

JOANNA URBANIAK

Ekspresja surwiwiny w nowotworach ludzkich

Expression of Survivin in Human Cancer

Katedra i Zakład Analityki Medycznej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Surwiwina, inhibitor apoptozy, ma zdolność regulacji cyklu komórkowego i apoptotycznej śmierci komórek. Surwiwina podlega ekspresji w czasie rozwoju płodowego oraz w większości tkanek nowotworowych, ale nie występuje w zróżnicowanych komórkach dojrzałych organizmów. Chociaż surwiwina jest zwykle wykrywana w cytoplazmie komórkowej i jej obecność jest związana ze złym rokowaniem w chorobie nowotworowej, istnieją doniesienia, że jądrowa lokalizacja surwiwiny może wskazywać na pomyślny przebieg choroby. Zidentyfikowano dwa warianty surwiwiny: surwiwinę-2B i surwiwinę-ΔEx3, które różnią się właściwościami antyapoptotycznymi. Prowadzone są intensywne prace mające określić przydatność surwiwiny jako potencjalnego markera diagnostycznego i prognostycznego w chorobach nowotworowych oraz jako celu w terapii nowotworów (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 6, 1037–1046).

Słowa kluczowe: surwiwina, nowotwór, marker prognostyczny.

Abstract

Survivin, an inhibitor of apoptosis, has been reported to be capable of regulating of cell cycle and apoptotic cell death. Survivin is expressed during fetal development and in most cancer tissues but not in differentiated normal adult tissues. Although survivin is usually detected in cytoplasmic region and associated with poor prognosis in cancer, nuclear localisation, indicative of favorable prognosis, has also been reported. Two alternative splice variants of survivin have been identified. Survivin-2B and survivin-ΔEx3 differ in their antiapoptotic properties. Extensive research has been conducted, aimed to determined usefulness survivin as a potentially diagnostic and prognostic marker of cancer and target for cancer therapies (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 6, 1037–1046).

Key words: survivin, carcinoma, prognostic marker.

Surwiwina (IAP-4), białko hamujące apoptozę, została odkryta przez Ambrosini et al. [1] w 1997 r. Należy do rodziny inhibitorów apoptozy (IAP – inhibitor of apoptosis protein), do której obecnie zalicza się osiem białek ssaków: XIAP, HIAP1, HIAP2, NAIP, surwiwinę, liwinę, Ts-IAP, apollon [2].

Dla IAP jest charakterystyczna obecność co najmniej jednej domeny BIR (baculovirus IAP repeat). Przez domenę BIR IAP w sposób bezpośredni i odwracalny wiąże się z aktywnymi formami kaspaz, enzymów proteolitycznych uczestniczących w programowanej śmierci komórki.

Niektóre z inhibitorów apoptozy (XIAP, HIAP1, HIAP2) mają na C-końcu cząsteczki domenę RING z motywem palca cynkowego, o aktywności ligazy ubikwityny. Domena RING bierze udział w ubikwitylacji białek przeznaczonych do

usunięcia przez proteosomy. Proces ten prowadzi do usuwania kaspaz (działanie antyapoptotyczne) oraz samych inhibitorów apoptozy (działanie proapoptotyczne).

Część inhibitorów apoptozy (XIAP, HIAP1, HIAP2) jest związana z receptorami błonowymi (np. receptor dla TNF) i uczestniczy w przekazywaniu sygnałów na drodze receptorowej.

Surwiwina i XIAP wykazują ponadto zdolność regulacji podziału komórkowego [2].

Szczególne zainteresowanie surwiwiną wynika z faktu, że białko to podlega ekspresji w komórkach nowotworowych i tkankach prawidłowych stale różnicujących się, nie stwierdza się natomiast jego obecności w nieproliferujących komórkach prawidłowych tkanek. Występowanie surwiwiny w komórkach niemal wszystkich typów nowotwo-

rów powoduje, że surwiwina bywa określana jako uniwersalny antygen nowotworowy. Surwiwina jest opisywana także jako potencjalny marker diagnostyczny i prognostyczny. Wydaje się dobrym celem w immunoterapii lub terapii genowej chorób nowotworowych.

Struktura cząsteczkowa surwiwiny

Surwiwina jest białkiem o masie cząsteczkowej około 16,5 kDa, zbudowanym ze 142 aminokwasów. W odróżnieniu od innych członków rodziny IAP zawiera tylko jedną domenę BIR, na N-końcu. Nie zawiera motywu palca cynkowego na C-końcu [1]. Badania krystalograficzne rekombinowanej surwiwiny wykazały dimeryczny układ monomerów, który jest utrzymywany głównie dzięki oddziaływaniom hydrofobowym [3].

