

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Über den Einfluss der Survivin-Expression auf die  
Überlebenszeit von Patienten mit Prostataneoplasma, die  
radikal prostatektomiert wurden**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Rolf Löser aus Itzehoe

Hamburg, 2011

Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.09.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Dirk Salomon

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Margit Fisch

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	Das Prostatakarzinom	4
1.2	Ätiologie und Pathogenese	4
1.3	Pathologie und Stadieneinteilung	5
1.4	Diagnostik des Prostatakarzinoms	7
1.5	Der PSA-Wert	7
1.6	Primäre Therapie des Prostatakarzinoms	9
1.7	Therapieoptionen des Prostatakarzinoms im hormonrefraktären Stadium	10
1.8	Survivin – Vorkommen, Anwendung und mögliche Anwendungsgebiete	12
1.9	Genetischer Locus, Struktur und Funktionsmechanismen des Survivins	13
1.10	Die Rolle des Survivin bei der Krebsentstehung und -progression	15
1.11	Survivin als ein Tumormarker	16
1.12	Survivin als prognostischer Marker	16
1.13	Vorhersage des Therapieansprechens durch Survivin	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Prinzip der Tissue Microarray Herstellung (TMA)	19
2.2	Einsatzmöglichkeiten der TMAs	19
2.3	Herstellung eines TMAs	20
2.4	Patienten	20
2.5	Tissue Mikroarray Herstellung	21
2.6	Immunhistochemie	22
2.7	Statistik	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>24</b>
3.1	Die Survivinexpression beim Prostatakrebs	24
3.2	Multivariat-Analyse	30
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>31</b>
4.1	Survivinfärbeintensität und Nachweishäufigkeit	31
4.2	Assoziation von Survivin mit klinisch-pathologischen Parametern	32
4.3	Mögliche pathophysiologische Funktion von Survivin	33
4.4	Gesamtüberleben vs biochemisches Rezidiv als Endpunkt	34
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>43</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Prostatakarzinom**

Das Prostatakarzinom ist der in Deutschland am häufigsten diagnostizierte Tumor des Mannes mit jährlich ca. 41.000 Neuerkrankungen (1). Es ist ein Karzinom des älteren Mannes, und es ist zu erwarten, dass die Inzidenz aufgrund der ansteigenden Lebenserwartung in den kommenden Jahren in den Industrienationen weiter zunimmt.

Die Neuerkrankungsrate pro Jahr pro 100.000 Menschen schwankt zwischen 1,3 (China), 30 (BR Deutschland), 60 bei weißen und 95 bei farbigen Amerikanern (2).

## **1.2 Ätiologie und Pathogenese**

Die genaue Ätiologie des Prostatakarzinoms ist unbekannt. Als Faktoren werden genetische Faktoren diskutiert: Ein Mensch, dessen Anverwandter ersten oder zweiten Grades ein klinisch manifestes Prostatakarzinom hat, trägt ein zwei- bis dreimal höheres Risiko, ebenfalls ein Prostatakarzinom zu entwickeln, und zwar bereits 10 bis 20 Jahre früher. Auch hormonelle Faktoren – Eunuchen entwickeln kein Prostatakarzinom – dürften eine Rolle spielen. Lebensumstände (Essgewohnheiten, Umweltfaktoren) können ebenfalls das Prostatakarzinom-Wachstum beeinflussen. So erfahren Japaner einen Anstieg ihrer niedrigen Prostatakarzinominzidenz, wenn sie in die USA einwandern. Eine weitere Ursache für ein Prostatakarzinom können durch die direkte Verbindung der prostatistischen Drüsen mit der proximalen Urethra Infektionserkrankungen sein. Allerdings blieben die bisherigen Ergebnisse kontrovers (2).

Eine entscheidende Rolle bei der Prostatakarzinom-Entwicklung spielen Onkogene. Ein signifikanter Einfluss auf Progression und Entwicklung von Malignomen wurde zum Beispiel für die Onkogene p-53 Suppressorgen, c-myc, Ha-ras und Ki-ras nachgewiesen (3).

### 1.3 Pathologie und Stadieneinteilung

Die Prostata ist ein fibromuskuläres und drüsiges Organ. Im Erwachsenenalter ist die Prostata kastaniengroß und ca. 20 g schwer. Innerhalb der Prostata werden verschiedene Zonen unterschieden. Zur rektalen Seite hin liegt die periphere Zone, die Ursprung für 75 % aller Prostatakarzinome ist. In der zentralen Zone, die um die Ducti ejaculatores liegt, die am Colliculus seminalis in die Urethra einmünden, entsteht in weniger als 5 % aller Fälle ein Prostatakarzinom. Etwa 20 % der Neoplasien entstehen in der Übergangszone, die um die proximale Urethra herum liegt. Hier entwickelt sich auch die benigne Prostatahyperplasie (2, 1).

In allen Zonen der Prostata befinden sich Drüsen und Drüsenausgänge, die mit kubischem Epithel ausgekleidet sind. Um die Drüsen herum liegt das bindegewebige Stroma. Zu 98 % entsteht das Prostatakarzinom aus dem Drüsenepithel. Plattenepithel- oder Übergangsepithelkarzinome werden selten diagnostiziert. Übergangsepithelkarzinome gehen meist von der Blasenschleimhaut aus und infiltrieren in die Prostata. Selten sind auch Sarkome, die vom Stroma der Prostata ausgehen wie Rhabdo- und Leiomyosarkome (1). Der häufigste epitheliale Tumor ist das Adenokarzinom. Es tritt meist multifokal auf und wird je nach Klassifikationsschema in 3 oder 4 Malignitätsgrade eingeteilt. Bei der Hälfte aller nachgewiesenen Prostatakrebe lassen sich unterschiedliche Differenzierungsgrade histologisch nachweisen (2).

Das Prostatakarzinom wächst im allgemeinen in Richtung Apex prostatae. Beim weiteren Fortschreiten wird die Prostata kapsel bevorzugt über die Perineuralspalten der Nervendurchgangsstellen penetriert. Der Kapseldurchbruch und die Samenblaseninfiltration sind Zeichen für ein lokal fortgeschrittenes Wachstum. Die Metastasierung erfolgt erst lymphogen und dann hämatogen (1). Die Lymphknoten der Fossa obturatoria sind die erste Station der lymphogenen Metastasierung. Die Obturatoriuslymphknoten eignen sich daher zum Staging (2). Die hämatogene Streuung erfolgt zumeist in das Skelettsystem als osteoblastische Metastasierung. Am häufigsten werden die Lendenwirbelkörper, der proximale Femur, das Becken, die Rippen befallen. Selten sind viscerale Organe betroffen (2, 1), siehe **Tabelle 1**.

**Tabelle 1:** Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM-Klassifikation, 6. Aufl. UICC 2002

<b>T-Primärtumor</b>	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in den bildgebenden Verfahren sichtbar ist <b>T1a</b> Tumor zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes <b>T1b</b> Tumor zufälliger histologischer Befund in mehr als 5 % des resezierten Gewebes <b>T1c</b> Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt <b>T2a</b> Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger <b>T2b</b> Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens <b>T2c</b> Tumor infiltriert beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel <b>T3a</b> Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig) <b>T3b</b> Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Blasenhals, Sphincter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)
<b>N-Regionäre Lymphknoten</b>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M-Fernmetastasen</b>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen <b>M1a</b> Nicht-regionärer Lymphknotenbefall <b>M1b</b> Knochenmetastasen <b>M1c</b> andere Manifestation

## 1.4 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Im allgemeinen ruft das Prostatakarzinom erst im fortgeschrittenen Stadium Symptome hervor. So kann es zu Miktionsbeschwerden ähnlich denen bei benigner Prostatahyperplasie kommen. Im metastasierten Stadium wird man zumeist erst durch Schmerzen, bedingt durch die Knochenmetastasen, aufmerksam.

Hauptursache für die höhere Zahl früh erkannter Prostatakarzinome ist der heutzutage zur Verfügung stehende Tumormarker prostataspezifisches Antigen (PSA). Lagen in der Vor-PSA-Ära bei etwa 33 % der Männer bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen vor, so wurden sie in den letzten Jahren nur noch in 7 % gefunden (Daten Tumor-Zentrum München). Zusätzlich ist die digitale rektale Untersuchung der Prostata von Bedeutung.

Bei der rektalen Untersuchung palpiert man den Sulcus in der Mitte der Prostata. Zur rechten und zur linken Seite sind die beiden Lappen prallelastisch abgrenzbar. Bei einem Prostatakarzinom tastet man einen derben höckrigen Knoten. Jeder tastbare Knoten erfordert eine bioptische Abklärung. Differentialdiagnostisch kommen chronische Entzündungen, Prostatakonkremente, Prostatainfarkte, Prostatacysten und die granulomatöse Prostatitis infrage (2).

Neben der rektalen Untersuchung wird die transrektale Sonographie mit einem 7,5 Mega-Hertz Schallkopf durchgeführt. Hierbei stellt sich ein Prostatakarzinomknoten im Allgemeinen als hyporeflexives Areal dar. Da dieses Zeichen nicht spezifisch ist, sollte ein auffälliges Areal in der peripheren Zone stets mit der Biopsiepistole transrektal-sonographisch biopsiert werden. Da die Schmerzbelastigung bei einer Prostatabiopsie gering ist, werden heute neben der gezielten Biopsie randomisierte Stanzungen der Prostatalappen (Apex, Mitte, Basis), mindestens 6, besser 10-12 Stenzen und mehr, durchgeführt. Da auch randomisierte Stanzungen bei einem erhöhten PSA-Wert negativ ausfallen können, ist bei persistierendem Tumorverdacht in angemessener Zeit eine Rebiopsie notwendig (2, 1).

## 1.5 Der PSA-Wert

### Der PSA-Wert (Prostataspezifisches Antigen)

Das PSA, ein Glykoprotein, ist nicht karzinomspezifisch. Es wird auch in benignen Prostatazellen gebildet und in hoher Konzentration in die Seminalflüssigkeit zur Verflüssigung des Samens, in geringer Menge in die Blutbahn abgegeben. Aus dem Blut erfolgt die Bestimmung (1).

### **Anwendungsgebiete des PSA**

- a) Differentialdiagnostik von Prostatitis, Prostatahyperplasie und Prostatakarzinom.
- b) Tumormarker zum Screening (Früherkennung) des Prostatakarzinoms.
- c) Prätherapeutische Bewertung des (lokoregionären) Prostatakarzinoms zwecks Therapieentscheid: Radikale Prostatektomie versus Radiatio.
- d) Verlaufsparemeter (Therapieüberwachung/ ansprechen) in der Tumornachsorge nach RPE (radikaler Prostatektomie), Radiatio, Hormontherapie.
- e) Prognosemarker, prä- wie posttherapeutisch (4)

### **Vor und Nachteile des PSA-Wertes**

Vorteile: Organspezifität, unkomplizierte Bestimmung aus dem Blut, guter diagnostischer Parameter, geeignet zur Verlaufskontrolle.

Sensivität für das Prostatakarzinom: ca. 70 %

Spezifität: bei PSA-Werten >10 ng/ml 80 %.

Nachteile: Verminderte Spezifität in der diagnostischen Grauzone von 4-10 ng/ml.

