 als ein komplementäres Survivin-Antisense-Konstrukt (Ambrosini et al. 1997). Andere Autoren nehmen an, dass EPR-1 nur in einigen Geweben exprimiert wird bzw. nicht existiert (Zaman und Conway 2000).

Schließlich wird auch der Einfluss der Survivin-Varianten Survivin-2B und Survivin- $\Delta$ 3 auf die Apoptose diskutiert. Gerade Survivin- $\Delta$ 3 enthält eine BH2-Bindedomäne (Mahotka et al. 1999) und ähnelt einem K7-Protein des Herpes simplex Virus (HSV), das durch die Bindung mit Bcl-2 und Inhibierung der Kaspase-3 die Apoptose verhindern kann (Wang et al. 2002). Survivin- $\Delta$ 3 wird als ein antiapoptotisches Protein beschrieben (Mahotka et al. 2002a). Demgegenüber wird der Survivin-2B-Variante eine proapoptotische Funktion durch die Regulation von wt-Survivin zugeschrieben (Mahotka et al. 1999, Krieg et al. 2002, Zhu et al. 2004). In Magentumoren konnte eine stadiumabhängige Expression von Survivin-2B festgestellt werden, während wt-Survivin und Survivin- $\Delta$ 3 in ihrer Expression unverändert blieben (Krieg et al. 2002). Die gezielte Expression von Survivin-2B oder die Hemmung von Survivin- $\Delta$ 3 könnte als Tumorthherapie Anwendung finden. Auch in normalem Hirngewebe konnten Survivin und seine Spleißvarianten nachgewiesen werden, wobei das Verhältnis der Expression von Survivin- $\Delta$ 3/Survivin signifikant höher in malignen als in benignen Hirntumoren war (Yamada et al. 2003, Altura et al. 2003).

Eine andere Möglichkeit, die Survivin-exprimierenden Tumorzellen zu schädigen, ist der Einsatz immunologischer Verfahrensweisen. Immunzellen (CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten) erkennen an der Zelloberfläche von Tumorzellen präsentierte Survivinproteinfragmente (Rohayem et al. 2000, Schmitz et al. 2000, Andersen et al. 2001, Hirohashi et al. 2002). In ersten Analysen konnten Survivin-spezifische Autoantikörper in Patienten mit Mammakarzinomen, Leukämie oder Melanomen detektiert werden (Andersen et al. 2001). Die Realisierung derartiger therapeutischer Ansätze erscheint relativ schwierig,

da viele Tumorzellen die MHC-präsentierenden Komplexe während der Progression verlieren. Ferner waren in diesen Experimenten nur HLA-A2-positive Zellen in der Lage, Survivin zu präsentieren bzw. konnte ein Survivin-2B-Proteinepitop mit einer Affinität zu HLA-A24 gefunden werden (Hirohashi et al. 2002).

Schließlich könnte man die Aktivierung des IAP verhindern. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung des Thr34 am Survivinprotein durch p34<sup>cdc2</sup> für die Aktivierung des Proteins notwendig ist (O'Connor et al. 2000, O'Connor et al. 2002). Eine dominant negative Mutation an der Thr34Ala-Phosphorylierungsstelle von Survivin führt dazu, dass Zellen, die dieses Protein exprimieren, absterben (Grossman et al. 2001, Blanc-Brude et al. 2003). Eine zweite dominant negativ wirkende Survivinmutante ist C84A (Cystein84 wird durch Alanin ersetzt), die die Aktivität der Kaspase-3 erhöht und die Apoptose induziert (Li et al. 1998). Jedoch sind solche Ansätze weniger als Therapie geeignet, da Zellen stabil transfiziert werden müssten.

Interessant ist auch, dass eine hohe Survivinexpression und aktives p34<sup>cdc2</sup> die apoptotische Wirkung des Chemotherapeutikums Taxol verhindert (O'Connor et al. 2002). Es ist denkbar, dass das an den Mikrotubuli gebundene Survivin physisch Taxol daran hindert, Tubulinmoleküle zu polymerisieren. Pharmakologisch wirksame Therapeutika, wie der CDK Inhibitor Flavopiridol, der als Antitumorreagenz die Apoptose auslöst (Wall et al. 2003) oder Purvalanol A ein p34<sup>cdc2</sup>-Inhibitor, wurden *in vitro* (u.a. HeLa-Zellen) und *in vivo* (u.a. MCF-7-Zellen in Nacktmäusen) eingesetzt (O'Connor et al. 2002, Wall et al. 2003). Auf diese Weise wird die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von Survivin verhindert.

Zudem haben andere Chemotherapeutika einen Einfluss auf die Survivinexpression. DNA-Schädigung von ALL-Zellen durch Doxorubicin verstärkt die Expression von wt-p53 und führt zur Inhibierung der Survivinexpression. Dadurch wurde ein Zellzyklusarrest und die Apoptose induziert (Zhou et al. 2002). Dagegen wurde Survivin in Zellen mit mutiertem p53-Allel hochreguliert und die Apoptose nicht induziert. Wenn die Survivin-Expression in diesen mt-p53-Zelllinien durch Antisense-Behandlung inhibiert wurde, waren die Zellen gegenüber der Doxorubicinbehandlung wieder sensitiv (Zhou et al. 2002).

Schließlich wurde eine Beziehung zwischen der Survivinexpression und der Radiosensitivität von Tumorzellen bereits beschrieben (vgl. Kap. 5.3.3).

## 5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Expression von Gesamt-Survivin im Tumorgewebe von WTS-Patienten untersucht. Des Weiteren liegen Ergebnisse für die Inhibierung von Survivin mit siRNA in WTS-Zellen *in vitro* vor. Ferner wurde untersucht, ob sich eine Survivininhibierung auf die Effekte einer Bestrahlung auswirkt.



Die Survivinvarianten von WTS-Proben werden gegenwärtig mittels quantitativer RT-PCR untersucht. In weiteren Analysen könnte die neu entdeckte Survivinvariante-3B ebenfalls analysiert werden.

Die Funktion und die Wirkung der Survivinvarianten Survivin- $\Delta$ 3 und Survivin-2B im Tumorprozess ist weitgehend unbekannt. Interessant wäre es „gain of function“-Studien mittels Plasmid-Konstrukten bzw. „loss of function“-Studien mittels siRNA-Applikation durchzuführen, um beide Varianten weiter zu charakterisieren. Erst vor kurzer Zeit sind variantenspezifische Antikörper erhältlich, mit deren Verwendung die postulierten Wechselwirkungen von Survivin und Survivin  $\Delta$ 3 bzw. Survivin 2B analysiert werden könnten (Mahotka et al. 1999, Li 2003).

Die Survivin-p53-Interaktion sollte weiter untersucht werden. Auch hierzu eignen sich wiederum „gain of function“- und „loss of function“-Studien. Mittels „Microarrays“ könnte analysiert werden, welche Gene und „Pathways“ durch die veränderte Survivinexpression beeinflusst werden (Pennati et al. 2004). Dadurch können Regulatorgene und Interaktionen mit anderen Genen identifiziert werden.

Die weitere Arbeit über Survivin sollte auf eine therapeutisch-gentechnisch orientierte Forschung mit Therapieoptionen fokussiert werden. Survivin ist ein ideales Tumortarget. Der „knock out“ von Survivin ist letal (Uren et al. 2000), außerdem wird es in Normalgewebe kaum exprimiert.

Es ist zu klären, unter welchen Voraussetzungen Normalgewebezellen nicht durch eine Therapie geschädigt werden. Die Survivinvarianten könnten in Tumorzellen anders exprimiert sein als in Normalgewebe. Durch eine differentielle Hemmung der Survivinvarianten, die lediglich die Tumorzellen schädigt, würde ein solcher Ansatz realisiert werden.

Des Weiteren ist vorstellbar, durch Bestrahlung oder Chemotherapie die Tumorzellen vorzuschädigen und apoptotische „Pathways“ zu aktivieren. Dieses „Pathways“ könnten gleichsam freigeschaltet werden, wenn ganze Familien von Genen, z.B. die IAP durch Inhibitoren (siRNA) hochspezifisch und quasi generell ausgeschaltet würden (Cao et al. 2004).

Eine weitere Verbesserung derartiger Therapien wäre der Einsatz von differenzierenden Substanzen wie Retinol oder Ascorbinsäure. Dedifferenzierte Tumorzellen könnten geschädigt und Differenzierungsprozesse aktiviert werden. Islam et al. 2000 u.a. zeigten, dass eine Differenzierung von Tumorzellen (z.B. Neuroblastomzellen) durch Retinol zu einer Reduktion der Survivinexpression führt (Islam et al. 2000b, Islam et al. 2000a, Moriai et al. 2001).

Die Dosis muss so gewählt werden, dass differenziertes Normalgewebe, das kaum Survivin exprimiert und durch Retinol wenig stimulierbar ist, nicht geschädigt wird. Eine Kombination

mit Bestrahlung und Chemotherapeutika/Zytostatika würde eher die sich teilenden Tumorzellen betreffen. Viele kleine, im Einzelnen harmlose Eingriffe in die Homöostase der Zellen, sollte der Tumorzelle schaden und von den Normalzellen bzw. Stammzellen toleriert werden. Derartige Therapieoptionen könnten etwa durch eine gezielte gegen Survivin gerichtete Immuntherapie unterstützt werden.

In letzter Zeit wird diskutiert, dass viele Tumorzellen Eigenschaften und Verhaltensweisen zeigen, die auch Stammzellen aufweisen, da Tumoren vielleicht aus den „adulten“ Stammzellen hervorgehen (Keith 2004). Die Resultate dieser Arbeit unterstützen diese Hypothese für WTS.

**Die Entwicklungsbiologie könnte der Schlüssel und ein Modellsystem zum Verständnis der Tumorzellbiologie sein. Differenzierungsexperimente von Stammzellen wären damit der Ausgangspunkt neuer und schonenderer Therapieverfahren für humane Tumoren.**

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des IAP Survivin für WTS auf mRNA- und Proteinebene untersucht.

Dabei erfolgte die Analyse der Expression der Survivin-mRNA und der Varianten Survivin- $\Delta 3$  und Survivin-2B in einer qualitativen PCR. Wildtyp-Survivin war in Normalgewebe und in Lymphozyten nachweisbar, wird aber im Tumorgewebe wesentlich stärker exprimiert. Nach der Etablierung einer quantitativen „real-time“-PCR (TaqMan-Assay), konnte die Gesamt-Survivin-Expression von WTS-Patientenproben analysiert werden. Die relative Survivin-Expression wurde als zeptomol Survivin ( $10^{-21}$  mol) je attomol GAPDH ( $10^{-18}$  mol) angegeben. In 77 (82%) der untersuchten Proben von WTS-Patienten und in allen Sarkomzelllinien war Gesamt-Survivin nachweisbar. Die detektierte Survivinexpressionen in Lymphozytenmaterial und Normalgewebe war ca. 10fach niedriger. Diese Ergebnisse dokumentieren, dass die durchschnittliche Survivinexpression in tumorfremem Gewebe (Normalgewebe und Lymphozytenmaterial) deutlich geringer als in Tumormaterial (WTS-Patientenproben und Sarkomzelllinienmaterial) ist. Mittels einer multivariaten Cox- Regressionsanalyse wurde eine mRNA-Gesamtsurvivin-Expression  $>2$  zeptomol Survivin je attomol GAPDH als ein negativer und unabhängiger Prognosemarker für WTS identifiziert (RR=2,7; p=0,009).

