

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Proteomik und Bioanalytik

## **Proteinanalyse klinisch relevanter Signalmoleküle aus Formalin-fixierten Tumorgeweben**

Claudia Jennifer Wolff

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Schemann  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Bernhard Küster  
2. apl. Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker

Die Dissertation wurde am 24.05.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch das Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 27.07.2012 angenommen.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY .....</b>	<b>7</b>
1.1	Zusammenfassung.....	7
1.2	Summary.....	8
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Molekulare Grundlagen der Krebsentstehung .....</b>	<b>9</b>
2.1.1	HER-Familie.....	10
2.1.2	PI3K/Akt -Signalweg.....	11
2.1.3	MAPK-Signalweg .....	13
2.1.4	Hitzeschock-Proteine.....	14
2.1.5	Steroidhormonrezeptoren .....	15
2.1.6	Plasminogen-Aktivierungssystem.....	16
<b>2.2</b>	<b>Proteinanalyse aus Formalin-fixierten Geweben.....</b>	<b>18</b>
2.2.1	Grundlagen der Formalin-Fixierung .....	18
2.2.2	Analyse von Makromolekülen aus Formalin-fixierten Gewebeproben .....	19
2.2.3	Proteinextraktion aus FFPE-Geweben nach Becker .....	21
<b>2.3</b>	<b>Reverse Phase Protein-Mikroarray .....</b>	<b>21</b>
2.3.1	Verfahren und Verwendung des Reverse Phase Protein-Mikroarrays.....	22
2.3.2	Quantifizierbarkeit und Sensitivität .....	25
2.3.3	Antikörpervalidierung .....	26
2.3.4	Auswertung von Reverse Phase Protein-Mikroarrays.....	26
<b>2.4</b>	<b>Mammakarzinom .....</b>	<b>32</b>
2.4.1	Diagnose.....	32
2.4.2	Klassifikation und zielgerichtete Therapie .....	33
<b>2.5</b>	<b>Ösophaguskarzinom.....</b>	<b>37</b>
2.5.1	Diagnose und Therapie.....	37
2.5.2	Therapieverbesserung beim ösophagealen Adenokarzinom.....	39
<b>2.6</b>	<b>Ziele der Arbeit.....</b>	<b>40</b>

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeine Puffer und Lösungen .....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese .....	42
3.1.2	Lösungen für die Immundetektion .....	43
3.1.3	Lysepuffer für Gefriergewebe.....	44
3.1.4	Lysepuffer für FFPE-Gewebe.....	44
<b>3.2</b>	<b>Allgemeine Reagenzien und Chemikalien.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen .....</b>	<b>46</b>
<b>3.4</b>	<b>Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>46</b>
<b>3.5</b>	<b>Antikörper .....</b>	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Rekombinante Proteine.....</b>	<b>48</b>
<b>3.7</b>	<b>ELISA-Kits.....</b>	<b>48</b>
<b>3.8</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>48</b>
<b>3.9</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>49</b>
<b>3.10</b>	<b>Software.....</b>	<b>49</b>
<b>3.11</b>	<b>Eingesetzte Gewebeproben .....</b>	<b>50</b>
3.11.1	Gewebe für die Optimierung der Proteinextraktion aus Formalin-fixierten Geweben.....	50
3.11.2	Mammakarzinomgewebe für die uPA und PAI-1 assoziierte Signalwegsanalyse .....	51
3.11.3	Gewebe für den Vergleich von Primärtumoren des Mammakarzinoms und assoziierter Lymphknotenmetastasen.....	52
3.11.4	Mammakarzinomgewebe zur RPPA Analyse der HER-Rezeptoren .....	54
3.11.5	Gewebe des Ösophaguskarzinoms zur Markeranalyse.....	55
3.11.6	Einverständniserklärung der Patienten .....	56
<b>3.12</b>	<b>Herstellung von FFPE-Gewebeblöcken .....</b>	<b>56</b>
<b>3.13</b>	<b>Herstellung von FFPE-Zellpellets.....</b>	<b>57</b>
<b>3.14</b>	<b>Proteinextraktion.....</b>	<b>58</b>
3.14.1	Proteinextraktion aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben .....	58
3.14.2	Proteinextraktion aus schockgefrorenen Geweben.....	58
3.14.3	Proteinextraktion aus Zellkulturen.....	59

<b>3.15</b>	<b>Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....</b>	<b>59</b>
<b>3.16</b>	<b>Methoden zur Umpufferung der Proteinlysate.....</b>	<b>60</b>
3.16.1	Aufreinigung über Entsalzungssäulen.....	60
3.16.2	Dialyse.....	60
3.16.3	SDS-Ausfällung.....	61
3.16.4	Proteinfällungen.....	61
<b>3.17</b>	<b>Gesamtproteinbestimmung .....</b>	<b>63</b>
3.17.1	Bradford-Assay .....	63
3.17.2	Sypro-Ruby-Färbung.....	63
<b>3.18</b>	<b>Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassays (ELISA) .....</b>	<b>64</b>
3.18.1	Femtelle ELISA.....	64
3.18.2	ELISA gegen denaturiertes uPA und PAI-1 .....	65
<b>3.19</b>	<b>Western Blot .....</b>	<b>66</b>
3.19.1	SDS-Gelelektrophorese.....	66
3.19.2	Transfer der Proteine .....	67
3.19.3	Immundetektion.....	68
<b>3.20</b>	<b>Reverse Phase Protein-Mikroarray .....</b>	<b>68</b>
3.20.1	Spotten der Proteinlysate .....	68
3.20.2	Immundetektion.....	69
3.20.3	Quantifizierung der Intensität mit MicroVigene .....	69
3.20.4	Bestimmung absoluter Proteinkonzentrationen .....	71
<b>3.21</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>71</b>
3.21.1	Statistische Tests und Korrelationsanalysen.....	71
3.21.2	Hierarchische Clusteranalysen .....	73
3.21.3	Überlebensanalysen.....	73
3.21.4	Multiples Testen.....	74
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimierung der Proteinextraktion aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben .....</b>	<b>75</b>
4.1.1	Verbesserung der Pufferzusammensetzung .....	75
4.1.2	Optimierung der Temperaturschritte .....	84

<b>4.2</b>	<b>Etablierung des Reverse Phase Protein-Mikroarrays .....</b>	<b>85</b>
4.2.1	Antikörpervalidierung .....	85
4.2.2	Nachweis der Reproduzierbarkeit .....	87
4.2.3	Überprüfung der Resultate des Reverse Phase Protein Mikroarrays.....	90
<b>4.3</b>	<b>Detektion der prognostischen Faktoren uPA und PAI-1 in Formalin-fixierten und Paraffin- eingebetteten Geweben .....</b>	<b>91</b>
4.3.1	Proteinlysate aus FFPE-Geweben im klinischen ELISA .....	92
4.3.2	Verringerung der SDS und $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration .....	94
4.3.3	Umpufferung durch Fällung .....	95
4.3.4	Entwicklung eines ELISA gegen denaturiertes uPA und PAI-1 .....	97
<b>4.4</b>	<b>Analyse von uPA/PAI-1 assoziierten Signalwegen im Mammakarzinom .....</b>	<b>99</b>
4.4.1	Korrelation der uPA und PAI-1 Expression mit Schlüssel-Signalmolekülen der Tumorprogression in Mammakarzinomen .....	99
4.4.2	Überprüfung der Beteiligung von uPA im Erk/Stat- und PAI-1 im Akt-Signalweg .....	102
4.4.3	Analyse der Signalwegsaktivierung in einzelnen Tumoren .....	103
<b>4.5</b>	<b>Expressionsvergleich zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase des Mammakarzinom .....</b>	<b>105</b>
<b>4.6</b>	<b>Untersuchung der Expression der Proteine der HER-Familie im Mammakarzinom .....</b>	<b>108</b>
4.6.1	Bestimmung des HER2-Status mittels Reverse Phase Protein-Mikroarray .....	108
4.6.2	Reanalyse der nicht-übereinstimmenden Fälle .....	111
4.6.3	Untersuchung des Aktivierungsstatus der HER-Rezeptoren.....	112
<b>4.7</b>	<b>Analyse möglicher Markerproteine beim Adenokarzinom des Ösophagus .....</b>	<b>116</b>
4.7.1	Schwellenwertanalyse 17 Ösophagus-relevanter Proteine.....	117
4.7.2	Hierarchische Clusteranalyse in Bezug auf Proteine der HER-Familie sowie auf HSP27 und dessen Phosphorylierungen .....	120
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>124</b>
<b>5.1</b>	<b>Verbesserte Proteinextraktion aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben. 124</b>	
5.1.1	Vorteile des Extraktionspuffers LMA.....	124
5.1.2	Optimierte Extraktionsbedingungen .....	128
<b>5.2</b>	<b>Stärken und Schwächen des Reverse Phase Protein-Mikroarrays .....</b>	<b>129</b>
5.2.1	Antikörpervalidierung .....	129
5.2.2	Reproduzierbarkeit des Reverse Phase Protein Mikroarrays .....	131
5.2.3	Widerspiegelung der biologischen Realität durch den RPPA.....	132

<b>5.3</b>	<b>Analyse von uPA und PAI-1 aus Formalin-fixierten Geweben mittels ELISA.....</b>	<b>133</b>
<b>5.4</b>	<b>Die Rolle von uPA und PAI-1 im Mammakarzinom .....</b>	<b>135</b>
5.4.1	Diskussion der erhaltenen Werte .....	135
5.4.2	PAI-1 assoziierte Signalwegsmoleküle.....	136
5.4.3	uPA assoziierte Signalwegsproteine.....	140
<b>5.5</b>	<b>Unterschiede zwischen Primärtumor und Lymphknoten-metastasen des Mammakarzinoms .</b>	<b>143</b>
5.5.1	Expressionsunterschiede von uPA und PAI-1 .....	144
5.5.2	Expressionsunterschiede von ER $\alpha$ und PR .....	144
5.5.3	Expressionsunterschiede von HER2.....	145
<b>5.6</b>	<b>Etablierung eines quantitativen Ansatzes zur HER2-Bestimmung im Mammakarzinom .....</b>	<b>146</b>
<b>5.7</b>	<b>Prognostische Bedeutung der aktivierten Formen der HER-Proteine im Mammakarzinom .....</b>	<b>149</b>
5.7.1	Nachweis von p-HER2-Expression in klinisch HER2-negativen Mammakarzinomen .....	149
5.7.2	Aktivierungsstatus der HER-Rezeptoren im Zusammenhang mit der HER2-Expression .....	151
<b>5.8</b>	<b>Identifikation neuer molekularer Marker im Adenokarzinom des Ösophagus .....</b>	<b>152</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>154</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>155</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>165</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>167</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>169</b>
	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>171</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>173</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

## 1.1 Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist in der Onkologie ein deutlicher Trend weg von der systemischen hin zur personalisierten Therapie erkennbar. Für einige Tumorarten, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, stehen inzwischen mehrere molekulare Marker nicht nur zur Unterstützung der Behandlungsstrategie sondern auch zur individuellen Therapie zur Verfügung. Problematisch ist jedoch, dass für die Marker häufig keine quantitative Bestimmung an den klinisch relevanten Formalin-fixierten Geweben möglich ist. Darüber hinaus ist in vielen Entitäten noch zu wenig über die Tumorbilogie bekannt um gezielt geeignete Marker identifizieren zu können. Die in den letzten Jahren entwickelte Proteinextraktion aus Formalin-fixierten Geweben ist ein wichtiger Schritt die genannten Hindernisse zu überwinden. Bei der Extraktion von sehr lange fixierten Proben oder alten Proben sind die bisherigen Protokolle jedoch nicht ausreichend.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodik daher besonders im Hinblick auf diese Aspekte erfolgreich weiterentwickelt. Mittels des optimierten Extraktionsverfahrens wurde versucht, drei molekulare Marker des Mammakarzinoms (uPA, PAI-1, HER2) in fixierten Geweben zu bestimmen. Für die invasionsassoziierten Proteine uPA und PAI-1 sollte dies zunächst mit Hilfe eines klinisch zugelassenen ELISA erreicht werden. Dieser Assay zeigte sich jedoch mit denaturierten Proteinen aus fixierten Geweben nicht kompatibel. Erst durch den Einsatz der Reverse Phase Protein Mikroarray (RPPA) Technologie konnten uPA und PAI-1 sowie deren assoziierte Proteinnetzwerke dargestellt und darüber hinaus eine absolute Quantifizierung von HER2 erreicht werden. Die Methodik des RPPA erlaubt die zeitgleiche Analyse einer Vielzahl von Tumoren hinsichtlich der Expression und Aktivierung von Proteinnetzwerken an klinisch relevantem, Formalin-fixiertem Material und ist damit bestens für solch eine Analyse geeignet. So konnten mit dieser Methode sowohl im Mammakarzinom (p-HER2) als auch im Ösophaguskarzinom (p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>, HER2) potentieller Biomarker identifiziert werden.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der RPPA in Kombination mit der von mir optimierten Methode der Proteinextraktion aus fixierten Geweben sowohl auf Forschungsebene als auch in der klinischen Routine einen wichtigen Beitrag zur Weiterentwicklung der personalisierten Medizin leisten kann.



## 1.2 Summary

In oncology a clear trend away from systemic therapies towards targeted treatment was recognizable in recent years. For some tumor types, like for example breast cancer, several molecular markers are available to support both treatment decision and personalised therapy. However problems still occur when it comes to the quantitative determination of these markers in clinical relevant, formalin-fixed tissues. Moreover in many entities only very little is known about the tumor biology. This knowledge however would be necessary to systematically identify novel molecular marker. The extraction of proteins from clinical tissues which was developed during the last years is an important step to overcome the mentioned obstacles. However, the current protocols are stretched to their limits if long-time stored or over-fixed samples are used for protein extraction.

To deal with this issue an enhanced extraction protocol was developed in this thesis. Applying the optimised method the determination of three molecular breast cancer markers (uPA, PAI-1, HER2) should be enabled. For the two invasion-associated proteins uPA and PAI-1 this should be achieved first by using the clinically approved FemtoELISA. Yet, this assay turned out to be incompatible with denatured proteins from formalin-fixed tissues. Not until the application of the Reverse Phase Protein Microarray (RPPA) approach it was possible to determine uPA and PAI-1 together with their associated protein networks. This high-throughput technology allows the parallel screening of a plurality of tumors for the expression and activation of whole protein networks. This method was also used for an absolute HER2 quantification from fixed tissue which was reached for the first time in this study. Furthermore capitalising the mentioned advantages of the RPPA, p-HER2 could be identified as a potential biomarker in breast cancer patients and p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> and HER2 as markers in oesophageal adenocarcinoma.

In conclusion, the results of this thesis show that the RPPA in combination with the optimised protein extraction method may contribute to the advancement of personalised medicine – both at research level and in the clinical routine.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Molekulare Grundlagen der Krebsentstehung

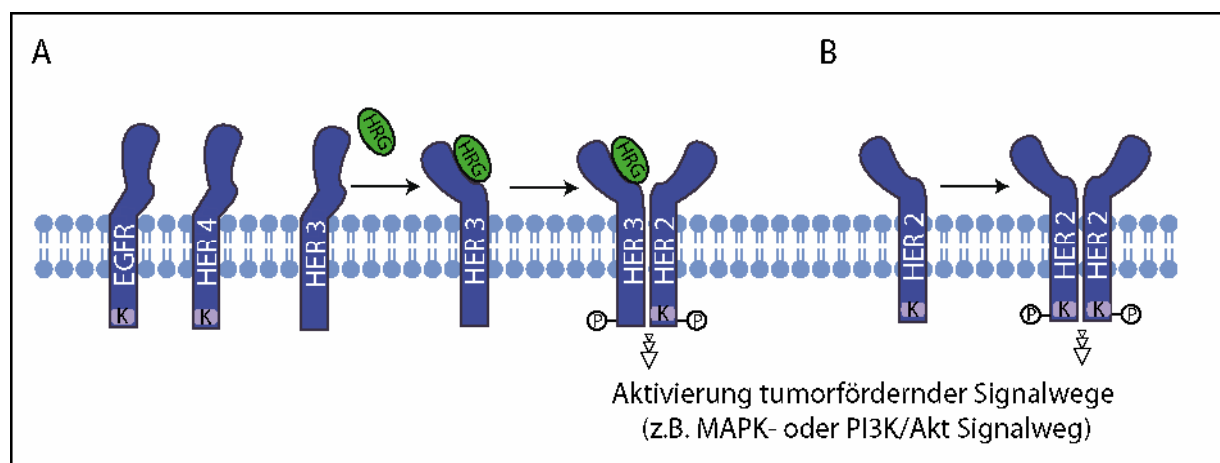
Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat gezeigt, dass Krebs eine multifaktorielle Krankheit darstellt, die durch genetische Veranlagung, Umweltfaktoren und im Laufe des Lebens erworbene Veränderungen im Erbgut entsteht. Mutationen in Proto-Onkogenen sowie in Tumorsuppressorgenen führen zu einer Deregulation der Zellteilung und damit letztendlich zur Tumorentstehung. Hanahan und Weinberg beschrieben im Jahr 2000 die sechs wesentlichen Kennzeichen von Tumorzellen: 1. Unabhängigkeit von Wachstumssignalen der Umgebung, 2. unbegrenztes Teilungspotential, 3. Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, 4. Umgehung der Apoptose, 5. gesteigerte Angiogenese und 6. Fähigkeit zur Metastasierung (Hanahan et al. 2000).

Auch nach heutigem Kenntnisstand kann die Relevanz der genannten Merkmale bestätigt werden. Allerdings legte die Forschung der letzten Jahre offen, dass weitere bisher nicht berücksichtigte Mechanismen eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung spielen. 2011 ergänzten die Autoren Ihre Liste daher um zwei weitere Kennzeichen: die Reprogrammierung des Energiestoffwechsels in Tumorzellen und die Fähigkeit, der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen (Hanahan et al. 2011).

Die Aufgabe der Forschung der nächsten Jahre wird es sein, die molekularen Grundlagen dieser phänotypischen Ausprägungen genauer zu ergründen. Bisher können zwar einzelne Mutationen oder Protein-Expressionshöhen mit dem Ansprechen auf Therapien assoziiert werden, es fehlt jedoch ein umfassendes Verständnis der relevanten Signalwege. Diese sind vor dem Hintergrund der zunehmenden Relevanz der personalisierten Medizin jedoch von besonderer Bedeutung. Bis heute sprechen auch bei zielgerichteten Therapien noch immer viele der Patienten nicht auf die empfohlene Therapie an, obwohl sie Marker aufweisen, die die Wirksamkeit des Medikaments eigentlich vorhersagen. Ein bekanntes Beispiel in diesem Kontext ist die Therapie von Mamma- oder Magenkarzinompatienten mit dem gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) gerichteten Antikörper Trastuzumab. Im nächsten Kapitel soll daher näher auf die Familie der HER-Rezeptoren sowie deren klinische Relevanz eingegangen werden.

### 2.1.1 HER-Familie

Gemeinsam mit HER1 (auch EGFR; epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), HER3 und HER4 bildet HER2 eine Proteinfamilie von vier strukturell ähnlichen Transmembranproteinen, die bis auf HER3 eine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität besitzen. Die Bindung von extrazellulären Liganden, führt zu einer Konformationsänderung, die die Homo- bzw. Heterodimerisierung der Rezeptoren und schließlich deren Aktivierung durch Transphosphorylierung ermöglicht (Heldin 1995; Hubbard 2002). Zu den Liganden der HER-Familie zählen unter anderem EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor), TGF $\alpha$  (Transformierender Wachstumsfaktor  $\alpha$ ) und verschiedene Isoformen der Heregulin-Familie (Hynes et al. 2005). HER2 besitzt keine bekannte Ligandenbindungsstelle und ist daher stets zu Dimerisierung bereit (Abbildung 2-1). Die phosphorylierten HER-Dimere aktivieren zahlreiche nachgeschaltete Signalwege, die diverse Prozesse, wie Differenzierung, Migration, Proliferation und Überleben regulieren. Beispiele für HER-regulierte Signalwege sind der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalweg oder der PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B)-Signalweg (Hynes et al. 2005).



**Abbildung 2-1 Dimerisierung und Aktivierung der Mitglieder der HER-Familie.** Bei EGFR, HER3 und HER4 führt die Bindung eines Liganden (hier HRG: Heregulin) zur Dimerisierung und damit Phosphorylierung des Rezeptors (A). HER2 kann unabhängig von extrazellulären Signalen dimerisieren (B). Da HER3 keine intrinsische Kinaseaktivität (K) besitzt, ist dieser Rezeptor auf eine Heterodimerisierung angewiesen, während die anderen Rezeptoren auch Homodimere bilden können.

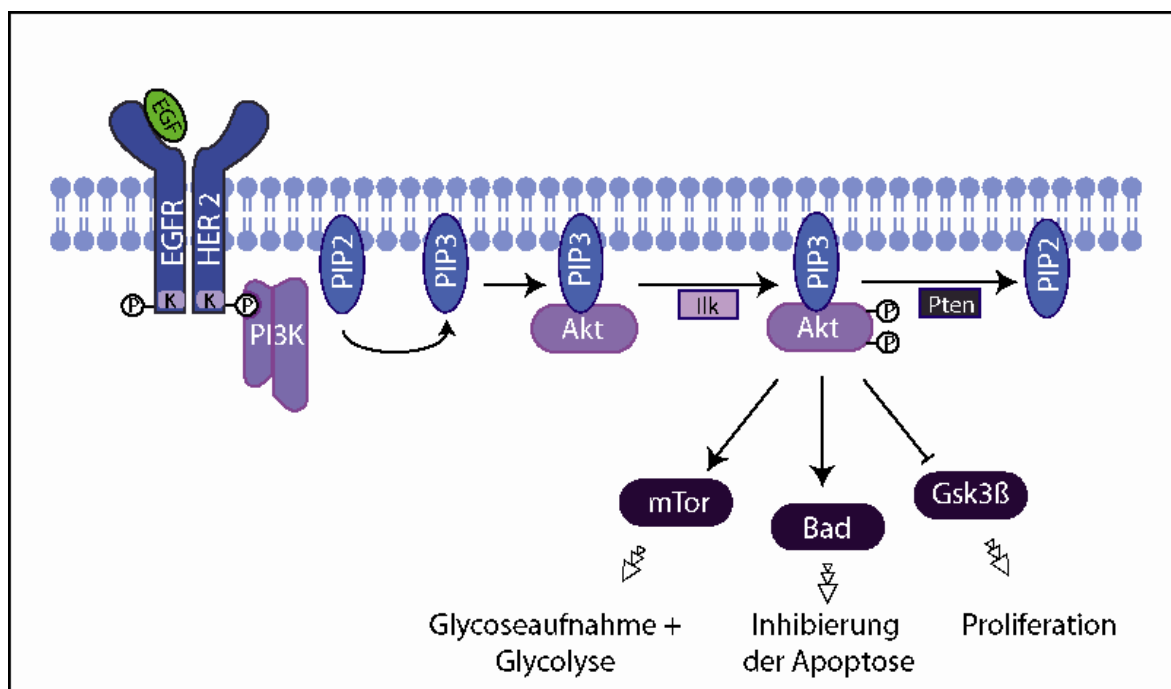
In vielen Tumorarten wie zum Beispiel beim Mammakarzinom kommt es zu einer Überexpression der HER-Rezeptoren. Durch die Möglichkeit unabhängig von der Bindung

eines Liganden zu dimerisieren, hat dies vor allem bei HER2 eine erhöhte Aktivierung zur Folge. Aber auch für die anderen Vertreter der Familie ist bekannt, dass eine Überexpression zu einer malignen Transformation der Zelle beiträgt. Vor allem aber nicht ausschließlich erlangen die Zellen durch eine Fehlregulation der HER-Rezeptoren unbegrenztes Teilungspotential, Resistenz gegenüber Chemo- und Hormontherapien, Umgehung der Apoptose sowie gesteigerte Angiogenese (Hudis 2007; Olayioye 2001). Aufgrund dieser vielfältigen Auswirkungen auf das Tumorstadium rückte HER2 schon früh in den Fokus der Wissenschaftler. Im Jahr 2000 wurde Trastuzumab als erster humanisierter monoklonaler Antikörper gegen HER2 bei metastasiertem Brustkrebs mit einer Überexpression an HER2 zugelassen. Die aufgrund dieser individuellen Behandlung erwarteten hohen Ansprechraten wurden jedoch nicht erreicht. Die Anzahl an vollständig ansprechenden Patienten stieg zwar von etwa 20 % (bei Behandlung nur mit Chemotherapie) auf 40 % bei einer Kombinationstherapie (Laino 2009), dennoch bedeutete dies, dass mehr als die Hälfte der HER2-positiven Patienten nicht ausreichend auf die individualisierte Therapie ansprechen. Im Moment wird davon ausgegangen, dass es den resistenten Tumoren gelingt über kompensatorische Signalwege die Inhibierung durch den Antikörper zu umgehen. Um ein genaueres Verständnis für diesen Mechanismus zu bekommen ist es nötig ein detailliertes Bild der Signalwege in Tumorgewebe zu bekommen. Dieses Wissen kann dann dazu beitragen Resistenzen von Tumoren zu vermeiden oder zu umgehen, zum Beispiel durch Kombinationstherapien. Im Folgenden soll daher näher auf den bisherigen Kenntnisstand über die wichtigsten dieser Signalwege eingegangen werden.

### **2.1.2 PI3K/Akt-Signalweg**

Der PI3K/Akt-Signalweg wird hauptsächlich über die oben beschriebenen HER-Rezeptoren sowie andere Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und Integrine mit gebundener fokaler Adhäsionskinase (FAK) aktiviert. Nach Phosphorylierung der Rezeptoren kann PI3K über seine Src Homologiedomäne 2 (SH2)-Domäne an diese binden (Chan et al. 1999; Franke et al. 1995). Durch die Bindung kommt es zur Konformationsänderung und zur Aktivierung der Kinase, die daraufhin PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat) phosphoryliert. PIP3 rekrutiert anschließend Proteinkinasen wie Akt und PDK1 (Phosphoinositid-abhängigen-1-Kinase), die mit ihrer PH

(Pleckstrin-Homolog)-Domäne an PIP3 binden (Rong et al. 2001). Durch die Bindung werden die zwei Phosphorylierungsstellen von Akt freigelegt und sofort durch andere Kinasen, wie Ilk (Integrin-gebundene Kinase), phosphoryliert. In diesem aktivierten Zustand reguliert Akt durch Phosphorylierung zahlreiche Substrate, wie Gsk3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ ), mTor (Rapamycin-Zielprotein) und BAD (Bcl-2-assoziiierter Todespromotor) (Woodgett 2005). Als direkter Gegenspieler von PI3K und Akt ist Pten (Phosphatase and Tensin-Homolog) zu nennen, da es die Dephosphorylierung von PIP3 in PIP2 fördert und damit eine Aktivierung von Akt verhindert (Carnero et al. 2008; Nielsen-Preiss et al. 2003). Die Abbildung 2-2 stellt die beschriebenen Regulationsmechanismen schematisch dar.



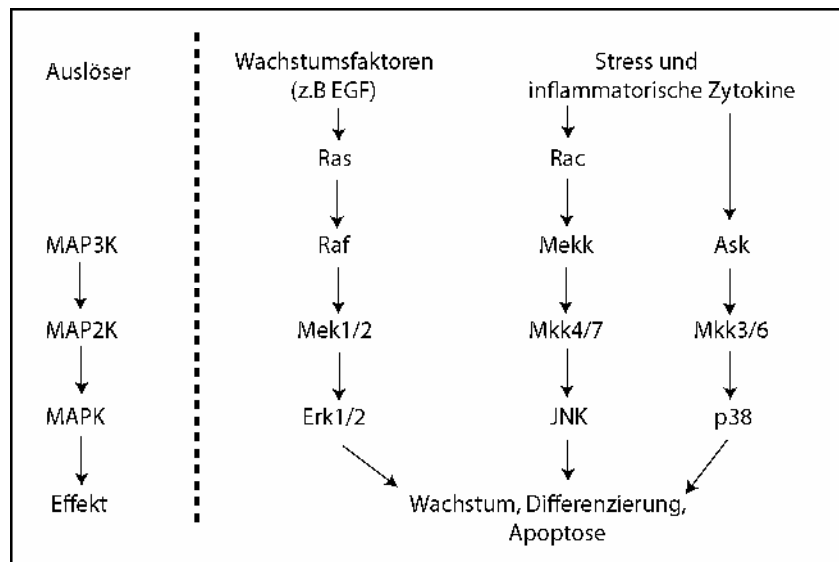
**Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs.** Nach Aktivierung phosphoryliert PI3K PIP2 zu PIP3. Akt bindet an PIP3 und kann anschließend von Kinasen, wie Ilk, phosphoryliert werden. Aktives Akt reguliert durch Phosphorylierung zahlreiche Substrate wie Gsk3 $\beta$ , mTor und Bad. Inhibiert wird dieser Prozess durch Pten, das zur Dephosphorylierung von PIP3 führt.

In vielen Tumoren ist dieser Signalweg konstitutiv aktiv und führt damit zu vermehrter Proliferation, verminderter Apoptose sowie verändertem Glucose-Metabolismus der betroffenen Zellen. Die dauerhafte Aktivierung kann wie oben beschrieben durch eine Überexpression der HER-Rezeptoren erfolgen, oder aber zum Beispiel durch eine inaktivierende Mutation von Pten. Die hohe Relevanz die dem PI3K/Akt-Signalweg bei der

Tumorprogression und Metastasierung zugeschrieben wird, belegt auch die große Anzahl an klinischen Studien, die eine gezielte Inhibierung dieses Signalwegs zur Grundlage haben. Meist handelt es sich dabei um eine Kombination von PI3K- und mTOR-gerichteten Kinaseinhibitoren und einem monoklonalen Antikörper gegen RTK, die wie bereits erwähnt die primären Auslöser der Signalkaskade darstellen. Beispiele sind eine Phase I/II Studie von Novartis mit dem PI3K-Inhibitor BKM120 in Kombination mit dem anti-HER2 Antikörper Trastuzumab gegen solide Tumore (<http://www.novartis oncology.us/research/pipeline/bkm120.jsp>, Stand: Februar, 2012) oder eine Phase III Studie von Merck mit dem mTOR-Inhibitor Ridaforolimus in Weichteilsarkomen (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00538239>, Stand: Februar 2012).

### **2.1.3 MAPK-Signalweg**

Neben dem PI3K/Akt-Signalweg spielt auch der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung. MAP Kinasen gehören zu der Familie der Serin/Threonin-Kinasen. Die bekanntesten Vertreter sind Erk1/2 (extrazellulär regulierte Kinase1/2), Jnk (Jun N-terminale Kinase) und p38. Erk1/2 wird vor allem nach Stimulation von RTK durch Wachstumsfaktoren aktiviert, während Jnk und p38 vor allem responsiv auf Stressfaktoren wie Hitzeschock, Hypoxie oder Zytokin-Stimulation reagieren (Übersicht in (Pearson et al. 2001)). Die Aktivierung erfolgt jedoch nicht direkt, sondern über eine mehrstufige Phosphorylierungskaskade. Typischerweise führen die genannten extrazellulären Signale zunächst zur Aktivierung einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (Mkkk). Diese aktiviert, wie der Name impliziert, eine MAP-Kinase-Kinase (Mkk), welche wiederum zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der oben erwähnten MAPK führt. Ebenso wie auf Ebene der MAPK gibt es auch auf der Ebene der MAP3K und der MAP2K verschiedene Vertreter, die mit unterschiedlichen extrazellulären Bedingungen in Zusammenhang gebracht werden. Abbildung 2-3 zeigt einen Überblick über mögliche Kaskaden. Die Signalweiterleitung durch die phosphorylierte MAPK wird entweder durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NFκB, c-fos, c-myc erreicht, oder durch die Aktivierung zahlreicher weiterer Kinasen wie Rsk (Ribosomale s6-Kinase) oder Prak (p38-regulierte/aktivierte Proteinkinase). Über beide Wege werden Prozesse wie Apoptose, Proliferation oder Differenzierung reguliert.



**Abbildung 2-3 Die Signaltransduktion der verschiedenen MAP-Kinase-Signalwegen.** Die Aktivierung erfolgt über eine Kaskade von Kinasen. Jede MAPK kann von anderen übergeordneten Kinasen aktiviert werden. Abkürzungen: Mekk (MAPK/Erk Kinase Kinase); Ask (Apoptose Signal-regulierende Kinase); Mek (MAPK/Erk Kinase); Mkk (Mitogen-aktivierende Protein Kinase Kinase) (modifiziert nach (Raman et al. 2007))

Kommt es zur Überaktivierung des Signalwegs, werden diese Prozesse verstärkt und es kommt zu einem Ungleichgewicht von wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Signalen. Die konstitutive Aktivierung erfolgt entweder wie im PI3K/Akt-Signalweg durch vermehrte Signale von RTK oder durch aktivierende Mutationen einiger Proteine des Signalwegs. Am häufigsten betroffen sind die MAP3K Raf sowie die GTPase Ras. Sie sind in etwa 30 % aller humanen Krebserkrankungen mutiert (Abrams et al. 1996). Als Konsequenz wurde schon früh mit der Suche nach spezifischen Medikamenten gegen den Signalweg begonnen. Ein Beispiel ist der 2006 für fortgeschrittene solide Tumore zugelassene Raf-Inhibitor Sorafenib. Neben Raf wirkt dieses Medikament auch inhibierend auf Tyrosinkinase des VEGF (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)-Signalweges (Escudier et al. 2007). Durch diesen Wirkungsmechanismus kommt es bei Behandlung mit Sorafenib zur Verminderung der Zellteilung sowie zur Reduktion der Tumor-Angiogenese.

### 2.1.4 Hitzeschock-Proteine

Neben den beiden im obigen Kapitel beschriebenen Auswirkungen des Raf-Inhibitors Sorafenib auf die Tumorprogression, kann der Wirkstoff indirekt auch Einfluss auf die Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen nehmen. Dies ist möglich, da Raf

über Prak zur Aktivierung von Hitzeschock-Proteine führt (New et al. 1998). Hitzeschock-Proteine sind Stress-induzierte Proteine, die solche Resistenzen fördern. Ihre Gemeinsamkeit liegt in der molekularen Chaperonfunktion, welche für die Modulation und Sicherstellung der korrekten Struktur anderer Proteine verantwortlich ist. Die Expression wird unter anderem durch verschiedene zelluläre Stresssituationen wie oxidativer/medikamentöser Stress, Hitze oder Kälte stimuliert. Man unterscheidet bezüglich ihres Molekulargewichts sechs Arten von Hitzeschock-Proteinen: HSP27, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 und HSP100.

In den letzten Jahren haben zahlreiche Publikationen über einen Zusammenhang von Hitzeschock-Proteine mit Tumorerkrankungen berichtet. Aufgrund der zellschützenden Eigenschaften wird der Proteinfamilie eine besondere Bedeutung bei der Prädiktion des Therapieansprechens zugesprochen. So konnte ein hohes Expressionsniveau von HSP27, HSP79 und HSP90 in verschiedenen Tumorarten mit einer Resistenz gegenüber Chemo- oder Strahlentherapie assoziiert werden (Ciocca et al. 2005). Die Konsequenz daraus ist der Versuch, die genannten Therapien mit einer Inhibierung der Hitzeschock-Proteine zu kombinieren. Erste viel versprechende Ergebnisse konnten bisher mit dem der HSP90 Inhibitor 17-AAG erreicht werden (Sharp et al. 2006).

### **2.1.5 Steroidhormonrezeptoren**

Aus der vielfältigen Gruppe der Steroidrezeptoren soll hier nur auf die beiden für die Tumorbilogie relevantesten Vertreter, den Progesteronrezeptor (PR) und den Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), eingegangen werden. Beide liegen in Abwesenheit ihres spezifischen Hormons meist inaktiv und nukleär vor (Giguère 2003; Hager et al. 2000), können jedoch auch cytosolisch auftreten (Germain 2011). Durch Bindung eines Liganden erfahren sie eine Konformationsänderung, die die Homodimerisierung fördert. Nach der Dimerisierung sind sie in der Lage an eine spezifische Region (Hormon-responsive DNA Element (HRE)) in den Promotoren Östrogen- bzw. Progesteron-regulierter Gene zu binden und fördern so die transkriptionelle Aktivierung (Beato et al. 1996). Welche Gene durch die Hormonrezeptoren reguliert werden ist stark gewebeabhängig. Beispiele sind der Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) (Barengolts et al. 1996; Kahlert et al. 2000), HSP27 (Bonkhoff et al. 2000; Moretti-Rojas et al. 1988) und die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase



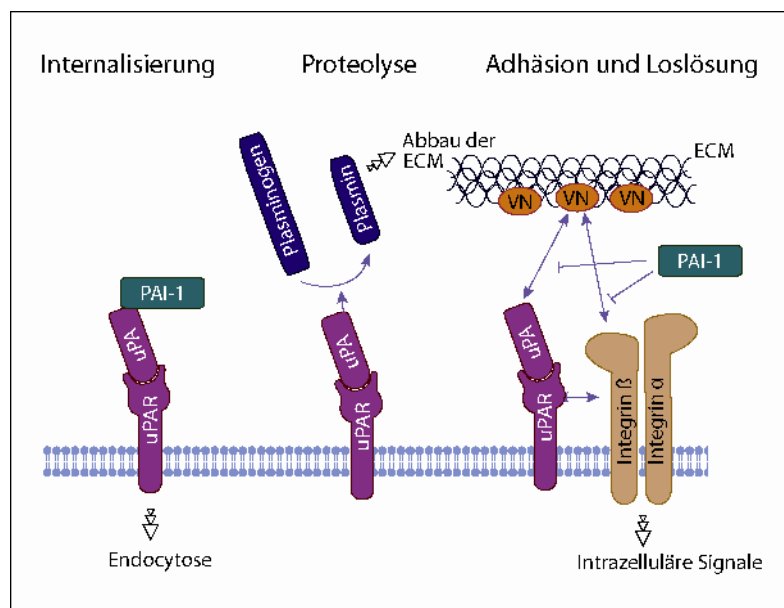
(GAPDH) (Farnell et al. 2002). Außerdem ist ein positiver Rückkopplungsmechanismus zwischen ER $\alpha$  sowie den oben besprochenen MAPK- und PI3K/Akt-Signalwegen bekannt. ER $\alpha$  kann von Erk1/2 (Bunone et al. 1996) und Akt (Campbell et al. 2001) phosphoryliert werden. Dies hat erstens eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität des Rezeptors zur Folge und zweites kommt es durch p-ER $\alpha$  zur Aktivierung von Erk1/2 (Zivadinovic et al. 2005) und Akt (Sun et al. 2001).

Eine Fehlregulation der Hormonrezeptoren, zum Beispiel durch Überexpression, kann die maligne Transformation der Zelle fördern. Dies erfolgt vor allem durch Umstellung des Stoffwechsels und Verstärkung der Proliferation (Murphy et al. 2002). Die höchste klinische Relevanz haben beide Rezeptoren im Mammakarzinom. Für diesen Tumortyp sind sowohl der ER $\alpha$  als auch der PR etablierte prognostische Marker. Darüber hinaus werden Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen den Effekt therapeutisch eingesetzt, um den Effekt der Östrogene durch kompetitive Hemmung zu antagonisieren (Sommer et al. 2001).

### **2.1.6 Plasminogen-Aktivierungssystem**

Eine weitere Proteingruppe, die vor allem im Mammakarzinom eine wichtige Rolle spielt, ist das Plasminogen-Aktivierungssystem. Es besteht aus drei Hauptkomponenten: den Serin-Proteasen, den Inhibitoren dieser Proteasen und einem Zelloberflächenrezeptor. Der wichtigste Vertreter der Gruppe der Serin-Proteasen ist der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA). Die Protease ist für die extrazelluläre Plasminogenaktivierung verantwortlich (Ferno et al. 1996) und führt so zum Abbau der extrazellulären Matrix (ECM), wodurch das Migrationspotential der Zellen erhöht wird (He et al. 1989). Zur vollen Aktivität gelangt uPA durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor uPAR. Der Rezeptor ist in der Lage, Vitronectin (VN) zu binden (Abbildung 2-4) und sorgt so für eine Verankerung der Zelle an der ECM (Behrendt et al. 1996). Die Bindungsaffinität wird verstärkt, wenn uPAR im Komplex mit uPA vorliegt (Kanase et al. 1996; Waltz et al. 1994). Inhibiert wird der Komplex durch Bindung des Plasminogen Aktivator Inhibitors-1 (PAI-1) an uPA, da dies zur Internalisierung des dadurch entstandenen Komplexes aus uPA/uPAR/PAI-1 führt (Abbildung 2-4). Über diesen Prozess wird sowohl die Konzentration von uPA und PAI-1 an der Zelloberfläche reguliert, als auch die Verteilung des Rezeptors

auf der Zelle und damit die Migrationsrate (Nykjaer et al. 1992). Darüber hinaus ist PAI-1 die hauptverantwortliche Komponente für eine weitere Funktion des Plasminogen-Aktivierungssystems: Die Loslösung der Zellen von der ECM (Abbildung 2-4). Damit steht es in direkter Konkurrenz zum uPAR (Deng et al. 1996; Kanse et al. 1996). Allerdings bleibt zu bedenken, dass dieses Wissen bisher nur auf Zellkulturexperimenten beruht. Eine Untersuchung der mit den Proteinen assoziierten Prozessen in klinisch relevanten Geweben, wie dem Mammakarzinom, fehlte zu Beginn dieser Arbeit jedoch.



**Abbildung 2-4 Aktivität des Plasminogen-Aktivierungssystem an der Zelloberfläche.** Durch das Zusammenspiel von uPA, PAI-1 und uPAR werden potentiell invasionsfördernde Prozesse wie Proteolyse, Adhäsion und Loslösung geregelt.

Wegen des großen Einflusses des Plasminogen-Aktivierungssystems auf die Migrationsfähigkeit einer Zelle, war früh klar, dass eine Deregulation die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung erhöhen könnte. Studien zur klinischen Relevanz des Systems in soliden Tumoren bestätigten diese Vermutung. Die eindeutigsten Ergebnisse wurden dabei für das Mammakarzinom erhalten. Eine Gruppe um Jänicke konnte zeigen, dass die Expressionshöhen von uPA und PAI-1 einen hohen prognostischen Wert für diesen Tumortyp haben (Janicke et al. 1991; Janicke et al. 1990; Janicke et al. 1993; Janicke et al. 1989). Aufgrund der Ergebnisse einer weitreichenden Metaanalyse (Look et al. 2002) werden uPA und PAI-1 von internationalen Brustkrebsleitlinien zur Therapieentscheidung bei nodal-negativem Mammakarzinom empfohlen (AGO 2010; Harris et al. 2007).

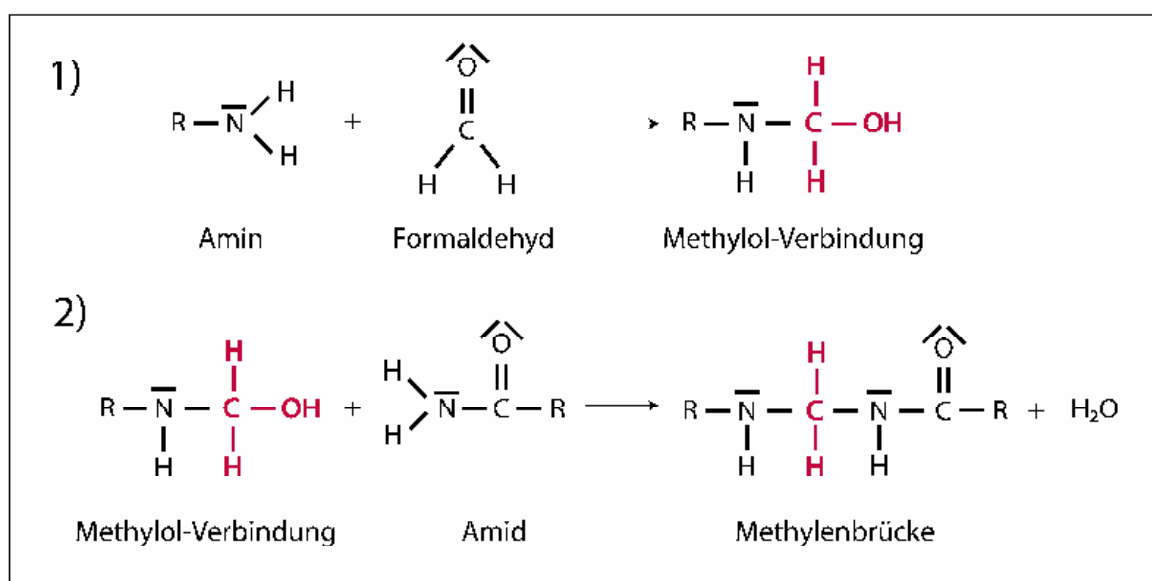
## 2.2 Proteinanalyse aus Formalin-fixierten Geweben

Ein Hauptproblem bei den oben beschriebenen Signalwegen ist die Tatsache, dass das Wissen über die dargestellten Zusammenhänge bisher so gut wie ausschließlich in Zellkulturexperimenten gewonnen wurde. Dabei werden zwischen verschiedenen Modellsystemen häufig stark unterschiedliche Regulationsmechanismen beobachtet. Die Frage, welche der Beobachtungen in Tumorgeweben eine Rolle spielt, wurde dabei bisher kaum berücksichtigt. Ein Grund dafür liegt in der schlechten Zugänglichkeit klinisch relevanter Tumorgewebe für molekularbiologische Analysen. Um einen optimalen Erhalt der Morphologie zu gewährleisten, werden in der klinischen Routine operativ entfernte Tumore so schnell wie möglich in Formalin fixiert. Die Gewinnung der einfacher analysierbaren, schockgefrorenen Gewebe spielt im klinischen Ablauf kaum eine Rolle. Darüber hinaus bleibt zu bedenken, dass Gefriergewebe rein für Forschungszwecke verwendet werden kann. Sollen die gewonnenen Erkenntnisse in die Klinik übertragen werden, müssen die nötigen Analysen auch mit Formalin-fixierten Geweben ermöglicht werden. Dies ist mit einigen Hürden verbunden, da es durch die Fixierung zu irreversiblen Quervernetzungen zwischen DNA, RNA und Proteinen kommt. Im Folgenden soll zum besseren Verständnis zunächst auf die Grundlagen der Formalin-Fixierung und danach auf die Fortschritte der Extraktion der genannten Makromoleküle aus diesen Geweben eingegangen werden.

### 2.2.1 Grundlagen der Formalin-Fixierung

Die Verwendung von Formalin als Fixiermittel für Operationspräparate mit nachfolgender Paraffin-Einbettung ist seit Jahrzehnten Standard in der klinischen Routine. Die Bezeichnung Formalin steht für 37-40 % Formaldehyd in Wasser mit 10 % Methanol als Anti-Polymerisationszusatz. Für den Einsatz in der Klinik wird eine zehnpromzentige in Phosphatpuffer neutral gepufferte Formalinlösung verwendet, da es in ungepufferten Lösungen zur Bildung von Ameisensäure und damit verbunden zu einer Absenkung des pH-Werts kommt, was zu Gewebeabbau führen kann (Wiegand et al. 1996). Bei der Fixierung macht man sich zu Nutze, dass Formaldehyd mit Aminosäuren reagiert, die eine zusätzliche Aminogruppe (Lysin, Asparagin, Glutamin, Arginin, Histidin (Imidazol)) tragen und dabei hoch reaktive Methylol-Verbindungen erzeugt (Abbildung 2-5, oben). Diese reagieren in einem zweiten Schritt mit einer weiteren Aminosäure, entweder wieder über

Amine und Amide, aber auch über Guanidin (Arginin) und Indol-Gruppen (Tryptophan). Die dabei entstehenden Methylenbrücken zwischen den Reaktionspartnern führen zur inter- sowie intramolekularen Quervernetzung von Proteinen (Abbildung 2-5, unten) (Puchtler et al. 1985). Darüber hinaus kommt es über ähnliche Mechanismen auch zur Vernetzung von DNA und RNA sowie der drei Makromolekülararten untereinander (Dubeau et al. 1986). Zusammen führen diese Querverbindungen zu einer optimalen Erhaltung der Gewebemorphologie, welche für die pathologische Begutachtung von entscheidender Bedeutung ist (Becker et al. 2007).



**Abbildung 2-5 Reaktionsmechanismus der Quervernetzung von Proteinen durch Formalin.**

In einem ersten Schritt reagiert Formaldehyd mit einer Aminogruppe einer Aminosäure zu einer reaktiven Methylol-Verbindung. Diese kann in einem zweiten Schritt unterschiedliche Gruppen einer weiteren Aminosäure angreifen (hier beispielhaft ein Amid, wie Glutamin). Die dabei neu entstehenden funktionellen Gruppen sind rot gekennzeichnet.

## 2.2.2 Analyse von Makromolekülen aus Formalin-fixierten Gewebeproben

Mit dem Fortschritt der personalisierten Medizin, wurden in den letzten Jahrzehnten neben morphologischen auch Veränderungen auf molekularer Ebene für die Diagnose immer bedeutender. Bei dem Versuch die relevanten Makromoleküle aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe zu analysieren, stellte sich jedoch schnell heraus, dass die irreversiblen Quervernetzungen eine Analyse anfangs unmöglich

machten. Aber Dank der Etablierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten schon in den 1980er und 1990er Jahren Methoden entwickelt werden, welche die Extraktion und nachfolgende Analyse von DNA und RNA aus Formalin-fixiertem Gewebe erlaubten (Almoguera et al. 1988; Ben-Ezra et al. 1991). Heute sind solche Verfahren auch in der klinischen Routine Standard (Specht et al. 2001).

Die Extraktion von Proteinen dagegen machte größere Probleme, so dass bis heute die Immunhistochemie die am weitesten verbreitete Methode zur Analyse von Proteinen aus FFPE-Geweben ist. Dabei werden Proteine direkt auf einem Gewebeschnitt mittels Antikörper detektiert und anschließend analysiert. Dies birgt gegenüber der Extraktion den Vorteil, dass nicht nur die Menge sondern auch die Lokalisation untersucht werden kann. Nachteilig ist hingegen, dass die Quantifizierung nur durch geschulte Pathologen möglich und damit zumindest teilweise subjektiv beeinflusst ist. Auch können so geringe Expressionsunterschiede zwischen zwei Geweben kaum identifiziert werden. Hinzu kommt, dass pro untersuchtem Protein ein Schnitt benötigt wird, was bei der Simultananalyse von mehreren Proteinen sowohl zu einem großen zeitlichen Aufwand als auch einem hohen Gewebeverbrauch führt. Aus diesen Gründen, und um Proteinanalysen von FFPE-Geweben auch mit anderen Methoden zu ermöglichen, wurden immer wieder Versuche unternommen, Proteine aus diesem Material zu extrahieren. Obwohl dies aufgrund der starken, Formalin-induzierten Quervernetzungen lange als unmöglich erachtet wurde, gelang es einer Arbeitsgruppe um Ikeda 1998 erstmals intakte, immunreaktive Proteine zu extrahieren (Ikeda et al. 1998). Zwar konnten mit diesem Verfahren nur eher kleine Proteine (< 120 kDa) in relativ geringer Ausbeute gewonnen werden, doch zeigte es, dass eine Extraktion grundsätzlich möglich ist. In den folgenden Jahren haben weitere Gruppen Protokolle für diesen Zweck veröffentlicht und es ist heute kein Problem mehr Proteine aus FFPE-Geweben zu extrahieren, die sich in ihren Eigenschaften kaum von Proteinen aus Gefriergeweben unterscheiden. Die entwickelten Protokolle unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Puffer sowie der für die Extraktion nötigen Inkubationszeiten. Gemeinsam ist jedoch allen eine hohe Konzentration an Natriumdodecylsulfat (SDS) und Reduktionsmittel im Extraktionspuffer sowie eine Inkubation bei hohen Temperaturen. Einen Überblick über die verschiedenen Methoden bieten zwei in unserer Arbeitsgruppe verfasste Publikationen (Berg et al. 2010; Malinowsky et al. 2010).

### **2.2.3 Proteinextraktion aus FFPE-Geweben nach Becker**

Für die Versuche dieser Arbeit wurde auf den Ergebnissen von Becker *et al.* aufgebaut (Becker et al. 2007), da gezeigt werden konnte, dass mit dieser Methode neben den Standardtechniken der Proteinanalytik, wie SDS-Gelelektrophorese und Immunblotting auch der unten beschriebene Reverse Phase Protein-Mikroarray (RPPA; siehe 2.3) reproduzierbar und mit Proteinen aus Gefriermaterial vergleichbar durchgeführt werden kann. Eine weitere Studie, zu deren Durchführung dieses Extraktionsverfahren benutzt wurde, ergab außerdem, dass sich auch für phosphorylierte Proteine kein Unterschied zu Gefriergewebe feststellen lässt - weder im Western Blot noch im RPPA (Becker et al. 2008). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da gerade in der Tumorentstehung nicht nur die Expressionshöhe einzelner Proteine sondern auch ihr Aktivitätszustand eine entscheidende Rolle spielt. Dabei bietet die Extraktion aus FFPE-Geweben gegenüber der aus Gefriermaterial nicht nur den Vorteil der einfachen Vereinbarkeit mit dem Routineablauf, sondern ermöglicht auch die gezielte Extraktion der für die Analyse relevanten Teile der Patientenprobe. Dies ist besonders bei Tumorproben ein wichtiger Aspekt, da bei der Entnahme des Tumors auch umliegendes, nicht-malignes Gewebe entfernt wird, um eine vollständige Resektion zu gewährleisten. Da dieses jedoch ein anderes, kaum verändertes Expressionprofil zeigt, ist es für die folgenden Untersuchungen sinnvoll zwischen Tumor und umliegendem Gewebe zu unterscheiden. Um dies zu ermöglichen, ist es nötig die Probe in einzelnen Schnitten auf Glasobjektträger aufzuziehen. Dieser Schritt ist für Gefriergewebe nur schwer durchführbar. Darüber hinaus kommt es sofort zum Auftauen des dünnen Schnitts und so möglicherweise zu Abbaureaktionen im Gewebe. Durch die Formalinfixierung sind FFPE-Gewebe vor diesem Abbau geschützt und das umgebende Paraffin erleichtert die Übertragung der Gewebeschnitte auf Objektträger. Nach einer histologischen Färbung der Schnitte, können die unterschiedlichen Gewebeareale erkannt und für die Extraktion mikrodisssektiert werden (Becker et al. 2008).

## **2.3 Reverse Phase Protein-Mikroarray**

Durch das oben beschriebene Verfahren zur Proteinextraktion aus FFPE-Geweben, bietet sich zum ersten Mal die Möglichkeit die über Jahrzehnte angesammelten Operationspräparate der Pathologien weltweit auf Proteinebene zu untersuchen. Dabei

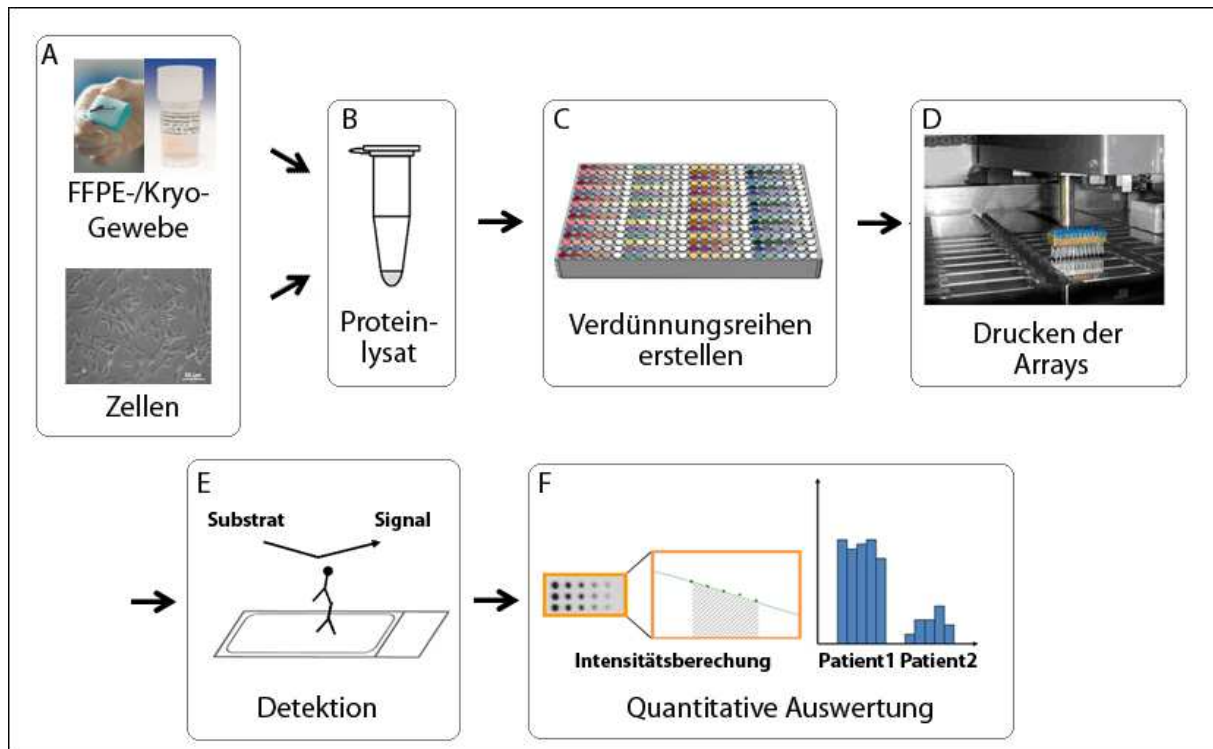
sollte idealerweise das gesamte Spektrum an interagierenden Proteinen und deren Modifikationen, wie Phosphorylierung oder Glykosylierung, betrachtet werden. Dieses Vorgehen hilft die Komplexität der Prozesse zu verstehen, die durch einzelne Proteine ausgelöst werden können. Um solche weitreichenden Untersuchungen durchführen zu können, ist es jedoch nötig über Methoden zu verfügen, die die Analyse einer Vielzahl von Proteinen in kurzer Zeit und unter Verwendung eines Minimums an Probenmaterial erlauben. In der Genomanalyse sind solche Hochdurchsatztechnologien, wie DNA- und mRNA-Mikroarrays, schon in den 1990er Jahren Standard geworden (Draghici et al. 2006; Schena et al. 1995). Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, dass sie nur Informationen über die Gene oder deren Transkription liefern, nicht aber über die endgültige Expressionhöhe oder gar die Aktivität der kodierten Proteine. Um dieses Problem zu lösen, wurde in den letzten Jahren der Fokus auch auf Methoden zur Hochdurchsatzanalyse von Proteinen gelegt. Dabei spielen vor allem die Massenspektrometrie (Krogan et al. 2006; Tyers et al. 2003) und die Protein-Mikroarrays (Lin 2010; Liotta et al. 2003) eine Rolle. Beide Techniken werden insbesondere dazu eingesetzt, Unterschiede im Expressions- und Phosphorylierungsprofil zweier Gruppen zu bestimmen. Im Bereich der Krebsforschung kann dies ein Vergleich von Normalgewebe mit tumorösem Gewebe sein, aber auch von Zellkulturen, welche mit verschiedenen Medikamenten behandelt wurden. Unter Verwendung der Massenspektrometrie ist es möglich proteomweit nach Expressionsunterschieden zu suchen und so Aufschluss über mögliche neue Biomarker zu gewinnen. Protein-Mikroarrays dienen dagegen zur gezielten Validierung von Biomarkern oder krankheitsrelevanten Signalwegen, deren Einfluss aufgrund vorhergehender Studien bereits vermutet wird. In dieser Arbeit wird das Potential des RPPA genutzt, um die Expression verschiedener Signalmoleküle darzustellen und damit Aufschluss über ihre Funktion im Tumorgewebe und ihre Brauchbarkeit als klinischer Marker zu erhalten. Im folgenden Abschnitt soll daher das Prinzip des RPPA ausführlich dargelegt werden.

