

Analyse von Signalproteinen in Zelllinien und Tumorgewebe mit Reverse Phase Proteinarrays

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Ingenieur (FH)

Heiko Alexander Mannsperger

aus Heidelberg

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Buselmaier

2. Gutachter: PD Dr. Stefan Wiemann

Tag der Verteidigung:

Zusammenfassung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit, wobei Lungen- und Prostatakrebs bei Männern die am weitesten verbreiteten Krebsarten sind. Dabei unterscheiden sich beide Krebsarten grundlegend. Während Lungenkrebs stark abhängig von umweltbedingten Risikofaktoren ist, zeigt Prostatakrebs eine ausgeprägte molekulare Heterogenität sowie ein altersbedingt steigendes Risiko. Der molekulare Hintergrund von Lungenkrebs ist häufig eine Deregulation der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalwege, speziell des AKT- und MAPK-Signalweges. Daher sind spezifische Kinase-Inhibitoren vielversprechende Wirkstoffe für die individuelle Therapie von Lungenkrebspatienten. Zur Beurteilung der Reaktion auf eine Behandlung mit solchen Inhibitoren sollte in einem Set von 84 Lungenkrebszelllinien nach Proteinexpressionsprofilen gesucht werden, die mit deren Wirksamkeit korrelieren. Als maßgebliche Grundlage zur Behandlung von Prostatakrebspatienten dient der in der Histopathologie bestimmte Gleasonwert der Biopsieproben. Jedoch führt dieser nicht immer zu einer angemessenen Therapieentscheidung, da die prognostische Aussage des Gleasonwertes nur unzureichend ist. Daher sollten zur Verbesserung der Prognose in einem Set von Tumorproben Markerproteine gefunden werden, die einerseits die Aggressivität der Tumore berücksichtigen sowie mit dem Auftreten des TMPRSS:ERG-Fusionsgens assoziiert sind.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde auf die Reverse Phase Proteinarray-Technologie zurückgegriffen, die zunächst im Hinblick auf Durchsatz, Sensitivität und Robustheit weiterentwickelt wurde. Eine antikörperbasierte Signalamplifikation wurde zur Steigerung der Sensitivität entwickelt, um auch die Detektion gering exprimierter Proteine zu ermöglichen. Die Validierung von Antikörpern mittels RNAi wurde etabliert, um die Datenqualität zu verbessern und die isoformspezifische Detektion von Proteinen sicherzustellen. Nach erfolgreicher Optimierung der RPPA-Technologie wurde in der statistischen Umgebung R ein Analysewerkzeug programmiert, das flexibel

eingesetzt werden kann, um RPPA-Daten einzulesen, zu normalisieren und zu visualisieren. Die Verwendung der experimentellen Verbesserungen wie auch der entwickelten Datenanalysewerkzeuge in einem miRNA-Screening bestätigte die hohe Leistungsfähigkeit und Robustheit zum Einsatz in Hochdurchsatzproteomanalysen.

Die Analyse der Lungenkrebszelllinien ergab für jeden Wirkstoff sechs bis acht potentielle Markerproteine, wobei vor allem Proteine des AKT-Signalweges als mögliche Resistenzmarker identifiziert wurden. Als Ergebnis der Analyse des RPPA-basierenden Proteomprofilings von Prostatatumoren konnte eine erhöhte Aktivierung von p38 mit geringen Gleasonwerten korreliert werden. Die TMPSS:ERG-fusionsgenpositiven Prostatatumore zeigten eine reduzierte Expression der onkogenen Proteine ERK, PI3K p110 und CDK6, was auf eine Assoziation mit weniger aggressiven Tumoren hinweist. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die formale Begriffsanalyse zur Datenintegration für kleine Probensätze sinnvoll eingesetzt werden kann. So wurde eine Korrelation des TMPRSS:ERG-Fusionsgens mit geringen Gleasonwerten beobachtet. Darüber hinaus zeigte sich eine gegensätzliche Regulation der p38- und ERK-Signalwege. In Proben hohen Gleasonwertes ist p38 gering aktiviert bei gleichzeitig hoher Expression und starker Aktivierung von ERK.

Abstract

Cancer is the most common death causing disease worldwide, of which lung and prostate cancers are the most common types within the male population. Considering the molecular characteristics these cancers are elementary different. Lung cancer is strongly associated with environmental risk factors and shows homogenous molecular patterns. In contrast prostate cancer is characterized by molecular heterogeneity and by strong age dependency. Common molecular alterations in lung cancer include receptor tyrosin kinase signaling especially through AKT and ERK signaling pathways. Therefore, specific kinase inhibitors are promising agents for the personalized treatment of lung cancer patients. However, individual response to therapeutic drugs is clinically challenging. Therefore, 84 lung cancer cell lines representing all molecular properties of this type of cancer were analyzed using reverse phase protein arrays to find predictors of drug responsiveness. With respect to prostate cancer, Gleason scoring of biopsy samples by histopathology is the basis for the treatment decisions. However, misclassification or inadequate grading of biopsies often leads to over- or undertreatment of patients. To overcome these problems and to find biomarkers for definitive diagnosis we performed RPPAs in a set of prostate cancer specimens with the defined pathological characteristics such as Gleason Score and a frequent gene fusion TMPRSS:ERG status in prostate cancer.

To answer these questions the reverse phase protein array technology was applied for large-scale proteomics with optimized capacity, sensitivity and robustness. To detect low abundant proteins with RPPA, an antibody mediated signal amplification was established. RNAi based validated antibodies made an isoformspecific detection of proteins possible. After successful optimization of the RPPA technology for further data analysis the RPPAnalyzer package was developed using the statistical environment R. The improved

technology as well as data analysis tools showed the high capacity and robustness for the implementation in high throughput proteomics in various projects.

Analysis of lung cancer cell lines by RPPA revealed potential prediction markers of drug responsiveness for common clinically relevant compounds. Additionally AKT pathway proteins were found to be associated with sensitivity towards drugs included in the study. The protein profiling of prostate cancer revealed that the activation of p38 is associated with a low gleason score. In TMPRSS:ERG fusion gene positive tumors ERK, PI3K p110, and CDK6 were downregulated indicating a correlation with low aggressive tumors. For the integration of RPPA data with pathological data and TMPRSS:ERG fusion gene status, formal concept analysis was applied and showed positive correlation between gene fusion and low Gleason score. Interestingly using FCA analysis showed that high gleason score is associated with high ERK expression and low p38 activation.

Für Melanie

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Werner Buselmaier möchte ich danken für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Herrn PD Dr. Stefan Wiemann bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die wertvollen Ratschläge zu Manuskripten, Berichten und Postern.

Meiner Betreuerin Dr. Ulrike Korf danke ich für die Unterstützung während der gesamten Arbeit und die Motivation eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen.

Besonderer Dank gilt Christian Schmidt für die unermüdliche Hilfe bei der Entwicklung der Laborautomation und der Betreuung der Mikroarraydrucker. Gleiches gilt für Maike Wosch, da ohne Sie der große Umfang der Experimente nicht möglich gewesen wäre.

Bei Sabrina Schumacher, Corinna Becki und Daniela Heiss möchte ich mich bedanken für die gute Zusammenarbeit und das Management der Labore.

Der Proteomics Gruppe möchte ich danken für die gute Zusammenarbeit, besonders Johanna Sonntag für die hilfreichen Diskussionen und Frank Götschel, Frauke Henjes sowie Ramesh Ummanni für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Tim Beissbarth möchte ich danken für die guten Tipps und die Motivation ein R-paket zur RPPA-Analyse auf den Weg zu bringen und Christian Bender für die Hilfe beim Einstieg in die R-Programmierung.

Der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Holger Sülzmann möchte ich danken für die sehr gute Zusammenarbeit, besonders Stephan Gade, Jan C. Brase, Maria Fälth-Savitski und Mark Johannes für alle Diskussionen und die Hilfe in Programmierfragen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der Krebsentwicklung	1
1.2 Lungenkrebs	2
1.2.1 Diagnose und Therapie	2
1.2.2 Der EGFR-Signalweg im Lungenkrebs	3
1.3 Das Prostatakarzinom	5
1.3.1 Diagnose und Therapie	5
1.3.2 Molekulare Grundlagen des Prostatakrebs	7
1.4 Proteomanalytik	8
1.4.1 Bedeutung der Proteinanalytik	8
1.4.2 Aufbau und Funktion von Proteinarrays	9
1.4.3 Reverse Phase Protein Arrays	10
1.5 Zielsetzung	12
2 Material & Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Geräte	13
2.1.3 Software	14
2.1.4 Verbrauchsmaterial	14
2.1.5 Puffer, Nährmedien, Lösungen und Inhibitoren	15
2.1.6 siRNAs	18

INHALTSVERZEICHNIS

2.1.7	Antikörper	19
2.1.8	Lungenkrebszelllinien	22
2.1.9	Prostatagewebeprobe	24
2.2	Methoden	27
2.2.1	Proteinextraktion aus Zellen	27
2.2.2	Proteinextraktion aus Gewebe	28
2.2.3	SDS-PAGE	28
2.2.4	Western Blot	29
2.2.5	Immunologische Proteindetektion	29
2.2.6	Drucken der RPPA	29
2.2.7	RPPA-Inkubation	30
2.2.8	RPPA-Bildanalyse	30
2.2.9	Datenanalyse	31
2.2.10	Zellkultur und si- miRNA Transfektion	31
2.2.11	Quantitative mRNA-Analyse (qRT-PCR)	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Proteomanalytik	33
3.1.1	Katalogisierung und Verwaltung von Antikörpern	33
3.1.2	Antikörpervalidierung	34
3.1.3	Signalamplifikation	45
3.1.4	Quantifizierung und Normalisierung von RPPA-Daten	52
3.1.5	Entwicklung eines Auswerteprogramms	66
3.2	Anwendung der RPPA-Technologie zum Screening einer miRNA-Bibliothek	70
3.2.1	Experimentelles Design	70
3.2.2	Normalisierung der Daten	71
3.2.3	Qualitätskontrolle der miRNA-Transfektionen	78
3.3	Analyse von Signalproteinen im Prostatakarzinom	79
3.3.1	Zusammensetzung und Qualität des Probensets	79
3.3.2	Selektion der Antikörper	80
3.3.3	Normalisierung der Daten	81
3.3.4	Korrelation von TMPRSS:ERG-Fusionsgen und Proteinexpression	82
3.3.5	Korrelation von Gleasonwert und Proteinexpression	82

3.3.6 Visuelle Datenintegration mit formaler Begriffsanalyse	83
3.4 Korrelation von Proteinexpressionsmustern und Inhibitorsensitivität . .	90
3.4.1 Einteilung von NSCLC-Zelllinien in Sensitivitätsgruppen	90
3.4.2 Proteine als Marker für Inhibitor-Sensitivität	92
4 Diskussion	97
4.1 Optimierung der RPPA-Technologie	97
4.1.1 Validierung von Antikörpern	97
4.1.2 Signalamplifikation auf RPPA	100
4.1.3 Quantifizierung	101
4.1.4 Normalisierung	102
4.2 Analyse von RPPA-Daten	104
4.3 Proteinexpression als Marker für Therapieresistenz	105
4.4 Proteinprofiling in Prostatatumoren	108
4.4.1 Deregulierte Signalwege beim Prostatakrebs	108
4.4.2 Eigenschaften des Probensets	109
4.4.3 Korrelation der p38-Aktivierung mit dem Gleasonwert	109
4.4.4 Biomarker für das TMPRSS:ERG-Fusionsgen	111
4.4.5 Visuelle Integration klinischer und experimenteller Daten	112
Abkürzungsverzeichnis	114
Referenzen	117

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

1.1	Überblick der Signaltransduktionsgene, die in nicht kleinzelligem Lungenkarzinom häufig mutiert sind	4
1.2	Beurteilungsschema der Zelldifferenzierung nach Gleason	6
1.3	Arten von Proteinmikroarrays	9
1.4	Arbeitskreislauf von RPPA Experimenten	11
3.1	Antikörperverwaltung mit der MGA Antikörper Datenbank	34
3.2	Antikörpervalidierung mittels Western Blot	35
3.3	Quantitative Western blot	36
3.4	EGFR Antikörpervalidierung auf RPPA	37
3.5	Reproduzierbarkeit von RPPA-Inkubationen	38
3.6	Spezifität von STAT3 Antikörpern auf Western Blot	40
3.7	Signalintensitäten von STAT3-Antikörpern auf RPPA	41
3.8	Unabhängigkeit von Signalstärke und Spezifität von Antikörpern	41
3.9	Isoformspezifität der RPPA-Technologie	43
3.10	Proteinexpression von siRNA-transfizierten Proben	43
3.11	Klusteranalyse der Proteinexpression von siRNA transfizierten MDA-MB-231-Zellen	44
3.12	Prinzip der antikörpervermittelten Signalamplifikation	46
3.13	Vergleich der Spezifität von Signalamplifikationsmethoden	47
3.14	Kreuzreaktivität mit humanem IgG auf RPPA	48
3.15	Ermittlung der optimalen Amplifikationsrundenanzahl für die AMSA-Methode	49
3.16	Western Blot-Analyse von 14 Proteinen in sieben humanen Zelllinien	50
3.17	Vergleich der Sensitivität von Standard-NIR-Detektion und AMSA	51

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

3.18 Vergleich der Detektionslimits zwischen Standard NIR-Detektion und AMSA	52
3.19 Signaldynamik von vier Antikörpern gegen konstitutiv exprimierte Proteine auf MDA-MB-231-Lysat	55
3.20 Darstellung der Signaldynamik von Antikörpern mit dem SuperCurve Model	56
3.21 Darstellung der Signaldynamik von Antikörpern mit dem Serial Dilution Algorithmus	57
3.22 Effekt der Normalisierung des Proteingehaltes	62
3.23 Vergleich der Dynamik von RPPA-Signalen bei verschiedenen Proteinkonformationen und Punktgrößen	63
3.24 Leistungsfähigkeit verschiedener Normalisierungsmethoden in Abhängigkeit vom Konzentrationsbereich der Proben	64
3.25 Vergleich der Normalisierungsmethoden, getrennt nach Konformation der Proben	65
3.26 Einfluss der Druckernadeln auf die Normalisierung der RPPAs	66
3.27 Flussdiagramm der Analyse von RPPA-Daten	67
3.28 Abgleich von arrayinternen Kontrollverdünnungsreihen	72
3.29 Qualitätskontrolle der Antikörperinkubationen	74
3.30 Normalisierung von Kontrollverdünnungsreihen zum Ausgleich des Proteingehaltes	75
3.31 Normalisierung der Signalniveaus unterschiedlicher Antikörper	75
3.32 Normalisierung der Arrayeffekte innerhalb eines Antiköpers	76
3.33 Vergleich der Normalisierungsverfahren für den miRNA Screen	77
3.34 Kontrolle der MiRNA-Transfektionen	78
3.35 Western Blots zur Antikörpervalidierung für die Untersuchung von Prostatagewebe	80
3.36 Vergleich des Gesamtproteingehaltes von Normal- und Tumorgewebe aus Prostata	81
3.37 Differentiell regulierte Proteine zwischen TMPRSS:ERG-Fusionsgen-positiven und -negativen Prostatatumoren	82
3.38 Aktivierung von p38 in Abhängigkeit vom Gleasonscore	83

3.39	Hasse-Diagramm zur visuellen Integration der klinischen Daten mit der Proteinexpression der Prostatatumore	86
3.40	Selektion von Teilbereichen eines Hasse-Diagramms zur Identifikation von Untergruppen der Prostatatumore	87
3.41	Hasse-Diagramm zur Gruppierung von Prostatatumoren nach den Attributen ERK und p-p38 Reduktion	88
3.42	Hasse-Diagramm zur Gruppierung von Prostatatumoren in Abhängigkeit von Gleasonwert, Fusionsgenstatus und ERK-Aktivierung	89
3.43	Kategorisierung der Sensitivitätswerte von Lungenkarzinomzelllinien	91
3.44	Differentielle Expression und Aktivierung von EGFR und ERBB2 in Erlotinib-sensitiven Zellen	92
3.45	Proteine mit Potential zur Vorhersage des Ansprechverhaltens gegenüber EGFR-Inhibitoren	94
3.46	Expression von Signalproteinen in Zelllinien unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Mek-Inhibitor UO126	95
3.47	Expression von Signalproteinen in Zelllinien unterschiedlicher Sensitivität gegenüber AURKA/B/C-Inhibitor VX680	95

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis

1.1	Tumorstadien für die Diagnostik von Lungenkrebs	3
2.1	Zusammensetzung der Acrylamidgele	16
2.2	siRNAs zur Reduktion der Proteinexpression	18
2.3	Antikörper zur Detektion von Gesamtprotein	19
2.3	Antikörper zur Detektion von Gesamtprotein	20
2.4	Antikörper zur Detektion von phosphoryliertem Protein	21
2.5	Lungenkrebszelllinien	22
2.5	Lungenkrebszelllinien	23
2.5	Lungenkrebszelllinien	24
2.6	Auffistung der Prostatagewebeproben	24
2.6	Auffistung der Prostatagewebeproben	25
2.6	Auffistung der Prostatagewebeproben	26
2.6	Auffistung der Prostatagewebeproben	27
3.1	Konstanz der Spezifität zweier Antikörper auf RPPA	39
3.2	Spezifische Eigenschaften von STAT3-Antikörpern	39
3.3	Probenverdünnung zur Bestimmung der leistungsfähigsten Normalisierung	61
3.4	Zusammenfassung der Parameter der Studienkohorte der Prostatagewe- beproben	79
3.5	Formaler einwertiger Kontext zur Beschreibung der Prostatatumore . .	84
3.6	Auffistung der Inhibitoren und die Kategorisierung der IC50-Werte . . .	91

TABELLENVERZEICHNIS

1

Einleitung

1.1 Grundlagen der Krebsentwicklung

Krebs entsteht durch eine Kette von Ereignissen, die sich in Veränderungen genetischen Materials niederschlagen. Im Laufe dieses Prozesses wandeln sich normal regulierte humane Zellen in Krebszellen um. Kennzeichen einer solchen Krebszelle sind (1) die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, (2) die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (3) das Eindringen in umliegendes Gewebe bzw. die Metastasierung, (4) das hohe Replikationspotential, (5) die nachhaltige Angiogenese und (6) das Umgehen von Apoptose (Hanahan and Weinberg, 2000). Die Ausprägung dieser Merkmale kommt durch die Deregulationen zentraler Signaltransduktionsmechanismen zustande, die wiederum genetische Instabilität voraussetzt. Eine spontane oder ererbte Mutation innerhalb eines Gens, das für die genetische Stabilität sorgen soll (z.B. Tumorsuppressorgen TP53), führt demnach im weiteren Verlauf zu Veränderungen von Genen, die sich in den oben genannten Phänotypen bemerkbar machen. Dabei führt die Deregulation zentraler Signaltransduktionswege zur Akkumulation krebstypischer Eigenschaften. Ein solches System, das bei Deregulation in vielfältiger Weise zur Tumorentstehung beiträgt, sind die MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege, die hauptsächlich über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen stimuliert werden. Diese Signalkaskaden unterstützen onkogene Eigenschaften wie Invasion, Proliferation und Migration, weshalb ihnen auch in der Krebsforschung eine zentrale Rolle zukommt (Zohrabian et al., 2009; Kim and Choi, 2010; Kohno and Pouyssegur, 2006).

1.2 Lungenkrebs

1.2.1 Diagnose und Therapie

Das Lungenkarzinom ist die Krebsart mit den weltweit häufigsten Todesfällen. Dabei leiden etwa 85 % der Lungenkrebspatienten unter nichtkleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC), von dem die häufigsten histologischen Untergruppen Adenokarzinom (ca. 50 %), Plattenepithelkarzinom (ca. 20 %) und großzelliger Lungenkrebs (ca. 10 %) sind (Wakelee et al., 2006). Der 5-Jahres-Überlebenszeitraum liegt bei nur etwa 15 % der neu diagnostizierten Tumore. Diese schlechte Prognose liegt vor allem an der meist späten Entdeckung der Tumore im bereits fortgeschrittenen, nicht mehr kurablen Stadium (Serke and Schönfeld, 2007). Eine spezielle Untersuchung erfolgt meist nach Auftreten klinischer Symptome wie Husten und Atemnot. Nur etwa 12 % der neu diagnostizierten Tumorpatienten zeigen keine typischen Beschwerden (Buccheri and Ferrigno, 2004). Nach Auftreten der klinischen Symptome erfolgt in den meisten Fällen die erste Diagnose anhand der Röntgen- und Computertomographie mit anschließender Bestimmung der histologischen Gruppe und der Beurteilung des Tumorstatus (Toloza et al., 2003). Die weitere Therapie wird festgelegt in Abhängigkeit des Tumorstadiums, dessen Beurteilung auf dem TNM-System basiert (Wohlschläger et al., 2010). Der Tumorstatus (T) wird eingeteilt in vier Stufen (T1-T4), wobei die Beurteilungsstufen in Abhängigkeit von Tumorgöße, Tumorlokalisation, Entzündungs- und Infiltrationsvorgängen abgeschätzt werden. Der Lymphknotenstatus (N) hat entscheidenden Einfluss auf das Vorgehen bezüglich operativer Eingriffe, systemischer Therapie oder Bestrahlung bei nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC). Die Einteilung erfolgt in vier Stufen von N0 (kein Lymphknotenbefall) bis N3, wobei nicht nur die Anzahl, sondern auch die Lokalisierung der befallenen Lymphknoten eine entscheidende Rolle spielen. Die Kombination aus Lymphknotenstatus (N0-N3) und Tumorstatus (T1-T4) ergibt die Tumorstadien, aufgeführt in Tabelle 1.1.

Frühe Stadien von NSCLC (Stadium I-II) können operativ behandelt werden, lokal fortgeschrittene (Stadium IIIA) werden oft mit kombinierter Chemoradiotherapie behandelt. Fortgeschrittene und metastasierende NSCLCs (Stadium IIIB) haben eine sehr schlechte Prognose und die Standardtherapien beinhalten aggressive Komponenten. Oftmals werden platinbasierte Wirkstoffe eingesetzt, zum Teil auch in Kombination mit Wirkstoffen der neueren Generation wie Gemcitabin und Vinorelbine (Stin-

Tabelle 1.1: Tumorstadien für die Diagnostik von Lungenkrebs als Kombination von Lymphknotenstatus (N0-N3) und Tumorstatus (T1-T4).

Status	T1	T2	T3	T4
N0	IA	IB	IIB	IIIB
N1	IIA	IIB	IIIA	IIIB
N2	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB
N3	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB

chcombe and Socinski, 2009). Trotz der Anwendung von aggressiven Wirkstoffen ist die Verlängerung der Überlebenszeit nur gering. Durch den Einsatz von spezifischen Wirkstoffen zur Inhibition spezieller Onkogene konnte das Therapieergebnis im Vergleich zur Kombination von Platin und Wirkstoffen der neueren Generation verbessern (Oxnard and Miller, 2010; Hirsh, 2010). Die Indikation für die Behandlung mit spezifischen Wirkstoffen kann auf klinischer, histologischer oder molekularer Basis ermittelt werden. Klinische Indikatoren wie weibliches Geschlecht, asiatische Abstammung und Nichtraucher indizieren eine Behandlung mit EGFR-Inhibitoren (z.B. Gefitinib, Erlotinib) (Giaccone, 2005). Auf molekularer Ebene ist die Überexpression und Mutation des EGFR ein Anhaltspunkt für erfolgreichen Einsatz von EGFR-Inhibitoren. Eine Mutation von KRAS dagegen weist, wie auch die spezielle Mutation T790M des EGFR, auf eine Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren hin (van Zandwijk et al., 2007).

1.2.2 Der EGFR-Signalweg im Lungenkrebs

Mutationen in Genen, die für Proteine der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Signalwege codieren, sind in Lungenkrebs sehr häufig zu finden und spielen die größte Rolle für die Planung der Behandlungsstrategie. Daher ist der EGF-Rezeptor einer der am besten charakterisierten Rezeptoren im Zusammenhang mit NSCLC. Mutationen des Rezeptors, die zu einer konstitutiven Aktivierung führen, stimulieren die darunterliegenden Signalwege RAS-RAF-MEK und PI3K-AKT-mTOR, was zu unkontrolliertem Zellwachstum führt (Sanders and Albitar, 2010) (siehe Abbildung 1.1). Die Häufigkeit einer EGFR-Mutation in Lungenkrebs ist korreliert mit dem Tabakkonsum und der histologischen Klassifizierung. Ungefähr 50 % der nichtrauchenden Lungenkrebspatienten und etwa 15 % der rauchenden Patienten haben eine EGFR-Mutation. Das bedeutet, Rauchen

1. EINLEITUNG

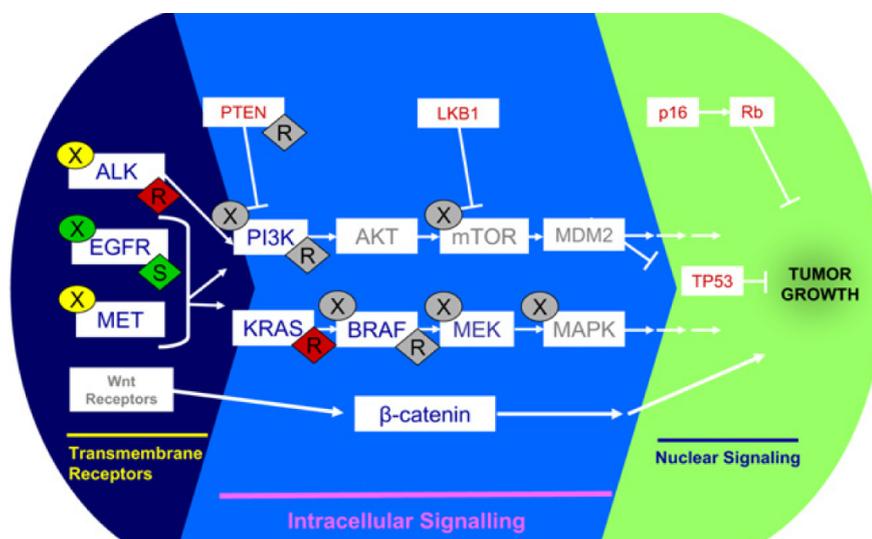


Abbildung 1.1: Überblick der Signaltransduktionsgene, die in nicht kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) häufig mutiert sind (blaue Schrift: Onkogene, rot: Tumorsuppressorgene). Signalproteine, die von spezifischen Wirkstoffen inhibiert werden, sind mit X markiert (grün: gängige klinische Routine für NSCLC, gelb: in klinischer Studie für NSCLC, grau: in klinischer Studie für andere Krebsarten bzw. getestet auf NSCLC-Zelllinien). Mutationen mit bekannter Reaktion auf anti-EGFR-Therapie sind indiziert mit sensitiv (S) und resistent (R) im farbigen Viereck (grün/rot: Reaktion von NSCLC bekannt, grau: Reaktion in anderen Krebsarten bekannt). Abbildung entnommen von Sanders und Kollegen (Sanders and Albitar, 2010).

steigert das Risiko, auch ohne onkogene EGFR-Mutation an Lungenkrebs zu erkranken, erheblich. Mutationen werden in fast 40 % der Adenokarzinompatienten (AD) gefunden, 30 % in gemischten Adenokarzinom-Plattenepithelkarzinomen und weniger als 5 % in Plattenepithel-(SQ) oder großzelligem Lungenkarzinom (LC). Unter allen histologischen Subtypen betreffen mehr als 70 % die Exons 19 und 21. Nur wenige EGFR-Mutationen wurden ausserhalb der Exons 18-21 gefunden, die für die Tyrosinkinase-Domäne codieren (Sanders and Albitar, 2010). Die inhibitorresistente Mutation T790M steht häufig im Zusammenhang mit erworbener Resistenz (Pao et al., 2005). Eine zusätzliche EGFR-Aktivierung kann auch durch eine Genamplifikation entstehen, die häufig in mutierten EGFR-Genen stattfindet und damit zu schlechter Prognose führt.

Der RAS-RAF-MEK-Signaltransduktionsweg wird direkt vom EGF-Rezeptor aktiviert. Eine aktivierende Mutation im KRAS-Gen ist die häufigste Mutation der drei

RAS-Gene (H-, K-, NRAS) in humanem Krebs, macht die Signaltransduktion unabhängig vom übergeordneten Rezeptor und führt zusätzlich zu einem veränderten Genexpressionsprofil (Roberts et al., 2010). Diese Unabhängigkeit macht die Tumorzellen widerstandsfähig gegen Behandlungen mit EGFR-Inhibitoren und ist damit ein Negativindikator für die spezifische Therapie (Massarelli et al., 2007). Zur Behandlung derartig mutierter Tumore ist die Inhibition einer KRAS-nachgeschalteten Kinase wie MEK1 vielversprechend. (Yeh et al., 2009).

1.3 Das Prostatakarzinom

1.3.1 Diagnose und Therapie

Prostatakrebs ist die unter Männern am weitesten verbreitete Krebsart (Crawford, 2009) und weist eine enorme biologische Heterogenität auf. Während einige Patienten mit metastasierenden Tumoren bereits 2-3 Jahre nach der Diagnose sterben, können andere 10-20 Jahre mit lokal begrenzten Tumoren leben. Nach Lungenkrebs ist Prostatakrebs die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern (Jemal et al., 2010). In den letzten drei Jahrzehnten hat die Verfügbarkeit des Bluttests für PSA (Prostate-specific antigen) die Diagnose von Prostatakrebs erleichtert (Lilja et al., 2008), obwohl ein hoher Anteil falsch positiver Analysewerte den Nutzen relativiert. Das Problem des PSA-Tests ist die unzureichende Spezifität hinsichtlich der Unterscheidung von gutartigen und aggressiven Tumoren (Tosoian and Loeb, 2010). So werden auch für gutartige Prostata-Hyperplasien (BPH) hohe Gehalte an PSA im Serum gemessen und die Patienten werden weiteren Behandlungen (z.B. Biopsien) unterzogen. Patienten mit erhöhtem PSA-Wert werden üblicherweise einer Biopsie unterzogen, um zu beurteilen, ob Krebs vorhanden ist. Das gängige Verfahren zur Beurteilung der Biopsien ist die Bewertung nach Gleason, die bereits 1966 eingeführt wurde (Gleason, 1966; Mellinger et al., 1967). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Beurteilung der Dedifferenzierung der beiden häufigsten Zellen der Prostata in fünf Stufen (siehe Abbildung 1.2) und wird dargestellt als Summe der Bewertungsstufen. Die Gleasonsumme von 7 kann aus den Gleasonwerten 3+4 oder 4+3 entstehen, wobei die erste Ziffer die Dedifferenzierungsstufe des häufigsten Zellmusters bewertet und die zweite Ziffer die zweithäufigsten Zellen. Patienten mit einer Gleasonsumme von weniger oder gleich 6 bleiben dabei unter weiterer Beobachtung, dagegen erfordert eine Gleasonsumme von

1. EINLEITUNG

7 oder mehr therapeutische Maßnahmen (Shah, 2009). Die Beurteilung der Prostata nach den Gleasonwerten ist bis heute, trotz Schwächen durch individuellen Einfluss der Pathologen (Burchardt et al., 2008), der zuverlässigste klinische Prognosemarker und spielt eine entscheidende Rolle für die individuelle Therapiegestaltung. Zeigt der pathologische Befund die Notwendigkeit einer Behandlung, bestehen folgende Möglichkeiten: eine Resektion, Strahlenbehandlung oder die Implantation radioaktiven Materials (Brachytherapie). Im Falle eines fortgeschrittenen Stadiums werden diese Therapieansätze ergänzt oder ersetzt mit chemischer Kastration zur Absenkung des Androgenniveaus. Diese Behandlung reduziert zwar den Tumor und senkt den zirkulierenden PSA-Spiegel, in den meisten Fällen jedoch kehrt die Krankheit in einer aggressiveren, androgenunabhängigen Form zurück. Diese Prostatatumore sind weitgehend resistent gegen jede Behandlung, eine Behandlung mit Standardtherapeutika bewirkt nur noch kurze Verlängerungen der Überlebenszeit (Petrylak et al., 2004).

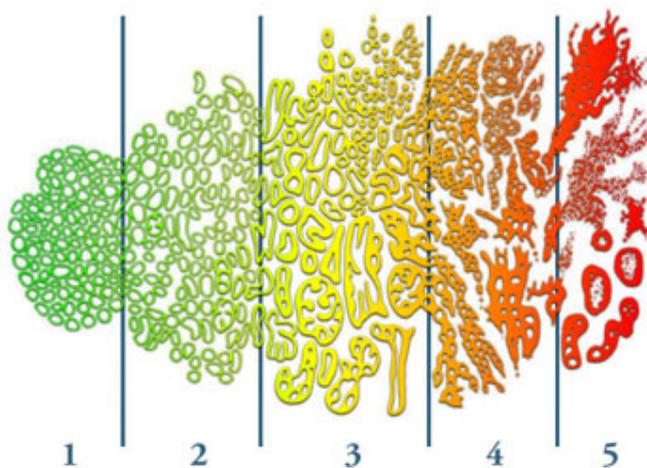


Abbildung 1.2: Beurteilungsschema der Zelldifferenzierung nach Gleason von Stufe 1 (annähernd normale Zellstrukturen) bis Stufe 5 (entartete Zellen mit hohem onkogenen Potential). Abbildung von St. Johns Providence Cancer Institute.

Nach den neuesten Empfehlungen sollten PSA-Untersuchungen später und seltener erfolgen, was eine neue Herausforderung für die Diagnose und Behandlung des Prostatakrebs darstellt (Wolf et al., 2010; Brooks et al., 2010). Diese Empfehlung wurde ausgesprochen, da die ausgedehnte PSA-Analyse zu einer häufigen Diagnose von relativ ungefährlichen Tumoren mit niedrigem Gleasonwert geführt hat, die keine Behandlung indizieren. Trotzdem wird sich ein kleiner Anteil von zunächst lokalisierten

Tumoren schnell entwickeln und benötigt sofortige Behandlung (Lu-Yao et al., 2009). Die Schwierigkeit der Diagnose besteht also darin, innerhalb der Tumore mit niedrigem Gleasonwert bereits zum Zeitpunkt der Biopsie zwischen aggressiven und benignen Tumoren zu unterscheiden (Sartor et al., 2008).

1.3.2 Molekulare Grundlagen des Prostatakrebs

Kennzeichnend für Prostatakrebs sind multiple unabhängige Primärtumore, die sich auch auf genetischer Ebene unterscheiden (Mehra et al., 2007; Clark et al., 2008). Im Gegensatz dazu sind die Metastasen innerhalb eines Patienten, trotz phänotypischer Heterogenität, klonal verwandt (Liu et al., 2009). Die molekulare Heterogenität der primären Prostataumore hat bisher verhindert, klare Subtypen zu definieren, die zum Verständnis des Unterschiedes zwischen latenten und klinisch relevanten Tumoren beitragen. Grundsätzlich scheinen Punktmutationen selten zu sein, so dass keine einzelnen Genmutationen als typisch für Prostataumore identifiziert werden konnten (Taylor et al., 2010). Vielmehr sind Veränderungen von Genen in Prostataumoren auf die Anzahl von Genkopien zurückzuführen. Über vergleichende genomische Hybridisierung (CGH) konnten Zugewinne der chromosomalen Region 8q und Verluste von 3p, 8p, 10q, 13q und 17p identifiziert werden (Lapointe et al., 2007; Taylor et al., 2010). Einige dieser genetischen Aberrationen wurden auch in Prostata-intraepithel-Neoplasmen (PIN) identifiziert, so dass sie als Wegbereiter für die Entstehung als auch die Progression von Prostatakarzinomen gelten. Einige Gene mit Schlüsselfunktion konnten den am häufigsten betroffenen Regionen zugeordnet werden, darunter NKX3.1 auf 8p21, PTEN auf 10q23 und MYC auf 8q24.

Der Androgenrezeptor-Signalweg spielt sowohl bei der regulären Entwicklung des Prostatagewebes als auch des Prostatakrebs eine zentrale Rolle. Das Androgen Testosteron und die aktivere Form Dihydroxy-Testosterone sind die Hauptliganden des AR. Der AR bindet nach Aktivierung spezifisch an DNA-Sequenzen (androgen responsive elements ARE) und ermöglicht über Chromatinummodellierung die Transkription von Genen für Zellwachstum und Proliferation. Eine Aktivierung von AR durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, MAP-Kinasen und AKT ist auch unabhängig von Androgen möglich (Manin et al., 2002), wodurch der AR-Signalweg eng verknüpft ist mit diesen typischen onkogenen Signalwegen. Daneben verhindert die Phosphorylierung des AR an Serin dessen Proteolyse (Blok et al., 1998) und fördert die Aktivität bei niedrigen

1. EINLEITUNG

Androgenkonzentrationen. Eine vielversprechende Entdeckung im Zusammenhang mit dem AR-Signalweg war eine Translokation von Chromosomen, durch die einige ETS-Transkriptionsfaktoren (ERG, ETV1, ETV4) aktiviert werden. Die häufigste Umlagerung generiert ein TMPRSS:ERG Fusionsgen, das zur Expression von ERG führt, kontrolliert vom androgenabhängigen TMPRSS-Promotor (Tomlins et al., 2005; Saramäki et al., 2008). Dieses Fusionsgen ist in etwa 15 % der fortgeschrittenen PINs und 50 % der lokalisierten Tumore zu finden (Mosquera et al., 2008; Albadine et al., 2009). Trotz der Häufigkeit dieses Fusionsgens ist weder seine Funktion noch das prognostische Potential abschließend geklärt.

1.4 Proteomanalytik

1.4.1 Bedeutung der Proteinanalytik

Für das Verständnis komplexer Zusammenhänge wie der Regulation zellulärer Systeme ist es unerlässlich, die einzelnen Komponenten zu identifizieren und deren Zusammenspiel zu analysieren. Eine wichtige Rolle spielen dabei die biochemischen Aktivitäten der Proteine, wie diese kontrolliert und modifiziert werden. Traditionell werden Proteine und deren Aktivität im Einzelmaßstab untersucht, in einer Abfolge einzelner Experimente. Diese Vorgehensweise ist jedoch nicht optimal, sondern vielmehr langsam und arbeitsintensiv (Hall et al., 2007). Um die Nachteile traditioneller Methoden auszugleichen, wurden sogenannte Hochdurchsatzmethoden zur Analyse von DNA, Protein und Metaboliten entwickelt. Besonders DNA-Mikroarrays haben sich schon früh in der Genomforschung durchgesetzt (Schena et al., 1995). Sie können eingesetzt werden, um Genexpressionsprofile sowie Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zu analysieren sowie Sequenzmutationen und -deletionen zu identifizieren. Vor allem Mikroarrays zur Analyse der mRNA-Expression sind in der biologischen Forschung unverzichtbar geworden. Jedoch können DNA-Mikroarrays nur Informationen über die Gene selbst und deren Transkription liefern und lassen nur indirekt Rückschlüsse auf die Funktion und Aktivität der codierten Proteine zu. Zur Analyse von Proteinen und deren Aktivität wurden daher ebenfalls Hochdurchsatzverfahren entwickelt. Auf diesem Gebiet haben sich vor allem die Massenspektrometrie (Krogan et al., 2006) und die Proteinarrays durchgesetzt (MacBeath and Schreiber, 2000; Korf et al., 2008; Laurenson et al., 2010).

1.4.2 Aufbau und Funktion von Proteinarrays

Zur Analyse von Genen und RNAs steht eine Vielzahl an validen kommerziellen Anwendungen zur Verfügung. Die Weiterentwicklung von Proteinmikroarrays wurde zum größten Teil in der wissenschaftlichen Forschung betrieben. Ursachen hierfür liegen in der Vielfältigkeit von möglichen Ansätzen, die Proteinarrays aufzubauen, wie auch in den Stabilitätsproblemen von Proteinen, was zu einer Verzögerung der Standardisierung führte. Demzufolge ist ein breites Spektrum an individuellen experimentellen Designs und Einsatzmöglichkeiten für Proteinarrays entstanden.

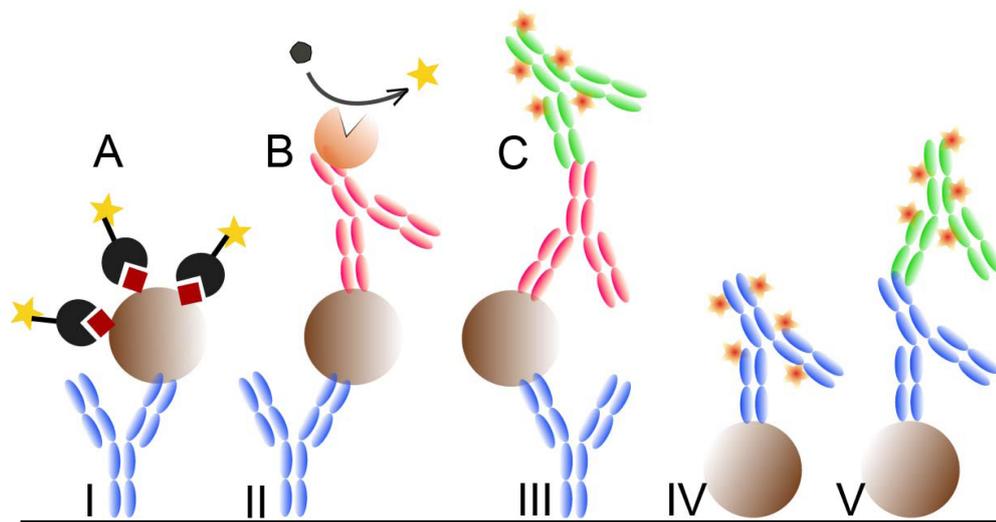


Abbildung 1.3: Verschiedene Arten von Proteinmikroarrays entstehen durch die individuelle Kombination aus Antikörpern und Detektionsmethoden. Immobilisierte Antikörper können Zielproteine aus einer flüssigen Probe herausfangen (I-III) oder die Proben werden direkt immobilisiert (IV, V). Die Detektion erfolgt über Markierung der Proteine, der Detektionsantikörper oder Zweitantikörper (A-C) und die Signalmoleküle werden vermittelt über Streptavidin-Biotin-Komplexe (A), generiert durch enzymatische Umsetzung von chromogenem Substrat (B) oder die Farbstoffe werden direkt an Antikörper gebunden (C).

Abbildung 1.3 veranschaulicht den modularen Aufbau und die Detektionsmöglichkeiten der Proteinarrays. Die am häufigsten verwendeten Protokolle zum Erzeugen von Signalen sind der enzymatische Umsatz von Substrat, die direkte Markierung mit sowie die Nutzung von Biotin-Streptavidin-Bindungskomplexen. Prinzipiell kann dabei die Probe selbst sowie der zielproteinspezifische oder Ig-spezifische Antikörper markiert sein. Die Signale selbst können dabei auf Basis von Fluoreszenz, über Farbniederschlag

1. EINLEITUNG

oder Chemolumineszenz erzeugt werden. Der Aufbau der ersten Proteinarrays bestand aus immobilisierten Antikörpern, welche die Zielproteine aus der Probe selektierten. Die Detektion erfolgte über direkt markierte Proteine oder über die Inkubation eines zweiten zielproteinspezifischen und dritten markierten Antikörpers. Diese Anordnung ist das sogenannte “Forward Phase“-Prinzip, was dem Aufbau eines DNA-Mikroarrays nachempfunden ist. Auf diese Weise kann in einer Probe parallel die Expression vieler Proteine untersucht werden.

