

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN



Lehrstuhl für Biochemie

Methodische Entwicklung eines standardisierten Verfahrens zur
quantitativen Proteomanalyse aus Formalin fixierten Geweben
und dessen Einsatz in Protein Microarrays

Volker Metzger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer.nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Christian F.W. Becker

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Michael Groll
2. apl. Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker

Die Dissertation wurde am 28.04.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.07.2010 angenommen.

Meinem Vater,

der den Abschluss meiner Dissertation leider nicht mehr miterleben durfte.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Fixierung und Antigendemaskierung von klinischem Archivmaterial	2
2.1.1	Erhebung und Einsatz von klinischem Archivmaterial	2
2.1.2	Formalin Fixierung	3
2.1.3	Antigendemaskierung	4
2.2	Protein Microarrays	5
2.2.1	Klassen von Protein Microarrays	7
2.2.2	Analytische Herausforderungen an Protein Microarrays	7
2.2.2.1	Eigenschaften des Proteoms	7
2.2.2.2	Sensitivität von Protein Microarrays	8
2.2.2.3	Antikörper.....	10
2.2.3	Detektionssystem	10
2.2.3.1	Detektionssubstrate für Reverse Phase Protein Microarrays	11
2.2.4	Quantifizierung der Proteinexpression.....	13
2.3	Die Rolle von E-Cadherin in der Entstehung von Tumoren.....	15
2.3.1	E-Cadherin Struktur und Funktion.....	15
2.3.2	E-Cadherin in malignen Magentumoren.....	17
2.4	Zielsetzung.....	19
3	Material.....	21
3.1	Kommerzielle Lösungen/Kits	21
3.2	Enzyme	21
3.3	Chemikalien, Lösungsmittel und Medien	21
3.4	Puffer	22
3.4.1	Proteinextraktionspuffer.....	22
3.4.2	Puffer und Lösungen für Western Blot	23
3.4.3	Blockierungslösungen.....	24
3.5	Puffer/Medien für Zellkultur	24
3.6	Zelllinien.....	25
3.7	Antikörper.....	25
3.8	Verbrauchsmaterialien	26
3.9	Geräte.....	26
3.10	Software	26
4	Methoden	27
4.1	Zellkultur	27
4.1.1	Zellkultivierung.....	27
4.1.2	Zellpassagierung	27
4.1.3	Starterkulturen aus Gefrierstock	27
4.1.4	Anlegen von Gefrierkulturen	27
4.1.5	Zellzahlbestimmung.....	27
4.1.6	Fixierung der Zellpellets	28
4.1.7	Paraffineinbettung der fixierten Zellpellets.....	28
4.2	Gewebe	28
4.2.1	Induktion der Tumorbildung in Nacktmäusen	28
4.2.2	Paraffinschnitte	29
4.2.3	Gefrierschnitte.....	29
4.2.4	Hämatoxilin/Eosin Färbung	29
4.3	Immunhistochemie.....	29
4.4	Proteinextraktion.....	30
4.4.1	Ultraschallbehandlung.....	30

4.4.2	Proteinextraktion aus nicht fixierten Zellen mit T-PER®Tissue Protein Extraction Reagent.....	30
4.4.3	Proteinextraktion aus fixierten und nicht fixierten Zellen mit FFPE Extraktionspuffer.....	30
4.4.4	Proteinextraktion aus FFPE- und Cryogewebe mit FFPE Extraktionspuffer.....	31
4.5	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	31
4.5.1	Gesamtproteinbestimmung nach Bradford.....	31
4.5.2	Gesamtproteinbestimmung nach Coomassie-Färbung.....	31
4.5.3	Gesamtproteinbestimmung nach EZQ® Protein Quantitation Kit.....	32
4.5.4	Gesamtproteinbestimmung nach Sypro® Ruby Protein Blot Stain.....	32
4.6	Western Blot	33
4.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
4.6.2	Coomassie Brilliant Blau R250 Färbung von Acrylamidgelen.....	33
4.6.3	Proteintransfer (Western Blot)	33
4.6.4	Immundetektion von Proteinen.....	34
4.7	Reverse Phase Protein Microarrays	34
4.7.1	Dot Blots	34
4.7.2	„Reverse Phase“ Protein Microarrays	35
4.7.3	Detektion mit dem CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System ...	36
4.7.4	Detektion mit ECLPlus	36
4.8	Densitometrische Vermessung von Protein Microarrays und Western Blots.....	36
5	Ergebnisse.....	38
5.1	Etablierung des Protokolls zur FFPE Proteinextraktion	38
5.1.1	Überprüfung der in der Literatur beschriebenen Proteinextraktionmethode aus FFPE Material	38
5.1.2	Grundlegende Betrachtungen zum Extraktionsverfahren	39
5.2	Etablierung der FFPE-Proteinextraktionsmethode anhand Zellkulturlysaten.....	41
5.2.1	Formalin fixierte und Paraffin eingebettete (FFPE) Zellen.....	41
5.2.2	Formalin fixierte (FF) Zellen ohne Paraffineinbettung.....	44
5.2.2.1	Variation der Extraktionspuffer und der Reaktionsbedingungen	45
5.2.2.2	Dauer der Formalinfixierung	50
5.2.3	Anwendbarkeit der FF Zellkulturergebnisse bei FFPE Geweben.....	52
5.3	Antikörper.....	54
5.3.1	Antikörperspezifität.....	54
5.3.2	Kompartimentierung und Phosphorylierung.....	55
5.4	Dot-Blots.....	56
5.5	„Reverse Phase“ Protein Arrays	58
5.5.1	CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System.....	59
5.5.2	Chemilumineszenz-basierte Signaldetektion	61
5.6	Verifizierung der Extraktionsmethode.....	63
5.6.1	Vergleich von Formalin fixierten und nicht fixierten Zelllinien.....	63
5.6.1.1	Western Blots.....	64
5.6.1.2	Reverse Phase Protein Microarrays	71
5.7	Quantifizierung der mutationsspezifischen E-Cadherin Expression von Magenkarzinomen aus klinischem Archivmaterial.....	78
6	Diskussion.....	81
7	Ausblick.....	87
8	Literaturverzeichnis	88
9	Abkürzungsverzeichnis.....	97
10	Anhang.....	98
11	Danksagung.....	103
12	Curriculum vitae	104

1 Zusammenfassung

Proteomanalysen drängen derzeit in den Vordergrund, um Strukturen, Funktionen und Interaktionen von Proteinen und ihre Rolle in Krankheiten aufzuklären. Die Entdeckung neuer hoch sensibler und spezifischer Biomarker für eine frühzeitige Erkennung von Krankheiten, sowie die Entwicklung von personalisierten Therapieansätzen sind die zukünftigen Schlüsselfaktoren in der Behandlung von komplexen Krankheiten wie Krebs. Klinisches Archivmaterial stellt eine umfangreiche und wertvolle Quelle an Gewebeproben dar, zur Identifizierung von krankheitsassoziierten Proteinmarkern. Aufgrund früherer Studien wurde angenommen, dass aus diesen Geweben keine Proteine isoliert werden können.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Methode etabliert werden, mit der nicht degradierte Proteine aus Formalin fixiertem Probenmaterial effizient extrahiert werden können. Die Proteindetektion erfolgte durch etablierte molekularbiologische Verfahren wie Western und Dot Blots. Die Extraktionsmethode konnte zudem so adaptiert werden, dass der Einsatz auf Reverse Phase Protein Microarrays möglich war. Protein Microarrays gehören zu einer aufstrebenden Klasse der Proteomanalyseverfahren, mit denen es möglich ist eine Vielzahl an Proben gleichzeitig zu detektieren und quantitative Analysen anzustellen. Die Vorteile neben der parallelen Prozessierung sind die hohe Sensitivität und die geringen Probenmengen, die benötigt werden. Die Methode ist daher sehr gut zur Untersuchung von Patientenbiopsien in der klinischen Routine geeignet. Es konnten Proteine aller Zellkompartimente (α -Tubulin, β -Actin, GAPDH, E-Cadherin, E-Cadherin Exon 9 Deletionsmutante, Histon H1) sowie posttranslational modifizierte Proteine (phospho-AMPK α) nachgewiesen werden. Die Spezifität der Antikörper wurde vor dem Einsatz in Reverse Phase Protein Microarrays mittels Western Blots überprüft.

Mit der dargestellten Methode können zuverlässig nicht degradierte Proteine aus Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten klinischem Archivmaterial extrahiert werden und mit routinemäßigen, molekularbiologischen Methoden nachgewiesen werden. Fixierte und nicht fixierte Lysate verhalten sich in den Auswertungen weitestgehend vergleichbar. Der Proteomforschung eröffnen sich damit große und informationsvernetzte Probenbibliotheken aus klinischem Archivmaterial. Weiterhin konnte die Methode auf die Hochdurchsatzanwendung mit Reverse Phase Protein Microarrays ausgelegt werden. Sie eignet sich daher auch für den Einsatz in der klinischen Diagnostik und zur exakten Quantifizierung von Biomarkern aus entnommenen Gewebeproben. Die Methode stellt damit einen wichtigen Schritt in Richtung personalisierter Medizin dar und ergänzt sinnvoll die histopathologische Bewertung von Gewebeschnitten.

2 Einleitung

2.1 Fixierung und Antigendemaskierung von klinischem Archivmaterial

2.1.1 Erhebung und Einsatz von klinischem Archivmaterial

Nach der operativen Entfernung eines Organs oder der Entnahme eines kleinen Gewebstückes (Biopsie) bzw. von Zellproben (Zytodiagnostik) durch einen Arzt, wird das entsprechende Gewebe pathologisch untersucht. Die entnommenen Gewebebiopsien werden direkt zu histologischen Schnittpräparaten weiterverarbeitet. Die Untersuchungsergebnisse geben Auskunft über die Art der Erkrankung und deren Schweregrad. Insbesondere im Fall von Krebserkrankungen ist die „Gutartigkeit oder Bösartigkeit“ eine wichtige Fragestellung. Durch Anwendung verschiedener diagnostischer Methoden wird der Typ, die Größe, die Ausdehnung und die Bösartigkeit eines Krebses begutachtet und hilft letztendlich zur adäquaten Behandlung des Patienten. Die pathologische Routinediagnostik beruht in erster Linie auf der Beurteilung der makroskopischen (pathologische Anatomie) und lichtmikroskopischen Befundung (Histopathologie, Zytologie) von Geweben. Dies zunehmend unter Einbeziehung biochemischer und molekularbiologischer Methoden, wie beispielsweise dem Nachweis veränderter Enzymaktivitäten oder veränderter Proteinexpression über Immunfluoreszenz oder Immunhistochemie. Die Immunhistochemie (IHC) (auch Immunhistologie oder Immun- bzw. Antikörperfärbung genannt) ist eine der zentralen Methoden der modernen histopathologischen Diagnostik und Forschung. Durch immunhistologische Techniken wird es möglich, Proteine, Polysaccharide u.a. Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, hochspezifisch nachzuweisen. Dadurch kann die konventionelle histologische Analyse von Differenzierungsmustern um die Ermittlung von Expressionsmustern ergänzt werden. Die derzeit angewandten Verfahren können dabei sehr gut die genaue Lokalisation und die allgemeine Gewebsverteilung von Biomarkern wiedergeben, ermöglichen jedoch nicht eine objektive Quantifizierung dieser. Seit etwa einem Jahrzehnt dienen semiquantitativ ermittelte immunhistochemische Befunde auch als direkte Grundlage für therapeutische Entscheidungen (beispielsweise Antihormontherapie und/oder Chemotherapie nach Ermittlung des Steroidrezeptorgehaltes, Chemotherapie und/oder Therapie mit Antikörpern nach Ermittlung der Her2neu-Onkoprotein-Expression beim Mammakarzinom). Für diese personalisierten Therapieansätze ist ein quantitatives Nachweisverfahren unabdingbar.

2.1.2 Formalin Fixierung

Unmittelbar nach der Entnahme setzt in Gewebeproben die Autolyse bzw. Heterolyse ein. Das Gewebe muß daher sofort frisch bearbeitet (Schnellschnitte) oder aber fixiert werden. Durch die Fixation wird die Zersetzung aufgehalten. Das am weitesten verbreitete Fixierungsmittel ist das Formalin (neutral gepufferte Formaldehydlösung). Die Formalinfixierung hat jedoch auch Nachteile. Die meisten Proteine verlieren durch die Fixierung einen Teil Ihrer morphologischen Struktur, ihre Funktion und einen großen Teil ihrer antigenen Eigenschaften. Viele enzymhistochemische und immunhistologische Untersuchungen können daher zum derzeitigen Stand der Technik nicht an Formalinfixiertem Material durchgeführt werden. Formaldehyd als Gewebe Fixierungsmittel wurde ursprünglich 1893 von Ferdinand Blum entdeckt und ist bis dato die am meisten verwendete Fixierungsmethode in Kliniken rund um die Welt. Es wird routinemäßig als 10 %ige neutral gepufferte Formalinlösung (3,7%-4% Formaldehyd) eingesetzt. Die Fixierungsreaktion benötigt generell 24 bis 48 Stunden bis zur vollständigen Komplettierung (Rhodes et al., 2000; Lee et al., 2002; Sompuram et al., 2004). Das heutige Verständnis der Effekte von Formaldehyd auf Proteine geht zurück auf die Arbeiten von Fraenkel-Conrat und Kollegen aus den 50iger Jahren (Fraenkel-Conrat et al., 1947, 1948a und 1948b). Formaldehyd kann demnach eine Reihe von chemischen Reaktionen eingehen, die zur Quervernetzung („cross-linking“) von Makromolekülen wie Proteine, DNA und RNA führen. Bis heute ist der genaue Mechanismus aber nicht aufgeklärt. Zusammenfassungen sind bei Shi et al., 1997, 2000 und 2001 zu finden. In Lösung kann Formaldehyd folgende Aminosäuren binden: Lysin (K), Arginin (R), Thyrosin (Y), Asparagin (N), Histidin (H), Glutamin (Q) und Serin (S). Die Fixierungsreaktion wird in zwei Stufen eingeteilt. Die Primäre Reaktion ist eine Additionsreaktion zwischen einem Amin und einem Aldehyd (z.B. Formalin) oder einem Keton (z.B. Aceton), wobei ein reaktives Iminium-Ion Intermediat entsteht. Der zweite Reaktionsschritt ist eine Kondensationsreaktion, die viel langsamer abläuft und bis zu einer Woche dauern kann. Die dabei ausgebildeten Methylen-Brücken (-CH₂-) werden als hauptsächliches Strukturelement der Quervernetzung angesehen (Auerbach et al., 1977). Die Primärstruktur der Proteine wird dabei nicht zerstört. In einer neueren Publikation von Sompuram et al., 2004 konnten Peptidbindemotive in drei Gruppen eingeteilt werden. In Gruppe drei war die Antikörperreaktion unbeeinflusst durch die Formalin Fixierung, in Gruppe eins konnte die Immunreaktivität durch Antigen-Epitop Demaskierung wieder hergestellt werden. Gruppe zwei zeigte einen Reaktionsverlust nach Formalin Fixierung nur, wenn andere irrelevante Proteine hinzugegeben wurden. Diese Beobachtung wurde durch eine Mannich Reaktion (Reaktion des reaktiven Iminium-Ions mit einer benachbarten Phenolgruppe von Thyrosin) erklärt und diese als wichtige Reaktion bezüglich der Antikörperzugänglichkeit postuliert.

Nach bewusstwerden, dass Formalin elementare chemische Reaktionen in Makromolekülen verursacht, wurden verschiedene Versuche unternommen die Fixierungsmethode zu modifizieren und alternative Fixative, wie Alkohole, Ketone und modifizierte Formaldehyde zu verwenden (Ahram et al., 2003; Vincek et al., 2003; Gillespie et al., 2002; Hannah et al., 1998; Taylor et al., 1994; Dapson, 1993; Colvin et al., 1988; Sato et al., 1986; Hopwood, 1985). Keine der Variationen konnte sich als universelle Fixierungsmethode hervortun. Die Formalin Fixierung hat insbesondere Vorteile, was die überragende Bewahrung von morphologischen Details betrifft. Durch den historisch bedingten langen Einsatz von Formalin als Gewebefixierung sind alle relevanten Diagnoseverfahren etabliert. Es liegen umfangreiche Erfahrungswerte damit vor und es ist als Referenzsystem für determinierte pathologische Diagnosekriterien zu betrachten. Dies sind die Gründe weswegen keine der alternativen Fixierungsmethoden, von denen manche durchaus besser zur Analytik geeignet scheinen, die Formalin Fixierung annähernd verdrängen konnte.

2.1.3 Antigendemaskierung

Da es bei Antigen-Antikörper Reaktionen oft auf die dreidimensionale Struktur der Proteine ankommt, liegt es nahe den Mechanismus der Antigen Demaskierung auf Basis einer Remodifikation der durch Formalin veränderten Proteinstruktur zu sehen. Aber ebenso wenig wie die Formalin Fixierung selbst, ist auch der Mechanismus beim „Antigen Retrieval“ (AR) verstanden. Eine große Herausforderung stellte anfangs die Wiederherstellung der Antigen Zugänglichkeit dar. Trotz technischer Fortschritte, die die Reaktivität deutlich verbesserten, wie die Hybridome Technologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Kohler und Milstein, 1975), der enzymatische Vorverdau (Huang, 1975) oder weiterer diverser Vorbehandlungsmethoden (Kitamoto et al., 1987; Hausen und Dreyer, 1982), blieb der Einsatz der meisten Antikörper limitierend (Leong et al., 1988). Einen Durchbruch in der Sensitivität wurde 1991 mit der Einführung der hitzeinduzierten AR-Methode nach Shi et.al. erzielt. Dadurch wird die benötigte Energie zur Verfügung gestellt, die nötig ist, um die Remodifikation der durch die Formalin Fixierung veränderten Proteinstruktur unter einer Serie von Konformationsänderungen zu ermöglichen, inklusive eines möglichen Aufbruchs (Hydrolyse) der Quervernetzungsreaktion. In Folge wurden verschiedene Hitzequellen getestet, um die benötigte Energie zu induzieren, wie Autoklavierung (Shin et al. 1991), Druckkochtopf (Norton et al., 1994), Wasserbad (Kawai et al., 1994), Mikrowellen (Pertschuk et al., 1994) und Dampfkochen (Taylor et al., 1995). Kritisch ist dabei die erreichte Temperatur. Generell lässt sich sagen, dass je geringer die Temperatur ist, desto länger die benötigte Zeit ist, um gleiche Demaskierungsergebnisse zu erzielen (Shi et al., 1995a; Taylor et al., 1995). Weitere Faktoren haben sich als wichtige Einflussgrößen herausgestellt. Darunter der pH Wert der Inkubationslösung (Shi et al., 1995b), die chemische Komposition der Lösung, insbesondere der Zusatz von Metall-Ionen (Jones et al., 1981), sowie das Puffersystem

selbst (Shi et al., 1995 a und b). Die Effektivität ist zudem abhängig vom untersuchten Proteintyp und dem verwendeten Ausgangsmaterial. Es existieren mehrere Hypothesen bezüglich des tatsächlichen Wirkmechanismus. Darunter finden sich das Aufbrechen der Crosslink-Reaktion durch Hydrolyse (Catoletti et al., 1993, Gown et al., 1993), die Extraktion von blockierenden Proteinkomplexen, Präzipitation von Proteinen und Rehydrierung des Gewebeschnittes zur besseren Löslichkeit und Penetration des Antikörpers (Suurmeijer et al., 1993), Entfernung von Kalziumkomplexen, die durch Käfig ähnliche Strukturen Epitope verdecken (Morgan et al., 1994), sowie die Entfernung von inhibitorischen Spuren an Paraffin und SDS (Gown et al., 1993, Yamashita and Okada, 2005). Die Variabilität ist demnach sehr hoch. Ob es eine universelle AR-Methode geben wird ist fraglich.

Die Antigendemaskierung ist immer noch in der methodischen Entwicklung. Um den exakten molekularen Mechanismus vollständig zu verstehen, müssen weitere Untersuchungen zur Proteinstruktur unter Normalbedingungen (frisch bzw. cryo-konserviert), nach Formalin Fixierung und nach Antigendemaskierung durchgeführt werden. Auf Basis dieser Studien können effektivere und maßgeschneiderte Methoden zur Antigen/Epitop Regeneration entwickelt werden, um so ein größeres Anwendungs- und Probenfeld zu erschließen.

2.2 Protein Microarrays

Nach der weitgehenden Entschlüsselung des humanen Genoms ist jetzt das Proteom ins Blickfeld der Biologie und Medizin geraten. Protein Microarrays stellen eine neue Technologie zur Proteomanalyse dar, die in einzigartiger Weise das parallele Screening von verschiedenen Zielproteinen in mehreren Geweben gleichzeitig ermöglicht (Paweletz et al., 2001). Da Lysatmengen im Nanoliterbereich gespottet werden, können auch minimale Probenmengen damit analysiert werden. Im Vergleich zu Genexpressionsanalysen liefern Untersuchungen auf Proteom-Ebene zusätzliche Informationen, da auch posttranslationelle Modifikationen und so ein großes Netzwerk interagierender Proteine erfasst werden. Ziel der Proteomik ist im engeren Sinne daher nicht die Beschreibung einzelner Proteine, sondern die Charakterisierung intrazellulärer Informationsflüsse, die über Proteinnetzwerke vermittelt werden. Diese werden nicht nur durch das Genom einer Zelle, sondern auch durch deren Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung bestimmt. Wie zudem bekannt ist müssen Transkriptom und Proteom einer Zelle nicht zwangsläufig korrelieren (Wei et al., 2005, Kumble, 2003). Dieser Ansatz hat sich in jüngster Zeit bei der Identifikation diagnostischer und prognostischer Biomarker als vielversprechend erwiesen. Er wird auch bei der Suche nach neuen Angriffspunkten molekularer Therapeutika und beim Einsatz dieser so genannten „targeted therapies“ bei molekular definierten Patientengruppen hilfreich sein (Espina, 2005; Liotta und Petricoin, 2000). Rechnet man posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Glycosylierung,

Acetylierung mit ein, existieren in humanen Zellen mindestens eine Million verschiedener Proteinvarianten, die alle im pathologischen Fall verändert sein können. Im Vergleich dazu gibt es nur ungefähr 22000 humane Gene, wie die Auswertungen des Human Genom Projekts (www.hugo-international.org) zeigen. Somit ist die Entwicklung von Protein Microarrays sehr viel komplexer, als die Entwicklung von DNA Arrays (Mitchell, 2002).

Im einfachsten Fall bestehen Protein Microarrays aus Spots von Proteinen, die auf einem Träger immobilisiert werden, wobei Microarray-Spotter eine Anordnung der Proben in hoher Dichte erlauben (siehe Abbildung 2-1). Die Proteine können in Ihrer Zusammensetzung homogen oder heterogen sein, beispielsweise Antikörper oder Proteinlysate. Ausschlaggebend für die Bindung der Proteine ist die Beschaffenheit der Oberfläche. Mit Aldehyd behandelten Glasoberflächen gelang der erste große Proteom Microarray (Zhu et al., 2001). Die Gruppe um Madoz-Gurpide untersuchte Aldehyd-, Amin- und Nitrocellulose-beschichtete Oberflächen. Gemäß dieser Studie war die Nachweisempfindlichkeit bei den Nitrocellulose beschichteten FAST™ Slides am höchsten (Madoz-Gurpide et al., 2001). Die Arbeit von Kukar bietet eine Erklärung für die höhere Nachweisempfindlichkeit, die auf den FAST™ Slides beobachtet wurde. Objektträger mit 2-dimensionaler Aldehyd- oder Aldehyd-ähnlicher Beschichtung verloren 95 % der aufgedruckten Proteine nach der Inkubation, dem Waschen und dem Nachweis, während auf den Nitrozellulose beschichteten Slides mehr als 95 % der Proteine gebunden blieben. Im Vergleich zu allen 2-dimensionalen Oberflächen-Beschichtungen bietet die 3-dimensionale, schwammartige, mikroporöse Nitrozellulose eine viel größere Oberfläche und höhere Beladungskapazität (Kukar et al., 2002).

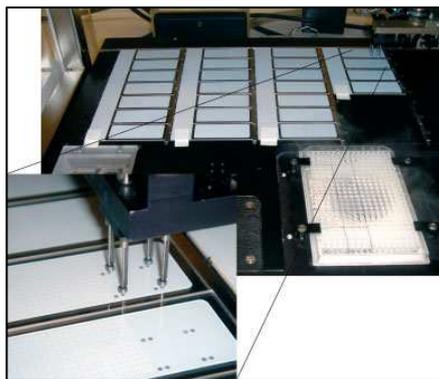


Abbildung 2-1: Erstellung von Reverse Phase Protein Microarrays auf Nitrozellulose beschichteten Glasobjektträgern mit einem Ring-and-Pin Array Roboter. Entnommen aus Gulmann et al., 2006

Aktuelle Nachweissysteme können unterteilt werden in markierungsfreie Methoden, wie Massenspektroskopie (MS) und Oberflächen Plasma Resonanz (SRP), sowie in Detektionsmethoden mit markierten Proben, wie Fluoreszenz, Chemilumineszenz, Colorometrie und Radioaktivität, wobei zwischen direkten, indirekten und „Sandwich“-Verfahren unterschieden wird. Die Signalintensität jedes Spots ist proportional zur

Konzentration des Zielmoleküls in diesem Proteinspot (Espina et al., 2004; Templin et al., 2002; Paweletz et al., 2001; Liotta and Petricoin, 2000; Johnsson et al., 1991).

2.2.1 Klassen von Protein Microarrays

Protein Microarrays können in zwei Klassen unterteilt werden. Arrays zum Proteinprofiling und Arrays für funktionelle Studien (Liotta et al., 2003; Poetz et al., 2005) Die Arrays zur Analyse der Proteinexpression werden weiter in zwei Gruppen unterteilt (Abbildung 2-2): „Forward Phase“ (FPA, A) und „Reverse Phase“ (RPA, B) Protein Microarrays. Im Falle der „Forward Phase“ Arrays sind verschiedene Fängermoleküle auf dem Array immobilisiert (z.B. Antikörper oder Aptamere). Innerhalb eines Experiments können somit in einer Probe viele verschiedene Zielproteine gleichzeitig detektiert und analysiert werden. Dieses Format eignet sich insbesondere zur Analyse von Protein-Netzwerken und Interaktionsstudien. Im Falle der „Reverse Phase“ Arrays werden unterschiedliche Proteinlysate auf dem Array immobilisiert. Durch Zugabe eines geeigneten Liganden, bzw. Antikörper kann ein spezielles Zielprotein in allen Proben gleichzeitig analysiert werden.

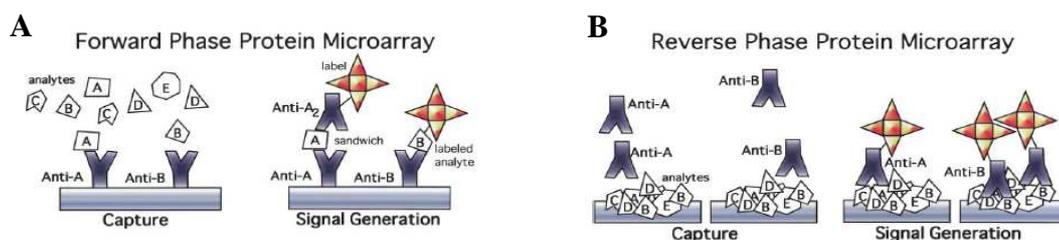


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung von (A) „Forward Phase“ (Antikörper Array) und (B) „Reverse Phase“ Protein Microarrays. Entnommen aus Liotta et al., 2003

Die Anwendung eignet sich insbesondere zur Detektion von Biomarkern oder des Status von posttranslationalen Proteinmodifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierung. Es erlaubt damit eine Aussage über eine krankheitsassoziierte veränderte und dysregulierte Proteinexpression/-modifikation (Sreekumar et al., 2001; Espina et al., 2003; Speer et al., 2005).

2.2.2 Analytische Herausforderungen an Protein Microarrays

2.2.2.1 Eigenschaften des Proteoms

Protein Microarrays sind durch die komplexe Struktur von Proteinen in der Handhabung weitaus komplizierter als DNA-basierte Microarrays. Proteine bestehen aus 20 Aminosäuren, die in der Lage sind komplexe Tertiärstrukturen auszubilden. Die chemischen Eigenschaften variieren in einem großen Bereich und posttranslationale Modifikationen erweitern die Variabilität nochmals erheblich. Proteine liegen, im

Gegensatz zu DNA oder RNA, in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor, Sie unterscheiden sich bis zu einem Faktor von 10^{10} . Hinzu kommt, dass klinisches Material, wie Biopsien und Körperflüssigkeiten, überwiegend in nur sehr kleinen Mengen vorhanden ist. Ein Kubikzentimeter Gewebe enthält geschätzte 10^9 Zellen. Bei einer Biopsie stehen somit etwa nur 100000 Zellen für eine Analyse zur Verfügung. Die Lysate liegen meistens sehr heterogen vor, d.h. die Proteine, die analysiert werden sollen, liegen immer in einem komplexen Gemisch mit anderen Proteinen vor. Nimmt man an, dass ein Antikörper eine Spezifität von 99 % besitzt, ein kreuzreagierendes Protein aber in einer tausendfach höheren Konzentration im Proteingemisch vorliegt als das zu detektierende Protein, werden für jedes richtig gemessene Protein zehn kontaminierende Proteine detektiert. Damit wird der Hintergrund des Arrays so hoch, dass dieser falsch positive Resultate liefert. Diese molekulare Variabilität, gekoppelt mit dem weiten Konzentrationsbereich und der heterogenen Proteinzusammensetzung stellen eine große Herausforderung an die Protein Immobilisierung und an die angewendeten Detektionssysteme. Extrem sensitive und spezifische Methoden müssen dafür entwickelt werden (Espina et al., 2004; Liotta et al., 2003; Zhu and Snyder, 2003; Lal et al. 2002).

2.2.2.2 Sensitivität von Protein Microarrays

Im Gegensatz zu Nukleinsäuren existieren für Proteine keine Amplifikationsverfahren, weshalb für Protein Microarrays indirekte und sehr sensitive Nachweismethoden notwendig sind. Die Anforderungen an das Detektionssystem sind dabei sehr hoch. Proteinkonzentrationen bis in den femtomolaren Bereich müssen nachweisbar sein, ohne dass dabei der unspezifische Hintergrund zu sehr ansteigt. Weiterhin müssen die Markierungs- und Signalamplifikationsverfahren über einen möglichst großen Bereich Linearität und Reproduzierbarkeit gewährleisten, um eine Quantifizierung der Proben zu ermöglichen. Das System muss zudem tolerant gegenüber dem großen dynamischen Konzentrationsbereich und der Komplexität der biologischen Proben sein. Natürlicherweise kommen in Gewebeproben Substanzen, wie Biotin, Peroxidasen, Phosphatasen oder fluoreszierende Proteine vor, die die Nachweisreaktion nicht signifikant beeinflussen dürfen (Espina et al., 2003; Liotta et al., 2003; Schweitzer et al., 2002). Die Anzahl an Zellen, die für einen Protein Microarray benötigt werden, ist abhängig von der Zahl der Zielmoleküle, die in der Zelle vorhanden sind, der Sensitivität des Systems und der Gesamtzahl der Moleküle pro Mol. Mathematisch kann dies nach Formel 2-1 dargestellt werden.

$$T = \frac{A * S}{X}$$

Formel 2-1

T=Detektionsgrenze in Zellen pro Volumen, A=Avogadrozahl ($6,023 \cdot 10^{23}$ Moleküle pro Mol), S=Sensitivität des Detektionssystems (mol pro Volumen), X=Anzahl der zu analysierenden Moleküle pro Zelle

Erreicht das Detektionssystem dabei nicht die adäquate Sensitivität, übersteigt die erforderliche Menge an Probenmaterial die zur Verfügung stehenden Mengen aus der klinischen Probenentnahme. Erst durch die Miniaturisierung der Arrayformate konnten diese Sensitivitätskriterien erreicht werden. Ekins und Kollegen zeigten, dass ein System, das auf einer kleinen Zahl von Detektionsmolekülen und einer kleinen Zahl von Zielmolekülen basiert, sensitiver sein kann, als ein System, das hundertmal mehr Material benötigt. Die Miniaturisierung ist der Schlüssel zum Erfolg und ihre Erkenntnisse ermöglichten erst den Einsatz von Protein-Arrays in der derzeitigen Form und Bandbreite (Ekins, 1989; Ekins et al., 1990; Ekins und Chu, 1992). Die grundlegenden Arbeiten dazu leistete Feinberg in seinen Untersuchungen zu Microspot Tests für Antigene und Antikörper (Feinberg, 1961).

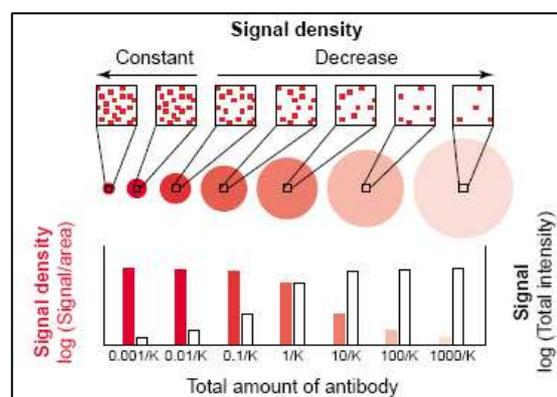


Abbildung 2-3: Signal und Signaldichte in Mikrosots. K= Affinitätskonstante. Modifiziert nach Ekins und Chu, 1992.

In Abbildung 2-3 ist die Signaldichte (Anzahl der Signale pro Fläche) von detektierten Zielmolekülen in einem Proteinspot gezeigt. Das Gesamtsignal (Anzahl aller Signale eines Spots) steigt mit einer steigenden Anzahl von Detektionsmolekülen bei ebenfalls steigender Spotgröße. Im Gegensatz dazu steigt die Signaldichte mit abnehmender Zahl von Detektionsmolekülen und Spotgröße. Damit ist auf einem genügend kleinen Spot die Signaldichte höher und die Sensitivität des Systems erhöht sich. Nach dieser Theorie der „ambient analyte condition“ werden Zielmoleküle, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen, mit einer hohen Affinität gebunden und detektiert. Das System ist hierbei unabhängig vom eingesetzten Volumen und kombiniert hohe Sensitivität mit geringstem Probenverbrauch (Ekins und Chu, 1992; Templin et al., 2002). Die Sensitivität von miniaturisierten Protein Microarrays kann je nach Detektionssystem bis unter den femtomolaren Bereich gehen (Espina et al., 2003, Templin et al., 2002). Die Forschungsgruppe um Paweletz bestimmte beispielsweise die Nachweisgrenze von rekombinantem PSA (Prostata spezifisches Antigen) auf FAST® Slides unter quantitativen Bedingungen mit linearen und quantifizierbaren Signalen im Bereich von 1,25 bis 20 fg.

Die Nachweisempfindlichkeit lag damit umgerechnet sogar im zeptomolaren (10^{-21} Mol) Bereich (Paweletz et al., 2001).

2.2.2.3 Antikörper

Eine weitere große Limitierung stellt die Verfügbarkeit von geeigneten Antikörpern dar, um die Spezifität der Protein Microarrays zu gewährleisten. Zur routinierten Anwendung der Protein Microarrays sind qualitativ hochwertige, spezifische und hochaffine Antikörper von essentieller Bedeutung. Da Antikörper nicht mit bekannter oder erwünschter Spezifität und Affinität produziert werden können, bedarf es einer individuellen Validierung, bevor diese auf den Arrays eingesetzt werden können. Beide Kriterien können unter Einsatz von vergleichbarem Probenmaterial durch Western Blots bestimmt werden. Eine singuläre Bande auf Höhe des spezifischen Molekulargewichts ist hier der Indikator für Sensitivität und Spezifität. Aktuell sind nur für einen geringen Prozentsatz der bekannten Proteine hoch spezifische Antikörper erhältlich und getestet. Um dieser Einschränkung Abhilfe zu schaffen, hat sich die „Human Proteom Organisation“ (HUPO, www.hupo.org) zum Ziel gesetzt, Antikörperbibliotheken zu erstellen, die für die wissenschaftliche Gemeinschaft frei zugänglich sein sollen (Hanash, 2003). Auch die Bibliothek für kombinatorische humane Antikörper HuCAL® (human combinatorial antibody library; MorphoSys, München, Deutschland) stellt eine wichtige Technologiebasis dar, zur Generierung massgeschneiderter und hoch affiner Antikörpern für Protein Microarrays (Poetz et al., 2005). Hilfreich sind zudem neue Datenportale, wie bsp. Proteinatlas (www.proteinatlas.org), die eine vernetzte und ganzheitliche Darstellung der Informationen bewerkstelligen. Die Affinitätskonstanten (Assoziations- und Dissoziationsrate) der Antikörper bestimmen zudem den linearen Bereich des Arrays. Ein linearer Nachweisbereich kann nur erreicht werden, wenn die Konzentration des Analyten und des Antikörper/Liganden zur Affinität passen. Dies ist insbesondere in multiplex Arrayformaten, sowie bei Sandwichverfahren schwierig zu erreichen. Meist befindet sich hier nur ein kleiner Teil der Proben im linearen Auswertebereich, da die verschiedenen Affinitätskonstanten über einen weiten Bereich streuen können. Ein weiterer Punkt, dem Beachtung zu schenken gilt, ist der Status von denaturiertem versus nativem Protein-zustand. Die meisten Antikörper werden in der Herstellung gegen Peptide gerichtet. Sie erkennen oft keine nativen Proteinstrukturen, da das Epitop linearisiert vorliegt. Insbesondere Protein-Protein Interaktionsstudien sind dadurch limitiert (Liotta et al., 2003).

2.2.3 Detektionssystem

Das Detektionssystem stellt eine wichtige Komponente im Nachweisprozess dar. Wichtig für die Anwendung sind korrelierbare Signalintensitäten in einem möglichst großen Detektionsbereich und niedrige Nachweisgrenzen. Der generelle Signalkurvenverlauf eines

Detektionssystem ist in Abbildung 2-4 gezeigt. Unterhalb einer Grenzkonzentration (LOD) wird kein bzw. ein nur sehr schwaches, annähernd gleich bleibendes Signal detektiert, welches nicht mit den Mengenverhältnissen korreliert. Je geringer dieser Schwellenwert, desto sensitiver ist das Detektionssystem. Die Kurve geht dann in den dynamischen Verlauf über, in dem die Signalstärke sich mit der Auftragsmenge verändert. Das Ende des dynamischen Bereichs markiert der Sättigungswert. Hier flacht sich die Kurve zunächst ab und bleibt in Folge auf gleicher Intensität, da keine Signalsteigerung möglich ist. Innerhalb des dynamischen Bereichs liegt der lineare Bereich, bei dem die Signalstärke direkt mit der Auftragsmenge korreliert.

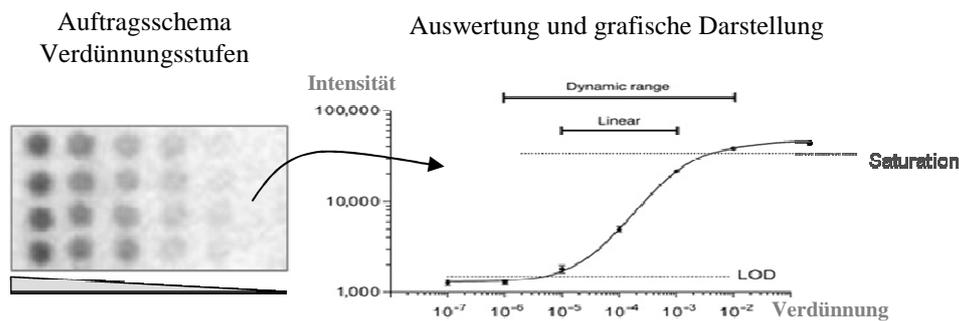


Abbildung 2-4: Theoretischer Signalverlauf eines Detektionssystems. Liegt die Probenverdünnung unterhalb der Nachweisgrenze (LOD) wird kein Signal, bzw. nur ein schwaches aber weitgehend von der Auftragsmenge unabhängiges Signal erhalten. Am anderen Ende der Skala tritt das System bei Überschreiten eines Schwellenwertes in die Sättigung ein. Der dynamische Bereich beschreibt den prinzipiellen Ansprechbereich des Detektionssystems, in dem verschiedene Auftragsmengen durch unterschiedliche Signalstärken wiedergespiegelt werden. Innerhalb dieses dynamischen Bereiches liegt der lineare Verlauf, wobei hier die Auftragsmenge und das Signal direkt korrelieren, also keine Schwelleneffekte auftreten. Nur im linearen Bereich sind ein Probenvergleich und eine aussagekräftige Quantifizierung möglich (modifiziert nach Chan et al., 2004).

Wichtig für die Proteinquantifizierung, sowie für den Probenvergleich ist, dass sich das Signal in diesem linearen Bereich befindet. Ansonsten wird die Messung durch Sättigungseffekte bzw. durch das Unterschreiten des Detektionslimits verfälscht. Daher ist ein großer linearer Bereich ein wünschenswertes Kriterium des Detektionssystems.

2.2.3.1 Detektionssubstrate für Reverse Phase Protein Microarrays

Fluoreszenz

Fluoreszenz Moleküle absorbieren Photonen von einer externen Lichtquelle. Das führt zu einer Verschiebung der Elektronen innerhalb des Moleküls und zur Emission von Licht einer anderen Wellenlänge. Fluorophore, wie Fluorescein, Rhodamine (Texas Red), Phycobilliprotein, Nitrobenzoxadiazole (NBD) und Cyanine werden routinemäßig für das markieren von Proteinen und Antikörpern verwendet. Der Nachweis des Gesamtproteins auf Reverse Phase Protein Microarrays mit Sypro®Ruby (Molecular Probes/Invitrogen) basiert ebenfalls auf dieser Technologie (Berggren et al., 1999).

Die Methode ist allerdings nicht für alle Proteine und Gewebe uneingeschränkt geeignet. Flavine und Flavoproteine aus Leber und Niere autofluoreszieren und emittieren Licht derselben Wellenlänge, wie beispielsweise Fluorescein (Pawley, 1995). Ebenso kann das Trägermaterial einen höheren Hintergrund hervorrufen. Vorteilhaft ist, dass mehrere verschiedene Proteine auf demselben Spot nachgewiesen werden können, indem Antikörper eingesetzt werden, die mit verschiedenen Fluorophoren markiert sind und somit Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (Espina et al., 2004; Kukar et al., 2002).

Chemilumineszenz

Diese Detektionsmethode basiert auf Western Blot Protokollen zur Detektion von Antigen gebundenen Primärantikörpern über Sekundärantikörper, die mit Meerrettich Peroxidase (HRP) oder der alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert sind. Die enzymatische Oxidation eines Substrats, wie Luminol führt zu einer anhaltenden Emission von Licht, das auf einem Röntgenfilm, einem Phosphoimager oder einer CCD Kamera aufgenommen werden kann. Nicht spezifische Proteinbindungen werden durch geeignete Blockierungslösungen abgedeckt. Der Vorteil des Systems ist die große Substratvielfalt, die hohe Sensitivität und die Geschwindigkeit, mit der die Signale detektiert werden können (Espina et al., 2004).

Radioaktivität

Die Nachweismethode mit radioaktiven Isotopen wird wegen ihres hohen Sicherheitsrisikos und der langen Detektionszeit nur sehr selten eingesetzt. Das Signal wird dabei auf einen Röntgenfilm oder im Phosphoimager aufgenommen. Die Möglichkeit ^{32}P sowohl in Proteinen, DNA und RNA zu inkorporieren, ermöglicht aber die Darstellung von „universellen“ Arrays, um Protein-Protein, Protein-DNA und Protein-RNA Interaktionen zu untersuchen (Ge, 2000; Espina et al., 2004).

Chromogene

Chromogene sind farblose Moleküle, die durch eine enzymatische Reaktion in ein farbiges Produkt umgesetzt werden. Das Produkt liefert ein permanentes Signal und kann leicht visualisiert und analysiert werden. Im einfachsten Fall ist der Antikörper direkt mit dem Enzym konjugiert. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind auch hier die alkalische Phosphatase (AP) und die Meerrettich Peroxidase (HRP). Die Signalintensität variiert dabei mit dem Substrat. In Kombination mit HRP wird häufig 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) als Substrat verwendet. Damit können Proteinkonzentrationen bis in den femtomolaren Bereich mit Protein Microarrays nachgewiesen werden (Pawletz et al., 2001). Um die Spezifität zu gewährleisten ist eine Blockierung für endogene Peroxidase, Biotin und Avidin nötig. Für eine Übersicht über die gebräuchlichsten Substrate siehe Espina et al., 2004. Für eine Signalamplifikation auf der Basis einer durch Peroxidase katalysierten Abscheidung einer Fluorescein markierten oder biotinylierten Phenolverbindung sind Kits wie das CSA (Catalyzed Signal Amplification) System (CSAII

Biotin-free Tyramide Signal Amplification System, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) erhältlich. Dieses hochempfindliche Färbeverfahren wurde für die Immunhistochemie entwickelt, um die Nachweisgrenzen zu erniedrigen. Es ist eine vereinfachte Version des CSA-Systems, das Biotyltyramid zur Signalamplifikation verwendet. Es basiert auf einer integrierten Signalamplifikation durch die Peroxidase katalysierte Abscheidung einer fluoresceinmarkierten Phenolverbindung, die dann im nächsten Schritt mit Peroxidase konjugiertem anti-Fluorescein detektiert werden kann (nach Wasielewski et al., 1997). Zuerst wird mit einem sekundären, Peroxidase konjugierten Antikörper ein primärer Antikörper nachgewiesen. Das im nächsten Schritt zugegebene Amplifikationsreagenz enthält ein Fluorescein konjugiertes Phenol (Fluorescein-Tyramid), dessen Oxidation durch die Peroxidase des sekundären Antikörpers katalysiert wird und dann auf der Probe ausfällt. Das gebundene Fluorescein wird durch ein Peroxidase konjugiertes anti-Fluorescein detektiert und mit dem Chromogensubstrat Diaminobenzidin/Wasserstoffperoxid sichtbar gemacht.

