

Institut für Pathologie
„Rudolf-Virchow-Haus“
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Mitte

Forschungsbericht 2003 - 2005
Auszug aus der Fakultätsdatenbank
FACTScience

Drittmittel-geförderte Projekte
und
Projekte der leistungsabhängig gewährten
universitären Forschungsförderung





Zusammenfassung der wichtigsten Arbeitsgruppen

1	Tumor-Marker / Diagnose und Pathogenese	22 - 33
1.1	Expressions- und Mutationsanalyse von PSMA, PSCA und Ep-CAM im Prostatakarzinom	22
1.2	Untersuchung des humanen ELAV-ähnlichen Proteins HuR und seiner Interaktion mit der COX-2 im Mammakarzinom	23
1.3	Evaluation der Expression diverser Targetproteine in malignen epithelialen Tumoren	24
1.4	Epigenetische Veränderungen humaner Tumoren als neues Diagnostikum	25
1.5	EGF-Rezeptor	26
1.6	Tumor Proteomics	27
1.7	Genexpression im Ovariakarzinom	28
1.8	Untersuchung der Expression der LPAAT-beta und der Auswirkung der LPAAT-beta-Inhibition im humanen Mammakarzinom	29
1.9	Funktionelle Analyse kritischer Kandidatengene in gynäkologischen Tumoren	30
1.10	Modellierung des humanen prä-leukämischen Syndroms	31
1.11	Search and characterization of phenotypically relevant upregulated in ovarian carcinoma genes	32
1.12	Analyse potentieller neuer Tumormarker in Ovariakarzinomen	33
2	Zytostatika-Resistenz	35 - 39
2.1	Vorhersage des Ansprechens auf eine Chemotherapie mit Hilfe von molekularen Signaturen	35
2.2	Proteom und Chemoresistenz	36
2.3	Multitarget Multiribozym	37
2.4	Chemoresistenz beim malignen Melanom	38
2.5	Atypical multidrug resistance of human cancer cells	39
3	Tumorgenetik	41 - 49
3.1	Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens IGFBP-7 in humanen Colon- und Lungenkarzinomen	41



3.2	Funktionelle Charakterisierung des Tumorsuppressorgens GABARAP	42
3.3	Tumorgenetik in der Progression von kolorektalen Karzinomen	43
3.4	p17-Kandidatengene	44
3.5	Identifizierung der genetischen Läsionen auf Chromosom 10 in der Tumorprogression vom Lungenkrebs	45
3.6	Charakterisierung des Tumorsuppressors LAGY	46
3.7	Comparative Genomic Hybridization (CGH) and expression profiling of lung cancer	47
3.8	Funktionelle Analyse des H-REV107-1 Tumorsuppressor Gens	48
3.9	Expression und Regulation des Tumorsuppressor Gens TIG3/H-REV107-2 in Ovarialkarzinomen	49
4	Experimentelle Krebsforschung / Signaltransduktion und genetisches Programm	51 - 62
4.1	Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) im Prostatakarzinom	51
4.2	Ras-abhängige Kontrolle des multifunktionalen Regulators YB-1 in Kolonkarzinomzellen	52
4.3	Einfluss von Ras auf die Histonacetylierung - Identifizierung von transkriptionellen Modulen in Kolonkarzinomen	53
4.4	Zelluläre Resistenz gegenüber onkogener Transformation	54
4.5	Transkriptionelle Determinanten der Progression, Metastasierung und Prognose beim Colonkarzinom	55
4.6	Onkogene Signalketten im Ovarialkarzinom	56
4.7	Modellierung von Signaltransduktion in Säugerzellen am Beispiel der RAS-Signalkaskaden	57
4.8	Modellierung von Signalkaskaden am Beispiel der RAS-Signalkette	58
4.9	Genexpressionsprofile in der malignen Transformation - von der molekularen Signatur zur Genfunktion	59
4.10	Differentiell exprimierte Gene in RAS-Onkogen-transformierten Zellen	60
4.11	Genomweite Expressions- und DNA Methylierungsanalyse von Zielgenen des RAS Onkogens	61
4.12	Funktionelle Analyse konservierter regulatorischer DNA Sequenzen in der Regulation von MEK/ERK Zielgenen	62



5	Diagnostische Pathologie Medizinische Informationsverarbeitung Telepathologie	64 - 68
5.1	Infrarot-navigierte Mikrodissektion zur Klonalitätsdiagnose in soliden Tumoren	64
5.2	Matching histologischer Bilder	65
5.3	Unterschiede in der zervikalen Karzigenese durch HPV 16 und HPV 18-Dysregulation	66
5.4	Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QulP) Diagnostische Molekularpathologie TBC-PCR Ringversuch	67
5.5	Entwicklung und Implementierung eines semantikorientierten Pathologie Retrieval Systems für Lungenerkrankungen	68
6	Medizingeschichte	70 - 73
6.1	Leopoldina Korrespondenz um 1750	70
6.2	Wissensvernetzung und Wissenschaftsorganisation jenseits der Universitäten: Die Leopoldina-Korrespondenz um 1750	71
6.3	Wissenschaftliche Dokumentation der Sammlungsbestände des Berliner Medizinhistorischen Museums	72
6.4	Medizinhistorische Erschließung der Albrecht von Graefe-Sammlung	73
7	Immun- und Entzündungspathologie	75 - 78
7.1	Humorale Immunantwort in der akuten zellulären Leberreaktion	75
7.2	Tumorzellmigration in 3-D Extrazellulär Matrix als Modell der Tumor-Host Interaktion	76
7.3	Prothesen-Infektion	77
7.4	Charakterisierung erkrankungsspezifischer Gene in der akuten und chronischen Lebertransplantatabstoßung	78





1 Tumor-Marker

Diagnose und Pathogenese



1.1. Expressions- und Mutationsanalyse von PSMA, PSCA und Ep-CAM im Prostatakarzinom

In the western world adenocarcinoma of the prostate (CaP) is the most common malignant neoplasia of human males. Treatment for CaP is limited due to our somewhat incomplete understanding of the underlying molecular principles. Prostate specific membrane antigen (PSMA) is expressed on the plasma membrane of normal prostate and in primary and metastatic prostate cancer of humans. Prostate stemcell antigen (PSCA) named for its strong sequence homology to the thymocyte marker stem cell antigen 2, is a cell surface antigen expressed in normal prostate and associated with human and murine prostate cancer. The MK-1 antigen, also termed Ep-CAM, is a membrane glycoprotein that is overexpressed on the majority of tumor cells of epithelial origin. These genes were shown to play a critical role in tumorigenesis and tumor progression in several CaPs. This research project intends to analyse expression profiles of these genes and correlate them with clinical and pathological data with regard to their relevance in prognosis and diagnosis. Furthermore, mutation analysis of all three genes from the analyzed, paraffin-embedded material is planned.

In the western world adenocarcinoma of the prostate (CaP) is the most common malignant neoplasia of human males. Treatment for CaP is limited due to our somewhat incomplete understanding of the underlying molecular principles. Prostate specific membrane antigen (PSMA) is expressed on the plasma membrane of normal prostate and in primary and metastatic prostate cancer of humans. Prostate stemcell antigen (PSCA) named for its strong sequence homology to the thymocyte marker stem cell antigen 2, is a cell surface antigen expressed in normal prostate and associated with human and murine prostate cancer. The MK-1 antigen, also termed Ep-CAM, is a membrane glycoprotein that is overexpressed on the majority of tumor cells of epithelial origin. These genes were shown to play a critical role in tumorigenesis and tumor progression in several CaPs. This research project intends to analyse expression profiles of these genes and correlate them with clinical and pathological data with regard to their relevance in prognosis and diagnosis. Furthermore, mutation analysis of all three genes from the analyzed, paraffin-embedded material is planned.

Projektleitung:

Mick Burkhardt

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie

Tel. 450 536 013

mick.burkhardt@charite.de

Förderinstitution:

Universitäre Forschungsförderung Charité



1.2 Untersuchung des humanen ELAV-ähnlichen Proteins HuR und seiner Interaktion mit der COX-2 im Mammakarzinom

In den letzten Jahren wurde für eine Vielzahl von malignen Tumoren eine vermehrte Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) im Tumorgewebe gezeigt. Nach Vorarbeiten der Antragsteller ist eine erhöhte Expression der COX-2 im Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Denkert et al., 2003). Die Expression der COX-2 wird unter anderem durch die Regulation der mRNA Stabilität gesteuert. Dabei spielt das humane mRNA - stabilisierende Protein HuR eine wichtige Rolle (Dixon et al., 2000; Dixon et al., 2001). Das vorliegende Projekt hat das Ziel, die Expression des humanen Proteins HuR in primären Mammakarzinomen sowie in Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen. Die Expressionsmuster wurden mit der Expression der COX-2 korreliert. In Zellkulturversuchen wurde die Expression und Regulation von HuR mittels Western Blot und RT-PCR sowie die Auswirkungen einer Inhibition von HuR durch RNA Interferenz untersucht.

An increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) has been detected in several types of malignant tumors. In our recent investigations we found that an increased expression of COX-2 in human breast carcinomas is associated with a reduced survival time (Denkert et al., 2003). The expression of COX-2 is partly regulated by modification of the mRNA stability. The human ELAV-like protein HuR is involved in regulation of stability of COX-2 mRNA as well as several other targets (Dixon et al. 2000, Dixon et al., 2001). In this project we investigated the expression and function of HuR in human breast carcinomas as well as breast carcinoma cell lines. The correlation between expression of HuR in tumor tissue and the expression of COX-2 was investigated. In cell culture experiments we studied the expression and regulation of HuR as well as the impact of inhibition of HuR by RNA interference.

Projektleitung:

Dr.med. Carsten Denkert
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536047
carsten.denkert@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Carsten Denkert, Klaus-Jürgen Winzer, Berit-Maria Müller, Wilko Weichert, Sören Pest, Martin Köbel, Glen Kristiansen, Angela Reles, Antje Siegert, Hans Guski, Steffen Hauptmann (2003). *Elevated expression of cyclooxygenase 2 is a negative prognostic factor for disease-free survival and overall survival of patients with breast carcinoma*. Cancer, 2003, 97:2978-2987

Carsten Denkert, Wilko Weichert, Sören Pest, Ines Koch, Dirk Licht, Martin Köbel, Antje Siegert, Angela Reles, Steffen Hauptmann. *Overexpression of the ELAV-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased COX-2 expression*. Cancer Research, 64, 189-195, 2004.

Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. *Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells*. J Clin Invest. 2001 Dec;108(11):1657-65.

Keene JD. *Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):5-7.



1.3 Evaluation der Expression diverser Targetproteine in malignen epithelialen Tumoren

Studien zur Klärung der Funktion von Proteinkaskaden in der Determinierung der Malignität von Tumoren erhellen zunehmend das Zusammenspiel einzelner Regelkreisläufe bei der malignen Transformation von Zellen. Besondere Aufmerksamkeit galt und gilt hier Proteinen, die bei der Proliferation, der Apoptoseregulation, der Adhäsivität, der Migration, der Invasion und der Chemoresistenz von Tumorzellen eine Rolle spielen. Will man nun allerdings diese funktionellen Ergebnisse praktisch nutzbar machen, ist eine genaue Kenntnis der Expression dieser Proteine in der großen Vielzahl von humanen Tumoren vonnöten. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe von Gewebe-Studienkollektiven für die größten Tumorgruppen des Menschen erstellt und hinsichtlich ihrer klinischen Repräsentativität überprüft, indem bekannte prognostische Faktoren der jeweiligen Tumoren auf ihre prognostische Relevanz in den Studienkollektiven getestet wurden. Die Untersuchung der Expression einzelner ausgewählter Proteine, die aufgrund funktioneller Ergebnisse als neue Chemotherapie-Angriffspunkte attraktiv erscheinen, wird nun in diesem Kooperationsprojekt durchgeführt. Ziel ist es zu evaluieren welche Tumoren eine starke Expression der Targetproteine aufweisen, um einen Anhaltspunkt dafür zu erlangen, welche Patientengruppen von einer auf diese Proteine zielenden inhibitorischen Strategie profitieren könnten. Zur Zeit liegt der Schwerpunkt der Analysen auf der NfκappaB-Signalkaskade sowie auf den HDAC-Isoformen.

Functional studies on the role of protein interactions in the determination of malignancy of cells provided a wealth of information on the interaction of different protein cascades in the regulation of proliferative capacity, adhesiveness, migration, invasiveness and resistance against chemotherapeutic treatment of tumour cells. In depth expression analysis of some of these proteins in various cancers and correlation of their expression with other tumour characteristics may provide the translational basis for such approaches in clinical practice. Therefore we created tissue-based study cohorts for the most common tumour entities and tested them for their representativeness by evaluating the significance of known prognostic factors (e.g. tumour stage, tumour grade) in the given study cohorts. Furthermore, expression of selected proteins, which may represent attractive targets for new therapeutic approaches, was tested in tissue of the respective study cohorts. By this strategy one might define patient groups, which may benefit from treatment with chemotherapeutics targeting these proteins. By now, expression analysis focuses on a variety of mitotic kinases, NfκappaB signaling intermediates and HDAC isoforms in different tumour entities.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Manfred Dietel
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536001/536009/536062
Fax 450-536900
manfred.dietel@charite.de

Fördereinrichtung:

Altana Pharma AG

Publikationen:

Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Köbel M, Dietel M, Hauptmann S. *Polo like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma*. Br J Cancer. 2004;90:815-21.
Weichert W, Kristiansen G, Winzer KJ, Schmidt M, Gekeler V, Noske A, Muller BM, Niesporek S, Dietel M, Denkert C. *Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications*. Virchows Arch 2005;446:442-450.
Weichert W, Schmidt M, Jacob J, Gekeler V, Langrehr J, Neuhaus P, Bahra M, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G. *Overexpression of Polo-like kinase 1 is a common and early event in pancreatic cancer*. Pancreatology. 2005;5:259-265.
Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Clin Cancer Res. 1999;5:119-27.
Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies*. Nat Rev Cancer. 2001;1:194-202.

Projektskizze:

[targetvalidierung.pdf](#)



1.4 Epigenetische Veränderungen humaner Tumoren als neues Diagnostikum

Epigenetische Veränderungen finden sich in einer Vielzahl humaner Tumoren und gelten als vielversprechendes Merkmal neuer diagnostischer Techniken. In Kooperation mit der Fa. Epigenomics werden humane Tumoren arraybasiert auf Veränderungen der Methylierungsmuster des Genoms untersucht und mit klinisch-pathologischen Parametern, einschließlich des Patientenüberlebens, korreliert. Dies erfordert die Aufarbeitung geeigneter humaner Gewebe, die sowohl als Gefriermaterial als auch als Paraffinmaterial prozessiert werden, welches gegebenenfalls eine Mikrodissektion zur präzisen morphologischen Charakterisierung einschließt. Die in vorläufigen Analysen beschriebenen Kandidatengene, deren Methylierungsstatus einen diagnostischen, prognostischen oder prädiktiven Wert besitzen, werden mit konventionellen Methoden (PCR) validiert. Von besonderem Interesse ist die Korrelation der Methylierungsdaten mit RNA Expressionsdaten, die bereits vorliegen und auch weiter generiert werden. Im Rahmen dieser Kooperation wurden z. B. PITX2 als prädiktiver Methylierungsmarker des Mammakarzinoms beschrieben und auf Kongressen vorgestellt (ASCO 2004).

Epigenetic changes are found in a variety of human tumors and are considered a promising characteristic for novel diagnostic techniques. In cooperation with Epigenomics, methylation patterns of the genome of tumors are being analysed in an array based fashion and the resultant data is correlated to clinico-pathological data including patient survival times. This requires the processing of appropriate human tissues, that can be processed as frozen or paraffin embedded tissues, which also can necessitate microdissection for precise morphological characterisation. Candidate genes from preliminary studies, for which a diagnostic, prognostic or predictive value could be demonstrated, have to be validated with conventional methods (PCR). Of special interest is the correlation of the methylation data with RNA expression data, that are already available or are still to be generated. In this cooperation, PITX2 could be described as a predictive methylation marker of breast cancer and has been published at the ASCO meeting in 2004.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Manfred Dietel
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536001/536009/536062
Fax 450-536900
manfred.dietel@charite.de

Fördereinrichtung:

Industrie



1.5 EGF-Rezeptor

Der EGF- Rezeptor ist als Mitglied membrangebundener Rezeptoren der sog. erb- Rezeptorfamilie zuzuordnen und wird v.a. auf epithelialen Zellen exprimiert. Über seine ligandeninduzierte (EGF, TGF alpha u.a.) Aktivierung werden intrazytoplasmatische Signalketten (Ras, MAPK and ERK1/2) aktiviert und damit Zellproliferation, -differenzierung reguliert. Epitheliale maligne Tumoren überexprimieren den EGF- Rezeptor, was mit einer deregulierten Proliferation und Differenzierung der Zellen einhergeht. Mittels monoklonaler Antikörper, die spezifisch und mit hoher Affinität an eine extrazelluläre Domäne des Rezeptors binden, kann die Aktivierung dessen blockiert werden. EMD 72000 ist ein von der Firma Merck produzierter humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den EGF- Rezeptor, der bereits in klinischen Studien der Phase II eingesetzt wird. Wir haben einen immunhistologischen Assay entwickelt, mit dem die "therapeutische" EGF- Rezeptorblockade mittels eines zweiten, um die gleiche Bindungsstelle konkurrierenden Antikörpers indirekt dargestellt werden kann. Der Assay wurde an kryofixierten Gewebeproben (Leber, Schleimhaut) einer Cynomolgus- Studie und an drei verschiedenen, in Nacktmäusen etablierten Xenografttumoren validiert. Inzwischen werden mit diesem Assay kryofixierte Haut- und Tumorproben aus verschiedenen klinischen Studien untersucht.

The EGF- receptor as a member of the erb- receptor family is expressed in different epithelial cells. Binding of natural ligands (EGF, TGF- alpha, heregulin) results in activation of ras-, MAPK-, and ERK 1/2 pathways and regulates proliferation and differentiation in normal cells. In epithelial tumors, especially in cancer the EGF- receptor is overexpressed and proliferation and differentiation are deregulated. In this case the EGF- receptor is a target for therapy with monoclonal antibodies to block activation of the receptor. EMD 72000 is a humanized monoclonal antibody, binds on an extracellular site of the EGF- receptor and blocks the receptor activation and down stream pathways. We developed and validated an immunohistochemical assay with a second antibody against the same receptor epitope to detect the EGF- receptor saturation with the potential therapeutic monoclonal antibody. The assay was developed on cryofixed sections of human skin and validated on tissues of a Cynomolgus study and different Xenografttumors. We could demonstrate a total and partial saturation of EGF- receptor by in vivo iv administered EMD 72000. In the meantime cryofixed skin and tumor samples of several clinical studies are investigated.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Manfred Dietel
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536001/536009/536062
Fax 450-536900
manfred.dietel@charite.de

Fördereinrichtung:

Industrie

Publikationen:

Mendelsohn J. *Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition by a Monoclonal Antibody as Anticancer Therapy*. Clin Cancer Res 1997; 3:2703-2707
Bier H. et al. *Clinical trial with escalation doses of the antiepidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72000 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx*. Cancer Chemother Pharmacol 2001; 47: 519-524
Vanhofer U et al. *Phase I Study of the Humanized Antiepidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody EMD 72000 in Patients With Advanced Solid Tumors That Express the Epidermal Growth Factor Receptor*. J Clin Oncol 2004; 22: 175-184



1.6 Tumor Proteomics

In diesem Projekt wurden unterschiedliche gastrointestinale Tumoren (Magen, Kolon, Pankreas) einer vergleichenden Proteomanalyse unterzogen. Dafür wurden Tumorproben mit Normalgewebe des selben Patienten miteinander verglichen. Für die Proteomanalysen wurden zwei unterschiedliche Techniken eingesetzt: 2D-Gelelektrophorese und SELDI. Die in diesem Projekt identifizierten Faktoren werden derzeit hinsichtlich ihrer möglichen Bedeutung für Prognose und Diagnostik von gastrointestinale Tumoren untersucht.