Diese Spezifität ist verbesserbar durch

1. PSA-Dichtemessung (ng/ml Prostatagewebe, gebildet aus dem Quotienten von Gesamt-PSA und Prostatavolumen). Ist die PSA-Dichte größer als 0,15 ng/ml, liegt Karzinomverdacht vor. (Bei einem Prostatakrebs ist die PSA-Abgabe deutlich höher. Finasteridgabe, LH-RH Analoga führen allerdings zu einer PSA-Erniedrigung.) Die PSA-Dichte-Messung kann allerdings auch zur Fehlinterpretation führen, da bei sehr großem Prostatavolumen rechnerisch eine normale PSA-Dichte trotz eines Prostatakrebses vorliegen kann.
2. PSA-Ratio. Hier handelt es sich um den Quotienten aus freiem PSA und Gesamt-PSA, in % oder reinem Zahlenwert angegeben. Je kleiner das freie PSA ist, desto größer ist die Prostatakarzinom-Wahrscheinlichkeit. Der Referenzbereich der PSA-Ratio liegt zwischen 14-21 %.
3. Altersspezifische PSA-Erhöhung. Dieser Wert, 1 ng/ml PSA-Erhöhung pro Lebensdekade, basiert auf der Feststellung, dass der PSA-Normwert eines 40-49-Jährigen von 2,5 ng/ml auf 6,5 ng/ml bei einem 70-79-Jährigen steigt.

Trotz dieser Berechnungsfaktoren - weitere werden wegen schlechter klinischer Anwendbarkeit nicht aufgeführt - und der übrigen oben genannten Untersuchungsmethoden bleibt die Grauzone zwischen 4 bis 10 ng/ml im wesentlichen bestehen. Insbesondere bleibt die Erkennung zunehmend kleinerer Prostatatumore fast schon dem Zufall überlassen. Darüber hinaus geben alle genannten Untersuchungen nur



sehr wenig Einblick in die Tumorbilogie und somit über den klinischen Verlauf, der uns eine valide Basis für Therapieentscheidungen geben könnte. Es besteht daher dringender Bedarf für einen neuen Marker, der idealerweise die frühen biologischen Stadien der Prostataerkrankung und Tumorentwicklung widerspiegelt (4).

## 1.6 Primäre Therapie des Prostatakarzinoms

Abkürzungen: WW: Watchful-waiting, HT: Hormontherapie, NHT: Neoadjuvante Hormontherapie, RT: Radiotherapie, RPE: Radikale Prostatektomie (5, 6)

Tumor	Therapieart	Kommentar
T1	WW	Standard bei gut differenzierten Tumoren
	RPE	Optional bei jungen Pat.
	RT	Optional bei jungen Pat.
	HT	Keine Option
	Kombi-Therapie	Keine Option
T1b-T2b	WW	Für asymptomatische Patienten mit gut differenzierten Tumoren
	RPE	Standard -Therapie bei Lebenserwartung > 10J
	RT	Für Pat. mit Lebenserwartung > 10J und Kontraindikation für die RP
	HT	Symptomatische Patienten, die ungeeignet für kurative Therapie sind
	Kombi-Therapie	NHT + RT kein Vorteil NHT + RP kein Vorteil HT (2-3 J) + RT besser als RT allein
T3-T4	WW	Option bei gut differenzierten T3 Tumoren
	RPE	Option bei selektierten T3a Tumoren
	RT	Bei T3 mit Lebenserwartung >5-10J Dosisescalation >70Gv zu empfehlen
	HT	Bei symptomatischen Patienten mit hohem PSA (>25) besser als watchful waiting
	Kombi-Therapie	HT + RT besser als Radiatio allein NHT + RP kein Vorteil
N+ MO	WW	Kann einen negativen Einfluss auf das Überleben haben
	RPE	Keine Standardoption
	RT	Keine Standardoption
	HT	Standardtherapie
	Kombi-Therapie	Keine Standardoption
M+	WW	Keine Standardoption
	RPE	Keine Option
	RT	Keine Option
	HT	Standardtherapie
	Kombi-Therapie	Keine Option

## 1.7 Therapieoptionen des Prostatakarzinoms im hormonrefraktären Stadium

Pro Jahr sterben in Deutschland fast 12.000 Patienten an ihrem hormonrefraktären Prostatakarzinom (HRPCA) (2, 1).

Durch die PSA-basierte Früherkennung ist es gelungen, eine Verschiebung zu früheren, kurativ behandelbaren Tumorstadien zu erreichen. Dennoch erleiden viele Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung einen Progress, sei es unter primär palliativer Therapie oder nach kurativem Ansatz wie nach radikaler Prostatektomie oder Radiatio. Sie erreichen dann das hormonrefraktäre Stadium (HRPCA) mit einer Überlebenszeit von rund 18 Monaten (7).

Als **HRPCA** wird ein PSA-Anstieg von drei konsekutiven Werten innerhalb von je 14 Tagen nach primärer und sekundärer Hormontherapie trotz im Kastrationsbereich liegendem Testosteronserumspiegel sowie einer Progression von Weichteil- und Knochenmetastasen definiert.

Ist das hormonrefraktäre Stadium erreicht, stehen heute nur begrenzt Therapieoptionen zur Verfügung (8).

### **Estramucinphosphat (EMP)**

EMP stellte lange Zeit die Standardtherapie der PSA-Progression nach primärer Anti-Androgentherapie dar. Bei EMP handelt es sich um ein Kombinationspräparat von Stickstofflost und Östradiol. Es wurde ab den 70er Jahren eingesetzt. Die Monotherapie beim HRPCA führt zu Ansprechraten von ca. 20% mit einer mittleren Ansprechdauer von 3-4 Monaten. Wegen gastrointestinaler und kardiovaskulärer Nebenwirkungen findet jedoch bei 40% der Patienten ein vorzeitiger Therapieabbruch statt (8).

### **Östrogene**

Der Einsatz hoch dosierter Östrogene (3-5mg/Tag) konnte sich wegen hoher kardiovaskulärer Komplikationen nicht durchsetzen.

Die Gabe niedrig dosierter Östrogene wie Diethylbestrol zeigte in 2 klinischen Studien neben einer positiven Ansprechrate von bis zu 80% eine 2-Jahres-Überlebensrate von 63%. Ähnlich gute Resultate wurden unter der Anwendung von Östrogenpflastern berichtet. Insgesamt wurden diese Therapieformen aber nicht wesentlich weiterverfolgt (8).

## **Chemotherapie**

Bis in die 1990er Jahre wurde das Prostatakarzinom als chemotherapieresistenter Tumor angesehen. 1996 konnte durch Mitoxantron (ein Antracyclin) im Vergleich zur alleinigen Prednisontherapie eine bessere Palliation erreicht werden. Seit 2004 ist die **Standardchemotherapie** die **Docetaxel**-Infusion. Alle drei Wochen verabreicht, konnte neben einer signifikanten Schmerzreduktion und Ansprechrate des Prostatakrebses erstmals ein Überlebensvorteil von nahezu 2,5 Monaten (18,9 versus 16,5 Monaten) gegenüber einer Mitoxantrontherapie nachgewiesen werden.

Taxane wie das Docetaxel wirken über die Phosphorylierung des Bcl-2-Antiapoptosegens, wodurch die Apoptose wieder in Gang gesetzt wird. Obwohl Docetaxel eine wirksame therapeutische Substanz ist, sind die Ergebnisse wegen des geringen Überlebensvorteils enttäuschend (8).

## **„Targeted-Therapie“**

In den letzten Jahren sind neue Substanzen entwickelt worden, die gezielt (= targeted) in den Zellstoffwechsel der Tumorzellen eingreifen können. Aus der Vielzahl der zielgerichteten Therapieansätze, die sich beim Prostatakarzinom derzeit in Phase I und II der klinischen Prüfung befinden, werden im Folgenden einige Substanzen dargestellt.

### **A. Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren**

#### **- Sunitinib (Sutent)**

Sunitinib ist ein Multityrosinkinaseinhibitor, der über den PDGF-(platelet derived growth factor) und VEGF-(vascular endothelial growth factor) Rezeptorsignalweg die Angiogenese und Proliferation von Tumorzellen beeinflusst. Das für die Behandlung des Nierenzellkarzinom zugelassene Präparat zeigte im Prostatakarzinom-Mausmodell eine Wachstumshemmung von ca. 50% (7). Eine Kombination mit Docetaxel führte zu einem überadditiven Effekt, der für eine Therapie des HRPKA genutzt werden könnte (9).

#### **- Sorafenib (Nexavar)**

Sorafenib ist ein Inhibitor der PDGF- und VEGF-Kinase. Außerdem hemmt es den c-Kit-Rezeptor, der über den Stammzellfaktor Proliferation vermittelt. Das Präparat ist zur Therapie des Nierenzell- und Leberzellkarzinoms zugelassen. In einer Untersuchung bei Patienten mit Prostatakarzinom zeigten 13 von 21 Patienten

einen PSA-Progress, allerdings ohne radiologischen Hinweis für eine Zunahme der Knochenmetastasen. In einer 2. Studie wurde nach Beendigung der Therapie ein Rückgang des PSA-Wertes beobachtet. Es bleibt daher offen, ob der PSA-Wert einen sinnvollen Parameter zur Therapiekontrolle darstellt. Zur Zeit wird in einer Phase-II-Studie in Deutschland die Wirksamkeit einer Docetaxel-/ Sorafenib-Kombination überprüft (7).

## **B. Angiogenesehemmer**

### **- Bevacizumab (Avastin)**

Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich an den VEGF-Rezeptor bindet und über diesen Weg die Angiogenese in Tumoren hemmt. In Kombination mit Docetaxel kam es zu einem deutlichen Absinken des PSA-Wertes (11 von 20 Patienten) (7). Drei der ausgiebig vorthera-pierten Patienten profitierten von dieser Therapie (10).

### **- Thalidomid**

Thalidomid wirkt ebenfalls über den VEGF-Rezeptorweg, wodurch es zu einer Hemmung der Vaskularisierung der Tumoren kommt. Thalidomid wurde in einer Phase-II-Studie an 75 Patienten in Kombination mit Docetaxel gegen eine Monotherapie mit Docetaxel untersucht. Es zeigte sich ein PSA-Ansprechen bei 53 vs. 37% zu Gunsten der Kombinationstherapie (7). Das progressionsfreie PSA-Intervall betrug 2,2 Monate (11), die Gesamtüberlebenszeit 28,5 Monate - ein deutlicher Zuwachs gegenüber den 18,9 Monaten in der Tax 327-Studie.

## **1.8 Survivin – Vorkommen, Anwendung und mögliche Anwendungsgebiete**

Survivin wurde vor 13 Jahren entdeckt (12). Survivin ist das kleinste Mitglied der Familie der „Inhibitors of Apoptosis“ Proteine (IAP) bei Säugern (13). Es ist ein multifunktional wirkendes Protein, das die Apoptose verhindert, die Zellteilung reguliert und die Angiogenese steigert (14).

Survivin wird in großer Menge in fetalem Gewebe exprimiert. In den meisten enddifferenzierten Geweben Erwachsener soll Survivin nicht mehr nachweisbar sein (12). Eine Survivin-Expression bei Adulten lässt sich jedoch u. a. im Thymus, in frühen Entwicklungsstufen von Knochenmarkzellen, basalen Colonepithelien und

auch in der Prostata nachweisen (15). Bei den meisten menschlichen Neoplasien einschließlich des Prostataneoplasmas wird die Survivin-Expression in den Tumorzellen reaktiviert über den Verlust von Tumorsuppressoren wie p53. Dadurch erfolgt eine Aktivierung des Survivin-Promotors.

Survivin liegt in drei subzellulären Formen vor: einer cytoplasmatischen, einer nukleären und einer mitochondrialen. Übereinstimmend mit dieser Lokalisation ist Survivin sowohl an der Regulation der Apoptose als auch an der Kontrolle der Zellteilung beteiligt (15).

Gegenwärtig wird über die Rolle des Survivins als ein Prognosefaktor bei Neoplasien diskutiert, da eine hohe cytoplasmatische Survivin-Expression in verschiedenen Tumorarten mit höherer Malignität, schlechterer Chemotherapie-wirksamkeit und kurzen Überlebenszeiten korreliert. (16).