2.2.4 Quantifizierung der Proteinexpression

Immunhistochemie ist bislang die einzige in der Routine angewandte Untersuchungsmethode auf Proteinebene, an Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Probenmaterial. Die Vorteile dieser Methode sind die Informationen über Histomorphologie und die zelluläre Lokalisation des nachzuweisenden Proteins. Die Auswertung ist allerdings sehr subjektiv und es kann nur schlecht quantifiziert werden. Die Quantifizierung durch Reverse Phase Protein Microarrays hebt diese Limitierung auf. Wichtig ist die Genauigkeit und die Verlässlichkeit der dadurch erhaltenen Daten, da bereits geringe Veränderungen in Signalwegen dramatische biologische Effekte bewirken können. Die Lysate werden in Wiederholungen auf den Array aufgetragen, um Schwankungen in der Aufbringung und im Detektionssystem zu kompensieren. Diese Technik hat sich mit „coefficient of variation“ (CV) Werten unter 10% als sehr robust und zuverlässig erwiesen. Ein weiteres wichtiges Attribut ist, dass die Proben in Verdünnungsreihen aufgetragen werden. Im Prinzip wird dadurch für jede Probe eine Kalibrierungskurve erstellt. Dies stellt sicher, dass die Konzentrationen des Antikörpers und des Analyten zueinander getroffen werden, so dass eine Linearität weitestgehend sicher gestellt ist (Liotta et al., 2003; Gulmann et al., 2006). Zur Quantifizierung wird die Expression des Zielproteins normalisiert auf die Expression eines Haushaltsgenes oder auf die Gesamtproteinmenge (Formel 2-2).

$$\text{relative Expression } Z = \frac{[Z]}{[RP]}$$

Formel 2-2

Z=Zielprotein, RP=Referenzprotein (Haushaltgen oder Gesamtprotein)

In Geweben korreliert die Proteinkonzentration allerdings nicht mit der Anzahl an Zellen, da auch die extrazelluläre Matrix eine Vielzahl an Proteinen enthält. Die Proteinexpression

sollte deshalb auf „Housekeeping“ Proteine, wie α -Tubulin, GAPDH oder β -Actin, die nur intrazellulär vorkommen, normalisiert werden. Beachtet werden sollte in diesem Zusammenhang allerdings, dass auch die oben aufgeführten Haushaltsgene, je nach Gewebetyp, unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, wie dies bei Ferguson et al., 2005 gezeigt wurde. Inwieweit eine Normalisierung auf das Gesamtprotein die Quantifizierung in diesen Geweben verfälscht gilt es zu bestimmen.

2.3 Die Rolle von E-Cadherin in der Entstehung von Tumoren

2.3.1 E-Cadherin Struktur und Funktion

Cadherine sind kalziumregulierte Zelladhäsionsmoleküle, die homophile Zellkontakte vermitteln (Takeichi, 1991). Die meisten Adhäsionsmoleküle gehören zu einer der vier Hauptfamilien: Selectine, Integrine, Immunglobulin (Ig)-Superfamilie und Cadherine (für eine Zusammenfassung siehe Pignatelli et al., 1994). Zu der Cadherin Superfamilie zählen die klassischen Cadherine, desmosomale Cadherine, die Protocadherin Familie, die FAT Tumorsuppressoren und die „Seven-pass“ Transmembran-Cadherine. Insgesamt sind in einer einzigen Spezies über 100 Vertreter dieser Familie bekannt (Yagi und Takeichi, 2000). Allen Cadherinen gemeinsam ist das Vorhandensein von sich wiederholenden Cadherin-Domänen (EC). Die Anzahl der Domänen ist für die unterschiedlichen Unterklassen der Cadherine charakteristisch und liegt zwischen zwei bis zu 34 Domänen. Klassische Cadherine sind Transmembranglykoproteine mit einer relativen Molekülmasse von 120-140 kD. Prominente Vertreter dieser Molekülklasse sind das N-Cadherin (neurales Cadherin, CDH2), das VE-Cadherin (vasculär-endotheliales Cadherin, CDH5) und das E-Cadherin (epitheliales Cadherin, CDH1).

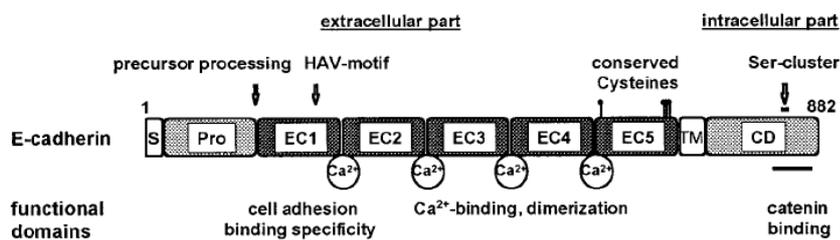


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung von E-Cadherin und seinen funktionellen Domänen (unprozessiert). EC1 bis EC5: Extrazelluläre Domänen, S: Signalsequenz, Pro: Vorläuferpeptid, TM: Transmembrandomäne, CD: Cytoplasmatische Domäne (aus Pötter et al., 1999).

Die Cadherine zeigen eine charakteristische Gewebeverteilung. E-cadherin wird hauptsächlich in nicht neuronalen Epithelzellen sowie während der Embryonalentwicklung exprimiert. In Epithelzellen ist E-Cadherin gewöhnlich im so genannten Adhäsionsgürtel konzentriert und vermittelt dort die Ca²⁺-abhängige Zell-Zell-Adhäsion. Während der Embryonalentwicklung wird es in allen Zellen von Embryonen vor der Einnistung exprimiert und induziert dadurch deren Kompaktion (Vestweber et al., 1987; Larue et al., 1996). Das 728 Aminosäuren umfassende Protein gliedert sich in die N-terminale, extrazelluläre Domäne (EC1-5), einer Transmembrandomäne (TM) und der C-terminalen, cytoplasmatischen Domäne (CD). Die homophile und kalziumabhängige Adhäsion wird über die extrazelluläre Region vermittelt. Diese besteht aus fünf sich wiederholenden Cadherindomänen mit spezifischen kalziumbindenden Aminosäure-Motiven (Abbildung

2-5). Jeweils zwei benachbarte Einheiten sind an der Kalziumbindung beteiligt (Nagar et al., 1996). Der Entzug von Kalzium hebt die homophile Wechselwirkung von Cadherinen gegenüberliegender Zellen auf und führt zu einer Inaktivierung der Adhäsionsfunktion (Ozawa et al., 1990; Noe et al., 1999). Ca^{2+} -Ionen sind essenziell für die Stabilisierung der Struktur des E-Cadherins, da der Kalziumentzug zu einer Konformationsänderung führt (Pokutta et al., 1994). Fehlt dieses, werden die Cadherine aufgrund von Änderungen in ihrer Sekundärstruktur dem Abbau durch Proteasen zugänglich gemacht (Hyafil et al., 1981). Zusätzlich zur Ausbildung homophiler Bindungen lagern sich jeweils die extrazellulären Domänen zweier Cadherin-Moleküle zu Adhäsionsdimere zusammen. Durch diese Formation der Cadherine auf der Zelloberfläche und durch die homophile Bindung der extrazellulären Cadherin-Domänen angrenzender Zellen werden „Reißverschluss-Strukturen“ (Zipper) aus Cadherintetrameren ausgebildet, die die stabile Zell-Zell-Adhäsion bewirken (Shapiro et al., 1995).

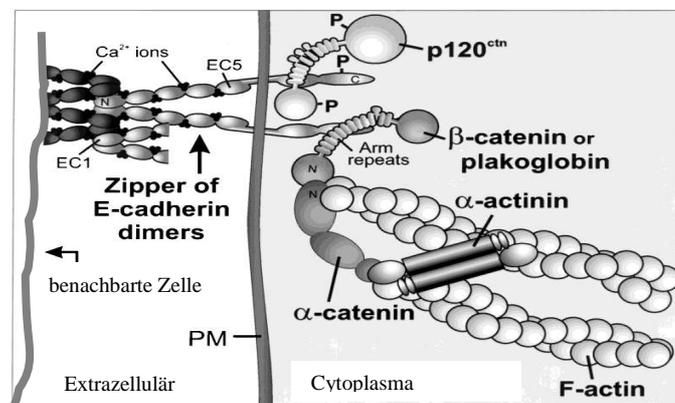


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des E-Cadherin/Catenin-Cyotskelett Komplexes an der Plasmamembran zweier benachbarter Zellen. Ausbildung der E-Cadherin vermittelten homophilen, reissverschlussähnlichen Zelladhäsion. P: Phosphorylierung von Serin oder Tyrosin Resten. Modifiziert nach Berx et al., 1998.

Der zytoplasmatische Teil von E-cadherin ist über α -Catenin und β -Catenin/ γ -Catenin (=Plakoglobin) an das Aktin-Cytoskelett gekoppelt (Abbildung 2-6). β -Catenin vermittelt dabei eine signalweiterleitende Wirkung zu dem Wnt/Wingless Signal-Transduktionsweg (Nelson und Nusse, 2004). Zusätzlich zu den beschriebenen Cateninen sind weitere Proteine direkt oder indirekt mit Cadherinen assoziiert. So beispielsweise das src-Kinase Substrat p120ctn (=p120cas), das direkt an die zytoplasmatische Domäne des E-Cadherins bindet. Der Cadherin/Catenin Komplex ist somit nicht nur an der Zelladhäsion, sondern auch an signaltransduktions und genregulatorischen Prozessen beteiligt (Reynolds et al., 1989; Pfeifer, 1995; Laux et al., 2004).

2.3.2 E-Cadherin in malignen Magentumoren

Magenkrebs ist die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Männern und Frauen. Insgesamt sinkt die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland, wie auch in anderen Industrienationen schon seit mehreren Jahrzehnten deutlich. Die Erkrankungsraten sind nur noch halb so hoch wie vor 30 Jahren. Dies wird vor allem auf veränderte Ernährungs- und Lebensgewohnheiten zurückgeführt. Trotzdem rechnen die Experten der Internationalen Krebsforschungsagentur (IARC) Magenkrebs in Europa gemeinsam mit Brustkrebs, Dickdarmkrebs und Lungenkrebs zu den „vier großen Killern“ unter den Krebstodesursachen. Magenkrebs ist weltweit die zweithäufigste Krebstodesursache (nach WHO, Stand 2007). Epitheliale Adenokarzinome stellen mit 95 Prozent die häufigste maligne Neoplasie des Magens dar. Seltener treten dagegen Lymphome, Sarkome und Karzinoide auf (Coit und Brennan, 1990). Nach der Laurénklassifizierung werden zwei Typen des Tumorwachstums unterschieden. Das diffuse Magenkarzinom und der intestinale Typ (Laurén, 1965). Im diffusen Magenkarzinom infiltrieren einzelne Zellen das Gewebe und bilden nicht kohäsive Zellansammlungen. Zeigen die Tumorzellen mehr als 50 Prozent intrazelluläre Mucineinlagerungen, liegt ein Siegelringzellkarzinom (engl.: signet ring cell carcinoma) vor. Tumorgewebe und Normalgewebe kann beim diffusen Magenkarzinom oft schlecht abgegrenzt werden (Werner et al., 2002). Im Gegensatz hierzu bilden intestinale Karzinome zusammenhängende Verbände, die drüsenähnliche, tubuläre Strukturen ausbilden. Die homophile Zell-zu-Zell-Adhäsion ist in diffus wachsenden Tumoren im Gegensatz zu intestinalen Tumoren oft stark herabgesetzt.

Ein intakter E-Cadherin/Catenin-Komplex wird für die Erhaltung der interzellulären Adhäsion benötigt. Aufgrund seiner Funktion in der Aufrechterhaltung der Zelladhäsion ist es in der Tumorgenese von fundamentaler Bedeutung. Eine Vielzahl von Tumoren sind bislang untersucht worden (Birchmeier und Behrens, 1994). Verringerte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin ist ein Charakteristikum vieler invasiver, epithelialer Tumore und korreliert mit Tumorprogression, Dedifferenzierung, Invasion und Erhöhung des metastatischen Potentials (Sommers et al., 1991; Girolodi et al., 1994; Lipponen et al., 1994; Vet et al., 1994; Valizadeh et al., 1997; Chen et al., 1997; Bailey et al., 1998). Eine Studie von Mayer et al., 1993 zeigte, dass alle der 21 untersuchten diffus wachsenden Magenkarzinome einen Verlust der E-Cadherin Immunreaktivität aufwiesen. Becker und Kollegen analysierten die E-Cadherin Sequenz von 26 diffusen Magenkarzinomen und konnten in 13 Fällen eine somatische Mutationen nachweisen, die in nicht tumorösem Gewebe desselben Patienten nicht vorhanden waren. Im Gegensatz dazu konnten in Proben des intestinalen Typs keine Mutation beschrieben werden. Eine Gruppe von Mischtypen (diffuse und intestinale Anteile) zeigten ebenfalls eine Mutationshäufung (Becker et al., 1993, Becker et al., 1994, Berx et al., 1998). Wie in Abbildung 2-7 gezeigt, deutet sich im Bereich zwischen Exon 7 und Exon 10 ein Mutations-Hotspot an. Insgesamt zeigten elf Patienten einen Verlust von Exon 9 (E-Cadherin $\Delta 9$) oder Exon 8 (E-Cadherin $\Delta 8$)

aufgrund von Mutationen in Splice-Site Bereichen. Eine Veränderung der E-Cadherin Expression durch Mutationen in Exon 8 oder Exon 9 ist in hohen Anteilen der diffusen Magenkarzinome ein charakteristisches Merkmal und tritt beim intestinalen Typ nicht auf (Rosivatz et al., 2002; Becker et al., 1999).

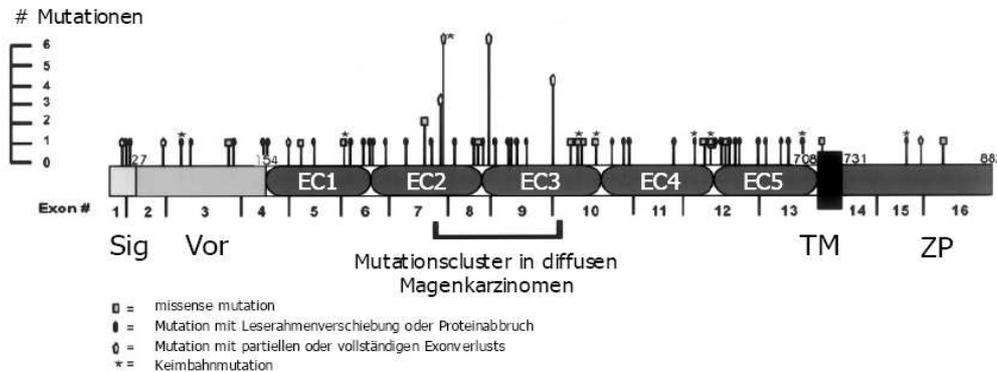


Abbildung 2-7: Mutationsverteilung und -typen im humanen E-Cadherin Genlocus. Sig: Signalpetid, Vor: Vorläuferpeptid, EC1 bis 5: extrazelluläre E-Cadherin-Domänen, TM: Transmembranbereich, ZP: Zytoplasmatischer Teil. Modifiziert nach Berx et al., 1998.

Die Inaktivierung der E-Cadherin vermittelten Zelladhäsion in invasiven Krebserkrankungen kann unter anderem durch Mutationen, Hypermethylierungen im Promotorbereich, posttranslationale Modifikationen und Transkriptionsrepressoren erfolgen (Campbell und Pignatelli, 2002; Hirohashi und Kanai, 2003; Hirohashi, 1998) und ist mit einem „loss of heterozygosity“ (LOH) verknüpft.

Die Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) ist ein wichtiger, hoch konservierter Prozess während der embryonalen Entwicklung, an dem eine Vielzahl von Signalwegen involviert sind. Letztendlich führen die an EMT beteiligten Signalwege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren von E-Cadherin, wodurch die Expression von E-Cadherin reduziert wird und die Zelle ihren epithelialen Phänotyp verliert. Dies ermöglicht ein lösen aus dem Zellverband mit der Möglichkeit an einen anderen Ort im Organismus zu gelangen. Dieser während der Embryonalentwicklung wichtige Prozess, wird auch von Tumorzellen im Prozess der Metastasierung gezeigt. Epithelien werden durch die Basalmembran von extrazellulären Bereichen und umgebende Gewebe abgegrenzt. Durch eine lokale Proliferation der Epithelzellen entsteht ein Adenom. Kommen zu dieser lokalen Dysregulation genetische Veränderungen oder transformierende Ereignisse hinzu, kann ein Karzinom entstehen, wobei die Basalmembran zunächst intakt und die Wucherung lokal begrenzt bleibt. Weitere genetische Veränderungen der Epithelzellen führen dazu, dass sie während der Tumourprogression ihren epithelialen Phänotyp verlieren und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen, die Basalmembran wird durch Proteasen aufgelöst und ein invasives Karzinom entsteht (Thiery et al., 2002, siehe Abbildung 2-8). Die Transkription des E-Cadherins steht unter der negativen Kontrolle des Transkriptionsfaktors Snail. Das Zink-Finger Protein Snail bindet an die E-Box des

Promotorbereiches von E-Cadherin und blockiert damit die Transkription von E-Cadherin. Durch Untersuchungen an frühen Mausembryonen, die einen Epithelial-Mesenchymal Übergang durchlaufen, konnte eine inverse Korrelation der Expressionsstärke von E-Cadherin und Snail gezeigt werden (Batlle et al., 2000, Cano et al., 2000).

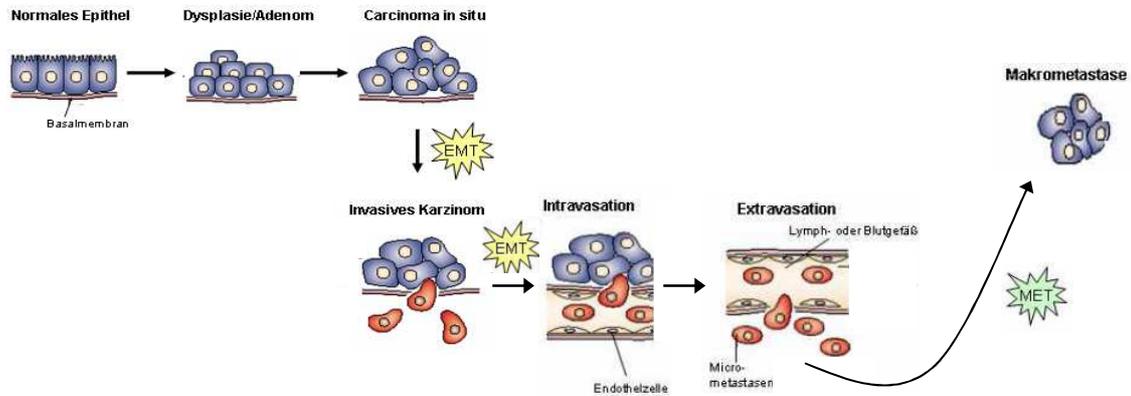


Abbildung 2-8: Tumorprogression. Schematische Darstellung der Schritte der Epithel-Mesenchym-Transition (EMT) und der Mesenchym-Epithel-Transition (MET) während der Tumorentwicklung. Modifiziert nach Thiery et al., 2002

Außer Snail wurde noch SIP1 und Twist als Repressoren der endogenen E-Cadherin Expression identifiziert (Comijn et al., 2001). Rosivatz et al. analysierten 28 diffuse und 20 intestinale Magenkarzinome aus FFPE Proben u.a. auf Snail, SIP1 und E-Cadherin Expression. In 39 Prozent der diffusen Magenkarzinome konnte eine verringerte E-Cadherin Expression festgestellt werden, wobei sechs dieser Proben eine erhöhte Snail Expression zeigten. SIP1 scheint dagegen eine regulatorische Rolle bei intestinalen Tumoren zu spielen (Rosivatz et al., 2002). Der reverse Prozess der EMT, die Mesenchym-Epithel-Transition (MET) ist ebenfalls in der embryonalen Entwicklung, bei der Ausbildung von neuen Organen, notwendig. Dieser Prozess wird auch in Tumorzellen bei der Wiedereinnistung als Metastase in anderen Geweben beobachtet (Thiery et al., 2002).

2.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es eine Methode zu entwickeln, um nicht degradierte Proteine aus Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Gewebeproben stabil und reproduzierbar zu extrahieren. Diese sollten mit etablierten molekularbiologischen Methoden nachzuweisen sein, um anschließend die Proteinexpression zu quantifizieren. Die Untersuchungen wurden an Zelllinien und Geweben durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die Extraktionsmethode eine vergleichbare Effizienz mit unfixiertem und fixiertem Material erreicht und die erhaltenen Ergebnisse dabei einander adäquat sind. Zielprotein der Quantifizierung war das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin. Zur Normalisierung wurden

verschiedene Haushaltgene herangezogen, zusätzlich wurde der Abgleich auf die extrahierte Gesamtproteinmenge durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das Extraktionsprotokoll sollte im nächsten Schritt auf die Hochdurchsatzanwendung mit Reverse Phase Protein Microarrays adaptiert werden. Die Ergebnisse wurden mit entsprechenden Western Blot Auswertungen verglichen, um die Verwendbarkeit der Protein Arrays zu bestätigen.

Abschließend sollte die E-Cadherin Expression in klinischem Archivmaterial von humanen diffusen Magenkarzinomen (E-Cadherin $\Delta 9$ positive Siegelringzellkarzinome) und entsprechenden nicht veränderten Patientenproben quantifiziert werden. Die Ergebnisse wurden der histopathologischen Befundung gegenübergestellt.

3 Material

3.1 Kommerzielle Lösungen/Kits

BIO-RAD Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad, München
Bromphenolblue Xylenecyanole Dye Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G-250	Bio-Rad, München
CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System (mouse primary antibodies)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Buckinghamshire, England
ECL™Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Buckinghamshire, England
EZQ®Protein Quantitation Kit	Molecular Probes/Invitrogen, Paisley, England
PAGEprep™ Protein Clean-Up and Enrichment Kit	Pierce, Rockford, USA
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Precision Plus Dual Color Protein Standard	Bio-Rad, München
Sigma FAST™3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets (DAB Peroxidase Substrat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Super Signal West Femto Substrat	Pierce, Rockford, USA
SYPRO® Ruby Protein Blot Stain	Molecular Probes/Invitrogen, Paisley, England
T-PER®Tissue Protein Extraction Reagent	Pierce, Rockford, USA
Vectastain®ABC Kit Mouse IgG	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA

3.2 Enzyme

Fibrinogen	Merck KGaA, Darmstadt
Thrombin	Merck KGaA, Darmstadt

3.3 Chemikalien, Lösungsmittel und Medien

Standardchemikalien sind nicht im Einzelnen aufgeführt. Soweit nicht anders angegeben erfolgte der Bezug von Sigma Aldrich, Steinheim.

Acrylamide/Bis-Solution 37,5:1	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Casein	Merck KGaA, Darmstadt
Citraconic anhydride	Merck KGaA, Darmstadt
Citric Acid Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin, 0,3 %ig in wässriger Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Milchpulver	Bio-Rad, München
Natriumdeoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt
NP-40	Merck KGaA, Darmstadt
Perhydrol®30 5 H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt
Pertex	Medite Medizintechnik, Burgdorf
SDS	USB, Cleveland, USA
SDS Lösung, 20 %ig	Applichem, Darmstadt
TEMED	Bio-Rad, München
Tissue-Tek®O.C.TTMCompound	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande

Puffer P6: Ultraschall Lysepuffer

Tris/Cl ⁻ , pH8,1	20 mM
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM
EDTA	5 mM
Natriumdeoxycholate	0,1% (v/v)
Triton X-100	1% (v/v)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette

Proteinfällung

Aceton	90 % (v/v)
TCA	10% (v/v)

3.4.2 Puffer und Lösungen für Western Blot**Sammelgel**

0,5 M Tris/HCl, pH6,8	1,25 ml
40 % Acrylamide/Bis-Solution (37,5:1)	0,63 ml
20% SDS-Lösung	25 µl
10% APS	40 µl
TEMED	4 µl
ddH ₂ O	ad 5 ml

Trenngel

1 M Tris/HCl, pH8,8	1,87 ml
40 % Acrylamide/Bis-Solution (37,5:1)	Variabel (je nach %igkeit)
20% SDS-Lösung	37,5 µl
10% APS	45 µl
TEMED	9 µl
ddH ₂ O	ad 7,5 ml

TBS-Puffer

NaCl	150 mM
Tris/HCl, pH8	50 mM

TBST-Puffer

TBS-Puffer + 0,1% Tween20

5x Lämmli-puffer (Ladepuffer)

60mM Tris/HCl, pH6,8	2,5 ml
Glycerin	4,5 ml
β-Mercaptoethanol	2,8 ml
Bromphenolblau	4 mg
SDS	1g
ddH ₂ O	ad 10 ml

SDS-Laufpuffer

TrisBase	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,2% (w/v)

SDS-Transferpuffer

TrisBase	48 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,2% (w/v)
Methanol	20% (v/v)

Coomassie Gel-Färbelösung

Methanol	450 ml
Eisessig	100 ml
Coomassie Brillant Blue G-250	0,5 g
ddH ₂ O	ad 1000ml

Coomassie Gel-Entfärbelösung

Methanol	450 ml
Eisessig	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000ml

Äquibrierungspuffer

TrisHCl, pH7,5	50 mM
SDS	1% (w/v)

Stripping-Puffer

TrisBase	48 mM
SDS	2% (w/v)
Methanol	20% (v/v)

3.4.3 Blockierungslösungen**Milchpulver**

2-10% Milchpulver	variabel (w/v)
TBS(T)	

BSA

3-5% BSA	variabel (w/v)
TBS(T)	

Gelatine

1-3% Gelatine	variabel (w/v)
TBS(T)	

Gelatine in der Lösung gut aufkochen.

NET-Gelatine, 10x

0,5 M TrisHCl, pH7,5	500 ml
50 mM EDTA	100 ml
1,5 M NaCl	67,66 ml
0,5% Triton X-100	5 ml
Gelatine	25 g
ddH ₂ O	ad 1000ml

Gelatine in der Lösung gut aufkochen. Trübung verliert sich nach ca. einem Tag.

Casein

TrisBase	10 mM
NaCl	150 mM
Casein	0,5% (w/v)

Titrierung pH7,3 mit 1N HCl. Lösen unter Erhitzung (~60°C) und ca. 2h rühren.

3.5 Puffer/Medien für Zellkultur

Dimethylsulfoxide (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco's MEM 4500 mg/L (DMEM, Hochglukose + Glutamax™-I + Pyruvate)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FCS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

Geneticin (G-418 Sulfat)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAA, Cölbe
Phosphate Buffered Saline (PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	PAA, Cölbe
RPMI 1640 Medium	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe

Formalin 10%, neutral gepuffert

Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	29 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	46 mM
Formalin (= Formaldehyd 37-40%)	10% (v/v)

Formalin 25%, neutral gepuffert

Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	29 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	46 mM
Formalin (=Formaldehyd 37-40%)	25% (v/v)

Einfriermedium

Zellkulturmedium (ohne Antibiotika)	80% (v/v)
FCS	10% (v/v)
DMSO	10% (v/v)

3.6 Zelllinien

MDA-MB-435S (Mamakarzinomzellen, human)	ATCC, Rockville, USA; (Frixen et al., 1991)
MDA-MB-435S (E-Cadherin wt, Δ8, Δ9 stabil transfiziert)	Institut für Pathologie, TU München (Handschuh et. al., 1999)
HSC45-M2 (Magenkarzinomzellen, human)	Institut für experimentelle Onkologie, TU München (Yanagihara et al., 1993)
A431 (epitheliale Karzinomzelllinie, human)	Nuklearmedizinische Klinik, TU München (Giard, D. J. et al., 1973)
GC2957 (Magenkarzinomzellen, human)	IPATIMUP, Porto, R. Seruca (Machado et al., 1999)
Ishikawa (+/-) (Endometriumkarzinomzellen, human)	Frauenklinik, LMU München (Holinka et al., 1986)

3.7 Antikörper**Primärantikörper**

anti β-Actin (clone AC-15), mouse Mab	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti E-cadherin (AEC, clone 36), mouse Mab	BD Biosciences, San Diego, USA
anti GAPDH, mouse Mab	Stressgen, Victoria, Canada
anti HECD-1 (anti E-Cadherin), mouse Mab	Takara, Genevilleiers, Frankreich
anti Snail 9H2 (gereinigter Hybridoma Überstand), rat Mab	Institut für Molekulare Immunologie; GSF, Dr. Kremmer (Rosivatz et al., 2006)
anti α-Tubulin (clone DM 1A), mouse Mab	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti Δ9 (clone 7E6), rat Mab	Institut für Molekulare Immunologie; GSF, Dr. Kremmer (Becker et al., 1999)
anti phospho-AMPKα(Thr172), rabbit Pab	Cell Signaling, Danvers, USA
anti Histon H1 (clone AE-4), mouse Mab	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Sekundärantikörper

ECL™anti mouse IgG Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	Amersham, Buckinghamshire, England
anti rat IgG Horseradish Peroxidase linked F(ab') ₂ fragment (from goat)	Amersham, Buckinghamshire, England

3.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten (5, 10 und 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
FAST Slides	Schleicher&Schuell, Dassel
Filterpapier	Whatman, Maidstone, England
Hybond ECL™ Nitrocellulose membrane	Amersham, Buckinghamshire, England
Hyperfilm™ ECL	Amersham, Buckinghamshire, England
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sequi-Blot™ PVDF Membran	Bio-Rad, München
Spritzen	B. Braun, Melsungen
SuperFrost® Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen	Nunc, Wiesbaden

3.9 Geräte

Blotapparatur Mini-PROTEAN®3	Bio-Rad, München
Brutschrank Cytoperm 8080	Heraeus, Hanau
Cryostat 1720	Leitz, Bensheim
Geldokumentation EAGLE EYE™ II	Stratagene, La Jolla, USA
Gelkammer Mini-PROTEAN®3	Bio-Rad, München
HPScanjet 3770	Hewlett-Packard, Dornach
Lichtmikroskop AXIOPHOT	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop LABOVERT FS	Leitz, Bensheim
MicroCaster™ Slide Microarrayer	Schleicher&Schuell, Dassel
Mikrotom HM335E	Microtech, Franchville, Frankreich
Powersupply	Biometra, Göttingen
Schlauchpumpe EP-1 Econo Pump	Bio-Rad, München
SpeedVac	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer DU® 530 LS UV/VIS	Beckman Coulter GmbH, München
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Tissue Block TBS88 Dispenser Unit	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Ultraschall, Branson	IKA-Labor Technik, Staufen
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Sigma 4K15	Sartorius AG, Göttingen

3.10 Software

Microsoft Excel (v2002)	Microsoft, Redmond, USA
ImageJ v1.32s	
ScionImage v0.4.0.3	Scion Corporation, Maryland, USA

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Zellkultivierung

Alle aufgeführten Zelllinien wurden standardmäßig bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ in einem geeignetem Medium inkubiert. Mit Ausnahme der Zelllinie GC2957 wurde hierfür Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin verwendet. Bei GC2957 wurde RPMI mit 25 mM HEPES, 20% FCS und 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin eingesetzt. Den stabil transfizierten MDA-MB-435 Zelllinien wurden zusätzliche 12 µl/ml Geneticin (G-418) zugegeben.

4.1.2 Zellpassagierung

Zur Passagierung wurden die adherenten Zellen bei einer Konfluenz von 80-90% zweifach mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (1ml/10cm Schale) abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert, im entsprechenden vorgewärmten Medium neu aufgenommen und anschließend in einer 1:5 bis 1:10 Verdünnung auf vorbereiteten Schalen neu ausgesät.

4.1.3 Starterkulturen aus Gefrierstock

Die Zellen wurden schnell im Wasserbad aufgetaut und zu 5 ml vorgewärmten Zellkulturmedium gegeben. Nach Zentrifugation bei 300 g wurden die Zellen in Zellkulturmedium resuspendiert und auf frische Zellkulturschalen verteilt. Nach 8-12 h wurde das Medium gewechselt.

4.1.4 Anlegen von Gefrierkulturen

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 80% gewaschen, trypsinisiert und in kaltem Zellkulturmedium (auf Eis) in Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 g wurden die Zellen in 2 ml Freezing Medium resuspendiert und auf Cryo-Gefäße verteilt. Die Einlagerung wurde zunächst für 2 h bei -20°C gestartet, dann erfolgte der Transfer in einen -80°C Gefrierschrank. Für eine Langzeitlagerung wurden die Kulturen in flüssigen Stickstoff überführt.

4.1.5 Zellzahlbestimmung

Ein Alliquot an Zellen wurde entnommen, in PBS verdünnt und mit Trypan Blau gefärbt, wobei nur intakte Zellen angefärbt werden. Die Zellzahl wurde anschließend unter dem

Mikroskop mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Lysat zur Proteinextraktion wurden 1×10^7 Zellen eingesetzt.

4.1.6 Fixierung der Zellpellets

Die Behandlung der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 80% durchgeführt. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden 2ml PBS auf die Platten gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 5 min gekühlt zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und die Zellen in der gepufferten 10% Formalinlösung (1ml/15cm Kulturschale) resuspendiert. Unter ständiger Agitation wurden die Zellen bei RT für 30 min. inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Formalinlösung abgesaugt und nochmals mit PBS gewaschen. Danach erfolgte direkt die Proteinextraktion oder die Einbettung der Zellpellets in Paraffin.

4.1.7 Paraffineinbettung der fixierten Zellpellets

Zur Paraffineinbettung wurde die Zellmenge von 4x 15 cm Zellkulturschalen herangezogen. Die Zellpellets wurden vor der Fixierung vereint. Zu den entsprechend vorbehandelten Zellen (siehe Kapitel 4.4.3) wurden gekühlt auf Eis in aufgeführter Reihenfolge 150µl Thrombin (10U/ml), 750µl Casein (10mg/ml, gelöst in 0,04M TrisHCl) und 600µl Fibrinogen (25mg/ml) gegeben. Mit dem letzten Volumen wurde die Zellsuspension gemischt und sofort auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Es folgte eine über Nacht Inkubation bei 4°C. Am folgenden Tag wurde das verfestigte Pellet in eine Biopsie-Einbettkassette überführt. Im nächsten Behandlungsschritt wurden die Zellen zum Wasserentzug durch eine aufsteigende Alkoholreihe geschleust und anschließend mit flüssigem Paraffin überschichtet. Nach Aushärtung können Mikrotom-Schnitte durchgeführt werden. Die Proteinextraktion erfolgte entsprechend nach Anleitung zur Behandlung der Gewebeschnitte (siehe Kapitel 4.4.4).

4.2 Gewebe

4.2.1 Induktion der Tumorbildung in Nacktmäusen

Eine Gesamtmenge von 1×10^6 A431 Zellen wurden in 200 µl sterilem PBS aufgenommen und subkutan in die Schulterpartie von weiblichen Nacktmäusen injiziert. Die applizierten Zellen bilden schnell einen soliden Tumor aus. Das Wachstum wurde wöchentlich kontrolliert. Bei Erreichen einer Tumorgöße von 10-15 mm im Durchmesser (ca. vier Wochen nach der Inokulation), wurden die Tiere getötet und die Tumoren chirurgisch entnommen. Das Tumorgewebe wurde in der Mitte geteilt. Eine Hälfte wurde unfixiert in flüssigem Stickstoff gelagert (Cryo-Konvervierung), die andere Hälfte wurde zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Isopropanol, Xylol,

je 2x 10 min.) entwässert, in 10 %igem Formalin für 24 h fixiert und abschließend in Paraffin eingebettet. Die Tierexperimente wurden in der Nuklearmedizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar, Technischen Universität München (Dr. Roswitha Beck) nach geltenden rechtlichen Richtlinien durchgeführt.

4.2.2 Paraffinschnitte

Für die Immunhistochemie und HE-Färbung wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 55°C getrocknet. Zur Proteinextraktion wurden 10 µm dicke Schnitte der fixierten und eingebetteten Gewebeproben hergestellt und auf Objektträger aufgebracht. Die epithelialen Tumorbereiche wurden nach HE-Färbung und anschließender Begutachtung durch einen erfahrenen Pathologen auf einem Referenzschnitt markiert.

4.2.3 Gefrierschnitte

Das in flüssigem Stickstoff gelagerte, unfixierte cryokonservierte Gewebe wurde mit Tissue-Tek®O.C.TTMCompound im Cryostat aufgefroren und geschnitten. Zur Proteinextraktion wurden 20 µm dicke Schnitte komplett in ein gekühltes Reaktionsgefäß gegeben, eine Mikrodissektion war mit diesen Schnitten in der praktischen Durchführung nicht möglich. Zur HE-Färbung wurden 10 µm Schnitte auf Objektträger aufgezogen und getrocknet.

4.2.4 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Die Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 10 min Xylol, 2x 2 min 100 % Isopropanol, 2x 2 min 96 % Ethanol, 2x 2 min 70 % Ethanol) entparaffiniert. Die Gefrierschnitte wurden für 1 min in Isopropanol mit 5 % Eisessig fixiert. Anschließend wurden sowohl die entparaffinierten FFPE Schnitte, als auch die Gefrierschnitte kurz in destilliertem Wasser gewaschen, 10 min. in Hämatoxylin gefärbt, 10 min. unter Leitungswasser gebläut und anschließend für 10 min. mit 0,3 %iger, wässriger Eosinlösung gefärbt. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Isopropanol, Xylol, je 2x 10 min.) entwässert und zur Fixierung mit Pertex überschichtet und eingedeckt.

4.3 Immunhistochemie

Immunhistochemie für E-Cadherin an FFPE Gewebe

Die Gewebeschnitte wurden zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und in PBS gelagert. Zur Antigendemaskierung wurden sie für 4 min im Schnellkochtopf in Citratpuffer gekocht und anschließend wieder in PBS abgekühlt. Durch eine 15 min Inkubation mit 1 % Wasserstoffperoxid wurden endogene Peroxidasen geblockt. Nach dreimaligem waschen in PBS wurden die Schnitte mit je 100 µl anti E-Cadherin (AEC)

Antikörper 1:1500 in 1 % BSA/PBS bzw. anti E-Cadherin ($\Delta 9$) 1:2000, 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch 3x 2 min waschen in PBS entfernt und die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur mit anti-Maus Sekundärantikörper (aus Vectastain®ABC-Kit), 1:200 in 1 % BSA in PBS, inkubiert. Parallel wurde der Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex angesetzt (aus Vectastain®ABC-Kit), die Gewebeschnitte mit je 200 μ l überschichtet und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem waschen in PBS wurden die Schnitte 10 min bei Raumtemperatur in DAB (je Sigma FAST™ DAB und Sigma FAST™ Urea H₂O₂ Tablette in 5 ml destilliertem Wasser) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen, für 10 sec mit Hämatoxylin gefärbt, kurz in warmem Wasser gebläut, durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, mit Pertex überschichtet und eingedeckt.

4.4 Proteinextraktion

4.4.1 Ultraschallbehandlung

Die Ultraschallbehandlung der fixierten und gewaschenen Zellen, bzw. der präparierten Gewebeproben wurde direkt in den Reaktionsgefäßen auf Eis durchgeführt. Hierzu wurde die Dispenserspitze des Ultraschallgeräts in den Extraktionspuffer im Reaktionsgefäß eingetaucht. Es wurden 10 Pulse mit einer Amplitude von 25% angewandt. Die Pulslänge betrug 20 sec. mit jeweils 30 sec. Pause zwischen den einzelnen Pulsen. Danach wurde wie in Kapitel 4.4.3 weiterverfahren.

4.4.2 Proteinextraktion aus nicht fixierten Zellen mit T-PER®Tissue Protein Extraction Reagent

Die unfixierten Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, abgeschabt und nochmals in PBS gewaschen. Die Zellen aus zwei 15 cm Schalen wurden ausgezählt, 1×10^7 Zellen in 200 μ l T-PER®Tissue Protein Extraction Reagent aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 20800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

4.4.3 Proteinextraktion aus fixierten und nicht fixierten Zellen mit FFPE Extraktionspuffer

Zur Proteinextraktion mit Extraktionspuffer wurden jeweils fixierte und nicht fixierte Zellen aus dem gleichen Kultursatz nach identischem Protokoll präpariert. Die Zellen von zwei 15 cm Kulturschalen wurden vereint und einer Fixierung unterzogen, die Zellen zwei weiterer Schalen wurden unfixiert belassen. Nach dem letztem Waschschrift in PBS wurden die Zellen ausgezählt. Pro Extraktion wurden 1×10^7 Zellen verwendet und in 200 μ l Extraktionspuffer aufgenommen (2ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluß). Die Inkubation erfolgte unter gelegentlichem Vortexen für 15 Minuten auf Eis. Optional wurde

hier ergänzend der mechanische Aufschluß mit Teflonpistille oder Glasperlen, bzw. die Ultraschallbehandlung durchgeführt. Die Proben wurden danach 20 Minuten im Wasserbad bei 100 °C gekocht, anschließend 2 Stunden im Heizblock bei 80°C mit 750 rpm geschüttelt und abschließend bei 4°C und 20800 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei –20°C gelagert.

4.4.4 Proteinextraktion aus FFPE- und Cryogewebe mit FFPE Extraktionspuffer

Für die Extraktion der FFPE Gewebe wurden die 10µm Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (je 3x 10 min Xylol, 2x 10 min 100 % Isopropanol, 2x 10 min 96 % Ethanol und 2x 70 % Ethanol) entparaffiniert und anschließend in destilliertem Wasser gelagert. Vor der Extraktion wurden die Tumorbereiche anhand der HE-Färbung von einem erfahrenen Pathologen markiert. Der auf der Referenz gekennzeichnete Bereich wurde von den Glasträgern mit einer Kanüle abgekratzt (mikrodissektiert) und in Extraktionspuffer suspendiert. Die Gefrierschnitte wurden direkt in Reaktionsgefäße mit vorgelegtem, gekühltem Extraktionspuffer gegeben. Beide wurden dann für 15 min unter gelegentlichem vortexen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben analog wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben, für 20 min im Wasserbad bei 100°C gekocht, 2 h bei 80°C und 750rpm inkubiert und zum Schluss 15 min bei 4°C und 20800 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei –20 °C gelagert.

4.5 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

4.5.1 Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der unfixierten Zellysate in T-Per wurde nach der Bradford-Methode ermittelt (Bradford, 1976). Dazu wurden 100 µl der Probe mit 900 µl BIO-RAD Protein Assay Farbstoffkonzentrat vermischt und die Extinktion bei 595 nm gegen eine Leerprobe ermittelt. Parallel wurde eine BSA Standard Konzentrationsreihe zwischen 1 µg/ml und 50 µg/ml vermessen und eine Eichkurve erstellt, woraus die Proteinkonzentration errechnet wurde.

4.5.2 Gesamtproteinbestimmung nach Coomassie-Färbung

Die Blotfärbemethode kam zu Anfang der Arbeit zum Einsatz. Hierbei wird das SDS-PAGE Gel zunächst in einer Coomassie Brilliant Blue R250-Färbelösung für 4 h unter Bewegung inkubiert. Nach anschließendem Entfärben in Entfärbelösung wurde die Gelfärbung digital dokumentiert (siehe auch Kapitel 4.6.2). Zur Ermittlung der aufgetragenen Proteinmenge wurde das Gel eingescannt und die gesamte Auftrennungsstrecke pro aufgetragenen Lysat densitometrisch vermessen. Bei zusätzlichem Auftrag von entsprechenden Standards kann die Lademenge und somit die Lysatkonzentration quantitativ bestimmt werden. Nachteil dabei ist, dass die Vermessung

als nicht besonders exakt einzustufen ist. Zudem ist dieses Verfahren zeit- und probenaufwendig.

