

**Mikroarray-basierende Proteomanalyse zur  
Detektion tumorspezifischer  
Markerproteine in Nierenzellkarzinomen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

**Stefan Kramer**



Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2006

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Schwarz



## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintrisphosphat
AU	Willkürliche Einheiten ( <i>Arbitrary Units</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CCA	Colonkarzinom ( <i>Colon Carcinoma</i> )
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
CHAPS	(3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfat)
Cy5	Cyanpolymethinfarbstoff 5
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektrometrie
Fab	Antigenbindendes Antikörperfragment ( <i>Fragment Antigen Binding</i> )
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	Kristallisierbares Fragment ( <i>Fragment Crystallisation</i> )
GB	Glioblastom
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Bisdestilliertes Wasser, deionisiertes Wasser, Aqua bidest.
HLA	Humanes Leukozyten Antigen ( <i>Human Leucocyte Antigen</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Immunoglobulin
kDa	Kilodalton
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MFI	Median der Fluoreszenzintensitäten
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
MHCquant	Quantifizierung von MHC Klasse I
min	Minute(n)

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
ProCa	Prostatakarzinom ( <i>Prostate Carcinoma</i> )
PWG	Planare Wellenleiter-Technologie ( <i>Planar Waveguide</i> )
RCA	Rektumkarzinom ( <i>Rectum Carcinoma</i> )
RCC	Nierenkarzinom ( <i>Renal Cell Carcinoma</i> )
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RFI	Referenzierte Fluoreszenzintensitäten
R-PE	R-Phycoerythrin
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPPM	Reverse-Phase-Protein-Mikroarray
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü/N	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>Weight per Volume</i> )

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die MHC-Moleküle des menschlichen Immunsystems .....	1
1.2	Krebserkrankung und Immuntherapie.....	5
1.2.1	Karzinogenese und Tumormarker.....	5
1.2.2	Identifizierung von Tumorantigenen.....	9
1.2.3	Immuntherapie bei Krebserkrankungen.....	12
1.3	Applikationsgebiet Nierenzellkarzinom .....	13
1.4	Protein-Mikroarray-Technologie.....	14
1.4.1	Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays (RPPMs) .....	16
1.4.2	Verfahren zur Fluoreszenzdetektion für Protein-Mikroarrays .....	19
1.5	Ziel dieser Arbeit .....	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1	Materialien.....	22
2.1.1	Chemikalien und Puffersysteme .....	22
2.1.2	MHC-Monomere .....	22
2.1.3	Geräte und Software .....	23
2.1.4	Verwendete Antikörper.....	24
2.2	Biochemische Methoden.....	25
2.2.1	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford.....	25
2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	26
2.2.3	Western-Blot.....	26
2.2.4	Herstellung von Gewebelysaten .....	29
2.2.5	Biotinylierung von Proteinen.....	33
2.2.6	Fluoreszenz-Markierung von Proteinen .....	34
2.3	Protein-Mikroarray-Technologien.....	34
2.3.1	Herstellung von Protein-Mikroarrays.....	34
2.3.2	Anfärbung von Proteinen auf Mikroarray-Substraten.....	37
2.3.3	Assaysysteme auf Mikroarray-Substraten .....	38
2.3.4	Verfahren zur Fluoreszenzdetektion von planaren Protein-Mikroarrays.....	39
2.3.5	Datenanalyse und statistische Verfahren.....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1	Aufbau einer Reverse-Screening-Plattform .....	42
3.1.1	Validierung verschiedener Mikrarray-Substrate.....	42
3.1.2	Weiterentwicklung der Reverse-Screening-Plattform – Einführung der Zeptosens-Technologie.....	46
3.1.3	Qualitätskontrolle von Protein-Mikroarrays .....	48

3.1.4	Antikörper-Charakterisierung .....	51
3.2	Anwendung der Reverse-Screening-Plattform (Quantifizierung von MHC Klasse I) .....	55
3.3	MHCquant - Quantifizierung von MHC Klasse I in Zell- und Gewebelysaten .....	61
3.3.1	MHCquant mit einem anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörper .....	61
3.3.2	MHCquant mit einem anti-HLA-A-Antikörper .....	64
3.4	Protein- und mRNA-Expressionsanalyse von MHC Klasse I .....	69
3.4.1	Proteinexpressionsanalyse von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C .....	69
3.4.2	Signifikanzanalyse der Proteinexpression von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C in Normal- und Tumorgeweben der Niere .....	74
3.4.3	Western-Blot-Analyse zur Protein-Expression von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C .....	76
3.4.4	mRNA-Expression von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A, HLA-B und HLA-C.....	77
3.4.5	Expressionsanalyse von MHC Klasse I in Normal- und Tumorgeweben der Niere - Protein versus mRNA .....	78
3.5	Tumor-Screening .....	82
3.5.1	Tumor-Screening von MHC Klasse I-Proteinen .....	82
3.5.2	Tumor-Screening zytosolischer und nukleärer Proteine .....	84
3.5.3	Tumor-Screening membranständiger Proteine .....	85
3.5.4	Tumor-Screening von Signalproteinen.....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1	Etablierung einer sensitiven Reverse-Screening-Plattform .....	90
4.2	MHCquant - Bestimmung des MHC-Gehaltes von Zell- und Gewebeprobe.....	94
4.3	Protein- und mRNA-Expressionsanalyse von MHC Klasse I .....	97
4.4	Tumor-Screening .....	99
4.4.1	Tumor-Screening von Tumor-assoziierten Antigenen .....	99
4.4.2	Tumor-Screening von Signaltransduktionsmolekülen.....	101
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>103</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Akademische Lehrer.....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>116</b>

‘Water, water, everywhere,

Nor any drop to drink’

S.Coleridge, Rime of the Ancient Mariner, 1798

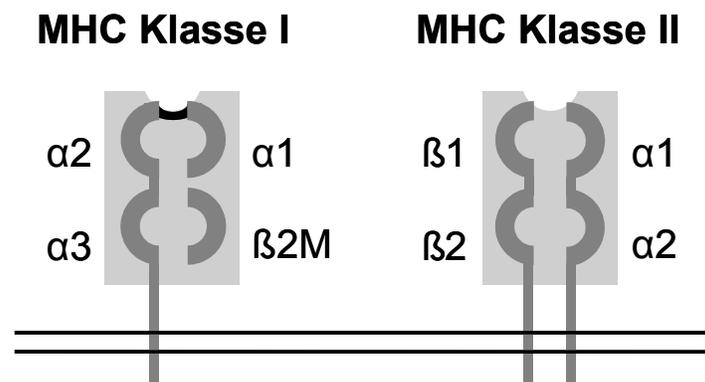
(Ludwig 2005)



# 1 Einleitung

## 1.1 Die MHC-Moleküle des menschlichen Immunsystems

MHC-Moleküle (MHC I bzw. MHC II) sind Erkennungselemente, die auf der Zelloberfläche nahezu aller somatischen Zellen exprimiert werden. Diese Moleküle präsentieren Peptide, die in der Zelle generiert werden, und signalisieren T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK) den physiologischen Status der Zelle (Viret 1999). Die genetischen Elemente, die die Immunantwort kontrollieren, sind auf Chromosom 17 in Mäusen und auf Chromosom 6 in Menschen lokalisiert. Sie werden Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (engl. MHC = *major histocompatibility complex*) genannt. Bei Menschen werden die MHC-Moleküle als HLA-Moleküle (*human leucocyte antigens*) bezeichnet (McCluskey 1999). Der MHC-Genlocus besteht aus mehreren Millionen Basen des Genoms, der ursprünglich aufgrund seiner Rolle in der Transplantatabstoßung identifiziert und benannt wurde (Rhodes 1999; Horton 2004).

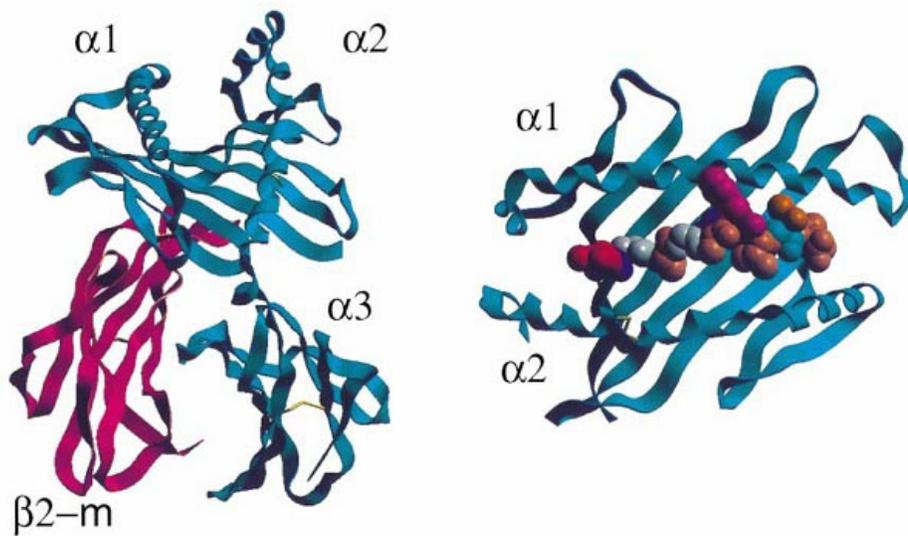


**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur von MHC Klasse I und II.** Links: ein MHC Klasse I-Molekül bestehend aus den  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ -Untereinheiten der schweren Kette und der nicht-kovalent assoziierten Untereinheit  $\beta 2$ -Mikroglobulin. Die Membranbindung findet über die Untereinheit  $\alpha 3$  statt. Die Bindungstasche wird von den Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  gebildet. Rechts: ein MHC Klasse II-Molekül bestehend aus den zwei nicht-kovalent assoziierten, membrangebundenen Ketten  $\alpha$  (32 kDa) und  $\beta$  (29 kDa), die beide aus je 2 Untereinheiten aufgebaut sind. Die Bindungstasche wird von den Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\beta 1$  gebildet.

Der Begriff MHC-Moleküle beschreibt die Proteine, die von den hochpolymorphen Genen im MHC-Genlocus codiert werden und die die wichtige immunologische Funktion der Antigen-Präsentation ausüben. Die MHC-Moleküle werden in Klasse I (MHC

I) und Klasse II (MHC II) unterteilt. Die beiden Klassen unterscheiden sich a) in der Struktur ihrer Untereinheiten (siehe Abbildung 1), b) in ihrer Biosynthese und Assemblierung, sowie c) in der Gruppe der T-Lymphozyten, mit welchen sie zur Regulierung der Immunantwort kooperieren.

MHC I-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer schweren Kette von 43 kDa und einer leichten Kette von 12 kDa bestehen. Sie sind auf der Zelloberfläche in einer für die T-Zell-Interaktion perfektionierten, räumlichen Orientierung lokalisiert (Mitra 2004). Die beiden Ketten sind nicht-kovalent assoziiert. Diese Moleküle werden in fast allen kernhaltigen Zellen synthetisiert und auf deren Zelloberfläche exprimiert. Es werden sechs unterschiedliche schwere Ketten für MHC Klasse I beschrieben: die klassischen MHC I-Moleküle HLA-A, -B und -C, sowie die nicht-klassischen Klasse I-Moleküle HLA-E, -F und -G.



**Abbildung 2: Die dreidimensionale Struktur von MHC Klasse I-Molekülen (Struktur eines H-2D<sup>d</sup>-Komplexes).** Im linken Teil der Abbildung ist die Struktur der MHC Klasse I-Proteinfaltung mit den 3 Untereinheiten der schweren Kette ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ; blau) und die nicht-kovalent assoziierte Untereinheit  $\beta 2$ -Mikroglobulin ( $\beta 2$ -m; magenta) zu erkennen. Der C-Terminus der  $\alpha 3$ -Untereinheit setzt sich in die Transmembranregion des Proteins fort (nicht gezeigt). Der rechte Teil der Abbildung zeigt in der Aufsicht die Peptidbindungstasche, die von den Untereinheiten  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  gebildet wird. Zudem ist das gebundene Decamer-Peptid RGPGRAFVTI zu sehen (Natarajan 1999).

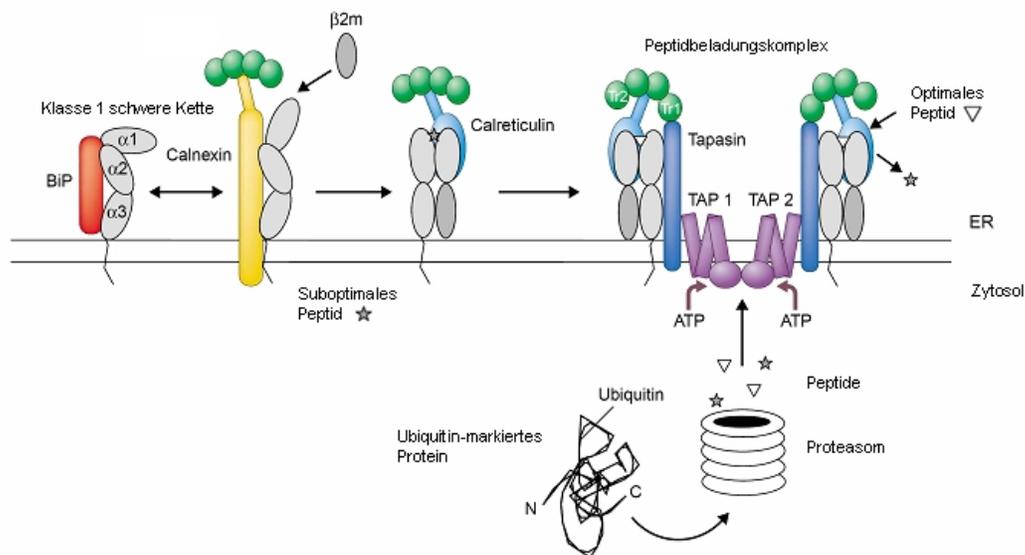
Die schwere Kette besteht aus drei extrazellulären Domänen ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ).  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  sind distal der Membran gelegen und bilden die Peptidbindungstasche für die Antigen-Präsentation (siehe Abbildung 2). Sie sind die Domänen, in denen sich der extreme Polymorphismus der MHC-Moleküle zeigt. Die Untereinheit  $\alpha 3$  ist eine Im-

munglobulin-ähnliche, proximal zur Zelloberfläche lokalisierte Struktur, die durch ein Transmembransegment in der Zellmembran verankert ist. Die leichte Kette der MHC I-Moleküle ist  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Dies ist ein lösliches, nicht-polymorphes Protein, das auch in Blut und Urin gefunden wird und mit der Untereinheit  $\alpha$ 3 der schweren Kette assoziiert ist.  $\beta$ 2-Mikroglobulin wird für die normale MHC I-Zelloberflächenexpression benötigt. Daher kann die Koassemblierung an die schwere Kette als praktischer Test für den Bezug neuer Moleküle zur erweiterten MHC I-Familie herangezogen werden (Natarajan 1999).

MHC II-Moleküle werden hauptsächlich von Zellen des Immunsystems exprimiert, darunter B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen, aktivierte T-Zellen und das Epithel des Thymus. Strukturell unterscheidbare Proteine von MHC Klasse II sind HLA-DP, -DQ und -DR. Die auf diesen Zellen als Antigen präsentierten Peptide werden im Kompartiment der Endosomen und Lysosomen generiert. Endosomen sind membrangebundene Vesikel, die Proteine zwischen verschiedenen vakuolären Kompartimenten hin- und hertransportieren. Die Vesikel sind durch eine Lipiddoppelschicht vom Zytosol abgetrennt. Endosomen führen Antigene mit sich, die durch Endozytose internalisiert wurden. Aus diesem Grunde sind viele der von MHC Klasse II-Molekülen präsentierten Peptide exogener Herkunft. Klasse II-Moleküle werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch nicht-kovalente Assoziation der  $\alpha$ -Kette (32 kDa) an die  $\beta$ -Kette (29 kDa) zusammengesetzt und durch ein monomorphes Protein zum Kompartiment der Endosomen transportiert. In dieser sauren Umgebung wird die Peptidbindungstasche fähig, Antigen-Peptide zu binden. Durch die Bindung eines Peptids wird das MHC II-Molekül stabilisiert. Die Mehrzahl der Peptide (13 – 25 Aminosäuren lang) werden durch die Aktivität der Endosom-/Lysosom-Proteasen gebildet. Ein zweiter, großer Teil der Peptide wird aus Proteinen gebildet, die durch Endozytose aufgenommen und in den Endosomen proteolytisch abgebaut wurden. Somit sind MHC Klasse II-Moleküle in der Lage, Antigene von endogenen wie exogenen Proteinen auf der Zelloberfläche zu präsentieren, die durch CD4-T-Zellen (T-Helferzellen) erkannt werden (McCluskey 1999; Nelson 1999).