1.4.3 Reverse Phase Protein Arrays

Im Gegensatz zu den Antikörperarrays werden bei den sogenannten “Reverse Phase“ Proteinarrays (RPPAs) die Proben als Array immobilisiert und anschließend mit einem individuellen monospezifischen Antikörper inkubiert (siehe Abbildung 1.4). Dieses Prinzip der RPPAs wurde vor etwa zehn Jahren vorgestellt (Paweletz et al., 2001) und seither in vielen Bereichen der Proteomforschung eingesetzt und weiterentwickelt. So wurde die Technologie genutzt, um Proteinexpressionsmuster in Zelllinien zu untersuchen (Nishizuka et al., 2003; Loebke et al., 2007; Akkiprik et al., 2006) als auch Biomarker in Prostataatumoren (Grubb et al., 2009), in kolorektalem Karzinom (Gulmann et al., 2009; Sheehan et al., 2008), in Brustkrebs (Boyd et al., 2008), in nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (Vanmeter et al., 2008) und in Ovarialkarzinom (Wulfkuhle et al., 2003; Sheehan et al., 2005; Petricoin et al., 2002) zu finden. Darüberhinaus rückt auch die klinische Anwendung der RPPAs immer weiter in den Fokus, da mit dieser Methode relativ schnell und kostengünstig detaillierte Proteinprofile von Tumorpatienten erstellt werden können, um die Behandlung individuell anzupassen (Calvo et al., 2005; Speer et al., 2007; Wulfkuhle et al., 2008). RPPAs sind besonders dafür geeignet, Proteine in sehr großen Probensätzen parallel in einer relativ kurzen Zeitspanne zu quantifizieren. Diese Eigenschaft macht sie zu einem sehr guten Werkzeug für die Systembiologie und die Biomarkerforschung. Die Daten von RPPAs sind semiquantitativ, das bedeutet, die Expression eines individuellen Zielproteins kann zunächst nur unter den Proben eines Arrays verglichen werden. Aussagen über die absolute Expression verschiedener Proteine einer bestimmten Probe sind unter Umständen ebenfalls möglich. Dies erfordert jedoch zielproteinspezifische Kalibratoren (Berg et al., 2010; Speer et al., 2007). Ein umfassendes Softwarepaket zur Analyse von RPPA-Daten, das lokal eingesetzt werden

kann, existiert noch nicht. Durch die hohe Diversität der RPPA-Protokolle sind bestehende Konzepte entweder beschränkt auf einzelne Schritte wie Normalisierung (Neeley et al., 2009) oder Quantifizierung (Hu et al., 2007) oder setzen die Nutzung einer bestimmten kommerziellen Software, wie z.B. MicroVigene[®], voraus (Stanislaus et al., 2008).

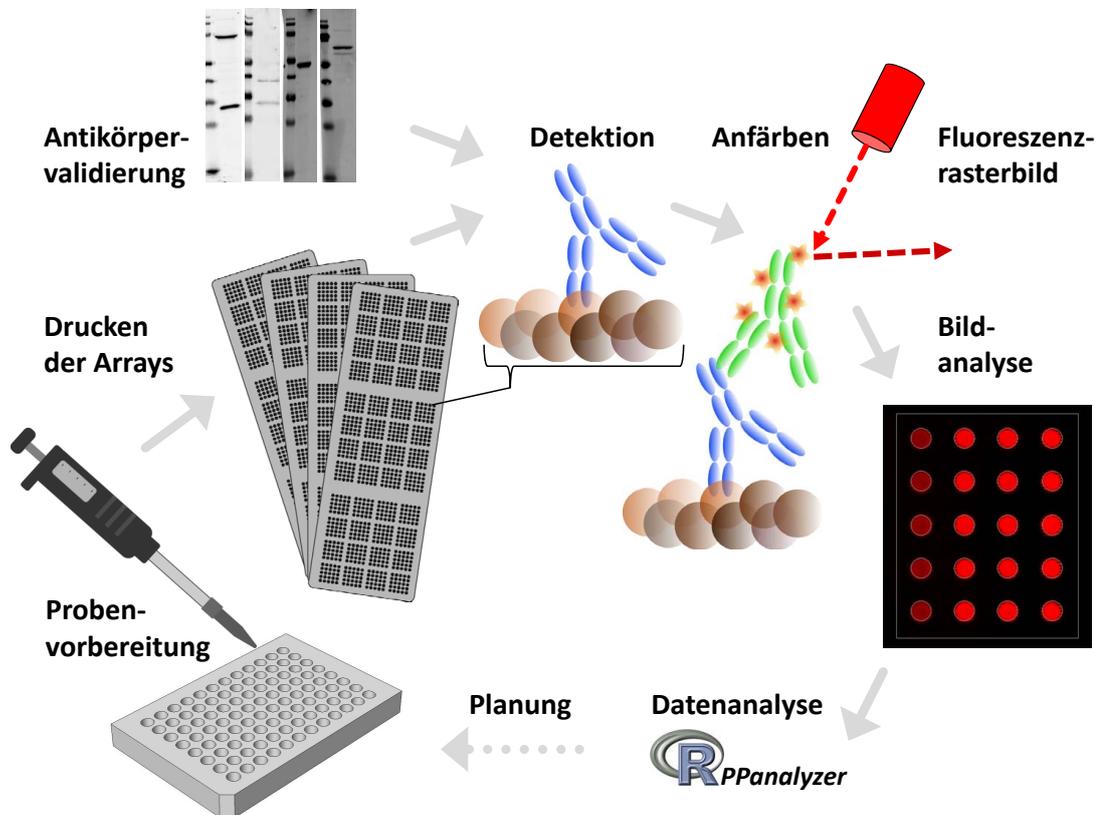


Abbildung 1.4: Arbeitskreislauf von RPPA-Experimenten: Nach der experimentellen Generation der Proben werden diese auf nitrozellulosebeschichtete Objektträger gedruckt. Die Zielproteine werden mit validierten Antikörpern detektiert und nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern gescannt (ein Fluoreszenzrasterbild erstellt). Mit Bildanalysesoftware werden die Fluoreszenzintensitäten in Zahlenwerte transformiert und anschließend mit dem R-paket RPPAnalyzer analysiert. Die Ergebnisse werden genutzt zur Planung der weiteren Experimente

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die RPPA-Technologie so zu optimieren, dass sie für bio-medizinische Fragestellungen einsetzbar ist. Dazu war es notwendig, den Durchsatz, die Sensitivität und die Robustheit der RPPAs weiterzuentwickeln und ein geeignetes Analysewerkzeug für die flexible Auswertung von RPPAs zu programmieren. Als Basis für die Weiterentwicklung diente das RPPA-Protokoll von Christian Löbke (Löbke et al., 2007). Die verbesserte Technologie und Datenanalyse sollte anschließend für die Untersuchung von nichtkleinzelligen Lungenkrebszelllinien eingesetzt werden, um Proteine zu finden, die mit der Sensitivität gegenüber Kinaseinhibitoren korrelieren und somit zur Vorhersage der Wirksamkeit der Wirkstoffe herangezogen werden können. Außerdem sollten über die Analyse von Signalproteinen in Prostatatumoren Expressions- und Aktivierungsprofile identifiziert werden, die mit dem Gleasonwert und dem TMPRSS:ERG Fusionsgen assoziiert sind, da die aktuellen molekularen Marker (z.B. AMARC, NKX3.1, CAMKK2 oder MAOA) nicht mehr prognostisches Potential als die traditionelle Beurteilung nach Gleason (True et al., 2006) bieten.

2

Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von folgenden Firmen erworben:

AppliChem (Darmstadt)	Baker (Groß-Gerau)	BioRad (München)
Fluka (Seelze)	Gerbu (Gaiberg)	Merck (Darmstadt)
PAA (Pasching)	Roth (Karlsruhe)	Sigma (Steinheim)

2.1.2 Geräte

2470 Nadeldrucker	Aushon, Billerica, USA
Sprint Piezodrucker	ArrayJet, Roslin, UK
Gewebehomogenisierer	Qiagen, Hilden, D
Biomek [®] FX	Beckman Coulter, Krefeld, D
Mikroarray-Inkubationskammer	Metecon, Mannheim, D
Inkubator BBD 6220	Heraeus, Hanau, D
Sterilbank (Hera-safe)	Heraeus, Hanau, D
Multikanalpipette	Biohit, Rosbach, D
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, D
Odyssey [®] Imaging System	LI-COR Bioscience, Lincoln, USA

2. MATERIAL & METHODEN

Axon 4000B Imaging System	Molecular Devices, Ismaning, D
pH Meter	Hanna Instruments, Kehl, D
Pipetteboy	Integra Biosciences, Fernwald, D
Pipetten	Gilson, Langenfeld, D Eppendorf, Hamburg, D
Elektrophoresezelle	BioRad, München, D
Elektrophorese-Netzgeräte	Consort, Turmhout, BE
Spectra MAX 190	Molecular Devices, Ismaning
Analysewaage	Mettler Toledo,
Schüttler	VWR, Darmstadt, D Stovall, Greensboro, UK Heidolph, Schwabach, D
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, D
Heizblock	Sigma, Steinheim, D
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, D Multifuge 4KR, Heraeus, Hanau, D Sigma 4K15C, Qiagen, Hilden, D Sorvall RC 5B Plus, Langenselbold, D Merck Eurolab, Darmstadt, D

2.1.3 Software

GenePix [®] 5.0	Molecular Devices, Ismaning, D
Odyssey [®] 2.0	LI-COR Bioscience, Lincoln, USA
R	(R Development Core Team, 2005)
Concept Explorer	(Yevtushenko, 2000)

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Mikrotiterplatten (6er)	Nunc, Langenselbold, D
Mikrotiterplatten (96er)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Mikrotiterplatten (384er)	ABgene, Epsom, UK
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, D

Zellschaber	TPP, Darmstadt, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Filterspitzen	Starlab, Ahrensburg, D
Pasteurpipetten	WU, Mainz, D
Reaktionsröhrchen	Eppendorf, Hamburg, D Greiner Bio-one, Frickenhausen, D
Serologische Pipetten	BD, Heidelberg, D
Nitrozelluloseslides	Grace Biolabs, Bend, USA
PVDF Membran (45 μ m)	Millipore, Eschborn, D
Blottingpapier (0,34 mm)	Whatman, Dassel, D
Stahlkugeln 5 mm	Qiagen, Hilden, D
Qiashredder	Qiagen, Hilden, D

2.1.5 Puffer, Nährmedien, Lösungen und Inhibitoren

0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
7-amino-actinomycin D	Calbiochem, Darmstadt
Antikörperverdünner	Dako, Glostrup
DMEM (41966)	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
DMEM (31053)	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
DPBS	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
Fetal	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
HEPES, 1M	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
l-glutamine, 200mM	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
Zelllysepuffer (M-PER)	Pierce, Bonn
Gewebelysepuffer (T-PER)	Pierce, Bonn
Nichtessentielle Aminosäuren	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
Nucleasefreies Wasser	Ambion, Darmstadt
Odyssey [®] Blockpuffer	Licor Bioscience, Bad Homburg
OptiMEM	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, Steinheim
Fast Green FCF	Sigma, Steinheim
Kolloidales Gold	BioRad, München

2. MATERIAL & METHODEN

SyproRuby®	BioRad, München
Ladepuffer (Roti-Load1)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
Natriumpyruvate, 100mM	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
TEMED	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Proteaseinhibitor (Complete Mini)	Roche, Mannheim
Phosphataseinhibitor (PhosStop)	Roche, Mannheim
peqGold Proteinmarker IV	Peqlab, Erlangen
peqGold Proteinmarker V	Peqlab, Erlangen
Lipofectamine™2000	Invitrogen, Darmstadt

Pufferstocklösungen

10x PBS (pH 7,4)	1,37M NaCl
	27mM KCL
	18mM KH ₂ PO ₄
	100mM Na ₂ PO ₄
10x TBS (pH 7,6)	1,37M NaCl
	200mM Tris

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Acrylamidgele für die Elektrophorese

	Sammelgel	Trenngele		
		15%	12,5%	7,5%
Acrylamid	1,33 ml	10 ml	8,3 ml	5 ml
4x Gel Puffer	2,55 ml	5 ml	5 ml	5 ml
10% SDS (w/v)	100 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l
10% APS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	5 μ l	6,7 μ l	6,7 μ l	6,7 μ l
ddH ₂ O	6 ml	4,7 ml	6,4 ml	9,7 ml

SDS-PAGE

4 x Sammelgelpuffer	5 M Tris-HCl; pH 6,8
4 x Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl; pH 8,8
1 x Laufpuffer	25 mM glycine + 0.1% SDS (w/v)
APS	10% in H ₂ O

Western Blot

Kathodenpuffer	40mM aminohexanoic acid, 20% Methanol
Anodenpuffer I	300mM Tris Base, 20% Methanol
Anodenpuffer II	25mM Tris Base, 20% Methanol
Waschpuffer	0,1% Tween [®] 20 in TBS (TBST)
Blockpuffer	Odyssey [®] Blockpuffer 1:2 in TBS 5mM Natriumfluorid 1mM Natriumorthovanadat
Zweitantikörperpuffer	Waschpuffer + 0,02% SDS (w/v)

Reverse Phase Proteinarray

Blockpuffer	Odyssey [®] Blockpuffer 1:2 in PBS 5mM Natriumfluorid 1mM Natriumorthovanadat
Erstantikörperpuffer	Blockpuffer oder DAKO Antikörperverdünner
Zweitantikörperpuffer	Waschpuffer + 0,02% SDS (w/v) + 0,5% BSA

2. MATERIAL & METHODEN

2.1.6 siRNAs

Tabelle 2.2: Auflistung der siRNAs zur Reduktion der Proteinexpression. Die Artikelnummern beziehen sich jeweils auf Mischungen von vier spezifischen Sequenzen (ON-TARGET plus Set of 4, Dharmacon RNAi Technologies).

Gen	Gen-ID	Accessionnummer	Artikelnummer
AKT1	207	NM_001014431	LQ-003000-00-0002
AKT2	208	NM_001626	LQ-003001-00-0002
CBL	867	NM_005188	LQ-003003-00-0002
CCND1	595	NM_053056	LQ-003210-00-0002
CCND3	896	NM_001760	LQ-003212-00-0002
CDK2	1017	NM_052827	LQ-003236-00-0002
CDK4	1019	NM_000075	LQ-003238-00-0002
EGFR	1956	NM_201283	LQ-003114-00-0002
ERBB2	2064	NM_004448	LQ-003126-00-0002
ERRFI1	54206	NM_018948	LQ-017016-01-0002
FRAP1	2475	NM_004958	LQ-003008-00-0002
GRB2	2885	NM_203506	LQ-019220-00-0002
GSK3B	2932	NM_002093	LQ-003010-00-0002
INPPL1	3636	NM_001567	LQ-004152-00-0002
MAPK1	5594	NM_138957	LQ-003555-00-0002
MAPK14	1432	NM_139013	LQ-003512-00-0002
MAPK3	5595	NM_002746	LQ-003592-00-0002
MAPK8	5599	NM_139049	LQ-003514-00-0002
PIK3CA	5290	NM_006218	LQ-003018-00-0002
PIK3CB	5291	NM_006219	LQ-003019-00-0002
PLCG1	5335	NM_182811	LQ-003559-00-0002
PRKCA	5578	NM_002737	LQ-003523-00-0002
PTEN	5728	NM_000314	LQ-003023-00-0002
PTPN11	5781	NM_002834	LQ-003947-00-0002
RB1	5925	NM_000321	LQ-003296-00-0002
SRC	6714	NM_198291	LQ-003175-00-0002
STAT3	6774	NM_213662	LQ-003544-00-0002

2.1.7 Antikörper

Tabelle 2.3: Antikörper zur Detektion von Gesamtprotein

Zielprotein	Synonyme	Anbieter	Bestellnummer	Wirt
AKT1	PKB alpha, Rac	Becton Dickinson	610860	Maus
AKT2	PKB beta, Rac-2	Cell Signaling	3063	Kaninchen
AKT3	PKB gamma	Cell Signaling	3788	Kaninchen
BAX	Bcl2L4	Cell Signaling	2772	Kaninchen
BCL2L1	Bcl-X	Sigma	B9304	Kaninchen
CASP3	Caspase 3	Cell Signaling	9665	Kaninchen
CBL	c-CBL	Cell Signaling	2747	Kaninchen
CCNE1	cyclinE1	Santa Cruz	sc-247	Kaninchen
CCND1	cyclinD1	Cell Signaling	2922	Kaninchen
CCND3	cyclinD3	Cell Signaling	2936	Maus
CDK2	CDK2	Sigma	C5223	Kaninchen
CDK4	CDK4	Epitomics	2341-1	Kaninchen
CDK6	CDK6	Santa Cruz	sc-69766	Maus
CDKN1B	p27	Becton Dickinson	610241	Maus
EGFR	ERRB1	Cell Signaling	2646	Kaninchen
EGFR	ERRB1	Santa Cruz	sc-03	Kaninchen
ERBB2	Her2	Neomarker	ab17	Maus
ERBB3	Her3	Santa Cruz	sc-415	Maus
ERRFI1	MIG6	Santa Cruz	sc-46165	Ziege
FRAP1	mTor	Cell Signaling	2983	Kaninchen
GRB2	Ash, NCKAP2	Cell Signaling	3972	Kaninchen
GSK3B	Gsk3beta	Cell Signaling	9315	Kaninchen
INPPL1	SHIP2	Cell Signaling	2839	Kaninchen
KRAS	c-Kras	Abcam	ab55391	Maus
MAPK1	ERK2	Santa Cruz	sc-81458	Maus
MAPK14	p38alpha	Cell Signaling	9212	Kaninchen
MAPK3	ERK1	RnD	AF1575	Kaninchen
MAPK8	JNK1	Abcam	ab7949	Kaninchen
MAP2K1	MEK1	Becton Dickinson	610122	Maus
MET	HGFR	Cell Signaling	3127	Maus
NFKBIA	Ik-B alpha	Cell Signaling	9242	Kaninchen
PAK1	Pak alpha	Cell Signaling	2602	Kaninchen
PCNA	PCNA	Santa Cruz	sc-7907	Kaninchen
PIK3CA	PI3K p110 alpha	Cell Signaling	4249	Kaninchen
PIK3CB	PI3K p110 beta	Abcam	ab32569	Kaninchen

2. MATERIAL & METHODEN

Tabelle 2.3: Antikörper zur Detektion von Gesamtprotein

Zielprotein	Synonyme	Anbieter	Bestellnummer	Wirt
PIK3R1	PI3Kp85 alpha	Abcam	ab40755	Kaninchen
PLCG1	PLCgamma	Abcam	ab41433	Maus
PLEKHE1	PHLPP1	Abcam	ab71277	Kaninchen
PP2A	PP2A A, PR65	Cell Signaling	2039	Kaninchen
PP2A	PP2A B, PR55	Cell Signaling	4953	Kaninchen
PRKCA	PKC alpha	Abcam	ab32376	Kaninchen
PTEN	MMAC1, PTEN1	Cell Signaling	9552	Kaninchen
PTPN1	PTP1B	Epitomics	2066-1	Kaninchen
PTPN11	SHP2	Epitomics	1609-1	Kaninchen
RB1	pRb, pp110	Cell Signaling	9309	Maus
RELA	Nf-kB p65	Cell Signaling	3034	Kaninchen
RPS6KB1	p70S6K	Becton Dickinson	611261	Maus
SHC1	p66, SHC	Cell Signaling	2432	Kaninchen
SMAD2	MADH2	Cell Signaling	3102	Kaninchen
STAT3	APRF	Calbiochem	569388	Kaninchen
STAT3	APRF	Cell Signaling	4904	Kaninchen
STAT3	APRF	Abcam	ab3162	Kaninchen
STAT3	APRF	Cell Signaling	9139	Maus
STAT3	APRF	Santa Cruz	sc-483	Kaninchen
STAT3	APRF	Millipore	06-569	Kaninchen
STAT3	APRF	Santa Cruz	sc-7179	Kaninchen
STAT3	APRF	Santa Cruz	sc-482	Kaninchen
XIAP	API3, XLP2	Sigma	X4503	Ziege

Tabelle 2.4: Antikörper zur Detektion von phosphoryliertem Protein

Zielprotein	Phosphorylierung	Anbieter	Bestellnummer	Wirt
AKT1	S473	Cell Signaling	4056	Kaninchen
EGFR	Y1086	Cell Signaling	2220	Kaninchen
EGFR	Y1068	Cell Signaling	2236	Maus
EGFR	Y1173	Cell Signaling	4407	Kaninchen
EGFR	Y992	Cell Signaling	2235	Kaninchen
ERBB2	Y1222	Cell Signaling	2243	Kaninchen
ERBB2	Y1139	Abcam	ab53290	Kaninchen
ERBB2	Y1248	Millipore	06-229	Kaninchen
MAPK1/3	T202,Y204	Cell Signaling	4370	Kaninchen
MAPK1/3	T202,Y204	RnD	AF1018	Kaninchen
MAPK14	T180,Y182	Cell Signaling	9215	Kaninchen
PAK1	T423	Sigma	P7746	Kaninchen
PRKCA	S657	Millipore	06-822	Kaninchen
PLCG1	S1248	Cell Signaling	4510	Kaninchen
RB1	S807,811	Cell Signaling	9308	Kaninchen
STAT3	Y705	Cell Signaling	9131	Kaninchen
STAT3	S727	Cell Signaling	9134	Kaninchen

2. MATERIAL & METHODEN

2.1.8 Lungenkrebszelllinien

Tabelle 2.5: Auflistung der Lungenkrebszelllinien und Einteilung der Sensitivitätsklassen der sieben Inhibitoren mit Er = Erlotinib, La = Lapatinib, Va = Vandetanib, Da = Dasatinib, PD = PD168393, UO = UO126 und VX = VX 680 in S = sensitiv, M = mittelsensitiv und R = resistent sowie n.v. = Information nicht verfügbar

Zelllinie	Anbieter	Nummer	Sensitivitätsklasse						
			Er	La	Va	Da	PD	UO	VX
A427	ATCC	HTB-53	M	M	M	M	M	R	S
A549	ATCC	CCL-185	R	R	M	R	R	M	R
Calu1	ATCC	HTB-54	R	R	M	M	M	M	M
Calu3	ATCC	HTB-55	M	S	M	M	S	R	R
Calu6	ATCC	HTB-56	M	M	M	R	R	M	M
Colo699	DSMZ	ACC 196	M	M	M	M	M	M	M
DV90	DSMZ	ACC 307	M	M	M	M	M	M	M
EKVX	Teil von NCI60	n.v.	R	R	M	M	M	M	M
H1299	ATCC	CRL-5803	R	R	R	M	R	R	M
H1355	ATCC	CRL-5865	M	M	M	M	M	S	M
H1395	ATCC	CRL-5868	M	M	R	R	M	M	R
H1437	ATCC	CRL-5872	R	R	R	M	R	M	M
H1563	ATCC	CRL-5875	R	R	M	M	M	M	M
H1568	ATCC	CRL-5876	M	M	M	M	S	M	M
H157	n.v.	n.v.	R	R	M	M	R	M	S
H1648	ATCC	CRL-5882	M	S	M	S	S	M	M
H1650	ATCC	CRL-5883	M	M	M	M	M	M	M
H1666	ATCC	CRL-5885	M	S	M	M	S	M	M
H1734	ATCC	CRL-5891	M	M	M	S	M	S	M
H1755	ATCC	CRL-5892	M	R	M	S	M	M	M
H1770	ATCC	CRL-5893	R	NA	M	R	M	NA	NA
H1781	ATCC	CRL-5894	M	M	R	M	S	M	S
H1792	ATCC	CRL-5895	R	R	M	M	R	M	M
H1819	ATCC	CRL-5897	M	S	M	M	M	R	M
H1838	ATCC	CRL-5899	M	R	M	M	S	R	R
H1915	ATCC	CRL-5904	R	R	M	M	M	M	M
H1944	ATCC	CRL-5907	M	R	M	M	M	M	M
H1975	ATCC	CRL-5908	R	R	M	M	M	M	M
H1993	ATCC	CRL-5909	M	M	M	R	M	S	M
H2009	ATCC	CRL-5911	R	R	M	M	M	M	M
H2030	ATCC	CRL-5914	M	M	M	M	M	M	M

Tabelle 2.5: Auflistung der Lungenkrebszelllinien und Einteilung der Sensitivitätsklassen der sieben Inhibitoren mit Er = Erlotinib, La = Lapatinib, Va = Vandetanib, Da = Dasatinib, PD = PD168393, UO = UO126 und VX = VX 680 in S = sensitiv, M = mittelsensitiv und R = resistent sowie n.v. = Information nicht verfügbar

Zelllinie	Anbieter	Nummer	Sensitivitätsklasse						
			Er	La	Va	Da	PD	UO	VX
H2052	ATCC	CRL-5915	M	R	M	S	M	M	M
H2077	n.v.	n.v.	R	R	M	M	M	M	M
H2087	ATCC	CRL-5922	R	R	M	M	R	M	M
H2110	ATCC	CRL-5924	M	M	M	M	M	M	S
H2122	ATCC	CRL-5985	R	R	R	M	M	M	M
H2126	ATCC	CCL-256	R	R	M	M	M	R	R
H2172	ATCC	CRL-5930	R	M	R	M	M	M	M
H2228	ATCC	CRL-5935	R	R	M	M	R	NA	NA
H23	ATCC	CRL-5800	R	M	M	M	M	M	NA
H2347	ATCC	CRL-5942	R	M	M	M	R	M	R
H2444	ATCC	CRL-5945	M	M	M	M	M	M	R
H28	ATCC	CRL-5820	R	M	M	S	M	S	M
H2882	n.v.	n.v.	R	M	M	M	M	M	M
H2887	n.v.	n.v.	R	R	M	M	NA	M	M
H3122	n.v.	n.v.	R	R	M	M	M	S	S
H322	n.v.	n.v.	M	M	M	M	S	M	M
H322M	Teil von NCI60	n.v.	M	S	M	S	S	M	M
H3255	n.v.	n.v.	S	S	S	M	S	M	M
H358	ATCC	CRL-5807	M	M	M	M	S	S	M
H441	ATCC	HTB-174	M	R	M	M	M	M	M
H460	ATCC	HTB-177	R	M	R	R	R	M	M
H520	ATCC	HTB-182	R	M	M	M	M	M	M
H522	ATCC	CRL-5810	M	M	M	M	M	M	M
H596	ATCC	HTB-178	M	R	M	M	R	M	M
H647	ATCC	CRL-5834	R	R	M	M	R	M	M
H661	ATCC	HTB-183	R	R	M	M	M	M	M
H820	ATCC	HTB-181	R	R	M	M	M	M	S
HCC1171	n.v.	n.v.	R	R	M	M	M	M	M
HCC1195	n.v.	n.v.	R	NA	M	M	M	M	R
HCC1359	n.v.	n.v.	R	R	R	M	M	M	M
HCC15	DSMZ	ACC 496	R	R	M	M	M	M	M
HCC1833	n.v.	n.v.	R	M	M	M	R	S	M
HCC193	n.v.	n.v.	R	M	M	M	S	M	M

2. MATERIAL & METHODEN

Tabelle 2.5: Auflistung der Lungenkrebszelllinien und Einteilung der Sensitivitätsklassen der sieben Inhibitoren mit Er = Erlotinib, La = Lapatinib, Va = Vandetanib, Da = Dasatinib, PD = PD168393, UO = UO126 und VX = VX 680 in S = sensitiv, M = mittelsensitiv und R = resistent sowie n.v. = Information nicht verfügbar

Zelllinie	Anbieter	Nummer	Sensitivitätsklasse						
			Er	La	Va	Da	PD	UO	VX
HCC2279	n.v.	n.v.	S	R	NA	M	M	M	M
HCC2429	n.v.	n.v.	R	M	M	M	R	M	S
HCC2450	n.v.	n.v.	R	R	M	M	M	M	M
HCC2935	ATCC	CRL-2869	M	S	S	M	S	M	R
HCC364	n.v.	n.v.	M	R	M	M	M	M	M
HCC366	DSMZ	ACC 492	M	R	M	M	M	M	M
HCC4006	ATCC	CRL-2871	S	S	S	M	S	M	M
HCC44	DSMZ	ACC 534	R	R	M	M	M	M	M
HCC461	n.v.	n.v.	M	R	M	M	R	M	M
HCC515	n.v.	n.v.	M	M	M	M	M	M	M
HCC78	DSMZ	ACC 563	R	M	M	M	M	M	M
HCC827	ATCC	CRL-2868	S	S	S	M	S	R	M
HCC95	n.v.	n.v.	R	M	M	M	M	M	M
HOP62	Teil von NCI60	n.v.	R	M	M	M	S	M	M
HOP92	Teil von NCI60	n.v.	R	R	M	M	R	M	M
LCLC10314	DSMZ	ACC 384	R	R	M	M	R	M	M
LCLC97TM1	DSMZ	ACC 388	M	M	M	M	M	M	S
LouNH91	DSMZ	ACC 393	M	M	M	M	S	M	M
PC9	n.v.	n.v.	S	M	S	M	S	M	M
Sklu1	ATCC	HTB-57	R	R	M	M	M	M	M

2.1.9 Prostatagewebeprobe

Tabelle 2.6: Auflistung der Prostatagewebeprobe

Probe	Fusionsgen	Konzentration	Gewebe	Alter	Gleasonwert
IGP-16		2.9	Normal	50	3+3
IGP-17		2.5	Normal	59	3+3
IGP-18		1.8	Normal	69	3+3
IGP-20		1.5	Normal	54	3+3
IGP-21	N	2.6	Tumor	68	4+5

Tabelle 2.6: Auflistung der Prostatagewebeproben

Probe	Fusionsgen	Konzentration	Gewebe	Alter	Gleasonwert
IGP-23	N	3	Tumor	50	4+3
IGP-25	Y	2.1	Tumor	61	4+5
IGP-26	N	1.8	Tumor	68	5+4
IGP-27		2.9	Tumor	66	4+5
IGP-28	Y	2.6	Tumor	62	3+3
IGP-29	N	3.8	Tumor	67	4+3
IGP-30		2.8	Tumor	63	4+3
IGP-31	N	1.8	Tumor	66	4+4
IGP-32	N	2.7	Tumor	69	5+4
IGP-33	N	3.2	Tumor	68	4+5
IGP-34		1.7	Tumor	70	4+5
IGP-35	N	2.1	Tumor	63	5+4
IGP-36	N	3.2	Tumor	67	4+3
IGP-37	Y	2.1	Tumor	50	4+3
IGP-38	N	3.4	Tumor	66	4+5
IGP-39		2.4	Tumor	64	4+3
IGP-40	Y	2.9	Tumor	67	4+3
IGP-41	Y	1.7	Tumor	66	4+3
IGP-42		6	Tumor	57	4+5
IGP-43	N	3.4	Tumor	57	3+4
IGP-44	Y	2.8	Tumor	68	4+3
IGP-45		2.6	Tumor	70	4+3
IGP-47	Y	1.2	Tumor	61	3+4
IGP-48	Y	2.1	Tumor	60	3+4
IGP-49	Y	1.6	Tumor	74	4+3
IGP-51	N	2.5	Tumor	65	4+3
IGP-52	N	2.9	Tumor	72	4+3
IGP-53		2.5	Tumor	58	4+3
IGP-54		2.1	Tumor	69	4+3
IGP-55	N	1.9	Tumor	65	4+3
IGP-57	N	2.1	Tumor	63	4+3
IGP-59		2.2	Tumor	56	3+4
IGP-60	Y	1.2	Tumor	70	3+4
IGP-61	Y	2.7	Tumor	58	3+4
IGP-62	Y	1.4	Tumor	63	4+3
IGP-63		1.4	Tumor	68	4+3
IGP-64	Y	4.7	Tumor	61	3+4

2. MATERIAL & METHODEN

Tabelle 2.6: Auflistung der Prostatagewebeproben

Probe	Fusionsgen	Konzentration	Gewebe	Alter	Gleasonwert
IGP-75		2.8	Normal	67	3+4
IGP-76		3	Normal	59	3+3
IGP-78		2.5	Normal	70	3+3
IGP-79		2.2	Normal	51	3+4
IGP-80	Y	1.1	Tumor	51	3+4
IGP-81	N	1.1	Tumor	64	4+3
IGP-82		1.6	Tumor	67	4+5
IGP-83	N	3	Tumor	66	4+3
IGP-84		1.7	Normal	51	3+3
IGP-85		2.7	Normal	67	4+3
IGP-86		3.5	Normal	65	3+4
IGP-87		2.5	Normal	72	3+4
IGP-88		3.1	Normal	67	4+3
IGP-89		2.1	Normal	49	3+3
IGP-90		1.5	Normal	56	3+3
IGP-91		1.8	Normal	57	3+4
IGP-92		2	Normal	75	3+4
IGP-102		2.6	Normal	62	3+3
IGP-103		1.5	Normal	61	3+3
IGP-104		2.3	Normal	65	4+3
IGP-105	y	1.5	Tumor	67	3+3
IGP-110	N	1.6	Tumor	57	4+3
IGP-111		2.5	Tumor	65	3+4
IGP-113		1	Tumor	68	4+5
IGP-115	y	1.7	Tumor	48	3+3
IGP-116	N	1.7	Tumor	67	3+4
IGP-117	Y	2.6	Tumor	67	3+3
IGP-118	N	3.2	Tumor	61	3+4
IGP-119		2	Normal	60	3+4
IGP-120		2.5	Normal	63	3+4
IGP-122		1.5	Normal	61	3+4
IGP-123		2	Normal	67	3+4
IGP-124		2.1	Normal	69	3+3
IGP-126		2	Normal	56	3+3
IGP-127		2.6	Normal	69	3+4
IGP-137		1.7	Normal	68	3+3
IGP-138		2.5	Normal	51	3+4

Tabelle 2.6: Auflistung der Prostatagewebeproben

Probe	Fusionsgen	Konzentration	Gewebe	Alter	Gleasonwert
IGP-139		2.1	Normal	71	3+4
IGP-140		2.5	Normal	68	3+4
IGP-141		1.8	Normal	66	3+3
IGP-142		1.7	Normal	57	3+3
IGP-143		2.3	Normal	61	3+4
IGP-144		1.5	Normal	71	3+4
IGP-145		3.2	Normal	64	3+3
IGP-173		1.9	Normal	62	3+3
IGP-174		2.4	Normal	58	3+3
IGP-175		1.7	Normal	67	3+4
IGP-176		1.5	Normal	69	3+3
IGP-177		0.9	Normal	71	3+4
IGP-178		1.5	Normal	60	3+3
IGP-179		2	Normal	60	4+5
IGP-180		2.3	Normal	64	3+4
IGP-181		1.5	Normal	62	3+3
IGP-182		3.1	Normal	69	3+4
IGP-183		1.6	Normal	68	3+3
IGP-184		1.2	Normal	72	3+4
IGP-185		0.9	Normal	58	3+3
IGP-186		1.1	Normal	64	3+3
IGP-187		2.1	Normal	60	3+4
IGP-188		1.7	Normal	60	3+4
IGP-189		2.1	Normal	68	3+3
IGP-190		2.1	Tumor	65	3+4

2.2 Methoden

2.2.1 Proteinextraktion aus Zellen

Zur Extraktion der Proteine aus pelletiertem Zellmaterial wurde der Lysepuffer (M-Per mit Proteaseinhibitor und Phosphataseinhibitor) direkt auf die gefrorenen Zellen gegeben und auf- und abpipettiert, bis das Pellet komplett gelöst war. Zur Lyse eines Zellpellet einer 6-well Zellkulturschale wurden 25 μl Lysepuffer eingesetzt und für 20 min bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden

2. MATERIAL & METHODEN

anschließend mit einer Zentrifugation bei 16000 g sedimentiert. Im Falle eines Interesses an phosphorylierten Proteinen wurden die Zellen ohne vorherige Trypsinbehandlung direkt auf der Zellkulturplatte mit 40 μl Lysepuffer versetzt und mit einem Zellschaber abgelöst. Die weitere Extraktion erfolgte wie für Zellpellet beschrieben. Abschließend wurde mit einem modifizierten BCA Proteinassay die Proteinkonzentration bestimmt (Korf et al., 2008). Für Zellpellets von MDA-MB-231-Brustkrebszellen aus der Kavität einer 6fach-Zellkulturschale lag die Proteinausbeute bei ca. 75 μg .

2.2.2 Proteinextraktion aus Gewebe

Die Gewebestückchen wurden zunächst im gefrorenem Zustand in 10-30 mg große Stücke geteilt und gewogen. Die erforderliche Menge an Lysepuffer wurde nach dem Gewicht der Teilstücke berechnet. Pro Milligramm Gewebe wurden 10 μl Lysepuffer (T-Per mit Protease-, Phosphatase- und Kinaseinhibitor) zugegeben. Nach der Zugabe einer 5 mm Stahlkugel wurde die Probe bei 30000 rpm für 4 min homogenisiert und nochmals für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe auf Trockeneis eingefroren. Nachdem alle Proben eines Sets homogenisiert und lysiert waren wurden die Proben auf dem Thermoschüttler bei 4 °C und 300 rpm aufgetaut und bei 16000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einer Minute bei 16000 g über ein Homogenisierröhrchen (Qiashredder) weiter aufgeschlossen. Die Proteinbestimmung erfolgte wie für Proben aus Zellkultur beschrieben. Die Proteinkonzentrationen der Gewebelysate lagen im Bereich von 1,5-6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.2.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche Natrium-Dodekylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS) verwendet (Laemmli, 1970). Es wurden Gele verwendet, die in einem grobvernetzten Sammelgel die Proteine auf einer Höhe konzentrieren und anschließend im engvernetzten Trenngel die Proteine auftrennen (siehe Tabelle 2.1). Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinlysate 1:4 mit 4fach-Auftragspuffer gemischt und für 5 *min* bei 95 °C denaturiert. Pro Spur wurden 15-30 μg Gesamtprotein geladen und je nach Größe bei 120-150 V 60-120 *min* getrennt.

2.2.4 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde ein Feuchtverfahren (semi-dry) mit drei unterschiedlich leitfähigen Puffern (Anodenpuffer 1 und 2, Kathodenpuffer) angewendet. Zur Übertragung der Proteine wurden vier Whatmanpapiere, getränkt in Anodenpuffer 1, zwei in Anodenpuffer 2, methanolaktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel sowie sechs Papiere, getränkt in Kathodenpuffer, in einem Stapel angeordnet. Mit einer Spannung von 25 V wurden die Proteine in einer Stunde auf die PVDF-Membran übertragen. Der Proteintransfer wurde gegebenenfalls mit einer reversiblen Ponceau-S Färbung kontrolliert. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

2.2.5 Immunologische Proteindetektion

Der zielproteinspezifische Antikörper wurde 1:1000 in Blockpuffer verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Anschließend wurde der nichtgebundene Erstantikörper in vier Waschschritten mit jeweils 5 *min* abgewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10000 für 60 *min* bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Nach erneutem Waschen wie zuvor wurden Fluoreszenzsignale der feuchten Membran mit dem Odysseyscanner eingelesen.

2.2.6 Drucken der RPPA

Um die Varianz der Proben zu verringern, wurden Proben mit hoher Proteinkonzentration auf eine bestimmte Konzentration mit Lysepuffer verdünnt. Diese Konzentration wurde so festgelegt, dass nur etwa 5 % unterhalb dieser Konzentration als Ausreisser gewertet wurden. Für das Drucken mit dem Piezodrucker ArrayJet Sprint wurden die Proben mit 50 % Glycerin auf eine Endkonzentration von 25 % verdünnt, um die nötige Viskosität zu gewährleisten. Je nach Ausgangskonzentration wurden 0,3-1,8 *nl* Probe auf einen Punkt des Arrays abgegeben. Für das Drucken mit dem Kontaktdrucker Aus-hon 2470 wurden die Proben mit 0,05 % Tween versetzt, um die Oberflächenspannung zu reduzieren. Je nach experimentellem Ansatz wurden die Proben mit Nadeln von 185 oder 110 μm Durchmesser gedruckt, was einer Abgabemenge von 1,6 bzw. 0,3 *nl* entspricht. Um Randeffekte während stundenlangen Druckens zu vermeiden, wurden auf den 384er Mikrotiterplatten jeweils die zwei äußeren Reihen mit PBS befüllt.

2. MATERIAL & METHODEN

2.2.7 RPPA-Inkubation

Standardinkubation Um die Inkubation von RPPAs effizienter und schneller durchführen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit Metecon eine variable Arrayinkubationskammer entwickelt, die je nach Größe des Probensets einen Objektträger in 1-16 Felder aufteilt. Vor der Inkubation werden die mit den Proben bedruckten Objektträger in die entsprechende Kammer eingespannt und für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wird über Nacht bei 4 ^{circ}C der Erstantikörper inkubiert. Für die meisten Antikörper ist eine Verdünnung von 1:300 optimal, einige wenige benötigen höhere Konzentrationen (z.B. anti-p27 BD610241 1:150). Nach der Inkubation werden die Arrays viermal zehn Minuten gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper in einer 1:8000 Verdünnung inkubiert. Nach viermaligen Waschen der Arrays werden die Objektträger aus der Inkubationskammer ausgebaut, mit deionisiertem Wasser abgespült und lichtgeschützt an der Luft getrocknet.

Inkubation mit Signalamplifikation Zur Inkubation der RPPAs mit antikörpervermittelter Signalamplifikation wurde ein automatisiertes Protokoll für den Pipettierroboter entwickelt. Das Blocken der Arrays wurde wie zuvor beschrieben, durchgeführt und die Inkubationskammern auf Schüttler in den Pipettierroboter gestellt. Die Erst- und Zweitantikörper wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt und nach Ablauf der Blockzeit startet die Inkubation des Erstantikörpers. Die Zweitantikörper wurden in fünf Zyklen jeweils 30 *min* inkubiert. Im Vergleich zur manuellen Inkubation wurden die Waschzyklen zwischen den Antikörperinkubationen auf fünf erhöht um das höhere Totvolumen des Roboters auszugleichen. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Arrays, wie zuvor beschrieben, gespült und getrocknet.

2.2.8 RPPA-Bildanalyse

Die Signalintensitäten der RPPAs wurden mit dem Odysseyscanner bei einer Wellenlänge von 700 bzw. 800 *nm* und einer Auflösung von 21 μm eingelesen und als 16-bit Graustufen TIFF-Datei (Tagged Image File Format) abgespeichert. Die Fluoreszenzrasterbilder wurden analysiert mit GenePix 5.0, ohne die automatische Anpassung der Größe des voreingestellten Durchmessers für die Punkte der Arrays. Die errechneten Signalintensitäten wurden als GPR-Datei (Gene Pix Results) gespeichert.

2.2.9 Datenanalyse

Die RPPA-Daten wurden mit dem Softwarepaket RPPAnalyzer (Mannsperger et al., 2010) eingelesen und hintergrundkorrigiert. Zur Kontrolle der Inkubation wurden die Antikörpersignale gegen den Blankwert aufgetragen und bei ungenügender Korrelation der Signalintensität mit der Konzentration wurde der Datensatz entfernt. Nach der Normalisierung wurden die Daten entweder mit im RPPAnalyzer implementierten Funktionen visualisiert oder mit individuellen Skripten weiteranalysiert.

2.2.10 Zellkultur und si- miRNA Transfektion

Die im folgenden beschriebene Methode wurde im Rahmen einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Rezeptor Tyrosine Kinase Signaling von Stefan Uhlmann durchgeführt. Die humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, USA) wurden kultiviert in Leibovitz L-15 Medium und ergänzt mit 50 U/ml Penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycinsulfat, 1 % (w/v) nichtessentielle Aminosäuren, 10 % fötales Rinderserum und 3 g/l Natriumbicarbonat. Die Zellen wurden ausgesät in Mikrotiterplatten mit sechs Kavitäten in einer Zelldichte von 2×10^5 /Kavität und kultiviert für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Vor der Transfektion wurde das Medium getauscht gegen antibiotikafreies Medium. Die Zellen wurden transfiziert mit si- miRNAs von Dharmacon (Lafayette, USA). Als Negativkontrolle wurde Allstar siRNA von Quiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die si- miRNAs wurden transfiziert mit Hilfe von Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) mit einer Konzentration von 20 nM. Die Zellernte erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 h.

2.2.11 Quantitative mRNA-Analyse (qRT-PCR)

Die im folgenden beschriebene Methode wurde im Rahmen einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Rezeptor Tyrosine Kinase Signaling von Stefan Uhlmann durchgeführt. Die gesamte RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit aus den geernteten Zellen extrahiert. Die cDNA wurde synthetisiert mit dem Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthese Kit unter Verwendung von 0,5 μg oligo(dT)primer mit 2 μl GesamtRNA. Die Quantifizierung der mRNA einschließlich der Housekeepinggene ACTB und HPRT wurde mit dem ABIPrism 7900HT Sequence Detection System durchgeführt. Die Sonden wurden aus der von Roche entwickelten Universal Probe Library gewählt, die Primer

2. MATERIAL & METHODEN

wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Die Datennormalisierung und Analyse erfolgte mit dem in der Abteilung entwickelten ddCt-Paket.