In this project, tumour specimens prepared from different gastrointestinal carcinomas (gastric, colon, pancreatic) were analysed by different proteomic techniques: 2D-gel electrophoresis and SELDI. The proteome profiles of neoplastic cells were compared to the proteomic profiles of normal cells from the same patient. By this approach various factors could be identified that could play a role in the tumour biology of the gastrointestinal carcinomas. Currently, the potential impact of these factors for prognosis and diagnostics of gastrointestinal carcinomas is under investigation.

Projektleitung:

PD. Dr. Hermann Lage
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536045
Fax +49 30 450 536900
hermann.lage@charite.de

Fördereinrichtung:

Europroteome AG

Publikationen:

Ebert, M.P.A., Krüger, S., Fogeron M.-L., Lamer, S., Chen, J., Pross, M., Schulz, H.-U., Lage, H., Heim, S., Roessner, A., Malfertheimer, P., and Röcken, C. (2005) *Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis*. *Proteomics* 5, 1693-1704.

Lage, H. (2003) *Molecular analysis of therapy resistance in gastric cancer*. *Digest. Dis.* 21, 326-338.

Lage, H. (2004) *Proteomics in cancer cell research: an analysis of therapy resistance*. *Pathol. Res. Pract.* 200, 105-117.

Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1999) *Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing*. *Electrophoresis* 20, 2961-2969.

Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M., Celis, J.E., and Lage, H. (2001) *Characterization of the differential protein expression associated with thermoresistance in human gastric carcinoma cell lines*. *Electrophoresis* 22, 2990-3000.

Sinha, P., Poland, J., Kohl, S., Schnölzer, M., Helmbach, H., Hütter, G., Lage, H., and Schadendorf, D. (2003) *Study of the development of chemoresistance in melanoma cell lines using proteome analysis*. *Electrophoresis* 24, 2386-2404.



1.7 Genexpression im Ovarialkarzinom

In diesem Projekt wurden vergleichende Transkriptom Analysen von Ovarialkarzinomzelllinien und Ovarialkarzinomproben durchgeführt. Besonderer Wert wurde dabei auf die Identifizierung von Faktoren gelegt, die eine Bedeutung für das Ansprechen auf eine Chemotherapie zeigen. Sowohl im Zellkulturmodell als auch in den Tumorproben konnte dabei eine herausragende Bedeutung der ABC-Transporter MDR1/P-Glykoprotein (MDR1/P-Gp) und MRP2 nachgewiesen werden. MDR1/P-Gp ist insbesondere für die Resistenz gegenüber Taxanen verantwortlich, MRP2 für Resistenz gegenüber platinhaltigen Zytostatika.

In this project, ovarian carcinoma cell lines as well as specimens obtained from ovarian carcinoma patients were investigated by transcriptome analyses. By this approach, new factors could be identified that are potentially useful for prognosis therapy response of ovarian carcinoma. Both, in ovarian cancer in vitro models and in samples prepared from patient suffering on ovarian carcinoma the ABC-transporters MDR1/P-glycoprotein (MDR1/P-gp) and MRP2 were identified as most important for therapy response. In particular, MDR1/P-gp was of major impact for response to treatment with taxane-based drugs and MRP2 to exposure to platinum-containing antineoplastic agents.

Projektleitung:

PD. Dr. Hermann Lage
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536045
Fax +49 30 450 536900
hermann.lage@charite.de

Fördereinrichtung:

Berliner Krebsgesellschaft e.V.

Publikationen:

Lage, H. (2003) *Drug resistance in breast cancer*. Cancer Ther. 1, 81-92.
Materna, V., Pleger, J., Hoffmann, U., and Lage, H. (2004) *RNA expression of MDR1/P-glycoprotein, DNA-topoisomerase I, and MRP2 in ovarian carcinoma patients: correlation with chemotherapeutic response*. Gynecol. Oncol. 94, 152-160.
Materna, V., Liedert, B., Thomale, J., and Lage, H. (2005) *Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells*. Int. J. Cancer 115, 393-402.
Surowiak, P., Materna, M., Denkert, C., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dietel, M., Zabel, M., and Lage, H. (2006) *Significance of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein coexpression in ovarian cancers*. Cancer Lett., in press
Surowiak, P., Materna, V., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dietel, M., Lage, H., and Zabel, M. (2005) *Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavorable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients*. Virchows Arch. 447, 626-633.



1.8 Untersuchung der Expression der LPAAT-beta und der Auswirkung der LPAAT-beta-Inhibition im humanen Mammakarzinom

In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Zelllinien gezeigt, daß die LPAAT-beta Proliferation und Transformation steigert (Bonham et al., 2003; Bonham et al., 2001). Dadurch erscheint sie als ein potientes neues Zielmolekül für die Chemotherapie maligner Tumoren. Vor kurzem wurden spezifische Inhibitoren der LPAAT-beta entwickelt (Gong et al., 2004 ;Gong et al, 2004). Vorarbeiten der Antragsteller zeigten, daß die LPAAT-beta in Ovarialkarzinomen im Vergleich mit benignen Ovarialtumoren und normalen Ovarien überexprimiert ist. Eine erhöhte LPAAT-beta-Expression fand sich zudem in schlechter differenzierten und größeren Karzinomen. Außerdem war die LPAAT-beta-Expression ein negativer prognostischer Marker für Patienten unter 60 Jahren (Niesporek et al., submitted). Das vorliegende Projekt hat das Ziel, mit Immunhistochemie, Western Blot und RT-PCR die Expression der LPAAT- in primären Mammakarzinomen sowie in Mammakarzinomzelllinien zu untersuchen. In Zellkulturversuchen soll die Auswirkung der LPAAT-beta-Inhibition auf Mammakarzinomzellen mittels RNA-Interferenz und spezifischen LPAAT-beta-Inhibitoren untersucht werden.

LPAAT-beta has been shown to increase proliferation and transformation of several cell types in the last few years (Bonham et al., 2003; Bonham et al., 2001). This makes it an interesting new target for chemotherapeutical intervention in human cancer. Recently, specific inhibitors of LPAAT-beta have been developed (Gong et al., 2004; Gong et al, 2004). In our recent investigations we found an increase of LPAAT-beta expression in ovarian carcinomas as compared to benign ovarian tumors and normal ovaries. LPAAT-beta expression was associated with higher tumor grading and staging. Furthermore, LPAAT-beta expression was a negative prognostic marker in patients younger than 60 years (Niesporek et al., submitted). The aim of this project is to investigate the expression of LPAAT-beta in primary human breast carcinomas as well as in breast cancer cell lines by immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR. In cell culture studies we plan to investigate the impact of LPAAT-beta inhibition on breast cancer cells by treatment with specific LPAAT-beta inhibitors as well as by RNA interference.

Projektleitung:

Dr. med. Silvia Niesporek
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450 536 158
silvia.niesporek@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Niesporek S, Denkert C, Weichert W, et al. *Expression of lysophosphatidic acid acyltransferase-beta (LPAAT-beta) in ovarian carcinoma - correlation with tumor grading and prognosis*. Br J Cancer, submitted
Bonham L, Leung DW, White T, et al. *Lysophosphatidic acid acyltransferase-beta: a novel target for induction of tumour cell apoptosis*. Expert Opin Ther Targets 2003;7(5):643-61
Coon M, Ball A, Pound J, et al. *Inhibition of lysophosphatidic acid acyltransferase beta disrupts proliferative and survival signals in normal cells and induces apoptosis of tumor cells*. Mol Cancer Ther 2003;2:1067-78
Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, et al. *Antitumor activity of lysophosphatidic acid acyltransferase-beta inhibitors, a novel class of agents, in multiple myeloma*. Cancer Res 2003; 63:8428-36



1.9 Funktionelle Analyse kritischer Kandidatengene in gynäkologischen Tumoren

Im Rahmen des Konsortiums "Gynäkologische Tumoren" wurden neue Gene identifiziert, die auf Grund ihres Expressionsmusters als potentielle Onkogene bzw. potentielle Tumorsuppressorgene wirken. Um die kausale Rolle in der Tumorigenese zu überprüfen, wurden funktionelle Studien durchgeführt. Aufgabe in diesem Teilprojekt war es, die onkogene Funktion der Kandidatengene nach Einschleusung in normale Zellen zu überprüfen. Als Parameter für onkogene Aktivität dienen die morphologische Transformation und die Erzeugung ankerunabhängiger Proliferation, die mit der Tumorigenität eng korreliert ist. Die mögliche Funktion als Tumorsuppressorgen wurde in Tumorzellen überprüft. Nach Transfektion des Kandidatengens wurde bestimmt, ob Zellüberleben und ankerunabhängige Proliferation reduziert sind oder ob morphologische Kriterien normaler epithelialer Zellen erzeugt werden. Die Testreihen wurden zum Teil in Multiwell-Platten durchgeführt, um den Durchsatz zu erhöhen. Aufgrund der großen Zahl von Kandidatengenen dauern diese Analysen noch an. Neu hinzugenommen wurden experimentelle Ansätze auf der Grundlage der RNA-Interferenz.

Novel genes identified within the consortium "Gynecological tumors" were classified as putative oncogenes or tumor suppressor genes due to their pattern of expression in normal relative to tumor tissue. To prove any causative role in tumorigenesis, functional assays were performed. We assayed oncogenic functions by incorporation of candidate genes into phenotypically normal cells. Morphological transformation and anchorage independent proliferation are diagnostic of oncogenic activity. The possible role of tumor suppressor genes was assayed in tumor cells. After transfection of the candidate gene, we determined any reduction or loss of cell survival, anchorage-independent proliferation and alterations of transformed morphology. Cellular assays were partially performed in multiwell plates to increase throughput. Due to the high number of candidate genes, the experiments are ongoing. In the meantime, we have also incorporated RNA interference as an efficient tool for assaying gene functions.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Dahl, E. et al. (The Gynecological Cancer Consortium), *Genetic Basis of sporadic gynecological carcinomas: Molecular analysis and validation of 50 candidate genes associated with sporadic breast, ovarian and endometrial cancer*. Progress Report Human Genome Research Project 1999-2002, p. 144-145.

Dahl, E., Sadr-Nabavi, A., Kloppocki, E., Betz, B., Grube, S., Kreuzfeld, R., Himmelfarb, M., Gelling, S., Klaman, I., Hinzmann, B., Kristiansen, G., Grützmann, R., Kuner, R., Petschke, B., Rhiem, K., Wiechen, K., Sers, C., Wiestler, O., Schneider, A., Höfler, H., Nährig, J., Dietel, M., Schäfer, R., Rosenthal, A., Schmutzler, R., Dürst, M., Meindl, A., Niederacher, D. (2005) *Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer*. J Pathol. 205, 21-28.



1.10 Modellierung des humanen prä-leukämischen Syndroms

Das langfristige Ziel dieses Projektes ist es, neue Expressionssysteme und transgene Mäuse zu generieren, um die molekulare Grundlage von Defekten in der Chromosomen-Region 5q31(5q-Syndrom) zu verstehen und neue Therapieansätze zu finden. Mehrere Kandidatengene, welche in der Regulation der Hämatopoese und an leukämischen Prozessen beteiligt sind, konnten in dieser Region durch das von der Europäischen Union geförderte Konsortium identifiziert werden. Das RIL-Gen auf 5q31 wurde von unserer Gruppe erstmals als ein Gen identifiziert, dessen Aktivität durch onkogene Signaltransduktion über RAS-Proteine blockiert wird. Das Produkt ist ein PDZ/LIM-Domänen-Protein und wirkt sehr wahrscheinlich als Adaptor für Signalproteine und Elemente des Zytoskeletts. Seine Rolle in der Wachstumskontrolle legt eine Tumor-Suppressorfunktion nahe.

The long-term goal of this project is to develop novel expression systems and mutant transgenic organisms, in order to gain insight into the role of the chromosome 5q31 region, revealing the functions of genes involved in hematopoiesis and the leukemic process. The RIL gene identified in our group several years ago as a factor down-regulated by oncogenic RAS signaling is a candidate gene located in the critical region on chromosome 5. Ril encodes a PDZ/LIM domain protein and very likely functions as an adapter for signaling molecules and cytoskeletal elements. Its role in growth control suggests a tumor suppressor function.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

European Commission

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Kiess, M., Scharm, A., Aguzzi, A., Hajnal, A., Klemenz, R., Schwarte-Waldhoff, I. and Schäfer, R. (1995) *Expression of ril, a novel LIM domain gene, is down-regulated in HRAS-transformed cells and restored in phenotypic revertants.* *Oncogene* 10, 61-68.

Vallenius, T., Scharm, B., Vesikansa, A., Luukko, K., Schäfer, R. and Mäkelä, T.P. (2004) *The PDZ-LIM protein RIL modulates actin stress fiber turnover and enhances the association of a-actinin with F-actin.* *Experimental Cell Research*, 293, 117-128.

Kamakari S, Roussou A, Jefferson A, Ragoussis I, Anagnou NP. *Structural analysis and expression profile of a novel gene on chromosome 5q23 encoding a Golgi-associated protein with six splice variants, and involved within the 5q deletion of a Ph(-) CML patient.* *Leukemia Research* 29, 17-31 (2005)



1.11 Search and characterization of phenotypically relevant upregulated in ovarian carcinoma genes

For the project we have selected genes usually upregulated in serous type of ovarian adenocarcinoma. SAM analysis of several genome wide screening studies revealed approx. 500 genes commonly upregulated in 53 serous ovarian adenocarcinoma samples compared to 13 normal surface ovarian epithelium probes (Affymetrix array studies). Then we have profiled OVCAR-3, SKOV-3 and normal HOSE cell lines using genome wide platform as well. The result was: 180 genes from primary tumors are also upregulated in both cell lines (OVCAR-3 and SKOV3) representing serous adenocarcinoma. Using RNAi we knocked down 8 genes selected from the list of 180 commonly upregulated targets. Three genes showed dramatic effect on cell growth for both cell lines and in both anchorage-dependent and anchorage-independent (polyHeme) conditions. Another two genes showed no effect. And rest 3 genes showed different effects depending on growth condition and cell line. As negative controls we have used 3 different "scrambled" siRNAs. All growth effects we have shown only with one gene-specific siRNA until now. In the future we would like to extend the number of siRNAs for tested genes to confirm specificity of the cell growth inhibition.

For the project we have selected genes usually upregulated in serous type of ovarian adenocarcinoma. SAM analysis of several genome wide screening studies revealed approx. 500 genes commonly upregulated in 53 serous ovarian adenocarcinoma samples compared to 13 normal surface ovarian epithelium probes (Affymetrix array studies). Then we have profiled OVCAR-3, SKOV-3 and normal HOSE cell lines using genome wide platform as well. The result was: 180 genes from primary tumors are also upregulated in both cell lines (OVCAR-3 and SKOV3) representing serous adenocarcinoma. Using RNAi we knocked down 8 genes selected from the list of 180 commonly upregulated targets. Three genes showed dramatic effect on cell growth for both cell lines and in both anchorage-dependent and anchorage-independent (polyHeme) conditions. Another two genes showed no effect. And rest 3 genes showed different effects depending on growth condition and cell line. As negative controls we have used 3 different "scrambled" siRNAs. All growth effects we have shown only with one gene-specific siRNA until now. In the future we would like to extend the number of siRNAs for tested genes to confirm specificity of the cell growth inhibition.

Projektleitung:

Dr.med. Oleg Tchernitsa
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536809
Fax 450-536909
oleg.tchernitsa@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Tchernitsa OI, Sers C, Zuber J, Hinzmann B, Grips M, Schramme A, Lund P, Schwendel A, Rosenthal, A and Schäfer R *The transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated transformation in ovarian epithelial cells.* Oncogene (2004) 23 4536-55



1.12 Analyse potentieller neuer Tumormarker in Ovarialkarzinomen

Evaluation of overexpressed in serous ovarian adenocarcinoma genes should help in application of targeting gene therapy. In our previous work we have shown significant up-regulation of number of genes as a result of K-ras induced transformation of rat ovarian surface epithelial cells. In this project we have tested expression of five candidate genes in human primary adenocarcinoma samples of the ovary. We show high or moderate expression of HMGA2 gene in 31 from 48 (65%) of serous ovarian cancer samples and in 4 from 5 cell line established from serous ovarian cancer. HMGA2 gene expression was undetectable in normal ovarian epithelium. Transient silencing of HMGA2 gene by means of siRNA resulted in growth suppression of ovarian cancer cells. Stable silencing of HMGA2 using short hairpin (shRNAs) expression DNA vector resulted in significant anchorage-dependent and -independent growth suppression and dramatic morphological changes of Ovar-3, OAW-42 and A27/80 ovarian cancer cell lines. In second part of the project we recovered set of genes, Ras-induced regulation of which depends on high level of HMGA2 protein expression. To estimate the effect of high expression of HMGA2 protein on set of Ras-controlled genes, we performed expression profiling assay with help of Ras signaling target array (RASTA) representing approximately 300 Ras-responseve target genes. Results of present study have revealed role of HMGA2 gene as promising target for gene therapy in ovarian carcinoma.

Evaluation of overexpressed in serous ovarian adenocarcinoma genes should help in application of targeting gene therapy. In our previous work we have shown significant up-regulation of number of genes as a result of K-ras induced transformation of rat ovarian surface epithelial cells. In this project we have tested expression of five candidate genes in human primary adenocarcinoma samples of the ovary. We show high or moderate expression of HMGA2 gene in 31 from 48 (65%) of serous ovarian cancer samples and in 4 from 5 cell line established from serous ovarian cancer. HMGA2 gene expression was undetectable in normal ovarian epithelium. Transient silencing of HMGA2 gene by means of siRNA resulted in growth suppression of ovarian cancer cells. Stable silencing of HMGA2 using short hairpin (shRNAs) expression DNA vector resulted in significant anchorage-dependent and -independent growth suppression and dramatic morphological changes of Ovar-3, OAW-42 and A27/80 ovarian cancer cell lines. In second part of the project we recovered set of genes, Ras-induced regulation of which depends on high level of HMGA2 protein expression. To estimate the effect of high expression of HMGA2 protein on set of Ras-controlled genes, we performed expression profiling assay with help of Ras signaling target array (RASTA) representing approximately 300 Ras-responseve target genes. Results of present study have revealed role of HMGA2 gene as promising target for gene therapy in ovarian carcinoma.

Projektleitung:

Dr. med. Oleg Tchernitsa
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536809
Fax 450-536909
oleg.tchernitsa@charite.de

Fördereinrichtung:

Berliner Krebsgesellschaft e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Sers C, Tchernitsa OI, Zuber J, Diatchenko L, Zhumabayeva B, Desai S, Htun S, Hyder K, Wiechen K, Agoulnik A, Scharff KM, Siebert PD, Schafer R. *Gene expression profiling in RAS oncogene-transformed cell lines and in solid tumors using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays*. Adv Enzyme Regul. 2002;42:63-82. No abstract available. [PubMed - in process] // Petersen S, Heckert C, Rudolf J, Schluns K, Tchernitsa OI, Schafer R, Dietel M, Petersen I. *Gene expression profiling of advanced lung cancer*. Int J Cancer. 2000 May 15;86(4):512-7. // Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schafer R. *A genome-wide survey of RAS transformation targets*. Nat Genet. 2000 Feb;24(2):144-52. // Tchernitsa OI, Zuber J, Sers C, Brinckmann R, Britsch SK, Adams V, Schafer R. *Gene expression profiling of fibroblasts resistant toward oncogene-mediated transformation reveals preferential transcription of negative growth regulators*. Oncogene. 1999 Sep 23;18(39):5448-54.