Die wichtigste, immunologische Funktion der MHC I-Moleküle besteht in dem Fangen intrazellulärer Peptide und der nachfolgenden Präsentation auf der Zelloberfläche zur spezifischen Erkennung durch CD8-T-Zellen (zytotoxische T-Zellen). Diese Präsentation sensibilisiert das Immunsystem für intrazelluläre Pathogene wie Viren, Proto-

zoen oder Bakterien. Zusätzlich können über diesen Mechanismus quantitative Veränderungen der Proteinexpression, wie sie z.B. während der Kanzerogenese auftreten, angezeigt werden (Natarajan 1999). Der Zusammenbau eines funktionellen MHC I-Moleküls beginnt mit der kotranslationalen Einführung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Polypeptiden und der schweren Kette in das ER. Neu synthetisierte MHC I-Moleküle sind instabil und empfänglich für proteolytischen Abbau. Deshalb werden sie im ER durch die Chaperon-Proteine Calnexin und Calreticulin stabilisiert. Durch die Beladung mit einem passenden Peptid wird der Zusammenbau der MHC I-Moleküle abgeschlossen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Peptidbeladung von MHC Klasse I.** Neu synthetisierte Klasse I schwere Kette kann mit BiP (Chaperon *immunoglobulin binding protein*) oder Calnexin assoziieren. Die Assoziation von  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta 2m$ ) und die Bindung eines suboptimalen Peptids bedingen eine Konformationsänderung in der schweren Kette und den Austausch von Calnexin durch Calreticulin unter Bildung des Peptidbeladungskomplexes. Ubiquitin-markierte Proteine werden im Zytosol durch das Proteasom abgebaut (Shastri 2002). Die resultierenden Peptide werden in einem ATP-abhängigen Schritt durch das Protein TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des ER transportiert. Im Peptidbeladungskomplex werden suboptimale Peptide in einem TAP-kooptinierten Prozess durch optimale Peptide ausgetauscht. Dem Beladen der Klasse-1-Moleküle mit hochaffinen Peptiden wird in diesem Schema die Bindung suboptimaler Peptide vorangestellt, da bekannt ist, dass mutierte Klasse-1-Moleküle aus dem ER transportiert werden und an instabile Peptide binden können. Abbildung verändert nach (Antoniou 2003).

Der Transfer zytosolischer Peptide in das ER beginnt mit der proteolytischen Degradation endogen synthetisierter, zytoplasmatischer Proteine durch das Proteasom. Diese große (20S) Struktur, die sich aus vielen Untereinheiten zusammensetzt, ist

Teil des physiologischen Protein-Umsatzes (*cellular protein turnover*). Vom Proteasom generierte Oligopeptide werden durch einen ATP-abhängigen Transportmechanismus des so genannten TAP-Proteins (TAP; engl. für *transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des ER überführt. TAP ist entweder direkt oder indirekt (über das ER-ständige Chaperon-Protein Tapasin) für die Beladung der MHC I-Moleküle mit Peptiden verantwortlich. Ein peptidbeladenes MHC I-Molekül wird nach weiteren Reifungsschritten (Glykosylierung im ER und Transport durch den Golgi-Apparat) auf der Plasmamembran exprimiert (Watts 1999; van den Elsen 2004).

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Peptid-Fragmente zu binden, selektieren MHC I-Moleküle Peptide aus dem intrazellulären Pool. Werden diese dann auf der Zelloberfläche präsentiert, sind die Peptid/MHC-Komplexe für die Interaktion mit T-Zellen oder NK-Zellen zugänglich. Da MHC-Moleküle für ungezählte Peptide spezifisch sein müssen, ist ein extremer Polymorphismus der codierenden MHC-Gene erforderlich (Rhodes 1999). In einigen Genen zeigen sich mehrere Hundert von allelischen Varianten, vor allem in den  $\alpha 1/2$ -Domänen von MHC Klasse I und in den  $\alpha 1$ -/ $\beta 1$ -Domänen von MHC Klasse II. Diese Proteindomänen formen die Peptidbindungstasche und erlauben es nur einem definierten Satz an Peptiden an die verschiedenen allelischen Varianten der Proteine zu binden. Mechanismen zur Ausbildung der Polymorphismen sind Genduplikation (mehrfaches Auftreten sequenzübereinstimmender, funktioneller Gene), Null-Allele (Präsenz eines DNA-Typus in Abwesenheit eines Protein-Typus), Punktmutationen (Bildung eines neuen Allels durch Einführung eines Allels mit spezifischem Basenaustausch) und Rekombination / Genkonversion (Rekombination verschiedener Allele, Segmentaustausch von Genen). Der Polymorphismus des MHC-Genlokus ist einzigartig im menschlichen Genom und erklärt die Befähigung des menschlichen Immunsystems, gegen unzählige, fremde Antigene eine spezifische Immunantwort einzuleiten (Little 1999).

## **1.2 Krebserkrankung und Immuntherapie**

### **1.2.1 Karzinogenese und Tumormarker**

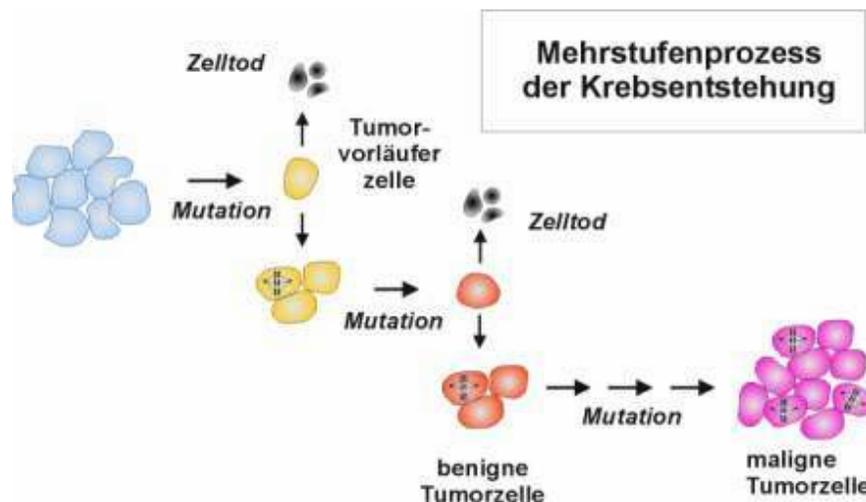
Die Zellen des menschlichen Körpers werden durch regulierende Kreisläufe zur Zellproliferation und Gewebemöostase vor einer Entartung zu einer Krebszelle ge-

schützt. Zur Manifestation eines malignen Wachstums werden sechs Veränderungen der Zellphysiologie als essentiell angesehen:

- Hemmung/Umgehung der Apoptose (programmierter Zelltod)
- Wachstumssignal-Autarkie (Selbstversorgung)
- Unempfindlichkeit gegenüber der Inhibition von Wachstum
- Gewebeinvasion und Metastasierung
- Unbegrenzt replikatives Potential
- Fortwährende Angiogenese (Gefäßbildung)

Jedes dieser Phänomene stellt ein erfolgreiches Durchbrechen eines Anti-Krebs-Verteidigungsmechanismus dar, die nur in ihrer Gesamtheit zur Karzinogenese führen. So kann der programmierte Zelltod durch Hochregulation des *bcl-2* Onkogens oder Mutation des *p53* Tumorsuppressorgens umgangen werden. Die Unabhängigkeit von der Versorgung mit Wachstumssignalen (Autarkie) wird in Tumorzellen z.B. durch die Produktion von PDGF (*platelet-derived growth factor*) and TGF-alpha (*tumor growth factor alpha*) in Glioblastomen und Sarkomen sowie die Aktivierung des *H-Ras* Onkogens erreicht. Hierdurch wird die Abhängigkeit der kanzerogenen Zellen von exogener Wachstumsstimulation weitestgehend reduziert. In einem normalen Zellverbund wird die Proliferation der Zellen auch durch antiproliferative Signale gesteuert (auf molekularer Ebene meistens durch das Retinoblastomprotein und seine Interaktionspartner reguliert), denen sich jedoch Tumorzellen durch Herunterregulation von Genen, die für Signalproteine des Wachstumsfaktorsignalweges oder Zellzyklus-regulierende Proteine kodieren, entziehen können. Die Fähigkeit zur Invasion in das umliegende Gewebe und zur Metastasierung befähigt Krebszellen, aus der primären Tumormasse auszutreten und an einem anderen Ort im menschlichen Körper neu zu wachsen. Die wichtigste Zell-zu-Umgebung-Interaktion wird durch das Protein E-Cadherin im Verbund mit dem zytoplasmatischen Protein  $\beta$ -Catenin geregelt und ist in Tumorzellen durch transkriptionelle Repression oder Mutationen der E-Cadherin- und  $\beta$ -Catenin-Gene außer Kraft gesetzt. Zur unbegrenzten Zellteilung setzen Krebszellen das zellautonome Programm zur Begrenzung der

Zellmultiplikation durch Einflussnahme auf die schon beschriebenen Signalwege außer Kraft. Des Weiteren wird durch Proteinüberexpression die Telomeraseaktivität erhöht, um die Telomere zur andauernden Replikation instand zu halten. Da Tumoren stark wachsen können, muss die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über Gefäße gewährleistet werden. Die Fähigkeit zur Angiogenese erwerben kanzerogene Zellen durch Veränderungen des Gleichgewichts von Gefäßbildungsinduktoren und -inhibitoren. Beispiele hierfür sind die verstärkte Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und die verminderte Expression endogener Inhibitoren wie Thrombospondin-1. Die sechs beschriebenen Veränderungen sind charakteristisch für die meisten humanen Tumoren und begründen die auf verschiedenen zellulären Ebenen wichtige Rolle der Proteine in der Kanzerogenese (Hanahan 2000).

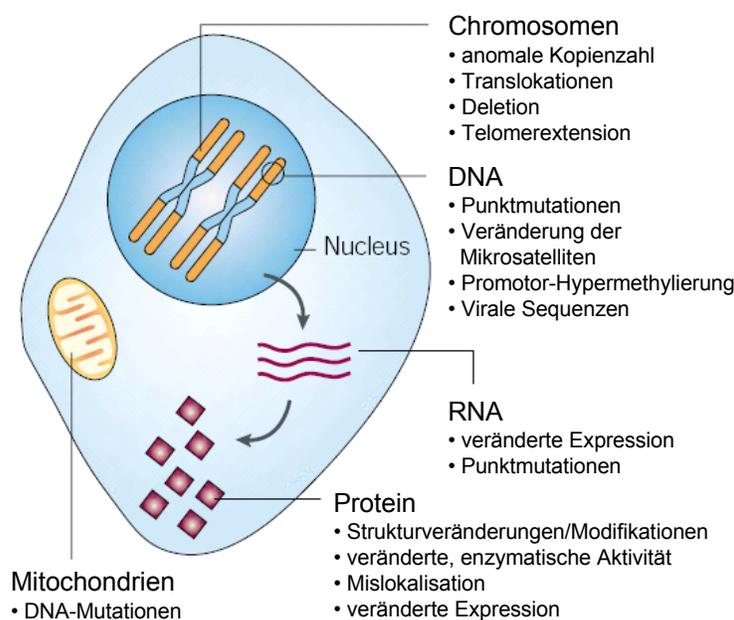


**Abbildung 4: Mehrstufenprozess der Kanzerogenese.** Ein durch ein Kanzerogen verursachter initialer DNA-Schaden (Tumorinitiation) löst eine Zellveränderung aus, die in der Bildung einer Tumorvorläuferzelle durch diese Mutation resultiert. Die veränderte Zelle kann durch den programmierten Zelltod (Apoptose) kontrolliert von Makrophagen beseitigt werden oder unterliegt weiteren Mutationen. Tumorpromovierende Faktoren erhöhen die Proliferationsrate von Tumorvorläuferzellen, die durch klonale Expansion unkontrolliert zu einem Tumor weiterwachsen. Abbildung verändert nach [www.unituebingen.de/toxikologie/](http://www.unituebingen.de/toxikologie/).

Das histopathologische Fortschreiten eines präneoplastischen Gewebes zum Tumor wird begleitet von einer Akkumulation genetischer Veränderungen (veranschaulicht in Abbildung 4). Diese können zu veränderten Proteinexpressionsmustern und Modifikationen der Proteinstruktur- und funktion führen. Die Veränderungen - die im Vergleich zum Normalgewebe - nur oder in größerem Ausmaß im Krebsgewebe auftreten, können durch Biopsien (Resektate) oder in Körperflüssigkeiten detektiert werden und werden als molekulare Marker eines Tumorgeschehens verwendet. Diese Mar-

ker sind notwendig für die möglichst frühe Erkennung von Tumoren. Sie geben Aufschluss über den Verlauf der Krebserkrankung und ermöglichen es, die Erkrankung zu überwachen und den Erfolg der Therapie zu kontrollieren (Sidransky 2002).

Tumormarker (gleichbedeutend mit „tumorspezifische Markerproteine“) werden als Moleküle, Prozesse oder Substanzen beschrieben, die unter präkanzerogenen und kanzerogenen Bedingungen qualitativ und quantitativ verändert vorliegen. Diese Veränderung kann durch ein Experiment detektiert werden. Die veränderten Moleküle können durch den Tumor selber oder durch das die Tumorzelle umgebende Normalgewebe produziert werden.



**Abbildung 5: Molekulare Ebenen von Tumormarkern**, die in Serum-, Urin- oder Speichelproben detektiert werden können. Abbildung verändert nach (Sidransky 2002).

Als Tumormarker können DNA, mRNA, Proteine oder Prozesse (z.B. Proliferation, Apoptose, Angiogenese, etc.) identifiziert werden. Die Marker können in unterschiedlichen Körperkompartimenten wie z.B. Gewebe, Blut (Plasma oder Serum), Urin oder Speichel gefunden werden. Um Tumormarker zu detektieren, werden heutzutage Methoden angewendet, die von komplexen Tiermodellen bis zu immunohistochemischen Methoden reichen. Am häufigsten verwendet wird der so genannte Immunoassay, bei dem zwei Antigen-spezifische Antikörper zur Erkennung der Tumormarker eingesetzt werden (Schrohl 2003).

Je nach Körperkompartiment können verschiedene Typen von Tumormarkern nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5). DNA kann auf Veränderungen der Kopienzahl, chromosomale Translokation, Deletion, Telomerextension, Mikrosatelliteninstabilität oder Promotor-Hypermethylierung untersucht werden. RNA kann auf veränderte Expressionslevel oder Punktmutationen, Proteine auf strukturelle Veränderungen, Modifikationen oder Veränderung der enzymatischen Aktivität, Lokalisation oder Expressionsmuster analysiert werden (Sidransky 2002). Von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) werden Biomarker, wie Tumormarker auch genannt werden, als eine Substanz, Struktur oder ein Prozess beschrieben, die im menschlichen Körper oder seinen Bestandteilen gemessen werden kann und die Inzidenz oder das Fortschreiten einer Erkrankung beeinflussen bzw. vorhersagen kann. Von der NIH (Nationale Gesundheitsinstitute der USA) werden Biomarker als ein Merkmal definiert, das gemessen werden kann und als Indikator normaler biologischer Prozesse, pathologischer Prozesse oder pharmakologischer Effekte zur therapeutischen Intervention genutzt werden kann (siehe „Biomarker Assay List“, [www.pharma.tno.nl](http://www.pharma.tno.nl)). Eine hohe Tumormarkerkonzentration bedeutet in diesem Sinne das Auftreten eines bestimmten Krebstyps im menschlichen Körper. Beispiele für Tumormarker sind CA 125 (Ovarialkrebs), CA 15-3 (Brustkrebs), CEA (*carcinoembryonic antigen*; Krebs der Ovarien, Lunge, Brust, Pankreas oder des Gastrointestinaltraktes) oder PSA (*prostate specific antigen*; Prostatakrebs).

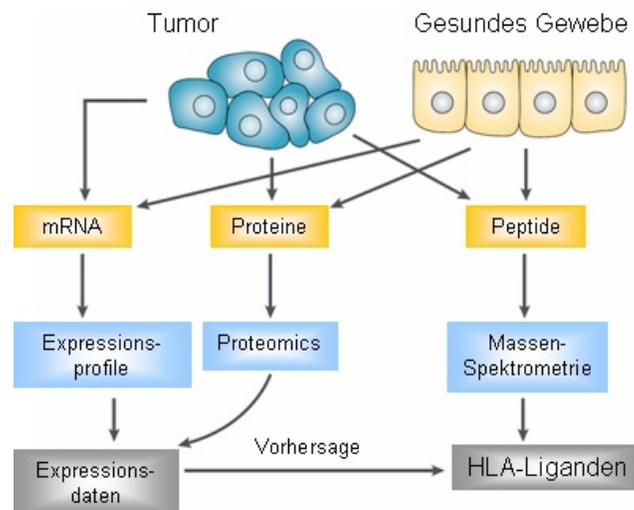
### 1.2.2 Identifizierung von Tumorantigenen

Über die letzten Jahrzehnte wurden verschiedene Strategien zur Identifizierung von Tumorantigenen (wie z.B. *in vivo*-Screening Tumor-reaktiver T-Zellen, mRNA-Expressionsanalyse oder HLA-Epitop-Analyse) verfolgt. Bezogen auf ihre Expressionsmuster können diese Antigene in verschiedene Klassen aufgeteilt werden (Paschen 2004):

- Differenzierungs-Antigene, die in normalen und neoplastischen Zellen der selben Abstammung exprimiert werden (z.B. Tyrosinase, MART-1 (*melanoma antigen recognised by T-cells*)),
- Tumor-spezifische Antigene, die in verschiedenen Tumoren exprimiert werden (z.B. MAGE (*melanoma antigen*)),

- Tumor-spezifische Antigene, die aufgrund einer spezifischen Mutation nur in einem Tumor auftreten (z.B.  $\beta$ -Catenin),
- überexprimierte Antigene, die über ihren höheren Expressionslevel im Vergleich zum Normalgewebe erkannt werden (z.B. Muc1, CEA).