Gen surwiwiny ludzkiej jest zlokalizowany na chromosomie 17q25. Transkrypcja genu prowadzi do powstania mRNA surwiwiny o długości 431 pz [1]. W komórkach raka nerki ludzkiej [4] oraz raka żołądka [5] odkryto dwa dodatkowe typy transkryptów określanych jako: surwiwina-2B (500 pz, 165 aminokwasów) oraz surwiwina-ΔEx3 (329 pz, 137 aminokwasów). Warianty surwiwiny wykazują wyraźne różnice strukturalne domeny BIR. Surwiwina 2B zawiera dodatkowy fragment intronu 2 (ekson 2B = 69 pz). Wariant 2B ma ograniczone w porównaniu do surwiwiny zdolności do hamowania apoptozy. Delecja fragmentu eksonu 3 (118 pz) powoduje przesunięcie ramki odczytu i utworzenie dodatkowej sekwencji aminokwasów na C-końcu. Zmiana ta nie wpływa na właściwości

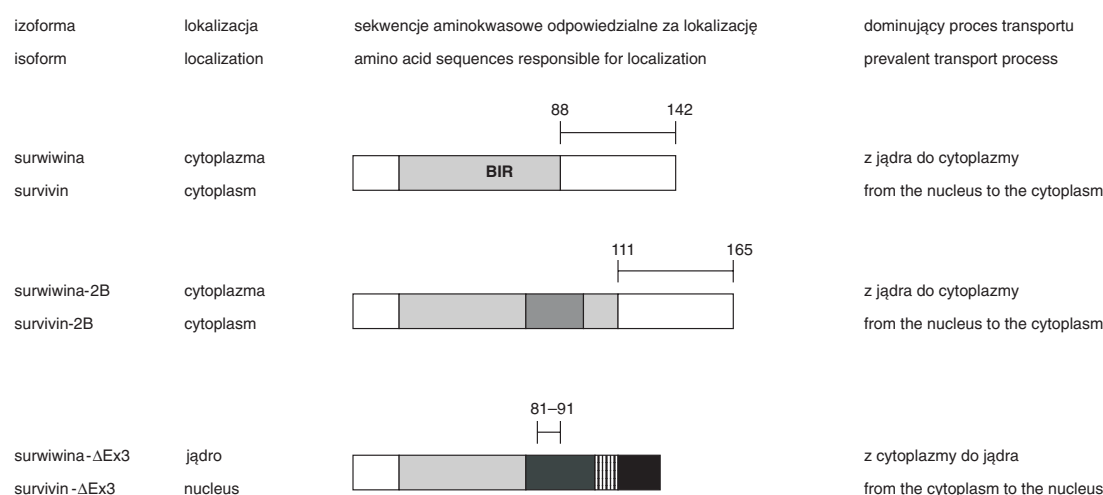
antyapoptotyczne białka. Formą dominującą pod względem ilościowym jest surwiwina [4].

Lokalizacja w komórce i mechanizm działania surwiwiny

Surwiwina oraz surwiwina-2B występują głównie w cytoplazmie komórkowej, natomiast izoforma ΔEx3 w jądrze komórkowym [6]. Lokalizacja izoform surwiwiny jest regulowana przez aktywny import do jądra komórki oraz eksport do cytoplazmy zależny od receptora eksportu CRM-1. Zdolność do przemieszczania się białek między kompartmentami komórki zależy od budowy domeny C-końcowej (ryc. 1). Za kumulację izoformy ΔEx3 w jądrze jest odpowiedzialna prawdopodobnie różnica w sekwencji aminokwasów domeny C-końcowej [7].

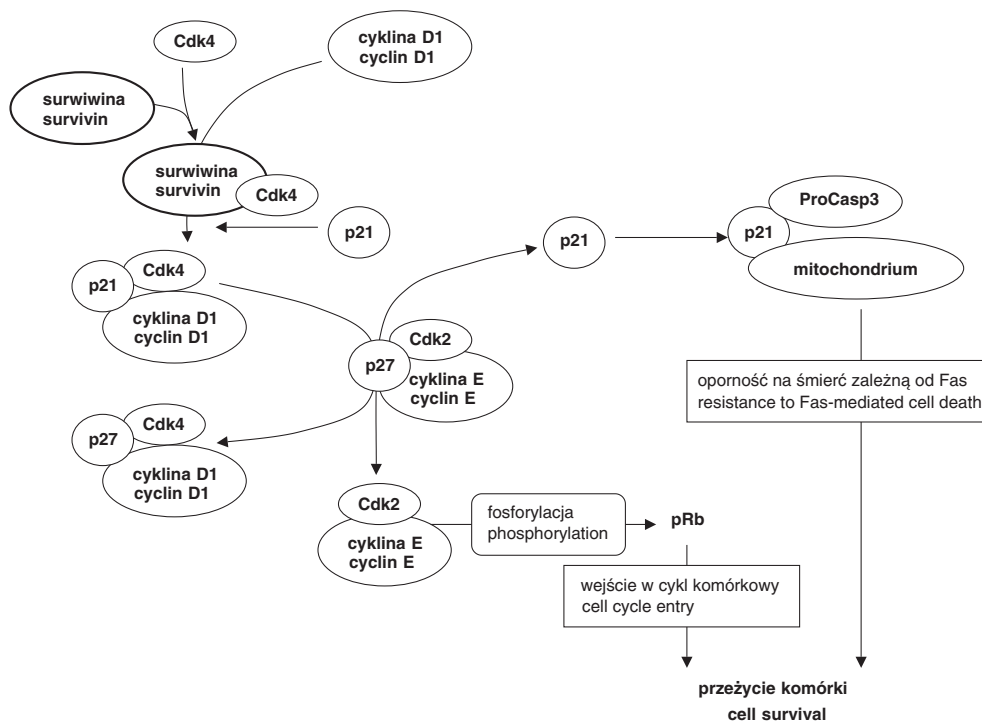
Surwiwina podlega ekspresji w sposób zależny od fazy cyklu komórkowego z maksimum w punkcie kontrolnym G2/M. Na początku mitozy swoje wiąże się z γ-tubulami wrzeczona kariokinezy [8]. Nie stwierdzono natomiast kolokalizacji surwiwiny-ΔEx3 i surwiwiny-2B z mikrotubulami lub centromerami w czasie mitozy [6].