2

Zytostatika-Resistenz



2.1 Vorhersage des Ansprechens auf eine Chemotherapie mit Hilfe von molekularen Signaturen

Klinische Tests zur Vorhersage des Erfolgs einer Chemotherapie stehen derzeit nicht zur Verfügung und einzelne Marker sind wenig informativ. Ausgehend von der Hypothese, dass Genexpressionsprofile chemo-resistenter Zellen die Therapieantwort vorhersagen können, haben wir Expressionsmuster von 13 verschiedenen Tumorzelllinien und resistenten Derivaten verglichen. Als Microarray-Plattform dienten cDNA Arrays repräsentativ für ca. 30 000 Gene. Die erhaltenen Expressionsprofile wurden in zwei Gruppen eingeteilt, entsprechend der Resistenz gegenüber Daunorubicin/Doxorubicin und Mitoxantron. Die Analyse ergab 79 Gene, welche am besten mit der Daunorubicin-Resistenz und 70 Gene, die mit der Mitoxantron-Resistenz korrelierten. In einem unabhängigen Klassifizierungsexperiment wendeten wir unser Modell auf 44 bereits klinisch charakterisierte Brusttumoren an. Die Gruppe von Patientinnen mit dem Expressionsprofil ähnlich dem für Daunorubicin-sensitive Zellen überlebten länger als die mit dem entsprechenden Resistenzprofil. Wir folgern daraus, dass das an Zellkulturen etablierte, Array-basierte Genmuster eine effiziente Vorhersage für das Ansprechen auf eine Daunorubicin-Monotherapie erlauben.

Clinical tests for predicting cancer chemotherapy response are not available and individual markers have shown little predictive value. We hypothesized that gene expression patterns attributable to chemotherapy resistant cells can predict response and cancer prognosis. We contrasted the expression profiles of 13 different human tumor cell lines of gastric, pancreatic, colon and breast origin and their counterparts resistant to the topoisomerase inhibitors daunorubicin, doxorubicin or mitoxantrone. We interrogated cDNA arrays with 43,000 cDNA clones (~30,000 unique genes) to study the expression pattern of these cell lines. We divided gene expression profiles into two sets: we compared the expression patterns of the daunorubicin/doxorubicin resistant cell lines and the mitoxantrone resistant cell lines independently to the parental cell lines. The analysis revealed 79 genes best correlated with doxorubicin resistance and 70 genes with mitoxantrone resistance. In an independent classification experiment we applied our model of resistance for predicting the sensitivity of 44 previously characterized breast cancer samples. The patient group characterized by the gene expression profile similar to those of doxorubicin-sensitive cell lines exhibited longer survival than the resistant group. The application of gene expression signatures derived from doxorubicin resistant and sensitive cell lines allowed to effectively predict clinical survival after doxorubicin monotherapy.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Manfred Dietel
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536001/536009/536062
Fax 450-536900
manfred.dietel@charite.de

Fördereinrichtung:

European Commission

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Györfy, B., Serra, V., Jürchott, K., Garber, M., Stein, U., Petersen, I., Lage, H., Dietel, M. and Schäfer, R. (2005) *Prediction of doxorubicin sensitivity in breast tumors based on gene expression profiles of drug resistant cell lines correlates with patient survival*. *Oncogene*, 24, 7542-7551.

Györfy, B., Surowiak, P., Kiesslich, O., Denkert, C., Schäfer, R., Dietel, M. and Lage, H. (2006) *Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations*. *Int. J. Cancer*, 118, 1699-1712.

Györfy, B., Serra, V., Materna, V., Schäfer, R., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (2006) *Analysis of gene expression profiles in melanoma cells with acquired drug resistance against antineoplastic drugs*. *Melanoma Research*, 16, 147-155.

Abdul-Ghani, R., Serra, V., Györfy, B., Jürchott, K., Solf, A., Dietel, M. and Schäfer, R. (2006) *Inhibition of the PI3K pathway blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1*. *Oncogene*, 25, 1743-1752



2.2 Proteom und Chemoresistenz

Der vorliegende Forschungsantrag zielte daraufhin, neue Proteine zu finden, deren Synthese möglicherweise an der Ausbildung unterschiedlicher Resistenzformen gegenüber Zytostatikabehandlung beteiligt ist. Hierfür wurden die Gesamtproteinextrakte der unterschiedlich resistenten Tumorzelllinien mittels eines neuen zweidimensionalen elektrophoretischen Verfahrens in definierten pH-Gradienten aufgetrennt. Mittels einer bioinformatischen Auswertungsmethode (PDQUEST-System) wurden die Gele digitalisiert und ausgewertet. Hierbei gefundene Proteine wurden anschließend aufgereinigt und isoliert, um sie einer näheren Charakterisierung unter dem Gesichtspunkt der Chemoresistenz zu unterziehen. Dies erfolgte durch Überexpression des entsprechenden Faktors über cDNA-Transfektion. Hierbei konnte u.a. der ABC-Transporter TAP als funktionell bedeutsam für Mitoxantronresistenz identifiziert werden. Durch das Verständnis der Funktionsweise dieser Proteine ergeben sich möglicherweise neue Ansätze zur Entwicklung von "Chemosensitizern", die im klinischen Einsatz eine Aufhebung der Resistenz bewirken können.

A major problem in the therapy of human cancers is the development of drug-resistant tumor cells. Besides the well-characterized phenotype of classical multidrug resistance (MDR) mediated by the ABC-transport molecule P-glycoprotein (P-gp), often tumor cells acquire an atypical MDR phenotype independent from P-gp activity. To get further insights into the biological mechanisms that cause an atypical MDR, previously an atypical MDR cell culture model system was established. To identify new factors that can potentially be involved in the atypical MDR of these tumor cells, the protein expression pattern of drug-sensitive and classical and atypical MDR cells were analyzed by comparing their protein expression patterns (proteomics). By this approach various proteins were identified which were differentially expressed in different drug-resistant tumor cell lines derived from various human tissues. To prove that these factors are indeed involved in the drug-resistant phenotype, expression vector constructs containing the cDNA sequences of that factors were transfected in formerly drug-sensitive cells. By this approach it could be demonstrated that the human ABC-transporter TAP, consisting of the two subunits TAP1 and TAP2, is involved in the atypical MDR phenotype. TAP1/TAP2 cotransfected clones showed a considerable elevated cellular content of the biological active TAP dimer and showed resistance against the anthracenedione mitoxantrone as determined by a cell proliferation assay.

Projektleitung:

PD. Dr. Hermann Lage
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Pädiopathologie
Tel. +49 30 450 536045
Fax +49 30 450 536900
hermann.lage@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Krebshilfe e.V.

Publikationen:

Lage, H. (2004) *Proteomics in cancer cell research: an analysis of therapy resistance*. Pathol. Res. Pract. 200, 105-117.
Sinha, P., Hütter, G., Köttgen, E., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (1999) *Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3- (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas*. Electrophoresis 20, 2952-2960.
Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M., Celis, J.E., and Lage, H. (2001) *Characterization of the differential protein expression associated with thermoresistance in human gastric carcinoma cell lines*. Electrophoresis 22, 2990-3000.
Poland, J., Urbani, A., Lage, H., Schnölzer, M., and Sinha, P. (2004) *Study of the development of thermoresistance in human pancreatic carcinoma cell lines using proteome analysis*. Electrophoresis 25, 173-183.



2.3 Multitarget Multiribozym

Im Rahmen des Forschungsprojekts wurden experimentelle Untersuchungen zur atypischen Multidrug Resistenz (MDR) unter besonderer Berücksichtigung der BCRP-vermittelten MDR durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde, aufbauend auf umfangreiche Vorarbeiten, ein induzierbares, bidirektionales Anti-BCRP Ribozym/Reportergen-Koexpressionsssystem etabliert, das es einerseits ermöglichte, die biologische BCRP Aktivität zu inhibieren, d.h. die MDR zu modulieren, und gleichzeitig die Ribozymexpression zu verfolgen. In einem nächsten Schritt wurde zur Überwindung unterschiedlicher atypischer MDR Phänotypen ein Multitarget-Multiribozym (MTMR) entwickelt, das in der Lage ist, gleichzeitig unterschiedliche ABC-Transporter zu inaktivieren und damit gegen verschiedene Formen der MDR eingesetzt werden kann. Das Forschungsprojekt diente damit einerseits zum besseren Verständnis der biologischen Funktionsweisen des erst kürzlich beschriebenen ABC-Transporters BCRP sowie der experimentellen Evaluierung des Designs von MTMRs. Die Forschungsergebnisse des Projekts tragen daher sowohl dem besseren Verständnis eines zentralen Problems in der onkologischen Klinik, der Therapieresistenz von Tumoren, bei und zeigen gleichzeitig einen Weg auf, diese über einen gentherapeutischen Ansatz zu überwinden.

In this project, we investigated the role of the ABC-transporter BCRP (breast cancer resistance protein) in atypical types of multidrug resistance (MDR). For this approach, we established an inducible, bidirectional anti-BCRP hammerhead ribozyme / reportergene coexpression system. Using this system it was possible to inhibit the biological activity of BCRP, i.e. to reverse the atypical MDR phenotype. Moreover, it was possible to monitor the expression of the anti-BCRP ribozyme construct. Subsequently, a multitarget-multiribozyme (MTMR) has been designed. By using this MTMR it was possible to reverse different types of atypical MDR phenotypes mediated by different ABC-transporters. This project was designed for (i) the better understanding of the biological function of the recently discovered ABC-transporter BCRP and (ii) for the experimental evaluation of MTMRs.

Projektleitung:

PD. Dr. Hermann Lage
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536045
Fax +49 30 450 536900
hermann.lage@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Publikationen:

Kowalski, P., Stein, U., Scheffer, G.L., and Lage, H. (2002) *Modulation of the atypical multidrug-resistant phenotype by a hammerhead ribozyme directed against the ABC-transporter BCRP/MXR/ABCG2*. Cancer Gene Ther. 9, 579-586.
Kowalski, P., Surowiak, P., and Lage, H. (2005) *Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC-transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP*. Mol. Ther. 11, 508-522.;
Lage, H. (2005) *Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer*. Future Oncology 1, 103-113.
Nieth, C., Pribsch, A., Stege, A., and Lage, H. (2003) *Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi)*. FEBS Lett. 545, 144-150.
Wichert, A., Stege, A., Midorikawa, Y., Holm, P.S., and Lage, H. (2004) *Glypican-3 is involved in cellular protection against mitoxantrone in gastric carcinoma cells*. Oncogene 23, 945-955.



2.4 Chemoresistenz beim malignen Melanom

Im Rahmen dieses Antrags sollten neue Resistenzmechanismen, die ursächlich für die schlechte Chemosensitivität von humanen Melanomzellen verantwortlich sein könnten, analysiert werden. Dazu wurde ein Modellsystem chemoresistenter Melanomzellklone in vitro etabliert und systematisch analysiert. Dabei konnten sowohl bereits in der Literatur beschriebene Resistenzmechanismen in den resistenten Melanomzellen wiedergefunden werden (z. B. Veränderte DNA-Reparatur-Systeme wie DNA-Mismatch Repair und MGMT- oder DNA-Topoisomerasen II-Aktivität), als auch eine ganze Reihe neuer Kandidatenfaktoren identifiziert werden, die möglicherweise eine Rolle bei der Ausbildung der Resistenz spielen. Für DFNA5, konnte ein funktioneller Nachweis über eine Beteiligung an Etoposid-Resistenz geführt werden. Cisplatin-Resistenz wird in erster Linie über den ABC-Transporter MRP2 vermittelt. Aufgrund der Pumpaktivität dieses Transporters wird die Platin-DNA Adduktformation drastisch vermindert, so dass keine apoptoseauslösenden Signale in der cisplatinresistenten Melanomzelle generiert werden können. Diese verminderte zelluläre Bereitschaft nach Cisplatingabe Apoptose auszulösen ist letztendlich gleichbedeutend mit Resistenz gegenüber Cisplatin.

In this project, the mechanism involved in chemoresistance of malignant melanoma should be analyzed. For this approach, an in vitro model system was established and analyzed extensively. Various resistance mechanisms described in the literature could be identified, e.g. alterations in DNA-repair pathways, or modulation of DNA-topoisomerase II activity. Moreover, various new candidate factors could be identified. For one of them, DFNA5, a contribution to an etoposide-resistant phenotype could be demonstrated. In the case of cisplatin resistance, the ABC-transporter MRP2 could be identified as important drug resistance-mediating factor. Due to the drug extrusion activity of this transporter, the platinum-DNA adduct formation was dramatically decreased. Thus, the cisplatin-resistant melanoma cells could not trigger apoptotic signal pathways. This reduced cellular readiness to trigger cell death pathways following cisplatin exposure is identical with resistance against cisplatin.

Projektleitung:

PD. Dr. Hermann Lage
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536045
Fax +49 30 450 536900
hermann.lage@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Publikationen:

Grottko, C., Mantwill, K., Dietel, M., Schadendorf, D., and Lage, H. (2000) *Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs*. Int. J. Cancer 88, 535-546.
Lage, H., Christmann, M., Kern, M.A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B., and Schadendorf, D. (1999) *Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance*. Int. J. Cancer 80, 744-750.
Lage, H., Helmbach, H., Dietel, M., and Schadendorf, D. (2000) *Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance*. Br. J. Cancer 82, 488-491.
Lage, H., Helmbach, H., Grottko, C., Dietel, M., and Schadendorf, D. (2001) *DFNA5 (ICERE-1) contributes to acquired etoposide resistance in melanoma cells*. FEBS Lett. 494, 54-59.
Liedert, B., Materna, V., Schadendorf, D., Thomale, J., and Lage, H. (2003) *Overexpression of cMOAT (MRP2 / ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin*. J. Invest. Dermatol. 121, 172-176.



2.5 Atypical multidrug resistance of human cancer cells

Das Hauptproblem bei der chemotherapeutischen Behandlung von Malignomen stellt die Entwicklung von therapieresistenten Tumorzellen dar. Neben dem detailliert charakterisierten klassischen Multidrug Resistenz (MDR) Phänotyp, der durch die verstärkte Aktivität des ABC-Transporters MDR1/P-Glykoprotein (MDR1/P-Gp) charakterisiert ist, existieren MDR1/P-Gp unabhängige, atypische MDR Formen. Um diese atypischen MDR Formen näher zu charakterisieren, wurden unterschiedliche gastrointestinale Modellsysteme mit einem atypischen MDR Phänotyp entwickelt. Von diesen in vitro Modellen wurden Genexpressionsbibliotheken erstellt und in zytostatikasensitive Nagerzellen transfiziert. Dabei sind Nagelzellklone mit atypischen MDR Phänotyp entstanden. Im nächsten Schritt wurden die resistenzvermittelnden cDNA Fragmente isoliert und sequenziert. Um zu beweisen, dass diese cDNAs tatsächlich an der Resistenz beteiligt sind, wurden diese anschließend erneut in sensitive Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft transfiziert. Dabei konnte ein Resistenzphänotyp aus vormals sensitive Tumorzellen übertragen werden. Eine weitere biologische Charakterisierung dieser cDNAs wird z. Zt. durchgeführt.

A problem in treatment of cancer cells is the emergence of therapy-resistant tumor cells. Besides the well-characterized phenotype of classical multidrug resistance (MDR) mediated by the ABC-transport molecule MDR1/P-glycoprotein (MDR1/P-gp), tumour cell often acquire an atypical MDR phenotype. To get further insides into the biological mechanisms that cause an atypical MDR phenotype, atypical MDR cell culture model system were established previously. To identify new genes that can potentially be involved in the atypical MDR of these tumour cells, gene expression libraries were constructed from the atypical MDR in vitro models. These expression libraries were transferred into drug-sensitive rodent cells. Transgenic rodent cell clones that became drug-resistant following this transfection experiment were isolated by continuous drug exposure. In the next step, the transferred cDNA sequences that conferred the drug-resistant phenotype to former drug-sensitive rodents cells were isolated. To proof that these new identified gene products can contribute to a MDR phenomenon, the expression of these genes was analysed in different drug-resistant tumor cells derived from different origin. Furthermore, these cDNA fragments were used in transfection experiments. It could be demonstrated that a drug-resistant phenotype could be transferred to cancer cells. Currently, a further biological characterisation of these cDNAs is under investigation.

Projektleitung:

PD. Dr. Hermann Lage

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie

Tel. +49 30 450 536045

Fax +49 30 450 536900

hermann.lage@charite.de

Fördereinrichtung:

Novartis Stiftung für therapeutische Forschung

Publikationen:

Lage, H., and Dietel, M. (2000) *Effect of the breast cancer resistance protein on atypical multidrug resistance*. *Lancet Oncol.* 1, 169-175.

Lage, H., Perlitz, C., Abele, R., Tampé, R., Dietel, M., Schadendorf, D., and Sinha, P. (2001) *Enhanced expression of human ABC-transporter TAP is associated with cellular resistance to mitoxantrone*. *FEBS Lett.* 503, 179-184.

Lage, H., and Dietel, M. (2002) *Multiple mechanisms confer different drug-resistant phenotypes in pancreatic carcinoma cells*. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 128, 349-357.

Nieth, C., Priebisch, A., Stege, A., and Lage, H. (2003) *Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi)*. *FEBS Lett.* 545, 144-150.

Ross, D.D., Yang, W., Abruzzo, L.V., Dalton, W.S., Schneider, E., Lage, H., Dietel, M., Greenberger, L., Cole, S.P.C., and Doyle, L.A. (1999) *Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines*. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 429-433.



3

Tumorgenetik



3.1 Expressionsanalyse des Tumorsuppressorgens IGFBP-7 in humanen Colon- und Lungenkarzinomen

Insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP-7) wird in unterschiedlichen Tumoren schwach exprimiert. Aber es ist noch nicht klar, welche Rolle das IGFBP-7 Gen bei Lungenkarzinomen spielen konnte. Wir haben gefunden, dass IGFBP-7 sich in Northern blot und Western blot durch ein stark herabregulierte Expression in getesteten Tumorzelllinien verglichen mit Normaler Zelllinie zeichnete. Ein Gewebearray bestehend aus 138 primären Tumoren wurde immunohistochemische angefärbt, hierbei konnte aufgezeigt werden, dass bei 80 primären Tumoren keine IGFBP-7-Expression nachweisbar war. Die Wiederherstellung der IGFBP-7 Genexpression wurde in 3 Tumorzelllinien nach 5-Aza-dc-Behandlung gefunden. Weiterhin wurde demonstriert, dass eine stabile Expression von IGFBP-7 nach Transfektion in der Tumorzelllinie H2170 in einer Reduktion der Potenz zum kontaktunabhängigen Wachstum in vitro sogar auch in vivo resultierte. Die Anzahl der apoptotischen Zellen sowie die Expression von Caspase-3 reduzierten. BrdU-Behandlung zeigte sich, dass IGFBP-7 in Lungen-Differenziation involvieren werden konnte. Basierend auf diesen Ergebnissen kann eine potenzielle Rolle von IGFBP-7 als Tumorsuppressorgen mit Relevanz zur Genese der Lungenkarzinome postuliert werden.

Insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP-7) has been shown to have decreased expression in various tumors. We evaluated the IGFBP-7 expression in lung cancer cell lines by Northern blot and Western blot analysis. We found that IGFBP-7 was down regulated in lung cancer cell lines. In 138 primary tumors analyzed by immunohistochemistry, 58 cases (42%) exhibited no expression of IGFBP-7, while in other 80 cases (58%) the IGFBP-7 staining was positive. Neither deletion or gene rearrangement nor loss of heterozygosity is responsible for the loss of IGFBP-7 expression in lung cancer. However, 5-aza-2'-deoxycytidine treatment restored the expression of IGFBP-7 in 3 out of 4 lung cancer cell lines. Stable transfection of IGFBP-7 full-length cDNA into a lung cancer cell line H2170 led to an increased protein expression of IGFBP-7, and remarkably reduced the ability of colony formation in soft agar and suppressed the tumor growth rate in nude mice compared to mock transfectant (empty vector) or parent cells of H2170. Furthermore, the number of apoptotic cells and caspase-3 expression increased in IGFBP-7. The involvement of IGFBP-7 in lung cancer differentiation was demonstrated by treatment of lung cancer cell lines with differentiation modulating agent 5-bromodeoxyuridine (BrdU). It turned out that IGFBP-7 was upregulated at both mRNA and protein levels after BrdU treatment. We suggest that IGFBP-7 is a potential tumor suppressor in human lung cancer.