4.5.3 Gesamtproteinbestimmung nach EZQ[®] Protein Quantitation Kit

Die im EB-Puffer (und den meisten anderen Extraktionspuffern) enthaltenen Komponenten verhindern eine Konzentrationsbestimmung der extrahierten Proteine mit dem Bradford Assay. Um diese Lysate für eine absolute Quantifizierung ebenfalls vermessen zu können, wurde der fluoreszenzbasierte EZQ[®] Protein Quantitation Kit verwendet. Die Methode kann bei Anwesenheit von Farbstoffen, Detergenzien, Harnstoff und Reduktionsmitteln angewandt werden. Sie ist zudem schnell und somit auch für die Hochdurchsatzanwendung geeignet. Als Standard wurde ein nicht fixiertes Zellysate von Ishikawa+ Zellen in T-PER[®]Tissue Protein Extraction Reagent (plus Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablette/10 ml Puffer) eingesetzt, dessen Konzentration per Bradford Assay bestimmt und in EB-Puffer auf Konzentrationen zwischen 0,06 µg/µl und 4 µg/µl eingestellt wurde. Jeweils 1 µl der Proteinlysate und des Standards wurden auf das im Kit enthaltene „Assay Paper“ aufgespottet. Nachdem die Lysatspots in das Papier eingezogen waren, wurden die Proteine 5 Minuten mit Methanol fixiert und die Filter anschließend im Trockenschrank getrocknet. Das Filterpapier wurde dann für 30 min mit EZQ Protein Quantitation Reagent unter leichtem Schütteln und vor Licht geschützt inkubiert. Abschließend wurde die Membran 3x je 2 Minuten mit EZQ Waschpuffer gewaschen. Die fluoreszenzmarkierten Proteine wurden im Eagle Eye Transilluminator bei 300 nm angeregt und detektiert. Die Proteinspots wurden mit ScionImage quantifiziert und die Konzentrationen anhand des parallel aufgetragenen Standards berechnet.

4.5.4 Gesamtproteinbestimmung nach Sypro[®] Ruby Protein Blot Stain

Die direkte Quantifizierung der Proteinspots auf den MicroArray Protein Slides wurde mithilfe des Sypro[®] Ruby Protein Blot Stain (Molecular Probes/Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert auf einer fluoreszierenden Ruthenium-Komplexverbindung. Sie kann in Anwesenheit von Farbstoffen, Reinigungsmitteln, Harnstoff und Reduktionsmitteln angewandt werden. Der große Vorteil liegt darin, dass die Methode sehr sensitiv ist, einen großen linearen Bereich zur Quantifizierung aufweist und die folgenden Prozessschritte nicht beeinflussen soll. Die Gesamtproteinbestimmung kann somit direkt auf dem Protein Microarrays erfolgen, ohne weitere Reinigungsschritte. Der Nachteil liegt in der Giftigkeit der Sypro[®]Ruby-Lösung. Alle Inkubationsschritte wurden unter leichter Bewegung durchgeführt. Die gespotteten Slides wurden zunächst mit einer Aquilibrierungslösung aus 7% Essigsäure/10% Methanol für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 4x mit deionisiertem Wasser für 5 min gespült. Die Slides wurden dann für 15 min in das Sypro[®] Ruby Färbereagenz gelegt. Nach mehrmaligem spülen mit Wasser, um überschüssiges Reagenz zu entfernen, wurden die Spots im Eagle Eye Transilluminator bei 300 nm angeregt und detektiert. Die

Färbeintensität wurde mit ScionImage ausgewertet und quantifiziert. Mithilfe eines zusätzlich aufgespotteten Standards kann eine absolute Quantifizierung direkt auf den Slides durchgeführt werden. Nach der digitalen Signalaufzeichnung wurden die Slides in 150 mM Tris (pH 8.8)/20% Methanol für 10 min inkubiert. Nach mehrfachem spülen mit Wasser und anschließender Trocknung konnten die Slides unmittelbar in der Immundetektion eingesetzt werden.

4.6 Western Blot

4.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Herstellung der Gele wurde das Mini PROTEAN®3 System von Bio-Rad Laboratories verwendet. Das Trenngel (je nach Anwendung 7-12%ig) wurde nach eingießen in die Kammer mit 0,1 %iger SDS-Lösung zur Oberflächenglättung überschichtet. Nach Auspolymerisierung wurde die SDS-Überschichtung mit destilliertem Wasser ausgespült, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach erneuten 30 min war dieses ebenfalls polymerisiert und die Proteinproben konnten in die Probentaschen eingefüllt werden. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Lämmli-puffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Die Auftrennung im Gel erfolgte bei 100-150 Volt in SDS-Laufpuffer.

4.6.2 Coomassie Brilliant Blau R250 Färbung von Acrylamidgelen

Das Sammelgel wurde zunächst mechanisch vom Trenngel entfernt. Das zugeschnittene Polyacrylamidgel wurde dann über Nacht bei Raumtemperatur in eine Coomassie Brilliant Blau R250 Färbelösung gelegt und am nächsten Tag solange entfärbt, bis die Banden gut sichtbar und der Hintergrund möglichst vollständig entfärbt war. Das Gel wurde in Folie eingelegt und eingescannt. Die Protein-Laufbanden wurden einer qualitativen Beurteilung unterzogen und über die Färbeintensität wurde darüber hinaus eine relative Gesamtproteinbestimmung auf dem Gel durchgeführt. Die Vermessung erfolgte mit ScionImage. Vor dem Blotten wurden die Gele kurz mit TBS gewaschen und zur vollständigen Entfärbung und pH-Kalibrierung für 30 min. in Äquilibriumspuffer inkubiert. Nach erneutem waschen in Transferpuffer konnten die Gele unmittelbar zum blotten eingesetzt werden.

4.6.3 Proteintransfer (Western Blot)

Zum Zwecke der Immundetektion wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel in einer Nassblot-Apparatur (Protean III, Biorad, München) nach Anleitung des Herstellers auf PVDF- bzw. Nylonmembranen transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei einer festen Spannung von 100 V in gekühltem Transferpuffer.

4.6.4 Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion wurde mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECLPlus)-System nach Angaben des Herstellers (Amersham) durchgeführt. Die Membranen wurden zunächst eine Stunde in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur blockiert, mit TBS gewaschen und unter ständiger Bewegung für 16 h bei 4°C mit den angegebenen Endkonzentrationen der primären Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Je nach verwendetem Antikörper wurden dazu verschiedene Blockierungslösungen verwendet (siehe Tabelle 4.1). Die Membranen wurden danach 3x 10 min mit TBST gewaschen und 2 h bei 4°C mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in geeigneter Konzentration inkubiert (siehe Tabelle 4.1). Anschließend wurde 3x mit TBST für 10 min gewaschen und nach Abtropfen der Membran für eine Minute mit dem Luminol Substrat ECLPlus inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

Primärantikörper*	Spezies	Verdünnung	Blockierungslösung	Inkubation
β-Actin	mouse	1:10000	0,5 % Casein/TBST	2 h bei 4°C
E-cadherin (AEC)	mouse	1:10000	NET-Gelatine/0,5 % Casein/TBST	2 h bei 4°C
E-cadherin (HECD)	mouse	1:2500	0,5 % Casein/TBST	2 h bei 4°C
E-cadherin (Δ9)	rat	1:1000	0,5 % Casein/TBST	ÜN bei 4°C
GAPDH	mouse	1:5000	0,5 % Casein/TBST	2 h bei 4°C
Snail	rat	1:20	5% Milchpulver/3% BSA (japan)	ÜN bei 4°C
α-Tubulin	mouse	1:5000	0,5 % Casein/TBST	2 h bei 4°C
pAMPKα	mouse	1:1000	5% Milchpulver	2 h bei 4°C
Sekundärantikörper*				
anti mouse IgG - HRP	sheep	1:10000	wie primärer Antikörper	2 h bei RT
anti rat IgG - HRP	goat	1:10000	wie primärer Antikörper	2 h bei RT

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper und Blockierungslösungen. * für die exakte Bezeichnung und Herkunft siehe Kapitel 3.7

4.7 Reverse Phase Protein Microarrays

4.7.1 Dot Blots

Anfänglich wurden die Lysate manuell im Dot Blot Verfahren auf PVDF- oder Nitrozellulosemembranen übertragen. Jeweils 1µl der Proteinlysate wurden dabei mit einer Pipette auf die Membran aufgebracht. Nach Trocknung wurde die Membran kurz in TBS gewaschen. Die Membran war anschließend direkt zur Immunodetektion einsetzbar. Bei Verwendung einer PVDF Membran wurde diese zuvor für 5 min in Methanol eingelegt und während des Spotauftrags auf Transferpuffer getränktem Filterpapier feucht gehalten.

4.7.2 „Reverse Phase“ Protein Microarrays

Grundlegend entspricht der Arrayansatz methodisch einem Dot Blot. Verwendet wurde ein kommerzielles System von Schleicher & Schuell. Zur Herstellung der standardisierten „Reverse Phase“ Protein Microarrays wurden der Handspotter MicroCaster™ Slide Microarrayer (Schleicher & Schuell Bioscience), sowie die vom gleichen Hersteller erhältlichen FAST™ Slides eingesetzt (siehe Abbildung 4-1).

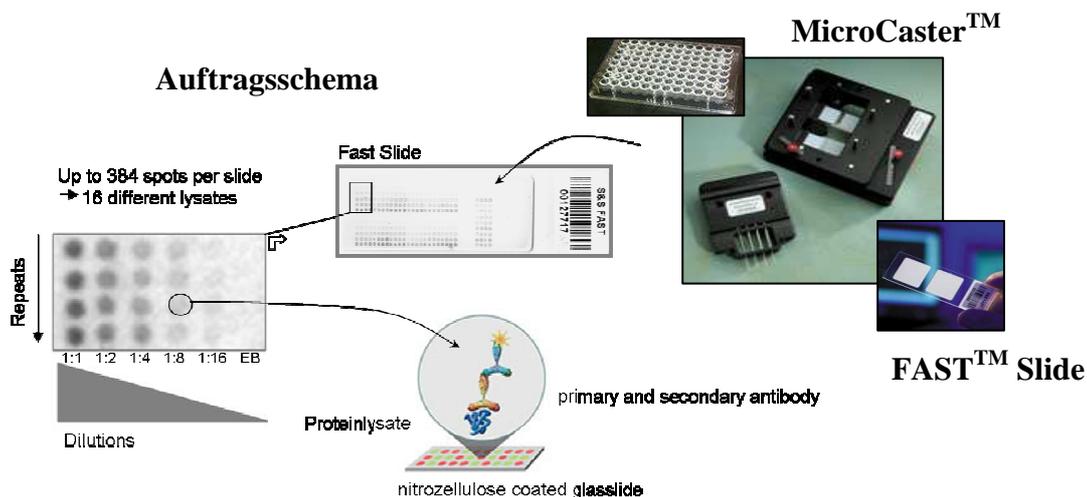


Abbildung 4-1: Instrumentelle Komponenten zur Herstellung und schematische Darstellung der Präparation der „Reverse Phase“ Phase Protein Microarrays. Die Probenvorbereitung erfolgte im 96 well Platten Format. Die Proben werden von dort mithilfe des MicroCaster Handspotters (Schleicher & Schuell) auf die vorbereiteten FAST™ Slides gespottet. Der Auftrag erfolgte in vier Wiederholungen mit jeweils 5 verschiedenen Verdünnungen (1:1 bis 1:16). Als Negativkontrolle wurde der Extraktionspuffer EB in der sechsten Spalte aufgetragen. Die Slides werden in Blockierungslösung gegeben und anschließend mit dem primären und sekundären Antikörper inkubiert (reverse Phase).

Es handelt sich bei Letzteren um Glasträger, die mit einer Nitrozellulosemembran beschichtet sind. Die Proteinlysate wurden hierzu in 96 well Platten überführt und mit dem Microarrayer auf die FAST™ Slides nach Herstellerangaben transferiert. Die dabei aufgebrachte Lysatmenge liegt bei etwa 40 nl, bei einem Spotdurchmesser von ca. 500µm, wobei die aufgebrachte Menge primär von dem verwendeten Puffersystem und dessen Adhäsionseigenschaften abhängig ist. Nach Trocknen der Spots, wurden die Slides für 5 min in TBS gewaschen und waren danach bereit für die weiteren Behandlungen, oder zur vorübergehenden Lagerung. Theoretisch sind mit diesem System bis zu 768 Spots pro Slide möglich. Bei den hier dargestellten Analysen wurden allerdings nur 384 Lysate gespottet, um zu verhindern, dass die einzelnen Spots ineinander übergehen. Die Lysate wurden in einer Verdünnungsreihe von unverdünnt bis zu einer 1:16 Verdünnung und der Puffer Negativkontrolle aufgetragen. Der Auftrag erfolgt in vier Wiederholungen, um eine statistische Absicherung zu erhalten und um die Wiederholbarkeit der Ergebnisse zu zeigen (vergl. Auftragsschema in Abbildung 4-1). Aus diesen Werten wurden das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Varianzkoeffizient der Proben errechnet.

4.7.3 Detektion mit dem CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System

Das System hat den Vorteil, dass durch den unlöslichen Farbniederschlag eine Signalamplifikation erreicht werden kann. Die Behandlung wurde mit kleinen Modifikationen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die FAST™ Slides wurden zunächst 60 min mit Peroxidase-Block inkubiert, in TBST gewaschen und anschließend für 60 min in 0,5 % Casein in TBST geblockt. Andere Blockierungslösungen zeigten hier einen unspezifischen Signalhintergrund. Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln durchgeführt. Die Antikörper wurden zunächst in den gleichen Verdünnungen eingesetzt, wie bei den Western Blots aufgeführt. In späteren Versuchen wurden die Antikörper Verdünnungen angepasst, so dass eine gemeinsame Auswertung bei gegebenen Lysatkonzentrationen möglich war. Nach 10 min waschen in TBST wurden die Arrays für 30 min mit Anti-Maus Immunoglobulin-HRP inkubiert, erneut gewaschen und für 15 min lichtgeschützt mit dem Amplifikationsreagenz inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde 15 min mit anti-Fluorescein-HRP inkubiert, nochmals gewaschen und zum Schluss der unlösliche Niederschlag mit Liquid DAB Substratchromogen sichtbar gemacht. Nach fünfminütiger Inkubation mit dem Substrat wurden die Slides mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Die Slides wurden eingescannt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit ScionImage.

4.7.4 Detektion mit ECLPlus

Der Nachweis wurde homolog der Western Blot Immundetektion durchgeführt (siehe Kapitel 4.6.4).

4.8 Densitometrische Vermessung von Protein Microarrays und Western Blots

Zur Densitometrischen Auswertung wurden die Western Blots und Protein Microarrays in Graustufen mit einer Auflösung von 600 dpi eingescannt und als nicht komprimierte Grafikdatei im Tiff Format abgespeichert. Die Grafikdateien wurden in ScionImage geladen. Zur Hintergrundkorrektur wurde zunächst der Algorithmus des 2D „Rolling Ball“ ($r=100$ für Microarray Spots und $r=200$ für Western Blot Banden) angewendet. Danach wurde eine geeignete Vermessungsfläche definiert, so dass alle Spots/Banden eines Arrays/Blots in dieses Areal gelegt und vermessen werden konnten. Die vom Programm ausgegebenen densitometrischen Zahlenwerte wurden mit Microsoft Excel weiter bearbeitet und ausgewertet. Von den einzelnen Spotwiederholungen wurde jeweils das arithmetische Mittel berechnet. Die relativen, gemittelten Endintensitäten der einzelnen Messpunkte wurden nach Abzug des zugehörigen arithmetischen Mittels der Negativkontrolle (=Puffer) erhalten. Die Ausschlussgrenze (LOD) von Messwerten wurde dabei nach Definition auf $2x SD(X)$ des zugehörigen Negativwertes festgelegt.

$$I = \bar{x} - \bar{p}$$

Formel 4-1

I = Spotintensität, \bar{X} = arithmetisches Mittel Messwert, \bar{p} = arithmetisches Mittel Negativkontrolle (Puffer)

Zur statistischen Auswertung wurden die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (%CV) berechnet. Die Standardabweichung (SD) ist ein Maß für die Streuung eines Wertes um seinen Mittelwert. Im konkreten Fall gibt sie an, wie konsistent die Intensität der in Wiederholung aufgetragenen Spots ausfällt. Da die Varianz und damit die Wurzel daraus, die Standardabweichung, nicht normiert sind, kann im Allgemeinen nicht beurteilt werden, ob die Standardabweichung im Verhältnis groß oder klein ist.

$$SD(X) = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Formel 4-2

n = Gesamtzahl der Messwerte, x = Messwert, \bar{X} = arithmetisches Mittel

Der Variationskoeffizient (%CV) drückt die Standardabweichung einer Verteilung in Einheiten des ihr zugrundeliegenden arithmetischen Mittels aus, d.h. man setzt die Streuung zum Mittelwert in Relation und drückt dies in der Regel als Prozentwert aus. Der Variationskoeffizient stellt als dimensionsloses Streuungsmaß eine Art Normierung der Varianz dar. Ein Wert von x Prozent bedeutet, dass die Streuung x % des arithmetischen Mittels ausmacht. Der Variationskoeffizient ist ein sehr geeignetes Maß, wenn man verschiedene Verteilungen hinsichtlich ihrer Streuungsverhältnisse miteinander vergleichen will. Je kleiner dieser Prozentwert, desto homogener ist die Streuung der Verteilung. Bei Werten $<10\%$ kann man von einer sehr homogenen Verteilung sprechen.

$$\%CV = \frac{SD(X)}{\bar{x}} * 100$$

Formel 4-3

\bar{X} = arithmetisches Mittel

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung des Protokolls zur FFPE Proteinextraktion

5.1.1 Überprüfung der in der Literatur beschriebenen Proteinextraktionmethode aus FFPE Material

Die Möglichkeit zur Extraktion von Proteinen aus Formalin fixiertem und Paraffin eingebetteten Geweben wurde 1998 in einer Publikation von Ikeda et al. beschrieben. Zum Einstieg in die dargestellte Arbeit wurde zunächst versucht die dort beschriebene Methode nachzubilden. Die Analysen wurden an Endometrium-Geweben durchgeführt. Als Puffer wurde der von Ikeda verwendete RIPA Puffer (in der weiteren Arbeit Puffer P2), sowie ein kommerziell erhältliches Extraktionssystem für Gesamtprotein aus Geweben (T-Per, Pierce) getestet. Darüber hinaus kam ein selbst entwickelter Extraktionspuffer, folgend EB genannt zum Einsatz. Die Proteinextraktion wurde nach Anleitung der von Ikeda beschriebenen Methode bei zwei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Die Proteinlysate wurden auf ein SDS-Page Gel aufgetragen, auf PVDF-Membran transferiert und die Immunreaktivität mit den Antikörpern gegen Snail, α -Tubulin und AEC getestet. In Abbildung 5-1 sind die Ergebnisse der Immunoblots dargestellt.

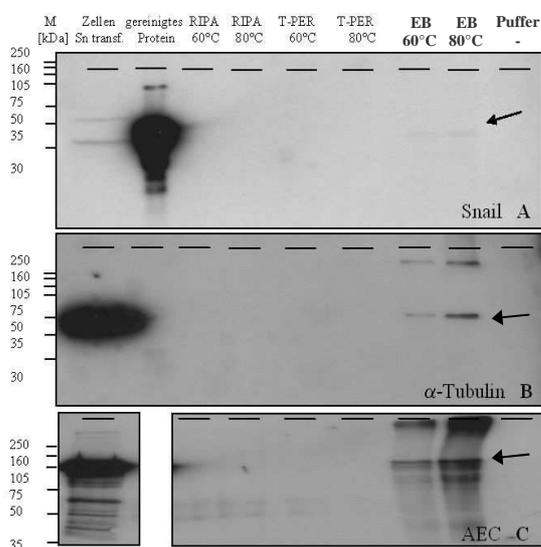


Abbildung 5-1: Extraktionsmethode nach Ikeda. Western Blot Detektion der Lysate aus Plazenta FFPE Geweben, die nach Extraktionsmethode von Ikeda et al., 1998. Pro Lysat wurden 4x10 μ m Gewebeschnitte in 50 μ l Extraktionspuffer suspendiert. Die Proben wurden 20 min bei 100°C sowie 2 h bei 60°C bzw. 80°C inkubiert. Es wurden jeweils 8 μ l auf das Gel aufgetragen. Als Kontrollen sind Lysate der unbehandelte GC2976 SnHis Zellkultur (24 μ g), sowie ein aufgereinigtes Snail Protein (20ng) aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit ECL^{Plus} (A) Antikörperreaktion gegen Snail (1:50), 12,5%iges SDS-Page Gel. (B) Antikörperreaktion gegen α -Tubulin (1:5000), 12,5%iges SDS-Page Gel (C) Antikörperreaktion gegen E-Cadherin (AEC 1:2500), 10%iges SDS-Page Gel.

Mit dem Antikörper gegen Snail konnten nur mit dem gereinigten Protein ein klares Signal erhalten werden (Abbildung 5-1 A). Ansonsten waren schwache Signale bei den transfizierten Zellkulturlysaten und den Lysaten mit EB-Puffer erkennbar (Pfeil). Für α -Tubulin (B) und AEC (C) wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Die unbehandelten Zellkulturlysate und die mit EB-Puffer behandelten Gewebe zeigten deutliche Signale bei der erwarteten Bandengröße. Die erhöhte Inkubationstemperatur von 80°C lieferte in allen Fällen ein besseres Ergebnis. Die Ergebnisse von Ikeda konnten in diesem Versuch nicht

reproduziert werden, zumindest nicht mit den dort beschriebenen Bedingungen. Allerdings erwies sich erfreulicherweise der von uns getestete, modifizierte Extraktionspuffer mit allen Antikörpern als effektiv. Dieses Puffersystem wurde in den weiteren Untersuchungen zur Extraktion verwendet und weiter entwickelt. Für nähere Informationen zum Puffersystem siehe QProteom FFPE Tissue Kit, Qiagen GmbH, Hilden (www.qiagen.com).

5.1.2 Grundlegende Betrachtungen zum Extraktionsverfahren

Variiert wurden im nächsten Schritt die Inkubationszeiten bei der Präparation. Es wurde jeweils eine kürzere Vorbehandlung bei 100°C durchgeführt (I(nkubation)-1), was zu einem „Aufbrechen“ der bei der Fixierung in Formalin stattfindenden Proteinvernetzung führen soll. Anschließend wurde bei 80°C für einen längeren Zeitraum inkubiert (I(nkubation)-2), um die Extraktionsreaktion zu vervollständigen. Im Experiment wurden dabei entweder die Zeiten der 100°C Inkubation variiert (Abbildung 5-2, links), oder die der Hauptinkubation bei 80°C (Abbildung 5-2, rechts).

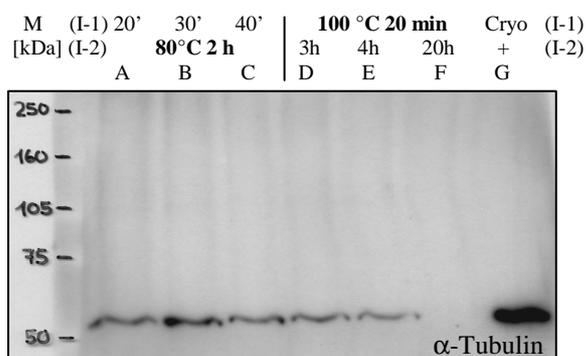


Abbildung 5-2: Inkubationsbedingungen. Variation der Lysat-Inkubationszeiten der thermischen Behandlung. Standard sind 100°C für 20 min (I-1)/80°C für 2 h (I-2). Links wurden die I-1 Inkubationszeiten variiert, rechts die I-2 Zeiten. Western Blot gegen α -Tubulin (1:2500), 7 %iges SDS-Page Gel. FFPE Darmgewebe. Pro Lysat wurden 4x 10 μ m Schnitte in 100 μ l Puffer eingesetzt. Gelauftrag 10 μ l. Positivkontrolle Plazenta Cryogewebe in T-Per (16 μ g). Die Detektion erfolgte mit ECL^{Plus}.

Die Lysate wurden bei diesem Ansatz aus Darmgewebe präpariert, um gewebespezifische Restriktionen auszuschließen. Als Antikörper wurde α -Tubulin verwendet. Das beste Ergebnis in der Präinkubation (I-1) wurde bei 30 min erreicht (Lysat B). Verlängerte Hauptinkubationszeiten (I-2) führen eher zu einer verminderten Reaktivität. Bei der 20h Inkubation (Lysat G) ging die Immunreaktivität sogar komplett verloren. Je länger die Proben somit den erhöhten Temperaturen ausgesetzt waren, desto schlechter war die Immunreaktivität. Um Proteinverluste oder Degradierungen zu vermeiden, wurden daher möglichst kurze Inkubationszeiten zur Extraktion gewählt. Darüber hinaus stellt dies auch einen ökonomischen Faktor in Hinblick auf den Hochdurchsatz-Einsatz in der klinischen Routine dar. Die Parameter für Inkubationszeiten und -temperaturen wurden auf 20 Minuten bei 100°C und einer folgenden Inkubation von 2 Stunden bei 80°C festgelegt. Die Verlängerung der I-1 Einwirkzeit stellt ggf. eine mögliche Modifikation des Standardprotokolls dar, um bei schwierigen Proben, oder bei sehr geringer Materialverfügbarkeit die Proteinausbeute zu erhöhen.

Bislang konnte gezeigt werden, dass eine Extraktion von nicht degradierten Proteinen möglich ist, nicht aber, dass diese auch in Lösung vorliegen und so folgend eine

quantitative Aussage möglich bzw. sinnvoll ist. Das Löslichkeitsverhalten sollte durch eine Verdünnungsreihe der Proben überprüft werden. Die detektierten Signalstärken sollten sich dabei analog der Auftragsmenge verhalten.

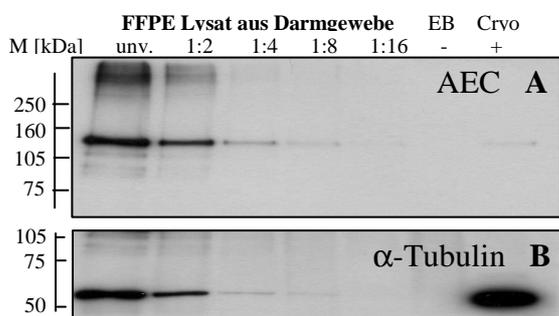


Abbildung 5-3: Löslichkeitsverhalten. Verdünnungsreihe des FFPE Darmgewebes (Lysat B) aus Abbildung 5-2. Western Blots gegen (A) E-Cadherin (AEC 1:2500) und (B) α -Tubulin (1:2500). Gelauftrag je 10 μ l der Verdünnungstufen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16. Die Verdünnung der Proben erfolgte mit EB-Puffer. Positivkontrolle Plazenta Cryogewebe in T-Per (16 μ g). Die Detektion erfolgte mit ECL^{Plus}.

Getestet wurden Antikörper gegen E-Cadherin (AEC) und α -Tubulin. Wie in Abbildung 5-3 gezeigt, nimmt die Signalstärke bei beiden Immunreaktionen entsprechend der Verdünnung ab. Die Banden zeigen die spezifische Größe für die untersuchten Proteine. Die extrahierten Proteine sollten daher weitestgehend in Lösung vorliegen, die gemessenen Signalintensitäten verhalten sich entsprechend der aufgetragenen Mengen, wobei auf eine exakte Vermessung verzichtet wurde.

Bei fast allen bisher durchgeführten Western Blots waren neben der spezifischen Bande weitere konkrete Banden zu erkennen. In späteren Untersuchungen mit E-Cadherin negativen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass diese Signale spezifisch für das detektierte Protein waren, es sich also um nicht vollständig aufgebrochene bzw. degradierte Proteinkomplexe handelt und nicht um unspezifische Kreuzreaktionen (siehe Abbildung 5-11, Antikörperspezifität). Darüber hinaus treten häufig auch unspezifische und diffuse Reaktionssignale auf, überwiegend im hochmolekularen Bereich. Eine Aufreinigung der Proteinlysate könnte folglich eine Möglichkeit sein die Signalspezifität zu verbessern. Die extrahierten Proteinlysate der FFPE Darmgewebe aus Abbildung 5-2 (Lysate A und B) wurden, zur Entfernung der hochmolekularen Bestandteile, auf kommerzielle PALL Nanosep-Säulen gegeben (siehe Abbildung 5-4 A). Die Ausschlussgrenzen lagen bei 100 kDa (links) bzw. 300 kDa (rechts). Die Proben A und B unterscheiden sich in der Dauer der ersten Inkubationsperiode bei 100°C mit 20 min (Probe A) bzw. 30 min (Probe B). Es wurden jeweils der Säulendurchfluss (D) und das Retenat (R) aufgetragen. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die verlängerte Inkubationszeit 1 von 30 min (Proben B in Abbildung 5-4) die Signalstärke zwar größer war, ebenso aber auch der Anteil an unspezifischen Produkten. Der Leitsatz einer möglichst kurzen Aufschlusszeit konnte auch hier bestätigt werden. Der Molekulargewichtsfiter bei 300 kDa (Abbildung 5-4 rechts) hatte einen geringen funktionellen Effekt. Durchfluss und Retenat unterscheiden sich kaum. Ein spezifischer Filtereffekt tritt dabei nicht auf. Es wird lediglich ein Anteil der Probe an der Membran zurückgehalten. Anders sieht es mit den 100 kDa Säulen (Abbildung 5-4 links)

aus. Hier wird eindeutig ein Reinigungseffekt erzielt. Die unspezifischen Signale im unteren Molekulargewichtsbereich verschwinden nach dem Säulendurchlauf fast vollständig. Allerdings wird auch der überwiegende Teil des spezifischen Signals im Molekularsieb zurückgehalten. Bei den insgesamt schwachen Signalen mit FFPE Material, ist eine Reduktion des Ursprungsignals auf etwa ein fünftel nicht als praktikabel zu bezeichnen. Eine selektive Aufreinigung unterhalb einer bestimmten Molekulargewichtsgrenze ist ebenfalls nicht zu erkennen, obwohl die Reduktion der hochmolekularen Anteile mit den 100 kDa Säulen überproportional höher ist.

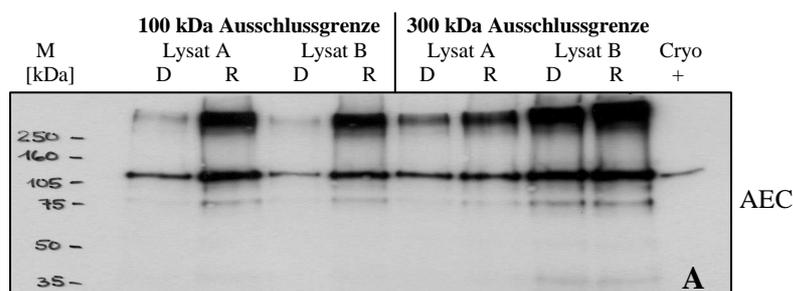


Abbildung 5-4: Nanosep-Säulenaufreinigung der FFPE Darmgewebe (Lysat A und B) aus Abbildung 5-2. Links wurde eine Ausschlussgrenze von 100 kDa gewählt. Rechts wurden Säulen mit einer Ausschlussgröße von 300 kDa benutzt. Western Blot gegen E-Cadherin (AEC 1:1500), Gelauftrag je 10 μ l von Durchfluss (D) und Retenat (R). Positivkontrolle Plazenta Cryogewebe in T-Per (16 μ g). Die Detektion erfolgte mit ECL^{Plus}.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass es prinzipiell möglich war intakte Proteine aus FFPE Geweben zu extrahieren und nachzuweisen. Dies sollte nun systematisch untersucht und weiterentwickelt werden.

5.2 Etablierung der FFPE-Proteinextraktionsmethode anhand Zellkulturlysaten

5.2.1 Formalin fixierte und Paraffin eingebettete (FFPE) Zellen

Die Methodik der Proteinisolation aus FFPE Material sollte im nächsten Schritt zunächst an FFPE Zellkulturansätzen genauer untersucht und etabliert werden. Die Bedingungen entsprechen systembedingt nicht vollständig denen von fixierten Geweben, eine Vergleichbarkeit sollte aber anzunehmen sein. Der Vorteil liegt darin, dass Lysate aus Zellkulturen in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen, so dass der Umfang der Tests erhöht werden kann. In den kultivierten Zellen liegen darüber hinaus meist definierte und auch bekannte Verhältnisse vor, so dass die Methodik einfach auf ihre Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit getestet werden kann. Zudem können die Ergebnisse mit entsprechenden, nicht fixierten Kulturen verglichen werden, wobei möglichst ähnliche Resultate zu erzielen sind. Die Präparation darf die Verhältnisse nicht verändern. Zunächst

wurde mit der Magenkrebs-Zelllinie GC2957 gearbeitet, die freundlicherweise vom IPATIMUP in Porto zur Verfügung gestellt wurde und zu der bereits Untersuchungen im Institut durchgeführt wurden. Neben der Wildtyp-Linie (GC2957 wt) existiert eine Snail überexprimierende Zelllinie (GC2957 SnHis), die stabil mit einem Expressionsvektor für Snail transfiziert wurde. Es wurden parallel jeweils Proteinlysate von unbehandelten und von FFPE Kulturen hergestellt. Es wurden Antikörper gegen β -Actin, α -Tubulin, E-Cadherin (AEC) und Snail getestet. Für die Linie GC2957 SnHis wird dabei eine stärkere Snail-Expression erwartet. Eine zusätzliche Behandlung, zunächst nur bei den unfixierten Zellkulturen, mit LiCl (40mM), einem GSK 3 β -Inhibitor (Klein & Melton, 1996, Stambolic et al., 1996) sollte diesen Effekt nochmals verstärken. GSK3 β agiert als Snail Repressor auf Transkriptionsebene (Bachelder et al., 2005). Durch dessen Inhibition ist eine höhere Snail-Expression und somit ein erhöhter Proteinlevel zu erwarten, was sich bei der Analyse der Zellkulturlysate widerspiegeln sollte.

Da eine Aufreinigung der Lysate über MolekulargewichtsfILTER keine zufriedenstellende Lösung darstellte, um die Signalqualität zu verbessern, wurden als weitere Möglichkeiten Protein Präzipitationsverfahren getestet. Die FFPE Lysate wurden nachfolgend einer Fällung mit Aceton (Resuspendierung in T-Per und EB) und einer Behandlung mit dem PAGEprep™-Kit unterzogen (Resuspendierung in EB). Die Ergebnisse der nicht fixierten Lysate und der FFPE Lysate sind in Abbildung 5-5 direkt miteinander verglichen. Exemplarisch sind die Ergebnisse für β -actin (A) und AEC (B) gezeigt.



Abbildung 5-5: FFPE Zellkultur, GC 2957 Zelllinie. Die FFPE Lyate wurden zusätzlich einer Aceton (Ac) Proteinfällung und der Präzipitation mit dem PAGEprep™-Kit unterzogen. Dargestellt sind Western Blots gegen (A) E-Cadherin (AEC 1:10000) und (B) β -Actin (1:10000). Gelauftrag der unfixierten Lysate 5 μ g. Positivkontrolle Plazenta Cryogewebe in T-Per (16 μ g). FFPE-Lysate je 15 μ l unvermessen aus gleicher Zellzahl (in 400 μ l Puffer, gefällte Lysate 100 μ l Puffer). Die Detektion erfolgte mit ECL^{Plus}.

Von großem Interesse war zunächst die Immunreaktion der FFPE Zellkulturlysate. Mit β -Actin konnten nur ein Nachweis der nicht fixierten Proben und der Cryo Positivkontrolle (+) erfolgen. Die FFPE Lysate zeigten keine Signale. Ein ähnliches Bild ergab sich für α -Tubulin und Snail. Die Signale für Snail waren generell sehr schwach, auch bei den unbehandelten Lysaten und es konnte auch kein Unterschied zwischen den beiden GC2957 Zelllinie festgestellt werden, ebenso nicht nach LiCl Behandlung (Daten nicht gezeigt).

Einzig AEC lieferte schwache Signale mit den FFPE Lysaten wie in Abbildung 5-5 B ersichtlich ist. Die GC 2957 SnHis Zelllinie zeigt dabei immer ein leicht schwächeres Signal, als die wt Linie. Dies ist durch eine höheren Snail Expression erklärbar und entspräche den Erwartungen, da E-Cadherin transkriptionell negativ von Snail beeinflusst wird. Ohne die Abgleichmöglichkeit mit einem Haushaltsgen ist diese Beobachtung aber wenig aussagekräftig. Die Aufreinigungen der Lysate zeigten eher schlechte Ergebnisse. Keine der präparierten Proben zeigte ein besseres Signalverhalten. Extrem diffus erwies sich das Signal nach der PAGEprep™ Behandlung. Da alle Proben in gleichen Mengen auf das Gel geladen wurden, das Volumen des Resuspensionspuffers nach Fällung aber nur ein Viertel der Ausgangsmenge betrug, ergibt sich zudem ein massiver Probenverlust durch die Fällungen. Problematisch stellte sich auch das Resuspendieren der präzipitierten Proben heraus. Teilweise musste zeitlich sehr lange gelöst werden und es gelang auch nicht immer das Pellet komplett wieder in Lösung zu bringen. Dies erschwert die Probenbehandlung und könnte zudem die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinflussen. Ein Einsatz ist daher auch hier nicht empfehlenswert.

Modifiziert wurden in der Folge verschiedene Immunoblot Parameter, um die Ergebnisse zu verbessern, respektive generell Signale mit den meisten Antikörpern für die FFPE Lysate zu erhalten. Verändert wurden dabei die Antikörperkonzentrationen, die Inkubationszeiten, das Detektionssubstrat, die Membrantypen, die Blockierung und es wurde versucht eine direkte in Gel Detektion (Desai et al., 2001) durchzuführen, um Transferprobleme auf die Membran auszuschließen. Sinnvolle Signale mit dem FFPE Zellmaterial konnten aber mit keiner der durchgeführten Modifikationen erhalten werden. Nur durch eine Erhöhung der Auftragsmenge um das etwa 20-fache, was der gesamten Lysatmenge aus hochgerechnet 2×10^7 Zellen entspricht, konnten auswertbare Signale erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Snail war aber auch hier nicht nachzuweisen. Der Antikörper ist wohl aufgrund seiner niedrigeren Immunogenität als zunächst nicht anwendbar für die grundlegenden Untersuchungen zur Extraktionsmethode einzustufen.

Von den FFPE Zellkulturlysaten war, im Gegensatz zu FFPE Geweben, keine effiziente Proteinextraktion möglich. Die FFPE Zellkulturfixierung wurde daher zugunsten einer alternativen Behandlungsroutine aufgegeben.

5.2.2 Formalin fixierte (FF) Zellen ohne Paraffineinbettung

Da die Proteinisolation aus FFPE Geweben nach den ersten Ergebnissen zuverlässig und stabil funktionierte, war anzunehmen, dass Behandlungsschritte bei der FFPE Zellfixierung die Immunreaktion störten. Die wesentlichen Unterschiede bei der Behandlung der Zellkulturen, waren die Fixierungslösung und die Pelletierung der Zellen zur Einbettung in Paraffin. Zur Fixierung wurde eine wässrige 10%-ige Formaldehydlösung verwendet. In der Routinefixierung von Geweben kommt eine neutral gepufferte 10%-ige Formalinlösung zum Einsatz, was einer 4%-igen Formaldehydlösung entspricht. Aber auch nach Umstellung der Fixierungslösung auf eine neutral gepufferte 10%-ige Formalinlösung verbesserte sich die Immunreaktivität nicht (Daten nicht gezeigt). Die Pelletierung der Zellen erfolgte nach Kapitel 4.1.7, was eine etablierte Methode zur Zelleinbettung für die Immunhistochemie ist und dort die Immunreaktion nicht merklich beeinträchtigt. Dieser Schritt scheint für die hier angewandte Protein Extraktionsmethodik allerdings kritisch zu sein. Wurde auf die Pelletierung und die folgende Paraffineinbettung der Zellen verzichtet, konnte eine effiziente Proteinisolation und Immunreaktion festgestellt werden. Es wurde daher beschlossen auf die Paraffinbehandlung zu verzichten und die Zellen für die weiteren Untersuchungen nur einer Formalinfixierung zu unterziehen. Dies sollte die Bedingungen von fixiertem Archivgewebe immer noch adäquat widerspiegeln, da nach bisherigen Erkenntnissen die Formalinfixierung der vermutlich kritische und irreversible chemische Schritt darstellt.

Als Zelllinie wurde auf die im Institut etablierte MDA-MB 435 S Kultur zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um eine Brustkrebslinie, die negativ für E-Cadherin ist (folgend MDA- bezeichnet). Die Umstellung auf die MDA Zelllinie erfolgte, da sich Snail, bedingt durch den vorliegenden Antikörper, als ungeeignetes Nachweisprotein herausgestellt hat. Der zusätzliche experimentelle Vorteil liegt in der Existenz von davon abgeleiteten, stabil transfizierte Zelllinien, die E-Cadherin als Wildtyp (MDA wt), Exon 9 Deletions Mutation (MDA d9) und Exon 8 Deletions Mutation (MDA d8) exprimieren. Durch die mutationsspezifischen MDA Zelllinien, sowie etablierten mutationsspezifischen Antikörpern wird dadurch auch das Nachweisspektrum erweitert. Die für E-Cadherin negative Ausgangskultur (MDA-) kann zudem als Negativkontrolle der E-Cadherin Immundetektion gesehen werden.

Zur Bewertung der Effektivität der durchgeführten Präparationsvariationen, wurden drei Parameter herangezogen. Zunächst wurden die SDS-PAGE Gele mit Coomassie Blue gefärbt. Anhand der Gelfärbung wurde die Proteinausbeute (Lysatquantität) und die Extraktionseffizienz (Lysatqualität) beurteilt. Hierzu wurden die Färbeintensität und das distinkte Bandenmuster beurteilt. Danach wurden die Proteine vom Gel auf eine PVDF Membran transferiert und die Immunreaktivität mit Antikörpern gegen die beiden Haushaltsgene β -Actin und α -Tubulin bestimmt. In Abbildung 5-6 ist eine

Zusammenfassung aller in dieser Arbeit verwendeten Lysattypen nach Coomassie-Färbung aufgeführt. Der prinzipielle Färbeverlauf und das distinkte Bandenmuster sind auf den entsprechenden Lysattyp generell übertragbar.

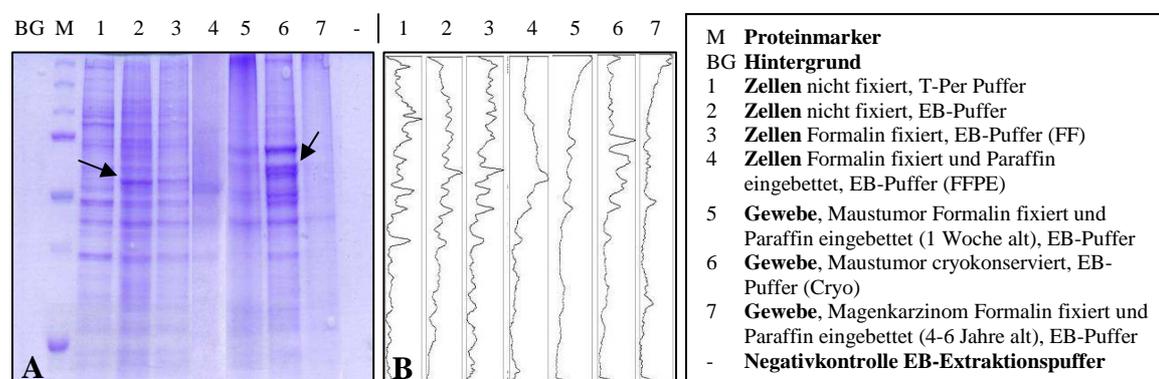


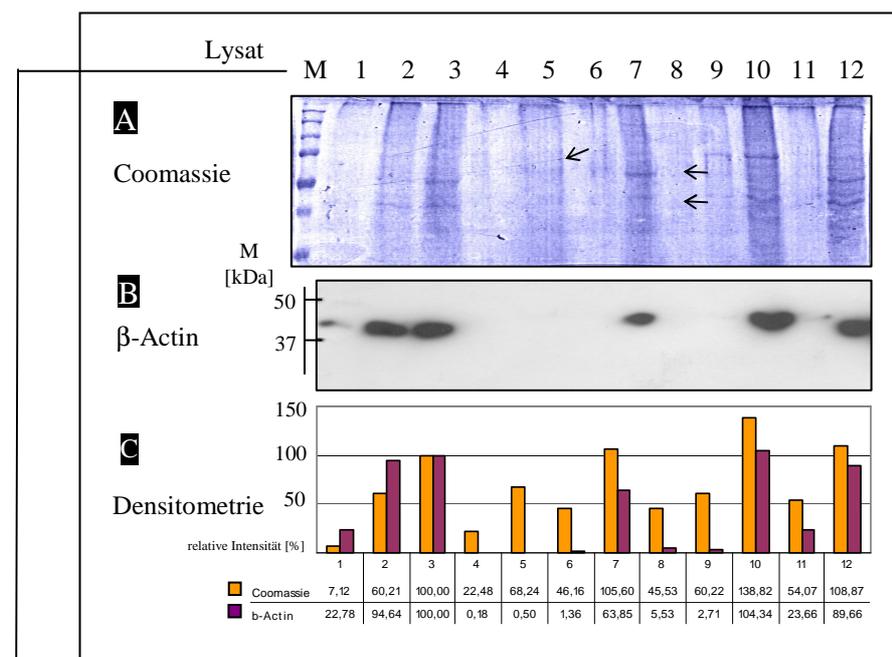
Abbildung 5-6: Gesamtübersicht über die in der Arbeit verwendeten **Lysattypen**. Dargestellt ist die Coomassie Gelfärbung zur Bewertung der verschiedenen Lysatpräparationen (**A**) Quantitative Bewertung. Die Färbeintensität der Bahnen wurde densitometrisch vermessen, was der aufgetragenen Gesamtproteinmenge entspricht. (**B**) Qualitative Bewertung. Das Bandenmuster über die Laufstrecke wurde grafisch aufgetragen, wobei die Peakhöhe die Färbeintensität wiedergibt.