In der Zukunft erhofft man sich durch Manipulation der Survivin-Regulation und Expression, der Umverteilung der cytoplasmatischen in nukleäre Survivin-Expression, die Entwicklung neuer immun- und gentherapeutischer Strategien für die Neoplasiebehandlung (17).

### **1.9 Genetischer Locus, Struktur und Funktionsmechanismen des Survivins**

Das 14,7 Kb große menschliche Survivin-Gen liegt auf dem Chromosom 17q25 (18) und codiert ein 16,5 kDa Protein. Survivin besitzt im Unterschied zu anderen IAP nur ein BIR („baculovirus IAP repeat“). Die BIR-Domäne faltet sich zu einer stark hydrophoben Tasche, die ein Zinkion einschließt und für Protein-Protein-Interaktionen wichtig zu sein scheint (12). Untersuchungen mit der Röntgen-Kristallographie haben ergeben, dass Survivin als Homodimer vorliegt (19).

Bisher sind fünf alternative Survivin-Spleißvarianten bekannt, wobei das wt (Wildtyp) Survivin (142 Aminosäuren) 4 Exone enthält. Die Survivin-2B-Variante (165 Aminosäuren) entsteht durch Insertion eines alternativen Exons 2. Die Survivin  $\Delta$ -EX-3-Variante (137 Aminosäuren), die eine BH2-Bindedomäne enthält, wird durch die Deletion des Exons 3 gebildet. Survivin-3B (120 Aminosäuren) entsteht durch die Verwendung eines alternativen Exons 3 (20). Jüngst wurde noch eine Spleißvariante Survivin-2a (74 Aminosäuren) bekannt. Sie besteht aus den Exons 1 und 2 sowie einem alternativen Exon 2a (21) (**Tabelle 2**).

Man meint, dass die BIR-Domäne für die antiapoptotische Wirkung federführend zuständig sei, während die  $\alpha$ -helikale Region des Proteins mit tubulären

Zellstrukturen in Wechselwirkung stünde und damit die Zellteilung beeinflussen würde (22).

Die Survivin-Spleißvarianten sind wohl in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten verteilt. So finden sich Survivin und 2B-Survivin vornehmlich im Cytoplasma, Δ-EX-3-Survivin vornehmlich in Nucleus und Survivin 2a gleichmäßig verteilt in Cytoplasma und Nucleus. Eventuell wird durch die verschiedene Verteilung der Spleißvarianten die regulatorische Balance zwischen Apoptoseeinleitung und der Apoptoseinhibition aufrechterhalten (23).

**Tabelle 2: Survivin und seine Varianten**

Abkürzungen: aa -Aminosäuren; BIR – „Baculovirus IAP repeats“; ORF – “Open reading frame”; c- c Domäne: coiled-coil domäne

-----BIR-Domäne-----			c-c Domäne			Survivin	142 aa
Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4				
-----BIR-Domäne-----			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	Exon 3	<b>Exon 3B</b>	Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	<b>Exon 2B</b>	Exon 3	Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne			Survivin 3B	120 aa
Exon 1	Exon 2	Exon 3		Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	Exon 3		Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	Exon 3		Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne			Survivin Δ Ex3	137 aa
Exon 1	Exon 2	Exon 3		Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	Exon 3		Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	Exon 3		Exon 4			
-----BIR-Domäne			c-c Domäne			Survivin -2a	74 aa
Exon 1	Exon 2	Exon 2A					
-----BIR-Domäne			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	Exon 2A					
-----BIR-Domäne			c-c Domäne				
Exon 1	Exon 2	Exon 2A					

### - Molekulare Funktionsmechanismen von Survivin

Survivin als multifunktionales Protein ist einerseits an der Mitose als nukleäres Survivin, andererseits als Zelltodinhistor in Form des cytoplasmatischen Survivins beteiligt (24). Die **apoptoseinhibitorische Wirkung** ist nicht vollständig geklärt; sie scheint durch Einwirkung auf die Apoptosekaskade durch Inaktivierung der Protease Caspase-9 und einen Co-Faktor (HBXIP, Hepatitis B interacting protein) vermittelt zu sein (25). Dohi et al. (26) zeigten, dass Survivin als Reaktion auf Zelltodstimuli aus dem mitochondrialen Kompartiment ins Cytoplasma freigegeben wird und dort mit dem XIAP interagiert, so dass dieser Komplex die XIAP-Stabilität erhöht und somit die Caspase-9-Aktivität als physiologischer Antagonist

unterdrückt. Die über diesen Weg erzielte antiapoptotische Einheit ist funktionell bedeutend: *In vivo* ist der Survivin-XIAP-Komplex offenbar mit einem zunehmenden Tumorwachstum verschiedenster Tumorarten assoziiert (27).

Die Rolle des Survivins bei der **Mitose** wurde durch einen Versuch an Mäuseembryonen belegt: Durch Tilgung des Survivin-Gens aus Mäusestammzellen starben die Embryonen innerhalb von 4-5 Tagen ab (28). Die nachträgliche Unterdrückung der Survivin-Expression verhinderte das Wachstum verschiedener Zelltypen einschließlich Colonkarzinom-, Lymphom- und Medulloblastomzellen (29). Von Survivin depletierte Lungenfibroblasten und retinale epitheliale Pigmentzellen wiesen ebenfalls eine defekte Zellteilung auf (30).

Der Mechanismus, über den Survivin die **Angiogenese** steigert, dürfte auf der Apoptoseinhibition in endothelialen Zellen beruhen. Als Beweis mag gelten, dass sich die Survivin-Expression in angiogenetisch stimulierten Zellen im Vergleich zu ruhenden Zellen hochreguliert fand (31). Bei colorektalen Neoplasien fand sich eine positive Korrelation zwischen Survivinspiegel und der Dichte von Mikrogefäßen (32).

### 1.10 Die Rolle des Survivin bei der Krebsentstehung und -progression

Allen et al. (33) verfassten einen der ersten Berichte über die Rolle des Survivins in der Karzinogenese. Sie zeigten, dass eine hohe Survivin-Expression eine zunehmende Umwandlung von Papillomen zu Plattenepithelkarzinomen der Haut zur Folge hatte. Weiter stellten sie fest, dass Papillome weniger häufig bei Mäusen mit hohem Survivinspiegel gebildet wurden als in der Kontrollgruppe.

Um festzustellen, welcher subzelluläre Survivin-Pool an der Neoplasiebildung beteiligt ist, transfizierten Dohi et al. (34) Insulinomzelllinien von Ratten mit Survivin, welches mittels Zielsequenz entweder mitochondrial oder cytoplasmal exprimiert wurde. Beim mitochondrial gerichteten Survivin kam es zu einer Steigerung der Zellkoloniebildung, zur Terminierung der Apoptose in den Tumorzellen und einem beschleunigten Tumorprogress im immunkompromittierten Mausmodell. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei Überexpression von cytoplasmatischem Survivin reduziertes Zellwachstum und Tumorbildung sowie eine gesteigerte Apoptoserate. Obwohl alle diese Modellsysteme ergeben haben, dass Survivin in den Tumorprogress eingreift, bleibt der genaue Angriffspunkt und Wirkmechanismus weiter unklar.

### **1.11 Survivin als ein Tumormarker**

Der ideale diagnostische Tumormarker sollte in allen Krebsarten, insbesondere bei frühen oder kleinen Malignomen, nicht aber im gesundem Gewebe nachweisbar sein. Darüber hinaus sollte der Nachweis möglichst nicht-invasiv, also z.B. im Urin und Blut erfolgen (35). Hier ist Survivin ein sehr interessanter Marker, da es bei verschiedenen Malignomen vermehrt exprimiert wird (35). Darüber hinaus wird eine hohe Survivin-Expression auch bei einer Reihe präinvasiver Läsionen mit hoher Entartungsprädisposition gefunden (36).

Die meisten Untersuchungen über die mögliche diagnostische Rolle des Survivins befassen sich mit Blasenkrebs. Unter anderem konnten Weikert et al (37) bei 24 von 35 Patienten (68%) mit Blasenkrebs Survivin-mRNA im Urin nachweisen. Im Gegensatz hierzu konnte weder im Urin von 11 gesunden Patienten noch von 22 Patienten mit einer gutartigen genitouretralen Erkrankung ein Survivin-mRNA-Nachweis geführt werden. Insgesamt ergab diese Studie über die Survivinbestimmung im Urin beim nicht-invasiven Blasentumor eine Sensitivität von 68,6% und eine Spezifität von 100%. Dies wäre besser als die konservative Urinzytologie. In der Urinzytologie hingegen ergab sich eine Sensitivität von 31,4% und eine Spezifität von 97,1%.

Obwohl diese bisherigen Ergebnisse (beim Blasentumor) vielversprechend sind, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bis Survivin als diagnostischer Marker benutzt werden kann. So liegen bisher nur wenige Veröffentlichungen über die Survivin-Expression in gutartigen Tumoren und entzündlich veränderten Geweben vor. Weitere Informationen hierüber sind aber von grundlegender Bedeutung, bevor Survivin als genereller Malignommarker klinisch eingesetzt werden kann.

### **1.12 Survivin als prognostischer Marker**

Prognostische Marker sagen im Idealfall den Krankheitsverlauf voraus. Traditionelle Prognosefaktoren schließen die Tumorgroße, den Entdifferenzierungsgrad und Lymphknotenmetastasierung ein. Survivin könnte durch seine Fähigkeit der Apoptoseverhinderung, Proliferationsförderung und Angiogenesesteigerung theoretisch eine relevante prognostische Aussage ermöglichen. Auch würden ansteigende Survivin-Spiegel möglicherweise etwas über die Aggressivität verschiedener Malignome voraussagen können (21). Voraussetzung für die



Nutzung von Survivin als Prognosefaktor wäre allerdings, dass die derzeit vorliegenden kleinen Fallzahlen durch große, belastbare Studien ergänzt werden. Ebenso wären Multivariat-Analysen für die jeweiligen Malignome notwendig. Zurzeit liegen valide Zahlen nur für Brustkrebs vor. Diese bestätigen, dass die Survivin-Expression ein unabhängiger Risikofaktor für ein kürzeres Überleben bei diesem Malignom ist (21). Span et al. (38) berichten, dass die Survivin-Expression bei 275 Brustkrebspatientinnen den Krankheitsverlauf unabhängig von deren Alter, dem Lymphknotenstatus, der Tumorgröße, dem histologischen Grad und dem Hormonrezeptorstatus voraussagte. In der vorgenommenen Multivariat-Analyse mit dem Gesamtüberleben als Endpunkt waren nur der Lymphknotenstatus und die Survivin-Expression unabhängige Risikofaktoren.

Alle Studien zur Rolle Survivins beim Brustkrebs legten aber entweder das Gesamt-Survivin mit allen subzellulären Pools oder exklusiv das cytoplasmatische Survivin zugrunde.

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung von nucleär-exprimierten Survivin liefert die Literaturrecherche widersprüchliche Ergebnisse (39):

Aktuell sind 19 Publikationen über die mögliche Rolle des nucleären Survivins bei Malignomen bekannt. Neun dieser Veröffentlichungen berichten über eine ungünstige Prognose bei zunehmender nucleärer Survivin-Expression, während fünf der Studien darlegen, dass der immunologische Nachweis von nucleärem Survivin einen günstigen prognostischen Faktor darstellt. In den verbleibenden fünf Publikationen wurde nichts über den Krankheitsverlauf berichtet (39).