Projektleitung:

Dr. med. Yuan Chen
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536035
Fax +49 30 450-536902
yuan.chen@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Chen Y, Huhn D, Knosel T, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Petersen I. *Downregulation of connexin 26 in human lung cancer is related to promoter methylation*. Int J Cancer. 2005 Jan 1;113(1):14-21 // Difilippantonio S, Chen Y, Pietas A, Schluns K, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Padilla-Nash HM, Ried T, Petersen I. *Gene expression profiles in human non-small and small-cell lung cancers*. Eur J Cancer. 2003 Sep;39(13):1936-47
Chen Y, Petersen S, Pacyna-Gengelbach M, Pietas A, Petersen I. *Identification of a novel homeobox-containing gene, LAGY, which is downregulated in lung cancer*. Oncology. 2003;64(4):450-8
Chen Y, Knosel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I, Petersen I. *Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis*. J Pathol. 2003 Aug;200(5):640-6
Mutaguchi K, Yasumoto H, Mita K, Matsubara A, Shiina H, Igawa M, Dahiya R and Usui T. *Restoration of insulin-like growth factor binding protein-related protein 1 has a tumor-suppressive activity through induction of apoptosis in human prostate cancer*. Cancer Res. 2003 63: 7717-7723.



3.2 Funktionelle Charakterisierung des Tumorsuppressorgens GABARAP

Das Mammakarzinom stellt mit etwa 46000 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste Krebsart bei Frauen in Deutschland dar. Anhand von CGH- und LOH-Studien konnte aufgezeigt werden, dass dieses Karzinom durch eine Vielzahl chromosomaler Aberrationen gekennzeichnet ist, die sich insbesondere auf das Chromosom 17 konzentrieren. Zudem wurde in Vorarbeiten demonstriert, dass der Transfer eines fragmentierten Chromosoms 17, bestehend aus 17p und 17q24-25, in die tumorigene Brustkrebszelllinie CAL51 zu einer Reversion des neoplastischen Phänotyps geführt hat. Ausgehend von diesen Daten wurde das Vorhandensein von Genen mit tumorsupprimierender Wirkung in diesen Chromosomenbereichen postuliert. Im Rahmen der Vorarbeiten wurde eine Genbibliothek erstellt, welche die in der Brustkrebszelllinie unterrepräsentierten Gene aufwies. Als potenzielles Kandidatengen konnte das in einer Vielzahl an Brusttumoren herabregulierte Gen GABARAP mit Lokalisation auf Chromosom 17p13.1 detektiert werden. Die nachgewiesene tumorsupprimierende Wirkung dieses Proteins und vesikelassoziierte subzelluläre Lokalisation lassen einen vesikelassoziierten Transportprozess/Signalkaskade im Rahmen der Kanzerogenese vermuten. In diesem Antrag soll die funktionelle Bedeutung von GABARAP hinsichtlich einer Involvierung in Signaltransduktionswege mit Relevanz zur Entstehung des Mammakarzinoms analysiert werden. Des Weiteren sollen mögliche GABARAP-Interaktionspartner identifiziert und charakterisiert werden.

Breast cancer is the most leading malignancy in women worldwide. Using Comparative Genomic Hybridization (CGH) and allelotyping we could demonstrate that a complex pattern of chromosomal imbalances was correlated with tumor progression. These alterations particularly affected the short arm of chromosome 17 (17p). Furthermore, transfer of 17p into a wild-type p53 breast cancer cell line resulted in suppression of tumorigenicity in nude mice, suggesting the presence of multiple tumor suppressor genes on this chromosome. By performing Suppression Subtractive Hybridization (SSH) to detect differentially expressed genes between the breast cancer cell line CAL51 and a nontumorigenic microcell hybrid CAL/17-1, we identified the gene for the -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor associated protein (GABARAP), located on 17p13.1. The vesicle-associated subcellular localization of this protein together with the tumor suppressing effect indicate that GABARAP acts via a vesicle transport mechanism as a tumor suppressor in breast cancer. In future studies the functional investigation of this protein in carcinogenesis will be analyzed. Moreover, potential interacting partners of GABARAP should be identified and further characterized regarding their role in breast cancer development.

Projektleitung:

Dr. rer. nat. Christiane Klebig
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450536902
Fax +49 30 450536902
christiane.klebig@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, and Petersen I. *Characterization of GABARAP, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer.* Cancer Res 2005; 65: in press.
Janke J, Schlüter K, Jandrig B, Theile M, Kölbl K, Arnold W, Grinstein E, Schwartz A, Estévez-Schwarz L, Schlag PM, Jockusch BM., and Scherneck S. *Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1.* J Exp Med 2000; 10: 1675-1685.
Seitz S, Poppe K, Fischer J, Nothnagel A, Estévez-Schwarz L, Haensch W, Schlag PM, and Scherneck S. *Detailed deletion mapping in sporadic breast cancer at chromosomal region 17p13 distal to the TP53 gene: association with clinicopathological parameters.* J Pathol 2001; 194: 318-326.



3.3 Tumorgenetik in der Progression von kolorektalen Karzinomen

Durch unsere Untersuchungen der chromosomalen Veränderungen über die Komparative Genomische Hybridisierung (CGH) bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen konnten wir zeigen, dass bestimmte chromosomale Veränderungen mit der Tumorprogression und Metastasierung assoziiert sind. Dem entsprechen offensichtlich spezifische Genexpressionsprofile, welche teils bereits publiziert und teils von kollaborierenden Arbeitsgruppen zur Zeit erstellt werden. Ziel des Antrags ist einerseits die Evaluierung und Validierung dieser Kandidatengene. Dazu soll insbesondere die Technik der Gewebe-Arrays (tissue microarray, TMA) Anwendung finden, wobei die Immunhistologie (IHC), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) sowie auch die quantitative real time RT-PCR und mRNA in situ Hybridisierung für ausgewählte Proben eingesetzt werden sollen. Die Ergebnisse werden mit klinisch-pathologischen Parametern sowie untereinander (insbesondere IHC versus FISH und mRNA Expression) verglichen. In Kollaboration mit anderen Berliner Arbeitsgruppen sollen so mindestens 15 Gene beim kolorektalen Karzinom untersucht werden. Andererseits sollen in dem Antrag die mittels CGH identifizierte chromosomalen Läsionen durch FISH-Untersuchungen weiter bzgl. ihrer Relevanz in der Tumorprogression charakterisiert werden. Ziel ist dabei die Erstellung eines diagnostisch einsetzbaren SONDENSATZES, der eine bessere Vorhersage der malignen Potenz kolorektaler Karzinome ermöglichen soll.

Comparative genomic hybridization (CGH) was used to screen 71 advanced colorectal carcinomas for chromosomal alterations. Using a sensitive statistical method for the determination of DNA imbalances and histograms for analysis of the incidence of changes, we identified deletions at 18q, 4q, 4p, 5q, 1p, 21q, 6q, 3p, 8p, 9p11q and additional changes in the metastases in 2q, 3, 5q, 8p, 9p, 10q, 11p and 12p while chromosome overrepresentation occur at 20q, 7q, 16p, 10p, 9q, 19q, 13q, 17q21, 22q11, 8q, 1q and additional changes at 1q, 17q12-21, 17q24-q25, 19p and 19q. For some of the chromosomal imbalances candidate genes have been identified. Such as APC at 5q21, SMAD2 and SMAD4 at 18q or STK15 at 20q. However for the majority of loci, the associated genetic defects especially in advanced tumors and their metastases are still unknown. The aim of our study is to evaluate possible candidate genes in a large tumor collection. In collaboration with other Berlin research groups we will analyze a well defined large tumor collective of 1000 specimens with tissue microarrays (TMAs) and correlate candidate genes, chromosomal regions, and proteins with clinicopathological parameters. Additionally we will correlate specific chromosomal regions with fluorescence in situ hybridization (FISH) with patients survival. The genomic data will hopefully enable a stratification of patients into subgroups with different survival highlighting the necessity of a genetically based tumor classification.

Projektleitung:

Dr.med. Thomas Knösel
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536155
thomas.knoesel@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Online-Informationen:

pathoweb.charite.de/tmaportal



3.4 p17-Kandidatengene

Chromosom 17 zeigt häufig Deletionen auf dem kurzen und DNA Gewinne auf dem langen Arm beim Mammakarzinomen und beherbergt bereits bekannte Tumor-assoziierte Gene, z.B. p53 und HER2/NEU. Es ist jedoch bekannt, dass diese nicht die einzigen Gene sein können, die in der Tumorentstehung und progression eine Rolle spielen. Das Ziel des Projektes ist die Identifikation und Charakterisierung neuer Kandidaten, insbesondere von potentiellen Tumorsuppressor-Genen. Hilfsmittel dazu sind zum einen der Microzell-vermittelte Chromosomentransfer, mit dem die Tumorigenität von Chromosom 17 defizienten Mammakarzinomzelllinien revertiert werden kann und zum anderen genom-weite Screeninguntersuchungen, die aufzeigen, welche Gene auf Chromosom 17 nach der Revertierung wieder zur Expression gelangen. Diese werden dann durch funktionelle und phänotypische Charakterisierung weiter auf ihre Relevanz in der Tumorigenese des Mammakarzinoms hin untersucht.

Chromosome 17 frequently shows deletions on the short arm and DANN overrepresentations on the long arm in mammary carcinomas. It carries already known tumor-associated genes like p53 and HER2/NEU. However, these can not be the only ones with importance to the cancer initiation and progression. The aim of the project is the identification and characterisation of further candidate, particularly of putative tumor suppressor genes. Essential tools are the microcell-mediated chromosome transfer which is able to revert the tumorigenicity of chromosome 17 deficient breast cancer cell lines and genome-wide screening techniques for the detection of genes being reexpressed after chromosome transfection and cancer cell reversion. The genes are then further characterized phenotypically and functionally in regard of their relevance in breast cancer tumorigenesis.

Projektleitung:

Univ.Prof.Dr. Iver Petersen
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450536050
Fax +49 30 450536902
iver.petersen@charite.de

Fördereinrichtung:

Wilhelm Sander-Stiftung

Publikationen:

Klebig C, Seitz S, Korsching E, Kristiansen G, Gustavus D, Scherneck S, Petersen I. *Profile of differentially expressed genes after transfer of chromosome 17 into the breast cancer cell line CAL51.* Genes Chromosomes Cancer. 2005 Nov;44(3):233-46.

Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S, Petersen I. *Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer.* Cancer Res. 2005 Jan 15;65(2):394-400.

Seitz S, Korsching E, Weimer J, Jacobsen A, Arnold N, Meindl A, Arnold W, Gustavus D, Klebig C, Petersen I, Scherneck S. *Genetic background of different cancer cell lines influences the gene set involved in chromosome 8 mediated breast tumor suppression.* Genes Chromosomes Cancer. 2006 Mar 21; [Epub ahead of print] PMID: 16552773 [PubMed - as supplied by publisher]



3.5 Identifizierung der genetischen Läsionen auf Chromosom 10 in der Tumorprogression vom Lungenkrebs

Wir konnten zeigen, dass Chromosom 10 eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression von Lungenkarzinomen spielt. Dabei ließen sich insbesondere Subregionen auf dem langen Arm identifizieren, die gehäuft von interstitiellen Deletionen betroffen sind. Ziel des Projektes ist die Identifizierung und Charakterisierung von Kandidatengenen, die als Tumorsuppressoren fungieren könnten. Als Hilfsmittel werden dazu spezifische Genexpressions-Bibliotheken erstellt, von denen einzelne Klone/Gene näher analysiert werden.

We showed that chromosome 10 plays an important role in the tumor progression of lung cancer. Specifically we could identify distinct subregions on the long arm that is affected by interstitial deletions. The aim of the project is the identification and characterization of candidate genes that may function as tumor suppressors. Therefore specific gene libraries were generated of which single clones/genes will be further analyzed.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Iver Petersen
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450536050
Fax +49 30 450536902
iver.petersen@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Krebshilfe e.V.

Online-Informationen:

amba.charite.de/cgh

Publikationen:

Petersen S, Wolf G, Bockmühl U, Gellert K, Dietel M, Petersen I. *Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and metastatic phenotype*. British Journal of Cancer (1998) 77: 270-276

Petersen S, Rudolf J, Bockmühl U, Gellert K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. *Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung*. Oncogene (1998) 17: 449-454

Petersen S, Heckert C, Rudolf J, Schlüns K, Tchernitsa OI, Schäfer R, Petersen I. *Gene expression profiling of advanced lung cancer*. International Journal of Cancer (2000) 86: 512-517

Pietas A, Schlüns K, Marenholz I, Schäfer BW, Heizmann CW, Petersen I. *Molecular cloning and characterization of the human S100A14 gene encoding a novel member of the S100 family*. Genomics (2002) 79: 513-522

Chen Y, Knösel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I, Petersen I. *Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumor progression and prognosis*. J Path (2003) in press

Chen Y, Petersen S, Pacyna-Gengelbach M, Pietas A, Petersen I. *Identification of the Novel Homeobox-Containing Gene, LAGY, that is downregulated in human Lung Cancer*. Oncology (2003) in press



3.6 Charakterisierung des Tumorsuppressors LAGY

Karzinome der Lunge haben die höchste Mortalitätsrate aller Malignome des Menschen. Viele Studien haben gezeigt, dass der Lungenkarzinogenese multiple genetische und epigenetische Veränderungen zugrunde liegen. Wir konnten in Vorläuferstudien Genbibliotheken differentiell exprimierter Gene mittels der Subtraktive Suppression-Hybridisierung (SSH) erstellen, die präferenziell bei Lungenkarzinomen herauf- bzw. herunterregulierte Gene beinhalten. Dabei haben wir einzelne unbekannte Gene gefunden. Eins ist das Gen LAGY, das auf Chromosom 4q11-13.1 lokalisiert und sowohl in Lungentumorzelllinien als auch in primären Lungenkarzinomen vermindert exprimiert wird und damit ein potentielles Tumorsuppressor Gen darstellt. Es gehört zur interessanten Gruppe der Homeobox-Gene, die als Transkriptionsfaktoren in die zelluläre Differenzierung und Proliferation involviert sind. Mehrere Vertreter wurden bereits mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht. In diesem Antrag sollen Experimente zur funktionellen Charakterisierung von LAGY sowie zwei anderen Homeobox Genen (HOXB2, PITX1), die ebenfalls in unseren SSH Bibliotheken repräsentiert sind, durchgeführt werden. Des Weiteren sollen aus den Bibliotheken Gene mit potentieller Funktion in der Lungendifferenzierung identifiziert werden.

We have isolated a novel human lung cancer-associated gene, LAGY (lung cancer-associated Y protein) by SSH-screening. The nucleotide sequence of LAGY predicts a small protein of 73 amino acid containing a putative Homeobox domain. Multiple tissue Northern blots analysis revealed that the gene is present in human placenta, lung, brain, heart and skeletal muscle. Gene mapping locates LAGY gene on chromosome 4q11-13.1. The expression of LAGY mRNA levels was widely lost in 5 immortalized human bronchial epithelial cell lines and 18 lung tumor cell lines comprising 4 major histological types including small cell lung carcinoma (SCLC), large cell lung carcinoma (LCLC), squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma (ADC) by Northern blot analysis and semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). In the survey of 72 primary lung tumors, this gene was significantly down-regulated in all tumors compared to 9 normal lung tissue samples, most prominently in SCC. For this tumor type, there was also a significant reduction for LAGY expression in tumors with increased grade and stage. No expression was detectable in two high grade SCC and 50% of SCLC and LCLC, respectively. Since homeodomain-containing genes are known to transcriptionally regulate key cellular processes and have been associated with carcinogenesis, we suggest that the LAGY gene should be considered as a candidate tumor suppressor in lung cancer development and progression.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Iver Petersen
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Pädiopathologie
Tel. +49 30 450536050
Fax +49 30 450536902
iver.petersen@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Krebshilfe e.V.

Publikationen:

Chen Y, Petersen S, Pacyna-Gengelbach M, Pietas A, Petersen I. *Identification of a novel homeobox-containing gene, LAGY, which is downregulated in lung cancer.* Oncology. 2003;64(4):450-8.



3.7 Comparative Genomic Hybridization (CGH) and expression profiling of lung cancer

Lungenkarzinome zeigen Muster chromosomaler Veränderungen, die sich mittels CGH Analyse als DNA Gewinne und Verluste einzelne chromosomalen Regionen zuordnen lassen. Diese genomischen Imbalanzen korrelieren mit einer veränderten Kopienanzahl von Gene in diese chromosomalen Regionen, was wiederum zu Expressionsunterschieden in einzelnen Genen und Gengruppen führen kann. In diesem Projekt sollen genomweite Expressionsanalysen bei Lungenkarzinomen erhoben werden, deren Ergebnisse mit den chromosomalen Alterationen korreliert werden sollen. Übergeordnetes Ziel ist eine verbesserte, auf genetischen Daten mit beruhende Klassifikation des Lungenkrebs.

Lung carcinomas show patterns of chromosomal alterations, which can be detected by CGH as DNA gains and losses being mapped to specific chromosomal regions. These genomic imbalances correlate with copy number changes of genes located on these chromosomes, which can thus induce differences in gene expression of specific genes and gene clusters. The objective of the project is the genome-wide expression analysis of lung carcinomas and its correlation with chromosomale imbalances. This will hopefully lead to a refined, genetic-based classification of lung cancer.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Iver Petersen
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450536050
Fax +49 30 450536902
iver.petersen@charite.de

Fördereinrichtung:

Industrie

Publikationen:

Difilippantonio S, Chen Y, Pietas A, Schlüns K, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Padilla-Nash HM, Ried T, Petersen I. *Gene expression profiles in human non-small and small-cell lung cancers*. Eur J Cancer. 2003; 39: 1936-1947.

Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna Gengelbach M, van de Rijn M, Rosen GD, Perou CM, Whyte RI, Altman RB, Brown PO, Botstein D, Petersen I. *Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung*. Proc Natl Acad Sci USA. 2001; 98: 13784-13789

Petersen I, Petersen S. *Towards a genetic-based classification of human lung cancer*. Anal Cell Pathol. 2001;22(3):111-121



3.8 Funktionelle Analyse des H-REV107-1 Tumorsuppressor Gens

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Promoter-Region des Tumorsuppressor Gens H-REV107-1 analysiert. Sie enthält Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren IRF-1 (ISRE), NF-kappaB/c-Rel und einige RAS abhängige AP-1 und Ets Elemente. Deletion und Mutation des ISRE Elementes zeigte, dass dieses keine Rolle in der IFN abhängigen Regulation von H-REV107-1 spielt. Das NFkappaB/c-Rel Element hingegen ist wichtig für die Aktivität des Promoters. Mutation und Deletion dieses Elementes, sowie Behandlung der Zellen mit einem I kappa B Super-Repressor der die Aktivität von NF-kappaB hemmt, führten zu einer Hemmung der Promoter Aktivität. Die Funktion der AP-1 und AP-4 Elemente in der Hemmung des Promoters nach Aktivierung des MAP-Kinase Weges wird derzeit untersucht. Weiterhin wurden mittels Hefe-2-Hybrid Analysen Interaktionspartner des H-REV107-1 Proteins identifiziert. Einige der potentiellen Partner wurden mittels Ko-Immunopräzipitation bestätigt. Darunter fanden wir die Phosphatase 2A (PP2A), deren Aktivität durch H-Rev107-1 gehemmt wird. Transfektion von H-REV107-1 in OVCAR-3 Zellen führt zu einer Translokation von PP2A vom Kern in das Zytoplasma. Dieser Transfer ist Voraussetzung für die Induktion von Apoptose, wie durch Spaltung der Caspase-8 nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wird nun der Signalweg untersucht und nach dem Zielprotein von PP2A gesucht, welches für die Auslösung der Apoptose in Anwesenheit von H-REV107-1 notwendig ist.