3

Ergebnisse

3.1 Proteomanalytik

3.1.1 Katalogisierung und Verwaltung von Antikörpern

Der tägliche Einsatz von Antikörpern in vielfältigen Projekten macht eine optimierte Verwaltung der Antikörperbibliothek unumgänglich. Zu diesem Zweck wurde eine Datenbank entwickelt, die sowohl den praktischen Umgang im Labor als auch die wissenschaftliche Planung von Proteinanalysen erleichtert. Zur Umsetzung des Projektes wurde eine Datenbankstruktur in PHP programmiert und im Laufe der Zeit immer weiter ausgebaut und ergänzt. Bestehende Onlinedatenbanken waren keine Alternative, da sie für Fremdlabore nicht erreichbar sind (Spurrier et al., 2007) oder nur unzureichende Informationen enthalten (Major et al., 2006). Eine sehr umfangreiche, teilweise kommerzialisierte Datenbank für Antikörper ist der Human Protein Atlas (Uhlén et al., 2005; Berglund et al., 2008; Lundberg and Uhlén, 2010), dessen Fokus jedoch auf der Validierung von Antikörpern für die Analyse von Gewebeschnitten liegt.

Die neu entwickelte Datenbank MGA Antibodies zielt auf die Verwaltung von Antikörpern für nahezu alle gängigen Proteinassays. Die Darstellung von Western Blot Ergebnissen mit dazugehörigen Protokollen liegt im Hauptfenster der Software, zusammen mit detaillierten Angaben zum Zielprotein und dem Antikörper. Die Informationen zu spezielleren Anwendungen wie Proteinarrays, Immunhistochemie oder Immunpräzipitation sind mit detaillierten Einträgen im zweiten Fenster abrufbar. Zur Zeit werden Validierungsdaten, technische Details und Firmeninformationen von rund 580 Antikörpern unterschiedlicher Hersteller in der Datenbank verwaltet.

3. ERGEBNISSE

Antibody ID	Lot#	Target Protein	Source	Western Blot	Dilution Western	Incubation Protocol	Stock	Evaluation Western	
2236		p-EGFR (Y1068)	mouse	Link	1:1000	Western phospho	Box 2b -20°C F4	Very Bad	Edit
E6029	117K1222	p-EGFR [pTyr845]	rabbit	Link	1:1000	Western phospho	-20°C	Very Bad	Edit
2479		VEGFR2	rabbit	Link	1:1000	Western Standard	Box 8 -20°C E2	-	Edit
E6154	038K1540	p-EGFR (Y1068)	rabbit	Link	1:1000	Western phospho	Box 2b -20°C G7	-	Edit
sc-03		EGFR	rabbit	Link	1:1000	Western Standard	Box 2 F1	Good	Edit
E1780	073K1072	p-EGFR (pTyr992)	rabbit	Link	1:1000	Western phospho	-20°C	Very Bad	Edit
2237		pEGFR (Tyr1045)	rabbit	Link	1:1000		Box 2b -20°C F5	Okay	Edit
4407		pEGFR (Y1173)	rabbit	Link	1:1000	Western phospho	Box 2b -20°C G2	Good	Edit
2231		pEGFR (Y845)	rabbit	Link	1:1000	Western Rockland	Box 2b -20°C F2	Good	Edit
2220		pEGFR (Y1086)	rabbit	Link	1:1000	Western Rockland	Box 2b -20°C F1	Okay	Edit

Abbildung 3.1: Antikörperverwaltung mit der MGA Antikörper Datenbank. Dargestellt ist ein Bildschirmfoto der Oberfläche des Hauptfensters, in dem sowohl Daten zu den Zielproteinen abrufbar sind als auch die Datenblätter der Antikörper, Western Blot Bilder und dazugehörige Protokolle, verknüpft mit einer Bewertung der Spezifität.

3.1.2 Antikörpervalidierung

Ermittlung der Antikörperspezifität mit Hilfe von Western Blots

Die Spezifität der Antikörper ist für die Verlässlichkeit der RPPAs von zentraler Bedeutung. Die Standardmethode zur Validierung von Antikörpern für Proteinarrays ist die Überprüfung der Spezifität mittels Western Blot. Es ist jedoch nicht möglich, Western Blot-Ergebnisse direkt auf Proteinarrays zu übertragen. Daher wurde eine Methode zur Validierung von Antikörpern entwickelt, die auf dem Einsatz von siRNAs basiert und direkt auf RPPAs durchgeführt werden kann. Die Western Blot Methode bleibt jedoch auch fester Bestandteil der hier vorgestellten Methode.

Als Modell für die Entwicklung der Methode wurden Antikörper gegen EGFR zur Verwendung in MDA-MB-231-Zellen validiert. Zunächst wurden die Antikörper auf Western Blot getestet, wobei zwei Antikörper gefunden wurden, die vergleichbare Spezifitäten zeigen. Beide Antikörper erkannten ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von etwa 175 kDa (siehe Abbildung 3.2).

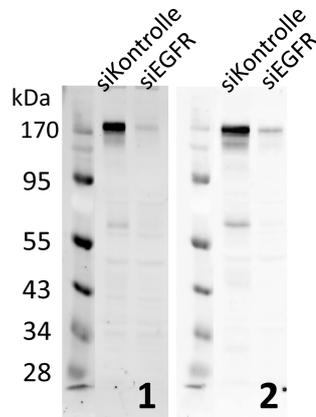


Abbildung 3.2: Antikörpervalidierung mittels Western Blot. Zwei Antikörper zeigen im Western Blot mit MDA-MB-231-Zellysate vergleichbare Spezifität zur Detektion von EGFR. Beide Antikörper erkennen die Reduktion von EGFR nach siRNA-Transfektion.

Quantifizierung von Knockdowns mittels Western Blot

Zur weiteren Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurde eine spezielle Negativkontrolle hergestellt. Dazu wurde die Expression des Zielproteins EGFR mittels Transfektion von siRNA unterdrückt (Knockdown von EGFR) und diese Knockdownprobe mit einer Kontrolltransfektion auf Western Blot Basis verglichen. Dazu wurden zusätzlich zu der Knockdown- und Kontrollprobe eine Kalibratorreihe aus Lysaten unbehandelter MDA-MB-231-Zellen auf den Western Blot aufgetragen. Nach der Quantifizierung der Banden wurde über eine lineare Regression der Kalibratorreihe die Konzentration der Knockdown- und Kontrollprobe errechnet. Beide Antikörper zeigten ein identisches Verhältnis der EGFR-Konzentration von Knockdownprobe zur Kontrolle (siehe Abbildung 3.3). Beide Antikörper detektierten die Reduktion von EGFR mit 80 %. Die Signalintensitäten unterschieden sich deutlich: während Antikörper 1 bei 30 μg Gesamtprotein aus MDA-MB-231 pro Spur eine Signalintensität der EGFR-Bande von ca. 3000 Einheiten zeigte, konnten für Antikörper 2 ca. 6000 Einheiten gemessen werden.

Quantifizierung der Antiköperspezifität mittels RPPA

Vergleichbar zum Verfahren auf Western Blot wurde der Knockdown von EGFR auch auf RPPA überprüft. Es wurden aus zwei Zellpellets von MDA-MB-231-Zellen Proteine extrahiert, Verdünnungsreihen hergestellt und als Kalibratoren auf Arrays gedruckt.

3. ERGEBNISSE

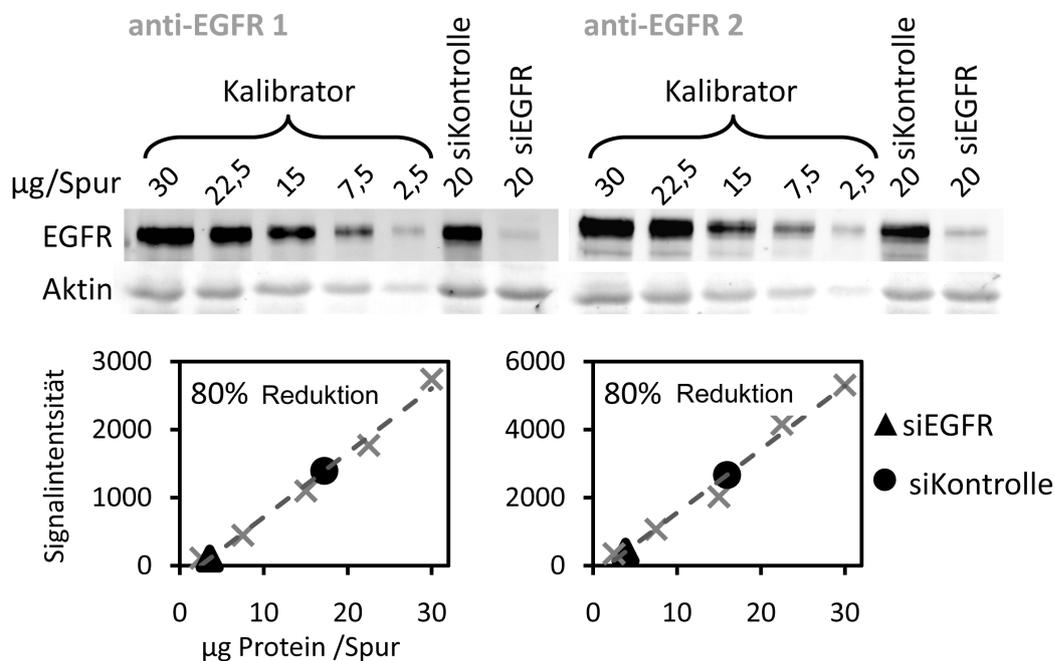


Abbildung 3.3: Bestimmung der EGFR-Konzentration mittels quantitativem Western Blot. Die Konzentration von EGRF in MDA-MB-231-Zellen nach Transfektion von Kontroll- und spezifischer siRNA wurde mittels linearer Regression (gestrichelte Linie) der Verdünnungsreihe eines Lysates unbehandelter Zellen (Kreuze) errechnet. Beide Antikörper detektieren eine Reduktion der EGFR-Expression um 80 %, jedoch mit unterschiedlichem Gesamtsignal.

Parallel dazu wurden zwei Transfektionen von EGFR-siRNA und vier Kontrolltransfektionen gedruckt. Nach der Inkubation mit den beiden EGFR-Antikörpern zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Spezifität beider Antikörper. Während Antikörper 1 eine Verminderung der Expression von EGFR in der Knockdownprobe um 58 % anzeigt, detektiert der Antikörper 2 eine Reduktion von 85 % (siehe Abbildung 3.4). Die bereits im Western Blot sichtbaren Unterschiede zwischen beiden Antikörpern spiegeln sich auch in der RPPA-Analyse wieder. Der Signalunterschied zwischen beiden Antikörpern vergrößert sich auf fast das Zehnfache.

Reproduzierbarkeit der RPPA-Ergebnisse

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Proben in mehrere Arrays gedruckt, beide EGFR-Antikörper auf jeweils drei identischen Arrays in-

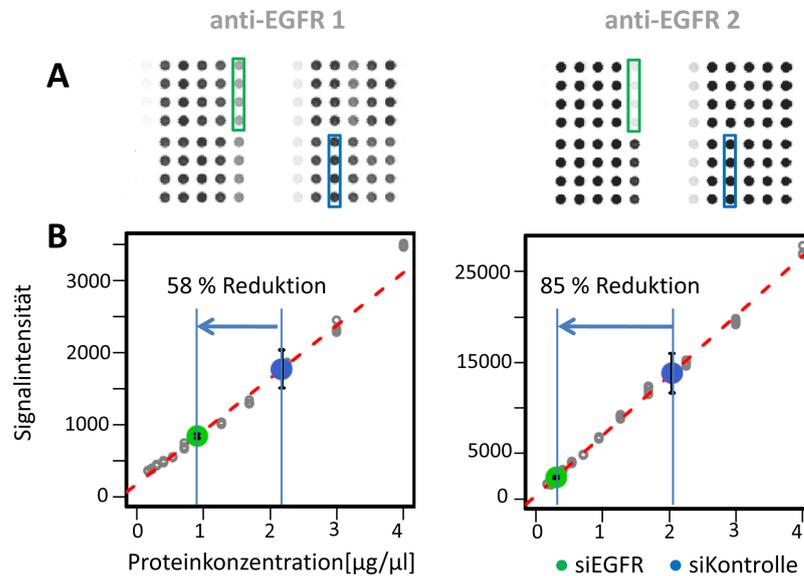


Abbildung 3.4: Bestimmung der EGFR-Konzentration mittels Reverse Phase Protein Array zur Validierung der Antikörperspezifität: Gedruckt wurde ein Array mit Lysaten aus siRNA-transfizierten MDA-MB-231-Zellen. Die Unterschiede in der Signalintensität der EGFR-reduzierten Probe (grün) gegenüber der Kontrolltransfektion (blau), lassen sich für zwei Antikörper bereits am Fluoreszenzrasterbild erkennen (A). Die Quantifizierung der EGFR-Minderung in siRNA-transfizierten Zellen über lineare Regression (rot gestrichelte Linie) ergab für Antikörper 1 58 % und für Antikörper 2 80 % Reduktion gegenüber der Kontrolltransfektion (B).

kubiert und die Signalintensitäten der einzelnen Arrays miteinander korreliert. Jeder Array enthielt zwei unabhängige Kalibratorreihen zur Quantifizierung der Knockdowns über lineare Regression. Beide Antikörper zeigen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit mit Korrelationskoeffizienten über 0,94 (siehe Abbildung 3.5). Ebenso wurde für alle drei Arrays und auf beiden Kalibratorreihen die Reduktion der EGFR-Expression berechnet. Auch hier zeigten beide Antikörper sehr gute Reproduzierbarkeit (siehe Tabelle 3.1) bei der Quantifizierung der Reduktion der Zielproteinexpression.

Unabhängigkeit von Signaldynamik und Antikörperspezifität

Die beiden hier validierten EGFR-Antikörper haben sich nicht nur hinsichtlich der Quantifikation der EGFR-Proteinexpression unterschieden, sondern bereits Differenzen in den Signalintensitäten gezeigt. Um zu untersuchen, ob die Eigenschaften hoher

3. ERGEBNISSE

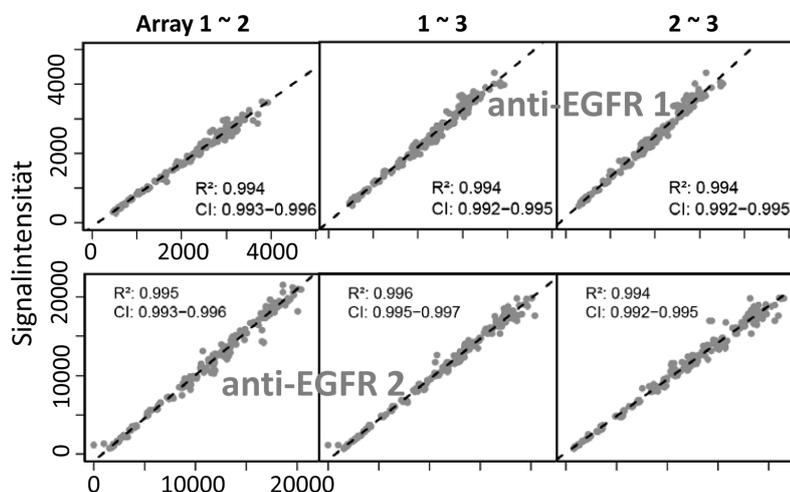


Abbildung 3.5: Reproduzierbarkeit der Inkubation von RPPA: Zwei Antikörper gegen EGFR wurden auf jeweils drei Arrays inkubiert und deren Signale zueinander korreliert (R^2 : Pearson Korrelation; CI : Konfidenzintervall).

Signalintensitäten mit der Spezifität der Antikörper korrelieren, wurde ein Set von zehn Antikörpern zur Detektion von STAT3 in MDA-MB-231-Zellen verglichen. Alle Antikörper waren kommerziell erhältlich und anhand der folgenden Gesichtspunkte ausgewählt. Die Antikörper sollten aus Maus oder Kaninchen und vom Typ IgG sein, humane Proteine erkennen und vom Hersteller für den Einsatz für Western Blot und Immunoprecipitation empfohlen sein. Antikörper, die nur gegen rekombinantes Protein getestet wurden, kamen daher nicht in Frage. Stattdessen wurden ausschließlich Antikörper berücksichtigt, die eine spezifische Bande des endogenen Proteins im Zelllysate zeigten. Alle Antikörper wurden nochmals mittels Western Blot untersucht (siehe Abbildung 3.6). Zwei Antikörper (Nr. 1 und 2) detektierten eine Doppelbande, vier (Nr. 3-6) eine einzelne Bande beim erwarteten Molekulargewicht. Vier der getesteten Antikörper (Nr. 7-10) zeigten zusätzlich unspezifische Banden.

Mit Ausnahme von Antikörper 6 wurde für alle Antikörper eine lineare Korrelation zwischen der Signalintensität und der Konzentration der Proben beobachtet. Die Steigung der Verdünnungsgeraden als dem Verhältnis von Signal zu Konzentration war jedoch sehr weit gestreut. Prinzipiell zeigten polyklonale Kaninchenantikörper weit höhere Signale als monoklonale Mausantikörper (siehe Abbildung 3.7).

In derselben Weise wie bereits für die EGFR-Antikörper beschrieben wurde die

Tabelle 3.1: Konstanz der Spezifität zweier Antikörper gegen EGFR. Für zwei Antikörper wurde auf jeweils drei Arrays anhand zweier Kalibratoren die Kapazität zur Detektion von EGFR-Knockdowns errechnet. Die unterschiedliche Detektionsleistung bestätigte sich für alle sechs Werte eines Antikörpers.

Antikörper	Kalibrator	Array		
		1	2	3
Anti-EGFR 1	1	59%	60%	61%
	2	58%	58%	60%
Anti-EGFR 2	1	85%	85%	84%
	2	85%	85%	84%

Tabelle 3.2: Spezifische Eigenschaften von STAT3-Antikörpern: Quantifizierung der Reduktion von STAT3 nach siRNA-Transfektion sowie Detektionslimit von zehn STAT3-Antikörpern, errechnet anhand zweier unabhängiger Kalibratorverdünnsreihen.

Antikörper- nummer	Reduktion STAT3		Detektionslimit [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	
	1	2	1	2
1	75%	74%	0,027	0,033
2	82%	81%	0,035	0,038
3	86%	85%	0,057	0,057
4	84%	83%	0,016	0,018
5	69%	68%	0,029	0,031
6	-2%	-3%	0,173	0,134
7	80%	80%	0,031	0,030
8	32%	33%	0,073	0,057
9	57%	56%	0,077	0,077
10	53%	52%	0,023	0,023

3. ERGEBNISSE

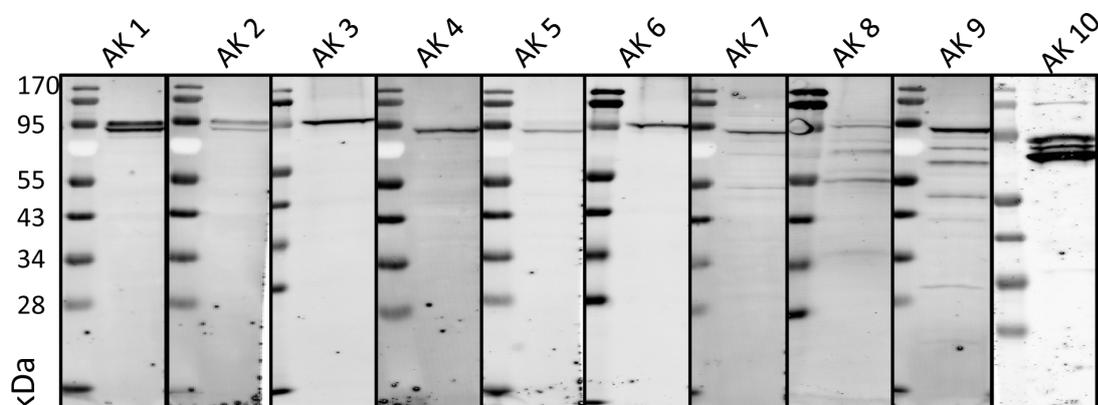


Abbildung 3.6: Spezifität von STAT3-Antikörpern: Zehn kommerzielle Antikörper gegen STAT3 wurden auf MDA-MB-231-Zellysat getestet mit jeweils 20 μg Gesamtprotein pro Spur.

Proteinexpression von siRNA-behandelten Zellen untersucht und anhand zweier Kalibratorreihen quantifiziert. Antikörper, die bereits im Westen Blot multiple Banden gezeigt hatten (Nr. 8-10), konnten die reduzierte STAT3-Expression mit 32 % bis 57 % nur ungenügend abbilden (siehe Tabelle 3.2). Die Antikörper 1 bis 5 und 7 zeigten Reduktionswerte von 69 % bis 86 %. Von dem monoklonalen Antikörper 6 konnten keine verwertbaren Signale detektiert werden. Die Werte für die Antikörper 1 bis 5 und 7 machen deutlich, dass die Spezifitäten der Antikörper auf Western Blot und RPPA ähnlich sind, die ausschließliche Beurteilung der Western Blots aber zu einer nicht optimalen Auswahl führen kann. Vier Antikörper detektierten die reduzierte STAT3-Expression mit ca. 80 %, wobei die Signalwerte im mittleren Intensitätsbereich liegen. Die Grafik in Abbildung 3.8 verdeutlicht, dass die absoluten Signalintensitäten der Antikörper nicht positiv mit der Spezifität der Antikörper korrelieren.

Detektionslimit als Parameter zur Antikörpervalidierung

Drei Antikörper haben die Reduktion von STAT3 in siRNA-transfizierten Zellen mit über 80 % detektiert. Um den sensitivsten Antikörper zu identifizieren, wurde das Detektionslimit als zusätzliches Kriterium herangezogen. Zuerst wurde der Median sowie der Median der absoluten Abweichung (median absolute deviation MAD) aus allen Pufferpunkten (Blankwert) errechnet. Das Signalminimum wurde auf Median plus 5 x MAD festgelegt. Diese Werte sind jedoch aufgrund der Unterschiede in den Signal-

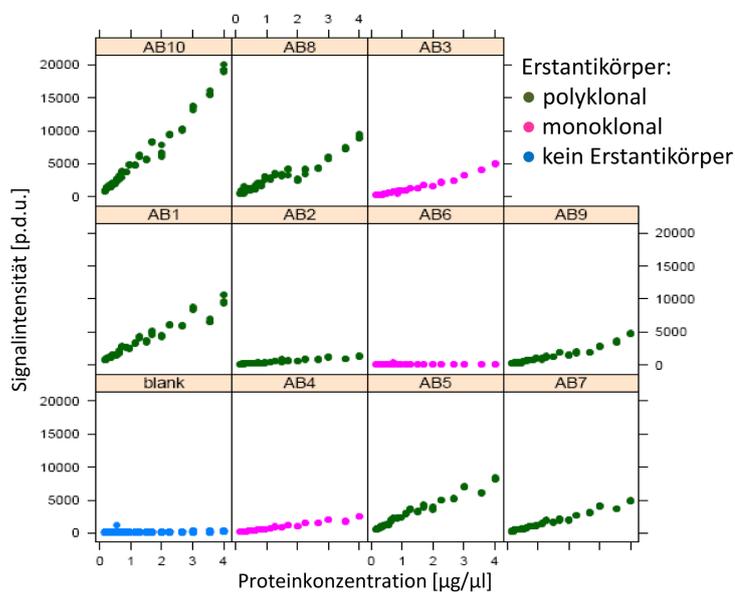


Abbildung 3.7: Dynamischer Bereich von STAT3-Antikörpern: Signalintensitäten von zehn STAT3-Antikörpern auf Verdünnungsreihen von MDA-MB-231-Zelllysate reichen von 2000 bis 20000 für die höchste Konzentration.

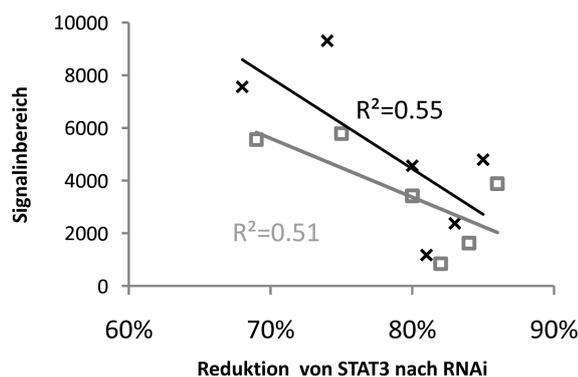


Abbildung 3.8: Die Signalstärke und Spezifität von Antikörpern ist unabhängig: Der Signalbereich der spezifischsten STAT3-Antikörper (niedrigstes - höchstes Signal, siehe Abbildung 3.7) in Abhängigkeit von der Messung der Reduktion von STAT3 nach Knockdown (siehe Tabelle 3.2). Dargestellt sind die Werte von sechs Antikörpern, jeweils errechnet über lineare Regression zweier unabhängiger Kalibratoren (Kreuz, Quadrat).

3. ERGEBNISSE

intensitäten der Antikörper nicht direkt vergleichbar. Daher wurde die entsprechende Konzentration über dieselbe lineare Regression der beiden Kalibratorreihen errechnet, die bereits zur Berechnung der Reduktion des Zielproteins eingesetzt wurde. Auf diese Weise wurde bei Antikörper 4 ein mittleres Detektionslimit von $0,017 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ermittelt. Damit war er der Antikörper mit dem niedrigsten Detektionslimit bei gleichzeitig sehr guter Spezifität und zeigte ein etwa 50 % niedrigeres Detektionslimit als der nächstbeste Antikörper 7.

Isoformspezifität der RPPA-Technologie

Über die Analyse von Proteinen nach siRNA-Transfektion lässt sich auch die Isoformspezifität der RPPA-Technologie überprüfen. Als Beispielproteine wurden AKT1 und AKT2 (Identität: 81,1 %, Ähnlichkeit 91,9 %), CCND1 und CCND3 (Identität: 51,7 %, Ähnlichkeit 67 %) und CDK2 und CDK4 (Identität: 43,6 %, Ähnlichkeit 61,5 %) ausgewählt. Die Expression der Proteine wurde mittels der RNAi-Technologie in MDA-MB-231-Zellen unterdrückt und die Lysate der Zellen auf RPPAs gedruckt. Abbildung 3.9 verdeutlicht die Auflösung der Detektion und damit die Spezifität der RPPAs anhand der Knockdown-Antikörper-Paare. Die Reduktion von AKT1, AKT2, CCND1 und CCND3 lässt sich eindeutig dem spezifischen Knockdown zuordnen. Der Knockdown von CDK4 zeigt auch eine reduzierte Expression von CDK2. Dies konnte jedoch bei der Quantifizierung des mRNA-Expressionslevels mit qRT-PCR bestätigt werden (siehe Abbildung 3.10).

Systembiologische Relevanz der Antikörpervalidierung

Im Rahmen der RNAi-Antikörpervalidierung wurden Antikörper getestet, die Zielproteine aus den Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-abhängigen Signaltransduktionsnetzwerken validieren. Dadurch wurde parallel ein Datensatz erzeugt, der systembiologisch relevante Informationen enthält. Durch die Analyse von Antikörper- und Knockdownpaaren sind Rückschlüsse auf die Protein-Protein-Interaktionen und Koregulationen möglich. Beispielsweise wurde in der Zelllinie MDA-MB-231 durch die Reduktion der MAPK14 (Synonym p38- α)-Kinase die Expression von AKT1 stimuliert (siehe Abbildung 3.11). Ebenso wurden durch die Unterdrückung der CDK2-Expression die Proteinlevel von CCND1 (CyclinD1) und RB1 (pRB) angehoben.

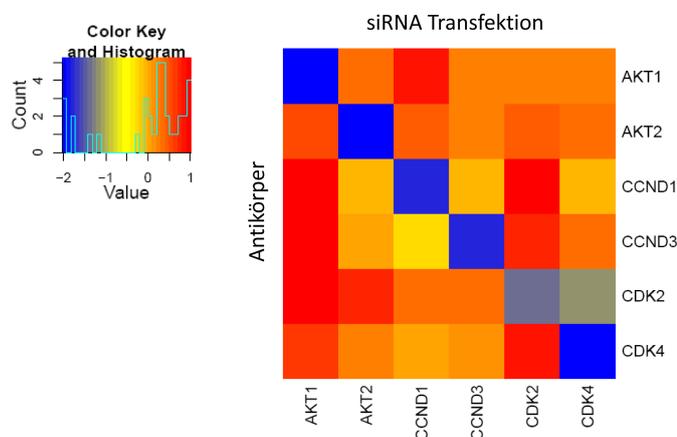


Abbildung 3.9: Isoformspezifität der RPPA-Technologie: Alphabetisch geordnete Heatmap-Darstellung der Expression von Proteinen in siRNA-transfizierten MDA-MB-231-Zellen. Blaue Felder indizieren Reduktion des gemessenen Proteins (horizontal) der jeweiligen siRNA-Transfektion (vertikal).

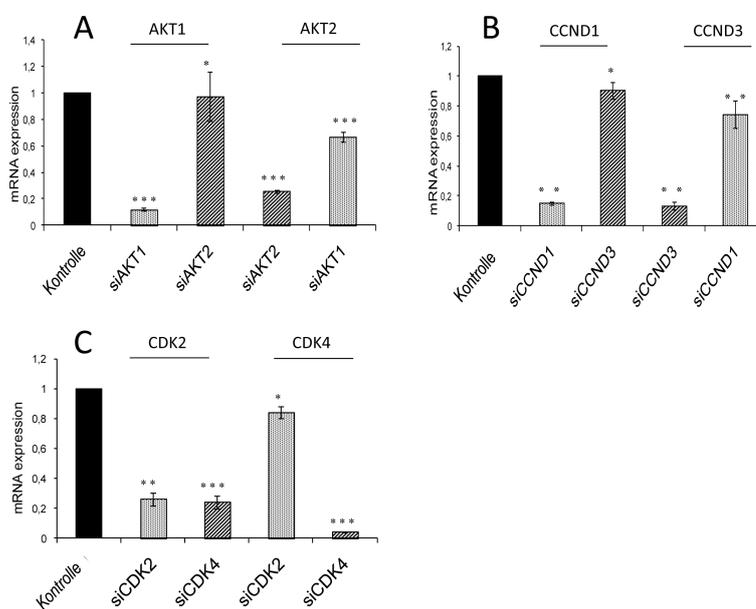


Abbildung 3.10: Evaluierung der mRNA-Expression der siRNA-transfizierten MDA-MB-231 Zellen (siehe Abbildung 3.9) mittels qRT-PCR.

3. ERGEBNISSE

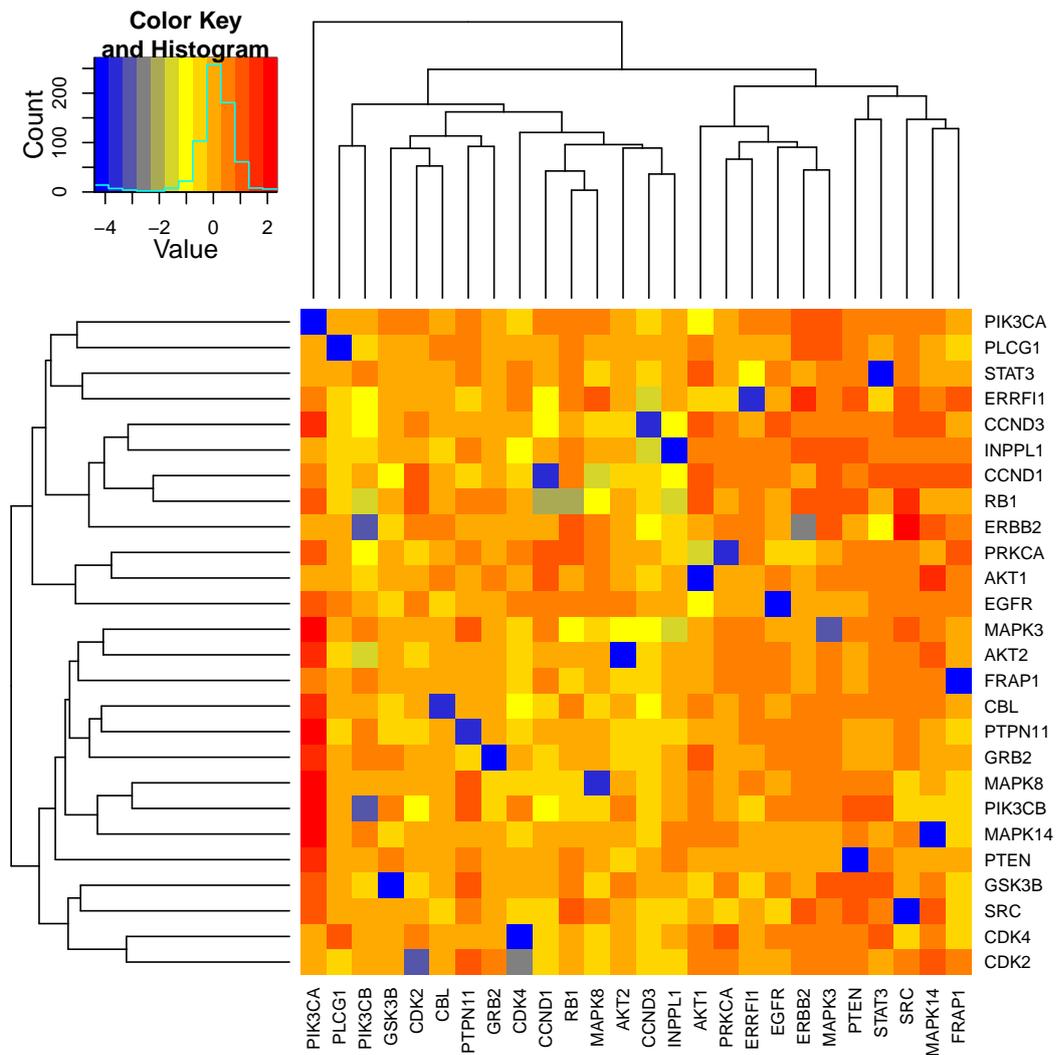


Abbildung 3.11: Klusteranalyse der Proteinexpression von siRNA-transfizierten MDA-MB-231-Zellen. Anordnung der vermessenen Proben in Spalten und der gemessenen Proteine in den Zeilen. Blaue Felder indizieren Reduktion, rote Felder verstärkte Expression der Proteine.

3.1.3 Signalamplifikation

Prinzip der antikörpervermittelten Signalamplifikation

Die Sensitivität von antikörperbasierenden analytischen Verfahren wie RPPAs kann durch Signalamplifikation gesteigert werden. Dabei ist es von größter Wichtigkeit, dass durch die Signalamplifikation die Spezifität des Assays nicht negativ beeinflusst wird. Die am häufigsten publizierte Methode zur Signalamplifikation auf RPPA beinhaltet einen enzymatischen Schritt, bei dem Biotin als Bindungsvermittler genutzt wird. Dies hat jedoch zum einen den Nachteil, dass biotinylierte Proteine mit zum Gesamtsignal beitragen und das spezifische Signal überdecken. Hinzu kommt, dass enzymatische Reaktionen generell sehr empfindlich auf Schwankungen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Substratverfügbarkeit reagieren, was zu einem Verlust an Reproduzierbarkeit führen kann. Um diese Nachteile auszugleichen, wurde ein antikörperbasiertes Signalamplifikationssystem entwickelt (Brase et al., 2010) und für RPPA-Anwendungen validiert. Dabei wurde durch aufeinander folgende Inkubationen von NIR-markierten Zweitantikörpern aus zwei verschiedenen Spezies, die gegeneinander gerichtet sind, eine Art Baumstruktur gebildet (siehe Abbildung 3.12). Diese Antikörperbäumchen tragen ein Vielfaches an Signalmolekülen im Vergleich zur einfachen Inkubation der Zweitantikörper und verstärken damit das Signal. Die Planung der Experimente im Rahmen dieses Projekts wurde hauptsächlich von mir ausgeführt und die Analyse der Daten von Holger Fröhlich und Stephan Gade.

Spezifität der antikörpervermittelten Signalamplifikation

Durch die antikörpervermittelte Signalamplifikation (AMSA) werden keinerlei unspezifische oder zusätzliche Signale generiert. Dagegen kann unter bestimmten Umständen die gebräuchliche Methode der Thyramid-Signalamplifikation (TSA) deutliche unspezifische Signale erzeugen. In Abbildung 3.13 wurde ein Antikörper gegen das Prostata-spezifische Antigen (PSA) auf Lysaten aus Kolonzelllinien, Mausleber und Prostata-tumorgewebe inkubiert. Die Standarddetektion wie auch die AMSA-Methode zeigten im Prostatagewebe eine deutliche Bande für PSA. Diese Bande wurde auch durch die TSA-Detektion sichtbar, es erschienen jedoch unspezifische Banden, wobei diese bei der Mausleberprobe am deutlichsten hervortraten.

3. ERGEBNISSE

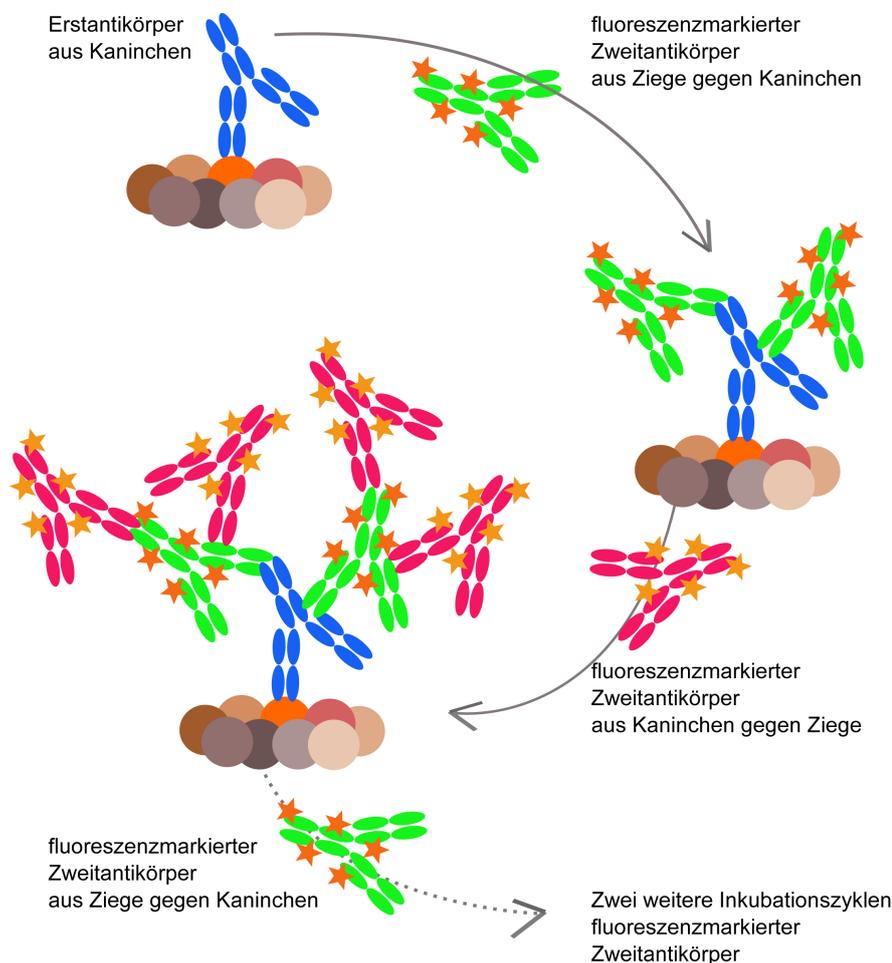


Abbildung 3.12: Prinzip der antikörpervermittelten Signalamplifikation

Im Hinblick auf Störungen der antikörpervermittelten Signalamplifikation durch unspezifische Signale ist Vorsicht bei Proben geboten, bei denen größere Mengen an Immunglobulin G zu erwarten sind, wie z.B. immunologische Proben sowie Tumorproben. Daher wurde eine mögliche Kreuzreaktivität der Methode mit humanem IgG getestet. Zu diesem Zweck wurden rekombinantes JNK1-Protein und humanes Immunglobulin in eine Matrix aus Rinderserumalbumin gegeben und jeweils mit der antikörperbasierten Amplifikationsmethode detektiert. Abbildung 3.14 zeigt, dass die antikörperbasierte Signalamplifikation von humanen Antikörpern unbeeinflusst bleibt. Weder in der JNK1-Probe wurden mit einem anti-human-IgG-Antikörper signifikante Signale gemessen noch in der IgG-Probe mit einem anti-JNK1-Antikörper. Kreuzreak-

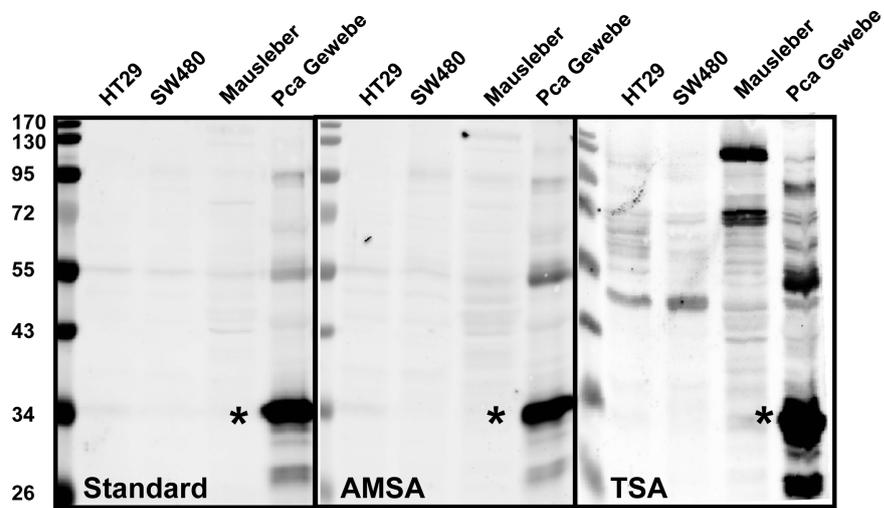


Abbildung 3.13: Vergleich der Spezifität von Signalamplifikationsmethoden: Detektion von PSA (*) mit der Standard-NIR-Methode (eingelesen mit Laserintensität 5), antikörpervermittelter Signalamplifikation und Tyramide-Signalamplifikation (jeweils Laserintensität 2,5). Je Spur wurden 5 μg Lysat aus Prostatakarzinom bzw. PSA-freies Lysat aus Kolonzelllinien (HT29 und SW480) und Mauseleber aufgetragen.

tionen mit humanen Immunglobulinen sind daher nicht zu erwarten.

3. ERGEBNISSE

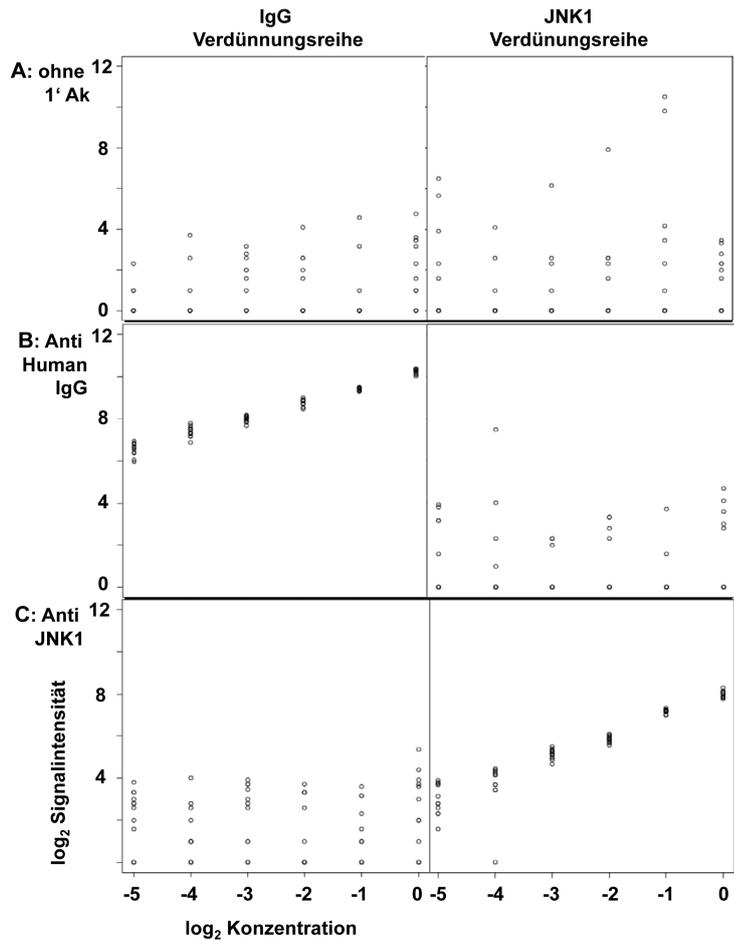


Abbildung 3.14: Kreuzreaktivität mit humanem IgG auf RPPA: Vergleich der Signale von humanem IgG und rekombinantem JNK1 nach antikörpervermittelter Signalamplifikation. Eine sechsstufige Verdünnungsreihe von IgG bzw. JNK1 in einer Proteinmatrix aus BSA wurde detektiert mit anti-Human-IgG bzw. anti-JNK1.