Ein weiteres Genprodukt, das wie Survivin vor allem in Tumorgeweben und in Stammzellen exprimiert wird, ist die katalytische Telomerase-Untereinheit des Replikationsapparates (hTERT). Die Analyse der mRNA von 89 WTS-Proben zeigte, dass Patienten deren Tumoren hTERT und Survivin in hohen Konzentrationen aufwiesen, ein 20fach erhöhtes Risiko aufwiesen, an einem WTS zu versterben. Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten, deren Tumoren beide Gene überexprimierten betrug 17 Monate, im Vergleich zu 124 Monaten bei Patienten, deren Tumoren beide Gene nur gering oder gar nicht exprimierten.

Die Proteinkonzentration von Survivin wurde mit zwei Methoden (Westernblot-Analyse (WB), ELISA) parallel an 63 WTS-Proben bestimmt. Mittels einer Cox- Regressionsanalyse zeigt sich, dass die Expression des Survivinproteins über dem jeweiligen methodenspezifischen Grenzwert ein negativer und unabhängiger Prognosemarker für WTS ist (WB: RR=5,1; p=0,004; ELISA: RR= 19,8; p=0,001).

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde *in vitro* die Survivinexpression inhibiert, um die Relevanz von Survivin als Therapietarget für WTS zu evaluieren.

In Vorstudien erfolgte die Visualisierung der Survivinexpression, indem Survivin bzw. die Varianten Survivin- $\Delta 3$  und Survivin-2B in einen Plasmidvektor (pEGFP-N1- Vektor) mit GFP fusioniert und anschließend in Sarkomzellen exprimiert wurden. Mittels FACS-Vitalsortierung

konnten die Zelllinien angereichert und die Lokalisation der Fusionsproteine analysiert werden. Die Überexpression von Wildtyp-Survivin zeigte keine abweichenden zellbiologischen Effekte zu einer mit GFP-transfizierten Kontrolle (z.B. Wachstumskurven, Bestrahlungseffekte).

Mittels der Survivin-spezifischen-siRNA konnte die Survivinexpression effektiv inhibiert werden. Fünf humane Sarkomzelllinien mit unterschiedlichem p53-Genstatus (A 204, US 8-93, SK-LMS, RD, Saos 2) wurden mit Survivin-spezifischen-siRNA bzw. Kontroll-siRNA behandelt. In den fünf Sarkomzelllinien war 24 h nach Behandlungsbeginn die Survivin-mRNA auf 12-27 % und das Survivinprotein auf 19-48 %, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, verringert. Die Inhibierung von Survivin verursachte eine Reduktion der Zellvitalität. In Zellkoloniebildungstests wurde die Plattiereffizienz auf 14-35 % im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen verringert. Die Applikation von siRNA gegen Survivin bewirkte in allen fünf Sarkomzelllinien unabhängig von deren p53-Genstatus eine spezifische Verringerung der Survivin-mRNA und des -Proteins sowie der Plattiereffizienz. Dieser Effekt war über 72 h nach siRNA-Inkubation nachweisbar.

Die Apoptose stieg infolge der siRNA-Behandlung weder in der US 8-93 noch in den anderen vier untersuchten Zelllinien wesentlich an. Die Analyse des Zellzyklus der US 8-93 zeigte, dass die Zellen 24 h nach dem Survivin-„knock down“ in der G2/M – Phase arretiert wurden (G2/M-Phase-Zellen 35 % vs. 21 %). 48 h bzw. 72 h nach der siRNA-Behandlung waren 8 % bzw. 10 % polyploide Zellen nachweisbar. Die polyploiden Zellen waren im Zellkoloniebildungstest in allen untersuchten Sarkomzelllinien 10 Tage nach dem Versuchsbeginn nachweisbar und vital.

Demzufolge sind ein G2/M-Arrest und die Generierung von teilungsinaktiven polyploiden Zellen für die zellbiologischen Effekte einer siRNA-Applikation gegen Survivin verantwortlich. Eine massive Induktion der Apoptose durch die Survivin-inhibierung wurde nicht beobachtet.

An zwei Zelllinien (mit wt-p53 bzw. mit mt-p53 Genstatus) erfolgte die Behandlung mit Survivin-spezifische-siRNA in Kombination mit Röntgenstrahlen. Dadurch sollte überprüft werden, ob die Survivin-inhibierung die Wirkung einer Bestrahlung an Sarkomzellen verbessern kann.

In beiden untersuchten Zelllinien wurde die Survivinexpression 3 h nach der Bestrahlung reduziert und in der wt-p53-Zelllinie p53 aktiviert. Zellbiologisch konnte durch Bestrahlung in beiden Zelllinien eine dosisabhängige Reduktion der Plattiereffizienz erreicht werden. Nur in der wt-p53-Zelllinie A-204 führt der Survivin-„knock down“ zu einer Strahlensensitivierung, d.h. die zellbiologische Wirkung der Bestrahlung wurde signifikant verstärkt. Der Verstärkungsfaktor nach einer Strahlendosis von 2 Gy lag bei 1,8 ( $p=0,05$ ) bzw. nach 4 Gy bei 2,5 ( $p=0,02$ ), normiert gegen eine mit Luziferase-siRNA behandelte und bestrahlte

Kontrolle. Keine Radiosensitivierung wurde dagegen in der mt-p53-Zelllinie US 8-93 gefunden.

Die Aktivität der mit Survivin assoziierten Kaspasen-3 und -7 war nur in der wt-p53-Zelllinie A-204 als Folge der Survivin-Inhibierung um das 5fache erhöht. Die Aktivität der Kaspasen-3 und -7 stieg in der wt-p53-Zelllinie A-204 auch in Abhängigkeit von der Dosis der Bestrahlung an. Demgegenüber konnte in der mt-p53-Zelllinie US 8-93 weder ein Einfluss eines Survivin „knock down“ noch ein dosisabhängiger Zusammenhang der Bestrahlung auf die Kaspaseaktivität festgestellt werden. In dieser Zelllinie scheint ein normaler Ablauf der Apoptose in der Folge einer Bestrahlung gestört zu sein.

Diese Versuche lassen sich durch die Bestimmung der Rate der Apoptose verifizieren. So stieg in der wt-p53-Zelllinie A 204 die frühe Apoptoserate 24 h nach Bestrahlung und Survivin „Knock down“ um das 1,5fache auf 10,9 % (4Gy) an. Während sich die Rate der Apoptose in der mt-p53-Zelllinie US 8-93 24 h nach Bestrahlung und Survivin „knock down“ nicht veränderte (2,1 % auf 2,2 % bei 4 Gy).

Somit wirkt sich ein Survivin-„knock down“ auf die Mitose der behandelten Zellen aus. Eine Survivin-siRNA-Behandlung kann als ein Radiosensitizer wirken, wenn die bestrahlten Zellen über einen intakten, über die Kaspase-9 ablaufenden „Apoptose-Pathway“, verfügen.

Eine erhöhte Survivinexpression wurde auf mRNA- und Proteinniveau als unabhängiger negativer Prognosefaktor für WTS-Patienten identifiziert und die Hemmung der Survivinexpression als kombinierte Therapieoption zur Radiotherapie nachgewiesen.

## 7 Literatur

- Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; (281): 1322-1326.
- Adams R R, Carmena M, Earnshaw W C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001; (11): 49-54.
- Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri D C. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998a; (351): 882-883.
- Adida C, Crotty P L, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri D C. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998b; (152): 43-49.
- Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri D C, Molina T J. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000; (96): 1921-1925.
- Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel M T, Taksin A L, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri D C, Dombret H. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; (111): 196-203.
- Altieri D C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001; (7): 542-547.
- Altieri D C. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003a; (88): 31-52.
- Altieri D C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003b; (3): 46-54.
- Altura R A, Olshefski R S, Jiang Y, Boue D R. Nuclear expression of Survivin in paediatric ependymomas and choroid plexus tumours correlates with morphologic tumour grade. *Br J Cancer* 2003; (89): 1743-1749.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; (3): 917-921.
- Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri D C. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998; (273): 11177-11182.
- Andersen M H, Pedersen L O, Capeller B, Brocker E B, Becker J C, Thor S P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res* 2001; (61): 5964-5968.
- Asanuma K, Kobayashi D, Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. A role for survivin in radioresistance of pancreatic cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2002; (93): 1057-1062.
- Asanuma K, Moriai R, Yajima T, Yagihashi A, Yamada M, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res* 2000; (91): 1204-1209.
- Assuncao G C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004; (271): 1638-1650.

- Bache M, Würfl P, Dietzel M, Meye A, Fröde D, Schmidt H, Rath F W, Wohlrab W, Dralle H, Dunst J, Taubert H. Two human sarcoma cell lines with different p53 gene status in their response on radiation. *Int J Oncol* 1997; 993-997.
- Bache M, Dunst J, Würfl P, Fröde D, Meye A, Schmidt H, Rath F W, Taubert H. G2/M checkpoint is p53-dependent and independent after irradiation in five human sarcoma cell lines. *Anticancer Res* 1999; (19): 1827-1832.
- Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; (314): 902-907.
- Banks D P, Plescia J, Altieri D C, Chen J, Rosenberg S H, Zhang H, Ng S C. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* 2000; (96): 4002-4003.
- Bartkova J, Bartek J, Lukas J, Vojtesek B, Staskova Z, Rejthar A, Kovarik J, Midgley C A, Lane D P. p53 protein alterations in human testicular cancer including pre-invasive intratubular germ-cell neoplasia. *Int J Cancer* 1991; (49): 196-202.
- Beltrami E, Plescia J, Wilkinson J C, Duckett C S, Altieri D C. Acute Ablation of Survivin Uncovers p53-dependent Mitotic Checkpoint Functions and Control of Mitochondrial Apoptosis. *J Biol Chem* 2004; (279): 2077-2084.
- Birnbaum M J, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 1994; (68): 2521-2528.
- Bishop J M. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; (235): 305-311.
- Blanc-Brude O P, Mesri M, Wall N R, Plescia J, Dohi T, Altieri D C. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003; (9): 2683-2692.
- Bolton M A, Lan W, Powers S E, McClelland M L, Kuang J, Stukenberg P T. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2002; (13): 3064-3077.
- Brennan M F. Management of soft tissue sarcoma. *Br J Surg* 1996; (83): 577-579.
- Brennan M F, Casper E S, Harrison L B, Shiu M H, Gaynor J, Hajdu S I. The role of multimodality therapy in soft-tissue sarcoma. *Ann Surg* 1991; (214): 328-336.
- Budach W, Budach V, Dinges S, Stuschke M, Sack H. Correlation between primary chemo- and radiation sensitivity in a panel of highly malignant human soft tissue sarcoma xenografts. *Radiother Oncol* 1997; (42): 181-187.
- Cantley L C, Auger K R, Carpenter C, Duckworth B, Graziani A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991; (64): 281-302.
- Cao C, Mu Y, Hallahan D E, Lu B. XIAP and survivin as therapeutic targets for radiation sensitization in preclinical models of lung cancer. *Oncogene* 2004; (23): 7047-7052.
- Carter B Z, Milella M, Altieri D C, Andreeff M. Cytokine-regulated expression of survivin in myeloid leukemia. *Blood* 2001; (97): 2784-2790.
- Carvalho A, Carmena M, Sambade C, Earnshaw W C, Wheatley S P. Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 2003; (116): 2987-2998.