Within this project, we have analysed the promoter region of the H-REV107-1 tumor suppressor gene. We found transcription factor binding elements for Interferon regulatory factor (ISRE), NF-kappaB/c-Rel and several RAS-responsive AP-1 and Ets elements. Deletion and mutation of the ISRE did not reveal a role for this promoter element in IFN -dependent gene regulation. In contrast, the NF-kappaB/c-Rel binding site is important for promoter activity. Mutation and deletion of this element and treatment of the cells with an I kappa B super-repressor which abrogates the function of NF- B resulted in a suppression of promoter activity. The role of AP-1 and AP-4 transcription factor binding sites in MAP-kinase dependent suppression of the H-REV107-1 promoter is currently investigated. We also have identified interaction partners of the H-REV107-1 protein using yeast-two-hybrid analysis. A small number of potentially interacting proteins have been confirmed using co-immunoprecipitation. We found the protein phosphatase 2A (PP2A), whose activity is suppressed by the H-REV107-1 protein. Upon transfection of H-REV107-1 into OVCAR-3 ovarian carcinoma cells, the protein mediates a translocation of the protein phosphatase 2A from the nucleus to the cytoplasm. This shuttling is necessary for induction of apoptosis as confirmed by the cleavage of caspase8. We now seek to identify the protein which is targeted by PP2A to induce apoptosis in tumor cells expressing H-REV107-1.

Projektleitung:

PD. Dr. Christine Sers
Charité - Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49-30-450-536185
Fax +49-30-450-535909
christine.sers@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Krebshilfe e.V.

Publikationen:

Sers, C., Emmenegger, U., Husmann, K., Bucher, K., Andres, A.-K. & Schäfer, R.. *Growth-inhibitory activity and downregulation of the classII tumor-suppressor gene H-rev107 in tumor cell lines and experimental tumors*. Journal of Cell Biology, 1997, 136: 935-944 // Husmann, K., Sers, C., Fietze, E., Mincheva, A., Lichter, P. and Schäfer, R. *Transcriptional and translational downregulation of H-REV107-1, a tumor suppressor gene located on human chromosome 11q11-13*. Oncogene 1998, 17: 1305-1312 // (Die beiden Erstautoren haben in gleichem Umfang zu der Arbeit beigetragen): Knut Husmann and Christine Sers Sers, C., Husmann, K., Nazarenko, I., Reich, R., Wiechen, K., Zhumabayeva, B., Adhikari, P., Schroeder, K., Gontarewicz, A. and Schäfer, R. *The classII tumorsuppressor gene H-REV107-1 is a target of interferon-regulatory factor 1 and is involved in interferon gamma-dependent growth suppression in human ovarian carcinoma*. Oncogene, 2002, 21: 2829-2839 // *Suppression of the TIG3 Tumorsuppressor Gene in Human Ovarian Carcinomas is mediated via Mitogen-activated Kinase-dependent and independent Mechanisms* Kristina Lotz, Tobias Kellner, Michaela Heitmann, Irina Nazarenko, Anastassia Malek, Aurelia Noske, Artur Gontarewicz, Reinhold Schäfer and Christine Sers Int J Cancer. 116: 894-902 (2005)



3.9 Expression und Regulation des Tumorsuppressor Gens TIG3/H-REV107-2 in Ovarialkarzinomen

Expression von TIG3/HREV107-2 H-REV107-2/TIG3 ist eine durch Retinoide induzierbares Klasse II Tumor Suppressorgen. Die Expression und Regulation des Gens wurde in humanen Ovarialkarzinomen analysiert. H-REV107-1 mRNA wird im normalen Ovar und in immortalen Ovariälepithelzellen exprimiert. In ca. 40% der untersuchten Ovarialkarzinome, wird H-REV107-2/TIG3 hingegen deutlich schwächer oder nicht mehr exprimiert. Überexpression von H-REV107-2/TIG3 führt in Ovarialkarzinom Zelllinien zur Wachstumsinhibition. Die Suppression des H-REV107-2/TIG3 Gens wird in einigen Zelllinien über einen aktivierten RAS-RAF-MEK Signalweg vermittelt und ist reversibel. Ähnlich wie das verwandte Tumor Suppressorgen H-REV107-1 kann die Expression von H-REV107-2/TIG3 über Interferone aktiviert werden. Vermutlich ist H-REV107-2/TIG3 an der Interferon-vermittelten Wachstumskontrolle von Tumorzellen beteiligt.

Expression of TIG3/HREV107-2 H-REV107-2/TIG3 is a retinoic acid inducible classII tumor suppressor gene. We analysed expression and regulation of this gene in human ovarian carcinomas. H-REV107-2/TIG3 mRNA was found to be expressed in normal ovary and in immortalized human ovarian epithelial cells. In contrast, H-REV107-2/TIG3 expression is lost in app. 40% of the ovarian tumors and tumor cell lines analysed. Re-expression of H-REV107-2/TIG3 in ovarian carcinoma cell lines results in growth inhibition. The suppression of H-REV107-2/TIG3 expression is mediated via an activated RAS-RAF-MEK pathway in a subgroup of ovarian cancer cell lines. Similar to the related tumor suppressor gene H-REV107-1, the expression of H-REV107-2/TIG3 can be stimulated via Interferons. Presumably, H-REV107-2/TIG3 participates in the interferon-mediated growth control of tumor cells.

Projektleitung:

PD. Dr. Christine Sers
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49-30-450-536185
Fax +49-30-450-535909
christine.sers@charite.de

Fördereinrichtung:

Berliner Krebsgesellschaft e.V.

Publikationen:

Suppression of the TIG3 Tumorsuppressor Gene in Human Ovarian Carcinomas is mediated via Mitogen-activated Kinase-dependent and independent Mechanisms Kristina Lotz, Tobias Kellner, Michaela Heitmann, Irina Nazarenko, Anastassia Malek, Aurelia Noske, Artur Gontarewicz, Reinhold Schäfer and Christine Sers Int J Cancer. 116: 894-902 (2005)



4

Experimentelle Krebsforschung

Signaltransduktion und genetisches Programm



4.1 Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) im Prostatakarzinom

In den letzten Jahren wurde für eine Vielzahl von malignen Tumoren gezeigt, dass im Tumorgewebe eine vermehrte Expression der Cyclooxygenase 2 vorhanden ist und dass Inhibitoren der Cyclooxygenase im Tiermodell sowie in Zellkulturversuchen das Tumorstadium und die Tumorstadien hemmen. Nach Vorarbeiten der Antragsteller ist eine erhöhte Expression der Cyclooxygenasen in gynäkologischen Tumoren mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Denkert et al., Am. J. Pathol. 2002, Denkert et al. Cancer, 2003). Für das Prostatakarzinom ist eine prognostische Bedeutung der COX-2 jedoch bisher noch nicht untersucht worden. Der vorliegende Antrag hat das Ziel, die Expression und prognostische Bedeutung der Cyclooxygenasen, insbesondere der COX-2 im humanen Prostatakarzinom zu bestimmen. Hierzu steht ein gut charakterisiertes Kollektiv von 102 Prostatakarzinomen mit Daten zum klinischen Rezidiv zur Verfügung (Kristiansen et al., Prostate 2003, in press). Nach aktuellen Ergebnissen der Antragsteller (Denkert et al., 2003, submitted) ist das humane RNA-stabilisierende Protein HuR mit der Expression der COX-2 im Tumorgewebe assoziiert und steuert möglicherweise über Veränderungen der mRNA-Stabilität die Überexpression der COX-2. Expression und prognostische Relevanz von HuR soll im vorliegenden Projekt für das Prostatakarzinom ebenfalls untersucht werden.

An overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) has been described in several different types of tumors. In cell culture experiments as well as in animal tumor models, inhibitors of COX-2 are able to reduce tumor proliferation and tumor progression. We have shown that an increased expression of cyclooxygenases is associated with poor prognosis in gynecological tumors (Denkert et al., Am. J. Pathol. 2002, Denkert et al. Cancer, 2003). The prognostic impact of COX-2 in prostate carcinoma has not been studied to a great extent, so far. In this study, we will investigate the expression and prognostic role of cyclooxygenases, particularly COX-2 in human prostate cancer. Furthermore, we will study the expression of the COX-2 regulatory protein HuR. In cell culture studies, we will evaluate expression of COX-2 and prostaglandin production in different prostate carcinoma cell lines. The investigation of the prognostic role of COX-2 might be a basis for a future evaluation of COX-2 inhibitors in the therapy of prostate carcinoma.

Projektleitung:

Dr. med. Carsten Denkert
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Pädiopathologie
Tel. 450-536047
carsten.denkert@charite.de

Fördereinrichtung:

Berliner Krebsgesellschaft e.V.

Publikationen:

Carsten Denkert, Wilko Weichert, Sören Pest, Ines Koch, Dirk Licht, Martin Köbel, Angela Reles, Jalid Sehoul, Manfred Dietel, Steffen Hauptmann. *Overexpression of the ELAV-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased COX-2 expression.* Cancer Research, 2004 Jan 1;64(1):189-95.
Carsten Denkert, Wilko Weichert, Klaus-Jürgen Winzer, Berit-Maria Müller, Aurelia Noske, Silvia Niesporek, Glen Kristiansen, Hans Guski, Manfred Dietel, Steffen Hauptmann. *Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer.* Clinical Cancer Research, 2004, 10, 5580-5586.
Sengupta S, Jang BC, Wu MT, Paik JH, Furneaux H, Hla T: *The RNA-binding protein HuR regulates the expression of cyclooxygenase-2.* J Biol Chem 2003, 278:25227-33.
Keene JD: *Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets.* Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96: 5-7



4.2 Ras-abhängige Kontrolle des multifunktionellen Regulators YB-1 in Kolonkarzinomzellen

Kolonkarzinome gehören mit zu den häufigsten Tumorerkrankungen der entwickelten Industrieländer der westlichen Welt. Mit einer Inzidenz von rund 40% gehören Mutationen von K-Ras mit zu den bedeutsamsten onkogenen Veränderungen in Kolonkarzinomen. Eine genomweite Analyse von transkriptionellen Zielmolekülen dieser Signalkaskade in drei Kolonkarzinomzelllinien ergab unter anderem Gruppen von Genen, deren Produkte wichtige Funktionen in der Regulation der Zellproliferation erfüllen. Eine in silico durchgeführte Promoteranalyse ergab überraschend eine Überrepräsentierung von sogenannten NFY-Bindungsstellen in den potentiellen Promoterregionen dieser Gene. Die funktionelle Bedeutung dieser Bindungsstellen konnte an Hand eines Modellpromoters (Cyclin B1) bestätigt werden. Im Rahmen des Projektes konnte nun mittels Chromatinimmunoprecipitation nachgewiesen werden, daß das YB-1 im fraglichen Promoterbereich von Cyclin B1 bindet, und daß diese Bindung abhängig von der Aktivität von Mek/Erk ist. Diese Ergebnisse konnte mittels EMSA bestätigt werden. Die Verringerung der zellulären YB-1 Konzentration mittels siRNA führte zu einer verringerten Expression von Cyclin B1 und in der Konsequenz zu einer verringerten Zellproliferation. Damit konnte gezeigt werden, daß YB-1 eine wichtige Position bei der Ras-vermittelten Induktion der Zellproliferation einnimmt.

Colon carcinomas are among the most frequent tumours in the developed industrial countries of the western world. A complex cooperation of different mutations in key molecules of signal transduction pathways contributes to the development and maintenance of the tumorigenic phenotype of the colon cells. Mutations in the K-Ras gene (about 40 %) belong to the most important oncogenic alterations in colon carcinomas. A genome wide analysis of transcriptional targets of the K-Ras dependent signalling cascade in three colon carcinoma cell lines resulted in the identification of clusters of genes associated with proliferation. An in silico analysis of the potential promoter regions of these genes revealed a significant overrepresentation of NFY-binding sites. The functional relevance of these binding sites was proven by using the cyclin B1 promoter as a model. The multifunctional protein YB-1 was identified as a regulating factor for the cyclin B1 expression in a former project. We now demonstrated by chromatinimmunoprecipitation that YB-1 interacts with the cyclin B1 promoter and that the binding is sensitive to Mek inhibition. We confirmed these results by EMSA (Electrophoretic mobility shift assay). The transient knock down of YB-1 using siRNA results in a decrease of cyclin B1 expression and in the consequence in a partial inhibition of cell proliferation. These data demonstrate a crucial role of YB-1 in the Ras-mediated induction of cell proliferation.

Projektleitung:

Dr.rer.nat. Karsten Jürchott
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536 194
Fax +49 30 450 536 909
karsten.juerchott@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Jürchott et al. *YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression.* J Biol Chem. 2003 ;278(30):27988-96.



4.3 Einfluss von Ras auf die Histonacetylierung - Identifizierung von transkriptionellen Modulen in Kolonkarzinomen

Die Deregulation von Signalwegen durch onkogenes Ras ist ein bedeutender Schritt bei der Entstehung von Kolonkarzinomen. Die Aktivierung von Ras führt zu einer Änderung der Genexpression zahlreicher Gene, wobei die Beteiligung epigenetischer Mechanismen bei diesem Prozess zur Zeit weitestgehend unbekannt ist. Im Rahmen des geförderten Projektes wurden Gene identifiziert, deren Expression sowohl nach der Inhibierung des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweges als auch der Histondeazetylasen induziert wurde. Dazu wurden Expressionsdaten mittels Affymetrix-Chips (HG-U133A) von drei Kolonkarzinomzelllinien verwendet, die einerseits mit U0126, und auf der anderen Seite mit TSA für jeweils 48 Stunden behandelt wurden. Aus dieser Gruppe wurde Clusterin als Modell für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Nach der Verifizierung der Änderung der Expression von Clusterin mittels semi-quantitativer RT-PCR konnte mittels Chromatinimmunoprecipitation nachgewiesen werden, dass das Histon-H3 in der Promoterregion von Clusterin nach der Hemmung der Ras/Raf/Mek/Erk-Kaskade in den SW480 Zellen verstärkt azetyliert ist. Im Gegensatz dazu ergab die Inhibierung des Signalweges keine Änderung des Gesamtazetylierungszustandes von Histon-H2A, H2B, H3 und H4. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass eine Aktivierung der Ras-abhängigen Signaltransduktion zur Inhibierung spezifischer Gene mittels epigenetischer Mechanismen führt.

The deregulation of signalling pathways mediated by oncogenic Ras is an important step during the development of colorectal carcinomas. The activation of Ras results in an alteration of gene expression. It is widely unknown, how epigenetic mechanisms are involved in this process. During this project we identified genes, which were induced after inhibition of the Ras/Raf/Mek/Erk-pathway as well as the histone deacetylation. Therefore, gene expression data (Affymetrix-Chips HG-U133A) from colon carcinoma cells treated either with U0126 or with TSA for 48 hours were used. Clusterin was selected as a model for further investigations. After verification of the changes in gene expression of clusterin we demonstrated by chromatinimmunoprecipitation, that the acetylation of histone H3 was increased in the promoter region of clusterin after inhibition of the Ras/Raf/Mek/Erk-signalling. In contrast we did not find a change of the global state of acetylation of histone H2A, H2B, H3 or H4. Therefore we conclude, that an activation of the Ras-dependent signalling results in a downregulation of specific genes by epigenetic mechanisms.

Projektleitung:

Dr. rer. nat. Karsten Jürchott
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536 194
Fax +49 30 450 536 909
karsten.juerchott@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité



4.4 Zelluläre Resistenz gegenüber onkogener Transformation

Wir haben die Genexpressionsprofile normaler Fibroblasten, die sich gegenüber der transformierenden Aktivität von Onkogenen resistent verhalten, mit denjenigen transformationsempfindlicher Zellen verglichen. Die resistenten Fibroblasten induzieren als Reaktion auf onkogene Ras-Expression vorzeitige Seneszenz. Dies stellt einen zellulären Sicherungsmechanismus dar, welcher Zellen mit onkogenem Insult vor der malignen Transformation schützt. Im Gegensatz dazu werden die transformationsempfindlichen Zellen unter diesen Bedingungen voll transformiert. Resistente Zellen exprimieren mehrere negative Wachstumsregulatoren, während diese in resistenten Zellen auf RNA-Ebene nicht nachweisbar sind. Gleichzeitig exprimieren sensitive Zellen verstärkt solche Gene, welche die Proliferation stimulieren. Wir schließen daraus, dass der Zustand der Präneoplasie durch die Balance positiver und negativer Wachstumsregulatoren charakterisiert ist. Der Verlust dieses Gleichgewichts ist die Voraussetzung für eine effiziente maligne Transformation. Eines der in der Onkogen-Resistenz involvierten Kandidatengene kodiert für das Protein SSeCKs, ein Hauptsubstrat der Protein-Kinase C mit Funktion in der zellulären Signalübertragung.

We have profiled gene expression in fibroblasts sensitive and resistant toward the transforming activity of oncogenes. The resistant fibroblasts respond to oncogenic RAS genes by inducing premature senescence, a failsafe mechanism essential for eliminating damaged cells at elevated risk for malignant transformation. In contrast, the sensitive cells expressing oncogenic RAS genes easily convert to fully malignant cells. Resistant cells are characterized by high expression of multiple negative growth regulators, while sensitive cells do not express them. Conversely, sensitive cells over-express a number of genes capable of stimulating growth. We conclude that preneoplasia is characterized by a largely perturbed balance of positive and negative growth regulators, which may be an important prerequisite for efficient malignant conversion. One of the candidate genes capable of modulating resistance toward oncogenes is SSeCKS, a major substrate of protein kinase C, involved in signal transduction.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Tchernitsa, O.I., Zuber, J., Sers, C., Brinckmann, R., Britsch, S.K., Adams, V. and Schäfer, R. (1999) *Gene expression profiling of fibroblasts resistant toward oncogene-mediated transformation reveals preferential transcription of redundant negative growth regulators.* *Oncogene*, 18, 5448-5454.



4.5 Transkriptionelle Determinanten der Progression, Metastasierung und Prognose beim Colonkarzinom

Das Projekt ist Teil eines Programms zur Erforschung der molekularen Grundlagen kolorektaler Tumoren, insbesondere der Mechanismen der organspezifischen Metastasierung und wird im Rahmen des Nationalen Genomforschungs-Netzwerks gefördert. Wir bestimmten in Colonkarzinom-Zelllinien mit definierten Mutationen im KRAS-Onkogen und dem TP53 Tumor-Suppressorgen die Veränderungen des Genexpressionsprofils, welche von Prozessen der onkogenen Signaltransduktion abhängig sind. Dazu wurden spezifische Signaleffektorproteine mit Hilfe von chemischen Inhibitoren oder kleinen interferierenden RNA-Molekülen (siRNA) blockiert. Das vertiefte Verständnis der Verschaltungen zwischen Signaltransduktion und Genkontrolle ist eine unerlässliche Voraussetzung für das Design effektiver Methoden zur therapeutischen Intervention und zur molekularen Diagnose.