Vergleicht man das Bandenmuster der aufgetragenen Proben nach Coomassie-Färbung, fallen deutliche Abweichungen auf. Die meisten Banden sind zwar bei allen Lysaten zu erkennen. Eine distinkte Bande unterscheidet sich allerdings deutlich mit dem T-Per und dem EB-Puffer (vergl. Abbildung 5-6 Bahnen 1, 2 und 3 Pfeil). Die verschiedenen Puffer vermögen somit unterschiedliche Proteine stärker oder schwächer in Lösung zu bringen. Die Proteinextraktionen mit dem EB-Puffer aus den Geweben (FFPE und Cryo) zeigen wiederum eine Differenz zu den EB-Zellkulturen (vergl. Bahnen 2 und 3 mit 5 und 6 Pfeile). Die markante Bande der Zellkulturlysate taucht hier nicht auf, dafür zwei weitere Banden bei einem höheren Molekulargewicht. FFPE und Cryo-Gewebe zeigen aber eine gute Übereinstimmung. Die FFPE-Lysate zeigen insgesamt eine deutliche Reduzierung der erkennbaren distinkten Banden im Vergleich zu den FF-Lysaten, bzw. dem Cryo-Gewebe (Bahnen 4, 5 und 7). Auch das Alter der Probe spielt offensichtlich eine Rolle (Bahnen 5 und 7). Im Vergleich zum „frischen“ FFPE Gewebe der Maustumore, weisen die Lysate der FFPE Magenkarzinome, die bereits 4-6 Jahre alt waren, fast gar keine konkrete Proteinbande mehr auf (ähnlich den FFPE-Zellkulturlysaten in Bahn 4). Die immunologische Reaktionsfähigkeit war allerdings nicht vergleichbar beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt).

5.2.2.1 Variation der Extraktionspuffer und der Reaktionsbedingungen

Zur Proteinextraktion wurden bislang nur drei Puffersysteme getestet. Der von Ikeda et al. beschriebene RIPA-Puffer, der kommerzielle T-Per Puffer und der selbst entwickelte EB-

Puffer. Zudem wurde bislang nur eine Behandlungsmethodik angewandt. Um einen besseren Einblick in den Mechanismus und die Anwendbarkeit der FFPE Proteinextraktion zu bekommen, wurden weitere Puffersysteme und Behandlungsmethoden zur Proteinisolation getestet. Neben der bisherigen Methode, des mechanischen Aufschlusses der Zellpellets per Teflonpistille, wurden Verfahren mit Glasperlen und Ultraschall getestet. Weiterhin wurden die Bedingungen der thermischen Inkubation variiert. Zur Kontrolle der Effizienz der modifizierten Lysatpräparationen, wurden auf jedem Gel ein Lysat aus nicht fixierten Zellkulturen (5 μ g), sowie ein Lysat, das nach dem bisherigen Standardverfahren präpariert wurde, aufgetragen. Die verschiedenen Puffer und Behandlungsmethoden zeigten deutliche Unterschiede, sowohl was die extrahierte Proteinmenge und die Lysatqualität, als auch was die Immunreaktivität der Lysate betraf, wie Abbildung 5-7 zeigt. Bis auf die Lysate 1 und 4 konnten bei allen Proben Proteine auf dem Coomassie Gel nachgewiesen werden (Abbildung 5-7 A). Die Lysate 6 und 8 zeigen zwar höhere Mengen bei der densitometrischen Vermessung, die Werte sind aber bei genauerer Betrachtung des Coomassiegels eher von einem höheren Hintergrund beeinflusst. Die höchsten Proteinmengen wurden bei Lysat 3, 7 und 10 erzielt. Hier zeigten sich auch die eindeutigsten Bandenmuster. Im direkten Vergleich ist das Lysat der nicht fixierten Zellkultur (Lysat 12) zu sehen, was normalerweise die höchste Lysatqualität aufweist. Interessanterweise tauchen bei allen Lysaten zwei prominente Banden im Gel auf (Pfeile rechts). Nur mit EB-Puffer laufen diese auf gleicher Höhe, wie beim nicht fixierten Lysat. Mit Puffer P4 (Lysat 7) sind diese Banden leicht nach oben verschoben. Das gleiche ist mit dem Puffer P6 (Lysat 9 und 10) zu beobachten. Die entsprechende obere Bande ist hier zwar auch vorhanden, allerdings um einiges schwächer ausgeprägt. Bei diesem Puffer taucht eine zweite prominente Bande auf, die etwas höher liegt, als bei den anderen Puffern. Diese Verschiebung lässt sich auch bei den Western Blots erkennen (Abbildung 5-7 B). Das deutet darauf hin, dass die Puffer neben den unterschiedlichen Proteinextraktionsfähigkeiten auch noch unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Für die weiteren Untersuchungen ist es daher sinnvoll neben β -Actin zumindest ein weiteres Haushaltsgen, wie α -Tubulin, parallel zu detektieren, um eventuelle Schwankungen besser aufdecken zu können. Die höchsten Signalintensitäten bei den Immunoblots wurden mit den Lysaten 2, 3, 10 und 12 erreicht (Abbildung 5-7 B). Sie lagen alle annähernd auf gleichem Niveau und korrelieren bis auf Lysat 2 mit den Auftragsmengen nach Coomassie. Das Lysat 7 wies ebenfalls eine hohe Proteinmenge auf, die Immunogenität fällt im Vergleich der anderen Proben allerdings geringer aus. Die Proben die auf dem Coomassiegel kaum Proteine aufwiesen, lieferten erwartungsgemäß auch kein Signal mit β -Actin.



D

Lysat	Mechanischer Aufschluss				Thermischer Aufschluss			
	Puffer**	Pistille	Ultraschall*	Glasperlen	Inkubation 1		Inkubation 2	
					Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur
1	EB	X						
2	EB	X					4h	65 °C
3	EB	X			20 min	100 °C	2h	80 °C
4	P1	X			20 min	100 °C	2h	80 °C
5	P2	X			20 min	100 °C	2h	80 °C
6	P3	X			20 min	100 °C	2h	80 °C
7	P4	X			20 min	100 °C	2h	80 °C
8	P5	X			20 min	100 °C	2h	80 °C
9	P6	X			20 min	100 °C	2h	80 °C
10	P6		X				4h	65 °C
11	P3			30 min, 4°C			4h	65 °C
12	+	T-Per	Lysat aus nicht fixierten Zellen, 5µg					

* Ultraschallaufschluss mit 10 Pulse bei einer maximalen Amplitude von 25%, 20 sec Pulsdauer, 30 sec Pause, Durchführung auf Eis.

** Aufschlüsselung der Puffer siehe Kapitel 3.4.1

■ Standard Präparationsmethode

Abbildung 5-7: Variation der verwendeten Lysepuffer und der Aufschlussbedingungen. Zur Lysatpräparation wurde die Zelllinie MDA MB 435 S (MDA-) verwendet. Pro Lysat wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt und in 200µl Extraktionspuffer aufgenommen. Die Lysatpräparation erfolgte nach Kapitel 4.4.3 und den hier aufgeführten Modifikationen. (A) SDS-PAGE Proteingel, 10%ig nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Vom gesamten Lysat wurden 20 µl auf das Gel aufgetragen. (B) Western Blot mit β-actin (1:10000) nach Transfer auf PVDF Membran. Sekundär AK anti mouse HRP (1:10000). Zur Detektion wurde ECL^{Plus} verwendet. (C) Von den detektierten Signalen wurde eine densitometrische Vermessung durchgeführt und grafisch aufgetragen. Das Referenzlysate der Standardpräparationsmethode wurde jeweils auf 100% gesetzt. (D) Übersicht über die Puffer und Behandlungsmethoden der aufgetragenen Lysate.

Ausnahme hierzu ist Lysat 1. Unerwartet verhält sich Lysat 5. Trotz hohen Proteinmengen wurden keinerlei Signale im Western Blot detektiert. Die Immunogenität des Puffers P2 war quasi nicht vorhanden. Es zeigten sich allerdings auch kaum distinkte Banden in der Gelfärbung. Zusammenfassend betrachtet zeigten nur zwei der verwendeten Puffer eine vernünftige Immunreaktivität bei der Behandlung nach Standardverfahren. Dies waren die

Ansätze mit EB-Puffer (Lysate 1-3) und mit Puffer P4 (Lysat 7). Beides sind stark Detergenz haltige Puffersysteme. Darüber hinaus hat sich der Ultraschallaufschluss als sehr effektiv erwiesen (Lysat 10). Der gleiche Puffer P6 in Kombination mit der Standard Behandlungsmethode war nahezu ohne Signal (Lysat 9). Ein besseres Verhalten zeigte auch der Glasperlenaufschluss. Die Ergebnisse mit diesem Aufschlussverfahren waren deutlich besser, als die bei mechanischer Behandlung mit der Pistille (Lysat 6 und 11), wobei das Signal im gesamten Vergleich aber eher schwach war und daher nicht weiter verfolgt wurde. Die letzten Ergebnisse legen allerdings nahe, dass der mechanische Aufschluss per Pistille nur einen geringen Einfluss auf die Effektivität der Methode hat. Da dies ein sehr aufwendiger Schritt bei der Lysatpräparation darstellt, wird im Folgenden darauf verzichtet. Die thermische Behandlung hat sich als wichtig erwiesen. Lysat 1 ohne diese Behandlung zeigte signifikant geringere Proteinausbeuten, allerdings mit im Verhältnis dazu recht hoher Immunreaktivität. Ähnlich verhält sich Lysat 2, nur mit insgesamt höheren Signalen. Hier wurde auf die Inkubation I verzichtet und die Inkubation II wurde bei 65°C verlängert durchgeführt. Die Proteinausbeute verringerte sich aber im Vergleich zu Lysat 3, dem Standardverfahren, die Immunreaktivität stieg aber verhältnismässig an. Offenbar führt die geringere Temperatur zu einer schonenderen Proteinextraktion.

Generell kann man sagen, dass bei ausreichender Signalstärke und distinkten Banden in der Gelfärbung, auch die Immunreaktivität mit β -Actin gut mit der aufgetragenen Lysatmenge korrelierte. Ausnahme hiervon ist Lysat 5. Die Lysate 1 und 2 weichen von der Feststellung insofern ab, dass beide Lysate in der Gelfärbung verhältnismässig schwach sind und doch ein starkes Signal im Western Blot zeigen. Dies ist wohl auf das generell hohe Immunpotential des verwendeten EB-Puffers zurückzuführen.

Da sich der Ultraschallaufschluss als sehr effektiv herausgestellt hat, wurde dieser mit den anderen Bedingungen kombiniert. Der Aufschluss mit Ultraschall funktionierte in allen getesteten Kombinationen von Puffern und thermischer Behandlung zuverlässig (Abbildung 5-8). Die erhofften synergistischen Effekte, zeigten sich aber nicht. Der EB Puffer und der Puffer P4 lieferten durchgehend etwa die gleichen Signale. Die Lysate mit den Puffern T-Per und P6 wiesen eine geringere Proteinmenge im Coomassie-Gel auf. Die Aussagen über die Bandenmuster konnten auch hier wieder bestätigt werden. Es waren zwei prominente Banden sichtbar, wobei bei P4 und P6 eine Verschiebung zu erkennen war, sowohl im Gel, als auch in den Western Blots. Der direkte Vergleich EB Puffer mit Ultraschallbehandlung (Lysat 3) und der rein thermischen Behandlung (Lysat 8 Standard), zeigte so gut wie keine Unterschiede. Es waren aber kaum Unterschiede in der Proteinausbeute bei der Variation der thermischen Behandlung zu erkennen (Lysate 1, 2, 3 und 8). Die Ultraschallbehandlung kompensiert in diesem Fall anscheinend das weniger effektive Extraktionsverhalten.

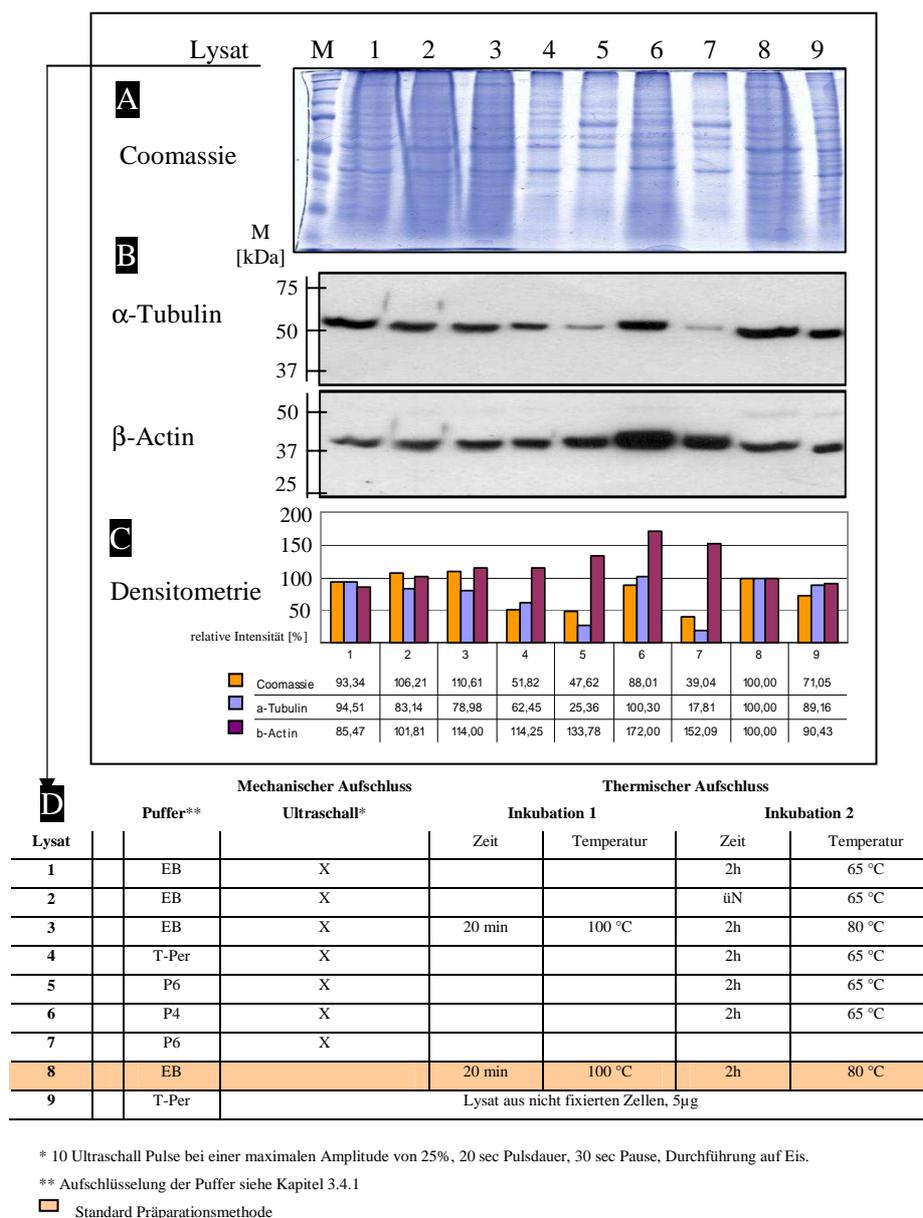


Abbildung 5-8: Ultraschallaufschluss mit ausgewählten Extraktionspuffern und Aufschlussbedingungen. Zur Lysatpräparation wurde die Zelllinie MDA MB 435 S (MDA-) verwendet. Pro Lysat wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt und in 200µl Extraktionspuffer aufgenommen. Die Lysatpräparation erfolgte nach Kapitel 4.4.3 und den hier aufgeführten Modifikationen. **(A)** SDS-PAGE Proteingel, 10%ig nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Vom gesamten Lysat wurden 20 µl auf das Gel aufgetragen. **(B)** Western Blot mit α -Tubulin (1:5000) und β -actin (1:10000) nach Transfer auf PVDF Membran. Sekundär AK anti mouse HRP (1:10000). Zur Detektion wurde ECL^{Plus} verwendet. **(C)** Von den detektierten Signalen wurde eine densitometrische Vermessung durchgeführt und grafisch aufgetragen. Das Referenzlysate der Standardpräparationsmethode wurde jeweils auf 100% gesetzt. **(D)** Übersicht über die Puffer und Behandlungsmethoden der aufgetragenen Lysate.

Dies ist auch im Vergleich der Lysate 5 und 7 ersichtlich, auch wenn die Signale hier insgesamt gering sind. Der komplette Verzicht auf die thermische Behandlung bei Lysat 5 führte in diesem Fall nicht zu einem drastischen Rückgang der Proteinmenge wie bei Lysat 1 in Abbildung 5-7. Es bleibt auf gleichem Niveau wie mit der thermischen Behandlung bei Lysat 7. Die zugehörigen Western Blots lieferten ein leicht inhomogeneres Bild

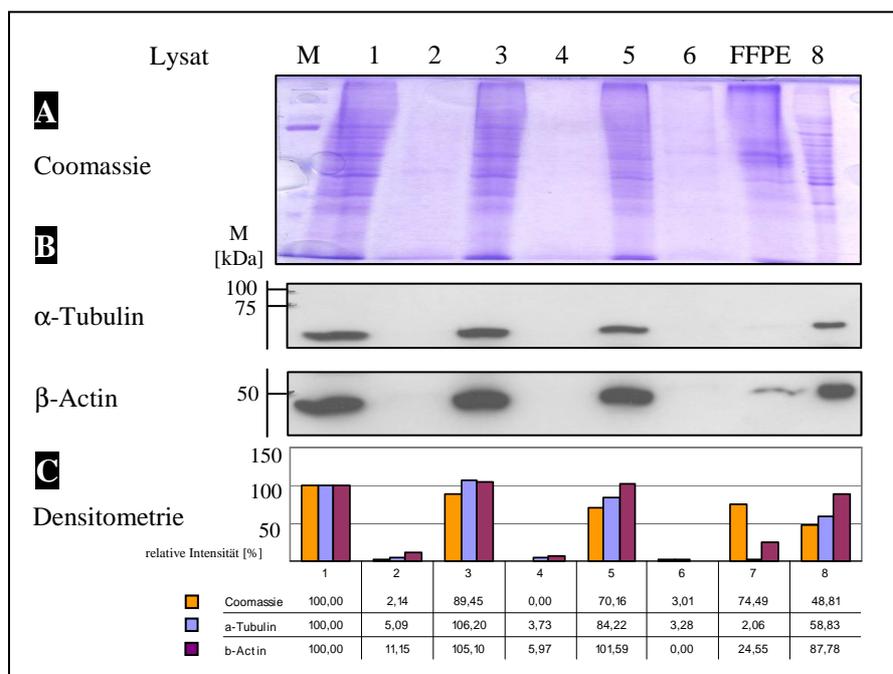
(Abbildung 5-8 B). Das absolut stärkste Signal konnte für beide Haushaltsgene mit Puffer P4 (Lysat 6) erhalten werden. Während die Ergebnisse mit α -Tubulin nahezu identisch mit denen der Coomassie Färbung waren, wick die Immunreaktion mit β -Actin in den Fällen der nicht EB-Puffer Lysate (Lysate 4-7) erheblich von den aufgetragenen Proteinmengen ab. Die Signale waren hier deutlich höher.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der EB Puffer auch hier wieder mit die besten Resultate zeigte. Sowohl was extrahierte Proteinmenge, als auch Immunreaktivität und insbesondere die Korrelation der Signale betrifft. Alle anderen Puffer zeigten mit β -Actin höhere Intensitäten im Western Blot. Die höchsten Werte wurden mit Puffer P4 erreicht. Der Ultraschallaufschluss stellt eine Alternative zu dem eingesetzten Standardverfahren mit EB-Puffer dar. Er liefert ähnlich gute Ergebnisse auch mit anderen Puffern oder bei mildereren Inkubationsbedingungen. In Kombination ergibt sich aber kein besserer Effekt.

5.2.2.2 Dauer der Formalinfixierung

Eine weitere denkbare Einflussgröße auf die Extrahierbarkeit von Proben stellt die Einwirkzeit der Fixierungslösung dar. In der Praxis können die Inkubationszeiten der Gewebeproben in der Formalinlösung sehr stark variieren. Nach der Probenentnahme werden diese in der Regel in die Formalinlösung gegeben, bis mit der Archivierung fortgefahren wird. Es sind allerdings keine festen Zeiten vorgegeben, wann die Gewebeprobe wieder entnommen wird. Hier sind Zeiträume von mehreren Stunden anzunehmen. Getestet wurden Fixierungszeiten von 30 min, 4 h und 20 h (üN). Als Puffer wurden EB und P4 verwendet, wobei die Lysatpräparation jeweils nach der Standardmethode erfolgte. Zusätzlich wurde ein MDA MB 435 S FFPE Lysat aufgetragen, das, wie das entsprechende FF-Lysat, für 30min mit 10% neutral gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Parafin eingebettet wurde. Was zunächst auffiel war, dass der Aufschluss mit P4 in allen Fällen nicht funktioniert hat. Entgegen der bisherigen Annahme, ist somit auch mit diesem Puffer ein mechanischer Aufschluss unerlässlich. In Kombination mit Pistille (Abbildung 5-7 Lysat 7) und Ultraschall (Abbildung 5-8 Lysat 6) konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Die mechanische Behandlung hatte somit einen größeren Einfluss als angenommen. Der einzige Puffer, der mit einer einfachen thermischen Behandlung exzellente Resultate liefert, war der EB-Puffer. Alle anderen Pufferkombinationen waren auf eine mechanische Zusatzbehandlung angewiesen. Der Einfluss der Inkubationszeit in der Formalinlösung selbst ist nur geringfügig. Das distinkte Bandenmuster wird zwar immer undeutlicher und die extrahierte Proteinmenge nimmt von 30 min zu 20 h sukzessive ab, wie in Abbildung 5-9 A zu erkennen ist. Die Immunreaktivität bleibt aber bei den beiden Antikörpern gegen α -Tubulin und β -Actin nahezu unverändert (Abbildung 5-9 B, Lysat 1, 3 und 5). Auch die Ergebnisse mit α -Tubulin und β -Actin waren weitestgehend konsistent zueinander. Das Lysat der FFPE

behandelten Zellkultur (Lysat 7 FFPE) zeigte im Vergleich zu den früheren Versuchen eine deutlich bessere Reaktion. Die Coomassie-Färbung bestätigt, dass fast eine mit der FF-Kultur (Lysat 1 Standard) vergleichbare Menge an Protein extrahiert wird. Das Bandenmuster ist aber sehr viel undeutlicher und stärker „verwaschen“. Signale im Western Blot mit den üblichen Einsatzmengen nun zwar vorhanden, aber immer noch verhältnismäßig schwach.



* Lysat aus Formalin fixierten und Paraffin eingebettete MDA- Zellkultur, Fixierung in 10% gepuffertem Formalin, $1 \cdot 10^7$ Zellen pro Ansatz.

■ Standard Präparationsmethode

Abbildung 5-9: Variation der Inkubationszeiten der Formalinfixierung. Zur Lysatpräparation wurde die Zelllinie MDA MB 435 S (MDA-) verwendet. Pro Lysat wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen eingesetzt, wobei die Fixierungszeiten von 30 min bis 20 h variiert wurden. Die Zellen wurden in 200µl Extraktionspuffer aufgenommen. Die Lysatpräparation erfolgte nach Kapitel 4.4.3 und den hier aufgeführten Modifikationen. (A) SDS-PAGE Proteingel, 10%ig nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Vom gesamten Lysat wurden 20 µl auf das Gel aufgetragen. (B) Western Blot mit α -Tubulin (1:5000) und β -actin (1:10000) nach Transfer auf PVDF Membran. Sekundär AK anti mouse HRP (1:10000). Zur Detektion wurde ECL^{Plus} verwendet. (C) Von allen detektierten Signalen wurde eine densitometrische Vermessung durchgeführt und grafisch aufgetragen. Das Referenzlysate der Standardpräparationsmethode wurde jeweils auf 100% gesetzt. (D) Übersicht über die Puffer und Behandlungsmethoden der aufgetragenen Lysate.

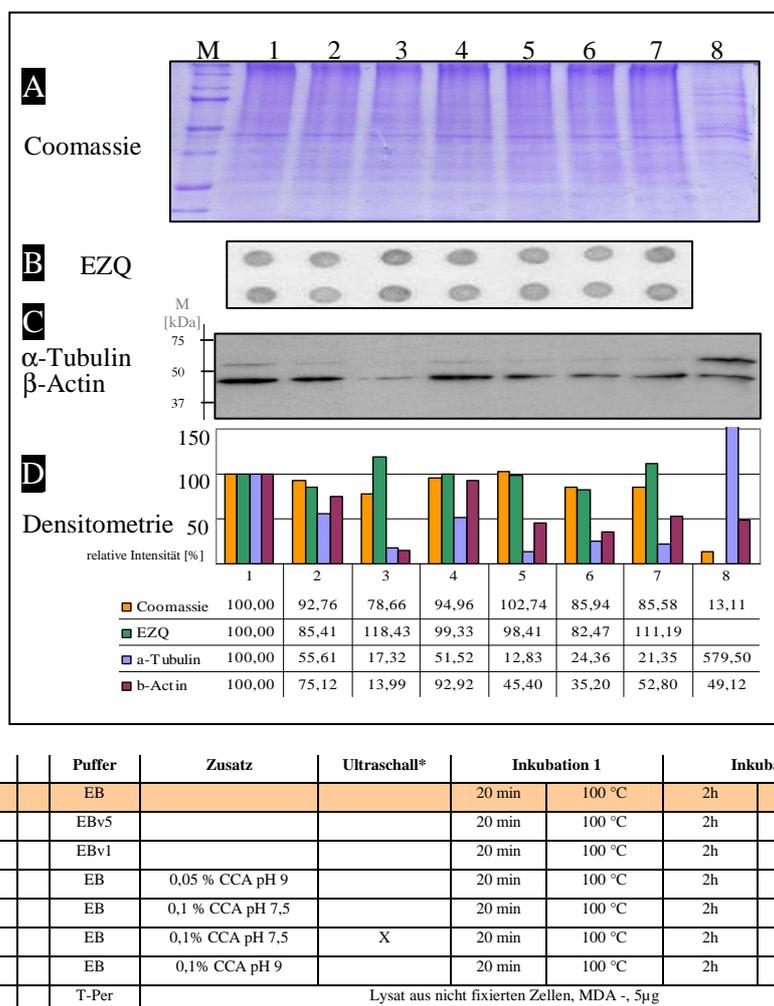
Basierend auf den Lysatvarianten 3 und 7 wurde auch eine Extraktion von einer MDA wt Zelllinie durchgeführt. Überraschenderweise zeigen die beiden Wildtyp Lysate signifikant

schlechtere Signale bei den längeren Inkubationszeiten. Die Proteinausbeute ist nach der Coomassiefärbung sehr gering. Entsprechend wurden auch nur sehr schwache Signale bei der Antikörperreaktion detektiert. Auch eine zusätzliche Ultraschallbehandlung zeigte hier keinen positiven Effekt. Der Effekt tritt nur bei den verlängerten Inkubationszeiten auf, nicht bei der üblichen Fixierungszeit von 30 min (Daten nicht gezeigt). Wodurch dieser deutliche negative Effekt letztendlich hervorgerufen wird ist unklar.

5.2.3 Anwendbarkeit der FF Zellkulturergebnisse bei FFPE Geweben

Die Ergebnisse, die bislang an Formalin fixierten Zellkulturen etabliert waren, wurden abschließend auf das eigentliche Untersuchungsmaterial, den FFPE Geweben, angewandt und gegebenenfalls adaptiert. Zur Untersuchung wurde ein nicht tumoröses Darmgewebe aus dem Jahre 2003 eingesetzt. Die Referenz stellt dabei auch hier die Extraktion mit EB-Puffer nach dem Standardverfahren dar. Zusätzlich zu den etablierten Puffer und Behandlungsmethoden - die Detailergebnisse können aufgrund von Geheimhaltungsvereinbarungen hier nicht näher dargestellt werden - wurden weitere Puffervarianten mit Zusatz von Citraconic Anhydride (CCA) verwendet. Von Namimatsu et al., 2005 wurde eine wissenschaftliche Arbeit veröffentlicht, die eine universelle und effektive Methode zum Antigen Retrieval für immunhistochemische Anwendungen beschrieb. Hierbei wurde Citraconic Anhydride (CCA) als Inkubationsagens verwendet, um die Effekte der Formalinfixierung rückgängig zu machen und die Proben der Antikörperreaktion zugänglich zu machen. Diese Technik schien auch für unser Anwendungsgebiet sehr vielversprechend, um die Effizienz des Extraktionssystems weiter zu steigern. Das CCA Agens wurde hierzu dem EB-Puffer in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-10 dargestellt. Die extrahierten Proteinmengen der FFPE Gewebelysate unterschieden sich in den einzelnen Fällen nur wenig, wobei die Werte von EZQ und der Coomassie-Färbung sehr gut übereinstimmen (A und B). Nur Lysat 3 und 7 zeigten mit EZQ höhere Werte und auch eine unterschiedliche Tendenz. Verglichen mit den Western Blot Ergebnissen erscheinen aber wiederum die Coomassie Daten verlässlicher. Die Immunreaktivitäten unterschieden sich deutlicher, wobei der Referenzansatz sowohl bei α -Tubulin, als auch bei β -Actin, die besten Resultate lieferte (C). Die Signale mit α -Tubulin waren allerdings verhältnismäßig schwach mit den FFPE-Gewebelysaten, was sich auch mit den beobachteten Signalintensitäten aus den vorherigen Kapiteln deckt. Hier scheinen selektive Unterschiede aufzutreten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Zellkultur schnitt der Puffer EBv1 (Lysat 3) sehr schlecht bei den FFPE Geweben ab. Nahezu gleich schwache Resultate lieferten die CCA-Puffervarianten in den Immunoblots, wobei die extrahierten Proteinmengen nahezu auf dem Niveau des Referenzsystems (Lysat 1) lagen. Einzig Lysat 4 mit dem geringeren CCA Anteil von 0,05% zeigte vergleichsweise gute Ergebnisse. Die Lysate 5, 6 und 7, bei denen dem EB Puffer 0,1% CCA bei verschiedenem pH zugesetzt wurden, erzielten erkennbar schlechtere

Signale in den Western Blots als die 0,05%ige Variante. Bei Lysat 6 wurde zusätzlich eine Ultraschallbehandlung durchgeführt, die allerdings auch keinen positiven Einfluss auf Proteinmenge oder Immunreaktivität hatte (vergl. Lysat 5 und 6).



* 10 Ultraschall Pulse bei einer maximalen Amplitude von 25%, 20 sec Pulsdauer, 30 sec Pause, Durchführung auf Eis.

■ Standard Präparationsmethode

Abbildung 5-10: Übertragung der FF Zellkulturergebnisse auf **FFPE Gewebe**, wobei die vielversprechendsten Extraktionsvariationen angewandt wurden. Als Gewebe wurden nicht tumoröse Darmschnitte ausgewählt. Je 2x 10µm Schnitte wurden in 200µl Extraktionspuffer aufgenommen. Die Lysatpräparation erfolgte nach Kapitel 4.4.3 und den hier aufgeführten Modifikationen. **(A)** SDS-PAGE Proteingel, 10%ig nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Vom gesamten Lysat wurden 40 µl auf das Gel aufgetragen. **(B)** Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mit dem EZQ Protein Quantitation Kit nach Angaben der Hersteller. **(C)** Western Blot mit α-Tubulin (1:5000) und β-actin (1:10000) nach Transfer auf PVDF Membran. Sekundär AK anti mouse HRP (1:10000). Zur Detektion wurde ECL^{Plus} verwendet. **(D)** Von allen detektierten Signalen wurde eine densitometrische Vermessung durchgeführt und grafisch aufgetragen. Das Referenzlysate der Standardpräparationsmethode wurde jeweils auf 100% gesetzt. **(E)** Übersicht über die Puffer und Behandlungsmethoden der aufgetragenen Lysate.

Ebensowenig zeigten die pH-Differenzen bei Lysat 5 und 7 Signalunterschiede. Als verhältnismäßig effektiv haben sich die Bedingungen bei den Lysaten 2 und 4 herausgestellt, die jedoch nicht an das Niveau des Referenzlysats herankamen. Aufgrund der Ergebnisse und der Toxizität von CCA ist ein Einsatz nicht zu empfehlen.

5.3 Antikörper

5.3.1 Antikörperspezifität

Eine essentielle Voraussetzung zum Einsatz der reverse Phase Arrays ist die Spezifität der Antikörper. Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, wurden daher vor der Verwendung im Western Blot an Formalin fixierten und unfixierten Zellkulturen getestet. Die monoklonalen Antikörper für β -Actin, α -Tubulin und GAPDH wurden auf einer Membran gleichzeitig inkubiert. Für AEC und dessen Mutationsvariante E-Cadherin- $\Delta 9$ wurde jeweils ein neues Gel verwendet, um Überblendungen zu vermeiden. Wie in Abbildung 5-11 A zu sehen, treten bei fixierten und unfixierten Kulturen nur die spezifischen Banden auf.

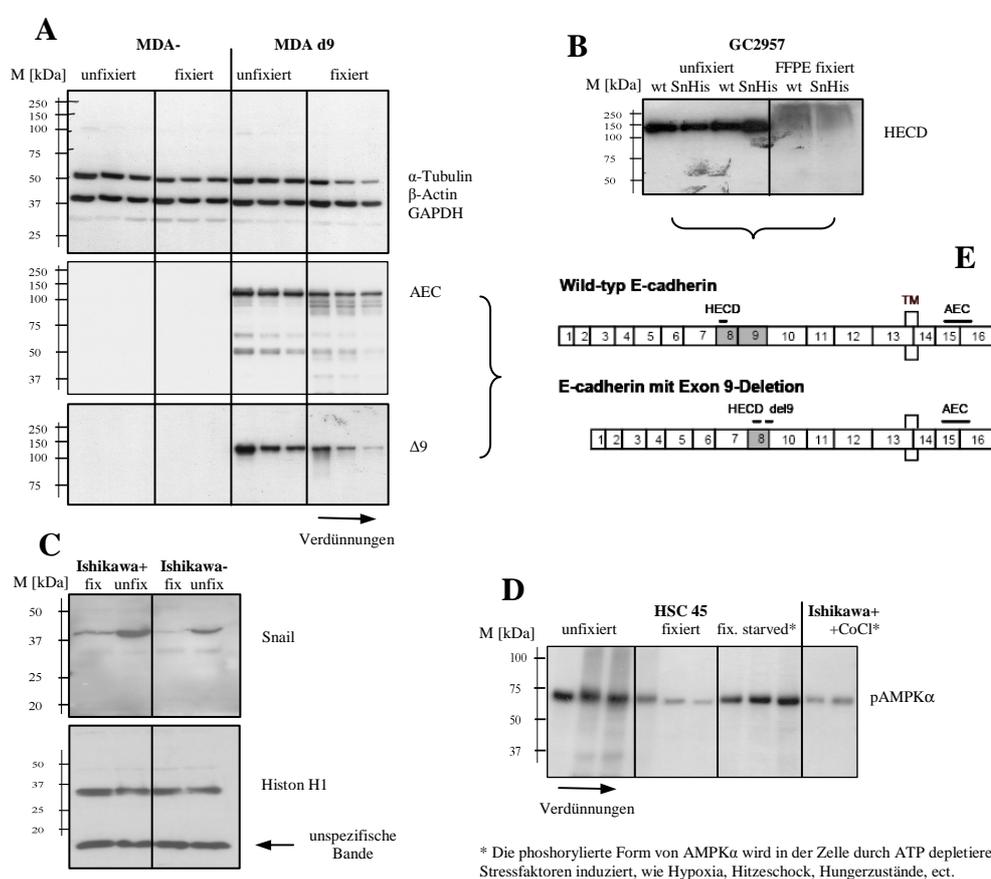


Abbildung 5-11: Signalspezifitäten der in der Arbeit verwendeten Antikörper. Verwendet wurden FF Zellkulturlysate von MDA, HSC45, GC2957 und Ishikawa-Zelllinien. Die Detektion erfolgte mit ECL^{Plus}. **(A)** Antikörper α -Tubulin (Cytosol), β -Actin (Cytosol), GAPDH (Cytosol), AEC (Membran) und $\Delta 9$ (Membran). **(B)** E-Cadherin Antikörper HECD (Membran). **(C)** Antikörper Snail und Histon H1 (Nukleus). **(D)** Antikörper phospho-AMPK α (Thr172 phosphorylierungsspezifisch). **(E)** Schematische Darstellung des wild-typ E-Cadherins sowie der d9 Deletionsmutante. Gezeigt sind die Exonstruktur, die Bindungsstellen der kommerziellen Antikörper AEC und HECD, sowie die Bindungsregionen des mutationspezifischen Antikörpers $\Delta 9$ (Klon 7E6). TM: Transmembranbereich

Bei AEC (A mitte) zeigen sich, wie in vorherigen Kapiteln bereits angesprochen, zwar meist noch weitere Banden, die allerdings E-Cadherin spezifisch sind und keine Crossreaktion mit anderen Proteinen darstellen, wie durch die Ergebnisse mit MDA- belegt ist. Der $\Delta 9$ Antikörper (A unten) zeigt ebenfalls eine spezifischen Bande bei 120 kDa, sowie die erwartete Zellspezifität. Das gleiche gilt prinzipiell für HECD in Abbildung 5-11 B, wobei hier nur ein sehr schwaches Signal mit den fixierten Gewebelysaten detektiert wurde. Ein Nachweis mit FF-Zellkulturlysaten wurde nicht durchgeführt. In (E) ist die Lage der erkannten Epitope der verschiedenen E-Cadherin Antikörper aufgeführt. Alle hier dargestellten Antikörper, bis auf Histon H1, sind anhand der erzielten Resultate in Kombination mit den reverse Phase Protein Microarrays einsetzbar.

5.3.2 Kompartimentierung und Phosphorylierung

Es wurden auf Basis der Zellkulturlysate noch weitere Antikörper getestet, um zu zeigen, dass sich die Methodik prinzipiell für den Nachweis von Proteinen aus allen Zellkompartimenten und auch von posttranslational modifizierten Proteinen eignet. Mit den bisher aufgeführten Antikörpern konnten Membranproteine (E-Cadherin mit AEC (intrazelluläre Domäne), HECD (extrazellulär Domäne) und $\Delta 9$ (mutationsspezifisch)), sowie cytoplasmatische Proteine (GAPDH, β -Actin und α -Tubulin) nachgewiesen werden. Zum Nachweis von nukleären Proteinen wurden erfolgreich die Antikörper gegen Snail und Histon H1 eingesetzt (Abbildung 5-11 C). Der Snail Antikörper detektiert dabei sowohl cytoplasmatische (phosphoryliert) sowie nukleäre (nicht phosphoryliert) Proteinvarianten (Dominguez et al., 2003). Der Histon H1 Nachweis sollte exklusiv auf das nukleäre Kompartiment begrenzt sein. Allerdings zeigte sich mit diesem Antikörper neben der spezifischen 32 kDa Bande eine weitere prominente Bande bei ca. 14 kDa (Pfeil). Die Spezifität müsste hier weiter überprüft werden, um eine unspezifische Kreuzreaktion auszuschließen. Darüberhinaus wurde, zum spezifischen Nachweis einer posttranslational modifizierten Proteinvariante, die Detektion von pAMPK α erfolgreich durchgeführt (Phosphorylierung).

Wie diese Ergebnisse zeigen, konnten erfolgreich Proteine aus allen Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Zudem zeigen die Ergebnisse mit pAMPK α , dass auch phosphorylierte Proteine mit der Methodik dargestellt werden können. Die Einsatzmöglichkeiten scheinen daher nicht eingeschränkt, der Methodik steht somit ein breites Untersuchungsgebiet offen.

5.4 Dot-Blots

Vorbereitend auf die Anwendung von „Reverse Phase“ Protein Microarrays wurde die Anwendbarkeit von Dot Blots getestet, auf dessen Prinzip die Protein Arrays basieren. In ersten Dot Blot Experimenten mit FFPE Gewebepoben (Darmgewebe aus Abbildung 5-3) hat sich gezeigt, dass insbesondere die Blockierungsbedingungen und die Antikörperkonzentrationen kritische Größen darstellen und nicht direkt von den Western Blot Verhältnissen übernommen werden können (siehe Abbildung 5-12).

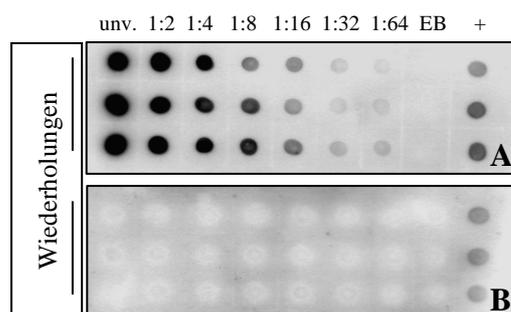


Abbildung 5-12: Dot Blot Verdünnungsreihen der FFPE Darmgewebe aus Kapitel 5.1.1. Es wurden jeweils 1 μ l der Lysate auf eine Nitrozellulose Membran gespottet. Blockiert wurde in 10% Milchpulver/TBST. (A) Immunreaktion mit AEC (1:5000). (B) Immunreaktion mit β -Actin (1:10000). Positivkontrolle (+) Plazenta Cryo Gewebe in T-Per (2 μ g). Zur Detektion wurde ECL^{Plus} eingesetzt.

Jeweils 1 μ l der Proteinlysate wurde in dreifacher Wiederholung auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet. Getestet wurden Antikörper gegen E-Cadherin (AEC) und β -Actin. Der Dot Blot für E-Cadherin zeigte die erwarteten Ergebnisse. Zum einen nimmt die Signalstärke mit der Verdünnung ab. Zum anderen sehen die Ergebnisse der Wiederholungen annähernd homogen aus. Leichte Abweichungen sind allerdings zu erkennen, was die Mittelung der Werte zur Ergebnissauswertung sinnvoll macht. Der Dot Blot mit β -Actin lieferte dagegen keine Signale bei den FFPE Geweben. Da die Positivkontrolle (+) ein Signal zeigte, war anzunehmen, dass die Immunreaktion prinzipiell funktioniert hat. Proteine waren ebenfalls gespottet, was eine nachfolgende positive Inkubation mit AEC zeigte (Daten nicht gezeigt). Kritisch haben sich dabei die Blockierungsbedingungen erwiesen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden daher zunächst verschiedene Blockierungslösungen im Dot Blot getestet und die zum Antikörper verlässlichste Methodik ausgewählt. In Abbildung 5-13 sind die Ergebnisse für eine Auswahl von üblichen Blockierungslösungen am Beispiel von β -Actin und AEC gezeigt. Als Lysate wurden jeweils 1 μ l Placenta-Gewebe, als Cryo- (rechts) bzw. FFPE-Präparationen (links) verwendet. Der EB-Extraktionspuffer (mitte) ist als Negativkontrolle aufgetragen. Die Inkubation mit AEC (A) zeigte sich dabei als weniger kritisch. In allen Fällen konnten Signale erzielt werden, ohne aufkommende Puffersignale. Die Signalstärke schwankte allerdings je nach eingesetztem Blockierungspuffer. Die Verhältnisse FFPE zu Cryo bleiben nahezu gleich, bis auf den Einsatz der NET-Gelatine. Zu erwähnen ist, dass der EB-Puffer auf den Protein Microarrays in Kombination mit dem CSAII-Detektionssystem bei AEC mit NET-Gelatine Blockierung Signale lieferte. Auch

hier bestätigt sich, dass die Western Blot Bedingungen nicht direkt auf die Dot Blots oder Protein Microarrays übertragbar waren. Erheblich größere Unterschiede zeigten sich bei β -Actin (A). Während mit 2% Milchpulver in TBST der EB-Puffer ein unspezifisches Signal liefert, wird bei 10% jegliches Signal geblockt.