Duffy und Kollegen empfehlen daher, in weiteren, notwendigen Studien zu untersuchen, ob gerade der Grad der Survivinexpression im Nucleus bei verschiedenen Tumorarten an eine gute oder schlechte Prognose gekoppelt ist. Darüber hinaus stehen zurzeit noch keine Daten über den möglichen prognostischen Wert der mitochondrialen Form des Survivins zu Verfügung (21).

### **1.13 Vorhersage des Therapieansprechens durch Survivin**

Prädiktive Marker sagen das Ansprechen auf spezifische Therapien vorher. Im allgemeinen bewirkt eine Anti-Krebstherapie eine Tumorregression unter anderem auch durch Apoptoseinduktion. Man vermutet, dass erhöhte endogene Survivin-Spiegel ein geringes Ansprechen auf die Tumorthherapie widerspiegeln könnten. Diese Hypothese wird durch verschiedene Studien in Tumorzelllinien gestützt. Sie belegen, dass eine künstliche Survivin-Depletion in Ovarial-, Magen-, Bronchial-

und Prostatakarzinom- sowie Melanomzellen *in vitro* die Sensibilität gegenüber der spezifischen Tumortherapie (Taxole, Cisplatin, 5-FU und Etoposid) verstärkt (21). Ebenso vermittelte eine Survivin-Überexpression in Zellen aus kolorektalen Karzinomen eine Radiatioresistenz, die sich in einer sehr niedrigen Apoptoserate dieser Zellen widerspiegelt (40). In gleichem Maße sprechen antiangiogenetische- und Immuntherapie bei starker Survivin-Expression schlecht an, wie Tran et al. (41) zeigen konnten. Auch in diesen Zellen fanden sich reduzierte Apoptoseraten (42). Voraussichtlich beeinflussen auch die Survivin-Spleissvarianten das Therapieansprechen und somit die Vorhersage des Therapieerfolges. Vermutlich jedoch nicht in gleichem Maße wie das wt-Survivin. So berichteten Zhu et al. (43), dass eine Überexpression von Survivin 2B in Leukämiezellen eine verstärkte Doxorubicin-induzierte Apoptose zu Folge hatte.

### **Gegenstand dieser Arbeit**

Die bisherigen Veröffentlichungen über die klinische Bedeutung der Survivin-Expression beim Prostatakarzinom enthalten unterschiedliche und sich teilweise widersprechende Angaben. In einigen Studien wurde eine hohe Survivin-Expression mit einem biologisch aggressiven Krankheitsverlauf sowie einer schlechten Prognose verbunden, während andere Arbeiten keinen oder einen gegenteiligen Effekt ergeben haben. Alle bisherigen Veröffentlichungen schlossen bisher nur kleine Patientenfallzahlen (52-380 Patienten) ein.

In Anbetracht der potentiellen prognostischen und somit klinischen Rolle des Survivins beim Prostatakrebs und des dringenden Bedürfnisses nach besseren Prognosemarkern bei diesem Tumor sollte die Rolle von Survivin in einem großen Kollektiv mit mehr als 3000 Prostatakarzinompatienten nach radikaler Prostatektomie mittels Immunhistochemie im Tissue-Microarray-Format durchgeführt werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Prinzip der Tissue Microarray Herstellung (TMA)**

TMA (tissue microarrays) ermöglichen die gleichzeitige Analyse von vielen Gewebeproben. Der Durchmesser der Gewebestücken auf den Arrays beträgt gewöhnlich 0,6 - 4mm (44). Die Stanzungen werden mit einer entsprechend großen Hohlzahn aus einem Donorblock (in Paraffin eingebettetes Gewebe) entnommen und auf einem Rezeptorblock (vorgestanzter Paraffinblock) aufgereiht (= „arrayed“). Wegen ihres geringen Durchmessers lassen sich bis zu 1000 Stanzungen auf einen Rezeptorblock übertragen (45).

Bei der TMA-Technik werden die Stanzungen in einem Koordinatensystem angeordnet. Hierzu wird der Rezeptorblock zuerst in Quadranten eingeteilt, die mit einem Großbuchstaben bezeichnet werden. Jedem der Quadranten ist eine x- und eine y-Achse zugeordnet. Die x-Achse wird durch Zahlen, die y-Achse durch klein geschriebene Buchstaben skaliert. Zur exakten Zuordnung der Stanzungen wird eine Datenbank angelegt, in der jedem Präparat durch die Präparatenummer eine Koordinate zugeordnet wird. Ab diesem Zeitpunkt ist die Lokalisation einer bestimmten Stanze nur noch über die Datenbank möglich. Da in die Datenbank im allgemeinen weitere relevante klinische und klinisch-pathologische Informationen aufgenommen werden, entsteht für jede Koordinate ein ganzer Datensatz.

Zuletzt werden von diesem Rezeptorblock mit dem Microtom Schnitte gewonnen, die, auf Objektträger übertragen, jeder beliebigen in situ (z. B. immunhistologische FISH) Analyse zugeführt werden. Jeder TMA-Block kann in 200 und mehr Schnitte verarbeitet werden.

### **2.2 Einsatzmöglichkeiten der TMAs**

TMAs haben eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten. Sie können abhängig von der Zielsetzung zusammengestellt werden. Soll zum Beispiel die Expression eines bestimmten Proteins innerhalb verschiedener Tumore erforscht werden, werden viele Stanzungen unterschiedlicher Entitäten auf einem Rezeptorblock platziert. Schnitte vom Rezeptorblock können dann als sogenannter Multitumorarray gleichzeitig untersucht werden.

Eine weitere Variante ist der Progressionsarray. Hier werden unterschiedliche Stadien, Vorstufen und Differenzierungsgrade eines Tumors in einem Array

zusammengetragen. An diesem Array wird nun die Änderung der Expression eines bestimmten Proteins, in Abhängigkeit vom Stadium, untersucht. Für einen Progressionsarray eignet sich z.B. das Prostatakarzinom: neben Gewebeproben aus dem Karzinom befänden sich dann auch Proben aus Krebsvorstufen und Metastasen auf dem TMA.

### **2.3 Herstellung eines TMAs**

Zur Herstellung eines Arrays ist ein Arrayer notwendig. Hierbei handelt es sich um ein Gerät, das aus zwei Komponenten besteht: dem Kopf und zwei Mikrometerschrauben, die den Kopf in x- und y-Richtung verschieben. Die Mikrometerschrauben werden über ein Programm gesteuert, in das man die x- und y-Koordinaten eingibt. Der Kopf enthält den Bohrer und die Hohlzylinder, zwischen denen man über einen Schiebemechanismus hin- und herschalten kann.

Mit dem Bohrer wird an definierter Stelle ein Loch in den Paraffinrezeptorblock gebohrt. Anschließend wird der Tumorparaffinblock unter den Kopf plaziert und mit der Hohlzylinder ein Gewebezylinder ausgestanzt. Nach erneutem Wechsel auf den Rezeptorblock wird der gewonnene Gewebezylinder mit einem bündigen Stahldraht in das vorgefertigte Stanzloch hineingedrückt. Anschließend wird der Arrayerkopf über die Mikrometerschrauben in die nächste Position gebracht (46).

### **2.4 Patienten**

Gewebeproben von 3261 in der Urologischen Klinik des UKE radikal prostatektomierter Patienten aus den Jahren 1992 bis 2005 standen aus früheren Untersuchungen zur Verfügung (**Tabelle 3**). Von 2483 (76,1%) Patienten lagen vollständige klinische Verlaufsdaten über einen Zeitraum von 1-194 Monaten vor (im Mittel 43 Monate). Adjuvante Therapie wurde bei 377 von 2979 Patienten (12,7 %) durchgeführt.

**Tabelle 3:** Grundcharakteristika der 3.261 Prostatakrebspatienten dieser Untersuchung

Parameter	Variable	n	%
Alter (y)	<50	83	2,7
	50-60	998	32,6
	60-70	1.807	59,0
	>70	175	5,7
Präoperatives PSA [ng/ml]	<4	513	16,8
	4 - 10	1.673	54,8
	10-20	641	21,0
	> 20	225	7,4
Gleason score	≤3+3	1.426	45,9
	3+4	1.311	42,2
	4+3	313	10,1
	≥4+4	55	1,8
Pathologische Klassifikation des Primärtumors	pT2	2.080	67,0
	pT3	981	31,6
	pT4	42	1,4
Pathologische Lymphknoten-Klassifikation	pN0	1.544	49,9
	pN1	89	2,9
	pN2	5	0,2
	pN3	2	0,1
	pNx	1.457	47,0
Chirurgische Schnittränder	negativ	2.475	79,8
	positiv	627	20,2
Insgesamt:		3.261*	

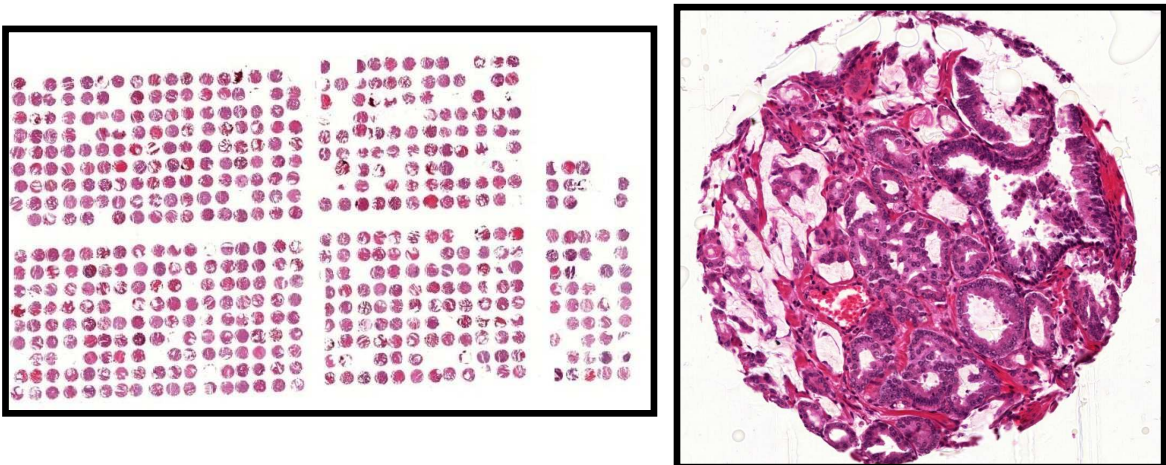
\*Abweichungen von der Gesamtzahl sind durch fehlende Daten in den Subkategorien bedingt.

## 2.5 Tissue Mikroarray Herstellung

Für die vorliegende Untersuchung wurden im TMA-Labor des pathologischen Institutes alle vollständig in Paraffinblöcken eingebetteten Prostatagewebe nach einer standardisierten Vorgehensweise analysiert (47). Aus dem Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf stammende Hämatoxylin-Eosin- (HE) gefärbte Prostatagewebsschnitte wurden erneut pathologisch begutachtet und die Areale mit dem größten Tumorherd und dem höchsten Gleason Score markiert. Aus diesen sogenannten Index Tumoren wurde je ein 0,6 mm Gewebezylinder gestanzt und auf einen TMA-Empfängerblock übertragen (48). Die

3261 Gewebstanzen wurden auf 7 Paraffin-Empfängerblöcke, die zwischen 129 bis 522 Tumorgewebsproben enthielten, verteilt. Zur internen Kontrolle wurden zudem auf jedem TMA-Block verschiedene Kontrollgewebstanzen einschließlich 10 Gewebstanzen aus gesunder Prostata sowie Proben anderer gesunder oder neoplastischer Gewebe (beispielsweise Kolon oder Lungenparenchym) verteilt (47). Diese TMA-Blöcke wurden am Microtom 4 µm dick geschnitten, auf einem Objektträger per UV-Crosslink fixiert und der immunhistochemischen Weiterverarbeitung zugeführt. Ein Beispiel eines HE-gefärbten Prostatakarzinom-TMA-Objektträgers sowie ein einzelner, vergrößerter TMA-Spot eines solchen Objektträgers sind in Abbildung 1 dargestellt.