The project is part of a program aiming at elucidating the molecular basis of colorectal tumors, particularly the mechanisms of organ-specific metastasis. It is supported by the National Genom Research Network in Germany (NGFN). We analysed colon cancer cell lines with defined mutations in the KRAS oncogene and the TP53 tumor suppressor gene for signaling pathway-specific alterations of gene expression using Affymetrix arrays. To study the role of intracellular signaling pathways in controlling gene expression and the malignant properties of cells, specific effector proteins were blocked by chemical inhibitors as well as by small interfering RNAs. Elucidating the network of signal transduction pathways and the wiring of gene control aids in designing better tools for molecular diagnosis and in defining novel ways for therapeutic intervention.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de



4.6 Onkogene Signalketten im Ovarialkarzinom

Obwohl Mutation im KRAS beim Ovarialkarzinom selten vorkommen, scheint die onkogene Aktivierung der RAS-vermittelten Signalketten die Teilungsfähigkeit und Malignität der Krebszellen zu bestimmen. Um die Auswirkung der RAS-Signalketten auf Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen, haben wir ein Zellkulturmodell bestehend aus normalen Ovarialepithelzellen und KRAS-transformierten Derivaten etabliert. Während die normalen Vorläuferzellen den epithelialen Phänotyp aufweisen, strikt ankerabhängig proliferieren und keine Tumoren bilden, machen die KRAS-transformierten Zellen die typische epithelio-mesenchymale Transition (EMT) durch, wachsen ankerunabhängig und sind hochgradig tumorigen. Das Modellsystem wurde benutzt, um den Einfluss verschiedener Signalinhibitoren, u.a. Farnesyltransferaseinhibitoren, Kinase-Inhibitoren und demethylierender Agenzien zu testen. Der maligne Phänotyp kann durch die Hemmung von Effektorkinasen effizient geblockt werden. Daher bilden die Kinasen interessante Angriffspunkte für die rationale Tumortherapie.

Although KRAS mutations are rare in ovarian carcinoma, several lines of evidence suggest that the oncogenic signaling pathway mediated by RAS proteins is the limiting process for mitogenesis and malignant transformation. To study the impact of RAS signaling on ovarian carcinoma cells, we have established a model system based on normal ovarian epithelial cells and KRAS-transformed derivatives. While the normal cells exhibit an epithelial phenotype, fail to initiate tumor growth in thymus-aplastic nude mice and to form colonies in soft agar medium, the KRAS-expressing cells undergo epithelial-mesenchymal transition, grow in an anchorage-independent manner and are highly tumorigenic. The model system is used for testing the effects of various inhibitors of signal transduction including farnesyltransferase inhibitors, effector kinase inhibitors as well as demethylating agents. The results of this study suggest that the malignant phenotype of the model cells as well as of cultured human ovarian carcinoma cells is sensitive toward inhibition by effector kinase inhibitors, thus defining new target structures for therapeutic intervention.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Berliner Krebsgesellschaft e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Tchernitsa, O.I., Sers, C., Zuber, J., Hinzmann, B., Grips, M., Schramme, A., Lund, P., Schwendel, A., Rosenthal, A. and Schäfer, R. (2004) *The transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated transformation in ovarian epithelial cells*. *Oncogene* 23, 4536-4555.
Sers, C., Tchernitsa, O.I., Zuber, J., Diatchenko, L., Zhumabayeva, B., Desai, S., Htun, S., Hyder, K., Wiechen, K., Agoulnik, A., Scharff, K.M., Siebert, P.M. and Schäfer, R. (2002) *Gene expression profiling in ras oncogene-transformed cell lines and in solid tumors using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays*. *Adv. Enzyme Reg.* 42, 63-82.



4.7 Modellierung von Signaltransduktion in Säugerzellen am Beispiel der RAS-Signalkaskaden

Das Projekt hat zum Ziel, die Struktur und Funktion intrazellulärer Signalkaskaden zu untersuchen. Der Ras-Signaltransduktionsweg ist von hoher klinischer Bedeutung und dient beispielhaft für experimentelle Studien und mathematische Modellierung. Signaltransduktionsketten sind hoch komplex, weil zentrale Schaltermoleküle mit zahlreichen Effektormolekülen in Wechselwirkung treten und durch Rückkoppelungen und kombinatorische Effekte beeinflusst werden. Darüber hinaus beeinflusst die Signaltransduktion die Transkriptionskontrolle. Wir erstellen genomweite Genexpressionsprofile mit Hilfe von cDNA Microarrays, um die Wirkung von Inhibitoren der Signalketten auf das genetische Programm zu untersuchen. Der Aktivitätszustand von Effektoren unterhalb von Ras-Proteinen wird in zellulären Extrakten mittels Immunoblot unter Verwendung von Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen der Effektorinasen bestimmt. Mit Hilfe mathematischer Modellierung definieren wir jene Prinzipien der Signalverstärkung und kombinatorischen Signalverarbeitung, welche die durch Ras-Proteine vermittelten zellulären Eigenschaften, insbesondere neoplastische Transformation, Zellüberleben und Proliferation kontrollieren.

The project aims at understanding the structure and function of intracellular signaling cascades. The Ras signaling pathway is of great clinical importance in human cancer and will be used as a paradigm for experimental studies and mathematical modeling. Signal transduction pathways are highly complex, since central switch molecules such as Ras proteins can interact with a multitude of effector molecules. Signal transduction processes from membrane to the nucleus are subject to feedback controls and combinatorial effects. Most importantly, signaling impinges on the genetic program of cells. To dissect signaling pathways via different effector kinases downstream of Ras, we use genome-wide expression profiling techniques (cDNA-microarrays) for analyzing the effects of signaling inhibitors on target gene activity. The activation status of effector kinases is determined in cellular lysates by immuno-blotting using antibodies against phosphorylated forms of the kinases. By mathematical modeling we define principles of signal input amplification and combinatorial signal processing resulting in Ras-induced cellular properties such as neoplastic transformation, cell survival, and proliferation.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Zuber, J., Tchernitsa, O.I., Hinzmann, B., Schmitz, A.C., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A., and Schäfer, R. (2000) *A genome-wide survey of Ras transformation targets*. Nature Genetics, 24, 144-152.
Sers, C., Tchernitsa, O.I., Zuber, J., Diatchenko, L., Zhumabayeva, B., Desai, S., Htun, S., Hyder, K., Wiechen, K., Agoulnik, A., Scharff, K.M., Siebert, P.M. and Schäfer, R. (2002) *Gene expression profiling in ras oncogene-transformed cell lines and in solid tumors using subtractive suppression hybridization and cDNA arrays*. Adv. Enzyme Reg. 42, 63-82.



4.8 Modellierung von Signalkaskaden am Beispiel der RAS-Signalkette

Ras-Signalketten koppeln unterschiedliche extrazelluläre Reize mit dem genetischen Programm von Säugerzellen. Als Folge der Stimulierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren oder intrinsischer aktivierender Mutationen werden Ras-Signalketten transient bzw. permanent aktiviert und steuern diverse Prozesse in der Kontrolle der Proliferation, des Zellüberlebens und der Differenzierung. Die mathematische Modellierung dieser Signalketten ist relevant für die Beantwortung genereller Fragen wie Schalterverhalten, Bistabilität, Rückkopplung, kombinatorische Balance, Signalspezifität und Cross-Talk, nicht zuletzt wegen der erheblichen klinischen Bedeutung der onkogen aktivierten Ras-Signaltransduktion bei Krebserkrankungen. Für den Erfolg und die Relevanz der Signalketten-Simulation ist jedoch die Identifizierung und Manipulation experimentell belastbarer Parameterwerte essentiell. In der kommenden Förderperiode sollen drei miteinander verknüpfte Fragestellungen im Mittelpunkt stehen: 1. Zeigen die Signalkaskaden Schalterverhalten oder Bistabilität? 2. Wie induzieren negative Rückkopplungen eine komplexe Aktivierungsdynamik? 3. Wie werden durch die Netzwerkstruktur Entscheidungsbilanzen realisiert? (2. Förderperiode SFB 618).

Ras signalling integrates different extracellular stimuli with the genetic program in mammalian cells. Ras signalling cascades are transiently activated by tyrosine receptor kinase stimulation through growth factors. Intrinsic activating mutations within the pathway result in permanent pathway activity and control diverse processes in proliferation control, survival and malignancy. Mathematical modelling of signalling events is of relevance for understanding general phenomena such as switch-like behaviour, bistability, feedback, combinatorial balance, signalling specificity and cross-talk. The identification and manipulation of experimental parametric values is essential for successful computational modelling of signal transduction. Main questions asked: 1. Do signalling cascades exhibit switch-like behaviour or bistability? 2. How do negative feedback loops induce complex dynamics of activation? 3. How does the network structure impinge on the balance between alternate outputs? (2nd funding period of special research program SFB 618).

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Schäfer, R., Tchernitsa, O.I., Zuber, J. and Sers, C. (2003) *Dissection of signal-regulated transcriptional modules by signaling pathway interference in oncogene-transformed cells*. Adv. Enzyme Reg. 43, 379-392.

Tchernitsa, O.I., Sers, C., Zuber, J., Hinzmann, B., Grips, M., Schramme, A., Lund, P., Schwendel, A., Rosenthal, A. and Schäfer, R. (2004) *The transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated transformation in ovarian epithelial cells*. Oncogene 23, 4536-4555.

Kielbasa, S.M., Blüthgen, N., Sers, C., Schäfer, R., Herzel, H. (2004) *Prediction of cis-regulatory elements of coregulated genes*. Genome Inform Ser Workshop Genome Inform., 15, 117-24.

Legewie, S., Blüthgen, N., Schäfer, R., Herzel, H. (2005) *Supersensitization. Switch-like behavior of cellular signalling by transcriptional induction*. PloS Computational Biology, 1 (5), e54.

Raudies, O., Kuban, R.-J., Hamacher, F., Klein-Hitpass, L., Tchernitsa, O.I., Sers, C., Herzel, H.-P. and Schäfer, R. (2005) *Functional analysis and secondary expression profiling of candidate genes deregulated in conjunction with oncogenic Ras signaling*. Adv. Enzyme Reg., 45/1, 63-84



4.9 Genexpressionsprofile in der malignen Transformation - von der molekularen Signatur zur Genfunktion

Schon seit Mitte der 80er Jahre ist bekannt, dass ca. 1000 Transkriptionseinheiten mit der malignen Transformation assoziiert sind. Mit Hilfe neuer Methoden zur Expressionsanalyse, u.a. der Microarray-Technologie und effizienten cDNA Subtraktionstechniken, konnten hunderte von Kandidatengenen in Modellen der RAS-Onkogen-induzierten Transformation in Epithelzellen und Fibroblasten identifiziert werden. Im Prozess der malignen Transformation werden diese Gene transkriptionell stimuliert oder reprimiert. Das vorliegende Projekt hat zum Ziel, den Beitrag der hoch regulierten Gene und einer Auswahl der reprimierten Gene zur malignen Transformation mit Hilfe der RNA-Interferenz in Kombination mit robusten zellbiologischen Tests zu ergründen. Die Vorversuche lassen erwarten, dass wir essentielle und modifizierende Funktionen hoch regulierter Gene unterscheiden können, in dem wir die Effekte der RNAi-vermittelten Ausschaltung auf zelluläre Parameter bestimmen, welche für RAS-transformierte Zellen charakteristisch sind. Dazu zählen Zellgestalt, epithelial-mesenchymale Transition, Proliferation, Adhäsionsverhalten und Invasivität. Parallel dazu sind auch traditionelle Funktionstests nach forcierter Expression der Kandidaten in transformierten Zellen geplant. Schlussendlich soll die Wirkung der positiv getesteten Gene auf das Expressionsprogramm der Zellen mit Hilfe eines spezifischen cDNA-Microarrays überprüft werden, um ein systembiologisches Verständnis der Krebszelle zu ermöglichen.

Since the mid-eighties it is well known that approx. 1,000 transcription units (genes) are associated with malignant transformation. New methods for expression profiling such as microarray technologies and efficient cDNA subtraction techniques have permitted to identify hundreds of candidate genes in models of RAS oncogene-induced transformation of fibroblasts and epithelial cells. These genes were stimulated or repressed at the level of transcription during the process of malignant conversion. Project objectives are to characterize the contribution to neoplasia of up-regulated genes and of selected down-regulated genes by an integrated approach based on RNA interference and robust cellular assays. Previous results have suggested that essential and modifying functions are distinguishable by monitoring RNAi effects on cellular morphology, epithelial-mesenchymal transition, proliferation, adhesion and invasion. In parallel, we will perform conventional gene function assays based on forced expression of the candidate genes in transformed cells. Finally, we will determine the effects of candidates on the genetic program using customized microarrays in order to contribute to an understanding of the systems biology of cancer cells.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Krebshilfe e.V.

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Schäfer, R., Tchernitsa, O.I., Zuber, J. and Sers, C. (2003) *Dissection of signal-regulated transcriptional modules by signaling pathway interference in oncogene-transformed cells*. Adv. Enzyme Reg. 43, 379-392.
Tchernitsa, O.I., Sers, C., Zuber, J., Hinzmann, B., Grips, M., Schramme, A., Lund, P., Schwendel, A., Rosenthal, A. and Schäfer, R. (2004) *The transcriptional basis of KRAS oncogene-mediated transformation in ovarian epithelial cells*. Oncogene 23, 4536-4555.
Raudies, O., Kuban, R.-J., Hamacher, F., Klein-Hitpass, L., Tchernitsa, O.I., Sers, C., Herzel, H.-P. and Schäfer, R. (2005) *Functional analysis and secondary expression profiling of candidate genes deregulated in conjunction with oncogenic Ras signaling*. Adv. Enzyme Reg., 45/1, 63-84.
Schäfer, R., Tchernitsa, O.I. and Sers, C. (2006) *Global effects of Ras signaling on the genetic program in mammalian cells*. In: RAS Family GTPases, pp. 169-193. Springer



4.10 Differentiell exprimierte Gene in RAS-Onkogen-transformierten Zellen

Ras Mutationen zählen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in Tumoren unterschiedlichen Typs. Ras Proteine wirken als zentrale Schalter in intrazellulären Signalprozessen, welche das genetische Programm sowie zentrale zelluläre Eigenschaften (z. B. Teilungsfähigkeit, Differenzierung) steuern. Genetische Defekte in den Ras Proteinen selbst sowie entsprechende Veränderungen in oberhalb und unterhalb des Schalters angeordneten Signaleffektoren (z. B. Tyrosinkinase-Rezeptoren, Effektorinasen) führen zur permanenten Aktivierung der Signalprozesse und Onkogenese. Wir untersuchen systematisch die ableitenden Signalwege, ihre Komponenten sowie deren Regulation und die Zielgene (Targets), welche die Endpunkte der Signalwege darstellen und die zellulären Eigenschaften direkt bestimmen. Verschiedene experimentelle Strategien werden benutzt, um primäre, funktionell wichtige von sekundären Targets zu unterscheiden. Detaillierte Kenntnisse über die funktionell essentiellen Targets sind wichtig, um neue Therapieoptionen im Sinne der Signalweg-Interferenz und neue Ansätze in der Diagnostik vorzubereiten.

Ras mutations represent the most common genetic alterations in different types of tumors. Ras proteins act as central switches in intracellular signaling processes, which regulate the genetic program and control essential cellular properties such as cell growth and differentiation. Defects in Ras proteins as well as alterations in upstream or downstream signaling effectors (e.g. tyrosine kinase receptors, cytoplasmic effector kinases) result in permanent signal activation and oncogenesis. We systematically analyze effector pathways downstream of the Ras switch and their targets, which serve as the endpoints of signal transduction and directly execute cellular properties. We employ different experimental strategies for distinguishing primary and secondary targets. A detailed understanding of functionally essential targets is instrumental for designing novel therapy options related to signalling interference and diagnostic approaches.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Reinhold Schäfer
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450 536072
Fax +49 30 450 536909
reinhold.schaefer@charite.de

Fördereinrichtung:

Industrie

Online-Informationen:

mtp.charite.de

Publikationen:

Ülkü, A.S., Schäfer, R. and Der C.J. (2003) *Essential role of Raf in Ras transformation and deregulation of matrix metalloprotease expression in ovarian epithelial cells*. Molecular Cancer Research 1, 1077-1088.
Raudies, O., Kuban, R.-J., Hamacher, F., Klein-Hitpass, L., Tchernitsa, O.I., Sers, C., Herzelt, H.-P. and Schäfer, R. (2005) *Functional analysis and secondary expression profiling of candidate genes deregulated in conjunction with oncogenic Ras signaling*. Adv. Enzyme Reg., 45/1, 63-84.
Schäfer, R., Tchernitsa, O.I. and Sers, C. (2006) *Global effects of Ras signaling on the genetic program in mammalian cells*. In: RAS Family GTPases, pp. 169-193. Springer



4.11 Genomweite Expressions- und DNA Methylierungsanalyse von Zielgenen des RAS Onkogens

In diesem Projekt wurde der Einfluss der RAS abhängigen Signalübertragung auf die transkriptionelle Regulation der Genexpression untersucht. Wir haben Genom-weite Expressionsmuster von Genen identifiziert die als Folge eines aktivierten RAS Onkogens über- oder unterexprimiert werden. Während der Mechanismus der RAS-abhängigen Gen-Aktivierung gut untersucht ist, ist völlig unbekannt wie Gene durch RAS-Signalwege supprimiert werden. Bislang gibt es nur wenig Information über Netzwerke von Genen, die gemeinsam über bestimmte Signalwege reguliert werden. Die Expression von mehr als 100 Genen wurde in RAS-transformierten FE-8 Zellen nach Behandlung mit 5-aza 2 deoxycytidine (5-aza-CdR) mittels Northern Blot untersucht. Weiterhin konnten wir mittels Microarray Analyse zusätzliche Gene identifizieren, deren Expression nach 5-aza-CdR Behandlung aktiviert wird. Überraschend war die Beobachtung, dass ein Teil der Gene, die nach 5-aza-CdR Behandlung aktiviert werden, bereits zuvor als Zielgene des RAF-MAP-ERK Weges identifiziert worden waren. Von vier dieser Gene ist die Promoter Sequenz des Ratten Gens bekannt und es wurde damit begonnen eine Methylierung dieser Promotoren in FE-8 Zellen zu untersuchen. Weiterhin nutzen wir Ratten Fibroblasten mit einem induzierbaren HRAS Onkogen um den Mechanismus der Genregulation über den RAF-MAP-ERK Weg und DNA-Methyltransferase zu analysieren.

The impact of RAS-signaling dependent transformation on the transcriptional regulation of genes was analysed. We have established genome-wide patterns of genes up- and down-regulated in response to activated RAS oncogenes. Whereas the mechanism of gene activation by RAS-dependent signaling has been studied fairly well, the mechanism by which genes are down-regulated in response to RAS activation is unknown. Up to now, there is only limited information about networks of genes commonly regulated by distinct signaling pathways. We have analysed the expression of more than 100 down-regulated genes using Northern Blot analysis in FE-8 cells after treatment of the cells with 5-aza 2 deoxycytidine (5-aza-CdR). In addition, we identified further 5-aza-CdR-responsive genes by hybridizing mRNA derived from treated cells to a micorarray consisting of several thousand oligonucleotides. Surprisingly, a subset of genes, which where up-regulated after de-methylation in FE-8 cells have been identified earlier as targets suppressed via the RAF-MAP-ERK pathway. The promoter sequence within the rat genome is available for four of these genes and we have now begun to investigate whether these regulatory regions are methylated in FE-8 cells. We are using a rat fibroblast system harbouring an inducible oncogenic HRAS to identify the mechanism of suppression involving an activated RAF-MAP-ERK pathway and DNA methyltransferase. Promoter sequences of co-regulated genes will be identified in silico.

Projektleitung:

PD. Dr. Christine Sers
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49-30-450-536185
Fax +49-30-450-535909
christine.sers@charite.de

Fördereinrichtung:

Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft

Publikationen:

Zuber, J., Tchernitsa, O.I., Hinzmann, B., Schmitz, A.-C., Grips, M., Hellriegel, M., Sers, C., Rosenthal, A., and Schäfer, R. *A genome-wide survey of Ras transformation targets*. Nature Genet., 24: 144-152, 2000.