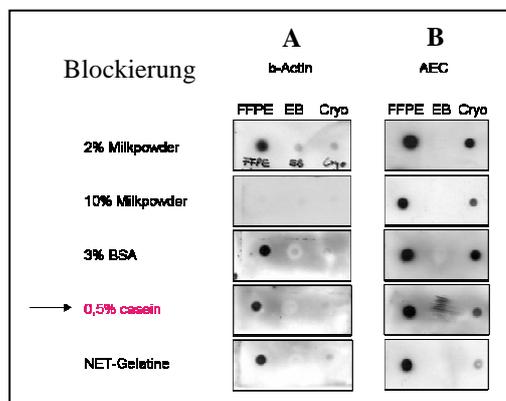


Abbildung 5-13: Blockierungsbedingungen für Dot Blots. Verwendet wurden FFPE Plazentagewebe (links) und Cryo Plazentagewebe (rechts). In der Mitte wurde jeweils der Extraktionspuffer EB als Negativkontrolle aufgetragen. Es wurde je 1 μ l der Lysate auf eine Nitrozellulose Membran gespottet. Die Lösungen zur Blockierung wurden dabei entsprechend der Aufführung variiert. (A) Dot Blot mit β -Actin (1:5000). (B) Dot Blot mit AEC (1:10000). Sekundär Antikörper anti mouse HRP (1:10000). Zur Detektion wurde ECL^{Plus} eingesetzt.

Die weiteren Blockierungslösungen zeigten ebenfalls deutliche Schwankungen in den Signalstärken mit FFPE- und Cryo-Material, wobei beispielsweise mit 3% BSA das Cryolysat so gut wie nicht mehr detektiert wurde. Generell waren dessen Signale schwach. Letztendlich wurde 0,5% casein in TBST (rot markiert) als Standardblockierung für alle Anwendungen ausgewählt, da dieses mit allen getesteten Antikörpern die besten Resultate lieferte. Nur für AEC wurde NET-Gelatine als Standard verwendet, da die Puffer Negativkontrolle hier am „saubersten“ war. Im Einzelfall wurden die Bedingungen aber variiert und an das jeweilige System angepasst.

Um die Anwendbarkeit und Vergleichbarkeit der Dot Blots nochmals konkreter aufzuzeigen, wurden nicht fixierte und fixierte MDA Zellkulturlysate aufgetragen und mit entsprechenden Western Daten verglichen. In Abbildung 5-14 A und B sind exemplarisch die Dot Blots der Lysate MDA- und MDA wt bei Detektion von β -Actin und AEC gezeigt. Über den gesamten Verdünnungsbereich sind klare Signale zu erkennen. Die in den Dot Blots aufgetragenen Verdünnungsreihen zeigten insgesamt ein gutes lineares Verhalten und auch eine gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Aufträgen im Western Blot. Wie erwartet waren mit AEC keine Signale bei den MDA- Lysaten zu detektieren. Neben den Dot Blots sind die entsprechenden Western Blots zu den MDA wt Lysaten dargestellt. Für AEC wurden die Western Blot und die Dot Blot Ergebnisse densitometrisch vermessen und grafisch aufgetragen (Abbildung 5-14 C). Die Verdünnungen der fixierten und nicht fixierten Proben auf den Dot Blots beschreiben beide einen sigmoiden Kurvenverlauf, mit einem nahezu linearen Verhältnis im mittleren Verdünnungsbereich. Das unfixierte Lysat zeigte insgesamt eine leicht stärkere Signalintensität (B unten). Bei einem Abgleich über β -Actin sollte sich dieser Unterschied aber relativieren, da die Signalstärke des unfixierten MDA wt Lysats hier ebenfalls leicht höher ist, als die des fixierten Lysats (A unten). Wie

in der grafischen Auswertung für AEC in (C) zu erkennen ist, stimmen die Ergebnisse von Dot Blots und Western Blots bei den drei ersten Verdünnungsstufen ebenfalls sehr gut überein. Zur besseren Vergleichbarkeit der Kurvenverläufe wurden die 1:1 Verdünnungen jeweils auf 100% gesetzt.

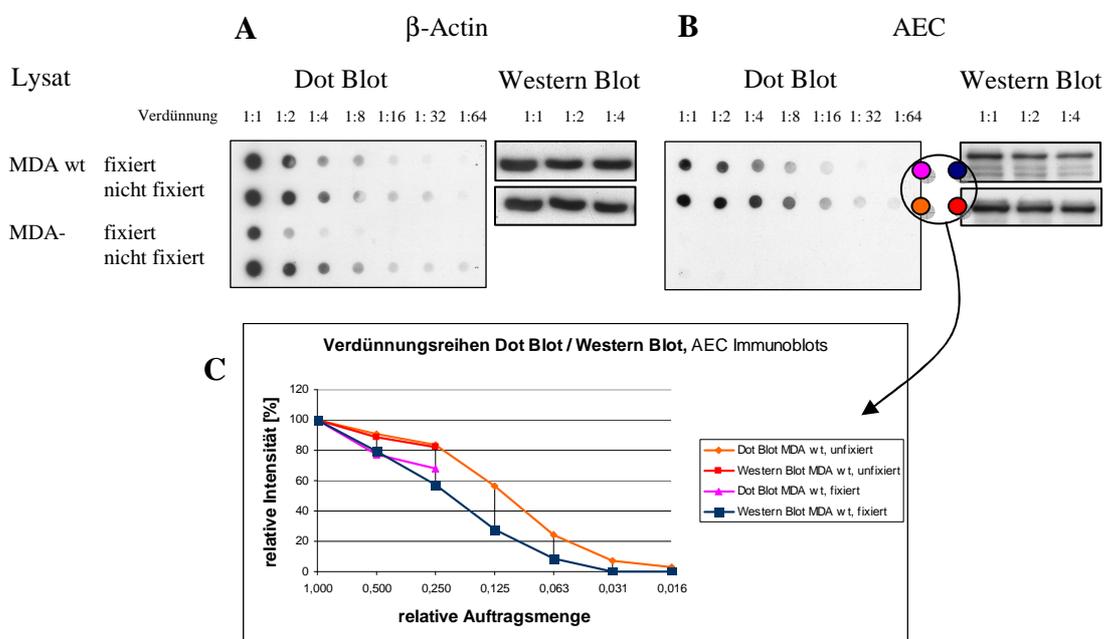


Abbildung 5-14: Vergleich von Dot Blot und Western Blot Ergebnisse für FF fixierte und nicht fixierte Zellkulturlysate. Im Dot Blot wurden je 1 μ l der Verdünnungen auf eine Nitrozellulose Membran gespottet. Im Western Blot wurden jeweils 10 μ l der Lysate aufgetragen. Der Transfer erfolgte auf eine Nitrozellulose Membran. **(A)** Dot Blot und Western Blot mit β -Actin (1:5000). **(B)** Dot Blot und Western Bot mit AEC (1:10000). Sekundär Antikörper anti mouse HRP (1:10000). Nachweissubstrat ECL^{Plus}. **(C)** Grafische Darstellung der AEC Ergebnisse nach densitometrischer Vermessung.

Es konnte somit gezeigt werden, dass sich die Auswertungen beider Präparationsarten, sowie die Signaldetektion auf Western und Dot Blots zueinander nur unwesentlich unterschieden. Die Anwendung der Extraktionsmethode in Dot Blot Analysen und damit skaliert auf „Reverse Phase“ Protein Microarrays war nach den hier erzielten Ergebnissen möglich und lieferte vergleichbare Resultate.

5.5 „Reverse Phase“ Protein Arrays

Die Proteindetektion und -nachweis über Western Blots hat mehrere Nachteile. Einmal werden große Mengen an Lysat benötigt, das meist nicht zur Verfügung steht. Zum anderen ist die reine Anzahl der analysierbaren Proben stark eingeschränkt. Zur Routineanalyse von klinischen Proben, aber auch zu Forschungszwecken ist folglich eine Nachweismethode wünschenswert, die nur geringe Lysatmengen benötigt und einen hohen Probendurchsatz gewährleistet. Hierzu bietet sich die Proteindetektion über einen „Reverse Phase“ Protein Microarray an.

5.5.1 CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System

Zur Detektion wurde in der Arbeit hauptsächlich das CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification Systems von Dako verwendet. Das System wird bei immunhistochemischen Untersuchungen zur Proteindetektion an Gewebeschnitten eingesetzt. Durch die Bildung eines unlöslichen Präzipitats von Fluorescyl-Tyramide, wird eine Signalverstärkung erzielt. Durch Variation der Inkubationszeiten der einzelnen Behandlungsschritte, sowie die Verwendung von alternativen Blockierungslösungen, anstelle des im Kit enthaltenen Proteinblock, konnte das CSAII System als Detektionssystem für die „Reverse Phase“ Protein Microarrays adaptiert werden. Bei der Verwendung hat sich aber gezeigt, dass das System für eine flexible Anwendung gravierende Nachteile hat. Die Detektion mit CSAII weist zwar eine hohe Sensitivität auf, zeigt dabei aber einen sehr engen linearen Detektionsbereich. Das Detektionssystem ist selbst nicht adaptierbar in dieser Hinsicht. Dies bedeutet, dass für eine gemeinsame Probenauswertung die Lysatkonzentrationen sehr genau eingestellt werden müssen, und/oder dass die Antikörperkonzentrationen jeweils an das aktuelle Lysat und dann insbesondere auch zueinander angepasst sein müssen. Beide Bedingungen konnten bei dem verhältnismäßig kleinen Set an getesteten Proben und Antikörpern noch gut gehandhabt werden, was aber wenig praktikabel in der Routineanwendung wäre. Zudem gibt es zu dem CSAII-System aktuell nur Sekundärantikörper gegen Maus und Kaninchen, was die Nutzung mancher Primärantikörper nicht zulässt. Im speziellen Fall betrifft das die Anwendung des E-Cadherin-d9 spezifischen Antikörpers ($\Delta 9$). Bei diesem Rattenantikörper musste auf Chemilumineszenz und Röntgenfilm ausgewichen werden. Die Problematik des Linearitätsverhaltens ist in Abbildung 5-15 gezeigt.

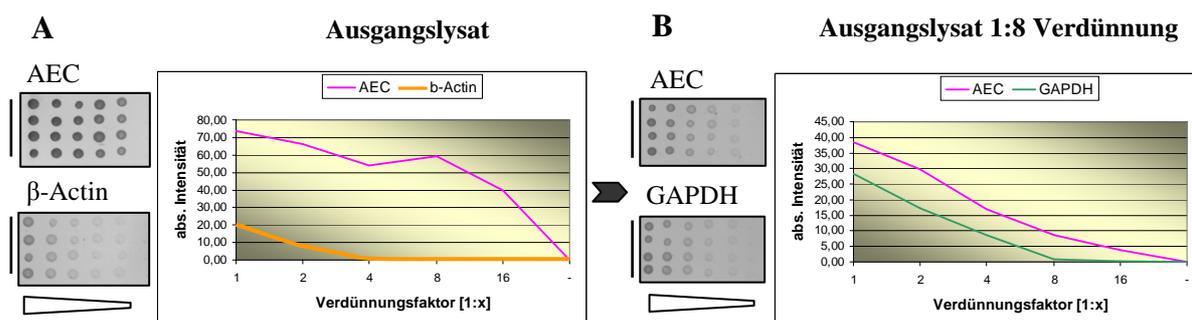


Abbildung 5-15: CSAII Detektionssystem. Anpassung der aufgetragenen Lysatmengen. Exemplarische Signal Darstellung des internen Kontrollstandards. Es waren jeweils die gleichen Lysate in den gleichen Mengen auf die einzelnen Microarrays aufgetragen. In (A) ist die Detektion von AEC und β -Actin gezeigt, mit den üblicherweise verwendeten Primär-Antikörperkonzentrationen. In (B) wurden die Lysate vor dem spotten nochmals 1:8 verdünnt. Die Antikörperkonzentrationen wurden beibehalten. Neben AEC wurde diesmal GAPDH verwendet, da beide erfahrungsgemäß ähnliche Signalstärken auf den Microarrays liefern.

Dargestellt sind die Signale der Verdünnungskurven des auf allen Slides aufgetragenen internen Standards (HSC45 Zellkultur, nicht fixiert). Auf die Slides wurden jeweils die gleichen Lysate gespottet. In (A) sind die Detektionsdaten für AEC und β -Actin gezeigt.

Während AEC sich bis zur 1:4 Verdünnung in der Sättigung befindet, zeigt β -Actin erst ab der 1:2 Verdünnung auswertbare Signale. Eine gemeinsame Auswertung wäre somit nicht möglich gewesen. Die Lysate wurden bei (B) daraufhin 1:8 verdünnt. Damit tritt AEC wie erwartet sehr gut in den linearen Kurvenverlauf ein, β -Actin lieferte hier aber wie ebenfalls erwartet keine detektierbaren Signale, da diese unterhalb des Detektionslimits liegen. An dessen Stelle ist die Detektion von GAPDH dargestellt, welches erfahrungsgemäß ähnliche Signalstärken wie AEC aufweist. Die Verdünnung der Lysate stellt zwar eine Möglichkeit dar, die einzelnen Antikörper in den linearen Signalbereich zu befördern, allerdings können damit nur Antikörper-kombinationen miteinander verglichen werden, die ähnliche Immunreaktionen zeigen. β -Actin würde im aktuellen Beispiel aus den Analysen komplett herausfallen. Um dies zu umgehen ist die Lysatkonzentration auf den schwächsten Antikörper zu kalibrieren und folgend die Antikörperverdünnungen aufeinander abzustimmen. Dies wurde in der Arbeit im Zusammenhang mit dem CSAII-Detektionssystem so praktiziert. Die Ergebnisse dieser Adaptionen sind in Abbildung 5-16 zusammengefasst. Wie ersichtlich konnten auf diese Weise alle mit dem CSAII-System verwendeten Antikörper auf vergleichbare Signalniveaus gebracht werden, wodurch eine Proteinquantifizierung erst ermöglicht wurde. Es bedurfte allerdings einer sehr aufwendigen Austestung der Lysatkonzentration und der Verdünnungen der einzelnen Antikörper zueinander.

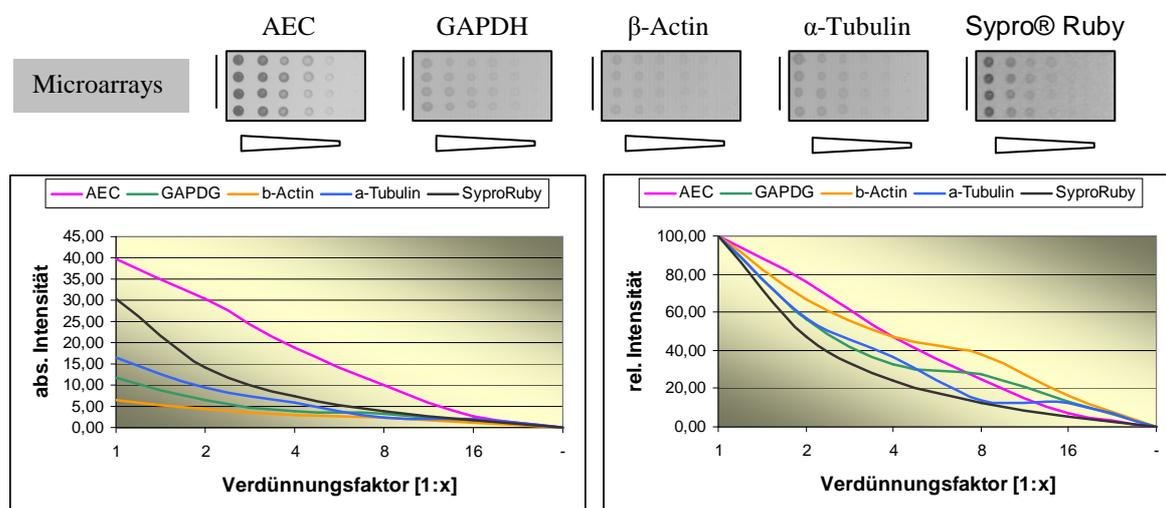


Abbildung 5-16: CSAII Detektionssystem. Anpassung der Antikörperverdünnungen. Exemplarische Signaldarstellung des internen Kontrollstandards. Es waren jeweils die gleichen Lysate in den gleichen Mengen auf die einzelnen Microarrays aufgetragen. Die Lysatkonzentrationen wurden zunächst auf den Antikörper mit dem schwächsten Signal (β -Actin) eingestellt, die restlichen Antikörperverdünnungen wurden experimentell aufeinander abgestimmt, so dass alle einen linearen Kurvenverlauf zeigten. Ebenso musste zur Gesamtproteinbestimmung das Signal mit Sypro® Ruby im linearen Bereich liegen, um eine gemeinsame Auswertung zu ermöglichen. **Links:** Absolutwerte, **Rechts:** Relativwerte, wobei die 1:1 Verdünnungen auf 100% gesetzt wurden.

Dies ist in der Praxis mit unterschiedlichsten Probenlysaten und Antikörpern so nicht handhabbar. Umgehen kann man dieses Problem, indem auf ein chemilumineszenz-

basiertes Detektionssystem zurückgegriffen wird. Die Signaldetektion ist bei diesem Verfahren selbst skalierbar durch die Expositionszeiten des Röntgenfilms.

Mit der CSAII-Signaldetektion konnte zudem mit AEC kein zufrieden stellendes Ergebnis bei der Zelllinie MDA- erzielt werden. Hier darf kein Signal auftreten, da diese Zelllinie E-Cadherin nicht exprimiert, was aber nicht der Fall war. Selbst der Extraktionspuffer lieferte bei manchen Blockierungsbedingungen unspezifische Signale, was die Handhabung des CSAII-Detektionssystems weiter erschwerte. Als Konsequenz wurde für AEC, wie auch für den mutationsspezifischen E-Cadherin Antikörper $\Delta 9$, ein chemilumineszenz basiertes Nachweisverfahren angewandt.

5.5.2 Chemilumineszenz-basierte Signaldetektion

Die Signalermittlung erfolgt bei diesem Ansatz analog der Western Blot Detektion, basierend auf den üblichen Reaktionsbedingungen der Antikörper und dem ECL^{Plus} Luminol-Substrat, das ein sehr gutes Verhältnis von spezifischem Signal zu Hintergrund, sowie eine hohe Sensitivität aufweist. Die Signalaufzeichnung erfolgte mittels Röntgenfilm. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Signalintensität durch verschiedene Auflegzeiten, bei der Exposition des Röntgenfilms, reguliert werden kann und der lineare Bereich somit über einen großen Bereich ausgedehnt werden kann (siehe Abbildung 5-17). Mit diesem Verfahren lassen sich somit viel effektiver Lysat- und Affinitätsschwankungen ausgleichen. Die Signale für AEC bleiben über Expositionszeiten von 1 min bis 5 min nahezu ideal innerhalb des linearen Kurvenverlaufs. Auch die Signalspezifität war mit den MDA- Lysaten gegeben. Es wurden keine falsch positiven Signale detektiert. Nachteilig ist, dass die Signale nicht so deutlich begrenzt sind, wie mit der kolorimetrischen Signaldetektion und dass das Hintergrundsignal des Films oftmals relativ hoch und weniger homogen ist, so dass die densitometrische Vermessung ungenauer wird.

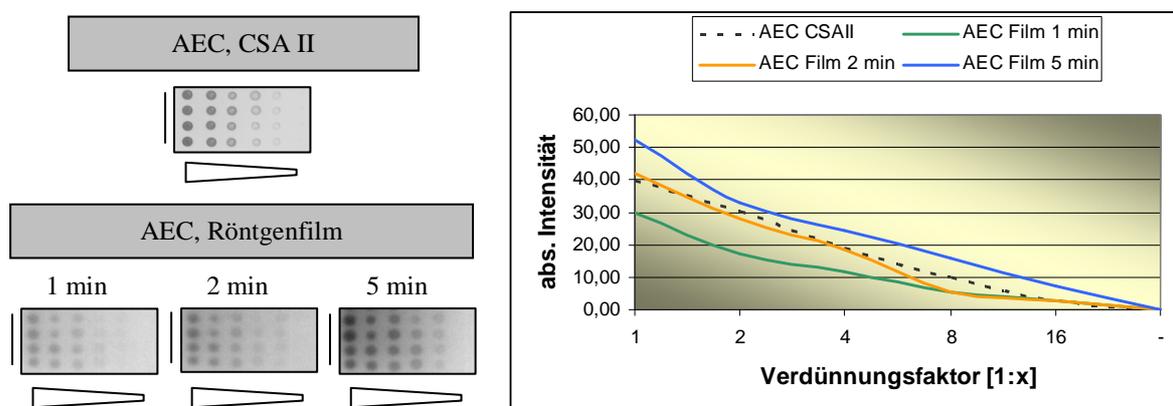


Abbildung 5-17: Angepasste Expositionszeiten mit Chemilumineszenz (Luminol) basierendem Detektionssystem. Exemplarisch ist das Signal des internen Kontrollstandards für AEC dargestellt. Es wurde jeweils die gleichen Lysate und die gleichen Mengen auf die einzelnen Slides aufgetragen. Die Signalanpassung kann in diesem Fall über die Expositionszeiten auf dem Röntgenfilm erfolgen. Deutlich wurde, dass dies über einen viel größeren Bereich möglich ist. Im Vergleich dazu ist das entsprechende Ergebnis mit CSAII dargestellt (gestrichelte Linie).

Problematisch ist die Quantifizierung von schwachen Proben, die auf dem Array direkt neben sehr starken Proben liegen, da die Signale leicht von den starken Proben überstrahlt werden.

Darüber hinaus hat das System aber den Vorteil, dass die meisten experimentellen Bedingungen bereits von den klassischen Western Blot Anwendungen bekannt sind direkt übernommen, bzw. leicht adaptiert werden können. Zudem kann auf ein großes Arsenal an Luminol-Substraten zurückgegriffen werden, die sich durch unterschiedliche Sensitivitäts- und Linearitätsverhalten ergänzen. Durch den Einsatz eines chemilumineszenz basierten Detektionssystems kann zwar die grundlegende Blockierungsproblematik nicht eliminiert werden, das System zeigt sich aber weitaus stabiler und zuverlässiger in dieser Hinsicht, insbesondere was den Praxiseinsatz betrifft.

5.6 Verifizierung der Extraktionsmethode

Bislang konnte gezeigt werden, dass es möglich ist aus Formalin fixierten Geweben und Zellen nicht degradierte Proteine zu isolieren und mithilfe im Labor etablierter, molekularbiologischer Routinemethode zu analysieren. Mit der entwickelten Methodik geschieht dies mit hoher Effizienz und Reproduzierbarkeit. Ebenfalls konnten die unterschiedlichen Detektions-systeme etabliert werden. Zur verlässlichen Quantifizierung und Auswertung der analysierten Proben war es nun wichtig zu zeigen, dass die Messergebnisse von unfixierten und fixierten Proben durch das Proteinextraktions-verfahren nicht verfälscht werden und vergleichbar waren. Dies wurde an Zellkulturlysaten und für Gewebe an Cryo- sowie FFPE-Lysaten evaluiert. Zudem musste gezeigt werden, dass die Daten der Western Blots denen der Microarrays entsprechen, um diese verlässlich und verifiziert einsetzen zu können. Durch den Nachweis verschiedener Haushaltsgene (α -Tubulin, β -Actin und GAPDH) und der Bestimmung der Gesamtproteinmenge über Sypro® Ruby und EZQ sollte zudem die beste Abgleichmethode zur Quantifizierung bestimmt werden.

5.6.1 Vergleich von Formalin fixierten und nicht fixierten Zelllinien

Zunächst wurden die Untersuchungen an Formalin fixierten Zelllinien durchgeführt. Der Vorteil liegt darin, dass auf ein grundlegend identisches Probenmaterial zurückgegriffen werden kann, mit entsprechenden Variationsmöglichkeiten zur Vorbehandlung bei der Extraktionsmethode. Tendenziell sollten sich die dabei generierten Ergebnisse nicht voneinander unterscheiden. Bei den kultivierten Zellen liegen darüber hinaus weitestgehend definierte Verhältnisse vor, so dass die Methodik leicht auf ihre Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit getestet werden kann. Folgende Zellkulturlysate wurden in den Untersuchungen eingesetzt: MDA-, MDA wt, MDA d9 und HSC45. Die verschiedenen MDA-Zelllinien wurden gewählt, da hier definierte E-Cadherin Bedingungen gewährleistet und zu erwarten waren. MDA- sollte keine Reaktion mit den E-Cadherin Antikörpern AEC und $\Delta 9$, MDA wt nicht mit $\Delta 9$ liefern. Die MDA d9 Zelllinie sollte ein Signal mit allen verwendeten Antikörpern zeigen. HSC45 wurde als zweite Linie hinzugenommen, um Zelllinien spezifische Effekte auszuschließen. Für die HSC45-Lysate waren mit allen Antikörpern Signale zu erwarten. Alle Zelllinien wurden als unfixierte Lysate präpariert, einmal nach T-Per-Extraktion (Kapitel 4.4.2) und nach EB-Extraktion (Kapitel 4.4.3), sowie als Formalin fixierte Lysate (FF) nach Anleitung der EB-Extraktion. Alle miteinander verglichenen Lysate stammten aus dem gleichen Zellkulturansatz und es wurden jeweils die gleichen Zellzahlen zur Lysatpräparation eingesetzt.

5.6.1.1 Western Blots

Die Zellkultur-Lysate wurden entsprechend der EZQ-Vermessung in Extraktionspuffer verdünnt und aufeinander eingestellt. Es wurde jeweils die gleiche Proteinnmenge auf das Gel aufgetragen, wobei die Lysate jeweils in vier Verdünnungen von 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8, zusammen mit einer Pufferkontrolle (-) auf die Polyacrylamid-Gele aufgetragen und aufgetrennt wurden. Nach blotten auf eine Nitrozellulosemembrane wurden diese mit Sypro® Ruby gefärbt, eingescannt und densitometrisch vermessen (Abbildung 5-18). Gezeigt sind exemplarisch die Lysate von MDA Δ9 und HSC45. Die weiteren, nicht dargestellten Lysate, zeigten vergleichbare Ergebnisse und auch die erwarteten Antikörperspezifitäten. Wie in Abbildung 5-18 A zu erkennen lieferten alle Lysate deutliche und mit den Verdünnungsstufen abnehmende Intensitäten auf den Blots. Es zeigten sich allerdings nach Auswertung der Gesamtproteinfärbung mit SYPRO® Ruby leichte Abweichungen in den Gesamtintensitäten und somit in den Auftragsmengen (siehe auch Tabelle 5-1). Die Einstellung der Proteinnmenge nach EZQ lieferte, wie auch bereits aus vorherigen Vermessungen zu beobachten war, keine absolut verlässlichen Werte. Für eine erste Abschätzung der Lysatkonzentrationen und damit einem möglichst homogen Probenauftrag (und folglich linearem Probenverhalten), ist die Gesamtproteinvermessung nach EZQ aber durchaus geeignet und zu empfehlen.

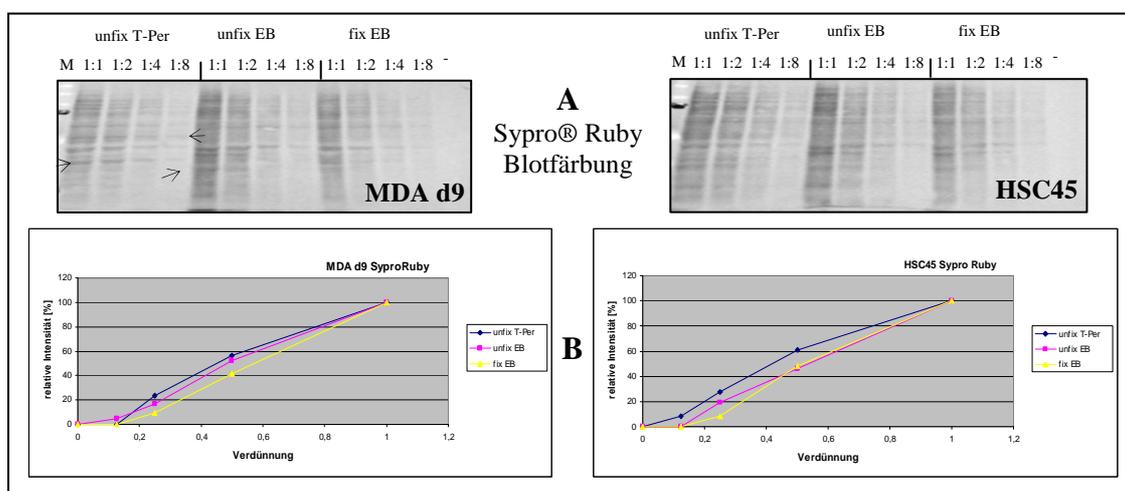


Abbildung 5-18: Gesamtproteinbestimmung der FF Zellkulturlysate nach SDS-Page Auftrennung und Transfer auf PVDF Membranen. **(A)** Sypro® Ruby Blotfärbung, Lysate von MDA d9 (links) und HSC45 (rechts) in den Verdünnungen von 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8. M Marker, - Puffer Negativkontrolle. Die Pfeile weisen exemplarisch auf die unterschiedlichen prominenten Extraktionsbanden der beiden Puffersysteme. **(B)** Grafische Auswertung nach densitometrischer Vermessung der gefärbten Western Blots. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die einzelnen Werte als relative Intensitäten [%] dargestellt, indem die 1:1 Verdünnungen jeweils auf 100% gesetzt wurden.

Wie zuvor schon bei der Coomassie-Gelfärbung beschrieben, zeigten sich auch nach der Blotfärbung mit SYPRO® Ruby leichte Unterschiede in den prominent auftretenden

Banden je nach verwendetem Extraktionspuffer (Pfeile Abbildung 5-18 A links). Die fixierten und nicht fixierten Lysate in EB-Puffer zeigten untereinander identische Muster. Die densitometrische Auswertung in (B) zeigt für beide Zelllinien ein nahezu ideales lineares Verhalten über die Verdünnungen hinweg. Die Gesamtproteinendarstellung mit Sypro® Ruby war somit für alle getesteten Lysate anwendbar und die Lysate lagen durchgängig im linearen Vermessungsbereich. Die Gesamtproteinbestimmung nach SYPRO® Ruby zeigte in den bisherigen Untersuchungen ein sehr zuverlässiges und homogenes Signalverhalten. Es ist als Methode der Wahl, insbesondere für die Protein Microarrays, zur Probennormalisierung zu betrachten.

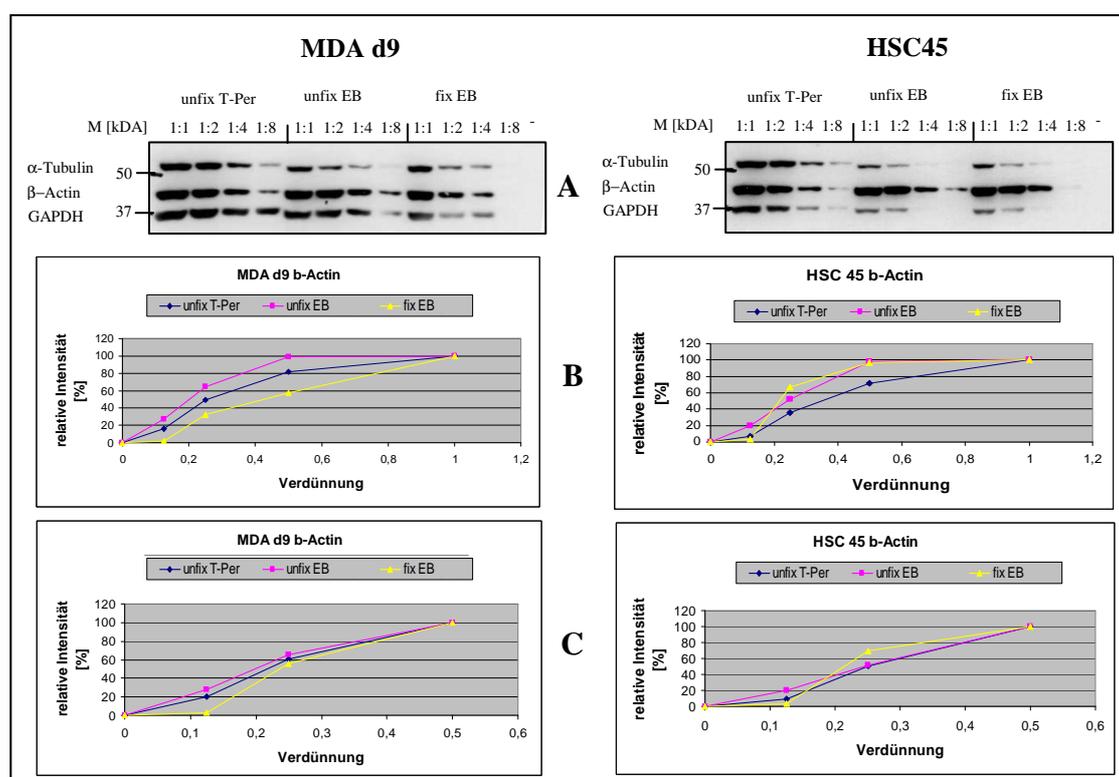


Abbildung 5-19: Western Blots der FF Zellkulturlysate zum Nachweis der „Haushaltsgene“ α -Tubulin, β -Actin und GAPDH. (A) Detektierte Signale nach ECL^{Plus} Inkubation, Zellkulturlysate von MDA d9 (links) und HSC45 (rechts) in den Verdünnungen von 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8. M Marker, - Puffer Negativkontrolle. (B) Grafische Auswertung nach densitometrischer Vermessung der Western Blot Banden, exemplarisch für β -Actin gezeigt. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die einzelnen Werte als relative Intensitäten [%] dargestellt, indem die 1:1 Verdünnungen jeweils auf 100% gesetzt wurden. In (C) sind die 1:1 Werte nicht berücksichtigt.

Nach Entfärbung wurden auf den gleichen Membranen die Immunodetektionen durchgeführt. Die drei ausgewählten Haushaltsgene α -Tubulin, β -Actin und GAPDH wurden in einem gemeinsamen Detektionsansatz nachgewiesen, wie in Abbildung 5-19 A gezeigt. Bei den Immunoblots zeigten sich größere Schwankungen in den vermessenen Werten, als bei der Gesamtproteinbestimmung nach Sypro® Ruby zu erwarten gewesen wäre. Die Signalkonsistenz zeigte sich bei Weitem nicht so stabil, was der Nachweismethode zugeschrieben werden muss.

Wie aus dem Kurvenverlauf in Abbildung 5-19 B ersichtlich, befinden sich die meisten Werte der 1:1 Verdünnungen bereits im Sättigungsbereich der Messung. Dieser Wertebereich ist nicht für eine Auswertung geeignet, da die Signalsättigung zu einer Verfälschung der Quantifizierungsergebnisse führen würde. Am anderen Ende der Skala liegen die meisten 1:8 Verdünnungswerte, insbesondere der fixierten Proben, nahe der Nachweisgrenze und sollten ebenfalls als nicht verlässlich erachtet werden (vergl. auch Abbildung 2-4). Lässt man in diesen Fällen die Werte der 1:1 Verdünnungen außer Betracht, ergeben sich sehr gute lineare Verhältnisse. Exemplarisch ist dies in Abbildung 5-19 C für β -Actin gezeigt.

Für beide Zelllinien wurde anschließend die E-Cadherin Mengen mit den beiden Antikörpern AEC und $\Delta 9$ bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-20 dargestellt.

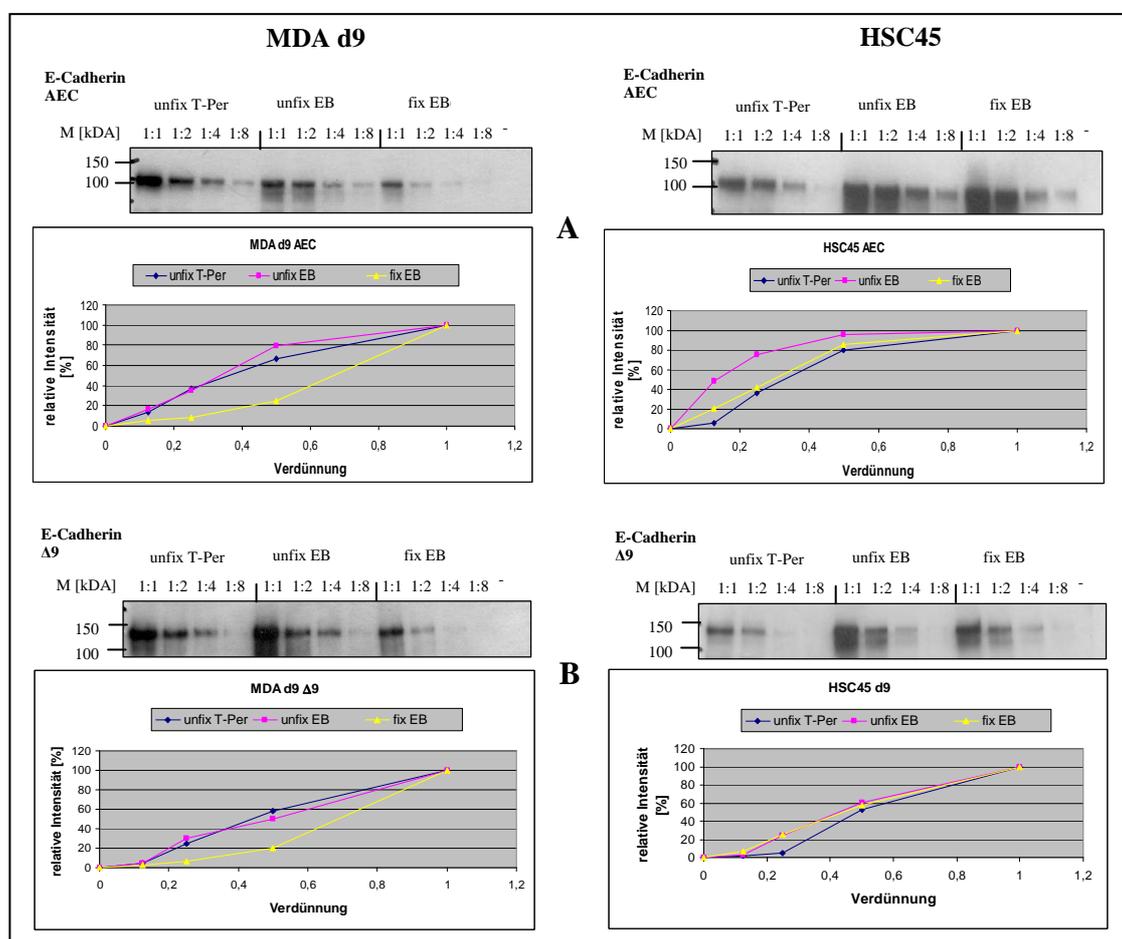


Abbildung 5-20: Immunoblots gegen E-Cadherin und (unten) Western Blots nach ECL^{Plus} Detektion, Lysate von MDA d9 (links) und HSC45 (rechts) in den Verdünnungen von 1:1, 1:2, 1:4 und 1:8. M Marker, - Puffer Negativkontrolle. (A) Nachweis von E-Cadherin mit AEC-Antikörper und grafische Auswertung nach densitometrischer Vermessung der Western Blot Banden (B) Nachweis von E-Cadherin mit mutationsspezifischen $\Delta 9$ Antikörper und grafische Auswertung nach densitometrischer Vermessung der Western Blot Banden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die einzelnen Werte als relative Intensitäten [%] dargestellt, indem die 1:1 Verdünnungen jeweils auf 100% gesetzt wurden.

Auch hier gilt, dass sich bei allen Ansätzen eine gute Linearität ergibt, insofern man die 1:1 Verdünnungswerte außer acht lässt. Beide Antikörper zeigen einen vergleichbaren Kurvenverlauf.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich sagen, dass sich ein lineares Signalverhalten bei den Immunoblots ebenfalls beobachten lässt, allerdings nur in einem relativ engen Mengenbereich. Die Signale der fixierten Zellkultur-Lysate liegen dabei fast ausnahmslos unterhalb denen der nicht fixierten. Durch die Formalinfixierung scheint daher eine Abnahme der Nachweisgrenze einherzugehen, was einer Abnahme in der Immunoreaktivität gleichzusetzen ist. Im Gegensatz zu Proteinextraktionen aus Geweben, bei denen auch extrazelluläre Proteine in gewissen Anteilen auftreten können, sollte bei den Zellkulturlysaten davon ausgegangen werden können, dass die Werte von Gesamtprotein und den Haushaltsgenen miteinander korrelieren. Ein Vergleich der Absolutwerte der Immunoblots zeigte allerdings signifikante Unterschiede im Vergleich zur Gesamtproteinbestimmung nach Sypro® Ruby. Einzig die Werte von β -Actin bei der MDA d9 Zelllinie spiegeln in etwa die gleichen Verhältnisse wieder (siehe Tabelle 5-1).

MDA d9	unfix T-Per	unfix EB	fix EB	HSC45	unfix T-Per	unfix EB	fix EB
α -Tubulin	87 (46)	33 (15)	25 (15)	α -Tubulin	88 (37)	13 (2)	13 (4)
β -Actin	109 (66)	112 (73)	65 (36)	β -Actin	100 (51)	122 (63)	117 (81)
GAPDH	108 (71)	75 (56)	21 (25)	GAPDH	52 (16)	16 (1)	12 (1)
Sypro® Ruby	14	24	12	Sypro® Ruby	28	22	16
AEC	110 (61)	79 (34)	16 (5)	AEC	71 (32)	84 (67)	87 (42)
Δ 9	83 (34)	65 (38)	16 (5)	Δ 9	41 (4)	55 (22)	57 (25)

Tabelle 5-1: Absolutwerte der densitometrischen Vermessung der Immunoblots für α -Tubulin, β -Actin und GAPDH sowie Gesamtprotein nach Sypro® Ruby für die beiden Zelllinien MDA d9 und HSC45. Dargestellt sind die Werte der 1:2 Verdünnungen. In Klammern die Werte der 1:4 Verdünnungen.

Deutlich wird dabei, dass im Vergleich zur Gesamtproteinmenge die Werte für das unfixierte Lysat mit T-Per Extraktion meist deutlich höher liegen, als die der beiden EB-Lysate, die nach dem Protokoll der FFPE-Extraktion behandelt wurden, wobei das fixierte Lysat nochmals eine geringere Immunreaktion zeigt. Nur für β -Actin bei der Zelllinie HSC45 war dies nicht der Fall. Hier waren alle Intensitäten auf einem annähernd gleichen Niveau, die EB-Lysate sogar mit leicht stärkerem Signal.

Auswertung der relativen E-Cadherin Mengen

E-Cadherin wurde anschließend anhand des Abgleichs auf die Haushaltsgene und auf die Gesamtproteinmenge nach Sypro® Ruby normalisiert und quantifiziert. Im Idealfall sollten mit allen Kombinationen zur E-Cadherin Normalisierung die gleichen Ergebnisse erzielt werden. Es wird angenommen, dass die Haushaltsgene in jeder Zelle in gleichen Mengen

vorhanden sind und keine merklichen Mengenänderungen zu beobachten sind. Da es sich um Zellkulturlysate handelt, sollte auch die Gesamtproteinbestimmung nach Sypro® Ruby mit der Zellzahl korrelieren und somit ebenfalls direkt vergleichbar sein.

Eine zusätzliche Beurteilung der Korrelation der Werte zueinander stellt Abbildung 5-21 dar. Hier sind die Expressionswerte von E-Cadherin direkt den Expressionswerten der Haushaltsgene, bzw. der Sypro® Ruby Färbung gegenüber gestellt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Trendlinie gibt an, wie gut die Verdünnungsreihen miteinander korrelieren. Werte bis 0,8 sind akzeptabel. Darunter sind Auswertungen kritisch zu betrachten, da die Schwankungen in den einzelnen Werten sehr hoch sind und die Verdünnungsreihen sich zueinander nicht linear verhalten.

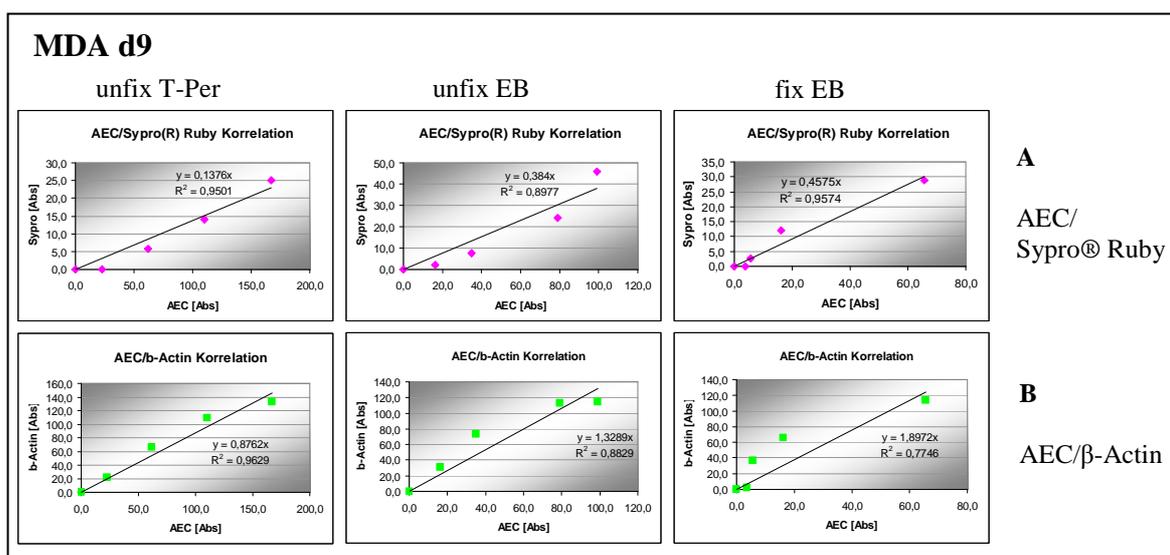


Abbildung 5-21: Korrelation der Immunoblots. Gegeneinander aufgetragen sind die Absolutwerte der jeweiligen Verdünnungsstufe. Exemplarisch gezeigt an den MDA d9 Lysaten für (A) AEC / Sypro® Ruby und (B) AEC / β -Actin.