Ausführliche Angaben zu Beispielen der unterschiedlichen Tumorantigen-Klassen wurden in (Renkvist 2001) beschrieben.



**Abbildung 6: Methodische Strategien zur Identifizierung von Tumormarkern.** Bei der Identifizierung von Markerproteinen untersucht man - im Vergleich Tumor- zu Normalgewebe - die Signaturen der Kanzerogenese auf Ebene der mRNA, Proteine und der über MHC-Moleküle präsentierten Peptide. Durch den Vergleich der verschiedenen Expressionsmuster können neue Tumormarker identifiziert werden. Abbildung verändert nach (Stevanović 2002).

In Abbildung 6 ist die Verknüpfung unterschiedlicher Strategien zur Erforschung neuer, bisher unbekannter Tumor-spezifischer Antigene dargestellt. Hierbei werden die Tumorgewebe auf der Ebene der mRNA, der Proteine und der HLA-Liganden im Vergleich mit dem gesunden Kontrollgewebe auf die unterschiedlichen Expressionslevel untersucht. Zur Analyse der mRNA und der Proteine werden Microarray-Experimente angewendet, die HLA-Epitop-Analyse basiert auf massenspektrometrischen Analysen.

#### 1.2.2.1 HLA-Epitop-Analyse

MHC-Peptide können durch Affinitäts-Chromatographie effizient von den membranständigen MHC-Molekülen aufgereinigt werden. Die gewonnenen Peptide können durch HPLC-MS-Methoden (Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie-Massen-

spektrometrie) analysiert und die Informationen gespeichert werden (Admon 2003; Lemmel 2003; Hofmann 2005). In Datenbanken wird anschließend über die Verwendung von Such-Algorithmen nach möglichen Ursprungsproteinen geforscht. So können neue Tumorantigene identifiziert und Proteine, deren schnelle Degradation signifikant für Tumorprogression und -metastasierung ist, erkannt werden. Beispiele neuer und durch HLA-Epitop-Analyse in der Arbeitsgruppe Stevanović erforschter Tumor-spezifischer Antigene sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1: Liste von Tumor-spezifischen Antigenen, die über HLA-Epitop-Analysen identifiziert wurden.** (Daten für diese Doktorarbeit freundlicherweise von S. Stevanović zur Verfügung gestellt).

Antigen	Funktion (Literaturstelle)
Adipophilin	Adipozyten-Differenzierung (Schmidt 2004)
Apolipoprotein L1	Cholesterin-Stoffwechsel (Duchateau 1997; Flad 1998; Duchateau 2001; Vanhamme 2003)
CA9 (Carboanhydrase IX)	Säure-Base-Haushalt, Tumor-assoziiertes Isoenzym (Ivanov 1998; Vissers 1999)
CEA ( <i>carcinoembryonic antigen</i> )	Einfluss auf Apoptose und Metastasierung, Tumormarker für z.B. Colonkarzinome (Sidransky 2002; Stevanović 2002)
cMet	Rezeptor-Tyrosinkinase, Proto-Onkogen (Birchmeier 2003; Schag 2004)
Cyclin D1	CDK-Kinase-Regulator, Zellzyklus-Steuerung, Kanzerogenese (Sadovnikova 1998; Anna 2003; Ewen 2004)
CYP1B1 (Cytochrom P450, Familie 1, Subfamilie B, Polypeptid 1)	Stoffwechsel von Prokarzinogenen, ER-lokalisiert (Maecker 2005)
Harmonin ( <i>usher syndrome 1c</i> )	Signal-Transduktion (El-Amraoui 2005)
IGFBP3 ( <i>insulin-like growth factor binding protein 3</i> )	Regulatorfunktion in Zellproliferation und Apoptose (Bok 2002)
KIAA0017 ( <i>splicing factor 3b</i> )	mRNA-Reifung (Kikuno 2004; Koga 2004)
KIAA0315 (Plexin B2)	Regulatorfunktion in Zellproliferation und -adhäsion (Artigiani 2003; Worzfeld 2004)
MMP-7 (Matrix-Metalloproteinase 7)	Extrazellulär-Matrix (Abbau) (Duffy 2000; li 2006)
Muc1 (Mucin 1)	Tumor-assoziiertes epitheliales Mucin, Glykoprotein (Brossart 2001; Wei 2005)

NNMT (Nicotinamid-N-methyltransferase)	oxidativer Stoffwechsel (Aksoy 1994; Kassem 2002)
PRAME (antigen preferentially expressed in melanoma)	Zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen für das humane Melanom (Kessler 2001; Epping 2005)
RECQL-1 ( <i>REC-Q protein-like 1</i> )	DNA-Helikase, Steuerung der DNA-Topologie (Puranam 1994; Kusano 1999)
RGS-5 ( <i>regulator of G-protein signalling 5</i> )	Signaltransduktion, GTPase-Aktivierung (Cismowski 1999; Berger 2005)
Survivin	Apoptose-Inhibitor (Schmitz 2000; Igney 2002)
Topo2 $\alpha$ (Topoisomerase 2-alpha)	Kontrolle der DNA-Topologie während der Transkription (Christensen 2002)
Zytokeratin 18	Intermediärfilament, Zellstrukturmolekül (Weinschenk 2002; Buhler 2005)

#### 1.2.2.2 mRNA-Expressionsanalyse

Tumorspezifische Antigene (im Zusammenhang mit der HLA-Epitop-Analyse) können zusätzlich mittels mRNA-Expressionsanalyse detektiert werden (van 't Veer 2002; Ransohoff 2003; Krüger 2005; Stahl 2005). Hierbei handelt es sich im Allgemeinen um so genannte überexprimierte Antigene, die über ihren höheren Expressionslevel im Vergleich zum Normalgewebe mithilfe der Affymetrix-Chip-Technologie (Lipshutz 1999) und anderer DNA-Chip-basierender Expressionsanalysen erkannt wurden. Beispiele für diese Art der Identifizierung von Tumormarkern sind Muc1 oder CEA.

#### 1.2.3 Immuntherapie bei Krebserkrankungen

Obwohl sogar „spontane“ Tumoren immunogen sind und in der Regel durch Tumorantigen-spezifische T-Zellen infiltriert werden, werden die meisten Tumoren nicht vollständig durch den Wirt abgestoßen und die Kanzerogenese schreitet fort. Durch Verstärkung der bestehenden, schwachen anti-Tumor-Immunantwort mittels therapeutischer Vakzinierung mit dem entsprechenden Tumorantigen kann die gegen Tumoren gerichtete Immunüberwachung des menschlichen Körpers zur Abstoßung der Krebszellen induziert werden (Smyth 2001; Admon 2003; Pawelec 2004). Proteine oder Peptide, die in allen normalen Zellen des menschlichen Körpers nicht auftreten, werden als Tumorantigene für die Immuntherapie bevorzugt. Höchste Priorität

zur Verwendung als Tumor-spezifische Antigene haben mutierte Proteine, die vorzugsweise für die Aufrechterhaltung des Transformationsstatus' der Krebszelle notwendig sind. Weitere, sinnvolle Tumorantigene sind embryonale Proteine, die in kanzerogenen Zellen aufgrund des auftretenden Verlustes der zellulären Kontrolle exprimiert werden (Anderson 2001). Zur klinischen Anwendung sollten die erforschten Tumor-spezifischen Antigene eine hohe Immunogenizität aufweisen, um eine möglichst starke *in vivo*-T-Zell-Antwort gegen die Krebserkrankung hervorrufen zu können (Singh-Jasuja 2004). Es werden unterschiedliche Strategien zellulärer Immuntherapien vorgeschlagen (Michael 2003):

- Vakzinierung mit bestrahlten, entnommenen Tumorzellen, die *in vitro* oder als Zelllinie angereichert wurden. Diese Zellen können zur Expression immunstimulatorischer Moleküle (z.B. Zytokine) genetisch verändert worden sein. Über diesen Ansatz wird das Immunsystem stärker für ein bereits erkanntes T-Zell-Epitop sensibilisiert.
- Vakzinierung mit Peptiden, die über T-Zell-Epitop-Analyse erkannt wurden. Die Peptide werden intradermal mit Adjuvantien appliziert, woraufhin sie von Antigen-präsentierenden Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Nachfolgend wird eine Immunantwort in den regionalen Lymphknoten ausgelöst.
- Vakzinierung mit DNA-Sequenzen, die für virale Gene, Zytokingene oder idio-typerische Sequenzen kodieren. Die Immunogenizität dieser Strategie kann durch Verwendung spezifischer Plasmide, die CpG-Repeat-Sequenzen tragen und als natürliches Adjuvans fungieren, optimiert werden.
- Vakzinierung mit dendritischen Zellen. Hierfür werden zytotoxische T-Zellen (CD8-T-Zellen) gegen mikrobielle Antigene oder Tumorzellen sensibilisiert. Die dendritischen Zellen werden *ex vivo* kultiviert und mit einem immunologischen Adjuvans verabreicht.

### 1.3 Applikationsgebiet Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (RCC, engl. *renal cell carcinoma*) gehört (neben Nierenadenom und Nierenonkozytom) zu den epithelialen Tumoren der Niere. Nierenzellkarzinome lassen sich in eine heterogene Gruppe von Tumoren aufteilen: das klarzellige

RCC, das papilläre RCC und das chromophobe RCC (Dal Cin 2003). Das Nierenzellkarzinom wird als immunogener Tumor klassifiziert, da eine kleine, aber signifikante Rate von spontaner Tumorregression beschrieben werden konnte (Nathan 2002). In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Nierenkrebs bei Frauen auf etwa 6320 und bei Männern auf etwa 8830 geschätzt. Insgesamt sind 4% aller bösartigen Neubildungen in der Niere lokalisiert. Nierenkarzinome sind für 3% aller Krebstodesfälle verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei ca. 65, für Frauen über 68 Jahren, nahe am mittleren Erkrankungsalter an Krebs insgesamt. Bei bösartigen Neubildungen der Niere im Erwachsenenalter handelt es sich zu 85% um Nierenzellkarzinome (Hypernephrome). Dagegen sind Nephroblastome (Wilms-Tumore), Sarkome oder Lymphome der Niere im Erwachsenenalter selten ([www.rki.de](http://www.rki.de)). Die im Rahmen des erblichen Hippel-Lindau-Syndroms (Kaelin 2002) auftretenden klarzelliger Nierenzellkarzinome sind oft multifokal (gleichzeitig an verschiedenen Stellen des selben Organs) und treten häufiger schon in jüngerem Lebensalter auf als Nierenkrebserkrankungen ohne genetische Disposition. Tumormarker, die mit dem Nierenzellkarzinom assoziiert werden, sind a) Akute-Phase-Reaktanten (z.B. Ferritin, CRP), b) genetische Marker (Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 (Dal Cin 2003) und Mutationen des VHL- oder Met-Gens), c) Proliferationsmarker (Ki67), d) Zelladhäsionsmoleküle (CD44), e) Cadherine und Catenine, f) Plasminogen-Aktivatoren, g) Neovaskularisationsmarker (VEGF, EGF), h) Tumor-assoziierte Antigene (PRAME, RAGE1, Glykoprotein 75, CA9) oder MUC1 als unabhängiger, prognostischer Marker (Kirkali 2003; Michael 2003; Oya 2003).

## **1.4 Protein-Mikroarray-Technologie**

Die Protein-Mikroarray-Technologie erlaubt die simultane Analyse vieler Parameter in einem einzigen Experiment. Hierfür wird nur eine geringe Menge der untersuchten Probe benötigt. Assaysysteme, die auf dieser Technologie aufbauen, werden heutzutage eingesetzt, um Proteine zu identifizieren, zu quantifizieren und funktionell zu analysieren. Hierbei handelt es sich vor allem um Proteine, die für die Proteomforschung, die angewandte Biologie und die Diagnostik von Interesse sind. Durch den Einsatz dieser Technologie können Biomarker identifiziert und potentielle Zielmoleküle pharmakologischer Therapien validiert werden (Templin 2002; Stoll 2004).

Die gestiegenen Erwartungen der Genom- und Proteomforschung zur Analyse der Funktion von Genen und Proteinen haben das Interesse an Mikroarray-basierten Technologien stark erhöht. Im letzten Jahrzehnt erlangten DNA-Mikroarrays den Status etablierter und routinemäßig angewandeter Hochdurchsatz-Hybridisierungssysteme, die das gesamte, menschliche Transkriptom in einem einzigen Experiment erforschbar machen (Chipping Forecast II 2002). Die grundlegenden Prinzipien der miniaturisierten Ligandenbindungsassays wurden Anfang der 1980er Jahre von Roger Ekins (Ekins 1989) gelegt, als Protein-Mikroarrays als parallelisierte, miniaturisierte Festphasenassays entwickelt wurden. Werden mit diesen Assays Proteinexpressionsstudien durchgeführt, findet sich selten eine absolute Korrelation zur korrespondierenden mRNA-Expression (Gygi 1999; Griffin 2002). Vergleichbar schwierig ist die Vorhersage des funktionellen Status' eines Proteins aufgrund der gewonnenen Expressionsdaten. Aus diesen Gründen sind Entwicklungen von Hochdurchsatz-Technologien zur Analyse der Funktion des menschlichen Proteoms weiter erforderlich (Poetz 2005).

Die hierzu entwickelten Protein-Mikroarray-basierten Technologien lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Anwendung in 2 Klassen aufteilen: a) Arrays für Proteomanalysen, d.h. zur Analyse der Proteinexpression und zur Proteinquantifizierung, und b) Arrays zur funktionellen Analyse von Proteinen, d.h. für Protein-Interaktionsstudien mit hunderten bis tausenden immobilisierter Moleküle (Proteine, Peptide, Oligosaccharide, DNA, organische Moleküle) (MacBeath 2002).

Die für DNA-Mikroarrays etablierten Technologien wurden zur Erforschung des menschlichen Proteoms an ein Protein-Mikroarray-Format adaptiert. Die DNA ist ein gleichförmiges und stabiles Molekül, das seine komplementären Interaktionspartner durch definierte Basenpaar-Wechselwirkungen binden kann. Diese Wechselwirkungen können leicht über die primäre DNA-Sequenz vorhergesagt werden. Zudem kann DNA effektiv durch Oligonukleotid-Synthese hergestellt oder über PCR-basierende Ansätze amplifiziert werden. Im Gegensatz dazu sind Proteine weitaus komplexere Moleküle, die aufgrund der verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der 20 proteinogenen Aminosäuren strukturell und funktionell sehr unterschiedlich sein können. Die Interaktion von Proteinen mit ihren Interaktionspartnern kann über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder schwache, hydrophobe van-der-Waals-Kräfte erfolgen. Proteine können mit unterschiedlichen

Bindungspartnern interagieren, aber nicht - wie DNA-Moleküle - vervielfältigt werden. Die Vorhersage der Interaktion hochaffiner Fängermoleküle über ihre primäre Aminosäuresequenz ist nicht möglich. Posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung müssen ebenso in Betracht gezogen werden (Templin 2003; Kramer 2005).

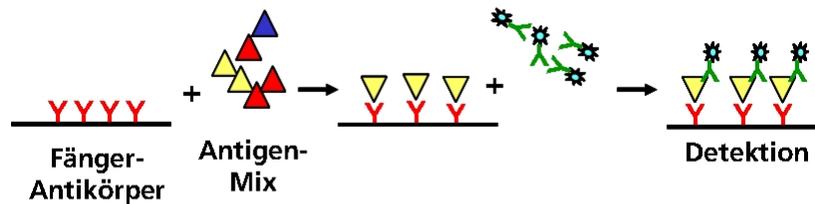
#### **1.4.1 Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays (RPPMs)**

Zur Expressionsanalyse und Quantifizierung von Proteinen werden Protein-Mikroarrays in zwei unterschiedlichen Formaten angewendet:

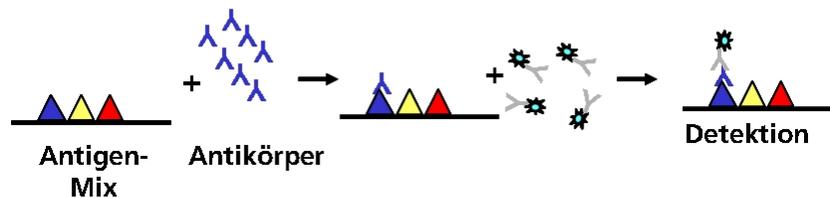
- **Forward-Phase-Protein-Mikroarrays.** Bei diesem Mikroarray-Format werden hochaffine Fängermoleküle (z.B. Antikörper) auf einer modifizierten Glasoberfläche (feste Phase) immobilisiert und in einem definierten Muster angeordnet. Über die xy-Position bei der Herstellung der Mikroarrays werden die Fängermoleküle kodiert. Mittels Forward-Phase-Protein-Mikroarrays können multiplexe Sandwichimmunoassays aufgebaut werden, die es erlauben viele Analyten in einer eingeschränkten Zahl von Proben über zwei antigen-spezifische Fängermoleküle zu detektieren.
- **Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays (RPPMs).** Besonders für die Analyse von Biomarkern besteht ein großes Interesse in der angewandten Proteomforschung. Über vergleichende Analysen der Proteinexpression in Tumor- und korrespondierenden Normalgeweben können unterschiedlich exprimierte Proteine identifiziert werden, die als neue Markerproteine charakterisiert werden können (Hanash 2003). Die Technologie der RPPMs erlaubt die Immobilisierung der gesamten, komplexen Probe auf einer Substrat-Oberfläche. Hierzu werden die lysierten Zellkultur- oder Gewebelysate mithilfe von Mikroarrayer-Systemen auf Mikroarray-Substrate gedruckt. Die zu untersuchenden Zielmoleküle können über ein Antigen-spezifisches Fängermolekül detektiert werden. Somit kann ein Antigen in einer großen Probenzahl in einem Experiment untersucht werden. Antigene, für die kein etabliertes Antikörperpaar vorliegt, können über diese Technologie ebenfalls analysiert werden.

