

Patologi Klinisk cytologi

1

Prostatacancer, upptäckt-prognos. Från mikroskopi till molekyllär gradering.

Christer Busch (1)
Avd f patologi, UAS (1).

Den randomiserade skandinaviska studien av utfallet efter total prostatektomi vid lokaliserad prostatacancer SPCG4 visar att ca 70% inte hade berörts av sin sjukdom efter 10 års uppföljning. En multidisciplinär grupp i Uppsala försöker att finna bättre metoder att identifiera dem som behöver behandlas och vilka som kan följas utan radikal terapi med låg risk för metastasering och död.

I. Förbättring och standardisering av biopsistrategierna:
Vi har fokuserat på preoperativ bestämning av:

1. Tumörens utbredning dvs volym och stadium.
2. Tumörens histologiska malignitetsgrad
3. Tumörens molekyllära malignitetsgrad

II. Identifiering av molekyllära markörer för: 1. Att upptäcka prostatacancer

2. Att bestämma tumörens malignitetsgrad

1. Preoperativa biopsier underskattar tumörstorlek och grad
 2. Övergången Gleason grad 3-->4 är prognostiskt mycket viktig, bl a ökar proliferationen 4 ggr härvid.
 3. Molekyler som relaterar till upprätthållande av cellers polaritet är dysreglerade i denna övergång (CEACAM1, occludin, E-cadherin).
 4. Andra dylika molekyler överuttrycks i prostatacancer liksom de visats göra i ovarialcancer och icke-småcellig lungecancer.
- Konklusioner:

*det behövs förbättringar av möjligheterna att före behandlingsbeslut bättre bestämma grad och stadium.

*Multidisciplinärt samarbete mellan urologer, kliniska kemister, radiologer och molekyllära patologer skall uppmuntras och utvecklas.

* man måste fokusera på att finna metoder att identifiera den elakaste delen av tumören och ta prov från den.

* vi måste lära oss att bättre förstå den molekyllära grunden till förändringen av malignitetsgraden GG 3 till GG4

Patologi Klinisk cytologi

2

TGF- β 1-Induced Activation of ATM and p53 Mediates Apoptosis in a Smad7-Dependent Manner

Shouthing Zhang (2), Maria Ekman (2), Noopur Thakur (2), Shizhong Bu (2), Susanne Grimsby (2), Carl-Henrik Heldin (3), Marene Landström (1)
Genetik Patologi UAS (1).LICR (2).Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden (3).

ATM, a DNA-damage sensitive kinase and p53, are frequently inactivated in a variety of cancers as they together with γ -H2AX are critical guardians against DNA damage. Here, we report of a functional cross-talk between the cytokine TGF- β 1 and p53, leading to apoptosis of epithelial cells, involving Smad7, a TGF- β 1 target gene, p38 MAP kinase, and ATM. Using ectopic expression of p53, siRNA for Smad7, p38 β , and γ -H2AX, deficient cells and specific inhibitors, we show that TGF- β 1 induces apoptosis via ATM and p53 in epithelial cells. Intriguingly, Smad7 act as a scaffold protein to promote functional interactions between p38, ATM and p53 upon TGF- β 1 treatment, facilitating their activation. Smad7 colocalizes with γ -H2AX in DNA damage foci and was required for proper cell cycle checkpoints to prevent genetic instability. Our data imply that Smad7 plays a crucial role upstream of ATM and p53 to protect the genome from insults evoked by extracellular stress.

Our data suggests that Smad7 expression in prostate cancer cells might be

useful to analyze as a novel biomarker for tumor progression and response to radiation or treatment with cytotoxic drugs.

Patologi Klinisk cytologi

3

Molecular Pathology as guidance for EGFR inhibitor therapy in lung cancer?

Patrick Micke (1), Johan Botling (1)
Inst. för genetik och patologi, Dag Hammarskjöldsv. 20, 752 37 Uppsala (1).

The introduction of effective EGF-receptor (EGFR) inhibitors into clinical practice has lead to promising novel treatment options for several solid cancer types. In patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) single-agent erlotinib (Roche) can significantly prolong survival and is approved for 2nd-line treatment after chemotherapy. However, only a fraction of patients benefits from this costly treatment in terms of objective response, symptom improvement and survival. Consequently, molecular markers have been extensively evaluated to predict therapy response. This includes EGFR status by EGFR immunohistochemistry, FISH based EGFR gene copy analysis, EGFR mutation evaluation, but also analyses of down stream signals like k-ras mutations or AKT phosphorylation. It is still controversy which marker has the best predictive power. Based on current studies EGFR- and k-ras-mutation status, as well as EGFR gene copy number seem to qualify best for this purpose.