Über die Steigung der eingezeichneten Trendlinie kann zudem eine Aussage getroffen werden, wie sich die einzelnen Lysate/Proben in Relation zueinander verhalten. Ist die Trendlinie bei dieser Auftragung steiler (größere Steigung), fällt die detektierte E-Cadherinmenge im Vergleich niedriger aus. Weiterhin kann für die Auswertung nach einem bestimmten Datenpunkt, respektive Verdünnung, die Aussage getroffen werden, ob dieser tendenziell eher zu höheren oder niedrigeren Mengen bei der Quantifizierung führt. Liegt der Messpunkt oberhalb der Trendlinie, ist der quantifizierte Wert möglicherweise als zu niedrig einzustufen und vice versa. Hierbei ist zu beachten, dass die Trendlinie eine Mittelung der einzelnen Messpunkte (Verdünnungen) darstellt. Sättigungseffekte, oder Werte nahe der Detektionsgrenzen spiegeln sich in der Trendlinie wieder, wobei sich dieses negativ im Bestimmtheitsmaß niederschlagen sollte. Auswertungen nach einem festgelegten Verdünnungswert können daher von den allgemeinen Aussagen hier signifikant abweichen. In (A) sind die Lysatkorrelationen nach AEC/Sypro® Ruby

dargestellt. Alle Bestimmtheitsmaße liegen mit Werten über 0,9 in akzeptablen Bereichen. Es wird erwartet, dass die errechneten E-Cadherin Mengen folgende Tendenzen aufweisen: unfix T-Per > unfix EB > fix EB, was sich auch bei der Quantifizierung bestätigte (siehe Abbildung 5-22 links). Das gleiche gilt für den Abgleich mit β -Actin (B), wobei die Korrelation für fix EB (B rechts) mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,77 kritischer zu betrachten ist.

Bei den Ergebnissen der Quantifizierung fällt zunächst auf, dass die beiden E-Cadherin Nachweise mit AEC und $\Delta 9$ sehr ähnliche Werte liefern. In Abbildung 5-22 sind die Auswertungen für MDA d9 (A) und HSC45 (B) dargestellt. Jeweils links in den Grafiken sind die Auswertungen zu AEC normalisiert mit den einzelnen Haushaltsgenen und dem Gesamtproteinabgleich nach Sypro® Ruby zu sehen, rechts die entsprechenden Ergebnisse mit dem $\Delta 9$ Antikörper. Die dargestellten Werte geben die relative Menge zum unfixierten Lysat nach T-Per Extraktion an, welches für alle Systeme auf 100% gesetzt wurde. Ein Wert größer 1 bedeutet eine x-fach höhere Cadherin Menge im Vergleich zum Referenzlysate, entsprechend ein Wert kleiner 1 die x-fach geringere Menge.

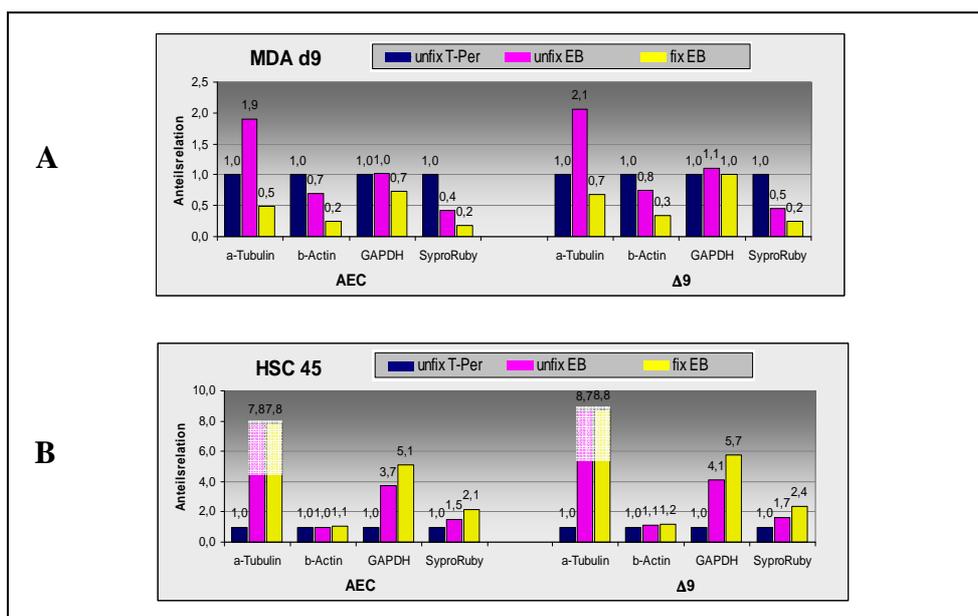


Abbildung 5-22: Quantifizierung von E-Cadherin durch Normalisierung auf die aufgeführten Haushaltsgene bzw. auf Gesamtprotein nach Sypro® Ruby. Zur Berechnung wurde der 1:2 Verdünnungswert herangezogen. (A) Lysate der Zelllinie MDA d9, links nach AEC, rechts nach $\Delta 9$. (B) Lysate der Zelllinie HSC45, wiederum links nach AEC, rechts nach $\Delta 9$.

In allen Auswertungen fällt die Korrelation mit α -Tubulin etwas aus dem Rahmen. Bei MDA d9 trifft dies auf unfix EB, bei HSC auf beide EB-Lysate zu. Vergleicht man dies mit den Signalwerten der Western Blots, erkennt man bei den genannten Lysaten einen unverhältnismäßigen Intensitätsabfall bei der 1:2 Verdünnung. Die ist bei der HSC45 Zelllinie auch mit GAPDH der Fall. Bei der Quantifizierung von E-Cadherin spiegelt sich dies in verhältnismäßig hohen Werten wieder, die als nicht korrekt anzusehen sind

(gewisst in Abbildung 5-22). Bei der Zelllinie MDA d9 (A) sieht die grundlegende Tendenz so aus, dass bei Lysat unfix EB im Vergleich zum Referenzlysat unfix T-Per eine leicht geringere Menge an E-Cadherin detektiert wurde. Das fixierte Lysat zeigte nochmals eine geringere Menge an detektiertem E-Cadherin. Nahezu gleich sind dabei die Auswertungen nach β -Actin und Sypro® Ruby. Lässt man, wie oben beschrieben, den α -Tubulin-Wert außer acht und geht davon aus, dass auch die GAPDH-Werte für die EB-Lysate leicht zu hoch sind, dann zeigt sich diese Tendenz (nahezu wertekonsistent) bei allen vier Normalisierungen. Die Auswertungen nach AEC (A links) und $\Delta 9$ (A rechts) sind dabei nahezu identisch. Ähnlich konsistent sieht die Analyse mit den HSC45 Lysaten aus (Abbildung 5-22 B). Auch hier ist eine klare Tendenz zu erkennen. Im Vergleich zum Lysat aus den unfixierten Zellen mit T-Per zeigt das unfixierte EB-Lysat einen höheren E-Cadherin Anteil. Das Lysat aus den fixierten Zellen liegt nochmals ein wenig höher. Die EB-Werte mit α -Tubulin und GAPDH sind, wie oben bereits erwähnt, bei kritischer Betrachtung als zu hoch einzuschätzen. Unter dieser Annahme findet sich die Tendenz damit ebenfalls bei allen vier Referenzsystemen, wobei sich diesmal die Ergebnisse von Sypro® Ruby und GAPDH am meisten ähnelten. Auch hier weichen die Auswertungen nach AEC (B links) und $\Delta 9$ (B rechts) kaum voneinander ab.

Interessanterweise verhalten sich damit die MDA d9 und die HSC45-Lysate exakt konträr zueinander (zumindest auf E-Cadherin bezogen). Bei MDA d9 nimmt die Immunogenität tendenziell mit EB-Puffer und Fixierung ab. Bei HSC45 zeigt sich tendenziell eine relative Steigerung der nachgewiesenen E-Cadherin Mengen. Weshalb sich die beiden Zelllinien in der prinzipiellen Tendenz so grundlegend unterscheiden ist unklar.

5.6.1.2 Reverse Phase Protein Microarrays

Auf die Protein Microarrays wurden die gleichen Lysate aufgebracht, wie bei den Western Blots der vorherigen Kapitel eingesetzt (siehe Abbildung 5-23). Die eingestellten Konzentrationsverhältnisse entsprechen einander somit ebenfalls. Zusätzlich wurden auf den Arrays noch weitere Kultivierungs- bzw. Extraktionsvariationen der HSC45 Zelllinie gespottet. Die Lysate der Arrays A10 bis A12 entsprechen denen in den Western Blots aufgetragenen Proben. Bei A13 wurde dem EB-Puffer 0,5% CCA zugesetzt. Im Idealfall wäre hier mit einer verbesserten Immunreaktivität zu rechnen. Bei A14 wurde die Fixierung mit einem höherem Formalin Gehalt durchgeführt, was den möglichen Einfluss von Schwankungen während der Probenkonservierung (Formalinkonzentration und Einwirkzeiten) aufzeigen sollte. Den Zellen in A15 wurden ca. 8h vor Proteinextraktion das Medium entzogen. Dies induziert einen Stresszustand, was in Reaktion zu unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern bei ausgewählten Proteinen führen sollte (beispielsweise pAMPK α). Zusätzlich wurde auf allen Slides in Position A16 ein interner Standard aufgetragen, um gegebenenfalls eine Auswertung verschiedener Slides miteinander zu ermöglichen. Bei den hier gezeigten Auswertungen war solch ein Abgleich nicht nötig, da hier nur Lysate miteinander verglichen wurden, die jeweils auf dem gleichen Slide positioniert waren.

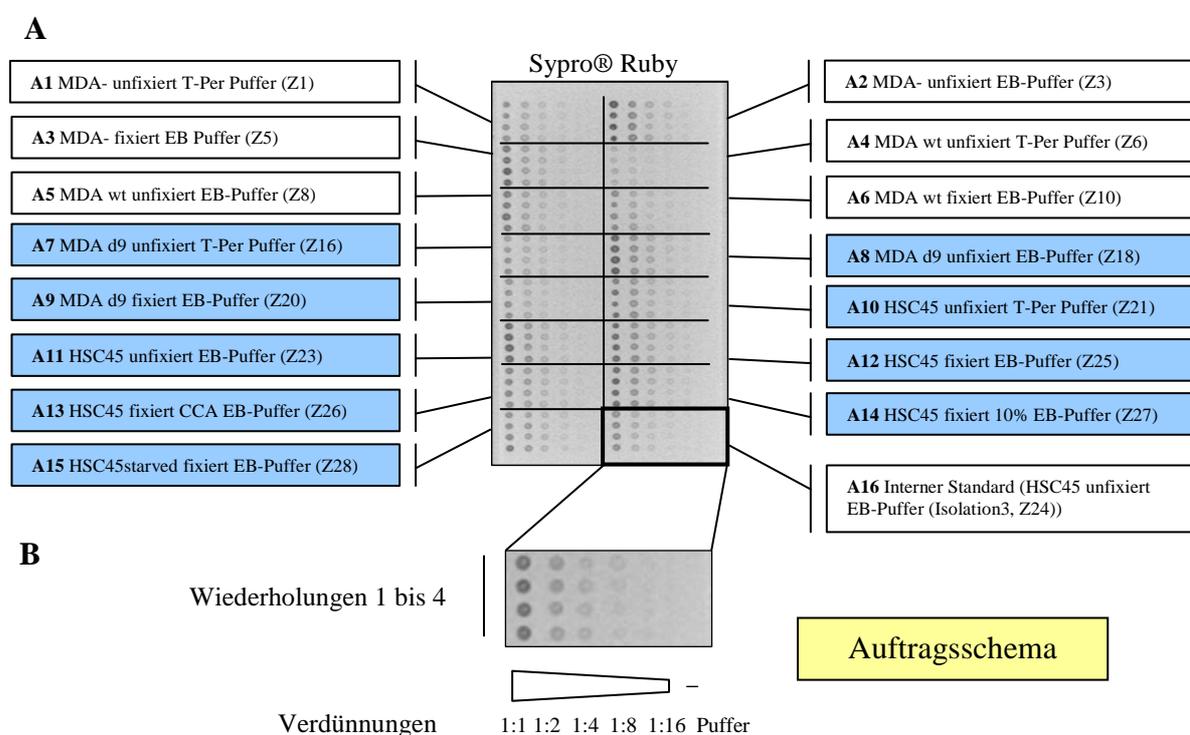


Abbildung 5-23: Auftragsschema der reverse Phase Protein Microarrays. Gezeigt ist ein Slide nach Sypro® Ruby Gesamtproteinanfärbung. In (A) sind die einzelnen Blocks, A(rray) 1-16, mit Aufführung der jeweils dort gespotteten Lysate dargestellt. (B) Die Lysate wurden jeweils in vier Wiederholungen (von oben nach unten) in den Verdünnungen 1:1 bis 1:16 (rechts nach links) aufgetragen. In der letzten Spalte wurde eine Negativkontrolle (Extraktionspuffer) aufgebracht. In A(rray) 16 wurde zudem ein interner Standard aufgetragen, um Auswertungen verschiedener Slides miteinander zu ermöglichen.

Die Detektion erfolgte für alle Haushaltsgene nach dem colorimetrischen CSAII-Detektionssystem. Der Nachweis von E-Cadherin nach AEC, wie auch $\Delta 9$, wurde mit Luminol und anschließender Exposition eines Röntgenfilms durchgeführt. Im CSAII-Nachweis zeigte die Pufferkontrolle mit AEC und der üblichen Blockierung in NET-Gelatine unspezifische Signale. Zudem lieferten die Lysate der MDA - Zelllinie, welche E-Cadherin negativ sein sollten, Signal mit AEC. Die unspezifischen Signale des Puffers konnten zwar durch die Blockierung in 0,5% Casein/TBST vermieden werden, die unspezifische Reaktion bei den MDA- Lysaten konnte aber durch keine Blockierungsmethode verhindert werden. Diese Problematik tritt bei der Detektion mit Luminol und Röntgenfilm nicht auf, wie dies auch in den Western Blots nicht zu beobachten war.

In Abbildung 5-24 sind die Auswertungen der reverse Phase Protein Microarrays exemplarisch für Sypro® Ruby, GAPDH und AEC gezeigt. Anhand des Slides zu Sypro® Ruby kann man zunächst erkennen, dass nahezu alle Lysate in sehr ähnlichen Mengen auf den Slides gespottet wurden (A links). Nur in A4 (MDA wt unfix T-Per) ist die aufgetragene Lysatmenge im Vergleich etwas geringer. Ansonsten war auffällig, dass fast alle fixierten Lysate, insbesondere der HSC45 Zelllinie, ein recht geringes Signal mit allen Haushaltsgenen lieferten. Die einzelnen Signale lagen im Vergleich deutlich unter denen des Gesamtproteins nach Sypro® Ruby (exemplarisch GAPDH in B links). Insgesamt lieferten alle Werte aber auswertbare Signalstärken. Die Kurvenverläufe sind in weiten Bereichen linear und die einzelnen Lysattypen verhielten sich dabei vergleichbar. Die HSC45 Lysate zeigen dabei eine etwas größere Variabilität, was ursächlich durch die insgesamt schwachen Signale beeinflusst ist. Bei GAPDH mit den Lysaten HSC45 fix EB CCA (A13) und HSC45 fix EB starved lagen die Absolutwerte der zur Auswertung verwendeten 1:4 Verdünnungen unter der Ausschlussgrenze von 2. Diese wurden daher nicht zu Berechnungen herangezogen. Die definierte Signal Ausschlussgrenze von 2 hat sich bei den bisherigen Auswertungen als kritisch heraus kristallisiert. Bei Berechnungen mit Werten, die unterhalb dieses Grenzwertes lagen, wurden in vielen Fällen augenscheinlich unglaubliche Berechnungsgrößen generiert. Die Korrelationen der Array-Werte und der Western Blot Werte fallen für die meisten Lysate gut aus und liegen mit Werte von über 0,8 beim Bestimmtheitsmass auf einem korrelierbaren Niveau (vergl. Abbildung 5-24 A-C rechts). Werden die 1:1 Messwerte nicht zur Auswertung hinzugezogen, bei denen in vielen Fällen Sättigungseffekte auftreten, wie zuvor auch bei den Western Blots in Abbildung 5-19 gezeigt, verbessern sich die Kurvenverläufe und die meisten Korrelationsgeraden nochmals deutlich (Daten nicht gezeigt).

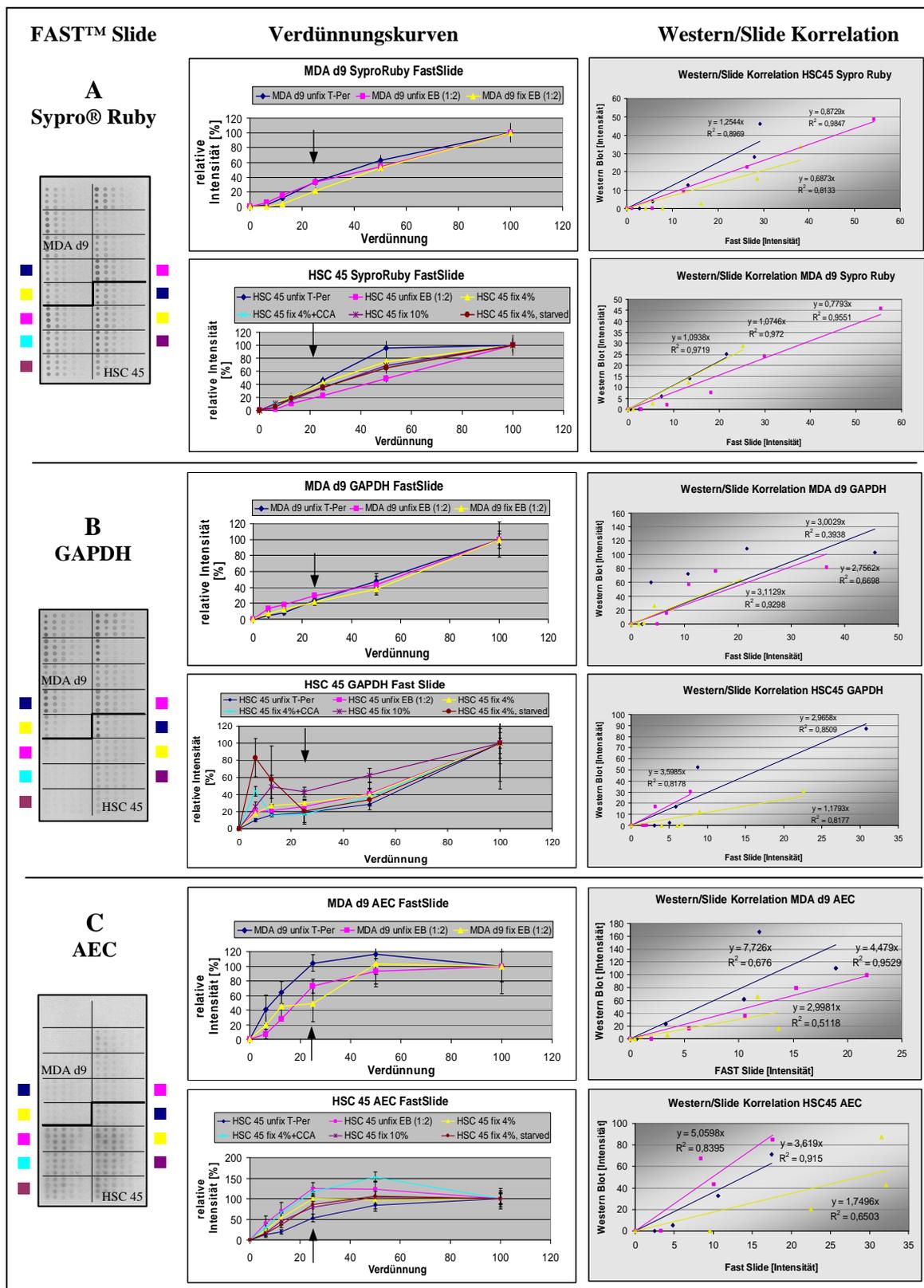


Abbildung 5-24: Reverse Phase Protein Microarrays. Der Lysatauftrag erfolgte mit dem Schleicher&Schuell MicroCaster auf kommerzielle Fast™ Slides anhand des Auftragsschemas aus Abbildung 5-23. **(A)-(C)** Nachweis und Auswertung von Gesamtprotein nach Sypro® Ruby, dem Haushaltsgen GAPDH, sowie E-Cadherin (AEC), exemplarisch an den beiden Zelllinien MDA d9 und HSC45. **Links** Protein Microarrays nach Sypro® Ruby-Färbung, bzw. nach immunologischer Antikörperreaktion und Detektion mit CSAII oder nach Röntgenfilm Exposition. In der **Mitte** die grafische Darstellung nach densitometrischer Vermessung der aufgetragenen Verdünnungswerte von 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16. Der 1:1 Verdünnungswert wurde zur besseren Vergleichbarkeit für alle Lysate auf 100% gesetzt. **Rechts** Korrelationsblots der Microarray- und der Western Blot Auswertungen anhand der 1:4 Verdünnungswerte (Pfeile).

In Abbildung 5-24 C sind die Ergebnisse für den AEC Nachweis gezeigt. Im Unterschied zu den Auswertungen der Haushaltsgene wurde die Detektion nach immunologischer Antikörperreaktion mittels Luminol und Röntgenfilm durchgeführt. Im Vergleich zu den Slides nach CSAII Detektion sehen die Spots nicht so deutlich begrenzt aus. Insgesamt ergibt sich ein mehr „verwaschener“ Eindruck (C links). Die Auswertbarkeit war dadurch aber nicht beeinträchtigt, auch wenn sich insgesamt leicht größere Messwertschwankungen ergaben. Die drei MDA- Lysate in den Feldern A1-A3 zeigten dabei mit dieser Behandlungsmethode keine Signale bei der Reaktion mit AEC, wie mit dieser Zelllinie zu erwarten war. Im Vergleich zu den CSAII-Slides fällt weiterhin auf, dass die Lysate genau die umgekehrte Antikörperaffinität zeigen. Die HSC45-Lysate weisen mit AEC ein deutlich stärkeres Signal auf, als die restlichen Lysate. Diese zeigten umgekehrt bei der Detektion der Haushaltsgene höhere Intensitäten, obwohl nach Gesamtprotein alle in ähnlichen Mengen auf den Protein Arrays aufgetragen waren.

Quantifizierung von E-Cadherin und Vergleich mit den Western Blot Auswertungen

Zur Quantifizierung von E-Cadherin wurden die 1:4 Verdünnungswerte der jeweiligen Lysate zur Berechnung herangezogen, da sich die 1:1 und die 1:2 Verdünnungen teilweise im Sättigungs- und somit nicht im korrelierbaren Bereich befanden (siehe Abbildung 5-24 mitte). Die AEC-Mengen wurden dabei auf die entsprechenden Haushaltsgene bzw. Sypro® Ruby normalisiert. Bei einem idealen Verdünnungsverhalten sollte der Abgleich aller Verdünnungsstufen die gleiche Intensität und damit Menge ergeben. Wie zu erkennen liegen die Werte aber nicht komplett im linearen Bereich, die unverdünnten Proben befinden sich oft schon im Sättigungsbereich der Messung, während sich die 1:16 Verdünnungen nahe oder unter der Nachweisgrenze befinden. Exemplarisch ist dies in Abbildung 5-25 für das Lysat MDA d9 unfix T-Per gezeigt.

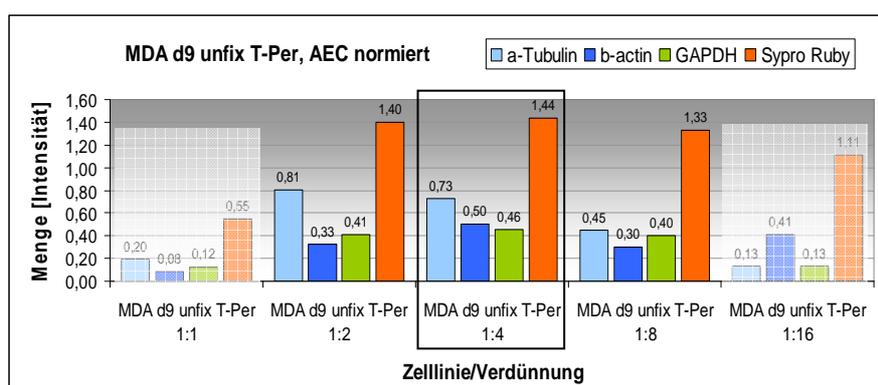


Abbildung 5-25: Vergleich der Normierung von E-Cadherin bei den einzelnen Verdünnungsstufen 1:1 bis 1:16, exemplarisch am Lysat MDA d9 unfix T-Per. Dargestellt sind die Auswertungen nach den Haushaltsgenen α -Tubulin, β -Actin und GAPDH, sowie Gesamtprotein nach Sypro® Ruby (Säulen von links nach rechts). Zur E-Cadherin Quantifizierung wurden folgend die Werte der 1:4 Verdünnungen verwendet.

Es zeigen sich die Effekte wie beschrieben und wie auch aus den Verdünnungskurven auszulesen. Im mittleren Verdünnungsbereich 1:2 bis 1:8 werden annähernd konstante Quantifizierungswerte erreicht. Besonders homogen zeigen sich die Abgleiche nach GAPDH (grün) und nach Sypro® Ruby (orange), welche auch nach den Auswertungen der Western Blots, als verlässlichste Normierungen angesehen werden können. Mit α -Tubulin und β -Actin werden auch noch gute Übereinstimmungen erhalten, die Werte zeigen aber nicht die Konstanz, wie mit GAPDH und Sypro® Ruby. Die Auswertungen nach den 1:1 und den 1:16 Verdünnungen fallen wie erwartet in ihrer Konsistenz gegenüber den mittleren Verdünnungsstufen ab (geweisst rechts und links in Abbildung 5-25). Für Auswertungen gilt es daher die geeignete Verdünnungsstufe zu wählen, bei der sich möglichst alle Werte im linearen Bereich zueinander befinden. Die Auswertung der Protein Arrays wurde bei allen Lysaten nach den 1:4 Verdünnungen durchgeführt. Nach Kontrolle aller Verdünnungswerte und Begutachtung der bisherigen Ergebnisse, lagen hier fast alle Werte in einem sehr gut auswertbaren Signalbereich.

In Abbildung 5-26 A und B rechts sind die Ergebnisse der E-Cadherin Quantifizierung der Protein Arrays dargestellt. Die gezeigten Werte beziehen sich auf die berechneten E-Cadherin Mengen des unfixierten Lysats in T-Per Puffer, welches jeweils auf 1 gesetzt wurde. Die Normierung erfolgte wie zuvor auch über die Haushaltsgene α -Tubulin, β -Actin, GAPDH und über Gesamtprotein nach Sypro® Ruby.

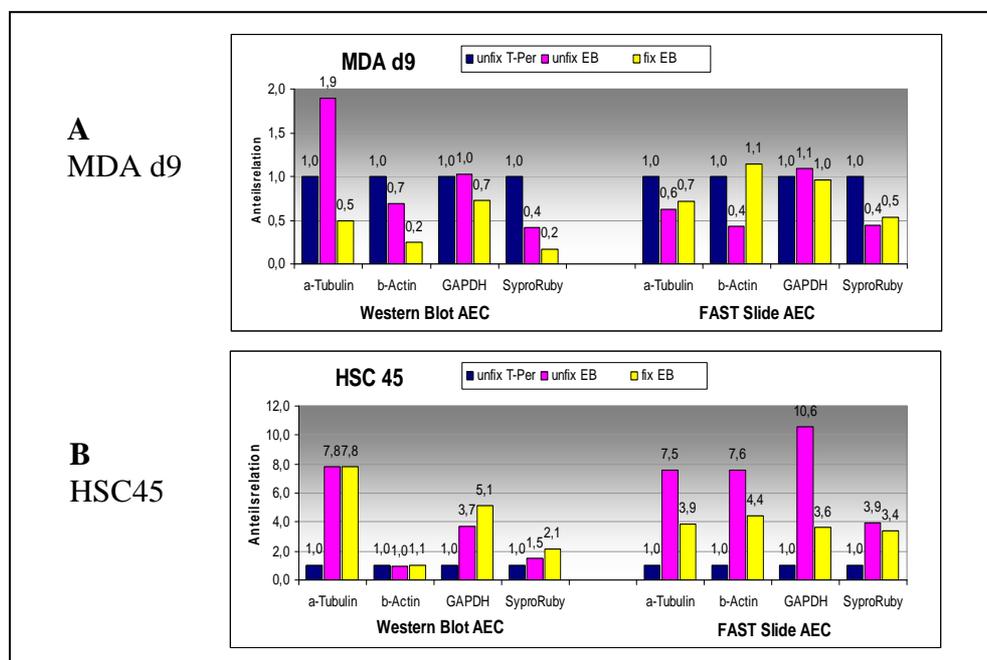


Abbildung 5-26: Quantifizierung der E-Cadherin Mengen (nach AEC) durch Normalisierung auf die aufgeführten Haushaltsgene α -Tubulin, β -Actin und GAPDH bzw. auf Gesamtprotein nach Sypro® Ruby. Zur Berechnung wurden die 1:4 Verdünnungswerte herangezogen. (A) Lysate der Zelllinie MDA d9, links nach Western Blot Auswertung, rechts nach Protein MicroArray Auswertung. (B) Lysate der Zelllinie HSC45, links nach Western Blot Auswertung, rechts nach Protein MicroArray Auswertung. Dargestellt sind die relativen Intensitäten zum Referenzlysat unfix T-Per.

Auf der linken Seite der Grafiken sind den Protein Array Ergebnissen die entsprechenden Western Blot Ergebnisse aus Kapitel 5.6.1.1 gegenübergestellt. In Abbildung 5-26 A sind die Quantifizierungen für die Zelllinie MDA d9 dargestellt. Auch wenn sich die berechneten relativen E-Cadherin Mengen unterscheiden, ist die Tendenz festzustellen, dass beide EB-Lysate eine geringere E-Cadherin Expression zeigen im Vergleich zum unfixierten Lysat in T-Per. Die beiden EB-Lysate liegen dabei nach den Protein Array Daten auf gleichem Niveau. Nur der Abgleich nach b-Actin mit dem fixierten Lysat fällt aus dieser Tendenz heraus. Diese Tendenz ist für MDA d9 unfix EB identisch mit der Western Blot Beurteilung. Das fixierte Lysat zeigte dort aber nochmals eine geringere E-Cadherin Menge im Vergleich zum nicht fixierten in EB. Nach den Ergebnissen der Protein Arrays liegen die Werte auf vergleichbarem Niveau. Auf dem Array zeigen dabei die Auswertungen nach α -Tubulin und Sypro® Ruby die größte Übereinstimmung. Im direkten Vergleich mit den Western Blot Daten werden mit GAPDH und mit Sypro® Ruby die besten Relationen bei beiden Analysemethoden erreicht. In Abbildung 5-26 B sind die entsprechenden Quantifizierungen für die Zelllinie HSC45 dargestellt. Die Tendenzen der Western Blots bestätigen sich ebenfalls mit den Protein Arrays. Beide EB-Lysate zeigen deutlich höhere Werte im Vergleich zum Referenzlysat. Das Lysat der fixierten Zellen (gelb) weist dabei über alle Normalisierungen einen nahezu gleichbleibenden Expressionswert auf. Das unfixierte EB-Lysat zeigt eine starke Erhöhung der E-Cadherinmenge. Aufgrund der sehr niedrigen Signalwerte nach CSAII-Detektion auf den Fast™ Slides müssen diese Quantifizierungsberechnungen vermutlich als zu hoch eingestuft werden. Realistisch sind die Verhältnisse wie bei der Sypro® Ruby Normalisierung zu bewerten. Als konsistenteste Abgleichmethoden können wiederum GAPDH und Sypro® Ruby genannt werden, letztere liefert in Gesamtbetrachtung aller Daten die verlässlichsten Korrelationswerte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Betrachtung der berechneten Intensitätswerte und unter Hinzuziehung der weiteren Ergebnisse, die beiden EB-Lysate (fixiert und unfixiert) annähernd auf einem gleichen Intensitätsniveau liegen. Dies ist prinzipiell das Ergebnis mit den MDA d9 und den HSC 45 Lysaten, wobei die Protein Arrays diese Korrelation deutlicher widerspiegeln. Gemittelt über alle berechneten Einzelintensitäten käme man zu einem ähnlichen Ergebnis. Bei der MDA d9 Zelllinie zeigt sich dabei eine Reduzierung der E-Cadherin Menge im Vergleich zur unfixierten Referenz mit T-Per. Die E-Cadherin Mengen der HSC45 Lysate zeigen dagegen deutlich höhere Werte als das Referenzlysat. Da beide EB-Lysate für die jeweiligen Zelllinien ähnliche Intensitäten zeigen, kann davon ausgegangen werden, dass die stattfindenden chemischen Reaktionen bei der Fixierung in Formalin durch die FFPE-Extraktionsmethode nahezu reversibel sind. Die Abweichungen in den E-Cadherin Mengen zum unfixierten Lysat in T-Per sind entsprechend auf das Extraktionsprotokoll und das Puffersystem zurückzuführen. Dass durch den EB-Puffer und die Präparationsmethode ein etwas anderer Anteil an

Proteinen extrahiert wird ist auch bereits anhand der Bandenmuster bei der Gelfärbungen mit Coomassie und Sypro® Ruby ersichtlich. Eine Auswertung von Proben, die nach der gleichen Methodik behandelt und präpariert wurden ist aber gewährleistet und konnte in den Versuchen auch gezeigt werden. Ebenso konnte die für die FFPE-Extraktion zuverlässigsten Normierungsmethoden mit GAPDH und Sypro® Ruby bestimmt werden.

5.7 Quantifizierung der mutationspezifischen E-Cadherin

Expression von Magenkarzinomen aus klinischem Archivmaterial

Im abschließenden Versuch wurde mittels der Proteinextraktionmethode klinisches Archivmaterial ausgewertet, welches in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet vorlag. Es wurden zwei Fälle von diffusen Magenkarzinomen ausgewählt, die bekanntermassen positiv für die E-Cadherin $\Delta 9$ Mutation waren. In die Begutachtung kamen jeweils Schnitte des Tumorbereichs, sowie des entsprechenden nicht tumorösen Gewebes. Die Tumorbereiche wurden nach vorheriger Begutachtung durch einen Pathologen markiert und per Hand mit einer Kanüle mikrodisssektiert. Die dadurch gewonnenen Probenlysate wurden auf „Reverse Phase“ Protein Microarrays aufgetragen und die $\Delta 9$ Expression nach Normalisierung auf Gesamtprotein nach Sypro® Ruby bestimmt. In Abbildung 5-27 sind die Ergebnisse der beiden getesteten Fälle zusammengefasst. In (A) das untersuchte Gewebe #1 und in (B) der Gewebefall #2. Die angefertigten Dünnschnittpräparate wurden nach der immunhistologischen Färbung mit $\Delta 9$ von einem Pathologen begutachtet (siehe pathologische Klassifizierung in Abbildung 5-27), um diese den Ergebnissen der Arrayauswertungen gegenüber zu stellen. Die extrahierten Gewebelysate wurden auf FAST™ Slides gespottet und es erfolgte ein Nachweis von E-Cadherin $\Delta 9$ sowie das Gesamtprotein nach Sypro® Ruby. Der Tumorschnitt (T) ist nach $\Delta 9$ Antikörperreaktion in beiden untersuchten Fällen deutlich positiv, wohingegen das jeweils nicht veränderte Gewebe (nT) keine positiven Signale mit $\Delta 9$ zeigt. Dies ist sowohl in der immunhistologischen Färbung (Daten nicht gezeigt), als auch auf den „Reverse Phase“ Microarrays zu erkennen (Abbildung 5-27 links unten). Die Signale zeigten damit die erwartete Spezifität für $\Delta 9$. Mit Sypro® Ruby konnte auf den Arrays in allen Fällen ein Signal erzielt werden.

Auf der rechten Seite sind die erhaltenen Mircoarray Daten ausgewertet und grafisch dargestellt. Für die „normalen“ Fälle (nT) liegt der $\Delta 9$ Wert jeweils um Null. Hier ergeben die Auswertungen entsprechend keine darstellbaren Graphen. Einzig die Intensitätswerte von Fall 1 auf den Microarrays mit Sypro® Ruby waren etwas schwach, wiesen aber immer noch eine verlässliche Intensität auf. Rechts oben ist jeweils das Linearitätsverhalten der Verdünnungsreihen gezeigt. Alle Lysate zeigten dabei ein gutes lineares Verhalten. Alle Lysate lagen bei den 1:1 und den 1:2 Verdünnungen im linearen Bereich und waren somit bei diesen Verdünnungen auch miteinander auswertbar. Dies zeigt jeweils auch der Korrelationsplot von Sypro® Ruby und $\Delta 9$ rechts unten in Abbildung 5-27 A und B. Die Absolutwerte der entsprechenden Verdünnung wurden hier gegeneinander aufgetragen. Wie ersichtlich weichen die Einzelwerte kaum von der Korrelationsgeraden ab. Der Abgleich nach Sypro® Ruby sollte somit verlässliche Werte liefern.

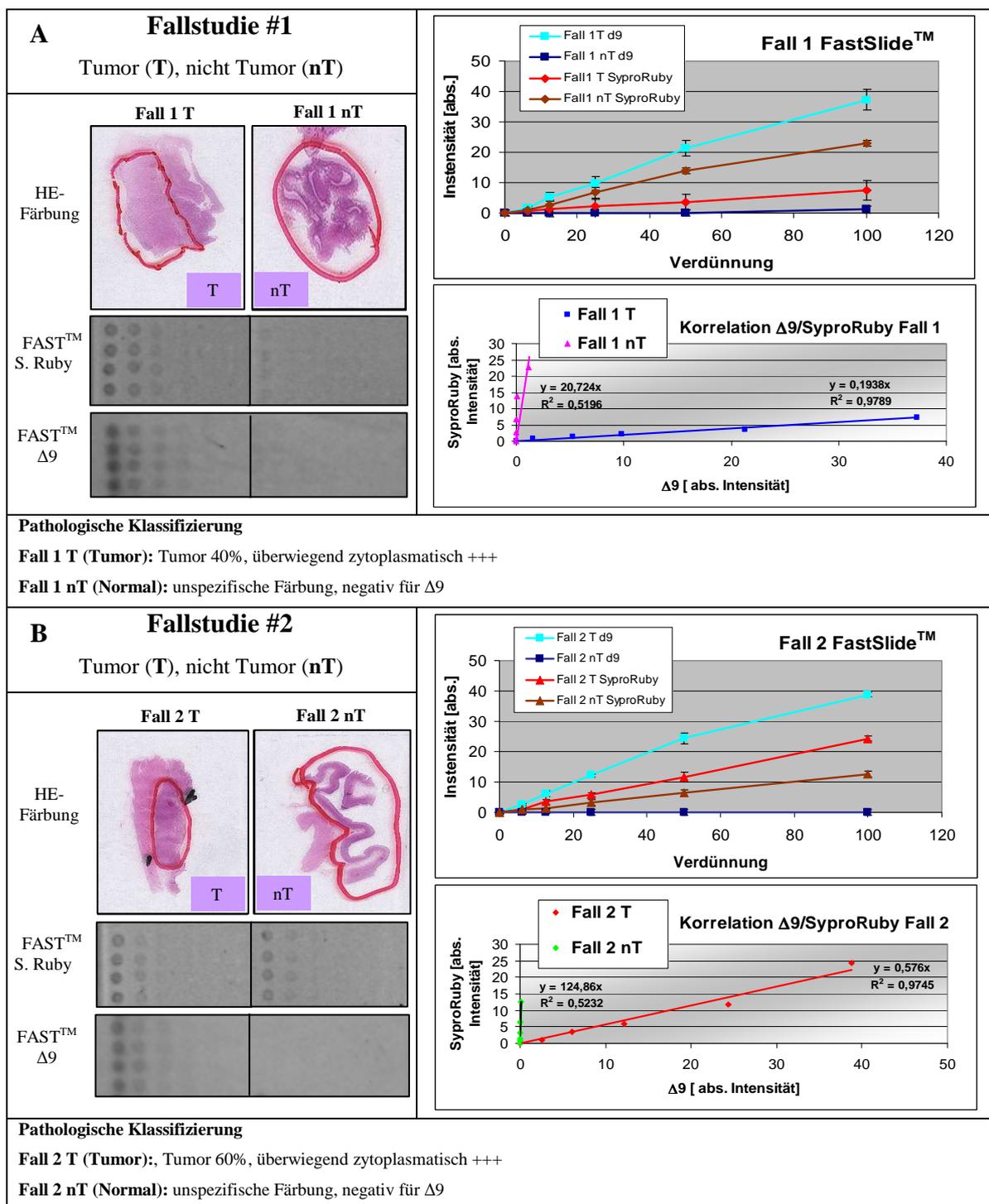


Abbildung 5-27: Magenkarzinom Fallstudien. (A) Fall 1. (B) Fall 2. Dünnschnittpräparate (T) Tumorgewebe, (nT) Normalgewebe. Links sind die HE-Färbungen der Gewebeprobe vor Mikrodissektion dargestellt. Darunter sind die Microarray Signale nach Δ9 (1:50) und Sypro® Ruby Inkubation gezeigt. Das Linearitätsverhalten der Verdünnungsreihen auf den Protein Microarrays nach Sypro® Ruby und Δ9 ist jeweils auf der rechten Seite dargestellt. Oben ist die Verdünnungsreihe grafisch aufgetragen, unten die Korrelation der Absolutwerte von Sypro® Ruby und Δ9 bei den einzelnen Verdünnungsstufen.

Die absoluten Quantifizierungen der Gewebe von Fall 1 und 2 nach der E-Cadherin $\Delta 9$ Mutation sind in Abbildung 5-28 gezeigt. Nach Normierung der gemessenen $\Delta 9$ Intensitäten auf das Gesamtprotein nach Sypro® Ruby beobachtet man einen deutlichen $\Delta 9$ E-Cadherin Anteil im analysierten Tumorgewebe (T), nicht aber in den nicht tumorösen Geweben (nT). Bei Fall 1 wurde ein absoluter Wert von 1,58 errechnet. Bei Fall 2 lag der Wert bei 1,84, also einem leicht höheren E-Cadherin $\Delta 9$ Anteil.

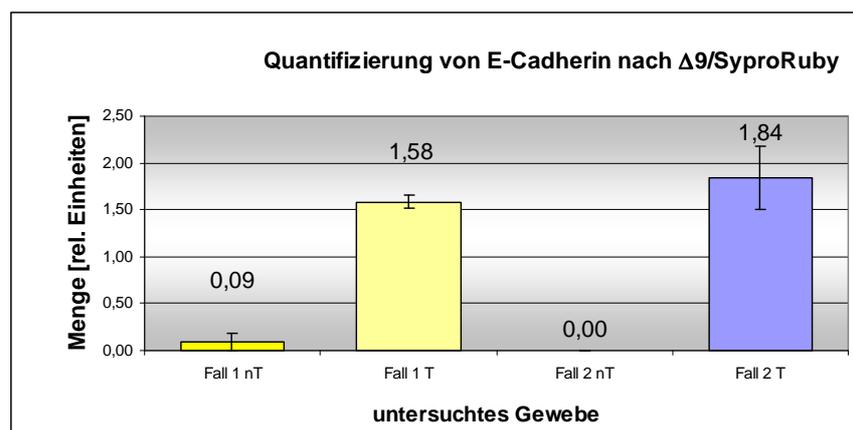


Abbildung 5-28: Quantitative Auswertung von E-Cadherin $\Delta 9$ nach Normierung auf Gesamtprotein nach Sypro® Ruby. Dargestellt sind die beide untersuchten Magenkarzinom Fälle Fall 1 und Fall 2 aus Abbildung 5-27. Aufgeführt ist jeweils der errechnete E-Cadherin $\Delta 9$ Anteil in den „normalen“, nicht tumorösen Gewebeproben (nT) und in den tumorösen Gewebeschnitten (T).

Diese Ergebnisse decken sich ausgesprochen gut mit der pathologischen Beurteilung (siehe Abbildung 5-27, pathologische Bewertung). Für Fall 1 wurde eine Durchmischung von 40% festgestellt, für Fall 2 ein leicht höherer Anteil von 60%. Diese Verhältnisse spiegeln sich somit sehr gut in den errechneten Werten der absoluten Quantifizierung auf den „Reverse Phase“ Protein Microarrays wieder.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Untersuchung erhobenen Daten von sehr guter Qualität waren. Die Ergebnisse der durchgeführten Quantifizierungen konnten in mehreren Ansätzen bestätigt werden und zeigen damit eine hohe Konsistenz und Sicherheit. Auch die Übereinstimmung mit den pathologischen Beurteilungen der immunhistologischen Schnitten ist weitestgehend gegeben, auch wenn die Ergebnisse sich nicht zwangsläufig decken müssen. Die Methodik stellt damit ein robustes Verfahren zur Proteinisolierung aus FFPE Geweben dar und ergänzt die praktizierte immunhistologische Routinbegutachtung mit absoluter Quantifizierbarkeit und somit einer objektiven Bewertungsgrundlage von Markerproteinen.