### **2.3.1 Verfahren und Verwendung des Reverse Phase Protein-Mikroarrays**

Das Prinzip der RPPAs wurde 2001 von Paweletz *et al.* vorgestellt (Paweletz et al. 2001). Das beschriebene Verfahren wird bis heute verwendet und folgt nachstehendem Ablauf:

1. Aus Zellen oder mikrodisektierten Geweben werden Proteine extrahiert. (Eine detaillierte Beschreibung dieses Schritts befindet sich in Abschnitt 2.2; siehe auch Abbildung 2-6 A+B)
2. Aus Mikrotiterplatten, befüllt mit Verdünnungsreihen von wenigen Mikrolitern der Proteinlysate, werden an definierten Stellen einige Nanoliter der Lysate über einen Mikroarray auf Nitrozellulose-beschichtete Objektträger aufgebracht (siehe Abbildung 2-6 C+D). Dadurch erhält man Spots mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich, von welchen jeder einen repräsentativen Anteil des zellulären Proteoms enthält. Die Erstellung von Verdünnungsreihen dient dabei der Erweiterung des dynamischen Bereichs, so dass sowohl hoch als auch niedrig exprimierende Proben im optimalen Bereich bestimmt werden können.
3. Im Folgenden wird jeder Objektträger mit einem spezifischen Antikörper inkubiert und dessen Bindung an das Zielepitop über Fluoreszenz-, Kolorimetrie-, oder Chemilumineszenzsignale detektiert werden kann (siehe Abbildung 2-6 E). Über die Intensitätsbestimmung der Signale kann die Menge des zu untersuchenden Proteins quantitativ bestimmt werden. (siehe Abbildung 2-6 F).





**Abbildung 2-6 Übersicht über den Ablauf einer RPPA-Analyse.** (A, B) Aus Zellen oder mikrodisssektierten Geweben werden Proteine extrahiert. (C) In einer Mikrotiterplatte wird für jede Probe eine Verdünnungsreihe erstellt. (D) Durch einen Mikroarrayer werden wenige Nanoliter der Proteinlysate auf einen Nitrozellulose-beschichtete Objektträger übertragen. (E) Das zu untersuchende Protein wird über Antikörper detektiert. (F) Die dabei erhaltenen Signale werden quantitativ ausgewertet.

Durch dieses Verfahren ist es möglich mehrere tausend Proteinspots pro Membran aufzutragen, so dass selbst bei der Verwendung von Verdünnungsreihen und Replikaten, noch hunderte Proben auf einen Objektträger aufgebracht werden können. Durch den geringen Probenverbrauch ist es möglich in einem Lauf eine große Anzahl an identischen Arrays zu produzieren. Damit bietet der RPPA die Möglichkeit in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl von Proben auf die Expression vieler verschiedener Proteine zu untersuchen und ist damit bestens für die Analyse und Darstellung bekannter Signalwege und Proteinnetzwerke geeignet (Liotta et al. 2003). In den vergangenen zehn Jahren wurden so schon Signalprofile verschiedener Tumorentitäten beschrieben (Grubb et al. 2009; Paweletz et al. 2001; Petricoin et al. 2002; Sheehan et al. 2008). Andere Gruppen haben in Zellkulturexperimenten den Einfluss von Medikamenten untersucht, indem sie Änderungen in den Signalwegen mit Hilfe des RPPA nachverfolgt haben (Akkiprik et al. 2006; Boyd et al. 2008). Mit dem aufkommenden Bewusstsein, dass es meist nicht reicht nur die Expressionsunterschiede eines einzelnen Proteins zu untersuchen um damit

diagnostische oder therapeutische Aussagen treffen zu können, werden solche Analysen und damit auch der RPPA immer mehr in den Fokus der medizinischen Forschung rücken.

### **2.3.2 Quantifizierbarkeit und Sensitivität**

Die personalisierte Therapie erfordert, dass Patienten auf eine Vielzahl molekularer Faktoren hin untersucht werden, um das für den jeweiligen Patienten wirksamste Medikament auszuwählen. Um diesen Anforderungen nachzukommen ist es denkbar, den RPPA in der klinischen Routine einzusetzen – allerdings sind bis dahin noch einige Hürden zu bewältigen (Berg et al. 2010). Eine der größten Herausforderungen ist es, die Vergleichbarkeit von verschiedenen Arrays aus unterschiedlichen Laboren zu ermöglichen. Grundsätzlich ist der RPPA eine semiquantitative Methode, was bedeutet, dass nur Proben eines Arrays miteinander verglichen werden können. Dem zu begegnen gibt es zwei Möglichkeiten: Die Erste besteht im Aufbringen einer Universal-Standardprobe, wodurch ein Vergleich unterschiedlicher Arrays ermöglicht wird, wenngleich dieser immer noch semiquantitativ ist. Die Anforderungen an einen solchen Standard sind hoch. Er sollte im großen Maßstab reproduzierbar sein, sich stabil über einen langen Zeitraum halten, eine große Vielfalt an unterschiedlichen Proteinen beinhalten und eine ähnliche Viskosität wie die zu testenden Proben aufweisen (Sheehan et al. 2005). Letzteres ist nötig, um die Menge an aufgetragenem Lysat zwischen Standard und Probe vergleichbar zu halten. Ein zweiter Weg ist die Auftragung Zielprotein spezifischer Kalibratoren, wie rekombinante Proteine. Dies erlaubt eine absolute Quantifizierung der Arrays, jedoch muss jeder Array eine Vielzahl solcher Kalibratoren erhalten, oder bei jedem Array muss im Vorhinein geklärt sein, welches Protein untersucht werden soll. Beide Ansätze sind noch nicht vollkommen ausgereift und bedürfen noch weiterer Forschungsarbeit, bevor die Methode klinische Standards erreicht.

Die Sensitivität der Arrays ist ein weiterer Aspekt, welcher sowohl für die Verwendung in der Klinik als auch in der Forschung wichtig ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Detektionsgrenze im Bereich von Attogramm ( $10^{18}$  g) des zu detektierenden Proteins liegt (Sheehan et al. 2005) und der RPPA damit deutlich sensitiver ist als andere antikörperbasierte Methoden, wie Western Blot und Immunassays (z.B. ELISA). Dabei können selbst im unteren Bereich noch geringe Abweichungen unterschieden werden

(Espina et al. 2004; Liotta et al. 2003). Dies sind sehr viel versprechende Ergebnisse, doch bleibt zu bedenken, dass sowohl die Detektionsgrenze als auch die detektierbaren Abweichungen stark von den untersuchten Protein-Antikörper Kombinationen abhängen und somit für jede Fragestellung variieren können.

### **2.3.3 Antikörpervalidierung**

Eine Voraussetzung für das Gelingen des RPPA ist die Verwendung von hochspezifischen Antikörpern. Viele der kommerziell erhältlichen Antikörper erfüllen diese Anforderung nicht. Dies zeigt sich zum Beispiel im Western Blot durch zusätzliche unerwartete Signale. Im besten Fall handelt es sich dabei um Proteinmodifikationen oder Abbauprodukte, welche ebenfalls spezifisch durch den Antikörper erkannt werden. Häufig kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um unspezifische Bindungen handelt. Für den RPPA müssen die Antikörper aber eine absolute Spezifität für das jeweilige Protein zeigen, da nur die Intensität eines Signals aber nicht das Molekulargewicht in die Auswertung mit einbezogen werden kann. Zeigt ein Antikörper neben dem spezifischen Signal noch ein weiteres, eventuell sogar stärkeres, Signal kommt es zu einer Verzerrung der Messergebnisse. Es ist daher nötig, jeden Antikörper vor seiner Anwendung im RPPA im Western Blot zu validieren (Berg et al. 2010). Dazu empfiehlt es sich, mit demselben Probenotyp, wie Zellextrakt oder Gewebelysat, zu arbeiten, der in der folgenden Arrayanalyse verwendet werden soll, um Unterschiede in der Detektion zwischen getestetem und analysiertem Lysat ausschließen zu können. Abschließend bleibt zu sagen, dass die Etablierung hochspezifischer Antikörper der zeitaufwendigste aber auch wichtigste Schritt bei der Generierung von RPPA ist, und deshalb mit größter Sorgfalt durchgeführt werden muss.

### **2.3.4 Auswertung von Reverse Phase Protein-Mikroarrays**

#### Intensitätsmessung

Wie in Abschnitt 2.3 näher erläutert, erlaubt die Verwendung des RPPA die Simultananalyse mehrerer hundert Proben mit einer Vielzahl an Antikörpern. Durch Detektion über Chemilumineszenz, Kolorimetrie oder andere Verfahren erhält man Aufschluss über die Expressionshöhen der untersuchten Proteine in den Proben. Um diese aber für weiterführende Auswertungen und Interpretationen nutzen zu können, müssen

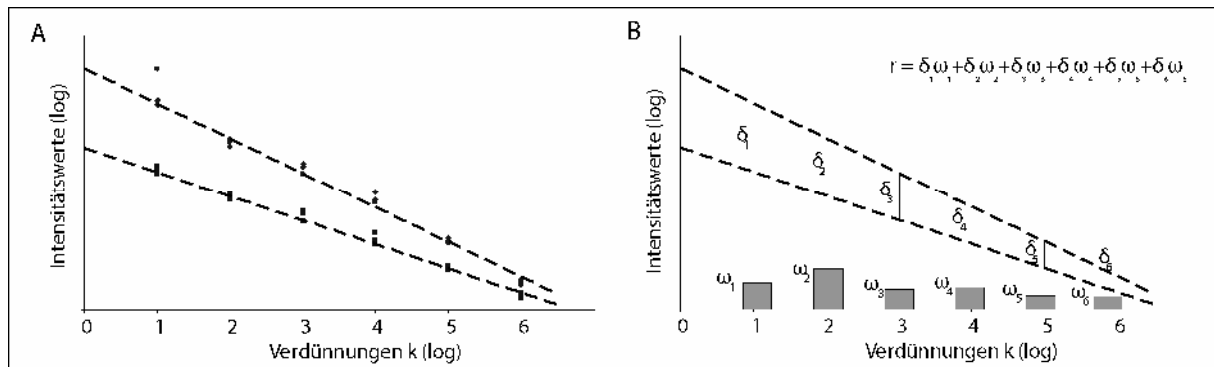
die Signale zunächst unter vertretbarem Aufwand und gleichzeitig mit größter Präzision analysiert werden. Der erste Schritt besteht aus der Bestimmung der Lage und Größe der Signalpunkte um im Folgenden die Intensität dieser so genannten Spots zu berechnen. Dazu müssen die Spots mit einer dafür geeigneten Bildbearbeitungssoftware möglichst exakt umrahmt werden. Dies kann bei geringeren Datenmengen von Hand mit allgemein zugänglichen Programmen erfolgen (Hipp et al. 2010), oder aber man bedient sich eines kommerziellen Programms, wie MicroVigene (Neeley et al. 2009), welches eigens für die Auswertung von RPPAs entwickelt wurde. Diese Software ist in der Lage, Spots aufgrund des unterschiedlichen Schwärzungsgrads von Hintergrund zu unterscheiden und diese somit weitgehend selbständig zu erkennen. In beiden Fällen sollte besonders in diesem Schritt auf eine genaue Arbeitsweise geachtet werden, da zur folgenden Intensitätsbestimmung der Schwärzungsgrad jedes markierten Pixels bestimmt und verrechnet wird. Markiert man den Spot zu großflächig, wird die Berechnung der Intensität durch die kaum geschwärzten miteinbezogenen Hintergrundpixel verfälscht. Eine zu kleine Abgrenzung des Signals führt zu zu hohen Intensitätswerten, weil schwächere Randbereiche des Spots nicht mit einbezogen werden. Da die Intensitätsbestimmung die Grundlage aller späteren Analysen bildet, muss hier mit großer Sorgfalt gearbeitet werden. Bevor die so gewonnenen Intensitäten weiterverwendet werden können, bietet sich ein Abgleich mit der Hintergrundintensität an. Dabei wird der Intensitätswert des Hintergrunds eines Spots von dessen Intensitätswert subtrahiert. Häufig wird dazu ein Mittelwert der als „nicht Spot“ markierten Flächen gebildet und mit jedem Spot verrechnet. Da es aber bei der Antikörperdetektion zu ungleichmäßig verteilten Schatten auf den Arrays kommen kann, ist es genauer den Hintergrund um jeden Spot einzeln zu bestimmen und einzeln zu verrechnen. Das in dieser Arbeit verwendete Programm, MicroVigene, verfährt nach diesem Prinzip.

### Bestimmung der Probengesamtintensität

Einer der Vorteile des RPPA ist, dass mehrere Datenpunkte pro Probe untersucht werden können und so eine exaktere Abschätzung der Proteinexpressionshöhen erfolgen kann. Nach Bestimmung der Intensitäten der Einzelspots erfolgt deshalb die Berechnung der Probengesamtintensität, welche, relativ zu den anderen Proben des Arrays, die Menge an untersuchtem Protein in der Probe repräsentiert. Die meisten Methoden dazu basieren auf der Erstellung und Anpassung von Graphen, welche den Zusammenhang zwischen

beobachtetem Signal und der Verdünnungsstufe beschreiben, aus dem dann die relative Expressionhöhe bestimmt wird. Dazu wurden in den letzten Jahren verschiedene Algorithmen entwickelt.

Mit die ersten waren Mircean *et al.* (Mircean et al. 2005), die ein lineares Regressionsmodell (bei doppelt logarithmischer Darstellung) nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate zur Erstellung des Graphen vorschlugen (siehe auch (Huber 1981)). Das Prinzip der kleinsten Quadrate ist eines der mathematischen Standardverfahren für die Berechnung einer Ausgleichungskurve zu einer Reihe von Datenpunkten. Dabei werden die Kurvenparameter so bestimmt, dass die Summe der quadratischen Abweichungen der beobachteten Punkte vom Kurvenverlauf minimiert wird. Abbildung 2-1 A zeigt beispielhaft zwei auf diese Weise erstellten Geraden bei sechs Verdünnungen und drei Replikaten pro Probe. Der nächste Schritt ist die Bestimmung des Unterschieds in der Expressionhöhe zweier Proben ( $r$ ) über die gewichtete Summe der Abstände ( $\delta$ ) der beiden angepassten Graphen bei jeder Verdünnung. Der Gewichtungsfaktor errechnet sich dabei aus dem Varianzkoeffizienten der Verdünnungsstufen, der als Quotient von Standardabweichung und Mittelwert definiert ist. In diesem Fall schlagen Mircean *et al.* vor, für jede Verdünnung jeder Probe den Varianzkoeffizienten zu berechnen um dann pro Verdünnung den Mittelwert der Koeffizienten zu bestimmen. Die Gewichtung erfolgt nach den inversen Werten der so ermittelten Varianzkoeffizienten, nachdem diese normalisiert wurden, so dass ihre Summe 1 ergibt ( $\omega$ ). Abbildung 2-1 B zeigt eine Veranschaulichung der zu berechnenden Abstände  $\delta_{1-6}$ , der Gewichtungswerte  $\omega_{1-6}$ , sowie die Formel für den daraus berechenbaren Abstand der beiden Geraden, welcher dem relativen Expressionsunterschied der beiden Proben entspricht.



**Abbildung 2-7 Berechnung der Proteinexpressionsverhältnisse nach Mircean *et al.* (Mircean *et al.***

**2005).**(A) In einem ersten Schritt wird mittels linearer Regression eine Gerade durch die gemessenen Intensitätswerte gelegt. Hier ist dieses Vorgehen für zwei Proben mit je sechs Verdünnungsstufen und drei Replikaten gezeigt. (B) Im Folgenden wird der Abstand der beiden Geraden an den x-Werten der 6 Verdünnungen bestimmt, sowie je eine Gewichtung (siehe Text) errechnet. Die Summe der gewichteten Abstände ergibt den relativen Expressionsunterschied der beiden Proben. Die Gleichung zur Berechnung ist oben rechts angegeben.

Dieser Algorithmus wurde für eine Studie entwickelt, welche primär den Vergleich von zwei Proben eines Patienten nicht aber von mehreren Patienten untereinander verfolgte. Daher berechnet er die Unterschiede zwischen zwei Proben, gibt aber keinen Wert für eine einzelne Probe aus. Dies kann bei anderen Fragestellungen zu Problemen führen, zum Beispiel wenn die erhaltenen Werte mit anderen Werten, wie klinischen Daten oder anderen Proteinexpressionshöhen, verglichen werden sollen. Zudem werden zwei weitere wichtige Aspekte vernachlässigt: Die Normalisierung sowie Sättigungseffekte. Wird nicht die exakt gleiche Menge an Gesamtprotein pro Spot aufgedruckt, müssen die gemessenen Einzelproteinwerte normalisiert werden (genauer dazu später im Kapitel). Dieser Punkt wird hier nicht berücksichtigt. Hinzu kommt, dass eine Gerade häufig nicht die optimale Beschreibung des entstehenden Graphs darstellt, da es bei niedrigen Verdünnungen zu einer Signalsättigung kommen kann sowie bei hohen Verdünnungen zu Werten nahe der Detektionsgrenze. Solch ein Verlauf lässt sich am besten mit einer Sigmoidfunktion beschreiben.

Diese Art der Kurvenanpassung wird daher von den meisten mit RPPA arbeitenden Gruppen bevorzugt (Frederick *et al.* 2011; Tabus *et al.* 2006; Usami *et al.* 2007), allerdings gibt es unterschiedliche Herangehensweisen die Funktion den Messwerten anzupassen, sowie unterschiedliche Verfahren, aus dem erhaltenen Graphen die Gesamtintensität einer

Probe zu bestimmen. Ein Ansatzpunkt dabei ist es, die mittlere effektive Konzentration (EC50) einer Verdünnungsreihe als Maß für die Expressionshöhe des untersuchten Proteins zu verwenden. Beim RPPA entspricht die EC50 dem Verdünnungsgrad, bei welchem die halbmaximale Intensität erreicht wird. Ein weiteres Vorgehen ist die Bestimmung des Integrals unter der Kurve, dessen Wert dann für die Gesamtintensität verwendet wird. Der Vorteil dabei ist, dass der gesamte Kurvenverlauf mit einbezogen wird. Für die Auswertung von RPPAs werden beide Verfahren verwendet und sind gleichermaßen anerkannt. Ähnlich unstandardisiert ist die Ermittlung der optimalen Funktion der Messwerte pro Probe. Das einfachste und gängigste Verfahren ist es den Funktionsverlauf jeder Probe mittels eines nicht-linearen Regressionsverfahrens nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate einem logistischen 4-Parameter Modell der Form

$$y_i = a + \frac{b-a}{1 + e^{c(d - \ln x_i)}}$$

anzupassen. Dabei ist  $y_i$  die beobachtete Intensität bei der  $i$ -ten Verdünnung (mit  $i = 1, \dots, l$ ),  $x_i$  das Verdünnungslevel (berechnet nach  $x_i = i - (1+l)/2$ ) und  $a, b, c, d$  die zu bestimmenden Parameter.

Neben diesem *sample-by-sample* Vorgehen, entstand in den letzten Jahren der Ansatz die Messwerte aller Proben in die Regression einfließen zu lassen: Die *SuperCurve*-Methode (Neeley et al. 2009; Usami et al. 2007). Dieses Verfahren stützt sich auf der Annahme, dass das Bindungsverhalten von Protein und entsprechendem Antikörper über alle Proben auf einem Array gleich bleibend ist und es damit einen global einheitlichen Funktionsverlauf je Protein/Antikörperverbindung gibt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass für das Regressionsverfahren deutlich mehr Datenpunkte zur Verfügung stehen als bei der Einzelbestimmung der Funktion. Das bei diesem Verfahren verwendete Modell entspricht der Form

$$y_{ij} = a + b \frac{2^{c(x_i + EC50_j)}}{1 + 2^{c(x_i + EC50_j)}} + \epsilon_{ij}$$

Dabei entspricht  $y_{ij}$  der beobachteten Intensität der  $j$ -ten Probe bei der  $i$ -ten Verdünnung (mit  $i = 1, \dots, l$ ),  $x_i$  dem Verdünnungslevel (berechnet nach  $x_i = i - (1+l)/2$ ) und  $\epsilon_{ij}$  den zufälligen Messabweichungen. Die probenspezifischen Variablen  $EC50_j$  sowie die globalen Parameter  $a, b, c$  werden mittels eines nicht-linearen Regressionsverfahrens nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate ermittelt. Der pro Kurve erhaltene  $EC50_j$  wird dann als



Messwert für die Expressionshöhe des untersuchten Proteins in der  $j$ -ten Probe verwendet. Dazu werden  $j$  Gleichungen aufgestellt, welche sich nur in dem Wert der  $EC50_j$  unterscheiden. Die Regression jedes Parameters erfolgt über alle Gleichungen, so dass die Gesamtsumme der Abstände aller  $j$  Gleichungen minimal wird (Prinzip der kleinsten Quadrate). Zur Bestimmung der globalen Parameter  $a$ ,  $b$ ,  $c$  stehen somit nicht nur  $i$  Werte, wie beim *sample-by-sample* Vorgehen, zur Verfügung sondern  $i*j$  Datenpunkte, was rein rechnerisch eine deutlich genauere Anpassung der Funktion erlaubt. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die Regression sich damit auf alle Proben bezieht, und eventuell relevante Schwankungen im Einzelfall wenig ins Gewicht fallen. Daher bleibt noch abzuwägen, ob diese größere Anzahl an Datenpunkten für die Einzelkurve entscheidende Vorteile bringt.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass bei der Bestimmung der Gesamtintensität der einzelnen Proben eines Arrays von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe unterschiedliche Vorgehensweisen verwendet werden, die alle glaubhafte und anerkannte Ergebnisse liefern. Trotzdem ist für die Zukunft ratsam sich auf ein Verfahren zu einigen, um die Vergleichbarkeit der Resultate zu verbessern.

### Normalisierung

Nach der Bestimmung der Probenintensität muss diese auf den Gesamtproteingehalt der entsprechenden Probe normalisiert werden. Ohne diesen Schritt ist die Vergleichbarkeit der Proben nicht gewährleistet, da eine höhere Signalintensität nicht zwangsläufig einer höheren Expression zuzusprechen ist, sondern möglicherweise schlicht einer höheren Ausgangskonzentration.

Im einfachsten Fall kann die Proteinkonzentration, die vor dem Auftragen bestimmt wurde, als Normalisierungswert herangezogen werden. Dies ist jedoch kritisch zu betrachten, da durch das Drucken entstandene Fehler nicht ausgeglichen werden können. Ein dabei kaum vermeidbares Problem sind die Verdunstungseffekte, die bei den meist mehrere Stunden dauernden Druckprozessen, trotz Regulierung der Luftfeuchtigkeit, auftreten. Entscheidend dabei ist auch, dass dieser Effekt nicht für alle Proben gleich ist, da zum Beispiel Mikrotiterplattenvertiefungen, die näher am Rand liegen stärker betroffen



sind als solche im mittleren Bereich. Zusätzlich können sich, wenn auch minimale Konzentrationsänderungen, durch den Eintrag von Waschpuffer in die Proben ergeben.

Besser ist es daher die tatsächlich aufgetragene Proteinmenge nach dem Drucken zu bestimmen. Unter der Annahme, dass alle in einer Probe detektierten Proteine der Gesamtkonzentration der Probe entsprechen, kann dazu der Median aller Signale einer Probe als Normalisierungswert verwendet werden. Deutlich reproduzierbarer und daher am weitesten verbreitet sind jedoch Gesamtproteinanfärbungen der Arrays. Neben dem Standardfarbstoff Sypro Ruby (siehe auch 3.17.23.17.2), können dazu auch Färbungen mit kolloidalem Gold oder Fast Green FCF durchgeführt werden.

Unabhängig von der Art der Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgt dann die Normalisierung der Antikörpersignale durch Division (beziehungsweise in der häufig verwendeten logarithmischen Berechnung durch Subtraktion) des entsprechenden Gesamtproteinwerts.

## **2.4 Mammakarzinom**

Die Kombination der beiden beschriebenen Methoden, Proteinextraktion aus FFPE-Geweben und RPPA, sollte in dieser Arbeit genutzt werden, um eine detaillierte Analyse klinisch relevanter Proteine in Mammakarzinomen durchführen zu können. Im Folgenden soll daher ein kurzer Abriss der momentanen Situation in der Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms gegeben werden.

### **2.4.1 Diagnose**

Mit 130 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr ist das Mammakarzinom in den westlichen Ländern die häufigste Krebserkrankung der Frau. Die Letalität ist, dank immer besserer Therapiemöglichkeiten, zwar rückläufig, liegt aber trotzdem noch bei etwa 30 % und ist damit die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 30. und dem 60. Lebensjahr (Giersiepen et al. 2005). Daher sieht das gesetzliche Krebs-Früherkennungsprogramm eine klinische Untersuchung der Brust durch einen Arzt ab dem 30. Lebensjahr vor. Wird bei einer Frau im Rahmen einer Tastuntersuchung eine Veränderung entdeckt, werden in einem nächsten Schritt bildgebende Verfahren wie Mammographie und Ultraschall

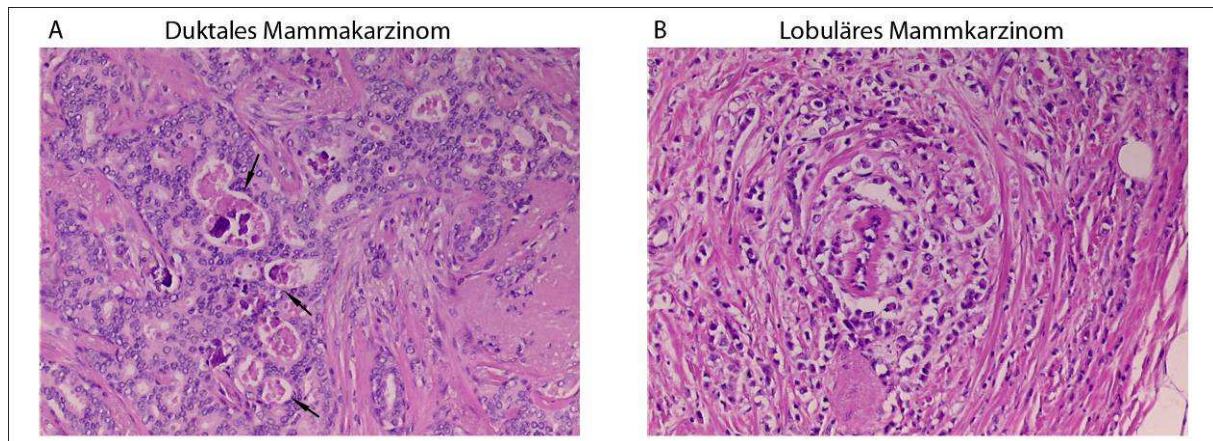
eingesetzt. Bestätigen diese Verfahren den Tumorverdacht, so wird zur Diagnosesicherung eine Gewebeprobe (Biopsie) entnommen. Diese wird anschließend (immun-)histologisch untersucht, um Aussagen über die Bösartigkeit aber auch über mögliche präoperative Therapien zu treffen. Im Falle eines malignen Tumors gibt es ein breites Spektrum an Therapiemöglichkeiten. Der entscheidendste Schritt ist die operative Entfernung des Tumors als Primärtherapie, wobei in 70 % - 80 % der Fälle brusterhaltend operiert werden kann. Im Zuge der Operation werden auch brustnahe Lymphknoten der Achselhöhle (axillär) entfernt. Dies hilft bei der Einstufung der Erkrankung und vermindert das Rezidivrisiko. Zusätzlich wird das verbliebene Brustgewebe nach Entfernung des Tumors standardmäßig strahlentherapeutisch behandelt (Kreienberg et al. 2008). Anschließend kann eine medikamentöse Behandlung erfolgen. Diese richtet sich nach der Klassifikation des vorliegenden Tumortyps.

#### **2.4.2 Klassifikation und zielgerichtete Therapie**

Um die für den Patienten optimale Therapieentscheidung treffen zu können, ist eine möglichst genaue Analyse des Tumors nötig.

##### Histologie

Der erste Schritt ist bis heute die histologische Begutachtung des Tumors. Dabei wird zunächst zwischen abgegrenztem Wachstum (nicht-invasives Wachstum; *Carcinoma in situ*) und invasivem Wachstum unterschieden. Invasive Karzinome werden weiter in duktale (aus dem Milchgang hervorgegangene, >80 %) und lobuläre (aus dem Drüsenlappen gebildete, ca. 10 %) Karzinome unterteilt (siehe auch Abbildung 2-8). Zusätzlich gibt es noch, wenn auch selten, muzinöse (schleimbildende), medulläre (das Mark betreffende) oder tubuläre (röhrenförmige) Karzinome.



**Abbildung 2-8 Histologische Darstellung der beiden häufigsten Arten des Mammakarzinoms.**

A) Duktales Mammakarzinom: Die Tumorzellen (dunkelviolette Kerne) wachsen undifferenziert und ungeordnet, ehemaliges Drüsengewebe (Pfeile) wurde zerstört. B) Lobuläres Mammakarzinom: Ein kleiner Milchgang ist von konzentrisch wachsenden Tumorzellen (dunkelviolette Kerne) umgeben.

#### Differenzierungsgrad nach Elston und Ellis

Neben der oben beschriebenen einfachen Histologie werden Karzinome der Brust auch nach ihrem Differenzierungsgrad (Grading) unterschieden. Der dazu gebräuchlichste Schlüssel ist das Elston-Ellis System. Dabei wird je nach Organisationsgrad des Gewebes, Kernausssehen und Zellteilungsrate Punkte von insgesamt 3 bis 9 vergeben. Hieraus wird dann der Tumorgrad abgeleitet, welcher von 1 bis 3 reicht und zwischen gut differenziert, mäßig differenziert und gering differenziert unterscheidet.

#### TNM-Klassifikation

Zusätzlich zu den beiden histologischen Einstufungen wird jeder maligne Tumor auch nach der TNM-Klassifikation der Internationalen Vereinigung gegen Krebs UICC beurteilt. Sie gibt Auskunft über die Größe des Tumors (T), den Lymphknotenbefall (N) und eine eventuelle Fernmetastasierung (M) (Wittekind et al. 2010). Beim Mammakarzinom erfolgt die Einteilung nach folgenden Kriterien (siehe auch Abbildung 2-9):

#### *Ausdehnung des Primärtumors*

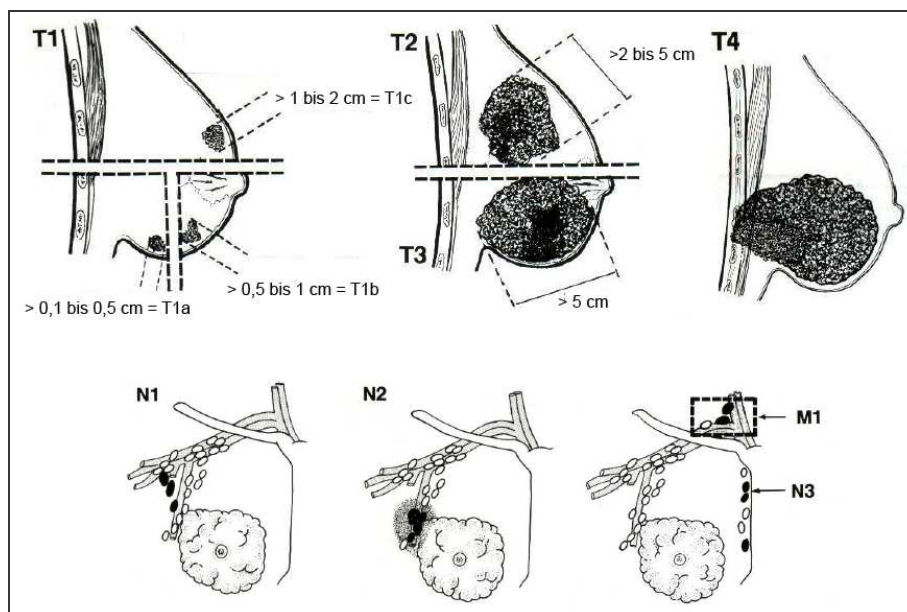
- \* T1 – Tumorgröße unter 2 cm,
- \* T2 – 2 bis 5 cm,
- \* T3 – mehr als 5 cm an der Stelle des größten Durchmessers
- \* T4 – Tumor ist in die Brustwand oder in die Haut eingewachsen
- \* TX – keine Aussage über den Primärtumor möglich

### Lymphknotenbefall

- \* N0 – keine Anzeichen für Lymphknotenbefall.
- \* N1 – Metastasen in 1 bis 3 axillären Lymphknoten
- \* N2 – Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten
- \* N3 – Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten oder in infraklavikulären (unter dem Schlüsselbein liegenden) Lymphknoten
- \* NX – keine Aussage über den Lymphknotenbefall möglich

### Fernmetastasen

- \* M0 – keine Anzeichen für Fernmetastasen
- \* M1 – Fernmetastasen vorhanden
- \* MX – keine Aussage über das Auftreten von Fernmetastasen möglich



**Abbildung 2-9 TNM-Klassifikation (modifiziert nach (Wittekind et al. 2010))**

### Molekulare Marker

Die drei bisher beschriebenen Klassifikationsmethoden sind für die meisten soliden Tumore seit langem Standard in der klinischen Routine. Sie geben Auskunft über die Prognose des Patienten und erlauben dem Arzt über den Nutzen einer Chemotherapie zu entscheiden. Darüber hinaus gibt es jedoch für das Mammakarzinom inzwischen weitere und vor allem spezifischere Therapien. Ob ein Patient für die jeweilige Therapie geeignet ist, lässt sich nur nach molekularer Analyse der Tumorgewebe beurteilen. Die ASCO

(*American Society of Clinical Oncology*) empfiehlt dafür die Bestimmung fünf molekularer Marker: Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, HER2-Status sowie die Expressionshöhen von uPA und dessen Inhibitor PAI-1 (Harris et al. 2007).

Der Hormonrezeptorstatus wird immunhistologisch ermittelt, indem man den Prozentsatz derjenigen Tumorzellen bestimmt, an denen sich die Rezeptoren nachweisen lassen. Ab einem Prozentsatz von 10 % positiver Zellen wird ein Tumor für den jeweiligen Rezeptor positiv eingestuft. Als „Hormonrezeptor-positiv“ gilt eine Probe wenn einer der beiden Rezeptoren die 10% Grenze überschreitet. Bei diesen Tumoren wird zusätzlich zur Chemotherapie ein Östrogenrezeptor-Modulator wie Tamoxifen gegeben, der die Estrogenrezeptoren verbliebener Tumorzellen hemmt, und damit deren erneute Wachstumsstimulation verhindern soll. Die Verwendung der Immunhistochemie erlaubt eine Bestimmung beider Rezeptoren an Formalin-fixierten Geweben unter Berücksichtigung des Gewebeaufbaus. Durch die mikroskopische Betrachtung des Präparats kann zwischen Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen unterschieden und so eine differenzielle Diagnose gestellt werden. Problematisch ist jedoch die Verwendung des subjektiv-beeinflussten Einstufungssystems sowie die unterschiedliche Sensitivität und Spezifität der verwendeten Antikörper.

Der HER2-Status wird ebenfalls immunhistologisch bestimmt. Nach den Empfehlungen der ASCO wird ein 4-stufiger *Score* angewandt. Weniger als 10 % gefärbter invasiver Tumorzellen bedeutet einen *Score* von 0, ab 10 % ist die Färbeintensität entscheidend. Eine schwache, inkomplette Färbung der Zellmembran entspricht einem *Score* von 1, eine mittelgradige Färbung führt zu einer Einordnung in *Score* 2 und bei einer starken Membranfärbung erhält der Tumor den *Score* 3. Für alle Tumore mit *Score* 2 wird zusätzlich eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Diese bestimmt die Häufigkeit des Auftretens des *her2* Gens, welches in Brustkrebs häufig amplifiziert ist. Als HER2-positiv, und damit für eine Trastuzumab-Therapie geeignet, werden Proben mit *Score* 3 oder *Score* 2 mit positivem FISH-Ergebnis (mehr als 6 HER2-Genkopien pro Zellkern) bezeichnet. Wie bei der Bestimmung des Hormonrezeptorstatus muss auch hier die Verwendung eines subjektiv beeinflussten, immunhistochemischen Einstufungssystems bemängelt werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Färbeintensität von der Art und Dauer der Fixierung beeinflusst wird (Penault-Llorca et al. 1994). Beide Punkte können zu

Fehldiagnosen führen. Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass der Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivität des Rezeptors nicht in die Einstufung mit einbezogen werden. Ein Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass die immunhistochemische Bestimmung von phosphoryliertem HER2 (p-HER2) bisher nicht stabil erreicht werden konnte. Eine Möglichkeit, die genannten Probleme zu umgehen, wird in der Verwendung der in Kapitel 2.3 beschriebenen Methodik des RPPA gesehen (Berg et al. 2010).

Die uPA und PAI-1 Werte eines Tumors werden für Mammakarzinome ohne Metastasen in tumornahen Lymphknoten (nodal-negativ) an Gefriergewebe mit Hilfe des klinisch zugelassenen Femtelle-ELISAs (enzymgekoppelten Immunadsorptionsassays) bestimmt. Ein Tumor gilt als uPA/PAI-1-positiv, sobald einer der Werte seinen Schwellenwert übersteigt. Dieser liegt für uPA bei 3 ng/mg Gesamtgewebe und für PAI-1 bei 14 ng/mg Gesamtgewebe. Da nodal-negative und uPA/PAI-1-negative Tumore ein sehr geringes Rezidivrisiko haben, kann diesen Patienten die Last einer adjuvanten Chemotherapie erspart bleiben (Look et al. 2002). Problematisch ist, dass trotz der Empfehlung der ASCO bis heute nur wenige Kliniken in Deutschland diesen Test durchführen. Dies liegt an der geringen Verfügbarkeit von Gefriergewebe in der klinischen Routine, in der die Gewebe so schnell wie möglich in Formalin-fixiert werden. Mit dieser Problematik beschäftigt sich auch die hier vorliegende Arbeit.

## **2.5 Ösophaguskarzinom**

Ebenso wie für das Mammakarzinom sollten unter Verwendung der RPPA-Technologie auch Proteinextrakte aus FFPE-Geweben des Ösophaguskarzinoms untersucht werden. Der Fokus lag dabei auf der Überprüfung der klinischen Relevanz einiger Markerproteine, die zurzeit in der Literatur diskutiert werden. Einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung sowie über die gegenwärtigen Diagnose- und Therapiemöglichkeiten wird nachfolgend gegeben.

### **2.5.1 Diagnose und Therapie**

Mit 10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner in den westlichen Ländern ist das Ösophaguskarzinom eine eher seltene Neoplasie im Bereich der Speiseröhre (Ösophagus) (Bosetti et al. 2008). Diese Tumore gehen in etwa 75 % vom ortständigen Plattenepithel



(Plattenepitelkarzinome) und in etwa 25 % vom metaplastischen Barrett-Epithel (Adenokarzinome) aus, wobei sich das Verhältnis in den letzten 15 Jahren zunehmend in Richtung der Adenokarzinome verschiebt. In dieser Arbeit wurden Proteinexpressionsprofile des ösophagalen Adenokarzinoms untersucht, deshalb soll im Weiteren detaillierter auf diesen Subtyp eingegangen werden. Die zwei größten Risikofaktoren sind ein erhöhter Rückfluss von Magen- und Gallensäuren aus dem Magen (Reflux, Sodbrennen) sowie Fettleibigkeit (Lagergren et al. 2000). Beide Faktoren haben in den letzten Jahrzehnten in den westlichen Ländern stark zugenommen. Diese Tatsache erklärt, dass die Häufigkeit des ösophagalen Adenokarzinoms seit den 1970er Jahren einen stärkeren Anstieg als jede andere Tumorart verzeichnet (Cook et al. 2009). Die Diagnose erfolgt primär über eine Endoskopie (Spiegelung) der Speiseröhre meist in Kombination mit einer Untersuchung des Magens und des Zwölffingerdarms. Von auffälligem Gewebe werden dabei Biopsien entnommen und histologisch von einem Pathologen untersucht. Mittels Endosonographie (Ultraschalluntersuchung der Speiseröhre) werden die Tiefe der Tumordinvasion sowie die Ausdehnung der Lymphknotenmetastasierung bestimmt. Fernmetastasen können sonographisch, radiologisch und computertomographisch nachgewiesen werden (Haringsma 2002). Die Klassifikation des Ösophaguskarzinoms erfolgt, wie beim Mammakarzinom beschrieben, nach dem Differenzierungsgrad (Grading) sowie dem TNM-System der Internationale Vereinigung gegen Krebs UICC (Wittekind et al. 2010). Problematisch ist, dass Symptome, wie Schluckbeschwerden und Rippenschmerzen, erst zu einem recht fortgeschrittenen Zeitpunkt auftreten. Dies hat zur Folge, dass auch die Diagnose in den meisten Fällen sehr spät erfolgt, was wiederum ein Grund für die schlechte Prognose ist. Patienten mit ösophagalem Adenokarzinom weisen eine 5-Jahresüberlebensrate von nur etwa 20 % auf (Sharma et al. 2004). Ein weiterer Grund hierfür sind die unzureichenden Therapiemöglichkeiten. Welche Therapie verwendet wird, hängt dabei stark vom Fortschritt des Tumors ab. Eine groß angelegte Kohortenstudie ergab, dass bis zu 75 % der Patienten mit ösophagalem Adenokarzinom, vor allem aufgrund ihres fortgeschrittenen Tumorstadiums, nur palliativ behandelt werden (Rouvelas et al. 2005). Die meistverwendete Maßnahme ist dabei ein endoskopisch platzierter Stent, aber auch Chemo- und Strahlentherapie werden eingesetzt. Der Hintergrund aller drei Maßnahmen ist es den Patienten leichteres Schlucken zu ermöglichen (Lagergren et al. 2010). Für Patienten mit weniger fortgeschrittenem, nicht-metastasiertem Tumor ist die primäre Methode die vollständige chirurgische

Tumorresektion. Die Frage, ob die Patienten neoadjuvant, also vor der Operation, durch Strahlen- oder Chemotherapie behandelt werden sollen, wird kontrovers diskutiert (GebSKI et al. 2007; Malthaner et al. 2004; Party 2002).

### **2.5.2 Therapieverbesserung beim ösophagealen Adenokarzinom**

Um die oben erwähnte schlechte Prognose für Patienten mit ösophagealen Adenokarzinom zu verbessern, liegt ein besonderer Schwerpunkt der aktuellen wissenschaftlichen Arbeiten auf der Analyse prätherapeutischer, molekularer Signaturen und deren Korrelation mit dem Ansprechen auf unterschiedliche Therapieansätze. Eine viel versprechende Gruppe dafür stellen die Hitzeschock-Proteine dar, für die im Ösophaguskarzinom eine Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden konnte. Eine Arbeit belegte die Überexpression von HSP90 im Adenokarzinom des Ösophagus in einem Rattenmodell und einem kleinen Kollektiv humaner Karzinome (Chen et al. 2004). Eine weitere Publikation beschrieb eine höhere HSP70 und HSP90 Expression in frühen Tumorstadien in einem größeren Kollektiv von Barrett-Karzinomen (Langer et al. 2008). Doak *et al.* berichten darüber hinaus von einer höheren HSP27 Expression in niedrig differenzierten ösophagealen Adenokarzinomen (Doak et al. 2004). Eine widersprüchliche Studie beschreibt jedoch den Expressionsverlust von HSP27 in Barrett-Metaplasie und Adenokarzinomen (Soldes et al. 1999). Eine mögliche Erklärung bietet die unterschiedliche Zusammensetzung der Kollektive, sowie die Tatsache, dass sowohl Soldes *et al.* als auch Doak *et al.* den mRNA Gehalt bestimmten, welcher stärkeren Schwankungen unterliegt als das exprimierte Protein. Auf jeden Fall bleibt die Schlussfolgerung zu ziehen, dass es noch weiterer Untersuchungen bedarf, um die Rolle der Hitzeschock-Proteine im ösophagealen Adenokarzinom verstehen zu können und damit hoffentlich die schlechte Therapiesituation dieser Tumorentität verbessern zu können.

Therapeutisch besonders interessant ist auch, dass in etwa 20 % bzw. 30-60 % aller Adenokarzinome des Ösophagus HER2 bzw. EGFR überexprimiert ist (al-Kasspooles et al. 1993; Langer et al. 2011; Nakamura et al. 1994; Polkowski et al. 1999; Wilkinson et al. 2004; Yacoub et al. 1997). Gegen beide Rezeptoren gibt es für andere Tumorentitäten bereits therapeutisch zugelassene, monoklonale Antikörper, so dass Grund zur Hoffnung besteht diese auch beim Ösophaguskarzinom einsetzen zu können. Im Moment laufen mehrere



klinische Studien, um den Effekt dieser Antikörper auf die Prognose der Patienten zu bestimmen. Die größte Aufmerksamkeit dabei hat die randomisierte, prospektive, multizentrische ToGA Studie erhalten (Bang et al. 2010). Die Studie ist die erste Phase III Studie, die die Wirksamkeit und Verträglichkeit des Anti-HER2 Antikörpers Trastuzumab in HER2-positiven, fortgeschrittenen, gastro-ösophagealen Karzinomen untersucht hat – mit großem Erfolg. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Kombinationstherapie von Trastuzumab und Chemotherapie das mediane Gesamtüberleben deutlich über dem bei alleiniger Chemotherapie lag (Bang et al. 2010). Zwar wurden in dieser Studie nur Adenokarzinome am unteren Ende der Speiseröhre im Übergang zum Magen untersucht, trotzdem lässt dies auch auf eine positive Wirkung der Therapie bei Adenokarzinomen des gesamten Ösophagus hoffen.

## **2.6 Ziele der Arbeit**

Trotz der Vielzahl an Biomarkern, welche in den letzten Jahren in der Forschung entdeckt und charakterisiert wurden, haben nur wenige den Sprung in die klinische Routine geschafft. Darüberhinaus sagen selbst die derzeit verwendeten therapielevanten Biomarker nicht immer korrekt ein Ansprechen der Patienten voraus. Ein Grund hierfür scheint der Mangel an Verständnis für die Vorgänge hinter den einzelnen Markern selbst zu sein: Welche Signalwege mit welchen Folgen werden durch den Marker reguliert? Gibt es Kompensationsmechanismen? Welche extra- und intrazellulären Einflüsse beeinflussen die Expression des Markers? Zusammenfassend, welche Rolle spielt der Marker im Gesamtgefüge des Tumors? Eine weitere in der Forschung bisher häufig vernachlässigte Fragestellung ist: Wie kann die Analyse des gefundenen Biomarkers an klinischen Formalin-fixierten Proben durchgeführt werden? Auch dies kann zu einer Verhinderung der Adaption des Markers in der Klinik führen. In Anbetracht dieser Probleme waren die Ziele meiner Arbeit:

1. Die Optimierung der Proteinextraktion aus routinemäßig gewonnenen Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten, humanen Geweben. Besonderes Interesse galt dabei der Proteinausbeute aus lange fixierten und alten Proben.
2. Die klinische Anwendung der Methode zur Analyse der beiden prognostischen Marker des Mammakarzinoms uPA und PAI-1 aus klinischen FFPE-Geweben.

3. Die Verwendung des Reverse Phase Protein-Mikroarrays (RPPA) zur erstmaligen Erstellung eines genaueren Bilds über die Signalwege, welche durch die beiden klinischen Marker uPA und PAI-1 in Mammakarzinomen und Lymphknotenmetastasen beeinflusst werden.
4. Die quantitative Bestimmung des therapeutisch relevanten HER2-Status aus FFPE-Geweben und die Klärung der Bedeutung der aktivierten Rezeptoren der HER-Familie im Mammakarzinom.
5. Die Ausweitung der Technik auf das Ösophaguskarzinom zur Überprüfung der prognostischen Relevanz einiger bekannter, aber für diese Tumorart bisher nicht näher analysierter, Proteine.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

##### 3.1.1 Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

###### Laufpuffer für SDS-PAGE

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

###### Gelladepuffer (5x)

Tris (1,25 M; pH 6,8)	312,5 mM
Glycerin	50 % (v/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	25 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (v/v)

###### Sammelgel (5 %)

Für ein 1,5 mm Gel des Mini-Protean3 Systems

dH <sub>2</sub> O	1,5 ml
Tris(1M; pH 6,8)	625 ml
Acrylamid (40 %)	380 ml
SDS (20 %)	12,5 $\mu$ l
APS (10 %)	20 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l

**Trenngel (10 %)**

Für ein 1,5 mm Gel des Mini-Protean3 Systems

dH <sub>2</sub> O	3,6 ml
Tris (1M; pH 8,8)	1,8 ml
Acrylamid (40 %)	1,8 ml
SDS (20 %)	37,5 µl
APS (10 %)	45 µl
TEMED	4,5 µl

**3.1.2 Lösungen für die Immundetektion****TBST**

Tris	20 mM
NaCl	137 mM
Tween20	0,1 % (v/v)
Auf pH = 7,4 einstellen	

**Transferpuffer**

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)

**5 % Bovines Serumalbumin in TBST (5 % BSA)**

Bovines Serumalbumin	2,5 g
TBST	50 ml

**5 % Magermilchpulver in TBST (5 % MP)**

Magermilchpulver	2,5 g
TBST	50 ml

### 3.1.3 Lysepuffer für Gefriergewebe

#### T-Per

Natriumfluorid	50 mM
Natrium-Orthovanadat	1 mM
$\beta$ -Glycerophosphat	10 mM
Natrium-Pyrophosphat,	1 mM
Proteaseinhibitor Tabletten	1 Stück
Complete Mini	
T-Per Extraktionspuffer	Ad to 10 ml

#### TBSTX

TBS (pH 8,5)	Molarität unbekannt (Puffer aus Femtelle ELISA-Kit; siehe Abschnitt 3.6)
Triton-X100	1 % (v/v)

### 3.1.4 Lysepuffer für FFPE-Gewebe

#### Extraktionspuffer (EB; patentiert)

Tris (1,25 M; pH 6,8)	60 mM
Glycerin	1,2 M
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,78 M (5,5 %)
SDS	70 mM (2 %)

#### Lämmli-Puffer mit $\beta$ -Mercaptoethanol (LM; nach Laemmli 1970)

Tris (1,25 M; pH 6,8)	60 mM
Glycerin	1,2 M
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,78 M (5,5 %)
SDS	70 mM (2 %)

**Lämmli-Puffer mit DTT (LD)**

Tris/HCl (1,25 M; pH 6,8)	60 mM
Glycerin	1,2 M
DTT	0,1 M
SDS	70 mM (2 %)

**Lämmli-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und Arginin (LMA)**

Tris (1,25 M; pH 6,8)	60 mM
Glycerin	1,2 M
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,78 M (5,5 %)
SDS	70 mM (2 %)
Arginin	10 mM

**Lämmli-Puffer mit DTT und Arginin (LDA)**

Tris (1,25 M; pH 6,8)	60 mM
Glycerin	1,2 M
DTT	0,1 M
SDS	70 mM (2 %)
Arginin	10 mM

## 3.2 Allgemeine Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 3-1 Verwendete Reagenzien und Chemikalien**

Reagenz	Hersteller
40 % Acrylamid/Bis 37.5:1	Bio-Rad (Hercules, USA)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dulbeccos PBS (für die Zellkultur)	PAA (Pasching, Österreich)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Formalin	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magermilchpulver (MP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mayers Hemalaun (Hämatoxylin)	Merck KGaA
Methanol	Merck (Darmstadt)
N, N, N', N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Bio-Rad (Hercules, USA)

Reagenz	Hersteller
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Paraffin	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Tris	Merck (Darmstadt)
Triton-X100	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Xylol	Merck (Darmstadt)

### 3.3 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen

**Tabelle 3-2 Verwendete Analysesysteme**

Reagenz/Kit	Hersteller
Complete, Mini Protease Inhibitor	Roche Applied Science (Mannheim)
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
peqGOLD Prestained Protein-Marker V	PeqLab (Erlangen)
Pertex	Medite Medizintechnik (Burgdorf)
Precision Plus Dual Colour Protein Standards	Bio-Rad (Hercules, USA)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad (Hercules, USA)
Protein Assay Standard II	Bio-Rad (Hercules, USA)
Real Peroxidase Blocking Solution	Dako (Glostrup, Dänemark)
SDS-Out	Pierce (Rockford, USA)
Sypro Ruby Protein Blot Stain	Invitrogen (Karlsruhe)
T-Per Proteinextraktionspuffer	Thermo Scientific (Surrey, UK)

### 3.4 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 3-3 Verwendetes Verbrauchsmaterial**

Material	Hersteller
96-well Platten, 384-well Platten	Biochrom (Berlin)
96-well Platten für ELISA	Becton/Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Cryovial PK/100 Cryocaps	Roth (Karlsruhe)
Deckgläser	Thermo Scientific (Surrey, UK)
Einbettkassetten	Medim (Giessen)
Hyperfilm ECL	Amersham (Braunschweig)
Küvetten	Hartenstein (Würzburg)
Nitrozellulosemembran BA85	Schleicher & Schuell (Dassel)
Objekträger	Thermo Scientific (Surrey, UK)
Objekträger Superfrost	Thermo Scientific (Surrey, UK)
Oncyte Avid Nitrocellulose Slides	Grace Bio-Lab (Bend, USA)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company (Chicago, USA)
Pasteurpipetten	Hartenstein (Würzburg)
Pipettenspitzen	Fisher Scientific (Schwerte)
Reaktionsgefäße (1,5, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Skalpellklingen	Sapphire (Pocasset, USA)
Slide-A-Lyzer	Pierce (Rockford, USA)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zeba Spin Desalting Columns	Pierce (Rockford, USA)
Zellkulturschalen (10 cm)	Biochrom (Berlin)
Zellschaber	Biochrom (Berlin)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)

### 3.5 Antikörper

**Tabelle 3-4 In dieser Arbeit eingesetzte Primärantikörper und deren Verdünnungen im Western Blot und Reverse Phase Protein Mikroarray**

Protein	Größe (kDA)	Klon	Hersteller	Blockierungslösung	Verdünnung Primärantikörper
Akt	60	#9272	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
p-Akt <sup>(Ser473)</sup>	60	#9271	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
β-Aktin	42	A1978 AC-15	Sigma-Aldrich	5 % MP	1:5000 5 % MP
E-Cadherin	120	#610182	BD	5 % MP	1:5000 5 % MP
EGFR	170	#2232	CST	5 % MP	1:2000 5 % BSA
p-EGFR <sup>(Tyr1086)</sup>	170-180	ZMD.504	Invitrogen	5 % MP	1:5000 5 % BSA
ERα	66	#E1629R06SG	DCS	5 % MP	1:100 5 % MP
p-ERα <sup>(Ser118)</sup>	66	#2511	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
Erk	42; 44	#9102	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
p-Erk <sup>(Thr202/Tyr204)</sup>	42; 44	#9101	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
FAK	125	3285	CST	5 % MP	1:3000 5 % MP
Gsk3β	46	#9315	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
p-Gsk3β <sup>(Ser9)</sup>	46	#9336	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
HER2	185	#A0485	Dako	5 % MP	1:1000 TBST
p-HER2 <sup>(Tyr1248)</sup>	185	#44-900	Invitrogen	5 % MP	1:1000 5 % BSA
HER3	185	ab40627	Abcam	5 % MP	1:200 5 % MP
p-HER3 <sup>(Tyr1289)</sup>	185	#4791	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
HER4	180	#4795	CST	5 % MP	1:1000 TBST
HSP 27	27	#2402	CST	5 % MP	1:1000 5 % MP
p-HSP 27 <sup>(Ser78)</sup>	27	#2405	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
p-HSP 27 <sup>(Ser82)</sup>	27	#2401	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
p-HSP 27 <sup>(Ser15)</sup>	27	ab39399	Abcam	5 % MP	1:1000 5 % MP
Ilk1	51	#3862	CST	5 % MP	1:2000 5 % MP
Integrin αV	135; 140	#47115	CST	5 % MP	1:2000 5 % MP
p38	38	#9212	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
p-p38 <sup>(Thr180/Tyr182)</sup>	38	#4631	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
PAI-1	45	MA1-27330	Dianova	5 % MP	1:500 5 % MP
PAI-1	45	AHP1100	Serotec	5 % MP	1:6000 5 % MP
PR	90; 118	PI633R06	DCS	5 % MP	1:100 5 % MP
PI3K	85	#4292	CST	5 % MP	1:1000 5 % MP
Pten	54	#9552	CST	5 % MP	1:2000 5 % BSA
p-Pten <sup>(Ser380)</sup>	54	#9551	CST	5 % MP	1:2000 5 % BSA
Rock	160	#4035	CST	5 % MP	1:1000 TBST
Snail	32; 64		Dr. Kremmer (Rosivatz et al. 2006)	5 % MP	1:2500 5 % MP
Stat3	79; 86	#4904	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
p-Stat3 <sup>(Ser727)</sup>	79, 86	#9136(Muraoka-Cook et al. 2006)	CST	5 % MP	1:1000 5 % MP
p-Stat3 <sup>(Tyr705)</sup>	79; 86	#9145	CST	5 % MP	1:1000 5 % BSA
uPA	33	ab8475	Abcam	5 % MP	1:200 5 % MP
uPA	35	ab19893	Abcam	5 % MP	1:500 5 % MP
uPAR	45	sc9793	Santa Cruz	5 % MP	1:500 5 % MP

Firmen und Abkürzungen:

CST: Cell signaling technology (Danvers, USA); Sigma-Aldrich (St. Louis, USA); BD: Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA); Invitrogen (Carlsbad, USA), Dako (Glostrup, Dänemark); Abcam (Cambridge, USA); Dianova (Hamburg); Santa Cruz (Santa Cruz, USA); MP: Magermilchpulver in TBST; BSA: Bovines Serumalbumin in TBST



**Tabelle 3-5 In dieser Arbeit eingesetzte Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper**

Antikörper	Klon	Hersteller	Verdünnung	
Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	#7074	Cell signalling (Danvers, USA)	1:2000	5 % MP
Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	NA931	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)	1:5000	5 % MP
Anti-Ratte IgG, HRP-gekoppelt	NA935	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)	1:5000	5 % MP
Anti-Ziege IgG, HRP-gekoppelt	ab6741	Abcam (Cambridge, USA)	1:5000	5 % MP

### 3.6 Rekombinante Proteine

**Tabelle 3-6 Zur Quantifizierung des Reverse Phase Protein Mikroarray eingesetzte aufgereinigte, rekombinante Proteine**

Protein (Bestellnr.)	Hersteller
HER2 (#PKSP011)	Biaffin (Kassel)
PAI-1	V. Magdolen, Frauenklinik der TUM
uPA (#Z00054)	GenScript (Piscataway, USA)

**Tabelle 3-7 Proteine zur Herstellung von Zellpellets**

Protein (Bestellnr.)	Hersteller
Casein (C7078)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fibrinogen (F8513)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Thrombin (T4648)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 3.7 ELISA-Kits

**Tabelle 3-8 Die in dieser Arbeit verwendeten ELISA**

Protein (Bestellnr.)	Firma
PAI-1 (EP1100-1)	Promega (Madison, USA)
PAI-1 (TC12075)	Technoclone (Wien, Österreich)
uPA (EU1001-1)	Promega (Madison, USA)
uPA (TC12010)	Technoclone (Wien, Österreich)
uPA/PAI-1 (#899, Femtelle)	American diagnostica (Pfungstadt)

### 3.8 Zelllinien

**Tabelle 3-9 Für Proteinextraktionen verwendete Zelllinien**

Name	Gewebe	Wachstumsmediu m	Wachstumsweise; Morphologie
HEC1A	Humanes Endometriumkarzinom	DMEM* + 10 % FKS#	adhärent; epithelial
MDA-MB-231	Humanes Mammakarzinom	DMEM* + 10 % FKS#	adhärent; epithelial
MDA-MB-435s	Humanes Mammakarzinom	DMEM* + 10 % FKS#	adhärent; epithelial

\*DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; #FKS: Fetales Kälberserum

### 3.9 Geräte

**Tabelle 3-10 In dieser Arbeit verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
BioOdysseyCalligrapher MiniArrayer	Bio-Rad (Hercules, USA)
Eismaschine	Scotsman Ice (Vernon Hills, USA)
Entwicklermaschine SRx-101A	Konica Minolta (Langenhagen)
Expert Plus Photometer	Asys (Eugendorf, Österreich)
Gelelektrophoresekammer Mini Sub Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
Histokinet Shandon Pathcentre	Global Medical Instrumentation GMI (Denver, USA)
HPScanjet3770	Hewlett-Packard (Dornach)
Kühltruhe Ultra Low Freezer	Sanyo (München)
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laborwaage	Sartorius (Göttingen)
Mikrotome HM335E	Microtech (Franchville, France)
Mini PROTEAN 3 Cell System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mini Trans-Blot Cell System	Bio-Rad (Hercules, USA)
MS1 Minishaker	IKA Works (Willmington, USA)
pH-Meter (pH 211)	HANNA instruments (Woonsocket, USA)
Photosystem Eagle Eye II	Stratagene (La Jolla, USA)
Pipette Pipetman (20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson (Middleton, USA)
Pipetten Eppendorf Research (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipetus-akku Pipetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad (Hercules, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
UV/Vis Spektrophotometer DU 530	Beckman (Fullerton, USA)
UV-Spektrometer Ultraspec 200	Amersham (Braunschweig)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

### 3.10 Software

**Tabelle 3-11 Für die Datenauswertung und die Erstellung von Abbildungen benutzte Software**

Software	Quelle
Microsoft Office 2003	Microsoft (Redmond, USA)
Adobe Photoshop Version CS3	Adobe Systems (San Jose, USA)
Adobe Illustrator CS3	Adobe Systems (San Jose, USA)
Tree View1.6	<a href="http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm">http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm</a>
MicroVigene 3.5.0.0	VigeneTech (Boston, USA)
SPSS für Windows 18.0	SPSS Inc. (Chicago, USA)
Cluster 2.11	<a href="http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm">http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm</a>

## **3.11 Eingesetzte Gewebeproben**

### ***3.11.1 Gewebe für die Optimierung der Proteinextraktion aus Formalin-fixierten Geweben***

Zur Etablierung eines verbesserten Puffers zur Extraktion von Proteinen aus FFPE-Geweben wurden verschiedene Versuchsansätze mit verschiedenen Geweben durchgeführt.