**Abbildung 1:** Beispiel eines mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbten TMA-Schnittes (links). Einzelner Spot eines Prostatakarzinom-TMA (HE-Färbung, Durchmesser 0,6 mm),( rechts)



## 2.6 Immunhistochemie

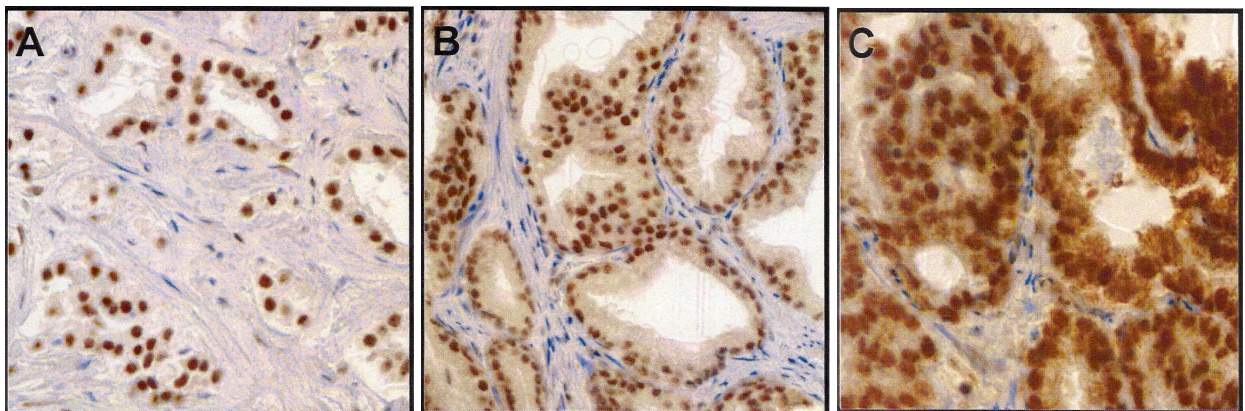
Alle TMA-Schnitte wurden im TMA-Labor des Institutes für Pathologie am gleichen Tag in einem Experiment gefärbt. Hierzu wurden die TMA-Schnitte entparaffiniert und anschließend einer Hitzebehandlung bei 120°C in einem Citratpuffer pH 6 oder 7,8 unterzogen, um die antigenen Epitope wiederzugewinnen. Der polyclonale Kaninchen-Anti-Survivin-Antikörper (Lab Vision, Fremont, Ca, USA) wurde letztendlich in einer Verdünnung von 1:900 eingesetzt. Die Survivin-Expression wurde mit dem Envision System (DAKO, Glostrup, Denmark) sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Objektträger mit dem MIRAX SCAN System (Zeiss, Jena, Germany) gescannt und als Digitalbilder unter Benutzung der MIRAX Viewer

software (Zeiss, Jena, Germany) bewertet. Nach Verblindung der klinischen Daten erfolgte die quantitative Auswertung der Survivin-Expression. Diese wurde getrennt für Zellkern und Cytoplasma semiquantitativ in folgendem 4-stufigen Intensitäts-score angegeben:

- **0:** keine Färbung
- **1:** schwache Färbung in  $\leq 80\%$  oder mittelstarke Färbung in  $\leq 20\%$  der Tumorzellen
- **2:** schwache Färbung  $>80\%$  oder mittelstarke in  $>20\%$ , aber  $<80\%$  der Tumorzellen oder starke Färbung in  $\leq 30\%$  der Tumorzellen
- **3:** mittelstarke Färbung in  $>80\%$  oder starke Färbung  $> 20\%$  der Tumorzellen.

Beispiele verschiedener Färbemuster und Färbeintensitäten sind in **Abbildung 2** dargestellt.

**Abbildung 2:** Mikrofotographien von ausgewählten Survivin-Färbemustern und Farbintensitäten bei ausgewählten TMA-Schnitten. Die hier dargestellten Fotografien zeigen alleinige nucleäre (A, B) und nucleäre und zusätzliche cytoplasmatische Färbung (C) in Prostatakarzinomzellen.



## 2.7 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit der JMP 5.0.1 Software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) unter Benutzung des Pearson's chi-Quadrat-Tests durchgeführt. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier- und Log rank-Test verglichen. Die Multivariat-Analyse wurde unter Benutzung des Regressionsmodells nach Cox durchgeführt. In allen Untersuchungen wurden p-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Survivinexpression beim Prostatakrebs

Eine Survivin-Färbung ließ sich in 2359 (99,4%) der auswertbaren Prostataprobe nachweisen. Die Zellkernfärbung war das vorherrschende Färbungsmuster, die cytoplasmatische Färbung kam in einem Teil der Proben als zusätzliche Färbung zu den gefärbten Zellkernen vor. Nur eine einzige Probe eines Prostatakarzinomgewebes zeigte eine alleinige cytoplasmatische Survivin-Färbung.

In allen 10 zufällig ausgewählten TMA-Spots, die normales Prostatagewebe enthielten, konnte eine nucleäre Survivinfärbung ebenfalls nachgewiesen werden. Bei 958 der Tumore (40,3%) beschränkte sich die Färbung auf den Nukleus. 1401 (58,8%) der Prostatatumore wiesen eine zusätzliche cytoplasmatische Färbung in allerdings unterschiedlicher Färbeintensität auf. Eine auffällige Heterogenität der Survivin-Expression innerhalb der analysierten Tumore konnte nicht beobachtet werden.

Zur statistischen Analyse wurden folgende 4 Gruppen gebildet:

- Färbung des Zellkerns allein (n = 958; 40,3%),
- schwache Färbung des Cytoplasmas (n = 526; 22,2%),
- mäßige Färbung des Cytoplasmas (n = 639; 26,9%) und
- starke Färbung des Cytoplasmas (n = 236; 9,9%).

(vgl. **Abbildung 2**)

Die Analyse einer möglichen Assoziation clinico-pathologischer Marker des Prostatakarzinoms wie präoperative PSA-Plasmakonzentration, Gleason-Wert, pT-Stadium oder der tumorfreie Resektatrand mit dem Survivin-Färbemuster ergab eine positive Korrelation von Gleason-Score und pT-Stadium mit der cytoplasmatischen Färbeintensität der Karzinome (beides  $p < 0,0001$ ). Präoperative PSA-Werte ( $p = 0,3691$ ) oder der Tumorstatus des Resektionsrands ( $p = 0,0916$ ) hingegen korrelierten nicht mit dem Färbemuster in der TMA-Analyse (**Tabelle 4**).



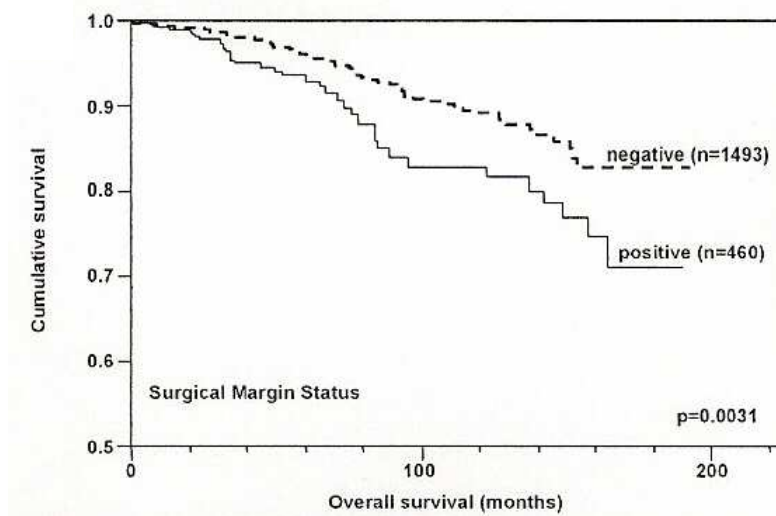
**Tabelle 4:** Survivin-Färbereintensitäten bei TMA-Proben radikal prostatektomierter Patienten

Parameter	Variable	n	<u>cytoplasmatisch</u>			<u>nucleär</u>	p-Wert
			stark (%)	mäßig (%)	schwach (%)	(%)	
Prä-operative PSA-Werte [ng/ml]	< 4	343	8.5	28.0	24.5	39.1	0.3691
	4 - 10	1,185	9.4	26.6	21.8	42.3	
	10 – 20	514	12.1	27.2	20.2	40.5	
	> 20	188	8.0	28.2	27.1	36.7	
Gleason Score	≤ 3 + 3	948	7.6	24.1	21.0	47.4	<0.0001
	3 + 4	1,010	10.4	29.0	25.0	35.6	
	4 + 3	259	15.8	29.3	16.2	38.6	
	≥4 +4	46	15.2	36.7	17.4	30.4	
pT Stadium	pT2	1,425	7.9	26.0	19.9	46.1	<0.0001
	pT3	802	13.8	28.9	25.6	31.7	
	pT4	35	2.9	28.6	34.3	34.3	
Chirurgische Resektatränder	Negativ	1,782	10.6	26.4	21.8	41.3	0.0916
	Positiv	479	7.5	30.1	23.4	39.0	

Die klinisch-prognostische Relevanz dieser Assoziationen wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse getestet. Zunächst konnte die bereits durch verschiedene Analysen in diesem TMA-Kollektiv bekannte solide Korrelation aller getesteten clinio-pathologischen Parameter mit dem biochemischen Krebsrezidiv (alle  $p < 0,0001$ ) und dem Gesamtüberleben der Patienten bestätigt werden (Gleason-Score:  $p < 0,0001$ ; pT-Stadium:  $p = 0,0322$ ; Status der chirurgischen Schnittränder:  $p = 0,0031$ ). Exemplarisch ist die Kaplan-Meier-Kurve für den Status der chirurgischen Schnittränder im Vergleich zum Gesamtüberleben des Kollektivs dargestellt (Abbildung **3A**).

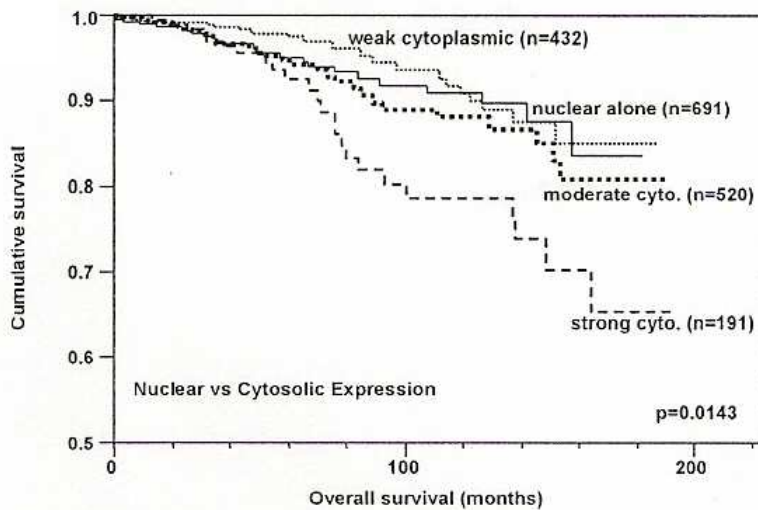
Eine starke zusätzliche cytoplasmatische Survivin-Färbung in TMA-Proben radikal prostatektomierter Prostatakarzinompatienten scheint Einfluss auf die Prognose zu haben. In der Kaplan-Meier-Analyse zeigt diese Subpopulation von Prostatakarzinompatienten ein deutlich reduziertes Gesamtüberleben ( $p = 0,143$ ; Abbildung **3B**).

