

Dipl.-Ing. (FH) Daniel Göttel  
Dr. sc. hum.

**Entwicklung und Anwendung automatisierter Analysverfahren von Gewebemicroarrays zur Identifikation und quantitativen Bestimmung von tumor-biologisch relevanten Proteinen.**

Geboren am 03.02.1973 in Bonn  
Diplom der Fachrichtung Chemieingenieurwesen am 02.06.1998 an der Fachhochschule Aachen.

Promotionsfach: Humangenetik  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. Stefan Joos

In den letzten Jahren wurden durch die Entwicklung von *High-Throughput-Technologien*, die globale Analysen auf tumorspezifische Veränderungen des Genoms, des Transkriptoms oder des Proteoms ermöglichen, eine Vielzahl von Kandidatengenomen bzw. Proteinen identifiziert. Diese können von potentieller Bedeutung entweder für die Entstehung oder Entwicklung von Tumorzellen sein oder aber eine mögliche diagnostische bzw. prognostische Relevanz haben. Um dies zu testen, ist es notwendig, große klinisch eingehend beschriebene Tumorkollektive zu analysieren. Zu diesem Zweck hat sich der Ansatz der TissueMicroArrays (TMAs) als besonders geeignet herausgestellt. Bei dieser Technik werden Hunderte von Tumorstanzen in regelmäßiger Form in einen Paraffinblock eingebettet, sodass eine große Anzahl konsekutiver Schnitte mit definierten Gewebeproben gewonnen werden kann. Die Technik erlaubt immunhistochemische (IHC) Untersuchungen unter hoch standardisierten Bedingungen und führt bei relativ geringem Material- und Zeitaufwand zu validen Aussagen, ob bestimmte molekulare Marker mit klinischen Parametern korrelieren. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Auswertung bzw. Datenverwaltung von IHC-Experimenten an TMAs sehr aufwendig ist. Darüber hinaus gibt es bei den konventionell praktizierten manuellen Auswertungen durch den Pathologen das Problem der Verwechslung sowie eine subjektive Komponente, die abhängig vom Erfahrungsstand der durchführenden Person ist.

In dieser Arbeit sollte daher eine Methode zur automatisierten Analyse und Auswertung von TMAs entwickelt werden. Hierzu wurde zunächst untersucht, ob der Einsatz einer Durchlichtmikroskop Workstation zur automatischen Analyse von TMAs (SpotBrowser® V2, Alphelys) geeignet ist, um die mit konventioneller IHC markierten TMAs zu analysieren. Um dies zu bestätigen wurden IHC-markierte TMAs manuell und automatisiert ausgewertet und die Resultate miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass alle mit manueller Auswertung durch einen Pathologen erhaltenen Expressionsergebnisse durch das hier eingesetzte automatische Verfahren mit höherer statistischer Sicherheit bestätigt werden konnten.

Darüber hinaus konnten die automatisierten Auswertungen mit beträchtlichen zeitlichen Vorteilen durchgeführt werden. Schließlich wurde durch die Computerunterstützung eine wesentlich bessere Verwaltung der gewonnenen Daten möglich. Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich für einige tumorbiologisch wichtige Fragestellungen eingesetzt. So konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von p53-exprimierenden Zellen in Glioblastomen Auswirkungen auf die Überlebensprognose von Patienten hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit dem hergestellten Glioblastom-TMA das breite Spektrum möglicher molekularer Veränderungen exakt abzubilden ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine erniedrigte Expression von EGFR in Ependymomen zu einer besseren Überlebensprognose führt. Ein in dieser Arbeit neu entwickelter Ansatz zur automatisierten TMA-Analyse war die Einführung der <sub>multi</sub>Fluor-Immunfluoreszenztechnik (IF). Hierbei werden im Prinzip zwei oder mehrere unterschiedlich Fluorochrom-markierte Antikörper gleichzeitig für IHC-Experimente eingesetzt. Mittels eines Fluoreszenzscanners, dessen Anwendung in dieser Arbeit in Kooperation mit der Fa. ZEISS entwickelt wurde, kann mit dieser Technik die Expression mehrerer Proteine gemessen werden. Dies bietet den für eine automatisierte Auswertung mit heterogen zusammengesetzten Tumoren den entscheidenden Vorteil, dass spezielle Tumorkompartimente (z.B. epitheliale Bereiche, angezeigt durch einen epithelspezifischen Antikörper) als digitale Maske für die Messung eines zweiten „Test“-Antikörpers definiert werden können. Die Eignung dieser Methode konnte an einer Reihe von Beispielen demonstriert werden. So konnte gezeigt werden, dass die antiapoptotischen Proteine HMGB1 und c-IAP2 in kolorektalen Karzinomen in der Regel in den gleichen Zellen verstärkt exprimiert werden, was die Hypothese untermauerte, dass HMGB1 über die Induktion von NFκB zu einer Erhöhung des Caspase-9 Inhibitors cIAP2 führt.

Bei Medulloblastomen konnte gezeigt werden, dass die verringerte Expression von SGK sowie die erhöhte Expression von β-Catenin einen positiven Einfluss auf die Überlebensprognose haben. Auch konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser zwei Proteine von der Anzahl des im Tumor vorkommenden Chromosoms 6 abhängig ist.

Eine weitere interessante Anwendung ist der simultane Einsatz von Antikörpern und phosphospezifischen Antikörpern gegen die Proteine STAT5 und STAT6 bzw. deren phosphorylierte Formen. Damit konnte durch digitale Messung der Fluoreszenzintensitäten das Verhältnis von phosphoryliertem STAT gegenüber der nichtphosphorylierten Form dargestellt werden. Diese Methode eignet sich, um den Aktivierungsgrad von zellulären Komponenten von Signalkaskaden an TMAs zu bestimmen (hier des JAK/STAT Signalwegs). Solche Analysen können dazu beitragen, Tumorgruppen zu identifizieren, die

durch die Aktivierung bestimmter Signalwege charakterisiert sind. Da man bereits zahlreiche Inhibitoren verschiedener Signalmoleküle kennt, wären diese möglicherweise erfolgreich gegen die mit Hilfe der IF-Technik identifizierten Tumorgruppen therapeutisch einsetzbar.