Przemieszczenie surwiwiny do jądra zależy m.in. od stymulacji receptora śmierci Fas lub proliferacji komórkowej. W jądrze surwiwina wiąże się z kinazą zależną od cyklu komórkowego 4 (Cdk4). Utworzenie tego połączenia powoduje rozpoczęcie cyklu komórkowego. Łączenie z Cdk4 prowadzi do aktywacji kompleksu Cdk2/cykliny E i fosforylacji białka Rb. Skutkiem tego procesu



Ryc. 1. Różnice lokalizacji, budowy, transportu izoform surwiwiny między jądrem i cytoplazmą (wg Rodriquez et al., 2002)

Fig. 1. Differential localization, structure and nuclear-cytoplasmic transport of survivin isoforms (adapted from Rodriquez et al., 2002)



Ryc. 2. Model wpływu surwiwiny na przeżycie komórki (według Suzuki et al., 2000).

Po stymulacji Fas, translokacja surwiwiny do jądra przyspiesza tworzenie kompleksu Cdk4/cyklina D1, w wyniku czego dochodzi do fosforylacji Rb. W czasie wchodzenia w cykl komórkowy jest wydzielany p21, który przemieszcza się do mitochondrium, gdzie łączy się z prokaspazą 3. Surwiwina wpływa na przeżycie komórki przez inicjowanie wejścia w cykl komórkowy oraz unieczynnienie kaspazy 3

Fig. 2. Model of survivin-induced cell survival (adapted from Suzuki et al., 2000).

Upon stimulation of Fas, nuclear translocation of survivin accelerates Cdk4/Cyclin D1 complex, resulting phosphorylation of Rb. During this cell cycle entry pathway, p21 is released and translocates to mitochondria, and mitochondrial p21 interacts with procaspase 3. Survivin initiates cell cycle entry and caspase 3 inactivation for cell survival

jest przejście do fazy S cyklu komórkowego. Równocześnie tworzenie połączenia surwiwina/Cdk4 uwalnia inhibitor p21 z kompleksu Cdk4/p21. Wydzielony p21 przemieszcza się do mitochondrium i wiąże się z prokaspazą 3, co powoduje blokowanie ścieżki śmierci zależnej od Fas (ryc. 2) [9].

Funkcje antyapoptotyczne surwiwiny wynikają ze zdolności do bezpośredniego blokowania aktywności enzymu efektorowego kaspazy 7 oraz aktywacji prokaspazy 9 [10]. Początkowe doniesienia o bezpośrednim hamowaniu także kaspazy 3 [10] nasuwają wątpliwości. Analiza struktury przestrzennej IAP-4 raczej wyklucza bezpośrednie hamowanie kaspazy 3 [3]. Blokowanie aktywności enzymu efektorowego powoduje, że surwiwina może hamować fazę egzekucyjną apoptozy indukowanej zarówno przez oddziaływanie ligandów z receptorem śmierci w błonie komórki, jak i wydzielanie cytochromu c z mitochondrium.

Dane i nowe hipotezy dotyczące mechanizmu działania oraz roli surwiwiny w cyklu komórkowym, a także aktywnej śmierci komórki przedstawił Altieri w pracy poglądowej opublikowanej w ubiegłym roku [11].

Występowanie surwiwiny

Surwiwina podlega ekspresji w czasie rozwoju zarodkowego. Jej obecność wykazano w tkankach płodowych mózgu, nerek, wątroby, płuc, trzustki i przewodu pokarmowego [1]. W dojrzałym organizmie występuje w śladowych ilościach w tkankach o wysokim potencjale proliferacyjnym, podlegających stałemu odnawianiu się, m.in. w komórkach grasicy, łożyska [1], endometrium [12]. W prawidłowych tkankach ostatecznie zróżnicowanych u osób dorosłych nie stwierdza się obecności białka i mRNA surwiwiny.

W licznych, niezależnych badaniach obserwowano wybiórczą nadekspresję IAP-4, w porównaniu do zdrowych tkanek, w komórkach nowotworowych. Za pomocą technik hybrydyzacji *in situ*, immunocytochemii i RT-PCR wykazano obecność surwiwiny w najczęściej występujących nowotworach ludzkich oraz w wielu transformowanych liniach komórkowych [5, 13–35]. Przegląd ważniejszych prac klinicznych, wraz z odsetkiem przypadków surwiwino-dodatnich w chorobach nowotworowych przedstawiono w tabeli 1. Obser-

Tabela 1. Występowanie surwiwiny w tkankach różnych nowotworów**Table 1.** Expression of survivin in various carcinoma tissues