- Chakravarti A, Noll E, Black P M, Finkelstein D F, Finkelstein D M, Dyson N J, Loeffler J S. Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* 2002; (20): 1063-1068.
- Chakravarti A, Zhai G G, Zhang M, Malhotra R, Latham D E, Delaney M A, Robe P, Nestler U, Song Q, Loeffler J. Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 2004; (23): 7494-7506.
- Chantalat L, Skoufias D A, Kleman J P, Jung B, Dideberg O, Margolis R L. Crystal structure of human survivin reveals a bow tie-shaped dimer with two unusual alpha-helical extensions. *Mol Cell* 2000; (6): 183-189.
- Chen J, Wu W, Tahir S K, Kroeger P E, Rosenberg S H, Cowser L M, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, Reed J C, Ng S C. Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia* 2000; (2): 235-241.
- Chiodino C, Cesinaro A M, Ottani D, Fantini F, Giannetti A, Trentini G P, Pincelli C. Communication: expression of the novel inhibitor of apoptosis survivin in normal and neoplastic skin. *J Invest Dermatol* 1999; (113): 415-418.
- Clem R J, Miller L K. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol* 1994; (14): 5212-5222.
- Cohen C, Lohmann C M, Cotsonis G, Lawson D, Santoianni R. Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis. *Mod Pathol* 2003; (16): 574-583.
- Coindre J M, Terrier P, Bui N B, Bonichon F, Collin F, Le D, V, Mandard A M, Vilain M O, Jacquemier J, Duplay H, Sastre X, Barlier C, Henry-Amar M, Mace-Lesech J, Contesso G. Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *J Clin Oncol* 1996; (14): 869-877.
- Conway E M, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, Baens M, Collen D, Schuh A C. Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. *Blood* 2000; (95): 1435-1442.
- Conway E M, Pollefeyt S, Steiner-Mosonyi M, Luo W, DeVriese A, Lupu F, Bono F, Leducq N, Dol F, Schaeffer P, Collen D, Herbert J M. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology* 2002; (123): 619-631.
- Conway E M, Zwerts F, Van E, V, DeVriese A, Nagai N, Luo W, Collen D. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol* 2003; (163): 935-946.
- Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, Oliva M R, Pollack D, Woodruff J M, Marechal V, Chen J, Brennan M F, Levine A J. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994a; (54): 794-799.
- Cordon-Cardo C, Richon V M. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol* 1994b; (144): 500-510.
- Crook N E, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993; (67): 2168-2174.



- Daidone M G, Porta C D, Pilotti S, Zaffaroni N. Coexpression of survivin and TERT in soft-tissue sarcoma. *Lancet* 2002; (360): 877.
- Debatin K M, Krammer P H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004; (23): 2950-2966.
- Deveraux Q L, Reed J C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; (13): 239-252.
- Deveraux Q L, Takahashi R, Salvesen G S, Reed J C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; (388): 300-304.
- Dhein J, Walczak H, Westendorp M O, Baumler C, Stricker K, Frank R, Debatin K M, Krammer P H. Molecular mechanisms of APO-1/Fas(CD95)-mediated apoptosis in tolerance and AIDS. *Behring Inst Mitt* 1995;13-20.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; (102): 33-42.
- Enzinger F M, Weiss S W. *Soft Tissue Tumors*. 4. Aufl, St. Louis Missouri, Mosby. St Louis Missouri, Mosby 2001.
- Fearon E R, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; (61): 759-767.
- Fogh J. *Human Tumor Cell in vitro*. Plenum Press, New York 1975.
- Fortugno P, Wall N R, Giodini A, O'Connor D S, Plescia J, Padgett K M, Tognin S, Marchisio P C, Altieri D C. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 2002; (115): 575-585.
- Fraser A G, James C, Evan G I, Hengartner M O. *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol* 1999; (9): 292-301.
- Fukuda S, Foster R G, Porter S B, Pelus L M. The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34(+) cells and modulates cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2002; (100): 2463-2471.
- Fukuda S, Pelus L M. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 2001; (98): 2091-2100.
- Fukuda S, Pelus L M. Elevation of Survivin levels by hematopoietic growth factors occurs in quiescent CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells before cell cycle entry. *Cell Cycle* 2002; (1): 322-326.
- Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Saccani G, Frati L, Agliano A M. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer. *Ann Oncol* 2003; (14): 85-90.
- Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, Shroyer K R. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* 2001; (32): 119-125.

- Giard D J, Aaronson S A, Todaro G J, Arnstein P, Kersey J H, Dosik H, Parks W P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; (51): 1417-1423.
- Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, Germer C T, Scherubl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; (88): 115-119.
- Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, Bottoni U, Innocenzi D, Calvieri S, Scuderi N, Frati L, Agliano A M. Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients. *J Clin Oncol* 2003; (21): 306-312.
- Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; (281): 1309-1312.
- Griffith T S, Fialkov J M, Scott D L, Azuhata T, Williams R D, Wall N R, Altieri D C, Sandler A D. Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; (62): 3093-3099.
- Grossman D, Altieri D C. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* 2001; (20): 3-11.
- Grossman D, Kim P J, Schechner J S, Altieri D C. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; (98): 635-640.
- Grossman D, McNiff J M, Li F, Altieri D C. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; (113): 1076-1081.
- Hashimoto H, Daimaru Y, Takeshita S, Tsuneyoshi M, Enjoji M. Prognostic significance of histologic parameters of soft tissue sarcomas. *Cancer* 1992; (70): 2816-2822.
- Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett* 2001; (169): 155-164.
- Hermanek P, Scheibe O, Spiessl B, Wagner G. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 4. vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo 2000.
- Hinds M G, Norton R S, Vaux D L, Day C L. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 1999; (6): 648-651.
- Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, Nabeta Y, Kamiguchi K, Sato T, Yoda J, Ikeda H, Hirata K, Yamanaka N, Sato N. An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res* 2002; (8): 1731-1739.
- Hoffman W H, Biade S, Zilfou J T, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; (277): 3247-3257.
- Ignatova T N, Kukekov V G, Laywell E D, Suslov O N, Vrionis F D, Steindler D A. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002; (39): 193-206.
- Ikawa M, Yamada S, Nakanishi T, Okabe M. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker in mammals. *Curr Top Dev Biol* 1999; (44): 1-20.

- Ikeguchi M, Kaibara N. survivin messenger RNA expression is a good prognostic biomarker for oesophageal carcinoma. *Br J Cancer* 2002a; (87): 883-887.
- Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002b; (11): 33-40.
- Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002c; (8): 3131-3136.
- Ikehara M, Oshita F, Kameda Y, Ito H, Ohgane N, Suzuki R, Saito H, Yamada K, Noda K, Mitsuda A. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung. *Oncol Rep* 2002; (9): 835-838.
- Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A. Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin- beta/2B. *Med Pediatr Oncol* 2000a; (35): 550-553.
- Islam A, Kageyama H, Takada N, Kawamoto T, Takayasu H, Isogai E, Ohira M, Hashizume K, Kobayashi H, Kaneko Y, Nakagawara A. High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene* 2000b; (19): 617-623.
- Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; (31): 1080-1085.
- Jensen O M, Høgh J, Ostgaard S E, Nordentoft A M, Sneppen O. Histopathological grading of soft tissue tumours. Prognostic significance in a prospective study of 278 consecutive cases. *J Pathol* 1991; (163): 19-24.
- Jiang X, Wilford C, Duensing S, Munger K, Jones G, Jones D. Participation of Survivin in mitotic and apoptotic activities of normal and tumor-derived cells. *J Cell Biochem* 2001; (83): 342-354.
- Joazeiro C A, Weissman A M. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000; (102): 549-552.
- Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K. Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer* 2003; (97): 1077-1083.
- Kallio M J, Nieminen M, Eriksson J E. Human inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit. *FASEB J* 2001; (15): 2721-2723.
- Kamihira S, Yamada Y, Hirakata Y, Tomonaga M, Sugahara K, Hayashi T, Dateki N, Harasawa H, Nakayama K. Aberrant expression of caspase cascade regulatory genes in adult T-cell leukaemia: survivin is an important determinant for prognosis. *Br J Haematol* 2001; (114): 63-69.
- Kania J, Konturek S J, Marlicz K, Hahn E G, Konturek P C. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2003; (48): 266-271.

- Kappler M, Bache M, Bartel F, Kotsch M, Panian M, Würfl P, Blümke K, Schmidt H, Meye A, Taubert H. Knockdown of survivin expression by small interfering RNA reduces the clonogenic survival of human sarcoma cell lines independently of p53. *Cancer Gene Ther* 2004; (11): 186-193.
- Kappler M, Köhler T, Kampf C, Diestelkoetter P, Würfl P, Schmitz M, Bartel F, Lautenschläger C, Rieber E P, Schmidt H, Bache M, Taubert H, Meye A. Increased survivin transcript levels: an independent negative predictor of survival in soft tissue sarcoma patients. *Int J Cancer* 2001; (95): 360-363.
- Kappler M, Kotsch M, Bartel F, Füssel S, Lautenschlager C, Schmidt U, Würfl P, Bache M, Schmidt H, Taubert H, Meye A. Elevated expression level of survivin protein in soft-tissue sarcomas is a strong independent predictor of survival. *Clin Cancer Res* 2003; (9): 1098-1104.
- Kappler M, Taubert H, Bartel F, Blümke K, Panian M, Schmidt H, Dunst J, Bache M. Radiosensitization, after a combined treatment of survivin siRNA and irradiation, is correlated with the activation of caspases 3 and 7 in a wt-p53 sarcoma cell line, but not in a mt-p53 sarcoma cell line. *Oncol Rep.* 2005 (13):167-172.
- Katenkamp D, Kosmehl H. Heterogeneity in malignant soft tissue tumors. *Curr Top Pathol* 1995; (89): 123-151.
- Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001; (95): 92-95.
- Kaur P, Kallakury B S, Sheehan C E, Fisher H A, Kaufman R P, Jr., Ross J S. Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004; (128): 39-43.
- Kawasaki H, Altieri D C, Lu C D, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; (58): 5071-5074.
- Keith W N. From stem cells to cancer: balancing immortality and neoplasia. *Oncogene* 2004; (23): 5092-5094.
- Kennedy S M, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott E W, Hill A D, O'Higgins N J, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003; (88): 1077-1083.
- Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; (26): 239-257.
- Kleideiter E, Schwab M, Friedrich U, Koscielniak E, Schafer B W, Klotz U. Telomerase activity in cell lines of pediatric soft tissue sarcomas. *Pediatr Res* 2003; (54): 718-723.
- Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod* 2000; (6): 529-534.
- Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Müller W, Takeno S, Suschek C V, Heydthausen M, Gabbert H E, Gerharz C D. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer* 2002; (86): 737-743.

- Ku J H, Kwak C, Lee H S, Park H K, Lee E, Lee S E. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2004; (171): 631-635.
- Kuttler F, Valnet-Rabier M B, Angonin R, Ferrand C, Deconinck E, Mouglin C, Cahn J Y, Fest T. Relationship between expression of genes involved in cell cycle control and apoptosis in diffuse large B cell lymphoma: a preferential survivin- cyclin B link. *Leukemia* 2002; (16): 726-735.
- LaCasse E C, Baird S, Korneluk R G, MacKenzie A E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; (17): 3247-3259.
- LeBlanc A C. Natural cellular inhibitors of caspases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; (27): 215-229.
- Lehner R, Lucia M S, Jarboe E A, Orlicky D, Shroyer A L, McGregor J A, Shroyer K R. Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; (10): 134-138.
- Lens S M, Wolthuis R M, Klomp maker R, Kauw J, Agami R, Brummelkamp T, Kops G, Medema R H. Survivin is required for a sustained spindle checkpoint arrest in response to lack of tension. *EMBO J* 2003; (22): 2934-2947.
- Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 2003; (197): 8-29.
- Li F, Ackermann E J, Bennett C F, Rothermel A L, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio P C, Altieri D C. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999; (1): 461-466.
- Li F, Altieri D C. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res* 1999; (59): 3143-3151.
- Li F, Ambrosini G, Chu E Y, Plescia J, Tognin S, Marchisio P C, Altieri D C. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; (396): 580-584.
- Lingner J, Cech T R. Telomerase and chromosome end maintenance. *Curr Opin Genet Dev* 1998; (8): 226-232.
- Loeb K R, Loeb L A. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000; (21): 379-385.
- Lu B, Mu Y, Cao C, Zeng F, Schneider S, Tan J, Price J, Chen J, Freeman M, Hallahan D E. Survivin as a therapeutic target for radiation sensitization in lung cancer. *Cancer Res* 2004; (64): 2840-2845.
- Lu C D, Altieri D C, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; (58): 1808-1812.
- Mahboubi K, Li F, Plescia J, Kirkiles-Smith N C, Mesri M, Du Y, Carroll J M, Elias J A, Altieri D C, Pober J S. Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway. *Lab Invest* 2001; (81): 327-334.

- Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek C V, Heydthausen M, Gabbert H E, Gerharz C D. Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002a; (100): 30-36.
- Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek C V, Schmitt M, Gabbert H E, Gerharz C D. Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 2002b; (9): 1334-1342.
- Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert H E, Gerharz C D. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 1999; (59): 6097-6102.
- Martinez A, Bellosillo B, Bosch F, Ferrer A, Marce S, Villamor N, Ott G, Montserrat E, Campo E, Colomer D. Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am J Pathol* 2004; (164): 501-510.
- Martinez-Serrano A, Villa A, Navarro B, Rubio F J, Bueno C. Human neural progenitor cells: better blue than green? *Nat Med* 2000; (6): 483-484.
- Martins L M, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty N F, Lemoine N R, Savopoulos J, Gray C W, Creasy C L, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 2002; (277): 439-444.
- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, Reed J C. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; (22): 2729-2740.
- Masuda H, Miller C, Koeffler H P, Battifora H, Cline M J. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; (84): 7716-7719.
- McAllister R M, Melnyk J, Finkelstein J Z, Adams E C, Jr., Gardner M B. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1969; (24): 520-526.
- Mesri M, Wall N R, Li J, Kim R W, Altieri D C. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001; (108): 981-990.
- Meye A, Bache M, Hinze R, Schmidt H, Würfl P, Holzhausen H J, Rath F W, Taubert H. Molecular characterization and liposomal transfection of a p53-mutated cell line established from a poorly differentiated leiomyosarcoma. *Int J Oncol* 1998; (13): 241-248.
- Miller L K. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 1999; (9): 323-328.
- Mirza A, McGuirk M, Hockenberry T N, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen S F, Wang L, Kirschmeier P, Bishop W R, Nielsen L L, Pickett C B, Liu S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002; (21): 2613-2622.
- Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, Taguchi T, Nagamachi M, Kaneko H, Sunagawa M. Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2003; (6): 217-224.
- Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez J J, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; (17): 2100-2104.

- Moriai R, Asanuma K, Kobayashi D, Yajima T, Yagihashi A, Yamada M, Watanabe N. Quantitative analysis of the anti-apoptotic gene survivin expression in malignant haematopoietic cells. *Anticancer Res* 2001; (21): 595-600.
- Muchmore S W, Chen J, Jakob C, Zakula D, Matayoshi E D, Wu W, Zhang H, Li F, Ng S C, Altieri D C. Crystal structure and mutagenic analysis of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin. *Mol Cell* 2000; (6): 173-182.
- Nachmias B, Ashhab Y, Ben Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004; (14): 231-243.
- Nakagawa Y, Yamaguchi S, Hasegawa M, Nemoto T, Inoue M, Suzuki K, Hirokawa K, Kitagawa M. Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2004; (28): 487-494.
- Nakanishi K, Tominaga S, Hiroi S, Kawai T, Aida S, Kasamatsu H, Aurues T, Hayashi T, Ikeda T. Expression of survivin does not predict survival in patients with transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *Virchows Arch* 2002; (441): 559-563.
- Noltenius H. *Tumorhandbuch: Pathologie und Klinik der menschlichen Tumoren*. 2.neubearb. u. erw. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München 1987.
- O'Connor D S, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A, Tognin S, Marchisio P C, Altieri D C. Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000a; (97): 13103-13107.
- O'Connor D S, Schechner J S, Adida C, Mesri M, Rothermel A L, Li F, Nath A K, Pober J S, Altieri D C. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000b; (156): 393-398.
- O'Connor D S, Wall N R, Porter A C, Altieri D C. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2002; (2): 43-54.
- O'Connor P M, Jackman J, Bae I, Myers T G, Fan S, Mutoh M, Scudiero D A, Monks A, Sausville E A, Weinstein J N, Friend S, Fornace A J, Jr., Kohn K W. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res* 1997; (57): 4285-4300.
- O'Driscoll L, Linehan R, Kennedy M, Cronin D, Purcell R, Glynn S, McDermott W, Hill D, O'H J, Parkinson M, Clynes M. Lack of prognostic significance of survivin, survivin-deltaEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNAs in breast cancer. *Cancer Lett* 2003; (201): 225-236.
- Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, Takano Y. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001; (163): 109-116.
- Olie R A, Simoes-Wust A P, Baumann B, Leech S H, Fabbro D, Stahel R A, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000; (60): 2805-2809.

- Ota T, Suto S, Katayama H, Han Z B, Suzuki F, Maeda M, Tanino M, Terada Y, Tatsuka M. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. *Cancer Res* 2002; (62): 5168-5177.
- Pennati M, Binda M, Colella G, Folini M, Citti L, Villa R, Daidone M G, Zaffaroni N. Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J Invest Dermatol* 2003; (120): 648-654.
- Pennati M, Binda M, Colella G, Zoppe M, Folini M, Vignati S, Valentini A, Citti L, De Cesare M, Pratesi G, Giacca M, Daidone M G, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells. *Oncogene* 2004; (23): 386-394.
- Pennati M, Colella G, Folini M, Citti L, Daidone M G, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated attenuation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *J Clin Invest* 2002; (109): 285-286.
- Pollock R E, Karnell L H, Menck H R, Winchester D P. The National Cancer Data Base report on soft tissue sarcoma. *Cancer* 1996; (78): 2247-2257.
- Pruschy M, Rocha S, Zaugg K, Tenzer A, Hess C, Fisher D E, Glanzmann C, Bodis S. Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; (49): 561-567.
- Rath F-H, Schönfelder M. Weichteilsarkome des Erwachsenen. *Contrib Oncol Basel, Karger* 2002; (56).
- Reddel R R, Bryan T M, Murnane J P. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. A review. *Biochemistry (Mosc)* 1997; (62): 1254-1262.
- Reed J C. Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. *Adv Pharmacol* 1997; (41): 501-532.
- Reed J C. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest* 2001; (108): 965-969.
- Reed J C, Reed S I. Survivin' cell-separation anxiety. *Nat Cell Biol* 1999; (1): E199-E200.
- Reissmann P T, Simon M A, Lee W H, Slamon D J. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene* 1989; (4): 839-843.
- Rödel C, Haas J, Groth A, Grabenbauer G G, Sauer R, Rödel F. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; (55): 1341-1347.
- Rödel F, Hoffmann J, Grabenbauer G G, Papadopoulos T, Weiss C, Gunther K, Schick C, Sauer R, Rödel C. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol* 2002; (178): 426-435.
- Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmichen A, Schmitz M, Mehlhorn J, Conrad K, Rieber E P. Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* 2000; (60): 1815-1817.
- Rothe M, Pan M G, Henzel W J, Ayres T M, Goeddel D V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995; (83): 1243-1252.



- Salvesen G S, Duckett C S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; (3): 401-410.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
- Sandler A, Scott D, Azuhata T, Takamizawa S, O'Dorisio S. The survivin:Fas ratio is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2002; (37): 507-511.
- Sarela A I, Macadam R C, Farmery S M, Markham A F, Guillou P J. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; (46): 645-650.
- Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001; (92): 271-278.
- Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D, Rammensee H G, Rieber E P. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res* 2000; (60): 4845-4849.
- Schultz I J, Kiemeny L A, Witjes J A, Schalken J A, Willems J L, Swinkels D W, de Kok J B. Survivin mRNA expression is elevated in malignant urothelial cell carcinomas and predicts time to recurrence. *Anticancer Res* 2003; (23): 3327-3331.
- Schütte J, Stuschke M. *Hämatologie, Onkologie*. Hrsg. Ostendorf PC; Arndt R. München. Urban & Schwarzenberg 1997.
- Serakinci N, Guldborg P, Burns J S, Abdallah B, Schrodder H, Jensen T, Kassem M. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 2004; (23): 5095-5098.
- Seshagiri S, Miller L K. *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr Biol* 1997; (7): 455-460.
- Shankar S L, Mani S, O'Guin K N, Kandimalla E R, Agrawal S, Shafit-Zagardo B. Survivin inhibition induces human neural tumor cell death through caspase-independent and -dependent pathways. *J Neurochem* 2001; (79): 426-436.
- Shannon K B, Salmon E D. Chromosome dynamics: new light on Aurora B kinase function. *Curr Biol* 2002; (12): R458-R460.
- Sharma H, Sen S, Mathur M, Bahadur S, Singh N. Combined evaluation of expression of telomerase, survivin, and anti-apoptotic Bcl-2 family members in relation to loss of differentiation and apoptosis in human head and neck cancers. *Head Neck* 2004; (26): 733-740.
- Shi Y. Survivin structure: crystal unclear. *Nat Struct Biol* 2000; (7): 620-623.
- Shin S, Sung B J, Cho Y S, Kim H J, Ha N C, Hwang J I, Chung C W, Jung Y K, Oh B H. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; (40): 1117-1123.
- Shinozawa I, Inokuchi K, Wakabayashi I, Dan K. Disturbed expression of the anti-apoptosis gene, survivin, and EPR-1 in hematological malignancies. *Leuk Res* 2000; (24): 965-970.

- Shiu M H, Hilaris B S, Harrison L B, Brennan M F. Brachytherapy and function-saving resection of soft tissue sarcoma arising in the limb. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; (21): 1485-1492.
- Singer S, Corson J M, Demetri G D, Healey E A, Marcus K, Eberlein T J. Prognostic factors predictive of survival for truncal and retroperitoneal soft-tissue sarcoma. *Ann Surg* 1995; (221): 185-195.
- Skoufias D A, Mollinari C, Lacroix F B, Margolis R L. Human survivin is a kinetochore-associated passenger protein. *J Cell Biol* 2000; (151): 1575-1582.
- Smith S D, Wheeler M A, Plescia J, Colberg J W, Weiss R M, Altieri D C. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA* 2001; (285): 324-328.
- Speliotes E K, Uren A, Vaux D, Horvitz H R. The survivin-like *C. elegans* BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Mol Cell* 2000; (6): 211-223.
- Stratton M R, Moss S, Warren W, Patterson H, Clark J, Fisher C, Fletcher C D, Ball A, Thomas M, Gusterson B A. Mutation of the p53 gene in human soft tissue sarcomas: association with abnormalities of the RB1 gene. *Oncogene* 1990; (5): 1297-1301.
- Stuschke M, Budach V, Sack H. Radioresponsiveness of human glioma, sarcoma, and breast cancer spheroids depends on tumor differentiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; (27): 627-636.
- Sugahara K, Uemura A, Harasawa H, Nagai H, Hirakata Y, Tomonaga M, Murata K, Sohda H, Nakagoe T, Shibasaki S, Yamada Y, Kamihira S. Clinical relevance of survivin as a biomarker in neoplasms, especially in adult T-cell leukemias and acute leukemias. *Int J Hematol* 2004; (80): 52-58.
- Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002; (21): 315-320.
- Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K. Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation. *Oncogene* 2000a; (19): 3225-3234.
- Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Oncogene* 2000b; (19): 1346-1353.
- Swana H S, Grossman D, Anthony J N, Weiss R M, Altieri D C. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999; (341): 452-453.
- Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2002; (184): 105-116.
- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero D A, Vigna N, Oltersdorf T, Reed J C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 1998; (58): 5315-5320.

- Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; (6): 127-134.
- Taubert H. Molekularpathologische Untersuchungen von Tumorsuppressor- und Onkogenen in Weichteilsarkomen des Erwachsenen. Habilitation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät und Medizinische Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 1999.
- Taubert H, Köhler T, Meye A, Bartel F, Lautenschläger C, Borchert S, Bache M, Schmidt H, Würfl P. mdm2 mRNA level is a prognostic factor in soft tissue sarcoma. *Mol Med* 2000; (6): 50-59.
- Taubert H, Meye A, Würfl P. Prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer Res* 1996; (56): 4134-4136.
- Taubert H, Meye A, Würfl P. Soft tissue sarcomas and p53 mutations. *Mol Med* 1998; (4): 365-372.
- Taubert H, Schmidt H, Würfl P, Hinze R, Meye A, Bache M, Berger D, Holzhausen H J, Dralle H, Rath F W. Morphological and molecular characterization of an undifferentiated soft tissue sarcoma cell line and derivative clones. *Int J Oncol* 1997; (11): 521-526.
- Temme A, Rieger M, Reber F, Lindemann D, Weigle B, Diestelkoetter-Bachert P, Ehninger G, Tatsuka M, Terada Y, Rieber E P. Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Mol Biol Cell* 2003; (14): 78-92.
- Terada Y. Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. *Cell Struct Funct* 2001; (26): 653-657.
- Terasaki T, Kyo S, Takakura M, Maida Y, Tsuchiya H, Tomita K, Inoue M. Analysis of telomerase activity and telomere length in bone and soft tissue tumors. *Oncol Rep* 2004; (11): 1307-1311.
- Thornberry N A. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 1998; (5): R97-103.
- Tran J, Master Z, Yu J L, Rak J, Dumont D J, Kerbel R S. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; (99): 4349-4354.
- Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil S D, LaCasse E, Korneluk R G, Kerbel R S. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; (264): 781-788.
- Uren A G, Beilharz T, O'Connell M J, Bugg S J, van Driel R, Vaux D L, Lithgow T. Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; (96): 10170-10175.
- Uren A G, Wong L, Pakusch M, Fowler K J, Burrows F J, Vaux D L, Choo K H. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell- cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 2000; (10): 1319-1328.
- Van Unnik J A, Coindre J M, Contesso C, Albus-Lutter C E, Schiodt T, Sylvester R, Thomas D, Bramwell V, Mouridsen H T. Grading of soft tissue sarcomas: experience of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 1993; (29A): 2089-2093.

- Vaux D L, Silke J. Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; (304): 499-504.
- Velculescu V E, Madden S L, Zhang L, Lash A E, Yu J, Rago C, Lal A, Wang C J, Beaudry G A, Ciriello K M, Cook B P, Dufault M R, Ferguson A T, Gao Y, He T C, Hermeking H, Hiraldo S K, Hwang P M, Lopez M A, Luderer H F, Mathews B, Petroziello J M, Polyak K, Zawel L, Kinzler K W, . Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999; (23): 387-388.
- Verdecia M A, Huang H, Dutil E, Kaiser D A, Hunter T, Noel J P. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000; (7): 602-608.
- Verhagen A M, Coulson E J, Vaux D L. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* 2001; (2): Reviews 3009.
- Verhagen A M, Ekert P G, Pakusch M, Silke J, Connolly L M, Reid G E, Moritz R L, Simpson R J, Vaux D L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; (102): 43-53.
- Vogelstein B, Kinzler K W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; (9): 138-141.
- Vucic D, Kaiser W J, Miller L K. Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol* 1998; (18): 3300-3309.
- Vucic D, Stennicke H R, Pisabarro M T, Salvesen G S, Dixit V M. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 2000; (10): 1359-1366.
- Wagener C. Einführung in die molekulare Onkologie. Stuttgart, Thieme 2001.
- Wall N R, O'Connor D S, Plescia J, Pommier Y, Altieri D C. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003; (63): 230-235.
- Wang H W, Sharp T V, Koumi A, Koentges G, Boshoff C. Characterization of an anti-apoptotic glycoprotein encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus which resembles a spliced variant of human survivin. *EMBO J* 2002; (21): 2602-2615.
- Weinberg R A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; (49): 3713-3721.
- Weinman E C, Roche P C, Kasperbauer J L, Cha S S, Sargent D J, Cheville J, Murphy L M, Chen L, Wettstein P J, Gostout B, Ferrone S, Strome S E. Characterization of antigen processing machinery and Survivin expression in tonsillar squamous cell carcinoma. *Cancer* 2003; (97): 2203-2211.
- Wheatley S P, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw W C. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* 2001; (11): 886-890.
- Williams N S, Gaynor R B, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003; (9): 931-946.

- Würl P, Kappler M, Meye A, Bartel F, Köhler T, Lautenschläger C, Bache M, Schmidt H, Taubert H. Co-expression of survivin and TERT and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Lancet* 2002; (359): 943-945.
- Würl P, Meye A, Berger D, Lautenschläger C, Bache M, Holzhausen H J, Schmidt H, Dralle , Rath F W, Taubert H. Significance of retinoblastoma and mdm2 gene expression as prognostic markers for soft-tissue sarcoma. *Langenbecks Arch Surg* 1998; (383): 99-103.
- Xia C, Xu Z, Yuan X, Uematsu K, You L, Li K, Li L, McCormick F, Jablons D M. Induction of apoptosis in mesothelioma cells by antisurvivin oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 2002; (1): 687-694.
- Xu Y, Fang F, Ludewig G, Jones G, Jones D. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol* 2004; (23): 419-429.
- Yamada Y, Kuroiwa T, Nakagawa T, Kajimoto Y, Dohi T, Azuma H, Tsuji M, Kami K, Miyatake S. Transcriptional expression of survivin and its splice variants in brain tumors in humans. *J Neurosurg* 2003; (99): 738-745.
- Yamamoto T, Manome Y, Nakamura M, Tanigawa N. Downregulation of survivin expression by induction of the effector cell protease receptor-1 reduces tumor growth potential and results in an increased sensitivity to anticancer agents in human colon cancer. *Eur J Cancer* 2002; (38): 2316-2324.
- Yoon H J, Carbon J. Participation of Bir1p, a member of the inhibitor of apoptosis family, in yeast chromosome segregation events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; (96): 13208-13213.
- Yoshida H, Ishiko O, Sumi T, Matsumoto Y, Ogita S. Survivin, bcl-2 and matrix metalloproteinase-2 enhance progression of clear cell- and serous-type ovarian carcinomas. *Int J Oncol* 2001; (19): 537-542.
- Zaman G J, Conway E M. The elusive factor Xa receptor: failure to detect transcripts that correspond to the published sequence of EPR-1. *Blood* 2000; (96): 145-148.
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich S M, Fields J Z, Boman B M. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001; (61): 8664-8667.
- Zhao J, Tenev T, Martins L M, Downward J, Lemoine N R. The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci* 2000; (113 Pt 23): 4363-4371.
- Zhou M, Gu L, Li F, Zhu Y, Woods W G, Findley H W. DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; (303): 124-131.
- Zhu L, Fukuda S, Cordis G, Das D K, Maulik N. Anti-apoptotic protein survivin plays a significant role in tubular morphogenesis of human coronary arteriolar endothelial cells by hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 2001; (508): 369-374.
- Zhu N, Gu L, Findley H W, Li F, Zhou M. An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. *Oncogene* 2004; (23): 7545-7551.

## 8 Anhang

Tabelle 8.1 Survivin-mRNA-Expression und klinischen Daten der untersuchten WTS-Patienten

Weichteilsarkompatienten	Summe	LS	MFH	MNT*	LMS	RMS	FS	syS	Andere WTS
Gesamtzahl	94	23	22	16 (3*)	10	8	6	6	3
Tumorstadium									
Tumorstadium 1	15	11	0	0 (0*)	1	0	3	0	0
Tumorstadium 2	40	9	9	8 (0*)	5	0	3	5	1
Tumorstadium 3	30	3	12	6 (2*)	3	5	0	1	0
Tumorstadium 4	9	0	1	2 (1*)	1	3	0	0	2
Geschlecht									
weiblich	51	11	15	9 (1*)	7	4	2	3	0
männlich	43	12	7	7 (2*)	3	4	4	3	3
<b>Survivin mRNA quantitativer Nachweis</b>	94								
≤ 2 zmol survivin /amol GAPDH	49	15	9	8 (1*)	3	4	4	5	1
> 2 zmol survivin /amol GAPDH	45	8	13	8 (2*)	7	4	2	1	2
<b>Survivin qualitativer Nachweis</b>	56								
Kein Transkript nachweisbar	20	12	3	1 (0*)	0	1	2	1	0
Nachweis von Survivin	21	3	6	3 (1*)	4	2	0	1	2
Nachweis von Survivin und Survivin ΔEx3	15	1	5	2 (0*)	2	2	1	2	0

Abkürzungen: FS-Fibrosarkom, LMS- Leiomyosarkom, LS-Liposarkom, MFH-malignes fibröses Histiocytom, MNT- maligner neuraler Tumor, RMS-Rhabdomyosarkom, syS-synoviales Sarkom, WTS - Weichteilsarkom (\*-bezeichnen 3 Neuroblastomproben)

Tabelle 8.2 Histologische und klinische Daten von WTS-Patienten

Die Expression von Survivin und hTERT wurde bestimmt und in vier Gruppen zusammengefasst.

Parameter	Fälle	<i>hTERT</i> – <i>survivin</i> – (1. Gruppe)	<i>hTERT</i> + <i>survivin</i> – (2. Gruppe)	<i>hTERT</i> – <i>survivin</i> + (3. Gruppe)	<i>hTERT</i> + <i>survivin</i> + (4. Gruppe)	Patienten Status: nicht- verstorben/ verstorben
<b>Geschlecht</b>						
männlich	42	9	12	9	13	24/18
weiblich	47	10	14	10	13	27/20
<b>Art des Tumors</b>						
Primäre Tumoren	59	12	16	11	20	35/24
Rezidive	24	7	7	6	4	14/10
Metastasen	6	0	3	1	2	2/4
<b>Histologische Typisierung</b>						
LS	21	7	7	4	3	15/6
MFH und FS	28	7	6	8	7	18/10
neurogene Sarkoma	13	1	6	0	6	6/7
RMS und LMS	17	2	4	5	6	7/10
andere WTS	10	2	3	1	4	5/5
<b>Tumorstadium</b>						
Tumorstadium 1	14	6	2	5	1	14/0
Tumorstadium 2	38	8	13	7	10	26/12
Tumorstadium 3	28	4	7	6	11	10/18
Tumorstadium 4	9	1	4	0	4	1/8
<b>Lokalisation des Tumor</b>						
Extremitäten	56	14	16	13	13	40/16
Thorax	6	1	2	1	2	2/4
Kopf	4	1	1	0	2	1/3
Abdominal (multiple)	23	3	7	4	9	8/15
<b>Art der Tumorresektion</b>						
Radikal (R0)	58	16	15	10	17	39/19
nicht Radikal (R1)	31	3	11	8	9	12/19
<b>Patientenstatus</b>						
nicht verstorben	51	17	13	13	8	
verstorben	38	2	13	5	18	
Summe	89	19	26	18	26	89

Abkürzungen: FS-Fibrosarkom, LMS- Leiomyosarkom, LS-Liposarkom, MFH-malignes fibröses Histiocytom, RMS-Rhabdomyosarkom, WTS – Weichteilsarkom, -unter dem Grenzwert liegende Expressionswerte, +über dem Grenzwert liegende Expressionswerte