Optimierung der Amplifikationsrundenanzahl

Die optimale Anzahl an Amplifikationsrunden wurde auf Grundlage des Signal-Rausch-Verhältnisses ermittelt, da erwartungsgemäß nicht nur das spezifische Signal, sondern auch die Hintergrundsignale mitverstärkt wurden. Zur Ermittlung des optimalen Signal-Rausch-Verhältnisses wurde rekombinantes aktives ERK1 (MAPK3) in das Lysat einer Kolonkarzinomzelllinie gegeben und als Array gedruckt. Das ERK1 wurde anschließend mit einem phosphospezifischen Antikörper im Standardverfahren und mit ein bis fünf Amplifikationsrunden detektiert. Nach den ersten zwei Amplifikationsrunden wurde noch keine Verbesserung des Signals im Vergleich zum Standard erreicht. Mit weiteren Amplifikationsrunden jedoch stieg das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich an und erreichte ein Optimum bei vier Amplifikationsrunden (siehe Abbildung 3.15), was einer fünfmaligen Inkubation mit Zweitantikörpern entspricht.

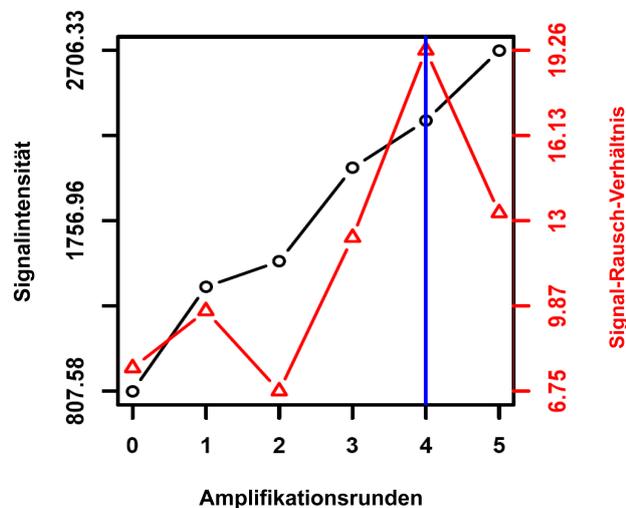


Abbildung 3.15: Ermittlung der optimalen Amplifikationsrunde für die AMSA-Methode: Zwölf Replikatepunkte einer Kolonzelllinie mit Zusatz von 35 fg rekombinantem phosphoryliertem ERK1 wurden als RPPA gedruckt. Detektion von p-ERK wurde durchgeführt mit der Standard NIR-Detektion (entspricht 0 Amplifikationsrunden) und verschiedener Anzahl an Amplifikationsrunden. Der Median (schwarz) und das Signal-Rausch-Verhältnis (rot) wurden berechnet. Die blaue Linie indiziert die optimale Anzahl an Amplifikationsrunden.

3. ERGEBNISSE

Robustheit der Signalamplifikation

Zum Vergleich der Standardmethode mit der Signalamplifikation wurden 14 Proteine ausgewählt und in sieben Zelllinien untersucht. Abbildung 3.16 A zeigt, dass alle Proteine in jeder Zelllinie exprimiert wurden. Die Zelllinien wurden auf RPPAs gedruckt, mit beiden Methoden untersucht und anschließend die logarithmierten Signale korreliert. Die starke Korrelation beider Methoden (Pearson = 0.89, p-Wert: $2.2 \cdot 10^{-16}$) beweist die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Amplifikationsmethode (siehe Abbildung 3.16 B).

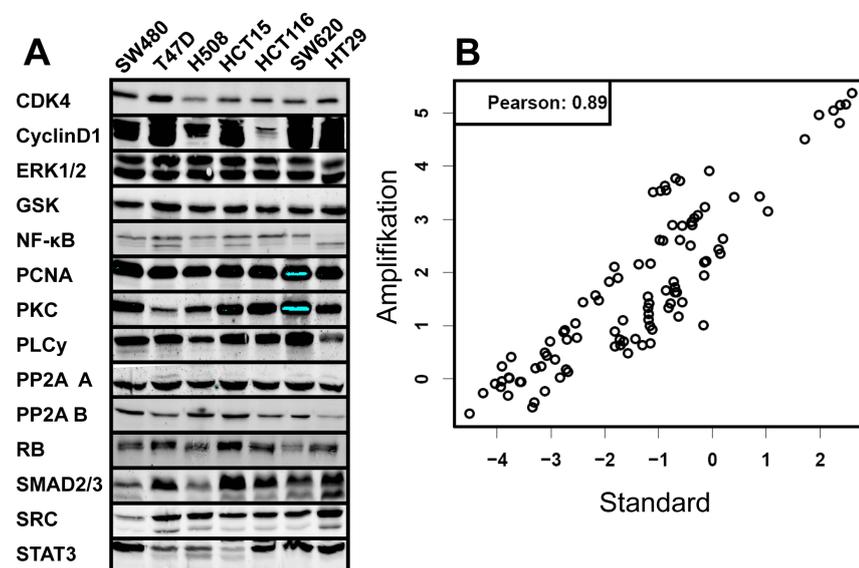


Abbildung 3.16: Western Blot-Analyse von 14 Proteinen in sieben humanen Zelllinien mit Standard NIR-Detektion (A). Analyse der Proteine mit RPPA zum Vergleich von Standard-NIR und antikörpervermittelter Signalamplifikation (B). Der Pearson Korrelationskoeffizient wurde mit logarithmierten Werten ermittelt.

Absenkung des Detektionslimit durch antikörpervermittelte Signalamplifikation

Um den Vorteil der AMSA-Methode gegenüber dem Standardprotokoll festzustellen, wurde eine serielle Verdünnung von rekombinantem JNK1 gedruckt und das Detektionslimit für beide Methoden bestimmt. Zu einer Mischung aus Lysaten dreier Kolonkarzinomzelllinien (HT29, SW480, RKO) wurde eine zwölfstufige Verdünnung von JNK1 zugesetzt und in zwölf Replikatspots auf Arrays gedruckt. Die Konzentrationen

lagen zwischen 0,27 fg und 0,56 pg rekombinantom JNK1. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden jeweils zwei Arrays auf einen Träger gedruckt und getrennt voneinander die Standard-NIR-Methode sowie die Amplifikationsmethode durchgeführt. Zur Berechnung des Detektionslimits wurde der Mittelwert der geringsten Konzentration der JNK1- Verdünnungsreihe als Hintergrundwert S_0 angenommen. Das Detektionslimit wurde anschließend in zwei Stufen ermittelt: Erstens musste der Wert größer sein als $S_0 + 2 \cdot Sd$ und zweitens über die weiteren Konzentrationsstufen stetig ansteigen. Das heißt, das Detektionslimit bezog sich auf die kleinste Konzentration, die sich signifikant vom Hintergrund absetzte und sich gleichzeitig von der nächst höheren Konzentration unterschied. Als Ergebnis wurde für die AMSA-Methode ein achtfach niedrigeres Detektionslimit bestimmt: 0,55 fg JNK1 könnten mit der Amplifikationsmethode im Vergleich zu 4,4 fg für die Standardmethode nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.17).

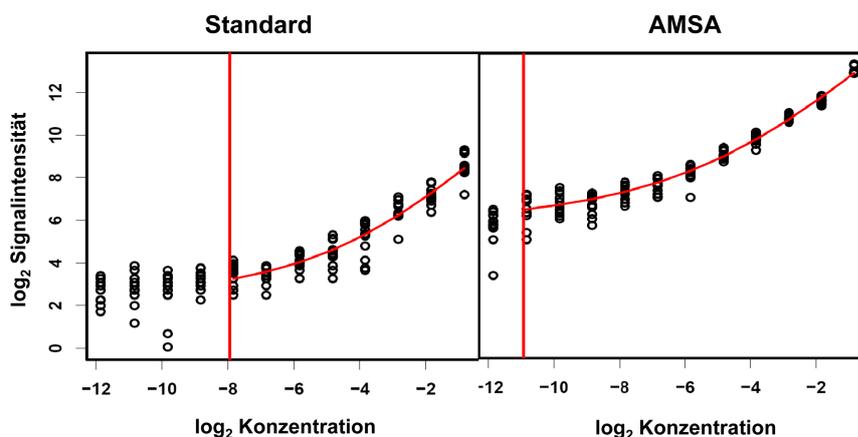


Abbildung 3.17: Vergleich der Sensitivität von Standard-NIR-Detektion und AMSA: Verdünnungsreihen von rekombinantom JNK1 (0,27 fg - 0,56 fg pro Punkt) in Lysaten aus humanen Kolonkarzinomzelllinien. Jeder Verdünnungsschritt wurde in zwölf Replikaten gedruckt. Arrays wurden gedruckt und auf einem Objektträger inkubiert. Die vertikale rote Linie indiziert das Detektionslimit.

In analoger Vorgehensweise wurden für beide Methoden die Detektionslimits für endogenes beta-Catenin, PDK1 und PCNA in elf Zelllinien (SW480, HCT15, HCT116, SW620, HT29, T47D, BT474, MDA-MB-231, SKBR3, HCC1954, MCF7) miteinander verglichen. Anstelle von absoluten Konzentrationen wurde die Verdünnungsstufe für die Beurteilung des Detektionslimits herangezogen. Abbildung 3.18 zeigt die Verdünnungs-

3. ERGEBNISSE

stufen, die jeweils als Detektionslimits ermittelt wurden. Im Durchschnitt aller Zelllinien war das Detektionslimit für β -catenin und PDK1 vier- bis fünffach niedriger mit der AMSA-Methode, für die Detektion des in Zelllinien hochexprimierten PCNA erbrachte die Signalamplifikation keinen Sensitivitätsgewinn.

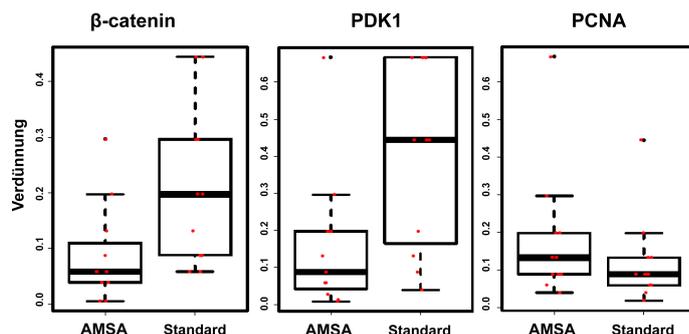


Abbildung 3.18: Vergleich der Detektionslimits zwischen Standard NIR-Detektion und AMSA für die Detektion von beta-Catenin, PDK1 und PCNA in elf Zelllinien (SW480, HCT15, HCT116, SW620, HT29, T47D, BT474, MDA, SKBR3, HCC1954, MCF7). Das Detektionslimit ist angezeigt als relative Verdünnungsstufe.

3.1.4 Quantifizierung und Normalisierung von RPPA-Daten

Signaldynamik auf Proteinarrays

Die Quantifizierung von Proteinen auf RPPA erfolgt über die Messung von optischen oder Fluoreszenz-Signalen, die auf Antikörper-Antigen-Bindung zurückzuführen sind. Zusätzlich kann mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion eine Signalamplifikation erfolgen. In Abhängigkeit der Kombination von Signalgebern und enzymatischer Signalamplifikation ergibt sich ein individueller linearer Signalbereich.

Optische Signale, meist generiert über Farbpräzipitation, haben einen schmalen dynamischen Bereich und damit eine geringere Informationstiefe als Fluoreszenzsignale. Fluoreszenzrasterbilder können einen großen dynamischen Bereich abbilden und benötigen daher Dateien im 16 bit-Format, um den vollen Umfang an optischer Information zu speichern.

Die Generation von Signalen, die nur über die Kopplung fluoreszenzmarkierter Antikörper abläuft, ist im wesentlichen abhängig von der Dissoziationskonstante K_D der Epitop-Paratop-Bindung. Die Dissoziationskonstante ergibt sich als Quotient aus

zwei kinetischen Konstanten: der Dissoziationsrate $k_d[s^{-1}]$ und der Assoziationsrate $k_a[M^{-1} \cdot s^{-1}]$.

$$K_D = \frac{c(\textit{Epitop}) \cdot c(\textit{Paratop})}{c(\textit{EpitopParatopKomplex})} = \frac{k_d}{k_a}$$

Die Bindungsreaktion ist damit abhängig von der Konzentration der Bindungspartner im Reaktionsraum. Im Falle von RPPA ist der Bindungspartner Antikörper für alle Proben gleich und somit ist die Bindung nur beeinflusst von der Konzentration des Antigens in den einzelnen Spots. Da die Antikörper im großen Überschuss zugegeben werden, ist ein signifikanter Rückgang während der Inkubation nicht zu erwarten. Wird zur Signalamplifikation eine enzymatische Reaktion genutzt, beeinflusst zusätzlich zur Epitop-Paratop-Bindungskinetik noch die Enzymkinetik des Detektionsverfahrens die Signalgeneration. Eine Enzymkinetik ist nach der Michaelis-Menten-Theorie vor allem durch das Phänomen der Sättigung gekennzeichnet. Das heißt, auch die enzymatisch verstärkten Signale unterliegen Sättigungsprozessen. Zusammenfassend gilt daher, dass RPPAs, die ein optisches Signal nutzen, das mit einer enzymatischen Reaktion erzeugt wird, einen wesentlich geringeren linearen (dynamischen) Messbereich haben als solche, die über fluoreszenzmarkierte Antikörper erzeugt werden. Über ein spezielles Design des Experiments lässt sich jedoch dieser Nachteil ausgleichen und der dynamische Messbereich ausweiten. Dazu muss von jeder Probe eine serielle Verdünnungsreihe hergestellt und gedruckt werden, wobei anhand der Signalwerte der Verdünnungsreihe die Konzentration der Probe geschätzt werden kann. Zur mathematischen Umsetzung dieser Methode wurden zwei Algorithmen entwickelt, die jeweils ein Modell auf Grundlage des gesamten Arrays berechnen und dieses zur Ermittlung der Konzentration der einzelnen Proben (Hu et al., 2007; Neeley et al., 2009) verwenden. Beide Algorithmen sind implementiert im RPPAnalyzer Softwarepaket (Mannsperger et al., 2010). Nachfolgend wurden beide Algorithmen angewendet, um zu zeigen, dass das in dieser Arbeit entwickelte RPPA-Protokoll keiner Signalsättigung unterworfen ist. Dazu wurden Lysate von MDA-MB-231-Zellen als serielle Verdünnungsreihe mit Startkonzentrationen von etwa $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ gedruckt. Bei einfachem Druck von Druckernadeln mit $185 \mu\text{m}$ Durchmesser werden etwa $1,6 \text{ nl}$ Lysat abgegeben. Dies ergibt eine Gesamtproteinkonzentration von etwa $3,2 \text{ ng}/\text{spot}$ für die unverdünnte Probe. Diese Arrays wurden mit vier unterschiedlichen RPPA-validierten Antikörpern ausgelesen.

3. ERGEBNISSE

Abbildung 3.19 zeigt beispielhaft die Signalintensitäten von vier hochexprimierten Proteinen (ERK1/2, PTEN, PI3K p85 und pRB) in drei seriell verdünnten Proben. Für keines der detektierten Proteine wurde eine Sättigung des Signals beobachtet. Auch in der Darstellung des SuperCurve Models (siehe Abbildung 3.20) erreichen die höchsten Signalintensitäten nicht die Sättigungsgrenze. Erreichen die Signale eines Arrays Sättigungsgrenze und Detektionslimit, stellt sich dies im SuperCurve Modell als sigmoide Kurve dar. In diesem Fall liegen die jeweils höchsten Konzentrationen der Verdünnungsreihen noch im linearen Signalbereich und die niedrigen Konzentrationen liegen unterhalb des Detektionslimits. Ebenso kann mit dem Serial Dilution Curve Algorithmus kein Sättigungswert aus den Signalintensitäten der vier gezeigten Antikörper errechnet werden (siehe Abbildung 3.21).

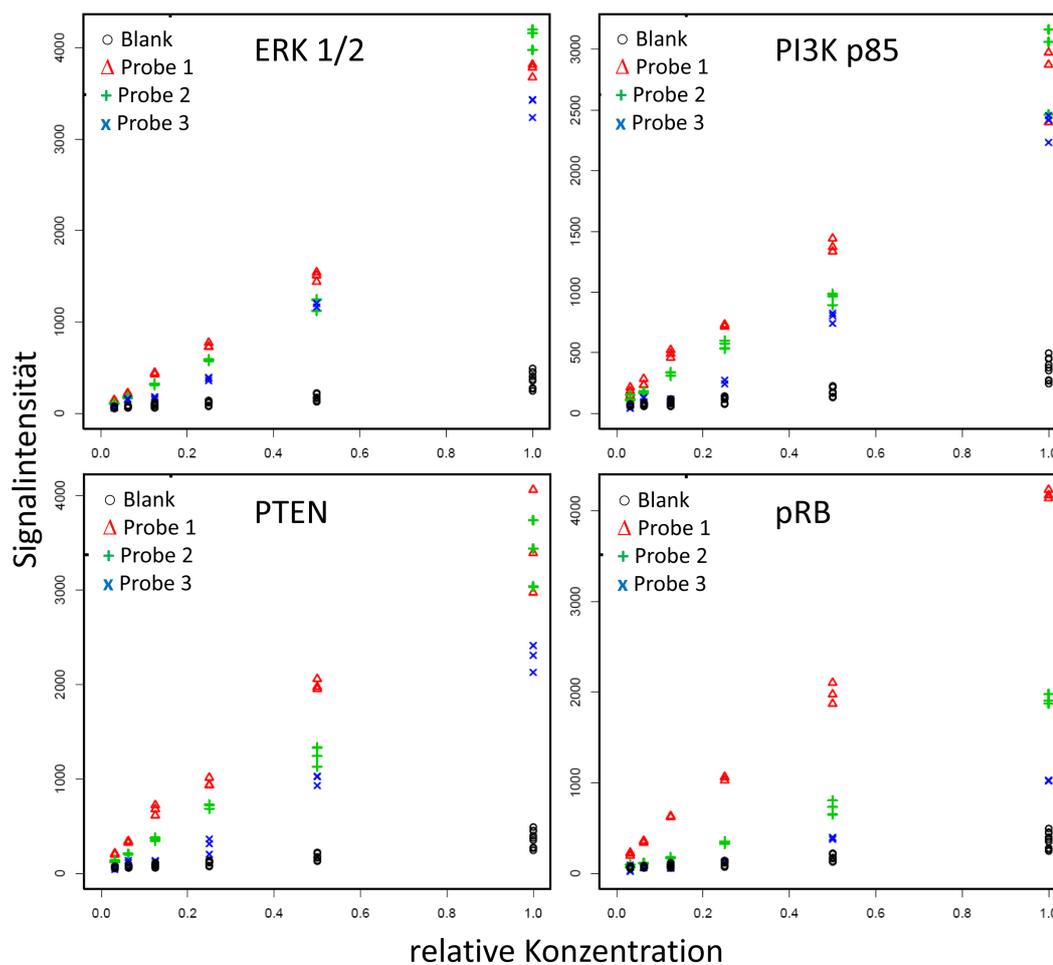


Abbildung 3.19: Darstellung der Signaldynamik von vier Antikörpern (ERK1/2, PTEN, PI3K p85 und pRB) gegen konstitutiv exprimierte Proteine in Lysat aus siRNA-transfizierten MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zum Blankwert. Die Graphiken sind erstellt mit dem RPPanalyzer Paket und zeigen einzelne Verdünnungsreihen eines Arrays. Sie dienen der einfachen Beurteilung der Antikörpersignale.

3. ERGEBNISSE

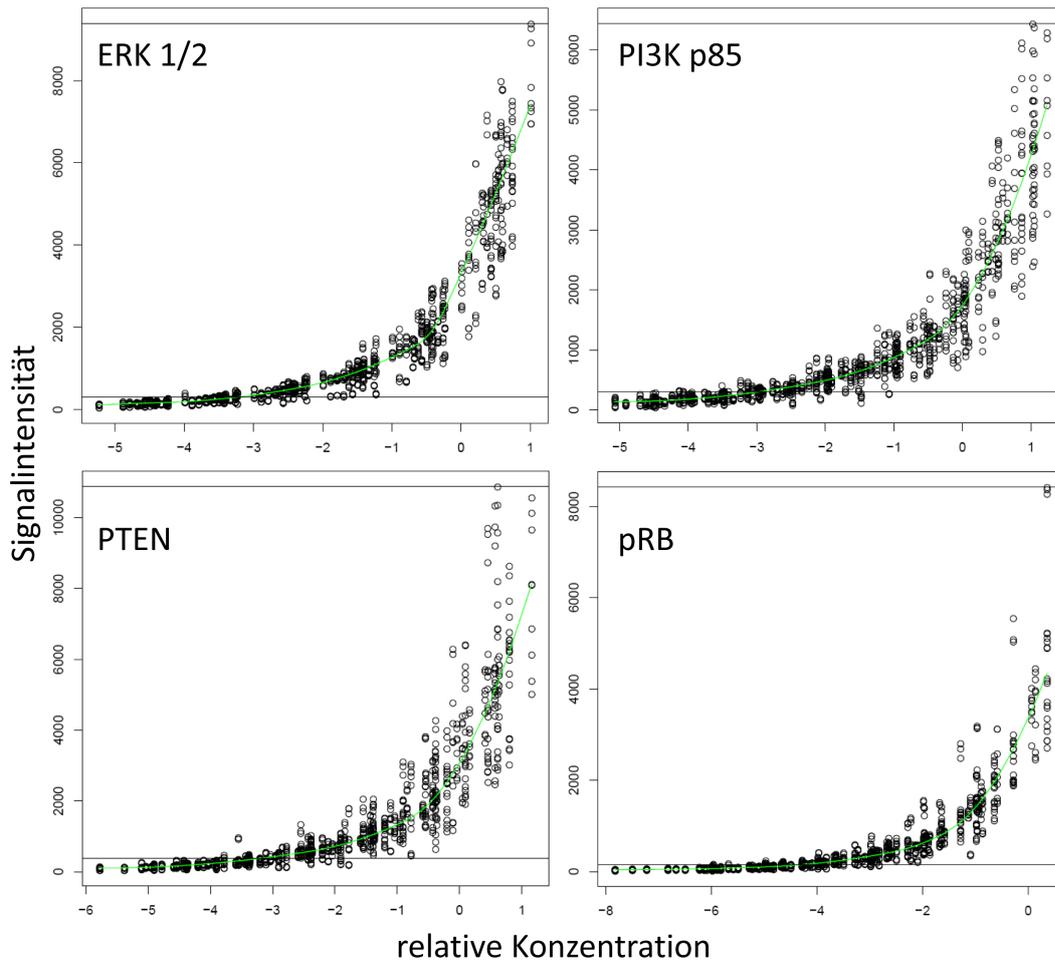


Abbildung 3.20: Darstellung der Signaldynamik von Antikörpern mit dem SuperCurve Model (Coombes et al., 2009). Alle Punkte des Arrays (schwarz) werden zur Errechnung des Models (grün) genutzt. Die angegebenen Konzentrationen sind prozessabhängige, geschätzte Werte und sind unabhängig von der tatsächlichen Konzentration.

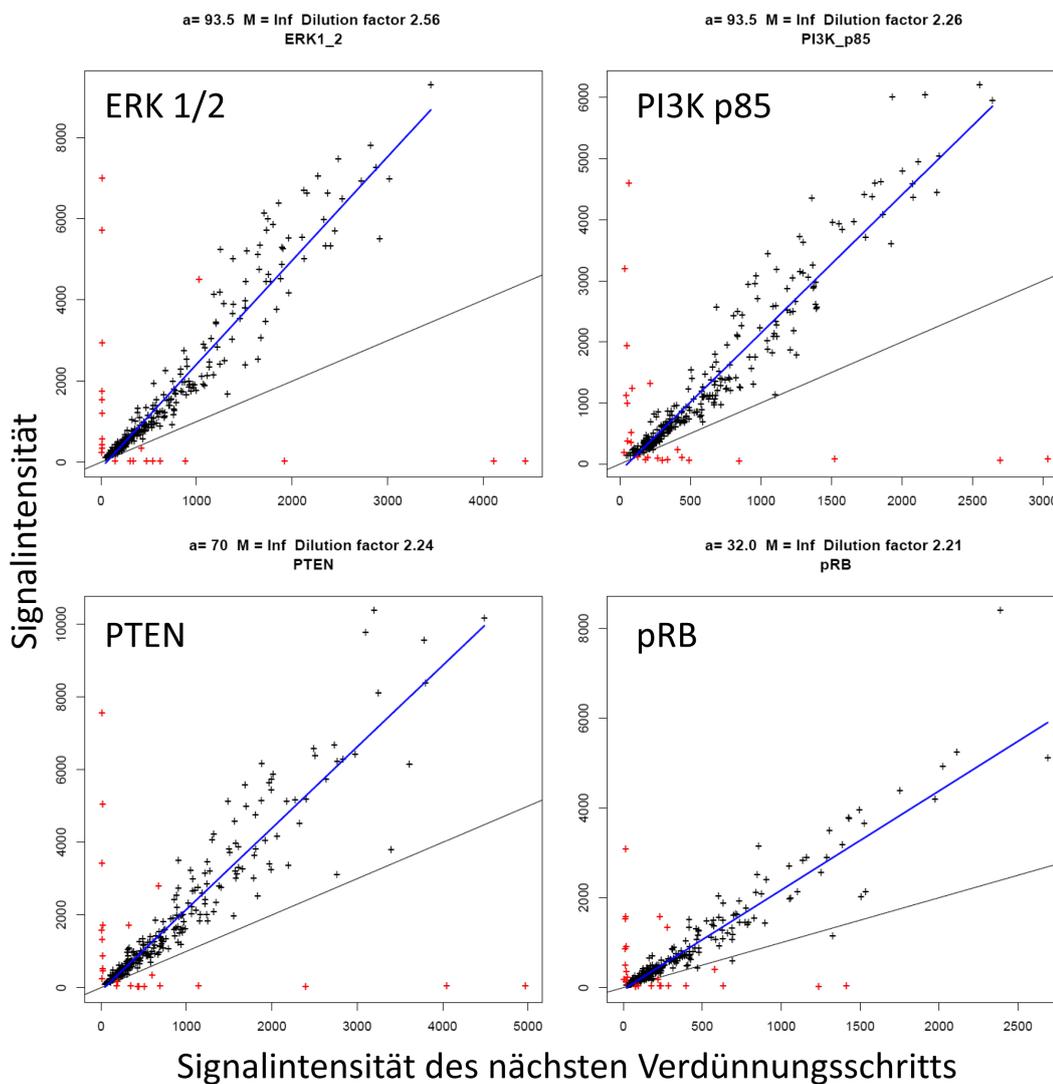


Abbildung 3.21: Darstellung der Signaldynamik von Antikörpern mit dem Serial Dilution Algorithmus (Zhang et al., 2009). Alle Punkte des Arrays (schwarz) werden zur Errechnung des Modells (blau) genutzt, bis auf die als Ausreisser definierten Punkte (rot). Zur Beurteilung der Signaldynamik dienen das geschätzte Detektionslimit (a) und die Sättigungsgrenze (M) sowie der theoretisch ermittelte Verdünnungsfaktor (Dilution factor).

3. ERGEBNISSE

Bedeutung der Normalisierung von RPPA-Daten

Unter Normalisierung versteht man im Zusammenhang mit RPPA die Korrektur der Signalintensitäten in Bezug auf eine einheitliche Größe, wie z.B. den Gesamtprotein-gehalt der gedruckten Proben. Dieser Schritt ist notwendig, um die Vergleichbarkeit der Proben bei quantitativer Analyse von Proteinen zu gewährleisten. Die Normalisierung läuft in zwei Schritten: zuerst wird ein Normalisierungsfaktor für jede Probe ermittelt, der anschließend auf der logarithmischen Skala vom Signalwert abgezogen wird. Der Hauptunterschied zwischen den verschiedenen Normalisierungsverfahren ist daher die Bestimmung des Normalisierungswertes. Hier wurden vier prinzipielle Arten der Normalisierungsarten verglichen: Messung von Housekeepingproteinen, Anfärbung mit Proteinfarbstoffen (Fast Green FCF, kolloidales Gold), extern ermittelte Konzentrationswerte (BCA-Assay) und die Normalisierung über die mittlere Expression aller gemessenen Proteine.

Jeder Arbeitsschritt, von der Extraktion der Proteine aus den Proben bis zum Drucken der Arrays, beeinflusst den Gesamtprotein-gehalt der Spots auf dem Array. Diese Unterschiede wirken sich auf das Signal des Zielproteins aus, da dies in Abhängigkeit vom Gesamtprotein-gehalt steht, den es deshalb auszugleichen gilt:

Durch unterschiedliche Verhältnisse von Lysepuffer und Zellzahl entstehen Konzentrationsunterschiede in den Proben. Diese werden ausgeglichen durch Verdünnen der Proteinkonzentration aller Proben auf einen festgelegten Wert, der bei Gesamtzelllysaten nicht unter $1,5 - 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ liegen sollte. Im Anschluss werden die Proben mit einem zusätzlichen Puffer versetzt, um die Viskosität dem Arraydrucker anzupassen. Für Kontaktdrucker (Nadeldrucker: Aushon 2470) wird mit Detergentien (z.B. Tween20 oder Igepal NP-40) die Oberflächenspannung herabgesetzt, für kontaktlose Drucker (Piezodrucker: ArrayJet Sprint) mit Glycerin oder Polyethylenglykol die Viskosität erhöht. Bedingt durch die heterogene Zusammensetzung unterschiedlicher Proben kann die Oberflächenspannung bzw. Viskosität aber nicht absolut gleichmäßig eingestellt werden, was sich auf die Aufnahme- und Abgabemenge auswirkt. Die Nadeln bzw. Piezoelemente der Drucker sind ebenfalls nicht absolut gleich und haben daher unterschiedliche Aufnahme- und Abgabemengen. Diese Größe lässt sich durch das Drucken geeigneter Standardproben bestimmen. Kleine Unterschiede in den Abgabemengen beeinflussen aber die Gesamtproteinmenge der Arraypunkte, wobei die voraus-

gehende variable Aufnahme zu unterschiedlichen Volumina der Proben führt. Da sich der Druck eines Probensatzes über mehrere Stunden hinzieht, entstehen zusätzliche Veränderungen, z.B. durch Verdunstungseffekte. Dabei ist dieser Effekt nicht für alle Proben gleich, da ungleiche Volumina und die biochemische Zusammensetzung die Verdunstung beeinflussen. Zusätzlich entstehen Konzentrationsänderungen durch den Eintrag von Waschpuffer in die Proben.

Als Normalisierungswert kann im einfachsten Fall die Proteinkonzentration, wie sie vor dem Drucken bestimmt wurde, herangezogen werden. Das ist jedoch nur sinnvoll, wenn der Arraydrucker sehr präzise arbeitet und der Druckvorgang weniger als eine Stunde dauert, da durch das Drucken entstandene Fehler nicht ausgeglichen werden können.

Unter der Annahme, dass alle in einer Probe gemessenen Proteine die Konzentration der Probe reflektieren, kann der Median aller Signale einer Probe als Normalisierungswert verwendet werden. Mit Hilfe dieses Ansatzes können Nadeleffekte ausgeglichen werden.

Am weitesten verbreitet sind Gesamtprotein-Anfärbungen eines oder mehrerer Arrays, die stellvertretend für alle Arrays aus einem Druckerlauf durchgeführt werden. Dazu werden Proteinfarbstoffe wie kolloidales Gold, Sypro Ruby oder Fast Green FCF verwendet. Mit dem so erzeugten Normalisierungswert lassen sich Unterschiede der Nadeln bzw. Piezoelemente ausgleichen und bis zu einem gewissen Anteil auch Verdunstungseffekte berücksichtigen. Je mehr Arrays aus einem Druckerlauf für die Anfärbung mit Farbstoff verwendet werden, desto genauer können zeitlich bedingte Effekte (Verdunstungseffekte) normalisiert werden.

Der theoretisch leistungsfähigste Normalisierungswert ist der, der auf demselben Array wie der Zielproteinwert erzeugt wird. Dies kann durch den Einsatz von Antikörpern gegen konstitutiv exprimierte Proteine (sogenannte Housekeeper), deren Konzentration von den experimentellen Parametern unbeeinflusst bleibt, erreicht werden. Durch Kombination der passenden Antikörperwirte und der Verwendung zweier unterschiedlicher Signale (z.B. verschiedener Wellenlängen) lassen sich auf einem Array beide Werte erzeugen.

3. ERGEBNISSE

Versuchsaufbau zur Bestimmung der leistungsfähigsten Normalisierung

Um das stabilste RPPA-Protokoll in Bezug auf die Normalisierung zu ermitteln, wurde die Auswirkung verschiedener Parameter (Druckernadelgröße, Proteinkonzentration und -konformation) auf die verschiedenen Normalisierungsmethoden (siehe Abschnitt 3.1.4) ermittelt. Dazu wurden Lysate mit nativer Proteinkonformation zweier Kolonkarzinomzelllinien H508 und HCT116 in zwei Teile aufgeteilt, wovon ein Teil mit 2 % SDS versetzt und 5 *min* bei 95 °C denaturiert wurde. Der andere Teil wurde mit der entsprechenden Menge an PBS verdünnt. Aus diesen vier Ansätzen wurden durch lineare Verdünnung jeweils 15 Proben erzeugt, um verschiedene Proteingehalte zu simulieren, beginnend mit einer Konzentration von 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Diese 60 Proben wurden anschließend in fünf Stufen seriell verdünnt (siehe Tabelle 3.3), um einen Datensatz zu erhalten, auf dem verschiedene Methoden der Quantifizierung angewendet werden konnten. Die seriellen Verdünnungen einer Probe wurden so in eine Mikrotiterplatte pipettiert, dass beim anschließenden Drucken jede Verdünnungsstufe der Probe mit derselben Nadel gedruckt wurde, um innerhalb der Proben Varianzen durch Nadelunterschiede zu vermeiden.

Der Probensatz wurde mit einem Kontaktdrucker in zwei verschiedenen Proteinmengen pro Punkt durch Verwendung unterschiedlicher Nadeldurchmesser (185 μm Nadeldurchmesser entsprechen etwa 1,6 *nl* Lysat, 110 μm etwa 0,3 *nl*) gedruckt. Zur Erzeugung des Normalisierungssignals wurden jeweils drei Arrays mit unterschiedlichen Proteinfarbstoffen (kolloidales Gold, Sypro Ruby, Fast Green FCF) angefärbt. Eine Mischung aus Antikörpern gegen GAPDH, Aktin und ribosomales Protein L19 wurde jeweils im Anschluss an die Inkubation von Antikörpern gegen EGFR, ERK, p-ERK und PCNA inkubiert.

Durch die verschiedenen Normalisierungsmethoden sollten die Signale der simulierten Proben unterschiedlicher Konzentration (siehe Tabelle 3.3) auf einen möglichst ähnlichen (im Idealfall einen einzigen) Signalwert normalisiert werden. Abbildung 3.22 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Normalisierung der ERK-Signale in Lysaten aus H508-Zellen, gedruckt mit 185 μm Nadeldurchmesser. Der Signalebereich der unterschiedlichen Konzentrationen wurde durch die Fast Green-Normalisierung eingengt, aber die Signale korrelierten nach wie vor mit der Konzentration der Proben. Wurde mit Hilfe des Medianwertes normalisiert, konnte diese Abhängigkeit aufgehoben

Tabelle 3.3: Verdünnung von Lysaten zur Simulation verschieden konzentrierter Proben zur Ermittlung der leistungsfähigsten Normalisierung.

Probe Nr.	Proben- konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Serielle Verdünnungsreihe				
1	6	3,0	1,5	0,75	0,375	0,1875
2	5,6	2,8	1,4	0,70	0,350	0,1750
3	5,2	2,6	1,3	0,65	0,325	0,1625
4	4,8	2,4	1,2	0,60	0,300	0,1500
5	4,4	2,2	1,1	0,55	0,275	0,1375
6	4	2,0	1,0	0,50	0,250	0,1250
7	3,6	1,8	0,9	0,45	0,225	0,1125
8	3,2	1,6	0,8	0,40	0,200	0,1000
9	2,8	1,4	0,7	0,35	0,175	0,0875
10	2,4	1,2	0,6	0,30	0,150	0,0750
11	2	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625
12	1,6	0,8	0,4	0,20	0,100	0,0500
13	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075	0,0375
14	0,8	0,4	0,2	0,10	0,050	0,0250
15	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125

3. ERGEBNISSE

werden. Die Leistungsfähigkeit einer Normalisierungsmethode kann daran gemessen werden, wie eng die Signale unterschiedlicher Konzentrationen eines Lysates nach der Normalisierung sind. Als Optimierungsparameter für die nachfolgend gezeigten Experimente wurde deshalb der 90 % Interquantilbereich gewählt, der anzeigt, wie gut die Konzentration der verschiedenen Proben ausgeglichen werden konnte.

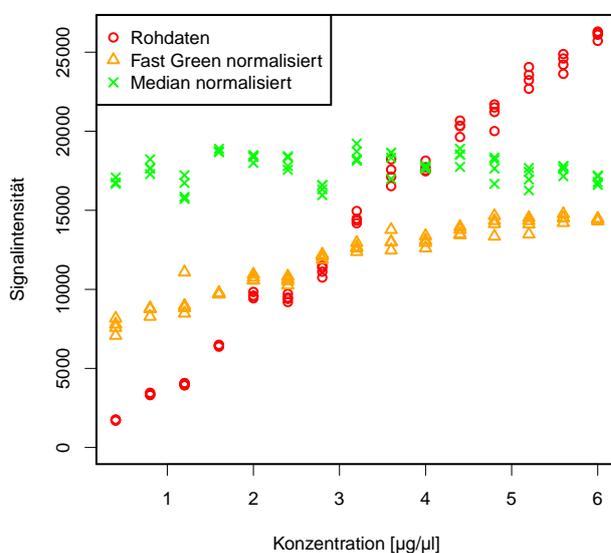


Abbildung 3.22: Effekt der Normalisierung von Signalen einer ERK-Messung nach dem Proteingehalt einer Verdünnungsreihe von Lysat aus H508-Zellen (rot) mit Signalen der Fast Green-Anfärbung (orange) und dem Median aller gemessenen Proteine des Experiments (grün).

Die Linearität der RPPA-Technologie wurde bereits in Abschnitt 3.1.4 für Probenkonzentrationen von etwa $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ gezeigt und konnte hier bis zu einer Probenkonzentration von $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ erweitert werden, unabhängig von Nadeldurchmesser und Probenkonformation. Abbildung 3.23 zeigt am Beispiel der Quantifizierung von ERK in den Zelllinien H508 und HCT116, dass auch in diesem experimentellen Aufbau in keiner Kombination ein Sättigungswert errechnet wurde.

Die Leistungsfähigkeit der unterschiedlichen Normalisierungsansätze wurde zunächst für verschiedene Konzentrationsbereiche untersucht. Dazu wurde die Konzentration in vier Bereiche aufgeteilt: niedrig $0,4$ bis $2,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, mittel $1,2$ bis $3,6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, hoch

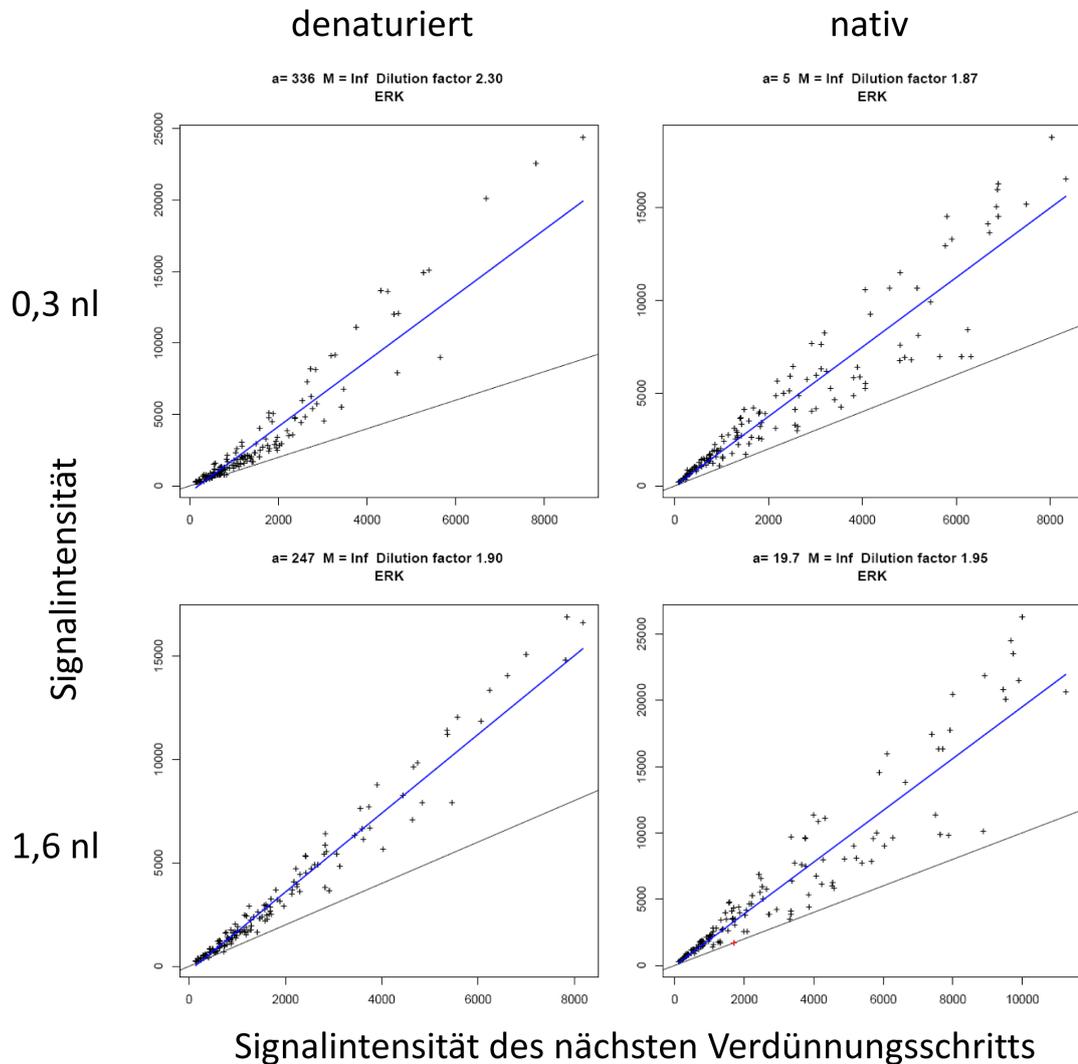


Abbildung 3.23: Vergleich der Dynamik von RPPA-Signalen für ERK bei verschiedenen Proteinkonformationen und Punktgrößen auf Grundlage des Serial Dilution Curve Algorithmus (Zhang et al., 2009). Gemessen wurden Lysate aus den Zelllinien H508 und HCT116 (siehe auch Abbildung 3.21)

3,6 bis $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ und der gesamte Bereich $0,4$ bis $6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dabei zeigte sich, dass der Interquantil-Bereich umso kleiner wurde, je höher die Proteinkonzentration der Proben war, wobei dies für alle Normalisierungsmethoden galt (siehe Abbildung 3.24). Daraus ergab sich, dass der Gewinnung hoher Konzentrationen im experimentellen Protokoll eine hohe Priorität einzuräumen ist.