Nowotwór (Cancer)	Ekspresja (Expression) (%)	Metoda (Method)	Piśmiennictwo (References)
Rak żołądka (Gastric cancer)	60/174 (34) 30/30 (100)	IC RT-PCR	Lu et al., 1998 Krieg et al., 2002
Rak jelita grubego (Colorectal cancer)	91/171 (53) (53) (62)	IC IC RT-PCR	Kawasaki et al., 1998 Sarela et al., 2000 Sarela et al., 2000
Rak wątroby (Hepatocellular carcinoma)	21/51 (41) 35/47 (74)	RT-PCR IC	Ikeguchi et al., 2002 Moon et al., 2003
Gruzołakorak trzustki (Pancreatic adenocarcinoma)	46/52 (88)	IC	Sarela et al., 2002
Rak piersi (Breast cancer)	118/167 (71) 176/293 (60) 72/106 (68)	IC IC RT-PCR	Tanaka et al., 2000 Kennedy et al., 2003 O'Driscoll et al., 2003
Niedrobnokomórkowy rak płuca (Non-small cell lung cancer)	71/83 (86)	RT-PCR	Monzo et al., 1999
Zwojak zarodkowy współczulny (Neuroblastoma)	34/72 (47)	IC, WB	Addida et al., 1998
Nowotwory układu nerwowego (Tumors of the nervous system)	97/112 (87)	IC	Sasaki et al., 2002
Glejak wielopostaciowy (Glioblastoma multiforme)	31/39 (79)	IC	Das et al., 2002
Rozlany chłoniak z dużych komórek B (Diffuse large B-cell lymphoma)	134/222 (60)	IC	Adida et al., 2000
Ostra białaczka mieloblastyczna (Acute myeloblastic leukaemia)	75/125 (60) 17/31 (55)	IC RT-PCR	Adida et al., 2000 Mori et al., 2002
Ostra białaczka limfoblastyczna (Acute lymphoblastic leukaemia)	11/16 (69)	RT-PCR	Mori et al., 2002
Rak pęcherza moczowego (Bladder cancer)	28/36 (78) 3/30 (30)	IC RT-PCR	Swana et al., 1999 Gazzaniga et al., 2003
Rak nerki (Renal carcinoma)	57/57 (100)	RT-PCR	Mahotka et al., 2002
Kostniakomięsak (Osteosarcoma)	23/40 (60)	IC	Trieb et al., 2003
Rak płaskonabłonkowy jamy ustnej (Oral squamous cell carcinoma)	91/110 (83)	IC	Muzio et al., 2003
Gruzołakorak gruczołu krokowego (Prostatic adenocarcinoma)	113/138 (82)	IC	Kaur et al., 2004

IC – immunohistochemia, WB – immunoblotting, RT-PCR – polimerazowa reakcja łańcuchowa połączona z odwrotną transkrypcją.

IC – immunohistochemistry, WB – western blotting, RT-PCR – reverse transcription-polymerase chain reaction.

wowane znaczne różnice częstości występowania surwiwiny w komórkach guzów nowotworowych (30–100%) mogą być wynikiem właściwości samego guza. Bardziej prawdopodobne jest jednak to, że różnice są skutkiem różnorodności metod detekcji surwiwiny: wykrywanie swoistego mRNA lub białka, stosowanie przeciwciał monoklonalnych lub poliklonalnych o różnej swoistości i awidności.

Udział surwiwiny w onkogenezie

Jedną z postulowanych przyczyn progresji choroby nowotworowej są zaburzenia równowagi między proliferacją i śmiercią komórek, spowodowane nieprawidłowym przebiegiem procesu apoptozy. Programowana śmierć komórki jest mechanizmem chroniącym przed nowotworzeniem dzięki usuwaniu komórek z uszkodzeniami DNA. Ha-

Tabela 2. Korelacja między występowaniem surwiwiny oraz bcl-2, p53 i indeksem apoptotycznym (AI) w różnych typach nowotworów**Table 2.** Correlation between expression of survivin and bcl-2, p53 protein, apoptotic index (AI) in various carcinoma

Nowotwór (Cancer)	Korelacja surwiwiny (Correlation of survivin and)			Piśmiennictwo (References)
	bcl-2	p53	AI	
Rak żołądka (Gastric cancer)	tak	tak	ujemna	Lu et al., 1997
Zwojak zarodkowy współczulny (Neuroblastoma)	tak	–	–	Addida et al., 1998
Rak jelita grubego (Colorectal cancer)	tak tak	brak tak	ujemna ujemna	Kawasaki et al., 1998 Sarela et al., 2000
Rak piersi (Breast cancer)	tak	brak	ujemna	Tanaka et al., 2000
Gruczolakorak trzustki (Pancreatic adenocarcinoma)	brak	tak	dodatnia	Sarela et al., 2002
Rozlany chłoniak z dużych komórek B (Diffuse large B-cell lymphoma)	tak	brak	ujemna	Adida et al., 2000
Glejak wielopostaciowy (Glioblastoma multiforme)	tak	–	ujemna	Das et al., 2002
Gruczolakorak gruczołu krokowego (Prostatic adenocarcinoma)	brak	–	–	Kaur et al., 2004

– nie badano.

– not determined.

mowanie apoptozy przedłuża czas życia komórek ze zmianami genetycznymi, co może prowadzić do kumulacji mutacji.

W wielu pracach klinicznych [13, 15, 16, 19, 20, 24, 26, 27, 35] badano związek między obecnością surwiwiny a stopniem nasilenia apoptozy wyrażonym jako indeks apoptotyczny (AI) oraz występowaniem białek proapoptotycznych (p53) i antyapoptotycznych (bcl-2) w tkance guza. Przegląd wyników badań przedstawiono w tabeli 2. W przypadku większości typów nowotworów wykazano korelację między występowaniem surwiwiny i obniżeniem indeksu apoptotycznego oraz ekspresją bcl-2. Współzależność między występowaniem surwiwiny i p53 pozostaje niejasna.