Abbildung 7 zeigt schematisch den unterschiedlichen Aufbau der zwei vorgestellten Arrayformate.

### Forward-Phase-Protein-Mikroarray:



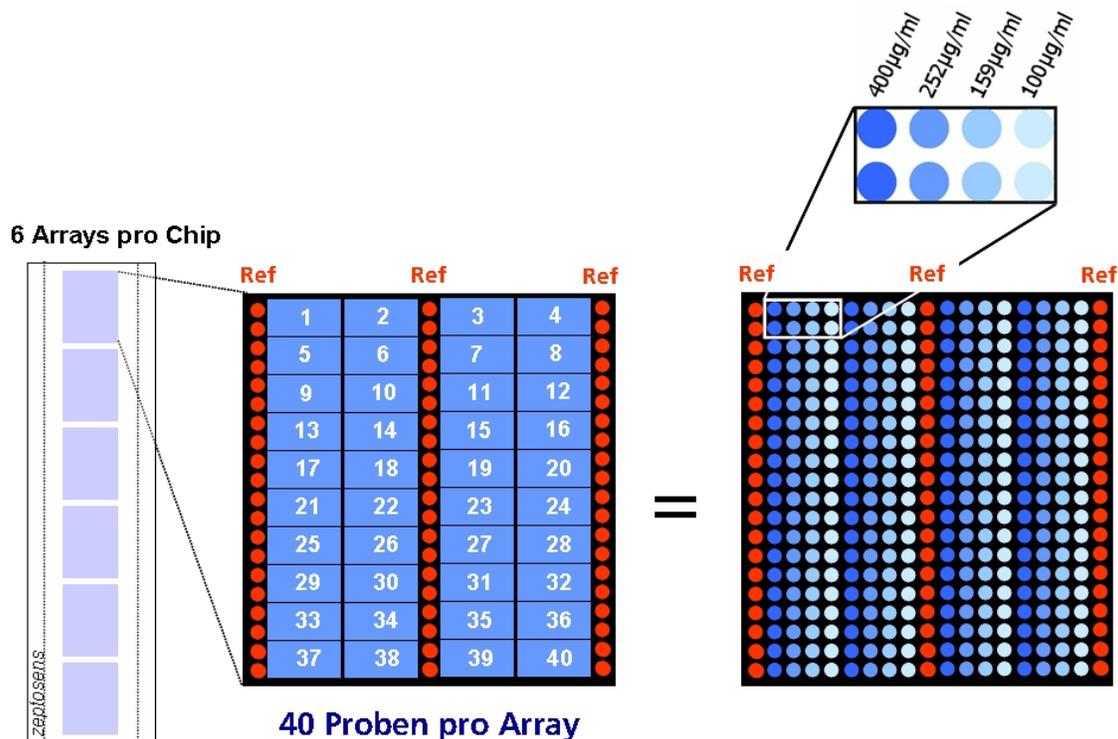
### Reverse-Phase-Protein-Mikroarray:



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau von Forward-Phase- und Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays.** Protein-Mikroarrays können in zwei unterschiedlichen Formaten aufgebaut werden. Bei Forward-Phase-Protein-Mikroarrays (oberer Teil der Abbildung) werden Fängermoleküle (z.B. Antikörper) auf Substraten (auch Glasobjektträger genannt) immobilisiert und mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Der Detektionsschritt erfolgt durch Verwendung eines zweiten Antigen-spezifischen Antikörpers, der mit einem Fluoreszenz-basierten Detektionssystem gekoppelt ist und unter Ausbildung eines Immunosandwich die Erkennung des Analyts ermöglicht. Bei Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays (unterer Teil der Abbildung) werden die Proteinlösungen direkt auf das Substrat aufgebracht und der Analyt über ein Antigen-spezifisches Fängermolekül untersucht. Die Detektion erfolgt hier über einen Spezies-spezifischen, Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper.

Obwohl Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays schon in verschiedenen Anwendungsgebieten eingesetzt wurden, sind sie eine neue technologische Entwicklung. In ersten Studien wurden Gewebeproben auf die Expressionsmuster von Signaltransduktionsproteinen zum Studium der Kanzerogenese analysiert (Paweletz 2001; Petricoin 2002; Espina 2003; Grubb 2003), Signaltransduktionswege, insbesondere bezogen auf Phosphorylierungsmuster, wurden in stimulierten Jurkatzellen charakterisiert (Chan 2004), die NCI-60-Zelllinien wurden auf die Expressionsmuster von > 50 Proteinen analysiert (Nishizuka 2003), Gewebeproben von Ovarialkarzinomen wurden mikrodisektiert und auf RPPMs charakterisiert (Jones 2002; Wulfschle 2003; Sheehan 2005), Apoptose-Proteine wurden in Lymphoma-Proben detektiert (Zha 2004), das mitochondriale Proteom wurde untersucht (Herrmann 2003) und ein großer Probensatz von Serumproben wurde auf den IgA-Gehalt untersucht (Janzi 2005). Die genannten Anwendungen zeigen das breite Anwendungsspektrum dieser Technologie, von denen einige Nitrozellulose-beschichtete Mikroarray-Substrate mit nachfolgender, chemolumineszenter Signaldetektion verwendeten. Allen gemeinsam ist eine

aufgrund der verwendeten Detektionsverfahren eingeschränkte Sensitivität der Messungen, die vor allem die Analyse von sehr niedrig konzentrierten Analyten (wie z.B. einige Tumormarker) verhindert, eine limitierte Dynamik der Messungen und eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit. Desgleichen wurden in keiner der vorgestellten Studien Versuche zur absoluten Quantifizierung von Proteinen unternommen.



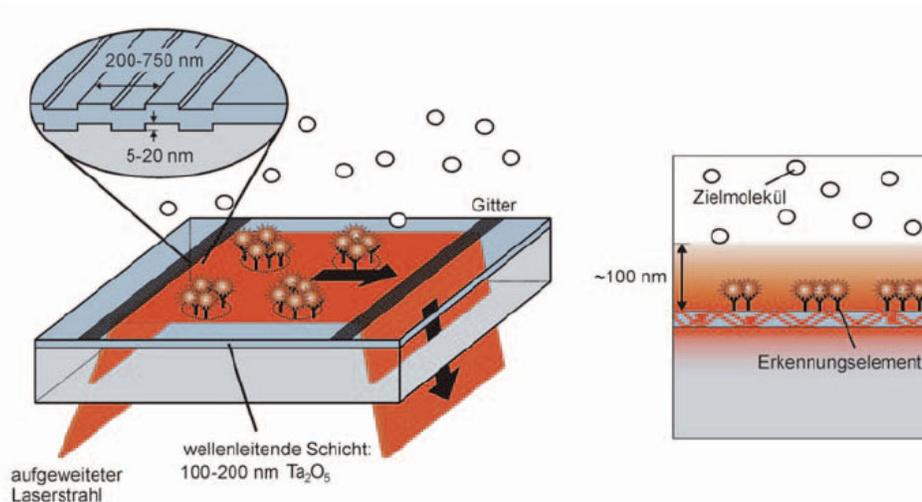
**Abbildung 8: Probenanordnung der in dieser Doktorarbeit untersuchten Proteinlösungen auf einem Zeptosens-Mikroarray-Substrat.** Ein Mikroarray-Substrat (in der Abbildung links als Chip dargestellt) beinhaltete 6 Sub-Arrays, in denen 40 Proben angeordnet wurden. Jede Probe wurde in Duplikaten in 4 verschiedenen Verdünnungsstufen (Konzentrationen im rechten, oberen Teil der Abbildung angegeben) immobilisiert. Die in rot dargestellten Spots (Ref) repräsentieren die BSA-Cy5-haltigen Referenzspots zur Berechnung der Abschwächung des Laserlichts im evaneszenten Feld. Die Abbildung wurde freundlicherweise von M.Pawlak zur Verfügung gestellt und modifiziert.

Für diese Doktorarbeit wurden RPPMs verwendet, um Proteine bezüglich ihrer Expression analysieren und über Standardreihen absolut quantifizieren zu können. Abbildung 8 veranschaulicht die hierzu verwendete Probenanordnung. Über die bei der Herstellung festgelegten x- und y-Koordinaten werden die Proben kodiert und können bei der späteren Signalmessung durch Fluoreszenzdetektion identifiziert werden. Auf einem der für die Mehrzahl der Experimente verwendeten Zeptosens-Mikroarray-Substrate wurden mithilfe von piezoelektrischen Mikrodosiersystemen, so genannten Mikroarrayern, 40 Proben in sechs identischen Sub-Arrays oder 80 Pro-

ben in 3x zwei identischen Sub-Arrays angeordnet. Jede Probe wurde in 4 Verdünnungsstufen immobilisiert, die wiederum in Duplikaten gespottet wurden. Somit wurden für die Untersuchung einer Probe 8 unterschiedliche Spots ausgewertet. Zusätzlich zu den Probenspots wurden 3 Spalten mit Cy5-markiertem BSA gedruckt, die nach der Fluoreszenzdetektion für die Berechnung der Laserlicht-Abschwächung (bei Einsatz der Planaren Wellenleitertechnologie) ausgewertet wurden.

#### 1.4.2 Verfahren zur Fluoreszenzdetektion für Protein-Mikroarrays

Bei der zur Fluoreszenzdetektion häufig angewendeten konfokalen Laser-Scanner-Technologie wird das Mikroarray-Substrat Punkt für Punkt mit einem Laserstrahl abgetastet. Auf der Detektionsseite sorgt eine spezielle Lochblende dafür, dass von der Probe zurückreflektierte Strahlen, die nicht im Fokus des Objektivs sind, vor dem Detektor abgeblockt werden. Dadurch nimmt der Photomultiplier nur Intensitäten von Signalen aus der Fokusebene auf (Conchello 2005).



**Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines Dünnschichtwellenleiters mit Verlauf des Laserstrahls (PWG-Technologie).** Das über ein Beugungsgitter auf der linken Seite des Zeptosens-Mikroarray-Substrats eingekoppelte Laserlicht läuft in einem sich bildenden, evaneszenten Feld in einer wellenleitenden Schicht (Dicke ca. 100-300 nm) aus Tantalpentoxid zum rechten Beugungsgitter und wird dort ausgekoppelt (linker Teil der Abbildung). Nur Erkennungselemente (Fluorophore), die innerhalb des evaneszenten Feldes lokalisiert sind, werden vom Laserlicht angeregt und über eine geräteinterne CCD-Kamera (im ZeptoREADER, Zeptosens) gemessen (rechter Teil der Abbildung). (Abbildung verändert nach (Pawlak 2002b)).

Bei der Planaren Wellenleiter-Technologie (PWG, *planar waveguide*) wird monochromatisches Licht über ein Beugungsgitter in eine 150 – 300 nm dünne, transpa-

rente und hochbrechende Schicht aus Tantalpentoxid ( $Ta_2O_5$ ) eingekoppelt, die auf einem Mikroarray-Substrat aus Glas (niedrigerer Brechungsindex) aufgebracht ist (Duveneck 1997; Pawlak 2002a). Das evaneszente Feld wird durch Lichtleitung in dieser wellenleitenden Schicht erzeugt und hat eine Eindringtiefe von einigen 100 nm in das umgebende wässrige Medium. Die auf der Oberfläche gebildeten Biomolekülkomplexe (Antigen + Primärantikörper + Fluorophor-gekoppelter Sekundärantikörper) befinden sich im Bereich des evaneszenten Feldes.

Abbildung 9 zeigt schematisch den Aufbau eines Dünnschichtwellenleiters. Zur Fluoreszenzdetektion der auf Zeptosens-Mikroarray-Substraten analysierten Protein-Mikroarrays wurde der ZeptoREADER™ (Zeptosens) verwendet, der mit Laserlichtquellen zur Fluoreszenzanregung bei 635 nm („rot“) und 532 nm („grün“) ausgerüstet ist. Die Fluoreszenzsignale der individuellen Spots eines rund 5 x 7 mm großen Mikroarrays werden durch eine CCD-Kamera als Vollbild aufgenommen. Da durch die Verwendung der PWG-Technologie einerseits weniger Hintergrundsignal generiert wird und die Fluoreszenzsignale andererseits empfindlicher gemessen werden, kann eine Steigerung der Detektionssensitivität um den Faktor 5-10 erreicht werden.

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Mit Hilfe der Protein-Mikroarray-Technologie konnten in den letzten Jahren neue Erkenntnisse über das menschliche Proteom und die vielfältigen Interaktionen von Proteinen gewonnen werden. Im Rahmen dieser Dissertation sollten die miniaturisierten, parallelisierten Assaysysteme als Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays zur Expressionsanalyse und absoluten Quantifizierung von Proteinen eingesetzt werden. Hierzu wurde die Technologie-Plattform der Firma Zeptosens mit der Reverse-Phase-Technologie zur sensitiveren Fluoreszenzdetektion und somit sensitiveren Analytdektion kombiniert.

Über vergleichende Analysen von Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe sollten Proteine identifiziert werden, die über ihre unterschiedliche Expression als potentielle Markerproteine charakterisiert werden können. Die technologischen Voraussetzungen einer solchen Screening-Plattform sollten am Modellmolekül MHC Klasse I etabliert und nachfolgend zur Quantifizierung des MHC-Gehaltes eines größeren Probensatzes angewendet werden. Dieser Ansatz sollte später für die Vorcharakterisierung von Patientenproben zur Immuntherapie durch Tumor-spezifische Peptid-Vakzinierungen dienen.

Zusätzlich sollten über Daten zur mRNA-Expression ausgewählter Proben (freundlicherweise von S. Stevanović zur Verfügung gestellt) Vergleichsanalysen mit der korrespondierenden Proteinexpression, die durch Protein-Mikroarray-Untersuchungen gewonnen werden sollten, durchgeführt werden.

Neben einer großen Zahl an Nierenzellkarzinomproben standen für diese Doktorarbeit Proben der Organe Prostata, Colon und Rektum zur Verfügung. Mit Hilfe einer etablierten Lysemethode sollten diese Proben durch Einsatz der neu entwickelten Reverse-Screening-Technologie auf die Expression von Markerproteinen untersucht werden, die in der Arbeitsgruppe Stevanović durch HLA-Epitop-Analysen und mRNA-Expressionsanalysen identifiziert wurden. In den Proben sollten zudem die Phosphorylierungsmuster ausgewählter Signaltransduktionsmoleküle analysiert werden. Durch Cluster-Analysen der Gruppen der Tumor- und Normalgewebe sollten die gewonnenen Proteinexpressionsergebnisse, mit Fokus auf die Nierenzellproben, weiterführend interpretiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Puffersysteme

Alle Standardchemikalien (von analytischem Reinheitsgrad) wurden von Merck KGaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Taufkirchen) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

**Tabelle 2: Verwendete Puffer**

Abkürzung	Zusammensetzung
PBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8.0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O bidest. pH 7.4
TBS	10 mM Tris-Hydrochlorid, 150 mM NaCl in H <sub>2</sub> O bidest. pH 7.4
TBST	1x TBS, 0.1% Tween-20
TBST 5% Milchpulver	1x TBST, 5% Milchpulver (Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell)
CLB1	Lysepuffer (Zeptosens, a Division of Bayer (Schweiz) AG Technology Services, Witterswil, Schweiz)
CSBL1	Druckpuffer (Zeptosens)
Assay Buffer	Inkubationspuffer (Zeptosens)
Blocking Buffer	Oberflächen-Blockierungspuffer (Zeptosens)

#### 2.1.2 MHC-Monomere

Die rekombinant hergestellten MHC-Monomere wurden von S. Walter synthetisiert und freundlicherweise von S. Stevanović zur Verfügung gestellt.