**Abbildung 3A:** Der Nachweis von Tumorgewebe in chirurgischen Schnitträndern nach Prostatektomie korreliert mit der Abnahme des Gesamtüberlebens in unserem Kollektiv der radikal prostatektomierten Patienten (n = 1953).

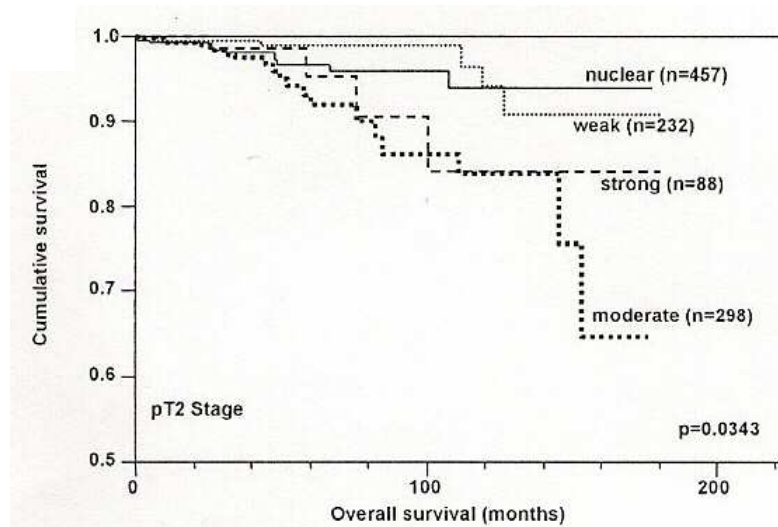


(cumulative survival = rezidivfreies Überleben; overall survival = Monate des Follow-up)

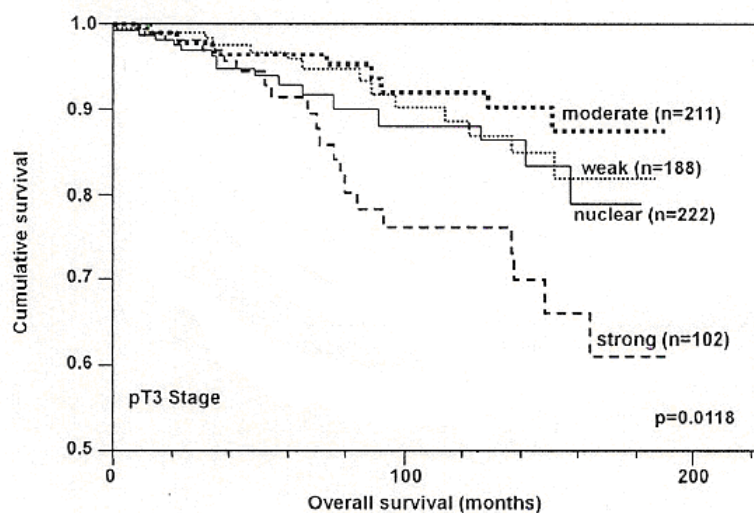
**Abbildung 3B:** Eine starke cytoplasmatische Färbung zusätzlich zur nukleären Färbung bedeutet eine insgesamt schlechtere Prognose als eine alleinige nukleäre Färbung (p=0,0143; n = 1734).



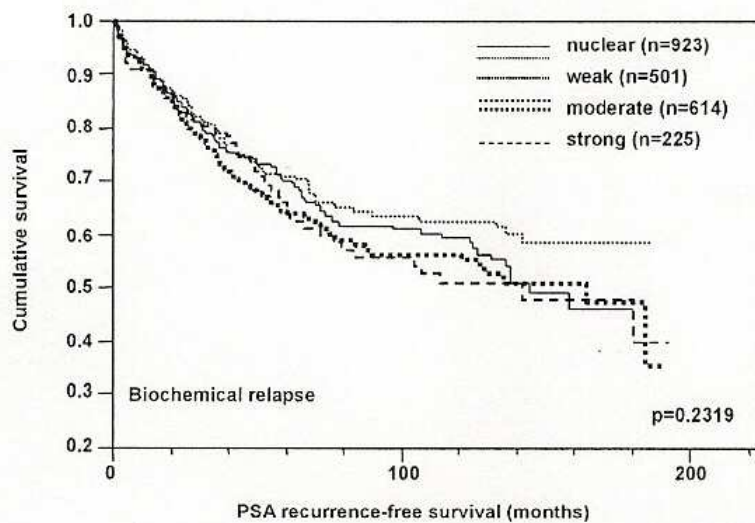
**Abbildung 3C:** stellt für das pT2 Stadium den deutlichen Zusammenhang zwischen mäßiger und starker cytoplasmatischer Survivin-Färbung und einer verkürzten Gesamt-Überlebenszeit dar ( $p=0,0343$ ;  $n = 1075$ ).



**Abbildung 3D:** stellt den Zusammenhang zwischen subzellulärem Survivin-Färbemuster und verkürzter Gesamt-Überlebenszeit am Beispiel des lokal fortgeschrittenen pT3 Prostatakarzinoms dar ( $p=0,0118$ ;  $n = 723$ ).



**Abbildung 3E:** Eine Verbindung zwischen subzellulärer Survivin-Expression und der biochemischen Karzinomwiederkehr (erneuter PSA-Anstieg) ließ sich nicht nachweisen ( $p=0,2319$ ;  $n = 2263$ ).



(cumulative survival = rezidivfreies Überleben; PSA recurrence-free survival = PSA wiederkehrfreies Follow-up in Monaten).

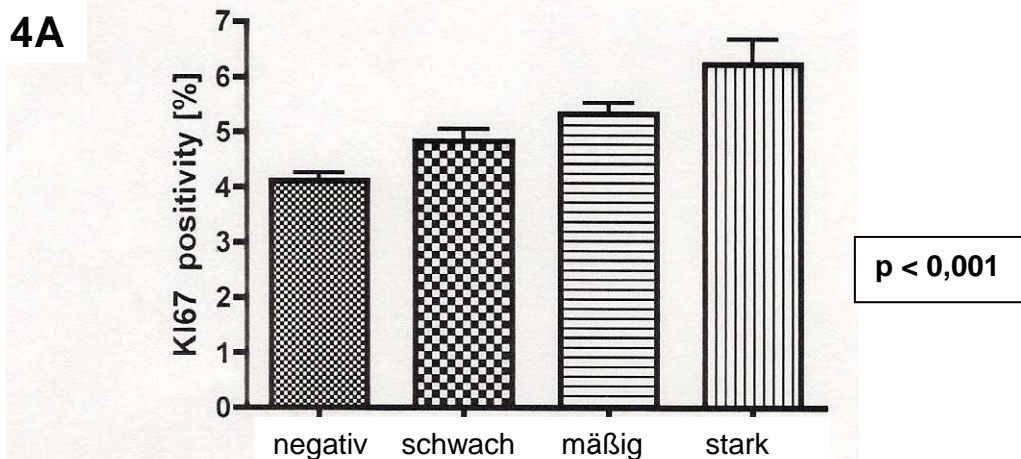
Die Korrelation von starker cytoplasmatischer Survivin-Färbung und ungünstiger Prognose scheint unabhängig vom pT-Stadium zu sein, da sich dieser Effekt in den beiden größten pT-Subgruppen in gleichem Maße zeigt (pT2-Tumoren:  $p=0,0343$ ; Abbildung 3C, pT3-Tumoren:  $p=0,0118$ ; Abbildung 3D).

Zwischen einer starken Survivin-Färbung und dem biochemischen Krebsrezidiv im Sinne eines signifikanten PSA-Wiederanstiegs im postoperativen Verlauf fand sich jedoch keine relevante Verbindung (Abbildung 3E).

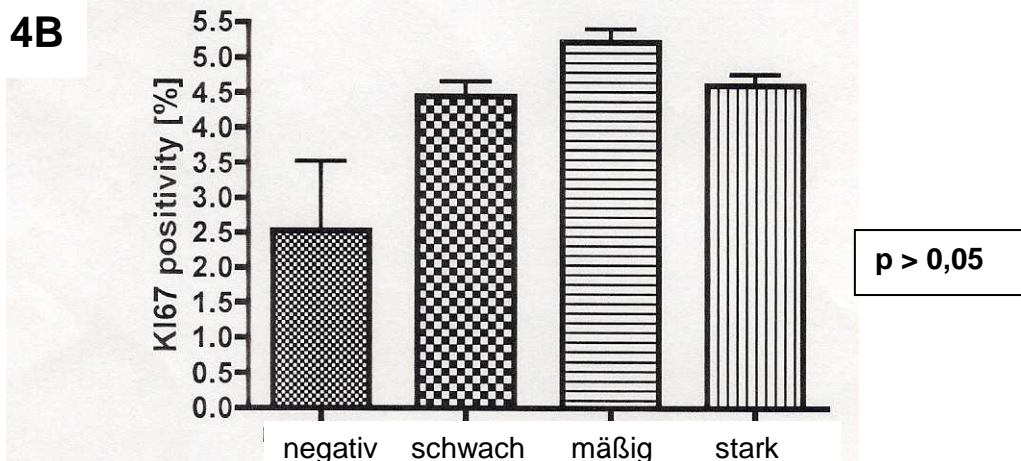
Die Frage, ob diese prognostisch ungünstige Rolle des cytoplasmatischen Survivins über eine verstärkte Proliferation der Prostatakarzinomzellen vermittelt wird, sollte über eine Analyse eines möglichen Zusammenhangs zwischen Survivin- und **Ki67**-Expression getestet werden.

**Ki67** ist ein Protein, das während aller aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. In ruhenden Zellen lässt es sich nicht nachweisen. Über den **Ki67-Proliferationsindex** können prognostische Aussagen über den Verlauf des Prostatakarzinoms getroffen werden, da **Ki67** positive Tumoren mit einem erhöhten Risiko für ein PSA-Rezidiv vergesellschaftet sind (49).

In unserem Kollektiv zeigte sich ein sehr deutlicher, linearer Zusammenhang zwischen dem Grad der cytoplasmatischen Survivin-Färbung und dem **Ki67-Proliferationsindex**, während die nucleäre Survivin-Färbeintensität keinen Einfluss auf den **Ki67-Proliferationsindex** von Prostatakarzinomzellen hatte (Abbildungen 4A und 4B).



Die cytoplasmatischen Survivin-Färbeintensitäten nehmen mit steigendem Ki67-Proliferationsindex direkt proportional zu.



Die nucleäre Survivin-Färbung verhält sich nicht proportional zum Proliferationsverhalten der Prostatakarzinomzellen.