Marker prognostyczny

Autorami pierwszego doniesienia o wartości prognostycznej surwiwiny byli Adida et al. [24]. Badając chorych na *neuroblastoma* wykazali, że obecność surwiwiny jest istotnie niższa w grupie pacjentów z korzystnym rokowniczo typem histologicznym guza. Silna reaktywność komórek nowotworowych z przeciwciałami antysurwiwina była związana z bardziej agresywnym przebiegiem choroby.

Wyników tych obserwacji nie potwierdzają badania Sasaki et al. [25], którzy wykrywali sur-

wiwinę metodą immunocytochemii w 112 przypadkach pierwotnych guzów układu nerwowego. Autorzy stwierdzili obecność białka w większości tkanek nowotworowych. Wysoką reaktywność wykazywały także komórki oponiaków i łagodnych nowotworów nerwów obwodowych.

Swana et al. [30] wykrywali surwiwinę metodą immunocytochemii w tkankach 36 chorych z nawracającym rakiem pęcherza moczowego w I, II, III stadium zaawansowania choroby. Obecność surwiwiny stwierdzono w 100% przypadków III stadium, w 90% II stadium i 65% I stadium. Średni czas, po którym nastąpił nawrót choroby u pacjentów z I stopniem zaawansowania choroby był istotnie krótszy u chorych surwiwino-dodatnich w porównaniu do surwiwino-ujemnych. Wyniki te wskazują, że na podstawie obecności surwiwiny w komórkach guza można wyróżnić grupę pacjentów wysokiego ryzyka, którzy wymagają częstych kontroli i/lub bardziej agresywnych metod terapii.

Odmienne wyniki uzyskali Gazzaniga et al. [31]. Badali ekspresję surwiwiny u chorych na raka pęcherza moczowego metodą RT-PCR. Transkrypty znaleziono tylko w 9 z 30 (30%) badanych tkanek nowotworowych. Dodatni wynik na obecność mRNA surwiwiny nie pozwalał przewidzieć nawrotu choroby w czasie 4-letniej obserwacji pacjentów, był więc pozbawiony wartości prognostycznej.

Badanie obecności surwiwiny może być wykorzystane do wczesnego wykrywania przerzutów czerniaka do węzłów chłonnych. Gradilone et al. [36] ustalili związek między obecnością transkryptów surwiwiny w komórkach najbliższych węzłów chłonnych a progresją choroby i śmiercią pacjentów. Brak ekspresji surwiwiny identyfikuje pacjentów, których mediana czasu wolnego od choroby wynosi około 53 miesiące.

W badaniach Kamihiry et al. [37] wykrywano mRNA surwiwiny u chorych na białaczkę T-komórkową dorosłych. We wszystkich 33 przypadkach ostrej białaczki z komórek T stwierdzono ekspresję surwiwiny o różnym nasileniu. Pacjentów podzielono na grupy o niskiej i wysokiej ekspresji tego inhibitora apoptozy. Autorzy wykazali, że wysoka ekspresja surwiwiny jest niezależnym czynnikiem niepomyślnego rokowania. Mediana czasu przeżycia pacjentów w grupach z wysokim i niskim poziomem transkryptów wynosiła, odpowiednio 6,4 oraz 18 miesięcy.

Obecność surwiwiny wiązano z niepomyślnym przebiegiem choroby także w przypadkach raka jelita grubego [16], wątroby [17], niedrobnokomórkowego płuca [23], rozlanego chłoniaka z dużych komórek B [27], ostrej białaczki nieлимfoblastycznej [28], chłoniaka z komórek płaszczka [40], raka płaskonabłonkowego jamy ustnej [34].

W wielu przeprowadzonych pracach klinicznych nie udało się jednak znaleźć zależności między ekspresją surwiwiny a rozmiarem i typem histologicznym guza, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, stopniem zaawansowania choroby, nawrotami choroby, czasem przeżycia pacjentów po zakończeniu leczenia lub długością czasu wolnego od wznowienia procesu chorobowego [13, 15, 19, 20, 22, 35, 38].

Występowanie i rola wariantów surwiwiny

Bardzo ciekawym zagadnieniem jest występowanie wariantów surwiwiny o różnej budowie domeny BIR i działaniu antyapoptotycznym odkrytych w 1999 r. [4]. Mahotka et al. kontynuowali badania, próbując określić rolę surwiwiny, surwiwiny-ΔEx3 i surwiwiny-2B w progresji raka żołądka [5] i nerki [32]. Badania z konieczności były prowadzone wyłącznie metodami biologii molekularnej, ze względu na brak swoistych przeciwciał rozpoznających poszczególne formy.

W 30 badanych przypadkach raka żołądka, niezależnie od typu histologicznego, stopnia zaawansowania choroby i stopnia zróżnicowania, były obecne transkrypty wszystkich trzech wariantów. Formą dominującą była surwiwina. Przy za-

stosowaniu półilościowej techniki RT-PCR było możliwe porównanie poziomu ekspresji trzech wariantów w zależności od stopnia zaawansowania choroby. W grupie pacjentów w stadium I i II, w porównaniu do pacjentów w stadium III i IV, poziom ekspresji surwiwiny i surwiwiny-ΔEx3 był zbliżony. W zaawansowanych stadiach choroby spada natomiast istotnie poziom surwiwiny-2B. Zmniejszenie liczby transkryptów surwiwiny-2B, może z jednej strony powodować wzrost poziomu form aktywnych (tzn. surwiwiny, surwiwiny-ΔEx3), ze względu na pochodzenie ze wspólnego prekursorowego hnRNA, z drugiej strony – wariant o znacznie obniżonej funkcji antyapoptotycznej może spełniać rolę naturalnego antagonisty form aktywnych [5].