Monomer	Spezifität
MHC-Monomer	HLA-A*0201 MUC1 biotinyliert

### 2.1.3 Geräte und Software

**Tabelle 3: Verwendete Geräte**

Verwendung	Produkt / Hersteller
Mikroarrayer	GMS417 Micro-Arrayer / Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
	BioChip Arrayer / PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA
	Nanoplotter NP 1.2 / GeSiM mbH, Großerkmannsdorf, Deutschland
Biochip-Scanner	GMS418 Micro-Array Scanner / Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
	ScanArray Gx / PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA
Auslesegerät für planare Wellenleitertechnologie	ZeptoREADER / Zeptosens
Pipettier-Roboter	Genesis Gemini 100 / TECAN, Hombrechtikon, Schweiz
FPLC-Anlage	SMART / Pharmacia, Uppsala, Schweden
Luminex <sup>100</sup>	Luminex®100™ / Luminex Corp, Austin, TX, USA
Mikrodismembrator	Mikrodismembrator / B. Braun Biotech International, Melsungen
Reinstwasseranlage	MembraPure / MembraPure GmbH, Bodenheim
Spektrometer	Fluostar OPTIMA / BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg
Gelelektrophorese	NuPAGE Gelelektrophorese / Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Geldokumentation	Kodak Image Station 440 CF / Kodak Eastman, Rochester, NY, USA
Gefriertrocknungsanlage	Alpha-1 / Christ, Osterrode
Zentrifugen	Rotanta und Universal 2S Zentrifugen / Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge	5415D Zentrifuge / Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Unitek HB-130 / SEL Laboratory Products, England

**Tabelle 4: Zur Datenanalyse verwendete Software**

Verwendung	Produkt / Hersteller
Datenanalyse allgemein	Origin V6.0 / Microcal, Northhampton, MA, USA
Auswertung planarer Mikroarrays	Imagene V4.0 / BioDiscovery, El Segundo, CA, USA
	ScanArray, QuantArray / PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA
	ZeptoVIEW / Zeptosens

Spektrometer	Fluostar OPTIMA V1.10-0 / BMG Labtechnologies GmbH
Geldokumentation	Kodak Digital Science V3.0.0 / Kodak Eastman Rochester, NY, USA
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 7.0 / Adobe Systems Incorp., San Jose, USA

## 2.1.4 Verwendete Antikörper

**Tabelle 5: Für Immunoassays verwendete Primärantikörper**

Antigen (Klon)	Spezies	Hersteller / Referenz
Actin	Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Adipophilin	Maus	PROGEN, Heidelberg, Deutschland
Carboanhydrase IX	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Carcinoembryonic antigen, CEA	Kaninchen	Labvision, Fremont, CA, USA
cMet	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
EGFR	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
ERK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
HLA-A (HCA2)	Maus	H.L.Ploegh, USA
HLA-A,B,C (W6/32)	Maus	Biotrend/Leinco, Köln, Deutschland
HLA-B,C (HC10)	Maus	H.L.Ploegh, USA
JNK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Ki67	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Muc-1	Maus	Chemicon, Temecula, CA, USA
phospho-ERK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
phospho-JNK	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
PRAME	Ziege	SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
$\beta$ -2-Mikroglobulin	Kaninchen	DakoZytomation, Glostrup, Dänemark
$\beta$ -Actin (AC15)	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
$\beta$ -Catenin	Kaninchen	Biosource, Camarillo, CA, USA
Topoisomerase 2 alpha	Kaninchen	SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Tubulin	Maus	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Zytokeratin-18	Maus	Chemicon, Temecula, CA, USA

**Tabelle 6: Verwendete Sekundärantikörper**

Spezifität	Spezies (Format)	Konjugation	Hersteller	Anwendung
Kaninchen IgG	Ziege (IgG)	HRP	Jackson Dianova, Hamburg, Deutschland	Western Blot
Maus IgG	Ziege (IgG)	HRP	Jackson Dianova, Hamburg, Deutschland	Western Blot
Ziege IgG	Esel (IgG)	HRP	Jackson Dianova, Hamburg, Deutschland	Western Blot
Kaninchen IgG (Fc)	Ziege (Fab)	Alexa 647	Molecular Probes, Eugene, USA	Protein-Mikroarray
Maus IgG (Fc)	Ziege (Fab)	Alexa 647	Molecular Probes, Eugene, USA	Protein-Mikroarray
Ziege IgG (Fc)	Ziege (Fab)	Alexa 647	Molecular Probes, Eugene, USA	Protein-Mikroarray
Kaninchen IgG	Esel (IgG)	R-PE	Jackson Dianova, Hamburg, Deutschland	Protein-Mikroarray

## 2.2 Biochemische Methoden

### 2.2.1 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

In der vorliegenden Arbeit wurde der Proteingehalt der untersuchten Lysate mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Das Prinzip dieses Tests ist die unspezifische Anlagerung des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G250 an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen, was eine Veränderung im Absorptionsverhalten des Farbstoffes bewirkt. Die Proteinbestimmung wurde in Mikrotiter-Platten (96 Kavitäten, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. 10 µl Lysat (in einer Verdünnung von 1:20 bis 1:50) wurden mit 300 µl 1x Bradford Reagenz (Coomassie Plus; PIERCE, Rockford, IL, USA) versetzt. Zu jeder Messreihe wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Standardprotein BSA durchgeführt. Die BSA-Konzentration der Messpunkte betrug hierbei zwischen 25 µg/ml und 1000 µg/ml (in PBS). Der Abgleich erfolgt gegen einen Reagenzien-Leerwert (Puffer CLB1; Zeptosens, Witterswil, Schweiz). Nach 10-minütiger Inkubationszeit bei Raum-

temperatur erfolgte die Absorptionsmessung im Spektrometer Fluostar OPTIMA (MWG Biotech, München) bei 570 nm. Mit Hilfe der geräteeigenen Software wurden anhand der über die BSA-Verdünnungsreihe geeichten optischen Dichte der Proben die Proteinkonzentrationen ermittelt.

### 2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche, denaturierende Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in dieser Doktorarbeit mit dem LDS-(Lithiumdodecylsulfat)-NuPAGE-Elektrophorese-System der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Das neutrale Milieu der vorgefertigten Gele sorgt während der Elektrophorese für maximale Stabilität der Gelmatrix und der Proteine. Die untersuchten Proben wurden 1:4 mit 4x Probenpuffer (106 mM Tris HCl, 141 mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris), 2% LDS, 10% Glycerol, 0.51 mM EDTA, 0.22 mM SERVA® Blue G250, 0.175 mM Phenol Red, pH 8.5) und 1:10 mit 10x Reduktionsmittel (500mM Dithiothreitol) versetzt und zur Denaturierung 10 min bei 70°C erhitzt. Während der Elektrophorese betrug die Spannung konstant 200 V, die Stromstärke 70-125 mA, der verwendete Laufpuffer setzte sich aus 50 mM MES, 50 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA in H<sub>2</sub>O bidest. pH 7.3 zusammen. Die Laufzeit betrug ca. 45 min. Zur Größenreferenzierung wurde in einer Spur ein Proteinstandard (4 µl, SeeBlue Plus2 Pre-Stained Marker (4 - 250 kDa); Invitrogen) aufgetrennt. Es wurden 4-12% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gradientengele (Dicke 1mm) sowie 4-20% Bis-Tris-Polyacrylamid- Gradientengele (Dicke 1mm) zur Analyse verwendet.

### 2.2.3 Western-Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zur weiteren Analyse in einer *Blot*-Apparatur (XCell II™ Blot Module; Invitrogen) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Protran 0.22 µm, Schleicher und Schuell, Keene, NH, USA) transferiert. Hierzu wurden auf die Kathode der Transferzelle zwei mit vorgekühltem Transferpuffer (25 mM N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin, 25 mM [Bis(2-Hydroxyethyl)imino]-tris(hydroxymethyl)methan, 1 mM EDTA, 10% Methanol, pH 7,2; Invitrogen) getränkte Schwämme gelegt, die von dem Gel und der Membran zwischen zwei puffergetränkten Filterpapieren (Schleicher und Schuell) sowie drei weiteren puffergetränkten Schwämmen bedeckt wurden. Die Zelle wurde mit der Anodenplatte ver-

schlossen. Es wurde mit konstanter Spannung bei 25 V über 1 h transferiert, die Stromstärke betrug zwischen 110 und 170 mA.

#### 2.2.3.1 Ponceau S-Färbung von Proteinen auf Western-Blot-Membranen

Für die reversible Färbung der Proteine auf Western-Blot-Membranen wurde eine Ponceau S-Lösung (0,1% (w/v) in 5% Essigsäure) verwendet. Nach 5-minütiger Inkubation in der Färbelösung wurden die Membranen kurz mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und auf der Kodak Image Station ausgelesen. Für die weitere Verwendung in der Western-Blot-Entwicklung wurden die Ponceau S-gefärbten Membranen zweimal 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und somit entfärbt.

#### 2.2.3.2 Antikörper-Inkubation auf Western-Blot-Membranen

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in einem 50 ml-Gefäß (Falcon, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) mit 10 ml Blockierungslösung (TBST: 10mM TBS, 0,1% Tween-20; mit 5% Milchpulver) inkubiert, wobei die Durchmischung auf einem Rollenmischer (RM5, Assistent, Sondheim, Deutschland) erfolgte. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation der Membran in der gewählten Primärantikörper-Lösung (in 10ml TBST) über Nacht bei 4-8°C. Es folgten drei Waschschrte à fünf min mit TBST. Die Membran wurde dann für 1 h mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem Zweitantikörper (gelöst in Blockierungslösung) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten à 10 min wurde die Detektion des Proteins durch Zugabe der Entwicklungslösung (SuperSignal West Pico; PIERCE) gestartet. Die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase oxidiert das zyklische Diacylhydrazid-Luminol unter Lichtemission ( $\lambda = 428 \text{ nm}$ ). Das Auslesen dieser Lichtemission erfolgte an einer Image-Station (Image Station 440 CF, Kodak, Rochester, NY, USA). Das resultierende Bild wurde mit der geräteeigenen Software Kodak Digital Science 1D analysiert.

#### 2.2.3.3 Western-Blots zur Antikörper-Charakterisierung

Zur Charakterisierung von Antikörpern hinsichtlich ihrer Spezifität (Erkennen des erwarteten Molekulargewichts bzw. Anzahl detektierter Banden) wurden jeweils 400 µg Zell- oder Gewebelysats per LDS-PAGE (4-20% Bis-Tris-Polyacrylamid-Gele 2D-Well) aufgetrennt und wie beschrieben auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (s.o.). Diese Membranen wurden in 0,5 cm breite Streifen geschnitten, auf denen zu-

sätzlich die Banden der aufgetrennten Markerproteine markiert wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Membranen lichtgeschützt und trocken bei Raumtemperatur gelagert.

#### 2.2.3.4 Mehrfach-Inkubation von Western-Blot-Membranen

Einmal verwendete Western-Blot-Membranen wurden teilweise zur erneuten Antikörperinkubation herangezogen. Die Behandlung solcher Membranen wird im Folgenden beschrieben. Direkt nach dem Auslesen der Lichtemission der ersten Messung erfolgte ein Waschschrift der Western-Blot-Membran mit TBST für 5 min. Die Membran wurde daraufhin für 15 min mit *Re-Blot Plus Mild Antibody Stripping Solution* bzw. *Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution* (Chemicon, Temecula, CA, USA) bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert. Nach zwei Waschschriften mit TBST 5% Milchpulver für jeweils 5 min war die Membran zur wiederholten Inkubation mit einem Primärantikörper bereit.

**Tabelle 7: Für Immunoassays (Western-Blots, Protein-Mikroarrays) verwendete Antikörperkonzentrationen**

Antigen (Klon)	Verdünnung / Konzentration	Verdünnung / Konzentration
	Western-Blot	Protein-Mikroarray
Primärantikörper		
Actin	1 : 2000	1 : 1000
Adipophilin	0.1 µg/ml	1 : 500
Carboanhydrase IX	1 : 1000	1 : 200
Carcinoembryonic antigen (CEA)	1 : 200	1 : 200
cMet	1 : 2000	1 : 200
EGFR	1 : 2000	1 : 500
ERK	1 : 1000	1 : 500
HLA-A (HCA2)	1 µg/ml	1 µg/ml
HLA-A,B,C (W6/32)	1 µg/ml	1 µg/ml
HLA-B,C (HC10)	0.5 µg/ml	1 µg/ml
JNK	1 : 1000	1 : 500
Ki67	1 : 1000	1 : 200
Muc-1	1 : 500	0.5 µg/ml
phospho-ERK	1 : 1000	1 : 500

phospho-JNK	1 : 1000	1 : 500
PRAME	1 : 1000	1 : 200
β2-Mikroglobulin	0.5 µg/ml	1 µg/ml
β-Actin	1 : 2000	1 : 1000
β-Catenin	1 : 2000	1 µg/ml
Topoisomerase 2 alpha	1 : 1000	1 : 200
Tubulin	1 : 2000	1 µg/ml
Zytokeratin-18	1 : 1000	1 : 500
<hr/>		
Sekundärantikörper		
<hr/>		
Spezifität / Konjugation	Verdünnung / Konzentration Western-Blot	Verdünnung / Konzentration Protein-Mikroarray
<hr/>		
anti-Kaninchen IgG-HRP	1 : 5000	
anti-Maus IgG-HRP	1 : 5000	
anti-Ziege IgG-HRP	1 : 5000	
Kaninchen IgG (Fc-spezifisch)-Alexa-647		1 : 500
Maus IgG (Fc-spezifisch)-Alexa-647		1 : 500
Ziege IgG (Fc-spezifisch)-Alexa-647		1 : 500
anti-Maus IgG-PE		1 : 5000
anti-Kaninchen IgG-R-PE		4 µg/ml

## 2.2.4 Herstellung von Gewebelysaten

### 2.2.4.1 Verwendetes Zell- und Gewebematerial

Aus Resektaten verschiedenen Tumorarten (Nierenzellkarzinom (RCC, *renal cell carcinoma*), Colonkarzinom (CCA, *colon carcinoma*), Rektumkarzinom (RCA, *rectum carcinoma*), Prostatakarzinom (ProCa, *prostate carcinoma*), Glioblastom (GB, *glioblastoma*)) und korrespondierendem Normalgewebe wurden Gewebelysate gewonnen (Krüger 2005). Das Material wurde für die Arbeitsgruppe Stevanović von der Urologischen Abteilung des Universitätsklinikum Tübingen zur Verfügung gestellt. Nach schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten wurden die Proben direkt nach operativer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die pathologische Charakterisierung der Gewebe

wurde von der Pathologischen Abteilung, die HLA-Typisierung von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen durchgeführt. Die örtliche Ethikkommission erklärt sich mit den durchgeführten Studien einverstanden. Zellkulturpellets wurden von P. Hrstic präpariert. Alle Proben wurden freundlicherweise von S. Stevanović für diese Doktorarbeit zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.4.2 Lyse unter nativen Bedingungen

Gefrorene Zellpellets (20 -100 ml) und schockgefrorene, solide Gewebeproben wurden mit einem Volumenteil Lysepuffer (2x; PBS; 0,6% CHAPS; pro 200 ml Pufferlösung 3 Tabletten Proteaseinhibitoren „complete“ (Roche, Basel, Schweiz)) versetzt und unter langsamen Rühren bei 4°C aufgetaut. Solides Gewebe wurde zusätzlich a priori in einem Mixer und dann in einem Potter zu einem Homogenat verarbeitet. Nach dem Auftauen der Proben wurde ein weiterer Volumenteil einfach konzentrierter Lysepuffer hinzugefügt und die Zellsuspension oder das aufgeschlossene Gewebe für 60 min bei 4°C verstärkt gerührt. Der weitere Aufschluss erfolgte im Dounce-Homogenisator durch 5 Kolbenstöße bei großem Spalt (50-70 µm) und 20 Stöße bei kleinem Spalt (10-30 µm). Nach Zugabe eines weiteren Volumens Lysepuffer wurde erneut 60 min gerührt. Das erhaltene Lysat wurde erst 20 min bei 4000 rpm (ca. 3000 g), 4°C (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R) und der Überstand dann 1 h bei 40000 rpm, 4°C (Beckman L-80 Ultracentrifuge, Rotor Ti45) zentrifugiert. Die gewonnenen Pellets wurden verworfen. Der verbliebene Überstand der Ultrazentrifugation wurde im Anschluss sterilfiltriert (0,2 µm).

**Tabelle 8: Zell- und Gewebeproben zur Lyse unter nativen Bedingungen.** RCC = renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom), CCA = colon carcinoma (Colonkarzinom), GB = glioblastoma (Glioblastom).

Zelllinie	Zelltyp	
DEU	EBV- transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie	
BM14	EBV- transformierte humane lymphoblastoide Zelllinie	

Gewebeprobe (Nummer)	Organ	
76	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
81	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
92	Niere, RCC	Tumorgewebe

---

98	Niere, RCC	Tumorgewebe
704	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
134	Dickdarm (Colon), CCA	Normal- und Tumorgewebe
135	Dickdarm (Colon), CCA	Normal- und Tumorgewebe
136	Dickdarm (Colon), CCA	Normal- und Tumorgewebe
139	Dickdarm (Colon), CCA	Normalgewebe
140	Dickdarm (Colon), CCA	Tumorgewebe
142	Dickdarm (Colon), CCA	Normal- und Tumorgewebe
143	Dickdarm (Colon), CCA	Tumorgewebe
148	Dickdarm (Colon), CCA	Normal- und Tumorgewebe
359	Glioblastom, GB	Tumorgewebe
361	Glioblastom, GB	Normalgewebe

#### 2.2.4.3 Lyse unter denaturierenden Bedingungen

Die tiefgefrorenen, soliden Gewebeproben wurden unter flüssigem Stickstoff mit Pistill und Mörser zu einem Gewebepulver zerkleinert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein Minimum von 20-30 mg Gewebepulver wurde mit einem 5-fachen Überschuss des Lysepuffers (CLB1, Zeptosens, Witterswil, Schweiz) zur vollständigen Denaturierung behandelt. Die Lyse erfolgte bei Raumtemperatur in 1,5 ml Reaktionsgefäßen auf einem Schüttler (650 rpm; Thermomixer Comfort; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Proben wurden anschließend bei 15000 rpm für 10 min zentrifugiert (5415D Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Überstände der Lysate wurden abgenommen, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Tiefgefrorene Zellproben (ca.  $1 \times 10^7$  Zellen pro Pellet) wurden mit 200  $\mu\text{l}$  Lysepuffer CLB1 inkubiert und entsprechend der Lyse-Prozedur für Gewebeproben weiterbehandelt. Die Gewebe- und Zelllysate wurden zusammen mit den Pellets bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

**Tabelle 9: Zell- und Gewebeproben zur Lyse unter denaturierenden Bedingungen.** RCC = Renal Cell Carcinoma (Nierenzellkarzinom), CCA = Colon Carcinoma (Colonkarzinom), RCA = Rectum Carcinoma (Rektumkarzinom). Die mittels mRNA-Expressionsanalyse (Affymetrix-Chip-Technologie) in der Arbeitsgruppe Stevanović charakterisierten Proben sind neben der jeweiligen Probennummer mit „Ax“ gekennzeichnet.