Um den Einfluss der zu testenden Puffer auf die Ausbeute und Qualität der Extrakte sowie die optimale Kochzeit für eine effiziente Proteinextraktion zu bestimmen, wurden zwei Nierenkarzinom-, zwei Kolonkarzinom- und drei Mammakarzinomproben verwendet. Die Gewebe wurden zwischen den Jahren 1997 und 2007 routinemäßig von der Pathologie des Klinikums rechts der Isar bearbeitet.

Um die Ortsunabhängigkeit der Effektivität der Puffer zu zeigen wurden darüber hinaus je drei Mammakarzinomproben aus der Routine der Pathologie des Klinikums rechts der Isar sowie des Klinikums Rosenheim aus dem Jahre 2008 verwendet.

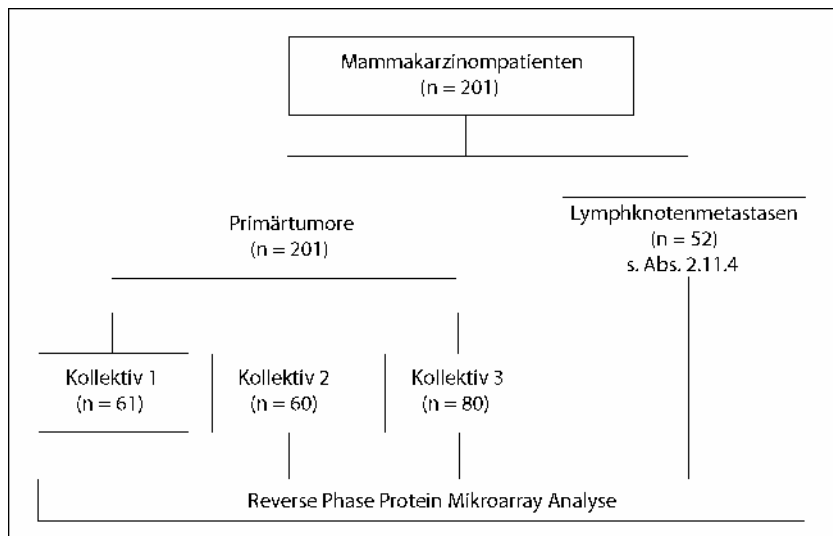
Für den Vergleich von Gefrier- und FFPE-Gewebe wurden vier Proben (gesundes Gewebe von Kolon, Magen und Muskel und ein Ovarialkarzinom) zu gleichen Teilen geteilt, wobei eine Hälfte routinemäßig in Formalin und die andere in Flüssigstickstoff fixiert wurde.

Der Einfluss der Fixierungszeiten in Formalin wurde an Hand von Lymphknotenproben überprüft, die für 6, 24, 48 bzw. 144 Stunden in Formalin fixiert wurden.

Für die Auswirkung der Lagerungsdauer von FFPE-Blöcken auf die Proteinausbeute wurden aus den Jahren 1990 und 2010 je ein Kolonkarzinom sowie je zwei Magenkarzinome untersucht.

### 3.11.2 Mammakarzinomgewebe für die uPA und PAI-1 assoziierte Signalwegsanalyse

Für die Analyse der uPA und PAI-1 assoziierten Signalwege im Mammakarzinom wurden drei Kollektive mit 60, 61 und 80 routinemäßig Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete primäre Brustkrebsgeweben untersucht (Abbildung 3-1 links).



**Abbildung 3-1 Schematischer Überblick über das Mammakarzinomkollektiv, das zur Analyse von uPA und PAI-1 assoziierten Signalwegen verwendet wurde.** Die Analyse von uPA und PAI-1 assoziierten Signalwegen wurde an drei unabhängigen Kollektiven mit insgesamt 201 Patienten durchgeführt. Für 52 der Patientinnen war es möglich Lymphknotenmetastasen zu untersuchen und mit den korrespondierenden Primärtumoren zu vergleichen. Dieses Teilkollektiv wird in Abschnitt 3.11.3 näher beschrieben

Die Diagnose und Operation der Patienten erfolgte in den Jahren 2000 - 2008. Die klinische und histopathologische Klassifizierung der Tumore erfolgte nach den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation WHO und der Internationale Vereinigung gegen Krebs UICC (Wittekind et al. 2010) und wurde für diese Studie aus dem routinemäßig verfassten Befund entnommen. Für eine detaillierte Darstellung der Zusammensetzung der drei Kollektive sowie des Gesamtkollektivs siehe Tabelle 3-12.

**Tabelle 3-12 Patienten- and Tumorcharakteristika der drei bezüglich der uPA und PAI-1 Signalregulation untersuchten Mammakarzinomkollektive.**

Faktor	Zusammenfassung der Kollektive		Kollektiv 1		Kollektiv 2		Kollektiv 3	
	Anzahl an Patienten	%	Anzahl an Patienten	%	Anzahl an Patienten	%	Anzahl an Patienten	%
<b>Gesamt</b>	201	100	61	100	60	100	80	100
<b>Alter</b>								
<50	37	18,4	8	13,1	13	21,7	16	20,0
≥50	164	81,6	53	86,9	47	78,3	64	80,0
<b>Tumorgröße</b>								
T1	78	38,8	19	31,1	20	33,3	39	48,7
T2	94	46,8	32	52,5	30	50,0	32	40,0
T3	12	6,0	2	3,3	6	10,0	4	5,0
T4	13	6,4	6	9,8	4	6,7	3	3,8
unbekannt	4	2,0	2	3,3	0	0,0	2	2,5
<b>Nodalstatus</b>								
negativ	91	45,3	18	29,5	28	46,7	45	56,3
positiv	105	52,2	41	67,2	32	58,7	32	40,0
unbekannt	5	2,5	2	3,3	0	0,0	3	3,7
<b>Fernmetastasen</b>								
M1	2	1,0	0	0,0	2	3,3	0	0,0
M0	178	88,6	57	93,4	52	86,7	69	86,3
unbekannt	21	10,4	4	6,6	6	10,0	11	13,7
<b>Grading</b>								
G1	19	9,5	3	5,0	3	5,0	13	16,3
G2	81	40,3	27	44,3	24	40,0	30	37,5
G3	88	43,7	28	45,8	26	43,3	34	42,5
unbekannt	13	6,5	3	4,9	7	11,7	3	3,7
<b>Hormonrezeptorstatus</b>								
positiv	151	75,1	41	67,2	43	71,7	67	83,8
negativ	35	17,4	9	14,8	15	25,0	11	13,7
unbekannt	15	7,5	11	18,0	2	3,3	2	2,5

### **3.11.3 Gewebe für den Vergleich von Primärtumoren des Mammakarzinoms und assoziierter Lymphknotenmetastasen**

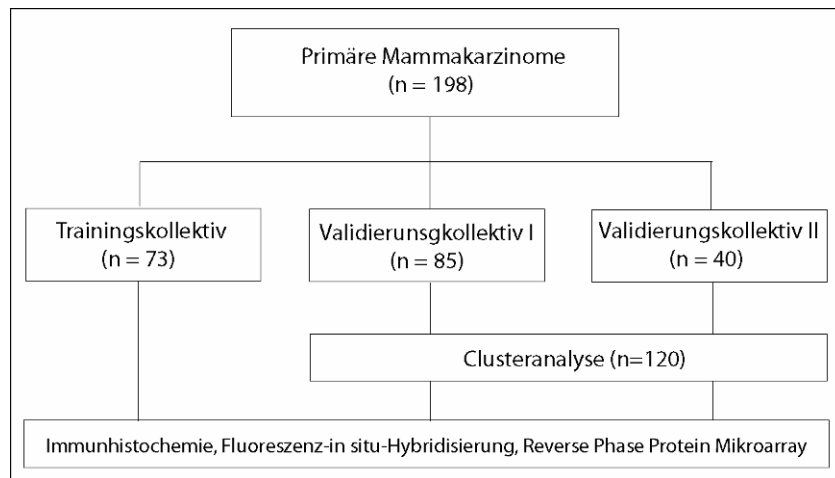
Für die Analyse der Signalwegsregulierung in Lymphknotenmetastasen des Mammakarzinoms wurden alle verfügbaren Metastasen zu dem oben beschriebenen Kollektiv aus dem Archiv der Pathologie des Klinikums rechts der Isar verwendet. Insgesamt wurden 52 routinemäßig Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Lymphknoten/Primärtumor-Paare untersucht (Abbildung 3-1). Die Zusammenstellung der klinischen Parameter der Primärtumore dieses Kollektivs ist aus Tabelle 3-13 ersichtlich.

**Tabelle 3-13 Patienten- und Tumorcharakteristika der untersuchten Mammakarzinome mit korrespondierenden Lymphknotenmetastasen**

Faktor	Anzahl an Patienten	%
<b>Gesamt</b>	52	100
<b>Alter</b>		
<50	6	11,5
≥50	46	88,5
<b>Tumorgröße</b>		
T1	11	21,2
T2	31	59,6
T3	7	13,5
T4	3	5,8
<b>Nodalstatus</b>		
N1	22	42,3
N2	16	30,8
N3	14	26,9
<b>Fernmetastasen</b>		
M1	0	0,0
M0	50	96,2
unbekannt	2	3,8
<b>Grading</b>		
G1	1	1,9
G2	24	46,1
G3	27	51,9
<b>Hormonrezeptorstatus</b>		
positiv	41	78,9
negativ	10	19,2
unbekannt	1	1,9

### 3.11.4 Mammakarzinomgewebe zur RPPA Analyse der HER-Rezeptoren

Die Analyse der Mammakarzinome in Bezug auf deren HER2-Status sowie die Expressionshöhen weiterer Mitglieder der HER-Familie wurde an drei unabhängigen Kollektiven mit insgesamt 198 Patienten durchgeführt. Die Kollektive werden im Weiteren als Trainingskollektiv (73 Patientinnen des Klinikums rechts der Isar), Validierungskollektiv I (85 Patientinnen des Klinikums rechts der Isar) und Validierungskollektiv II (40 Patientinnen des Klinikums Rosenheim) bezeichnet.



**Abbildung 3-2 Zusammenstellung der für die Analyse der HER-Familie verwendeten Mammakarzinomproben.** Insgesamt wurden 198 Primärtumore untersucht. Diese waren in drei unabhängige Kollektive (Trainingskollektiv, Validierungskollektiv I, Validierungskollektiv II) unterteilt. 120 Fälle der beiden Validierungskollektive wurden in eine Clusteranalyse bezüglich der Expression der HER-Proteine integriert.

Die Zusammensetzung erfolgte nicht zufällig, sondern es wurde, soweit möglich, auf eine ungefähre Gleichverteilung der in diesem Zusammenhang interessanten fünf HER2 Diagnosegruppen (IHC-Status = 0; IHC-Status = 1; IHC-Status = 2 + FISH negativ; IHC-Status = 2 + FISH positiv; IHC-Status = 3) geachtet. Tabelle 3-14 gibt eine genaue Zusammenstellung der klinischen Parameter.

**Tabelle 3-14 Patienten- and Tumorcharakteristika des bezüglich des HER2 und p-HER2-Status untersuchten Mammakarzinomkollektivs**

Faktor	Trainingskollektiv		Validierungskollektiv I		Validierungskollektiv II	
	Anzahl an Patienten	%	Anzahl an Patienten	%	Anzahl an Patienten	%
<b>Gesamt</b>	73	100	85	100	40	100
<b>Alter</b>						
<50	14	19,2	14	16,5	5	12,5
≥50	59	80,8	71	83,5	35	87,5
<b>Tumorgroße</b>						
T1	32	43,8	35	41,2	19	47,5
T2	32	43,8	42	49,4	17	42,5
T3	4	5,5	6	7,1	3	7,5
T4	4	5,5	2	2,3	1	2,5
unbekannt	1	1,4	0	0	0	0
<b>Nodalstatus</b>						
negativ	41	56,2	46	54,1	23	57,5
positiv	31	42,4	35	41,2	17	42,5
unbekannt	1	1,4	4	4,7	0	0
<b>Fernmetastasen</b>						
M1	0	0	2	2,4	0	0
M0	73	100	83	97,6	0	0
unbekannt	0	0	0	0	40	100
<b>Grading</b>						
G1	7	9,6	8	9,4	1	2,5
G2	30	41,1	34	40,0	20	50,0
G3	34	47,9	42	49,4	19	47,5
unbekannt	1	1,4	1	1,2	0	0
<b>HER2-Status</b>						
IHC 0	23	31,5	16	18,8	4	10,0
IHC 1	23	31,4	24	28,2	8	20,0
IHC 2/FISH-	11	15,1	20	23,6	12	30,0
IHC 2/FISH+	10	11,7	12	14,1	1	2,5
IHC 3	6	8,2	13	15,3	15	37,5
<b>Hormonrezeptorstatus</b>						
positiv	58	79,4	68	80,0	28	70,0
negativ	15	20,6	16	18,8	12	30,0
unbekannt	0	0	1	1,2	0	0

### 3.11.5 Gewebe des Ösophaguskarzinoms zur Markeranalyse

Für die retrospektive Analyse des Barrett-Karzinoms standen 87 routinemäßig Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebeproben zur Verfügung. Dieses Kollektiv setzte sich aus allen Patienten zusammen, welche im Zeitraum von 1990 bis 2005 am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München aufgrund von Speiseröhrenkrebs operiert wurden. Keiner der Patienten erhielt eine tumorbedingte neoadjuvante oder adjuvante Therapie. Die klinischen und histopathologischen Parameter wurden dem



routinemäßig verfassten Befund entnommen, welcher den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation WHO und der Internationalen Vereinigung gegen Krebs UICC (Wittekind et al. 2010) entspricht. Für eine detaillierte Darstellung der Zusammensetzung des Kollektivs siehe Tabelle 3-15.

**Tabelle 3-15 Patienten- and Tumorcharakteristika des in dieser Arbeit untersuchten Ösophaguskarzinomkollektivs**

Faktor	Anzahl an Patienten	%
<b>Gesamt</b>	87	100
<b>Alter</b>		
Mittelwert	63	
Spannweite	33-82	
<b>Geschlecht</b>		
weiblich	8	17
männlich	79	83
<b>Tumorgroße</b>		
T1	29	33
T2	19	22
T3	39	45
<b>Nodalstatus</b>		
negativ	44	51
positiv	43	49
<b>Fernmetastasen</b>		
M0	79	91
M1	8	9
<b>Grading</b>		
G1	1	1
G2	41	47
G3	45	52

### **3.11.6 Einverständniserklärung der Patienten**

Alle Patienten gaben ihre Zustimmung zur Verwendung ihrer Resektate zu Forschungszwecken und alle oben erwähnten Studien wurden von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München genehmigt. Referenznummern: 2136/08 und 2056/08

## **3.12 Herstellung von FFPE-Gewebeblöcken**

In der klinischen Routine ist es seit Jahrzehnten Standard Patientengewebe nach der Operation schnellstmöglich in Formalin zu fixieren und folgend in Paraffin einzubetten.

Durch die Fixierung kommt es zur Quervernetzung von Proteinen, DNA und RNA und somit zu einer guten morphologischen Konservierung des Gewebes.

Die für diese Arbeit verwendeten Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebe (FFPE-Gewebe) wurden im Routinelabor des Instituts für Pathologie des Klinikum rechts der Isar mit Hilfe des Histokineten „Shandon Pathcentre“ (GMI) automatisiert angefertigt. Dabei wurden die schon, je nach Größe der Gewebestücke und Zeitpunkt der Operation, 6- 60 Stunden in Formalin fixierten Gewebe, zunächst nochmals 2 Stunden in 10 % methanolstabilisiertes Formalin eingelegt und folgend durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1x 1 Stunde 70 % Ethanol, 2x 1 Stunde 96 % Ethanol, 3x 1 Stunde 100 % Isopropanol und 2x 1 Stunde Xylol) entwässert. Nachfolgend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Um Alkoholrückstände im Paraffin zu vermeiden, wurde das Gewebe dazu nacheinander für 2x 15 Minuten, 1x 30 Minuten, 1x 1 Stunde in vier Paraffinbäder getaucht. Abschließend wurde das Gewebe mittels Einbettautomaten vollständig in Paraffin eingebettet.

### **3.13 Herstellung von FFPE-Zellpellets**

Um die Bestimmung des uPA und PAI-1 Gehalts aus FFPE-Proben mittels des klinisch zugelassenen ELISA auszutesten, wurde zunächst die Kompatibilität des ELISA an Hand von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Zellen (Hec1A und MDA-MB-435s) überprüft. Für die Generierung solcher FFPE-Zellen war es nötig diese mit Thrombin, Casein und Fibrinogen zu pelletieren. Dazu wurden pro Zelllinie vier Zellkulturschalen (Ø 10 cm, 80 % konfluent) verwendet, die 2x mit 4 °C kaltem PBS gewaschen wurde. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in je 2 ml PBS abgelöst und in ein auf Eis stehendes 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Zellen für 5 Minuten bei 4 °C und 300 g wurde das Pellet in 10 % Formalin resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Pellet mit 150 µl Thrombin (100 U/ml), 750 µl Casein (10 mg/ml) und 600 µl Fibrinogen (25 mg/ml) versetzt und für mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert. Abschließend wurden die fest gewordenen Pellets mittels Einbettautomaten in Paraffin eingebettet. Jede weitere Behandlung erfolgte entsprechend der Protokolle für FFPE-Gewebe.

## **3.14 Proteinextraktion**

### ***3.14.1 Proteinextraktion aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben***

Um Proteine aus FFPE Gewebe extrahieren zu können, muss zunächst das Paraffin entfernt werden. Dazu wurde das Gewebe in 10 µm dicken Schnitten auf Glasobjektträger aufgezogen und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 3x 10 Minuten Xylol, 2x 10 Minuten 100 % Isopropanol, 2x 10 Minuten 96 % Ethanol und 2x 70 % Ethanol) entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte kurzfristig bis zur weiteren Verwendung in destilliertem Wasser aufbewahrt. Um sicherzugehen, dass bei der folgenden Mikrodisektion nur Tumorbereiche mit mindestens 80 % Tumorzellen verwendet wurden, wurden diese Tumorareale vor der Extraktion von einem erfahrenen Pathologen auf einem HE-gefärbten Schnitt markiert. Im Folgenden wurde das gewünschte Gewebe von etwa drei 10 µm dicken Schnitten mit je 0,5 cm<sup>2</sup> Gewebe mikrodisektiert und in 100 µl Extraktionspuffer (LMA) überführt. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Proben für 20 Minuten im Wasserbad bei 100 °C gekocht, 2 Stunden bei 80 °C und 750 rpm inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 4 °C und 14000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Für den Vergleich des in dieser Arbeit neu etablierten Puffers LMA mit dem Vorgänger EB wurde obiges Protokoll ebenfalls mit EB als Extraktionspuffer durchgeführt. Für die Ermittlung der optimalen Extraktionstemperatur wurde die sowohl die Kochzeit (10, 15 oder 20 Minuten) variiert, als auch die Notwendigkeit des Inkubationsschritts bei 80 °C überprüft.

### ***3.14.2 Proteinextraktion aus schockgefrorenen Geweben***

Für die in Abschnitt 4.1.1 beschriebene Etablierung des FFPE-Extraktionspuffers LMA sollte die Qualität und Ausbeute der FFPE-Proteinextrakte mit denen aus Kyromaterial verglichen werden. Daher wurde die Extraktion aus Gefriergewebe sowohl mit LMA und EB als auch einem Standardpuffer für Gefriergewebe T-Per durchgeführt. Dazu wurden 20 µm dicke Schnitte in ein Reaktionsgefäß überführt und in der entsprechenden Menge Puffer für 15

Minuten auf Eis lysiert (etwa 1,5 mm<sup>3</sup> in 100 µl Puffer). Im Anschluss wurde für einige Sekunden sonifiziert und 15 Minuten bei 4 °C und 14000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Für den klinischen uPA/PAI-1 ELISA wurden ebenfalls Extrakte aus Gefriergewebe benötigt. Diese Lysate wurden nach Herstellerangaben in der klinischen Routine produziert und standen mir aliquotiert zur Verfügung. Die zu Vergleichszwecken benötigten Lysate aus Gefriergewebe in LMA wurden nach obigem Protokoll angefertigt.

### **3.14.3 Proteinextraktion aus Zellkulturen**

Zu Herstellung von Proteinlysaten aus Zellkulturen wurde eine Zellkulturschale (Ø 10 cm, 80 % konfluent) verwendet, welche 2x mit 4 °C kaltem PBS gewaschen wurde. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen in 150 µl Puffer abgelöst, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 Minuten unter gelegentlichem Mischen auf dem Vortexer auf Eis inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14000 g wurde der Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert. Der Extraktionspuffer entsprach dabei dem Puffer, der für die Herstellung des zu vergleichenden Gewebelysats verwendet wurde. TBSTX wurde für die Versuche mit dem klinischen ELISA verwendet, LMA unter anderem für die Vorversuche zur Antikörpervalidierung für FFPE-Gewebe.

## **3.15 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine der Standardfärbungen in der Histologie, die es mit der nötigen Erfahrung möglich macht, zwischen normalem, entzündlich-verändertem oder pathologischem Gewebe zu unterscheiden. Im ersten Schritt werden die Kerne mit einer Hämatoxylinlösung gefärbt. Sie erscheinen danach blau bis schwarz. Der zweite Schritt ist die Gegenfärbung mit dem Xanthen-Farbstoff Eosin. Dabei werden Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rot gefärbt.

Alle HE-Färbungen für diese Arbeit wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt. Zunächst mussten die FFPE-Schnitte durch Xylol und eine darauf folgende absteigende Alkoholreihe (je 3x 10 Minuten Xylol, 2x 10 Minuten 100 % Isopropanol, 2x 10 Minuten 96 % Ethanol und 2x 70 % Ethanol) entparaffiniert und rehydriert werden, um sie für die

Farbstoffe zugänglich zu machen. Anschließend erfolgten die Färbung in Hämatoxylin, ein Waschschriff unter fließendem Wasser und die Färbung mit Eosin, jeweils für 10 Minuten. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 2x 96 % Ethanol, 2x 100 % Isopropanol und Xylol) wurden die Schnitte mit einem Kleber (Pertex) und einem Deckglas konserviert.

## **3.16 Methoden zur Umpufferung der Proteinlysate**

### **3.16.1 Aufreinigung über Entsalzungssäulen**

Um eine Kompatibilität der FFPE-Extrakte mit dem klinischen Femtelle-ELISA zu ermöglichen, sollten alle Salze und andere Moleküle, speziell  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS, mit Hilfe der Entsalzungssäulen „Zeba Desalt Spin Columns“ (Pierce) aus den Proteinextrakten entfernt werden. Die dazu verwendeten Säulen sind mit hohlen Granulatkügelchen gefüllt, die eine Porengröße von etwa 20 kDa aufweisen. Wird das Proteinlysate aufgetragen, dringen Moleküle kleiner 20 kDa in das Granulat ein, während größere Moleküle, zum Beispiel die Proteine ungehindert durchlaufen und somit schneller eluiert werden können.

Bei der Verwendung der Säulen wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Zunächst wurde der in den Säulen befindliche Lagerungspuffer durch Zentrifugation für 1 Minute bei 1500 g entfernt. Nach dreimaligem Waschen der Säulen mit 300  $\mu$ l des gewünschten Eluationspuffer TBXTX wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 70 – 130  $\mu$ l des Lysats aufgetragen. Anschließend wurde für 2 Minuten bei 1500 g zentrifugiert und so das aufgereinigte Protein gewonnen.

### **3.16.2 Dialyse**

Ein anderer Ansatz war die Proteinlysate mittels Dialyse umzupuffern. Bei diesem Verfahren macht man sich das Prinzip der Diffusion durch eine semipermeable Membran (Osmose) zu Nutze. Die Membran ist für kleinere Moleküle wie zum Beispiel Salze durchlässig, nicht aber für größere Moleküle wie Proteine. Wird die Proteinlösung getrennt durch eine semipermeable Membran in ein großes Volumen von Wasser oder Puffer

gebracht, kommt es somit zur Diffusion der kleineren Lösungsbestandteile nicht aber der Proteine.

In dieser Arbeit wurde dafür der Slide-A-Lyzer (Pierce) verwendet. Dies ist ein 1 ml fassender Zylinder, der an seiner Unterseite von einer Dialysemembran mit einer Porengröße von 20 kDa überzogen ist. Durch diesen Aufbau ist eine einfache Handhabung auch von geringen Lysatvolumina gewährleistet. Zur SDS- und  $\beta$ -Mercaptoethanol-Entfernung wurden die Zylinder nach Vorschrift mit 10 – 100  $\mu$ l Proteinlysat befüllt und in einem Schwimmständer in ein mit TBSTX befülltes Becherglas gestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Pegel des Puffers unter dem des Lysats blieb, um ein Einströmen des Puffers aufgrund von hydrostatischem Druck zu vermeiden. Unter vorsichtigem Rühren, wurde die Probe für 1 Stunde dialysiert. Anschließend wurde das Lysat aus der Dialyseeinheit entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

### **3.16.3 SDS-Ausfällung**

Das Reagenz SDS-Out (Pierce) ist nach Herstellerangaben dazu geeignet gelöstes SDS aus Proteinlysaten zu entfernen. Dazu wurde das Lysat im Verhältnis 20:1 mit SDS-Out versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das ausgefällte SDS bei 10000 g für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand über eine im Kit enthaltene Membran gefiltert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

### **3.16.4 Proteinfällungen**

#### Aceton-Fällung

Aceton ist ein organisches Lösungsmittel, das mit den Proteinen um das Hydratationswasser konkurriert und so zur Fällung der Proteine führt. Zur Durchführung der Fällung wurde die Proteinlösung mit dem 4-fachen Volumen an eiskaltem Aceton versetzt und mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14000 g für 15 Minuten bei 4 °C wurde das Pellet kurz bei Raumtemperatur getrocknet und in dem gewünschten Puffer gelöst.

### Aceton/TCA-Fällung

Die Verwendung von 10 % Trichloressigsäure (TCA) in Aceton ist eine sehr effektive Methode um Proteine zu fällen, da das anionische Trichloracetat die Verdrängung der Hydrathülle des Proteins durch Aceton verstärkt.

Für diese Fällung wurde die Probe im Volumenverhältnis 2:1 mit TCA-Lösung versetzt und anschließend für 2 Stunden bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 14000 g wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, indem es durch Pipettieren gelöst und anschließend für 15 Minuten bei 14000 g und 4 °C abzentrifugiert wurde. Danach wurde es kurz bei Raumtemperatur getrocknet und folgend in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

### Methanol/Chloroform-Fällung

Das Prinzip der Methanol/Chloroform-Fällung beruht auf der Erzeugung einer Emulsion aus einer organischen Phase (Methanol/Chloroform) und einer wässrigen Phase (Wasser). Um diese zu erzeugen, wurde das Proteinlysate im Volumenverhältnis 1:4 mit Methanol v. Die Probe wurde kurz geschüttelt, sowie folgend bei 14000 g für 10 Sekunden abzentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von Chloroform und destilliertem Wasser beides im Verhältnis 1:1 zur Probe. Durch 1-minütige Zentrifugation trennte sich das Gemisch in zwei Phasen wodurch die Proteine an der Interphase ausfielen. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und erneut Methanol hinzu pipettiert. Durch den Überschuss an Methanol sowie durch 2-minütige Zentrifugation der Probe wurde ein proteinhaltiges Pellet erzeugt und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit Ethanol gewaschen, indem es durch Pipettieren gelöst und anschließend für 2 Minuten bei 14000 g und 4 °C abzentrifugiert wurde. Danach wurde es kurz bei Raumtemperatur getrocknet und folgend in dem gewünschten Puffer aufgenommen.

## **3.17 Gesamtproteinbestimmung**

### **3.17.1 Bradford-Assay**

Die Gesamtproteinkonzentration der hergestellten Proteinlysate wurde nach Bradford bestimmt. Grundlage diese Methode ist die Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue an basische (Arg, His, Lys) sowie aromatische (Try, Tyr, Phe) Reste der Proteine im sauren Milieu. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt sich durch die Bindung an Proteine von 470 nm (rötlich-braun) nach 595 nm (blau). Dieser Farbumschlag ist im Bereich von circa 1-200 µg/ml linear proportional zur Proteinmenge (Bradford, 1976), welche somit indirekt in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann.

Zur Durchführung des Arrays wurde eine Eichgeraden mit je 100 µl BSA-Standard II (Bio-Rad) in Konzentrationen zwischen 1,6 und 50 µg/ml vorgelegt. Die zu untersuchenden Proben wurden 1:100 verdünnt, ebenfalls zu einem Endvolumen von 100 µl. Zu den so vorbereiteten Standards und Proben wurden je 900 µl des 1:5 verdünnten Protein Assay Dye Reagent (Bio Rad) gegeben und nach 5 Minuten die Absorption mit Hilfe des UV/Vis Spectrophotometer 530 (Beckman) bei 595 nm bestimmt.

### **3.17.2 Sypro-Ruby-Färbung**

Nachdem die Proteinextrakte wie unter 3.20.1 beschrieben, auf einen Nitrozellulose-beschichteten Glasobjektträger gespottet wurden, folgte ein Gesamtproteinnachweis mit Hilfe des Sypro-Ruby Protein Blot Stains (Molecular Probes). Sypro-Ruby ist ein organometallischer Ruthenium-Chelatkomplex, welcher im sauren Milieu nicht-kovalente Wechselwirkungen mit den Aminogruppen der basischen Aminosäuren, Lysin, Arginin, und Histidin, eingeht. Die damit erzielte Bestimmung des Gesamtproteingehalts ist nötig, um eine Referenz für die Normalisierung der im folgenden Versuchsverlauf immunologisch bestimmten Protein/Antikörper-Signale zu bekommen.

Für die Bestimmung wurden die Objektträger kurz in TBST (siehe Abschnitt 3.1.2) equilibriert, für 15 Minuten in 7 % Essigsäure/10 % Methanol geschwenkt, 4-mal je 5 Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen, für 10 Minuten in der Sypro-Ruby Lösung



gefärbt und abschließend 4-mal je 1 Minute in deionisiertem Wasser gewaschen. Die Signale auf den noch feuchten Objektträgern wurden unter UV-Licht mit einem Eagle-Eye II (Stratagene) detektiert.

### **3.18 Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassays (ELISA)**

Das Prinzip des enzymgekoppelten Immunadsorptionsassays (engl.: enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)) beruht auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an Proteine. Die in dieser Arbeit verwendete und meist verbreitete Form des ELISA ist der Sandwich-ELISA. Hierbei bindet das nachzuweisende Protein zunächst an einen auf einer Trägeroberfläche immobilisierten Antikörper. Folgend bindet ein zweiter Antikörper an diesen Antikörper-Protein-Komplex. Dabei ist es entscheidend, dass beide Antikörper unterschiedliche Epitope des Proteins erkennen, um sich nicht gegenseitig zu behindern. Das Protein befindet sich also wie in einem Sandwich zwischen zwei Antikörpern. Die Detektion erfolgt dann, ähnlich wie im Western Blot, zum Beispiel über einen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper. Die Oxidation des Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) durch die Peroxidase bewirkt einen Farbumschlag von farblos nach blau (655 nm). Meist, so auch in dieser Arbeit, erfolgt die Messung aber erst nach dem Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure, welche durch Protonierung zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in den gelben Bereich (450 nm) führt.

#### **3.18.1 Femtelle ELISA**

In dieser Arbeit wurde der kommerziell erhältliche „Femtelle ELISA“ (American Diagnostica) verwendet, welcher auch in der klinischen Routine zur klinischen Bestimmung von uPA und PAI-1 benutzt wird. Die Handhabung erfolgte streng nach Angaben des Herstellers. Je 100 µl der auf 0,1-0,15 mg/ml Gesamtprotein eingestellten Proteinextrakte sowie der im Kit enthaltenen Standardverdünnungen wurden in die mit Antikörper beschichteten Platten pipettiert und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit einer im Kit enthaltenen PBS/0,1% Triton-X100 Lösung wurden pro Vertiefung der Platte 100 µl der entsprechenden Antikörperlösung zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Inhalt verworfen und die Platten erneut 4 Mal mit PBS-TX gewaschen. Mit dem Sekundärantikörper wurde ebenso verfahren (100 µl pro Vertiefung, 1 Stunde bei Raumtemperatur, Waschen). Für die Detektion wurden

je 100 µl TMB-Substratlösung zugegeben. Nach 20 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 0,5 N Schwefelsäure sowie die zeitnahe Messung bei 450 nm.

### **3.18.2 ELISA gegen denaturiertes uPA und PAI-1**

Neben dem oben beschriebenen kommerziellen Femtelle-ELISA wurde der Versuch unternommen einen ELISA mit Antikörpern gegen die denaturierten Formen von uPA und PAI-1 in unserem Labor zu entwickeln. Dazu wurden 96-well Platten (BD) zunächst mit je 50 µl des ersten Antikörper (Anti-PAI-1: AHP1100, serotec; anti-uPA: Ab19893, Abcam) beschichtet. Dieser Schritt wird im Weiteren als Coating bezeichnet. Anschließend erfolgte ein Blockierungsschritt, die Inkubation mit 50 µl der Probe und die Inkubation mit 50 µl eines zweiten Antikörper (Anti-PAI-1: MA1-27330, Dianova; anti-uPA: Ab8475, Abcam). Bei der Wahl des zweiten Antikörpers wurde sowohl auf unterschiedliche Herkunftsorganismen geachtet als auch darauf, dass sich die Bindungsstellen beider Antikörper nicht überlappen. Als letzter Schritt erfolgte die Inkubation mit 50 µl des entsprechenden Sekundärantikörper (Bei PAI-1: anti-Ziege; bei uPA: anti-Maus). Die 3-fach Waschschriffe, welche zwischen jedem Schritt durchgeführt wurden, erfolgten mit einer PBS/0,1% Triton-X100 Lösung. Für jeden dieser Schritte wurden verschiedene Bedingungen ausgetestet. Eine Übersicht ist in Tabelle 3-16 gegeben. Nach einem letzten Waschschriffe wurden 50 µl der TMB-Substratlösung (aus Femtelle ELISA Kit, American Diagnostica) zugegeben. Nach 20 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 0,5 N Schwefelsäure sowie die zeitnahe Messung bei 450 nm.

**Tabelle 3-16 Übersicht über die ausgetesteten Bedingungen zur Entwicklung eines ELISAs gegen uPA und PAI-1 aus FFPE-Geweben.**

Schritt	uPA		PAI-1	
	Verdünnung in TBS pH 8,5	Dauer/Temperatur	Verdünnung in TBS pH 8,5	Dauer/Temperatur
Coating mit 1. Antikörper	Kein Coating		Kein Coating	
	1:1000	üN/4 °C	1:500	üN/4 °C
	1:2500	üN/4 °C	1:750	üN/4 °C
	1:5000	üN/4 °C	1:5000	üN/4 °C
Blocken	Kein Blocken		Kein Blocken	
	0,5 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C	0,5 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C
	1 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C	1 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C
	2,5 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C	2,5 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C
	5 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C	5 % BSA	7h/RT oder üN/4 °C
	0,5 % FKS	7h/RT oder üN/4 °C	0,5 % FKS	7h/RT oder üN/4 °C
	1 % FKS	7h/RT oder üN/4 °C	1 % FKS	7h/RT oder üN/4 °C
	Probe	1:20	üN/4 °C	1:20
2. Antikörper	1:1000	2 h/RT	1:16000	2 h/RT
	1:5000	2 h/RT	1:32000	2 h/RT
Sekundärantikörper	1:5000	1 h/RT	1:5000	1 h/RT
	1:10000	1 h/RT	1:10000	1 h/RT

Abk.: üN: über Nacht; RT: Raumtemperatur; BSA: Bovines Serumalbumin; FKS: Fetales Kälberserum

## 3.19 Western Blot

### 3.19.1 SDS-Gelelektrophorese

Um die in den Lysaten vorhandenen Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei ist zu beachten, dass die Wandergeschwindigkeit von Proteinen in einem elektrischen Feld grundsätzlich direkt proportional zu ihrer Gesamtladung und indirekt proportional zu ihrer Masse ist. Daher ist es für eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht nötig, die Eigenladung der Proteine zu überdecken. Dies geschieht mit Hilfe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), welches sich wie eine Hülle um das gesamte Protein legt, es dabei denaturiert und ihm eine negative Ladung verleiht. Da sich pro Masseneinheit Protein eine konstante Menge SDS anlagert (1,4 g SDS/g Protein), ist das Verhältnis von Ladung zu Masse in allen SDS-Proteinkomplexen weitgehend gleich. Die Beweglichkeit dieser Protein/SDS Komplexe in einer Gelmatrix hängt deswegen nur von ihrer Größe und Form ab. Um die Beeinflussung durch die Form, also durch die Tertiärstruktur des Proteins, auszuschließen, müssen die Proteine vollständig denaturiert werden. Zwar kann SDS, wie oben erwähnt, zur Denaturierung beitragen, allerdings ist diese bei alleiniger Behandlung mit SDS nicht vollständig, da SDS

keine reduzierenden Eigenschaften besitzt und somit nicht in der Lage ist, etwaige Disulfidbindungen zu lösen. Aus diesem Grund ist es nötig die Proteinlysate zusätzlich mit einem Reduktionsmittel, zum Beispiel  $\beta$ -Mercaptoethanol, zu versetzen. Dies erlaubt eine vollständige Linearisierung der Proteine, so dass Unterschiede in den Laufweiten im Idealfall nur vom Molekulargewicht abhängen.

Um die beschriebene Denaturierung und Ladungsdeckung zu erreichen, wurde die gewünschte Menge (12,5 - 50  $\mu$ g) an zu untersuchendem Protein mit SDS- und  $\beta$ -mercaptoethanolhaltigem Gelladepuffer versetzt. Zur vollständigen Denaturierung wurden Zelllysate und Gefrierproben anschließend für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Für FFPE-Lysate ist dieser Schritt wegen der stark reduzierenden Bedingungen während der Extraktion nicht nötig.

Folgend wurden die Lysate auf vorbereitete 10 %ige Acrylamidgеле (siehe Abschnitt 3.1.1) aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5  $\mu$ l des vorgefärbten Proteinmarkers „Dual Color Precision Plus Protein Standard“ (Biorad) oder des „peqGOLD Protein-Marker V“ (PeqLab) verwendet. Bei der folgenden Elektrophorese liefen die Proben zunächst bei 100 Volt in das Sammelgel ein. Danach erfolgte der Lauf bei 120 Volt für circa 90 Minuten.

### **3.19.2 Transfer der Proteine**

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Antikörper immunologisch nachzuweisen, wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dazu wurden im „Sandwich-Verfahren“ Schwamm, Filterpapier, Acrylamidgel, Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und ein zweiter Schwamm in die Transfer-Halterung geschichtet und in das Mini Trans-Blot Cell System (Biorad) eingesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich die Nitrozellulosemembran auf der zur Anode gewandten Seite des Acrylamidgels befindet, da die immer noch negativ geladenen Proteine so aus der Gelmatrix auf die Membran wandern. Nachdem die Blot-Apparatur mit Transferpuffer (siehe Abschnitt 3.1.2) aufgefüllt wurde, fand der Transfer für 90 Minuten bei 100 V auf Eis statt. Die Membran wurde anschließend in TBST gewaschen, um Pufferreste zu entfernen und optimale Bedingungen für die folgende Antikörperdetektion zu erhalten

### **3.19.3 Immundetektion**

Nach dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte die Detektion der zu untersuchenden Proteine durch Antikörper. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem für den jeweiligen Antikörper optimalen Reagenz geblockt (siehe Tabelle 3-4). Danach erfolgte ein Waschschriff während dessen die Membran zweimal kurz, dann dreimal 5 Minuten mit TBST gewaschen wurde. Anschließend erfolgte unter Schütteln die Inkubation im verdünnten primären Antikörper (siehe Tabelle 3-4) für 16 Stunden bei 4 °C. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem passenden Meerrettich-Peroxidase gekoppelten, sekundären Antikörper inkubiert und erneut gewaschen. Zuletzt erfolgte die Signaldetektion durch 5-minütige Inkubation in der Chemilumineszenz -Substratlösung „ECLPlus Western Blotting Detection Reagent“ (GE Healthcare). Für die Signalerzeugung ist die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase verantwortlich. Sie führt zur Oxidation des in der Substratlösung enthaltenen Luminols, welches dadurch in einen angeregten Zustand übergeht. Beim Zurückfallen in den Grundzustand erfolgt die Freisetzung von Energie in Form von Licht, welches mittels eines Röntgenfilms detektiert werden kann. Die Membran wurde dazu luftblasenfrei zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde in der Dunkelkammer auf die Membran gelegt, und die Kassette lichtundurchlässig verschlossen. Die Belichtungszeiten betragen, je nach Signalstärke, zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten. Anschließend wurde der Film im Filmentwicklergerät SRx-101A (Konica Minolta) entwickelt.

## **3.20 Reverse Phase Protein-Mikroarray**

### **3.20.1 Spotten der Proteinlysate**

Das Konzept des Reverse Phase Protein-Mikroarrays (RPPA) entspricht weitestgehend dem des Western Blots: Proteine werden auf einer Nitrozellulosemembran fixiert, um dann über Immundetektion die Expressionhöhe bestimmter Proteine zu ermitteln. Der Hauptunterschied der beiden Methoden liegt in der Art, die Proteine auf die Membran zu transferieren. Während im Western Blot, wie oben beschrieben, der Transfer aus einer Gelmatrix mit Hilfe eines elektrischen Felds erfolgt, werden die Proteinlysate beim RPPA

direkt auf eine auf einem Glasobjektträger fixierte Membran gedruckt. Dazu werden die Gesamtproteinextrakte aus einer Mikrotiterplatte mittels eines Metallstifts (Pin) auf die Membran übertragen, wo sie über hydrophobe Wechselwirkungen an der Nitrozelluloseoberfläche haften.

In dieser Arbeit wurde jede Probe in Triplikaten in einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8; 1:16, Pufferkontrolle) aufgetragen, um die Möglichkeit zu haben, alle Analyt/Antikörper-Kombinationen im optimalen, linearen Bereich zu detektieren. Um die Varianz der Proben zu verringern, wurden Lysate mit höherer Proteinkonzentration auf 2 mg/ml verdünnt. Die Proteinlysate wurden dazu in ihren Verdünnungen in 384-well Platten überführt und mit dem BioOdyssey Calligrapher MiniArayer (BioRad) mit Microarray Spotting Pins PTS200 (Point Technologies) auf die Objektträger gedruckt. Das abgegebene Volumen dieser Pins auf die verwendeten Oncyte Avid Nitrozellulose Slides (Grace Bio-Labs) betrug nach Herstellerangaben 1 nl pro Proteinpunkt.

### **3.20.2 Immundetektion**

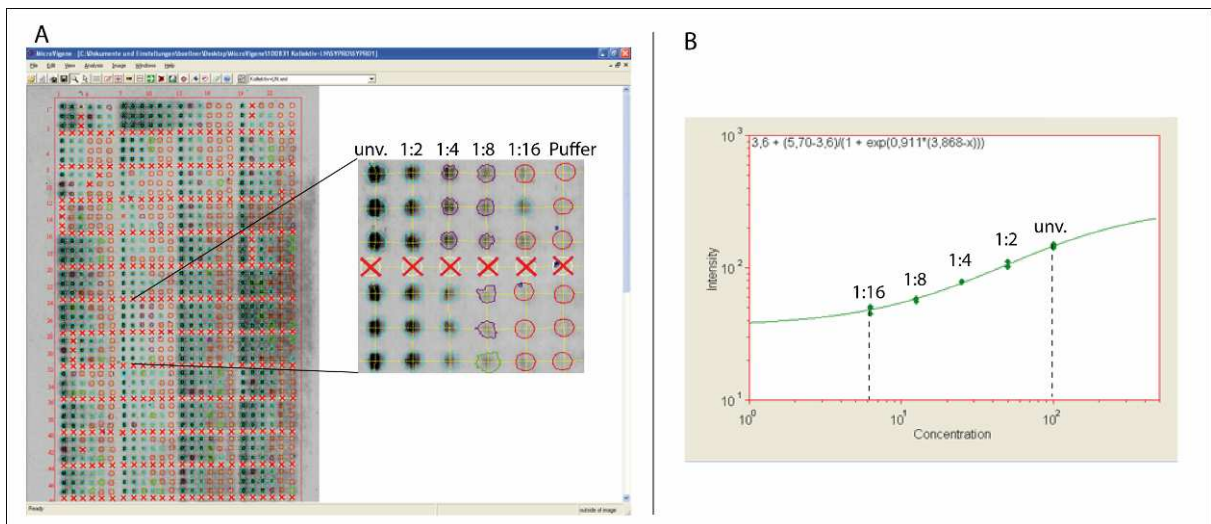
Die so produzierten Arrays wurden im Folgenden mit den relevanten Antikörpern detektiert. Dazu wurden die Arrays zunächst in einer Peroxidase Blocking Solution (Dako) inkubiert. Diese enthält Wasserstoffperoxid, Natriumazid und ein Lösungsmittel, wodurch eine mögliche endogene Peroxidaseaktivität inhibiert wird. Nach dreimaligem, kurzem Waschen mit TBST (siehe Abschnitt 3.1.2) wurde die Detektion dem Western Blot Protokoll entsprechend durchgeführt (siehe Abschnitt 3.19.3).

### **3.20.3 Quantifizierung der Intensität mit MicroVigene**

Die entwickelten Filme wurden mit einem CanoScan 8800F Durchlichtscanner (Canon) mit einer Punktdichte von 1200 dpi (Dots per Inch) digitalisiert und als 8-bit Graustufen TIF-Datei (Tagged Image File Format) abgespeichert. Sowohl die Messung der Intensitäten der einzelnen Spots als auch die weitere Datenverarbeitung wurden mit dem Softwarepaket MicroVigene (VigeneTech) durchgeführt. MicroVigene ist eine Analysesoftware, welche speziell auf die Auswertung von RPPAs ausgerichtet ist. Sie erlaubt eine vereinfachte, korrekte Erkennung der Spots und ist in der Lage Verdünnungsreihen in die

Intensitätsberechnung einzubeziehen. Die Auswertung wurde wie folgt schrittweise durchgeführt.

1. Exakte Markierung der einzelnen Spots
2. Bestimmung der Spotintensität aufgrund des Schwärzungsgrades der einzelnen Pixel. Dabei wurden die Pixel um den markierten Spot als Hintergrund bewertet und die Intensität berechnet. Diese wurde von der Spotintensität subtrahiert.
3. Bestimmung der Probenintensität: Für jede Probe wurde aus den Mittelwerten der je drei Replikate pro Verdünnungen ein sigmoidaler Kurvenverlauf berechnet. Die Fläche unter dem Graph, beginnend bei der stärksten Verdünnung und endend bei dem Wert der unverdünnten Probe, ergab die Probenintensität.
4. Normalisierung der Antikörper-Probenintensität auf die Gesamtproteinintensität derselben Probe.
5. Optional: Sollten Proben unterschiedlicher Arrays miteinander verglichen werden, erfolgte eine Normalisierung der Probenintensität auf die Gesamtintensität des Arrays. Dies ist nötig, da sich zum Beispiel durch unterschiedlich lange Belichtungszeiten von Array zu Array unterschiedliche Intensitäten ergeben können, nur die Relation der Proben bleibt gleich.



**Abbildung 3-3 Überblick über die Quantifizierung der Probenintensität mit MicroVigene (MV).**

(A) Darstellung der MV Oberfläche mit markiertem Array und einer Vergrößerung für zwei Fälle. Die Markierung der Spots (automatisch durch MV oder/und von Hand) ist der erste Schritt zur Quantifizierung. (B) Um aus den Spotintensitäten die Probenintensität zu berechnen, wurden die Intensitäten der Verdünnungsstufen gegen die relativen Konzentrationen (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 %) aufgetragen, ein Graph angepasst und die Fläche unter dem Graph beginnend bei der stärksten Verdünnung und endend bei dem Wert der unverdünnten Probe berechnet.



### **3.20.4 Bestimmung absoluter Proteinkonzentrationen**

In dieser Arbeit wurden für drei Proteine (uPA, PAI-1 und HER2) über Standardkurven der rekombinanten Proteine neben den relativen Intensitäten auch die absoluten Proteinmengen in den Patientenproben bestimmt. Dies erlaubt einen einfacheren Vergleich der Expressionshöhen auch zwischen unterschiedlichen Arrays und ist eine wichtige Voraussetzung für die Implementierung in die Klinik.

Das entsprechende rekombinante Protein wurde in Triplikaten in einer Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8; 1:16, Pufferkontrolle) auf den Array mit aufgebracht. Das lyophilisierte HER2 wurde dazu zunächst in einem HER2-negativen Patientenlysat aufgenommen und entsprechend verdünnt, während uPA und PAI-1 schon gelöst vorlagen und in LMA auf die gewünschte Startkonzentration verdünnt wurden. Die Bestimmung der einzelnen Spotintensitäten der aufgereinigten Proteine wie auch der Patientenproben des selben Arrays erfolgte wie oben beschrieben mit der Software MicroVigene. Anschließend wurde für jede Verdünnungsstufe der Mittelwert berechnet und aus diesen für die Proteine eine Standardkurve (Konzentration in pg/nl gegen Intensität) erstellt. Für die Patientenproben wurde für jede Verdünnung unter Zuhilfenahme der Standardkurve die Konzentration in pg/nl berechnet und anschließend mit der durch Bradford bestimmten Gesamtproteinkonzentration (mg/ml) verrechnet. Das Ergebnis war somit die Proteinkonzentration in pg pro ng Gesamtprotein.

## **3.21 Statistische Methoden**

### **3.21.1 Statistische Tests und Korrelationsanalysen**

#### Korrelationsanalysen

Zur Quantifizierung bivariater Zusammenhänge kontinuierlicher Messgrößen (Expressionswerte) wurden der Spearman Korrelationskoeffizient ( $r_s$ ) verwendet, da dieser im Gegensatz zum Korrelationskoeffizient nach Pearson, keine Normalverteilungsannahme der in Beziehung zu setzenden Merkmale voraussetzt. Korrelationskoeffizienten nehmen Werte im Bereich  $-1$  bis  $1$  an. Je näher der Spearman Korrelationskoeffizient am Absolutwert  $1$  liegt umso größer ist der monotone Zusammenhang zwischen zwei



quantitativen Merkmalen. Das Vorzeichen des Koeffizienten gibt an, ob ein gleichsinniger (positiver) Zusammenhang oder ein gegensinniger (inverser) Zusammenhang besteht, d.h. ob mit steigenden Werten des einen Merkmals ebenfalls die Werte der anderen Größe ansteigen oder ob diese fallen. Zur Illustration von bivariaten Korrelationen wurden Streudiagramme verwendet.

In Anlehnung an Empfehlungen in der Literatur (Fowler 1998; Innominato et al. 2009; Untersteiner 2007) wurden lediglich Zusammenhänge, für welche sich ein Korrelationskoeffizient von  $|r_s| \geq 0,33$  ergab, als biologisch relevant erachtet.

Um die stichprobengrößen-bedingte Unsicherheit der Ergebnisse der Korrelationsanalysen beurteilen zu können, wurden für die Korrelationskoeffizienten zweiseitige Signifikanzprüfungen vorgenommen ((Sachs 1992), S. 557).

#### Chi<sup>2</sup>-Test

Um bivariate Assoziationen zwischen kategorialen Merkmalen zu prüfen wurde der Chi<sup>2</sup> – Test verwendet. Der Chi<sup>2</sup>-Test prüft, ob die Häufigkeitsverteilung eines interessierenden Merkmals von den Ausprägungen einer weiteren (kategorialen) Variable abhängt

#### Mann-Whitney- U Test

Um zwei unabhängige Untersuchungsgruppen (Cluster) hinsichtlich der Verteilung eines kontinuierlichen Merkmals (Expressionswerte) zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U Test vorgenommen. Als nicht-parametrisches Verfahren ist der Mann-Whitney- U Test unabhängig von jeglichen Verteilungsannahmen. Anstatt der real gemessen Werte verwendet dieser Test die Ränge der (geordneten) Werte und kann somit über die (mittleren)-Rangsummen statistisch relevante Verteilungsunterschiede der entsprechenden Zielgröße zwischen zwei Vergleichsgruppen feststellen.

#### Konkordanz/Cohens Kappa Koeffizient

Zur Evaluation der Übereinstimmung von definierten Expressionsniveaus (positiv/negativ) zwischen zwei Methoden, wurde die Konkordanz (Prozentwert übereinstimmender Expressionsstufen) sowie Cohens Kappa Koeffizient ( $\kappa$ ) verwendet. Der Cohens Kappa Koeffizient berücksichtigt den Anteil an rein zufälligen Übereinstimmungen zwischen den

beiden Methoden und rechnet diese heraus. Kappa kann Werte zwischen  $\kappa = +1$  (bei hoher Konkordanz) und  $\kappa \leq 0$  (bei niedriger Konkordanz) annehmen.

### **3.21.2 Hierarchische Clusteranalysen**

Für die Darstellung von Zusammenhängen mehrerer kontinuierlichen Messgrößen (Expressionswerte) wurden hierarchische Clusteranalysen durchgeführt. Zur Berechnung der Cluster sowie zur Darstellung der Expressionshöhen in *heat maps* wurde das Softwarepaket Cluster/TreeView (Eisen et al. 1998) genutzt. Für die Berechnung der Abstände zweier Objekte (Patienten) wurde, der Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$  verwendet. Die Zusammenfassung der Cluster (Patientengruppen) erfolgte nach dem *average linkage* (dt. mittlerer Abstand) Verfahren. Dieser Algorithmus berechnet den Abstand zweier Gruppen als Mittelwert der Abstände zwischen allen Paaren der Gruppen.

### **3.21.3 Überlebensanalysen**

Um optimale Schwellenwerte für Expressionsmarker hinsichtlich der Diskriminierung von Hoch- und Niedrig-Risikopatienten in Bezug auf das Gesamtüberleben zu ermitteln, wurden multiple *log-rank*-Tests für alle möglichen Schwellenwerte vorgenommen. Für diese fortgeschrittenen statistischen Analysen wurde die Programmbibliothek „maxstat“ (Hothorn 2009) in der statistischen Software „R“ (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>) verwendet. Dieses Auswertverfahren berücksichtigt adäquat die Inflation des Fehlers erster Art mit zunehmender Anzahl statistischer Tests.

Zur weiterführenden Analyse von Überlebenszeiten wurden Kaplan-Meier-Kurven für die resultierenden Patientensubgruppen vorgenommen. Die Kaplan-Meier Methode stellt ein Verfahren zur Schätzung und Darstellung von Überlebenswahrscheinlichkeiten dar, wenn die Zeit bis zum Ereignis „Tod“ nicht für alle Beobachtungseinheiten vorliegt (zensierte Beobachtungen). Des Weiteren wurde Cox-Regressionsmodelle verwendet, um die eruierten Assoziationen neuer Marker zum Überleben, auf Unabhängigkeit bezüglich bereits etablierter prognostischer Faktoren zu prüfen. In Zuge dieser Rechnungen wurden adjustierte *hazard ratio* Schätzungen mit 95% Konfidenzintervallen ermittelt. *Hazard ratio*-Statistiken geben dabei den relativen Risikounterschied zu Versterben zwischen zwei unabhängigen Patientengruppen an. Eine *hazard ratio* von 1 bedeutet demnach, dass kein

Unterschied im Sterberisiko zwischen zwei Patientengruppen besteht, so dass für eine signifikante Assoziation zum Überleben, der kritische Wert 1 nicht im 95% Konfidenzintervall für das *hazard ratio* enthalten sein darf.

### **3.21.4 Multiples Testen**

Liegt der p-Wert eines statistischen Tests unter dem in dieser Arbeit festgesetzten Signifikanzniveau von  $p = 0,05$ , bedeutet dies, dass mit maximal 5% Wahrscheinlichkeit der festgestellte Unterschied nur zufällig aufgetreten ist (Fehler erster Art). Werden nun mehrere Tests bezüglich einer oder mehrerer Fragestellungen an einem Kollektiv (Stichprobe) durchgeführt so steigt die Wahrscheinlichkeit zufällig signifikante Ergebnisse zu erhalten, obwohl keine vorhanden sind. Um solch einer Inflation des Fehlers erster Art im Zuge der multiplen Korrelationsanalysen entgegenzuwirken, wurden alle aus den Korrelationsanalysen resultierenden p-Werte nach der Methode von Bonferroni adjustiert (Bonferroni 1936). Bei dieser Vorgehensweise werden alle berechneten p-Werte mit der Anzahl an vorgenommenen Tests ( $k$ ) multipliziert. Damit wird der Fehler erster Art – mit maximal 5% auch für alle  $k$  Tests eingehalten. Für adjustierte p-Werte  $> 0,99$  wurden nicht die errechneten Werte angegeben, sondern vermerkt, dass  $p > 0,99$  ist, da der p-Wert als Wahrscheinlichkeit den Wert 1 nicht überschreiten kann.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Optimierung der Proteinextraktion aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben

Die Extraktion von immunreaktiven Proteinen aus Formalin-fixierten Paraffingeweben (FFPE-Gewebe) galt lange Zeit als unmöglich. In den letzten Jahren gelang jedoch mehreren Arbeitsgruppen die Extraktion, zwar durch die harten Extraktionsbedingungen denaturierter, aber intakter und immunreaktiver Proteine aus diesen Geweben (Addis et al. 2009; Chu et al. 2005; Chung 2008; Nirmalan et al. 2009; Shi et al. 2006). Dennoch befindet sich diese Technik noch am Anfang ihrer Verbreitung und einige der veröffentlichten Protokolle zeigen Schwachstellen, wie zum Beispiel geringe Proteinausbeuten oder den Verlust von Membranproteinen. Im Vergleich gute Ergebnisse erzielte das Verfahren von Becker und Porschewski (Becker et al. 2006), das in unserem Labor entwickelt und 2006 zum Patent (Patentnummer: WO2006/122898 A1) angemeldet wurde. Auf Grundlage dieses Protokolls versuchte ich die Extraktion von Proteinen aus FFPE-Geweben weiter zu optimieren.

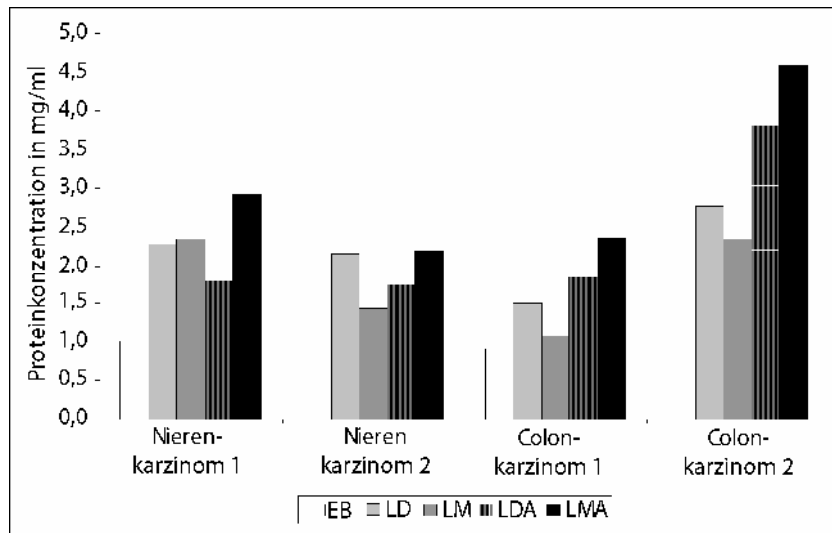
#### 4.1.1 Verbesserung der Pufferzusammensetzung

In einem ersten Schritt sollte die Zusammensetzung des Puffers untersucht und verbessert werden. Der oben erwähnte, in unserem Labor entwickelte Puffer EB ist eine 1:2 Mischung aus dem kommerziell erhältlichen Puffer T-Per (Pierce) und Lämmli-Puffer. In einer Publikation von Nirmalan *et al.* wird die Verwendung von 1-fach Lämmli-Puffer (LM) vorgeschlagen (Nirmalan et al. 2009). Damit würde sich die Verwendung der kommerziellen Komponente verhindern lassen. Um jedoch sicher zu gehen, dass entsprechende Resultate erzielt werden können, sollten beide Puffer verglichen werden. Darüber hinaus würde es die Handhabung des Puffers deutlich vereinfachen, wenn an Stelle des Kontaktgifts  $\beta$ -Mercaptoethanols das weniger giftige Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) verwendet werden könnte (Puffer LD). Daher wurden auch die Extraktionsergebnisse bei Verwendung von LM und LD verglichen. Ein dritter Ansatzpunkt war die Zugabe von Arginin (A), welches laut Literaturangaben die Aggregation von Proteinen verhindern kann (Arakawa et al. 2003; Lange et al. 2009), die durch die hohen

Temperaturen während der Extraktion auftreten könnte. Die genaue Zusammensetzung der getesteten Puffer EB, LM, LD, LMA, LDA findet sich im Abschnitt 3.1.4.