Zbliżone wyniki uzyskano w badaniach 57 przypadków raka nerki. Przy zastosowaniu ilościowej techniki RT-PCR porównywano poziom transkryptów trzech wariantów surwiwiny w tkankach nowotworowych pochodzących od pacjentów w różnych stadiach choroby. Poziom ekspresji surwiwiny i surwiwiny-ΔEx3 u pacjentów był podobny niezależnie od stadium zaawansowania choroby. Stwierdzono natomiast istotnie niższy stosunek mRNA surwiwiny-2B do surwiwiny w późnych stadiach choroby [32].

O'Driscoll et al. [22] badali ekspresję trzech wariantów surwiwiny w biopsjach 106 chorych na raka piersi. Transkrypty surwiwiny, surwiwiny-ΔEx3 i surwiwiny-2B znaleziono w odpowiednio 68, 54,7, 9,4% tkanek nowotworowych. Nie wykazano związku między obecnością któregośkolwiek z wariantów a przebiegiem choroby. Według autorów pracy wykrywanie mRNA surwiwiny nie ma znaczenia prognostycznego w raku piersi.

Występowanie przeciwciał antysurwiwina

We krwi niektórych chorych na raka płuca (11 z 51) i okrężnicy (4 z 49) zaobserwowano występowanie przeciwciał antysurwiwina. U osób z przeciwciałami antysurwiwina nie znaleziono przeciwciał anty-p53 i odwrotnie. U 2 osób obecność przeciwciał wyprzedzała o kilkanaście miesięcy wystąpienie objawów klinicznych choroby. Możliwe, że przeciwciała antysurwiwina mogą być wykrywane, podobnie jak anty-p53, na kilka lat przed objawami klinicznymi choroby [39]. Do tej pory nie prowadzono jednak badań, które pozwoliłyby określić rzeczywiste znaczenie przeciwciał antysurwiwina w diagnostyce, monitorowaniu leczenia pacjentów z chorobą nowotworową.

Rozbieżność wyników i opinii

Opinie o możliwościach wykorzystania surwiwiny jako markera diagnostycznego i/lub prognostycznego są często niejednoznaczne, a nawet sprzeczne. Znaczne rozbieżności wynikają przede wszystkim z różnorodności stosowanych metod badawczych, ale także różnej liczebności i stanu pacjentów klasyfikowanych do badanych grup, sposobu interpretacji wyników. Dobrym przykładem mogą być wyniki badań chorych na raka piersi.

Tanaka et al. [20] przedstawili wyniki badań 167 chorych na raka piersi w stadium I–III. U 71% stwierdzono dodatnią cytoplazmatyczną reakcję komórek nowotworowych z monoklonalnymi przeciwciałami antysurwiwina. Nie odnotowano reakcji przeciwciał z prawidłowymi komórkami podścieliska czy odczynowymi limfocytami. Obecność surwiwiny ujemnie korelowała z nasileniem apoptozy wyrażonej przez indeks apoptotyczny. Odsetek pacjentek, które przeżyły 5 lat od chwili zabiegu wynosił odpowiednio 87% w przypadku guzów surwiwino-dodatnich i 96% w przypadku guzów surwiwino-ujemnych. Analiza Kaplana-Meiera nie wykazała istotnych różnic czasu przeżycia pacjentek w obydwu grupach ($p = 0,108$). Mimo to autorzy pracy uznali surwiwinę za zły niezależny czynnik rokowniczy.

Nasu et al. [38] wykrywali mRNA surwiwiny w tkankach raka piersi oraz tkankach nienowotworowych otaczających guz metodą RT-PCR. Obserwowali ekspresję surwiwiny w blisko 90% tkanek guzów (37 z 41), a także śladową ekspresję w 23% przypadków tkanek otaczających (3 z 13). Występowanie surwiwiny nie było związane ze stanem klinicznym pacjentek i przebiegiem choroby. Autorzy uznali surwiwinę za dobry marker diagnostyczny raka piersi.

Kennedy et al. [21] badali 293 przypadki pierwotnego inwazyjnego raka piersi. Zastosowali w badaniach immunocytochemicznych dwa rodzaje przeciwciał poliklonalnych. Komórki guzów wykazywały trzy typy reakcji: jądrową, cytoplazmatyczną i mieszaną. W 60% wszystkich tkanek obserwowano reakcję dodatnią: w 31% reakcję wyłącznie jądrową, w 13% tylko cytoplazmatyczną, w 16% – obydwie. Autorzy nie znaleźli związku między występowaniem surwiwiny w komórkach nowotworowych a wiekiem pacjentek, rozmiarami guza, stopniem histologicznym, stanem węzłów chłonnych czy obecnością receptorów estrogenowych. Wykazali natomiast, że jądrowy typ reakcji na obecność surwiwiny jest niezależnym czynnikiem dobrego rokowania, co wyraża się dłuższym czasem wolnym od wznowy i dłuż-

szym całkowitym czasem przeżycia chorych w porównaniu do przypadków z ekspresją cytoplazmatyczną.