Zelllinie	Zelltyp	
A431	humane Platten-Epithelkarzinom-Zelllinie	
HeLa	humane Cervix-Epithelkarzinom-Zelllinie	
Jurkat	humane, leukämische T-Zell-Lymphom-Zelllinie	
JY	EBV- transformierte, humane, lymphoblastoide Zelllinie	
LCL	EBV- transformierte, humane, lymphoblastoide Zelllinie	
WILJON	EBV- transformierte, humane, lymphoblastoide Zelllinie	

Gewebeprobe (Nummer)	Organ	
6	Niere, RCC	Tumorgewebe
11	Niere, RCC	Tumorgewebe
12	Niere, RCC	Tumorgewebe
23	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
24	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
25	Niere, RCC	Tumorgewebe
26	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
27	Niere, RCC	Normalgewebe
28	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
29	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
30	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
34	Niere, RCC	Tumorgewebe
35	Niere, RCC	Tumorgewebe
38	Niere, RCC	Normalgewebe
44	Niere, RCC	Normalgewebe
45	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
46	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
47	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
48	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
49	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
51	Niere, RCC	Normalgewebe
58	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe

59	Niere, RCC	Normalgewebe
71	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
44 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
70 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
98 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
99	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
100 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
103 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
110 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
119 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
130 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
133 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
180 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
182 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
190 Ax	Niere, RCC	Normal- und Tumorgewebe
190M1 Ax	Niere, RCC	Tumorgewebe (Metastase1)
190M2 Ax	Niere, RCC	Tumorgewebe (Metastase2)
21	Rektum, RCA	Normal- und Tumorgewebe
23	Rektum, RCA	Normal- und Tumorgewebe
26	Rektum, RCA	Normal- und Tumorgewebe
7	Dickdarm (Colon), CCA	Normal- und Tumorgewebe
17	Dickdarm (Colon), CCA	Normalgewebe
18	Dickdarm (Colon), CCA	Normalgewebe
21	Dickdarm (Colon), CCA	Normalgewebe

### 2.2.5 Biotinylierung von Proteinen

Zur Biotinylierung von Proteinen wurde N-Hydroxy-Succinimid (NHS) aktiviertes Biotin (EZ-Link NHS-LC-LC-Biotin, 5.5 µl, 2 mg/ml in DMSO; PIERCE, Rockford, USA) in 50-fach molarem Überschuss zur Proteinlösung (50 µl, 1 mg/ml in PBS) gegeben und gemischt. Die Reaktion wurde über 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Freies, ungebundenes Biotin wurde mit Hilfe von Gelfiltrationssäulen (Centrispin, Princeton Separations) abgetrennt. Dazu wurde das Gelmaterial der Säulen zunächst mit PBS (650 µl) äquilibriert. Auftretende Luftblasen im Gelbett wurden durch kräftiges Mischen entfernt. Das Gel der Filtrationssäulen quoll anschließend für 30 min bei Raumtemperatur. Vor der Auftrennung der Proben wurde die Säule 2 min bei

3000 rcf (750 rpm) in einer Zentrifuge (Eppendorf 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, worauf der erste Durchlauf verworfen wurde und der Reaktionsansatz aufgetragen werden konnte. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 3000 g) wurde das proteinhaltige Eluat entnommen. Das biotinylierte Protein wurde bei -20°C gelagert. Diese Methode fand in dieser Doktorarbeit auch zur Biotinylierung von Antikörpern Anwendung. Die Lösungen der biotinylierten Antikörper wurden in 50% Glycerin in Puffer bei -20°C gelagert.

### **2.2.6 Fluoreszenz-Markierung von Proteinen**

Zur Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden die NHS-aktivierten Farbstoffe Cy5- und Cy3 (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) verwendet. Um in mehrfachem, molaren Farbstoff-Überschuß Proteine zu modifizieren, wurde eine Packungseinheit (100µg) an Fluoreszenz-Farbstoff zur Proteinlösung (100 µl, 1 mg/ml in PBS mit 5 µl Kopplungspuffer: 1 M Natriumcarbonatpuffer pH 9,3) gegeben. Die Reaktion erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur, wobei alle 10 min durchmischt wurde. Nicht reagierter, freier Farbstoff wurde gemäß 2.2.5 mit Hilfe von Gel-filtrationssäulen abgetrennt. Diese Methode wurde für diese Doktorarbeit zur Fluoreszenz-Markierung von Antikörpern und dem Protein BSA verwendet. Die Fluoreszenz-markierten Proben wurden wie unter 2.2.5 beschrieben bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## **2.3 Protein-Mikroarray-Technologien**

### **2.3.1 Herstellung von Protein-Mikroarrays**

Zur Herstellung der planaren Protein-Mikroarrays wurden kontaktlose, piezoelektrische Mikrodosiersysteme, genannt Mikroarrayer, eingesetzt, die Volumina im Pico- bis Nanoliterbereich reproduzierbar dosieren können. Es wurden die Mikroarrayer-Systeme Biochip-Arrayer (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) und Nanoplotter NP1.2 (GeSiM mbH, Großerkmannsdorf, Deutschland) zur Herstellung von Protein-Mikroarrays verwendet.

#### **2.3.1.1 Protein-Mikroarrays auf Standard-Mikroarray-Substraten**

Für das Bedrucken von Standard-Mikroarray-Substraten der Größe 25 x 75 mm wurde das Biochip-Arrayer-System verwendet. Proteinhaltige Lösungen wurden mit dem

Biochip-Druckpuffer (0.01% Bromphenolblau, 100 µg/ml BSA Fraktion V bei Verwendung rekombinanter Proteine) auf die entsprechende Druckkonzentration eingestellt und in die Kavitäten einer Mikrotiter-Platte (384 Kavitäten, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Es wurden jeweils 20 µl Lösung in die entsprechenden Kavitäten vorgelegt. Zur Festlegung der Anordnung der Protein-Spots auf dem Mikroarray-Substrat und der entsprechenden Position der Lösung in der Mikrotiter-Platte wurde die Software BCTable 3.2 (Perkin Elmer) verwendet. Mittels der geräteeigenen Steuerungssoftware wurden Protein-Mikroarrays auf Mikroarray-Substrate gedruckt. Der Druckvorgang fand unter Reinraumbedingungen (Klasse 100) bei konstanter Luftfeuchtigkeit (~ 65%) und 20°C statt. Das gedruckte Volumen eines Mikrosports betrug 330 pl. Der Abstand zwischen den einzelnen Spots in x- und y-Dimension betrug stets 375 µm. Auf einem Mikroarray-Substrat wurden die Proteine in 6 - 12 identischen Einheiten, den so genannten Sub-Arrays, angeordnet. Nach Beendigung des Druckprozesses wurden die Arrays in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer über Nacht gelagert, wobei die bedruckte Seite der Mikroarray-Substrate nach unten zeigte. Zur weiteren Stabilisierung und zur Lagerung der Protein-Mikroarrays wurden die einzelnen Sub-Arrays mit einem Fettstift (PAP Pen (*liquid repellent slide marker pen*, SCS Science Services, München) umrandet und die damit entstandenen Inkubationsflächen mit jeweils 60-80 µl Blockierungspuffer (1.5% BSA (Fraktion V), 5% Milchpulver, 0.1% Tween-20 in PBS) bei Raumtemperatur für 2 h behandelt. Überschüssige Lösung wurde entfernt. Die Mikroarray-Substrate wurden lichtgeschützt und trocken bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

**Tabelle 10: Verwendete Standard-Mikroarray-Substrate der Größe 25 x 75 mm**

Mikroarray-Substrate	Oberflächenaktivierung	Wechselwirkung mit Proteinen	Hersteller
CodeLink	Amino-reaktive, hydrophile Polymere	Kovalent (über Aminofunktionen)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
CSS silylated slides	Aldehyd-Gruppen	Kovalent (über Aminofunktion)	CEL Associates Telechem Int. Sunnyvale, CA, USA

FAST slides	Nitrozellulose-Polymer	Adsorption	Schleicher & Schüll, Keene, NH, USA
GAPS II	Aminosilan	Ionostatische Interaktion	Corning, Acton, MA, USA
Hydrogel-coated slides	Modifizierte Polyacrylamid-Gelmatrix	Adsorption (Interaktion mit 3D-Matrix)	PerkinElmer, Boston, MA, USA
NucleoLink	Aktiviertes, hitzestabilisiertes Polymer	hydrophobe Interaktion	Nunc GmbH & Co., Wiesbaden, Deutschland
Poly-Prep Slides	Poly-L-Lysin	Adsorption, ionostatische Interaktion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Quantifoil	Epoxy	Kovalent (über Amino-, Thiol- oder Hydroxyl-Funktionen)	Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, GmbH

### 2.3.1.2 Protein-Mikroarrays auf Zeptosens-Mikroarray-Substraten

Für das Drucken von Proteinmikroarrays auf Mikroarray-Substraten der Größe 14 x 57 mm (ZeptoMARK *hydrophobic substrates*, Zeptosens) wurde das Nanoplotter-System verwendet. Diese Zeptosens-Mikroarray-Substrate wiesen neben der im Vergleich zu Standard-Mikroarray-Substraten unterschiedlichen Größe, weitere Charakteristika auf: a) die Oberflächenstruktur wurde durch Alkylphosphate gebildet, die Proteinimmobilisierung über hydrophobe Wechselwirkungen ermöglichte (Textor 2000), b) in die Substrate waren Beugungsgitter zur Fluoreszenzdetektion mittels Planarer Wellenleitertechnologie eingätzt (Heyse 1995; Pawlak 2002a). Die Proteinlösungen wurden mit Lysepuffer (CLB1, Zeptosens) auf die 10-fache Druckkonzentration (4 mg/ml) eingestellt und in Mikrotiter-Platten (96 Kavitäten, Greiner) vorgelegt. Mittels eines Pipettierroboters (Genesis Gemini 100, Tecan, Hombrechtikon, Schweiz; Steuerungssoftware Gemini 3.5) wurden die Proben aus der Mikrotiter-Platte (96 Kavitäten) mit dem Druckpuffer (CSBL1, Zeptosens) auf die Druckkonzentrationen von 0.4, 0.25, 0.16 und 0.1 mg/ml verdünnt. Anschließend wurden pro Verdünnung je 25 µl Lösung in eine weitere Mikrotiter-Platte (384 Kavitäten, Greiner) überführt. Das Nanoplotter-System wurde nun mit der Mikrotiter-Platte (384 Kavitäten) bestückt. Mittels der Steuerungssoftware (npC8, GeSiM) wurden Protein-

Mikroarrays auf Mikroarray-Substraten hergestellt. Der Druckvorgang fand unter Reinraumbedingungen (Klasse 100) bei konstant gehaltener Luftfeuchtigkeit (~ 65%) und 20°C Raumtemperatur statt. Das abgesetzte Volumen der Proben betrug ca. 0,4 nl. Der Abstand zwischen den einzelnen Spots betrug in x-Dimension 280 µm und in y-Dimension 300 µm. Auf einem Mikroarray-Substrat wurden jeweils 6 Sub-Arrays gedruckt, die auf zwei Arten angeordnet werden konnten. Es wurden zum einen 6 identische Sub-Arrays aus jeweils 40 Proben à 4 Konzentrationsstufen hergestellt, zum anderen wurden 3x 2 identische Sub-Arrays hergestellt, wobei insgesamt 80 Proben à 4 Konzentrationsstufen auf einem Mikroarray-Substrate immobilisiert wurden. Nach Beendigung des Druckprozesses wurden die Objektträger für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zeptosens-Mikroarray-Substrate für 30 min in Blockierungspuffer (Zeptosens) oder einer 1-prozentigen Tween-20-Lösung (in PBS) bei Raumtemperatur in einem Ultraschallvernebler (Blocking Device, Zeptosens) behandelt. Die bedruckten und blockierten Träger wurden abschließend mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und mit N<sub>2</sub> trockengeblasen. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Mikroarray-Substrate lichtgeschützt und trocken bei 4 – 8°C gelagert.

### **2.3.2 Anfärbung von Proteinen auf Mikroarray-Substraten**

Um auf Mikroarray-Substraten immobilisierte Proteine mit einem Fluorophor zu markieren, wurde NHS-Alexa647 (Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit A-20186, Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Eine Packungseinheit des Farbstoffes (1 mg) wurde in 1.2 ml wasserfreiem DMSO gelöst, aliquotiert (à 12 µl) und bei -20°C in lichtgeschützten Reaktionsgefäßen unter Ausschluss von Feuchtigkeit gelagert. Tween-20-blockierte Protein-Mikroarrays wurden für 10 min in Reaktionspuffer (50 mM Natriumcarbonat pH 9.3, 0.1% Tween-20 in PBS) vorinkubiert. Zur Erfassung von Kontrollbildern vor der Proteinfärbung wurden alle Sub-Arrays bei 635 nm im ZeptoREADER (Belichtungszeit von 1 s, Graufilterstufen von 0.1 bis 1) ausgelesen. Zur Färbung der Proteine wurde ein Aliquot Fluoreszenzfarbstoff in 1.2 ml Reaktionspuffer aufgenommen. Jede Inkubationskammer (entsprechend einem Sub-Array) wurde mit jeweils 200 µl befüllt und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Färbereaktion durch zügiges Waschen mit 3x 200 µl TBST gestoppt. Die Mikroarray-Substrate wurden mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit N<sub>2</sub> trockengeblasen. Zur Detektion der Proteinfärbung bei 635 nm im Zepto-

READER (Belichtungszeit von 1 s, Graufilterstufen von 0.1 bis 1) wurden die Mikroarray-Substrate erneut mit Reaktionspuffer inkubiert.

### 2.3.3 Assaysysteme auf Mikroarray-Substraten

Für die Durchführung von Antikörper-Assays wurden für die verwendeten Protein-Mikroarray-Systeme zwei Protokolle entwickelt. Alle Antikörperinkubationen fanden stets bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss statt.

a) Zur Durchführung eines Assays auf Standard-Mikroarray-Substraten wurden die einzelnen Inkubationsflächen vor der Inkubation mit Primärantikörper-Lösung mit Waschpuffer (TBST) für 5 min rehydriert. Anschließend wurden die Antikörperlösungen in den entsprechenden Verdünnungen (siehe Tabelle 7) appliziert und über 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Es folgten mindestens 3 Waschschritte bei denen jeweils 60 µl Waschpuffer pro Feld verwendet wurde. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Flüssigkeit vom Mikroarray-Substrate abgeklopft. Die anschließende Sekundärantikörperinkubation erfolgte für 45 min. Nach erneutem Waschen (3x 60 µl) wurden die Mikroarray-Substrate intensiv mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und unter N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

b) Für Versuche mit Zeptosens-Mikroarray-Substraten wurden die Mikroarray-Substrate mit der bedruckten Seite nach oben in eine spezielle Halterungsvorrichtung (ZeptoCARRIER, Zeptosens) eingelegt, mit einer Flusszelle (Zeptosens) bedeckt und verschraubt. Die einzelnen Sub-Arrays waren sodann durch O-Ringe abgetrennt und konnten einzeln über Öffnungen in der Flusszelle mit Lösungen versehen werden.

Nach einer 5-minütigen Rehydrierung der Arrays mit Assay-Puffer (Zeptosens) wurden die Kammern mit Primär-Antikörper-Lösung versehen. Die Inkubationsdauer betrug 14 – 18 Stunden, wobei die Bindemoleküle in den in Tabelle 7 angegebenen Verdünnungen verwendet wurden. Anschließend wurden die einzelnen Kammern mit insgesamt 400 µl Assay-Puffer (Zeptosens) durchspült und über eine Absaugvorrichtung (Vacuboy, IBS Integra Biosciences, Wallisellen, Schweiz) entleert. Die Zweitantikörper-Lösung (1 : 500 in Assay-Puffer) wurde eingebracht und nach 45 min Inkubation entfernt. Die Kammern wurden erneut zweimal durchspült, entleert und zur Signalmessung der Arrays mit Assay-Puffer (200 µl) befüllt. Zur Fluoreszenzdetekti-

on der Sub-Arrays bei 635 nm wurde der ZeptoREADER (Zeptosens) anschließend mit dem ZeptoCARRIER bestückt.