6 Diskussion

Hochdurchsatztechniken in der funktionellen Genomforschung gewinnen nach Abschluss der Sequenzierung des menschlichen Genoms (Venter et al., 2001; McPherson et al., 2001) immer mehr an Bedeutung. Dabei rücken Proteomanalysen derzeit in den Vordergrund, um Strukturen, Funktionen und Interaktionen von Proteinen und ihre Rolle in Krankheiten aufzuklären (Liotta & Petricoin, 2000). Ein Grund ist die begrenzte Aussagekraft Chip basierter Genexpressionsanalysen, die zum Beispiel keine Informationen über die durch Proteinphosphorylierung gesteuerte Signaltransduktion, posttranslationale Proteinmodifikationen oder Bindungspartner liefern kann (Ge et al., 2003; Williams & Hochstrasser, 1997). Zudem wurde gezeigt, dass eine Korrelation zwischen Gentranskript und Proteinmenge nicht zwangsläufig gegeben ist (Gygi et al., 1999).

Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE) Gewebeproben aus der klinischen Routine werden seit Jahrzehnten für histopathologische Untersuchung verwendet und archiviert. Es steht somit ein großes Archiv an Material zur Verfügung, zu dem darüber hinaus die Diagnose und weitergehend auch der Krankheitsverlauf, Überlebenszeit und Therapie des Patienten dokumentiert sind. Alle diese Informationen sind sehr wertvoll in Kombination mit Expressionsstudien insbesondere zur Detektion von Protein Biomarkern und deren Korrelation mit Erkrankungen, was letztendlich zur Identifikation von neuen Therapieansätzen und diagnostischen Verfahren führen wird. Momentan fehlt es allerdings an Methoden zur Quantifizierung der Proteinexpression in Formalin fixierten Geweben. Die Immunhistochemie ist derzeit die einzige routinemäßig angewandte Methode zur Untersuchung der Proteinexpression und Verteilung in FFPE Geweben. Das Verfahren ist allerdings beschränkt in seiner Sensitivität, Quantifizierbarkeit und Skalierbarkeit.

Ziel der Arbeit war es eine Methode zu entwickeln, um nicht degradierte Proteine aus FFPE Archivgeweben extrahieren und mit etablierten molekularbiologischen Methoden detektieren zu können. Ein wissenschaftliches Interesse an Analysen mit FFPE Materialien war in jüngster Zeit zu beobachten. Aufgrund des weitgehenden Fehlens einer etablierten Methode zur Extraktion und Analyse von gelösten Proteinen aus diesen Geweben, gingen die Entwicklungen in Richtung alternativer Detektionsverfahren, wie dem Peptidnachweis über Massenspektroskopie (Prieto et al., 2005; Hood et al., 2005) und auf alternative Fixierungsmethoden (Ahram et al., 2003; Gillespie et al., 2002). Beides wird in der Routine jedoch nicht angewendet.

Darüber hinaus war das Ziel ein Nachweisverfahren mit „Reverse Phase“ Protein Microarrays (RPPM) zu etablieren, das den Einsatz in Hochdurchsatz „Proteom“ Maßstäben ermöglicht. „Reverse Phase“ Protein Microarrays stellen eine Technologie dar, die in einzigartiger Weise das parallele Screening von verschiedenen Zielproteinen in

mehreren Geweben gleichzeitig ermöglicht. Da Lysatmengen im Nanoliterbereich gespottet werden, können auch kleinste Gewebebiopsien damit analysiert werden. Technologisch grundlegend dazu waren die Arbeiten von Feinberg, 1961 über „Microspot“ Tests von Antigenen und Antikörpern. Seit Entwicklung der „Reverse Phase“ Protein Microarrays als neue Technologie zur Proteom Analyse (Paweletz et al., 2001) wurden damit diverse Untersuchungen zu Protein Signalwege oder Phosphorylierungsstadien in verschiedenen Tumorgeweben durchgeführt. Bei allen Arbeiten musste auf einen begrenzten Pool aus frisch präparierten oder Cryo-konservierten Geweben zurückgegriffen werden (Gulmann et al., 2005, Petricoin et al., 2005, Nishizuka et al., 2003, Wulfskuhle et al., 2003). Die hier beschriebene Methodik hebt diese Beschränkungen auf und eröffnet der RPPM Proteom Analyse ein weites Feld an Probenmaterialien. Die Informationen, die aus der immunhistochemischen Befundung gewonnen werden sind mit der Methode selbstverständlich nicht zu ersetzen, die Beschränkungen in der Quantifizierbarkeit und der Skalierbarkeit können dadurch aber aufgehoben werden.

Methodisch orientierte sich das Verfahren an Ikeda et al., die bereits 1998 ein Verfahren zur Extraktion von cytosolischen, nukleären und Membranproteinen aus Formalin fixiertem Gewebe und deren Detektion in Western Blots beschrieben hat. Basierend auf dessen Ergebnissen wurde ein Extraktionssystem entwickelt, bestehend aus einem speziellen Extraktionspuffer (EB) und einem speziellen Extraktionsprotokoll, mit dem sich nicht degradierte Proteine aus Formalin fixierten Materialien effektiv, robust und in gelöster Form extrahieren lassen. Die Antigendemaskierung (AR) erfolgt durch thermische Behandlung in Kombination mit dem darauf abgestimmten EB Puffer-System. Der Effekt von Hitze auf das Aufbrechen der durch Formalin induzierten Quervernetzung von Proteinen wurde 1991 von Chi et al. für die Immunhistochemie beschrieben. Die Hitzebehandlung stellt heute die populärste AR Methode dar. Sie hat die Sensitivität der Immunhistochemie stark verbessert und wird auch im neu entwickelten Protokoll zur Extraktion von Proteinen aus Formalin fixiertem Material ausgenutzt. Wobei zu erwähnen ist, dass bis dato der genaue Mechanismus der Formalin Fixierung und entsprechend der Antigendemaskierung nicht bekannt ist (Shi et al., 2001; Sompuram et al., 2004). Mit dem vorliegenden Protokoll wurden die durch Formalin verursachten Quervernetzungen der Proteine effektiv aufgebrochen und die Proteine konnten in Lösung gebracht werden. Die extrahierten Proteine werden im Extraktionspuffer stabilisiert und können ohne weitere Aufreinigung oder Behandlung direkt für molekularbiologische Analysen auf Western Blots oder Reverse Phase Protein Microarrays herangezogen werden. In den Kapiteln 5.1 und 5.2 ist die Etablierung der Methode dargestellt. Interessanterweise war der EB Puffer der einzige Puffer, der ohne eine mechanische Zusatzbehandlung zuverlässig Proteine in Lösung bringen konnte. Eine zusätzliche Ultraschallbehandlung kann zu einer generellen Steigerung der Proteinausbeute, insbesondere bei kritischen Proben beitragen. Um einen

großen Probendurchsatz zu gewährleisten, wäre hierzu der Einsatz von Hochenergie Ultraschallbädern zu empfehlen. Der Zusatz des in der Literatur beschriebenen universellen Agens zur Antigendemaskierung, Citraconic Anhydride (Namimatsu et al., 2005), brachte bei allen Untersuchungen nicht die erhoffte Effizienzsteigerung.

Eine Übersicht zu aller in dieser Arbeit präparierten Lysattypen findet sich in Abbildung 5-6. Die aufgetragenen Proteinextrakte sind durch Coomassiefärbung des SDS-Page Gels sichtbar gemacht. Wie bei Ikeda et al. waren distinkte Banden zwischen 15 und 150 kDa zu sehen. Abhängig vom verwendeten Puffer und vom Typ des Probenmaterials waren diese Banden mehr oder weniger gut ausgeprägt, wobei auch das Alter der Proben eine Rolle spielte. Insbesondere zwischen den beiden verwendeten Puffern (T-Per und EB), aber auch zwischen Zellkultur und Gewebe zeigten sich Unterschiede im distinkten Bandenmuster. Dies belegt, dass die Puffer verschiedene Proteine probenspezifisch mit unterschiedlicher Effizienz extrahieren. Eine relative starke Färbung oberhalb von 150 kDa der fixierten Gewebe, die auch durch Aufreinigungsverfahren kaum eliminiert werden konnten, rührt wahrscheinlich von quervernetzten Proteinagglomeraten her, die durch das Extraktionsprotokoll nicht in Lösung gebracht werden konnten. Insbesondere am Übergang von Sammelgel und Trenngel war bei den FFPE Proben oftmals eine starke Färbung mit Coomassie zu erkennen, die nicht weiter ins Gel eingelaufen ist. Auf den dargestellten Coomassie-Gelen ist dieser Bereich nicht zu sehen, da das Sammelgel vorher abgetrennt wurde. Dies spricht für nicht aufgelöste Protein-Agglomerate, die einer Analyse nicht zugänglich sind. Daraus ergibt sich eine weitere Schlussfolgerung, die experimentell auch beobachtet werden konnte. Die Gesamtproteinvermessung nach EZQ zeigte überwiegend höhere Werte, als tatsächlich auf den Gelen vermessen wurde. Die EZQ-Werte wurden daraufhin immer mit einem Faktor nach unten korrigiert.

Die durchschnittlichen Extraktionsmengen (Werte nach EZQ) lagen bei den unfixierten und fixierten Zellkulturen auf ähnlichem Niveau zwischen 1,6 und 2,2 mg Protein/ 10^7 Zellen. Die FFPE Gewebe lagen zwischen 200-900 μg aus $4 \times 10 \mu\text{m}$ Schnitten (abhängig von der dissektierten Materialmenge), Cryo-Gewebe zwischen 400-800 μg aus $2 \times 20 \mu\text{m}$ Schnitten. Dies lag auf vergleichbarem Niveau, wie von Ikeda beschrieben. Nach dem Protokoll von Chu et al., 2005, konnten dagegen nur 10-25 % aus Formalin fixiertem Material gewonnen werden, im Vergleich zu unfixiertem Material. Die Extraktion von intakten Membranproteinen erwies sich mit ihrem Protokoll als schwierig. Die Extraktionsmethode nach Chu ist dem in der Arbeit vorgestellten Verfahren methodisch sehr ähnlich und basiert auf Hitzebehandlung in teilweiser Ergänzung mit Mikrowellen oder Ultraschallbehandlung und einem geeigneten Puffersystem. Interessant an der Methode war die Möglichkeit zur parallelen Extraktion von Proteinen und Nukleinsäuren. Dies wurde hier bislang noch nicht getestet. In den letzten Jahren wurden weitere Arbeiten zum Thema Proteinanalytik aus FFPE Material veröffentlicht, was die aktuelle Relevanz verdeutlicht (Nirmalan et al. 2009; Chung et al., 2008; Shi et al., 2006).

Mit Immunoblots konnten für einen kleinen Satz an Antikörpern nicht degradierte Proteine erfolgreich und mit hoher Signalsicherheit nachgewiesen werden. Darunter waren Antikörper gegen Proteine aller Kompartimente (cytosolisch, nukleär und membranständig) sowie ein phosphorylierungsspezifischer Antikörper (pAMPK α). In Abbildung 5-11 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Am Beispiel von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) konnte Ikeda zeigen, dass die spezifische Bande im Western Blot mit Verdünnung des Lysates abnimmt, die Proteine also in Lösung vorliegen. Auch das konnte hier für alle Probenotypen (Zellkultur FF fixiert und unfixiert sowie Gewebeschnitte FFPE und Cryo) sowie mit allen Nachweissystemen (Western Blot, Dot Blot und Reverse Phase Protein Microarray) gezeigt werden. Wichtig für den Einsatz in Reverse Phase Protein Microarrays ist insbesondere die Antikörperspezifität. Nishizuka et al., 2003 zeigten, dass aus einem Set von >200 Antikörpern nur ca. 70% für die Anwendung in Arrays geeignet waren. Die Untersuchungen wurden an nicht fixierten Zelllinien durchgeführt, bei Übertragung auf FFPE Lysate dürfte eine noch höhere Ausfallquote zu erwarten sein. Die Antikörperverfügbarkeit ist somit als kritischer Faktor zu betrachten. Technologieplattformen wie die HuCal der Morphosys AG in München können hier hilfreich sein (Poetz et al., 2005). Alle verwendeten Antikörper wurden daher vorher auf Ihre Spezifität in Western Blots überprüft. Einzig bei AEC war der Einsatz zunächst fraglich, da neben der spezifischen 120 kDa Bande teilweise eine Vielzahl weiterer prominenter Banden auftraten. Da AEC aber mit Lysaten aus FF MDA- (Abbildung 5-11 A mitte) und FFPE Ishikawa- (Daten nicht gezeigt) keine Reaktion zeigte, konnte nachgewiesen werden, dass die vermeintlich unspezifischen Signale E-Cadherin korreliert sind und keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen darstellen. Bei einer genaueren Betrachtung der AEC Detektionsergebnisse erkennt man in den meisten Fällen 3 zusätzliche Banden unterhalb der spezifischen 120 kDa Bande. Die Größen liegen schätzungsweise bei 100, 90 und 80 kDa (beispielsweise Abbildung 5-3 A). In der Literatur wurden entsprechend verkürzte E-Cadherin Fragmente bereits mehrfach beschrieben. Sie werden posttranslational durch einen spezifischen proteolytischen „Angriff“ generiert und sind mit einer fortschreitenden Metastasierung von Tumoren assoziiert (Wheelock et al., 1987; Vallorosi et al., 2000; Rashid et al., 2001; Kuefer et al., 2003). Es liegt nahe anzunehmen, dass es sich hierbei um diese verkürzten E-Cadherin Fragmente handeln könnte, da diese Banden mit AEC sehr konsistent auftreten. Zwei Tatsachen sprechen dem allerdings entgegen. Die trunkeierten E-Cadherin Varianten sind auf cytosolischer Seite verkürzt, sollten also mit AEC nicht detektiert werden (siehe Epitopbereich in Abbildung 5-11 E). Zudem zeigen die Antikörper HECD und $\Delta 9$ diese Degradationsbanden nicht, was dafür spricht, dass es sich eher um Präparationsartefakte der exponierten Domänen handelt. Die Signale im hochmolekularen Bereich sind eher auf Proteinagglomerate zurückzuführen, die durch die Fixierung entstehen und durch die Extraktionsprozedur nicht aufzulösen sind, wie auch bereits bei der Coomassiefärbung weiter oben beschrieben.

Zur Evaluierung der Zuverlässigkeit, der besten Detektionssysteme und der geeignetsten Proteinabgleichmethoden zur Quantifizierung wurden zunächst Analysen an FF Zellkulturlysaten, sowohl im Western Blot als auch auf dem „Reverse Phase“ Protein Microarray durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Kapitel 5.6 aufgeführt.

Es wurden die Haushaltsgene α -Tubulin, β -Actin und GAPDH sowie E-Cadherin (AEC und $\Delta 9$) immunologisch nachgewiesen. Zudem wurde auf den Western Blot Membranen und auf den „Reverse Phase“ Protein Microarrays die aufgetragene Gesamtproteinmenge durch eine Sypro® Ruby Färbung bestimmt. Alle aufgeführten Proteine konnten detektiert werden. Die Verdünnungsreihen ergaben gut korrelierende Kurvenverläufe, so dass eine Normierung der detektierten E-Cadherin Mengen auf alle Referenzen erfolgen konnte. Ausgewertet wurden die Zellkulturlysate MDA d9 und HSC45, jeweils unfixiert in T-Per Puffer, unfixiert in EB Puffer und fixiert in EB Puffer. Es wurde eine relative Quantifizierung für E-Cadherin durchgeführt, indem das unfixierte Lysat jeweils auf 100% gesetzt wurde. Die Western Blot Auswertungen ergaben für die Zelllinie MDA d9 die Tendenz unfixiert T-Per > unfixiert EB = fixiert EB. Für die Zelllinie HSC45 wurde die genau gegenteilige Tendenz unfixiert T-Per < unfixiert EB < fixiert EB festgestellt. Die Ergebnisse waren nach AEC und $\Delta 9$ nahezu identisch. Die Übereinstimmung der Quantifizierung nach den einzelnen Haushaltsgenen bzw. Sypro®Ruby zeigte deutliche Abweichungen, insbesondere was die absoluten Differenzen der berechneten Werte betraf, die beschriebene Tendenz war aber mit fast allen Referenzproteinen nachzuvollziehen (siehe Abbildung 5-22). Die entsprechenden Auswertungen auf den „Reverse Phase“ Protein Microarrays zeigten mit ähnlicher Konsistenz folgendes Bild für MDA d9: unfixiert T-Per > unfixiert EB = fixiert EB und für HSC45: unfixiert T-Per < unfixiert EB = fixiert EB. Die Western Blot Tendenz T-Per zu EB Puffer wurden durch die Ergebnisse der Protein Arrays somit bestätigt. Die Verhältnisse der beiden EB Lysate, fixiert und unfixiert liegen hier allerdings auf gleichem Niveau (Abbildung 5-26). Die Unterschiede der Western Blot Auswertungen für beide EB Lysate waren jedoch nicht so eindeutig. Je nach Interpretation der Ergebnisse kann auch auf die Array Ergebnisse geschlossen werden. Mittelt man beispielsweise über alle Western Blot Quantifizierungswerte kommt man zu dem gleichen Ergebnis wie mit dem Protein Array.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unfixierten und die fixierten Zellkulturlysate ähnliche Quantifizierungsergebnisse liefern, insofern die Proteinextraktion mit dem gleichen Puffer und dem gleichen Protokoll durchgeführt wird. Dies ist nicht weiter verwunderlich nach den bisherigen Beobachtungen, dass die Puffer-/Extraktionsmethode Proteine unterschiedlich in Lösung zu bringen vermag. Weshalb die EB Puffer Lysate im Vergleich zur unfixierten MDA d9 Zelllinie in T-Per eine geringere E-Cadherin Menge und zur unfixierten HSC45 Zelllinie in T-Per eine höhere E-Cadherin Menge ergeben, muss unbeantwortet bleiben. Die Ergebnisse aller Auswertungen sind in dieser Hinsicht aber eindeutig. Weiterhin korrelieren die Western Blot Ergebnisse gut mit den Array Ergebnissen. Ein gleichwertiger Einsatz der „Reverse Phase“ Protein Microarrays als

Analyseplattform ist damit anzunehmen. Die konsistentesten Ergebnisse wurden jeweils mit GAPDH und Sypro® Ruby erzielt, die folgend zur Quantifizierung benutzt wurden. Insbesondere für die Protein Quantifizierung von Geweben ist es sinnvoll mehrere Referenzproteine zur Normierung parallel zu testen, da die einzelnen Haushaltsgene gewebespezifisch variieren können, wie Ferguson et al., 2005 gezeigt haben. Zudem kommen in Geweben extrazelluläre Proteinanteile vor, sodass ein Abgleich auf die Gesamtproteinmenge immer kritisch zu prüfen ist.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass fixierte und nicht fixierte Proben in der Zellkultur vergleichbare Ergebnisse generieren, sollte untersucht werden, ob dies mit verschiedenen Geweben/Gewebepräparationen ebenfalls der Fall ist.

In der abschließenden Studie in Kapitel 5.7 wurde E-Cadherin in zwei diffusen Magenkarzinomfällen auf reverse Phase Protein Microarrays quantifiziert und mit der immunhistologischen Bewertung in Bezug gesetzt. Es wurde jeweils nicht veränderte mit tumorösen Gewebebereiche verglichen, die epithelialen Areale wurden mikrodisssektiert. Von beiden Fällen war bekannt, dass sie eine Exon 9 Deletion von E-Cadherin aufwiesen. Dies konnte verlässlich mit dem spezifischen $\Delta 9$ Antikörper nachgewiesen werden. Inwieweit die Proteinquantifizierung auf den Protein Microarrays mit der Quantifizierung in der IHC tatsächlich übereinstimmt, kann anhand dieser kleinen Stichprobe nicht wirklich bewertet werden. Hierzu bedarf es weiteren, umfangreicheren Studien. Die Methodik stellt eine Ergänzung zu der vergleichsweise subjektiven Einschätzung der IHC dar und soll diese Limitation aufheben. Es sollte eine gleiche Tendenz der Resultate gegeben sein, eine absolute Übereinstimmung muss aber nicht zwangsläufig vorhanden sein.

Die hier generierten Ergebnisse basieren überwiegend auf der Signaldetektion mit dem CSAII Biotin-free Tyramide Signal Amplification System. Für die Praxisanwendung empfiehlt es sich ein chemilumineszenz basiertes Detektionssystem einzusetzen, da es weitaus flexibler ist, als das CSAII-System (siehe Kapitel 2.2.3 und Kapitel 5.5). Die Signale mit dem CSAII-System sind zwar schärfer, der lineare Detektionsbereich ist allerdings sehr begrenzt. Es bedurfte eines erheblichen Aufwands, die Proben auf den reverse Phase Arrays so aufeinander abzustimmen, dass eine gemeinsame Auswertung möglich war. Das chemilumineszenz basierte System ist durch die Expositionszeit auf dem Röntgenfilm selbst skalierbar, wodurch Schwankungen in den Auftragsmengen in gewissen Grenzen ausgeglichen werden können. Die Vorteile überwiegen dabei den Nachteil von weniger scharfen Signalen des Detektionssystems.

7 **Ausblick**

Proteomanalysen drängen derzeit in den Vordergrund, um Strukturen, Funktionen und Interaktionen von Proteinen und ihre Rolle in Krankheiten aufzuklären. Protein Microarrays stellen dabei ein neues Verfahren zur Proteomanalyse dar und haben großes Potential routinemäßig in der klinischen Forschung und der *in vitro* Diagnostik angewendet zu werden. Die personalisierte Medizin wird in Zukunft eine immer größere Rolle spielen. Dies zeigen auch die aktuellen Anstrengungen der Pharmaindustrie, wie am Beispiel des gegen den HER2 Rezeptor gerichteten monoklonalen Antikörper Trastuzumab bei Brustkrebs (Petricoin et al., 2002). Die Kombination der Expressionsanalyse zu Genom und Proteom, sowie der Histopathologie können zukünftig zu einer ganzheitlichen Diagnose mit individuell angepassten Behandlungsprofilen führen.

Mit dem neuen Extraktionsverfahren können intakte Proteine aus Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Geweben extrahiert werden und mit „klassischen“ molekularbiologischen Verfahren analysiert werden. Damit eröffnet sich eine umfangreiche Bibliothek von klinischen Archivgeweben. Der große Vorteil ist, dass für Proteomanalysen, beispielsweise auf „Reverse Phase“ Protein Microarrays, die gleichen Gewebepräparationen, wie für die histopathologische Diagnose verwendet werden können (Becker et al., 2006). Der Patient und das Klinikpersonal werden dadurch nicht zusätzlich belastet und die Ergebnisse sind direkt miteinander vergleichbar. Mit der Methode ist es möglich auch aus kleinen Gewebemengen, wie Patientenbiopsien, Proteine zu extrahieren. In Kombination mit Mikrodissektionstechniken, wie insbesondere der Lasermikrodissektion (LCM, Emmert-Buck et al., 1996, Becker et al., 1996), können nicht Tumor assoziierte Zellen, extrazelluläre Proteine oder infiltrierende Lymphozyten von der Analyse ausgeschlossen werden und gewährleistet so eine spezifische und akkurate Proteinquantifizierung. Wichtig ist die Weiterentwicklung statistischer Auswertungsverfahren, um die Datensicherheit zu gewährleisten, wobei auf konsolidierte Erfahrungen mit DNA-Microarrays zurückgegriffen werden kann (Liotta et al., 2003; Vitzthum et al., 2005). Mittlerweile sind mehrere Studien erfolgreich auf Basis der entwickelten Methode durchgeführt worden (Becker et al., 2007; Hipp et al.; 2008 Kroll et al., 2008) und sie wird in der Zwischenzeit auch kommerziell vertrieben (Qproteome FFPE Tissue Kit, Qiagen). Die Methode eröffnet ein neues Probenspektrum, ist günstig in der Anwendung, kann im Hochdurchsatzverfahren propagiert werden und sie benötigt nur sehr wenig Patientenmaterial. Beste Voraussetzungen für einen erfolgreichen Einsatz in der Klinik.

8 Literaturverzeichnis

Ahram, M., M. J. Flaig, J. W. Gillespie, P. H. Duray, W. M. Linehan, D. K. Ornstein, S. Niu, Y. Zhao, E. F. Petricoin, 3rd and M. R. Emmert-Buck, 2003. "Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications." *Proteomics* **3**(4): 413-21.

Auerbach, C., M. Moutschen-Dahmen and J. Moutschen, 1977. "Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds." *Mutat Res* **39**(3-4): 317-61.

Bachelder, R. E., S. O. Yoon, C. Franci, A. G. de Herreros and A. M. Mercurio, 2005. "Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition." *J Cell Biol* **168**(1): 29-33.

Bailey, T., L. Biddlestone, N. Shepherd, H. Barr, P. Warner and J. Jankowski, 1998. "Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation." *Am J Pathol* **152**(1): 135-44.

Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida and A. Garcia De Herreros, 2000. "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." *Nat Cell Biol* **2**(2): 84-9.

Becker, K. F., C. Schott, S. Hipp, V. Metzger, P. Porschewski, R. Beck, J. Nahrig, I. Becker and H. Hofler, 2007. "Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis." *J Pathol* **211**(3): 370-8.

Becker, K. F., E. Kremmer, M. Eulitz, I. Becker, G. Handschuh, C. Schuhmacher, W. Muller, H. E. Gabbert, A. Ochiai, S. Hirohashi and H. Hofler, 1999. "Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody." *Am J Pathol* **155**(6): 1803-9.

Becker, K. F., M. J. Atkinson, U. Reich, H. H. Huang, H. Nekarda, J. R. Siewert and H. Hofler, 1993. "Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas." *Hum Mol Genet* **2**(6): 803-4.

Becker, K. F., M. J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, J. R. Siewert and H. Hofler, 1994. "E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas." *Cancer Res* **54**(14): 3845-52.

Becker, I., K. F. Becker, M. H. Rohrl, G. Minkus, K. Schutze and H. Hofler, 1996. "Single-cell mutation analysis of tumors from stained histologic slides." *Lab Invest* **75**(6): 801-7.

Becker, K. F., V. Metzger, S. Hipp and H. Hofler, 2006. "Clinical proteomics: new trends for protein microarrays." *Curr Med Chem* **13**(15): 1831-7.

Berggren, K., T. H. Steinberg, W. M. Lauber, J. A. Carroll, M. F. Lopez, E. Chernokalskaya, L. Zieske, Z. Diwu, R. P. Haugland and W. F. Patton, 1999. "A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports." *Anal Biochem* **276**(2): 129-43.

Berx, G., K. F. Becker, H. Hofler and F. van Roy, 1998. "Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene." *Hum Mutat* **12**(4): 226-37.

Birchmeier, W. and J. Behrens, 1994. "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness." *Biochim Biophys Acta* **1198**(1): 11-26.

Bradford, M. M., 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Campbell, R. J. and M. Pignatelli, 2002. "Molecular histology in the study of solid tumours." *Mol Pathol* **55**(2): 80-2.

Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo and M. A. Nieto, 2000. "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." Nat Cell Biol **2**(2): 76-83.

Cattoretti, G., S. Pileri, C. Parravicini, M. H. Becker, S. Poggi, C. Bifulco, G. Key, L. D'Amato, E. Sabattini, E. Feudale and et al., 1993. "Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections." J Pathol **171**(2): 83-98.

Chan, S. M., J. Ermann, L. Su, C. G. Fathman and P. J. Utz, 2004. "Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways." Nat Med **10**(12): 1390-6.

Chu, W. S., Q. Liang, J. Liu, M. Q. Wei, M. Winters, L. Liotta, G. Sandberg and M. Gong, 2005. "A nondestructive molecule extraction method allowing morphological and molecular analyses using a single tissue section." Lab Invest **85**(11): 1416-28.

Coit, D. G. und M. F. Brennan, 1990. „Gastric neoplasms” in F. G. Moody, L. C. Carey, R. S. Jones, K. A. Kelly, D. L. Nahrwold, D.B. Skinner, eds. Surgical Treatment of Digestive Disease. Year Book Medical Publishers, Chicago.

Comijn, J., G. Berx, P. Vermassen, K. Verschuere, L. van Grunsven, E. Bruyneel, M. Mareel, D. Huylebroeck and F. van Roy, 2001. "The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion." Mol Cell **7**(6): 1267-78.

Dapson, R. W., 1993. "Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments." Biotech Histochem **68**(2): 75-82.

Desai, S., B. Dworecki and E. Cichon, 2001. "Direct immunodetection of antigens within the precast polyacrylamide gel." Anal Biochem **297**(1): 94-8.

Dominguez, D., B. Montserrat-Sentis, A. Virgos-Soler, S. Guaita, J. Grueso, M. Porta, I. Puig, J. Baulida, C. Franci and A. Garcia de Herreros, 2003. "Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor." Mol Cell Biol **23**(14): 5078-89.

Ekins, R. and F. Chu, 1992. "Multianalyte microspot immunoassay. The microanalytical 'compact disk' of the future." Ann Biol Clin (Paris) **50**(5): 337-53.

Ekins, R. P., 1989. "Multi-analyte immunoassay." J Pharm Biomed Anal **7**(2): 155-68.

Ekins, R., F. Chu and E. Biggart, 1990. "Multispot, multianalyte, immunoassay." Ann Biol Clin (Paris) **48**(9): 655-66.

Emmert-Buck, M. R., R. F. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuaqui, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss and L. A. Liotta, 1996. "Laser capture microdissection." Science **274**(5289): 998-1001.

Espina, V., 2005. "Development of the protein microarray technique and usefulness in individualized molecular tumor therapy." Onkologie **28 Suppl 4**: 40-2.

Feinberg, J. G., 1961. "A 'microspot' test for antigens and antibodies." Nature **192**: 985-6.

Ferguson, R. E., H. P. Carroll, A. Harris, E. R. Maher, P. J. Selby and R. E. Banks, 2005. "Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies." Proteomics **5**(2): 566-71.

Fraenkel-Conrat H and H. Olcott, 1948a. "The reaction of formaldehyde with proteins, V: crosslinking between amino and primary amide or guanidyl groups." J Am Chem Soc **70**:2673-2684.

Fraenkel-Conrat H and H. Olcott, 1948b. "Reaction of formaldehyde with proteins, VI: crosslinking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups." J Biol Chem **174**:827-843.

Fraenkel-Conrat H., Brandon B and H. Olcott, 1947. "The reaction of formaldehyde with proteins, IV: participation of indole groups: gramicidin." J Biol Chem **168**:99-118.

- Frixen, U. H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner and W. Birchmeier**, 1991. "E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells." J Cell Biol **113**(1): 173-85.
- Ge, H.**, 2000. "UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions." Nucleic Acids Res **28**(2): e3.
- Ge, H., A. J. Walhout and M. Vidal**, 2003. "Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology." Trends Genet **19**(10): 551-60.
- Gillespie, J. W., C. J. Best, V. E. Bichsel, K. A. Cole, S. F. Greenhut, S. M. Hewitt, M. Ahram, Y. B. Gathright, M. J. Merino, R. L. Strausberg, J. I. Epstein, S. R. Hamilton, G. Gannot, G. V. Baibakova, V. S. Calvert, M. J. Flaig, R. F. Chuaqui, J. C. Herring, J. Pfeifer, E. F. Petricoin, W. M. Linehan, P. H. Duray, G. S. Bova and M. R. Emmert-Buck**, 2002. "Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies." Am J Pathol **160**(2): 449-57.
- Giroldi, L. A., P. P. Bringuier and J. A. Schalken**, 1994. "Defective E-cadherin function in urological cancers: clinical implications and molecular mechanisms." Invasion Metastasis **14**(1-6): 71-81.
- Golini, P., Bianchi, D., Battistel, E., Cesti, P. and R. P. Tassinari**, 1995. "Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeasts: characterization and application in the deamination of cephalosporin C." Enzyme and Microbial Technology, **17**. 324-329.
- Gown A, Wever ND and H. Battifora**, 1993. "Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry." Appl Immunohistochem **1**:256-266.
- Gulmann, C., K. M. Sheehan, E. W. Kay, L. A. Liotta and E. F. Petricoin, 3rd**, 2006. "Array-based proteomics: mapping of protein circuitries for diagnostics, prognostics, and therapy guidance in cancer." J Pathol **208**(5): 595-606.
- Gulmann, C., V. Espina, E. Petricoin, 3rd, D. L. Longo, M. Santi, T. Knutsen, M. Raffeld, E. S. Jaffe, L. A. Liotta and A. L. Feldman**, 2005. "Proteomic analysis of apoptotic pathways reveals prognostic factors in follicular lymphoma." Clin Cancer Res **11**(16): 5847-55.
- Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza and R. Aebersold**, 1999. "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." Mol Cell Biol **19**(3): 1720-30.
- Hanash, S.**, 2003. "Disease proteomics." Nature **422**(6928): 226-32.
- Handschuh, G., S. Candidus, B. Luber, U. Reich, C. Schott, S. Oswald, H. Becke, P. Hutzler, W. Birchmeier, H. Hofler and K. F. Becker**, 1999. "Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility." Oncogene **18**(30): 4301-12.
- Hannah, M. J., U. Weiss and W. B. Huttner**, 1998. "Differential extraction of proteins from paraformaldehyde-fixed cells: lessons from synaptophysin and other membrane proteins." Methods **16**(2): 170-81.
- Hipp, S., A. Walch, T. Schuster, H. Hofler and K. F. Becker**, 2008. "Precise measurement of the E-cadherin repressor Snail in formalin-fixed endometrial carcinoma using protein lysate microarrays." Clin Exp Metastasis.
- Hirohashi, S. and Y. Kanai**, 2003. "Cell adhesion system and human cancer morphogenesis." Cancer Sci **94**(7): 575-81.
- Hirohashi, S.**, 1998. "Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers." Am J Pathol **153**(2): 333-9.
- Holinka, C. F., H. Hata, H. Kuramoto and E. Gurpide**, 1986. "Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line)." Cancer Res **46**(6): 2771-4.

Hood, B. L., M. M. Darfler, T. G. Guiel, B. Furusato, D. A. Lucas, B. R. Ringeisen, I. A. Sesterhenn, T. P. Conrads, T. D. Veenstra and D. B. Krizman, 2005. "Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue." Mol Cell Proteomics **4**(11): 1741-53.

Hopwood, D., 1985. "Cell and tissue fixation, 1972-1982." Histochem J **17**(4): 389-442.

Hyafil, F., C. Babinet and F. Jacob, 1981. "Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium." Cell **26**(3 Pt 1): 447-54.

Ikeda, K., T. Monden, T. Kanoh, M. Tsujie, H. Izawa, A. Haba, T. Ohnishi, M. Sekimoto, N. Tomita, H. Shiozaki and M. Monden, 1998. "Extraction and analysis of diagnostically useful proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections." J Histochem Cytochem **46**(3): 397-403.

Jones MD, Banks PM and BL Caron, 1981. "Transition metal salts as adjuncts to formalin for tissue fixation." Lab Invest **44**:32A

Jonsson, U., L. Fagerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas, B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg and et al., 1991. "Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology." Biotechniques **11**(5): 620-7.

Kawai, K., A. Serizawa, T. Hamana and Y. Tsutsumi, 1994. "Heat-induced antigen retrieval of proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in formalin-fixed, paraffin-embedded sections." Pathol Int **44**(10-11): 759-64.

Klein, P. S. and D. A. Melton, 1996. "A molecular mechanism for the effect of lithium on development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8455-9.

Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O. P. Kallioniemi, 1998. "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med **4**(7): 844-7.

Kroll, J., K. F. Becker, S. Kuphal, R. Hein, F. Hofstadter and A. K. Bosserhoff, 2008. "Isolation of high quality protein samples from punches of formalin fixed and paraffin embedded tissue blocks." Histol Histopathol **23**(4): 391-5.

Kuefer, R., M. D. Hofer, J. E. Gschwend, K. J. Pienta, M. G. Sanda, A. M. Chinnaiyan, M. A. Rubin and M. L. Day, 2003. "The role of an 80 kDa fragment of E-cadherin in the metastatic progression of prostate cancer." Clin Cancer Res **9**(17): 6447-52.

Kukar, T., S. Eckenrode, Y. Gu, W. Lian, M. Megginson, J. X. She and D. Wu, 2002. "Protein microarrays to detect protein-protein interactions using red and green fluorescent proteins." Anal Biochem **306**(1): 50-4.

Kumble, K. D., 2003. "Protein microarrays: new tools for pharmaceutical development." Anal Bioanal Chem **377**(5): 812-9.

Lal, S. P., R. I. Christopherson and C. G. dos Remedios, 2002. "Antibody arrays: an embryonic but rapidly growing technology." Drug Discov Today **7**(18 Suppl): S143-9.

Larue, L., C. Antos, S. Butz, O. Huber, V. Delmas, M. Dominis and R. Kemler, 1996. "A role for cadherins in tissue formation." Development **122**(10): 3185-94.

Lauren, P., 1965. "The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification." Acta Pathol Microbiol Scand **64**: 31-49.

Laux, H., R. Tomer, M. T. Mader, J. Smida, J. Budczies, R. Kappler, H. Hahn, M. Blochinger, U. Schnitzbauer, F. Eckardt-Schupp, H. Hofler and K. F. Becker, 2004. "Tumor-associated E-cadherin mutations do not induce Wnt target gene expression, but affect E-cadherin repressors." Lab Invest **84**(10): 1372-86.

- Lee, H., A. G. Douglas-Jones, J. M. Morgan and B. Jasani**, 2002. "The effect of fixation and processing on the sensitivity of oestrogen receptor assay by immunohistochemistry in breast carcinoma." *J Clin Pathol* **55**(3): 236-8.
- Liotta, L. A., V. Espina, A. I. Mehta, V. Calvert, K. Rosenblatt, D. Geho, P. J. Munson, L. Young, J. Wulfkühle and E. F. Petricoin, 3rd**, 2003. "Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications." *Cancer Cell* **3**(4): 317-25.
- Liotta, L. and E. Petricoin**, 2000. "Molecular profiling of human cancer." *Nat Rev Genet* **1**(1): 48-56.
- Lipponen, P., E. Saarelainen, H. Ji, S. Aaltomaa and K. Syrjänen**, 1994. "Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer." *J Pathol* **174**(2): 101-9.
- Machado, J. C., P. Soares, F. Carneiro, A. Rocha, S. Beck, N. Blin, G. Berx and M. Sobrinho-Simoes**, 1999. "E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas." *Lab Invest* **79**(4): 459-65.
- Madoz-Gurpide, J., H. Wang, D. E. Misek, F. Brichory and S. M. Hanash**, 2001. "Protein based microarrays: a tool for probing the proteome of cancer cells and tissues." *Proteomics* **1**(10): 1279-87.
- Mayer, B., J. P. Johnson, F. Leitzl, K. W. Jauch, M. M. Heiss, F. W. Schildberg, W. Birchmeier and I. Funke**, 1993. "E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration." *Cancer Res* **53**(7): 1690-5.
- McPherson, J. D., M. Marra, et al.**, 2001. "A physical map of the human genome." *Nature* **409**(6822): 934-41.
- Mitchell, P.**, 2002. "A perspective on protein microarrays." *Nat Biotechnol* **20**(3): 225-9.
- Morgan, J. M., H. Navabi, K. W. Schmid and B. Jasani**, 1994. "Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval." *J Pathol* **174**(4): 301-7.
- Nagar, B., M. Overduin, M. Ikura and J. M. Rini**, 1996. "Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization." *Nature* **380**(6572): 360-4.
- Namimatsu, S., M. Ghazizadeh and Y. Sugisaki**, 2005. "Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride and heat: a universal antigen retrieval method." *J Histochem Cytochem* **53**(1): 3-11.
- Nelson, W. J. and R. Nusse**, 2004. "Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways." *Science* **303**(5663): 1483-7.
- Nirmalan, N. J., P. Harnden, P. J. Selby and R. E. Banks**, 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.
- Nishizuka, S., L. Charboneau, L. Young, S. Major, W. C. Reinhold, M. Waltham, H. Kouros-Mehr, K. J. Bussey, J. K. Lee, V. Espina, P. J. Munson, E. Petricoin, 3rd, L. A. Liotta and J. N. Weinstein**, 2003. "Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14229-34.
- Noe, V., E. Chastre, E. Bruyneel, C. Gespach and M. Mareel**, 1999. "Extracellular regulation of cancer invasion: the E-cadherin-catenin and other pathways." *Biochem Soc Symp* **65**: 43-62.
- Norton, A. J., S. Jordan and P. Yeomans**, 1994. "Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues." *J Pathol* **173**(4): 371-9.
- Ornstein, D. K., J. W. Gillespie, C. P. Paweletz, P. H. Duray, J. Herring, C. D. Vocke, S. L. Topalian, D. G. Bostwick, W. M. Linehan, E. F. Petricoin, 3rd and M. R. Emmert-Buck**, 2000. "Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and in vitro prostate cell lines." *Electrophoresis* **21**(11): 2235-42.

- Ozawa, M., J. Engel and R. Kemler**, 1990. "Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function." Cell **63**(5): 1033-8.
- Paweletz, C. P., L. Charboneau, V. E. Bichsel, N. L. Simone, T. Chen, J. W. Gillespie, M. R. Emmert-Buck, M. J. Roth, I. E. Petricoin and L. A. Liotta**, 2001. "Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front." Oncogene **20**(16): 1981-9.
- Pawley, J.B.**, 1995. "Handbook of Biological Confocal Microscopy." Plenum, New York.
- Pertschuk, L. P., Y. D. Kim, C. A. Axiotis, A. S. Braverman, A. C. Carter, K. B. Eisenberg and L. V. Braithwaite**, 1994. "Estrogen receptor immunocytochemistry: the promise and the perils." J Cell Biochem Suppl **19**: 134-7.
- Petricoin, E. F., 3rd, V. E. Bichsel, V. S. Calvert, V. Espina, M. Winters, L. Young, C. Belluco, B. J. Trock, M. Lippman, D. A. Fishman, D. C. Sgroi, P. J. Munson, L. J. Esserman and L. A. Liotta**, 2005. "Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy." J Clin Oncol **23**(15): 3614-21.
- Petricoin, E. F., K. C. Zoon, E. C. Kohn, J. C. Barrett and L. A. Liotta**, 2002. "Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality." Nat Rev Drug Discov **1**(9): 683-95.
- Pfeifer, M.**, 1995. "Cell adhesion and signal transduction: the Armadillo connection." Trends in Cell Biology **5**:224-229.
- Pignatelli, M. and C. J. Vessey**, 1994. "Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology." Hum Pathol **25**(9): 849-56.
- Poetz, O., J. M. Schwenk, S. Kramer, D. Stoll, M. F. Templin and T. O. Joos**, 2005. "Protein microarrays: catching the proteome." Mech Ageing Dev **126**(1): 161-70.
- Pokutta, S., K. Herrenknecht, R. Kemler and J. Engel**, 1994. "Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding." Eur J Biochem **223**(3): 1019-26.
- Pötter, E., Bergwitz, C. and G. Brabant**, 1999. „The Cadherin-Catenin System: Implications for Growth and Differentiation of Endocrine Tissues." Endocr. Ref **20**: 207-239
- Prieto, D. A., B. L. Hood, M. M. Darfler, T. G. Guiel, D. A. Lucas, T. P. Conrads, T. D. Veenstra and D. B. Krizman**, 2005. "Liquid Tissue: proteomic profiling of formalin-fixed tissues." Biotechniques Suppl: 32-5.
- Qproteome FFPE Tissue Kit, Qiagen (Hilden, DE):**
<http://www1.qiagen.com/products/protein/proteomics/Qproteome/QproteomeFFPETissueKit.aspx>
- Rashid, M. G., M. G. Sanda, C. J. Vallorosi, J. Rios-Doria, M. A. Rubin and M. L. Day**, 2001. "Posttranslational truncation and inactivation of human E-cadherin distinguishes prostate cancer from matched normal prostate." Cancer Res **61**(2): 489-92.
- Reynolds, A. B., D. J. Roesel, S. B. Kanner and J. T. Parsons**, 1989. "Transformation-specific tyrosine phosphorylation of a novel cellular protein in chicken cells expressing oncogenic variants of the avian cellular src gene." Mol Cell Biol **9**(2): 629-38.
- Rhodes, A., B. Jasani, A. J. Balaton and K. D. Miller**, 2000. "Immunohistochemical demonstration of oestrogen and progesterone receptors: correlation of standards achieved on in house tumours with that achieved on external quality assessment material in over 150 laboratories from 26 countries." J Clin Pathol **53**(4): 292-301.
- Rosivatz, E., I. Becker, K. Specht, E. Fricke, B. Lubber, R. Busch, H. Hofler and K. F. Becker**, 2002. "Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer." Am J Pathol **161**(5): 1881-91.