To, że jądrowy typ reakcji może być czynnikiem pomyślnego rokowania wykazali również Trieb et al. [33] u chorych na kostniakomięsaka. Surwiwinę wykryto w cytoplazmie komórek 23 badanych tkanek oraz w jądrze 20 z 40 badanych tkanek nowotworowych. Obecność surwiwiny w cytoplazmie komórki nie była powiązana z przebiegiem choroby, w przeciwieństwie do reakcji jądrowej dodatnio skorelowanej z czasem przeżycia pacjentów.

Jądrowa ekspresja surwiwiny nie w każdym typie nowotworu stanowi czynnik korzystny. W badaniach Martinez et al. [40] u chorych na chłoniaka z komórek płaszczka jądrowa ekspresja surwiwiny była związana z istotnie krótszym czasem przeżycia pacjentów.

Możliwości terapii genowej

Występowanie surwiwiny w komórkach nowotworowych i brak ekspresji w prawidłowych komórkach zdrowych tkanek może pozwolić na selektywną eliminację lub zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych przez blokowanie ekspresji genu bez efektów ubocznych dla zdrowych tkanek. W badaniach prowadzonych obecnie przede wszystkim na komórkach linii nowotworowych w warunkach *in vitro* wykorzystuje się najczęściej strategię tripleksu lub antysensu.

Strategia tripleksu prowadzi do hamowania procesu transkrypcji surwiwiny przez tworzenie stabilnych, trójniciowych połączeń między syntetycznymi oligonukleotydami i dwuniciową helisą DNA. Tę metodę stosowali Shen et al. [41]. Tworzenie stabilnych tripleksów odpowiednich oligodeoksynukleotydów i DNA w komórkach raka płuca linii A549 powodowało istotne zmniejszenie stężenia białka surwiwiny i indukcję apoptozy komórek nowotworowych.

Możliwe jest również niszczenie mRNA surwiwiny przez rybozomy, które przecinając mRNA w swoistych miejscach niszczą transkrypt, uniemożliwiając rozpoczęcie procesu syntezy białka. Przykładem takich doświadczeń są prace Pennati et al. [42]. Sekwencje rybozomu wprowadzano do komórek *melanoma* linii JR8 i M14 przez transfekcję komórek z użyciem wektora pRc/CMV. Komórki, w których potwierdzono ekspresję rybozomu, wykazywały istotnie niższe stężenia białka surwiwiny w porównaniu do komórek pierwotnych. Modyfikacja powodowała istotny wzrost wrażliwości komórek na promieniowanie γ . Po-

nadto zmodyfikowana linia JR8 charakteryzowała się wyższym odsetkiem komórek podlegających apoptozie pod wpływem promieniowania w porównaniu do linii niepoddanej modyfikacji genetycznej.

Strategia antysensu zakłada syntezę oligonukleotydów o sekwencji komplementarnej do krytycznych dla translacji obszarów mRNA surwiwiny, które wiążąc się z fragmentami mRNA zapobiegają rozpoczęciu procesu syntezy białka. Tu et al. [43] przygotowali plazmidy zawierające swoiste oligonukleotydy antysensowne do wybranych fragmentów mRNA surwiwiny i wprowadzili je do komórek raka żołądka linii BCG-823 i MKN-45. W zmodyfikowanych komórkach obydwu linii obserwowano spadek poziomu białka surwiwiny o ponad 90%. Komórki były również bardziej podatne na działanie czynników proapoptotycznych (cisplatyna i 5-fluorouracyl) w porównaniu do komórek pierwotnych. Stwierdzono w nich również obecność zjawisk charakterystycznych dla tzw. katastrofy mitotycznej. Autorzy wykorzystali pierwotną i zmodyfikowaną linię BCG-823 w badaniach *in vivo*, wywołując nowotworzenie w organizmach myszy. U zwierząt, którym wstrzyknięto ko-

mórki modyfikowane obserwowano mniejsze rozmiary guza i znacznie wolniejszy jego wzrost. Było to związane ze zmniejszeniem ekspresji surwiwiny w komórkach guza *in vivo* i spadkiem proliferacji komórek nowotworowych. Skutkiem blokowania ekspresji surwiwiny było również hamowanie procesu neowaskularyzacji guza.

W ciągu 7 lat od odkrycia nowego inhibitora apoptozy nastąpił postęp w badaniach nad występowaniem, mechanizmem działania i udziałem surwiwiny w procesie apoptozy i regulacji cyklu komórkowego. Wyniki badań klinicznych dostarczają jednak wielu sprzecznych danych, które nie pozwalają jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, czy surwiwina może być uznana za marker diagnostyczny lub prognostyczny. Porównywanie wyników prac różnych grup badawczych jest obecnie niemożliwe ze względu na znaczne różnice metod stosowanych do wykrywania lub ilościowego oznaczania poziomu transkryptów lub białka surwiwiny. Obiecujące są natomiast wyniki badań nad opracowaniem podstaw nowej strategii leczenia chorób nowotworowych opartej na wybiórczym blokowaniu ekspresji surwiwiny.