Tabelle 8.3 Proteinexpression der untersuchten Zelllinien und des Normalgewebes

Art des Gewebes	Type	Quantifikation der Survivinexpression	
		ELISA (ng Survivin/mg Gesamtprotein)	WB (Survivin Units / β-Aktin Units)
<b>Zelllinien</b>			
A-204	RMS	2.8	0,59
RD	RMS	5.1	n.b.
SKLMS-1	LMS	6.3	0,66
Saos-2	OS	7.1	1,81
US8-93	US	8.1	2,04
LMS6-93	LMS	8.7	1,11
<i>nicht-maligne Zellen</i>			
Fibroblasten Z49-94		<Nachweislimit	n.b.
Lymphozyten (n=4)		< Nachweislimit <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>Normalgewebe</b>			
Milzgewebe		3.59	n.b.
Magen		5.54	n.b.
Schilddrüse		< Nachweislimit	n.b.
Lunge		< Nachweislimit	n.b.
Brustgewebe		< Nachweislimit	n.b.
Muskel (n=5)		< Nachweislimit <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Abkürzungen: <sup>a</sup>- in jeder der Proben LMS- Leiomyosarkom, n.b. –nicht bestimmt, RMS- Rhabdomyosarkom, OS-Osteosarkom, US undifferenziertes WTS, WTS- Weichteilsarkom

Tabelle 8.4 Proteinnachweis mittels ELISA und Westernblotanalyse unter Berücksichtigung der jeweiligen Grenzwerte

ELISA	Westernblotanalyse		Gesamtproben
	unterhalb des jeweiligen Grenzwertes	oberhalb des jeweiligen Grenzwertes	
unterhalb des jeweiligen Grenzwertes	13	2	15
oberhalb des jeweiligen Grenzwertes	11	37	48
Gesamtproben	24	39	63



Tabelle 8.5 Histologische und klinische Daten von 63 Patienten deren Tumoren mittels ELISA bzw. Westernblotanalyse untersucht wurden

Parameter	Fälle	ELISA + <sup>a</sup> (in %)	WB + <sup>b</sup> (in %)	verstorbene Patienten (in %)
<b>Geschlecht</b>				
männlich	27	19 (70%)	14 (52%)	13 (48%)
weiblich	36	29 (81%)	25 (69%)	16 (44%)
<b>Art des Tumors</b>				
Primärtumor	41	29 (71%)	26 (63%)	16 (39%)
Rezidiv	16	13 (81%)	9 (56%)	9 (56%)
Metastase	6	6 (100%)	4 (67%)	4 (67%)
<b>Histologische Typisierung</b>				
LS	18	9 (50%)	9 (50%)	7 (39%)
FS	3	2 (66%)	2 (66%)	1 (33%)
MFH	14	12 (86%)	12 (86%)	8 (57%)
RMS	5	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)
LMS	11	10 (91%)	6 (55%)	5 (45%)
neurogenes Sarkom	5	4 (80%)	3 (60%)	1 (20%)
mal. synoviales Sarkom	3	2 (66%)	1 (33%)	0
mal. Hemangioperizyotom	3	3 (100%)	1 (33%)	2 (66%)
mal. Mesotheliom	1	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<b>Tumorstadium</b>				
1	10	4 (40%)	5 (50%)	0
2	29	22 (76%)	16 (55%)	13 (45%)
3	17	16 (94%)	13 (77%)	10 (59%)
4	7	6 (86%)	5 (71%)	6 (86%)
<b>Lokalisation des Tumors</b>				
Extremitäten	39	27 (69%)	22 (56%)	14 (36%)
Thorax	3	3 (100%)	3 (100%)	2 (67%)
Kopf	1	1	0	1
Abdomen/Retroperitoneum	20	17 (85%)	14 (70%)	12 (60%)
<b>Art der Tumorresektion</b>				
radikal (R0)	39	31 (80%)	25 (64%)	13 (33%)
nicht radikal (R1)	24	17 (71%)	14 (58%)	16 (67%)
<b>Patientenstatus</b>				
nicht- verstorben	34	21 (62%)	17 (50%)	-
verstorben	29	27 (93%)	22 (76%)	29

Abkürzungen: <sup>a</sup> - über dem Grenzwert von 0,5 ng Survivin je mg Gesamtprotein, <sup>b</sup> - über dem Grenzwert von 0,1 Survivin Units /  $\beta$ -Aktin Unit, FS-Fibrosarkom, LMS- Leiomyosarkom, LS-Liposarkom, MFH-malignes fibröses Histiocyotom, mal.- malignes, MNT- maligner neuraler Tumor, RMS-Rhabdomyosarkom

Tabelle 8.6 Darstellung der Survivin-mRNA\* und -Proteinexpression° und des klonogenen Überlebens§ von fünf WTS-Zelllinien. Ferner ist der relative Quotient der mit siRNA gegen Survivin behandelten Zellen zu den mit Nonsense siRNA behandelten Zellen gezeigt.

Zelllinien	A 204	US 8-93	SK-LMS	RD	Saos 2
<b>p53 Genstatus</b>	wt/wt	wt/mt	mt/-	mt/-	-/-
<b>mRNA-Expression*</b>					
siRNA gegen Survivin/ Nonsense siRNA	12 %	27 %	15 %	23 %	18 %
siRNA gegen Survivin	<b>2,7</b>	<b>1,1</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>4,6</b>
Nonsense siRNA	<b>22,4</b>	<b>4,1</b>	<b>14,8</b>	<b>9,4</b>	<b>25,4</b>
unbehandelte Kontrolle	17,6	3,5	15,6	16,5	29,9
<b>Proteinexpression°</b>					
siRNA gegen Survivin/ Nonsense siRNA	39 %	41 %	48 %	19 %	39 %
siRNA gegen Survivin	<b>2,8</b>	<b>0,7</b>	<b>1,2</b>	<b>1,1</b>	<b>4,6</b>
Nonsense siRNA	<b>7,2</b>	<b>1,7</b>	<b>2,5</b>	<b>5,9</b>	<b>11,9</b>
unbehandelte Kontrolle	5,2	2,0	2,6	5,7	9,4
<b>Plattiereffizienz§</b>					
siRNA gegen Survivin/ Nonsense siRNA	22 %	35 %	14 %	22 %	27 %
siRNA gegen Survivin	<b>2,1</b>	<b>12,7</b>	<b>2,7</b>	<b>5,0</b>	<b>4,9</b>
Nonsense siRNA	<b>9,6</b>	<b>36,0</b>	<b>19,8</b>	<b>22,4</b>	<b>17,9</b>
unbehandelte Kontrolle	23,8	43,8	20,9	19,8	23,7

Abkürzungen : wt-Wildtype, mt – mutiert,\* - Survivin mRNA Expression in zmol Survivin mRNA / amol GAPDH mRNA, ° - Survivinproteinexpression in ng survivin / mg Gesamtprotein§ - in Prozent

**Verschlüsselung der klinischen Daten**

Schlüssel	interne Schlüsselnummer des Patienten
Tumorart	LS-Liposarkom FS-Fibrosarkom MFH-malignes fibröses Histiozytom MNT- maligner neuraler Tumor (neurogenes Sarkom) RMS-Rhabdomyosarkom LMS- Leiomyosarkom syS- synoviales Sarkom
Geschlecht	m-männlich w-weiblich
verst	während der Beobachtungszeit am Tumor verstorben (ja/nein)
ÜZT	Überlebenszeit der Patienten nach der Diagnose (in Monaten)
Grad	Grading des Primärtumors
Stad	Stadium des Primärtumors
Survivin-mRNA	Survivin-Expression (zmol Survivin mRNA/amol GAPDH mRNA)
hTERT-mRNA	TERT-Expression (mRNA Kopien hTERTx10 <sup>-3</sup> / mRNA Kopie PBGD)
Survivin-WB	Survivin-Expression (fluorimetrische Survivin Units / $\beta$ -Aktin Unit)
Survivin-ELISA	Survivin-Expression (ng Survivinprotein / mg Gesamtprotein)

Tabelle 8.7 Zusammenfassung der klinischen und molekularen Daten der WTS-Patienten

Schlüssel	Tumorart	Geschlecht	verst.	ÜZT	Grad	Stad	Survivin-mRNA	hTERT-mRNA	Survivin-WB	Survivin-ELISA
*1/96	MFH	m	nein	9	G3	22	25,57	4,60		
29/94	MNT	w	nein	78	G2	22	0,69	0,38		
40/95	LS	w	nein	30	G3	32	1,60			
*5/96	SyS	w	ja	201	G3	32	1,17	11,60		
*1/93	LS	w	nein	58	G1	12	10,56	0,00		
*11/96	MNT	w	ja	14	G3	32	0,04	2,80		
17/93	MFH	w	ja	8	G2	22	29,87	0,00		
58/92	MFH	w	nein	45	G2	22	0,01	0,00		
44/92	LS	m	nein	33	G2	22	0,00	56,30		
23/95	LS	m	nein	6	G1	12	4,82			
*7/93	andere	w	ja	11	G3	32	12,92	3,70		
*8/94	MFH	m	nein	51	G2	21	0,00	0,49		
*8/93	RMS	m	ja	15	G3	32	8,42	26,70		
37/95	MNT	m	ja	5	G3	42	19,52	6,76		
*5/94	MFH	m	nein	20	G3	31	0,00	0,00		
28/94	MNT	w	ja	16	G3	32	29,60	3,10		
18/96	LS	m	ja	45	G2	22	1,60	0,00		
37/94	LMS	w	ja	6	G2	22	0,33			
59/92	LS	w	nein	23	G2	22	0,00	308,50		
46/92	MNT	w	ja	2	G3	32	0,62	1,84		
26/96	andere	w	nein	9	G3	32	0,00			
28/96	MNT	m	ja	12	G3	32	3,61	13,90		
51/92	LS	m	nein	69	G2	22	0,00	53,60		
LZ78	MFH	m	nein	50	G3	32			0,65	4,73
LZ70	LMS	m	nein	8	G2	22	42,67	0,00	0,02	1,79
LZ3	LS	w	ja	68	G2	22	0,00	104,00	0,00	0,00
LZ33	MFH	m	nein	25	G3	32	1,90	2,60	0,00	0,00
LZ1	MFH	w	nein	56	G2	22	45,71	0,00	0,88	5,28
LZ10	LS	m	nein	28	G2	22	0,00	4,90	0,00	1,27
LZ7	MFH	m	ja	26	G2	22	1,72	29,80	0,16	1,70
LZ14	FS	w	nein	24	G1	12	0,29	0,00	0,00	0,00