- Rosivatz, E., K. F. Becker, E. Kremmer, C. Schott, K. Blechschmidt, H. Hofler and M. Sarbia**, 2006. "Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract." *Virchows Arch* **448**(3): 277-87.
- Sato, Y., K. Mukai, S. Watanabe, M. Goto and Y. Shimosato**, 1986. "The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining." *Am J Pathol* **125**(3): 431-5.
- Shapiro, L., A. M. Fannon, P. D. Kwong, A. Thompson, M. S. Lehmann, G. Grubel, J. F. Legrand, J. Als-Nielsen, D. R. Colman and W. A. Hendrickson**, 1995. "Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins." *Nature* **374**(6520): 327-37.
- Shi S-R, Cote RJ, Young L, Yang C, Chen C, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Hall FL, Taylor CR**, 1995a. "Development of optimal protocols for antigen retrieval immunohistochemistry based on the effects of variation in temperature and pH: use of a "test battery." In Bailey GW, Ellisman MH, Hennigar RA, Zaluzec NJ, eds. *JMSA Proceedings Microscopy and Microanalysis*. New York, Boston, Jones & Begell Publishing, 828-829
- Shi S-R, Gu J, Turrens J, et al.**, 2000. "Development of the antigen retrieval technique: philosophical and theoretical bases." In: Shi S-R, Gu J, Taylor C, eds. *Antigen Retrieval Techniques: Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. Natick, MA: Eaton Publishing: 17-40.
- Shi, S. R., M. E. Key and K. L. Kalra**, 1991. "Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections." *J Histochem Cytochem* **39**(6): 741-8.
- Shi, S. R., R. J. Cote and C. R. Taylor**, 1997. "Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future." *J Histochem Cytochem* **45**(3): 327-43.
- Shi, S. R., R. J. Cote and C. R. Taylor**, 2001. "Antigen retrieval techniques: current perspectives." *J Histochem Cytochem* **49**(8): 931-7.
- Shi, S. R., S. A. Imam, L. Young, R. J. Cote and C. R. Taylor**, 1995b. "Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies." *J Histochem Cytochem* **43**(2): 193-201.
- Shi, S. R., C. Liu, B. M. Balgley, C. Lee and C. R. Taylor**, 2006. "Protein extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections: quality evaluation by mass spectrometry." *J Histochem Cytochem* **54**(6): 739-43.
- Shin, R. W., T. Iwaki, T. Kitamoto and J. Tateishi**, 1991. "Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues." *Lab Invest* **64**(5): 693-702.
- Sommers, C. L., E. W. Thompson, J. A. Torri, R. Kemler, E. P. Gelmann and S. W. Byers**, 1991. "Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities." *Cell Growth Differ* **2**(8): 365-72.
- Sompuram, S. R., K. Vani, E. Messana and S. A. Bogen**, 2004. "A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval." *Am J Clin Pathol* **121**(2): 190-9.
- Speer, R., J. D. Wulfkuhle, L. A. Liotta and E. F. Petricoin, 3rd**, 2005. "Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis." *Curr Opin Mol Ther* **7**(3): 240-5.
- Sreekumar, A., M. K. Nyati, S. Varambally, T. R. Barrette, D. Ghosh, T. S. Lawrence and A. M. Chinnaiyan**, 2001. "Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins." *Cancer Res* **61**(20): 7585-93.
- Stambolic, V., L. Ruel and J. R. Woodgett**, 1996. "Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells." *Curr Biol* **6**(12): 1664-8.

- Suurmeijer, A. J. and M. E. Boon**, 1993. "Notes on the application of microwaves for antigen retrieval in paraffin and plastic tissue sections." Eur J Morphol **31**(1-2): 144-50.
- Takeichi, M.**, 1991. "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science **251**(5000):1451-5.
- Takeo, S., T. Noguchi, S. Fumoto, Y. Kimura, T. Shibata and K. Kawahara**, 2004. "E-cadherin expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: promoter hypermethylation, Snail overexpression, and clinicopathologic implications." Am J Clin Pathol **122**(1): 78-84.
- Taylor CR, Chen C, Shi S-R, Young L, Yang C, Cote RJ**, 1995. "A comparative study of antigen retrieval heating methods." CAP Today **9**:16-22
- Taylor, C. R., S. R. Shi, B. Chaiwun, L. Young, S. A. Imam and R. J. Cote**, 1994. "Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin-paraffin sections: androgen receptor, estrogen receptor, progesterone receptor, p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67 antigen revealed by antigen retrieval techniques." Hum Pathol **25**(3): 263-70.
- Templin, M. F., D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer and T. O. Joos**, 2002. "Protein microarray technology." Trends Biotechnol **20**(4): 160-6.
- Thiery, J. P.**, 2002. "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Valizadeh, A., A. J. Karayiannakis, I. el-Hariry, W. Kmiot and M. Pignatelli**, 1997. "Expression of E-cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120) in colorectal polyps." Am J Pathol **150**(6): 1977-84.
- Vallorosi, C. J., K. C. Day, X. Zhao, M. G. Rashid, M. A. Rubin, K. R. Johnson, M. J. Wheelock and M. L. Day**, 2000. "Truncation of the beta-catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution." J Biol Chem **275**(5): 3328-34.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al.**, 2001. "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Vestweber, D., A. Gossler, K. Boller and R. Kemler**, 1987. "Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos." Dev Biol **124**(2): 451-6.
- Vet, J. A., F. M. Debruyne and J. A. Schalken**, 1994. "Molecular prognostic factors in bladder cancer." World J Urol **12**(2): 84-8.
- Vincek, V., M. Nassiri, M. Nadji and A. R. Morales**, 2003. "A tissue fixative that protects macromolecules (DNA, RNA, and protein) and histomorphology in clinical samples." Lab Invest **83**(10): 1427-35.
- Vitzthum, F., F. Behrens, N. L. Anderson and J. H. Shaw**, 2005. "Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs." J Proteome Res **4**(4): 1086-97.
- von Wasielewski, R., M. Mengel, S. Gignac, L. Wilkens, M. Werner and A. Georgii**, 1997. "Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry." J Histochem Cytochem **45**(11): 1455-9.
- Wei, Q., L. E. Wang, E. M. Sturgis and L. Mao**, 2005. "Expression of nucleotide excision repair proteins in lymphocytes as a marker of susceptibility to squamous cell carcinomas of the head and neck." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(8): 1961-6.
- Werner, M., K.-F. Becker, K. Böttcher, G. Keller, H. Höfler**, 2002. „Magenkarzinom“ in D. Ganten und K. Ruckpaul, eds. Nichthereditäre Tumorerkrankungen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Wheelock, M. J., C. A. Buck, K. B. Bechtol and C. H. Damsky**, 1987. "Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion." J Cell Biochem **34**(3): 187-202.

Williams, K.L. and Hochstrasser, D.F., 1997. "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics." Wilkins MR, Williams KL, Appel RD and Hochstrasser DF (eds). Springer: Berlin, Germany, 1-11.

Wulfschle, J. D., J. A. Aquino, V. S. Calvert, D. A. Fishman, G. Coukos, L. A. Liotta and E. F. Petricoin, 3rd, 2003. "Signal pathway profiling of ovarian cancer from human tissue specimens using reverse-phase protein microarrays." Proteomics **3**(11): 2085-90.

Yamashita, S. and Y. Okada, 2005. "Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: analyses in vitro employing SDS-PAGE and immunohistochemistry." J Histochem Cytochem **53**(1): 13-21.

Yanagihara, K., N. Kamada, M. Tsumuraya and F. Amano, 1993. "Establishment and characterization of a human gastric scirrhous carcinoma cell line in serum-free chemically defined medium." Int J Cancer **54**(2):200-7.

Zhu, H. and M. Snyder, 2003. "Protein chip technology." Curr Opin Chem Biol **7**(1): 55-63.

Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein and M. Snyder, 2001. "Global analysis of protein activities using proteome chips." Science **293**(5537): 2101-5.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abs	Absolutwert
Ad	Auffüllen auf
AR	englisch.: Antigene Retrieval (Antigendemaskierung)
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CCA	Citraconic Anhydride
Cryo	in flüssigem Stickstoff konservierte Gewebeproben
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FF	Formalin fixiert
FFPE	Formalin fixiert und Paraffin eingebettet
fix	fixiert
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HuCAL	Human Combinatorial Antibody Library
IHC	Immunhistochemie
kDa	103 Dalton, Molekulargewichtseinheit
LB	Lämmlipuffer
LiCl	Lithiumchlorid
LOD	Limit of Detection (=2x SD über Hintergrund)
LOH	englisch: Loss of Heterozygosity
mAb	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimum Essential Medium
NaCl	Natriumchlorid
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RPPM	Reverse Phase Protein Arrays
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SybR	Sypro® Ruby
TBS	Tris-Buffered-Saline
TBST	Tris-Buffered-Saline/Tween 20
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
u.a.	unter anderem
ün	über Nacht
unfix	unfixiert
v. v.	vice versa
v/v	Volumen zu Volumen
vergl.	vergleiche
w/v	Gewicht zu Volumen
wt	wildtype = nicht mutierte Variante
Δ8 E-Cad	Exon 8 deletiertes E-Cadherin
Δ9 E-Cad	Exon 9 deletiertes E-Cadherin
APS	Ammoniumpersulfat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase
SD	Standardabweichung
MW	arithmetischer Mittelwert
%CV	Varianzkoeffizient in Prozent

Standardeinheiten sind nach dem internationalen SI-System benannt

10 Anhang

Rohdaten

Western Blots Zellkulturlysate									
Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Mittelwert (korrigiert) [%]	Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Mittelwert (korrigiert) [%]
SyproRuby									
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	66,63	25,09	100,00					
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	55,67	14,13	56,32					
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	47,40	5,86	23,33					
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	41,35	0,00	0,00					
Puffer	0,00	41,54	0,00	0,00					
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	87,50	45,78	100,00					
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	65,77	24,05	52,55					
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	49,42	7,70	16,81					
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	43,74	2,02	4,42					
Puffer	0,00	41,72	0,00	0,00					
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	69,35	28,91	100,00					
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	52,48	12,04	41,64					
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	43,25	2,80	9,70					
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	40,14	0,00	0,00					
Puffer	0,00	40,44	0,00	0,00					
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	89,99	46,11	100,00					
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	72,02	28,15	61,05					
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	56,66	12,78	27,73					
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	47,86	3,99	8,65					
Puffer	0,00	43,87	0,00	0,00					
HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	91,72	48,57	100,00					
HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	65,58	22,44	46,19					
HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	52,39	9,24	19,02					
HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	43,26	0,11	0,23					
Puffer	0,00	43,15	0,00	0,00					
HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	77,25	33,78	100,00					
HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	59,73	16,26	48,14					
HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	46,20	2,74	8,10					
HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	40,91	0,00	0,00					
Puffer	0,00	43,46	0,00	0,00					
AEC					GAPDH				
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	172,12	166,79	100,00	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	105,70	103,42	100,00
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	115,74	110,42	66,20	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	110,62	108,34	104,76
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	67,22	61,89	37,11	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	74,27	71,99	69,61
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	28,34	23,01	13,80	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	62,11	59,83	57,85
Puffer	0,00	5,32	0,00	0,00	Puffer	0,00	2,28	0,00	0,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	104,18	99,05	100,00	MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	83,43	81,28	100,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	84,19	79,06	79,82	MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	78,10	75,95	93,44
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	40,03	34,90	35,24	MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	58,72	56,57	69,60
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	21,54	16,41	16,56	MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	17,36	15,21	18,72
Puffer	0,00	5,13	0,00	0,00	Puffer	0,00	2,15	0,00	0,00
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	70,76	65,53	100,00	MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	64,87	62,69	100,00
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	21,35	16,12	24,60	MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	23,94	21,76	34,71
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	10,91	5,68	8,67	MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	28,06	25,88	41,28
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	8,95	3,72	5,68	MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	3,79	1,62	2,58
Puffer	0,00	5,23	0,00	0,00	Puffer	0,00	2,18	0,00	0,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	96,86	89,33	100,00	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	90,30	86,78	100,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	78,86	71,33	79,85	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	55,74	52,23	60,18
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	40,29	32,76	36,67	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	20,44	16,93	19,50
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	12,77	5,24	5,87	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	5,96	2,45	2,82
Puffer	0,00	7,53	0,00	0,00	Puffer	0,00	3,51	0,00	0,00

Western Blots Zellkulturlysate									
Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Mittelwert (korrigiert) [%]	Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Mittelwert (korrigiert) [%]
β-Actin					α-Tubulin				
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	135,52	133,20	100,00	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	97,86	95,54	100,00
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	111,49	109,17	81,96	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	89,67	87,34	91,42
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	68,68	66,36	49,82	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	48,82	46,50	48,68
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	24,02	21,70	16,29	MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	14,94	12,62	13,20
Puffer	0,00	2,32	0,00	0,00	Puffer	0,00	2,32	0,00	0,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	116,61	114,33	100,00	MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	62,25	59,84	100,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	115,02	112,74	98,61	MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	35,46	33,05	55,23
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	76,04	73,76	64,51	MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	18,11	15,71	26,25
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	33,21	30,92	27,05	MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	5,51	3,11	5,20
Puffer	0,00	2,28	0,00	0,00	Puffer	0,00	2,40	0,00	0,00
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	116,00	113,70	100,00	MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	73,72	71,36	100,00
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	68,00	65,70	57,79	MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	28,15	25,79	36,14
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	39,05	36,75	32,32	MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	18,33	15,98	22,39
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	4,37	2,07	1,82	MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	3,21	0,86	1,20
Puffer	0,00	2,30	0,00	0,00	Puffer	0,00	2,35	0,00	0,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	143,41	141,59	100,00	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	108,38	106,73	100,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	102,71	100,90	71,26	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	90,46	88,81	83,21
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	53,21	51,39	36,29	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	38,81	37,16	34,82
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	10,88	9,07	6,40	HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	12,06	10,41	9,76
Puffer	0,00	1,82	0,00	0,00	Puffer	0,00	1,65	0,00	0,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	125,85	124,11	100,00	HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	36,33	34,57	100,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	124,15	122,42	98,63	HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	15,27	13,51	39,09
HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	65,65	63,91	51,49	HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	4,09	2,33	6,73
HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	26,13	24,40	19,66	HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	3,60	1,84	5,31
Puffer	0,00	1,74	0,00	0,00	Puffer	0,00	1,76	0,00	0,00
HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	123,40	121,56	100,00	HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	47,16	45,52	100,00
HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	119,09	117,26	96,46	HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	15,58	13,94	30,63
HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	83,24	81,41	66,96	HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	5,80	4,16	9,14
HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	5,94	4,10	3,38	HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	2,20	0,56	1,23
Puffer	0,00	1,83	0,00	0,00	Puffer	0,00	1,64	0,00	0,00

Fast™ Slides Zellkulturlysate										
Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Mittelwert [AM]	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Standardabweichung [SD]	Varianz koefizient [%CV]	Mittelwert (korrigiert) [%]
SyproRuby										
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	23,15	23,27	27,90	29,48	25,95	21,59	3,23	14,96	100,00
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	16,15	18,13	17,38	20,06	17,93	13,57	1,64	12,05	62,85
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	10,15	12,67	11,13	12,63	11,65	7,28	1,23	16,85	33,74
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	7,48	7,56	5,81	6,46	6,83	2,46	0,84	34,26	11,40
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	6,25	4,33	4,65	5,69	4,92	4,90	0,53	0,58	109,12	2,47
Puffer	0,00	3,96	4,10	4,15	5,25	4,37	0,00	0,60	0,00	0,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	52,69	59,08	66,15	59,06	59,25	55,44	5,50	9,92	100,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	31,35	34,54	35,87	33,33	33,77	29,97	1,92	6,41	54,05
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	20,17	21,81	22,52	23,40	21,98	18,17	1,37	7,53	32,78
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	13,27	13,46	10,50	11,04	12,07	8,26	1,52	18,36	14,91
MDA d9 unfix EB (Z18)	6,25	6,94	6,63	7,29	5,42	6,57	2,77	0,81	29,30	4,99
Puffer	0,00	3,63	3,63	4,37	3,58	3,80	0,00	0,38	0,00	0,00
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	29,08	26,65	32,23	28,65	29,15	25,01	2,31	9,23	100,00
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	16,87	16,62	16,63	19,46	17,39	13,25	1,38	10,44	52,98
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	11,37	8,71	8,44	9,62	9,53	5,39	1,32	24,50	21,55
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	5,83	5,92	4,12	4,81	5,17	1,02	0,86	84,42	4,09
MDA d9 fix EB (Z20)	6,25	4,40	3,96	3,73	3,87	3,99	0,00	0,29	0,00	0,00
Puffer	0,00	4,81	4,46	3,85	3,46	4,14	0,00	0,60	0,00	0,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	31,87	37,88	29,08	34,46	33,32	29,20	3,75	12,85	100,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	27,88	31,25	32,87	36,37	32,09	27,97	3,52	12,60	95,78
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	18,13	16,88	15,69	19,67	17,60	13,47	1,71	12,67	46,14
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	11,06	12,25	7,83	8,17	9,83	5,70	2,17	38,05	19,53
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	6,25	5,87	7,33	6,69	7,63	6,88	2,75	0,78	28,38	9,44
Puffer	0,00	4,10	4,31	4,37	3,73	4,13	0,00	0,29	0,00	0,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	50,25	60,25	62,96	56,90	57,59	54,25	5,49	10,11	100,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	28,85	27,21	28,87	34,35	29,82	26,47	3,12	11,78	48,80
HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	16,79	16,15	12,94	17,29	15,79	12,45	1,96	15,72	22,95
HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	10,65	9,50	6,69	9,04	8,97	5,63	1,66	29,59	10,37
HSC 45 unfix EB (Z23)	6,25	4,63	4,71	4,81	3,88	4,51	1,16	0,42	36,33	2,14
Puffer	0,00	3,38	3,50	3,42	3,08	3,35	0,00	0,19	0,00	0,00
HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	35,85	40,87	44,60	44,92	41,56	38,15	4,23	11,09	100,00
HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	27,77	33,02	29,98	37,21	32,00	28,59	4,09	14,31	74,93
HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	19,10	21,00	18,56	20,08	19,68	16,27	1,08	6,64	42,66
HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	13,10	12,81	9,25	9,87	11,25	7,85	1,98	25,23	20,57
HSC 45 fix EB (Z25)	6,25	8,35	6,90	7,54	7,40	7,55	4,14	0,60	14,45	10,85
Puffer	0,00	4,15	3,63	2,94	2,90	3,41	0,00	0,60	0,00	0,00

Fast™ Slides Zellkulturlysate											
Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Mittelwert [AM]	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Standardabweichung [SD]	Varianz koeffizient [%CV]	Mittelwert (korrigiert) [%]	
AEC		Verdünnung	1:8000	Blockierung	0,5%casein	Substrat	CSAII				
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	12,28	11,54	11,86	16,46	13,03	11,89	2,31	19,39	100,00	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	15,84	18,98	18,54	26,97	20,08	18,94	4,80	25,32	159,27	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	10,64	12,98	10,33	12,59	11,64	10,49	1,34	12,81	88,24	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	6,25	5,56	2,73	3,12	4,41	3,27	1,75	53,64	27,50	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	6,25	1,77	1,93	1,92	1,34	1,74	0,59	0,28	46,87	5,00	
Puffer	0,00	1,19	1,02	1,21	1,16	1,14	0,00	0,09	0,00	0,00	
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	20,74	23,20	24,86	22,56	22,84	21,80	1,70	7,82	100,00	
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	15,09	16,56	17,22	16,37	16,31	15,27	0,89	5,85	70,05	
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	11,22	11,51	11,34	12,44	11,63	10,59	0,56	5,26	48,57	
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	8,57	8,14	3,77	5,46	6,48	5,45	2,28	41,83	24,98	
MDA d9 unfix EB (Z18)	6,25	3,42	3,38	2,70	2,51	3,00	1,96	0,46	23,60	9,00	
Puffer	0,00	1,17	1,06	0,93	1,00	1,04	0,00	0,10	0,00	0,00	
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	17,72	13,31	11,73	8,16	12,73	11,70	3,96	33,87	100,00	
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	17,58	16,25	10,89	14,14	14,72	13,69	2,92	21,31	116,98	
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	7,64	4,05	3,41	2,67	4,44	3,41	2,20	64,58	29,17	
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	2,28	2,38	1,61	1,51	1,94	0,91	0,45	49,41	7,81	
MDA d9 fix EB (Z20)	6,25	1,32	1,67	1,46	1,45	1,48	0,45	0,15	32,53	3,82	
Puffer	0,00	1,06	0,99	1,04	1,03	1,03	0,00	0,03	0,00	0,00	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	21,72	24,57	19,82	22,72	22,21	21,16	1,98	9,38	100,00	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	15,86	17,60	19,37	21,30	18,53	17,49	2,33	13,34	82,63	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	12,19	10,43	10,06	14,04	11,68	10,64	1,83	17,19	50,26	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	6,41	8,38	3,69	4,85	5,83	4,79	2,03	42,39	22,61	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	6,25	2,56	3,72	3,54	4,20	3,50	2,46	0,69	28,02	11,62	
Puffer	0,00	1,01	1,02	1,02	1,13	1,05	0,00	0,06	0,00	0,00	
HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	12,38	10,38	10,72	11,57	11,26	10,14	0,90	8,85	100,00	
HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	17,54	18,37	17,19	21,91	18,75	17,63	2,16	12,27	173,94	
HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	13,08	8,66	5,14	11,31	9,55	8,42	3,45	40,98	83,12	
HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	12,11	11,54	11,04	10,04	11,18	10,06	0,88	8,71	99,23	
HSC 45 unfix EB (Z23)	6,25	5,22	2,86	5,86	3,73	4,42	3,29	1,37	41,58	32,49	
Puffer	0,00	1,10	1,34	1,04	1,02	1,12	0,00	0,15	0,00	0,00	
HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	25,49	30,82	31,77	34,21	30,57	29,25	3,68	12,57	100,00	
HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	28,83	33,97	32,26	36,30	32,84	31,51	3,14	9,98	107,75	
HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	33,64	34,56	31,81	33,85	33,47	32,14	1,17	3,65	109,90	
HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	30,88	28,78	17,80	17,73	23,80	22,47	7,02	31,23	76,83	
HSC 45 fix EB (Z25)	6,25	13,50	10,91	10,63	8,51	10,89	9,56	2,04	21,38	32,70	
Puffer	0,00	1,27	1,21	1,33	1,50	1,33	0,00	0,13	0,00	0,00	
GAPDH		Verdünnung	1:7500	Blockierung	0,5%casein	Substrat	CSAII				
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	49,36	42,81	51,29	47,19	47,66	45,63	3,64	7,98	100,00	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	16,26	28,20	25,56	24,89	23,73	21,70	5,18	23,87	47,55	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	11,57	12,55	14,72	11,89	12,69	10,65	1,42	13,32	23,35	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	5,58	6,66	6,56	4,45	5,81	3,78	1,03	27,27	8,28	
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	6,25	4,69	4,37	4,13	3,30	4,12	2,09	0,59	28,43	4,58	
Puffer	0,00	1,89	1,97	2,10	2,17	2,03	0,00	0,13	0,00	0,00	
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	44,93	33,90	38,44	37,86	38,78	36,57	4,57	12,49	100,00	
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	11,46	20,30	20,51	19,95	18,05	15,84	4,40	27,80	43,32	
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	12,66	12,77	12,95	13,65	13,01	10,80	0,44	4,11	29,53	
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	9,30	9,28	9,62	7,33	8,88	6,67	1,04	15,65	18,25	
MDA d9 unfix EB (Z18)	6,25	7,48	7,18	7,21	6,49	7,09	4,88	0,42	8,66	13,35	
Puffer	0,00	2,35	2,13	2,22	2,13	2,21	0,00	0,10	0,00	0,00	
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	28,58	22,35	15,89	21,61	22,11	20,40	5,19	25,44	100,00	
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	10,95	9,75	6,87	9,97	9,38	7,67	1,76	22,89	37,61	
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	6,65	6,68	6,36	4,73	6,10	4,39	0,93	21,14	21,54	
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	4,05	3,83	4,47	4,13	4,12	2,41	0,26	10,89	11,81	
MDA d9 fix EB (Z20)	6,25	2,60	3,20	3,28	3,68	3,19	1,48	0,45	30,12	7,25	
Puffer	0,00	1,60	1,68	1,87	1,69	1,71	0,00	0,11	0,00	0,00	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	26,26	32,10	28,30	45,19	32,96	30,76	8,50	27,64	100,00	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	12,04	13,14	7,94	10,64	10,94	8,74	2,24	25,66	28,41	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	8,37	9,47	7,33	7,07	8,06	5,86	1,09	18,67	19,05	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	8,00	6,41	6,78	7,67	7,22	5,02	0,74	14,81	16,31	
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	6,25	5,32	5,97	4,29	5,53	5,28	3,08	0,71	23,03	10,00	
Puffer	0,00	2,60	2,36	1,92	1,92	2,20	0,00	0,33	0,00	0,00	
HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	14,67	10,89	8,33	5,24	9,78	7,80	3,99	51,21	100,00	
HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	6,08	5,84	5,27	3,55	5,18	3,20	1,14	35,57	41,05	
HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	4,83	4,27	3,89	2,99	4,00	2,01	0,77	38,24	25,82	
HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	3,86	3,76	4,12	2,73	3,62	1,63	0,61	37,52	20,96	
HSC 45 unfix EB (Z23)	6,25	3,68	3,44	3,51	3,51	3,53	1,55	0,10	6,71	19,92	
Puffer	0,00	1,96	2,06	1,83	2,07	1,98	0,00	0,11	0,00	0,00	
HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	45,48	19,07	16,70	16,88	24,53	22,56	14,01	62,08	100,00	
HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	10,63	8,66	12,80	11,63	10,93	8,96	1,75	19,56	39,72	
HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	7,03	8,61	9,40	9,34	8,59	6,62	1,10	16,67	29,36	
HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	7,64	8,18	7,90	8,35	8,02	6,05	0,31	5,19	26,81	
HSC 45 fix EB (Z25)	6,25	5,50	6,36	6,19	5,82	5,97	4,00	0,38	9,59	17,73	
Puffer	0,00	1,91	1,93	2,05	1,98	1,97	0,00	0,06	0,00	0,00	

Fast™ Slides Zellkulturlysate										
Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Mittelwert [AM]	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Standardabweichung [SD]	Varianz koeffizient [%CV]	Mittelwert (korrigiert) [%]
β-Actin		Verdünnung	t5000	Blockierung	0,5%casein	Substrat	CSAII			
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	58,23	39,97	43,14	45,67	46,75	44,07	8,00	18,15	100,00
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	24,73	22,21	20,36	14,19	20,37	17,69	4,49	25,40	40,14
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	9,94	9,88	9,34	7,27	9,11	6,43	1,25	19,49	14,58
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	7,97	6,84	5,11	3,92	5,96	3,28	1,80	54,71	7,45
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	6,25	3,52	3,60	2,99	2,39	3,12	0,45	0,56	125,47	1,01
Puffer	0,00	2,43	3,81	2,42	2,05	2,68	0,00	0,77	0,00	0,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	62,14	60,84	61,70	61,23	61,48	58,77	0,56	0,96	100,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	34,99	34,16	33,35	24,35	31,71	29,00	4,95	17,07	49,35
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	18,80	19,94	19,44	18,38	19,14	16,43	0,69	4,19	27,96
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	16,67	17,01	12,16	8,63	13,62	10,91	3,99	36,61	18,57
MDA d9 unfix EB (Z18)	6,25	9,34	10,65	9,17	7,46	9,15	6,45	1,31	20,28	10,97
Puffer	0,00	2,72	2,92	2,60	2,59	2,71	0,00	0,16	0,00	0,00
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	18,48	7,13	5,46	4,80	8,97	6,51	6,41	98,53	100,00
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	8,64	5,29	3,85	4,44	5,56	3,10	2,14	69,09	47,59
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	6,21	4,41	4,03	4,04	4,67	2,22	1,04	47,08	34,03
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	4,43	4,02	3,45	4,33	4,06	1,60	0,44	27,72	24,58
MDA d9 fix EB (Z20)	6,25	2,79	2,60	2,40	3,19	2,75	0,29	0,34	117,87	4,43
Puffer	0,00	2,00	2,49	2,35	2,99	2,46	0,00	0,41	0,00	0,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	45,92	42,42	28,25	38,39	38,74	35,04	7,64	21,82	100,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	16,03	17,44	13,53	15,04	15,51	11,81	1,65	13,97	33,70
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	14,87	11,23	8,76	9,76	11,15	7,45	2,68	35,92	21,26
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	10,76	7,83	7,17	7,54	8,33	4,62	1,64	35,55	13,20
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	6,25	6,67	6,09	5,34	7,35	6,36	2,66	0,85	32,03	7,59
Puffer	0,00	2,49	2,63	3,70	5,99	3,70	0,00	1,62	0,00	0,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	33,06	38,43	44,12	13,68*	28,90	26,60	5,53	20,80	100,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	15,04	12,47	14,29	4,63*	10,45	8,15	1,32	16,25	30,63
HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	6,97	5,62	5,72	5,22	5,88	3,58	0,75	21,08	13,46
HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	5,01	5,07	4,52	3,06	4,42	2,11	0,94	44,44	7,95
HSC 45 unfix EB (Z23)	6,25	3,75	3,02	3,63	2,38	3,19	0,89	0,63	70,89	3,35
Puffer	0,00	2,04	2,53	2,62	2,02	2,30	0,00	0,32	0,00	0,00
HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	43,91*	14,47	15,01	13,86	10,84	8,67	0,57	6,62	100,00
HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	19,28	21,35	11,04	8,04	14,93	12,76	6,40	50,14	147,25
HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	11,35	8,98	8,92	7,32	9,14	6,97	1,66	23,76	80,46
HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	11,10	7,15	5,62	4,60	7,12	4,95	2,86	57,73	57,08
HSC 45 fix EB (Z25)	6,25	5,73	5,31	4,45	4,01	4,88	2,71	0,79	29,05	31,22
Puffer	0,00	2,42	2,50	1,97	1,79	2,17	0,00	0,34	0,00	0,00
α-Tubulin		Verdünnung	t5000	Blockierung	0,5%casein	Substrat	CSAII			
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	100,00	48,94	41,27	45,08	36,98	43,07	40,08	5,13	12,79	100,00
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	50,00	21,47	16,56	19,18	16,90	18,53	15,54	2,28	14,67	38,77
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	25,00	14,79	12,01	12,58	10,59	12,49	9,51	1,74	18,34	23,72
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	12,50	8,49	7,45	8,32	6,86	7,78	4,79	0,76	15,93	11,96
MDA d9 unfix T-Per (Z16)	6,25	5,69	6,79	5,79	5,71	6,00	3,01	0,53	17,59	7,51
Puffer	0,00	2,50	3,24	3,63	2,59	2,99	0,00	0,54	0,00	0,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	100,00	38,43	32,73	39,30	33,49	35,99	33,17	3,36	10,12	100,00
MDA d9 unfix EB (Z18)	50,00	26,08	18,98	30,00	27,20	25,56	22,75	4,69	20,62	68,58
MDA d9 unfix EB (Z18)	25,00	19,34	18,36	20,71	19,85	19,57	16,75	0,98	5,86	50,50
MDA d9 unfix EB (Z18)	12,50	14,06	8,98	12,67	9,44	11,29	8,47	2,47	29,16	25,54
MDA d9 unfix EB (Z18)	6,25	9,21	9,77	7,01	9,06	8,76	5,95	1,21	20,33	17,93
Puffer	0,00	3,31	2,80	2,44	2,72	2,82	0,00	0,36	0,00	0,00
MDA d9 fix EB (Z20)	100,00	11,42	14,97	12,17	12,88	12,86	10,37	1,53	14,73	100,00
MDA d9 fix EB (Z20)	50,00	14,45	10,81	10,84	8,39	11,12	8,63	2,49	28,90	83,24
MDA d9 fix EB (Z20)	25,00	8,99	7,47	7,93	6,73	7,78	5,29	0,95	17,88	51,00
MDA d9 fix EB (Z20)	12,50	5,98	5,61	5,48	5,99	5,76	3,27	0,26	7,93	31,55
MDA d9 fix EB (Z20)	6,25	4,16	4,61	3,85	4,24	4,22	1,72	0,31	18,17	16,61
Puffer	0,00	2,28	2,59	2,49	2,62	2,49	0,00	0,15	0,00	0,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	100,00	38,76	49,82	49,94	67,60	51,53	48,78	11,93	24,45	100,00
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	50,00	26,90	23,08	21,88	19,80	22,91	20,17	2,98	14,79	41,34
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	25,00	18,40	15,79	15,85	14,51	16,14	13,39	1,63	12,15	27,45
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	12,50	8,64	10,06	10,12	10,56	9,85	7,10	0,83	11,72	14,55
HSC 45 unfix T-Per (Z21)	6,25	5,76	7,24	4,87	5,70	5,89	3,15	0,99	31,40	6,45
Puffer	0,00	2,70	2,60	2,74	2,94	2,75	0,00	0,14	0,00	0,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	100,00	18,47	16,64	12,93	10,19	14,56	12,11	3,71	30,66	100,00
HSC 45 unfix EB (Z23)	50,00	11,10	7,86	8,79	7,12	8,72	6,27	1,73	27,58	51,77
HSC 45 unfix EB (Z23)	25,00	9,40	9,38	8,55	8,26	8,90	6,45	0,58	8,97	53,28
HSC 45 unfix EB (Z23)	12,50	5,57	6,90	8,55	7,88	7,22	4,78	1,29	27,07	39,46
HSC 45 unfix EB (Z23)	6,25	4,94	7,02	4,61	5,87	5,61	3,16	1,08	34,11	26,11
Puffer	0,00	2,49	2,50	2,50	2,29	2,44	0,00	0,10	0,00	0,00
HSC 45 fix EB (Z25)	100,00	35,97	34,42	21,41	29,12	30,23	26,78	6,57	24,54	100,00
HSC 45 fix EB (Z25)	50,00	23,09	17,51	23,47	20,38	21,11	17,67	2,77	15,67	65,96
HSC 45 fix EB (Z25)	25,00	17,16	18,90	17,66	17,03	17,69	14,24	0,86	6,00	53,18
HSC 45 fix EB (Z25)	12,50	10,66	8,67	11,51	7,13	9,49	6,05	1,97	32,65	22,58
HSC 45 fix EB (Z25)	6,25	7,14	9,13	6,80	7,12	7,55	4,10	1,07	25,97	15,31
Puffer	0,00	3,59	3,63	3,13	3,43	3,45	0,00	0,23	0,00	0,00

Magenkarzinom Fall 1										
Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Mittelwert [AM]	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Standardabweichung [SD]	Varianz koeffizient [%CV]	Mittelwert (korrigiert) [%]
A9										
IV C 3S T (T7)	100,00	37,68	40,71	45,33	45,33	42,26	37,24	3,25	8,73	100,00
IV C 3S T (T7)	50,00	21,88	26,66	28,61	28,02	26,29	21,27	2,64	12,43	57,12
IV C 3S T (T7)	25,00	11,31	14,53	16,79	16,61	14,81	9,79	2,21	22,57	26,28
IV C 3S T (T7)	12,50	8,76	9,51	12,53	10,36	10,29	5,27	1,41	26,84	14,14
IV C 3S T (T7)	6,25	6,96	7,36	6,41	5,64	6,59	1,57	0,65	41,20	4,22
Puffer	0,00	4,53	4,98	6,58	3,99	5,02	0,00	0,97	0,00	0,00
V 3S/1 nT (T1)	100,00	7,11	9,19	8,75	6,87	7,98	1,15	1,00	87,15	100,00
V 3S/1 nT (T1)	50,00	5,81	8,46	7,02	6,43	6,93	0,10	0,98	975,80	8,75
V 3S/1 nT (T1)	25,00	2,79	5,01	7,69	6,61	5,52	0,00	1,84	0,00	0,00
V 3S/1 nT (T1)	12,50	2,74	3,98	5,42	6,56	4,68	0,00	1,44	0,00	0,00
V 3S/1 nT (T1)	6,25	6,44	4,00	5,23	4,53	5,05	0,00	0,91	0,00	0,00
Puffer	0,00	8,00	5,37	7,39	6,56	6,83	0,00	0,99	0,00	0,00
SyproRuby										
IV C 3S T (T7)	100,00	26,73	28,87	29,58	30,13	28,83	22,83	1,29	5,66	100,00
IV C 3S T (T7)	50,00	18,63	19,75	20,92	20,17	19,87	13,87	0,83	5,97	60,76
IV C 3S T (T7)	25,00	12,83	12,02	12,69	13,19	12,68	6,68	0,42	6,35	29,28
IV C 3S T (T7)	12,50	7,85	8,81	8,65	9,13	8,61	2,61	0,47	18,17	11,44
IV C 3S T (T7)	6,25	7,75	7,42	5,96	6,29	6,86	0,86	0,75	87,50	3,75
Puffer	0,00	6,38	5,17	5,92	6,52	6,00	0,00	0,53	0,00	0,00
V 3S/1 nT (T1)	100,00	12,81	12,94	12,08	11,46	12,32	7,40	0,60	8,05	100,00
V 3S/1 nT (T1)	50,00	8,98	8,73	7,65	8,46	8,46	3,54	0,50	14,09	47,79
V 3S/1 nT (T1)	25,00	8,35	7,42	6,15	6,69	7,15	2,24	0,82	36,80	30,19
V 3S/1 nT (T1)	12,50	6,21	6,69	5,92	6,08	6,23	1,31	0,29	22,02	17,66
V 3S/1 nT (T1)	6,25	5,50	5,67	5,33	6,12	5,65	0,74	0,29	39,86	9,94
Puffer	0,00	4,85	3,54	5,46	5,83	4,92	0,00	0,87	0,00	0,00
Magenkarzinom Fall 2										
Lysat	Verdünnung [x:100]	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Mittelwert [AM]	Mittelwert (Puffer korrigiert)	Standardabweichung [SD]	Varianz koeffizient [%CV]	Mittelwert (korrigiert) [%]
A9										
III B 3S T (T16)	100,00	44,07	42,00	43,62	42,42	43,03	38,82	0,84	2,18	100,00
III B 3S T (T16)	50,00	26,48	28,03	31,06	28,66	28,56	24,36	1,65	6,76	62,73
III B 3S T (T16)	25,00	17,21	16,40	16,13	15,65	16,35	12,15	0,56	4,65	31,28
III B 3S T (T16)	12,50	8,81	10,36	10,59	11,40	10,29	6,08	0,94	15,41	15,67
III B 3S T (T16)	6,25	6,67	6,98	6,29	7,00	6,74	2,53	0,29	11,41	6,53
Puffer	0,00	3,82	4,74	3,69	4,55	4,20	0,00	0,45	0,00	0,00
III L 3S nT (T22)	100,00	5,40	3,31	3,19	5,16	4,26	0,00	1,02	0,00	nb
III L 3S nT (T22)	50,00	6,53	4,82	4,09	3,69	4,78	0,00	1,09	0,00	nb
III L 3S nT (T22)	25,00	4,25	6,21	5,72	4,32	5,12	0,00	0,86	0,00	nb
III L 3S nT (T22)	12,50	4,81	4,54	5,11	5,04	4,87	0,00	0,22	0,00	nb
III L 3S nT (T22)	6,25	6,92	6,68	6,49	4,93	6,25	0,00	0,78	0,00	nb
Puffer	0,00	7,12	8,49	9,02	8,61	8,31	0,00	0,72	0,00	nb
SyproRuby										
III B 3S T (T16)	100,00	28,35	27,00	29,79	29,31	28,61	24,25	1,07	4,39	100,00
III B 3S T (T16)	50,00	14,77	16,04	16,85	16,60	16,06	11,70	0,80	6,86	48,25
III B 3S T (T16)	25,00	11,08	10,10	10,02	9,40	10,15	5,78	0,60	10,36	23,85
III B 3S T (T16)	12,50	8,63	8,10	7,46	6,87	7,76	3,40	0,66	19,56	14,02
III B 3S T (T16)	6,25	6,17	4,81	5,44	5,40	5,46	1,09	0,48	44,36	4,50
Puffer	0,00	4,60	3,40	4,90	4,56	4,37	0,00	0,57	0,00	0,00
III L 3S nT (T22)	100,00	18,38	17,27	19,52	19,69	18,72	12,49	0,97	7,81	100,00
III L 3S nT (T22)	50,00	11,44	11,79	13,42	13,58	12,56	6,33	0,95	15,04	50,67
III L 3S nT (T22)	25,00	8,67	8,79	9,50	10,96	9,48	3,25	0,91	28,05	26,03
III L 3S nT (T22)	12,50	6,44	7,15	8,12	8,10	7,45	1,22	0,70	57,37	9,78
III L 3S nT (T22)	6,25	7,06	7,37	6,63	7,62	7,17	0,94	0,37	39,04	7,51
Puffer	0,00	6,15	5,50	6,48	6,79	6,23	0,00	0,48	0,00	0,00

* Werte wurden nicht zur Berechnung herangezogen

nb nicht berechenbar

11 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker für die tatkräftige Unterstützung und kompetente Begleitung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Groll gilt mein Dank für die offizielle Betreuung der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Heinz Höfler möchte ich für die Möglichkeit danken, die Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Ich danke insbesondere Michaele Blöchinger und Christina Schott für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Frauke Neff danke ich für die pathologischen Bewertungen.

Meinen Kollegen Erika Rosiwatz, Catarina Alves, Rita Mateus, Daniela Angermeier und Susanne Hipp einen herzlichen Dank, für all die fachlichen und menschlichen Hilfen und schönen Dinge, die wir zusammen erlebt haben.

Insbesondere gilt ein großes Lob meinen direkten Bürogenossen mich jahrelang ertragen zu haben. Holger Laux für lange, lustige Diskussionen und dem uns gemeinsamen Chaos. Susi Pielhofer und Kareen Blechschmid für die kreative Kurzweile, die sich in vielen gemeinsamen Werken manifestiert hat und für jegliche Unterstützung, fachlicher und privater Art. Es war eine Bereicherung bei euch gewesen zu sein.

Herzlichen Dank geht an alle nicht namentlich genannten Kollegen am Institut, die mich mit Ihrem Interesse, ihrer Hilfe und Ihrer Kollegialität auf eine schöne Zeit im Institut zurückblicken lassen.

Zuletzt danke ich meiner ganzen Familie und meinen Freunden, die mir über alle Hürden hinweg geholfen haben und mir in schönen sowie schweren Zeiten mit unerschütterlichem Vertrauen stets zur Seite standen.

12 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Volker Metzger
 geboren am 01/07/1972 in Bad Dürkheim
 deutsche Staatsangehörigkeit

Erwerbstätigkeit

01/2007 – 08/2010 Scientific Sales Manager, GENEART AG, Regensburg

Hochschulausbildung

04/2003 – 09/2006 Promotion bei Prof. Dr. Karl-Friedrich Becker am
 Institut für Pathologie der Technischen Universität
 München
*„Methodische Entwicklung eines standardisierten Verfahrens
 zur quantitativen Proteomanalyse aus Formalin fixierten
 Geweben und dessen Einsatz in Protein Microarrays“*

08/2001 - 08/2002 Diplomarbeit bei Roche Diagnostics, Penzberg
*„Stabilitätsanalyse und Optimierung von PCR-generierten
 Templates für die zellfreie Proteinexpression“*

11/2000 - 05/2001 Studienarbeit am Fraunhofer Institut für Grenzflächen-
 und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart
*„Charakterisierung von hyphenspezifisch exprimierten
 Proteinen in Candida albicans“*

10/1995 - 08/2002 Studium der technischen Biologie an der Universität
 Stuttgart mit dem Abschluss Diplom-Biologe technisch
 orientiert (t.o.)

10/1994 - 09/1995 Studium der Verfahrenstechnik (Dipl.) an der Universität
 Stuttgart

Zivildienst

07/1993 – 09/1994 Evangelisches Krankenhaus Hochstift in Worms/Rhein

Schulbildung

09/1983 – 06/1993 Werner Heisenberg Gymnasium in Bad Dürkheim mit
 dem Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

08/1979 – 08/1983 Grundschule in Freinsheim

Publikationen

Becker, K. F., V. Metzger, S. Hipp and H. Höfler, 2006. "Clinical proteomics: new trends for protein microarrays." Curr Med Chem **13**(15): 1831-7.

Becker, K. F., C. Schott, S. Hipp, V. Metzger, P. Porschewski, R. Beck, J. Nahrig, I. Becker and H. Höfler, 2007. "Quantitative protein analysis from formalin-fixed tissues: implications for translational clinical research and nanoscale molecular diagnosis." J Pathol **211**(3): 370-8.

Poster

Quantitative Proteinanalyse von Formalin fixierten Geweben

V. Metzger, C. Schott, S. Hipp, H. Höfler, K.-F. Becker

Institut für Pathologie, Technische Universität München

90. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V., Berlin

Proteomic analysis of formalin fixed cancer tissues using protein microarrays

K.-F. Becker, S. Hipp, V. Metzger, H. Höfler

Institut für Pathologie, Technische Universität München.

27. Deutscher Krebskongress, Berlin