The presentation will summarise the available knowledge about molecular markers and the correlation to benefit from treatment with EGFR inhibitors. Special focus will be on the description of different methods used for analyses, requirements for material selection, and classical pitfalls connected with molecular analysis of clinical samples. Finally the experience and the current practise of the molecular pathology unit from the Uppsala university hospital will be presented.

Patologi Klinisk cytologi

4

Morfologiska studier av Langerhanska öar transplanterade intraportalt till diabetiska patienter

Mansour Naghibi (1), Erik Larsson (1)
Inst. genetik och patologi, Rudbecklaboratoriet 75185 Uppsala (1).

Sedan ett antal år tillbaka transplanteras Langerhanska öar till utvalda patienter för att behandla och förhoppningsvis bota diabetes. I nuläget har inom det nordiska nätverket (under ledning av prof. Olle Korsgren) ca. 100 ö-transplantationer utförts. Det finns nu samlat mycket erfarenhet rörande det kliniska förloppet hos dessa patienter, men förvånansvärt lite är känt vad om händer med öarna i den nya omgivningen i levern. Med anledning av detta har vi inlett systematiska morfologiska studier avseende histopatologiska och immunhistokemiska karakteristika hos transplanterade öar.

Frågeställning:
Vad händer med öarna, blir de kvar i kärlen eller integreras de i levervävnaden?
Sker en revaskularisering av dem? Hur påverkas hormonproduktion?
Bildas amyloid?

Vi har studerat transplanterade öar i levern hos en avliden patient vilken erhållit öar vid 3-tillfällen.
Patienten var en 50-år gammal man som avled i hjärtattack.

Levervävnad tillvaratogs och formalinfixerades i samband med obduktionen. Öarna identifierades via rutinhistologi.
Förekomst av följande polypeptidhormon studerades immunhistokemiskt: chromogranin, insulin, glukagon, synaptofucin, ghrelin, vip och somatostatin.

Vidare lokaliserades inflammatoriska celler med markörer för B och T celler samt makrofager. Komplementdeponeringar undersöktes med antikroppar mot C4d, C3 och C3A. Nybildade kärl identifierades med kända antikroppar mot endotelceller. De morfologiska fynden kommer att redovisas samt hypoteser rörande fyndens betydelse vid ö-transplantationer kommer att diskuteras. Betydelse: En ökad kunskap om de transplanterade öarna kommer säkerligen att vara av betydelse för hur de skall förbehandlas och administreras i samband med transplantation.

Patologi Klinisk cytologi

5

A protein expression atlas based on cell lines and automated image analysis

Sara Strömberg (2), Anna Asplund (2), Fredrik Pontén (1)
Avd. för Patologi och Cytologi, Uppsala Universitet (1).Inst. för Genetik och Patologi, Rudbecklaboratoriet, Uppsala Universitet (2).

The Swedish Human Protein Atlas project is set to generate expression data for a multitude of normal and cancer tissues using tissue microarrays and immunohistochemistry. The aim is to use an antibody-based proteomics approach for exploration of the entire human proteome, which will be publicly available as high-resolution images of immunohistochemically stained tissues along with annotations of protein expression through the Human Protein Atlas (www.proteinatlas.com). With the aim to also include expression data on a selection of well-characterized in vitro cultured cell lines in the protein atlas, a high-throughput strategy using IHC on a recently developed cell microarray (CMA) was employed. To enhance the throughput, a novel, automated image-analysis application (TMAX) was developed, which automatically recognizes cells, measures several features describing the immunohistochemistry staining intensity and counts the fraction of stained cells. The resulting IHC expression data on 47 frequently used cell lines and 12 cell samples is displayed in a Cell Atlas in the current version of the protein atlas, as a complement to protein profiles of normal and cancer tissue. In October 2007 a new release of the Protein Atlas was launched, displaying more than 1.8 million images and data for approximately 3000 antibodies for both tissues and cell lines. In addition, a new feature visualizing subcellular localization was introduced through confocal images of immunofluorescence staining in a limited set of cell lines. Although the protein profile content of the protein atlas so far only constitute a subset of the human proteome, the available expression data constitute a valuable resource to define phenotypical properties and relationships between cells and tissues as well as to support the discovery of novel biomarkers. Since cell lines are a widely used research tool in biology and medicine, the access to global protein profiles of a large cell line collection, will enhance opportunities for basic biological and medical research.