LZ29	RMS	m	ja	18	G3	32	1,66	7,60	0,00	1,85
LZ9	LS	w	nein	30	G1	12	2,67	0,00	0,00	0,00
LZ5	LMS	w	ja	23	G3	32	20,54	0,00	0,00	2,64
LZ24	MNT	w	nein	25	G2	22	19,57	25,10	1,28	2,88
LZ50	MNT	m	nein	18	G1	21	1,45	2,40	0,00	0,00
LZ32	FS	m	ja	96	G2	21	7,26	0,00	3,66	6,80
LZ47	LS	m	ja	19	G3	31	6,98	0,35	0,77	2,77
LZ63	LMS	w	ja	44	G2	22			0,00	1,88
LZ13	RMS	w	ja	3	G3	42	0,00	5,00	1,09	18,38
LZ28	RMS	w	ja	8	G3	41	38,67	64,50	1,00	7,51
LZ45	MFH	m	ja	80	G2	21	4,70	0,00	0,00	0,00
LZ26	LS	w	nein	23	G1	12	0,00	400,50	0,00	0,38
LZ2	MFH	w	ja	7	G3	32	33,91	7,00	0,48	4,27
LZ31	LS	w	ja	18	G2	22	12,87	1,31	1,59	5,00
LZ80	SyS	w	nein	98	G2	22	1,62		0,00	0,00
LZ53	LS	m	nein	19	G1	11	2,06	0,00	0,26	0,00
LZ54	LMS	m	ja	4	G3	32	30,77	8,90	4,04	8,28
LZ79	LMS	m	nein	10	G3	32	2,15	9,10	0,10	1,12
LZ57	MFH	w	nein	16	G3	32	7,59	0,00	0,94	4,80
LZ67	andere	m	ja	86	G2	22			1,04	4,25
LZ66	LMS	w	nein	37	G3	31			0,00	1,45
LZ36	LS	w	nein	31	G1	12	0,00	0,00	5,26	0,71
LZ61	LS	m	nein	13	G1	12	8,94	5,80	0,13	0,00
LZ15	SyS	m	nein	47	G2	22	1,15	0,00	0,00	1,78
LZ23	MFH	w	ja	6	G3	32	18,79	1,60	3,11	15,82
LZ34	RMS	w	ja	3	G3	42	0,47	19,50	1,43	3,96
LZ56	LS	w	ja	32	G2	22			1,01	2,30
LZ55	MNT	m	ja	9	G2	42	0,11	350,00	1,33	3,74
LZ58	RMS	w	nein	18	G3	32	38,62	0,56	1,44	5,98
LZ18	9	m	ja	13	G2	41			0,30	4,07
LZ37	MFH	w	ja	25	G3	31	0,01	0,73	3,68	7,51
LZ49	LMS	w	nein	20	G2	42	0,00	0,00	0,00	0,00
LZ51	MNT	m	nein	19	G2	22	3,44	0,00	0,00	1,01
LZ68	MFH	w	nein	13	G3	32	50,65	0,55	2,09	5,25
LZ76	LMS	w	nein	7	G2	22	4,07	0,00	0,00	0,88
LZ27	MFH	w	nein	24	G2	22	0,03	8,40	2,72	6,25

LZ6	MNT	m	nein	27	G2	21	6,46	5,20	0,00	1,83
LZ46	MNT	w	nein	17	G1	21	20,44	19,60	5,08	6,39
LZ20	MFH	w	ja	3	G3	32	0,01	63,10	0,86	9,27
LZ35	LMS	w	ja	26	G2	22	24,09	4,75	6,91	4,10
LZ69	SyS	m	nein	26	G2	22	24,24	45,54		
LZ71	LMS	w	nein	7	G1	12	28,99	0,00	0,01	1,86
LZ11	LS	m	ja	11	G2	22	4,89	11,70	1,16	12,67
LZ59	LS	w	nein	17	G1	12	0,00	0,00	0,00	0,00
LZ60	LMS	w	nein	15	G2	22	0,84	2,30	8,31	16,79
LZ48	LS	m	nein	21	G1	21	0,83	0,00	0,00	0,00
LZ72	MFH	w	nein	6	G3	32	23,70	7,25	0,17	1,60
LZ65	andere	m	ja	2	G3	42	10,00	2,28	0,00	0,62
LZ21	LS	m	nein	29	G1	12	0,69	0,00	0,00	1,48
LZ30	MNT	m	ja	17	G2	22	2,68	1,90	4,24	7,66
LZ17	LS	w	nein	29	G1	12	0,75	0,36	0,04	1,69
LZ25	LS	m	nein	24	G1	12	1,06	0,00	0,00	0,00
LZ73	MFH	w	nein	10	G3	32	27,43	5,80	0,06	0,62
LZ38	SyS	w	nein	105	G2	21	0,00	48,90	8,41	3,60
25/92	MFH	w	ja	20	G3	41	3,99	3,70		
*2/97	RMS	m	nein	27	G3	31	1,76	0,00		
54/92	MFH	w	nein	63	G3	31	0,03	0,00		
30/95	FS	w	ja	15	G2	21	1,02			
13/96	MNT	w	nein	20	G2	22	0,96	2,21		
34/94	MFH	w	ja	15	G2	22	4,54	13,02		
23/93	FS	m	nein	104	G1	12	2,85	0,00		
47/92	LS	w	ja	38	G3	32	0,00	60,70		
45/92	RMS	m	ja	30	G3	31	12,98	8,36		
*2/96	MNT	m	ja	10	G2	42	0,54	205,90		
*11/94	SyS	m	nein	145	G2	22	0,06	0,00		
48/92	FS	m	nein	106	G2	22	1,74	6,90	1,00	8,35
*2/93	MFH	m	nein	60	G3	31	33,89	0,00		
37/92	MNT	m	ja	33	G2	22	0,00	45,00		
24/92	FS	m	nein	31	G1	12	0,00	6,20		
16/95	MFH	w	nein	67	G2	22	0,05	0,00		
LZ77	LS	m	nein	16	G2	22			0,00	0,00

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen verwendet. Alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, oder aus unveröffentlichten oder veröffentlichten Arbeiten entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien und erbrachten Leistungen sind als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), 21. Oktober 2004

Matthias Kappler

### Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerald Moritz und Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Helge Taubert für die vielseitige Unterstützung der Forschungsarbeiten bedanken. Durch beide Wissenschaftler wurde mein Interesse an der Forschung gefördert und mein wissenschaftliches Denken geprägt.

Für die Überlassung des interessanten Themas meiner Dissertation danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Helge Taubert. Seit meiner Diplomarbeit am Institut für Pathologie wurde ich insbesondere von meinem Lehrer Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Helge Taubert unterstützt, motiviert und gelenkt. Es machte Spaß unter diesen Bedingungen zu forschen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Matthias Bache, Herrn Dr. rer. nat. Frank Bartel und Herrn Dr. rer. nat. Axel Meye herzlich bedanken. Sie unterstützten mich während meiner Arbeit bei methodischen und fachlichen Problemen durch viele Ratschläge und Hinweise. Unserem klinischen Partner Herrn OA PD Dr. med. habil. Peter Würfl möchte ich für seine konstruktiven Diskussionen und die Bereitstellung der Tumorproben herzlich danken. Frau Dr. rer. nat. Hannelore Schmidt sowie Frau Karen Blümke gilt mein Dank für die Schaffung einer wohlthuenden Arbeitsatmosphäre.

Ferner möchte ich mich bei den Professoren Herrn Prof. Dr. med. habil. Friedrich-Wilhelm Rath, Herrn Prof. Dr. med. habil. Jürgen Dunst und Herrn Prof. Dr. med. habil. Steffen Hauptmann bedanken, an deren Instituten diese Arbeit entstand und die mich wohlwollend unterstützten.

Des Weiteren möchte ich folgenden Kollegen für ihre Unterstützung bei meiner Arbeit danken: Prof. Dr. med. habil. Hans-Jürgen Holzhausen, der, bei Fragen die Pathologie betreffend, stets hilfsbereit war, den technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe Molekularpathologie/Gewebezüchtung (Frau Sandy Kaufhold, Frau Kathrin Spröte, Frau Ute Rolle, Frau Ilona Wiederhold, Frau Birgit Wypior) sowie Herrn Matti Panian für die allseitige Hilfe und Unterstützung, sowie vielen ungenannt gebliebenen Diplomanden/Medizin-Doktoranden unserer Arbeitsgruppe für ihre hilfreiche Mitarbeit. Darüber hinaus bin ich allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für die jahrelange bereitwillige Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie für die großzügige Möglichkeit der Durchführung von FACS-Analysen und Sortierexperimenten, wobei ich Frau OÄ Dr. med. Dagmar Riemann besonders danken möchte.

Die Zellzyklus-Analysen wurden freundlicherweise im Institut für Dermatologie (Herrn Dr. rer. nat. Thomas Klapperstück, Frau Ursula Schramm) ausgeführt.



## Danksagung

---

Frau Dr. Bettina Hause (IPB Halle) ermöglichte und begleitete die Untersuchungen am Laserscanningmikroskop, auch dafür meinen Dank.

Die Sequenzanalysen wurden dankenswerterweise von Herrn PD Dr. rer. nat. habil. Georg Kaltenborn am Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der medizinischen Fakultät durchgeführt.

Für die mathematischen Analysen danke ich recht herzlich Frau Dr. rer. nat. Christine Lautenschläger.

Für die Entwicklung eines Assays zur Echtzeit-Quantifizierung von Gesamtsurvivin-mRNA danke ich Frau Dr. rer. nat. Anne-Kathrin Rost und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Köhler der Firma Roboscreen GmbH (Leipzig). Für die Etablierung des Survivin-ELISA gilt mein Dank Herrn Dr. med. Matthias Kotsch sowie Frau Antje Zobjack (Institut für Pathologie, Dresden).

Für die kritische Durchsicht dieser Arbeit danke ich Herrn Diplom-Biologen Lukas Kratzsch sowie Herrn Matti Panian.

Mein besonderer Dank geht an meinen Bruder sowie an meine Eltern, die mich immer unterstützten.

## Curriculum vitae

### Matthias Kappler

Anschrift	Torstraße 23 06109 Halle (Saale)
Familienstand	ledig
06.01.1975	geboren in Staßfurt
1981-1991	Besuch der Polytechnischen Oberschule „Käthe-Kollwitz“ in Salzwedel
1991-1993	Besuch des Gymnasiums „Käthe-Kollwitz“ in Salzwedel
1993	Abitur

#### Wissenschaftlicher Werdegang

1993-1994	Studium der Physik an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
1994-2000	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2000	Abschluss des Studiums als Diplombiologe (Spezialisierung Entwicklungsgenetik, Entwicklungsbiologie) am Institut für Pathologie (Herr Prof. F.-W. Rath)
seit 2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Halle-Wittenberg am Institut für Pathologie, Abt. Molekularpathologie (Herr PD Dr. H. Taubert) (Herr Prof. F.-W. Rath, Herrn Prof. S. Hauptmann) und in der Klinik für Strahlentherapie (Herr Prof. J. Dunst)
März 2005	Promotion .

## Thesen

- Humane Weichteilsarkome (WTS) sind eine sehr heterogene Gruppe maligner Tumoren, die mit wenigen Ausnahmen einen mesenchymalen Ursprung haben. Charakteristisch für diese Tumoren ist ihre Lokisationsvielfalt, ihr beschwerdearmes Wachstum und die Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie. Die Häufigkeit der Metastasierung von WTS beträgt etwa 50-80 %. Ferner haben WTS eine relativ hohe Rezidivneigung.
- WTS können pathomorphologisch gut klassifiziert werden. Eine genaue individuelle Prognoseaussage ist jedoch gegenwärtig nicht möglich. Es ist deshalb erforderlich nach molekularen Markern für die Abschätzung der Prognose, die eine individuelle Therapie des WTS möglich macht, zu suchen.
- In dieser Arbeit wurde solch ein neuer für WTS potentieller Tumormarker untersucht. Es handelt sich um den Inhibitor der Apoptose (IAP) Survivin. Das Genprodukt ist ein essentielles Protein der Mitose und verbindet als „passenger protein“ die Chromosomensegregation mit der Zytokinese. Ferner kann Survivin die Apoptosekaskade, durch die Reprimierung der Kaspase-9, inhibieren. Sowohl die Regulation der Mitose/Zellteilung als auch die der Apoptose sind in allen Tumoren verändert.
- Survivin wird in fötalen Geweben normal exprimiert, aber kann in differenzierten adulten Normalgewebe kaum nachgewiesen werden. Demgegenüber wird Survivin in den meisten Tumoren detektiert. Dieser Nachweis korreliert häufig mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit Karzinomen oder Leukämien.
- In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von Gesamtsurvivin mittels RT-PCR quantitativ und qualitativ und die Expression der Survivin-Spleißvarianten qualitativ analysiert. Gesamt-Survivin ließ sich mittels RT-PCR schwach in Normalgewebe und in Lymphozyten nachweisen, wird aber im Tumorgewebe (WTS von erkrankten Patienten) wesentlich stärker exprimiert. Mittels einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurde eine mRNA-Gesamtsurvivin-Expression  $>2$  zeptomol Survivin je attomol GAPDH als ein negativer und unabhängiger Prognosemarker für 94 WTS-Patienten identifiziert (RR=2,7 ;  $p=0,009$ ).
- Die Proteinexpression von Survivin konnte mittel Westernblot-Analyse bzw. ELISA an 63 Proben von WTS-Patienten bestimmt werden. Mittels einer Cox-Regressionsanalyse zeigt sich, dass auch die Expression des Survivinproteins ein negativer und unabhängiger Prognosemarker für WTS ist (WB: RR=5,1;  $p=0,004$ ;

ELISA: RR= 19,8; p=0,001). Wenn Survivin auf mRNA- oder Proteinniveau in WTS verstärkt exprimiert wird, korreliert dies mit einem erhöhten Sterberisiko.