Quantitativer und qualitativer Vergleich der Extraktionsresultate unter Verwendung der verschiedenen Puffern

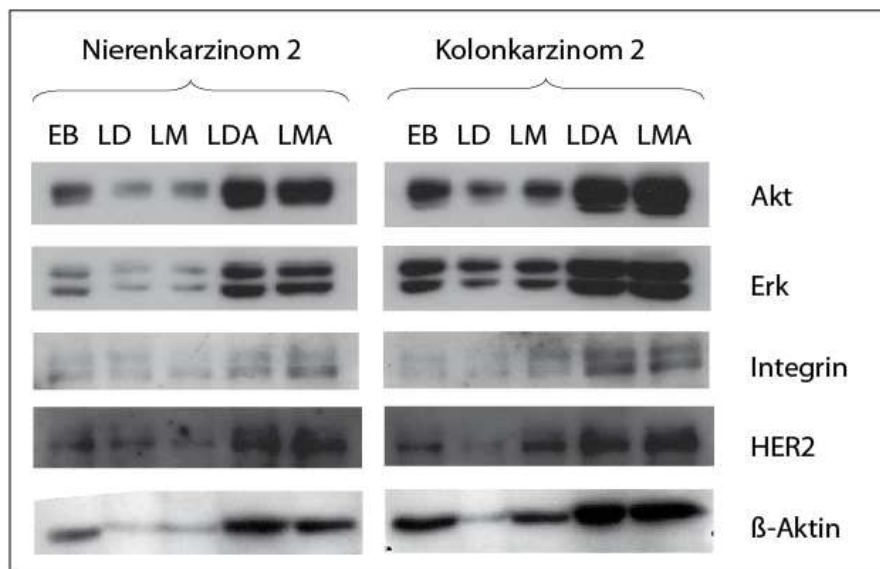
Um die Effektivität der verschiedenen Puffer bezüglich der Proteinextraktion überprüfen zu können, wurden aus je zwei Nierenkarzinom- bzw. Kolonkarzinomgeweben Proteine extrahiert. Für alle fünf Puffer wurde hierfür die gleiche Menge an Gewebe in gleichem Volumen lysiert, um die Vergleichbarkeit der Proteinausbeuten zu gewährleisten. Nach der Extraktion erfolgte die Bestimmung der Gesamtproteinmenge mittels des Bradford-Assays von Bio-Rad (Abbildung 4-1). Die mitgeführten Pufferkontrollen erzeugten dabei kein Signal. Es stellte sich heraus, dass Puffer auf reiner Basis von Lämmli-Puffer (Mittelwert(LD) = 2,81 mg/ml, Mittelwert(LM) = 1,80 mg/ml, Mittelwert(LDA) = 2,30 mg/ml, Mittelwert(LMA) = 3,02 mg/ml) ein deutlich besseres Ergebnis liefern, als die Mischung von Lämmli-Puffer mit T-Per (Mittelwert(EB) = 1,38 mg/ml). Für die beiden argininhaltigen Puffer LDA und LMA erreichte der Unterschied statistische Signifikanz ( $p(t\text{-Test, LDA}) = 0,008$ ;  $p(t\text{-Test, LMA}) = 0,011$ ), so dass von einem positiven Effekt durch Zusatz von Arginin auf die Gesamtproteinausbeute auszugehen ist. Weniger eindeutig war der Effekt von DTT im Vergleich mit  $\beta$ -Mercaptoethanol. Zwar zeigte LMA in allen vier Proben eine höhere Ausbeute als LDA, doch konnte dieser Effekt in den argininfreien Puffern LD bzw. LM nicht bestätigt werden. Über alle Puffer betrachtet, konnten die höchsten Proteinkonzentrationen bei Verwendung von LMA erreicht werden.



**Abbildung 4-1 Vergleich der Proteinausbeuten unter Verwendung von verschiedenen Extraktionspuffern.** Aus je zwei FFPE-Nierenkarzinom- bzw. Colonkarzinomgeweben wurden unter Verwendung fünf verschiedener Puffer (EB, LD, LM, LDA, LMA) Proteine extrahiert. Anschließend wurde die Gesamtproteinkonzentration mittels Bradford-Assay bestimmt. Grundsätzlich zeigten sich bei den neu getesteten Puffern auf Basis von Lämmli-Puffer bessere Ergebnisse als bei der Verwendung des zuvor etablierten Puffers EB (weiß). Die besten Resultate konnten unter Einsatz von LMA ( $\beta$ -mercaptoethanolhaltiger Puffer auf Lämmli-Basis mit Arginin, schwarz) erzielt werden.

Als nächster Schritt wurde eine Western Blot Analyse aller Extrakte durchgeführt, um eine mögliche Degradation und die Immunreaktivität der erhaltenen Proteine zu kontrollieren. Dazu wurde jeweils ein Zehntel der extrahierten Probe aufgetragen. Dadurch sollte überprüft werden, ob sich die durch die verschiedenen Puffer gewonnenen Extrakte in ihrer Einzelproteinzusammensetzung unterscheiden. Ein möglicher Unterschied zwischen den Puffern könnte in diesem Zusammenhang zum Beispiel in der Fähigkeit zur Extraktion von Membranproteinen bestehen. Die Detektion erfolgte daher mit Antikörpern sowohl gegen Rezeptorproteine (Intergin  $\alpha$ V, HER2) als auch gegen zytosolische Proteine (Akt, Erk1/2,  $\beta$ -Aktin). Wie Abbildung 4-2 belegt, konnten mit allen fünf Puffern intakte, immunreaktive Proteine extrahiert werden, wobei die stärksten Signale für die mit LMA und LDA gewonnenen Extrakte erhalten wurden. Die Signale nach Extraktion mit EB waren in den meisten Fällen stärker, als für die beiden anderen argininfreien Puffer LD und LM. Die beschriebenen Signalverhältnisse für alle untersuchten Proteine konstant blieben, so dass davon ausgegangen werden kann, dass alle fünf Puffer Extrakte ähnlicher Einzelproteinzusammensetzung liefern. Sowohl die deutlich stärkeren Signale der beiden argininhaltigen Puffer als auch die im Vergleich relativ starken Banden für die EB-Lysate stehen jedoch nicht in Einklang mit der Gesamtproteinbestimmung. Eine mögliche

Erklärung hierfür ist, dass die Proteine in diesen Lysaten vor thermischer Aggregation geschützt sind und somit besser in das Gel einwandern. Auf diesen Umstand und weitere mögliche Ursachen wird in der Diskussion genauer eingegangen. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der Puffer LMA der effektivste der fünf Puffer zur Proteinextraktion aus FFPE ist.

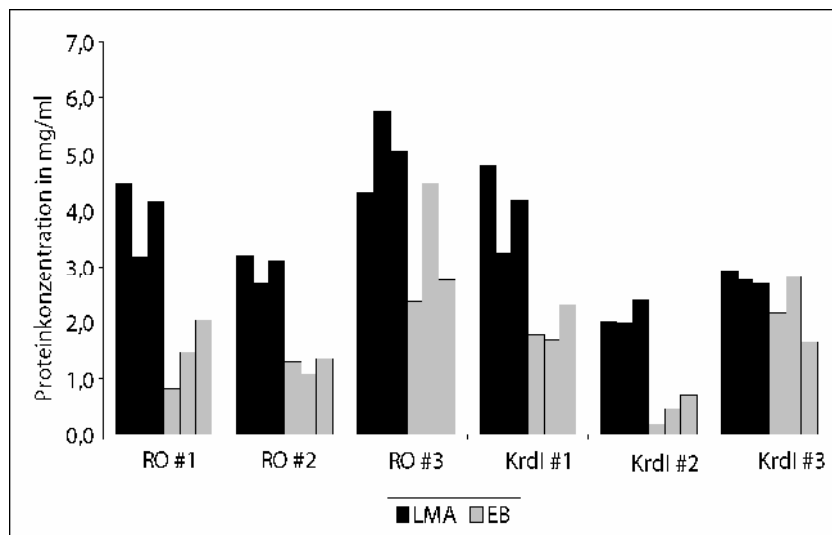


**Abbildung 4-2 Western Blot Analyse der durch Extraktion mit verschiedenen Puffern (EB, LD, LM, LDA, LMA) gewonnenen Lysaten.** Es wurde jeweils ein Zehntel der extrahierten Probe aufgetragen, um den Gehalt der fünf Proteine zwischen den Puffern zu vergleichen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen die Proteine Akt, Erk, Integrin  $\alpha$ V, HER2 und  $\beta$ -Aktin. Mit allen Puffern konnten intakte, immunreaktive Proteine extrahiert werden. Der Spezifitätsnachweis der Antikörper wird in Kapitel 4.2.1 erbracht.

### Reproduzierbarkeit der Extraktion

In einem nächsten Schritt sollte die technische Reproduzierbarkeit der Resultate durch Extraktion von Triplikaten überprüft werden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit der klinischen Proben, wurde dies nicht für alle fünf Puffer sondern nur für den vielversprechendsten Puffer LMA und vergleichend für EB durchgeführt. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, dass der Puffer nicht nur für in unserem Institut prozessierte Proben sondern klinikumsunabhängig zu verbesserten Ausbeuten führt. Daher wurden je drei Mammakarzinomproben vom Klinikum rechts der Isar sowie vom Klinikum Rosenheim in Triplikaten extrahiert. Wie Abbildung 4-3 zeigt, konnte unter Verwendung von LMA für beide Kliniken höhere Ausbeuten erzielt werden (Mittelwert(EB) = 1,74 mg/ml, Mittelwert(LMA) = 3,50 mg/ml). Die Abweichung zwischen den Triplikaten war, bis auf

einen Ausreißer bei Fall RO #3 extrahiert mit EB, für beide Puffer über alle Proben sehr gering. Der mittlere Varianzkoeffizient, welcher der auf den Mittelwert normalisierten Standardabweichung entspricht, betrug über alle Fälle 13 %. Es konnte somit gezeigt werden, dass unter Verwendung des Puffers LMA klinikumsunabhängig und reproduzierbar hohe Proteinausbeuten erhalten werden können.



**Abbildung 4-3 Vergleich der Proteinausbeuten von Proben aus zwei verschiedenen Krankenhäusern in Triplikaten.** Um die Reproduzierbarkeit der Extraktion mit LMA zu überprüfen, wurden je drei Mammakarzinomproben vom Klinikum rechts der Isar (Krdl) sowie vom Klinikum Rosenheim (RO) in Triplikaten extrahiert. Unabhängig von der Klinik erzielte die Extraktion mit LMA (dunkelgrau) über alle Fälle deutlich höhere Ausbeuten als mit EB (hellgrau). Für beide Puffer konnten nur geringe Abweichungen zwischen den Triplikaten beobachtet werden.

#### Proteinextraktion aus lange archivierten FFPE-Geweben

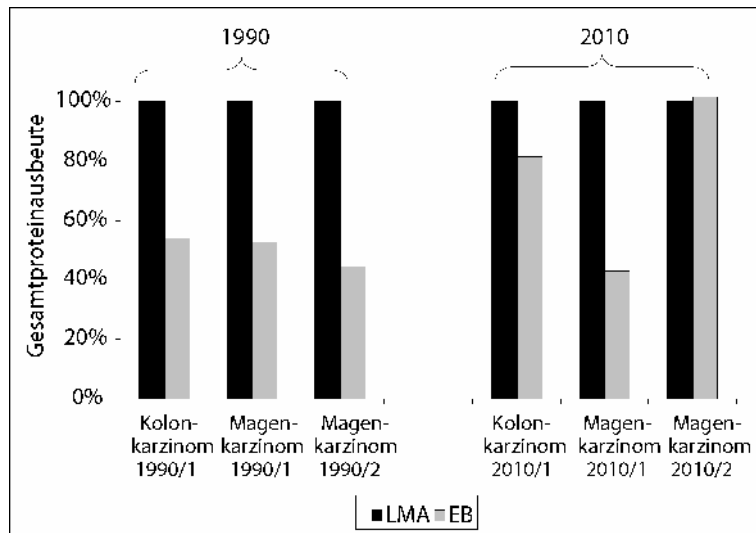
Während der Optimierungsversuche machte es den Anschein, dass der Puffer LMA besonders in älteren, länger archivierten Proben deutlich bessere Ergebnisse liefert, als der bisher verwendete EB. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden eine Kolonkarzinomprobe sowie zwei Magenkarzinomproben jeweils aus dem Jahr 2010 als auch aus 1990 untersucht. Die insgesamt sechs Fälle wurden sowohl in EB als auch in LMA extrahiert und die Ausbeuten verglichen. Es zeigte sich, dass der Proteingehalt der Lysate aus den zwanzig Jahre alten Proben (Mittelwert 1,26 mg/ml) deutlich unter dem der Proben aus 2010 lag (Mittelwert 2,49 mg/ml) – unabhängig vom verwendeten Puffer (siehe Tabelle 4-1).



**Tabelle 4-1 Vergleich der Proteinausbeute aus Gewebeproben von 1990 und 2010**

Fälle von 1990		Konz. in mg/ml	Fälle von 2010		Konz. in mg/ml
Kolonkarzinom	90/1 EB	0,80	Kolonkarzinom	10/1 EB	2,24
Magenkarzinom	90/1 EB	0,98	Magenkarzinom	10/1 EB	1,39
Magenkarzinom	90/2 EB	0,75	Magenkarzinom	10/2 EB	2,67
<b>Mittelwert</b>		<b>0,84</b>	<b>Mittelwert</b>		<b>2,10</b>
Kolonkarzinom	90/1 LMA	1,48	Kolonkarzinom	10/1 LMA	2,76
Magenkarzinom	90/1 LMA	1,87	Magenkarzinom	10/1 LMA	3,24
Magenkarzinom	90/2 LMA	1,69	Magenkarzinom	10/2 LMA	2,63
<b>Mittelwert</b>		<b>1,68</b>	<b>Mittelwert</b>		<b>2,88</b>
<b>Gesamtmittelwert</b>		<b>1,26</b>	<b>Gesamtmittelwert</b>		<b>2,49</b>

Beim Vergleich der beiden Puffer untereinander, stellte sich heraus, dass die Proteinausbeute für die Gewebeproben aus 2010 zwar im Mittel 25 % höher war als die mit EB aus demselben Jahr, der Unterschied zwischen den beiden Puffern erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ( $p(t\text{-Test}) = 0,337$ ). Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der Extraktionen mit den Fällen aus dem Jahr 1990 einen statistisch signifikanten Unterschied ( $p(t\text{-Test}) = 0,015$ ) von im Mittel etwa 50 % mehr Proteinausbeute bei Verwendung von LMA (Abbildung 4-4). Diese Resultate bestätigen den anfangs gewonnenen Eindruck, dass besonders in lange archivierten FFPE-Geweben durch die Verwendung von LMA anstelle von EB mehr Protein erhalten werden kann. Dass auch die aus älteren Gewebeproben gewonnenen Proteine noch immunologisch nachweisbar sind, zeigt der Western Blot des 1997 archivierten Nierenkarzinoms aus Abbildung 4-2. Der Extraktionspuffer LMA verbessert somit die Möglichkeit der Proteinextraktion aus lange archivierten Gewebeproben.

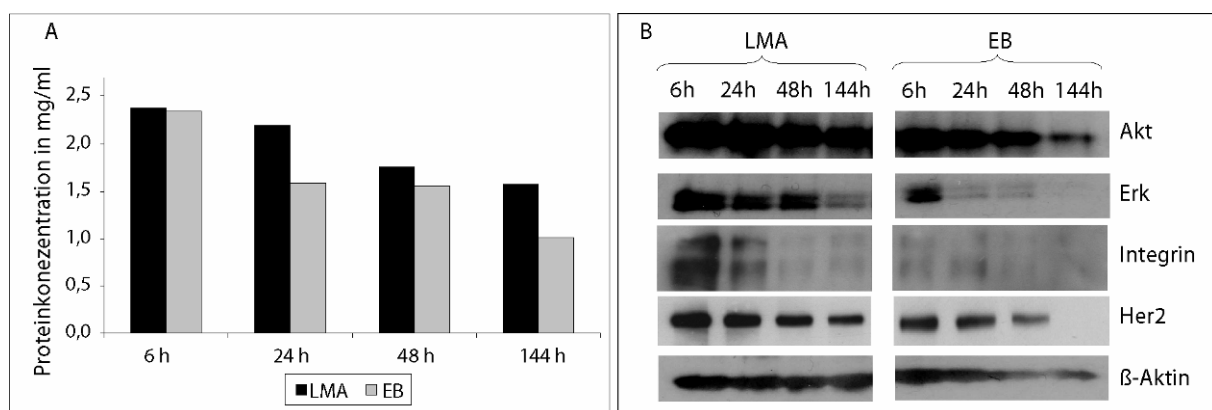


**Abbildung 4-4 Proteinextraktion aus FFPE-Proben aus dem Jahr 1990 im Vergleich zu Proben aus dem Jahr 2010.** Es wurden jeweils eine Kolonkarzinomprobe sowie zwei Magenkarzinomproben aus den Jahren 2010 und 1990 in LMA und EB extrahiert und die jeweilige Gesamtproteinausbeute bestimmt. Für beide Jahre wurden unter Verwendung von LMA größere Proteinmengen erhalten als mit EB, für die zwanzig Jahre alten Proben war der Unterschied zwischen den Puffern jedoch deutlich größer.

#### Proteinausbeute und –qualität aus überfixierten FFPE-Geweben

Neben der Lagerungsdauer ist die Fixierungsdauer der Gewebe ein weiterer kritischer Punkt bei der Proteinextraktion. Dieser Aspekt ist vor allem bei Verwendung von Proben der Krankenhausroutine relevant, da es dort aufgrund von praktischen und organisatorischen Gründen zu großen Schwankungen der Fixierungszeit kommen kann. Die minimale Fixierungsdauer beträgt, je nach Gewebegröße, etwa sechs Stunden. Trifft eine Probe jedoch kurz vor dem Wochenende oder vor Feiertagen ein, kann die Probe auch für mehrere Tage in Formalin bleiben. Aus dem Bereich der RNA-Extraktion aus FFPE-Geweben ist belegt, dass es bei einer zu langen Fixierung der Proben in Formalin (Überfixierung) zu Ausbeuteverlusten kommt, insbesondere wenn die Fixierungszeit 24 Stunden überschreitet (Bhudevi et al. 2003; Bresters et al. 1994; Macabeo-Ong et al. 2002). Dementsprechend ist bei der immunhistochemischen Proteindetektion ebenfalls eine schwächere Färbung bei zu langer Fixierung auffällig (Burandt et al. 2010). Aufgrund des positiven Einflusses des Puffers LMA auf die Proteinausbeute älterer Fälle sollte daher auch dessen Nutzen bei überfixierten Proben überprüft werden. Die Situation in der Krankenhausroutine berücksichtigend, wurden vier etwa 0,25 cm<sup>3</sup> große Lymphkotenngewebeproben unterschiedlich lange fixiert (6, 24, 48 und 144 Stunden), in Paraffin eingebettet und mit LMA und EB extrahiert.

Für die kürzeste Fixierungszeit (6 Std.) konnte kein Unterschied in der Proteinausbeute zwischen den beiden Puffern festgestellt werden (Abbildung 4-5 A). Aber schon bei der Standardfixierungszeit von 24 Stunden führte die Extraktion mit LMA zu einer deutlich höheren Proteinausbeute, welche auch bei einer Fixierung von 48 und 144 Stunden erhalten blieb. Obwohl Proteinextraktionen aus Lymphknoten im Vergleich zu anderen Geweben häufig mit einer niedrigeren Proteinausbeute verbunden sind (Wolff et al. 2011), konnte mit LMA selbst in der 144 Stunden fixierten Probe eine zufriedenstellende Proteinmenge (1,57 mg/ml in 100 µl) erhalten werden (Abbildung 4-5 A).



**Abbildung 4-5 Proteinkonzentration (A) und Western Blot Analyse (B) von unterschiedlich lange fixierten Lymphknotenproben extrahiert mit LMA und EB.** Um den Einfluss der Fixierungszeit auf die Proteinextraktion zu überprüfen, wurden etwa gleichgroße Lymphknoten für 6, 24, 48 und 144 Stunden fixiert und anschließend mit LMA und EB extrahiert. Die Bestimmung der Gesamtproteinausbeute (A) sowie der durchgeführte Western Blots (B) machen deutlich, dass bei einer kurzen Fixierungszeit von 6 Stunden kein Unterschied zwischen den beiden Puffern zu erkennen ist. Aber schon ab der Standardfixierungszeit von 24 Stunden zeigen sich sowohl für die Gesamtproteinkonzentration als auch für die detektierten Proteine bessere Resultate bei der Verwendung von LMA.

Als nächstes sollte der Einfluss der Fixierungszeit auf die Proteinqualität im Western Blot überprüft werden. Dazu wurde wieder ein Zehntel der extrahierten Proben aufgetragen und mit den fünf Antikörpern, die auch für den Puffervergleich verwendet wurden (Akt, Erk, Integrin  $\alpha$ V, HER2,  $\beta$ -Aktin), detektiert (Abbildung 4-5 B). Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass selbst stark exprimierte Proteine, wie Erk und HER2, in der lang fixierten Probe nur schlecht detektierbar sind, wenn EB verwendet wird. Für Integrin wurde in der 24 Stunden fixierten Probe mit EB nur noch ein sehr schwaches Signal erhalten, während man mit LMA noch sehr gute Resultate erhält. Für  $\beta$ -Aktin fällt auf, dass in den LMA-extrahierten Proben kein Rückgang dieses Proteins zu erkennen ist, während in den EB-

extrahierten, langzeitfixierten Geweben eine Abschwächung des  $\beta$ -Aktin-Signals zu erkennen ist. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass unter Verwendung von LMA auch aus langzeitfixierten Proben noch gute Extraktionsresultate erzielt werden können.

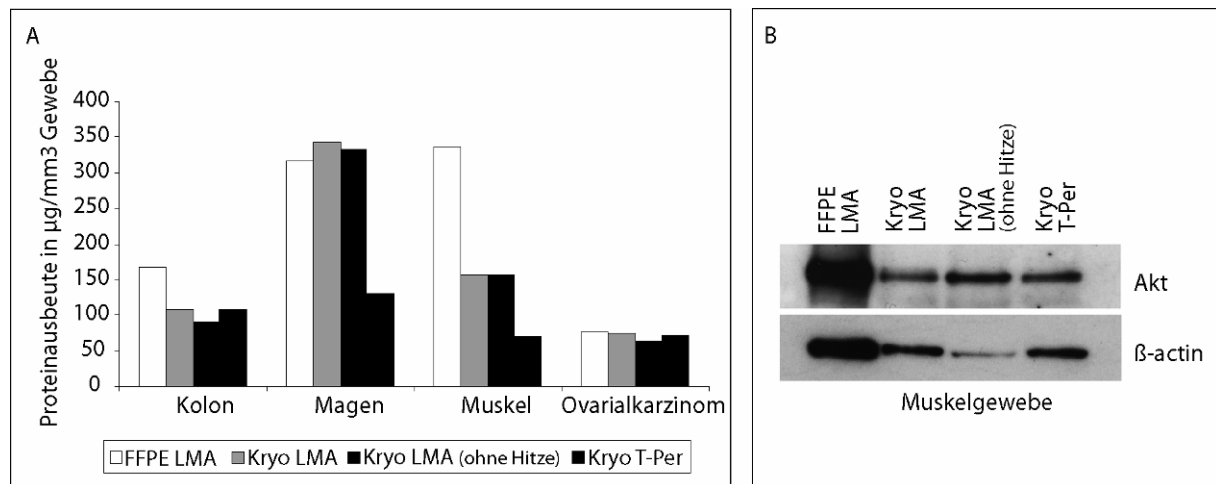
Aufgrund der allgemein höheren Ausbeuten mit LMA sowie der Vorteile bei der Verwendung dieser Puffer in „kritischen“ Geweben wurde dieser Puffer als Standardpuffer festgelegt und für alle weiteren Analysen verwendet.

#### Vergleich der Extraktion von FFPE-Geweben mit Gefriergeweben

Sowohl für EB als auch für den Lämmli-Puffer wurde bereits der Nachweis erbracht, dass die Qualität der Extrakte aus FFPE-Geweben mit denen aus Gefriergewebe vergleichbar ist (Becker et al. 2007; Nirmalan et al. 2009). Dies sollte auch für den neu etablierten Puffer LMA bestätigt werden. Dazu wurden Proteine aus vier FFPE-Geweben (Kolon, Magen, Muskel, Ovarialkarzinom) mit LMA extrahiert. Vergleichend wurden Gefriergeweben derselben Patienten mit in einem kommerziell erhältlichen Standardpuffer zur Gefrierextraktion (T-Per; Thermo Fisher) lysiert. Da die erhaltene Proteinzusammensetzung der Lysate vom Extraktionspuffer beeinflusst wird, ist es für Vergleichsanalysen von Vorteil beide Gewebearten mit demselben Puffer extrahieren zu können. Aus diesem Grund wurde das Gefriergewebe zusätzlich in LMA nach FFPE-Standardprotokoll lysiert. Außerdem wurde neben dem normalen Extraktionsprotokoll auch ein verkürzter Ablauf ohne die Temperaturschritte (20 Minuten, 100 °C und 2h, 80 °C, siehe 3.14.1) durchgeführt, da normalerweise für die Extraktion aus Gefriergewebe keine Hitze nötig ist.

Um die Proteinausbeuten vergleichen zu können, mussten die ermittelten Konzentrationen auf die Menge an verwendetem Material bezogen werden. Dazu wurde von jeder Probe das Volumen (Schnittdicke \* Schnittfläche) an eingesetztem Gewebe bestimmt. Dies war nötig, da im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen nicht die verschiedenen Puffer am selben Gewebestück, sondern die Extraktion aus unterschiedlichen Gewebestücken verglichen werden sollten und es dementsprechend zu Variation in der Gewebemenge kam. Für zwei Gewebe (Kolon und Ovarialkarzinom) waren die erhaltenen Proteinmengen in etwa gleich, für die beiden anderen (Magen und Muskel) ergab sich mit LMA sogar eine höhere Ausbeute als mit dem Vergleichspuffer T-Per

(Abbildung 4-6A). Der in Abbildung 4-6B gezeigte, mit je 12 µg beladene Western Blot bestätigt die in diesem Kapitel mehrfach gezeigte gute Qualität der extrahierten Proteine, auch im Vergleich zum Gefriergewebe am Beispiel des Muskelgewebes. Es bleibt somit festzuhalten, dass der Puffer LMA falls erwünscht auch für vergleichende Extraktion von FFPE und Gefriergeweben geeignet ist.



**Abbildung 4-6 Vergleich der Proteinausbeute und –qualität zwischen FFPE- und Gefriergeweben.**

Vier verschiedene FFPE-Gewebe (Kolon, Magen, Muskel, Ovarialkarzinom) wurden mit LMA nach Standardprotokoll extrahiert (weiß). Die korrespondierenden Gefriergewebe wurden mit LMA (mit (hellgrau) und ohne (dunkelgrau) die Temperaturschritte) und T-Per (schwarz), als Standard, extrahiert. Es zeigte sich, dass die Ausbeute (A) sowie die Qualität (B) für alle Bedingungen vergleichbar waren.

#### 4.1.2 Optimierung der Temperaturschritte

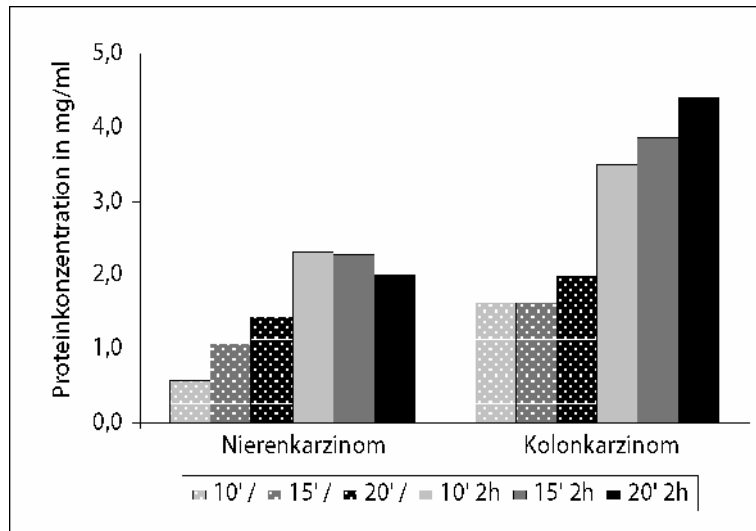
Neben der Optimierung der Pufferzusammensetzung sollte auch die optimale Temperatur während der Extraktion bestimmt werden. In vorangegangenen Versuchen in unserem Labor zeigte sich, dass die Probe etwa 15 Minuten bei 100 °C gekocht und nachfolgend für 2 Stunden bei 80 °C inkubiert werden sollte. Aus der Literatur ergaben sich Hinweise (Chu et al. 2005), dass der Inkubationsschritt unter Umständen nicht erforderlich ist und so deutlich Zeit eingespart werden kann. Ich überprüfte aufgrund dieser Datenlage sowohl die optimale Kochzeit (10, 15 oder 20 Minuten) sowie die Notwendigkeit der darauf folgenden Inkubation bei 80 °C an zwei Tumorgeweben (Niere, Kolon).

Wie Abbildung 4-7 verdeutlicht, können auch ohne zweistündige Inkubation bei 80 °C Proteine aus FFPE-Geweben extrahiert werden. Mit diesem Schritt ist die Ausbeute jedoch deutlich höher. Die Variation der Kochzeit von 10 bis 20 Minuten zeigt nur geringe Unterschiede, mit einer Tendenz zu höheren Ausbeuten bei längerer Kochzeit. Daher

wurde das Protokoll für alle weiteren Versuche mit folgenden Temperaturschritten festgelegt:

Kochschritt: 20 Minuten bei 100 °

Inkubationsschritt: 2 Stunden bei 80 °C



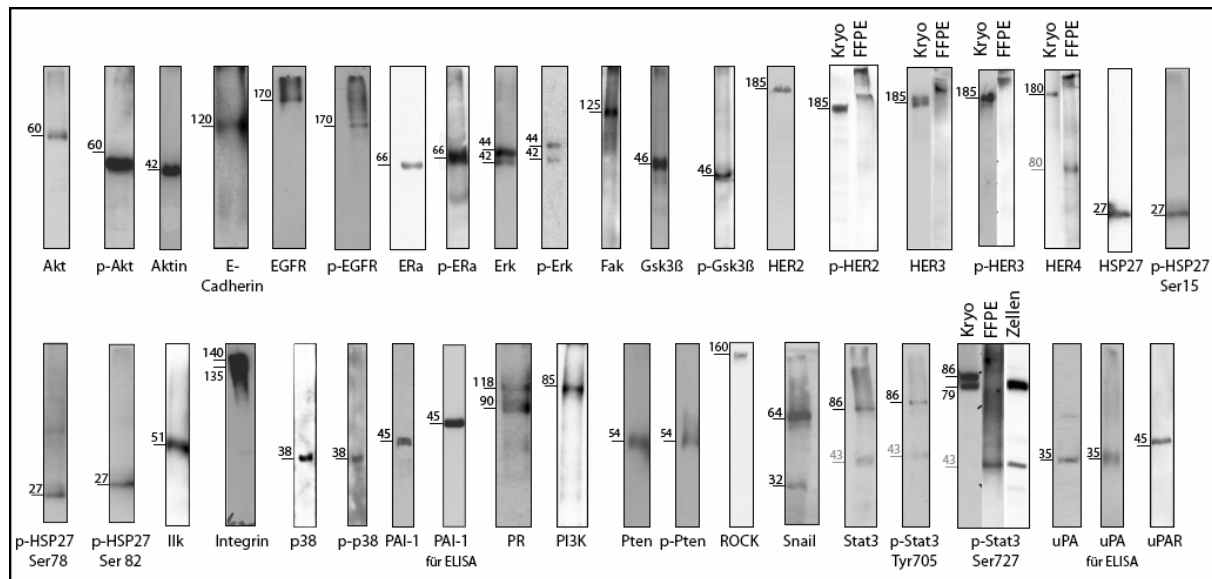
**Abbildung 4-7 Proteinausbeute bei Verwendung unterschiedlicher Inkubationstemperaturen und -zeiten.** Zwei Karzinomgewebe (Niere, Kolon) wurden unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen (10' 100 °C, 15' 100 °C, 20' 100 °C, 10' 100 °C + 2h 80 °C, 15' 100 °C + 2h 80 °C, 20' 100 °C + 2h 80 °C) mit LMA extrahiert. Die Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford lässt erkennen, dass durch die Inkubation für 2 Stunden bei 80 °C (ausgefüllte Balken) eine höhere Proteinausbeute erzielt werden kann als ohne diesen Schritt (gepunktete Balken). Des Weiteren zeigt sich, wenn auch nur in geringem Maß, eine Tendenz zu höheren Ausbeuten bei längeren Kochzeiten (hellgrau 10 Minuten, grau 15 Minuten, schwarz 20 Minuten).

## 4.2 Etablierung des Reverse Phase Protein-Mikroarrays

### 4.2.1 Antikörpervalidierung

Der Reverse Phase Protein-Mikroarray (RPPA) ist eine Methode, die die Untersuchung mehrerer hundert Proben auf die Expression einer Vielzahl von Proteinen erlaubt. Wichtig dabei ist die Verwendung hochspezifischer Antikörper, da im RPPA nur die Intensität eines Signals nicht aber das Molekulargewicht des detektierten Proteins in die Auswertung mit einbezogen werden kann. Tritt neben dem spezifischen Signal noch ein weiteres, eventuell sogar stärkeres, Signal auf, kommt es zu einer Verzerrung der Messergebnisse.

Bevor die in Tabelle 3-4 aufgelisteten Antikörper im RPPA verwendet wurden, mussten sie daher mittels Western Blot Analysen auf ihre Spezifität geprüft werden. Um Unterschiede im Bindungsverhalten des Antikörpers zwischen getestetem Probenotyp und im RPPA analysierten Probenotyp auszuschließen, wurden die Western Blots zur Validierung mit Proteinextrakten aus FFPE-Gewebe durchgeführt. Dies stellte sich für manche sehr große Proteine (p-HER2, HER3, p-HER3, HER4) als problematisch heraus, da diese kaum in das Polyacrylamid-Gel einwanderten oder zu undefinierten Banden auf dem Blot führten (Abbildung 4-8). Dieser Sachverhalt erklärt sich durch die unvollständige Spaltung der Quervernetzungen zwischen den Proteinen während der Extraktion, wodurch gerade große Proteine noch teilweise verbunden sein können. Da beim RPPA jedoch keine elektrophoretische Auftrennung erfolgt, ist dieser Umstand für dessen Detektion nicht von Bedeutung. Um dennoch die Spezifität der Antikörper nachweisen zu können und somit ihre Verwendung im RPPA zu ermöglichen, erfolgte die Western Blot Analyse in diesen Fällen zusätzlich mit Extrakten aus Gefriergewebe. Die verwendeten Antikörper gegen HER4, Stat3, p-Stat3<sup>(Ser727)</sup>, p-Stat3<sup>(Tyr705)</sup> zeigten zusätzlich zur erwarteten Bande noch eine weitere bei 80 kDa (HER4) bzw. 43 kDa ((p-)Stat3). Nach Abgleich mit der Literatur sowie nach Rücksprache mit dem Hersteller (Matthews et al. 2007; Muraoka-Cook et al. 2006), konnte die Spezifität der Banden jedoch bestätigt werden (siehe auch 5.2.1). Die Spezifität für das jeweilige Protein konnte damit für alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper nachgewiesen werden.



**Abbildung 4-8 Nachweis der Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.** Für jeden in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurde eine Western Blot Analyse zum Nachweis der Spezifität durchgeführt. Die Laufzeiten der Gele variierten zwischen den verschiedenen Analysen. Dies resultiert in unterschiedlichen Laufhöhen ähnlich großer Proteine. Um keine unnötigen Änderungen an den Originalbildern vorzunehmen, wurde dies jedoch in Kauf genommen. Grau markierte Laufhöhen waren auf dem Datenblatt des Herstellers nicht angegeben.

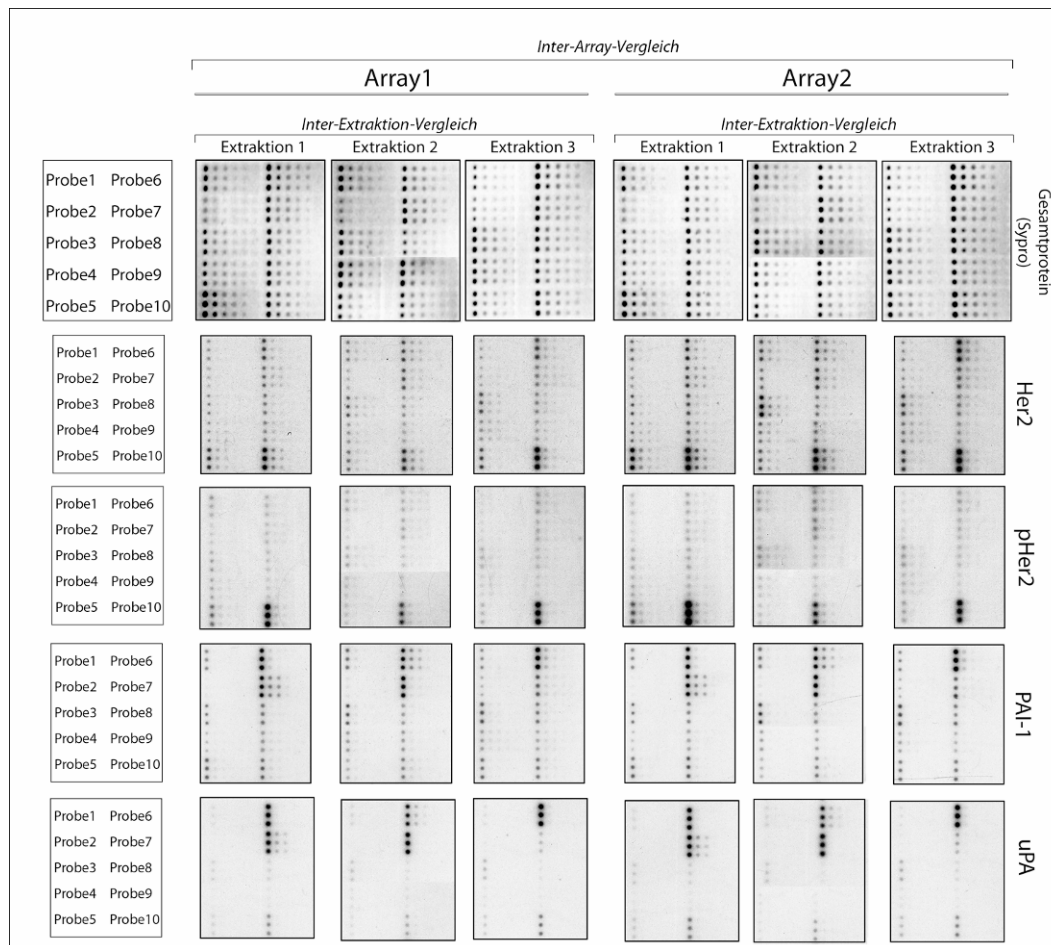
#### 4.2.2 Nachweis der Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit und Variabilität des RPPA beurteilen zu können, untersuchte ich sowohl die Abweichung zwischen verschiedenen Extraktionen (Inter-Extraktions-Vergleich) als auch die Schwankungen zwischen zwei Arrayansätzen (Inter-Array-Vergleich). Dazu wurde in zehn verschiedenen Mammakarzinomproben sowohl die Expression der löslichen Proteine PAI-1 und uPA als auch die des Rezeptors HER2 in unphosphoryliertem sowie phosphoryliertem Zustand bestimmt.

Zunächst wurde der Einfluss der Extraktion und Probenvorbereitung auf die Variabilität des RPPA überprüft, indem alle Proben in unabhängigen Ansätzen dreimal extrahiert und gemeinsam auf einen Objektträger gedruckt wurden. Abbildung 4-9 links zeigt die Resultate nach der Detektion mit Antikörpern gegen die vier beschriebenen Proteine sowie das Ergebnis der Gesamtproteinfärbung. Letztere ist nötig, um die nach der Antikörperdetektion erhaltenen Intensitäten durch Normalisierung vergleichbar zu machen. Die Notwendigkeit dieses Schrittes erschwert auch die rein visuelle Vergleichbarkeit der Resultate. Trotzdem lässt sich aus Abbildung 4-9 (links) der erste



Schluss ziehen, dass insgesamt große Ähnlichkeit zwischen den Extraktionen herrscht, obwohl auch Schwankungen zu erkennen sind.



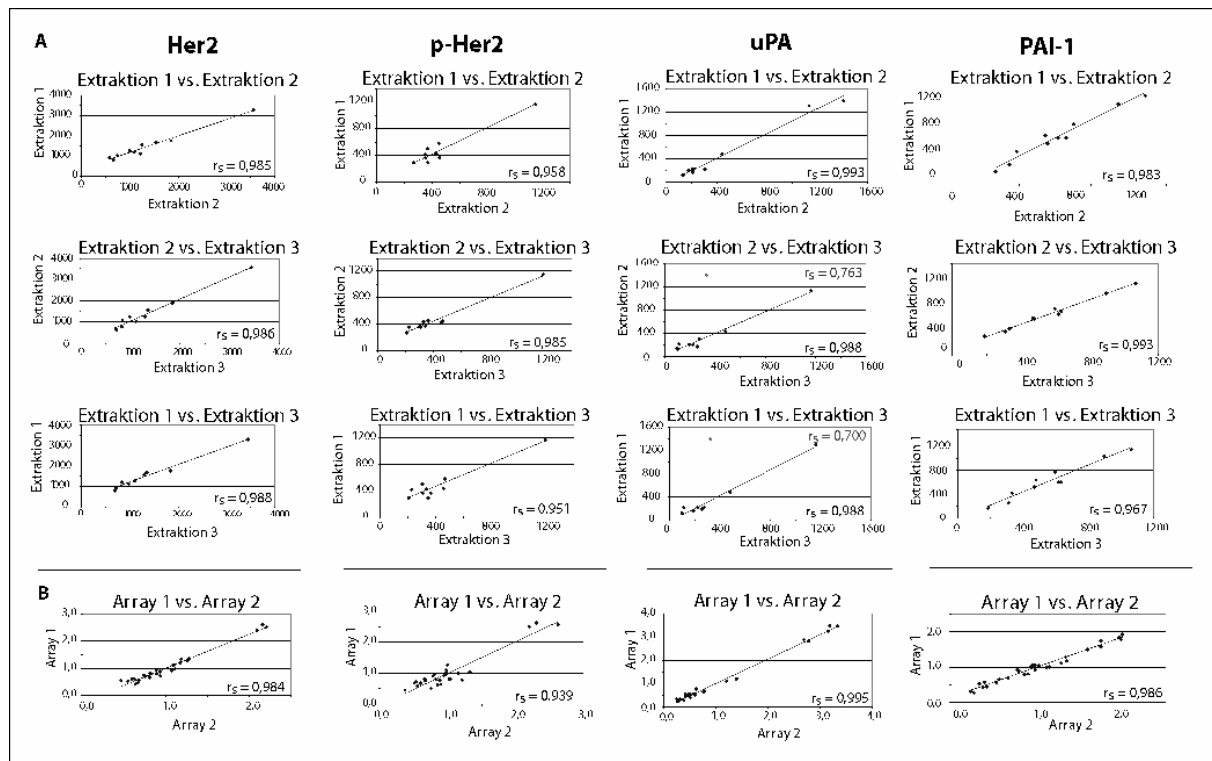
**Abbildung 4-9 Darstellung der Ergebnisse zum Nachweis der Reproduzierbarkeit des RPPA.** Es wurden 10 Mammakarzinomgewebe je drei Mal extrahiert und auf zwei Arrays aufgetragen. Dies ermöglicht einen Vergleich der Reproduzierbarkeit von unterschiedlichen Extraktionen (Inter-Extraktion) als auch von unterschiedlichen Spotting-Ansätzen (Inter-Array). Trotz einiger Abweichungen ist eine große Ähnlichkeit sowohl zwischen den Extraktionen als auch zwischen den Arrays zu erkennen. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Antikörper-Signale erst nach der Normalisierung auf die Gesamtproteinwerte wirklich vergleichbar werden.

Um die Abweichung zwischen den Extraktionsansätzen genauer zu bestimmen, wurden die mit MicroVigene errechneten und auf das Gesamtprotein normalisierten Werte der drei Extraktion je gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4-10 A) und der Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r_s$  ermittelt. Es lag zwischen den Extraktionen für HER2 im Schnitt bei  $r_s = 0,986$  (Min = 0,985; Max = 0,988), für p-HER2 bei  $r_s = 0,965$  (Min = 0,951; Max = 0,985), für PAI-1 bei  $r_s = 0,981$  (Min = 0,967; Max = 0,993) und für uPA bei  $r_s$

= 0,990 (Min = 0,988; Max = 0,993). Um die Vergleichbarkeit der Replikate zu garantieren, sollte jedoch nicht nur der Trend übereinstimmen, sondern es sollten auch die absoluten Werte der Intensitäten vergleichbar sein. In wie weit dies gegeben ist, lässt sich mittels des Varianzkoeffizient CV (Verhältnis von Standardabweichung und Mittelwert) bestimmen. Für den Inter-Extraktion Vergleich ergab sich über alle Antikörper ein mittlerer CV = 12,6 % (Min = 10,6 %; Max = 14,0 %). Trotz dieser sehr guten Werte, die für eine hohe Reproduzierbarkeit der Methode sprechen, muss darauf hingewiesen werden, dass Probe 7 der dritten Extraktion für uPA ein deutlich niedrigeres Signal zeigte als die vergleichbaren Lysate. Da der Fehler jedoch nur für diesen einen Antikörper auftrat, ist erkennbar, dass es sich nicht um einen systematischen Fehler handelte, sondern um eine einmalige Abweichung. Daher wurde dieser Fall nicht in die Berechnungen miteinbezogen. In Abbildung 4-10 A ist zur Vollständigkeit jedoch auch der  $r_s$  unter Einbeziehung dieses Werts angegeben (grau).

In einem nächsten Schritt sollten mögliche Unterschiede untersucht werden, welche bei der Vorbereitung der Verdünnungsreihen sowie beim Drucken der Arrays entstehen können. Dazu wurden die Gesamtproteinlysate aus den drei Extraktion neu verdünnt und auf einen zweiten Array gespottet (Inter-Array Vergleich). Das Ergebnis beider Ansätze ist in Abbildung 4-9 zu sehen. Schon durch Betrachtung der Abbildung lässt sich eine große Ähnlichkeit der beiden Arrays erkennen, wenn auch mit einigen Schwankungen. Ob diese auf tatsächlichen Unterschieden oder nur auf der visuell fehlenden Normierung beruhen, soll im Folgenden geklärt werden. Wie beim Extraktionsvergleich wurden sowohl der Korrelationskoeffizient  $r_s$  als auch den Varianzkoeffizient CV zwischen den beiden Arrays berechnet. Dabei ist zu beachten, dass die absoluten Intensitätswerte nur innerhalb eines Arrays verglichen werden können. Um die Arrays aber dennoch in Bezug auf ihre Expressionshöhe vergleichen zu können, wurden die bestimmten Intensitäten je Array auf den Mittelwert seiner Gesamtintensität normalisiert und gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4-10 B). Der Korrelationskoeffizient für die unterschiedliche Versuchsansätze lag für HER2 bei  $r_s = 0,984$ , für p-HER2 bei  $r_s = 0,939$ , für PAI-1 bei  $r_s = 0,986$  und für uPA bei  $r_s = 0,995$ . Der mittlere CV für alle Antikörper errechnete sich zu 9,2 % (Min = 7,6 %; Max = 12,5 %) und liegt damit unter dem des Inter-Extraktion Vergleichs. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für beide Ansätze gute

Übereinstimmungen erhalten wurden und die Reproduzierbarkeit der Methode damit bestätigt werden konnte.

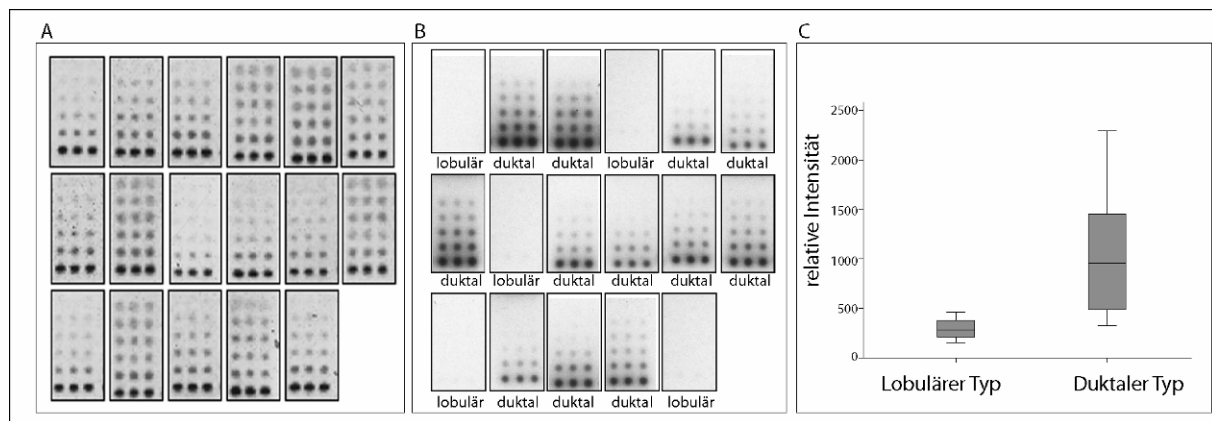


**Abbildung 4-10 Vergleich der Intensitäten von HER2, p-HER2, PAI-1 und uPA zwischen Inter-Extraktion und Inter-Array Replikaten.** Für jeden Antikörper wurden die beiden produzierten Arrays (B) sowie für Array 1 die drei unabhängig extrahierten Lysate (A) gegeneinander aufgetragen. Innerhalb eines Arrays (Inter-Extraktion, A) wurden die absoluten Intensitätswerte verglichen, während eine Inter-Array Vergleichbarkeit (B) erst nach Normalisierung der Werte auf den Intensitätsmittelwert gewährleistet ist. Für jeden Graph ist unten rechts den Korrelationskoeffizienten nach Spearman  $r_s$  angegeben. (Für uPA auch der  $r_s$ -Wert unter Berücksichtigung eines Ausreißers; grau)

### 4.2.3 Überprüfung der Resultate des Reverse Phase Protein Mikroarrays

Um zu kontrollieren in wie weit die Ergebnisse einer RPPA-Analyse die Realität widerspiegeln, war es nötig Proben mit bekannter Expression eines Testproteins zu untersuchen. Da im weiteren Verlauf der Arbeit primär Mammakarzinomgewebe analysiert werden sollte, wurde diesen Gewebetyp zur Überprüfung des Arrays verwendet. Es ist bekannt, dass es im lobulären Mammakarzinom durch eine *nonsense*-Mutation im *E-Cadherin* Gen zur Unterbrechung der Proteinsynthese sowie zum Verlust der immunologischen Nachweisbarkeit des Proteins kommt (Berx et al. 1995). Im duktalem Mammakarzinom hingegen ist die niedrige E-Cadherin Expression ein Maß für die

Aggressivität des Tumors (Gamallo et al. 1993; Gillett et al. 2001). Zur Überprüfung ob die beschriebenen Unterschiede auch mittels RPPA bestätigt werden können, wurden 17 Mammakarzinomproben auf deren E-Cadherin-Expression untersucht. Es zeigte sich, dass in keinem der fünf lobulären Karzinome eine Expression nachweisbar war, während die duktales Karzinome alle eine Expression in unterschiedlicher Stärke zeigten (siehe Abbildung 4-11). Die Übereinstimmung der Resultate mit den aus der Literatur gezogenen Erwartungen bestätigt die Vertrauenswürdigkeit der RPPA-Methodik.



**Abbildung 4-11 Ergebnis der Bestimmung der E-Cadherin-Expression mittels RPPA.**

Proteinlysate aus 17 Mammakarzinomgeweben wurden auf einen Objektträger gedruckt und bezüglich ihrer E-Cadherin-Expression untersucht. Wie aus der Literatur bekannt, konnte keine E-Cadherin-Expression für lobuläre Proteine nachgewiesen werden. (A) Gesamtproteinfärbung; (B) Ergebnis der immunologischen E-Cadherin-Detektion; des Arrays; (C) BoxPlot-Darstellung der mittels MicroVigene bestimmten Array-Werte.

### 4.3 Detektion der prognostischen Faktoren uPA und PAI-1 in Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben

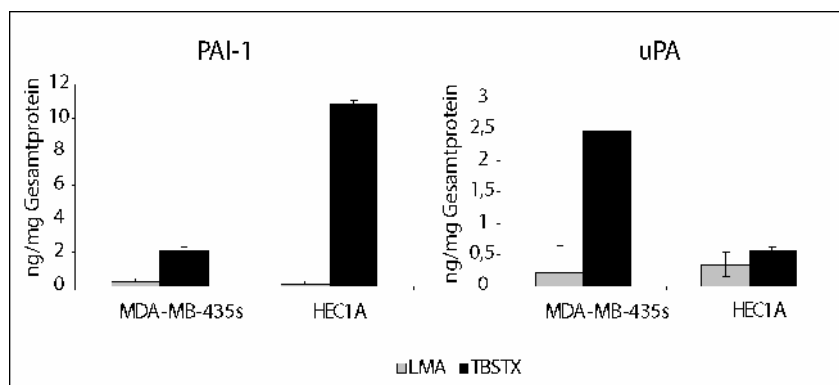
Klassische Prognosefaktoren, wie zum Beispiel Alter, Grading oder der Hormonrezeptorstatus, haben bei Mammakarzinom-Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen nur eine begrenzte Aussagekraft bezüglich der Prognose und des Ansprechens auf eine Chemotherapie. In den letzten Jahren wurden mit uPA und PAI-1 zwei Prognosefaktoren gefunden, die den Nutzen als auch das Ansprechen dieser nodal-negativen Patientinnen auf eine Chemotherapie besser voraussagen können.

Die Bestimmung der beiden Faktoren erfolgt aus Proteinextrakten von schockgefrorenen Proben (Gefrierproben) mittels eines kommerziellen Immunassays. Dies ist der

Hauptgrund, warum bisher nur wenige Kliniken deutschlandweit diesen Test durchführen. Um zur Verbreitung der Nutzung dieser Marker beizutragen, ist es nötig diese auch an klinischen FFPE-Geweben durchführen zu können. Da beide Proteine sowohl rezeptorgebunden als auch intra- und extrazellulär auftreten, gerät die in solchen Fällen häufig verwendete Immunhistochemie an ihre Grenzen und kann nicht empfohlen werden. Ziel dieses Teilprojekts war es daher zu untersuchen, ob mit dem im vorherigen Abschnitt 4 optimierten Verfahren der Extraktion von Proteinen aus FFPE-Geweben eine Analyse von uPA und PAI-1 auch aus fixierten Geweben möglich ist.

#### 4.3.1 Proteinlysate aus FFPE-Geweben im klinischen ELISA

Der erste Ansatz war es, den uPA und PAI-1 Gehalt von FFPE-Proteinlysaten direkt mit Hilfe des klinisch zugelassenen ELISA (Femelle; American Diagnostica) zu bestimmen. Dazu wurde zunächst die Expressionshöhe der beiden Proteine in einer uPA-positiven, aber PAI-1-negativen Zelllinie (MDA-MB-435s) sowie in einer uPA-negativen, aber PAI-1-positiven Zelllinie (Hec1A) untersucht. Dazu wurde je ein Teil der Zellen pelletiert, wie die Gewebe in Formalin-fixiert, in Paraffin-eingebettet und nach FFPE-Standardprotokoll mit LMA extrahiert. Der andere Teil der Zellen wurde im für den ELISA empfohlenen Puffer (TBS + 1 % Triton-X100; kurz: TBSTX) lysiert und sollte als Referenz dienen. Das Resultat der in Triplikaten durchgeführten Analyse zeigte, dass in keiner mit LMA extrahierten Probe ein Signal erhalten werden konnte, während die in TBSTX extrahierten Kontrollen reproduzierbare Signale zeigten (Abbildung 4-12).



**Abbildung 4-12 ELISA-Resultate für uPA und PAI-1 in zwei verschiedenen Zelllinien.** Es wurden Zellen einer uPA-positiven, aber PAI-1-negativen Zelllinie (MDA-MB-435s) sowie einer uPA-negativen, aber PAI-1-positiven Zelllinie (Hec1A) sowohl in LMA als auch im Standardpuffer des ELISA-Tests (TBSTX) extrahiert und

mittels ELISA analysiert. Während für die Kontrollen reproduzierbare Ergebnisse erhalten wurden, konnte für keines der LMA-Lysate ein verwertbares Signal detektiert werden.