Patologi Klinisk cytologi

6

HPA - En satsning på att kartlägga de mänskliga proteinerna

Caroline Kampf (1), Fredrik Pontén (1)
Institutionen för genetik och patologi, Rudbecklaboratoriet, Uppsala universitet, Uppsala (1).

Kartläggningen av det mänskliga genomet har öppnat möjligheten att på ett systematiskt sätt undersöka de mänskliga proteinerna och deras roll inom olika processer i kroppen. The Human Protein Atlas program (HPA) startade 2003 och dess främsta mål är att kartlägga de mänskliga proteinernas uttryck ffa i normal och cancervävnad. Denna kartläggning görs genom att använda antikropps-baserad proteomik. Produktionen av specifika antikroppar kombineras med immunhistokemi och vävnadsmikroarrayer.

Unika delar av proteiner, Protein epitope signature tags (PrESTar), designas baserat på det mänskliga genomet. Dessa PrESTar fungerar sedan som antigen för att producera polyklonala antikroppar. Vid efterföljande affinitetsrening av dessa antikroppar genereras sk monospecifika antikroppar. Antikropparna kvalitetskontrolleras genom att använda proteinarrayer samt Western blotanalyser. Över 700 vävnadsprover analyseras för varje antikroppsinfärgning. Dessa infärgningar digitaliseras sedan för att snabbare och enklare kunna analysera resultatet samt publicera detta i en publik protein atlas (www.proteinatlas.org).

Patologi Klinisk cytologi

7

Samband mellan den lätta kedjans struktur och inlagringsmönster vid systemisk AL-amyloidosis

Stina Enqvist (3), Knut Sletten (1), Fred Stevens (2), Ulf Hellman (4), Per Westermark (3)
Biotechnologiseret, Oslo, Norge (1).Center for Mechanistic Biology and Biotechnology, Argonne National Laboratory, Argonne, USA (2).Inst genetik och patologi, Uppsala universitet, 75185 Uppsala (3).Ludwiginstitutet, BMC, 75263 Uppsala (4).

Amyloidosis orsakas av att normalt lösliga proteiner lagras in i olika vävnader och organ som olösliga trådformade aggregat. Det finns idag mer än 25 beskrivna proteiner som på detta sätt orsakar allvarliga sjukdomar som Alzheimers, typ-2 diabetes och familjär transtyretinamyloidosis. De kliniska symptomen varierar beroende på vilket protein som inlagras och vilka organ som drabbas. Vid AL-amyloidosis är det amyloidogena proteinet (A) en monoklonal lätt immunoglobulinkedja (L). Det är en allvarlig sjukdom och patienter överlever oftast bara 1-2 år efter diagnos om de inte svarar på behandling. De två typerna av lätt kedja, kappa och lambda, kodas av ett stort antal gener och delas in i subgrupper beroende på sekvenslikhet i de 20 N-terminala aminosyraresterna. Trots att ett stort antal amyloidogena lätta kedjor har sekvenserats har man ännu inte identifierat några med identiska primärstrukturer. Systemisk AL-amyloidosis en heterogen sjukdom, som är svår att diagnostisera då patienterna har stora skillnader i drabbade organ och symptom. I princip har varje patient en egen sjukdom.

Vi syftar till att öka förståelsen för hur de lätta kedjorna lagras in i specifika organ och om detta påverkas av den lätta kedjans aminosyrasekvens. Vi har därför undersökt patienter vilkas AL-proteiner har snarlika proteinsekvenser och jämfört deras inlagringsmönster för att se om enstaka aminosyror kan påverka inlagringarnas vävnadsfördelning. Patienter med AL-protein från två gener (subgrupp kappa1b och kappa3a) analyserades histologiskt och deras AL-proteinsekvenser bestämdes med Edman-teknik och masspektrometri.