- Wird die katalytische Telomerase-Untereinheit des Replikationsapparates (hTERT), die wie Survivin vor allem in Tumor- und fötalem Gewebe exprimiert wird, in die Überlebensanalysen einbezogen, verschlechtert sich die Prognose der Patienten weiter. Patienten, deren Tumoren hTERT- und Survivin-mRNA in hohen Konzentrationen exprimieren, zeigen ein 20-fach erhöhtes Risiko an einem WTS zu versterben, im Vergleich zu Patienten deren Tumoren diese Gene nicht überexprimieren. Die durchschnittliche Überlebenszeit von Patienten deren Tumoren beide Gene überexprimierten, betrug 17 Monate, im Vergleich zu 124 Monaten bei Patienten, deren Tumoren beide Gene nur gering oder gar nicht exprimierten.
- hTERT und Survivin sind zwei Stammzellmarker, die unreguliert auch in WTS sowie anderen Tumoren exprimiert sind und zur Progression transformierter Zellen beitragen. Eine Hypothese beschreibt, dass WTS durch die Transformation multipotenter mesenchymaler Stammzellen entstehen. Die Expression beider Gene in WTS würde diese Hypothese unterstützen. Häufig sind undifferenzierte Tumoren aggressiver und scheinbar dedifferenzieren auch die metastasierenden Tumorzellen. Vielleicht sind Tumorzellen fähig, durch die Expression dieser und anderer „Stammzell“-Gene, den physiologisch „autarken“ Charakter von Stammzellen nachzuahmen. Nach Verlust von Kontrollmechanismen dieser Gene würden Tumorzellen einen wesentlichen Wachstums- und Überlebensvorteil erwerben.
- Ein zweiter Schwerpunkt dieser Arbeit war die *in vitro* Analyse der Survivinexpression in WTS-Zelllinien. In Vorstudien erfolgte die Überexpression und Visualisierung der Survivinexpression, indem Survivin bzw. die Varianten Survivin-Δ3 und Survivin-2B in einen Plasmidvektor mit GFP fusioniert und anschließend in Sarkomzellen exprimiert wurden. Mittels FACS-Vitalsortierung konnten die Zelllinien angereichert und die Lokalisation der Fusionsprotein analysiert werden. Die Überexpression von Wildtyp-Survivin zeigte keine abweichenden zellbiologischen Effekte zu einer mit GFP-transfizierten Kontrolle (z.B. Wachstumskurven, Bestrahlungseffekte).
- Da eine hohe Survivinexpression ein Schutzmechanismus der Tumorzelle vor der Apoptose sein könnte, wurden *in vitro* Inhibierungsexperimente durchgeführt. Mittels Survivin-spezifischen-siRNA konnte die Survivinexpression in Sarkomzelllinien effektiv inhibiert werden. Fünf humanen Sarkomzelllinien, mit unterschiedlichem p53-Genstatus (A 204, US 8-93, SK-LMS, RD, Saos 2) wurden mit Survivin-spezifischen-siRNA bzw. Kontroll-siRNA behandelt. 24 h nach Behandlungsbeginn konnte die Survivin-mRNA auf 12-27 % und das Survivinprotein auf 19-48 %, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, verringert werden. Die Plattiereffizienz

wurde auf 14-35 % im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen verringert. Die Applikation von siRNA gegen Survivin bewirkte in allen fünf Sarkomzelllinien unabhängig von deren p53-Genstatus eine spezifische Verringerung der Survivin-mRNA und des -Proteins, sowie der Plattiereffizienz.

- Die Apoptose stieg infolge der siRNA Behandlung jedoch in keiner Sarkomzelllinie wesentlich an. Die Analyse des Zellzyklus der US 8-93 zeigte, dass die Zellen 24 h nach dem Survivin „knock down“ in der G2/M – Phase arretiert wurden (G2/M-Phase-Zellen 35 % vs. 21 %). 48 h bzw. 72 h nach der siRNA-Behandlung waren 8 % bzw. 10 % polyploide Zellen nachweisbar. Die polyploiden Zellen waren im Zellkoloniebildungstest in allen untersuchten Sarkomzelllinien 10 Tage nach dem Versuchsbeginn nachweisbar und vital. Demzufolge sind ein G2/M-Arrest und die Generierung von teilungsinaktiven polyploiden Zellen für die zellbiologischen Effekte einer siRNA-Applikation gegen Survivin verantwortlich.
- An zwei Zelllinien (mit wt-p53 bzw. mit mt-p53 Genstatus) erfolgte die Behandlung mit Survivin-spezifischen siRNA in Kombination mit Röntgenstrahlen. Dadurch sollte überprüft werden, ob die Survivin-inhibierung die Wirkung einer Bestrahlung an Sarkomzellen verbessern kann. Nur in der wt-p53 Zelllinie A-204 führt der Survivin „knock down“ zu einer Strahlensensitivierung, d.h. die zellbiologische Wirkung der Bestrahlung wurde signifikant verstärkt. Der Verstärkungsfaktor nach einer Strahlendosis von 2 Gy lag bei 1,8 ( $p=0,05$ ) bzw. nach 4 Gy bei 2,5 ( $p=0,02$ ), normiert gegen eine mit Luziferase-siRNA behandelte und bestrahlte Kontrolle. Keine Radiosensitivierung wurde dagegen in der mt-p53 Zelllinie US 8-93 gefunden.
- Die Aktivität der mit Survivin assoziierten Kaspasen-3 und -7 war nur in der wt-p53 Zelllinie als Folge der Survivin-Inhibierung um das 5fache erhöht. Die Aktivität der Kaspasen-3 und -7 stieg in der wt-p53 Zelllinie A-204 auch in Abhängigkeit von der Dosis der Bestrahlung an. Demgegenüber konnte in der mt-p53-Zelllinie US 8-93 weder ein Einfluss eines Survivin „knock down“ noch ein dosisabhängiger Zusammenhang der Bestrahlung auf die Kaspaseaktivität festgestellt werden. In dieser Zelllinie scheint ein normaler Ablauf der Apoptose in der Folge einer Bestrahlung gestört zu sein.
- Es lässt sich feststellen, dass sich ein Survivin „knock down“ auf die Mitose der behandelten Zellen auswirkt. Eine Survivin siRNA-Behandlung kann als ein Radiosensitizer wirken, wenn die bestrahlten Zellen über einen intakten, über die Kaspase-9 ablaufenden „Apoptose-Pathway“, verfügen.
- Eine erhöhte Survivinexpression wurde auf mRNA und Proteinniveau als ein unabhängiger Prognosefaktor für WTS-Patienten identifiziert und die Hemmung der Survivinexpression als kombinierte Therapieoption zur Radiotherapie nachgewiesen

## Thesen zum Nachdenken

---

„ Die wachsende Fähigkeit des Menschen Erkenntnisse zu erlangen, hat nicht unbedingt seine Dummheit verringert. “  
(Prof. Sirius aus dem Film „Planet der Affen“ )

„ Das größte Problem mit dem die Menschheit heutzutage konfrontiert ist, besteht darin, dass ihre Ideale und Verhaltenskonzepte der genetischen Realität um eine Million Jahre voraus sind. “  
(A. und B. Pease)

„ Nichts kann anders sein und geschehen, als es ist und geschieht. – Kausalnexus “  
(Baruch de Spinoza)

„ Wer „(also)“ nicht von 3000 Jahren sich weiß Rechenschaft zu geben, bleib im Dunkel unerfahren, mag von Tag zu Tage leben “

„ Nur der verdient sich Freiheit wie das Leben der täglich sie erobern muss. “ „ Was Du ererbt hast von Deinen Vätern, erwirb es um es zu besitzen. “  
(Johann Wolfgang Goethe)

„ Die Ära des Lichts, ist die Ankunft des Menschen in seiner Mündigkeit. “ „ Handle so, dass du die Menschheit sowohl in deiner Person als in der Person eines jeden anderen jederzeit zugleich als Zweck, niemals bloß als Mittel brauchst. “  
(Immanuel Kant)

„ Möglichkeit wird zur Wirklichkeit nur durch Aktivität. Allgemeingültiges Wissen kann nur Resultat des Denkens sein. “

„ Wie bei den Festspielen von Olympia nicht die den Siegerkranz erringen , die am schönsten und stärksten aussehen, sondern die Kämpfer- denn aus ihren Reihen treten die Sieger-, so gelangen auch zu den Siegerpreisen des Lebens nur die Menschen, die richtig handeln. “

„ Glückseligkeit ist letzter und höchster Zweck menschlichen Handelns, sie wird nicht um eines Zweckes willen, sondern um ihrer selbst willen angestrebt. Glückseligkeit ist kein Mittel zum Zweck, sondern Selbstzweck, “  
(Aristoteles von Stageira)

„ Doch alle Lust will Ewigkeit. Will tiefe, tiefe Ewigkeit! “ „ Traue keinen Philosophen! “  
(Friedrich Nietzsche)

„ Für alles das ist der Ausgangspunkt und das höchste Gut die Vernunft. Deshalb ist diese sogar wertvoller als die Philosophie: aus ihr erwachsen alle übrigen Tugenden, da sie lehrt, dass man nicht lustvoll lebt, ohne vernünftig, anständig und gerecht zu leben, und umgekehrt nicht vernünftig, anständig und gerecht, ohne lustvoll zu leben. “ „ Wer könnte nach Deiner Meinung höher stehen als jener Mann, der über die Götter fromme Gedanken hegt, der den Tod stets furchtlos gegenübersteht, der das naturgemäße Endziel erkannt hat und begreift, dass das äußerste Gute leicht zu erfüllen und zu beschaffen ist, das äußerste Übel aber nur kurze Zeit dauert oder geringen Schmerz verursacht? Die Schicksalsnotwendigkeit aber, die einigen als Herrin über alle Dinge eingeführt wird, erklärt er für ein leeres Wort und behauptet vielmehr, dass einiges mit Notwendigkeit geschehe, anderes durch Zufall, wieder anderes durch unsere eigene Entscheidung. “ „ Denn in keiner Weise gleicht einem sterblichen Wesen ein Mensch, der im Besitz unvergänglicher Güter lebt. “  
(Epikur ( Brief an Menoikeus ))

„ Man sieht nur mit dem Herzen gut, das Wesentliche bleibt den Augen meist verborgen. “  
(Antoine de Saint-Exupery)

„ Habt Ehrfurcht vor dem Leben. “  
(Albert Schweitzer)