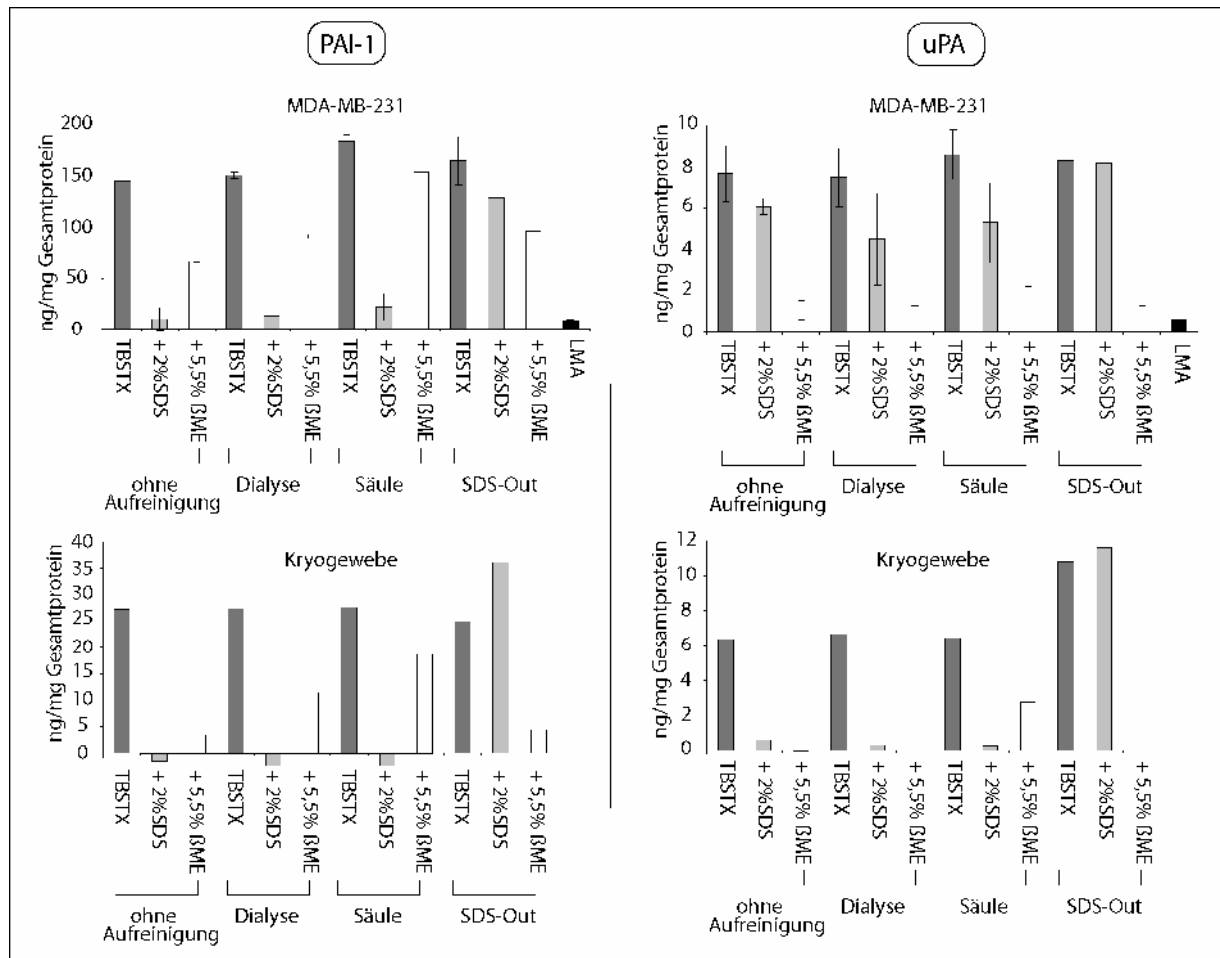
Eine mögliche Ursache vermutete ich in den denaturierenden Eigenschaften des zur Proteinextraktion aus FFPE-Geweben nötigen LMAs, welcher sowohl eine hohe Konzentration an SDS (2 %) als auch an  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME; 5,5 %) enthält. Durch diese Komponenten kommt es sowohl zur Denaturierung der extrahierten Proteine als auch möglicherweise zur Denaturierung der Antikörper im ELISA. Zwar wird jede Probe vor dem Einsatz in den ELISA mindestens 1:20 verdünnt, dennoch kann eine Beeinträchtigung des ELISA nicht ausgeschlossen werden. Die Frage ob die Denaturierung von uPA und PAI-1 deren Bestimmung mittels des vorliegenden ELISA verhindert, konnte auch nach Rücksprache mit dem Hersteller nicht geklärt werden. Entscheidend wäre es gewesen das Epitop der im ELISA verwendeten Antikörper zu kennen. Dies hätte eine Aussage darüber erlaubt, ob die verwendeten Antikörper die denaturierten Formen der Proteine erkennen. Da der Hersteller darüber jedoch keine Auskunft erteilen konnte, überprüfte ich zunächst die mögliche denaturierende Wirkung des Puffers auf die Antikörper des ELISA. Dazu lysierte ich die doppelt-positive Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 in TBSTX und versetzte ein Aliquot mit 2 % SDS, ein zweites mit 5,5 %  $\beta$ -ME und ließ ein weiteres als Vergleichsprobe ohne Zusätze. Abbildung 4-13 (oben; Spalte „ohne Aufreinigung“) zeigt die Resultate des zweifach durchgeführten Versuchs. Die Anwesenheit beider Substanzen hatte einen reduzierenden Einfluss auf das erhaltene Signal des PAI-1 ELISA, wobei SDS jedoch zu einer deutlich stärkeren Störung führte. Interessanterweise zeigte sich für uPA ein leicht anderes Bild. Auch hier störten beide Reagenzien den ELISA, allerdings hatte die Zugabe von  $\beta$ -ME einen deutlich stärkeren Einfluss als die von SDS.

Um sicherzugehen, dass die beobachteten Effekte kein reines Zellphänomen sind, wurde darüber hinaus ein klinisches Proteinlysate eines stickstoffkonservierten Mammakarzinoms untersucht, welches ebenfalls in drei unterschiedliche Aliquots geteilt wurde (2 % SDS; 5,5 %  $\beta$ -ME; ohne Zusatz). Auch bei dieser Probe konnte weder für uPA noch für PAI-1 nach Zugabe von SDS oder  $\beta$ -ME ein Signal detektiert werden (siehe Abbildung 4-13 unten; Spalte „ohne Aufreinigung“). Die störende Wirkung beider Substanzen wurde damit als bestätigt angesehen.

### **4.3.2 Verringerung der SDS und $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration**

Aufgrund dieser Resultate schien es sinnvoll, beide Substanzen vor der Applikation der Proben im ELISA aus dem Puffer zu entfernen. Dazu wurden drei Verfahren verwendet: Eine Dialyse der Proben mit Slide-A-Lyzer (Pierce), eine Aufreinigung über Entsalzungssäulen (Zeba Spin Desalting Columns; Pierce) sowie das Reagenz SDS-Out (Pierce), das speziell zur Entfernung von SDS aus Proteinlösungen entwickelt wurde. Um den Effekt dieser Methoden zu überprüfen, wurden die oben beschriebenen Proben (MDA-MB-231/Gefriergewebe mit 2 % SDS; mit 5,5 %  $\beta$ -ME, ohne Zusatz) nach Protokoll der drei Verfahren behandelt. Wie Abbildung 4-13 zeigt, ist die Ausbeute aller drei Methoden sehr gut, da die in reinem TBSTX gelösten Proben (dunkelgrau) nach der Behandlung sehr ähnliche ELISA-Werte zeigten wie vor der Behandlung. Leider ist dieser Aspekt nebensächlich, da sich weder nach Dialyse noch nach der Reinigung über die Säulen die Werte der mit Detergens oder Reduktionsmittel versetzten Proben deutlich verbesserten. Einen guten Effekt zeigte das SDS-Out. Nach Behandlung mit dieser Lösung sind die ELISA-Resultate sowohl für die Zellen als auch für das Gewebe mit denen in reinem TBSTX vergleichbar. Da es mit keiner dieser Methoden (auch nicht in Kombination) gelang, beide Substanzen SDS und  $\beta$ -ME zu entfernen, wurde der Ansatz der gezielten Beseitigung beider Substanzen verworfen.





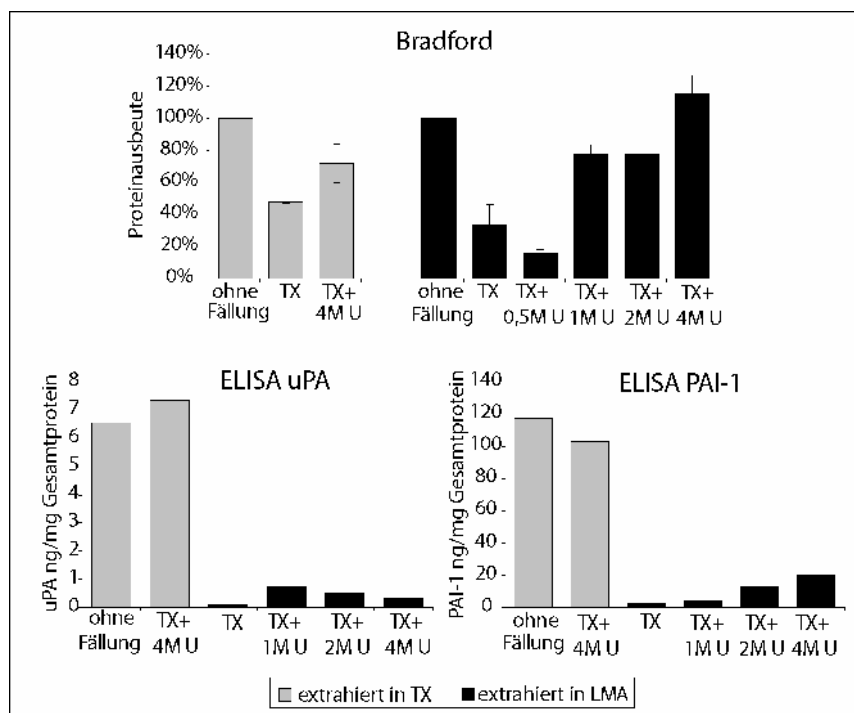
**Abbildung 4-13 Auswirkung von SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) auf das Signal des klinischen ELISA Femtelle vor und nach Behandlung der Lysate.** Es wurden MDA-MB-231-Zellen sowie ein Mammakarzinom-Gefriergewebe mit TBS/1 % Triton-X100 (TBSTX) extrahiert (dunkelgrau) und nachfolgend entweder mit 2 % SDS (hellgrau) oder 5,5 %  $\beta$ -ME (weiß) versetzt. Anschließend erfolgte die Messung im ELISA. Für beide Proben zeigte sich sowohl für uPA als auch für PAI-1 ein störender Einfluss der beiden Reagenzien (ohne Aufreinigung). Auch nach Behandlung mit Dialyse oder über eine Entsalzungssäule konnte keine Verbesserung festgestellt werden. Das Reagenz SDS-Out war dagegen in der Lage SDS aus den Proben zu entfernen.

### 4.3.3 Umpufferung durch Fällung

In einem nächsten Schritt sollte versucht werden, eine Gesamtumpufferung über Fällung zu erreichen. Dazu wurden MDA-MB-231 Zellen sowohl in LMA als auch in TBSTX lysiert und anschließend mit Aceton, Aceton/TCA oder Methanol/Chloroform gefällt. Unabhängig von der verwendeten Fällungsmethode war es jedoch nicht möglich, die Proteine der FFPE-Lysate im für den ELISA empfohlenen Puffer TBSTX wieder in Lösung zu überführen. Aus diesem Grunde wurde versucht, die Löslichkeit der Proteine durch Harnstoffzugabe in den Puffer zu erhöhen. Der Harnstoff führte ab einer Konzentration von 1 M zu einer



verbesserten Löslichkeit der Proteine (Abbildung 4-14 oben), allerdings zeigten auch die so behandelten Lysate keine verwertbaren Signale im ELISA (Abbildung 4-14 unten). Dass der Harnstoff selbst oder die Fällung keinen negativen Einfluss auf die ELISA Resultate hatte, zeigte die in TBSTX extrahierte und nach der Fällung in TBSTX mit 4 M Harnstoff aufgenommene Probe (TX + 4M U). Es kann somit festgehalten werden, dass auch eine Umpufferung durch Proteinfällung nicht zu einer Kompatibilität der Proben mit dem ELISA führte.

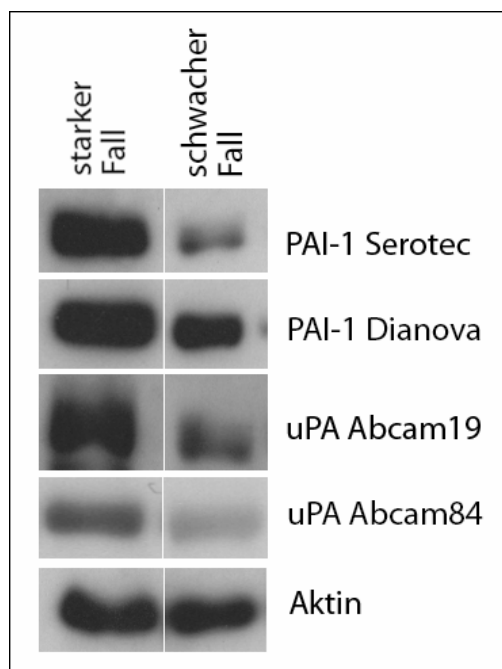


**Abbildung 4-14 Einfluss der Fällung der Lysate sowie der Zugabe von Harnstoff (U) auf die Proteinausbeute und die Kompatibilität mit dem klinischen ELISA.** Für die hier gezeigten Daten, wurden MDA-MB-231 in TBS/1 % Triton X-100 (TX; grau) sowie in LMA (schwarz) extrahiert und anschließend mit Aceton gefällt. Die Resuspendierung erfolgte in TBSTX mit 0 M, 0,5 M, 1 M, 2M und 4 M Harnstoff (in der Grafik markiert als TX, TX+0,5M U, TX+1M, U TX+2M U TX+4M U). Die Messung der Gesamtproteinkonzentration (oben) zeigt, dass erst ab einer Konzentration von 1M Harnstoff eine Resuspendierung möglich ist. Die ELISA-Daten (unten) zeigen, dass eine Zugabe der maximalen Harnstoffkonzentration von 4 M nicht zu einer Störung des ELISA führt, die in LMA extrahierten Proben, jedoch auch nach der Fällung im ELISA nicht detektierbar sind.

#### 4.3.4 Entwicklung eines ELISA gegen denaturiertes uPA und PAI-1

Die dargestellten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der kommerzielle, klinisch verwendete ELISA nur die native Struktur nicht aber die durch Extraktion aus FFPE-Geweben gewonnene, denaturierte Form der Proteine erkennt. Auch von anderen Firmen waren keine ELISA verfügbar, die gesichert die denaturierten Formen von uPA und PAI-1 detektieren.

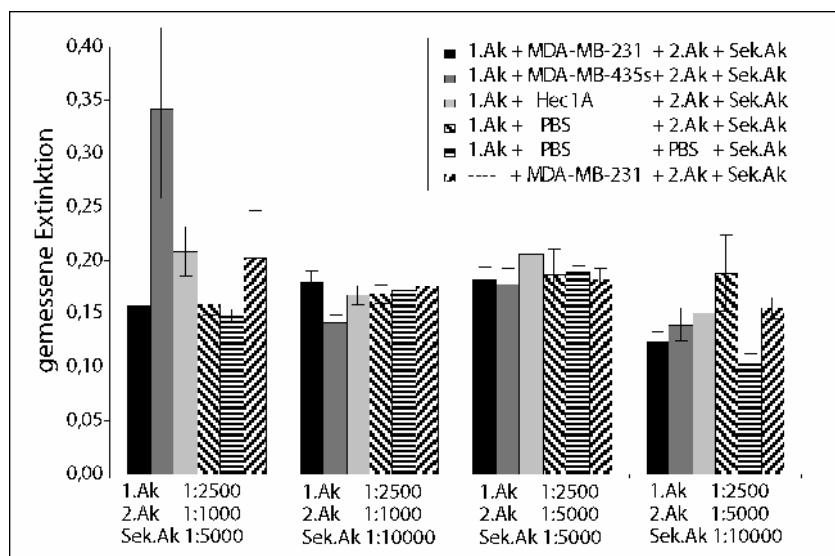
In Western Blot Experimenten, welche ich für die in Abschnitt 4.4 beschriebene Fragestellung durchgeführt hatte, war es jedoch möglich uPA und PAI-1 aus denaturierten FFPE-Lysaten nachzuweisen. Abbildung 4-15 zeigt einen Western Blot mit zwei FFPE-Geweben, die uPA und PAI-1 unterschiedlich stark exprimieren. Die Spezifität aller vier Antikörper ist in Abbildung 4-8 gezeigt.



**Abbildung 4-15 Western Blot Analyse von FFPE-Gewebelysaten mit Antikörpern gegen uPA und PAI-1.** Je 25 µg eines uPA und PAI-1 stark exprimierenden Mammakarzinomlysats sowie eines schwach exprimierenden Lysats wurden aufgetragen und mit je zwei Antikörpern gegen uPA und PAI-1 inkubiert.

Daher war ein weiterer Ansatz selbst einen ELISA mit diesen Antikörpern gegen die denaturierten Proteine zu erstellen. Dabei wurden verschiedene Konzentration des Beschichtungs- (PAI-1, serotec; uPA, Abcam19) und des Detektionsantikörpers (PAI-1, Dianova; uPA, Abcam84), sowie unterschiedliche Blockierungslösungen kombiniert

(Tabelle 3-16). Um die Funktionsweise der so erzeugten ELISAs zu überprüfen, wurden sowohl mit TBSTX als auch mit LMA extrahierte Zelllysate der Zelllinien MDA-MB-231, Hec1A und MDA-MB-435s verwendet. Die LMA-Lysate wurden vor Gebrauch über eine Methanol/Chloroform-Fällung in TBSTX umgepuffert. Für keine der ausgetesteten Bedingungen konnten jedoch reproduzierbare über dem Hintergrundsignal liegende Signale erhalten werden. Abbildung 4-16 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines uPA-ELISAs, in welchem die optimale Verdünnung der Antikörper untersucht werden sollte.



**Abbildung 4-16 Ansatz zur Entwicklung eines gegen uPA gerichteten ELISAs.** Aus FFPE-Zellblöcken dreier Zelllinien (MDA-MB-231; Hec1A; MDA-MB-435s) wurden mittels LMA Proteine extrahiert und anschließend durch Fällung umgepuffert. Unter Verwendung verschiedener Antikörperkonzentrationen (1. Antikörper = 1:2500; 2. Antikörper = 1:1000 bzw. 1:5000; Sekundärantikörper = 1:5000 bzw. 1:10000) wurden diese im ELISA eingesetzt. Zusätzlich wurden drei Kontrollen (gestrichelt) mitgeführt. Für die erste Kontrolle wurde nach normalem Protokoll verfahren, jedoch wurde anstelle eines Zelllysats PBS eingesetzt. Für die zweite Kontrolle wurde sowohl das Zelllysate als auch der 2. Antikörper durch PBS ersetzt. Die dritte Kontrolle bestand aus dem direkten Auftrag des Lysats in die 96-well Platte ohne Verwendung des 1. Antikörpers. Für keine der ausgetesteten Bedingungen konnten über dem Hintergrundsignal liegende Signale erhalten werden.

## **4.4 Analyse von uPA/PAI-1 assoziierten Signalwegen im Mammakarzinom**

### ***4.4.1 Korrelation der uPA und PAI-1 Expression mit Schlüssel-Signalmolekülen der Tumorprogression in Mammakarzinomen***

Das vorherige Kapitel behandelt die Problematik der klinischen Bestimmung der Protease uPA und ihres Inhibitors PAI-1. Ein weiterer kritischer Punkt bezüglich dieser beiden prognostischen Marker besteht in der Tatsache, dass die Rolle der beiden Proteine bisher nur in Zellkultursystemen beschrieben ist. Zu Beginn dieser Arbeit gab es jedoch keine Studie, welche ihre Funktion bei der Regulation von Signalwegen in klinisch relevantem Mammakarzinomgewebe darstellte. Da es aber bekanntermaßen zu Unterschieden in der Signaltransduktion zwischen Zellsystemen und Geweben kommen kann, ist dies von entscheidender Bedeutung, um die Mechanismen hinter den beiden prognostischen Markern zu verstehen.

Um einen ersten Überblick über die möglichen Signalwege zu bekommen, in die uPA und PAI-1 involviert sind, wurden die beiden und 21 weitere Proteine auf deren Expression in drei unabhängigen Mammakarzinomkollektiven (60, 80 und 61 Patienten) untersucht. Neben den klinischen Brustkrebsmarkern, HER2, Progesteronrezeptor (PR) und Estrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), wurden weitere Vertreter der HER-Familie (EGFR, HER3, HER4, p-EGFR, p-HER2, p-HER3) untersucht, da diese Rezeptorgruppe allgemein eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms einnimmt. Darüber hinaus wurde die Expression der Integrin-Untereinheit  $\alpha$ V sowie des Rezeptors uPAR analysiert. Beide Proteine sind aus Zellkultorexperimenten bekannte Interaktionspartner von uPA und PAI-1. Außerdem sind beide Moleküle, wie auch die untersuchten Rezeptoren Snail und E-Cadherin, für den Zell-Zell beziehungsweise Zell-Stroma Kontakt mitverantwortlich und spielen damit eine Rolle bei der Adhäsion und Migration von Tumorzellen. Erk, Akt, Stat3 und Pten sowie ihre aktivierten Formen wurden als Kernmoleküle des jeweiligen Signalwegs ausgewählt, um erste Hinweise zu erhalten, ob uPA oder PAI-1 mit einem dieser Signalwege in Zusammenhang steht.

Die Verwendung der drei Kollektive erlaubte es, die im ersten Kollektiv erhaltenen Korrelationsergebnisse in zwei weiteren, statistisch unabhängigen Untersuchungen zu validieren. Für jedes Kollektiv wurde ein Array produziert und mit den Antikörpern gegen die oben beschriebenen 23 Proteine inkubiert. Die nach der Auswertung mit MicroVigene erhaltenen Expressionswerte von uPA und PAI-1 wurden mit denen der Membranrezeptoren und Signalmolekülen nach Spearman korreliert. Der Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$  sowie die nach Bonferroni angepassten p-Werte sind für PAI-1 in Tabelle 4-2 und für uPA in Tabelle 4-3 aufgelistet.

**Tabelle 4-2 Beschreibung der Korrelation von PAI-1 mit den Expressionshöhen von Membranrezeptoren und Signalmolekülen** durch den Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$  sowie die nach Bonferroni angepassten p-Werte. Signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) sind grau unterlegt.

PAI-1 vs.	Kollektiv1		Kollektiv2		Kollektiv3	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
<b>EGFR</b>	0,476	0,008	0,402	0,008	0,513	0,001
<b>HER3</b>	0,484	0,017	0,454	0,001	0,413	0,013
<b>HER4</b>	0,484	0,002	0,461	0,015	0,406	0,028
<b>Integrin <math>\alpha</math>V</b>	0,449	0,024	0,404	0,008	0,398	0,034
<b>p-Akt</b>	0,517	0,002	0,415	0,025	0,619	0,000
<b>p-HER2</b>	0,552	0,000	0,392	0,017	0,477	0,003
<b>uPAR</b>	0,484	0,006	0,659	0,000	0,407	0,033
<b>E-Cadherin</b>	0,545	0,001	0,143	>0,99	0,077	>0,99
<b>Erk</b>	0,480	0,014	0,035	>0,99	0,185	>0,99
<b>p-EGFR</b>	0,497	0,006	0,134	>0,99	0,184	>0,99
<b>p-Pten</b>	0,600	0,000	0,221	>0,99	0,108	>0,99
<b>Akt</b>	0,398	0,077	0,303	0,000	0,291	0,648
<b>HER2</b>	0,313	0,528	0,515	0,000	0,072	>0,99
<b>p-Stat3</b>	0,396	0,080	-0,028	>0,99	0,508	0,003
<b>Stat3</b>	0,335	0,358	0,119	>0,99	0,462	0,014
<b>uPA</b>	-0,017	>0,99	0,019	>0,99	0,756	<0,001
<b>ER<math>\alpha</math></b>	0,261	>0,99	0,284	>0,99	0,284	0,917
<b>p-Erk</b>	0,284	0,904	0,301	0,401	0,308	0,688
<b>Pten</b>	0,378	0,125	0,284	0,535	-0,069	>0,99
<b>PR</b>	0,253	>0,99	0,248	>0,99	0,406	0,061
<b>p-HER3</b>	0,367	0,191	0,367	0,101	0,407	0,073
<b>Snail</b>	0,410	0,055	0,131	>0,99	0,189	>0,99

**Tabelle 4-3 Beschreibung der Korrelation von uPA mit den Expressionshöhen von Membranrezeptoren und Signalmolekülen** durch den Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$ , sowie die nach Bonferroni angepassten p-Werte. Signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) sind grau unterlegt.

uPA vs.	Kollektiv 1		Kollektiv 2		Kollektiv 3	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
<b>ER<math>\alpha</math></b>	0,457	0,016	0,354	0,040	0,430	0,026
<b>p-Erk</b>	0,424	0,042	0,392	0,039	0,447	0,022
<b>Stat3</b>	0,501	0,007	0,416	0,014	0,490	0,004
<b>PAI-1</b>	-0,017	>0,99	0,019	>0,99	0,756	0,000
<b>p-Akt</b>	-0,042	>0,99	0,083	>0,99	0,498	0,003
<b>p-Stat3</b>	0,116	>0,99	-0,036	>0,99	0,419	0,036
<b>Akt</b>	-0,193	>0,99	-0,208	>0,99	0,290	>0,99
<b>E-Cadherin</b>	0,045	>0,99	-0,288	0,397	0,050	>0,99
<b>EGFR</b>	-0,131	>0,99	-0,118	>0,99	0,380	0,184
<b>Erk</b>	0,358	0,067	0,380	0,051	0,426	>0,99
<b>HER2</b>	0,037	>0,99	0,146	>0,99	0,021	>0,99
<b>HER3</b>	0,012	>0,99	-0,128	>0,99	0,238	>0,99
<b>HER4</b>	0,109	>0,99	-0,074	>0,99	0,261	>0,99
<b>Integrin <math>\alpha</math>V</b>	-0,046	>0,99	0,300	0,197	-0,066	>0,99
<b>p-EGFR</b>	0,000	>0,99	0,171	>0,99	0,133	>0,99
<b>Pten</b>	-0,031	>0,99	-0,179	>0,99	0,060	>0,99
<b>PR</b>	-0,113	>0,99	-0,095	>0,99	0,187	>0,99
<b>p-HER2</b>	0,064	>0,99	-0,231	>0,99	-0,037	>0,99
<b>p-HER3</b>	0,060	>0,99	0,069	>0,99	0,260	>0,99
<b>p-Pten</b>	0,089	>0,99	-0,094	>0,99	0,159	>0,99
<b>Snail</b>	0,155	>0,99	0,004	>0,99	0,330	0,329
<b>uPAR</b>	-0,092	>0,99	0,100	>0,99	0,313	0,528

Für einige der Signalwegsmoleküle konnte nur in einem Kollektiv eine statistisch signifikante Korrelation ( $p < 0,05$ ) mit PAI-1 (E-Cadherin, Erk, p-EGFR, p-Pten, Akt, HER2, p-Stat3, Stat3, uPA) oder uPA (p-Akt, p-Stat3, PAI-1) nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4-2 und Tabelle 4-3). Diese Korrelationen wurden deshalb nicht als allgemein gültig angesehen. Für alle anderen Proteine zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang in entweder keinem oder allen drei Kollektiven. So war die Expression von PAI-1-positiv korreliert mit der Expression der Integrin-Untereinheit  $\alpha$ V, uPAR, p-Akt, ER $\alpha$ , EGFR, HER3, HER4 und p-HER2. Kein Zusammenhang konnte für PAI-1 mit p-Erk, Pten, PR, p-HER3 und Snail nachgewiesen werden. Dies gibt erste Hinweise darauf, dass PAI-1 im Mammakarzinom im Akt- und HER-Signalweg eine Rolle spielen könnte, aber nicht im Erk/Stat-Signalweg. Für uPA konnte eine statistisch signifikante, positive Korrelation mit ER $\alpha$ , p-Erk und Stat3 nachgewiesen werden.

#### **4.4.2 Überprüfung der Beteiligung von uPA im Erk/Stat- und PAI-1 im Akt-Signalweg**

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse konnte vermutet werden, dass uPA im Erk/Stat-Signalweg und PAI-1 im Akt-Signalweg eine Rolle spielt. In einer weiteren RPPA-Analyse der 201 Brustkrebsproben sollte dieser mögliche Zusammenhang näher untersucht werden. Dazu wurden die Expressionshöhen von sechs im Akt-Signalweg involvierten Proteinen (PI3K, Fak, Gsk3 $\beta$ , p-Gsk3 $\beta$ , Ilk, Rock) untersucht sowie fünf Proteine, welche mit uPA in Zusammenhang stehen könnten (p38, p-p38, p-ER $\alpha$ , HSP27, p-Stat3<sup>S727</sup>). Um erneut die Reproduzierbarkeit der Arrays und damit die Konsistenz der Ergebnisse zu überprüfen, wurden zusätzlich auch noch einmal p-Akt und p-Erk analysiert. Die nach Detektion und Auswertung erhaltenen Daten der Analyse der drei Kollektive mit den 13 erwähnten Parametern (Tabelle 4-4 und Tabelle 4-5) zeigen einen deutlichen Zusammenhang von PAI-1 mit dem Akt-Signalweg. PAI-1 korrelierte mit Fak, Ilk, PI3K und Rock. Darüber hinaus konnte der Zusammenhang von PAI-1 und p-Akt aus der ersten Analyse bestätigt werden. Dies bekräftigt sowohl die Einbindung von PAI-1 in den Akt-Signalweg, als auch die Reproduzierbarkeit der Methode. Neben den, dem Akt-Signalweg zugehörigen, Proteinen zeigte sich ein Zusammenhang der Expression von PAI-1 mit HSP27 und der p-p38 MAPK, nicht jedoch mit der unphosphorylierten Form p38. Zu erwähnen ist auch die Tatsache, dass keine Korrelation zu Gsk3 $\beta$  und dessen aktivierter Form gezeigt werden konnte, obwohl Gsk3 $\beta$  durch phosphoryliertes Akt inhibiert werden kann. Für uPA waren die Ergebnisse erneut weniger deutlich. Das Protein korrelierte, wie im ersten Ansatz, mit p-Erk. Darüber hinaus zeigte sich ein Zusammenhang mit p-p38 und HSP27, jedoch nicht mit p-ER $\alpha$  oder mit p-Stat3<sup>(Ser727)</sup>, so dass die nach dem ersten Durchlauf postulierte Interaktion von uPA mit dem Estrogen-Signalweg und dem Erk-Signalweg nicht bestätigt werden konnte. Eher den Erwartungen entspricht, dass uPA mit keinem Protein des Akt-Signalwegs korrelierte.

**Tabelle 4-4 Beschreibung der Korrelation von PAI-1 mit den Expressionshöhen der untersuchten Signalwegproteine** durch den Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$  sowie die nach Bonferroni angepassten p-Werte. Signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) sind grau unterlegt.

PAI-1 vs.	Kollektiv 1		Kollektiv 2		Kollektiv 3	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
<b>Fak</b>	0,499	0,001	0,547	0,000	0,468	0,000
<b>HSP27</b>	0,463	0,010	0,552	0,000	0,553	0,000
<b>Ilk</b>	0,457	0,006	0,431	0,013	0,495	0,000
<b>p-Akt</b>	0,441	0,012	0,405	0,027	0,399	0,006
<b>PI3K</b>	0,516	0,001	0,553	0,000	0,449	0,001
<b>p-p38</b>	0,554	0,000	0,707	0,000	0,596	0,000
<b>Rock</b>	0,535	0,000	0,636	0,000	0,602	0,000
<b>p-ERa</b>	0,523	0,000	0,291	0,412	0,336	0,037
<b>p-Erk</b>	0,542	0,000	0,307	0,355	0,258	0,416
<b>Gsk3<math>\beta</math></b>	0,444	0,009	0,274	0,578	0,165	>0,99
<b>p38</b>	0,374	0,068	0,461	0,005	0,053	>0,99
<b>p-Gsk3<math>\beta</math></b>	0,322	0,216	0,333	0,171	0,126	>0,99
<b>p-Stat3<sup>(S727)</sup></b>	0,245	0,968	0,337	0,156	0,165	>0,99

**Tabelle 4-5 Beschreibung der Korrelation von uPA mit den Expressionshöhen der untersuchten Signalwegproteine** durch den Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$  sowie die nach Bonferroni angepassten p-Werte. Signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) sind grau unterlegt.

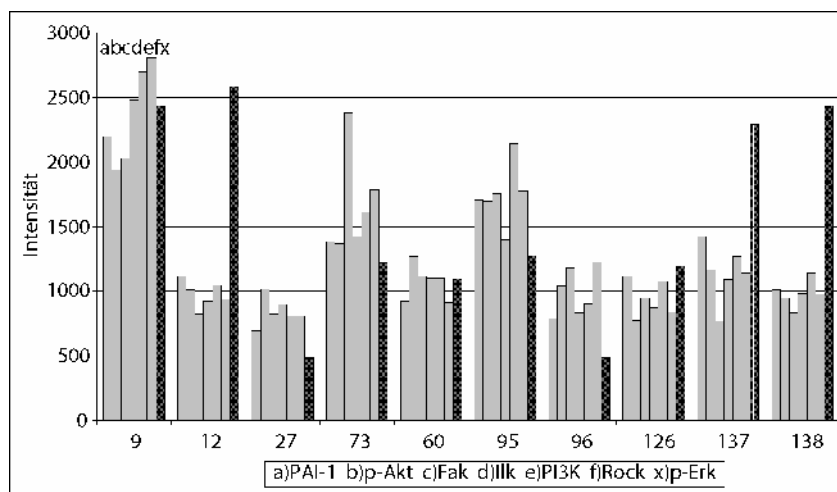
uPA vs.	Kollektiv 1		Kollektiv 2		Kollektiv 3	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
<b>HSP27</b>	0,524	0,001	0,401	0,028	0,591	0,000
<b>p-Erk</b>	0,408	0,028	0,444	0,012	0,375	0,024
<b>p-p38</b>	0,473	0,008	0,465	0,016	0,369	0,022
<b>Fak</b>	0,392	0,043	0,239	0,991	0,118	>0,99
<b>p-ERa</b>	0,429	0,015	0,040	>0,99	0,283	0,206
<b>Rock</b>	0,327	0,196	0,390	0,035	0,309	0,103
<b>Ilk</b>	0,303	0,325	0,271	0,552	0,339	0,043
<b>Gsk3<math>\beta</math></b>	0,295	0,380	0,025	>0,99	-0,050	>0,99
<b>p38</b>	0,202	>0,99	0,226	>0,99	-0,032	>0,99
<b>p-Akt</b>	0,313	0,296	0,154	>0,99	0,078	>0,99
<b>p-Gsk3<math>\beta</math></b>	0,280	0,513	0,152	>0,99	0,098	>0,99
<b>PI3K</b>	0,077	>0,99	0,298	0,326	0,164	>0,99
<b>p-Stat3<sup>(S727)</sup></b>	0,135	>0,99	0,286	0,417	0,006	>0,99

#### 4.4.3 Analyse der Signalwegsaktivierung in einzelnen Tumoren

Durch die Korrelationsanalyse wurde deutlich, dass PAI-1 im Akt-Signalweg involviert ist. Um zu überprüfen ob dieser Zusammenhang auch in einzelnen Tumoren Bestand hat, wurden die Daten der obigen Korrelationsanalyse bezüglich der sechs relevanten Proteine (p-Akt, Fak, Rock, Ilk, PI3K, PAI-1) in einzelnen Patienten zueinander verglichen. Bis zu einer 0,5-fachen Abweichung der Expressionhöhe eines Proteins vom Mittelwert der Expressionshöhe aller Proteine eines Patienten wurde von einer Koexpression der Proteine



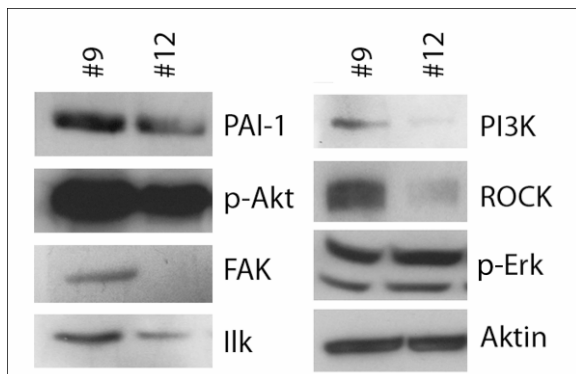
in diesem Patienten ausgegangen. Diese Berechnung erlaubt es die biologischen Schwankungen der Proteinexpression zwischen den Patienten zu berücksichtigen. Vier der 201 Patienten konnten aufgrund fehlender Werte nicht in die Analyse mit einbezogen werden. In 178 von 197 (90 %) konnte eine Koexpression der Proteine gezeigt werden. In 8,1 % (16) zeigte eines der Proteine eine im Vergleich deregulierte Expression und in nur in 1,5 % (3) der Fälle traf dies auf zwei Proteine zu. Es zeigte sich des Weiteren, dass für die Kinasen Ilk und Rock in keinem der Patienten eine Abweichung auftrat. Die weiteren vier Proteine waren in drei (PI3K), in fünf (Fak, p-Akt) bzw. in neun (PAI-1) der Patienten differenziell exprimiert. Interessanterweise war die PI3K-Expression in den drei Fällen, in denen sie von der Expressionshöhe der anderen Vertreter des PI3K/Akt-Signalwegs abwich, immer niedriger als der Durchschnitt exprimiert. Für Fak, p-Akt und PAI-1 wurde ausschließlich der umgekehrte Fall beobachtet. In Abbildung 4-17 sind die Expressionsprofile von zehn repräsentativen Fällen dargestellt. Um zu zeigen, dass es sich nicht um probenabhängige Schwankungen, sondern für den Signalweg spezifische Regulationen handelt, ist in der Abbildung zusätzlich die Expression der Kinase p-Erk dargestellt, für welche kein Zusammenhang zu PAI-1 gezeigt werden konnte.



**Abbildung 4-17 Expressionslevel der im PAI-1/Akt-Signalweg involvierten Proteine.** An Hand von zehn repräsentativen Fällen ist gezeigt, dass es eine Verknüpfung der Expressionshöhen von PAI-1, p-Akt, Fak, Ilk, PI3K und Rock auch bei einzelnen Patienten gibt, während die Expressionshöhe von nicht involvierten Proteinen wie p-Erk keinen Zusammenhang vermuten lässt. Bis auf für Fall 73 wurden die Schwankungen der Expressionshöhen nach den im Text erläuterten Kriterien als tolerierbar eingestuft.

Auf Grundlage der RPPA-Daten wurde darüber hinaus je ein die oben erwähnten Proteine (PAI-1, p-Akt, Fak, Ilk, PI3K, Rock) hoch (#9) bzw. niedrig (#12) exprimierender Fall für eine Western Blot Analyse ausgewählt. Diese bestätigte erneut den postulierten

Zusammenhang von PAI-1 mit den PI3K/Akt-assoziierten Proteinen. Kein Zusammenhang konnte dagegen für PAI-1 und p-Erk oder Aktin nachgewiesen werden (Abbildung 4-18).



**Abbildung 4-18 Western Blot Analyse gegen PAI-1 und PAI-1 assoziierte Proteine sowie p-Erk und Aktin.** Es wurden je 25 µg einer PAI-1-positiven Mammakarzinomprobe sowie einer PAI-1 gering exprimierender Proben aufgetragen. Die Expression von p-Akt, FAK, Ilk, PI3K und Rock verhielt sich ähnlich der PAI-1 Expression, während für p-Erk und Aktin kein Zusammenhang erkennbar war.

+Sowohl die Daten der Korrelationsanalyse, als auch die Untersuchung der Expression der Proteine in einzelnen Tumoren mit RPPA und Western Blot legen somit eine Assoziation der PAI-1-Expression und der Expression der Proteine des Akt/PI3K-Signalwegs nahe.

## 4.5 Expressionsvergleich zwischen Primärtumor und korrespondierender Lymphknotenmetastase des Mammakarzinom

Für eine erfolgreiche Tumorthherapie ist es nicht nur wichtig, den Primärtumor anzugreifen und zu entfernen, sondern vor allem auch eventuell unentdeckte Metastasen zu erreichen. Dieser Aspekt wird bis heute bei vielen Tumorbehandlungen vernachlässigt. Gerade bei zielgerichteten Antikörpertherapien stützt sich die Therapieentscheidung nur auf die Expression eines entscheidenden Proteins im Primärtumor. Für das Mammakarzinom gibt es im Moment fünf klinisch relevante Markerproteine: HER2, ERα, PR, uPA und PAI-1. Daher soll im Folgenden geklärt werden, wie sich die Expression dieser Proteine zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen unterscheidet. Die Entscheidung für Lymphknotenmetastasen hat zwei Gründe. Erstens führt der Weg einer entstehenden Fernmetastase des Mammakarzinoms meist über die brustnahen, axillären Lymphknoten, so dass Lymphknotenmetastasen als Ursprung aller Metastasen gesehen werden können. Und zweites war die Anzahl an Metastasen, die für die Analyse zur Verfügung standen

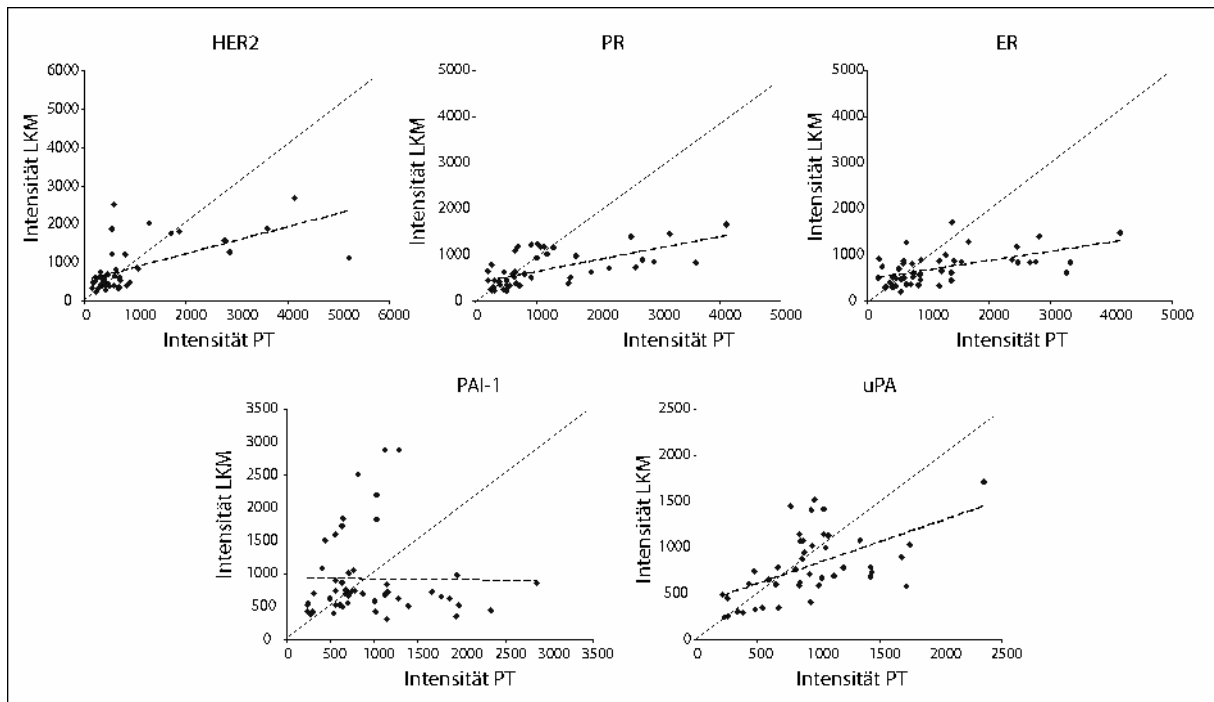
deutlich größer, als bei der Verwendung von Fernmetastasen. So konnten für 52 Patienten des oben erwähnten Mammakarzinomkollektivs Primärtumor/Lymphknotenmetastasen Paare gebildet werden.

In einem ersten Schritt sollte bestimmt werden, ob es für die fünf klinisch relevanten Proteine einen linearen Zusammenhang zwischen Lymphknotenmetastase und Primärtumor gibt. Dazu wurden für die insgesamt 104 Gewebeproben Gesamtproteinlysate gewonnen, gemeinsam als ein Array gedruckt und mit Antikörpern gegen die fünf erwähnten Proteine inkubiert. Die so bestimmten Expressionshöhen wurden für jedes Protein zwischen Metastase und Primärtumor nach Spearman korreliert. Wie aus Tabelle 4-6 und Abbildung 4-19 ersichtlich, konnte für alle Proteine außer für PAI-1 eine Korrelation zwischen den beiden Entitäten nachgewiesen werden.

**Tabelle 4-6 Beschreibung der Korrelation der Expressionshöhen der fünf klinisch relevanten Markerproteine, HER2, ER $\alpha$ , PR, uPA und PAI-1, im Vergleich von Lymphknotenmetastasen (LKM) und Primärtumor (PT)** durch den Spearman Korrelationskoeffizient  $r_s$  sowie die nach Bonferroni angepassten p-Werte. Signifikante Korrelationen ( $p < 0,05$ ) sind grau unterlegt.

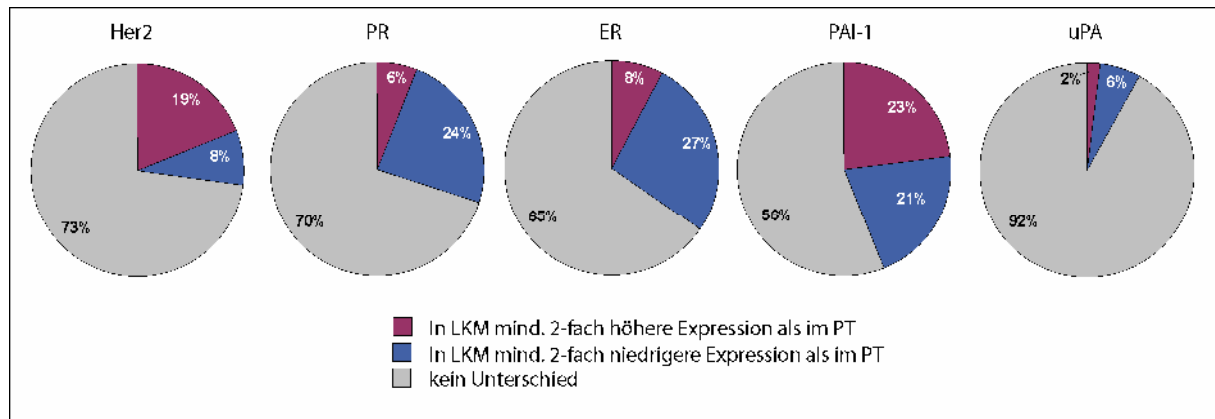
LKM vs. PT	$r_s$	$p$
HER2	0,626	0,000
PR	0,680	0,000
ER $\alpha$	0,608	0,000
uPA	0,566	0,002
PAI-1	0,173	>0,99

Allerdings haben Korrelationsanalysen den Nachteil, dass sie zwar Auskunft über den linearen Zusammenhang zweier Proben geben, nicht aber über die Unterschiede der Wertehöhen. In diesem Fall bedeutet das, dass Proteine, welche zwischen Lymphknotenmetastase und Primärtumor korrelieren, zwar in beiden Gewebearten in gleichem Maße reguliert werden, aber nicht unbedingt die gleiche Expressionshöhe haben. Dass dies vor allem für PR, ER und PAI-1 der Fall zu sein scheint, wird in Abbildung 4-19 deutlich. Gerade diese Absolutexpression ist aber für die prognostische Relevanz von molekularen Markern besonders von Bedeutung. Bei zielgerichteten Therapieansätzen zum Beispiel können niedrige Expressionshöhen in den Lymphknotenmetastasen ein Ansprechen verhindern.



**Abbildung 4-19 Streudiagramme der Expression von HER2, PR, ER, PAI-1 und uPA in Lymphknotenmetastasen (LKM) und Primärtumoren (PT).** Die mittels RPPA bestimmten Werte der Expression der fünf genannten Proteine wurden jeweils für beide Entitäten gegen einander aufgetragen. Die gestrichelte Linie stellt die Regressionsgerade dar. Die durchgezogene Linie markiert die Winkelhalbierende des ersten Quadranten. Werte unter der Winkelhalbierenden weisen eine höhere Expression im Primärtumor auf, Werte oberhalb eine höhere Expression in den Lymphknoten.

Um diesen Aspekt mit zu berücksichtigen, wurden in einem nächsten Schritt die Unterschiede in den Expressionshöhen zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen verglichen. Dabei wurden Abweichungen ab Faktor 2 als tatsächliche Änderung angesehen. Es zeigte sich, dass die beiden Hormonrezeptoren in etwa jedem vierten Fall (24 % für PR; 27 % für ER $\alpha$ ) im Lymphknoten niedriger waren, während sie nur in 6 % (PR) beziehungsweise 8 % (ER $\alpha$ ) stärker exprimiert waren. Für HER2 stellte sich ein umgekehrtes Bild dar. Es war in 19 % der Fälle im Lymphknoten stärker vertreten und nur in 8 % schwächer. PAI-1 zeigte in etwa der Hälfte alle Fälle mehr als 2-fache Expressionsunterschiede zwischen Lymphknoten und Primärtumor. Für 21 % war die PAI-1 Expression in den Lymphknoten höher, für 24 % im Primärtumor. Im Gegensatz dazu waren für uPA kaum Unterschiede feststellbar (2 % höher im Lymphknoten, 6 % höher im Primärtumor). Eine Veranschaulichung der Daten ist in Abbildung 4-20 gezeigt.



**Abbildung 4-20 Graphische Darstellung der Expressionsunterschiede zwischen Lymphknotenmetastase (LKM) und Primärtumor (PT) für die für das Mammakarzinom klinisch relevanten Proteine HER2, Progesteronrezeptor (PR), Estrogenrezeptor (ER $\alpha$ ), PAI-1 und uPA**

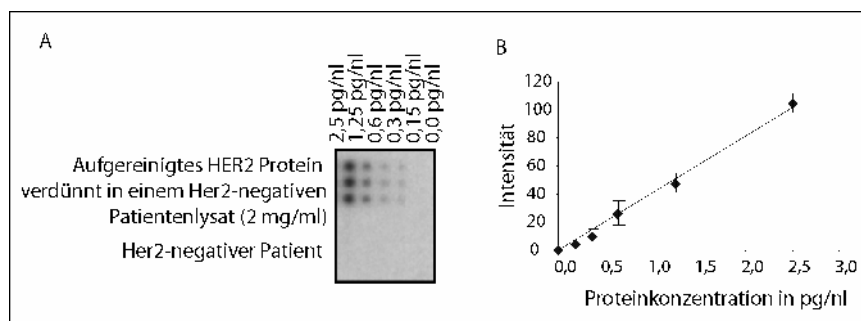
Es bleibt damit festzuhalten, dass keine generelle Aussage über die Regulation der Proteinexpression zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase getroffen werden kann. Vielmehr muss ein möglicher Zusammenhang speziell für jedes Protein untersucht werden.

## 4.6 Untersuchung der Expression der Proteine der HER-Familie im Mammakarzinom

### 4.6.1 Bestimmung des HER2-Status mittels Reverse Phase Protein-Mikroarray

Der HER2-Status wird beim Mammakarzinom im Rahmen der Therapiefindung routinemäßig bestimmt. Patienten mit einem hohen HER2-Status wird eine Therapie mit dem HER2-gerichteten Antikörper Trastuzumab empfohlen. Im Moment werden zur Ermittlung des HER2-Status die Immunhistochemie (IHC) sowie eine indirekte genomische Analyse, die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) verwendet. Beide Verfahren erlauben keine quantitative Bestimmung der Proteinexpressionshöhe. Die Verwendung des RPPA dagegen würde eine solche Quantifizierung ermöglichen und so eine weniger subjektiv beeinflusste Diagnose erlauben. Um die Vergleichbarkeit beider Herangehensweisen zu überprüfen, wurden insgesamt 198 FFPE-Mammakarzinomgewebe mittels RPPA auf ihre HER2 Expressionshöhe untersucht und mit dem in der klinischen Routine über IHC und FISH ermittelten HER2-Status verglichen. Der RPPA ist in der Regel eine semi-quantitative

Methode, bei welcher nur die Proben eines Arrays untereinander verglichen werden können. Um dennoch eine absolute Quantifizierung der HER2-Proteinkonzentration erreichen zu können, wurde zusätzlich zu den Tumorproben eine Verdünnungsreihe des rekombinanten, aufgereinigten HER2 Proteins in Triplikaten auf jeden Array mit aufgetragen und daraus eine Standardkurve erstellt; für eine beispielhafte Darstellung siehe Abbildung 4-21. Da Lysateigenschaften wie der Gesamtproteingehalt der Probe oder die pufferbedingte Viskosität Einfluss auf den Spotting-Prozess haben können, wurde das zunächst lyophilisierte Protein in das Gewebelysate eines HER2-negativen Patienten aufgenommen und verdünnt.

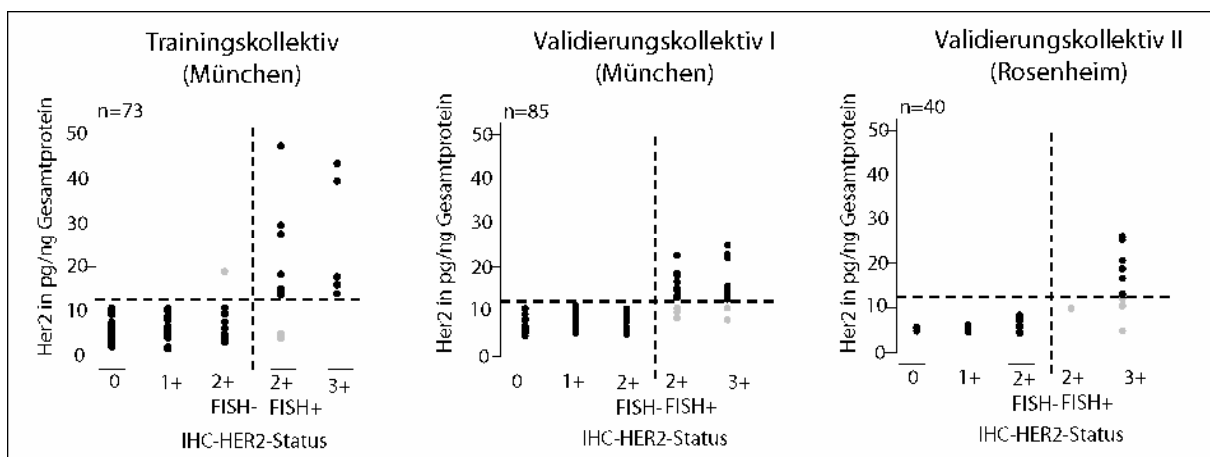


**Abbildung 4-21 Erstellung einer Standardkurve zur quantitativen Bestimmung des HER2 Proteingehalts in Tumorproben.** (A) Rekombinantes HER2 wurde in einer 2-fachen Verdünnungsreihe in Triplikaten aufgetragen. Um bei Bedingungen so nahe wie möglich an den Patientenproben zu arbeiten, wurde das Protein in einem HER2-negativen Patienten verdünnt. (B) Aus den bekannten Konzentrationen und den erhaltenen Intensitäten konnte eine Standardkurve berechnet werden.

Die so erhaltene HER2 Konzentration (in pg/ml) in den verschiedenen Tumorproben wurde nachfolgend auf den jeweiligen Gesamtproteingehalt (ng/ml) normalisiert. Die bestimmten Werte tragen somit die Einheit pg/ng Gesamtprotein und sind auch zwischen verschiedenen Arrays vergleichbar.

Wie unter 3.11.4 näher erläutert, spaltete sich das Kollektiv wie folgt auf: Ein Trainingskollektiv (TK, 73 Patientinnen), ein Validierungskollektiv I (VK-I) bestehend aus 85 Patientinnen des Klinikums rechts der Isar sowie ein Validierungskollektiv (VK-II) mit 40 Patientinnen des Klinikums Rosenheim. Unter Verwendung des Trainingskollektivs wurde ein optimaler Schwellenwert der HER2-Konzentration bestimmt, um HER2-negative (IHC-Status 0, IHC-Status 1 und IHC-Status 2/FISH-) und HER2-positive Tumore (IHC-Status 2/FISH+ und IHC-Status 3) bestmöglich unterscheiden zu können. Dieser Schwellenwert

wurde bei 12 pg HER2 pro ng Gesamtprotein festgelegt (Abbildung 4-22 links). Damit wurde mit der RPPA gestützten Analyse im Vergleich zur IHC/FISH eine Konkordanz von 96 % ( $\kappa = 0,877$ ;  $CI^{95} = 88-99$  %) erreicht. Im Folgenden sollte dieser Wert mit den beiden Validierungskollektiven auf seine Beständigkeit überprüft werden. Die Verwendung von Fällen unterschiedlicher Kliniken sollte eine mögliche, ortspezifische Beschränkung des Schwellenwerts ausschließen. Wie Abbildung 4-22 zeigt, konnte der Schwellenwert in beiden Kollektiven bestätigt werden. Für das VK-I ergab sich zwischen den Werten des RPPA und der Kombination IHC/FISH eine Konkordanz von 92 % ( $\kappa = 0,790$ ;  $CI^{95} = 83-97$  %) für das VK-II eine Konkordanz von 90 % ( $\kappa = 0,783$ ;  $CI^{95} = 76-97$  %). Der RPPA stellt damit eine zuverlässige Methode zur Bestimmung des klinischen HER2-Status dar.



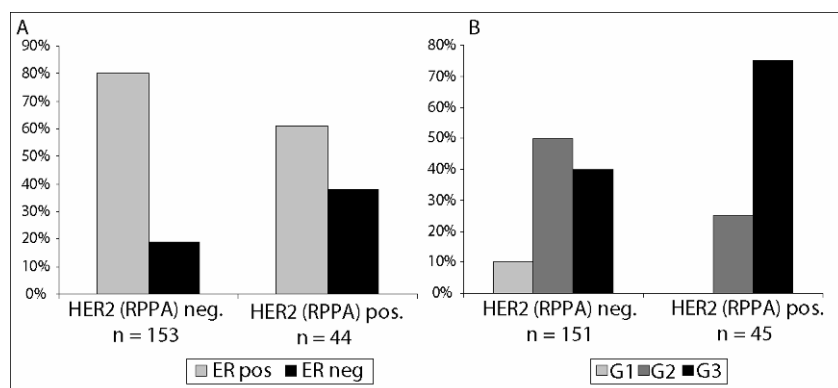
**Abbildung 4-22 Vergleich der HER2 Expressionshöhe bestimmt durch RPPA mit den klinischen Werten (bestimmt über IHC und FISH).** Mittels eines Trainingskollektivs ( $n = 73$ ) wurde für die mit RPPA bestimmten Werte ein Schwellenwert bei 12 pg/ng Gesamtprotein festgelegt. Dieser konnten in zwei Validierungskollektiven (aus München  $n = 85$  und Rosenheim  $n = 40$ ) bestätigt werden. Für nur zwölf der insgesamt 198 Fälle stimmte die Klassifizierung zwischen beiden Methoden nicht überein (grau).

In einem nächsten Schritt sollte der Zusammenhang der RPPA-basierten HER2 Klassifikation mit den bekannten klinischen Parametern (Tumorstatus, Nodalstatus, Grading, Estrogenrezeptorstatus and Progesteronrezeptorstatus) mittels  $\chi^2$ -Test untersucht werden.

**Tabelle 4-7 Zusammenhang des mit RPPA bestimmten HER2-Status mit klinischen Parametern.** Über alle 198 Fälle der drei untersuchten Kollektive (TK, VK-I, VK-II) wurde mittels Chi<sup>2</sup>-Test der Zusammenhang von HER2-Status und den bekannten klinischen Parametern bestimmt. Der Fernmetastasen-Status wurde aufgrund von nur 2 positiven Fällen nicht mit einbezogen. P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet und sind grau hinterlegt.

Klinischer Parameter	p-Wert (Chi <sup>2</sup> )	n (Anzahl Fälle)
Grading	< 0,001	196
Estrogenrezeptorstatus	< 0,001	197
Progesteronrezeptorstatus	0,074	197
Tumorgroße	0,094	197
Nodalstatus	0,489	193

Ein signifikanter Zusammenhang konnte für das Grading und den Estrogenrezeptorstatus ermittelt werden (siehe Tabelle 4-7). Das Grading zeigte dabei eine positive Beziehung zum HER2-Status, während der Estrogenrezeptorstatus sich invers zum HER2-Status verhielt (siehe Abbildung 4-23).



**Abbildung 4-23 Darstellung der gefundenen Zusammenhänge von HER2-Status und Estrogenrezeptorstatus (ER) und Grading (G).** Es ist die Häufigkeitsverteilung des ER-Status (A) bzw. des Gradings (B) vergleichend in HER2-negativen und HER2-positiven Patienten dargestellt. Der HER2-Status verhält sich invers zum ER-Status. Für das Grading gilt dagegen der positive Zusammenhang: Je höher das Grading desto mehr HER2-positive Fälle.

#### 4.6.2 Reanalyse der nicht-übereinstimmenden Fälle

Trotz der guten Übereinstimmung von IHC/FISH und RPPA gab es einige Fälle, die mit den beiden Methoden bezüglich ihres HER2-Status unterschiedlich eingestuft wurden. Dabei ist auffällig, dass nur ein klinisch negativer Fall durch den RPPA als positiv eingestuft wurde, während der umgekehrte Fall über alle drei Kollektive elf Mal eintrat (2x im TK, 5x im VK-I, 4x im VK-II). Um zu klären, ob dies eventuell auf methodische Fehler zurückzuführen ist, wurden elf der zwölf Fälle erneut untersucht. Ein Fall konnte aufgrund



fehlenden Materials nicht reevaluiert werden. Dazu wurden die Proben als ein Array gedruckt, mit einem anti-HER2 Antikörper detektiert und die erhaltenen Signale ausgewertet. Parallel dazu wurden die Fälle nochmals mittels IHC und wenn nötig mittels FISH untersucht und von einem Pathologen bezüglich des HER2-Status verblindet beurteilt. Bezüglich des RPPA-bestimmten HER2-Status traten keine Änderungen auf, während die IHC/FISH Bestimmung in fünf Fällen, darunter auch der vorher negative Fall, zu einem anderen Ergebnis führte und damit mit dem RPPA übereinstimmte (Tabelle 4-8). Dies zeigt, dass etwa die Hälfte der Unstimmigkeiten wohl auf methodische Fehler der IHC/FISH zurückzuführen ist. Die Ursache für die Unterschiede der weiteren sechs Fälle bleibt jedoch zu klären.