### 3.2 Multivariat-Analyse

In einer Multivariat Analyse zur Identifikation unabhängiger Risikofaktoren für ein verkürztes Gesamtüberleben bei Patienten mit Prostatakarzinomen wurden der Status der chirurgischen Resektionsränder, der Gleason Score, das pT-Stadium (pathologisches Tumorstadium) und die cytoplasmatische Survivin-Färbungsintensität miteinander verglichen. Bei der Analyse stellten sich nur der Gleason score ( $p=0,0003$ ) und der Resektionsrandstatus ( $p=0,0063$ ) als eindeutig unabhängige ungünstige Prognose-Faktoren für eine verkürzte Gesamt-Überlebenszeit in unserem Kollektiv radikal prostatektomierter Patienten heraus. Für die cytoplasmatische Survivin-Färbungsintensität ergab sich ein grenzwertiges Ergebnis ( $p = 0,0492$ )

Tabellarische Darstellung der Multivariat-Analyse:

<b>Variable</b>	<b>P-wert</b>
Gleason score	0,0003
pT Stadium	0,5497
Chirurg. Schnittränder	0,0063
Cytoplasmat. Survivin-Färbungsintensität	0,0492

## 4 Diskussion

### 4.1 Survivin-Färbintensität und Nachweishäufigkeit

In der vorliegenden Arbeit konnte ein immunhistochemischer Nachweis von Survivin in 99,4% aller analysierbaren Prostataneoplasien geführt werden. Diese Färbung war vorwiegend nucleär. Tatsächlich zeigte lediglich ein einzelner TMA-Spot eine rein cytoplasmatische Survivin-Färbung. Eine zusätzliche cytoplasmatische Färbung wurde jedoch in 58,8% der Malignome gefunden. In den bisher vorliegenden Studien wurde insgesamt über niedrigere Survivin-Färbungsspiegel bei Prostatakarzinomschnitten von 71% bis 83% berichtet, ohne dass jedoch in jedem Fall zwischen nucleärer und cytoplasmatischer Färbung unterschieden wurde (49, 51, 52, 53).

In unseren TMA-Schnitten konnte ein zusätzlicher cytoplasmatischer Survivinnachweis auch in etwa 40% der nicht-malignen Schnitte, die präkanzeröses wie auch normales Prostatagewebe enthielten, detektiert werden. Dies entspricht auch früher veröffentlichten Ergebnissen auf RNA- und Proteinebene aus kleineren Prostatakarzinomkollektiven (Survivinpositivität im Bereich von 36% bis 59% aller Zellen) (52, 53, 54).

Zudem haben wir eine nucleäre Survivinexpression in 100% der getesteten Prostatanormalgewebe detektiert.

Als mögliche Ursache dieser divergierenden Expressionsergebnisse kommen verschiedene Mechanismen infrage.

Zum einen wäre eine deutlich weniger differentielle Regulation der Survivin-Expression zwischen malignen und normalen Geweben als bisher angenommen möglich. So beschrieben Xing et al. (55) eine Survivin-Expression nicht nur in Prostatakarzinomzellen, sondern auch in prämaligen oder nicht-malignen neuroendokrinen Prostatazellen. Neuroendokrine Zellen der Prostata scheinen zudem die drittgrößte Zellpopulation der Prostata zu darstellen und sind daher eine relevante Subgruppe in der Prostata. Diese Möglichkeit scheint aber nicht nur auf die Prostata begrenzt zu sein, da beispielsweise Gianani et al. (56) ebenfalls eine weniger straffe Regulation der Survivin-Expression in normalem, entzündlichem, prämaligen aber auch maligne transformiertem Kolon nachweisen konnten (57).

Als weitere Möglichkeit der in unserem Kollektiv quantitativ deutlich stärkeren Survivinexpression kämen auch methodische Ursachen infrage, wie beispielsweise die Verwendung verschiedener Antikörper in den einzelnen Studien (39),



verschiedener Konzentrationen und Inkubationszeiten der eingesetzten Antikörper, verschiedener Verfahren bei Lagerung und Bearbeitung der Gewebe (21).

Möglicherweise sind die Unterschiede in den Expressionsanalysen auch mit einem unterschiedlichen Bindeverhalten der jeweils eingesetzten Antikörper mit den einzelnen Survivin-Isoformen erklärbar. Diese sind zwar in ihrer aminoterminalen Primärstruktur weitgehend identisch, unterscheiden sich aber in der carboxyterminalen Domäne (39, 58). Die meisten kommerziell verfügbaren Antikörper binden Epitope in den Aminotermini, wodurch auch Isoformen mitgefärbt werden könnten (59). In der vorliegenden Untersuchung wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper von Thermo Scientific eingesetzt. Er ist gegen ein carboxyterminales Epitop gerichtet und sollte somit nur die wt-Survivin-Isoform erfassen.

#### **4.2 Assoziation von Survivin mit klinisch-pathologischen Parametern**

Obwohl die stärkere, cytoplasmatische Survivinfärbung eindeutig mit Merkmalen von aggressiven Unterformen des Prostatakrebses assoziiert ist, ließ sich keine Korrelation zum biochemischen Krankheitsrezidiv nach radikaler Prostatektomie nachweisen. Diese Ergebnisse werden jedoch auch von Krajewska et al. (51), Kauer et al. (49) und Shariat et al. (52) in ihren Untersuchungen bestätigt.

Tatsächlich konnte bis jetzt erst eine einzige Publikation eine Assoziation von Survivin-Expression und Prognose beim Prostatakarzinom aufzeigen.

Zhang et al. (59) wiesen in einer retrospektiven Korrelationsanalyse nach, dass eine starke nucleäre Survivin-Färbung einen günstigen Prognosefaktor darstellt (verlängertes Gesamtüberleben der 68 untersuchten Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatatumor in der RTOG-8610-Studie).

Die hier vorliegende Arbeit ist die erste, die zudem eine Korrelation zwischen starker cytoplasmatischer Survivin-Färbung und einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit bei Patienten mit lokal begrenzten, fortgeschrittenen Prostata-tumoren zeigt.

Andererseits wiesen aber auch in unserer Studie Patienten mit Tumoren, die lediglich eine nucleäre Survivinfärbung zeigten, ein deutlich verbessertes Gesamtüberleben auf verglichen mit den Patienten, deren Tumore zusätzlich cytoplasmatisches Survivin exprimierten.

Dies deckt sich mit zellsystembasierten *in vitro* Versuchen, in denen gezeigt werden konnte, dass eine künstliche Herabregulation der Survivinexpression durch siRNA (short interfering RNA) zu einem besseren Therapieansprechen in Prostata-



karzinom-Zellen führt (60).

### 4.3 Mögliche pathophysiologische Funktion von Survivin

Die Verbindung von starker cytoplasmatischer Survivin-Expression und verkürzter Überlebenszeit könnte unter Umständen durch die verschiedenen subzellulären Funktionen der Survivin-Isoformen und unterschiedlichen subzellulären Pools erklärt werden. So kann das nucleäre Survivin, das wahrscheinlich in homodimerer Form vorliegt und voraussichtlich nur in dieser Form die Mitose beeinflussen kann, nicht ins Cytoplasma exportiert werden (61, 62). Hierdurch könnte in der vorliegenden Arbeit die hohe Rate nucleärer Färbung erklärt werden. Noch bleibt aber die genaue Funktion des nucleären Survivins unbekannt (27): Die bisher veröffentlichten Daten legen für die nucleäre Form eine Rolle als Angelpunkt in der Regulation der Zellteilung als Stabilisator von Microtubuli im Rahmen der Zielsteuerung des chromosomalen Passagierkomplexes nahe (21, 63, 30). Daher nimmt man an, dass eine kräftige nucleäre Färbung eine hohe Mitoserate repräsentiert (59). In Prostatakarzinomzellen aus unserem Kollektiv gab es jedoch nur einen proportionalen Zusammenhang von cytoplasmatischer Survivinfärbung mit dem Ki67-Proliferationsindex, nucleäres Survivin hingegen korrelierte nicht.

Möglicherweise wird die in verschiedenen Tumoren wie auch dem Prostatakarzinom berichtete, zunächst widersprüchlich erscheinende proliferationsfördernde und -inhibierende Funktion des Survivins durch die verschiedenen Spleißvarianten bedingt (zu Problemen der immunologisch sicheren Unterscheidung siehe 4.2). So findet sich Survivin  $\Delta$ -Ex-3 vorzugsweise im Nucleus, während wt-Survivin und Survivin 2B vorzugsweise im Cytoplasma nachweisbar sind. Survivin  $\Delta$ -Ex-3 könnte durch Bildung von Homodimeren mit reduziertem antiapoptotischen Potential die Wirkung des wt-Survivin abschwächen. Diese Homodimere könnten dann als natürlich vorkommende Antagonisten des wt-Survivin wirken (64, 65). Verschiedene Survivin-Isoformen könnten beispielsweise so miteinander interagieren, und die subzelluläre Verteilung der Isoformen könnte so zur komplexen Regulation von Apoptose und Mitose beitragen.

Eine weitere Ursache für das kürzere Gesamtüberleben von Prostatakarzinompatienten mit starker cytoplasmatischer Survivin-Expression könnte darin begründet sein, dass Survivin mit einem bisher unklaren Mechanismus auch eine Resistenz gegenüber der antiandrogenen Therapie vermittelt (66). Diese Erkenntnis ist insofern von großem Interesse, da der Einsatz von siRNA (Anti-Survivin) die

Empfindlichkeit auf Chemotherapien im Prostatakrebs-Mausmodell erhöht (60). Williams et al. berichten außerdem, dass die Transfektion von Colonkarzinomzellen mit siRNA gegen Survivin das Wachstum der Karzinomzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* inhibieren kann (29).

#### **4.4 Gesamtüberleben vs biochemisches Rezidiv als Endpunkt**

In den bisherigen, großen Arbeiten zu molekularen Prognosemarkern des Prostatakarzinoms wurde nahezu ausschließlich der Zeitpunkt des biochemischen Rezidivs als Endpunkt verwendet. Dies liegt darin begründet, dass Prostatakarzinome im wesentlichen sehr langsam wachsende Karzinome älterer Männer sind (1), die im höheren Alter auch ein höheres Co-Morbiditätsrisiko aufweisen als jüngere Patienten. Daher muss der Endpunkt „Gesamtüberlebenszeit“ sicherlich kritisch hinterfragt werden. Auch in unserem Kollektiv waren 64,7% der 3261 radikal prostatektomierten Patienten älter als 60 Jahre. Laut Bundessterbestatistik („Gesundheit in Deutschland, 2006“. Häufige Todesursachen, Kapitel 1.4.2) nimmt mit zunehmendem Alter der Tod durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen noch vor den Krebserkrankungen eine führende Rolle ein. In der Todesursachenstatistik (Todesfälle je 100 000 Einwohner 2004) findet sich die „bösartige Neubildung der Prostata (C61)“ erst auf Rang 7. Vergleicht man hingegen die Überlebenszeit radikal Prostatektomierter mit dem „watchful waiting“ beim Prostatakarzinom - bei Progress wurden die Patienten allerdings hormontherapiert -, zeigt sich, dass das prostatakarzinomspezifische Überleben verbessert wird. Beim Gesamtüberleben wiederum ließ sich auch nach 10 Jahren Nachbeobachtungszeit kein wesentlicher Überlebensvorteil für die radikal Prostatektomierten nachweisen (67).

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Survivin im Cytoplasma und Zellkern der Prostatakrebszelle immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Eine nucleäre Anfärbung besteht praktisch bei allen Prostatakarzinomen (und vermutlich auch in gesundem Gewebe). Prostatatumore mit einer zusätzlichen cytoplasmatischen Survivinfärbung zeigen ein biologisch aggressives Verhalten, das mit verkürzter Überlebenszeit bei Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie unterzogen haben, assoziiert ist. Survivin stellt in unserem großen Kollektiv jedoch keinen klinisch relevanten prognostischen Marker für ein biochemisches Krebsrezidiv dar. Aufgrund dieser Daten scheint Survivin derzeit keine

herausragende klinisch-praktische Bedeutung beim Prostatakarzinom zu haben.