3. ERGEBNISSE

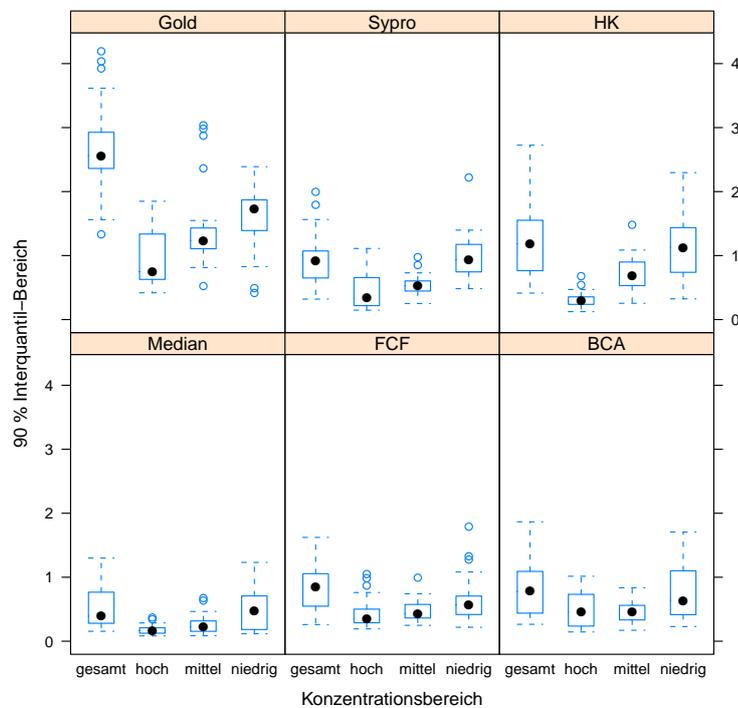


Abbildung 3.24: Leistungsfähigkeit verschiedener Normalisierungsmethoden in Abhängigkeit von der Konzentration: Dargestellt sind die 90 % Interquantilbereiche der logarithmierten Signale der normalisierten virtuellen Proben in Abhängigkeit des zu normalisierenden Proteinbereiches (niedrig 0,4 bis 2,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, mittel 1,2 bis 3,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, hoch 3,6 bis 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, gesamt 0,4 bis 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) für sechs unterschiedliche Normalisierungsmethoden.

Die Normalisierungsergebnisse wurden auch nach Lysemethode getrennt betrachtet. Im mittleren Konzentrationsbereich zeigte sich, dass sich nach Normalisierung insgesamt die native Konformation etwas besser rechnen ließ, da der Interquantil-Bereich etwas kleiner wurde. Für die native Lyse erwies sich die Mediannormalisierung als am leistungsfähigsten. Vergleichbar gut schnitt die Fast Green FCF-Normalisierung (siehe Abbildung 3.25) ab. Die größte Variation zeigte die Normalisierung mit kolloidalem Gold. Für die denaturierende Lyse galt ein ähnliches Verhältnis, aber insgesamt blieb hier eine etwas größere Varianz zurück.

Die Größe der Druckernadeln und damit die Proteinmenge der Spots beeinflussten ebenfalls die Normalisierungsleistung. Hier zeigte sich ein signifikanter Vorteil (p -Wert $< 0,001$) der größeren 185 μm Nadeln unabhängig von der Lysemethode (siehe Abbil-

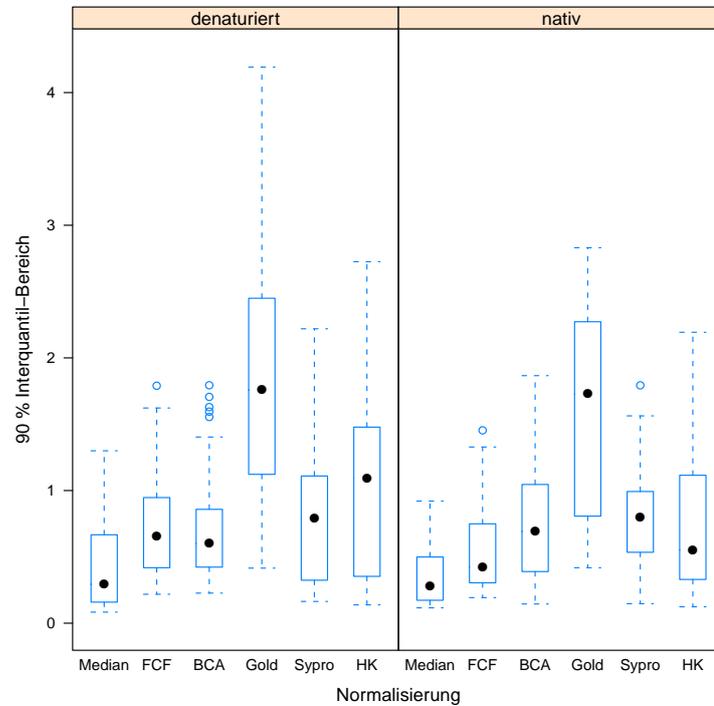


Abbildung 3.25: Vergleich der Normalisierungsmethoden, getrennt nach Konformation der Proben: Dargestellt sind die 90 % Interquartilbereiche der logarithmierten Signale der normalisierten virtuellen Proben in Abhängigkeit der Normalisierungsmethode.

Abbildung 3.26). Zusammenfassend stellte sich die Verwendung von 185 μm Nadeln, nativer Proteinkonformation, der Anfärbung eines Arrays pro Drucklauf mit Fast Green FCF und der Arbeit mit möglichst hohen Konzentrationen als geeignetste Kombination für eine leistungsfähige Normalisierung dar. Die Normalisierung mit dem Median über alle gemessenen Proteine einer Probe bleibt als Option immer erhalten und kann jederzeit zusätzlich herangezogen werden, da keine zusätzlichen Laborarbeiten notwendig sind.

3. ERGEBNISSE

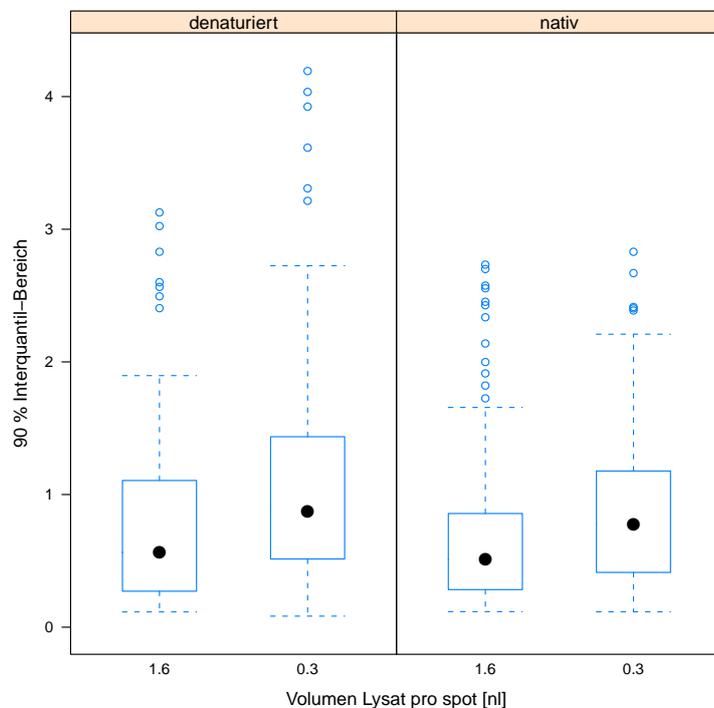


Abbildung 3.26: Einfluss der Druckernadeln auf die Normalisierung der RPPAs: Darstellung der 90 % Interquantilbereiche der logarithmierten Signale der normalisierten virtuellen Proben.

3.1.5 Entwicklung eines Auswerteprogramms

Notwendigkeit der Entwicklung einer Software zur RPPA-Datenanalyse

Im Verlauf der Arbeit wurde die Kapazität der RPPAs durch die Anschaffung leistungsfähigerer Drucker und einer Teilautomatisierung der Inkubationsschritte erheblich verbessert. Dies führte zu sehr umfangreichen Datensätzen, zu deren Auswertung Tabellenkalkulationsprogramme nicht mehr ausreichend waren. Aufgrund der noch relativ geringen Verbreitung dieser jungen Technologie und der großen Flexibilität ihres Einsatzes war aber weder ein kommerzielles noch ein freies Auswerteprogramm verfügbar. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das Softwarepaket RPPAnalyzer zur Analyse von RPPA-Daten in der statistischen Umgebung R entwickelt. Das Softwarepaket wurde in der freien Programmiersprache R geschrieben, da R die am weitesten verbreitete und akzeptierte Plattform zur statistischen Analyse biologischer Datensätze ist (R

Development Core Team, 2005). Das Softwarepaket stellt Funktionen bereit, die vom Einlesen der Rohdaten bis hin zur Visualisierung der Ergebnisse alle Analyseschritte abdecken (siehe Abbildung 3.27).

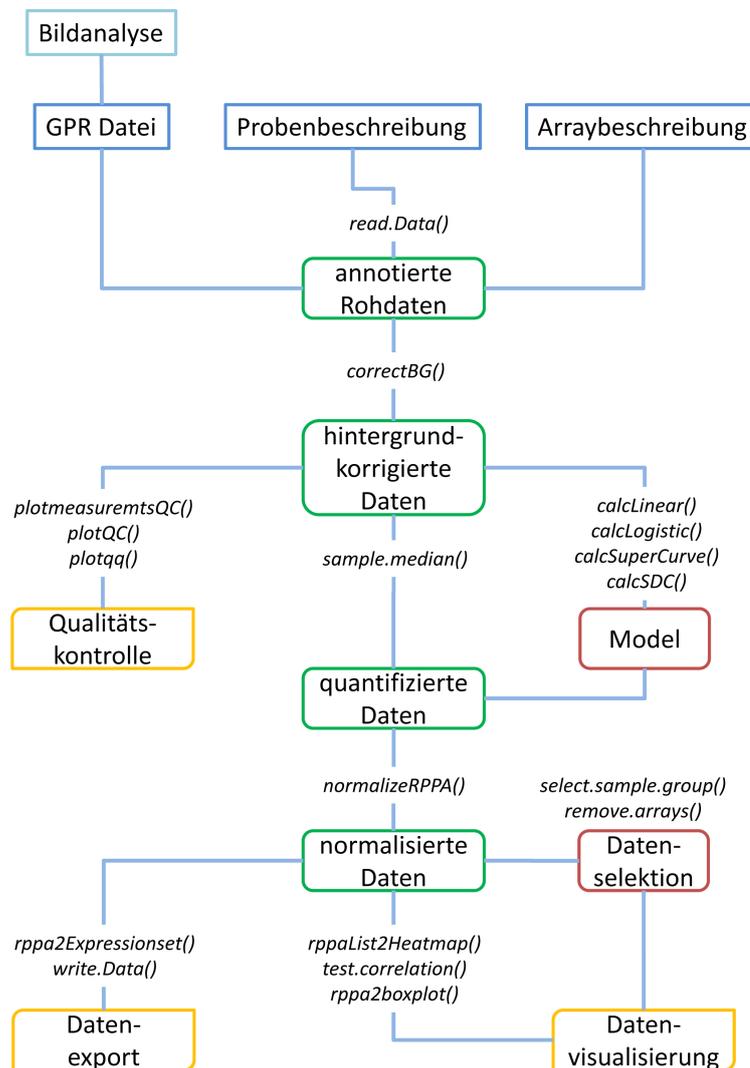


Abbildung 3.27: Flussdiagramm der Analyse von RPPA-Daten mit dem R-Paket RPP-analyzer mit Dateien zur Beschreibung der Proben, Arrays und Proteinexpression (blaue Kästen), Datenobjekte (grün) und Datenvisualisierung bzw. -export (gelb).

3. ERGEBNISSE

Integration von Soft- und Hardware zur automatischen Analyse von RPPA-Daten

Die Software zur Analyse der RPPA-Daten wurde im Hinblick darauf entwickelt, größtmögliche Flexibilität in der Planung und Durchführung der Laborarbeiten zu gewährleisten. Dies konnte durch die Integration der Druckersoftware (Mikroarraydrucker ArrayJet Sprint und Aushon 2470) mit der Bildanalysesoftware (GenePix) und der Datenanalysesoftware (RPPAnalyzer) erreicht werden. Im Einzelnen werden die Protokolle der Arraydrucker genutzt, um die Proben auf den Arrays bei der Bildanalyse zu lokalisieren. Mit einer Beschreibung der Mikrotiterplatte, in der die Proben gelagert werden, und der zur Inkubation verwendeten Antikörper in einer weiteren Datei werden die Ergebnisse aus der Bildanalyse den einzelnen Punkten des Experiments zugeordnet. Das bedeutet, es gibt mit Ausnahme der Beachtung der Probenaufnahmemuster der Drucker keinerlei Einschränkungen beim Planen der Experimente.

Einlesen der Rohdaten

Die Daten, die das RPPA-Experiment beschreiben, werden aus einem gemeinsamen Ordner eingelesen:

1. Die Beschreibung der Proben ist als Textdatei zusammengefasst und enthält die experimentellen oder klinischen Daten sowie die Position in der Mikrotiterplatte.
2. Eine Textdatei, die Daten zu den einzelnen Arrays enthält, wie z.B. der verwendete Antikörper und das untersuchte Zielprotein.
3. Die Ergebnisdateien der Bildanalysesoftware müssen als GenePix Result Datei (*.gpr) bereitgestellt werden.

Der Datenimport erstellt eine Liste (R-Objekt) aus vier Elementen: eine Matrix mit den Signalintensitäten der Probenpunkte und eine weitere mit dem lokalen Hintergrundsignal. Jede Zeile dieser Matrizen beinhaltet einen Vektor, der sich auf die einzelnen Arraypunkte bezieht, und jede Spalte einen Vektor, der die einzelnen Arrays zusammenfasst. Das dritte Element beschreibt die Spalten der beiden Matrizen und damit die Arrays. Entsprechend beschreibt das vierte Element die Zeilen bzw. Punkte (Spots). Diese Vier-Elemente-Struktur wird während der nachfolgenden Analyseschritte beibehalten und kann jederzeit in Form von zwei Textdateien exportiert werden. Die

Textdateien enthalten den Matrizen entsprechende Signalwerte, annotiert mit Proben und Arrayinformation und sind optimiert zur weiteren Analyse mit Tabellenkalkulationsprogrammen, wie *MS Excel* oder *OpenOffice.org Spreadsheet*.

Hintergrundkorrektur und Quantifizierung

Nach dem Einlesen kann optional mit Algorithmen des *limma* R-Pakets (Ritchie et al., 2007) eine Korrektur des Hintergrundes durchgeführt werden. Zur Quantifizierung kann entweder der Median der technischen Replikatepunkte herangezogen werden oder im Fall einer seriellen Verdünnung der Proben die Konzentration über ein mathematisches Modell geschätzt werden. Dabei stehen sowohl ein lineares wie auch ein logistisches Modell zur Verfügung, die für jede Probe eigene Parameter für die Schätzung zur Verfügung stellen, als auch Modelle, die alle Punkte eines Arrays zur Modellberechnung einbeziehen (Hu et al., 2007; Zhang et al., 2009).

Normalisierung der Proteingehalte

Zur Normalisierung der Arraydaten sind alle Verfahren aus Abschnitt 3.1.4 implementiert, wobei jedes Verfahren unterschiedliche experimentelle Designs berücksichtigt und verschiedene Fehlerquellen ausgleicht.

Visualisierung der Ergebnisse

Um einen Überblick über die biologische Relevanz der Daten zu erhalten, sind Funktionen zur Visualisierung der Daten implementiert:

- Boxplots zur Darstellung differentiell exprimierter Proteine in unterschiedlichen Probengruppen zusammen mit den Ergebnissen eines statistischen Tests (Wilcoxon-Test).
- Korrelation der Proteinexpression mit kontinuierlichen Eigenschaften der Proben (Pearson-Test).
- Klusteranalyse in Heatmaps mit Annotation spezifischer Eigenschaften der Proben.
- Darstellung von zeitlich aufgelösten Experimenten (Stimulationszeitreihen).

3. ERGEBNISSE

Datenexport

Zur weiteren Analyse mit R-Paketen aus dem Bereich des Expressionsprofiling können die Daten als S4-Objekt (Expression Set) exportiert werden, da auf diesem Datenformat viele etablierte Softwarepakete der Bioconductor-Plattform aufbauen. Zur Weiterverarbeitung der Daten mit Tabellenkalkulationsprogrammen lassen sich die Daten in Textdateien schreiben und mit *MS Excel* oder *OpenOffice.org Spreadsheet* öffnen. Um das *lattice*-Paket zur multivariaten Datenvisualisierung anwenden zu können, ist es möglich, das Listenobjekt in ein Datenfeld (Data frame) umzuwandeln.

3.2 Anwendung der RPPA-Technologie zum Screening einer miRNA-Bibliothek

3.2.1 Experimentelles Design

In diesem Projekt sollte die Anwendbarkeit der RPPA-Technologie zur Analyse von Signalproteinen in großen Probensätzen gezeigt werden. Dazu wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe Receptor Tyrosine Kinase Signaling unter der Leitung von Özgür Sahin die Effekte von 810 miRNA-Transfektionen auf die Expression von Proteinen des ERBB-Signalnetzwerks quantifiziert werden. Als biologisches System wurde die humane Zelllinie MDA-MB-231 herangezogen, die als Modell für dreifach negativen Brustkrebs gilt. Das bedeutet, die Zelllinie exprimiert kein oder nur sehr wenig ERBB2, Progesteron- und Östrogenrezeptor. Zusätzlich fällt die Zelllinie in die Brustkrebs-Klasse der Claudin-reduzierten (claudin-low) Tumore (Prat et al., 2010). Die Transfektion der miRNA-Bibliothek wurde von Stefan Uhlmann mittels eines automatisierten Protokolls von Christian Schmidt durchgeführt. Die Proben wurden für die RPPA-basierenden Analysen als Zellpellet bereitgestellt.

Alle Detektionsantikörper wurden, wie in Abschnitt 3.1.2 dargestellt, validiert. Zusätzlich wurde ein weiteres Auswahlkriterium eingeführt, um die Signifikanz der Ergebnisse abzusichern. Das Verhältnis der Reduktion der mRNA in der Knockdownprobe, gemessen mit qRT-PCR, zu der Reduktion des Proteingehaltes auf RPPA sollte größer als 0,5 sein. Das heißt, der Antikörper sollte mindestens die Hälfte der Reduktion an mRNA auf Proteinebene erkennen. Die in Abbildung 3.11 gezeigten Proteine

3.2 Anwendung der RPPA-Technologie zum Screening einer miRNA-Bibliothek

bilden die Auswahl an Antikörpern für dieses Projekt. Herausgenommen wurde der Antikörper gegen SRC, da die Expression dieses Proteins erst in einem späteren Drucklauf untersucht werden sollte. Zusätzlich aufgenommen wurde ein Antikörper gegen MAPK1 (ERK2), der aber zu einem späteren Zeitpunkt validiert und deshalb nicht auf allen in Abbildung 3.11 gezeigten Knockdowns inkubiert wurde.

Aufgrund der hohen Anzahl an Proben wurde das gesamte Probenset zur Extraktion der Proteine, Vornormalisierung und Vorbereitung in kleinere Sets unterteilt. Diese Aufteilung erfolgte unter Optimierung der Einfrier- und Auftauzyklen, Standzeiten und Drucklayouts sowie der späteren Normalisierung von Gruppeneffekten. Die miRNA-Bibliothek wurde in 34 Einzelläufen mit jeweils drei biologischen Replikaten von 24 miRNAs und fünf Kontrolltransfektionen transfiziert. Die Kontrolltransfektionen teilten sich auf in zwei Positivkontrollen (siEGFR und miRNA-7) und drei Negativkontrollen. Für die Analyse auf RPPA wurden jeweils zwei biologische Replikate verwendet. Es wurde jeweils ein Transfektionslauf lysiert, der Proteingehalt gemessen und vornormalisiert. Zwei Transfektionsläufe mit insgesamt 116 Proben wurden anschließend so in eine Mikrotiterplatte pipettiert, dass alle 24 verfügbaren Nadeln des Druckers mit fünf Aufnahmen die Proben drucken konnten. Die Proben wurden auf vier Unterarrays aufgeteilt, was die Druckzeit und damit die Verweilzeit der Proben bei Raumtemperatur um 75 % von 14 auf 3,5 Stunden reduziert. Zum Normalisieren der Arrayeffekte wurden vier Kontrollverdünnungsreihen hergestellt, je zwei aus Zelllysaten unbehandelter und Zelllysaten siRNA-transfizierter MDA-MB-231-Zellen. Diese Verdünnungsreihen wurden mit jedem der vier Teilarrays gedruckt. Durch diese identischen Kontrollen auf jedem Teilarray konnten die Arrayeffekte ermittelt und normalisiert werden. Die Kontrollverdünnungsreihen zeigten im Einzelnen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Proteine (siehe Abbildung 3.28). Daher wurden zur Beurteilung der Normalisierungseffizienz die einzelnen Kontrollverdünnungsreihen gemeinsam betrachtet.

3.2.2 Normalisierung der Daten

Alle Antikörper zeigten auf den Kontrollverdünnungsreihen eine lineare Abhängigkeit zwischen Signalintensität und Proteinkonzentration (siehe Abbildung 3.29). Nur die Inkubation des Antikörpers gegen PIK3CB verlief nicht optimal, worauf die Daten von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden.

3. ERGEBNISSE

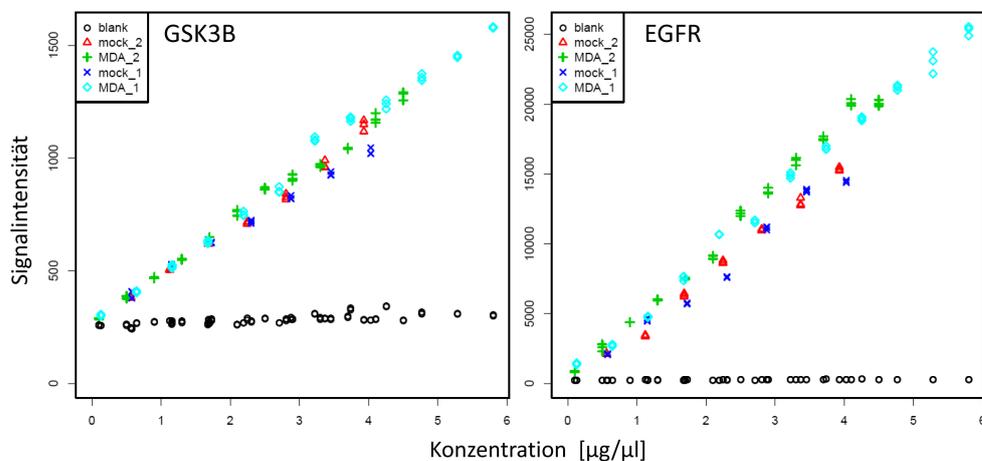


Abbildung 3.28: Qualitätskontrolle der Arrayinkubationen anhand von Kontrollverdünnungsreihen. Zwei zwölfstufige Verdünnungsreihen mit gleichmäßigen Konzentrationsabstufungen von 5,8 bis 0,1 bzw. 4,5 bis 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aus Lysaten unbehandelter MDA-MB-231-Zellen (grün und hellblau), sowie siebenstufige Verdünnungsreihen von 4 bis 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit Kontroll-siRNA-transfizierten MDA-Zellen (rot und blau) im Vergleich zu den Blankwerten.

Die Normalisierung der Signale in Bezug auf den Gesamtproteingehalt der Proben erfolgte wie in Abschnitt 3.1.4 zum einen über Fast Green FCF-Signale, zusätzlich wurde ein Datensatz mit Mediannormalisierung erstellt. Mit beiden Normalisierungsarten konnte eine sehr gute Angleichung der Signale unterschiedlich konzentrierter Proben erreicht werden. Abbildung 3.30 zeigt die Effektivität der beiden Normalisierungsarten am Beispiel von fünf Antikörpern. Nach einer Normalisierung der Proben über die Signale der Fast Green FCF-Anfärbung blieb eine leichte Abhängigkeit der Signale von der Proteinkonzentration erhalten, nach der Mediannormalisierung war diese nicht mehr zu erkennen (vergleichbar mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.1.4 Abbildung 3.22). Deutlich zu erkennen waren die unterschiedlichen Signalniveaus der einzelnen Antikörper, die einen direkten Vergleich der Arrays ohne Ausgleich der Arrayeffekte unmöglich machte.

Um diese Arrayeffekte auszugleichen, wurden zwei verschiedene Methoden miteinander verglichen. Zum einen wurden die Mittelwerte der normalisierten Kontrollverdünnungsreihen als Korrekturfaktor für die jeweiligen Arrays verwendet und von allen Werten des Arrays abgezogen. Zum anderen wurde eine Z-score-Normalisierung

3.2 Anwendung der RPPA-Technologie zum Screening einer miRNA-Bibliothek

mit folgender Formel durchgeführt:

$$x_{ni}^{norm} = \frac{x_{ni} - \mu_i}{\sigma_i}$$

wobei x_{ni} den Probenpunkt n des Arrays i bezeichnet, μ_i den Mittelwert aller x des i -ten Arrays und σ_i die entsprechende Standardabweichung darstellt. Abbildung 3.31 zeigt die Signalwerte der Kontrollverdünnungsreihen nach Mediannormalisierung der Proteingehalte und anschließender Normalisierung der Arrayeffekte. Beide Arraynormalisierungen brachten die Signale der individuellen Arrays auf ein gleiches Niveau, jedoch mit unterschiedlicher Streuung der Werte.

Dieser Effekt wurde ebenfalls deutlich beim Vergleich der vier Arrays, die mit dem gleichen Antikörper inkubiert wurden. Abbildung 3.32 zeigt die Werte aller miRNA-Transfektionen am Beispiel der Detektion von GSK3B nach unterschiedlicher Normalisierung des Proteingehaltes (Zeilen 1 und 2) und Arrayeffektes (Spalten A-C). Beide Arraynormalisierungen konnten die unterschiedlichen Arrayniveaus angleichen, wobei die Z-score-Normalisierung die gleichmäßigste Verteilung erreichte (Spalte C), aber im Vergleich zur Normalisierung über die arrayinternen Kontrollen (Spalte B) entstand eine wesentlich breitere Streuung der Einzelwerte. Der Einfluss unterschiedlicher Proteinnormalisierungen schien die Arraywerte wenig zu beeinflussen.

3. ERGEBNISSE

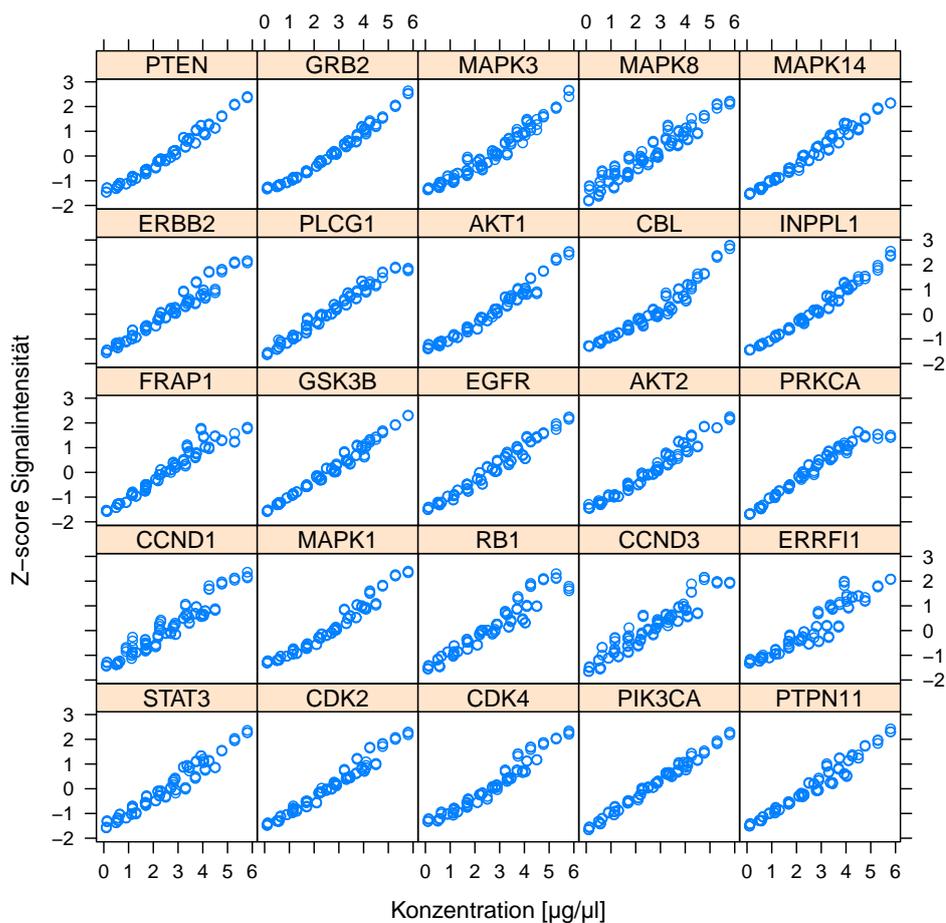


Abbildung 3.29: Qualitätskontrolle der Antikörperinkubationen über die Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Antikörpersignale der 25 validierten Antikörper. Zur Vereinfachung der Abbildung wurden die unterschiedlichen Signalwerte der Antikörper einheitlich skaliert. Für jeden Antikörper sind alle in Abbildung 3.28 beschriebenen Verdünnungsreihen dargestellt.

3.2 Anwendung der RPPA-Technologie zum Screening einer miRNA-Bibliothek

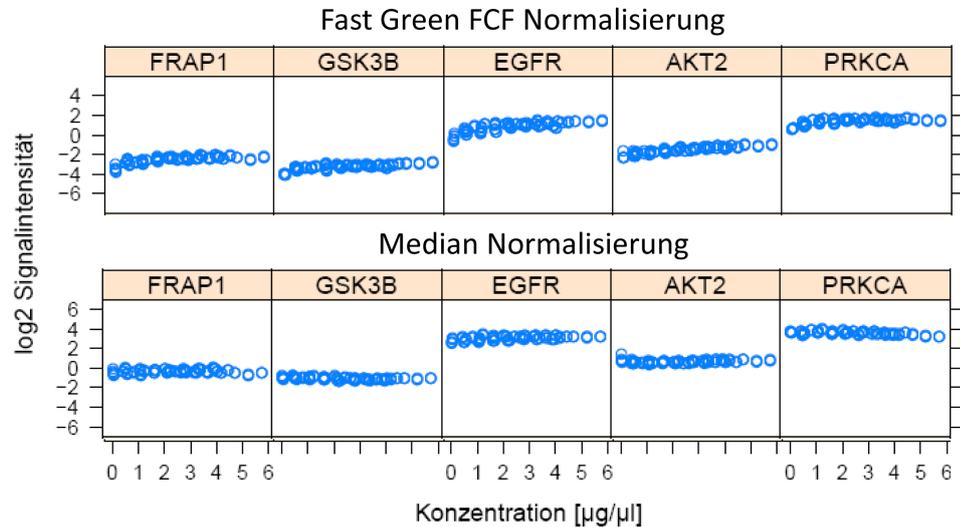


Abbildung 3.30: Darstellung der Kontrollverdünnungsreihen nach Normalisierung zum Ausgleich des Proteingehaltes: Die Ergebnisse der Normalisierung mit den Signalen des Proteinfarbstoffes (oben) sind im Vergleich mit der Normalisierung über die mittlere Proteinexpression (unten) anhand von fünf ausgewählten Proteinen dargestellt.

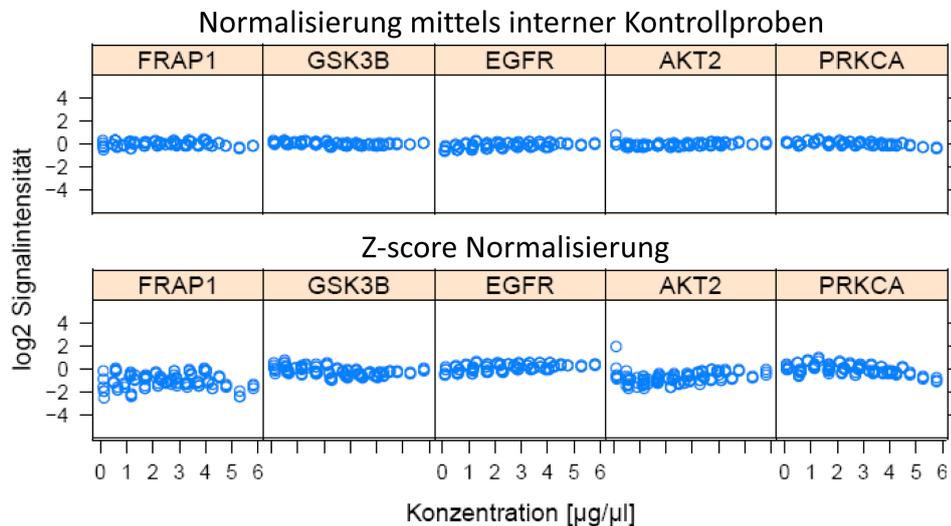


Abbildung 3.31: Normalisierung der Signalniveaus unterschiedlicher Antikörper über zwei verschiedene Ansätze: Normalisierung der Arraysignale mit dem mittleren Signal der Kontrollverdünnungsreihen (oben) und mit der Z-score-Normalisierung (unten) nach Ausgleich der Proteingehalte mit der mittleren Proteinexpression.

3. ERGEBNISSE

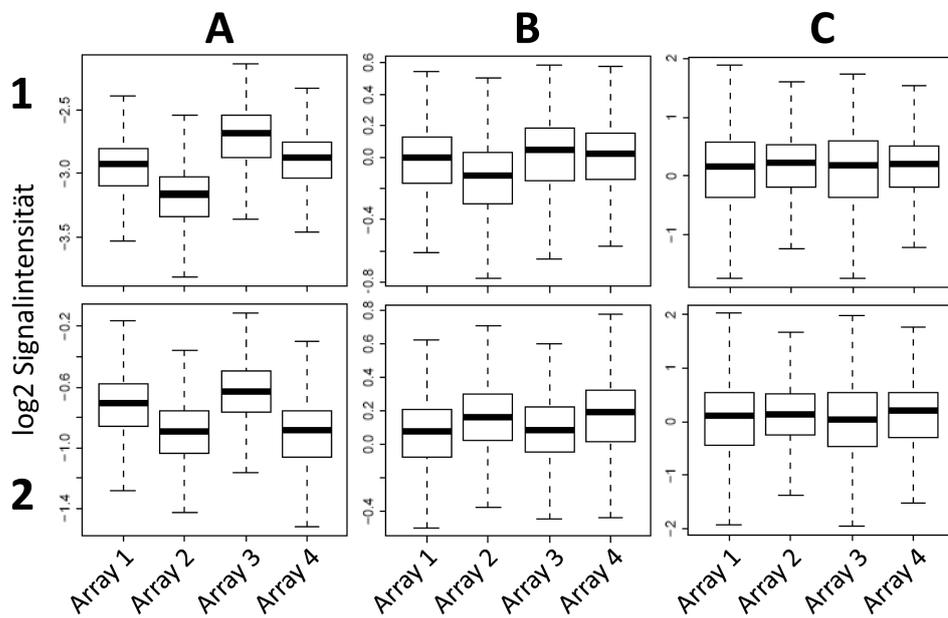


Abbildung 3.32: Normalisierung der Arrayeffekte innerhalb eines der vier Teilarrays des GSK3B-Antikörpers: Die obere Reihe (1) zeigt die GSK3B-Signale aller Proben des miRNA screenings nach Fast Green- Normalisierung, die untere (2) nach Normalisierung über die mittlere Proteinexpression. Spalte A zeigt die unnormalisierten Teilarrays, B Normalisierung der Arrayeffekte mit dem mittleren Wert der Kontrollverdünnungsreihen und C Normalisierung mit Z-score.

3.2 Anwendung der RPPA-Technologie zum Screening einer miRNA-Bibliothek

Zur abschließenden Bewertung der Normalisierungsmethoden für das miRNA-Screening wurde wie in Abschnitt 3.1.4 der Interquantilbereich der normalisierten Kontrollverdünnungsreihen als Optimierungsparameter herangezogen. Dazu wurden zunächst Verdünnungsstufen mit einer Konzentration von weniger als $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ vom Datensatz entfernt, um das Ergebnis nicht zu verzerren. Anschließend wurde für jede der vier Kontrollverdünnungsreihen (zwei Lysate unbehandelter MDA-Zellen und zwei mit Kontroll-siRNA transfizierte Lysate) für jeden Antikörper über alle Teilarrays hinweg der 95 % Interquantilbereich berechnet. Die Kombination aus Normalisierung der Proteingehalte über die mittlere Proteinexpression mit anschließender Normalisierung der Arrayeffekte über das mittlere Signal der Kontrollen zeigte über alle Antikörper und Kontrollen hinweg den schmalsten Interquantilbereich (siehe Abbildung 3.33) und wurde als Basis für die weiteren Analysen ausgewählt.

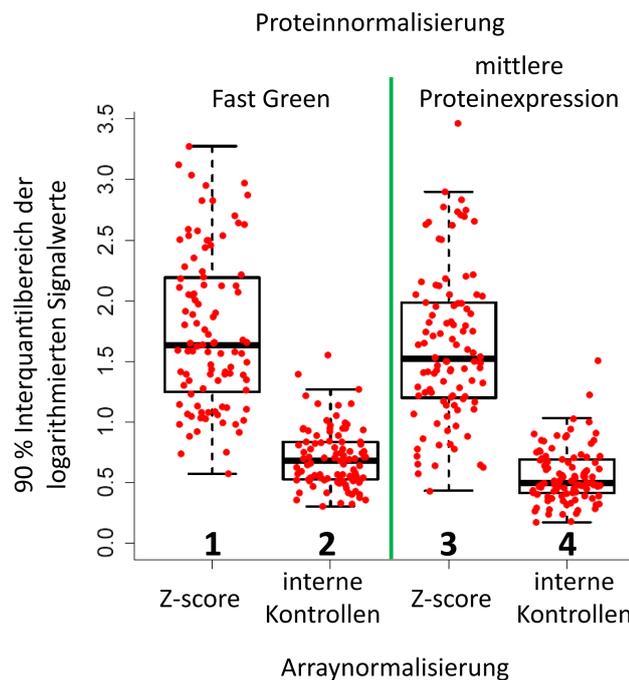


Abbildung 3.33: Vergleich der Normalisierungsverfahren für den miRNA Screen: Die Kombination aus Proteinnormalisierung über die mittlere Proteinexpression mit anschließender Normalisierung der Arrayeffekte über das mittlere Signal der internen Kontrollen (4) zeigt signifikant die niedrigsten Interquantilbereiche ($p\text{-Wert} \leq 0,001$) im Vergleich zur nächsthöheren Kombination (2).

3. ERGEBNISSE

3.2.3 Qualitätskontrolle der miRNA-Transfektionen

Die 811 miRNA-Transfektionen wurden innerhalb von sechs Monaten in 34 einzelnen Läufen durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit der Daten überprüfen zu können, wurden bei jedem Transfektionslauf jeweils zwei biologische Replikate von drei Negativkontrollen (siKontrolle, miKontrolle 1 und 2) sowie zwei Positivkontrollen (siEGFR und miR-7) produziert. Beim Vergleich der EGFR-Expression in den Kontrollen aller 34 Transfektionsläufe konnte ein sehr homogenes Expressionsmuster detektiert werden. Die Reduktion von EGFR war in der siEGFR-transfizierten Probe am stärksten, gefolgt von der miR-7-Transfektion. Innerhalb der Negativkontrollen zeigte sich die miKontrolle 1 durchweg mit etwas erhöhter Konzentration an EGFR. Abbildung 3.34 zeigt einen Querschnitt der Ergebnisse anhand von vier über alle 34 Transfektionen verteilten Kontrollen.

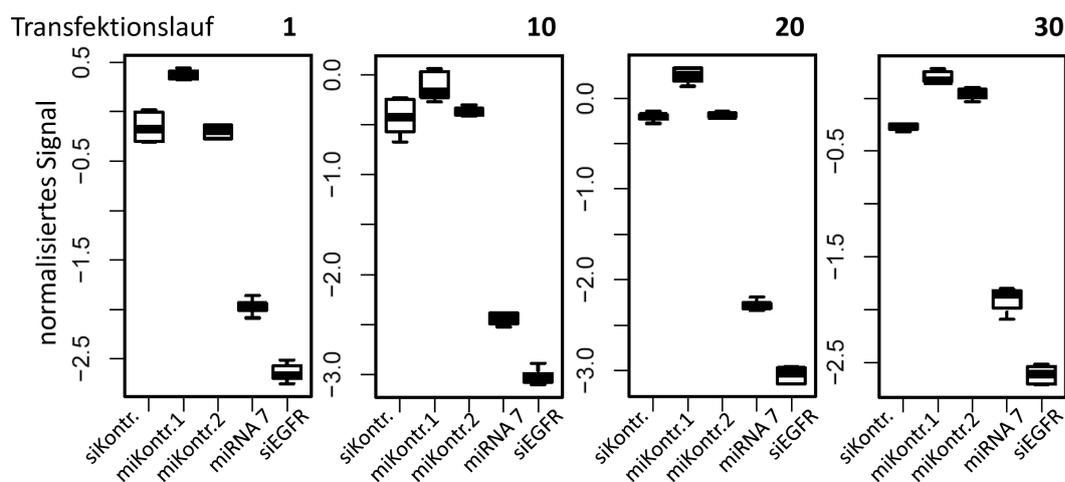


Abbildung 3.34: Kontrolle der miRNA-Transfektionen anhand der EGFR-Expression in Positiv- (miR-7, siEGFR) und Negativkontrollen (siKontrolle, miKontrolle 1 und 2). Stellvertretend für die 34 Transfektionsläufe sind die Ergebnisse der Transfektionen Nummer 1, 10, 20 und 30 dargestellt. Ein Boxplot repräsentiert jeweils zwei biologische Replikate mit je drei Replikatpunkten nach Normalisierung des Proteingehaltes und der Arrayeffekte.

Dieses Screening verdeutlichte das Potential der RPPA-Technologie, eine große Anzahl von Proben schnell und präzise zu vermessen und qualitativ hochwertige Daten zu produzieren. Die Rohdaten aus diesem Screening wurden an Jitao Zhang übergeben, der diese nach Normalisierung weiterleitete an die Arbeitsgruppe Netzwerkanalyse und

3.3 Analyse von Signalproteinen im Prostatakarzinom

Graphentheorie der Fakultät für Mathematik der Universität Heidelberg unter der Leitung von Katharina Zweig, die zusammen mit Emoke-Agnes Horvath auf der Grundlage der RPPA-Daten einen speziellen Algorithmus zur Berechnung detaillierter Protein-miRNA-Netzwerke entwickelt hat.

3.3 Analyse von Signalproteinen im Prostatakarzinom

3.3.1 Zusammensetzung und Qualität des Probensets

Die Universitätsklinik in Hamburg-Eppendorf stellte einen Probensatz mit 104 Gewebeproben aus Prostata für die Analyse von tumorrelevanten Signalproteinen zur Verfügung, der sich aufteilte in 51 Tumorproben und 53 Normalgewebeproben von Tumorpatienten. Als weitere Parameter zur Differenzierung der Tumorproben standen der Gleason Score und Analysen des TMPRSS:ERG-Fusionsgens (gemessen von Jan C. Brase, Arbeitsgruppe Holger Sültmann) zur Verfügung (siehe Tabelle 3.4). Die Gewebeproben wurden mit unbekanntem Anteil an Fixiergel (Tissue-Tek[®]) von der Pathologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf auf den Tumoranteil untersucht und als Schnitte vorbereitet.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Parameter der Studienkohorte der Prostatagewebeproben

Charakteristik	Wert	% Anteil
Alter	48,4-73,8 (63,7)	
Gleason Score	3+3	4
	3+4	12
	4+3	22
	4+4	1
	4+5	9
	5+4	3
TMPRSS:ERG	ja	17
	nein	20
	unsicher	14

Nach der Lyse der Tumor- und Normalproben wurde insgesamt eine stark schwankende und vergleichsweise geringe Proteinkonzentration zwischen 1 - 3,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gemessen.

3. ERGEBNISSE

sen. Dabei zeigten die Lysate aus Normalgewebe einen mittleren Proteingehalt von $2,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei einer prozentualen Standardabweichung von 29 % und die Tumorgewebe $2,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit 39 % Standardabweichung. Lysate hoher Proteinkonzentration wurden mit Lysepuffer auf $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt, um homogene Arrays drucken zu können.