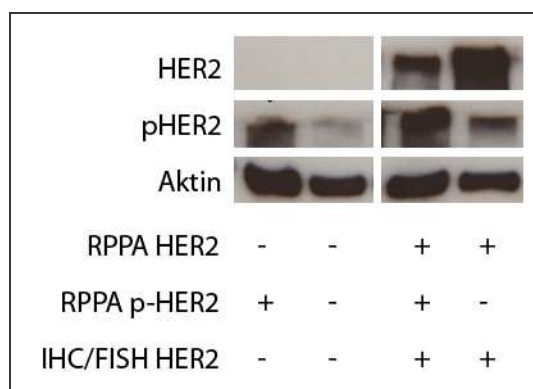
**Tabelle 4-8 Ergebnisse der Reanalyse der nicht übereinstimmenden Fälle.** Elf Fälle, die sich in ihrem HER2-Status zwischen IHC/FISH und RPPA unterschieden, wurden mit beiden Methoden erneut bestimmt. Für fünf der Fälle kam es dabei zu einer Änderung des IHC/FISH-Status (grau).

Fall	Ursprüngliche HER2 Bestimmung		Reanalyse der nicht-übereinstimmenden Fälle	
	IHC/FISH	RPPA	IHC-Status	RPPA
95	3	-	2/FISH-	-
330	3	-	1	-
111	2/FISH+	-	1	-
214	2/FISH+	-	2/FISH-	-
103	2/FISH-	+	2/FISH+	+
127	2/FISH+	-	2/FISH+	-
217	2/FISH+	-	2/FISH+	-
354	2/FISH+	-	2/FISH+	-
275	3	-	2/FISH+	-
336	3	-	2/FISH+	-
356	3	-	2/FISH+	-

#### 4.6.3 Untersuchung des Aktivierungsstatus der HER-Rezeptoren

Über die im Moment in der klinischen Routine verwendeten Methoden IHC und FISH lässt sich zwar die Expressionshöhe sowie eine Genamplifikation des HER2 gut bestimmen, doch ist es nicht möglich den Aktivierungszustand des Rezeptors zu überprüfen. Da in den vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass der RPPA eine verlässliche Methode für die HER2 Expressionsbestimmung darstellt, sollte nun auch den Aktivierungszustand des Rezeptors über diesen Weg ermittelt werden. Dazu wurden 120 Fälle aus den beiden Validierungskollektiven (siehe Abschnitt 3.11.4; fünf Fälle konnten aufgrund fehlenden Materials nicht miteinbezogen werden) mittels RPPA untersucht und die relative Expression des p-HER2<sup>(Tyr1248)</sup> bestimmt. Da keine klinischen Vergleichsdaten zur

Abschätzung des Schwellenwerts für p-HER2 vorliegen, wurde dieser aufgrund von laborinternen Erfahrungswerten bei einer relativen Intensität von 1000 festgelegt. Fälle mit einem Wert über diesem Schwellenwert galten als p-HER2-positiv, Fälle mit einem niedrigeren Wert als p-HER2-negativ. Es stellte sich heraus, dass es nur einen bedingten Zusammenhang von HER2 Expression und Aktivierung in den untersuchten Mammakarzinomen gab. In 81 (67,5 %) Fälle zeigte sich eine Übereinstimmung des Expressionsstatus von HER2 und p-HER2. In 55,8 % der Fälle waren beide negativ, in 11,7 % beide positiv. In 14 (11,7 %) Fällen dagegen konnte eine HER2 Expression nachgewiesen werden, aber keine Aktivierung des Rezeptors. Am Interessantesten ist jedoch die Tatsache, dass in 25 der 120 Fälle (20,8 %) eine p-HER2 Expression nachzuweisen war, jedoch keine HER2-Expression (siehe auch Tabelle 4-9). Zur Bestätigung dieser Resultate ist in Abbildung 4-24 ein Western Blot mit allen vier erwähnten Konstellationen der Expression von HER2 und p-HER2 gezeigt. Am interessantesten ist die Tatsache, dass auch mit dieser Methode eine p-HER2 Expression nachgewiesen werden konnte, obwohl weder mit IHC/FISH noch mit RPPA oder Western Blot eine Amplifikation bzw. Expression von HER2 belegt werden konnte (Abbildung 4-24 links). Anzumerken bleibt noch, dass keiner der HER2-positiven Fälle komplett negativ für p-HER2 war, sondern sowohl im RPPA als auch im Western Blot mindestens ein schwaches Signal zeigte (Abbildung 4-24 rechts).



**Abbildung 4-24 Western Blot Analyse gegen HER2 und p-HER2.** Auf Grundlage der Resultate des RPPA sowie der klinischen HER2 Bestimmung (IHC/FISH) wurden vier Mammakarzinomfälle die folgende Bedingungen erfüllten ausgewählt: HER2-negativ/p-HER2-positiv, HER2-negativ/p-HER2-negativ, HER2-positiv/p-HER2-positiv, HER2-positiv/p-HER2-schwach. Von jeder Probe wurden 25 µg aufgetragen..

In einem nächsten Schritt wurde daher die Aktivierung der Dimerisationspartner von HER2, p-EGFR<sup>(Tyr1086)</sup> und p-HER3<sup>(Tyr1248)</sup>, überprüft. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie schon für

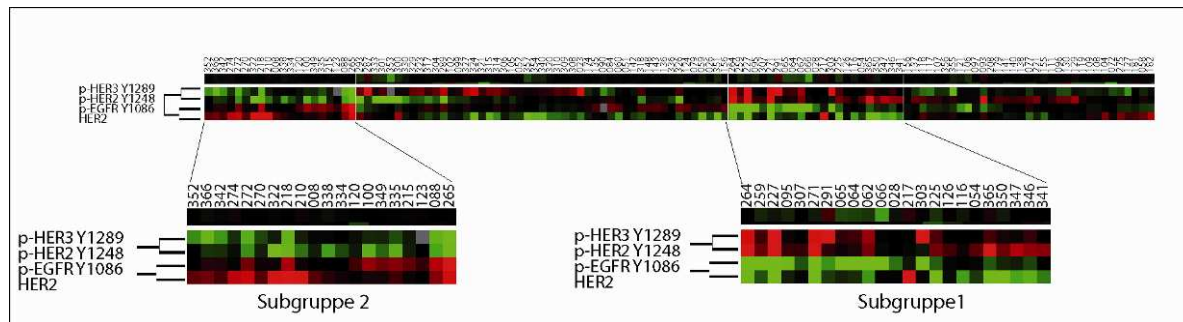
p-HER2. In 11,7 % bzw. 19,2 % konnte eine Aktivierung von p-EGFR bzw. p-HER3 in HER2-negativen Patienten nachgewiesen werden (Tabelle 4-9).

**Tabelle 4-9 Anzahl an phosphorylierten HER Rezeptoren in Bezug auf das HER2 Expressionlevel.**

Auffällig ist, dass trotz detektierter HER2-Negativität 25 der Patienten eine p-HER2 Aktivierung zeigen (grau). Auch die anderen beiden Rezeptoren zeigten in einigen HER2-negativen Patienten eine Aktivierung (grau).

HER2	p-HER2 <sup>(Tyr1248)</sup>		p-EGFR <sup>(Tyr1086)</sup>		p-HER3 <sup>(Tyr1289)</sup>	
	negativ (%)	positiv (%)	negativ (%)	positiv (%)	negativ (%)	positiv (%)
<b>negativ</b>	67 (56)	25 (21)	78 (65)	14 (12)	69 (58)	23 (19)
<b>positiv</b>	14 (12)	14 (12)	12 (10)	16 (13)	8 (7)	20 (17)

Um das erhaltene Aktivitätsprofil der HER-Rezeptoren graphisch darzustellen, wurde eine hierarchische Clusteranalyse verwendet. Diese Art der bioinformatischen Datendarstellung ist hauptsächlich aus der Aufarbeitung von Gen-Arrays bekannt, eignet sich aber auch um die Daten eines RPPA zu veranschaulichen. Die Analyse ordnet dabei die Tumorpatienten nach deren Ähnlichkeit bezüglich der untersuchten Merkmale (hier: Expressionshöhe von HER2, p-HER2, p-EGFR und p-HER3). Ein Vorteil der Methode ist, dass kein Schwellenwert festgelegt werden muss, sondern die kontinuierlichen Daten verwendet werden können. Ein anderer ist die relativ übersichtliche Aufbereitung eines großen Datensatzes. In Abbildung 4-25 sind die relativen Proteinexpressionen in einer so genannten *heat map*, dem Ergebnis der Clusteranalyse, dargestellt. Rot repräsentiert dabei eine im Vergleich aller untersuchten Patienten relativ höhere, grün eine relativ geringere Expression des jeweiligen Proteins.



**Abbildung 4-25 Ergebnis der hierarchische Clusteranalyse dargestellt als *heat map*.** Für die 120 mittels RPPA-Analyse auf HER2, p-HER2, p-EGFR und p-HER3 untersuchten Patienten wurde auf Grundlage einer hierarchischen Clusteranalyse eine *heat map* erstellt. Es fallen deutlich zwei Subgruppen von Patienten auf, welche sich bezüglich ihres HER-Expressionsprofil invers unterscheiden. Subgruppe 1 besteht hauptsächlich aus HER2 und p-EGFR niedrig aber p-HER2 und p-HER3 hoch exprimierenden Patienten, während Subgruppe 2 eine hohe HER2 und p-EGFR Expression aber eine niedrige p-HER2 und p-HER3 Expression aufweist. Farbschlüssel: Rot – im Vergleich aller untersuchten Patienten hoch reguliert; grün – im Vergleich herunter reguliert; schwarz – unverändert.

Bei der Betrachtung der *heat map* lassen sich zwei Subgruppen von Patienten erkennen, die durch folgende Merkmale gekennzeichnet sind: Subgruppe 1 zeigt eine durch den Mann-Whitney-U-Test bestätigte, signifikant niedrigere Expression von HER2 und p-EGFR im Vergleich zu p-HER2 (p-HER2 vs. HER2  $p < 0,001$ ; p-HER2 vs. p-EGFR  $p < 0,001$ ) und p-HER3 (p-HER3 vs. HER2  $p = 0,001$ ; p-HER3 vs. p-EGFR  $p = 0,011$ ), während Subgruppe 2 eine signifikant höhere Expression von HER2 und p-EGFR im Vergleich zu p-HER2 (p-HER2 vs. HER2  $p = 0,001$ ; p-HER2 vs. p-EGFR  $p < 0,001$ ) und p-HER3 (p-HER3 vs. HER2  $p < 0,001$ ; p-HER3 vs. p-EGFR  $p < 0,001$ ) aufweist. Eine Übersicht der Werte ist in Tabelle 4-10 gegeben.

**Tabelle 4-10 Mann-Whitney-U Test zur Bestätigung der in der Clusteranalyse gefundenen zwei Subgruppen.** Subgruppe 1 besteht aus HER2 und p-EGFR niedrig aber p-HER2 und p-HER3 hoch exprimierenden Tumoren, während Subgruppe 2 eine signifikant höhere Expression von HER2 und p-EGFR im Vergleich zu p-HER2 und p-HER3 aufweist.

Subgruppe 1			Subgruppe 2		
<i>p</i> -Wert (Mann-Whitney-U)	HER2 (Median=527)	p-EGFR (Median=523)	<i>p</i> -Wert (Mann-Whitney-U)	HER2 (Median=1755)	p-EGFR (Median=1445)
p-HER2 (Median = 1025)	0,000	0,000	p-HER2 (Median = 1010)	0,001	0,000
p-HER3 (Median = 1414)	0,001	0,011	p-HER3 (Median = 1231)	0,000	0,000

Bezüglich der Zusammensetzung nach den bekannten klinischen Parametern „Größe des Tumors“, „Auftreten von Lymphknotenmetastasen“, „Grading“ und

„Hormonrezeptorstatus“ konnte mittels Chi<sup>2</sup>-Test für keine der beiden Subgruppen ein Unterschied zum Gesamtkollektiv festgestellt werden. Besonders interessant ist, dass die beiden gefundenen Subgruppen, passend zu der durchgeführten Schwellenwertanalyse, bezüglich ihrer HER2 Expression und Aktivierung gegenläufig erscheinen. Die vorliegenden Daten legen somit nahe, dass auch wenn HER2 immunologisch nicht nachweisbar ist, eine Aktivierung des Rezeptors nicht auszuschließen ist. Auf die klinischen Konsequenzen dieser Beobachtung wird in der Diskussion unter 5.7 eingegangen.

#### **4.7 Analyse möglicher Markerproteine beim Adenokarzinom des Ösophagus**

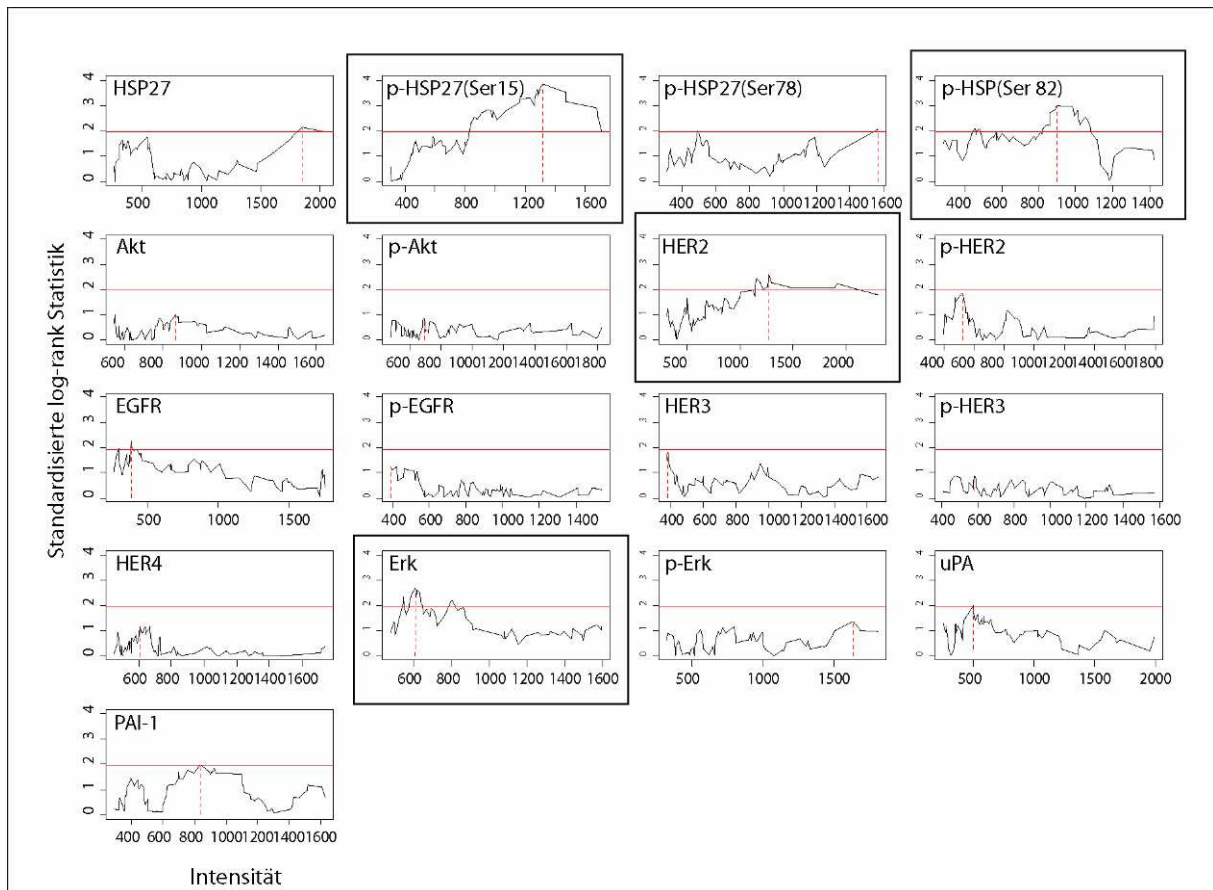
Anders als für das bisher untersuchte Mammakarzinom, hat die Therapie des Ösophagusadenokarzinoms in den letzten Jahren wenig Verbesserung erfahren. Zwar wurden immer wieder Studien zur Etablierung einer Radio- oder Chemotherapie für die Patienten durchgeführt, dennoch ist die operative Entfernung des Tumors bis heute die effektivste Methode sowohl in Bezug auf die Heilungschancen als auch auf die bloße Linderung des Leidens. Diese spärlichen Therapiemöglichkeiten führen, neben der häufig zu späten Entdeckung des Tumors, zu einer niedrigen 5-Jahresüberlebensrate von nur etwa 20 % (Lagergren et al. 2010). Ziel der folgenden Analyse war es deshalb, neue molekulare Marker zu identifizieren, welche sowohl eine detaillierte Prognose ermöglichen als auch die Chancen für eine optimierte, zielgerichtete Therapie erhöhen sollen. Dazu wurden die Expressionshöhen von 17 verschiedenen Proteinen in 87 Formalin-fixierten Ösophagusadenokarzinomproben im RPPA bestimmt. Es wurden sowohl Proteine untersucht, welche generell mit der Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht werden (Akt, p-Akt, Erk, p-Erk, uPA, PAI-1) als auch Proteine, die nach der veröffentlichten Literatur einen möglichen Einfluss bei der Entwicklung des Ösophaguskarzinoms spielen. Dazu gehört der in unserem Institut in den letzten Jahren intensiv erforschte, in Brustkrebs bereits etablierte Marker HER2, welcher auch in Adenokarzinomen des Ösophagus überexprimiert ist (al-Kasspoles et al. 1993; Langer et al. 2011; Langer et al. 2006; Polkowski et al. 1999; Walch et al. 2000; Walch et al. 2001; Walch et al. 2004). HER2 steht in engem Kontakt mit den weiteren Vertretern der HER-Familie (EGFR, HER3, HER4). Daher wurden auch diese sowie ihre aktivierte Zustände (p-EGFR, p-HER2, p-HER3) untersucht. Des Weiteren sollten HSP27 sowie dessen phosphorylierte Formen (p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>,

p-HSP27<sup>(Ser78)</sup>, p-HSP27<sup>(Ser82)</sup> auf Ihre Bedeutung beim Ösophaguskarzinom überprüft werden. Diese Wahl beruhte auf den Ergebnisse von Zhang et al., die zeigen konnten, dass p-HSP27<sup>(Ser82)</sup> im Mammakarzinom mit der HER2-Expression in Zusammenhang steht (Zhang et al. 2007). Darüber hinaus ist auch eine allgemeine Relevanz der HSP im Ösophaguskarzinom bekannt (siehe auch Kapitel 2.5.2).

#### **4.7.1 Schwellenwertanalyse 17 Ösophagus-relevanter Proteine**

Für alle 87 Tumore des unter 3.11.4 beschriebenen Ösophaguskarzinomkollektivs wurden Gesamtproteinlysate aus den klinischen FFPE-Geweben extrahiert. Die Qualität der Extraktion wurde stichprobenartig mittels Western Blot überprüft und als einwandfrei bestätigt. Durch das Drucken der Lysate auf nitrozellulosebeschichtete Glasobjektträger wurde ein Array produziert. Das Kollektiv wurde aus Platzgründen dafür auf je zwei Objektträger aufgeteilt. Im Folgenden wurden die Objektträger mit Antikörpern gegen die oben beschriebenen 17 Proteine inkubiert. Der Gesamtproteingehalt einzelner Proben wurde mittels Sypro-Ruby Färbung auf vier Arrays bestimmt. Der Mittelwert jeder Probe wurde für die Normalisierung der Antikörper-Signale verwendet.

Um die klinische Relevanz der untersuchten Proteine zu evaluieren, untersuchte ich ob einige der Proteine eine prognostische Bedeutung bezüglich des Überlebens der Patienten aufweisen. Dazu wurde für jedes Protein ermittelt, ob es mittels univariatem *log-rank* Test möglich ist einen Schwellenwert zu bestimmen, der Patienten mit besserer Prognose von solchen mit schlechterer Überlebensprognose signifikant ( $p < 0,05$ ) unterscheidet. Es zeigte sich, dass dies für vier Moleküle der Fall war (Abbildung 4-26): HER2 (Schwellenwert bei 1276), p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> (1316), p-HSP27<sup>(Ser82)</sup> (898) und Erk (606).



**Abbildung 4-26 Log-rank Statistik zur Bestimmung optimaler Schwellenwerte der 17 in dieser Studie untersuchten Proteine in Bezug auf das Gesamtüberleben.** 87 Patientenproben wurden mittels RPPA auf die Expression von 17 Proteinen untersucht. Für jedes Protein wurde über alle Patienten mittels log-rank Statistik eine Schwellenwertanalyse durchgeführt. Für vier der Proteine konnte ein signifikanter ( $p < 0,05$  *log-rank*  $> 1,96$ ; rote Linie) Schwellenwert (gestrichelte, rote Linie) bestimmt werden (Umrahmung).

In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die vier gefundenen Marker mit bereits bekannten Markern wie „Größe des Tumors (T)“, „Auftreten von Lymphknotenmetastasen (N)“, „Auftreten von Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Operation (M)“ oder „Grading (G)“ zusammenhängen und somit keine neue Aussagekraft bringen, oder aber ob sie unabhängig von diesen Variablen Aufschluss über den Tumorverlauf geben. Für diesen Zweck wurde für jedes der vier Proteine eine multivariate Cox-Regression mit den oben erwähnten Markern durchgeführt. HER2 und p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> erwiesen sich als von T, N, M und G unabhängige Marker ( $p = 0,017$  bzw.  $p = 0,015$ ) während sich für p-HSP27<sup>(Ser82)</sup> und Erk ein Zusammenhang mit den bekannten Markern zeigte ( $p = 0,055$  bzw.  $p = 0,217$ ). Dies spricht dafür, dass letztere beiden keinen neuen prognostischen Wert bringen. Sie wurden daher nicht weiter untersucht. Für HER2 und p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> wurde abschließend eine multivariate Cox-Regressionsanalyse beider



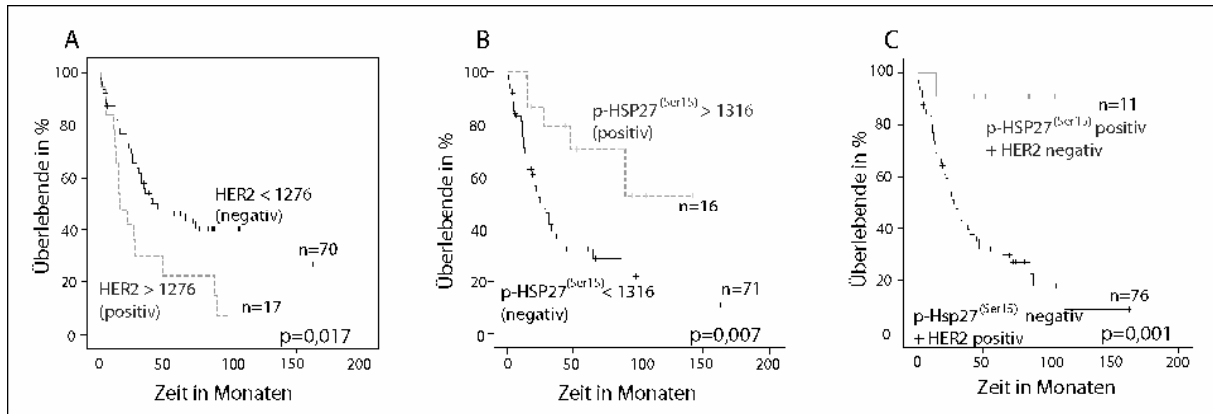
Proteine gemeinsam mit den vier etablierten Markern durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4-11 zu sehen und zeigt, dass auch HER2 und p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> voneinander unabhängige Marker darstellen.

**Tabelle 4-11 Ergebnisse der multivariate Cox-Regression.** p-HSP27 und HER2 sind von einander sowie von den etablierten Markern der TNM-Klassifikation und dem Grading unabhängig und bringen somit zusätzliche prognostische Information für das Ösophaguskarzinom.

	Koeff	hazard ratio	95 %-CI der hazard ratio*		p-Wert
			unteres	oberes	
HSP27Ser15 neg vs. pos <sup>†</sup>	1,5029	4,49	1,35	15,00	0,0145
HER2 pos <sup>#</sup> vs. neg	0,6757	1,97	1,01	3,82	0,0465
T2 vs. T1	1,0864	2,96	1,02	8,60	0,0457
T3 vs. T1	0,8143	2,26	0,77	6,63	0,1387
N1 vs. N0	0,7399	2,10	0,89	4,92	0,0894
M1 vs. M0	0,5089	1,66	0,67	4,13	0,2727
G3 vs. G2	-0,3688	0,69	0,38	1,26	0,2295

Darüber hinaus zeigt die *hazard ratio*, welche vereinfacht gesprochen das Verhältnis der Sterberisiken der beiden Gruppen darstellt, dass p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>-positive Patienten im Beobachtungszeitraum (3-162 Monate) ein 4,5-fach niedrigeres Sterberisiko haben als negative Patienten. Wo hingegen HER2-positive Patienten ein 2-fach höheres Sterberisiko zeigen als solche mit negativem HER2-Status. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4-27 graphisch durch Kaplan-Meier Überlebenskurven dargestellt. Dabei bestätigte sich, dass HER2-positive Patienten mit  $p = 0,017$  (*log-rank* Test) eine signifikant schlechtere Prognose haben als HER2-negative (Abbildung 4-27 A). Patienten mit einem positiven p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>-Status haben dagegen deutlich bessere Überlebenschancen als Patienten mit negativem Status ( $p = 0,007$ ; Abbildung 4-27 B).



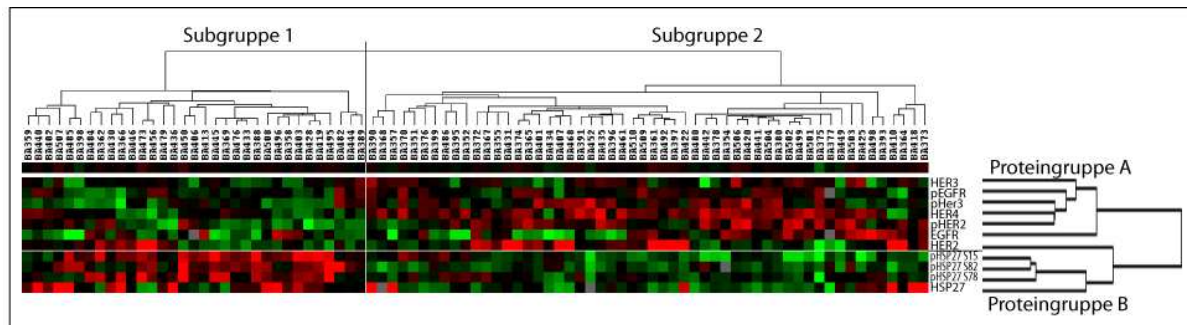


**Abbildung 4-27 Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben** von Patienten mit (A) HER2- negativem vs. HER2-positivem Expressionsstatus, mit (B) p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>-negativem vs. p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>-positivem Expressionsstatus sowie (C) mit der Kombination der beiden Marker.

Durch die Kombination beider Marker lässt sich die prognostische Bedeutung der beiden Proteine sogar noch erhöhen ( $p = 0,001$  siehe Abbildung 4-27 C). Zwar bleibt zu beachten, dass nur noch elf Personen der Patientengruppe mit guter Langzeitprognose zuzuordnen sind, andererseits ist die Prognose für diese Gruppe besonders viel versprechend, mit nur einem Todesfall unter elf Patienten.

#### **4.7.2 Hierarchische Clusteranalyse in Bezug auf Proteine der HER-Familie sowie auf HSP27 und dessen Phosphorylierungen**

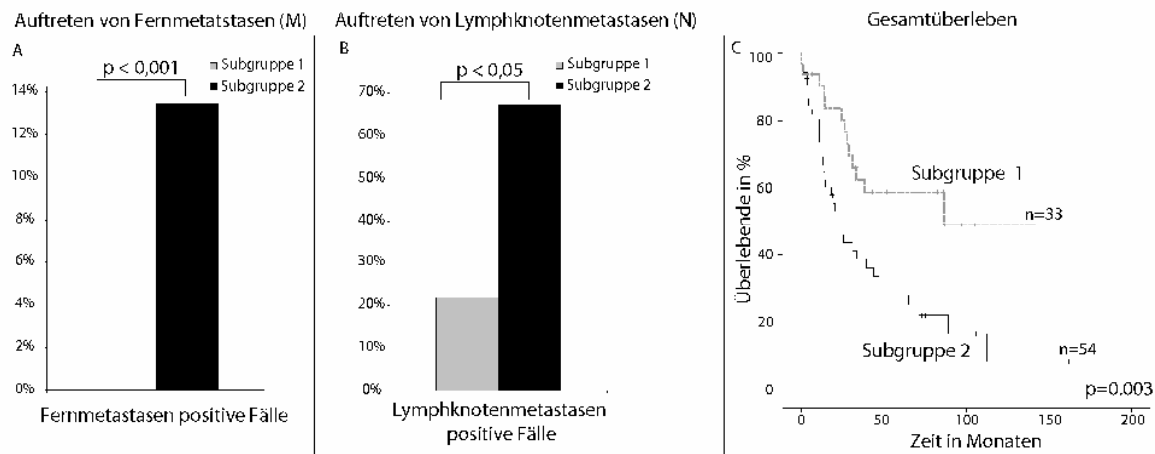
Aufgrund der gewonnenen Erkenntnis über die prognostische Relevanz von HER2 und p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> im Ösophaguskarzinom wurde in einem nächsten Schritt der Zusammenhang der beiden Proteine sowie der anderen Vertreter beider Gruppen (EGFR, HER3, HER4, p-EGFR, p-HER2, p-HER3, HSP27, p-HSP27<sup>(Ser78)</sup>, p-HSP27<sup>(Ser82)</sup>) mittels hierarchischer Clusteranalyse analysiert. Wie schon unter 4.6.3 näher erläutert, werden bei diesem Verfahren kontinuierliche Daten verwendet. Dies ermöglichte eine Überprüfung der zuvor gewonnenen Erkenntnis ohne Einbeziehung des Schwellenwerts. In Abbildung 4-28 ist das Ergebnis der Clusteranalyse in Form einer so genannten *heat map* dargestellt. Rot repräsentiert dabei eine im Vergleich zu allen untersuchten Patienten relativ höhere, grün eine relativ geringere Expression des jeweiligen Proteins.



**Abbildung 4-28 Hierarchische Clusteranalyse von 87 Ösophaguskarzinomen in Bezug auf Proteine der HER-Familie sowie auf HSP27 und dessen phosphorylierte Formen, dargestellt als *heat map*.** Durch die Clusteranalyse konnte das Kollektiv in zwei Subgruppen unterteilt werden. Subgruppe 1 mit einer höheren Expression der HSP27-Gruppe und einer niedrigeren Expression der Proteine der HER-Familie und Subgruppe 2, welche sich aus Patienten mit einer erhöhten Expression der HER-Familie und einer verringerten Expression an den untersuchten Molekülen der HSP27-Gruppe zusammensetzt. Farbschlüssel: Rot – im Vergleich hoch reguliert; grün – im Vergleich herunter reguliert; schwarz – unverändert.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass sich das Kollektiv bezüglich der untersuchten Moleküle in zwei Subgruppen teilt. Subgruppe 1, weist eine durch den Mann-Whitney-U-Test bestätigte, signifikant höhere Expression der HSP27-Gruppe gegenüber der HER-Familie auf ( $p\text{-HSP27}^{\text{(Ser15)}}$  vs. HER2  $p = 0,001$ ). Subgruppe 2 besteht vermehrt aus Patienten mit einer signifikant erhöhten Expression der Proteine der HER-Familie aber einer verringerten Expression der untersuchten Moleküle der HSP27-Gruppe ( $p\text{-HSP27}^{\text{(Ser15)}}$  vs. HER2  $p = 0,039$ ). Beide Subgruppen verhalten sich somit in ihrer Expression der untersuchten Proteine invers. In Klammern sind beispielhaft die Vergleiche der prognostisch relevanten Proteine  $p\text{-HSP27}^{\text{(Ser15)}}$  und HER2 angegeben.

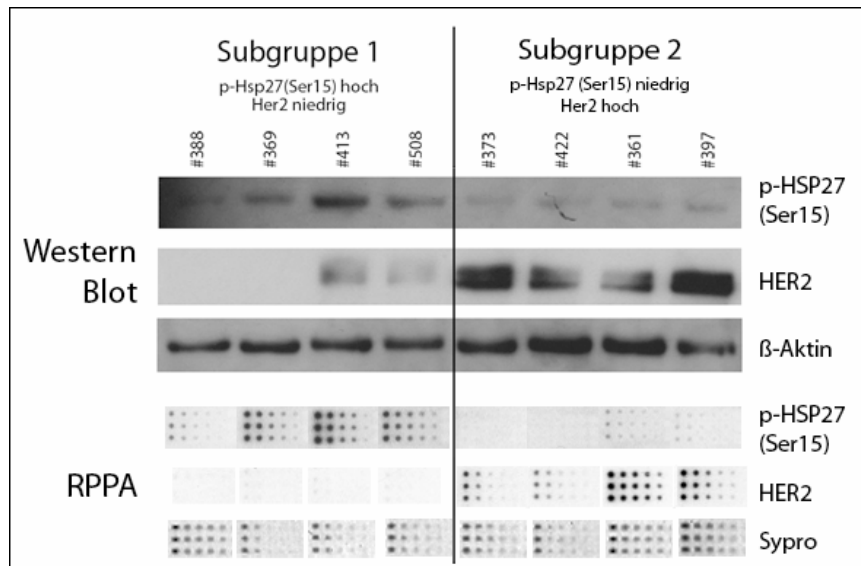
Vergleicht man beide Subgruppen bezüglich der für das Ösophaguskarzinom relevanten klinischen Parameter, so wird deutlich, dass Subgruppe 2 signifikant mehr Fernmetastasen (M) positive (15 % vs. 0 %,  $p = 0,020$  ( $\text{Chi}^2$ )) sowie mehr Lymphknotenmetastasen (N) positive Fälle (67 % vs. 21 %,  $p < 0,001$  ( $\text{Chi}^2$ )) enthält (siehe Abbildung 4-29 A und B).



**Abbildung 4-29 Veranschaulichung der gefundenen Unterschiede in der Zusammensetzung der Subgruppen.** Subgruppe 1 (HER-Familie niedrig, HSP27-Gruppe hoch) setzte sich aus deutlich weniger Fernmetastasen positiven (A) und Lymphknoten positiven (B) Fällen zusammen als Subgruppe 2 und zeigte passend zu dieser Beobachtung das bessere Gesamtüberleben (C).

Für die weiteren untersuchten Parameter „Größe des Tumors“ (T), „Grading“ (G), Alter und Geschlecht konnten keine Unterschiede zwischen den Subgruppen festgestellt werden. Passend zu dieser Verteilung war auch die Prognose der verstärkt Metastase-positiven Subgruppe 2 deutlich schlechter als die von Subgruppe 1 (siehe Abbildung 4-29 C). Darüber hinaus erhärten diese durch die Clusteranalyse gewonnenen Erkenntnisse jene der Schwellenwertanalyse, welche ein besseres Überleben für p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>-positive und HER2-negative Patienten anzeigte.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde abschließend eine Western Blot Analyse der Expression von p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> und HER2 mit je vier Fällen beider Cluster durchgeführt.



**Abbildung 4-30 Western Blot Analyse zur Überprüfung der p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> und HER2-Expression in den zwei ermittelten Subgruppen des Ösophaguskarzinoms.** Aus jeder Subgruppe wurden vier Patienten auf deren p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> und HER2-Expressionshöhe untersucht. Die vorherigen Ergebnisse bestätigend zeigte sich ein inverses Verhalten der beiden Proteine. Vergleichend werden auch die Ergebnisse des RPPA gezeigt.

Wie aus Abbildung 4-30 ersichtlich, konnte die inverse Expression der beiden Moleküle in den untersuchten Patienten belegt werden. Darüber hinaus bleibt festzuhalten, dass alle vier Fälle der Subgruppe 1 eine überdurchschnittliche Überlebensdauer (> 33 Monate) aufwiesen, während alle vier Patienten der Subgruppe 2 in den ersten zwei Jahre nach der Diagnose verstarben. Sowohl die prognostische Relevanz als auch die in vielen Patienten gegensinnige Expression beider Proteine konnte somit durch verschiedene Herangehensweisen bestätigt werden.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Verbesserte Proteinextraktion aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben

Die personalisierte Therapie und die damit verbundene molekulare Medizin nehmen insbesondere in der Krebsdiagnostik eine immer wichtigere Rolle ein. Um die in der Forschung erzielten Fortschritte für den Patienten nutzbar machen zu können, besteht ein großer Bedarf an molekularen Analysemethoden, die in die Krankenhausroutine integrierbar sind. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung war die Etablierung der Extraktion von Proteinen aus Formalin-fixierten Geweben. Dies vereinfacht die Analyse von Markerproteinen in der klinischen Routine und öffnet darüber hinaus Gewebesammlungen von Pathologien aus aller Welt für proteinbasierte retrospektive Studien (Becker 2008; Chung 2008). Trotz des hohen Potentials der Methode und der bisher erzielten Erfolge, muss darauf hingewiesen werden, dass die veröffentlichten Protokolle Probleme wie Proteinaggregation oder geringe Proteinausbeute noch nicht zufrieden stellend gelöst haben (Chu et al. 2005). Durch die in dieser Arbeit verbesserten Extraktionsbedingungen konnten einige der Limitierungen minimiert werden.

#### 5.1.1 Vorteile des Extraktionspuffers LMA

##### *β-Mercaptoethanol und Arginin als wichtige Pufferkomponenten*

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer verbesserten Pufferzusammensetzung, diente der von unserer Gruppe 2006 zum Patent angemeldete Puffer EB (Becker et al. 2006). Dieser besteht aus einer 1:2 Mischung des kommerziell erhältlichen Puffers T-Per (Pierce) mit Lämmli-Puffer. Da auch die Verwendung von 1-fach Lämmli-Puffer gute Resultate erzielte (Nirmalan et al. 2009), sollte zunächst die Notwendigkeit des Zusatzes von T-Per überprüft werden. Das Ergebnis zeigte, dass unter Verwendung von reinem Lämmli-Puffer bei gleich bleibender Proteinqualität unabhängig vom Gewebetyp eine bessere Ausbeute erzielt werden konnte. Dies deckt sich mit den in den letzten Jahren veröffentlichten Pufferzusammensetzungen (Addis et al. 2009; Chung 2008; Shi et al. 2006), aus welchen hervorgeht, dass die entscheidenden Bestandteile für eine effektive Extraktion eine hohe SDS- sowie eine hohe Reduktionsmittelkonzentration sind.

Eine eindeutige Aussage welches Reduktionsmittel die besten Resultate erzielt, lässt sich allerdings aus den bisherigen Veröffentlichungen nicht ableiten. Sowohl unter Verwendung von Puffern mit Dithiothreitol als auch mit  $\beta$ -Mercaptoethanol konnten gute Extraktionsergebnisse erzielt werden. Ein direkter Vergleich wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. Da die Verwendung von Dithiothreitol anstelle des giftigeren  $\beta$ -Mercaptoethanols die Handhabung des Puffers erleichtern würde, wurde die Effektivität beider Substanzen überprüft. Es stellte sich heraus, dass der dithiothreitolhaltige Puffer LDA (Lämmli mit DTT und Arginin, siehe auch 3.1.4) im Vergleich zum entsprechenden  $\beta$ -mercaptoethanolhaltigen Puffer LMA (Lämmli mit Arginin) etwas schlechtere Ausbeuten zeigte. Im Weiteren wurde daher  $\beta$ -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel verwendet.

Ein weiterer getesteter Faktor war die Zugabe von Arginin. Arginin ist ein bekanntes Hilfsmittel, um thermische Aggregation zu verhindern (Arakawa et al. 2003; Ejima et al. 2005), auch wenn der Mechanismus dieses Prozesses nicht vollständig geklärt ist (Das et al. 2007; Lyutova et al. 2007). Proteinaggregation, vor allem großer Proteine, ist ein häufiges Problem bei der Extraktion aus FFPE-Geweben. Dies kann einerseits der vorliegenden Vernetzung der Proteine durch Formalin zugerechnet werden, andererseits aber auch den hohen Temperaturen (80 – 100 °C), die zur Extraktion nötig sind. Daher sollte überprüft werden, ob eine Zugabe der Aminosäure Arginin zu verbesserten Resultaten führt. Die Gesamtproteinanalyse ließ nur einen schwachen Trend zu einer höheren Ausbeute bei Verwendung eines argininhaltigen Puffers erkennen. In der anschließend durchgeführten Western Blot Analyse wurden jedoch deutlich stärkere Signale für die argininhaltigen Lysate beobachtet. Dies lässt die Vermutung zu, dass Arginin zwar keinen Einfluss auf die Extraktionsmenge, wohl aber auf den Zustand der Proteine hat. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass die Argininzugabe die Proteine vor Abbau schützt. Denn die Bradford-Gesamtproteinmessung, welche Peptide und Proteine ab einer Länge von drei Aminosäuren nachweist (Compton et al. 1985), würde auch bei teilweisem Proteinabbau hohe Signale erzeugen. Gegen diese Theorie spricht jedoch, dass im Western Blot keine Abbauprodukte in Form multipler Banden detektiert werden konnten. Wahrscheinlicher ist daher, dass Arginin wie in der Literatur beschrieben die Aggregation der Proteine verhindert. Dies würde ebenfalls in beiden Fällen zu einem ähnlichen Bradford-Ergebnis beider Ansätze führen. Viele der Proteine die sonst durch die Aggregation nicht in das Gel einwandern wären dann im Western Blot detektierbar. In

diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass Arginin als basische Aminosäure zwar ein Bindungspartner des Bradfordfarbstoffs Coomassie Blau ist, allerdings nicht als Einzelmolekül sondern nur im Verbund mit anderen Aminosäuren (Compton et al. 1985). Eine Verfälschung des Messergebnisses durch die Zugabe der Aminosäure ist daher auszuschließen. Dies konnte auch durch die mitgeführte Pufferkontrolle bestätigt werden.

#### Nutzen von LMA bei der Extraktion von Gewebeproben aus der klinischen Routine

Der allgemein anerkannte, größte Vorteil der Möglichkeit der Proteinextraktion aus FFPE-Geweben ist, dass die bisher für die Proteinanalyse so gut wie verschlossenen, klinischen Gewebesammlungen nutzbar werden. Trotzdem gibt es bisher keine Studie, die sich mit den Tücken der Verwendung dieser Proben näher beschäftigt hat. Eine Schwierigkeit ist dabei zum Beispiel, dass man keine genaue Information über die Fixierungsdauer der Proben hat und oft auch auf ältere Gewebeblöcke zurückgreifen möchte. Bisher hat keine Studie den Einfluss dieser beiden Faktoren auf die Proteinextraktion untersucht.

Während der Optimierungsversuche des Extraktionspuffers fiel auf, dass der Puffer LMA zwar grundsätzlich die besten Resultate brachte, dieser Vorsprung sich aber im Besonderen bei länger gelagerten Fällen zeigte. Da aus älteren Gewebeproben häufig sehr geringen Proteinausbeuten erhalten werden, würde dies die Extraktion solcher Proben deutlich verbessern. Durch eine systematische Überprüfung der Vermutung an Hand von drei 20 Jahre alten Proben sowie drei Proben aus dem Jahr 2010 konnte der Einfluss auf die Proteinausbeute bestätigt werden. Unter Verwendung von LMA an Stelle von EB konnte aus den 20 Jahre alten Proben etwa doppelt soviel Protein erhalten werden. Bei den jüngeren Proben lag der Unterschied nur noch bei 25 %. Unabhängig von der Pufferwahl war aus den älteren Proben jedoch eine deutlich niedrigere Ausbeute zu beobachten als aus den kurz gelagerten Blöcken. Zwar erscheint dieser Effekt auf die Proteinausbeute einleuchtend, dennoch sollte erwähnt werden, dass die Lagerungszeit keinen Einfluss auf die Extraktion von RNA aus FFPE-Geweben hat (Specht et al. 2001).

Über die Extraktion von RNA aus FFPE-Geweben ist ebenfalls bekannt, dass eine Überfixierung des Gewebes zu Problemen führen kann, vor allem wenn die Fixierungszeit 24 Stunden überschreitet (Bhudevi et al. 2003; Bresters et al. 1994; Macabeo-Ong et al. 2002). Diese Sachlage ist auch für die Extraktion von Proteinen bekannt, allerdings deutlich

weniger untersucht. Aufgrund des positiven Einflusses des Puffers LMA auf die Proteinausbeute bei älteren Fällen sollte daher auch dessen Nutzen bei überfixierten Proben überprüft werden. Im Vergleich der beiden Puffer EB und LMA zeigte sich ein Trend zu höheren Ausbeuten unter Verwendung des neuen Puffers LMA bei Zunahme der Fixierungszeit. Der Unterschied zwischen den beiden Puffern wurde vor allem im Western Blot sichtbar. Hier verringerte sich das Signal in den EB-extrahierten Proben mit Zunahme der Fixierungszeit deutlich, während in den mit LMA extrahierten Proben bis zur längsten Fixierungszeit (144 Stunden) ein deutliches Signal zu erkennen blieb. Dies ist von großer Relevanz, da die Fixierungsdauer in der klinischen Routine starken Schwankungen unterliegt und beispielsweise kurz vor dem Wochenende eintreffende Proben oft länger fixiert werden als nötig. Die Verwendung von LMA ermöglicht es jedoch, klinische Proben unabhängig von der Fixierung oder Lagerungsdauer für die Proteinextraktion zugänglich zu machen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt, um weltweite Archive zugänglich zu machen, ist die Reproduzierbarkeit der Resultate - unabhängig vom Klinikum. Hierfür wurde in dieser Arbeit mit dem in Triplikaten durchgeführten Vergleich der Extraktion von Proben des Klinikums rechts der Isar sowie des Klinikums Rosenheim ein erster Schritt gemacht. Um die bisher erzielten, viel versprechenden Ergebnisse zu bestätigen, ist es weiterhin nötig, auch Gewebe weiter entfernter Klinikzentren zu untersuchen. Dennoch kann man aufgrund der hier vorgelegten Daten davon ausgehen, dass die Extraktion aus FFPE-Geweben eine schnelle Verbreitung erfahren wird und so die weltweiten FFPE-Gewebearchive für Forschungszwecke verwendet werden können.

#### Verwendung von LMA für Extraktionen aus Gefriergewebe

Ein weiterer interessanter Aspekt der Etablierung war die Beurteilung der Eignung von LMA zum Vergleich von Stickstoff-konserviertem und Formalin-fixiertem Gewebe. Da Stickstoff-konserviertes Gewebe noch immer der „Goldstandard“ zur Proteinanalyse ist, ist es häufig ratsam Lysate aus FFPE-Geweben mit jenen aus Gefriermaterial zu vergleichen. Um ähnliche Gesamtproteinzusammensetzungen für Lysate aus beiden Gewebetypen zu gewährleisten, sollte die Verwendbarkeit von LMA zur Extraktion aus Gefriergewebe überprüft werden. Bedenken, dass der relativ aggressive Puffer zu Problemen bei der Extraktion aus Gefriergewebe führt, konnten nicht bestätigt werden. Die Proteinausbeuten



aus Stickstoff-konserviertem Gewebe waren in allen Fällen mindestens so hoch wie mit einem kommerziellen Extraktionspuffer für Gefriergewebe und auch bei der Proteinqualität konnte kein Unterschied beobachtet werden. Der Puffer kann daher bedenkenlos für eine Extraktion aus Gefriergewebe verwendet werden.

### **5.1.2 Optimierte Extraktionsbedingungen**

Wie oben erwähnt, spielt bei der Proteinextraktion aus FFPE-Geweben neben der Wahl eines geeigneten Extraktionspuffers die richtige Temperatur eine entscheidende Rolle. Die Ausgangslage meiner diesbezüglichen Optimierungsversuche bildete erneut das in unserer Arbeitsgruppe zum Patent angemeldete Protokoll. Es gibt vor, die Gewebe zunächst 15 Minuten bei 100 °C aufzukochen und anschließend 2 Stunden bei 80 °C zu inkubieren. Aus der Literatur ergab sich allerdings der Hinweis, dass der zweite Inkubationsschritt möglicherweise nicht erforderlich ist und so deutlich Zeit eingespart werden kann (Chu et al. 2005; Chung 2008; Nirmalan et al. 2009). Die Überprüfung dieses verkürzten Protokolls zeigte jedoch, dass es mit diesem zwar möglich ist Proteine zu extrahieren, die Ausbeuten jedoch deutlich niedriger sind. Eine Durchführung des 80 °C Schritts wird daher weiterhin empfohlen.

Auch die Dauer des 100 °C Kochschritts wurde im Zuge der Etablierung des neuen Extraktionsprotokolls überprüft. Dabei stellte sich sowohl die Frage ob eventuelle auch eine verkürzte Kochzeit genügt und die Proteine somit kürzer den hohen Temperaturen ausgesetzt sind, als auch ob eine Verlängerung zu noch höheren Ausbeuten führt. Von den drei in dieser Arbeit untersuchten Zeiten (10, 15 und 20 Minuten) konnte in drei von vier Versuchen nach 20 Minuten die größte Ausbeute erzielt werden. Nicht veröffentlichte, laborinterne Versuche anderer Gruppenmitglieder haben darüber hinaus ergeben, dass eine Verlängerung der Kochzeit auf 40 Minuten zwar keine im Western Blot spürbaren negativen Auswirkungen auf die Proteinqualität aber auch keine deutliche Erhöhung der gewonnenen Proteinmenge zu Folge hat. Aus diesem Grund wird eine Kochzeit von 20 Minuten als optimal angesehen.

Zusammenfassend lässt sich anfügen, dass das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll einen günstigen, effektiven und einfach handhabbaren Weg für die Proteinextraktion aus FFPE-

Geweben darstellt. Im Vergleich zu dem vorher verwendeten Puffer EB oder anderen publizierten Protokollen (Chu et al. 2005) ist keine Verwendung kommerzieller Lösungen nötig. Darüber hinaus können mit den hier vorgestellten Bedingungen hohe Gesamtproteinkonzentrationen von bis zu 6 mg/ml erreicht werden. Eine Ausbeute die bisher noch mit keinem anderen Protokoll erreicht werden konnte.

## **5.2 Stärken und Schwächen des Reverse Phase Protein-Mikroarrays**

Während des letzten Jahrzehnts wurden große Fortschritte gemacht, Krankheiten mit ihren molekularen Ursachen zu verknüpfen. Ein Vorreiter auf diesem Gebiet ist die Tumordiagnostik. In diesem Bereich wurde und wird bis heute intensiv daran gearbeitet zu klären, wie die Deregulierung von Signalwegen zur Entstehung von Tumorerkrankungen führen kann (Blume-Jensen et al. 2001). Ein ganzheitliches Verständnis über den Informationsfluss in den Signalnetzwerken einer Zelle ist jedoch aufgrund der hohen Komplexität noch nicht erreicht worden. Dieses Wissen würde die Möglichkeit eröffnen, gezielter in die Signaltransduktion einzugreifen und so therapeutischen Fortschritt zu erreichen. Durch die Möglichkeit einer parallelen Analyse des Expressions- als auch des Aktivierungsstatus einer großen Anzahl an Proteinen in einer Vielzahl an Proben, ist der Reverse Phase Protein-Mikroarray (RPPA) eine der vorteilhaftesten Methode zu diesem Zweck (Sheehan et al. 2005; Voshol et al. 2009). Die Kombination des RPPA mit der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Proteinextraktion aus klinischen FFPE-Geweben erhöht das Potenzial der Methode weiter. Damit ist es erstens möglich mit der Art von Gewebe zu arbeiten, die für therapeutische Entscheidungen verwendet wird und zweitens auf große, jahrzehntelang gesammelte Archive zugreifen zu können.

### **5.2.1 Antikörpervalidierung**

Die größte Einschränkung des RPPA ist, wie bei vielen immunologischen Verfahren, die Etablierung spezifischer Antikörper. Welche und wie viele Signalmoleküle mit der RPPA-Technologie untersucht werden können, wird primär durch diesen Punkt beschränkt. Andere Immunassays wie Western Blot und ELISA können zumindest eine geringfügige Unspezifität, durch Molekulargewichtsabgleich beziehungsweise die Verwendung zweier spezifischer Antikörper, kompensieren. Der RPPA hingegen benötigt hochspezifische

Antikörper. Stand der Technik zur Validierung von Antikörpern für den RPPA ist ein Test der Spezifität mittels Western Blot. Dabei ist darauf zu achten, denselben Probentyp (z.B. Zellextrakt oder Gewebelysat) zu verwenden, der für die folgenden Arrayanalyse relevant ist. Damit können Unterschiede in der Detektion zwischen getestetem und analysiertem Lysat ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurden daher alle im RPPA verwendeten Antikörper zunächst im Western Blot unter Verwendung von FFPE-Gewebe getestet. Mit 27 der 38 getesteten Antikörper wurde eine Bande auf der erwarteten Höhe detektiert. Sieben Antikörper zeigten zwei Banden, welche entweder Isoformen des Proteins (Erk, p-Erk, PR) oder Homodimere (Snail, Stat3, p-Stat3<sup>(Ser727)</sup>, p-Stat3<sup>(Tyr705)</sup>) darstellen. Während auf die Spezifität für beide Isoformen im Datenblatt des Herstellers hingewiesen wird, ist die Nachweisbarkeit der Snail- und Stat3-Dimere unerwartet. Durch stark denaturierende Bedingungen bei der Proteinextraktion würde man eher von einer Auflösung polymerer Strukturen ausgehen. Da die Dimerbande für Stat3 jedoch mit allen drei Antikörpern unabhängig voneinander nachgewiesen wurde, ist die Spezifität des Signals glaubwürdig. Anti-Snail ist ein von unserer Arbeitsgruppe mitproduzierter Antikörper, der im Zuge der Entwicklung mit verschiedenen Methoden auf seine Spezifität überprüft wurde (Rosivatz et al. 2006). Daher wurde er trotz der zusätzlichen Bande auf Höhe eines Homodimers ebenso als spezifisch und als für den RPPA geeignet angesehen. Die Aufrechterhaltung der Dimerstruktur kann zudem über die während der Formalinfixierung erzeugten Quervernetzungen erklärt werden. Die Quervernetzungen werden auch für die Beobachtung verantwortlich gemacht, dass vier der untersuchten Antikörper zwar (p-HER2, HER3, p-HER3, HER4) ein spezifisches Signal erzeugten, dieses bei Verwendung von FFPE-Lysaten jedoch am Übergang von Sammel- und Trenngel auftrat. Vor allem bei großen Molekülen kann es nicht verhindert werden, dass es bei der Extraktion zu einer unvollständigen Spaltung der Quervernetzung kommt. Dies hat zur Folge, dass die Proteine nur schlecht in das Gel einlaufen oder zu undefinierten Banden führen. Für die Anwendung im RPPA stellt dies jedoch kein Hindernis dar, da es zu keiner Auftrennung der Proteine kommt. Um sich über die Spezifität der vier Antikörper dennoch sicher zu sein, wurde zusätzlich zum FFPE-Lysat ein Gefrierlysat untersucht. Dieses zeigte für alle vier Moleküle eine deutliche Bande auf der korrekten Höhe. Die Tauglichkeit der Antikörper für den RPPA konnte damit für alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper bestätigt werden.

### **5.2.2 Reproduzierbarkeit des Reverse Phase Protein Mikroarrays**

Obwohl der RPPA eine in vielen Laboren etablierte Methode ist (Espina 2008; Frederick et al. 2011; Grubb et al. 2003) und auch in unserem Institut bereits mehrfach Anwendung fand (Becker 2008; Hipp et al. 2008; Wolff et al. 2011), sollte in dieser Arbeit die Reproduzierbarkeit weiter überprüft werden. Sowohl der Vergleich zwischen verschiedenen Extraktionsansätzen (Inter-Extraktion) als auch der zwischen zwei Arrays (Inter-Array) ergab einen Korrelationskoeffizienten  $r_s > 0,9$  und einen mittleren Varianzkoeffizient von  $CV = 11\%$ . Während der Korrelationskoeffizient für beide Validierungsansätze meist knapp unter 1 lag und damit kaum Platz für Kritik lässt, befindet sich der CV eher am oberen Ende der tolerierbaren Abweichung (Kricka et al. 2008; Tibes et al. 2006). CV-Werte von unter 5% wie sie bei der Proteinbestimmung mittels ELISA möglich sind (Collins et al. 1993), konnten mit dieser Methode noch nicht erreicht werden. Vergleicht man den RPPA jedoch mit der klinisch relevanten Methode zum Proteinnachweis, der Immunhistochemie (IHC), befindet sich die RPPA-Technologie klar im Vorteil. Die IHC weist, unter anderem auf Grund der subjektiven Bestimmung, deutlich höhere CV-Werte von bis zu über 50% auf und noch CV-Werte bis 30% werden als akzeptabel angesehen (Hsu et al. 2003; Kleiner et al. 2009). Außerdem bleibt festzuhalten, dass der CV des Inter-Array Vergleichs mit 9,2% unter dem CV des Inter-Extraktion Vergleichs (12,6%) lag. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass die Verlässlichkeit des RPPA durch die Verwendung desselben Extrakts für alle Arrays erhöht werden kann.

Darüber hinaus wird anhand dieser Validierungsversuche die Notwendigkeit der Normalisierung auf das Gesamtprotein deutlich. Beispielhaft ist dies für den mit PAI-1 detektierten Array erkennbar. Bei visueller Betrachtung der Ergebnisse (Abbildung 4-9) ist ein deutlicher Unterschied für die Proben 6 und 7 zwischen den Extraktionen erkennbar. Erst nach Normalisierung auf den Gesamtproteingehalt kommt es zu einer Übereinstimmung der Resultate für alle drei Extraktionen, wie aus Abbildung 4-10 ersichtlich ist.

Es sei auch erneut darauf hingewiesen, dass es beim Drucken der Probe 7 der dritten Extraktion zu einem Fehler gekommen ist. Für dieses Lysat konnte im Gegensatz zu den beiden anderen Extraktionsdurchläufen kein uPA-Signal detektiert werden. Da die anderen

Antikörper jedoch für diese Probe gute Signale zeigen, muss von einem Druckfehler auf den beiden uPA-Arrays ausgegangen werden. Dies ist insofern bedenklich, dass dieser Fehler in einer einmalig durchgeführten Analyse nicht bemerkt worden wäre. Eine Möglichkeit, solch einen Irrtum zu verhindern, wäre die Gesamtproteinbestimmung jedes Arrays vor der Inkubation mit dem Antikörper. Dies ist jedoch im Laboralltag praktisch nicht möglich. Erstens liefern einige Antikörper schlechtere Resultate, wenn zuvor mit Sypro-Ruby gefärbt wurde und zweites wäre es ein zu hoher Zeit- und Kostenfaktor. Bei der Untersuchung von hundert bis zweihundert Proben wie in dieser Arbeit kann davon ausgegangen werden, dass solche einzelnen Abweichungen keine große Veränderung der Gesamtdatenlage bewirken. Anders stellt sich die Sachlage für die Verwendung der Methodik in der Klinik dar. Dieses Einsatzfeld wird im Moment in der Literatur stark diskutiert (Sheehan et al. 2005; Wulfkuhle et al. 2006; Wulfkuhle et al. 2008). Um dies zu ermöglichen, muss das Auftreten falsch negativer, aber auch falsch positiver Signale auf ein Minimum reduziert werden. Entscheidend dabei scheint vor allem die Wahl des Mikroarrayers. Hochdurchsatzgeräte, wie der „2470 Arrayer“ von Aushon, erlauben eine noch bessere Reproduzierbarkeit und wären Voraussetzung für eine Implementierung in die Klinik.

### **5.2.3 Widerspiegelung der biologischen Realität durch den RPPA**

Die oben aufgeführten Daten legen deutlich dar, dass der RPPA eine verlässliche und reproduzierbare Methode zum immunologischen Proteinnachweis darstellt. In einem letzten Etablierungsansatz sollte daher überprüft werden, inwiefern die mittels RPPA bestimmten Signale die biologische Realität in der Probe widerspiegeln. Die zu diesem Zweck durchgeführte Analyse von lobulären und duktalem Mammakarzinomen auf ihre E-Cadherin-Expression zeigte wie erwartet keine Expression in den lobulären Karzinomen und eine variable Expression in den duktalem Tumoren. Eine weitere Bestätigung des RPPA bezüglich der Darstellung realer Zustände gibt die bereits mehrfach nachgewiesene Tatsache, dass ein direkter und eindeutiger Zusammenhang zwischen RPPA und Western Blot Signalen besteht (Becker et al. 2007). Dies ist aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Methoden zwar nicht überraschend, doch bestätigt es erneut die Verlässlichkeit des RPPA.