### **2.3.4 Verfahren zur Fluoreszenzdetektion von planaren Protein-Mikroarrays**

#### **2.3.4.1 Konfokale Laser-Scanner-Technologie: Fluoreszenzdetektion von Standard-Mikroarray-Substraten**

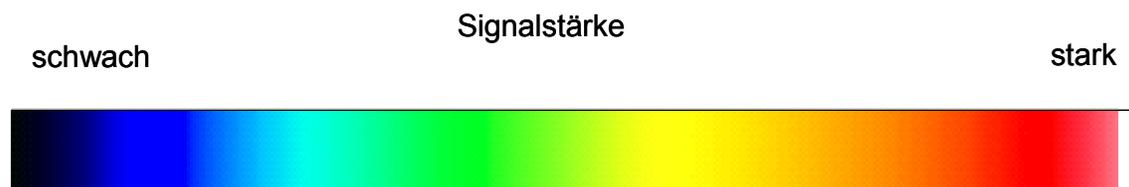
Die auf Standard-Mikroarray-Substrate untersuchten, trockenen Protein-Mikroarrays wurden in einem Mikroarray-Scanner (GMS 418, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) mit 10  $\mu\text{m}$  Auflösung unter Verwendung des Fluorophor-spezifischen Fluoreszenzkanals ausgelesen. So wurde bei Cy5- bzw. Alexa647-Fluorophoren zur Anregung die Wellenlänge 635 nm des roten Lasers und bei Cy3- bzw. Phycoerythrin-Fluorophoren die Wellenlänge 532 nm des grünen Lasers verwendet. Die maximale Laserintensität und die Verstärkung des Photomultipliers wurden dem resultierenden Fluoreszenzsignal-Spektrum angepasst, d.h. es wurde das maximale Signal-/Rausch-Verhältnis angestrebt, ohne dass „gesättigte“ Spots (Signale mit  $2^{16}$  Fluoreszenz-Einheiten) auftraten. Zur weiteren Bildverarbeitung wurden 16-bit Tiff-Dateien mit der geräteeigenen Steuerungs-Software generiert. Diese Dateien wurden mittels der Bildprozessierungs-Software Microarray Imogene V4.0 (Biodiscovery, El Segundo, CA, USA) ausgewertet. Für jeden Analysepunkt (Spot) wurde der Median der relativen Fluoreszenzeinheiten (MFU, median fluorescence units) gebildet.

#### **2.3.4.1 Planare Wellenleiter-Technologie: Fluoreszenzdetektion von Zeptosens-Mikroarray-Substraten**

Im Gegensatz zu den konfokalen Fluoreszenz-Scannern wurde zur Fluoreszenzdetektion der Zeptosens-Mikroarray-Substrate die Planare Wellenleitertechnologie (Planar Waveguide (PWG) oder Evaneszent-Feld-Technologie) eingesetzt. Die Fluoreszenz-Signale wurden durch eine CCD-Kamera als Vollbild aufgenommen und als 16-bit-Tiff-Datei abgespeichert. Die Bildanalyse und Auswertung erfolgte mit der Auswertungs-Software ZeptoVIEW™ (Zeptosens). Für jeden Analysepunkt (Spot) wurde der Mittelwert der relativen Fluoreszenzeinheiten (MFU, median fluorescence units) gebildet.

### 2.3.4.2 Bildhafte Darstellung von Protein-Mikroarrays

Zur bildhaften Darstellung der verschiedenen Antikörper-Detektionen auf den untersuchten Protein-Mikroarrays wurden für das jeweilige Kapitel dieser Studie so genannte Falschfarbenbilder mit der Bildbearbeitungs-Software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorp.) generiert. Die durch die unterschiedlichen Detektionsverfahren generierten 16-bit Tiff-Dateien wurden auf 8-bit Tiff-Dateien komprimiert und auf eine Falschfarben-Skala bezogen (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Falschfarbenskala.** Die Übersetzung starker Assay-Signale in eine so genannte Falschfarbe ergibt weiße bzw. rote Farben, schwache Signale ergeben blaue bzw. grüne Farben.

### 2.3.5 Datenanalyse und statistische Verfahren

#### 2.3.5.1 Quantifizierung des MHC-Gehaltes von Proben

Jeder Protein-Mikroarray, dessen Proben (Zellkultur- oder Gewebeproben) auf den Gehalt an MHC untersucht werden sollte, enthielt eine Eichreihe von MHC-Monomeren. Die Mittelwerte der Spot-Duplikate der Antigenkonzentration wurden zur linearen Regression in der Auswertungs-Software Origin 6.0 (Microcal) verwendet. Der Mittelwert aus den Messpunkten der Zell- oder Gewebeproben wurde berechnet und der MHC-Gehalt über die Standardkurve quantifiziert.

#### 2.3.5.2 Fehlerfortpflanzung

Da bei der Berechnung der proteinnormierten Signale der Zell- oder Gewebeproben verschiedene fehlerbehaftete Größen miteinander betrachtet werden, war es notwendig den resultierenden Fehler durch die Fehlerfortpflanzung zu bestimmen:

Der Einfluss einer fehlerbehafteten Größe  $x$  auf das Endergebnis kann abgeschätzt werden, indem man das Endergebnis als Funktion von der fehlerbehafteten Größe betrachtet, nach dieser ableitet und mit dem absoluten Fehler der fehlerbehafteten Größe multipliziert:

$$y = y(x) \Rightarrow \Delta y = \left| \frac{dy}{dx} \right| \cdot \Delta x$$

**Abbildung 11: Formel zur Berechnung des Fehlers in Abhängigkeit von einer fehlerbehafteten Größe.**

Fließen mehrere fehlerbehaftete Größen  $x_i$  bei der Ermittlung von  $y$  ein, so werden deren Einflüsse auf  $y$  quadratisch addiert, solange die Fehler der  $x_i$  unabhängig voneinander sind, sich also nicht gegenseitig beeinflussen:

$$y = y(x_1, x_2, \dots, x_n) \Rightarrow \Delta y^2 = \sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \Delta x_i^2 \Rightarrow \Delta y = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 \cdot \Delta x_i^2}$$

**Abbildung 12: Formel zur Berechnung des Fehlers in Abhängigkeit von mehreren fehlerbehafteten Größen.**

### 2.3.5.3 Clusteranalyse komplexer Datensätze

Zur Analyse komplexer Datensätze (in dieser Studie angewandt für die Untersuchung von mehr als 20 verschiedene Proteinmarker in mehr als 80 Gewebeprobe) wurde die so genannte Clusteranalyse verwendet, um einen sehr großen Datensatz (hier: mehr als 1600 Datenpunkte) anschaulich darstellen zu können.

Unter Clusteranalyse versteht man verschiedene multivariante Verfahren der Datenanalyse für die Ermittlung von Gruppen (*Cluster*) zusammengehöriger Objekte aus einer Grundmenge von numerisch beschriebenen Objekten. Die Objekte können beispielsweise Datensätze von Messwerten oder Bildpunkte sein, in denen geordnete Ansammlungen oder Hierarchien gefunden werden sollen. Dafür verwendete Daten-*clustering* Algorithmen können hierarchisch oder partitionierend sein. Je nach Algorithmus muss eine Distanzfunktion zur Bestimmung des Abstands zweier Elemente  $d(a,b)$ , zum Beispiel die euklidische Distanz, bekannt sein.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Aufbau einer Reverse-Screening-Plattform

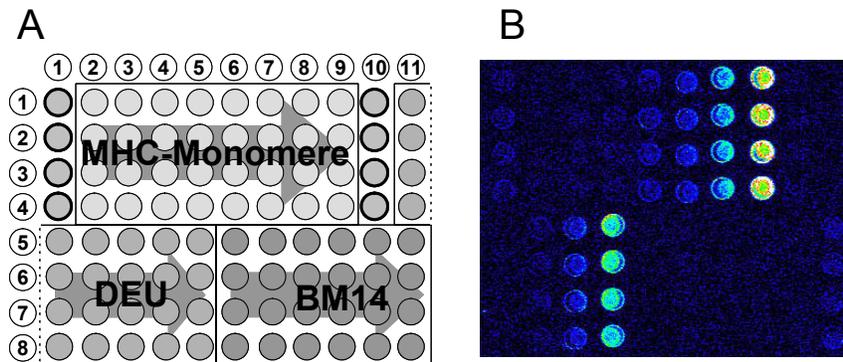
Zur Proteinquantifizierung und Expressionsanalyse wurde mit Hilfe von Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays eine Screening-Plattform aufgebaut. Durch die Verwendung rekombinanter Proteine und Zellkultur- bzw. Gewebelysaten wurden verschiedene Anbindungschemien untersucht. Hierfür wurden die rekombinanten, aufgereinigten MHC-Monomere und die Lysate in Verdünnungsreihen auf Standard-Mikroarray-Substraten verschiedener Hersteller immobilisiert. Die Substrate wurden hinsichtlich der Protein-Anbindung, der Linearität der Mess-Signale der Verdünnungsstufen und der Nachweisgrenze charakterisiert.

#### 3.1.1 Validierung verschiedener Mikrarray-Substrate

Die im Methodenteil (Tabelle 10) beschriebenen Mikroarray-Substrate wiesen verschiedenste Oberflächenbeschichtungen auf, die - als Vorbedingung - mit Puffern zur Durchführung einer nativen Lyse der untersuchten Proben kompatibel sein sollten. Dies galt besonders hinsichtlich der Detergenzien-haltigen (z.B. CHAPS in einer Konzentration von 0,15 - 0,3%) bzw. Tris-basierenden Puffer. Die Untersuchungen zeigten, dass diese Kriterien nur von dem Mikroarray-Substrat *CodeLink Activated Slides* erfüllt wurden. Auf diesen Trägern konnte eine verwendbare Anbindung und Detektionsmöglichkeit von MHC-Monomeren (die in Tris-haltigem Puffer vorlagen) und CHAPS-Puffer-lysierten Zellkultur- und Gewebeproben gewährleistet werden. Die im Folgenden beschriebene Methoden-Etablierung wurde daraufhin ausschließlich mit *CodeLink Activated Slides* durchgeführt.

In den ersten Reverse-Screening-Experimenten wurden MHC-Monomere eingesetzt, die auch für die im Folgenden durchgeführten Quantifizierungsexperimente verwendet wurden. Die zu analysierenden Zellkulturproben waren hinsichtlich ihrer MHC-Expression vorcharakterisiert und dienten als Kontrolle der Etablierungs-Experimente. Die Zelllinie BM14 war als niedrig MHC Klasse I-exprimierende Zelllinie bekannt, wo hingegen die Zelllinie DEU als hoch MHC Klasse I-exprimierende Zelllinie beschrieben worden war. Aus dem Verhältnis der Ausbeuten HLA-extrahierter

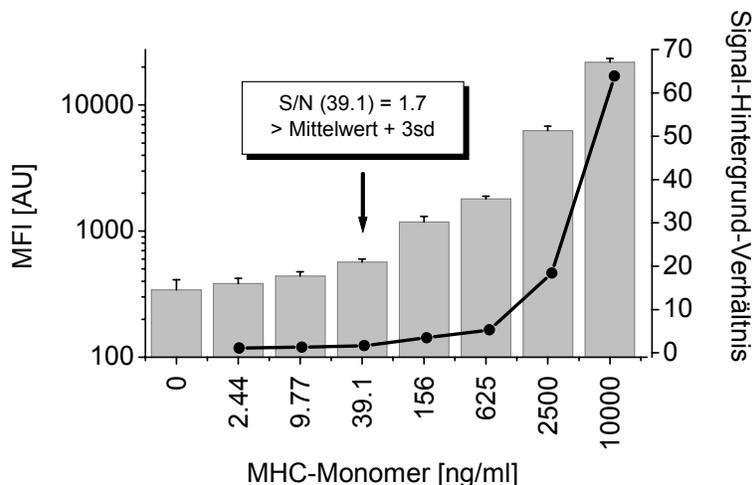
Peptide sollte sich die Expression von MHC Klasse I zwischen den beiden Zelllinien um den Faktor 1 : 10 bis 1 : 15 (BM14 : DEU) unterscheiden (Information von S. Stevanović). Die Detektion der MHC-Moleküle erfolgte in diesem experimentellen Ansatz über die nicht-kovalent an die schwere Kette von MHC Klasse I assoziierte Untereinheit  $\beta$ 2-Mikroglobulin.



**Abbildung 13: Nachweis von MHC Klasse I auf CodeLink-Mikroarray-Substraten.** A) Anordnung der Proben auf einem RPPM (Reverse-Phase-Protein-Mikroarray). Die hellgrauen Spots stellen die MHC-Monomere dar, welche in 8 Verdünnungsstufen (von 0.6 ng/ml bis 10  $\mu$ g/ml) gedruckt wurden. Die grauen Spots stellen das Zellkulturlysate DEU (6 Verdünnungsstufen von 0.2 bis 200  $\mu$ g/ml) dar. In dunkelgrau sind die Spots des Zellkulturlysats von BM14 dargestellt, welche in 6 Verdünnungsstufen (von 0.2 bis 200  $\mu$ g/ml) gedruckt wurden. Die breit umrandeten Spots weisen auf Puffer-Spots hin, welche der Leerwert-Bestimmung dienen. B) Scannerbild: Die Falschfarben-Darstellung eines gescannten Experiments. Das Bild zeigt Fluoreszenzsignale nach einer Inkubation mit Kaninchen-anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin (Erstantikörper) zum Nachweis von MHC Klasse I über diese Untereinheit und Esel-anti-Kaninchen-R-PE (Zweitantikörper). Detektion der Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanner bei 532 nm.

Abbildung 13A zeigt eine standardmäßig verwendete Druckanordnung der untersuchten Protein-Mikroarrays. Die in Sub-Arrays aufgeteilten Mikroarray-Substrate wurden mit einem anti-MHC Klasse I-Antikörper (anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin) und einem Fluoreszenz-gekoppelten Detektionssystem inkubiert. Der Assay wurde im konfokalen Laser-Scanner bei 532 nm ausgelesen. Die verschiedenen Verdünnungsstufen der untersuchten Proteine, welche als Replikate vertikal übereinander angeordnet worden waren, ließen erste Aussagen über die Linearität und Sensitivität der MHC-Nachweisreaktion zu. Das Falschfarbenbild in Abbildung 13B zeigt starke Fluoreszenz-Signale bei den höchsten eingesetzten MHC- und Lysat-Konzentrationen (weiße und rote Färbung), die über die einzelnen Verdünnungsstufen zu schwächeren Signalen hin abnahmen (grüne und blaue Färbung). Wie erwartet, zeigte die Kontrolle DEU ein hohes MHC Klasse I-Signal (grün, 200  $\mu$ g/ml) und eine mögliche Signaldetektion über 3 Verdünnungsstufen (200 – 50 – 12,5  $\mu$ g/ml). Dahingegen

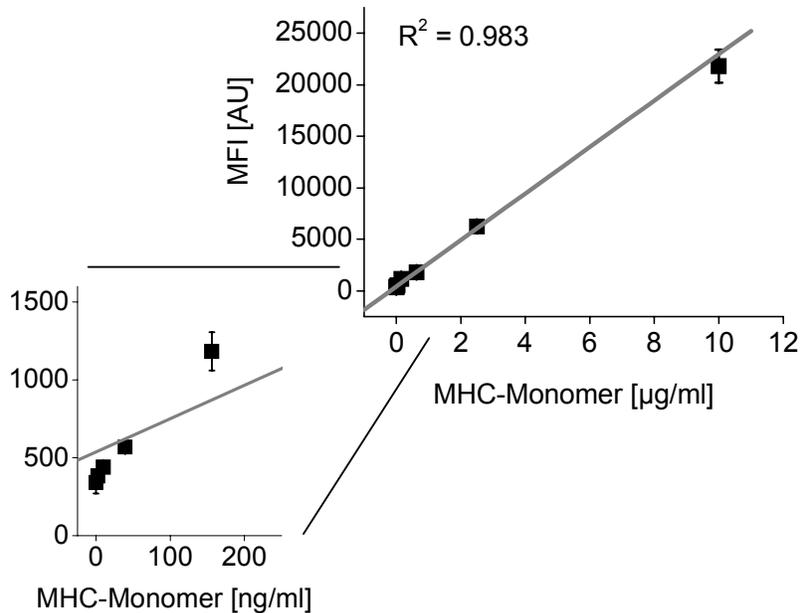
konnte für die Kontrolle BM14 nur ein einzelnes, niedriges Signal (blau, 200 µg/ml) für die höchste eingesetzte Druckkonzentration nachgewiesen werden.



**Abbildung 14: Fluoreszenz-Signal und Signal-Hintergrund-Verhältnis der detektierten MHC-Monomer-Verdünnungsreihe.** Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 4 Replikaten.  $S/N$  = Signal to Noise (Signal über Hintergrund).

Wird die Nachweisgrenze als Mittelwert  $\pm$  3 Standardabweichungen des Leerwertes bezogen auf den eingesetzten Leerwert (Puffer-Spots) definiert (siehe Abbildung 14), so lag die Grenze für den Nachweis von MHC Klasse I über  $\beta$ 2-Mikroglobulin bei ca. 40 ng/ml. Dies entsprach 730 pM MHC und lag 1,7-fach über dem Hintergrund-Rauschen. Bezogen auf die Anzahl der Moleküle pro Spot ließ sich bei einem abgegebenen Tropfenvolumen des verwendeten Mikroarrays (ca. 0,33 nl pro Tropfen) und dem Molekulargewicht von MHC Klasse I (55 kDa) eine Nachweismöglichkeit von ca. 100 000 MHC-Monomer-Molekülen pro Spot errechnen.