3.3.2 Selektion der Antikörper

Für die Validierung der Antikörper mittels Western Blot wurden repräsentative Lysatmischungen von Normal- und Tumorzellen angesetzt. Zusätzlich wurde ein Lysat der Zelllinie PC3 aufgetragen. Für valide Antikörper wurde eine monospezifische Bande in den Gewebeproben vorausgesetzt. Bei sehr starkem spezifischem Signal wurden auch schwache unspezifische Banden toleriert (siehe Abbildung 3.35). In einem zweiten Validierungsschritt wurden die Linearität der Signale sowie die Höhe der Signale im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Erstantikörper (Blankwert) berücksichtigt.

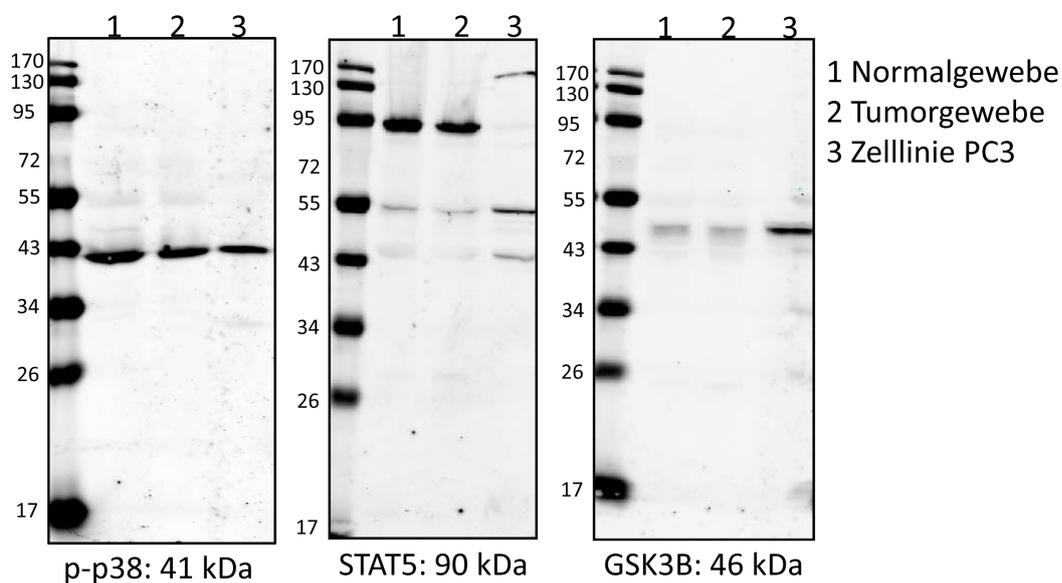


Abbildung 3.35: Western Blots zur Antikörpervalidierung für die Untersuchung von Prostatagewebe: Drei als valide eingestufte Antikörper verdeutlichen das Spektrum der Antikörperqualitäten mit starkem monospezifischem Signal (p-p38), überlegenem spezifischem Signal (STAT5) und schwachem monospezifischem Signal (GSK3B).

3.3.3 Normalisierung der Daten

Nach dem Drucken und Inkubieren der Arrays wurden zunächst die Faktoren errechnet, die zur Normalisierung angewendet werden sollten. Trotz Angleichung der Konzentration zeigte sich hier ein Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe (siehe Abbildung 3.36). Das Fast Green FCF-Signal zeigt für die Tumorproben im Mittel etwa 25 % höhere Werte gegenüber den Normalgewebeproben. Der Median über alle gemessenen Proteine zeigt für die Tumorproben ca. 50 % höhere Werte ebenso wie die Signale der konstitutiv exprimierten Proteine (Housekeeping Proteine). Nach Normalisierung der Antikörpersignale mit dem Proteinfarbstoff Fast Green FCF zeigten 27 von 41 gemessenen Arrays eine signifikante Korrelation der Signale mit der ursprünglich gemessenen Proteinkonzentration (p -Wert $< 0,05$). Nach der Mediannormalisierung wurden für 14 Arrays positive und für neun Arrays negative Korrelationen errechnet, d.h. insgesamt konnte der Einfluss der Ausgangsproteinkonzentration auf die Signalintensität reduziert werden. Für die weitere Analyse der Daten wurde deshalb die Mediannormalisierung herangezogen. Aufgrund der ungeklärten Differenzierung zwischen Tumor- und Normalgewebe wurde auf einen Vergleich der beiden Gruppen verzichtet und nur die Tumorproben weiter analysiert.

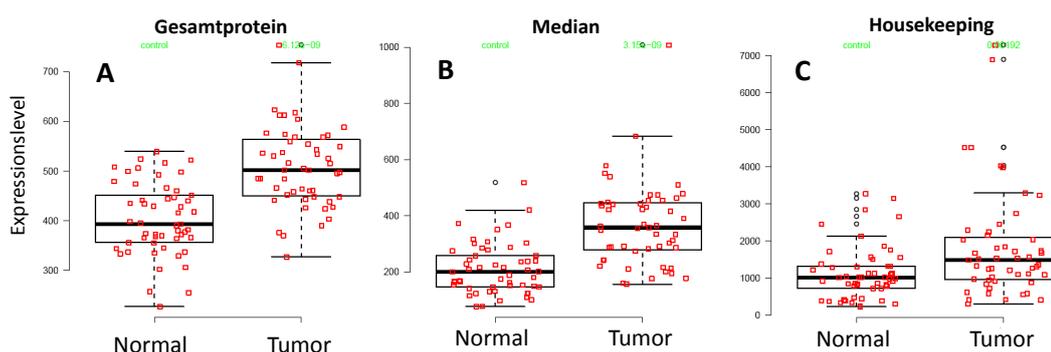


Abbildung 3.36: Vergleich der Signale zwischen Normalgewebe ($n=53$) und Tumorgewebe ($n=51$) für die Proteinfärbung mit Fast Green FCF (A), den Median über alle gemessenen Proteine (B) und den Housekeepingproteinen GAPDH, Actin, V-ATPase und ribosomalem Protein L19 (C).

3. ERGEBNISSE

3.3.4 Korrelation von TMPRSS:ERG-Fusionsgen und Proteinexpression

Von den 51 Tumorproben konnten 17 für das TMPRSS:ERG-Fusionsgen positiv getestet werden. Für 20 Proben wurde bei der PCR-Validierung ein eindeutig negatives Ergebnis erzielt. Für diese beiden Gruppen wurden drei differentiell exprimierte Proteine identifiziert (siehe Abbildung 3.37), denen überwiegend onkogene Eigenschaften zugewiesen werden: PI3Kp110, CDK6 und ERK. Die Expression aller drei Proteine ist in Proben mit Fusionsgen signifikant reduziert, allerdings bleibt eine deutliche Überlappung der Konfidenzintervalle bestehen.

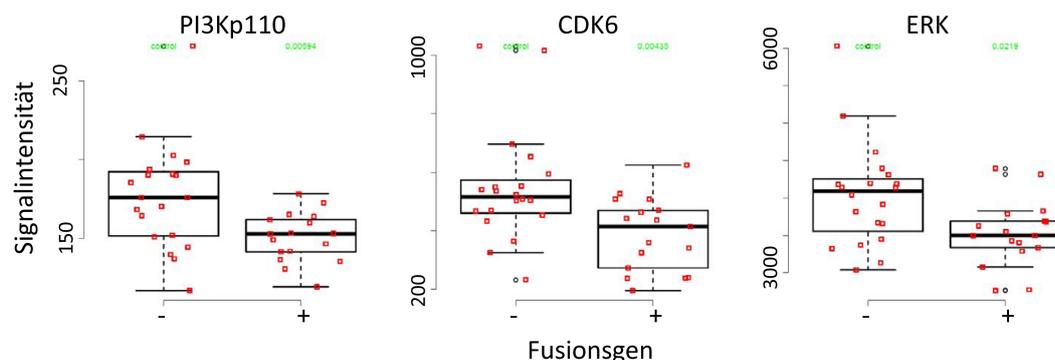


Abbildung 3.37: Drei signifikant (p -Wert $< 0,05$; Wilcoxon-Test) differentiell regulierte Proteine zwischen TMPRSS:ERG-Fusionsgen-positiven ($n=17$) und -negativen ($n=20$) konnten in Prostatatumoren identifiziert werden.

3.3.5 Korrelation von Gleasonwert und Proteinexpression

Zur Identifikation von in Abhängigkeit des Gleasonwertes differentiell regulierter Proteine wurden die Tumorproben nach dem Gleasonwert in zwei Gruppen eingeteilt. Die Aufteilung erfolgte nach Gleasonsummen von über 7 und von kleiner oder gleich 7, wie von Grubb et al. (2009) vorgeschlagen. Die Einteilung von Gleasonwerten in <7 , 7 und >7 wurde ebenfalls publiziert (Saramäki et al., 2008), aber aufgrund von nur vier Werten <7 wurden die niedrigen Gleasonwerte in einer Gruppe ≤ 7 zusammengefasst. Beim Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich der p-p38-Wert als signifikant reduziert bei hohem Gleasonwert (siehe Abbildung 3.38).

3.3 Analyse von Signalproteinen im Prostatakarzinom

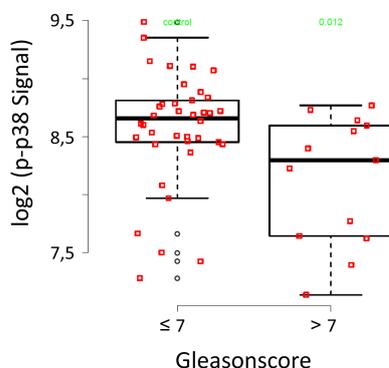


Abbildung 3.38: Aktivierung von p38 ist signifikant reduziert (p-Wert $< 0,05$; Wilcoxon-test) in Proben mit einer Summe des Gleasonwertes von über 7.

3.3.6 Visuelle Datenintegration mit formaler Begriffsanalyse

Der Datensatz der Prostataproben ergab insgesamt drei signifikant differentiell regulierte Proteine (PI3Kp110, CDK6, ERK) für den TMPRSS:ERG-Fusionsgenstatus und ein Protein, das mit dem Gleasonwert korreliert (p-p38). Damit standen sechs Probeneigenschaften mit Potential zur Klassifizierung der Prostataumore zur Verfügung. Über die Integration dieser Probeneigenschaften mittels der Formalen Begriffsanalyse wurde versucht, eine Klassifizierung herauszuarbeiten. Diese Art der Datenanalyse bzw. -visualisierung setzt jedoch die Umwandlung der Daten in einen formalen einwertigen Kontext voraus. Dazu werden die Proben als Objekte definiert und die Proteinsignale, Gleasonwerte und der Fusionsgenstatus als Attribute. Es wurden nur Proben aufgenommen, deren Fusionsgenstatus eindeutig bestimmt werden konnte ($n=37$). Für den einwertigen Kontext wurden die Gleasonwerte wie in Abbildung 3.38 in zwei Gruppen (≤ 7 und > 7) eingeteilt. Die Proteinsignale wurden kategorisiert, indem die Signale in drei Intervalle (33 % Quantile) eingeteilt wurden. In der ersten Analyse wurde ein Protein dann gewertet, wenn es zur Gruppe der 33 % höchsten Signale gehörte (siehe Tabelle 3.5).

Die Umsetzung des formalen Kontextes in ein Diagramm (Hasse-Diagramm) wurde mit der Software Concept Explorer (Yevtushenko, 2000) ausgeführt. Abbildung 3.39 zeigt das Netzwerk mit den 37 Prostataumoren als Objekte (schwarzer unterer Halbkreis in den Knotenpunkten) und den Proteinsignalen und klinischen Parametern als Attribute (blauer oberer Halbkreis in den Knotenpunkten). Leere Knotenpunkte stel-

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3.5: Formaler einwertiger Kontext zur Beschreibung von Analyseergebnissen und klinischen Parametern der Prostatatumore. Die Markierung in den Proteinspalten bezeichnet die Zugehörigkeit der Signale zu den 33 % der höchsten Werte.

Proben	Proteinsignal hoch				Fusionsgen	Gleasonwert	
	CDK6	ERK	PI3Kp110	p-p38		>7	≤7
IGP-116			X	X			X
IGP-26		X				X	
IGP-115					X		X
IGP-33						X	
IGP-29	X						X
IGP-25		X			X	X	
IGP-118			X				X
IGP-32			X			X	
IGP-28	X			X	X		X
IGP-23	X		X				X
IGP-117					X		X
IGP-31	X	X				X	
IGP-21		X	X			X	
IGP-52	X		X	X			X
IGP-47					X		X
IGP-38	X	X				X	
IGP-51	X	X					X
IGP-41		X	X		X		X
IGP-37				X	X		X
IGP-49				X	X		X
IGP-44				X	X		X
IGP-40				X	X		X
IGP-36	X	X	X				X
IGP-48					X		X
IGP-43	X	X		X			X
IGP-35		X	X			X	
IGP-81		X	X				X
IGP-62					X		X
IGP-57	X		X	X			X
IGP-80					X		X
IGP-61	X			X	X		X
IGP-55		X	X	X			X
IGP-64	X			X	X		X
IGP-60					X		X
IGP-110	X						X
IGP-105			X	X	X		X
IGP-83		X					X

3.3 Analyse von Signalproteinen im Prostatakarzinom

len Kombinationen von Attributen dar, die auf keines der Objekte passt. Die Dicke der Kanten und die Größe der Knoten korreliert mit der Anzahl an Attributen bzw. Objekten. Die Attribute sind im oberen Teil des Netzwerkes angeordnet, darunter folgen die Objekte in drei unterschiedlichen Ebenen. Diese Ebenen der Objekte verdeutlichen die unterschiedliche Menge an Attributen, die den einzelnen Objekten zugeordnet sind. In der oberen Ebene sind Objekte zusammengefasst, die ein bis zwei Attribute aufweisen, darunter liegen Objekte mit 2-3 Attributen und zuunterst Objekte mit 3 oder mehr Attributen. Als einzige sich ausschließende Attribute (disjunkte Mengen) wurden hoher Gleasonwert (GS.u für Gleasonscore up) und niedriger Gleasonwert (GS.d für Gleasonscore down) aufgenommen. Die Trennung der Objekte nach dem Gleasonwert lässt sich dem Netzwerk direkt entnehmen. Beim Vergleich der Attribute hoher Gleasonwert und TMPRSS:ERG-Fusionsgen zeigte sich eine deutliche Trennung dieser Gruppen: nur eine fusionsgenpositive Probe hatte auch einen hohen Gleasonwert (siehe Abbildung 3.40 A und D). Dies lässt auf eine Assoziation von Fusionsgen und niedrigem Gleasonwert schließen. Die Kontrolle durch den Vergleich des Gleasonwertes (auf Basis der Zahlenwerte 1-6 für die Gruppen 3+3 - 5+4) mit dem Fusionsgenstatus TMPRSS:ERG ergab einen signifikant niedrigeren Gleasonwert in der fusionsgenpositiven Gruppe (p-Value = 0,002; Wilcoxon Test).

Durch Vergleich der Teilnetzwerke konnten zum einen die Erkenntnisse aus der klassischen Betrachtungsweise der Einzelmerkmale wie in den Abschnitten 3.3.4 und 3.3.5 bestätigt als auch weitere Details der Eigenschaften der Tumorproben entschlüsselt werden. Zudem können die Eigenschaften der individuellen Patientenproben genau nachvollzogen werden. Die Korrelation der Phosphorylierung von p-38 mit dem Gleasonwert aus Abschnitt 3.3.5 wurde durch die absolute Trennung der jeweiligen Teilnetzwerke (siehe Abbildung 3.40A und B) bestätigt. Keine Probe, die der Gruppe der p-p38-hochregulierten angehört, ist auch in der Gruppe mit Gleasonwert >7 vertreten. Das bedeutet, die Gruppe der p-p38-hochregulierten Proben ist eine Teilmenge der Gruppe mit niedrigem Gleasonwert.

Bei der Rekonstruktion der Ergebnisse von Abschnitt 3.3.4 zeigten nur zwei Proben mit TMPRSS:ERG-Fusionsgen gleichzeitig eine hohe Expression von ERK (siehe Abbildung 3.40 C und D). Ähnlich klein zeigten sich die Schnittmengen der Begriffsverbände der CDK6-hochexprimierenden Proben und PI3Kp110-hochexprimierenden Proben mit dem Teilnetzwerk der fusionsgenpositiven Proben.

3. ERGEBNISSE

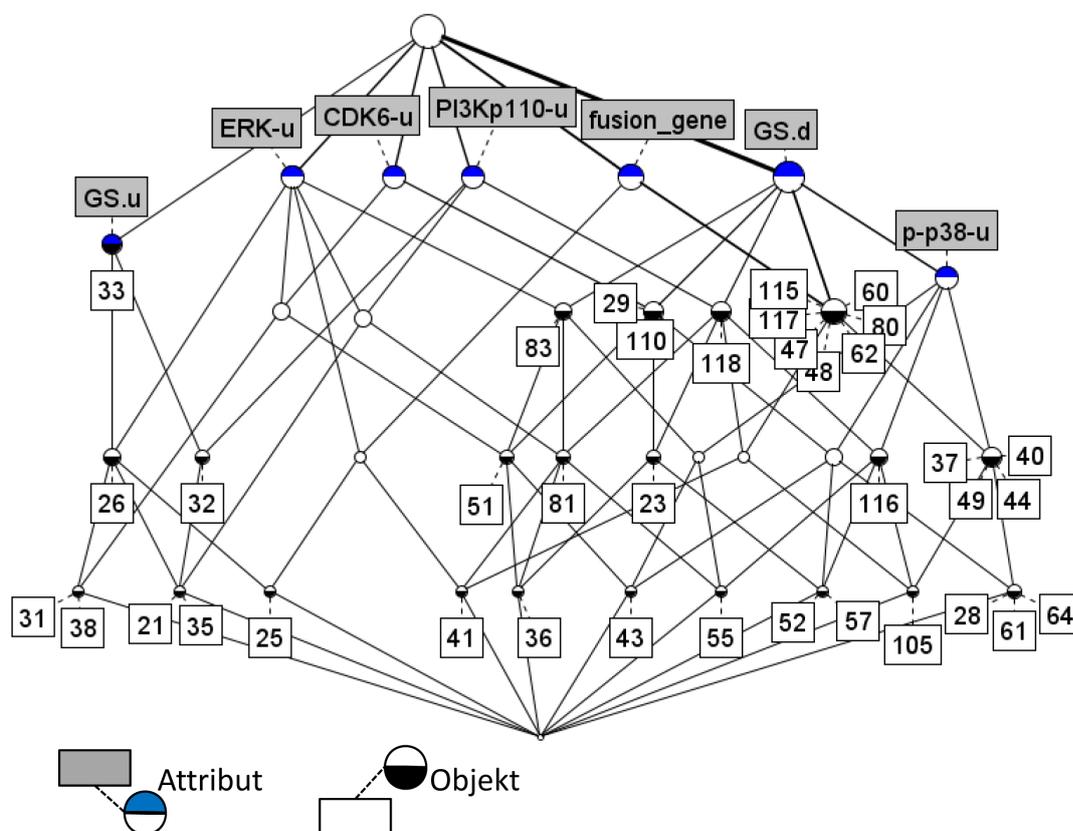


Abbildung 3.39: Hasse-Diagramm zur visuellen Integration der klinischen Daten Tmprss:ERG-Fusionsgen, hoher (GS.u: Gleason up) und niedriger Gleasonwert (GS.d: Gleason down) sowie der Proteinexpression als Attribute der Prostatatumore als Objekte (bezeichnet mit Nummern).

Zusätzlich ließen sich mittels der Hasse-Diagramme der Begriffsverbände auch sehr gut die Proteinexpressionswerte untereinander vergleichen. Die Gruppe der ERK-hoch-exprimierenden Proben überschneidet sich in nur zwei Proben mit der p-p38-hoch-exprimierenden Gruppe was auf eine getrennte Regulierung der beiden Signalwege schließen lässt. Im Vergleich mit der CDK6-Gruppe, hatte die Gruppe mit hoher ERK-Expression eine größere Schnittmenge mit hohem Gleasonwert. Umgekehrt hatten nur zwei Proben mit hohem Gleasonwert gleichzeitig einen hohen CDK6-Gehalt. Auch beim Vergleich der Proteinreduktionen als Gegenprobe (Abbildung 3.41 A) überschneidet sich die Gruppe der p-p38-reduzierten in zwei Proben (IGP-32, IGP-33) mit der ERK-reduzierten Gruppe (Abbildung 3.41 B und E). Genau diese zwei Proben hatten zusätzlich als einzige einen hohen Gleasonwert ohne ERK-Überexpression (Abbildung 3.41 D). Im

3.3 Analyse von Signalproteinen im Prostatakarzinom

Gegenzug waren von zwölf Proben mit reduziertem ERK-Gehalt zehn in der Gruppe mit niedrigem Gleasonwert (Abbildung 3.41 E und C).

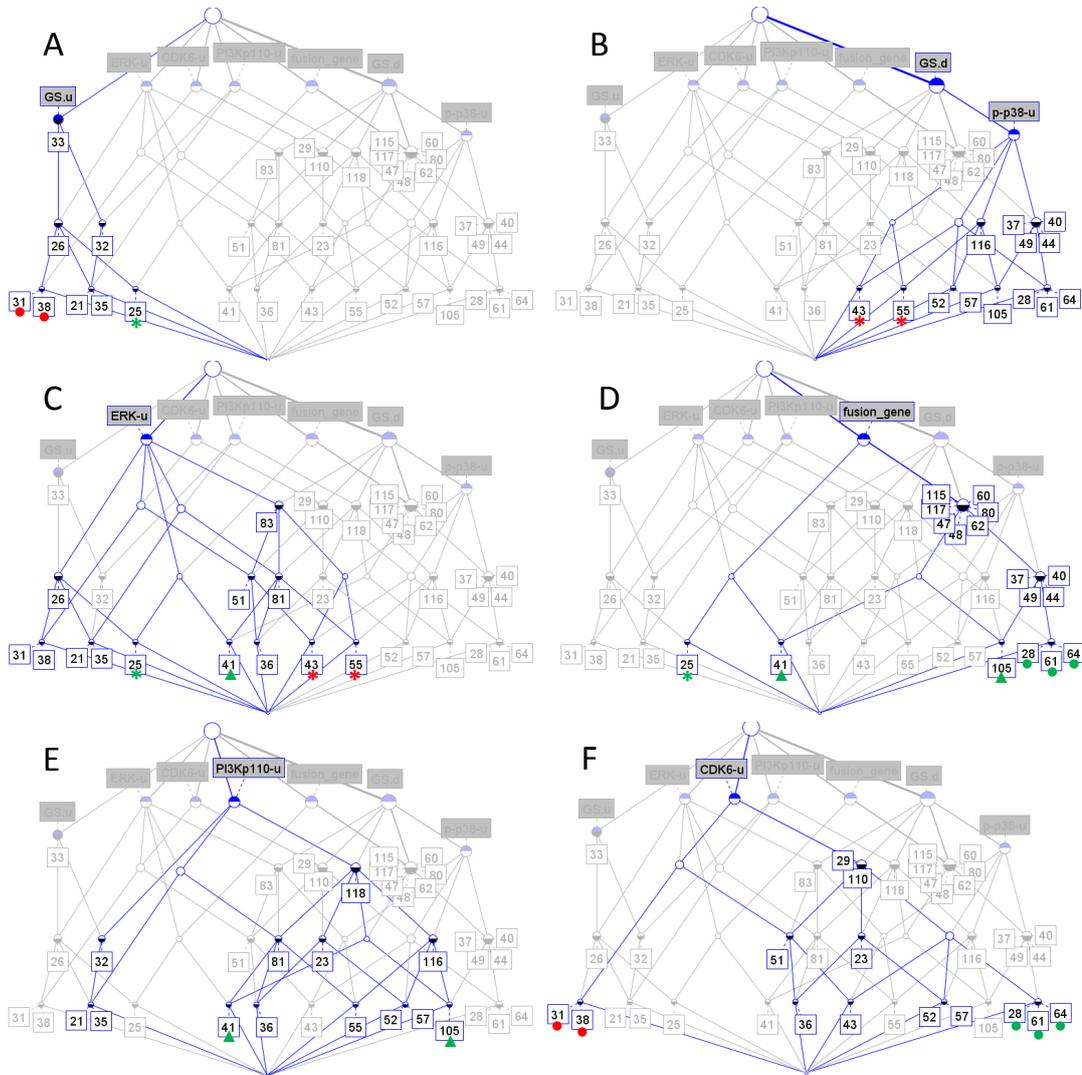


Abbildung 3.40: Selektion von Teilbereichen eines Hasse-Diagramm zur Identifikation von Untergruppen der Prostatakarzinome

Beim Screening von Merkmalen, die mit traditioneller Analyse keine signifikanten Effekte zeigten, konnte mit der Formalen Begriffsanalyse ein weiteres mit dem Gleasonwert verknüpfttes Attribut identifiziert werden. Proben mit niedriger ERK-Aktivierung zeigten sich vollständig als Untergruppe von niedrigem Gleasonwert (siehe Abbildung 3.42 A und B), umgekehrt hatten fünf von acht Proben mit hohem Gleasonwert auch

3. ERGEBNISSE

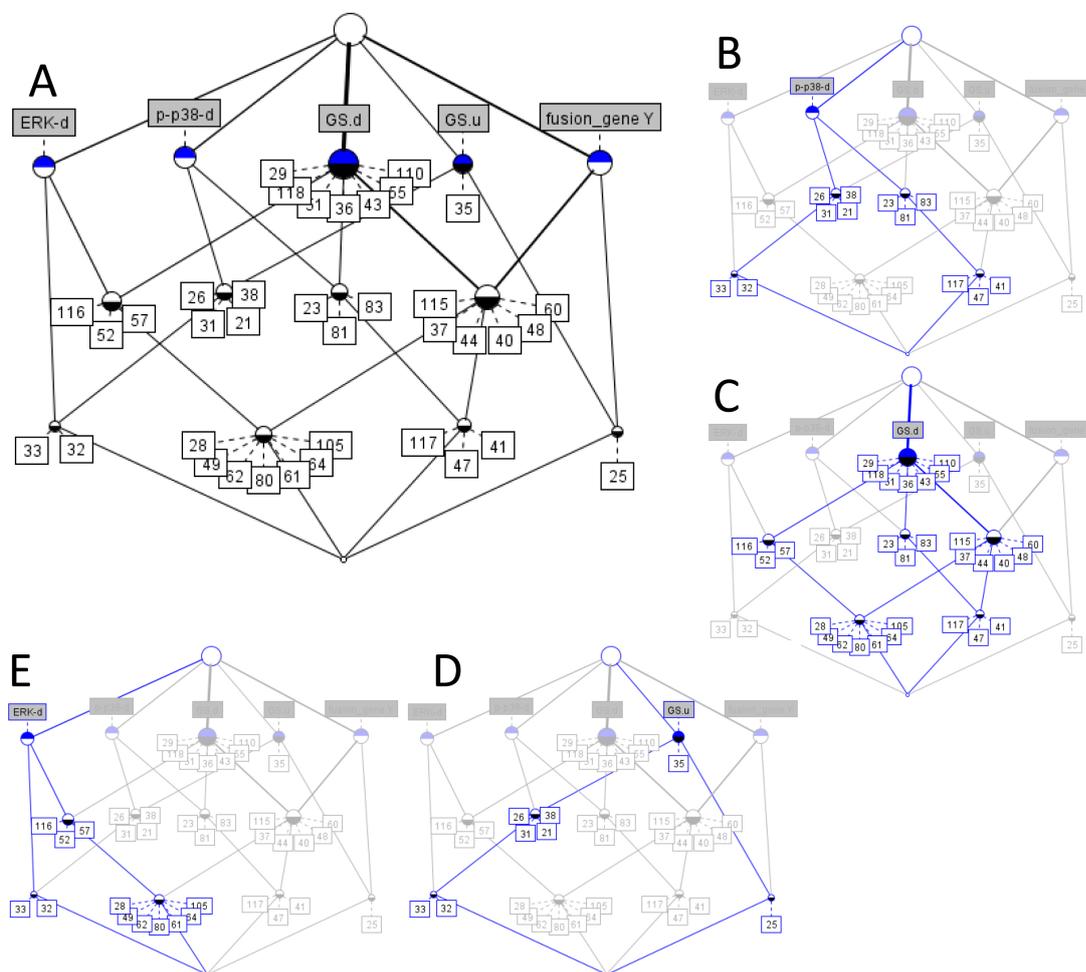


Abbildung 3.41: Hasse-Diagramm zur Gruppierung von Prostatatumoren. Dargestellt ist die Gliederung von 37 Prostatatumoren anhand der Attribute ERK und p-p38 Reduktion, Gleasonwert und Fusionsgenstatus (A) und jeweils hervorgehobenen Untergruppen p-p38 Reduktion (B), niedriger Gleasonwert (C), hoher Gleasonwert (D) und ERK-Reduktion (E).

eine hohe ERK-Aktivierung (siehe Abbildung 3.42 C und D), was zusammen mit den Ergebnissen der ERK-Expression auf eine Trennung der p38- und ERK-Signalwege hinweist.

Die Analyse der RPPA-Ergebnisse aus der Quantifizierung von krebsrelevanten Signalproteinen in einem Set von Prostatatumoren ergab mit traditioneller Analyse drei signifikant mit dem Fusionsgenstatus verknüpfte Proteine. Die Expression von ERK, CDK6 und PI3K p85 wurden in Proben mit Fusionsgen als reduziert gemessen. Die

3.3 Analyse von Signalproteinen im Prostatakarzinom

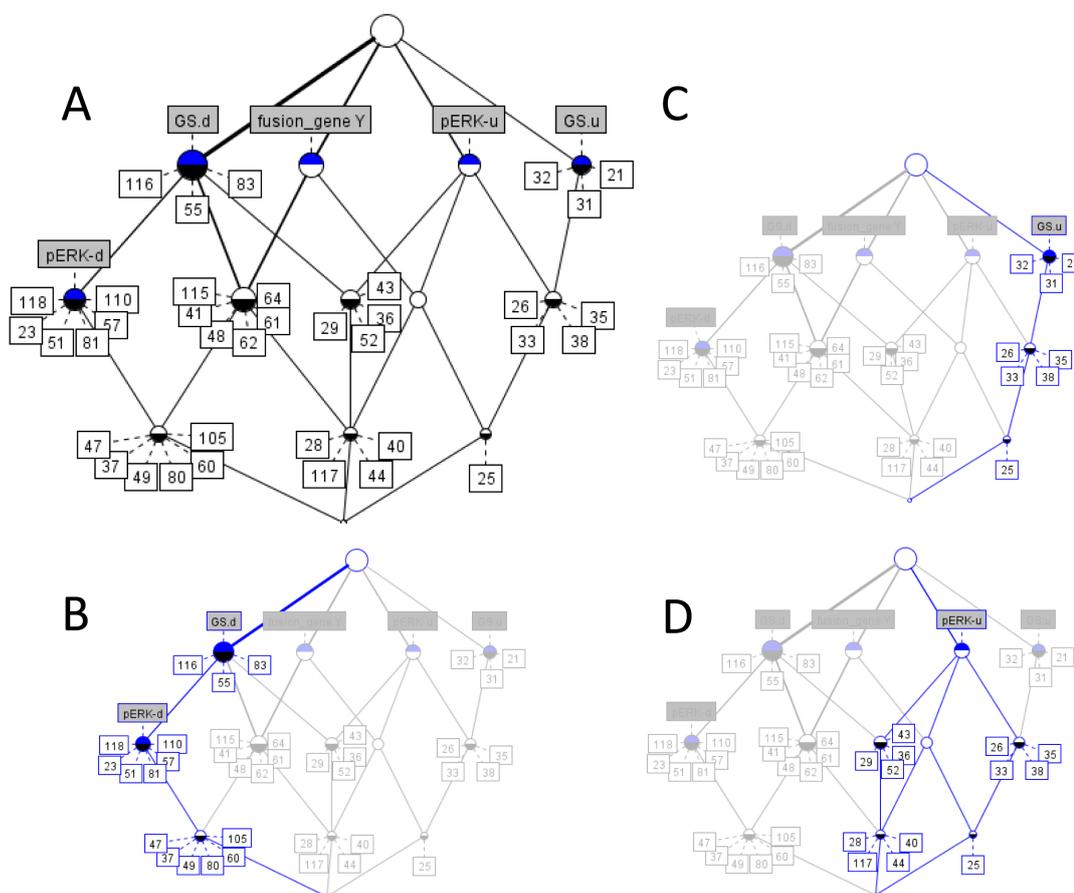


Abbildung 3.42: Hasse-Diagramm zur Gruppierung von Prostata Tumoren in Abhängigkeit von Gleasonwert, Fusionsgenstatus und ERK-Aktivierung (A) mit den jeweils hervorgehobenen Untergruppen pERK-Reduktion (B), hoher Gleasonwert (C) und hoher ERK-Aktivierung (D).

Aktivierung von p38 korrelierte signifikant mit dem Gleasonwert. Durch den Einsatz der Formalen Begriffsanalyse konnten diese Ergebnisse visuell umgesetzt und die gegensätzliche Aktivität der ERK- und p38-Signalwege aufgezeigt werden. Darüberhinaus war es möglich, auch einen Zusammenhang zwischen dem Gleasonwert und dem ERK-Signalweg sowie die Assoziation mit dem TMPRSS:ERG-Fusionsgenstatus herauszuarbeiten.

3.4 Korrelation von Proteinexpressionsmustern und Inhibitorsensitivität

3.4.1 Einteilung von NSCLC-Zelllinien in Sensitivitätsgruppen

Um im Kontext von Lungenkrebs die Proteinexpression mit der Empfindlichkeit gegenüber Therapeutika zu korrelieren, wurden die Proteinprofile von 84 Lungenkarzinomzelllinien untersucht. Diese Zelllinien wurden bereits im Hinblick auf den Zusammenhang von genetischen Aberrationen und der Sensitivität gegenüber Therapeutika/Inhibitoren (Sos et al., 2009) charakterisiert. Mit der RPPA-Technologie konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die signifikant mit der Sensitivität der Zelllinien gegenüber verschiedenen Inhibitoren korrelieren. Die Sensitivität der Zelllinien wurde auf Basis des IC₅₀-Wertes in sensitiv (S), mittel sensitiv (M) und resistent (R) eingeteilt. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Verteilung der IC₅₀-Werte der verschiedenen Wirkstoffe war eine Gruppeneinteilung mit statistischen Algorithmen nicht möglich, daher wurde die Einteilung individuell für jeden Wirkstoff vorgenommen (siehe Abbildung 3.43 sowie Tabelle 3.6). Dabei wurde nach folgenden Gesichtspunkten vorgegangen: Um die Wahrscheinlichkeit, signifikant differentiell regulierte Proteine zu finden, zu erhöhen, wurden die Gruppen sensitiv und resistent im Vergleich zur mittleren Gruppe relativ klein (minimale Anzahl 5 Zelllinien) und nach Möglichkeit gleich groß gehalten. Zusätzlich wurde versucht, die Grenze zwischen zwei Gruppen in die Nähe eines sprunghaften Anstiegs der IC₅₀-Konzentration zu legen. Das bedeutet, dass für Inhibitoren, gegen die sehr viele Zelllinien robust sind (z.B. Erlotinib, Lapatinib), die Gruppe der sensitiven Zelllinien im Vergleich zu den resistenten sehr viel kleiner gewählt wurde. Die wirksame Konzentration der einzelnen Inhibitoren war sehr unterschiedlich, so dass die Konzentration des IC₅₀-Grenzwertes zwischen sensitiv und mittelsensitiven um mehr als zwei Größenordnungen variierte (siehe Tabelle 3.6).

3.4 Korrelation von Proteinexpressionsmustern und Inhibitorsensitivität

Tabelle 3.6: Auflistung der Inhibitoren und deren Zielproteine sowie die Kategorisierungsgrenzen der IC50-Werte

Inhibitor	Zielproteine	IC50 Wert [$\mu\text{g/ml}$]	
		sensitiv \leq	resistent \geq
Erlotinib	EGFR	0.04	10
Vandetanib	EGFR	0.5	10
Lapatinib	EGFR, ERBB2	1	10
PD168393	EGFR	0.5	10
Dasatinib	ABL1, SRC, EGFR	0.1	20
VX 680	AURKA, -B, -C	1	14
UO126	MEK1	8	65

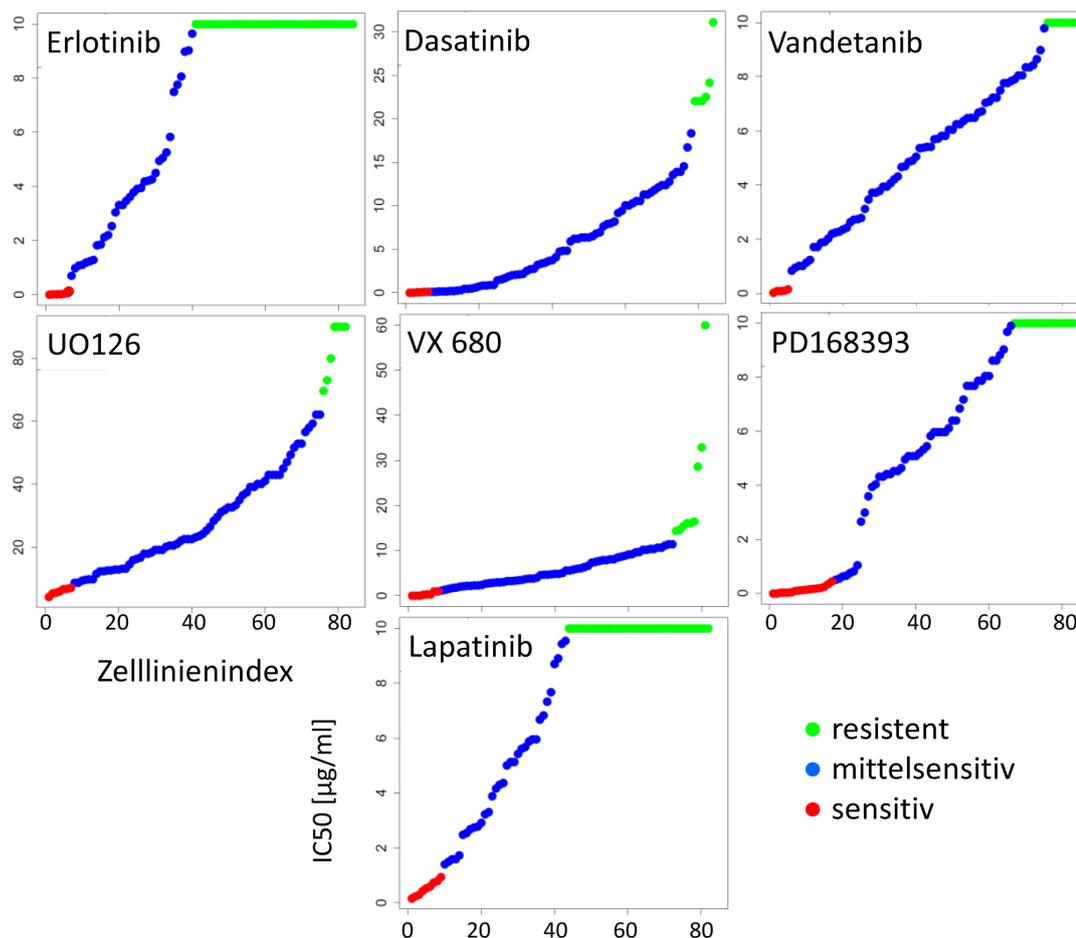


Abbildung 3.43: Kategorisierung der IC50-Sensitivitätswerte von Lungenkarzinomzelllinien für sieben Inhibitoren.

3. ERGEBNISSE

3.4.2 Proteine als Marker für Inhibitor-Sensitivität

Die Gruppe der Zelllinien, die als sensitiv gegenüber EGFR-Inhibitoren bestimmt wurde, zeigte eine erhöhte Aktivierung bzw. Expression des EGFR und ERBB2. Abbildung 3.44 zeigt am Beispiel von Erlotinib, dass fast alle sensitiven Zelllinien eine hohe Aktivierung von EGFR und ERBB2 aufwiesen. Dieser Zusammenhang traf auch für die anderen Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren Lapatinib, Vandetanib, PD168393 und Dacomitinib zu.

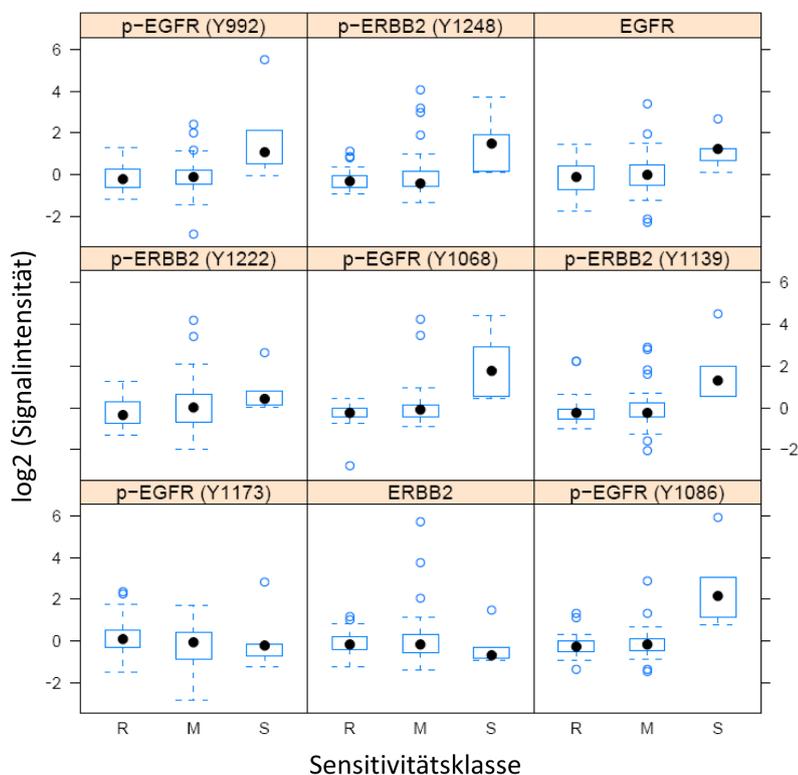


Abbildung 3.44: Differentielle Expression und Aktivierung von EGFR und ERBB2 in Erlotinib-sensitiven Zellen.

Zusätzlich zu den direkten Zielproteinen der EGFR-Inhibitoren konnte eine Reihe weiterer Proteine gefunden werden, welche in sensitiven Zelllinien im Vergleich mit resistenten Zelllinien signifikant reduziert oder überexprimiert waren (p-Wert < 0,05; Wilcoxon Test). Erlotinib-sensitive Zelllinien zeigten reduzierte Level an elementaren Komponenten des AKT-Signalweges sowie GRB2 und SMAD2/3 (siehe Abbildung

3.4 Korrelation von Proteinexpressionsmustern und Inhibitorsensitivität

3.45). Lapatinib ist ein dualer Inhibitor von EGFR und ERBB2, der dadurch den ERK- und AKT-Signalweg inhibiert. Allerdings konnten in Lapatinib-sensitiven Zelllinien keine signifikant deregulierten Proteine des Akt-Signalweges identifiziert werden. Nur die Phosphatase PP2A A, die AKT inhibiert, ist negativ mit Lapatinib-Sensitivität verknüpft. Zusätzlich ist die Expression von GSK3- β , PAK1 und I κ B- α erhöht sowie PLC- γ , CyclinE und Bax reduziert. Die Sensitivität gegenüber dem EGFR-Inhibitor Vandetanib war positiv korreliert mit der Bcl-X und CyclinD1-Expression und zeigte vergleichbar mit Erlotinib negative Korrelation mit Proteinen des AKT-Signalweges wie p27, p70S6K, pAKT, PI3K p85, SMAD2/3 sowie dem Zellzyklusregulator CDK2. Dasatinib inhibiert eine Reihe verschiedener Kinasen, darunter ABL1, SRC und EGFR. Zelllinien, die auf eine Behandlung mit Dasatinib sensitiv reagieren, zeigten einen hohen Phosphorylierungsgrad von STAT3, PAK1 und PLC- γ sowie eine erhöhte GSK3- β Expression bei gleichzeitiger Reduktion von PP2A A und SMAD2/3. Die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor PD168393 ging einher mit elf signifikant differentiell regulierten Proteinen: In sensitiven Zelllinien waren STAT3, MET, Caspase3, CyclinD1, PAK1 und I κ B- α überexprimiert und die Expression von Bax, PP2A A und B, p27 und Xiap reduziert.