Resultaten från kappa 3a-gruppen visar att det fanns många likheter i inlagring, men i kappa 1b gruppen hade patienterna stor variation i vilka organ som var drabbade. Orsakerna till dessa skillnader är ännu okända men vi arbetar nu med att identifiera andra faktorer som kan påverka inlagringen. Sådana kan vara glykosylering och proteolytisk klyvning eftersom AL-proteiner nästan alltid är C-terminalt trunkerade. Resultaten från främst kappa 3a-gruppen talar för att sekvenslikhet är en viktig faktor för vävnadsspecifik inlagring men att också andra variabler är betydelsefulla. Ökad kännedom om vilka dessa faktorer är skulle kunna leda till en mer specifik behandling och därmed skulle fler patienter kunna behandlas framgångsrikt.

Patologi Klinisk cytologi

8

Aggregerat medin som patogenetisk faktor vid thorakalt aortaaneurysm och thorakal aortadissektion

Annika Larsson (3), Siwei Peng (3), Erik Wassberg (2), Pär Gerwins (1), Stefan Thelin (2), Per Westermark (1)
Inst genetik och patologi, Uppsala universitet, 75185 Uppsala (1).Inst kirurgiska vetenskaper, Uppsala universitet, 75185 Uppsala (2).Institutionen för genetik och patologi, Uppsala universitet, 75185 Uppsala (3).

Patogenesen vid thorakalt aortaaneurysm och thorakal aortadissektion, vilka kan leda till aortaruptur, är i stort sett okänd. Amyloidinlagringar, bestående väsentligen av den 50 aminosyrarester långa peptiden medin är mycket prevalent i den proximala delen av aorta. Medin är en liten del av det större proteinet laktadherin, som produceras av kärlväggens glatta muskelceller.

Vi har studerat sambandet mellan aggregerat medin och de två aortasjukdomarna. Aortabiopsier från 27 individer med aneurysm, 10 med dissektion och 29 utan känd aortasjukdom undersöktes med avseende på amyloidmängd i aortas media liksom grad av medin-immunoreaktivitet i samma lager. Effekten av aggregerat medin på glatta muskelcellers viabilitet mättes in vitro liksom deras uttryck av gelatinaser.

Mängden amyloid var signifikant lägre vid aneurysm och dissektion (0.63 ± 0.13 och 0.36 ± 0.24 amyloidpartiklar per mm^2) jämfört med kontrollmaterialet (2.37 ± 0.58). Medinimmunoreaktivitet utan amyloid fanns däremot i högre mängd i sjukdomsgrupperna. Aggregerat medin utövade en toxisk effekt på glatta muskelceller in vitro, vilka också visade högre uttryck av gelatinaser.

Senare års amyloidforskning indikerar att oligomera, prefibrillära aggregat har större toxisk effekt än mogen amyloid på celler i deras närhet. Våra fynd talar för att aggregerat medin, som ännu inte bildat amyloidfibriller, är skadligt för aortas glatta muskelceller dels genom att inducera celldöd och dels genom att ge ökat uttryck av enzymer, som kan degradera kollagen och elastin. På detta sätt kan medin vara en tidigare okänd, viktig patogenetisk faktor för uppkomst av thorakalt aortaaneurysm och thorakal dissektion.

Patologi Klinisk cytologi

9 Utryck av humana endogena retrovirus (HERV) proteiner i normal och sjuklig vävnad.

Erik Larsson (1)
Inst. genetik och patologi, Rudbecklaboratoriet 75185 Uppsala (1).

Nästan 10% av det humana genomet är endogena retrovirussekvenser. Dessa klassificeras i olika grupper, beroende hur de är besläktade med kända exogena retrovirus. Det är tidigare känt att vissa human endogena retrovirus (HERV) är transkriberade och även i vissa fall bildar proteiner. Man vet att de framför allt är aktiva i organ involverade i reproduktion såsom moderkaka, ovarier, testis, binjurar m.fl. Vidare har några retrovirusproteiner kopplats till viktiga fysiologiska funktioner såsom cellfusion (bildandet av placenta), immunmodulering mm.

Vi har systematiskt med immunhistokemi studerat proteinuttryck av några HERV; nämligen HERV-W, HERV-R och HERV-K. Detta har gjorts med nya antikroppar framställda inom ramen för proteinprojektet HPR- human proteomic resource (F. Ponten och M. Uhlen).

Våra resultat bekräftar de studier som gjorts på RNA nivå med PCR och Northern blot.

Vissa HERV-proteiner uttrycks såväl organ som cellspecifikt. Detta stödjer hypotesen att de är involverade i viktiga basala mekanismer såsom cellfusion och immunmodulering.