### **5.3 Analyse von uPA und PAI-1 aus Formalin-fixierten Geweben mittels ELISA**

Die Bestimmung der beiden molekularen Marker uPA und PAI-1 wird seit 2002 zur verbesserten Diagnose beim nodal-negativen Mammakarzinom empfohlen (AGO 2010). Eine niedrige Expression beider Proteine wird mit einer guten Prognose in Verbindung gebracht, so dass von einer Chemotherapie abgesehen werden kann (Look et al. 2002). Trotzdem nutzen nur wenige Kliniken das Potential der Marker. Dies liegt vor allem daran, dass zur klinisch zugelassenen Bestimmung mittels ELISA Gefriergewebe benötigt wird. Um eine bessere Verbreitung der Marker zu erreichen, sollte in dieser Arbeit versucht werden, die Bestimmung von uPA und PAI-1 auch aus klinischen FFPE-Geweben zu ermöglichen. Diese Vorgehensweise bedeutet auch methodisches Neuland zu betreten, da zu diesem Zeitpunkt generell der Einsatz von FFPE-Lysaten in einem ELISA noch nie untersucht wurde.

Es wurde schnell deutlich, dass der für die Proteinextraktion aus FFPE-Geweben nötige Puffer die Signalbestimmung störte. Eine Erklärung wäre es, dass die im ELISA verwendeten Antikörper die denaturierte Form der Proteine nicht erkennen können. Eine weitere mögliche Ursache, wäre eine Denaturierung der ELISA-Antikörper durch die im Puffer enthaltenen hohen SDS- und  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentrationen. Zur Überprüfung der ersten Hypothese wäre es wichtig die Epitope der Antikörper zu kennen. Leider war es auch nach Rücksprache mit dem Hersteller nicht möglich diese Fragestellung zu klären. Daher sollte zunächst die zweite Theorie durch Entfernung der störenden Substanzen überprüft werden. Eine Methode, die für diesen Zweck angewandt wurde, war eine Dialyse mit einer Porengröße für Moleküle von etwa 20 kDa. Dem zufolge sollten alle Moleküle kleiner als 20 kDa durch die semipermeable Membran diffundieren und somit aus der Lysatlösung entfernt werden.  $\beta$ -Mercaptoethanol mit einem Molekulargewicht von etwa 80 Da als auch SDS mit etwa 300 Da liegen deutlich unter dieser Grenze. Allerdings ist es bekannt, dass SDS aufgrund seiner tensidartigen Struktur (hydrophiler Kopf, hydrophober Schwanz) zur Mizellenbildung neigt. Eine Mizelle besteht aus etwa 60 SDS-Molekülen (Lietzow 2006). Dies führt zu einem Gesamtgewicht von etwa 18 kDa, so dass eine vollständige SDS-Entfernung durch Dialyse nicht gewährleistet werden kann. Dies trifft auch auf die eingesetzten Entsalzungssäulen zu, welche ebenfalls ein

Ausschlussgewicht von 20 kDa hatten. Die Verwendung eines größeren Ausschlussgewichts war aufgrund der Größe von uPA (33 kDa) und PAI-1 (45 kDa) nicht möglich. Daher wurde versucht die beiden erwähnten Methoden mit dem Reagenz SDS-Out zu kombinieren. Die Lösung soll freies SDS aus dem Proteinlysate durch gezielte Ausfällung entfernen. Ein genaueres Funktionsprinzip wird vom Hersteller (Pierce) nicht angegeben. Jedoch wurde auch nach Behandlung mit einer Kombination der Methoden kein verwendbares Signal bei der ELISA-Messung erhalten. Dies lässt zwei Schlüsse zu: Erstens es wurden nicht alle störenden Substanzen entfernt oder zweitens der Pufferaustausch war erfolgreich, aber, wie schon eingangs überlegt, die denaturierte Konformation der Proteine wird von den Antikörpern nicht erkannt. Zwar deuten die Ergebnisse eher auf die zweite Ursache hin, dennoch sollte eine weitere Vorgehensweise zum Pufferaustausch überprüft werden.

Über verschiedene Fällungsarten sollten die Proteine pelletiert und nachfolgend in einem ELISA-kompatiblen Puffer resuspendiert werden. Die Methanol/Chloroform-Fällung wurde aufgrund der besonderen Eignung zur Entfernung von Detergenzien und  $\beta$ -Mercaptoethanol (Wessel et al. 1984) gewählt, die Aceton- und Aceton/TCA-Fällung wurden wegen ihrer einfachen Handhabung untersucht. Leider brachte auch dieser Ansatz keinen Erfolg bezüglich der Messbarkeit von uPA und PAI-1 im klinischen ELISA. Die Vermutung, dass nicht primär die Pufferzusammensetzung, sondern der denaturierte Zustand der Proteine nach Extraktion mit LMA eine Detektion im ELISA verhindert, wurde daher als sehr wahrscheinlich angesehen.

Die logische Schlussfolgerung war es eine Methode zur Bestimmung von denaturiertem uPA und PAI-1 zu entwickeln. Da ein ELISA einfach zu handhaben ist und somit in den Klinikalltag integriert werden könnte, war der erste Versuch die Methode selbst unter Verwendung anderer Antikörper beizubehalten. Aus Western Blot Experimenten, welche für eine andere Fragestellung durchgeführt wurden, standen spezifische Antikörper gegen denaturierte Proteine zu Verfügung. Dass auch dieser Ansatz keinen Durchbruch brachte, lag vor allem an der hohen Anzahl an möglichen Varianten der einzelnen Schritte. Dies überschritt die Kapazitäten unseres Labors.



## 5.4 Die Rolle von uPA und PAI-1 im Mammakarzinom

In den letzten Jahren wurde in zellkulturbasierten Ansätzen ein guter Überblick über die Funktionen und Bindungspartner der Mitglieder des Plasminogen-Aktivierungssystems gewonnen. Allerdings beschränkte sich die Mehrheit dieser Studien auf einen Signalweg oder sogar nur ein Protein. Darüber hinaus zeigte es sich, dass je nach verwendeter Zelllinie unterschiedliche und häufig auch gegensätzliche Zusammenhänge zwischen den untersuchten Proteinen bekundet wurden. In dieser Arbeit wurde versucht auf beide Problematiken einzugehen, indem über 30 Proteine verschiedener Signalwege in 201 Mammakarzinomgeweben im Zusammenhang mit uPA und PAI-1 untersucht wurde. Dies sollte einen Überblick erlauben, welche der in Zellkulturexperimenten gefundenen uPA/PAI-1 assoziierten Signalwege auch in einem zufällig ausgewählten Patientenkollektiv nachweisbar sind.

### 5.4.1 Diskussion der erhaltenen Werte

Bevor auf die biologische Interpretation der gewonnenen Ergebnisse eingegangen wird, sollen die erhaltenen Werte an sich diskutiert werden. Grundsätzlich ist der RPPA, wie unter Abschnitt 5.2 ausführlich dargelegt, eine gut reproduzierbare Hochdurchsatzmethode, die eine realitätsnahe Darstellung der Signalwege einer Zelle erlaubt. Dennoch kam es bei der Analyse der drei Mammakarzinomkollektive für einige Antikörper zu großen Unterschieden bezüglich der Korrelationen zu uPA und PAI-1. Ein Beispiel ist p-Stat3<sup>(Y705)</sup>. Dieses Protein korreliert mit PAI-1 im ersten Kollektiv mit  $r_s = 0,396$ , im zweiten mit  $r_s = -0,028$  und im dritten mit  $r_s = 0,508$  (siehe auch Tabelle 4-2). Für die Korrelation mit uPA wurden ähnliche Differenzen beobachtet ( $r_{s1} = 0,116$ ;  $r_{s2} = -0,036$ ;  $r_{s3} = 0,419$ ; aus Tabelle 4-3). Dies sind deutliche Unterschiede und es stellt sich die Frage warum es trotz zufälliger Zusammensetzung der Kollektive zu solch ausgeprägten Differenzen kommt. Eine eingehende Überprüfung der Arrays selbst sowie der nach der Auswertung erhaltenen Werte gaben keinen Grund zur Beanstandung. Es wird daher angenommen, dass zufällig auftretenden Unterschiede in der Kollektivzusammensetzung vorliegen. Um diesen Aspekt berücksichtigen zu können, sah das Studiendesign von Beginn an vor mehrere Kollektive zu untersuchen. Durch diesen Schritt sinkt die Wahrscheinlichkeit falsch positive Ergebnisse zu erhalten deutlich. Nur Werte, die in allen drei Kollektiven eine signifikante Korrelation erreichen, können als allgemein gültig angesehen werden.



Interessant wäre es selbstverständlich auch zu klären, worin die, wenn auch geringen, Unterschiede zwischen den Kollektiven liegen und inwiefern dies zum Beispiel einen Einfluss auf die Stat3-Aktivierung hat. Allerdings war das keine Fragestellung der hier vorgelegten Arbeit.

Ein weiterer zu diskutierender Aspekt besteht in der Höhe der gefundenen Korrelationen. Aufgrund der verwendeten Fallzahl von 60-80 Fälle pro Kollektiv erreichen Korrelationen ab einem Korrelationskoeffizienten von etwa  $r_s = 0,35$  statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Es ist jedoch wichtig sich darüber im Klaren zu sein, dass die Signifikanz nicht das ausschlaggebende Maß für die Relevanz einer Korrelation sein darf. Durch Erhöhung der Fallzahl wäre es möglich signifikante Korrelationen mit einem  $r_s = 0,1$  zu erreichen, welche jedoch nicht mehr biologisch relevant wäre. Die Frage bis zu welchem Wert eine Korrelation biologisch relevant ist, lässt sich schwer pauschalisieren, sondern hängt von der vorliegenden Fragestellung ab. Der Korrelationskoeffizient gibt an in wie weit ein Faktor mit einem anderen untersuchten Parameter in Zusammenhang steht. Es ist daher einfach nachvollziehbar, dass bei Signalweganalysen keine Korrelationskoeffizienten nahe  $r_s = 1$  erwartet werden können, da die Expression eines bestimmten Proteins von vielen Faktoren beeinflusst wird. Allgemein werden Korrelationen ab  $r_s = 0,25$  oder  $r_s = 0,33$  für eine Signalweganalyse als biologisch relevant erachtet (Innominato et al. 2009; Untersteiner 2007). In dieser Arbeit wurde wie in Abschnitt 3.21.1 dargelegt ein  $r_s = 0,30$  als Untergrenze für einen biologisch relevanten Zusammenhang festgelegt.

Allerdings trifft diese Zahl selbstverständlich keine Aussage über die Art der Beeinflussung. Das heißt man erhält keine Information, ob es sich um einen direkten Zusammenhang der Proteine handelt, zum Beispiel weil sie in einem Signalweg auftreten, oder aber ob es sich um eine indirekte Co-Expression handelt. Letzteres könnte zum Beispiel auftreten, wenn die Expression beider Proteine durch ähnliche Umwelteinflüsse beeinflusst wird. Dennoch gilt, je höher der Zusammenhang zweier Faktoren, umso höher ist auch die Wahrscheinlichkeit eines direkten Zusammenhangs.

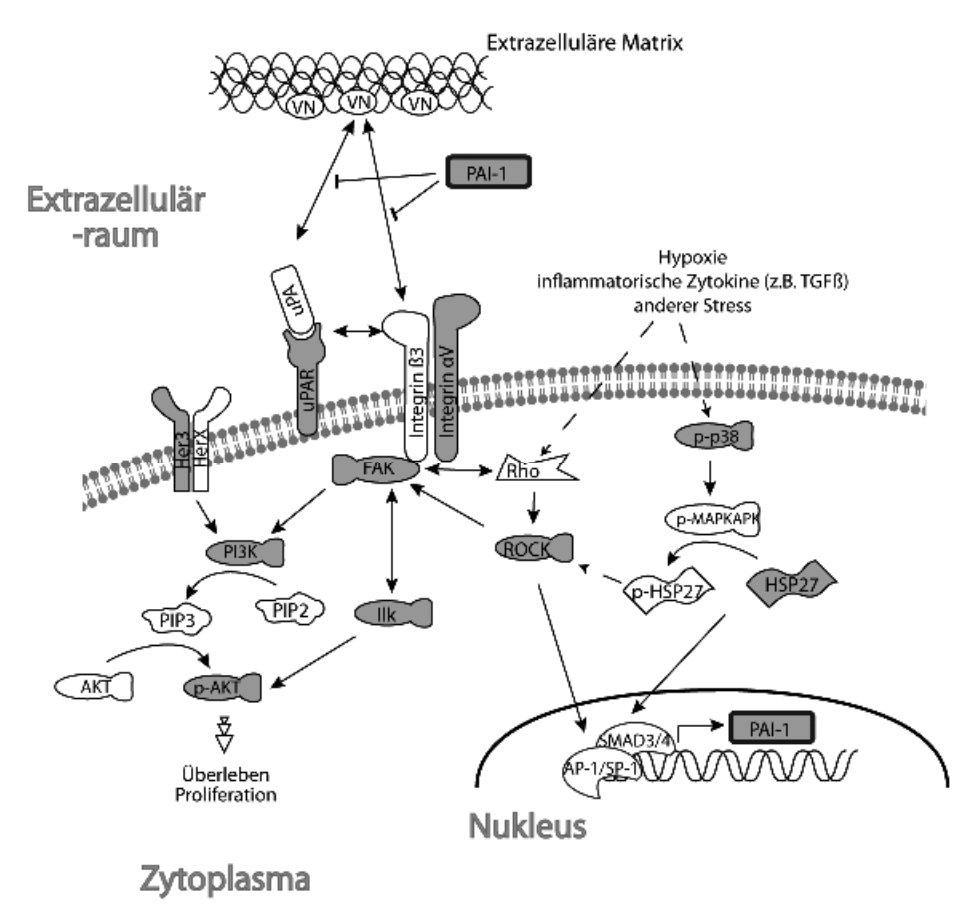
#### **5.4.2 PAI-1 assoziierte Signalwegsmoleküle**

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass eine Hochregulation von PAI-1 mit einer vermehrten Aktivierung von Akt (p-Akt<sup>(S473)</sup>) in Zusammenhang steht. Entsprechend ist eine

schwache PAI-1 Expression im Gewebe mit einer geringen Akt-Phosphorylierung korreliert. Dies stimmt mit einer Beobachtung von Romer *et al.* über ein. Die Gruppe konnte in PAI-1 gendefizienten murinen Fibrosarkomzellen eine deutlich schwächere Aktivierung von Akt nachweisen als in den vergleichbaren Wildtyp-Fibrosarkomzellen (Romer *et al.* 2008). Darüber hinaus ist bekannt, dass eine Überexpression von Akt, aber nicht von Erk, zu erhöhter PAI-1 mRNA Transkription führt (Kietzmann *et al.* 2003). Diese Daten unterstützen nicht nur die gefundene p-Akt/PAI-1 Korrelation, sondern bestärken auch die Erkenntnis, dass keine Korrelation von PAI-1 mit Erk oder p-Erk gefunden werden konnte. Andere Gruppen haben jedoch auch widersprüchliche Beobachtungen veröffentlicht. So wurde sowohl in SKOV-3 Ovarialkarzinomzellen (Whitley *et al.* 2007) als auch in humanen Fibroblasten (Kortlever *et al.* 2006) eine negative Regulierung des PI3K/Akt-Signalwegs in Bezug auf die PAI-1 Expression nachgewiesen. Dass diese Daten jedoch nicht die Situation im Mammakarzinom widerspiegeln, zeigt die positive Korrelation von PAI-1 mit der Integrin-Untereinheit  $\alpha V$  sowie den Proteinen Fak, Ilk, PI3K und Rock, welche alle eine wichtige Rolle im PI3K/Akt-Signalweg spielen. Leider war es, unter anderem aufgrund des Fehlens von arraytauglichen Antikörpern, nicht möglich auch die aktivierten Formen dieser Proteine zu analysieren. Trotzdem kann aus den gewonnenen Daten geschlossen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem PI3K/Akt-Signalweg und der PAI-1 Expression gibt. Noch keine Aussage kann über die Art des Zusammenhangs getroffen werden. Wird die PAI-1 Expression von den gefundenen Proteinen beeinflusst, oder führt PAI-1 zur Stimulation des Signalwegs? Falls Letzteres der Fall ist, geschieht die Anregung direkt über Aktivierung oder indirekt durch eine PAI-1-induzierte Expression der Proteine? Vor allem bei der Klärung der ersten Frage gerät die in dieser Arbeit verwendete Untersuchung von Geweben an ihre Grenzen, da es anderes als in Zellen nicht möglich ist, einzelne Signalwege zu stimulieren. Erste Hinweise können jedoch aus der Literatur gewonnen werden. So konnte zum Beispiel in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden, dass es nach Bindung von Integrin  $\alpha V\beta 3$  an Vitronectin zu einer 4-fach erhöhten PAI-1-Expression kommt (Hapke *et al.* 2001). Diese Stimulation der PAI-1 Expression kann als eine Art Regulationsmechanismus der Integrin-Vitronectin Bindung betrachtet werden, da Integrine und PAI-1 überlappende Bindestellen am Vitronectin besitzen (Stefansson *et al.* 1996). Darüber hinaus sind Integrine bekannte Aktivatoren des PI3K/Akt-Signalwegs (Giancotti *et al.* 1999). Beides spricht für eine Stellung von Integrin *up-stream* von PAI-1. Ähnliches gilt auch für Rock, welches durch Aktivierung von Smad3/4, einem PAI-1

Transkriptionsfaktor, zu einer Hochregulation von PAI-1 führt (Samarakoon et al. 2008). Allerdings bleibt zu bedenken, dass diese Erkenntnisse nicht für Mammakarzinomzellen bestätigt sind und auch ein Zusammenspiel der gefundenen Proteine bisher nicht untersucht wurde. Eine Veranschaulichung der hier aufgeführten Zusammenhänge sowie der im Folgenden diskutierten Assoziationen ist in Abbildung 5-1 gegeben.

Neben diesen mit dem PI3K/Akt Signalweg verbundenen Korrelationen wurden einige weitere Zusammenhänge aufgedeckt, zum Beispiel zwischen PAI-1 und uPAR. Diese Beziehung ist vermutlich der Tatsache zu zuschreiben, dass uPAR mit PAI-1 an vielen Stellen in Konkurrenz steht. Ein Beispiel ist, dass uPAR an derselben Stelle an Vitronectin bindet wie PAI-1 und damit sowohl mit PAI-1 als auch mit den Integrinen um die Bindungsstelle konkurriert (Hapke et al. 2001). Darüber hinaus führt die Bindung von PAI-1 an uPAR-gebundenes uPA zu Internalisierung aller drei Proteine, wobei uPA und PAI-1 abgebaut werden, uPAR jedoch wieder an die Oberfläche transportiert wird (Nykjaer et al. 1992). Die Assoziation, dass eine hohe uPAR-Expression mit einer hohen PAI-1 Expression einhergeht, erscheint somit wichtig, um das Gleichgewicht im Wechselspiel beider Proteine aufrecht zu erhalten. Allerdings ist nicht davon auszugehen, dass diese Korrelation durch direkte gegenseitige Stimulation in einem Signalweg zustande kommt. Viel mehr muss davon ausgegangen werden, dass durch eine Verschiebung des Gleichgewichts bisher nicht-assoziierte Signalwege aktiviert werden, um eine Einstellung des Gleichgewichts zu erreichen.



**Abbildung 5-1 Übersicht über das Zusammenspiel von PAI-1 und den mit PAI-1 korrelierenden Proteinen (grau).** Die Korrelation von PAI-1 mit der Integrin-Untereinheit  $\alpha V$ , FAK, Ilk, PI3K, Rock und p-Akt gibt einen Hinweis auf eine Beteiligung von PAI-1 im PI3K/Akt-Signalweg. Da uPAR, Integrin  $\alpha V$  und PAI-1 in Konkurrenz um die Bindung an Vitronectin (VN) stehen erscheint es logisch, dass eine hohe Konzentration eines Proteins die Hochregulation der anderen bewirkt. Der gefundene Zusammenhang von PAI-1 mit p-p38 und HSP27 entsteht durch die Aktivierung der PAI-1 Expression durch die Zusammenarbeit beider Proteine.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Menge an PAI-1-positiv mit der Expression der HER-Rezeptoren (EGFR, HER3, HER4, p-HER2) verbunden ist. Auffällig ist, dass nur HER2 in seiner aktivierten Form mit PAI-1 in Zusammenhang gebracht werden kann, während für EGFR, HER3 und HER4 eine Verknüpfung mit der reinen Expression der Proteine gezeigt wurde. Erstaunlicherweise gibt es sehr wenige Studien, die sich mit der Beziehung von PAI-1 und den Mitgliedern der HER-Familie auseinander setzen, obwohl beide eine wichtige Rolle im Mammakarzinom spielen. Der aus dieser Studie erhaltene Hinweis über einen Zusammenhang dieser klinisch relevanten Proteine, sollte daher den Anstoß für weitere, funktionelle Untersuchungen geben. Eine Studie mit Mammakarzinomzellen (MCF7) zeigte interessanterweise, dass eine Stimulation der HER2-Expression zu einer erhöhten PAI-1-Sekretion führt (Connolly et al. 1997). Dies unterstützt erstens die

Ergebnisse dieser Arbeit und gibt zweitens einen Hinweis auf eine geeignete Zelllinie für die erwähnten weiterführenden, funktionellen Ansätze.

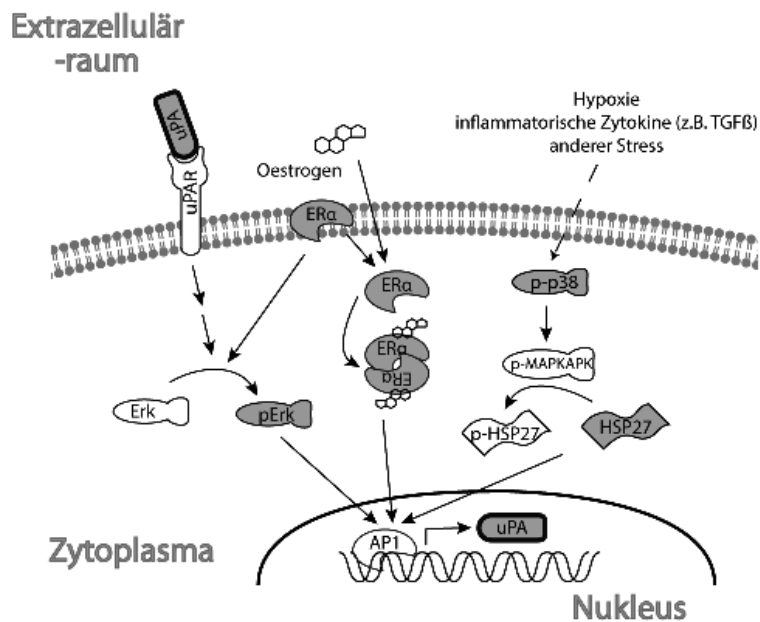
Als letztes bleibt noch die Korrelation von PAI-1 mit HSP27 und p-p38 zu erwähnen. Funktionelle Studien konnten zeigen, dass eine Aktivierung von p38 zu einer Hochregulation der PAI-1-Expression führt (Jaulmes et al. 2009), und entsprechend eine Inhibierung der Phosphorylierung von p38 eine Herabregulation zur Folge hat (Nerurkar et al. 2007; Vayalil et al. 2007). Des Weiteren ist es eine anerkannte Tatsache, dass p-p38 über MAPKAPK zur Aktivierung von HSP27 führt (Hong et al. 2009; Pramanik et al. 2003), was wiederum zur Aktivierung von Rock führt (Pramanik et al. 2003). Für Rock konnte, wie oben erwähnt, ebenfalls eine Korrelation mit PAI-1 nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden keine phosphorylierten Formen von HSP27 oder Rock untersucht, so dass dieser Sachverhalt für das Mammakarzinom noch nicht lückenlos belegt werden kann. Nichtsdestotrotz gibt es ebenfalls Hinweise, dass p38 neben der Aktivierung auch die Expression von HSP27 erhöht (Hirade et al. 2002). Während eine Überexpression von HSP27 wiederum zu einer Hochregulation der PAI-1-Expression führt (Aldrian et al. 2003). Zusammengenommen bestätigen die gefunden Korrelationen das aus der Literatur bekannte Zusammenspiel von PAI-1, p38 und HSP27 auch für das Mammakarzinom (siehe Abbildung 5-1).

### **5.4.3 uPA assoziierte Signalwegsproteine**

Für uPA wurden deutlich weniger Korrelationen identifiziert als für PAI-1. Im ersten Ansatz, welcher zunächst einen Überblick über mögliche assoziierte Signalwege geben sollte, korrelierte uPA mit ER $\alpha$ , Stat3 und p-Erk. Im Folgenden soll kurz auf die Hintergründe der gefundenen Korrelationen eingegangen werden. So ist bekannt, dass die Aktivierung des Erk-Signalwegs (Lengyel et al. 1996; Lengyel et al. 1995), und im Speziellen auch von Erk selbst (Aguirre-Ghiso et al. 2001), in humanen Zelllinien zu einer verstärkten uPA Expression führt. Interessanterweise konnte jedoch auch der umgekehrte Weg, eine Aktivierung von Erk durch hohe gemeinsame Expression von uPA/uPAR in denselben Zelllinien beobachtet werden (D'Alessio et al. 2009; Liu et al. 2002). Welcher der beiden Wege im Mammakarzinom eine Rolle spielt oder ob es tatsächlich eine positive Rückkopplung zwischen beiden Proteinen gibt, ist mit der bisherigen Datenlagen jedoch

nicht zu klären (siehe auch Abbildung 5-2). Ungeachtet der Lage der beiden Proteine im Signalweg zueinander, könnte Erk das Bindeglied zwischen uPA und Stat3 darstellen, welches ebenfalls mit uPA korrelierte, da eine Aktivierung von Erk zu einer Stimulation des Stat3-Signalwegs (Plaza-Menacho et al. 2007) führt. Überraschend ist jedoch, dass die Proteinexpression von Stat3 und nicht die aktivierte Form p-Stat3<sup>(Y705)</sup> mit uPA in Zusammenhang zu bringen ist. Es gibt mehrere Literaturberichte, die darlegen, dass die Bindung von uPA an seinen Rezeptor uPAR zu einer Tyrosin-Phosphorylierung von Stat3 führt (Shetty et al. 2006; Shushakova et al. 2005). Dies scheint jedoch, aufgrund der vorliegenden Daten, im Mammakarzinom kein Aktivierungsmechanismus für Stat3 zu sein. Die Überlegung war daher, dass uPA zur Aktivierung von Erk führt, welches dann, wie oben beschrieben, Stat3 aktiviert. Dieser Weg würde eher zu einer Serin-Phosphorylierung als zu einer Phosphorylierung am Y705 führen (Plaza-Menacho et al. 2007). Allerdings konnte in der daraufhin durchgeführten Analyse der p-Stat3<sup>(S727)</sup>-Expression ebenfalls keine Korrelation mit uPA beobachtet werden. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass uPA im Mammakarzinom direkt oder indirekt in die Stimulation des Stat3-Signalwegs involviert ist.

Eine weitere Korrelation konnte zwischen uPA und ER $\alpha$  beobachtet werden. Die Regulation von uPA ist in mehreren Zelllinien hormonell beeinflusst. Östradiol stimuliert die Sekretion von uPA in den Mammakarzinomzelllinien MCF7 (Butler et al. 1979) und ZR-75-1 (Huff et al. 1984). Diese Stimulation kann über verschiedene Signalwege induziert werden. Der wahrscheinlichste Weg verläuft über den ER $\alpha$ . Nicht nur weil ER $\alpha$  einer der primären Östrogenrezeptoren ist, sondern auch aufgrund der Tatsache, dass die ER $\alpha$ -Expression im Mammakarzinom mit der Aktivität von uPA in Zusammenhang steht (Sutherland 1980; Thorsen 1982). Diese Vermutung wird des Weiteren durch die gefundene Korrelation von uPA und ER $\alpha$  unterstützt. Interessanterweise belegt eine Studie von Zivadinovic *et al.* darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen membrangebundenem ER $\alpha$  und einer östrogeninduzierten Aktivierung von Erk in MCF7 Zellen (Zivadinovic et al. 2005). Diese Daten in Kombination mit den hier gezeigten Korrelationsanalysen lassen die Vermutung zu, dass eine Überexpression von ER $\alpha$  zu hohen uPA-Konzentrationen in der Zelle führt, wodurch es anschließend zu einer Aktivierung von Erk kommt (siehe auch Abbildung 5-2).



**Abbildung 5-2 Übersicht über das Zusammenspiel von uPA und den mit uPA korrelierenden Proteinen (grau).** Aufgrund der geringen Anzahl an Korrelationen von uPA mit den 33 untersuchten Proteinen, wurde kein eindeutig definiertes, uPA-assoziiertes Signalnetzwerk deutlich. Dennoch kann die Graphik einen Überblick über die diskutierten Signalwege geben. Aufgrund von veröffentlichten Zellkulturexperimenten ist davon auszugehen, dass die Korrelation von uPA mit ERα, p-Erk, p-p38 und HSP27 auf einer Stimulation der uPA-Expression durch die erwähnten Proteine beruht. Es konnte jedoch auch eine Aktivierung von Erk durch uPA gezeigt werden, so dass dies ebenfalls eine Erklärung für den gefundenen Zusammenhang wäre. Der gefundene Zusammenhang von Stat3 und uPA wurde aufgrund fehlender Hintergrundinformation nicht in die Graphik integriert.

Neben den schon erwähnten Korrelationen konnte ein Zusammenhang von uPA mit HSP27 und p-p38 aufgedeckt werden. Dies ist interessant, da wie oben erwähnt auch PAI-1 mit beiden Proteinen korrelierte. HSP27 und p-p38 sind somit die einzigen in dieser Studie gefundenen Proteine, die sowohl mit PAI-1 als auch mit uPA assoziiert scheinen. Die Korrelation mit p-p38 ist für uPA, ähnlich wie für PAI-1, bereits in der Literatur beschrieben worden (Han et al. 2008; Shin et al. 2011; Wang et al. 2010). Besonders hervorzuheben ist eine Studie an Mammakarzinomgewebe welche die uPA- und p-p38-Expression mittels IHC untersuchte und ebenfalls eine Korrelation ( $r_s = 0,367$ ) beider Proteine nachweist (Han et al. 2008). Wie schon in Abschnitt 5.4.2 für PAI-1 dargelegt, könnte p-p38 auch das Bindeglied zwischen uPA und HSP27 darstellen, da die Aktivierung von p38 die Hochregulation (und Aktivierung) von HSP27 verursacht (Hirade et al. 2002; Hong et al. 2009). Darüber hinaus konnte für uPA auch ein direkter Zusammenhang zu HSP27 gezeigt



werden. Aldrian *et al.* konnten belegen, dass eine Überexpression von HSP27 zu einer Hochregulation der uPA-Expression führt (Aldrian *et al.* 2003) (siehe auch Abbildung 5-2). Insgesamt zeigen sich große Parallelen bezüglich des Zusammenspiels von uPA beziehungsweise von PAI-1 mit HSP27 und p-p38. Es ist daher davon auszugehen, dass HSP27 und p-p38 eine wichtige Rolle bei der Regulation des Plasminogen-Aktivierungssystems spielen. Eine Untersuchung der klinischen Relevanz der beiden Proteine wäre daher sinnvoll.

## **5.5 Unterschiede zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastasen des Mammakarzinoms**

Der vorangegangene Abschnitt beschäftigte sich mit der uPA und PAI-1 assoziierten Signaltransduktion in Primärtumoren des Mammakarzinoms. Dieses Wissen hilft, die Gründe für die prognostische Aussagekraft der beiden Proteine besser zu verstehen. Ein weiterer, in dieser Richtung zu berücksichtigender Aspekt, ist die Frage nach möglichen Unterschieden in der Proteinexpression zwischen Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Diese Fragestellung kann ebenfalls von prognostischer und damit von entscheidender therapeutischer Bedeutung sein – besonders bei zielgerichteten Therapien. Bisher werden die molekularen Eigenschaften vorhandener Lymphknotenmetastasen jedoch nicht in die Therapieentscheidung miteinbezogen. Dies kann ein Grund für die häufige Beobachtung sein, dass Patienten zwar auf eine Therapie gut ansprechen jedoch später einen Rückfall erleiden. Unterscheiden sich die Eigenschaften eventuell entstandener (Mikro-)Metastasen von denen des Primärtumors, können sie der Wirkung der Therapie entgehen und so zu einem Wiederauftreten der Tumorerkrankung führen. Auf Grundlage dieser Überlegungen wurden die Unterschiede der für das Mammakarzinom klinisch relevanten Proteine HER, ER $\alpha$ , PR, uPA und PAI-1 zwischen den beiden Entitäten, Primärtumor und Lymphknotenmetastase, untersucht.



### **5.5.1 Expressionsunterschiede von uPA und PAI-1**

Für PAI-1 zeigte nur etwa die Hälfte der Fälle eine gleich bleibende Expressionshöhe in der Lymphknotenmetastase, verglichen zum Primärtumor. Interessant ist, dass kein Trend zu einer Hoch- oder Herabregulation erkennbar ist. Etwa der gleiche Anteil an Patienten (23 % bzw. 21 %) zeigt eine höhere beziehungsweise niedrigere Expression im Lymphknoten. Dies ist auch der Grund für die geringe Korrelation von PAI-1 zwischen den beiden Entitäten. Im starken Kontrast dazu steht uPA. Dieser Marker weist in beiden Entitäten eine gleich bleibende Expressionshöhe auf. Bisher wurde nur eine ähnliche, vergleichende Studie für uPA und PAI-1 im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit durchgeführt (Kamer 2007). Ein Grund dafür ist wohl die Tatsache, dass uPA und PAI-1 nur in Patientinnen ohne Lymphknotenbefall als prognostische Marker zugelassen sind. Doch gerade das verleiht den Resultaten dieser Untersuchung besondere Bedeutung. Denn die Änderungen in der PAI-1-Expression können ein Grund für das eingeschränkte Potential des Markerpaars sein. In nicht-metastasierten, nodal-negativen Karzinomen hat primär die Proteinexpression im Tumor selbst einen Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf, während in nodal-positiven Karzinomen auch das veränderte Expressionsprofil der Lymphknoten eine Rolle spielt. Es wäre daher denkbar, dass PAI-1 auch in nodal-positiven Mammakarzinomen eine prognostische Relevanz zeigen würden, wenn seine Expression in den Lymphknoten untersucht würde. Diese Vermutung lassen auch die Ergebnisse der oben erwähnten Studie zu. In der Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Lymphknotenmetastase und Primärtumor sowohl für PAI-1 als auch für uPA nachgewiesen werden (Kamer 2007). Leider wird keine Aussage über das Verhalten der Expression in den einzelnen Patienten getroffen. Daher kann die Studie schlecht mit den Werten dieser Arbeit verglichen werden. Dennoch macht sie nochmals deutlich, dass eine veränderte Expression der beiden Marker in Lymphknotenmetastasen keine Seltenheit ist und in Zukunft weitere Beachtung finden sollte.

### **5.5.2 Expressionsunterschiede von ERα und PR**

Die beiden Hormonrezeptoren zeigen ein zueinander ähnliches Bild. Die Expressionshöhe beider Proteine bleibt in 65-70 % der Fälle gleich, es kommt nur in sehr seltenen Fällen (6-8 %) zu einer Hochregulation, aber in etwa einem Viertel der Fälle zu einer niedrigeren Expression in den Lymphknoten. Dies ist eine sehr interessante Beobachtung, da bis zu

50 % der Hormonrezeptor-positiven Patienten nicht auf eine endokrine Therapie ansprechen (Azam et al. 2009). Als Ursache werden verschiedene Aspekte wie Probleme bei der Zellzyklus Kontrolle (Thangavel et al. 2011) oder eine Überaktivierung des Erk-Signalwegs (Levin 2009) gesehen. Die Tatsache, dass etwa ein Viertel der Patienten eine Herabregulation der Hormonrezeptoren in den Lymphknotenmetastasen zeigen, könnte weiterer Grund für die Problematik sein. Unterstützt wird diese Theorie von der Tatsache, dass auch andere Studien eine Absenkung der ER $\alpha$ /PR-Expression in 15 -30 % der Lymphknoten beobachten konnten (Azam et al. 2009; Cianga et al. 2003; Liedtke et al. 2011). Die meisten Autoren zogen ebenfalls die Schlussfolgerung, dass dies ein Grund für die hohe Rezidivrate endokriner Tumore sein könnte. Dennoch gibt es bis heute keine klinische Studie die diesen Sachverhalt überprüft hätte.

### **5.5.3 Expressionsunterschiede von HER2**

Betrachtet man die Expression von HER2 erkennt man, ähnlich zu ER $\alpha$ /PR eine Übereinstimmung in etwa 70 % der Fälle. Allerdings ist nur in 8 % der Fälle eine niedrigere HER2-Expression in den Lymphknoten aufgetreten, während 19 % eine verstärkte HER2-Expression zeigten. Untersuchungen von Gancberg *et al.* und Zidan *et al.* zeigten vergleichbare Resultate (Gancberg et al. 2002; Zidan et al. 2005). Beide Studien untersuchten die HER2 Expression vergleichend in Primärtumor und Fernmetastasen. Sie konnten eine Herabregulation in 2 % bzw. 0 % der Metastasen beobachten und eine verstärkte HER2-Expression in 12 % bzw. 6 %. Die Werte des Vergleichs von Lymphknotenmetastasen und Primärtumor sind etwas höher aber der Trend bleibt erhalten. Diese Beobachtung kann auf der Tatsache beruhen, dass die Zellen der Lymphknotenmetastasen sich noch auf dem Weg zu einer neuen Tumornische befinden, während die Fernmetastasen eher gefestigt sind und so Primärtumor-ähnlichere Eigenschaften annehmen. In beiden Fällen ist die Gefahr eines Nicht-Ansprechens auf Trastuzumab bei HER2-positivem Primärtumor jedoch eher gering. Die Bestimmung der HER2-Expression in metastasierten Lymphknoten würde sich dennoch lohnen. Denn für die Patienten mit hoher HER2-Expression in den Lymphknoten wäre eine HER2-gerichtete Therapie denkbar - zwar nicht zur direkten Tumorbekämpfung, aber zur Eindämmung der Metastasierung.

Zusammengefasst legen diese Daten offen, dass trotz teilweise guten Übereinstimmungen in der Proteinexpression von Lymphknotenmetastase und Primärtumor in einigen Patienten Expressionsänderungen zu beobachten sind. Dies sollte Anstoß zu der Überlegung geben nicht nur den Tumor selbst sondern auch seine Metastasen vor der Therapie auf molekulare Marker zu untersuchen. Im Moment werden die axialen Lymphknoten bei Verdacht auf Metastasierung zwar routinemäßig entfernt, aber nur mittels HE-Färbung auf das Auftreten von Metastasen geprüft. Eine molekularbiologische Untersuchung befallener Lymphknoten wäre daher für den Patienten mit keiner zusätzlichen Operation verbunden, könnte jedoch die Heilungschancen deutlich verbessern.

## **5.6 Etablierung eines quantitativen Ansatzes zur HER2-Bestimmung im Mammakarzinom**

Zurzeit sind die Immunhistochemie (IHC) und die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) die Standardmethoden zur Bestimmung des klinischen HER2-Status beim Mammakarzinom. Problematisch dabei ist, dass mit keiner der beiden Methoden eine quantitative Bestimmung der HER2 Expression möglich ist. Mittels FISH wird nur der Amplifikationsstatus des *her2* Gens bestimmt, während es bei der Verwendung der IHC zwar zur Anfärbung der HER2 Proteine kommt, aber die Bestimmung der Expressionshöhe von der subjektiven Beurteilung des Pathologen beeinflusst wird. Die Verwendung des RPPA würde eine computerbasierte und damit quantitative HER2-Bestimmung unter Beibehaltung der Verwendung von FFPE-Gewebe ermöglichen.

In dieser Studie wurde daher der klinische HER2-Status mit den mittels RPPA bestimmten Werten verglichen. Dazu wurde zunächst ein Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen HER2-positiv und HER2-negativ ermittelt. Dieser lag bei 12 pg/ng und konnte in zwei Validierungskollektiven bestätigt werden. Da dies die bisher erste Studie zur quantitativen Bestimmung von HER2 mittels RPPA darstellt, können darüber hinaus keine direkten Vergleichswerte zur Überprüfung des Schwellenwerts herangezogen werden. In zwei veröffentlichten Studien wurde die HER2-Expression jedoch mittels ELISA bestimmt. Larson *et al.* untersuchten unter Verwendung dieser Methode verschiedene Mammakarzinomzelllinien auf die Expression von HER2. Die dabei erhaltenen Werte

reichten von 1,0 bis 295 ng HER2/mg Gesamtprotein (Larson et al. 2010). Ebenfalls unter Verwendung eines ELISA untersuchte eine andere Gruppe 149 stickstoffgelagerte Mammakarzinomgewebe und ermittelte Werte von 0,0 bis 214,0 ng HER2/mg Gesamtprotein. Der Schwellenwert (HER2-positiv/HER2-negativ) wurde nach Abstimmung mit der IHC bei 6,0 ng HER2/mg Gesamtprotein festgesetzt (Solbach et al. 2003). Die RPPA-Werte (0,0 – 31 pg HER2/ng Gesamtprotein) liegen damit eine Einheit über den ELISA-Werten (ng/mg  $\triangleq$  fg/ng). Allerdings befindet sich die Anzahl an positiven Fällen sowohl in der Studie von Solbach *et al.* als auch in der hier vorliegenden Arbeit mit 29,5 % bzw. 21,5 % in einem ähnlichen Bereich. Beide Anteile befinden sich darüber hinaus in der in zahlreichen klinischen Studien bestätigten Spannweite HER2-positiven Fällen (15-30 %) (Buzdar et al. 2005; Muss et al. 1994). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die deutlichen Unterschiede der zur Detektion eingesetzten Volumina (1 nl im RPPA, 100  $\mu$ l im ELISA) zu einem unterschiedlichen Protein/Antikörper-Bindungsverhalten führen. Eine proportionale Beziehung der mit den beiden Methoden ermittelten Konzentrationen ist damit nicht gegeben. Die lineare Umrechnung der im ELISA gemessenen Werte von ng/mg Gesamtprotein in fg/ng Gesamtprotein ist somit nicht möglich. Auf die klinische Aussagekraft der jeweiligen Methode hat dies jedoch keinen Einfluss.

Die durchgeführte Bestimmung des HER2-Status und klinischen Parametern bestätigte diese Vermutung. Der gezeigte inverse Zusammenhang von HER2-Status und ER-Status, sowie die positive Beziehung zwischen HER2-Status und Grading ist auch durch eine Vielzahl anderer Studien belegt (Lal et al. 2005; Onitilo et al. 2009; Rilke et al. 1991). Dies gilt ebenfalls dafür, dass kein Zusammenhang mit den Parametern Tumorgroße und Nodalstatus nachgewiesen werden kann (Al-Ahwal 2006; Ayadi et al. 2008; Hoff et al. 2002). Über die Beziehung von HER2-Status und PR-Status kann aus der Literatur keine klare Aussage entnommen werden. So wird einerseits, wie in dieser Studie, kein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern beobachtet (Al-Ahwal 2006). Andererseits gibt es aber auch Untersuchungen, die ein inverses Verhalten von HER2-Status und PR-Status beschreiben (Ayadi et al. 2008).

Unter Verwendung des etablierten Schwellenwerts von 12 pg/ng Gesamtprotein konnte eine Übereinstimmung von durchschnittlich 93 % mit der IHC erreicht werden. Bei der verblindeten Reanalyse der nicht-übereinstimmenden Fälle mit beiden Vorgehensweisen

(IHC/FISH und RPPA) zeigte sich nach der RPPA Analyse für keinen der Fälle ein Unterschied zur ersten Bestimmung. Die Ergebnisse, welche nach IHC/FISH erhalten wurden, hingegen änderten sich in fünf der elf untersuchten Fälle. In einem Fall änderte sich die Einstufung durch den Pathologen sogar von HER2 IHC-Status 3 auf HER2 IHC-Status 1. Dies zeigt deutlich den Einfluss der subjektiven Einstufung der Präparate. Die bestehen bleibende Abweichung der weiteren sechs Fälle könnte aufgrund methodischer Unterschiede entstanden sein. Der genaue Grund lässt sich mit diesen Daten jedoch nicht endgültig klären.

Es kann somit festgehalten werden, dass der RPPA zur Bestimmung des klinisch relevanten HER2-Status valide und reproduzierbare Ergebnisse liefert und somit für diesen Zweck verwendet werden kann. Im Vergleich zur IHC/FISH bietet der RPPA überdies die Möglichkeit einer objektiven Quantifizierung des Proteingehalts. Die Verwendung eines rekombinanten Proteins als Standard ermöglicht eine genaue, quantitative Auswertung mit numerischen Resultaten. Dies minimiert die Möglichkeit einer Fehldeutung des Ergebnisses und vereinfacht die Vergleichbarkeit der Resultate. Durch die Auftragung einer Verdünnungsreihe in Replikaten kann selbst bei stark unterschiedlichem Gehalt an HER2 in den Proben ein zu schwaches Signal ebenso wie eine Signalsättigung vermieden werden (Berg et al. 2010; Wulfkuhle et al. 2006). Darüber hinaus hat der RPPA den Vorteil, dass mit nur wenigen Mikrolitern Lysat die Expression einer Vielzahl an Proteinen sowie deren Phosphorylierungsstatus untersucht werden kann (Liotta et al. 2003). Auf die Bedeutung dieser Möglichkeit wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen. Obwohl bis dahin noch einige Hürden zu nehmen sind (Berg et al. 2010), zeigen die hier vorgelegten Daten, dass eine Implementierung des RPPA zur Bestimmung des HER2-Status in die klinische Routine möglich ist und zu einer erhöhten Objektivität bei der Therapieplanung beitragen kann.

## **5.7 Prognostische Bedeutung der aktivierten Formen der HER-Proteine im Mammakarzinom**

Wie im vorhergehenden Abschnitt diskutiert, eignet sich der RPPA zur klinischen Bestimmung des HER2-Status im Mammakarzinom, welcher vom behandelnden Arzt zur Therapiefindung verwendet wird. HER2-positiven Patienten wird zusätzlich zur Chemotherapie meist eine Behandlung mit dem HER2-spezifischen therapeutischen Antikörper Trastuzumab empfohlen (Harris et al. 2007). Dieser soll durch Bindung an den Rezeptor das Auslösen einer intrazellulären, proliferationsfördernden Signalkaskade verhindern (Valabrega et al. 2007). Da solch eine Kaskade erst nach Aktivierung von HER2 durch Phosphorylierung ausgelöst wird, liegt die hohe Relevanz dieser postrationalen Modifikation in diesem Zusammenhang auf der Hand. Dennoch stützt sich die Therapieentscheidung bis heute nur auf den Amplifikationsstatus des Gens sowie auf die Expressionshöhe des Rezeptors. Auch der Expressions- und Phosphorylierungsstatus der anderen Mitglieder der HER-Familie wird bis zum heutigen Zeitpunkt nicht in die Therapieentscheidung mit einbezogen. Dies ist jedoch von entscheidender Bedeutung, da HER2 selbst keine Bindungsstelle für extrazelluläre Signale, wie Wachstumsfaktoren, aufweist (Garrett et al. 2003), sondern primär durch Dimerisierung mit anderen, aktivierten Vertretern der HER-Familie zur Signaltransduktion angeregt wird (Graus-Porta et al. 1997). Die fehlende Miteinbeziehung dieser Faktoren in die Therapiefindung wird als ein Grund für die relativ niedrige Ansprechrate von HER2-positiven Patienten auf eine Trastuzumab-Therapie angesehen.

### **5.7.1 Nachweis von *p*-HER2-Expression in klinisch HER2-negativen Mammakarzinomen**

In dieser Arbeit wurde daher unter Verwendung des RPPA eine simultane Analyse der HER2-Expressionshöhe sowie des Phosphorylierungsstatus von HER2 an der Aminosäure Tyr1248, von HER3 am Tyrosin 1289 und von EGFR an der Aminosäure Tyr1086 durchgeführt. Diese gelten jeweils als eine der primären Phosphorylierungsstellen (Cicenas et al. 2006; Dittmar et al. 2002; Lee-Hoeflich et al. 2008; Lombardo et al. 1995) und wurden aus diesem Grund für die Untersuchung ausgewählt. Für den phosphorylierten Rezeptor HER4 konnte kein für den RPPA geeigneter Antikörper etabliert werden.

Die Analyse von 120 Mammakarzinomfällen ergab, dass in erstaunlicherweise 21 % der Fälle eine p-HER2-Expression nachzuweisen war, jedoch keine Expression des unphosphorylierten Rezeptors. Eine Erklärung hierfür ist die Lage der Bindungsstelle des HER2-Antikörpers am HER2-Molekül. Dieses liegt nach Herstellerangaben ebenso wie die Phosphorylierungsstelle Tyr1248 in der intrazellulären Domäne des Rezeptors. Auch wenn keine genaue Sequenz des Epitops bekannt ist, kann vermutet werden, dass eine Bindung des HER2-gerichteten Antikörpers durch Phosphorylierung des Rezeptors verhindert wird. Da in dieser Arbeit derselbe HER2-Antikörper verwendet wurde wie in der IHC der Krankenhausroutine, gilt dies auch für die dort stattfindenden Diagnostikuntersuchungen. Alle Patientinnen, welche eine nahezu vollständige Phosphorylierung von HER2 aufweisen, werden somit fälschlicherweise als HER2-negativ eingestuft, obwohl sie wahrscheinlich von einer Trastuzumab-Therapie profitieren würden. Zu demselben Schluss kommt auch eine bisher unveröffentlichte Studie von Emanuel III Petricoin *et al.*. Seine Gruppe untersuchte, zeitgleich zu der von mir durchgeführten Analyse, ebenfalls den Zusammenhang der HER2- und p-HER2-Expression im Mammakarzinom, allerdings in Gefriergewebe. Auch hier zeigte sich, dass in einigen Patienten (16%; 7 von 44) eine p-HER2 Expression auftritt, obwohl kein HER2 detektierbar ist. Die Unabhängigkeit der beiden Ansätze, sowohl räumlich als auch bezüglich der Prozessierung des Gewebes, bestärkt die Relevanz der gefundenen Ergebnisse.

Darüber hinaus stehen diese Resultate in Einklang mit der Beobachtung von Paik *et al.*, die eine Reanalyse eines 2005 als HER2-positiv bestimmten Kollektivs (1787 Mammakarzinomfälle) durchführten (Paik et al. 2008). Dabei stellte sich heraus, dass etwa zehn Prozent der HER2-positiv eingestuften Patienten in Wahrheit HER2-negativ waren. Dennoch sprachen die Patientinnen auf die HER2-Therapie an. Ihre Wahrscheinlichkeit auf ein krankheitsfreies Überleben war dreimal höher als bei einer HER2-negativen Vergleichsgruppe ohne Therapie (Paik et al. 2008). Die Vermutung ist daher, dass diese Patientinnen eventuell p-HER2-positiv sind und aus oben genannten Gründen nur „fälschlicherweise“ als HER2-negativ eingestuft wurden.

Dieser Klassifikationsfehler könnte umgangen werden, indem ein Antikörper verwendet wird, welcher HER2 unabhängig vom Phosphorylierungsstatus erkennt. Noch bessere wäre



es jedoch, zusätzlich zur HER2-Bestimmung auch den p-HER2 Status zu bestimmen. Dies hätte den Vorteil, dass nicht nur eine Aussage über den Expressionszustand sondern auch über den für die Signaltransduktion relevanten Phosphorylierungsstatus des Rezeptors getroffen werden könnte.

### **5.7.2 Aktivierungsstatus der HER-Rezeptoren im Zusammenhang mit der HER2-Expression**

Auch der Phosphorylierungszustand der anderen Vertreter der HER-Familie hat einen Einfluss auf die HER2-vermittelte Signaltransduktion. Eine verstärkte Aktivierung von p-EGFR, p-HER3 und p-HER4 im Tumor kann kompensatorisch auf eine HER2-Inhibierung wirken und so zu einem schlechten Ansprechen des Patienten führen. Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, zeigen 14 % der HER2-negativen Patienten eine hohe Aktivierung des EGFR und 23 % eine hohe Aktivierung von HER3. Allerdings ist zu beachten, dass für die phosphorylierten Proteine (p-HER2, p-HER3, p-EGFR) keine klinisch bestimmten Vergleichswerte vorlagen. Der Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen „positiv“ und „negativ“ wurde daher nach laborinternen Erfahrungswerten auf eine normalisierte Intensität (siehe 3.20.3) von 1000 festgelegt.

Das Auftreten HER2-negativer, p-HER2-positiver Patienten bestätigt auch die durchgeführte hierarchischen Clusteranalyse. Für diese Art des Datenvergleichs ist keine Gruppierung in negativ/positiv nötig. Stattdessen werden die kontinuierlichen Daten verwendet. In den gefundenen Patientensubgruppen 1 und 2 kam es zu einer Paarung der Expression von p-HER2 und p-HER3 und invers dazu von HER2 und p-EGFR. Therapeutisch besonders interessant sind die Patienten der p-HER2/p-HER3-positiven, HER2/p-EGFR-negativen Gruppe. Diese Patienten würden nach heutigen Standards keine HER2-gerichtete Therapie bekommen, obwohl sie einen hohen Aktivierungsgrad der HER-Rezeptoren aufweisen. Vor allem die Erkenntnis, dass sich die beiden Subgruppen nicht durch bekannte prognostische Parameter unterscheiden ließen, macht deutlich wie wichtig eine detaillierte Analyse des (HER)-Expressionsprofils der Patienten wäre.



## 5.8 Identifikation neuer molekularer Marker im Adenokarzinom des Ösophagus

Anders als für das bisher untersuchte Mammakarzinom, sind die Therapiemöglichkeiten beim Ösophaguskarzinom bis heute sehr begrenzt. Eine groß angelegte Kohortenstudie von Rouvelas *et al.* ergab, dass etwa 75 % der Patienten nur palliativ behandelt werden (Rouvelas *et al.* 2005). Daher besteht ein großer Bedarf an der Erforschung und Etablierung prognostischer oder therapeutischer molekularer Marker.

In der in dieser Arbeit durchgeführten Studie wurde das Potenzial des RPPA daher genutzt, um molekulare Markersignaturen beim Adenokarzinom des Ösophagus zu identifizieren. Unter Verwendung verschiedener Herangehensweisen (Schwellenwertanalyse, Clusteranalyse und Western Blot) konnte belegt werden, dass p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> und HER2 neue, von bisherigen Parametern unabhängige Marker für die Diagnose von Ösophaguspatienten darstellten. Dabei waren eine niedrige Expression von HER2 sowie eine hohe Expression von p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> mit einem guten Gesamtüberleben verbunden. Die Unabhängigkeit beider Marker voneinander zeigte sich neben der durchgeführten Cox-Regressionsanalyse auch durch den Synergieeffekt auf das Gesamtüberleben von Patienten mit beiden Eigenschaften.

Die Tatsache, dass eine HER2 Überexpression oder Genamplifikation mit einer schlechten Überlebensprognose einhergeht, ist für viele Tumorentitäten, wie unter anderem für das Mammakarzinom, (Emens 2005; Piccart *et al.* 2001; Slamon *et al.* 1989; Slamon *et al.* 2001) bekannt. Kürzlich konnte dies auch für das Ösophagusadenokarzinom bestätigt werden (Brien *et al.* 2000; Langer *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu gibt es bisher keine Studie, die den Einfluss von p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> in humanem Tumorgewebe untersucht hat. Eine Studie von Kawanishi *et al.* belegt jedoch, dass eine hohe Expression von HSP27 mit einem guten Gesamtüberleben im zweiten Typ des Ösophaguskarzinoms, dem Plattenepithelkarzinom, in Zusammenhang zu bringen ist (Kawanishi *et al.* 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die HSP27 Expression von normalem Ösophagusgewebe über die Krebsvorstufe der Barrett-Metaplasie hin zum Ösophagusadenokarzinom deutlich abnimmt (Soldes *et al.* 1999). Aus der Clusteranalyse in dieser Arbeit wurde deutlich, dass HSP27 ein dem p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> ähnliches Expressionsprofil zeigt. Daher kann das in den

vorherigen Studien vermutete prognostisches Potential von HSP27 zwar im Prinzip bestätigt werden, allerdings erreichte nur p-HSP27<sup>(Ser15)</sup>, das bisher nicht berücksichtigt wurde, in der univariaten Schwellenwertanalyse prognostische Relevanz.

Neben dem prognostischen Potential der beiden Proteine, war es eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit, dass sich die Expressionslevel von HER2 und p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> in vielen Patienten invers verhalten. Dieser Zusammenhang wurde bisher in keiner anderen Studie untersucht, birgt jedoch ein hohes therapeutisches Potential. Wie oben dargelegt, haben Patienten mit niedriger HSP27-Expression ein schlechtes Gesamtüberleben. Trotz der eher anti-apoptischen Eigenschaften des Proteins (Lanneau et al. 2010; Mairesse et al. 1998) ist dieser Zusammenhang auch für andere Tumorentitäten bekannt (Duval et al. 2006; Geisler et al. 1999; Lebret et al. 2003; Lo Muzio et al. 2006). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Adenokarzinompatienten mit einer geringen Menge an HSP27 schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen (Langer et al. 2008). Dies wird als ein weiterer Grund für die schlechte Prognose von Patienten mit niedriger HSP27-Expression gesehen. Die Erkenntnis dieser Arbeit, dass gerade diese Gruppe von Patienten eine hohe HER2-Expression aufweist, birgt die Chance auf eine für diese Krebsentität neue Therapiemöglichkeit: Die HER2-gerichtete Antikörpertherapie. Wie in den Abschnitten 5.6 und 5.7 schon ausführlich diskutiert, ist diese Therapie bei HER2-überexprimierenden Mammakarzinomen bereits gut etabliert. Zudem legte eine Studie von Kang *et al.* offen, dass die Herabregulation von HSP27 durch siRNA die Empfänglichkeit von humanen Mammakarzinomzellen für eine Trastuzumab-Therapie erhöhte (Kang et al. 2008). Des Weiteren konnte in der kürzlich veröffentlichten ToGA-Studie gezeigt werden, dass eine HER2-spezifische Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab auch für die Behandlung von Karzinomen des Magens sowie des gastro-ösophagealen Übergangs geeignet ist und hohe Ansprechraten erreicht werden (Bang et al. 2010). Die Nähe der beiden Entitäten zum Ösophagus unterstützt die Vermutung einer Wirksamkeit von Trastuzumab beim ösophagealen Adenokarzinom. Vor dem Hintergrund der ToGA-Studie sowie den Erkenntnisse dieser Arbeit ist eine klinische Studie der nächste Schritt, um die Wirksamkeit der Therapie zu überprüfen und so möglicherweise eine verbesserte Behandlung der Ösophaguskarzinompatienten zu realisieren.