Eine Gruppe dem Mek-Inhibitor UO126 gegenüber sensibler Zelllinien zeigte ebenfalls signifikante Proteinstmuster. Das direkte Zielprotein MEK war in der Gruppe UO126-sensibler Zelllinien im Vergleich zu den Resistenten stärker exprimiert. Dies stellte die sogenannte Positivkontrolle dar, vergleichbar mit der Überexpression von EGFR in EGFR-Inhibitor-sensitiven Zelllinien (siehe Abbildung 3.46). Desweiteren wurden hohe Level an p-ERBB2, p-ERK, PCNA und Nf κ B p65 in der Gruppe UO126-resistenter Zelllinien gemessen, was diesen eine Rolle als Resistenzfaktoren zuweist.

Für den Aurorakinaseinhibitor VX680 konnte mangels spezifischer Antikörper keine Positivkontrolle gemessen werden. Dennoch wurden Proteine identifiziert, die signifikant mit der Sensitivität gegenüber VX680 korreliert sind. VX680-resistente Zelllinien zeigten eine Reduktion von RB1, CDK2, PI3K p85, p-AKT und p-EGFR sowie Überexpression von CyclinD1. Zusammenfassend konnten für alle sieben Inhibitoren, zusätzlich zu den direkten Zielproteinen der Wirkstoffe, Proteine identifiziert werden, die mit der Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber den spezifischen Wirkstoffen korreliert sind. Diese Proteine könnten nach einer weiteren Validierung eventuell als Marker dienen, um Resistenzen vorauszusagen und die passende Therapie zu wählen.

3. ERGEBNISSE

Proteine zur Vorhersage des Ansprechverhaltens	EGFR spezifische Therapeutika					Protein in sensitiven Zelllinien
	Erlotinib	Lapatinib	Vandetanib	Dasatinib	PD168393	
GSK3B	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	
PAK1	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	
IκBa	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	
Bcl-X	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	ohne Effekt	
CyclinD1	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	überexprimiert	
Caspase 3	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	
MET	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	
STAT3	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	
pSTAT3 (S727)	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	
pPAK1	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	
pPLCγ (Y783)	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	überexprimiert	ohne Effekt	
PLCγ	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	
CyclinE	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	
CDK2	ohne Effekt	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	
Bax	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	reduziert	
PP2A A	reduziert	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	reduziert	
PP2A B	reduziert	ohne Effekt	reduziert	reduziert	reduziert	
p70S6K	reduziert	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	
PI3K p85	reduziert	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	
p27	reduziert	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	reduziert	
pAKT (S473)	reduziert	ohne Effekt	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	
SMAD2/3	reduziert	ohne Effekt	reduziert	reduziert	ohne Effekt	
GRB2	reduziert	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	
Xiap	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	ohne Effekt	reduziert	

Abbildung 3.45: Proteine mit Potential zur Vorhersage des Ansprechverhaltens gegenüber EGFR-Inhibitoren

3.4 Korrelation von Proteinexpressionsmustern und Inhibitorsensitivität

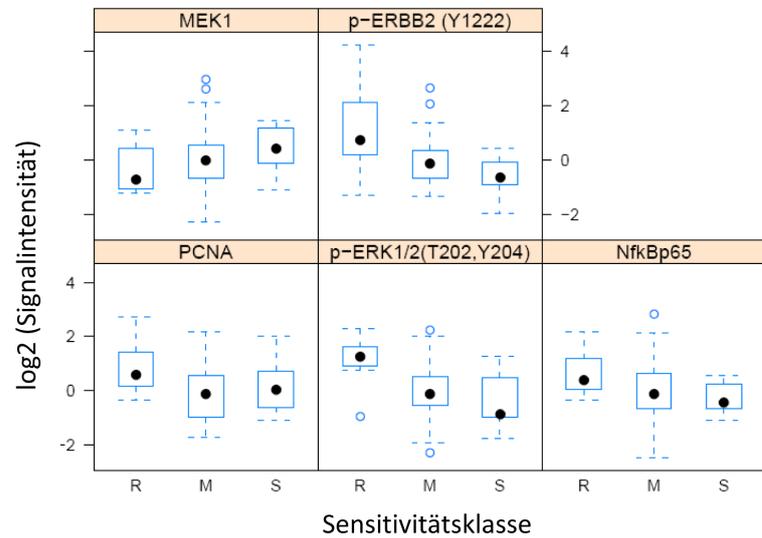


Abbildung 3.46: Expression von Signalproteinen in Zelllinien unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Mek-Inhibitor UO126

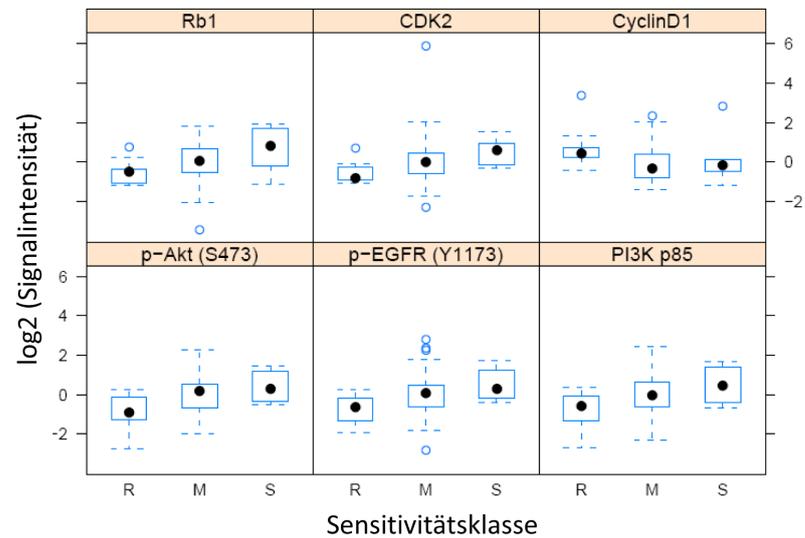


Abbildung 3.47: Expression von Signalproteinen in Zelllinien unterschiedlicher Sensitivität gegenüber AURKA/B/C-Inhibitor VX680

3. ERGEBNISSE

4

Diskussion

4.1 Optimierung der RPPA-Technologie

4.1.1 Validierung von Antikörpern

Antikörper sind das zentrale Werkzeug zur spezifischen Detektion von Proteinen in Immunoassays. Fast alle Protokolle nutzen die spezifische Bindung von Antikörpern an ihr Zielprotein und bestimmen damit maßgeblich die Qualität und Robustheit der Assays. Im Besonderen hängt die Datenqualität der Reverse Phase Protein Mikroarrays von der Spezifität der Antikörper ab (Nishizuka and Spurrier, 2008). Im Gegensatz zu RPPAs haben viele Immunoassays noch eine Möglichkeit, geringfügige unspezifische Bindungen zu kompensieren. Western Blots bieten durch die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht die Möglichkeit, unspezifische Bindungen zu identifizieren und von der Analyse auszuschließen. Bei dem Einsatz von Antikörpern zur Anfärbung von Gewebeschnitten können unter Umständen über die erwartete Lokalisierung des Zielproteins unspezifische Bindungen bestimmt werden. Durch den parallelen Einsatz von zwei Antikörpern in ELISAs und Mikrosport-Immunoassays (MIAs) können leichte Unspezifitäten der einzelnen Antikörper kompensiert werden. In den RPPAs wird ein Signal auf einem Punkt erzeugt, so dass sich Signale der spezifischen und unspezifischen Bindungen untrennbar überlagern.

Zur Validierung von Antikörpern für Anwendungen der Immun-Histochemie wurden bereits Studien veröffentlicht und auf die Notwendigkeit der Validierung zum Einsatz in der klinischen Routine hingewiesen (Pozner-Moulis et al., 2007; Bordeaux et al., 2010).

4. DISKUSSION

Stand der Technik zur Validierung von Antikörpern für RPPA ist ein Test der Spezifität mittels Western Blot. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Validierung von Antikörpern ausschließlich mit Western Blot für RPPAs nicht ausreichend zuverlässig ist. Die Kombination aus einer Vorauswahl von Antikörpern anhand der Western Blot Ergebnisse, ergänzt um eine RNAi-basierte Validierung auf RPPAs im speziellen zellulären Kontext, verspricht eine deutliche Steigerung der Datenqualität.

Alle Antikörper, die im Rahmen dieser Studie getestet wurden, sind kommerziell erhältlich und wurden von verschiedenen Firmen bezogen. Alle Antikörper zur Detektion von EGFR und STAT3 erkannten das entsprechende Zielprotein im Western Blot. Die anschließende Quantifizierung der Reduktion des Zielproteins nach siRNA-Transfektion mittels RPPA offenbarte aber deutliche Unterschiede. Eine Verminderung konnte zwar fast immer gemessen werden, jedoch in sehr unterschiedlicher Höhe, was sich direkt auf die Datenqualität auswirkte. Je größer der gemessene Abstand der Proteinexpression zwischen Kontroll- und Knockdownprobe ist, desto genauer kann zwischen Proben ähnlichen Proteingehalts aufgelöst werden.

Die zehn Antikörper zum Nachweis von STAT3 detektierten die Reduktion nach siRNA-Transfektion mit 32-86 % auf RPPA. Nur ein monoklonaler Antikörper lieferte trotz monospezifischer Bande im Western Blot keine verwertbaren Signale auf RPPA. Da monoklonale Antikörper nur ein einzelnes Epitop erkennen, ist die Detektion in hohem Maße abhängig von dessen Zugänglichkeit, was unter den nativen Bedingungen des RPPA offensichtlich nicht möglich war. Das bedeutet auch, dass ein Antikörper der auf Western Blot Monospezifität zeigt, nicht zwangsläufig ebenso gut auf RPPA funktioniert. Beispielsweise zeigte ein im Western Blot monospezifischer STAT3-Antikörper geringere Knockdown-Quantifizierung auf RPPA als ein Antikörper mit zusätzlichen Banden im Western Blot. Die spezifische Reduktion von Zielproteinen und anschließende Quantifizierung mit der RPPA-Technologie erwies sich als verlässliche Methode zur Charakterisierung von Antikörpern zum Einsatz auf RPPA.

Antikörper, die im Western Blot mehrere Banden zeigen, sind nicht zwangsläufig unspezifisch, da durch posttranslationale Modifikationen das Molekulargewicht verändert werden kann. Das bedeutet, dass ein spezifischer Antikörper unter Umständen verworfen wird, wenn mit Western Blot die Spezifität nicht eindeutig zugeordnet werden kann.

Die Eigenschaft der RPPA-Technologie, dass die experimentellen Proben direkt auf einem Träger immobilisiert werden, hat seit der Einführung durch Paweletz et al. (2001) eine Kommerzialisierung weitgehend verhindert. Die Zeptosens-Plattform ist bis jetzt das einzige käufliche RPPA-Komplettpaket (Pawlak et al., 2002; Weissenstein et al., 2006). Sie ist allerdings beschränkt auf etwa 200 Einzelpunkte pro Array und hat sich bis jetzt in der wissenschaftlichen Forschung nicht durchgesetzt. Die einzelnen Institute und Arbeitsgruppen haben jeweils individuelle Kombinationen aus Arrayproduktion und Detektion entsprechend ihren Ansprüchen entwickelt. In unserem Labor hat sich die Kombination des Druckens nativer Proteine und Detektion mit markierten Antikörpern im nahen Infrarotbereich (NIR) als sehr effektiv gezeigt (Loebke et al., 2007). Tibes und Kollegen drucken denaturierte Proteine, verwenden eine enzymatische Signalamplifikation und lesen die Arrays im sichtbaren Bereich aus (Tibes et al., 2006). Ein weiteres System löst die Proteine aus formalinfixierten Gewebeschnitten und detektiert mit ECL (enhanced chemiluminescence) (Berg et al., 2010) und viele weitere Kombinationen sind denkbar. Diese experimentelle Diversität der RPPA-Technologie erfordert die individuelle Validierung der Antikörper für das entsprechende Protokoll im speziellen biologischen Kontext. Die hier vorgestellte Methode lässt sich auf die individuellen experimentellen Bedingungen anpassen und sogar auf alternative Detektionsmoleküle, wie z.B. Darpins (Stumpp and Amstutz, 2007) oder Aptamere (Laurenson et al., 2010), erweitern.

Als Alternative Antikörpervalidierung ist die Quantifizierung von rekombinantem Protein, das in einer bestimmten Konzentration zu einer Probe zugegeben wurde, denkbar. In diesem Falle kann sich jedoch das endogene Protein der Probe in Sequenz, posttranslationaler Modifikation und Faltung vom rekombinanten Protein unterscheiden, was zu unterschiedlicher Bindungsaffinität führt. Da außerdem die Limitation der RPPA-Technologie eher das Detektionslimit als die Sättigungsgrenze ist, können mit der Verminderung des Zielproteins die Grenzen des Möglichen besser ausgelotet werden als mit einer Zugabe.

Die isoformspezifische Detektion von Proteinen innerhalb von Signalnetzwerken ist unerlässlich für die eindeutige Identifikation des individuellen Beitrags der einzelnen Isoformen zur Signalweiterleitung. Da Proteinisoformen meist sehr homologe Aminosäuresequenzen aufweisen, ist die Spezifität der einzusetzenden Antikörper dabei von höchster Bedeutung. Die hier vorgestellte Methode hat das Potential, Zielproteine

4. DISKUSSION

isoformspezifisch zu quantifizieren und damit die RPPA-Technologie als Werkzeug der Systembiologie zu validieren. Deshalb eröffnet diese Methode neue Möglichkeiten in der Erforschung des Proteoms.

Die hier vorgestellte Methode ist zugeschnitten auf die Validierung von Antikörpern für Forschungszwecke. Die Antikörper sollten für jeden experimentellen Kontext neu validiert werden. Der Einsatz von RPPA in der klinischen Routine würde eine weitaus detailliertere Validierung erfordern (Speer et al., 2007; Wulfkuhle et al., 2008). Vor allem in Hinblick auf die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen zwischen unterschiedlichen Produktionschargen von Antikörpern wären weitere Tests notwendig (Kricka and Master, 2008).

4.1.2 Signalamplifikation auf RPPA

Die RPPA-Technologie ist für die spezifische Detektion einzelner Proteine in einer komplexen Proteinmatrix entwickelt worden. Das Ziel ist, bereits geringste Mengen des Zielproteins in einer komplexen Proteinmatrix zu quantifizieren. Die Limitation der Technologie bildet daher das Detektionslimit und die Sensitivität (siehe auch Abschnitt 4.1.1). Um die Detektionsgrenze weiter nach unten zu verschieben, wurde eine Signalamplifikation entwickelt, die auf den Einsatz von Enzymen verzichtet und die damit verbundenen Nachteile vermeidet. Wir konnten zeigen, dass die Methode der aufeinanderfolgenden Inkubation gegeneinander gerichteter Zweitantikörper das Detektionslimit signifikant absenkt und damit die Sensitivität der Standardmethode verbessert. Verschiedene Arten von Signalamplifikation für RPPA-Signale wurden bereits entwickelt. Farbmetrische (Paweletz et al., 2001), Chemilumineszenz (Berg et al., 2010), Fluoreszenz (Calvert et al., 2004; Dupuy et al., 2009), lineare Lichtwellenleiter (Pawlak et al., 2002) und Rolling Circle Amplifikation (Schweitzer et al., 2000) wurden bereits erfolgreich auf Proteinarrays eingesetzt. Die Thyramid-Signalamplifikation (TSA) mit farbmetrischem Signal im sichtbaren Bereich ist eine der meist eingesetzten Technologien, um die Sensitivität von RPPAs zu steigern (Paweletz et al., 2001; Wulfkuhle et al., 2003; Nishizuka et al., 2003; Ramalingam et al., 2007). TSA basiert auf der katalytischen Ablagerung von Thyramid in unmittelbarer Nähe des sekundären Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Antikörpers (Bobrow et al., 1989; Hunyady et al., 1996). Die typische enzymatische Reaktion bewirkt erwartungsgemäß Sättigungseffekte des Signals (Ramaswamy et al., 2005), was eine sigmoide Kurve der Signale serieller Verdünnungsreihen

widerspiegelt (Hu et al., 2007). Dieser sigmoide Verlauf der Signale in Abhängigkeit der Konzentration erfordert das Drucken aller Proben als serielle Verdünnung, was sich negativ auf die Kapazität der Arrays auswirkt. Die antikörpervermittelte Signalamplifikation zeigte, vergleichbar zur Standard NIR-Detektion, einen sehr großen linearen Bereich. Zusätzlich wurde für TSA eine oft unzureichende Spezifität festgestellt (Ambroz et al., 2008), was vor allem auf die Verwendung von Biotin als Bindungsvermittler zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass die spezifische Analyse von Proteinen in Lysaten mit einem hohen Anteil an biotinylierten Proteinen unmöglich wird. In unseren Händen konnte auch ein spezielles Blockprotokoll diese prinzipielle Unspezifität nicht verhindern. Die antikörperbasierte Signalamplifikation dagegen verstärkt keine unspezifischen Signale. Dies konnte auch durch den Zusatz von humanem Immunglobulin nicht erzwungen werden.

4.1.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung von RPPA-Signalen beinhaltet, aus mehreren Replikatpunkten oder seriellen Verdünnungsreihen einer Probe einen Wert zu errechnen. Dieser Wert hat zunächst keine Einheit, sondern basiert auf den geräteabhängigen Signaleinheiten, die von der Bildanalysesoftware (z.B. GenePix, Micovigene) ausgelesen werden. Sie ist dazu geeignet, die Proben eines Arrays untereinander zu vergleichen. Die Wahl der Quantifizierungsmethode ist in hohem Maße abhängig von der verwendeten Detektionsmethode und dem experimentellen Design der Arrays. Detektionsmethoden, die Signalsättigung erwarten lassen, machen es erforderlich, von jeder Probe eine Verdünnungsreihe herzustellen und diese im Replikat zu drucken. Das Drucken jeder einzelnen Probe als Verdünnungsreihe, als Basis für die mathematischen Modelle, erfordert aber ein größeres Probenvolumen, verursacht erhöhten Laboraufwand und verbraucht Platz auf den Arrays, was den Probendurchsatz um mindestens den Faktor fünf verringert. Aus diesen Verdünnungsreihen kann über ein mathematisches Modell ein Konzentrationswert ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden speziell für RPPA zwei mathematische Modelle entwickelt (Hu et al., 2007; Zhang et al., 2009). Der SuperCurve-Algorithmus Coombes et al. (2009), der auf dem nichtparametrischen Modell von Hu et al. (2007) basiert, wurde bereits vielfach erfolgreich eingesetzt (Carey et al., 2010; Iadevaia et al., 2010). Dennoch sind mathematische Modelle immer nur Versuche, ein möglichst realistisches Bild des jeweiligen biologischen oder biochemischen Kontextes wiederzugeben.

4. DISKUSSION

Ein gewisser Fehler durch das Modell bleibt immer zurück. Die Größe dieses Fehlers schwankt somit in Abhängigkeit des Assayprotokolls, was für Anwender des Algorithmus nur schwer nachvollziehbar ist. Bei der Vielzahl an möglichen Kombinationen für die Signalgeneration auf RPPAs (Spurrier et al., 2008) wird die Wahrscheinlichkeit, dass der Algorithmus nicht für alle gleich effektiv arbeitet, relativ hoch. Bei Detektionsmethoden, die über einen großen Konzentrationsbereich linear sind, ist es ausreichend, eine Probe anhand des Median von Replikatpunkten zu quantifizieren. Somit können die beschriebenen Nachteile vermieden werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Signale der RPPA über fluoreszenzmarkierte Antikörper bei Anwendung verschiedener Druckernadeln, bei nativen und denaturierten Proben für alle eingesetzten Antikörper im linearen Bereich liegen. Dadurch lassen sich valide Daten ohne serielle Verdünnung der Proben generieren.

4.1.4 Normalisierung

Die Normalisierung von RPPA-Daten soll die Vergleichbarkeit der Proben eines Arrays sichern. Als Basis für die Normalisierung dient in erster Linie der Gesamtproteingehalt der Proben. Die verschiedenen Normalisierungsverfahren unterscheiden sich im wesentlichen in der Ermittlung dieses Gesamtproteingehaltes. Der Einsatz von Proteinfarbstoffen wie Fast Green FCF (Loebke et al., 2007), Supro Ruby (Wulfkuhle et al., 2008; Espina et al., 2010) oder kolloidalem Gold (Spurrier et al., 2008) zur Anfärbung der Proteine sind dabei die am häufigsten eingesetzten Methoden. Die Vorteile des Einsatzes von Proteinfarbstoffen sind die weitgehende Unabhängigkeit von der Art der Probe und den funktionellen Eigenschaften der Proteine sowie eine gute Reproduzierbarkeit. Der Nachteil ist der etwas kleinere lineare Signalbereich, vor allem die Anfärbung mit kolloidalem Gold erreicht relativ schnell die Sättigungsgrenze. Proteinfarbstoffe können außerdem nicht zusammen mit den spezifischen Antikörpern auf demselben Array verwendet werden, da diese die Epitope der Zielproteine verändern und damit die Detektion durch Antikörper beeinflussen. Der Einsatz der Farbstoffe nach der Detektion der Zielproteine ist ebenfalls unmöglich, da Farbstoffe nicht zwischen Zielprotein und Blockreagenz unterscheiden und somit auch die Arrayoberfläche anfärben würden. Zur Normalisierung müssen also zusätzliche Arrays angefärbt werden, die parallel gedruckt wurden.

Eine Alternative liegt in der Normalisierung über die mittlere Proteinexpression aller gemessenen Proteine. Sie ist eine stabile Methode (Carey et al., 2010) und hat sich auch in dieser Arbeit als sehr leistungsfähig erwiesen. Der lineare Bereich ist sehr groß, da die spezifischen Antikörper als Grundlage der Signale dienen (vgl. Abschnitt 4.1.3). Der Nachteil dieser Methode ist die Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Probensets, wie auch der Anzahl und der Auswahl an detektierten Proteinen. Sollen beispielsweise der zeitliche Verlauf der Aktivierung von Signaltransduktionsproteinen nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren gemessen werden (sog. Time Courses), wird ein bestimmtes zeitliches Aktivierungsmuster erwartet. In Proben, die zum zeitlichen Höhepunkt der Aktivierung gehören, wird demnach vermehrte Phosphorylierung von Signalproteinen gemessen. Im Mittel wären die Signale in diesen Proben folglich höher und damit auch der Normalisierungsfaktor. Die Normalisierung würde also den biologischen Effekt der Aktivierung reduzieren. Ebenso würde eine solche Normalisierung die Trennung von Lysaten aus Normal- und Tumorgewebe bei überwiegender Detektion von onkogenen Proteinen verwischen. Für Experimente, in denen mehr als 25 Proteine in homogenen Proben gemessen werden und sich die erwarteten Effekte nicht addieren, ist diese Normalisierung allerdings sehr gut geeignet.

Eine weitere Möglichkeit zur Normalisierung der Proteingehalte bietet die Detektion von konstitutiv exprimierten Proteinen (sogenannte Housekeeper). Diese Normalisierung ist das Standardverfahren für quantitative Western Blots und kann auf RPPA übertragen werden. Die Herausforderung lag darin, eine Mischung von Antikörpern zu finden, die Proteine detektieren, welche von den experimentellen Parametern unbeeinflusst bleiben. Der Vorteil ist, dass das Zielproteinsignal auf demselben Punkt gemessen werden kann wie das Normalisierungssignal. Daher können nahezu alle Fehler, welche die Proteinkonzentration beeinflussen, ausgeglichen werden. Problematisch ist mitunter die Analyse von hochexprimierten Proteinen wie ERK, da sich Zielprotein- und Housekeeping-Antikörper sterisch behindern. Dies kann zu Varianzen des Normalisierungsfaktors führen, der wiederum beim Verrechnen das Zielproteinsignal verfälscht.

Welche Normalisierungsmethode für einen bestimmten Versuchsaufbau die geeignetste ist, muss jeweils individuell entschieden werden. Als Parameter zur Auswahl der optimalen Methode kann die Normalisierung von Verdünnungsreihen herangezogen werden. Nach einer Normalisierung sollten die Signale der unterschiedlichen Konzentrationen in einem möglichst kleinen Bereich liegen. Bei der Detektion von Signalproteinen

4. DISKUSSION

mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern hat sich die Normalisierung über den mittleren Proteinexpressionswert als sehr effektiv erwiesen. Falls die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Verwendung dieser Methode nicht gegeben sind, erbringt auch die Normalisierung mit Fast Green FCF gute Ergebnisse.

Die RPPA-Technologie konnte im Rahmen dieser Arbeit in vielen Aspekten verbessert werden. Durch die schlüssige Validierung der Antikörper und dem Einsatz einer leistungsfähigen Normalisierungsmethode können überzeugende Daten produziert werden. Durch den großen linearen Signalebereich unserer Methode kann durch Verzicht auf serielle Verdünnung der Proben die Arrayfläche optimal genutzt und die Kapazität der RPPAs durch den kombinierten Einsatz leistungsfähigerer Drucker und automatischer Inkubation deutlich verbessert werden. Das Potential der RPPA-Technologie als Hochdurchsatzmethode konnte anschließend bei der Analyse von 25 Signalproteinen in 810 miRNA-Transfektionen gezeigt werden.

4.2 Analyse von RPPA-Daten

Die Analysemethoden und Algorithmen, die für die Analyse von DNA-Mikroarraydaten entwickelt wurden (zum Beispiel aus dem limma-Paket), lassen sich nur bedingt zur Analyse von Proteinarraydaten einsetzen. In der Arbeit von Sboner et al. (2009) wurde bereits auf diese Problematik hingewiesen. Dieser Umstand entsteht durch Unterschiede in der Datenstruktur von DNA- und Proteinmikroarrays, die sich zum einen aus der Biochemie der Bindungen zwischen den Reaktionspartnern als auch aus dem Umfang der Zahlenwerte pro Datensatz entwickeln. Die Bindung zwischen den immobilisierten Oligonukleotiden und den Hybridisierungs sonden lässt sich aufgrund der komplementären Basenpaarung sehr gut berechnen und kontrollieren. Dagegen ist die Bindung zwischen Epitop des Zielproteins und Paratop des detektierenden Antikörpers multifaktoriell bedingt und damit stark abhängig von den Reaktionsbedingungen. Daraus entstehen Signalunterschiede zwischen den Arrays von bis zu zwei Größenordnungen, die man bei DNA-Mikroarrays in dieser Höhe nicht erwartet. Zudem ergeben sich bei DNA-Mikroarrayexperimenten in der Regel mindestens um den Faktor 10^3 mehr Expressionswerte für eine Probe als bei RPPAs. Algorithmen, die zur Analyse von DNA-Mikroarraydaten entwickelt wurden, basieren daher auf einer völlig anderen Zahlenstruktur.

4.3 Proteinexpression als Marker für Therapieresistenz

Auch die Fragestellung unterscheidet grundlegend zwischen DNA- und Proteinarrays. Das Ziel der Analyse von DNA-Mikroarraydaten ist in der Regel das Herausfiltern von signifikant differentiell regulierten Genen aus großen Datensätzen. Proteinarrayexperimente werden jedoch meist so geplant, dass nur für die Fragestellung potentiell relevante Proteine analysiert werden (educated guess), die dann demzufolge bei der Auswertung alle berücksichtigt werden. Algorithmen zum Herausfiltern von signifikant differentiell regulierten Proteinen werden daher nur selten benötigt.

Innerhalb eines Gesamtexperimentes werden zur Beantwortung spezifischer Fragestellungen häufig eine Vielzahl an Proteinarrayexperimenten nacheinander durchgeführt. Arrays für die Charakterisierung der DNA bzw. RNA in biologischen und klinischen Proben sind zwar etablierte Systeme, werden aber im Rahmen eines Gesamtexperimentes, nicht zuletzt wegen des relativ hohen Preises, eher für initiale Screenings eingesetzt. Der alltägliche Einsatz der Proteinarrays macht ein flexibles und übersichtliches Auswerteprogramm notwendig. Diese Anforderungen wurden umgesetzt im R-Paket RPPanalyzer (Mannsperger et al., 2010), das die grundlegenden Funktionen wie Einlesen, Normalisieren und Visualisieren zur Verfügung stellt und sich im täglichen Gebrauch bewährt hat. Da die Entwicklung einer Software jedoch nie als komplett abgeschlossen betrachtet werden kann, wird auch dieses Paket verbessert und erweitert werden müssen.

4.3 Proteinexpression als Marker für Therapieresistenz

Wie in allen Krebsarten sind auch bei der Entstehung und Weiterentwicklung von Lungenkrebs eine Vielzahl von Signaltransduktionsmechanismen, die multiple zelluläre Prozesse steuern, dereguliert (Sanders and Albitar, 2010). Auf diesem Wissen basierend wurden einige Behandlungsstrategien entwickelt, um die Überlebensrate von Lungenkrebspatienten zu erhöhen. Als Alternative zur Standard-Chemotherapie hat sich die Behandlung mit zielgerichteten Therapeutika wie Erlotinib bewährt (Riely et al., 2006; Oxnard and Miller, 2010). In diesen zielgerichteten Behandlungen werden Proteine inhibiert, denen eine Schlüsselrolle beim Tumorwachstum und der Metastasierung zukommt. Die Wirksamkeit dieser zielgerichteten Therapeutika basiert im wesentlichen auf der molekularen Struktur der Tumore. Sie entfalten nur dann ihre maximale Wirksamkeit, wenn das Zielprotein in bestimmter Weise in die Signaltransduktion eingebun-

4. DISKUSSION

den ist. Beispielsweise ist eine Behandlung, die auf der Inhibition des EGF-Rezeptors beruht, im Falle einer Mutation des in der Signalkaskade abwärts gelegenen KRAS-Gens weitgehend wirkungslos (Massarelli et al., 2007; Heinemann et al., 2009). Diese Tatsache bedingt die Notwendigkeit, die molekularen Strukturen und Zusammenhänge der Signaltransduktion in Lungenkrebs weiter aufzuklären, um die zielgerichteten Behandlungen optimal einsetzen zu können. Obwohl bereits viel über die genetischen und pharmakologischen Aspekte von verschiedenen Lungenkrebszelllinien bekannt ist, ist nur wenig Information über die Regulation der zellulären Signaltransduktionsmechanismen bekannt. Es ist allerdings unumstritten, dass sich in Lungenkrebs viele genetische Aberrationen, die sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene betreffen, akkumulieren. Diese Eigenschaft zieht als Konsequenz die Entwicklung von Resistenzen gegenüber zielgerichteten Therapeutika nach sich und ist damit von höchster klinischer Bedeutung. Die Reaktion auf Therapeutika ist darüberhinaus unterstützt von Mechanismen wie posttranskriptionaler Regulation, posttranslationaler Modifikation oder Protein-Protein-Wechselwirkungen, die nicht auf der Transkriptomebene erforscht werden können (Calvo et al., 2005; Petricoin et al., 2002). Proteinanalysemethoden sind daher besonders geeignet, unter Berücksichtigung dieser Parameter Muster zu finden, die mit der Sensitivität korrelieren. In dieser Arbeit wurde die Expression und Aktivierung von Proteinen von 84 Zelllinien im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber sieben Kinaseinhibitoren untersucht. Dabei konnten Signalproteine identifiziert werden, die in direktem Zusammenhang mit der Sensitivität gegenüber ausgewählten Therapeutika stehen, und damit Potential aufweisen, Biomarker zu identifizieren.

Der EGFR-Signaltransduktionsweg ist in NSCLC in vielen zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Metastasierung eingebunden (Kamath and Buolamwini, 2006). Die Expression von ERBB2 trägt ebenfalls zur Resistenzbildung und zur Metastasierung bei (Tsai et al., 1993). Die systematische Evaluierung der Proteinexpression zeigte die bekannte Assoziation der Sensitivität gegenüber den RTK-Inhibitoren Lapatinib, Vandetanib, Erlotinib und PD168393 mit der Expression und Aktivierung von EGFR und ERBB2 (Pao et al., 2004; Riely et al., 2006; Sequist et al., 2007; Tsao et al., 2005). Ebenso wurde eine erhöhte Expression von MEK in gegenüber UO126-sensitiven Zelllinien festgestellt (Sos et al., 2009). Die Identifizierung der Überexpression der jeweiligen Zielproteine in den sensitiven Zelllinien bestätigt die Funktionalität des

4.3 Proteinexpression als Marker für Therapieresistenz

experimentellen Ansatzes zur Bestimmung von Proteinen, die mit der Sensitivität verbunden sind. Zusätzlich konnten weitere Proteine bestimmt werden, die Aufschluss darüber geben könnten, welche Signalwege, außer dem des Zielproteins, noch in die Resistenzentwicklung eingebunden sind. In Zelllinien, die gegenüber Erlotinib sensitiv sind, konnte die Reduktion von acht Proteinen gemessen werden, wovon sieben mehr oder weniger direkt mit dem AKT-Signalweg verbunden sind (PP2A A und B, p70S6K, PI3K p85, p-AKT (S474), GRB2 und p27). GRB2 ist ein Adaptorprotein von EGFR und aktiviert den MAPK-Signalweg über Ras als auch den AKT-Signalweg über PI3K p85. PI3K p85 wird ebenfalls über IRS1 aktiviert, setzt Phosphoinositid um, was im Anschluss die AKT-Kinase PDK1 aktiviert. Der Zellzyklusinhibitor p27 wiederum wird von AKT inhibiert, was im weiteren Verlauf zu einer Progression des Zellzyklus führt. PP2A A und B gehören zu einem heterotrimeren Phosphatasesystem, das eine Vielzahl an Substraten dephosphoryliert, so auch AKT (Eichhorn et al., 2009). Mindestens eine der beiden Proteinuntereinheiten von PP2A ist in sensitiven Zelllinien reduziert. Die Reduktion der Proteine des AKT-Signalweges ist möglicherweise die Reaktion des Signalnetzwerkes auf die erhöhte Expression von EGFR in den Erlotinib-sensitiven Zelllinien. Vandetanib-sensitive Zelllinien zeigten ein ähnliches Proteinexpressionsmuster wie Erlotinib, was einen ähnlichen Wirkmechanismus nahelegt. Als weitere Marker wurden hier das antiapoptotische Protein Bcl-X sowie das Zellzyklusprotein CyclinD1 gefunden. Die Proteine, deren Expression mit der Sensitivität gegenüber einer der RTK-Inhibitoren (Lapatinib, Erlotinib, Vandetanib, Dasatinib, PD168393) assoziiert ist, sind strikt getrennt nach verstärkter und verringerter Expression und bilden damit zwei Gruppen. Eine Gruppe zeigt nur Überexpression in sensitiven Zelllinien, die andere nur Reduktion, wobei diese Aufteilung unabhängig von den tumorsuppressiven oder onkogenen Eigenschaften der Proteine ist.

Molekulare und prognostische Marker zur Planung der optimalen Behandlung von NSCLC konnten bis jetzt nicht abschließend validiert werden (Coate et al., 2009). In dieser Arbeit konnten jedoch weitere Proteine identifiziert werden, die mit der Sensitivität gegenüber spezifischen Wirkstoffen korrelieren. Nach einer erfolgreichen Validierung der hier vorgestellten Marker, könnte dies ein weiterer Schritt in Richtung personalisierter Therapie sein.

4.4 Proteinprofiling in Prostata Tumoren

4.4.1 Deregulierte Signalwege beim Prostatakrebs

Eine charakteristische Eigenschaft des Prostatakarzinoms ist die molekulare Heterogenität der Tumore. Aufgrund dessen blieb die Suche nach einem Genexpressionsprofil, das eine genaue Klassifizierung von Prostatakrebs ermöglicht, bisher erfolglos. Im Gegensatz dazu können im Brustkrebs deutlich abgegrenzte molekulare Subtypen definiert werden (Sorlie et al., 2003). Dennoch sind auch in Prostata einige Signaltransduktionswege dereguliert, die auch in anderen Krebsarten eine Rolle spielen. Dabei spielen aber weniger Mutationen eine Rolle, sondern vielmehr Gendelektionen bzw. -amplifikationen. Die in dieser Studie untersuchten Proteine wurden im Hinblick auf häufig beschriebene Effekte in Prostatakrebs ausgewählt:

Die Deregulation des TGF-beta-Signalweges (Guo and Kyprianou, 1998; Zhu et al., 2008) führt über Aktivierung von SMAD2/3 zur Expression der Zellzyklusinhibitoren p15, p21, 27 und des pro-apoptotischen Proteins BAX bei gleichzeitiger Suppression der Onkogene c-MYC und BCL2. Die Verringerung der Expression von TGF-beta Rezeptoren führt in Prostatakrebs (bei Abwesenheit von Androgen) zur Unterdrückung von Apoptose (Assinder et al., 2009). Der Verlust der Phosphatase PTEN ist häufiges Ereignis der Karzinogenese in Prostata (Wang et al., 2006; Salmena et al., 2008). Die tumorsuppressive Eigenschaft von PTEN ist begründet durch die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol, das für die Signalweiterleitung von PDK1 zu AKT notwendig ist. Die aktive Form von AKT inhibiert Tumorsuppressor GSK3B und das pro-apoptotische Protein BAD und aktiviert die onkogene mTOR-Signalkaskade (Nelson et al., 2007; Gao et al., 2003; Thomas et al., 2004; Kinkade et al., 2008). Der Verlust des Tumorsuppressorgens RB1 ist ebenfalls ein häufig beschriebenes Ereignis in der Karzinogenese des Prostatakrebs (Taylor et al., 2010). RB1 inhibiert durch Bindung an E2F die Transkription von Proteinen, die notwendig sind für die Zellzyklusprogression. Zur Untersuchung der Tumorproben wurden 42 Antikörper ausgewählt, die im Zusammenhang mit den beschriebenen Signalwegen stehen. Es konnten für die prostatakrebstypischen mRNA-Marker AR, AMARC und NKX3.1 keine Antikörper zur Verwendung auf RPPA validiert werden, so dass auf deren Analyse verzichtet werden musste.

4.4.2 Eigenschaften des Probensets

Das Probenset umfasste 104 Gewebeproben, aufgeteilt in 51 Tumor- und 54 Normalgewebe. Dabei handelt es sich um Gewebeschnitte, die aus technischen Gründen mit einer Fixiersubstanz (Tissue Tek[®]) versetzt sind. Die Proteinausbeuten, gemessen nach der Lyse der Proben, waren relativ niedrig, was auf eine eventuell verminderte Effizienz der Lyse schließen lässt. Die Proteingehalte der Proben wurden vor dem Drucken auf RPPAs auf eine Konzentration von $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt, um eine homogene Verteilung der Konzentration der Spots zu erreichen. Trotz dieser Vornormalisierung der Proben zeigten die Werte, die nur von der Proteinkonzentration abhängen sollten (Fast Green FCF, Housekeeping Proteine) sowie die mittlere Expression aller gemessenen Proteine eine signifikante Abhängigkeit vom Gewebetyp. Dabei ergaben die Tumorproben einen 20 bis 50 % höheren Wert. Die meisten der gemessenen Proteine besitzen onkogene Eigenschaften, weshalb ein höherer Wert des Median über alle gemessenen Proteine in den Tumorproben einen biologischen Hintergrund haben kann. Da jedoch die konstitutiv exprimierten Proteine GAPDH, Actin, V-ATPase und ribosomales Protein L19 einen im selben Maße erhöhten Wert zeigten, scheint ein rein biologischer Hintergrund unwahrscheinlich. Aufgrund dieser grundlegenden Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe wurden die Proben aus Normalgewebe von der Analyse ausgeschlossen. Die Verteilung der Gleasonwerte der Tumorproben deckte einen Bereich von 3+3 bis 5+4 ab. Der TMPRSS:ERG-Fusionsgenstatus konnte (Jan C. Brase) in 37 der 51 Tumorproben eindeutig identifiziert werden, woraus folgt, dass die Integration der Ergebnisse für Fusionsgen und Gleasonwert auf diese 37 Proben beschränkt bleibt.

4.4.3 Korrelation der p38-Aktivierung mit dem Gleasonwert

Der pathologische Gleasonwert ist als Parameter zur Beurteilung der Aggressivität der Prostatatumore zu verstehen und bildet maßgeblich die Grundlage für Therapieentscheidungen (Shah, 2009). Der Nachteil der Beurteilung anhand des Gleasonwertes ist jedoch der subjektive Einfluss des beurteilenden Pathologen. In einer Studie zur Evaluierung der Reproduzierbarkeit der pathologischen Beurteilung von Prostatatumoren wurde die Subjektivität dieser Klassifizierung deutlich (Burchardt et al., 2008). Besonders kleine Tumore wurden von nur 68 % der Pathologen korrekt beschrieben. Eine

4. DISKUSSION

objektivere Klassifizierungsmöglichkeit auf Grundlage von Gen- oder Proteinexpression könnte direkt den Patienten zugute kommen. Daher wurde die Proteinexpression der Tumore in Abhängigkeit des Gleasonwertes, aufgeteilt in zwei Gruppen ($\leq 7, > 7$), analysiert. Als Ergebnis konnte eine signifikant höhere Aktivierung von p38 in Tumoren mit geringerem Gleasonwert festgestellt werden. Die Expression von p38 zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den Gleasonwerten. Grubb et al. (2009) konnten eine Deaktivierung von p38 in Metastasen aus Prostatakrebs messen, jedoch keine Unterschiede innerhalb der Primärtumore. Metastasen sind im Prinzip eine weitere Entwicklungsstufe der Aggressivität von Tumoren und von daher bestätigt das Ergebnis von Grubb et al. (2009) indirekt unsere Analysen. Die Familie der p38 MAPK besteht aus vier Mitgliedern p38- α , - β , - γ und - δ , die von verschiedenen Genen codiert sind. Während p38- α in den meisten Zelltypen konstitutiv exprimiert wird, werden die anderen gewebespezifisch exprimiert; p38- β in Gehirn, p38- γ in Muskelgewebe und p38- δ in Drüsengewebe. Darüberhinaus wurden verschieden Splicevarianten von p38- α beschrieben. Die Variante MXI2 ist identisch mit den Aminosäuren 1-280 von p38- α und reguliert den nuklearen Import von ERK1/2. EXIP hat zusätzlich 53 Aminosäuren am C-Terminus und regelt den Nf- κ B-Signalweg. Wie viele andere Kinasen wird p38 aktiviert über Phosphorylierung, speziell über eine duale Phosphorylierung eines Thr-Gly-Tyr-Motivs. Die Aktivatoren und Substrate von p38 umfassen ein Vielzahl von Proteinen, weshalb p38 auf verschiedene Stimulanzen reagiert und verschiedene Signalwege integriert. Die Aktivierung von p38 erfolgt als Antwort auf Stress (z.B. oxidativ oder Strahlung), Entzündung (Cytokine) oder Wachstumsfaktorstimulation. Die möglichen physiologischen Reaktion auf eine p38-Aktivierung sind vielfältig und nicht vollständig geklärt (Cuadrado and Nebreda, 2010). Diese Reaktionen stehen dabei in Abhängigkeit von Gewebe und Stimulus. Die tumorsuppressiven Eigenschaften von p38 (Haq et al., 2002; Li et al., 2003; Hui et al., 2007) könnten die hohe Aktivierung von p38 in Prostata Tumoren mit niedrigem Gleasonwert allgemein erklären. Eine spezielle Rolle spielt dabei der Prozess der Zellalterung. Sie bezeichnet eine Art Zellzyklusarrest, bei dem die Zellen ihre Lebensfähigkeit erhalten, sich aber trotz Anwesenheit von mitogenen Signalen nicht mehr teilen (d'Adda di Fagagna, 2008; Saab, 2010; Courtois-Cox et al., 2008). Dieser Effekt kann den Übergang von gutartigen zu aggressiveren Tumoren verhindern. In der Prostata spielt die Zellalterung während der altersbedingten Vergrößerung der Prostata eine Rolle und ist in tumorsuppressive Mechanismen eingebunden. Erhöhte Expression

von Biomarkern für Zellalterung wie p14^{arf} und p16^{ink4a} wurden in gutartigen Prostatatumoren gemessen und sind potentielle Marker zur Unterscheidung von gutartigen und aggressiven Tumoren (Zhang et al., 2006). In dieser Arbeit konnte die Aktivierung von p38 als neuer potentieller Marker für weniger aggressive Prostatatumore identifiziert werden.