Oncogenic HRAS suppresses Clusterin and MMP2 expression through epigenetic modification Per Lund, Karen Weißhaupt, Thomas Mikeska, Diana Jammias, Xiahua Chen, Ralf-Jürgen Kuban, Ute Ungethüm, Ulf Krapfenbauer, Hans-Peter Herzel, Reinhold Schäfer, Jörn Walter, Christine Sers Oncogene, in press 2006



4.12 Funktionelle Analyse konservierter regulatorischer DNA Sequenzen in der Regulation von MEK/ERK Zielgenen

Für die Identifizierung funktionaler Transkriptionsfaktor-Module aus theoretischen Analysen bedarf es der Entwicklung neuer Algorithmen. Ansätze wie lineare oder logistische Regression und Methoden des statistischen Lernens (z. B. Bayes-Netze) werden getestet. Ziel ist es, Hypothesen zu generieren, welche Module von Transkriptionsfaktoren in welchen biologischen Prozessen eine Rolle spielen (AG Vingron). Im Rahmen des SFB 618 soll durch eine Kollaboration zwischen den AGs Vingron und Sers das theoretische Wissen auf einen konkreten biologischen Prozess angewendet werden. Für die genomweite Erfassung RAS-abhängiger Veränderungen der Genexpression wurden in der AG Sers Genexpressionsprofile humaner, RAS-transformierter Zellen im Vergleich zu den immortalen Ausgangszellen erstellt. Durch pharmakologische Hemmung des MEK-Signalweges wurden Gengruppen identifiziert, deren Expression reversibel über MEK1/2 aktiviert oder gehemmt wird. Für die Identifizierung der Mechanismen der MEK-Signalweg-abhängigen Genregulation, sollen die Promotorbereiche der MEK-abhängig regulierten Gene identifiziert werden. Diese Sequenzen werden auf konservierte Bindungsstellen hin untersucht. Die Bedeutung potentiell daran bindender Transkriptionsfaktoren soll mittels siRNA-vermittelter Expressionshemmung und mittels Chromatin-Immunpräzipitation in Kombination mit einer Array-Analyse (ChIP-on-chip) nachgewiesen werden.

New algorithms will have to be developed to allow the recognition of functional transcription factor modules via theoretical analyses. For this purpose, methods like linear and logistic regression as well as Bayes networks will be used. The aim is to generate hypotheses about which transcription factors are relevant in distinct biological processes (M. Vingron). In the context of the SFB618, the theoretical knowledge will be used for the detailed analysis of a certain biological system during a collaboration between the groups of M. Vingron and C. Sers. Genome-wide expression profiles demonstrating transcriptional alterations in response to oncogenic RAS have been performed in the group of C. Sers. Pharmacological interference with the MEK/ERK signaling pathway revealed distinct groups of genes which are either stimulated or inhibited via MEK1/2. For the analysis of the mechanisms of MEK/ERK-dependent transcriptional control, the promoter regions of genes regulated in a MEK/ERK-dependent way will be identified. These promoter regions will be analyzed for the presence of conserved transcription factor binding motifs. The functional relevance of transcription factors will be further investigated via siRNA-dependent knock-down of individual factors and via chromatin immunoprecipitation analysis in combination with microarray analysis (ChIP-on-chip).

Projektleitung:

PD. Dr. Christine Sers
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49-30-450-536185
Fax +49-30-450-535909
christine.sers@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Publikationen:

Functional analysis and secondary profiling of candidate genes deregulated in conjunction with oncogenic Ras signaling Oliver Raudies, Ralf-Jürgen Kuban, Frank Hamacher, Ludger Klein-Hitpass, Olegl Tchernitsa, Christine Sers, Hans-Peter Herzel, Reinhold Schäfer *Adv Enzyme Regul.* 45:63-84 (2005)

Prediction of cis-regulatory elements of coregulated genes Szymon Kielbasa, Nils Bluethgen, Christine Sers, Reinhold Schäfer, Hanspeter Herzel *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.* 15:117-124 (2004)

Exploring potential target genes of signaling pathways by predicting conserved transcription factor binding sites. Dieterich, C, Herwig, R, Vingron, M *Bioinformatics*, 2003, Suppl2: I150-I156



5

Diagnostische Pathologie

**Medizinische
Informationsverarbeitung**

Telepathologie



5.1 Infrarot-navigierte Mikrodisektion zur Klonalitätsdiagnose in soliden Tumoren

Das Verfahren der Laser-Mikrodisektion hat neue Möglichkeiten für nicht-interventionelle Untersuchungen zur Genetik und Genexpression in morphologisch homogenen ex vivo gewonnenen Zellpopulationen eröffnet. Die Identifikation spezifischer Gewebsregionen bedarf gegenwärtig noch verschiedener Färbeverfahren welche häufig die Probenintegrität und die präparative Ausbeute beeinträchtigen. Neue Infrarot (IR)-spektroskopische Techniken liefern morphologisch und biochemisch informative mikroskopische Bilder ungefärbter Proben aus räumlich aufgelösten Spektren ohne Verlust der molekularen Integrität. Der Antragsteller hat ein kombiniertes Verfahren auf IR-spektroskopischer Darstellung basierender Mikrodisektion entwickelt bei dem Gefrierschnitte auf minimal IR-absorbierenden Trägern getrocknet werden und so undegradiert mikrodiseziert werden können. Das Projekt soll dieses Verfahren im Kontext der Echtzeit-PCR mitochondrialer Mutationen zur Klonalitätsanalyse solider Tumoren evaluieren. An dieser molekularpathologisch relevanten Fragestellung sollen die Vorteile nicht-degradativer mikroskopischer Darstellung für Laser-Mikrodisektionsverfahren gezeigt werden.

Laser-assisted microdissection (LMD) has opened new possibilities for the non-interventional study of complex genetics and expressional states in morphologically homogeneous cell population obtained from ex-vivo tissue samples. However, identifying regions of interest in tissue sections currently requires various stains often detrimental to sample integrity and preparative yield. Novel IR-spectroscopic techniques provide biochemically and morphologically informative microscopic mapping of native unstained biological samples which could avoid artifactual sample degradation while at the same time providing uncharted detail derived from spatially resolved spectral information on the sample s biochemistry. The applicant has recently developed an integrative technology of IR-spectroscopic imaging and subsequent laser-microdissective isolation of the same tissue. Cryostat sections are mounted on minimally IR-absorptive sub-micron transparent carriers and rapidly desiccated thus ensuring minimal degradation and sample conditions compatible with IR-mapping and LMD. It is proposed to apply this methodology to clonality assessment using quantitative real-time melting curve analyses of mitochondrial mutations as markers for mono- and oligoclonality in solid tumors. The proposed project is aimed at demonstrating the conceptual and applicative advantage of combining non-degradative imaging with LMD in a testbed relevant to molecular pathologic research and diagnostics.

Projektleitung:

Dr. Dr. Konrad Kölbl
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450536054
Fax 450536910
konrad.koelble@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Kölbl K (2002) *Microdissection system I60053PCT Kölbl K (2000) The LEICA microdissection system: design and applications.* J Mol Med 78: B24
Fabian H, Lasch P, Boese M, Haensch W (2002) *Mid-IR microspectroscopic imaging of breast tumor tissue sections.* Biopolymers (Biospectroscopy) 67: 354
Schultz CP (2002) *The potential role of Fourier transform infrared spectroscopy and imaginh in cancer diagnosis incorporating complex mathematical models.* Techn Cancer Res Treatm 1: 95
Wetzel DL, LeVine S (1999) *Imaging molecular chemistry with infrared microscopy.* Science 185:1224



5.2 Matching histologischer Bilder

State of research The Virtual Slide (VS), as the term for a digital data set that corresponds to a real glass slide, is mainly known from the telepathological frozen section diagnosis. Introducing the VS into routine pathology failed up to now for several reasons. The high resolution images are too large (up to 10 GB), and the necessary functionality is still missing. Own preparatory work A Virtual Microscope software has already been developed as a prototype within the sub-project Virtual histology course of the Meducase project at the Charité. This system gets customized for the implementation of the matching routine by adjusting the user interface and the design of the data base. The same project has also run a study on file sizes and expected data volumes of the images.

Aims The project targets on the development of algorithms resp. software tools for the automatic matching of histology images without any interaction. This might include a scaling and simple geometric equalization of the images. The result of the matching are one or more geometrically accurately corresponding histology images of one preparation in several stains. This allows the synchronous visualization of several stains of one VS either through semi-transparent visualization or through direct switching to other stains. Moreover this technique allows the creation of difference images and other visual data that supports the pathologists diagnosis.

State of research The Virtual Slide (VS), as the term for a digital data set that corresponds to a real glass slide, is mainly known from the telepathological frozen section diagnosis. Introducing the VS into routine pathology failed up to now for several reasons. The high resolution images are too large (up to 10 GB), and the necessary functionality is still missing. Own preparatory work A Virtual Microscope software has already been developed as a prototype within the sub-project Virtual histology course of the Meducase project at the Charité. This system gets customized for the implementation of the matching routine by adjusting the user interface and the design of the data base. The same project has also run a study on file sizes and expected data volumes of the images.

Aims The project targets on the development of algorithms resp. software tools for the automatic matching of histology images without any interaction. This might include a scaling and simple geometric equalization of the images. The result of the matching are one or more geometrically accurately corresponding histology images of one preparation in several stains. This allows the synchronous visualization of several stains of one VS either through semi-transparent visualization or through direct switching to other stains. Moreover this technique allows the creation of difference images and other visual data that supports the pathologists diagnosis.

Projektleitung:

Kai Saeger

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie

Tel. 450-536188

Fax 450-536910

kai.saeger@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Wolf G, Petersen D, Dietel M, Petersen I. *Telemicroscopy via Internet*. Nature, 1998, 391:613-614.

Petersen I, Wolf G, Roth K, Schlüns K. *Telepathology by the Internet*. J. Pathol. 2000 May; 191(1):8-14.

Felten, C L et al.: *Virtual Microscopy: High Resolution Digital Photomicrography as a tool for light microscopy simulation*. Hum. Pathol. 1999; 30 (4); 477-83.

Ferreira R, Moon B, Humphries J, Sussman A, Saltz J, Miller R, Demarzo A. *The Virtual Microscope*. Proc. AMIA Annu. Fall Symp. 1997;:449-53.

Furness P: *The use of digital images in Pathology*. J. Pathol. 1997; 183; 253-63.



5.3 Unterschiede in der zervikalen Karzigenese durch HPV 16 und HPV 18-Dysregulation

Die genitale Infektion mit HPV16 oder HPV18 ist mit einem hohen Risiko der Entstehung eines Zervixkarzinoms vergesellschaftet. Man weiß, dass HPV18 häufiger in Adenokarzinomen als in Plattenepithelkarzinomen gefunden wird und das HPV18-positive Karzinome (unabhängig vom histologischen Typ) aggressiver sind als solche, in denen HPV16 nachweisbar ist. Dies lässt vermuten, dass die Pathogenese von HPV18-induzierten Tumoren anderen Wegen folgt als die der HPV16-induzierten Karzinome. Nach eigenen Untersuchungen ist Nucleolin für den onkogenen Effekt von HPV18 bedeutsam. Wir planen, an zwei definierten Kollektiven (HPV16 vs. HPV18) zervikaler intraepithelialer Neoplasien verschiedener Grade (CINI-III) und invasiver zervikaler Karzinome (Adeno- und Plattenepithelkarzinome) zu untersuchen, ob Zellzyklusregulatoren wie Rb und p16 sowie p53 in unterschiedlicher Weise exprimiert werden und ob es Differenzen in der DNA-Verteilung gibt.

Infection with HPV16 or HPV18 bears a high risk for the development of cervical cancer. HPV18 infection is associated with a more aggressive form of cervical cancer and it is the most prevalent type in cervical adenocarcinoma. Therefore, the pathogenesis of cervical carcinoma seems to be different in HPV16 and HPV18 positive cases. We have recently shown that nucleolin is directly linked to HPV18-induced cervical carcinogenesis. In this study we would like to investigate the differences in HPV16 and HPV18 driven cervical carcinogenesis more in depth. In a collection of cervical intra-epithelial neoplasias (of various types) and invasive carcinomas (squamous and adeno), we will define the HPV type by PCR and then investigate the expression of cell cycle regulators like p16 and Rb as well as p53. Moreover, we will analyze the DNA distribution by DNA image cytometry.

Projektleitung:

Dr.rer.nat. Christiane Schewe
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450536106
Fax + 49 30 450536916
christiane.schewe@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité



5.4 Qualitätssicherungs-Initiative Pathologie (QuIP) Diagnostische Molekularpathologie TBC-PCR Ringversuch

Forschungen auf dem Gebiet der Molekularpathologie bildeten die Voraussetzung für dieses Projekt. Dazu gehören als Vorarbeiten molekulare Nachweise von Infektionserregern aus Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Material, speziell Untersuchungen zur Korrelation zwischen Infektionserregern und der Ätiopatogenese des Morbus Crohn und Untersuchungen an Epitheloidzellgranulomen. Das Institut ist an Ringversuchen beteiligt, welche die Qualitätssteigerung entsprechender PCR-Nachweise zum Ziel hat, ist Referenzzentrum für solche Untersuchungen und hat speziell im Falle der Tbc-Erreger die Leitung eines externen bundesweiten Ringversuches übernommen. Dieser externe Ringversuch geht auf die Initiative der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und des Berufsverbandes Deutscher Pathologen zurück. 4 Panellabore (Pathologie CCM, Forschungszentrum Borstel, TU Dresden, KH München Bogenhausen) haben in einem internen Ringversuch die Voraussetzungen für Qualitätsstandards und einen Probenpool geschaffen. Der Ringversuch ist vorerst für einen Zeitraum von 2 Jahren geplant und externe Laboratorien sind aufgefordert, an dieser Qualitätssicherungsinitiative teilzunehmen. Organisatorisch und inhaltlich wird das Projekt von der Fa. oligene GmbH (www.oligene.com) begleitet. Vom Projekt werden neue Erkenntnisse in der Tbc-Diagnostik sowie der Qualitätssicherung und standardisierten Einführung von evaluierten molekularbiologischen Nachweisverfahren in der Pathologie erwartet.

The present study is based on an initiative for quality assurance (QuIP) of the German Society of Pathology and the Professional Association of German Pathologist (www.mh-hannover.de/institute/pathologie/dpg/). Four laboratories with experience and expertise in PCR detection of Mycobacterium tuberculosis were selected to establish the prerequisite for continuous external laboratory trial. In an internal trial the laboratories test their own reliability and reproducibility. A high degree of inter-laboratory reliability was achieved. Recommendations for applying PCR-based methodology for detection of mycobacterial DNA in surgical specimens of pathology are provided (Schewe et al 2005 Virchows Arch 2005). Supplementary data are available online at <http://www.charite.de/ch/patho> (rubrik "Forschung"). Now pre-tested specimens can be ordered from the steering laboratory (Pathologie CCM) via oligene GmbH (www.oligene.com). External laboratories are invited to participate in this quality assurance initiative.

Projektleitung:

Dr. rer. nat. Christiane Schewe
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. +49 30 450536106
Fax + 49 30 450536916
christiane.schewe@charite.de

Fördereinrichtung:

Oligene GmbH

Online-Informationen:

www.oligene.com/interlaboratory_tests_QuIP.160.0.html

Publikationen:

Schewe C; Goldmann T; Grosser M; Zink A; Schlüns K; Pahl S; Ulrichs T; Kaufmann SH; Nerlich A; Baretton GB; Dietel M; Vollmer E; Petersen I: *Inter-laboratory validation of PCR-based detection of Mycobacterium tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*. Virchows Arch (2005) 447:573-585

Projektskizze:

[TBC-PCR Ringversuch.pdf](#)



5.5 Entwicklung und Implementierung eines semantikorientierten Pathologie Retrieval Systems für Lungenerkrankungen

Entwicklung eines prototypischen Systems für die Verarbeitung und Retrieval von Bildbeschreibungen in der Pathologie, speziell für Lungenerkrankungen. Die Informationen werden durchgehend semantisch annotiert, was eine Recherche nach Inhalten ermöglicht.

Development of a prototypic system for retrieval of descriptions of images and reports in pathology, esp. lung pathology. The information is consequent semantic orientated and allows a retrieval for content.

Projektleitung:

Dr. med. Thomas Schrader
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536113
Fax 450-536910
thomas.schrader@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Online-Informationen:

www.inf.fu-berlin.de/inst/ag-nbi/research/swpatho/



6

Medizingeschichte



6.1 Leopoldina Korrespondenz um 1750

Das Projekt zielt auf eine Analyse der grundlegenden Kommunikationsinhalte und der basalen Organisationsstrukturen der Deutschen Akademie der Naturforscher (Leopoldina) um 1750. Im Zentrum des Vorhabens steht die Erschließung und Bearbeitung der Kernkorrespondenz zwischen den führenden Leopoldina-Repräsentanten in dieser Zeit, dem zunächst in Erfurt und ab 1745 in Halle lehrenden Professor der Medizin Andreas Elias Büchner (1701-1769) und dem in Nürnberg tätigen Arzt und Naturforscher Christoph Jacob Trew (1695-1769). Zwischen 1744 und 1769 verfassten Büchner und Trew füreinander mindestens 101 Briefe, die sich heute im Archiv der Universitätsbibliothek Erlangen erhalten haben. Weitere wertvolle Quellen finden sich im Archiv der Leopoldina in Halle. Die Ergebnisse der Studie wird in einer umfangreichen monographischen Analyse mit einer integrierten historisch-kritischen Edition der Schriftstücke vorgelegt. Mit der Veröffentlichung wird es möglich sein, ein wesentlich differenzierteres Bild der Leopoldina im Jahrhundert der Aufklärung zu zeichnen.

The project aims at the analyzation of basic communicative contents and structures of the German Academy of Natural Scientists (Leopoldina) around 1750. In a first step the medical and natural scientific network of correspondence will be reconstructed and investigated for that period. The core of the work will be formed by studying the correspondence of the then leading representatives of the Leopoldina, Andreas Elias Büchner (1701-1769), medical professor in Erfurt and Halle, and Christoph Jacob Trew (1695-1769), physician and ambitious natural scientist in Nuremberg. Between 1744 and 1769 Büchner and Trew exchanged at least 101 letters, which are archived in the manuscript department of the university library of Erlangen today. The archive of the Leopoldina, situated in Halle, holds additional very valuable material to be included into the study. The project will be realized in a larger monography with an integrated historical critical edition of the Büchner-Trew correspondence which will also contain important letters from further correspondents. The publication will generate a new historcal picture of the Leopoldina in mid 18th century.

Projektleitung:

Univ.Prof.Dr. Thomas Schnalke
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536077
Fax 450-536905
thomas.schnalke@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Publikationen:

Thomas Schnalke: *Die korrespondierende Akademie - Organisation und Entwicklung der Leopoldina um 1750*. In: Benno Parthier und Dietrich v. Engelhardt (Hg.): 350 Jahre Leopoldina - Anspruch und Wirklichkeit. Festschrift der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina 1652-2002. Halle (Saale) 2002, 95-119



6.2 Wissensvernetzung und Wissenschaftsorganisation jenseits der Universitäten: Die Leopoldina-Korrespondenz um 1750

Das medizinhistorische DFG-Projekt zielt auf die Edition und erste Auswertung der Kernkorrespondenz der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina um 1750. Bis 2005 konnten 140 Briefe und Briefentwürfe der führenden Repräsentanten der Leopoldina, Andreas Elias Büchner (1701-1769) und Christoph Jacob Trew (1695-1769) transkribiert, kommentiert und über ein Register erschlossen werden. Es gelang zudem, relevante Drittkorrespondenten mit relevanten Briefpassagen in die Briefedition zu integrieren. Die Auswertung zielt auf eine Analyse der inneren Struktur der Akademie und des Beitrags der gelehrten Gesellschaft zur Wissenschaftsorganisation im Jahrhundert der Aufklärung. Derzeit wird das Manuskript zum Druck vorbereitet.