## 6 AUSBLICK

Bei neuen Ansätzen zur Behandlung von Tumorpatienten nimmt die umfassende Charakterisierung deregulierter Signalproteine im erkrankten Gewebe eine Schlüsselrolle ein. Damit lassen sich zum einen Zielstrukturen für effektivere Therapien entwickeln, zum anderen stellen abnormal exprimierte und aktivierte Signalmoleküle Biomarker dar, um Patienten für diese neuen Therapieoptionen auswählen zu können. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an solchen potentiellen Biomarkern veröffentlicht. Dass nur ein Bruchteil davon den Sprung in die Klinik erreicht hat, ist verschiedenen Hindernissen zuzurechnen. So mangelt es Erkenntnissen aus Zellkulturstudien an der Einbeziehung des komplexen Zusammenspiels eines Tumors mit der extrazellulären Matrix oder dem Immunsystem. Wird Patientengewebe untersucht, greifen die meisten Forschungsgruppen auf Gefriergewebe zurück, welches jedoch nicht oder nur mit großem logistischem Aufwand in die klinische Routine implementiert werden kann. Darüber hinaus werden Therapiemarker häufig als allein stehend und ohne ihren biologischen Zusammenhang betrachtet, was bei einer gerichteten Behandlung zu nicht vorhergesehenen Kompensationsmechanismen der Tumorzellen führen kann. In der vorliegenden Arbeit sollten diese Aspekte berücksichtigt und umgangen werden. Die Kombination einer Proteinextraktion aus routinemäßig fixierten Geweben mit der Antikörper-basierten Hochdurchsatztechnologie des RPPA erwies sich dabei als optimal um Expressions- und Aktivierungsprofile der Tumorgewebe analysieren zu können. Durch dieses Vorgehen konnten bestehende Proteinbiomarker wie HER2 im Mammakarzinom bestätigt werden und neue wie p-HER2 im Mammakarzinom oder die Kombination von p-HSP27<sup>(Ser15)</sup> und HER2 im Ösophaguskarzinom entdeckt werden. Der nächste Schritt ist nun das Potential der gefunden Proteinmarker weiter zu überprüfen, bestenfalls in prospektiven Studien. Dazu ist eine enge Zusammenarbeit mit Ärzten und (Pharma-)Unternehmen nötig. Daher befindet sich unsere Arbeitsgruppe im Moment im Aufbau einer Kooperation mit mehreren biopharmazeutischen Unternehmen. Parallel dazu werden die mittels RPPA gefunden Signalnetzwerke der Marker funktionell in Zellkulturstudien überprüft, um das oben bereits erwähnte, wichtige biologische Verständnis über die Wirkungsweise und Wechselwirkung der Marker zu erweitern.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrams, SI, Hand, PH, Tsang, KY and Schlom, J (1996). "Mutant ras epitopes as targets for cancer vaccines." *Semin Oncol* **23**(1): 118-134.
- Addis, MF, Tanca, A, Pagnozzi, D, Crobu, S, et al. (2009). "Generation of high-quality protein extracts from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues." *Proteomics* **9**(15): 3815-3823.
- AGO (2010). Brustkrebs - AGO Empfehlungen 2010, Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
- Aguirre-Ghiso, JA, Liu, D, Mignatti, A, Kovalski, K, et al. (2001). "Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo." *Mol Biol Cell* **12**(4): 863-879.
- Akkiprik, M, Nicorici, D, Cogdell, D, Jia, YJ, et al. (2006). "Dissection of signaling pathways in fourteen breast cancer cell lines using reverse-phase protein lysate microarray." *Technol Cancer Res Treat* **5**(6): 543-551.
- Al-Ahwal, MS (2006). "HER-2 positivity and correlations with other histopathologic features in breast cancer patients--hospital based study." *J Pak Med Assoc* **56**(2): 65-68.
- al-Kasspooles, M, Moore, JH, Orringer, MB and Beer, DG (1993). "Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas." *Int J Cancer* **54**(2): 213-219.
- Aldrian, S, Kindas-Mugge, I, Trautinger, F, Frohlich, I, et al. (2003). "Overexpression of Hsp27 in a human melanoma cell line: regulation of E-cadherin, MUC18/MCAM, and plasminogen activator (PA) system." *Cell Stress Chaperones* **8**(3): 249-257.
- Almoguera, C, Shibata, D, Forrester, K, Martin, J, et al. (1988). "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes." *Cell* **53**(4): 549-554.
- Arakawa, T and Tsumoto, K (2003). "The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation." *Biochem Biophys Res Commun* **304**(1): 148-152.
- Ayadi, L, Khabir, A, Amouri, H, Karray, S, et al. (2008). "Correlation of HER-2 over-expression with clinicopathological parameters in Tunisian breast carcinoma." *World J Surg Oncol* **6**: 112.
- Azam, M, Qureshi, A and Mansoor, S (2009). "Comparison of estrogen receptors, progesterone receptors and HER-2/neu expression between primary and metastatic breast carcinoma." *J Pak Med Assoc* **59**(11): 736-740.
- Bang, YJ, Van Cutsem, E, Feyereislova, A, Chung, HC, et al. (2010). "Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial." *Lancet* **376**(9742): 687-697.
- Barengolts, EI, Kouznetsova, T, Segalene, A, Lathon, P, et al. (1996). "Effects of progesterone on serum levels of IGF-1 and on femur IGF-1 mRNA in ovariectomized rats." *J Bone Miner Res* **11**(10): 1406-1412.
- Beato, M and Sanchez-Pacheco, A (1996). "Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex." *Endocr Rev* **17**(6): 587-609.
- Becker, K and Porschewski, P (2006). "Proteinextraktion aus Formalin-fixiertem Gewebe (WO 2006/122898 A1)."
- Becker, KF, Mack, H, Schott, C, Hipp, S, et al. (2008). "Extraction of phosphorylated proteins from formalin-fixed cancer cells and tissues." *TOPATJ* **2**: 44-52.
- Becker, KF, Schott, C, Becker, I and Höfler, H (2008). "Guided protein extraction from formalin-fixed tissues for quantitative multiplex analysis avoids detrimental effects of histological stains." *Proteomics Clin Appl* **2**(5): 737-743.
- Becker, KF, Schott, C, Hipp, S, Metzger, V, et al. (2007). "Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis." *J Pathol* **211**(3): 370-378.
- Becker, KF, Schott C, Becker I, Höfler, H (2008). "Guided protein extraction from formalin-fixed tissues for quantitative multiplex analysis avoids detrimental effects of histological stains." *Proteomics Clin Appl* **2**: 737-743.
- Becker, KF, Schott, C., Becker, I., and Höfler, H. (2008). "Guided protein extraction from formalin-fixed tissues for quantitative multiplex analysis avoids detrimental effects of histological stains." *Proteomics Clin Appl* **2**: 737-743.
- Behrendt, N, Ronne, E and Dano, K (1996). "Domain interplay in the urokinase receptor. Requirement for the third domain in high affinity ligand binding and demonstration of ligand contact sites in distinct receptor domains." *J Biol Chem* **271**(37): 22885-22894.

- Ben-Ezra, J, Johnson, DA, Rossi, J, Cook, N, et al. (1991). "Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction." *J Histochem Cytochem* **39**(3): 351-354.
- Berg, D, Hipp, S, Malinowsky, K, Bollner, C, et al. (2010). "Molecular profiling of signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded cancer tissues." *Eur J Cancer* **46**(1): 47-55.
- Berx, G, Cleton-Jansen, AM, Nollet, F, de Leeuw, WJ, et al. (1995). "E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers." *EMBO J* **14**(24): 6107-6115.
- Bhudevi, B and Weinstock, D (2003). "Detection of bovine viral diarrhoea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman)." *J Virol Methods* **109**(1): 25-30.
- Blume-Jensen, P and Hunter, T (2001). "Oncogenic kinase signalling." *Nature* **411**(6835): 355-365.
- Bonferroni, C (1936). "Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità." *Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze* **8**: 3-62.
- Bonkhoff, H, Fixemer, T, Hunsicker, I and Remberger, K (2000). "Estrogen receptor gene expression and its relation to the estrogen-inducible HSP27 heat shock protein in hormone refractory prostate cancer." *Prostate* **45**(1): 36-41.
- Bosetti, C, Levi, F, Ferlay, J, Garavello, W, et al. (2008). "Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe." *Int J Cancer* **122**(5): 1118-1129.
- Boyd, ZS, Wu, QJ, O'Brien, C, Spoerke, J, et al. (2008). "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.
- Bresters, D, Schipper, ME, Reesink, HW, Boeser-Nunnink, BD, et al. (1994). "The duration of fixation influences the yield of HCV cDNA-PCR products from formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissue." *J Virol Methods* **48**(2-3): 267-272.
- Brien, TP, Odze, RD, Sheehan, CE, McKenna, BJ, et al. (2000). "HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma." *Hum Pathol* **31**(1): 35-39.
- Bunone, G, Briand, PA, Miksicek, RJ and Picard, D (1996). "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation." *EMBO J* **15**(9): 2174-2183.
- Burandt, E and Sauter, G (2010). "[HER2 ASCO guidelines. The answer to everything?]." *Pathologie* **31 Suppl 2**: 285-291.
- Butler, WB, Kirkland, WL and Jorgensen, TL (1979). "Induction of plasminogen activator by estrogen in a human breast cancer cell line (MCF-7)." *Biochem Biophys Res Commun* **90**(4): 1328-1334.
- Buzdar, AU, Ibrahim, NK, Francis, D, Booser, DJ, et al. (2005). "Significantly higher pa remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer." *J Clin Oncol* **23**(16): 3676-3685.
- Campbell, RA, Bhat-Nakshatri, P, Patel, NM, Constantinidou, D, et al. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance." *J Biol Chem* **276**(13): 9817-9824.
- Carnero, A, Blanco-Aparicio, C, Renner, O, Link, W, et al. (2008). "The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications." *Curr Cancer Drug Targets* **8**(3): 187-198.
- Chan, TO, Rittenhouse, SE and Tsichlis, PN (1999). "AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation." *Annu Rev Biochem* **68**: 965-1014.
- Chen, Y, Kelm, RJ, Jr., Budd, RC, Sobel, BE, et al. (2004). "Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1." *J Cell Biochem* **92**(1): 178-188.
- Chu, WS, Liang, Q, Liu, J, Wei, MQ, et al. (2005). "A nondestructive molecule extraction method allowing morphological and molecular analyses using a single tissue section." *Lab Invest* **85**(11): 1416-1428.
- Chung, JY, Lee, S. J., Kris, Y., Braunschweig, T., Traicoff, J. L., and Hewitt, S. M. (2008). "A well-based reverse-phase protein array applicable to extracts from formalin-fixed paraffin-embedded tissue." *Proteomics Clin. Appl* **2**: 1539-1547.
- Cianga, C, Cianga, P, Cozma, L, Diaconu, C, et al. (2003). "[Loss of hormonal receptors expression from primary breast carcinoma to axillary lymph node metastases]." *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* **107**(3): 540-544.
- Cicenas, J, Urban, P, Kung, W, Vuaroqueaux, V, et al. (2006). "Phosphorylation of tyrosine 1248-ERBB2 measured by chemiluminescence-linked immunoassay is an independent predictor of poor prognosis in primary breast cancer patients." *Eur J Cancer* **42**(5): 636-645.
- Ciocca, DR and Calderwood, SK (2005). "Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications." *Cell Stress Chaperones* **10**(2): 86-103.



- Collins, MT, Angulo, A, Buergelt, CD, Hennager, SG, et al. (1993). "Reproducibility of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis among eight laboratories." *J Vet Diagn Invest* **5**(1): 52-55.
- Compton, SJ and Jones, CG (1985). "Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay." *Anal Biochem* **151**(2): 369-374.
- Connolly, J and Rose, D (1997). "Expression of the invasive phenotype by MCF-7 human breast cancer cells transfected to overexpress protein kinase C-alpha or the erbB2 proto-oncogene." *Int J Oncol* **10**(1): 71-76.
- Cook, MB, Chow, WH and Devesa, SS (2009). "Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005." *Br J Cancer* **101**(5): 855-859.
- D'Alessio, S and Blasi, F (2009). "The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction." *Front Biosci* **14**: 4575-4587.
- Das, U, Hariprasad, G, Ethayathulla, AS, Manral, P, et al. (2007). "Inhibition of protein aggregation: supramolecular assemblies of arginine hold the key." *PLoS One* **2**(11): e1176.
- Deng, G, Curriden, SA, Wang, S, Rosenberg, S, et al. (1996). "Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?" *J Cell Biol* **134**(6): 1563-1571.
- Dittmar, T, Husemann, A, Schewe, Y, Nofer, JR, et al. (2002). "Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via EGFR." *FASEB J* **16**(13): 1823-1825.
- Doak, SH, Jenkins, GJ, Parry, EM, Griffiths, AP, et al. (2004). "Differential expression of the MAD2, BUB1 and HSP27 genes in Barrett's oesophagus-their association with aneuploidy and neoplastic progression." *Mutat Res* **547**(1-2): 133-144.
- Dubeau, L, Chandler, LA, Gralow, JR, Nichols, PW, et al. (1986). "Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens." *Cancer Res* **46**(6): 2964-2969.
- Duval, A, Oлару, D, Campos, L, Flandrin, P, et al. (2006). "Expression and prognostic significance of heat-shock proteins in myelodysplastic syndromes." *Haematologica* **91**(5): 713-714.
- Eisen, MB, Spellman, PT, Brown, PO and Botstein, D (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-14868.
- Ejima, D, Yumioka, R, Tsumoto, K and Arakawa, T (2005). "Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography." *Anal Biochem* **345**(2): 250-257.
- Emens, LA (2005). "Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." *Am J Ther* **12**(3): 243-253.
- Escudier, B, Eisen, T, Stadler, WM, Szczylik, C, et al. (2007). "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma." *N Engl J Med* **356**(2): 125-134.
- Espina, V, Edmiston, K. H., Heiby, M., Pierobon, M., Sciro, M., Merritt, B., Banks, S., Deng, J., VanMeter, A. J., Geho, D. H., Pastore, L., Sennesh, J., Petricoin, E. F., 3rd, and Liotta, L. A. (2008). "A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process." *Mol Cell Proteomics* **7**: 1998-2018.
- Espina, V, Woodhouse, EC, Wulfkuhle, J, Asmussen, HD, et al. (2004). "Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies." *J Immunol Methods* **290**(1-2): 121-133.
- Farnell, YZ and Ing, NH (2002). "Estradiol and a selective estrogen receptor modulator affect steroid hormone receptor messenger RNA levels and turnover in explant cultures of sheep endometrium." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**(10): 595-600.
- Ferno, M, Bendahl, PO, Borg, A, Brundell, J, et al. (1996). "Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay." *Eur J Cancer* **32A**(5): 793-801.
- Fowler, JC, L. Jarvis, P. (1998). *Practical Statistics for Field Biology*, John Wiley & Sons.
- Franke, TF, Yang, SI, Chan, TO, Datta, K, et al. (1995). "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase." *Cell* **81**(5): 727-736.
- Frederick, MJ, VanMeter, AJ, Gadhikar, MA, Henderson, YC, et al. (2011). "Phosphoproteomic analysis of signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma patient samples." *Am J Pathol* **178**(2): 548-571.
- Gamallo, C, Palacios, J, Suarez, A, Pizarro, A, et al. (1993). "Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma." *Am J Pathol* **142**(4): 987-993.
- Gancberg, D, Di Leo, A, Cardoso, F, Rouas, G, et al. (2002). "Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites." *Ann Oncol* **13**(7): 1036-1043.

- Garrett, TP, McKern, NM, Lou, M, Elleman, TC, et al. (2003). "The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors." *Mol Cell* **11**(2): 495-505.
- Gebski, V, Burmeister, B, Smithers, BM, Foo, K, et al. (2007). "Survival benefits from neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy in oesophageal carcinoma: a meta-analysis." *Lancet Oncol* **8**(3): 226-234.
- Geisler, JP, Geisler, HE, Tammela, J, Miller, GA, et al. (1999). "A study of heat shock protein 27 in endometrial carcinoma." *Gynecol Oncol* **72**(3): 347-350.
- Germain, D (2011). "Estrogen carcinogenesis in breast cancer." *Endocrinol Metab Clin North Am* **40**(3): 473-484, vii.
- Giancotti, FG and Ruoslahti, E (1999). "Integrin signaling." *Science* **285**(5430): 1028-1032.
- Giguère, V (2003). *Handbook of Cell Signaling* Ed. Ralph A. Bradshaw and Edward A. Dennis, Chapter 275, Elsevier, Academic press, CA.
- Gillett, CE, Miles, DW, Ryder, K, Skilton, D, et al. (2001). "Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast." *J Pathol* **193**(4): 433-441.
- Graus-Porta, D, Beerli, RR, Daly, JM and Hynes, NE (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." *EMBO J* **16**(7): 1647-1655.
- Grubb, RL, Calvert, VS, Wulkuhle, JD, Paweletz, CP, et al. (2003). "Signal pathway profiling of prostate cancer using reverse phase protein arrays." *Proteomics* **3**(11): 2142-2146.
- Grubb, RL, Deng, J, Pinto, PA, Mohler, JL, et al. (2009). "Pathway biomarker profiling of localized and metastatic human prostate cancer reveal metastatic and prognostic signatures." *J Proteome Res* **8**(6): 3044-3054.
- Hager, GL, Lim, CS, Elbi, C and Baumann, CT (2000). "Trafficking of nuclear receptors in living cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5): 249-254.
- Han, Y, Liu, L, Yan, D and Wang, G (2008). "Correlation between Expression of P38 MAPK-Signaling and uPA in Breast Cancer." *CHINESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY* **5**(3).
- Hapke, S, Kessler, H, Arroyo de Prada, N, Bengel, A, et al. (2001). "Integrin alpha(v)beta(3)/vitronectin interaction affects expression of the urokinase system in human ovarian cancer cells." *J Biol Chem* **276**(28): 26340-26348.
- Haringsma, J (2002). "Barrett's oesophagus: new diagnostic and therapeutic techniques." *Scand J Gastroenterol Suppl*(236): 9-14.
- Harris, L, Fritsche, H, Mennel, R, Norton, L, et al. (2007). "American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer." *J Clin Oncol* **25**(33): 5287-5312.
- He, CS, Wilhelm, SM, Pentland, AP, Marmer, BL, et al. (1989). "Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2632-2636.
- Heldin, CH (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." *Cell* **80**(2): 213-223.
- Hipp, S, Berg, D, Ergin, B, Schuster, T, et al. (2010). "Interaction of Snail and p38 mitogen-activated protein kinase results in shorter overall survival of ovarian cancer patients." *Virchows Arch* **457**(6): 705-713.
- Hipp, S, Walch, A, Schuster, T, Hofler, H, et al. (2008). "Precise measurement of the E-cadherin repressor Snail in formalin-fixed endometrial carcinoma using protein lysate microarrays." *Clin Exp Metastasis* **25**(6): 679-683.
- Hirade, K, Kozawa, O, Tanabe, K, Niwa, M, et al. (2002). "Thrombin stimulates dissociation and induction of HSP27 via p38 MAPK in vascular smooth muscle cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(3): H941-948.
- Hoff, ER, Tubbs, RR, Myles, JL and Procop, GW (2002). "HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade." *Am J Clin Pathol* **117**(6): 916-921.
- Hong, Z, Zhang, QY, Liu, J, Wang, ZQ, et al. (2009). "Phosphoproteome study reveals Hsp27 as a novel signaling molecule involved in GDNF-induced neurite outgrowth." *J Proteome Res* **8**(6): 2768-2787.
- Hothorn, T. (2009). "maxstat: Maximally Selected Rank Statistics. R package version 0.7-13; <http://CRAN.R-project.org/package=maxstat>".
- Hsu, CY, Ho, DM, Yang, CF and Chiang, H (2003). "Interobserver reproducibility of MIB-1 labeling index in astrocytic tumors using different counting methods." *Mod Pathol* **16**(9): 951-957.
- Hubbard, SR (2002). "Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition." *Curr Opin Struct Biol* **12**(6): 735-741.
- Huber, P (1981). "Robust statistics." *Wiley, New York*.
- Hudis, CA (2007). "Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice." *N Engl J Med* **357**(1): 39-51.

- Huff, KK and Lippman, ME (1984). "Hormonal control of plasminogen activator secretion in ZR-75-1 human breast cancer cells in culture." *Endocrinology* **114**(5): 1702-1710.
- Hynes, NE and Lane, HA (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* **5**(5): 341-354.
- Ikeda, K, Monden, T, Kanoh, T, Tsujie, M, et al. (1998). "Extraction and analysis of diagnostically useful proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections." *J Histochem Cytochem* **46**(3): 397-403.
- Innominato, PF, Focan, C, Gorlia, T, Moreau, T, et al. (2009). "Circadian rhythm in rest and activity: a biological correlate of quality of life and a predictor of survival in patients with metastatic colorectal cancer." *Cancer Res* **69**(11): 4700-4707.
- Janicke, F, Schmitt, M and Graeff, H (1991). "Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer." *Semin Thromb Hemost* **17**(3): 303-312.
- Janicke, F, Schmitt, M, Hafter, R, Hollrieder, A, et al. (1990). "Urokinase-type plasminogen activator (u-PA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer." *Fibrinolysis* **4**: 69-78.
- Janicke, F, Schmitt, M, Pache, L, Ulm, K, et al. (1993). "Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* **24**(3): 195-208.
- Janicke, F, Schmitt, M, Ulm, K, Gossner, W, et al. (1989). "Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer." *Lancet* **2**(8670): 1049.
- Jaulmes, A, Sansilvestri-Morel, P, Rolland-Valognes, G, Bernhardt, F, et al. (2009). "Nox4 mediates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 via p38 MAPK pathway in cultured human endothelial cells." *Thromb Res* **124**(4): 439-446.
- Kahlert, S, Nuedling, S, van Eickels, M, Vetter, H, et al. (2000). "Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway." *J Biol Chem* **275**(24): 18447-18453.
- Kamer, C (2007). Vom Primärtumor zur Metastase: uPA (Urokinasetyp-Plasminogenaktivator) und PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1) Gehalt im primären Mammakarzinomgewebe und korrespondierenden axillären Lymphknoten *Fakultät für Medizin München, TU München*.
- Kang, SH, Kang, KW, Kim, KH, Kwon, B, et al. (2008). "Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability." *BMC Cancer* **8**: 286.
- Kanse, SM, Kost, C, Wilhelm, OG, Andreasen, PA, et al. (1996). "The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells." *Exp Cell Res* **224**(2): 344-353.
- Kawanishi, K, Shiozaki, H, Doki, Y, Sakita, I, et al. (1999). "Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus." *Cancer* **85**(8): 1649-1657.
- Kietzmann, T, Jungermann, K and Gorch, A (2003). "Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases." *Thromb Haemost* **89**(4): 666-673.
- Kleiner, HE, Krishnan, P, Tubbs, J, Smith, M, et al. (2009). "Tissue microarray analysis of eIF4E and its downstream effector proteins in human breast cancer." *J Exp Clin Cancer Res* **28**: 5.
- Kortlever, RM, Higgins, PJ and Bernards, R (2006). "Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence." *Nat Cell Biol* **8**(8): 877-884.
- Kricka, LJ and Master, SR (2008). "Validation and quality control of protein microarray-based analytical methods." *Mol Biotechnol* **38**(1): 19-31.
- Lagergren, J and Lagergren, P (2010). "Oesophageal cancer." *BMJ* **341**: c6280.
- Lagergren, J, Ye, W, Bergstrom, R and Nyren, O (2000). "Utility of endoscopic screening for upper gastrointestinal adenocarcinoma." *JAMA* **284**(8): 961-962.
- Laino, C (2009). "Trastuzumab Increases Pathologic Complete Response Rates." *Oncology Times* **31**(4): 20-21.
- Lal, P, Tan, LK and Chen, B (2005). "Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas." *Am J Clin Pathol* **123**(4): 541-546.
- Lange, C and Rudolph, R (2009). "Suppression of protein aggregation by L-arginine." *Curr Pharm Biotechnol* **10**(4): 408-414.
- Langer, R, Feith, M, Siewert, JR, Wester, HJ, et al. (2008). "Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus." *BMC Cancer* **8**: 70.
- Langer, R, Ott, K, Specht, K, Becker, K, et al. (2008). "Protein expression profiling in esophageal adenocarcinoma patients indicates association of heat-shock protein 27 expression and chemotherapy response." *Clin Cancer Res* **14**(24): 8279-8287.
- Langer, R, Rauser, S, Feith, M, Nahrig, JM, et al. (2011). "Assessment of ErbB2 (Her2) in oesophageal adenocarcinomas: summary of a revised immunohistochemical evaluation system, bright field double in situ hybridisation and fluorescence in situ hybridisation." *Mod Pathol*.



- Langer, R, Von Rahden, BH, Nahrig, J, Von Weyhern, C, et al. (2006). "Prognostic significance of expression patterns of c-erbB-2, p53, p16INK4A, p27KIP1, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in oesophageal adenocarcinoma: a tissue microarray study." *J Clin Pathol* **59**(6): 631-634.
- Lanneau, D, Wettstein, G, Bonniaud, P and Garrido, C (2010). "Heat shock proteins: cell protection through protein triage." *ScientificWorldJournal* **10**: 1543-1552.
- Larson, JS, Goodman, LJ, Tan, Y, Defazio-Eli, L, et al. (2010). "Analytical Validation of a Highly Quantitative, Sensitive, Accurate, and Reproducible Assay (HERmark) for the Measurement of HER2 Total Protein and HER2 Homodimers in FFPE Breast Cancer Tumor Specimens." *Patholog Res Int* **2010**: 814176.
- Lebret, T, Watson, RW, Molinie, V, O'Neill, A, et al. (2003). "Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma." *Cancer* **98**(5): 970-977.
- Lee-Hoeflich, ST, Crocker, L, Yao, E, Pham, T, et al. (2008). "A central role for HER3 in HER2-amplified breast cancer: implications for targeted therapy." *Cancer Res* **68**(14): 5878-5887.
- Lengyel, E, Gum, R, Stepp, E, Juarez, J, et al. (1996). "Regulation of urokinase-type plasminogen activator expression by an ERK1-dependent signaling pathway in a squamous cell carcinoma cell line." *J Cell Biochem* **61**(3): 430-443.
- Lengyel, E, Stepp, E, Gum, R and Boyd, D (1995). "Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promoter activity by c-Ha-ras." *J Biol Chem* **270**(39): 23007-23012.
- Levin, ER (2009). "Plasma membrane estrogen receptors." *Trends Endocrinol Metab* **20**(10): 477-482.
- Liedtke, C, Gluz, O, Heitz, F, Wuerstlein, R, et al. (2011). "Systematic comparison of tumor phenotype in primary breast cancer versus corresponding lymph nodes and disease recurrences: Results of the retrospective multicenter WSG/DETECT PriMet study." *J Clin Oncol* **29**(abstr 1038).
- Lietzow, R (2006). "Herstellung von Nanosuspensionen mittels Entspannung überkritischer Fluide." *Cuvillier* **1-179**.
- Liotta, LA, Espina, V, Mehta, AI, Calvert, V, et al. (2003). "Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications." *Cancer Cell* **3**(4): 317-325.
- Liu, D, Aguirre Ghiso, J, Estrada, Y and Ossowski, L (2002). "EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma." *Cancer Cell* **1**(5): 445-457.
- Lo Muzio, L, Campisi, G, Farina, A, Rubini, C, et al. (2006). "Prognostic value of HSP27 in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective analysis of 57 tumours." *Anticancer Res* **26**(2B): 1343-1349.
- Lombardo, CR, Consler, TG and Kassel, DB (1995). "In vitro phosphorylation of the epidermal growth factor receptor autophosphorylation domain by c-src: identification of phosphorylation sites and c-src SH2 domain binding sites." *Biochemistry* **34**(50): 16456-16466.
- Look, MP, van Putten, WL, Duffy, MJ, Harbeck, N, et al. (2002). "Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients." *J Natl Cancer Inst* **94**(2): 116-128.
- Lyutova, EM, Kasakov, AS and Gurvits, BY (2007). "Effects of arginine on kinetics of protein aggregation studied by dynamic laser light scattering and turbidimetry techniques." *Biotechnol Prog* **23**(6): 1411-1416.
- Macabeo-Ong, M, Ginzinger, DG, Dekker, N, McMillan, A, et al. (2002). "Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses." *Mod Pathol* **15**(9): 979-987.
- Mairesse, N, Bernaert, D, Del Bino, G, Horman, S, et al. (1998). "Expression of HSP27 results in increased sensitivity to tumor necrosis factor, etoposide, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in an oxidative stress-resistant cell line." *J Cell Physiol* **177**(4): 606-617.
- Malinowsky, K, Bollner, C, Hipp, S, Berg, D, et al. (2010). "UPA and PAI-1 analysis from fixed tissues - new perspectives for a known set of predictive markers." *Curr Med Chem* **17**(35): 4370-4377.
- Malthaner, RA, Wong, RK, Rumble, RB and Zuraw, L (2004). "Neoadjuvant or adjuvant therapy for resectable esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis." *BMC Med* **2**: 35.
- Matthews, JR, Watson, SM, Tevendale, MC, Watson, CJ, et al. (2007). "Caspase-dependent proteolytic cleavage of STAT3alpha in ES cells, in mammary glands undergoing forced involution and in breast cancer cell lines." *BMC Cancer* **7**: 29.
- Mircean, C, Shmulevich, I, Cogdell, D, Choi, W, et al. (2005). "Robust estimation of protein expression ratios with lysate microarray technology." *Bioinformatics* **21**(9): 1935-1942.
- Moretti-Rojas, I, Fuqua, SA, Montgomery, RA, 3rd and McGuire, WL (1988). "A cDNA for the estradiol-regulated 24K protein: control of mRNA levels in MCF-7 cells." *Breast Cancer Res Treat* **11**(2): 155-163.
- Muraoka-Cook, RS, Sandahl, M, Husted, C, Hunter, D, et al. (2006). "The intracellular domain of ErbB4 induces differentiation of mammary epithelial cells." *Mol Biol Cell* **17**(9): 4118-4129.

- Murphy, LC and Watson, P (2002). "Steroid receptors in human breast tumorigenesis and breast cancer progression." *Biomed Pharmacother* **56**(2): 65-77.
- Muss, HB, Thor, AD, Berry, DA, Kute, T, et al. (1994). "c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer." *N Engl J Med* **330**(18): 1260-1266.
- Nakamura, T, Nekarda, H, Hoelscher, AH, Bollschweiler, E, et al. (1994). "Prognostic value of DNA ploidy and c-erbB-2 oncoprotein overexpression in adenocarcinoma of Barrett's esophagus." *Cancer* **73**(7): 1785-1794.
- Neeley, ES, Kornblau, SM, Coombes, KR and Baggerly, KA (2009). "Variable slope normalization of reverse phase protein arrays." *Bioinformatics* **25**(11): 1384-1389.
- Nerurkar, SS, Olzinski, AR, Frazier, KS, Mirabile, RC, et al. (2007). "P38 MAPK inhibitors suppress biomarkers of hypertension end-organ damage, osteopontin and plasminogen activator inhibitor-1." *Biomarkers* **12**(1): 87-112.
- New, L, Jiang, Y, Zhao, M, Liu, K, et al. (1998). "PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase." *EMBO J* **17**(12): 3372-3384.
- Nielsen-Preiss, SM, Silva, SR and Gillette, JM (2003). "Role of PTEN and Akt in the regulation of growth and apoptosis in human osteoblastic cells." *J Cell Biochem* **90**(5): 964-975.
- Nirmalan, NJ, Harnden, P, Selby, PJ and Banks, RE (2009). "Development and validation of a novel protein extraction methodology for quantitation of protein expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using western blotting." *J Pathol* **217**(4): 497-506.
- Nykjaer, A, Petersen, CM, Moller, B, Jensen, PH, et al. (1992). "Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes." *J Biol Chem* **267**(21): 14543-14546.
- Olayioye, MA (2001). "Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members." *Breast Cancer Res* **3**(6): 385-389.
- Onitilo, AA, Engel, JM, Greenlee, RT and Mukesh, BN (2009). "Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival." *Clin Med Res* **7**(1-2): 4-13.
- Paik, S, Kim, C and Wolmark, N (2008). "HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer." *N Engl J Med* **358**(13): 1409-1411.
- Party, MRCOCW (2002). "Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer: a randomised controlled trial." *Lancet* **359**(9319): 1727-1733.
- Pawelczak, CP, Charboneau, L, Bichsel, VE, Simone, NL, et al. (2001). "Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front." *Oncogene* **20**(16): 1981-1989.
- Pearson, G, Robinson, F, Beers Gibson, T, Xu, BE, et al. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-183.
- Penault-Llorca, F, Adelaide, J, Houvenaeghel, G, Hassoun, J, et al. (1994). "Optimization of immunohistochemical detection of ERBB2 in human breast cancer: impact of fixation." *J Pathol* **173**(1): 65-75.
- Petricoin, EF, Ardekani, AM, Hitt, BA, Levine, PJ, et al. (2002). "Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer." *Lancet* **359**(9306): 572-577.
- Piccart, M, Lohrisch, C, Di Leo, A and Larsimont, D (2001). "The predictive value of HER2 in breast cancer." *Oncology* **61 Suppl 2**: 73-82.
- Plaza-Menacho, I, van der Sluis, T, Hollema, H, Gimm, O, et al. (2007). "Ras/ERK1/2-mediated STAT3 Ser727 phosphorylation by familial medullary thyroid carcinoma-associated RET mutants induces full activation of STAT3 and is required for c-fos promoter activation, cell mitogenicity, and transformation." *J Biol Chem* **282**(9): 6415-6424.
- Polkowski, W, van Sandick, JW, Offerhaus, GJ, ten Kate, FJ, et al. (1999). "Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction." *Ann Surg Oncol* **6**(3): 290-297.
- Pramanik, R, Qi, X, Borowicz, S, Choubey, D, et al. (2003). "p38 isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-Jun. The determinant roles of the isoforms in the p38 MAPK signal specificity." *J Biol Chem* **278**(7): 4831-4839.
- Puchtler, H and Meloan, SN (1985). "On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions." *Histochemistry* **82**(3): 201-204.
- Raman, M, Chen, W and Cobb, MH (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." *Oncogene* **26**(22): 3100-3112.

- Rilke, F, Colnaghi, MI, Cascinelli, N, Andreola, S, et al. (1991). "Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors." *Int J Cancer* **49**(1): 44-49.
- Romer, MU, Larsen, L, Offenber, H, Brunner, N, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor 1 protects fibrosarcoma cells from etoposide-induced apoptosis through activation of the PI3K/Akt cell survival pathway." *Neoplasia* **10**(10): 1083-1091.
- Rong, SB, Hu, Y, Enyedy, I, Powis, G, et al. (2001). "Molecular modeling studies of the Akt PH domain and its interaction with phosphoinositides." *J Med Chem* **44**(6): 898-908.
- Rosivatz, E, Becker, KF, Kremmer, E, Schott, C, et al. (2006). "Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract." *Virchows Arch* **448**(3): 277-287.
- Rouvelas, I, Zeng, W, Lindblad, M, Viklund, P, et al. (2005). "Survival after surgery for oesophageal cancer: a population-based study." *Lancet Oncol* **6**(11): 864-870.
- Sachs, L (1992). *Angewandte Statistik*, Springer-Verlag.
- Samarakoon, R, Higgins, SP, Higgins, CE and Higgins, PJ (2008). "TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling." *J Mol Cell Cardiol* **44**(3): 527-538.
- Sharma, P, McQuaid, K, Dent, J, Fennerty, MB, et al. (2004). "A critical review of the diagnosis and management of Barrett's esophagus: the AGA Chicago Workshop." *Gastroenterology* **127**(1): 310-330.
- Sharp, S and Workman, P (2006). "Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status." *Adv Cancer Res* **95**: 323-348.
- Sheehan, KM, Calvert, VS, Kay, EW, Lu, Y, et al. (2005). "Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma." *Mol Cell Proteomics* **4**(4): 346-355.
- Sheehan, KM, Gulmann, C, Eichler, GS, Weinstein, JN, et al. (2008). "Signal pathway profiling of epithelial and stromal compartments of colonic carcinoma reveals epithelial-mesenchymal transition." *Oncogene* **27**(3): 323-331.
- Shetty, S, Rao, GN, Cines, DB and Bdeir, K (2006). "Urokinase induces activation of STAT3 in lung epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**(4): L772-780.
- Shi, SR, Liu, C, Balgley, BM, Lee, C, et al. (2006). "Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry." *J Histochem Cytochem* **54**(6): 739-743.
- Shin, BK, Wang, H and Yim, AM (2011). "Expression and Significance of p-p38 and uPA in Gastric Cancer Tissues." *Cancer Research*.
- Shushakova, N, Tkachuk, N, Dangers, M, Tkachuk, S, et al. (2005). "Urokinase-induced activation of the gp130/Tyk2/Stat3 pathway mediates a pro-inflammatory effect in human mesangial cells via expression of the anaphylatoxin C5a receptor." *J Cell Sci* **118**(Pt 12): 2743-2753.
- Slamon, DJ, Godolphin, W, Jones, LA, Holt, JA, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* **244**(4905): 707-712.
- Slamon, DJ, Leyland-Jones, B, Shak, S, Fuchs, H, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." *N Engl J Med* **344**(11): 783-792.
- Solbach, C, Roller, M, Budischewski, K, Loibl, S, et al. (2003). "EGF-R and Her2/neu overexpressing tumors: independent collectives for treatment of breast cancer by specific monoclonal antibody-therapy." *J Cancer Res Clin Oncol* **129**(4): 250-251.
- Soldes, OS, Kuick, RD, Thompson, IA, 2nd, Hughes, SJ, et al. (1999). "Differential expression of Hsp27 in normal oesophagus, Barrett's metaplasia and oesophageal adenocarcinomas." *Br J Cancer* **79**(3-4): 595-603.
- Sommer, S and Fuqua, SA (2001). "Estrogen receptor and breast cancer." *Semin Cancer Biol* **11**(5): 339-352.
- Specht, K, Richter, T, Muller, U, Walch, A, et al. (2001). "Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue." *Am J Pathol* **158**(2): 419-429.
- Stefansson, S and Lawrence, DA (1996). "The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin." *Nature* **383**(6599): 441-443.
- Sun, M, Paciga, JE, Feldman, RI, Yuan, Z, et al. (2001). "Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K." *Cancer Res* **61**(16): 5985-5991.
- Sutherland, DJ (1980). "Plasminogen-activating activity: association with steroid binding by cytosols of human breast cancers." *J Natl Cancer Inst* **64**(1): 3-7.

- Tabus, I, Hategan, A, Mircean, C, Rissanen, J, et al. (2006). "Nonlinear Modeling of Protein Expressions in Protein Arrays." *IEEE TRANSACTIONS ON SIGNAL PROCESSING* **54**(6): 2394-2407.
- Thangavel, C, Dean, JL, Ertel, A, Knudsen, KE, et al. (2011). "Therapeutically activating RB: reestablishing cell cycle control in endocrine therapy-resistant breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **18**(3): 333-345.
- Thorsen, T (1982). "Association of plasminogen activator activity and steroid receptors in human breast cancer." *Eur J Cancer Clin Oncol* **18**(2): 129-132.
- Tibes, R, Qiu, Y, Lu, Y, Hennessy, B, et al. (2006). "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.
- Untersteiner, H (2007). "Statistik-Datenauswertung mit Excel und SPSS." *facultas wuv* **2**.
- Usami, S, Moriya, T, Amari, M, Suzuki, A, et al. (2007). "Reliability of prognostic factors in breast carcinoma determined by core needle biopsy." *Jpn J Clin Oncol* **37**(4): 250-255.
- Valabrega, G, Montemurro, F and Aglietta, M (2007). "Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer." *Ann Oncol* **18**(6): 977-984.
- Vayalil, PK, Iles, KE, Choi, J, Yi, AK, et al. (2007). "Glutathione suppresses TGF-beta-induced PAI-1 expression by inhibiting p38 and JNK MAPK and the binding of AP-1, SP-1, and Smad to the PAI-1 promoter." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **293**(5): L1281-1292.
- Voshol, H, Ehrat, M, Traenkle, J, Bertrand, E, et al. (2009). "Antibody-based proteomics: analysis of signaling networks using reverse protein arrays." *FEBS J* **276**(23): 6871-6879.
- Walch, A, Bink, K, Hutzler, P, Hofler, H, et al. (2000). "HER-2/neu gene amplification by FISH predicts poor survival in Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma." *Hum Pathol* **31**(10): 1332-1334.
- Walch, A, Specht, K, Bink, K, Zitzelsberger, H, et al. (2001). "Her-2/neu gene amplification, elevated mRNA expression, and protein overexpression in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus." *Lab Invest* **81**(6): 791-801.
- Walch, A, Specht, K, Braselmann, H, Stein, H, et al. (2004). "Coamplification and coexpression of GRB7 and ERBB2 is found in high grade intraepithelial neoplasia and in invasive Barrett's carcinoma." *Int J Cancer* **112**(5): 747-753.
- Waltz, DA and Chapman, HA (1994). "Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy." *J Biol Chem* **269**(20): 14746-14750.
- Wang, R, Li, ZQ, Han, X, Li, BL, et al. (2010). "Integrin beta3 and its ligand regulate the expression of uPA through p38 MAPK in breast cancer." *APMIS* **118**(12): 909-917.
- Wessel, D and Flugge, UI (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." *Anal Biochem* **138**(1): 141-143.
- Whitley, BR, Beaulieu, LM, Carter, JC and Church, FC (2007). "Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates the balance between plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase to promote migration of SKOV-3 ovarian cancer cells." *Gynecol Oncol* **104**(2): 470-479.
- Wiegand, P, Domhover, J and Brinkmann, B (1996). "[DNA degradation in formalin fixed tissues]." *Pathologie* **17**(6): 451-454.
- Wilkinson, NW, Black, JD, Roukhadze, E, Driscoll, D, et al. (2004). "Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma." *J Gastrointest Surg* **8**(4): 448-453.
- Wittekind, C and Meyer, HJ (2010). "TNM. Klassifikation maligner Tumoren." *Weinheim Wiley* **7. Auflage**.
- Wolff, C, Malinowsky, K, Berg, D, Schragner, K, et al. (2011). "Signalling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis." *J Pathol* **223**(1): 54-63.
- Wolff, C, Schott, C, Porschewski, P, Reischauer, B, et al. (2011). "Successful protein extraction from over-fixed and long-term stored formalin-fixed tissues." *PLoS One* **6**(1): e16353.
- Woodgett, JR (2005). "Recent advances in the protein kinase B signaling pathway." *Curr Opin Cell Biol* **17**(2): 150-157.
- Wulfkuhle, JD, Edmiston, KH, Liotta, LA and Petricoin, EF, 3rd (2006). "Technology insight: pharmacoproteomics for cancer--promises of patient-tailored medicine using protein microarrays." *Nat Clin Pract Oncol* **3**(5): 256-268.
- Wulfkuhle, JD, Speer, R, Pierobon, M, Laird, J, et al. (2008). "Multiplexed cell signaling analysis of human breast cancer applications for personalized therapy." *J Proteome Res* **7**(4): 1508-1517.
- Yacoub, L, Goldman, H and Odze, RD (1997). "Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis." *Mod Pathol* **10**(2): 105-112.

- Zhang, D, Wong, LL and Koay, ES (2007). "Phosphorylation of Ser78 of Hsp27 correlated with HER-2/neu status and lymph node positivity in breast cancer." Mol Cancer **6**: 52.
- Zidan, J, Dashkovsky, I, Stayerman, C, Basher, W, et al. (2005). "Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease." Br J Cancer **93**(5): 552-556.
- Zivadinovic, D and Watson, CS (2005). "Membrane estrogen receptor-alpha levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells." Breast Cancer Res **7**(1): R130-144.



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 2-1</b> Dimerisierung und Aktivierung der Mitglieder der HER-Familie.....	10
<b>Abbildung 2-2</b> Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs.....	12
<b>Abbildung 2-3</b> Die Signaltransduktion der verschiedenen MAP-Kinase-Signalwegen. ....	14
<b>Abbildung 2-4</b> Aktivität des Plasminogen-Aktivierungssystem an der Zelloberfläche. ....	17
<b>Abbildung 2-5</b> Reaktionsmechanismus der Quervernetzung von Proteinen durch Formalin.....	19
<b>Abbildung 2-6</b> Übersicht über den Ablauf einer RPPA-Analyse.....	24
<b>Abbildung 2-7</b> Berechnung der Proteinexpressionsverhältnisse nach Mircean <i>et al.</i> (Mircean et al. 2005).....	29
<b>Abbildung 2-8</b> Histologische Darstellung der beiden häufigsten Arten des Mammakarzinoms. ....	34
<b>Abbildung 2-9</b> TNM-Klassifikation (modifiziert nach (Wittekind et al. 2010)) .....	35
<b>Abbildung 3-1</b> Schematischer Überblick über das Mammakarzinomkollektiv, das zur Analyse von uPA und PAI-1 assoziierten Signalwegen verwendet wurde.....	51
<b>Abbildung 3-2</b> Zusammenstellung der für die Analyse der HER-Familie verwendeten Mammakarzinomproben.....	54
<b>Abbildung 3-3</b> Überblick über die Quantifizierung der Probenintensität mit MicroVigene (MV). ....	70
<b>Abbildung 4-1</b> Vergleich der Proteinausbeuten unter Verwendung von verschiedenen Extraktionspuffern.77	
<b>Abbildung 4-2</b> Western Blot Analyse der durch Extraktion mit verschiedenen Puffern (EB, LD, LM, LDA, LMA) gewonnenen Lysaten.....	78
<b>Abbildung 4-3</b> Vergleich der Proteinausbeuten von Proben aus zwei verschiedenen Krankenhäusern in Triplikaten.....	79
<b>Abbildung 4-4</b> Proteinextraktion aus FFPE-Proben aus dem Jahr 1990 im Vergleich zu Proben aus dem Jahr 2010.....	81
<b>Abbildung 4-5</b> Proteinkonzentration (A) und Western Blot Analyse (B) von unterschiedlich lange fixierten Lymphknotenproben extrahiert mit LMA und EB. ....	82
<b>Abbildung 4-6</b> Vergleich der Proteinausbeute und -qualität zwischen FFPE- und Gefriergeweben. ....	84
<b>Abbildung 4-7</b> Proteinausbeute bei Verwendung unterschiedlicher Inkubationstemperaturen und -zeiten.85	
<b>Abbildung 4-8</b> Nachweis der Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.....	87
<b>Abbildung 4-9</b> Darstellung der Ergebnisse zum Nachweis der Reproduzierbarkeit des RPPA.....	88
<b>Abbildung 4-10</b> Vergleich der Intensitäten von HER2, p-HER2, PAI-1 und uPA zwischen Inter-Extraktion und Inter-Array Replikaten. ....	90
<b>Abbildung 4-11</b> Ergebnis der Bestimmung der E-Cadherin-Expression mittels RPPA.....	91
<b>Abbildung 4-12</b> ELISA-Resultate für uPA und PAI-1 in zwei verschiedenen Zelllinien.....	92
<b>Abbildung 4-13</b> Auswirkung von SDS und $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) auf das Signal des klinischen ELISA Femtelle vor und nach Behandlung der Lysate. ....	95
<b>Abbildung 4-14</b> Einfluss der Fällung der Lysate sowie der Zugabe von Harnstoff (U) auf die Proteinausbeute und die Kompatibilität mit dem klinischen ELISA.....	96
<b>Abbildung 4-15</b> Western Blot Analyse von FFPE-Gewebelysaten mit Antikörpern gegen uPA und PAI-1.....	97

<b>Abbildung 4-16</b> Ansatz zur Entwicklung eines gegen uPA gerichteten ELISAs.....	98
<b>Abbildung 4-17</b> Expressionslevel der im PAI-1/Akt-Signalweg involvierten Proteine.....	104
<b>Abbildung 4-18</b> Western Blot Analyse gegen PAI-1 und PAI-1 assoziierte Proteine sowie p-Erk und Aktin..	105
<b>Abbildung 4-19</b> Streudiagramme der Expression von HER2, PR, ER, PAI-1 und uPA in Lymphknotenmetastasen (LKM) und Primärtumoren (PT). .....	107
<b>Abbildung 4-20</b> Graphische Darstellung der Expressionsunterschiede zwischen Lymphknoten-metastase (LKM) und Primärtumor (PT).....	108
<b>Abbildung 4-21</b> Erstellung einer Standardkurve zur quantitativen Bestimmung des HER2 Proteingehalts in Tumorproben.....	109
<b>Abbildung 4-22</b> Vergleich der HER2 Expressionshöhe bestimmt durch RPPA mit den klinischen Werten (bestimmt über IHC und FISH).....	110
<b>Abbildung 4-23</b> Darstellung der gefundenen Zusammenhänge von HER2-Status und Estrogenrezeptorstatus (ER) und Grading (G). .....	111
<b>Abbildung 4-24</b> Western Blot Analyse gegen HER2 und p-HER2. ....	113
<b>Abbildung 4-25</b> Ergebnis der hierarchische Clusteranalyse dargestellt als <i>heat map</i> .....	115
<b>Abbildung 4-26</b> <i>Log-rank</i> Statistik zur Bestimmung optimaler Schwellenwerte der 17 in dieser Studie untersuchten Proteine in Bezug auf das Gesamtüberleben.....	118
<b>Abbildung 4-27</b> Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben.....	120
<b>Abbildung 4-28</b> Hierarchische Clusteranalyse von 87 Ösophaguskarzinomen in Bezug auf Proteine der HER-Familie sowie auf HSP27 und dessen phosphorylierte Formen, dargestellt als <i>heat map</i> .....	121
<b>Abbildung 4-29</b> Veranschaulichung der gefundenen Unterschiede in der Zusammensetzung der Subgruppen.....	122
<b>Abbildung 4-30</b> Western Blot Analyse zur Überprüfung der p-HSP27 <sup>(Ser15)</sup> und HER2-Expression in den zwei ermittelten Subgruppen des Ösophaguskarzinoms.....	123
<b>Abbildung 5-1</b> Übersicht über das Zusammenspiel von PAI-1 und den mit PAI-1 korrelierenden Proteinen (grau). .....	139
<b>Abbildung 5-2</b> Übersicht über das Zusammenspiel von uPA und den mit uPA korrelierenden Proteinen (grau). .....	142

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 3-1</b> Verwendete Reagenzien und Chemikalien .....	45
<b>Tabelle 3-2</b> Verwendete Analysesysteme.....	46
<b>Tabelle 3-3</b> Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	46
<b>Tabelle 3-4</b> In dieser Arbeit eingesetzte Primärantikörper und deren Verdünnungen im Western Blot und Reverse Phase Protein Mikroarray .....	47
<b>Tabelle 3-5</b> In dieser Arbeit eingesetzte Peroxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper .....	48
<b>Tabelle 3-6</b> Zur Quantifizierung des Reverse Phase Protein Mikroarray eingesetzte aufgereinigte, rekombinante Proteine .....	48
<b>Tabelle 3-7</b> Proteine zur Herstellung von Zellpellets .....	48
<b>Tabelle 3-8</b> Die in dieser Arbeit verwendeten ELISA .....	48
<b>Tabelle 3-9</b> Für Proteinextraktionen verwendete Zelllinien.....	48
<b>Tabelle 3-10</b> In dieser Arbeit verwendete Geräte.....	49
<b>Tabelle 3-11</b> Für die Datenauswertung und die Erstellung von Abbildungen benutzte Software .....	49
<b>Tabelle 3-12</b> Patienten- and Tumorcharakteristika der drei bezüglich der uPA und PAI-1 Signalregulation untersuchten Mammakarzinomkollektive.....	51
<b>Tabelle 3-13</b> Patienten- und Tumorcharakteristika der untersuchten Mammakarzinome mit korrespondierenden Lymphknotenmetastasen .....	53
<b>Tabelle 3-14</b> Patienten- and Tumorcharakteristika des bezüglich des HER2 und p-HER2-Status untersuchten Mammakarzinomkollektivs.....	55
<b>Tabelle 3-15</b> Patienten- and Tumorcharakteristika des in dieser Arbeit untersuchten Ösophaguskarzinomkollektivs .....	56
<b>Tabelle 3-16</b> Übersicht über die ausgetesteten Bedingungen zur Entwicklung eines ELISAs gegen uPA und PAI-1 aus FFPE-Gewebe.....	66
<b>Tabelle 4-1</b> Vergleich der Proteinausbeute aus Gewebeproben von 1990 und 2010 .....	80
<b>Tabelle 4-2</b> Beschreibung der Korrelation von PAI-1 mit den Expressionshöhen von Membranrezeptoren und Signalmolekülen .....	100
<b>Tabelle 4-3</b> Beschreibung der Korrelation von uPA mit den Expressionshöhen von Membranrezeptoren und Signalmolekülen .....	101
<b>Tabelle 4-4</b> Beschreibung der Korrelation von PAI-1 mit den Expressionshöhen der untersuchten Signalwegsproteine.....	103
<b>Tabelle 4-5</b> Beschreibung der Korrelation von uPA mit den Expressionshöhen der untersuchten Signalwegsproteine.....	103
<b>Tabelle 4-6</b> Beschreibung der Korrelation der Expressionshöhen der fünf klinisch relevanten Markerproteine, HER2, ER $\alpha$ , PR, uPA und PAI-1, im Vergleich von Lymphknotenmetastasen (LKM) und Primärtumor (PT).....	106
<b>Tabelle 4-7</b> Zusammenhang des mit RPPA bestimmten HER2-Status mit klinischen Parametern.....	111
<b>Tabelle 4-8</b> Ergebnisse der Reanalyse der nicht übereinstimmenden Fälle. ....	112



**Tabelle 4-9** Anzahl an phosphorylierten HER Rezeptoren in Bezug auf das HER2 Expressionlevel. .... 114

**Tabelle 4-10** Mann-Whitney-U Test zur Bestätigung der in der Clusteranalyse gefundenen zwei Subgruppen.  
..... 115

**Tabelle 4-11** Ergebnisse der multivariate Cox-Regression. .... 119

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AGO</b>	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
<b>ASCO</b>	American Society of Clinical Oncology
<b>Akt</b>	Proteinkinase B
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Destilliertes Wasser
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EB</b>	Extraktionspuffer
<b>ECM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>EGFR</b>	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
<b>ELISA</b>	Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay
<b>Erk</b>	Extrazellulär regulierte Proteinkinase
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Östrogenrezeptor $\alpha$
<b>FAK</b>	Fokale Adhäsionskinase
<b>FFPE</b>	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
<b>FISH</b>	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
<b>G</b>	Grading
<b>Gsk3<math>\beta</math></b>	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
<b>HER2</b>	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
<b>HER3</b>	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 3
<b>HER4</b>	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 4
<b>HSP27</b>	Hitze-Schock Protein 27
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>Ilk1</b>	Integrinverbundene Kinase
<b>LD</b>	Lämmli-Puffer mit Dithiothreitol
<b>LDA</b>	Lämmli-Puffer mit Dithiothreitol und Arginin
<b>LKM</b>	Lymphknotenmetastase
<b>LM</b>	Lämmli-Puffer mit $\beta$ -Mercaptoethanol
<b>LMA</b>	Lämmli-Puffer mit $\beta$ -Mercaptoethanol und Arginin
<b>M</b>	Metastasierungsstatus
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MP</b>	Magermilchpulver
<b>N</b>	Nodalstatus
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>p-</b>	Phospho-

<b>p38</b>	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
<b>PAI-1</b>	Plasminogenaktivator-Inhibitor 1
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinasen
<b>PR</b>	Progesteronrezeptor
<b>PT</b>	Primärtumor
<b>Pten</b>	Phosphatase und Tensin Homolog
<b>Rock</b>	Rho-assoziierte Proteinkinase
<b>RPPA</b>	Reverse Phase Protein Mikroarray
<b>RTK</b>	Rezeptortyrosinkinase
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Ser</b>	Serin
<b>Stat3</b>	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription 3
<b>T</b>	Tumorgröße
<b>TBST</b>	Tris-gepufferte Saline und Tween 20
<b>TBSTX</b>	Tris-gepufferte Saline und TritonX-100
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>Thr</b>	Threonin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>UICC</b>	Internationale Vereinigung gegen Krebs
<b>uPA</b>	Urokinase-ähnlicher Plaminogen Aktivator
<b>uPAR</b>	Urokinase-ähnlicher Plaminogen Aktivator-Rezeptor
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation

## PUBLIKATIONEN

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vorab in den nachfolgend aufgeführten Publikationen und Präsentationen veröffentlicht.

### Originalpublikationen

- Wolff C, Malinowsky K, Berg D, Schragner K, Schuster T, Walch A, Bronger H, Höfler H, Becker KF. *Signalling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis*. J Pathol. 2011;223(1):54-63.
- Wolff C, Schott C, Porschewski P, Reischauer B, Becker KF. *Successful protein extraction from over-fixed and long-term stored formalin-fixed tissues*. PLoS One. 2011; 6(1):e16353.
- Wolff C, Schott C, Malinowsky K, Berg D, Becker KF. *Producing reverse phase protein microarrays from formalin-fixed tissues*. Methods Mol Biol. 2011;785:123-40.
- Berg D\*, Wolff C\*, Langer R, Schuster T, Feith M, Slotta-Huspenina J, Malinowsky K, Becker KF. *The discovery of new molecular subtypes in oesophageal adenocarcinoma*. PLoS One. 2011;6(9):e23985.
- Berg D, Wolff C, Malinowsky K, Tran K, Walch A, Bronger H, Schuster T, Höfler H, Becker KF. *Profiling signalling pathways in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues reveals cross-talk between EGFR, HER2, HER3 and uPAR*. J Cell Physiol. 2012;227(1):204-12.
- Malinowsky K, Wolff C, Berg D, Schuster T, Walch A, Bronger H, Mannsperger H, Schmidt C, Korf U, Höfler H, Becker KF. *uPA and PAI-1-Related Signaling Pathways Differ between Primary Breast Cancers and Lymph Node Metastases*. Trans Onc 2012; 5: 98–104.

### Reviews

- Malinowsky K, Wolff C, Ergin B, Berg D, Becker KF. *Deciphering signaling pathways in clinical tissues for personalized medicine using protein microarrays*. J Cell Physiol. 2010 Nov;225(2):364-70.
- Malinowsky K, Wolff C, Gündisch S, Berg D, Becker KF. *Targeted therapies in cancer - challenges and chances offered by newly developed techniques for protein analysis in clinical tissues*. J Cancer. 2010 Dec 19;2:26-35.

- Berg D, Malinowsky K, Reischauer B, Wolff C, Becker KF.

Use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for diagnosis and therapy in routine clinical settings. *Methods Mol Biol.* 2011;785:109-22.

## **Eigene Vorträge**

Wolff C, Malinowsky K, Berg D, Walch A, Schuster T, Bronger H, Becker KF. *uPA and PAI-1 interact with signaling pathways regulating proliferation as well as migration potential of cells in breast cancer*

95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 16. - 19. Juni 2011 in Leipzig

Wolff C, Berg D, Malinowsky K, Langer R, Tran K, Walch A, Schuster T, Bronger H, Becker I, Waldhör C, Kiechle M, Höfler H, Becker KF

*Co-expression of p-HER2 and p-HER3 define a novel subgroup among HER2-negative breast cancer patients*

Munich Biomarker Conference – BioM, 29. November 2011 in München

Wolff C, Malinowsky K, Becker KF

*Molecular Profiling of human cancer tissues by Reverse Phase Protein Microarray*

Interact symposium 2012, 29. – 30. März 2012 in München

## **DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker für die Themenstellung, Betreuung und Bereitschaft, die Projekte zu jeder Zeit zu diskutieren, die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Erklärungen und seine Unterstützung während der ganzen Zeit.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Bernhard Küster für seine Bereitschaft die Doktorarbeit als Erstprüfer zu bewerten.

Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie anfertigen zu dürfen.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) danke ich für die Finanzierung meiner Projekte im Rahmen der NGFN (Nationales Genomforschungsnetz)-Transfer-Förderung.

Herrn Dr. Holger Bronger, Herrn Dr. Ruppert Langer und Frau Dr. Julia Slotta-Huspenina danke ich sehr für die Hilfe beim Zusammenstellen der verschiedenen Patientenkollektive sowie für die Unterstützung bei klinischen sowie histologischen Fragestellungen. Ein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Herrn Prof. Dr. Axel Walch für die gemeinsame Betrachtung und Beurteilung unzähliger Tumorproben am Diskussionsmikroskop.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Ingrid Becker und Frau Dr. Christine Waldhör für die großzügige Bereitstellung der Gewebeproben des Klinikums Rosenheims.

Herrn Dr. Tibor Schuster möchte ich für die weit reichende Unterstützung beim Erstellen der Statistik meiner Arbeit sehr danken. Vor allen Dingen danke ich ihm, dass er sich viel Zeit für die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen genommen hat und mir somit die Möglichkeit gegeben hat, einen Einblick in einige statistische Methoden zu erlangen.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Katharina Malinowsky, Frau Dr. Daniela Berg, Frau Dr. Sibylle Gündisch und Frau Dr. Bilge Ergin für die enge und kollegiale Zusammenarbeit, die vielen Anregungen und Diskussionen und die tatkräftige Unterstützung. Sibylle und Katharina möchte ich an dieser Stelle auch für ihre Geduld und Sorgfalt beim Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Vielen Dank an Kerstin Schragner, Christian Beese, Dibora Tibebu, Sabrina Thulke, Kai Tran und Christa Schott, auf deren Hilfe ich bei allen Tücken des Laboralltags immer zählen konnte. Christa möchte ich darüber hinaus besonders für die Zusammenarbeit bei der Etablierung des Extraktionsprotokolls für Proteine aus FFPE-Gewebe danken und dafür, dass sie stets den Überblick behalten hat.

Allen Mitarbeitern der Pathologie, ehemaligen wie aktuellen, danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Vor allem aber möchte ich mich bei Stefan Heindl, Lukas Bauer, Simone Keller und Kathrin Mutze bedanken, für diverse fachliche Diskussionen und für all den Spaß innerhalb wie außerhalb des Labors.

Ich danke meinen Eltern und Großeltern, dafür dass sie immer an mich geglaubt haben und mir damit den Grundstock zur Erreichung meiner Ziele gelegt haben.

Ein herzlicher Dank geht an meine Freunde, meine Schwester und besonders an meinen Ehemann, die mir alle in den letzten Jahren nicht nur ein wichtiger Rückhalt waren, sondern auch für die nötige Balance zwischen Arbeit und Freizeit gesorgt haben.

DANKE!