## **5 Zusammenfassung**

Survivin, ein in Zellproliferation und Angiogenese eingreifendes Protein, kann in einer Vielzahl maligne transformierter Gewebe nachgewiesen werden, während es im Normalgewebe deutlich seltener vorzukommen scheint. Eine verstärkte Survivinexpression scheint größtenteils mit aggressiveren Tumorphänotypen und konsekutiv schlechter Prognose assoziiert zu sein. Beim Prostatakarzinom (PCa) sind jedoch widersprüchliche Daten zur möglichen Funktion Survivins als Biomarker publiziert. Das prostata-spezifische Antigen (PSA) wiederum ist der am besten evaluierte prognostische Biomarker beim PCa. PSA zeigt jedoch eine verminderte Spezifität in der Grauzone von 4-10 ng/ml. Daher können Prostatatumore im Frühstadium eigentlich nur zufällig entdeckt werden. Wegen der fehlenden Tumorspezifität, dem hieraus resultierenden fehlenden Einblick in die Tumorbiologie und den klinischen Verlauf, sind neue Tumormarker dringend notwendig.

Daher sollte, basierend auf der immunhistochemischen Auswertung eines Tissue Microarrays mit Gewebeproben von 3261 radikal prostatektomierten Patienten aus der Urologischen Klinik des UK Eppendorf, für die weitgehend vollständige klinische Verläufe vorlagen, die Bedeutung der Survivinexpression als Biomarker des PCa untersucht werden.

Survivin ist in 99,4% aller PCa-Proben nachzuweisen. Eine alleinige nucleäre Färbung konnte bei 40,3% der Proben detektiert werden, während 58,8% der Gewebe gleichzeitig eine nucleäre und cytoplasmatische Färbung aufwiesen. Der Grad der cytoplasmatischen Färbung korrelierte mit dem Gleason Score, der pathologischen Tumorklassifikation, einer hohen proliferativen Aktivität des Gewebes gemessen am Ki67-Index (alle  $p < 0,0001$ ) sowie einem verkürzten Gesamtüberleben der Patienten ( $p = 0,0143$ ). Es gab jedoch keine Korrelation zwischen Survivin-Färbeintensität und präoperativem PSA-Wert sowie dem biochemischen Krankheitsrezidiv.

Daher lässt sich zusammenfassend sagen, dass Survivin stark in normaler Prostata und PCa exprimiert ist und die cytoplasmatische Färbung auch mit einem biologisch aggressiveren Tumortypus assoziiert ist. Als neuer prognostischer Biomarker für das PCa in Patienten nach radikaler Prostatektomie ist Survivin jedoch nicht ausreichend belastbar.

## 6 Literatur

1. Wolf J, Altwein J. Prostatakarzinom (2004), Springer-Verlag Heidelberg, Berlin 6-8.
2. Hautmann R, Huland H. Urologie (1997), Springer-Verlag Heidelberg, Berlin 230-236.
3. Remmele. Pathologie Vol 5 (1997), Springer-Verlag Heidelberg, Berlin 80-94.
4. Franke M, Kreutzig T. Prostata-Spezifisches Antigen (2001) Dr. T. Kreutzig Verlag 13-25.
5. Heidenreich et al. European Association of Urology 2008.
6. Heidenreich et al. EUR UROL (2008);53:68-80.
7. Börgermann C, Dorn F, vom Schenk M et al. Der Stellenwert der Targeted-Therapie beim Prostatakarzinom. Urologe 2008;47: 1315-1319.
8. Heidenreich A. Therapie des hormonrefraktären Prostatakarzinoms Urologe 2006;45: 1481-1490.
9. Guerin O, Formento P, Lo N C et al. Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. J Cancer Res Clin Oncol 134 (1):51-57.
10. Di Lorenzo G, Figg W D, Fossa S D et al. (2008) Combination of Bevacizumab and Docetaxel in Docetaxel-Pretreated Hormon refractory Prostate Cancer: A Phase II Study. EUR Urol (Epub ahead of print).
11. Dahut W L, Gulley I L, Arlen P M et al. (2004) Randomized phase II trial of Docetaxel plus Thalidomide in androgen-independent prostate cancer. J Clin Oncol 22(13): 2532-2539.
12. Ambrosini G, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med 1997; 3(8): 917-921.
13. Srinivasula S M, Ashwell J W. 2008; Mol Cell 30:123-135.
14. Altieri D C, Marchisio C. Survivin apoptosis, an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. 1999, Lab Invest 79(11) 1327-1333.
15. Altieri D C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. Nat Rev Cancer 3; 46-54, 2003.
16. Altieri D C et al. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. Trends Mol Med 7; 542-547, 2001.
17. Cancer Letters 250; 177-193; 2007.
18. 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.

19. Verdecia M A, Huang H, Dutil et al. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000; (7) 602-608.
20. Badran A, Yoshida A, Ishikawa K et al. Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; (314):902-907.
21. Duffy M, O'Donovan N, Brennan D et al. Survivin: A promising tumor biomarker. *Cancer Letters* 2007(249): 49-60.
22. Johnson M E and Howerth E W. Survivin: a bifunktional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol* 2004; 41:599-607.
23. Mathoka C, Liebmann J, Wenzel M et al. Differential subcellular localization of funktionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 2002b; (9): 1434-1342.
24. Uren A G, Beilharz T, O'Connell M J et al. Role for Yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proc Nat Acad Sci Usa* 1999; (96): 10170-10175.
25. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsch K et al. HBXIP funktions as a cofaktor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* 2003; (22):2729-2740.
26. Dohi T, Okada K, Xia F et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279 (2004) 34087-34090.
27. Altieri D C. New wirings in the survivin networks. *Oncogene* 2008 (27): 6276-6284.
28. Uren A G, Wong L, Pakusch M et al. Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* 10(2000) 1319-1328.
29. Williams N S, Gaynor R B, Scoggin S et al. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 9 (2003) 931-946.
30. Yang D, Wein A, Bishop J M. Cell survival in the absence of survivin. *Proc Nat Acad Sci USA* 101 (2004) 15100-15105.
31. O'Connor D S, Schechner J S, Adida C et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 156 (2000) 393-398.
32. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis during human colorectal carcinogenesis. *Cancer* 91 (2001) 2026-2032.

33. Allen S M, Florell S R, Hanks A N et al. Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. *Cancer Res* 63 (2003) 567-572.
34. Dohi T, Beltrami E, Wall N R et al. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 114 (2004) 1117-1127.
35. Duffy T. Clinical uses of Tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci* 38 (2001) 225-262.
36. Schultz I J, Witjes J A, Swinkels D W et al. Bladder cancer diagnosis and recurrences prognosis: comparison of markers with emphasis on surviving. *Clin Chim Acta* 368 (2006) 20-32.
37. Weikert S, Christoph F, Schrader F et al. Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int J Cancer* 116 (2005) 100-104.
38. Span P N, Sweep F C, Wiegerinck E T et al. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer Patients. *Clin Chem* 50 (2004) 1983-1986.
39. Li F, Yang J, Rammath N et al. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is significant? *Int J Cancer* 114 (2005) 509-512.
40. Rodel C, Haas J, Groth et al. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin is a radioresistance factor. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 55 (2003) 1341-1347.
41. Tran J, Master Z, Yü J L et al. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4349-4354.
42. Johnstone R W, Ruefli A A, Lowe S et al. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108 (2002) 153-164.
43. Zhu N, Gu L, Findley H W et al. An alternatively spliced survivin variant is positively regulated by p53 and sensitizes leukemia cells to chemotherapy. *Onkogene* 23 (2004) 7545-7551.
44. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays for early target evaluation. *Drug Discovery Today: Technologies* Vol No 1 (2004) 41-48.
45. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 3(4) 2003, 89-95.
46. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue Microarrays in Drug Discovery. *Nature Reviews* 2003; 12 Vol 2: 962-969.

47. Köllermann J, Schlomm T, Bang H et al. Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate Cancer. *Eur Urol* (2008), doi: 10.1016 / j.eururo.2008.01.001.
48. Bubendorf L. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* (1999) 59 (4): 803-806.
49. Schlomm T et al. *World J Urology* 2007.
50. Kauer P, Kallakury B S, Sheehan C E et al. Survivin and bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128 (1):39-43.
51. Krajewska M, Krajewski S, Banares S et al. Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9 (13) 4914-4925.
52. Shariat S, Lotan Y, Saboorian H et al. Survivin expression is associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma. *Cancer* 2004; 100 (4): 751-757.
53. Kishi H, Igawa M, Kikuno N et al. Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *J Urol* 2004; 171 (5): 1855-1860.
54. Koike H, Sekine Y, Kamiya M et al. Gene expression of survivin and its spliced isoforms associated with proliferation and aggressive phenotypes of prostate cancer. *Urology* 2008; 72 (6): 1229-1233.
55. Xing N, Qian J, Bostwick G et al. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate* 2001; 48(1): 7-15.
56. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic and neoplastic colonic mucosa. *Human Pathology* 2001; 32(1): 119-125.
57. Frost M, Jarboe E A, Orlicky et al. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(5): 738-744.
58. Li F, Ling X. Survivin study: an update of "what is the next wave"? *J Cell Physiol* 2006; 208(3):476-486.
59. Zhang M, Ho A, Hammond E et al. Prognostic value of survivin in locally advanced prostate cancer: Study based on RTOG 8610. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(4): 1033-1042.
60. Shen J, Liu J, Long Y et al. Knockdown of survivin expression by siRNAs enhances chemosensitivity of prostate cancer cells and attenuates its tumorigenicity. *Acta Biochimica et Biophysica Siniaca* 2009; 41 (3):233-230.

61. Engelsma D, Rodriguez J A, Fish A et al. Homodimerization antagonizes nuclear export of Survivin. *Traffic* 2007; 8 (11) 1495-1502.
62. Connell C M, Colnaghi R, Wheatley S P et al. Nuclear survivin has reduced stability and is not cytoprotective. *J Biol Chem* 2008; 283 (6): 3289-3296.
63. Vader G, Kauw J J, Medema R H et al. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep* 2006; 7(1): 85-92.
64. Noton E A, Colnaghi R, Tate S et al. Molecular analysis of survivin isoforms; Evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 1286-1295.
65. Krieg A, Mahotka C, Krieg T et al. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: First clues to a role of survivin 2B in tumor progression. *Br J cancer* 2002; 86: 737-743.
66. Zhang M, Latham D, Delaney et al. Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* 2005; (24/15): 2474-2482.
67. Holmberg L, Bill Axelson A, Helgesen F et al. A randomized trial comparing rad. prostatectomy with watchful waiting in early prostate cancer. *N. Engl J Med* 2002, 12 sept; 347: 781-789.  
Bill Axelson A et al. *JNCI* aug. 2008 100 (16: 1123).



## **7 Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. G. Sauter danke ich für die spontane Überlassung des Dissertationsthemas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. J.K. Hennigs danke ich für die Begleitung bei der vorliegenden Arbeit.

## **8 Tabellarischer Lebenslauf**

### **Rolf Löser**

Lehmwohldstraße 10, 25524 Itzehoe

#### **Persönliche Angaben**

Geburtsort: Karlshafen/Weser 15.11.1943

Familienstand: verheiratet

#### **Schulbildung**

01.09.1949 - 03.03.1964 Grundschule/ Gymnasium

(Schadow Schule, Berlin Zehlendorf)

#### **Abschluss**

Allgemeine Hochschulreife

#### **Studium**

Humanmedizin an der Freien Universität Berlin

SS 1964 - SS 1970

Staatsexamen 14.08.1970

#### **Medizinalassistenten-Zeit**

01.10.1970 - 30.09.1971

#### **Approbation als Arzt**

30.09.1971

#### **Assistenzarzt-Zeit**

01.10.1971 - 28.02.1976

Städtisches Krankenhaus Berlin-Moabit, Urologische Abt.

#### **Facharzt für Urologie**

01.10.1975

#### **OA für Urologie**

01.03.1976 - 30.11.2008

KKH Itzehoe, Robert-Koch-Str. 2, 25524 Itzehoe

#### **Rentner**

01.12.2008 - lfd.

## **9 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Rolf Löser