Piśmiennictwo

- [1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997, 3, 917–921.
- [2] Holcik M: The IAP proteins. *Trends Genet* 2002, 18, 537–538.
- [3] Verdecia MA, Huang H-K, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP: Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000, 7, 602–608.
- [4] Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD: Survivin-ΔEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* 1999, 59, 6097–6102.
- [5] Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabasch H, Muller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD: Expression of different variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumor progression. *Br J Cancer* 2002, 86, 737–743.
- [6] Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD: Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death Differ* 2002, 9, 1334–1342.
- [7] Rodriguez JA, Span SW, Ferreira CGM, Krut FAE, Giaccone G: CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein survivin. *Exp Cell Res* 2002, 275, 44–53.
- [8] Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998, 396, 580–584.
- [9] 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* 2000, 19, 1346–1353.
- [10] 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.
- [11] Altieri DC: Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003, 22, 8581–8589.
- [12] Konno R, Yamakawa H, Utusunomiya 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.
- [13] Lu CD, Altieri DC, 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.
- [14] Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Müller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD: 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.
- [15] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N: Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998, 58, 5071–5074.
- [16] Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ: Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000, 46, 645–650.

- [17] 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.* 2002, 11, 33–40.
- [18] Moon WS, Tarnawski AS: Nuclear translocation of survivin in hepatocellular carcinoma: a key to cancer cell growth? *Hum Pathol* 2003, 34, 1119–1126.
- [19] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ: Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002, 86, 886–892.
- [20] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N: Expression of survivin and its relation to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000, 6, 127–134.
- [21] Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M: Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003, 88, 1077–1083.
- [22] O'Driscoll L, Linehan R, Kennedy S, Cronin D, Purcell R, Glynn SW, McDermott ED, Hill AJ, O'Higgins N, 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.
- [23] Monzo M, Rosell R, Felipe E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A: A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognostic marker in non small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999, 17, 2100–2104.
- [24] Addida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC: Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998, 351, 882–883.
- [25] Sasaki T, Lopes MBS, Hankins GR, Helm GA: Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 2002, 104, 105–109.
- [26] Das A, Tan W-L, Teo J, Smith DR: Expression of survivin in primary glioblastomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002, 128, 302–306.
- [27] Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Domret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ: Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000, 96, 1921–1925.
- [28] Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC, Dombret H: Expression and prognostic significance of survivin in *de novo* acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000, 111, 196–203.
- [29] Mori A, Wada H, Nishimura Y, Okamoto T, Takemoto Y, Kakishita E: Expression of antiapoptosis gene survivin in human leukemia. *Int J Haematol* 2002, 75, 161–165.
- [30] Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC: Tumor content of the apoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999, 341, 452–453.
- [31] Gazzaniga P, Gradilone A, Giuliani L, Gandini O, Silvestri I, Nofroni I, Saccani G, Frati L, Agliano AM: 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.
- [32] Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD: Distinct *in vivo* expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 2002, 100, 30–36.
- [33] Trieb K, Lehner R, Stulnig T, Sulzbacher I, Shroyer KR: Survivin expression in human osteosarcoma is a marker for survival. *Eur J Surg Oncol* 2003, 29, 379–382.
- [34] Muzzio LL, Pannone G, Staibanos S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA, Procaccini M, Ferrari F, De-Rosa G, Altieri DC: Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003, 89, 2244–2248.
- [35] Kaur P, Kallakury BVS, Sheehan CE, Fisher HAG, Kaufman RP, Ross JS: Survivin and bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004, 128, 39–43.
- [36] Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, Bottoni U, Innocenzi D, Calvieri S, Scuderi N, Frati L, Agliano AM: Survivin, bcl-2, bax, bcl-x gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients. *J Clin Oncol* 2003, 21, 306–312.
- [37] 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.
- [38] Nasu S, Yagihashi A, Izawa A, Saito K, Asanuma K, Nakamura M, Kobayashi D, Okazaki M, Watanabe N: Survivin mRNA expression in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2002, 22, 1839–1843.
- [39] Rohayem J, Diestelkoetter P, Weigle B, Oehmichen A, Schmitz M, Mehlhorn J, Conrad K, Rieber EP: Antibody response to the tumor-associated inhibitor of apoptosis protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* 2000, 60, 1815–1817.
- [40] 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.
- [41] Shen C, Buck A, Polat B, Schmid-Kotsas A, Matuschek C, Gross HJ, Bachem M, Reske SN: Triplex-forming oligodeoxynucleotides targeting survivin inhibit proliferation and induce apoptosis of human lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2003, 10, 403–410.
- [42] Pennati M, Binda M, Colela G, Folini M, Citti L, Villa R, Daidone MG, Zaffaroni N: Radiosensitization of human melanoma cells by ribozyme-mediated inhibition of survivin expression. *J Invest Dermatol* 2003, 120, 648–654.
- [43] Tu S-P, Jiang XH, Lin MCM, Cui JT, Yang Y, Lum CT, Zou B, Zhu YB, Jiang SH, Wong WM, Chan AO-O, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong C-Y: Suppression of survivin expression inhibits *in vivo* tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res* 2003, 63, 7724–7732.

Adres do korespondencji:

Joanna Urbaniak
Katedra i Zakład Analityki Medycznej AM
Wybrzeże L. Pasteura 2
50-367 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.01.2004 r.

Po recenzji: 24.05.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 26.05.2004 r.

Received: 13.01.2004

Revised: 24.05.2004

Accepted: 26.05.2004