The DFG-project aims at the edition and a basic analysis of the core correspondence of the Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina around 1750. Until 2005 around 140 letters and drafts of the two leading representatives of the Leopoldina--Andreas Elias Büchner (1701-1769) and Christoph Jacob Trew (1695-1769)--have been transcribed. Comments have been written and various registers established. The analysis focuses on the internal structures of the learned society and the contribution of the academy to the organization of spheres of science and knowledge in the period of Enlightenment. Currently, the manuscript is finished for publication.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Thomas Schnalke
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536077
Fax 450-536905
thomas.schnalke@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Forschungsgemeinschaft e.V.

Online-Informationen:

www.bmm.charite.de

Publikationen:

Thomas Schnalke: *Die korrespondierende Akademie - Organisation und Entwicklung der Leopoldina um 1750*. In:

Parthier, Benno und Dietrich von Engelhardt (Hg.): *350 Jahre Leopoldina - Anspruch und Wirklichkeit*. Halle (Saale) 2002, S. 95-119

Thomas Schnalke: *Wissenskommunikation und Wissenschaftsorganisation jenseits der Universitäten. Die Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina um 1750* im Spiegel der Korrespondenz zwischen Andreas Elias Büchner und Christoph Jacob Trew. In:

Döring, Detlef und Kurt Nowack (Hg.): *Gelehrte Gesellschaften im mitteldeutschen Raum (1650-1820). Teil II*. Stuttgart u. Leipzig 2002, S. 73-94

Thomas Schnalke: *Leopoldina intern. Die Deutsche Akademie der Naturforscher um 1750 im Spiegel ihrer Korrespondenz*. Würzburger medizinhistorische Mitteilungen 22 (2003), S. 158-166

Thomas Schnalke: *Anatomie einer Korrespondenz. Abraham Vater im Briefwechsel mit dem Nürnberger Arzt und Naturforscher Christoph Jacob Trew*. In:

Helm, Jürgen und Karin Stukenbrock: *Anatomie. Sektionen einer medizinischen Wissenschaft im 18. Jahrhundert*. Stuttgart 2004, S. 29-47

Marion Maria Ruisinger und Thomas Schnalke: *Der Lehrer und sein Schüler. Die Korrespondenz zwischen Lorenz Heister und Christoph Jacob Trew*. Gesnerus 61 (2004), S. 198-231



6.3 Wissenschaftliche Dokumentation der Sammlungsbestände des Berliner Medizinhistorischen Museums

Bis 2005 wurde im Rahmen des Projekts am Berliner Medizinhistorischen Museum der Charité eine Museumsdatenbank (GOS) etabliert und damit begonnen, Objekte aus den wissenschaftlichen Sammlungen darin zu erfassen. Im Vordergrund der Erschließungsmaßnahmen standen bislang Präparate aus der reichen Sammlung des Museums sowie Objekte aus den augenarzt- und urologiegeschichtlichen Beständen. Über die fortgesetzte wissenschaftliche Archivierung werden wertvolle medizinhistorische Sachquellen der Charité für eine weitergehende wissenschaftshistorische Auswertung zur Verfügung gestellt.

Until 2005 a highly effective museological data base has been successfully established and filled with first items at the Berlin Museum of Medical History. The ongoing scientific registration and archiving currently focuses on the documentation of human specimens from the rich Rudolf Virchow-collection in the Museum and objects and manuscripts from the fields of the history of ophthalmology and urology. The aim is to create a broad 'material' basis for further research in the field of medical history and the history of science.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Thomas Schnalke
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536077
Fax 450-536905
thomas.schnalke@charite.de

Fördereinrichtung:

Freunde und Förderer der Charité

Online-Informationen:

www.bmm.charite.de

Publikationen:

Marion Maria Ruisinger und Thomas Schnalke: *Das "Medico-historische Cabinet". Eine vergessene Sammlung im Germanischen Nationalmuseum Nürnberg*. *Medizinhistorisches Journal* 35 (2000), S. 361-381

Thomas Schnalke: *Wissenswertes - Lebensspuren. Rudolf Virchow und das Medizinische Sammeln*. In:

Te Heesen, Anke (Hg.): *cut and paste um 1900. Der Zeitungsausschnitt in den Wissenschaften*. Berlin 2002, S. 82-98

Thomas Schnalke: *Stumme Gesänge. Zur Geschichte einer Sirene im Berliner Medizinhistorischen Museum*. In:

Dotzler, Bernhard; Schmidgen, Henning und Cornelia Weber (Hg.): *Parasiten und Sirenen: Zwei Zwischenräume*. Berlin 2004, S. 87-101

Thomas Schnalke: *Der expandierte Mensch. Zur Konstitution von Körperbildern in anatomischen Sammlungen des 18. Jahrhunderts*. In:

Stahnisch, Frank und Florian Steger (Hg.): *Medizin, Geschichte und Geschlecht. Körperhistorische Rekonstruktionen von Identitäten und Differenzen*. Stuttgart 2005, S. 62-82

Gottfried Bogusch, Thomas Schnalke (Hrsg.): *Das besondere Objekt. Bemerkenswerte Gegenstände aus den Sammlungen der Charité*. Berlin 2006 (im Druck)



6.4 Medizinhistorische Erschließung der Albrecht von Graefe-Sammlung

Das professionelle Wirken des bedeutenden Berliner Augenarztes Albrecht von Graefe (1828-1870) hat in zahlreichen Dokumenten ihren Niederschlag gefunden, die in die Albrecht von Graefe-Sammlung der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) eingegangen sind. Seit 2002 befindet sich dieser Quellenbestand als Dauerleihgabe in den wissenschaftlichen Sammlungen des Berliner Medizinhistorischen Museums. Bis 2005 konnten die historischen Quellen konservatorisch behandelt und unter archivalischen Gesichtspunkten gelagert, registriert und gesichert werden. Überdies wurden sie zusammen mit zahlreichen Abbildungen, Instrumenten und vorhandener Literatur nach formalen Kriterien in eine Datenbank aufgenommen. Die handschriftlichen Bestände wurden mikroverfilmt und digitalisiert. Damit steht der einzigartige Quellenkorpus für die weitergehende wissenschaftliche Aufarbeitung zur Verfügung.

The professional life of the renowned Berlin ophthalmologist Albrecht von Graefe (1828-1870) has been documented in many sources, which are kept in the Albrecht von Graefe-collection of the Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG). Since 2002 the materials are associated with the scientific collections of the Berlin Museum of Medical History on a permanent loan basis. Until 2005 all historical items underwent conservatory treatment. They have been stored, registered, and secured according to archival criteria. In addition, they have been documented in a data base along with many illustrations, instruments, and relevant publications following formal categories. All manuscripts have been digitalized and documented on microfilm. Having taken all these measures, this unique corpus of medical historical sources is ready for further scientific investigations.

Projektleitung:

Univ. Prof. Dr. Thomas Schnalke
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536077
Fax 450-536905
thomas.schnalke@charite.de

Fördereinrichtung:

Deutsche Ophthalmol. Gesellschaft e.V.

Online-Informationen:

www.bmm.charite.de



7

Immun- und Entzündungspathologie



7.1 Humorale Immunantwort in der akuten zellulären Leberrejektion

Die Rolle antikörpervermittelter Mechanismen in der akuten zellulären Leberrejektion (ACR) ist bis heute unklar. Ziel der vorausgegangenen Arbeit war daher die Untersuchung von B-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Komplementfragmenten in Fällen von ACR. Zu diesem Zweck wurden 35 Leberbiopsien (ACR n=22, Kontrollen n=13) mittels immunohistochemischen Einzel- bzw. Doppelfärbungen untersucht. Die Anzahl CD20+, CD38+ und CD68+ Zellen pro Portalfeld wurde ermittelt und Ablagerungen der Komplementfragmente C4d und C3d semiquantitativ bewertet. Dabei konnte in ACR-Biopsien im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg CD20+ ($p=0.029$) und CD38+ ($p=0.014$) Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten 50% der ACR-Biopsien Ablagerungen von C4d entlang portaler Endothelien. Der Nachweis von C4d war dabei mit einer signifikant erhöhten Infiltration der Portalfelder durch Makrophagen assoziiert ($p=0.007$). Diese Ergebnisse unterstützen das Vorhandensein einer humoral vermittelten Immunantwort in der akuten zellulären Leberrejektion. Um herauszufinden, ob diese Ergebnisse eine klinische Relevanz haben, muss die Korrelation mit klinischen Daten folgen. Außerdem soll ein streng definiertes Kollektiv steroid-resistenter ACR-Fälle untersucht werden und ein Vergleich von Patienten mit HCV-Reinfektion und ACR erfolgen.

Almost no data exist concerning the role of antibody mediated mechanisms in human acute cellular liver allograft rejection (ACR). Therefore, the aim of our previous study was to clarify if ACR is associated with deposition of complement split products and an increased infiltration by B-lymphocytes, plasma cells and macrophages. 35 liver biopsy specimens (acute cellular rejection n=22, controls n=13) were analyzed by immunohistochemical single and double staining. The average number of CD20+, CD38+ and CD68+ cells per portal tract was established while the presence of C4d and C3d deposits was evaluated semiquantitatively. Comparing cases of ACR to controls a significant increase of CD20+ ($p=0.029$) and CD38+ ($p=0.014$) cells could be demonstrated. Additionally, 50% of patients diagnosed with ACR revealed C4d deposits along portal capillaries, which was associated with a significantly increased portal infiltration by macrophages ($p=0.007$). As these results support an involvement of humorally mediated mechanisms in a part of ACR cases, we wondered, whether C4d may serve as a specific marker for the differential diagnosis of acute rejection versus HCV-reinfection. In the present study immunohistochemical analysis of liver biopsies from 97 patients was performed. While 67.7% of patients with acute rejection displayed C4d-positive staining in liver biopsies, only 11.8% of patients with HCV-reinfection showed C4d deposits. We therefore conclude that detection of C4d may be helpful to.

Projektleitung:

Dr. med. Anja Dankof
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536-163
Fax 450-536-900
anja.dankof@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Publikationen:

Krukemeyer MG, Moeller J, Morawietz L, et al. (2004) *Description of B- lymphocytes and plasma cells, complement, and chemokines/receptors in acute liver allograft rejection*. Transplantation 78: 65-70
Moeller J, Krukemeyer MG, Morawietz L, et al. (2004) *Molecular case report: IgVh analysis in acute humoral and cellular liver allograft rejection suggesting a selected accumulation of effector B-cells and plasma cells*; Virchows Arch. 446 (3): 325-32
Dankof A, Schmeding M, Morawietz L, et al. (2005) *Portal capillary C4d deposits and increased infiltration by macrophages indicate humorally mediated mechanisms in acute cellular liver allograft rejection*; Virchows Arch. 447 (1): 87-93
Schmeding M, Dankof A, Krenn V, et al. (2006) *C4d in acute rejection after liver transplantation-a valuable tool in differential diagnosis to hepatitis C recurrence*. Am J Transplant. 6 (3): 523-30



7.2 Tumorzellmigration in 3-D Extrazellulär Matrix als Modell der Tumor-Host Interaktion

Migration ist essentiell für die Tumorzell dissemination sowie Invasion der extrazellulären Matrix. Die meisten Migrationsmodelle zur in vitro Untersuchung basieren auf der Beobachtung von Tumorzellwanderung auf planaren 2-D Oberflächen. Diese spiegeln die Verhältnisse in vivo nur begrenzt wieder und überschätzen die Bedeutung der Adhäsion. Um die Tumorzellmigration in einer 3-dimensionalen Umgebung zu untersuchen, soll ein Migrationsassay etabliert werden, um Migration über einen längeren Zeitraum in komplexen ECMatrices zu beobachten. Hierzu besteht die Möglichkeit zur Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. P. Friedel (Hautklinik, Universität Würzburg), welche auf eine lange Erfahrung auf diesem Gebiet zurückblicken kann. Durch dieses Assay ergibt sich die Möglichkeit Tumorzellen auf ihre migratorischen Fähigkeiten zu screenen sowie einerseits den Einfluss pharmakologischer Inhibitoren und von gene silencing Methoden und andererseits die Bedeutung der Zusammensetzung der ECMatrix für die Migration zu untersuchen. Auswertwertet werden neben der Art der Migration, der mobile Anteil der Zellen, Geschwindigkeit und Direktionalität.

Migration is essential for tumor cell dissemination and invasion of extracellular matrix. Most models are based on migration across 2-D surfaces. This reflects the situation in vivo only partially and indicate, that migration is predominantly a function of adhesion. For studying tumor cell migration in 3-D environment we want to built up an assay, which allows to observe tumor cells in a complex ECM. We are in cooperation with Dr. P. Friedel (Dep. of Dermatology, University Würzburg), who works for a few years in this field. With this assay we have the opportunity to screen tumor cells for their migratory capacity, the influence of pharmacological inhibitors, the effects of gene silencing and the composition of the ECM on tumor cell migration. The data assessment comprises type of migration, mobile fraction, velocity and directionality.

Projektleitung:

Dr.med. Martin Köbel
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 450-536158
Fax 450-536902
martin.koebel@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité



7.3 Prothesen-Infektion

Die Prothesenlockerung wird durch zwei verschiedene Pathomechanismen hervorgerufen, die sich anhand histomorphologischer Charakteristika der periprothetischen Membran unterscheiden lassen: aseptische (AL) und septische (SL) Lockerung. Es wurden periprothetische Membranen von zwei Patienten mit SL und drei Patienten mit AL in Form von komparativen Hybridisierungen von auf PIQORTM cDNA Arrays untersucht. 34 Gene wurden konstant differentiell exprimiert. In AL waren unter Anderen hochreguliert: cd9, cd11b, cd18, cd68, osteopontin, ferritin heavy-chain, in SL waren unter Anderen collagen types 1alpha-1, 3alpha-1, integrin alpha-1, thrombospondin2 und nidogen hochreguliert. Die ausgeprägteste differentielle Expression (von 20fach bis 323fach) zeigte megakaryocyte stimulating factor (msf) in allen AL Fällen und in einem der beiden SL Fälle, was durch real-time RT-PCR belegt wurde. Das msf splice Produkt Lubricin ist der wesentliche Faktor für die Lubrikation gesunder Gelenke und wird normalerweise von synovialen Fibroblasten produziert. Seine hervorragende Gleitfähigkeit könnte jedoch den festen Halt der Prothese im Knochen beeinträchtigen und so wesentlich zum Lockerungsprozess beitragen.

Endoprosthesis loosening is caused by two different pathomechanisms that can be discriminated by their histomorphological characteristics: aseptic loosening (AL) and septic loosening (SL). This study evaluates differences in gene expression in AL and SL by competitive hybridization on PIQORTM cDNA arrays. Ots with AL. 34 genes were found constantly differentially expressed, among which were cd9, cd11b, cd18, cd68, osteopontin, ferritin heavy-chain upregulated in AL and collagen types 1alpha-1, 3alpha-1, integrin alpha-1, thrombospondin2 and nidogen upregulated in SL. The most striking finding was the strong upregulation (from 20fold to 323fold) of megakaryocyte stimulating factor (msf) in all aseptic cases and one of the two septic cases, which was confirmed by real-time RT-PCR. icin is responsible for the lubrication of healthy joints, but its excellent lubrication ability may disturb the tight interaction between bone and prosthesis and thereby contribute to prosthesis loosening.

Projektleitung:

Univ.Prof.Dr. Veit Krenn
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. 030 450 536 134
Fax 030 450 536 907
veit.krenn@charite.de

Fördereinrichtung:

Endoklinik - Gemeinnütziger Verein



7.4 Charakterisierung erkrankungsspezifischer Gene in der akuten und chronischen Lebertransplantatabstoßung

Obwohl antikörpervermittelte Mechanismen eine pathogenetische Rolle bei der Abstoßung von Leber-Allotransplantationen spielen, gab es lange Zeit keine Kenntnisse über B-Lymphozyten, Plasmazellen, Komplement und Chemokine in der Transplantatabstoßung. Wir untersuchten Leberbiopsate von 25 Patienten mit akuter Rejektion (AR) mittels Immunhistologie und RT-PCR und verglichen die Befunde mit Biopsaten, welche vor Implantation (PI) gewonnen worden waren. Dabei stellten wir fest, dass die Anzahl CD20+ B-Lymphozyten ($p=0,002$) und CD138+ Plasmazellen ($p=0,022$) in der Rejektion signifikant anstieg. Die Chemokine MIP-3alpha und CCR6 wurden in den Portalfeldern aller AR-Biopsate nachgewiesen. Immunhistologische Doppelfärbungen zeigten eine Kolo-kalisation MIP-3alpha+ und CD20+ Zellen, ferner konnten wir Komplement C4d entlang der portalen Kapillaren darstellen. Mittels semiquantitativer PCR wurde eine Überexpression von CXCL10 und 11 in der AR gezeigt. Eine Proliferation von Lymphozyten oder Plasmazellen konnte immunhistologisch (MIB-1) nicht festgestellt werden. Diese Befunde legen nahe, dass eine Migration von B-Lymphozyten und Plasmazellen vermittelt durch die B-Zell-aktivierenden Chemokine und Rezeptoren sowie die Aktivierung des Komplementsystems eine wichtige Rolle bei der akuten Lebertransplantatabstoßung spielen.

Although antibody mechanisms play a pathogenetic role in liver allograft rejection, no data existed on B-lymphocytes, plasma cells, complement and chemokines in rejected liver tissue. Liver biopsies from 25 patients with acute allograft rejection were analyzed by immunohistochemistry and RT-PCR and compared to biopsies taken prior to implantation (PI-biopsy). Comparing acute rejection (AR)-biopsies with PI-biopsies, the number of B-lymphocytes ($p=0,002$) and plasma cells ($p=0,022$) was significantly higher. MIP-3alpha+ and CCR-6+ cells were detected in the portal fields of all AR-biopsies. IH double staining revealed a colocalization of MIP3alpha+/CD20+ cells, and C4d deposits could be demonstrated along the portal capillaries. All examined chemokines and receptors could be detected in normal liver tissue and in AR-biopsies by RT-PCR and semiquantitative RT-PCR, demonstrating an overexpression of CXCL 10 and 11. The significant increase of B-lymphocytes and plasma cells during acute rejection, together with the lack of a significant increase of proliferating cells, indicate that the migration of B-lymphocytes and plasma cells - promoted by the expression of B-cell activating chemokines/receptors - plays a key role in the acute liver rejection. The C4d deposits along the portal capillaries indicate a humorally mediated allo-response caused by the accumulated B- and plasma cells.

Projektleitung:

Dr. med. Lars Morawietz
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Institut für Pathologie mit den Abteilungen Pathologie und Paidopathologie
Tel. (030) 450 536 174
Fax (030) 450 536 907
lars.morawietz@charite.de

Fördereinrichtung:

Universitäre Forschungsförderung Charité

Online-Informationen:

141.42.37.15/Webpage/pages/forschung/arbeitsgruppen/ag-krenn/index.htm

Publikationen:

Dankof A, Schmeding M, Morawietz L, Gunther R, Krukemeyer MG, Rudolph B, Koch M, Krenn V, Neumann U. *Portal capillary C4d deposits and increased infiltration by macrophages indicate humorally mediated mechanisms in acute cellular liver allograft rejection.* Virchows Arch 2005; 447: 87-93.

Moeller J, Krukemeyer MG, Morawietz L, Schmeding M, Dankof A, Neumann U, Krenn V, Berek C. *Molecular case report: IgVH analysis in acute humoral and cellular liver allograft rejection suggests a selected accumulation of effector B cells and plasma cells.* Virchows Arch 2005; 446: 325-332.

Krukemeyer MG, Moeller J, Morawietz L, Rudolph B, Neumann U, Theruvath T, Neuhaus P, Krenn V. *Description of B-Lymphocytes and Plasma Cells, Complement and Chemokines/Receptors in Acute Liver Allograft Rejection.* Transplantation 2004; 78: 65-70.