4.4.4 Biomarker für das TMPRSS:ERG-Fusionsgen

Umgruppierungen von Chromosomen, die eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie, im Besonderen ERG, zur Folge haben, wurden in einer Mehrzahl der Prostatatumore identifiziert (Rouzier et al., 2008). Die weitaus häufigste dieser Umgruppierungen generiert ein TMPRSS:ERG-Fusionsgen, das zu erhöhter Expression eines N-terminal gekürzten ERG unter der Kontrolle des TMPRSS-Promotors führt. Die Auswirkungen dieses Fusionsgens betreffen viele Aspekte des Prostatakrebs. Der Zusammenhang mit der Tumoraggressivität ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (Tomlins et al., 2009). Die ETS-Umgruppierungen können wegen ihrer Fähigkeit, Differenzierungsprozesse zu unterbrechen, und der Beteiligung an anderen Transformationsereignissen tendenziell als onkogen interpretiert werden (Shen and Abate-Shen, 2010). Vielfach wird das TMPRSS:ERG-Fusionsgen als von Gleasonwert, Tumorstatus oder Proliferationsaktivitäten unabhängiger Faktor gesehen (Saramäki et al., 2008; Mehra et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch auf eine Verringerung der Expression der drei onkogenen Proteine PI3K p110, ERK und CDK6 in den TMPRSS:ERG-Fusionsgen-positiven Tumoren hin. PI3K p110 und ERK sind zentrale Kinasen des AKT- bzw. MAPK-Signalweges, die in vielen Krebsarten maßgeblich an der Karzinogenese beteiligt und daher auch Ziel intensiver Forschung zur Entwicklung von therapeutischen Wirkstoffen sind (Sarker et al., 2009; Roberts and Der, 2007). CDK6 (wie auch CDK4) ist eine Komponente der Zellzyklusregulation und regelt mit CyclinD die Progression der G1-Phase. Zusätzlich zeigen die Tumore mit TMPRSS:ERG-Fusionsgen signifikant niedrigere Gleasonwerte. Zusammengenommen deuten die Ergebnisse auf eine Assoziation des Fusionsgens mit verringerter Aggressivität der Tumore hin.

4. DISKUSSION

4.4.5 Visuelle Integration klinischer und experimenteller Daten

Um die in den vorangegangenen Abschnitten 4.4.3 und 4.4.4 diskutierten Einzelergebnisse zu integrieren, wurde eine junge Methode aus dem Bereich der diskreten Mathematik angewandt, die Formale Begriffsanalyse. Diese Methode basiert auf der Strukturierung binärer Relationen, wurde 1940 von Garrett Birkhoff begründet und seit 1982 von Bernhard Ganter und Rudolf Wille weiterentwickelt (Ganter and Wille, 1996). In der biologischen Forschung wurde diese Methode bereits eingesetzt zur Identifizierung von Biomarkern in Brustkrebs (Alexe et al., 2007; Motameny et al., 2008) und zur Aufklärung von Signaltransduktionsnetzwerken (Wollbold et al., 2009). Die Anwendung dieser Methode setzt die Umsetzung der kontinuierlichen Daten (z.B. der Proteinexpression) in einwertige Kontexte voraus, die Objekte (Patientenproben) und Attribute (Eigenschaften der Proben) ordnen. Das bedeutet, die kontinuierlichen Daten werden zunächst in Kategorien unterteilt und die einzelnen Proben werden diesen Kategorien (*Attributen*) zugeordnet. Um die Aussagekraft der Visualisierung zu erhöhen, wurden in diesem Projekt die kontinuierlichen Daten in drei Kategorien unterteilt und nur die Gruppen hoher und niedriger Expression bzw. Aktivierung betrachtet. Die formalen Kontexte wurden mit der Software Concept Explorer als Begriffsverband, sogenannte Hasse-Diagramme, visualisiert. Diese Methode ermöglicht die Integration von klinischen Daten und Proteinexpression und ist geeignet, in kleineren Datensätzen Zusammenhänge aufzudecken, die aufgrund der kleinen Anzahl an Proben in den Einzelgruppen mit den traditionellen statistischen Tests keine Signifikanzen ergeben. Da die Begriffsverbände nur den logischen Zusammenhang der Proben darstellen und keinerlei weitere Algorithmen verwendet werden, ist ein systematischer Fehler durch die Auswahl eines nicht optimalen Algorithmus oder statistischen Tests ausgeschlossen. Denn statistische Tests erfordern immer eine Grund- bzw. Nullhypothese und setzen eine bestimmte Datenstruktur voraus. Ebenso basieren mathematische Modelle zur Berechnung biologischer Zusammenhänge auf grundlegenden Annahmen, die der biologische Kontext erfüllen muss. Der einzige Faktor, der möglicherweise zu einer Fehlinterpretation der Begriffsverbände führen könnte, ist eine unpassende Kategorisierung der kontinuierlichen Daten.

Aus den Begriffsverbänden (Hasse-Diagrammen) konnten die Ergebnisse der statistischen Tests rekonstruiert werden, indem aktiviertes p38 in die Gruppe mit niedri-

gem Gleasonwert (Gleasonsumme ≤ 7) fällt. Nur wenige Proben mit hoher Expression von CKD6, ERK und PI3K p110 zeigen gleichzeitig das TMPRSS:ERG-Fusionsgen. Zusätzlich konnte eine Auftrennung der Attribute hoher ERK-Expression und hoher p38-Aktivierung beobachtet werden, d.h. alle Proben mit niedriger ERK-Aktivierung zeigen gleichzeitig niedrige Gleasonwerte. Die hohe p38- und niedrige ERK-Aktivierung in Proben mit niedrigem Gleasonwert spiegelt den bereits bekannten Antagonismus zwischen den ERK- und p38-Signalwegen wider. Durch die Aktivierung von PP2A, das wiederum MEK dephosphoryliert, senkt p38 indirekt die Aktivität von ERK (Junttila et al., 2008). Die Kombination der Einzelergebnisse für ERK und p38 könnten einen kombinatorischen Marker bilden, um zusammen mit dem TMPRSS:ERG-Fusionsgenstatus die Aggressivität von Prostatatumoren zu prognostizieren. Dies bedarf jedoch einer weiteren Validierung in einer größeren Patientenkohorte.

Zusammenfassend ist es gelungen, durch Integration von TMPRSS:ERG-Fusionsgenstatus, pathologischem Gleasonwert und Proteinexpression potentielle Biomarker zur Klassifizierung des Prostatakrebs zu identifizieren. Die durch traditionelle Analyse gefundenen einzelnen Markerproteine ergaben durch die Anwendung formaler Begriffsanalyse ein schlüssiges Gesamtbild des Zusammenhangs dieser drei integrierten Parameter.

4. DISKUSSION

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCA	Formale Begriffsanalyse (Formal Concept Analysis)
NSCLC	nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNAi	RNA Interferenz
RPPA	Reverse Phase Protein Mikroarray
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	Single Interferenz RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TNM	Klassifikationssystem für maligne Tumore: T = Tumor, N = Lymphknoten (nodes), M = Metastasen
NGFN	Nationales Genom Forschungsnetzwerk

Abkürzungsverzeichnis

Referenzen

- Akkiprik, M., D. Nicorici, D. Cogdell, Y. J. Jia, A. Hategan, I. Tabus, O. Yli-Harja, D. Y. A. Sahin, and W. Zhang (2006, Dec). Dissection of signaling pathways in fourteen breast cancer cell lines using reverse-phase protein lysate microarray. *Technol Cancer Res Treat* 5(6), 543–51. 10
- Albadine, R., M. Latour, A. Toubaji, M. Haffner, W. B. Isaacs, E. A. Platz, A. K. Meeker, A. M. Demarzo, J. I. Epstein, and G. J. Netto (2009, Nov). Tmprss2-erg gene fusion status in minute (minimal) prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 22(11), 1415–1422. 8
- Alexe, G., G. S. Dalgin, S. Ganesan, C. Delisi, and G. Bhanot (2007, Aug). Analysis of breast cancer progression using principal component analysis and clustering. *J Biosci* 32(5), 1027–1039. 112
- Ambroz, K. L. H., Y. Zhang, A. Schutz-Geschwender, and D. M. Olive (2008, Jun). Blocking and detection chemistries affect antibody performance on reverse phase protein arrays. *Proteomics* 8(12), 2379–83. 101
- Assinder, S. J., Q. Dong, Z. Kovacevic, and D. R. Richardson (2009, Jan). The tgf-beta, pi3k/akt and pten pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochem J* 417(2), 411–421. 108
- Berg, D., S. Hipp, K. Malinowsky, C. Boellner, and K.-F. Becker (2010, Jan). Molecular profiling of signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded cancer tissues. *Eur J Cancer* 46(1), 47–55. LCM, ECL readout,. 10, 99, 100
- Berglund, L., E. Björling, P. Oksvold, L. Fagerberg, A. Asplund, C. A.-K. Szigyarto, A. Persson, J. Ottosson, H. Wernérus, P. Nilsson, E. Lundberg, A. Sivertsson, S. Navani, K. Wester, C. Kampf, S. Hober, F. Pontén, and M. Uhlén (2008, Oct). A genecentric human protein atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics* 7(10), 2019–2027. 33
- Blok, L. J., P. E. de Ruiter, and A. O. Brinkmann (1998, Mar). Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry* 37(11), 3850–3857. 7

REFERENZEN

- Bobrow, M. N., T. D. Harris, K. J. Shaughnessy, and G. J. Litt (1989, Dec). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. application to immunoassays. *J Immunol Methods* 125(1-2), 279–285. 100
- Bordeaux, J., A. Welsh, S. Agarwal, E. Killiam, M. Baquero, J. Hanna, V. Anagnostou, and D. Rimm (2010, Mar). Antibody validation. *Biotechniques* 48(3), 197–209. 97
- Boyd, Z. S., Q. J. Wu, C. O'Brien, J. Spoerke, H. Savage, P. J. Fielder, L. Amler, Y. Yan, and M. R. Lackner (2008, Dec). Proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes and biomarkers of response to targeted kinase inhibitors using reverse-phase protein microarrays. *Mol Cancer Ther* 7(12), 3695–3706. 10
- Brase, J. C., H. Mannsperger, H. Froehlich, S. Gade, C. Schmidt, S. Wiemann, T. Beissbarth, T. Schlomm, H. Sueltmann, and U. Korf (2010). Increasing the sensitivity of reverse phase protein arrays by antibody-mediated signal amplification. *Proteome Sci* 8, 36. 45
- Brooks, D. D., A. Wolf, R. A. Smith, C. Dash, and I. Guessous (2010, May). Prostate cancer screening 2010: updated recommendations from the american cancer society. *J Natl Med Assoc* 102(5), 423–429. 6
- Bucheri, G. and D. Ferrigno (2004, Dec). Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J* 24(6), 898–904. 2
- Burchardt, M., R. Engers, M. Müller, T. Burchardt, R. Willers, J. I. Epstein, R. Ackermann, H. E. Gabbert, A. de la Taille, and M. A. Rubin (2008, Oct). Interobserver reproducibility of gleason grading: evaluation using prostate cancer tissue microarrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(10), 1071–1078. 6, 109
- Calvert, V., Y. Tang, V. Boveia, J. Wulfschlegel, A. Schutz-Geschwender, M. Olive, L. Liotta, and E. Petricoin (2004, Jan). Development of multiplexed protein profiling and detection using near infrared detection of reverse-phase protein microarrays. *Clinical Proteomics* 1, 81–89. 100
- Calvo, K. R., L. A. Liotta, and E. F. Petricoin (2005). Clinical proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. *Biosci Rep* 25(1-2), 107–125. 10, 106
- Carey, M. S., R. Agarwal, B. Gilks, K. Swenerton, S. Kalloger, J. Santos, Z. Ju, Y. Lu, F. Zhang, K. R. Coombes, D. Miller, D. Huntsman, G. B. Mills, and B. T. Hennessy (2010, May). Functional proteomic analysis of advanced serous ovarian cancer using reverse phase protein array: Tgf-beta pathway signaling indicates response to primary chemotherapy. *Clin Cancer Res* 16(10), 2852–2860. 101, 103
- Clark, J., G. Attard, S. Jhavar, P. Flohr, A. Reid, J. De-Bono, R. Eeles, P. Scardino, J. Cuzick, G. Fisher, M. D. Parker, C. S. Foster, D. Berney, G. Kovacs, and C. S. Cooper (2008,

- Mar). Complex patterns of ets gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene* 27(14), 1993–2003. 7
- Coate, L. E., T. John, M.-S. Tsao, and F. A. Shepherd (2009, Oct). Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 10(10), 1001–1010. 107
- Coombes, K. R., S. Neeley, C. Joy, J. Hu, K. Baggerly, , and P. Roebuck. (2009). *SuperCurve: SuperCurve Package*. Department of Bioinformatics and Computational Biology, The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA,. R package version 1.3.3. 56, 101
- Courtois-Cox, S., S. L. Jones, and K. Cichowski (2008, May). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27(20), 2801–2809. 110
- Crawford, E. D. (2009, May). Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology* 73(5 Suppl), S4–10. 5
- Cuadrado, A. and A. R. Nebreda (2010, Aug). Mechanisms and functions of p38 mapk signalling. *Biochem J* 429(3), 403–417. 110
- d’Adda di Fagagna, F. (2008, Jul). Living on a break: cellular senescence as a dna-damage response. *Nat Rev Cancer* 8(7), 512–522. 110
- Dupuy, L., C. Gauthier, G. Durand, A. Musnier, D. Heitzler, A. Herledan, V. Sakanyan, P. Crépieux, and E. Reiter (2009, Dec). A highly sensitive near-infrared fluorescent detection method to analyze signalling pathways by reverse-phase protein array. *Proteomics* 9(24), 5446–5454. 100
- Eichhorn, P. J. A., M. P. Creighton, and R. Bernards (2009, Jan). Protein phosphatase 2a regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1795(1), 1–15. 107
- Espina, V., B. D. Mariani, R. I. Gallagher, K. Tran, S. Banks, J. Wiedemann, H. Huryk, C. Mueller, L. Adamo, J. Deng, E. F. Petricoin, L. Pastore, S. Zaman, G. Menezes, J. Mize, J. Johal, K. Edmiston, and L. A. Liotta (2010). Malignant precursor cells pre-exist in human breast dcis and require autophagy for survival. *PLoS One* 5(4), e10240. 102
- Ganter, B. and R. Wille (1996). *Formale Begriffsanalyse: Mathematische Grundlagen*. Springer. 112
- Gao, N., Z. Zhang, B.-H. Jiang, and X. Shi (2003, Oct). Role of pi3k/akt/mtor signaling in the cell cycle progression of human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 310(4), 1124–1132. 108
- Giaccone, G. (2005, May). Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23(14), 3235–3242. 3

REFERENZEN

- Gleason, D. F. (1966, Mar). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50(3), 125–128. 5
- Grubb, R. L., J. Deng, P. A. Pinto, J. L. Mohler, A. Chinnaiyan, M. Rubin, W. M. Linehan, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, and J. D. Wulfschlegel (2009, Jun). Pathway biomarker profiling of localized and metastatic human prostate cancer reveal metastatic and prognostic signatures. *J Proteome Res* 8(6), 3044–54. RPPA, Prostate Cancer, Biomarker, denaturation, catalyzed signal amplification, DAKO, colorimetric readout. 10, 82, 110
- Gulmann, C., K. M. Sheehan, R. M. Conroy, J. D. Wulfschlegel, V. Espina, M. J. Mullarkey, E. W. Kay, L. A. Liotta, and E. F. Petricoin (2009, Aug). Quantitative cell signalling analysis reveals down-regulation of mapk pathway activation in colorectal cancer. *J Pathol* 218(4), 514–9. 10
- Guo, Y. and N. Kyprianou (1998, Feb). Overexpression of transforming growth factor (tgf) beta1 type ii receptor restores tgf-beta1 sensitivity and signaling in human prostate cancer cells. *Cell Growth Differ* 9(2), 185–193. 108
- Hall, D. A., J. Ptacek, and M. Snyder (2007, Jan). Protein microarray technology. *Mech Ageing Dev* 128(1), 161–167. 8
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000, Jan). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57–70. 1
- Haq, R., J. D. Brenton, M. Takahashi, D. Finan, A. Finkielstein, S. Damaraju, R. Rottapel, and B. Zanke (2002, Sep). Constitutive p38hog mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res* 62(17), 5076–5082. 110
- Heinemann, V., S. Stintzing, T. Kirchner, S. Boeck, and A. Jung (2009, May). Clinical relevance of egfr- and kras-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the egfr. *Cancer Treat Rev* 35(3), 262–71. 106
- Hirsh, V. (2010, Apr). Systemic therapies in metastatic non-small-cell lung cancer with emphasis on targeted therapies: the rational approach. *Curr Oncol* 17(2), 13–23. 3
- Hu, J., X. He, K. A. Baggerly, K. R. Coombes, B. T. J. Hennessy, and G. B. Mills (2007, Aug). Non-parametric quantification of protein lysate arrays. *Bioinformatics* 23(15), 1986–94. 11, 53, 69, 101
- Hui, L., L. Bakiri, A. Mairhorfer, N. Schweifer, C. Haslinger, L. Kenner, V. Komnenovic, H. Scheuch, H. Beug, and E. F. Wagner (2007, Jun). p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the jnk-c-jun pathway. *Nat Genet* 39(6), 741–749. 110
- Hunyady, B., K. Krempels, G. Harta, and E. Mezey (1996, Dec). Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J Histochem Cytochem* 44(12), 1353–1362. 100

- Iadevaia, S., Y. Lu, F. C. Morales, G. B. Mills, and P. T. Ram (2010, Sep). Identification of optimal drug combinations targeting cellular networks: integrating phospho-proteomics and computational network analysis. *Cancer Res* 70(17), 6704–6714. 101
- Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60(5), 277–300. 5
- Junttila, M. R., S.-P. Li, and J. Westermarck (2008, Apr). Phosphatase-mediated crosstalk between mapk signaling pathways in the regulation of cell survival.eine. *FASEB J* 22(4), 954–965. 113
- Kamath, S. and J. K. Buolamwini (2006, Sep). Targeting egfr and her-2 receptor tyrosine kinases for cancer drug discovery and development. *Med Res Rev* 26(5), 569–594. 106
- Kim, E. K. and E.-J. Choi (2010, Apr). Pathological roles of mapk signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802(4), 396–405. 1
- Kinkade, C. W., M. Castillo-Martin, A. Puzio-Kuter, J. Yan, T. H. Foster, H. Gao, Y. Sun, X. Ouyang, W. L. Gerald, C. Cordon-Cardo, and C. Abate-Shen (2008, Sep). Targeting akt/mtor and erk mapk signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model. *J Clin Invest* 118(9), 3051–3064. 108
- Kohno, M. and J. Pouyssegur (2006). Targeting the erk signaling pathway in cancer therapy. *Ann Med* 38(3), 200–211. 1
- Korf, U., S. Derdak, A. Tresch, F. Henjes, S. Schumacher, C. Schmidt, B. Hahn, W. D. Lehmann, A. Poustka, T. Beissbarth, and U. Klingmüller (2008, Nov). Quantitative protein microarrays for time-resolved measurements of protein phosphorylation. *Proteomics* 8(21), 4603–4612. 28
- Korf, U., F. Henjes, C. Schmidt, A. Tresch, H. Mannsperger, C. Löbke, T. Beissbarth, and A. Poustka (2008). Antibody microarrays as an experimental platform for the analysis of signal transduction networks. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 110, 153–175. 8
- Kricka, L. J. and S. R. Master (2008, Jan). Validation and quality control of protein microarray-based analytical methods. *Mol Biotechnol* 38(1), 19–31. 100
- Krogan, N. J., G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A. P. Tikuisis, T. Punna, J. M. Peregrín-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M. D. Robinson, A. Paccanaro, J. E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D. P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M. M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S. R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J. J. Rilstone, K. Gandi, N. J. Thompson, G. Musso, P. S. Onge, S. Ghanny, M. H. Y. Lam, G. Butland, A. M. Altaf-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O’Shea, J. S. Weissman, C. J. Ingles, T. R. Hughes, J. Parkinson, M. Gerstein, S. J. Wodak, A. Emili, and J. F. Greenblatt (2006, Mar). Global landscape of protein complexes in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440(7084), 637–643. 8

REFERENZEN

- Laemmli, U. K. (1970, Aug). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature* 227(5259), 680–685. 28
- Lapointe, J., C. Li, C. P. Giacomini, K. Salari, S. Huang, P. Wang, M. Ferrari, T. Hernandez-Boussard, J. D. Brooks, and J. R. Pollack (2007, Sep). Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 67(18), 8504–8510. 7
- Laurenson, S., M. R. Pett, K. Hoppe-Seyler, C. Denk, F. Hoppe-Seyler, N. Coleman, and P. K. Ferrigno (2010, Nov). Development of peptide aptamer microarrays for detection of hpv16 oncoproteins in cell extracts. *Anal Biochem.* 8, 99
- Li, S.-P., M. R. Junttila, J. Han, V.-M. Kähäri, and J. Westermarck (2003, Jul). p38 mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1,2. *Cancer Res* 63(13), 3473–3477. 110
- Lilja, H., D. Ulmert, and A. J. Vickers (2008, Apr). Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 8(4), 268–278. 5
- Liu, W., S. Laitinen, S. Khan, M. Vihinen, J. Kowalski, G. Yu, L. Chen, C. M. Ewing, M. A. Eisenberger, M. A. Carducci, W. G. Nelson, S. Yegnasubramanian, J. Luo, Y. Wang, J. Xu, W. B. Isaacs, T. Visakorpi, and G. S. Bova (2009, May). Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med* 15(5), 559–565. 7
- Loebke, C., H. Suelmann, C. Schmidt, F. Henjes, S. Wiemann, A. Poustka, and U. Korf (2007, Feb). Infrared-based protein detection arrays for quantitative proteomics. *Proteomics* 7(4), 558–64. 10, 12, 99, 102
- Lu-Yao, G. L., P. C. Albertsen, D. F. Moore, W. Shih, Y. Lin, R. S. DiPaola, M. J. Barry, A. Zietman, M. O’Leary, E. Walker-Corkery, and S.-L. Yao (2009, Sep). Outcomes of localized prostate cancer following conservative management. *JAMA* 302(11), 1202–1209. 7
- Lundberg, E. and M. Uhlén (2010, Jul). Creation of an antibody-based subcellular protein atlas. *Proteomics* 10, 1–13. 33
- MacBeath, G. and S. L. Schreiber (2000, Sep). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289(5485), 1760–1763. 8
- Major, S. M., S. Nishizuka, D. Morita, R. Rowland, M. Sunshine, U. Shankavaram, F. Washburn, D. Asin, H. Kouros-Mehr, D. Kane, and J. N. Weinstein (2006). Abminer: a bioinformatic resource on available monoclonal antibodies and corresponding gene identifiers for genomic, proteomic, and immunologic studies. *BMC Bioinformatics* 7, 192. 33
- Manin, M., S. Baron, K. Goossens, C. Beaudoin, C. Jean, G. Veyssiere, G. Verhoeven, and L. Morel (2002, Sep). Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide

- 3-kinase/akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J* 366(Pt 3), 729–736. 7
- Mannsperger, H. A., S. Gade, F. Henjes, T. Beissbarth, and U. Korf (2010, Jul). Rppanalyzer: Analysis of reverse phase protein array data. *Bioinformatics* 26, 2202–2203. 31, 53, 105
- Massarelli, E., M. Varella-Garcia, X. Tang, A. C. Xavier, N. C. Ozburn, D. D. Liu, B. N. Bekele, R. S. Herbst, and I. I. Wistuba (2007, May). Kras mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 13(10), 2890–2896. 5, 106
- Mehra, R., B. Han, S. A. Tomlins, L. Wang, A. Menon, M. J. Wasco, R. Shen, J. E. Montie, A. M. Chinnaiyan, and R. B. Shah (2007, Sep). Heterogeneity of tmprss2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res* 67(17), 7991–7995. 7, 111
- Mellinger, G. T., D. Gleason, and J. Bailar (1967, Feb). The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol* 97(2), 331–337. 5
- Mosquera, J.-M., S. Perner, E. M. Genega, M. Sanda, M. D. Hofer, K. D. Mertz, P. L. Paris, J. Simko, T. A. Bismar, G. Ayala, R. B. Shah, M. Loda, and M. A. Rubin (2008, Jun). Characterization of tmprss2-erg fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clin Cancer Res* 14(11), 3380–3385. 8
- Motameny, S., B. Versmold, and R. Schmutzler (2008). Formal concept analysis for the identification of combinatorial biomarkers in breast cancer. *ICFCA 2008 LNAI 4933*, 229–240. 112
- Neeley, E. S., S. M. Kornblau, K. R. Coombes, and K. A. Baggerly (2009, Feb). Variable slope normalization of reverse phase protein arrays. *Bioinformatics* 25, 1384–1389. normalization of array effects. 11, 53
- Nelson, E. C., C. P. Evans, P. C. Mack, R. W. Devere-White, and P. N. Lara (2007). Inhibition of akt pathways in the treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 10(4), 331–339. 108
- Nishizuka, S., L. Charboneau, L. Young, S. Major, W. C. Reinhold, M. Waltham, H. Kouros-Mehr, K. J. Bussey, J. K. Lee, V. Espina, P. J. Munson, E. Petricoin, L. A. Liotta, and J. N. Weinstein (2003, Nov). Proteomic profiling of the nci-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(24), 14229–34. 10, 100
- Nishizuka, S. and B. Spurrier (2008, Feb). Experimental validation for quantitative protein network models. *Curr Opin Biotechnol* 19(1), 41–9. 97

REFERENZEN

- Oxnard, G. R. and V. A. Miller (2010, Apr). Use of erlotinib or gefitinib as initial therapy in advanced nslc. *Oncology (Williston Park)* 24(5), 392–399. 3, 105
- Pao, W., V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, and H. Varmus (2004, Sep). Egf receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36), 13306–13311. 106
- Pao, W., V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris, and H. Varmus (2005, Mar). Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the egfr kinase domain. *PLoS Med* 2(3), e73. 4
- Paweletz, C. P., L. Charboneau, V. E. Bichsel, N. L. Simone, T. Chen, J. W. Gillespie, M. R. Emmert-Buck, M. J. Roth, E. F. P. III, and L. A. Liotta (2001, Apr). Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 20(16), 1981–1989. 10, 99, 100
- Pawlak, M., E. Schick, M. A. Bopp, M. J. Schneider, P. Oroszlan, and M. Ehrat (2002, Apr). Zeptosens' protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis. *Proteomics* 2(4), 383–393. 99, 100
- Petricoin, E. F., A. M. Ardekani, B. A. Hitt, P. J. Levine, V. A. Fusaro, S. M. Steinberg, G. B. Mills, C. Simone, D. A. Fishman, E. C. Kohn, and L. A. Liotta (2002, Feb). Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359(9306), 572–577. 10
- Petricoin, E. F., J. L. Hackett, L. J. Lesko, R. K. Puri, S. I. Gutman, K. Chumakov, J. Woodcock, D. W. Feigal, K. C. Zoon, and F. D. Sistare (2002, Dec). Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nat Genet* 32 Suppl, 474–479. 106
- Petrylak, D. P., C. M. Tangen, M. H. A. Hussain, P. N. Lara, J. A. Jones, M. E. Taplin, P. A. Burch, D. Berry, C. Moinpour, M. Kohli, M. C. Benson, E. J. Small, D. Raghavan, and E. D. Crawford (2004, Oct). Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 351(15), 1513–1520. 6
- Pozner-Moulis, S., M. Cregger, and R. Camp (2007, Jan). Antibody validation by quantitative analysis of protein expression using expression of met *Lab Invest* 87, 251–260. 97
- Prat, A., J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He, and C. M. Perou (2010, Sep). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12(5), R68. 70
- R Development Core Team (2005). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. 14, 66

- Ramalingam, S., P. Honkanen, L. Young, T. Shimura, J. Austin, P. S. Steeg, and S. Nishizuka (2007, Jul). Quantitative assessment of the p53-mdm2 feedback loop using protein lysate microarrays. *Cancer Res* 67(13), 6247–52. 100
- Ramaswamy, A., E. Lin, I. Chen, R. Mitra, J. Morrisett, K. Coombes, Z. Ju, and M. Kapoor (2005, Jan). Application of protein lysate microarrays to molecular marker verification and quantification. *Proteome science* 3, 9. 100
- Riely, G. J., W. Pao, D. Pham, A. R. Li, N. Rizvi, E. S. Venkatraman, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi, and V. A. Miller (2006, Feb). Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 12(3 Pt 1), 839–844. 105, 106
- Ritchie, M. E., J. Silver, A. Oshlack, M. Holmes, D. Diyagama, A. Holloway, and G. K. Smyth (2007, Oct). A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23(20), 2700–2707. 69
- Roberts, P. J. and C. J. Der (2007, May). Targeting the raf-mek-erk mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26(22), 3291–3310. 111
- Roberts, P. J., T. E. Stinchcombe, C. J. Der, and M. A. Socinski (2010, Nov). Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is kras a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol* 28(31), 4769–4777. 5
- Rouzier, C., J. Haudebourg, X. Carpentier, L. Valério, J. Amiel, J.-F. Michiels, and F. Pedoutour (2008, May). Detection of the tmprss2-ets fusion gene in prostate carcinomas: retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 183(1), 21–27. 111
- Saab, R. (2010). Cellular senescence: many roads, one final destination. *ScientificWorldJournal* 10, 727–741. 110
- Salmena, L., A. Carracedo, and P. P. Pandolfi (2008, May). Tenets of pten tumor suppression. *Cell* 133(3), 403–414. 108
- Sanders, H. R. and M. Albitar (2010, Nov). Somatic mutations of signaling genes in non-small-cell lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 203(1), 7–15. 3, 4, 105
- Saramäki, O. R., A. E. Harjula, P. M. Martikainen, R. L. Vessella, T. L. J. Tammela, and T. Visakorpi (2008, Jun). Tmprss2:erg fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res* 14(11), 3395–3400. 8, 82, 111
- Sarker, D., A. H. M. Reid, T. A. Yap, and J. S. de Bono (2009, Aug). Targeting the pi3k/akt pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15(15), 4799–4805. 111

REFERENZEN

- Sartor, A. O., H. Hricak, T. M. Wheeler, J. Coleman, D. F. Penson, P. R. Carroll, M. A. Rubin, and P. T. Scardino (2008, Dec). Evaluating localized prostate cancer and identifying candidates for focal therapy. *Urology* 72(6 Suppl), S12–S24. 7
- Sboner, A., A. Karpikov, G. Chen, M. Smith, D. Mattoon, M. Dawn, L. Freeman-Cook, B. Schweitzer, and M. B. Gerstein (2009, Dec). Robust-linear-model normalization to reduce technical variability in functional protein microarrays. *J Proteome Res* 8(12), 5451–5464. 104
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown (1995, Oct). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science* 270(5235), 467–470. 8
- Schweitzer, B., S. Wiltshire, J. Lambert, S. O'Malley, K. Kukanskis, Z. Zhu, S. F. Kingsmore, P. M. Lizardi, and D. C. Ward (2000, Aug). Inaugural article: immunoassays with rolling circle dna amplification: a versatile platform for ultrasensitive antigen detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18), 10113–10119. 100
- Sequist, L. V., D. W. Bell, T. J. Lynch, and D. A. Haber (2007, Feb). Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25(5), 587–595. 106
- Serke, M. and N. Schönfeld (2007, May). [diagnosis and staging of lung cancer]. *Dtsch Med Wochenschr* 132(21), 1165–1169. 2
- Shah, R. B. (2009, Nov). Current perspectives on the gleason grading of prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133(11), 1810–1816. 6, 109
- Sheehan, K. M., V. S. Calvert, E. W. Kay, Y. Lu, D. Fishman, V. Espina, J. Aquino, R. Speer, R. Araujo, G. B. Mills, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, and J. D. Wulfkühle (2005, Apr). Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 4(4), 346–55. 10
- Sheehan, K. M., C. Gulmann, G. S. Eichler, J. N. Weinstein, H. L. Barrett, E. W. Kay, R. M. Conroy, L. A. Liotta, and E. F. Petricoin (2008, Jan). Signal pathway profiling of epithelial and stromal compartments of colonic carcinoma reveals epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 27(3), 323–331. 10
- Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010, Sep). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 24(18), 1967–2000. 111
- Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J. S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C. M. Perou, P. E. Lønning, P. O. Brown, A.-L. Børresen-Dale, and D. Botstein (2003, Jul). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14), 8418–8423. 108

- Sos, M. L., K. Michel, T. Zander, J. Weiss, P. Frommolt, M. Peifer, D. Li, R. Ullrich, M. Koker, F. Fischer, T. Shimamura, D. Rauh, C. Mermel, S. Fischer, I. Stückrath, S. Heynck, R. Beroukhim, W. Lin, W. Winckler, K. Shah, T. LaFramboise, W. F. Moriarty, M. Hanna, L. Tolosi, J. Rahnenführer, R. Verhaak, D. Chiang, G. Getz, M. Hellmich, J. Wolf, L. Girard, M. Peyton, B. A. Weir, T.-H. Chen, H. Greulich, J. Barretina, G. I. Shapiro, L. A. Garraway, A. F. Gazdar, J. D. Minna, M. Meyerson, K.-K. Wong, and R. K. Thomas (2009, Jun). Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 119(6), 1727–1740. 90, 106
- Speer, R., J. Wulfkühle, V. Espina, R. Auraño, K. H. Edmiston, L. A. Liotta, and E. F. Petricoin (2007, Jan). Development of reverse phase protein microarrays for clinical applications and patient-tailored therapy. *Cancer genomics & proteomics* 4(3), 157–64. 10, 100
- Spurrier, B., P. Honkanen, A. Holway, K. Kumamoto, M. Terashima, S. Takenoshita, G. Wababayashi, J. Austin, and S. Nishizuka (2008, Jul). Protein and lysate array technologies in cancer research. *Biotechnology Advances* 26(4), 361–369. 102
- Spurrier, B., S. Ramalingam, and S. Nishizuka (2008, Jan). Reverse-phase protein lysate microarrays for cell signaling analysis. *Nat Protoc* 3(11), 1796–808. 102
- Spurrier, B., F. L. Washburn, S. Asin, S. Ramalingam, and S. Nishizuka (2007, Sep). Antibody screening database for protein kinetic modeling. *Proteomics* 7(18), 3259–3263. 33
- Stanislaus, R., M. Carey, H. F. Deus, K. Coombes, B. T. Hennessy, G. B. Mills, and J. S. Almeida (2008, Jan). Rppaml/rims: A meta data format and an information management system for reverse phase protein arrays. *BMC Bioinformatics* 9(1), 555. 11
- Stinchcombe, T. E. and M. A. Socinski (2009, Apr). Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6(2), 233–241. 2
- Stumpp, M. T. and P. Amstutz (2007, Mar). Darpins: a true alternative to antibodies. *Curr Opin Drug Discov Devel* 10(2), 153–159. 99
- Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers, and W. L. Gerald (2010, Jul). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18(1), 11–22. 7, 108
- Thomas, G. V., S. Horvath, B. L. Smith, K. Crosby, L. A. Lebel, M. Schrage, J. Said, J. D. Kernion, R. E. Reiter, and C. L. Sawyers (2004, Dec). Antibody-based profiling of the phosphoinositide 3-kinase pathway in clinical prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10(24), 8351–8356. 108

REFERENZEN

- Tibes, R., Y. Qiu, Y. Lu, B. Hennessy, M. Andreeff, G. B. Mills, and S. M. Kornblau (2006, Oct). Reverse phase protein array: validation of a novel proteomic technology and utility for analysis of primary leukemia specimens and hematopoietic stem cells. *Mol Cancer Ther* 5(10), 2512–2521. Method: denaturation after lysis, serial dilution, DAKO signal amplification. 99
- Tolosa, E. M., L. Harpole, and D. C. McCrory (2003, Jan). Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest* 123(1 Suppl), 137S–146S. 2
- Tomlins, S. A., A. Bjartell, A. M. Chinnaiyan, G. Jenster, R. K. Nam, M. A. Rubin, and J. A. Schalken (2009, Aug). Ets gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol* 56(2), 275–286. 111
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, S. Perner, S. M. Dhanasekaran, R. Mehra, X.-W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J. E. Montie, R. B. Shah, K. J. Pienta, M. A. Rubin, and A. M. Chinnaiyan (2005, Oct). Recurrent fusion of tmprss2 and ets transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310(5748), 644–648. 8
- Tosoian, J. and S. Loeb (2010). Psa and beyond: the past, present, and future of investigative biomarkers for prostate cancer. *ScientificWorldJournal* 10, 1919–1931. 5
- True, L., I. Coleman, S. Hawley, C.-Y. Huang, D. Gifford, R. Coleman, T. M. Beer, E. Gelmann, M. Datta, E. Mostaghel, B. Knudsen, P. Lange, R. Vessella, D. Lin, L. Hood, and P. S. Nelson (2006, Jul). A molecular correlate to the gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29), 10991–10996. 12
- Tsai, C. M., K. T. Chang, R. P. Perng, T. Mitsudomi, M. H. Chen, C. Kadoyama, and A. F. Gazdar (1993, Jun). Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with her-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. *J Natl Cancer Inst* 85(11), 897–901. 106
- Tsao, M.-S., A. Sakurada, J.-C. Cutz, C.-Q. Zhu, S. Kamel-Reid, J. Squire, I. Lorimer, T. Zhang, N. Liu, M. Daneshmand, P. Marrano, G. da Cunha Santos, A. Lagarde, F. Richardson, L. Seymour, M. Whitehead, K. Ding, J. Pater, and F. A. Shepherd (2005, Jul). Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353(2), 133–144. 106
- Uhlén, M., E. Björling, C. Agaton, C. A.-K. Szgyarto, B. Amini, E. Andersen, A.-C. Andersson, P. Angelidou, A. Asplund, C. Asplund, L. Berglund, K. Bergström, H. Brumer, D. Cerjan, M. Ekström, A. Elobeid, C. Eriksson, L. Fagerberg, R. Falk, J. Fall, M. Forsberg, M. G. Björklund, K. Gumbel, A. Halimi, I. Hallin, C. Hamsten, M. Hansson, M. Hedhammar, G. Hercules, C. Kampf, K. Larsson, M. Lindskog, W. Lodewyckx, J. Lund, J. Lundeborg, K. Magnusson, E. Malm, P. Nilsson, J. Odling, P. Oksvold, I. Olsson, E. Oster, J. Ottosson, L. Paavilainen, A. Persson, R. Rimini, J. Rockberg, M. Runeson, A. Sivertsson, A. Sköllermo, J. Steen, M. Stenvall, F. Sterky, S. Strömberg, M. Sundberg, H. Tegel, S. Tourle, E. Wahlund,

- A. Waldén, J. Wan, H. Wernérus, J. Westberg, K. Wester, U. Wrethagen, L. L. Xu, S. Hober, and F. Pontén (2005, Dec). A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* 4(12), 1920–1932. 33
- van Zandwijk, N., A. Mathy, L. Boerrigter, H. Ruijter, I. Tielen, D. de Jong, P. Baas, S. Burgers, and P. Nederlof (2007, Jan). Egfr and kras mutations as criteria for treatment with tyrosine kinase inhibitors: retro- and prospective observations in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 18(1), 99–103. 3
- Vanmeter, A. J., A. S. Rodriguez, E. D. Bowman, J. Jen, C. C. Harris, J. Deng, V. S. Calvert, A. Silvestri, C. Fredolini, V. Chandhoke, E. F. Petricoin, L. A. Liotta, and V. Espina (2008, Apr). Laser capture microdissection and protein microarray analysis of human non-small cell lung cancer: Differential epidermal growth factor receptor (egfr) phosphorylation events associated with mutated egfr compared with wild type. *Molecular & Cellular Proteomics* 7(10), 1902–1924. 10
- Wakelee, H. A., P. Bernardo, D. H. Johnson, and J. H. Schiller (2006, May). Changes in the natural history of nonsmall cell lung cancer (nscLc)—comparison of outcomes and characteristics in patients with advanced nscLc entered in eastern cooperative oncology group trials before and after 1990. *Cancer* 106(10), 2208–2217. 2
- Wang, S., A. J. Garcia, M. Wu, D. A. Lawson, O. N. Witte, and H. Wu (2006, Jan). Pten deletion leads to the expansion of a prostatic stem/progenitor cell subpopulation and tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5), 1480–1485. 108
- Weissenstein, U., M. J. Schneider, M. Pawlak, J. Cienas, S. Eppenberger-Castori, P. Oroszlan, S. Ehret, A. Geurts-Moespot, F. C. G. J. Sweep, and U. Eppenberger (2006, Mar). Protein chip based miniaturized assay for the simultaneous quantitative monitoring of cancer biomarkers in tissue extracts. *Proteomics* 6(5), 1427–36. 99
- Wohlschläger, J., C. Wittekind, and D. Theegarten (2010, Sep). [new tmn classification of malignant lung tumours]. *Pathologie* 31(5), 355–360. 2
- Wolf, A. M. D., R. C. Wender, R. B. Etzioni, I. M. Thompson, A. V. D’Amico, R. J. Volk, D. D. Brooks, C. Dash, I. Guessous, K. Andrews, C. DeSantis, R. A. Smith, and A. C. S. P. C. A. Committee (2010). American cancer society guideline for the early detection of prostate cancer: update 2010. *CA Cancer J Clin* 60(2), 70–98. 6
- Wollbold, J., R. Huber, D. Pohlert, D. Koczan, R. Guthke, R. W. Kinne, and U. Gausmann (2009, Jan). Adapted boolean network models for extracellular matrix formation. *BMC systems biology* 3, 77. 112
- Wulfkühle, J. D., J. A. Aquino, V. S. Calvert, D. A. Fishman, G. Coukos, L. A. Liotta, and E. F. Petricoin (2003, Nov). Signal pathway profiling of ovarian cancer from human tissue specimens using reverse-phase protein microarrays. *Proteomics* 3(11), 2085–2090. 10, 100

REFERENZEN

- Wulfkuhle, J. D., R. Speer, M. Pierobon, J. Laird, V. Espina, J. Deng, E. Mammano, S. X. Yang, S. M. Swain, D. Nitti, L. J. Esserman, C. Belluco, L. A. Liotta, and E. F. Petricoin (2008, Apr). Multiplexed cell signaling analysis of human breast cancer applications for personalized therapy. *J Proteome Res* 7(4), 1508–1517. 10, 100, 102
- Yeh, J. J., E. D. Routh, T. Rubinas, J. Peacock, T. D. Martin, X. J. Shen, R. S. Sandler, H. J. Kim, T. O. Keku, and C. J. Der (2009, Apr). Kras/braf mutation status and erk1/2 activation as biomarkers for mek1/2 inhibitor therapy in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 8(4), 834–843. 5
- Yevtushenko, S. A. (2000). System of data analysis concept explorer. In *Proceedings of the 7th national conference on Artificial Intelligence KII-2000*. 14, 83
- Zhang, L., Q. Wei, L. Mao, W. Liu, G. Mills, and K. Coombes (2009, Jan). Serial dilution curve: a new method for analysis of reverse phase protein array data. *Bioinformatics* 25, 650–654. 57, 63, 69, 101
- Zhang, Z., D. G. Rosen, J. L. Yao, J. Huang, and J. Liu (2006, Oct). Expression of p14arf, p15ink4b, p16ink4a, and dcr2 increases during prostate cancer progression. *Mod Pathol* 19(10), 1339–1343. 111
- Zhu, M.-L., J. V. Partin, E. M. Bruckheimer, S. E. Strup, and N. Kyprianou (2008, Feb). Tgf-beta signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer cells. *Prostate* 68(3), 287–295. 108
- Zohrabian, V. M., B. Forzani, Z. Chau, R. Murali, and M. Jhanwar-Uniyal (2009, Jan). Rho/rock and mapk signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. *Anticancer Res* 29(1), 119–123. 1

Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben. Die direkten oder indirekten Übernahmen von Methoden, Proben oder Ergebnissen Dritter wurden als solche spezifiziert. Diese Arbeit wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Diese Arbeit wurde erstellt vom 1. Oktober 2007 bis 30. November 2010, betreut von Dr. Ulrike Korf am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Heidelberg, den 30.11.2010

Heiko Mannsperger