Vergleichende Analysen eines Forward-Phase-Protein-Mikroarrays (*Immuno-Sandwich*), bei dem auf einem Mikroarray-Substrat erst das Fängermolekül immobilisiert und anschließend die Proben und das Detektionssystem hinzugeben wurden, ergaben vergleichbare Sensitivitäten und Signalverläufe (immobilisiertes Fängermolekül / Erstantikörper: Maus-anti-HLA-A,B,C (w6/32), Detektion über den Zweitantikörper Ziege-anti-Maus-R-PE im Laser-Scanner bei 532 nm) (Daten in dieser Studie nicht gezeigt). Damit wird deutlich, dass das aufgebaute Reverse-Screening-System eine gute Empfindlichkeit aufweisen konnte.



**Abbildung 15: Detektion von MHC-Monomeren auf CodeLink-Mikroarray-Substraten.** Eine Verdünnungsreihe von MHC-Monomeren wurde über 8 Verdünnungsstufen (2,4 ng/ml bis 10 µg/ml) gedruckt und durch Inkubation mit Kaninchen-anti-β2-Mikroglobulin nachgewiesen. Die jeweils 4 Replikate wurden im Array vertikal übereinander angeordnet. Die Auswertung erfolgte über lineare Regression. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der vier Messwerte vom Mittelwert.

In Abbildung 15 ist ein zu erwartender, linearer Verlauf der MHC-Signale zu erkennen, welcher sich über einen Konzentrationsbereich von mehr als 2 Zehnerpotenzen erstreckte. Der Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0.983$  verdeutlichte die auch in niedrigeren MHC-Konzentrationsbereichen gute Linearisierbarkeit der detektierten Signale. Die Nachweisgrenze konnte in diesem Ansatz mit  $\geq 40$  ng/ml bestimmt werden. Die dargestellten Fehlerbalken der jeweils 4 Replikate der einzelnen Verdünnungsstufen bestätigten die erwartete, geringe Varianz der Fluoreszenzsignale einzelner Replikatspots zueinander.

Die Etablierung der Reverse Screening-Plattform zielte darauf ab, die charakterisierten Lysate in mehreren Konzentrationen auf den ausgewählten CodeLink-Mikroarray-Substraten zu untersuchen, so dass eine Quantifizierung des MHC-Gehaltes (siehe Tabelle 11) der Proben erfolgen konnte.

**Tabelle 11: Nachgewiesene MHC-Moleküle pro Zelle**

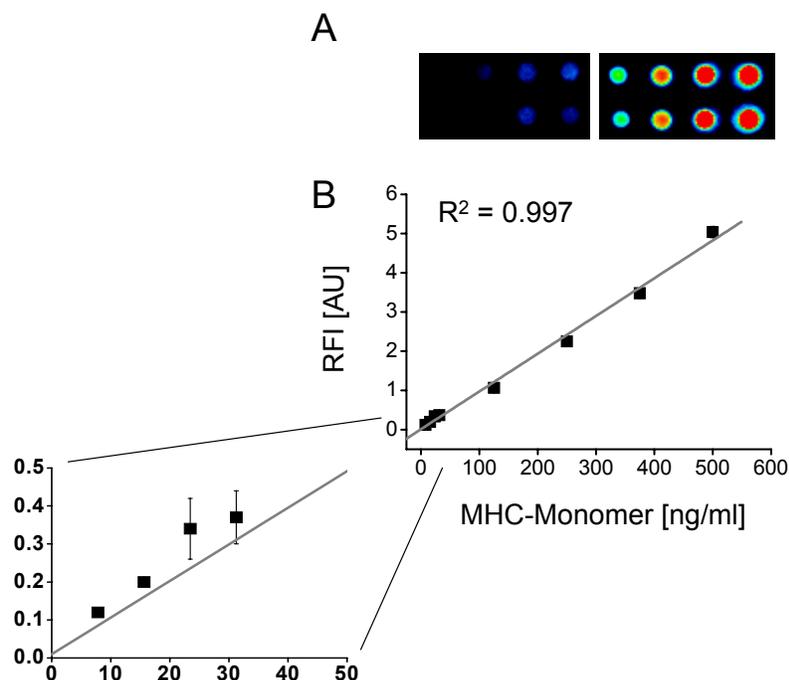
Lysat	nachgewiesene MHC Moleküle pro Zelle	untersuchte Lysatkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
BM14	96 000	12.5 - 200 (gemittelt)
DEU	940 000	12.5
	2 000 000	50
	5 600 000	200

Die Bestimmung der Anzahl der MHC-Moleküle pro Zelle wurde über die Fluoreszenz-Signale der untersuchten Lysate und die lineare Regression der MHC-Verdünnungsreihe errechnet. Hierbei war zudem die Anzahl an Zellen pro lysiertem Pellet bekannt. Die Ergebnisse der Messungen zeigten hier zum einen, dass für die Zellen der Linie BM14 die Dichte der MHC-Moleküle pro Zelle mit einem biologisch relevanten Wert von ca. 100.000 Molekülen MHC pro einzelner Zelle unabhängig von der Menge an untersuchtem Lysat ermittelt werden konnte (vergleichbare Angaben finden sich in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Yewdell (Yewdell 2003) und McCluskey (McCluskey 1999). Zum anderen konnte für die Ergebnisse der DEU-Zellen kein einheitlicher Wert, konzentrationsunabhängiger Wert bestimmt werden. Nichtsdestotrotz lag das DEU-Ergebnis mit gemittelt ca.  $2 \times 10^6$  MHC-Molekülen pro Zelle den erwarteten Faktor über dem BM14-Resultat.

### 3.1.2 Weiterentwicklung der Reverse-Screening-Plattform – Einführung der Zeptosens-Technologie

Die vorgestellten Ergebnisse dieser Studie, die auf *CodeLink*-Mikroarray-Substraten durchgeführt wurden und die ersten Experimente mithilfe der Reverse-Screening-Technologie darstellten, zeigten die Machbarkeit und das Potential dieser Methode auf. Mittels dieser neuartigen Technologie konnte das Modell-Molekül MHC Klasse I, das als rekombinant synthetisiertes Monomer vorlag, mit ausreichender Sensitivität nachgewiesen werden und zwei Zellkulturkontrollen (DEU und BM14) auf die Expression von MHC Klasse I-Molekülen pro Zelle quantifiziert werden. Um aber a) in späteren Experimenten auch sehr gering konzentrierte Proteine (wie z.B. einige Tumormarker) nachweisen und b) Proteine genau und mit höchster Sensitivität in Ge-

webelysaten quantifizieren zu können, wurde die Reverse-Screening-Methode zur Detektion der Fluoreszenz auf ein neues, bekanntermaßen sensitiveres System der Firma Zeptosens umgestellt (Pawlak 2002a). Der Reverse-Screening-Ansatz, der in den einführenden Untersuchungen mit dem Biochip-Arrayer-System, *CodeLink*-Mikroarray-Substraten und der Fluoreszenzdetektion im konfokalen Laser-Scanner durchgeführt wurde, wurde auf das Nanoplotter-System, Zeptosens-Mikroarray-Substrate und ein Detektionsverfahren unter Verwendung der Planaren Wellenleiter-Technologie umgestellt.



**Abbildung 16: Quantifizierung von MHC in CHAPS-Lysaten.** (A) Falschfarbendarstellung und (B) lineare Regression der MHC-Monomer-Verdünnungsreihe (7,8 - 500 ng/ml). Inkubation der Protein-Mikroarrays mit anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin. Fluoreszenzdetektion im ZeptoREADER bei 635 nm über Ziege-anti-Kaninchen-Fab-Alexa647 (Zweitantikörper). graue Balken = Normalgewebe, schwarze Balken = Tumorgewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Abweichung vom Mittelwert der Duplikatspots. Die Nachweisgrenze konnte mit  $< 8$  ng/ml MHC-Monomer bestimmt werden.

Um die neue Technologie-Plattform mit der Reverse-Screening-Methode zu verknüpfen, wurden die bereits in den einführenden Experimenten verwendeten Kontrollen (MHC Klasse I-Monomere) auf den Zeptosens-Mikroarray-Substraten immobilisiert. Zum Nachweis von MHC Klasse I wurden die Protein-Mikroarrays analog zu den ersten Etablierungsexperimenten mit dem anti-MHC Klasse I-Antikörper anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin inkubiert.

Der in Abbildung 16 dargestellte dynamische Bereich der MHC-Signale konnte mit  $> 2.5$  Zehnerpotenzen ermittelt werden (7.8 bis 500 ng/ml MHC Klasse I-Monomer). Die MHC-Signale zeigten mit einem Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0.997$  eine sehr gute Linearisierbarkeit über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich. Diese im Vergleich zu den *CodeLink*-Ergebnissen vergrößerte Dynamik bestätigte die erhöhte Sensitivität der Zeptosens-Technologie. Die Nachweisgrenze wurde mit  $< 8$  ng/ml MHC-Monomer angegeben, was eine Sensitivitätssteigerung nach Einführung der Planaren Wellenleiter-Technologie um mindestens Faktor 5 bedeutete.

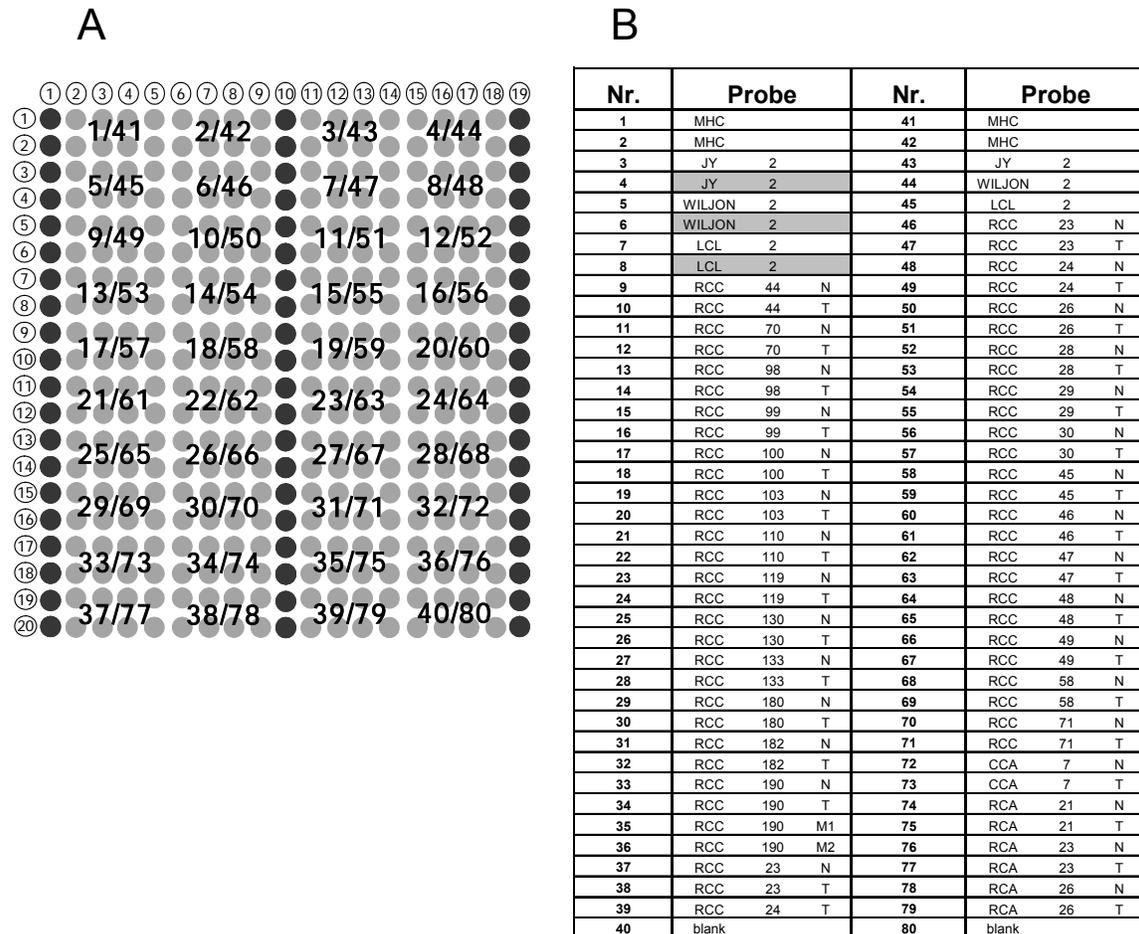
### 3.1.3 Qualitätskontrolle von Protein-Mikroarrays

Um vertrauenswürdige Aussagen über die ausgelesenen Antikörper-Signale, bezogen auf die tatsächlich immobilisierte Proteinmenge, treffen zu können, wurden Methoden zur Qualitätskontrolle von Protein-Mikroarrays entwickelt. Von DNA-Arrays war bekannt, dass die detektierten Proben-spezifischen Signale durch a) kompetitive Hybridisierung der Proben, b) vergleichende Analyse zweier, mit unterschiedlichen Farben, markierter Proben oder c) *perfect match / mismatch*-Strategie mit großer Genauigkeit und Glaubwürdigkeit bestimmt werden konnten (Lipshutz 1999).

Die Qualitätskontrolle von Protein-Mikroarrays wurde zu Beginn dieser Doktorarbeit durch Immunoassays mit Antikörpern durchgeführt, die gegen konstitutiv exprimierte Proteine so genannter *housekeeping genes* (z.B. Proteine des Zytoskeletts wie Actin oder Tubulin) gerichtet waren. Diese Proteine zeigen einen Expressionslevel, der auch nach Stimulation wenig verändert ist. Es zeigte sich jedoch, dass der Nachweis solcher Proteine aufgrund heterogener, schlecht reproduzierbarer Ergebnisse keine geeignete Methode zur Bestimmung der auf Mikroarray-Substraten immobilisierten Proteinmenge war. Es konnte wiederholt nachgewiesen werden, dass eine stabile Expression dieser Proteine in den zahlreichen untersuchten Gewebe- und Zellkulturlysaten nicht zu beobachten war (Daten in dieser Studie nicht gezeigt).

Zur Qualitätskontrolle von Protein-Mikroarrays wurde daraufhin für diese Doktorarbeit eine neue Methode entwickelt. Hierbei wurden die immobilisierten Proteine unter Verwendung des unter 2.3.2 beschriebenen Protokolls über reaktive Aminogruppen von Proteinen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa647 markiert. Die Reaktion findet nach dem Drucken der Protein-Mikroarrays direkt auf den verwendeten Mikroarray-Substraten statt. Der Zeitpunkt der Qualitätskontrolle stellt den spätest möglichen

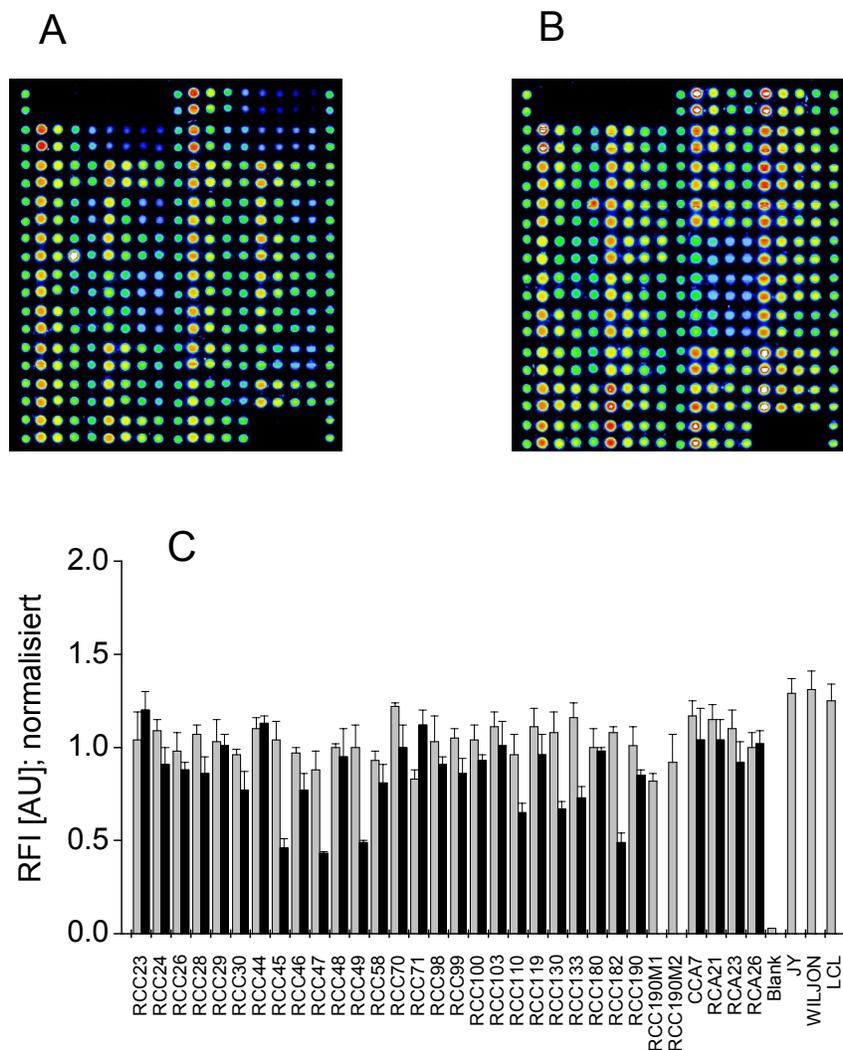
Punkt im Verlauf der Protein-Mikroarray-Herstellung dar und sollte auch deshalb die zuverlässigsten Aussagen über die Qualität der gedruckten Protein-Mikroarrays geben können.



**Abbildung 17: Array-Aufbau zur Qualitätskontrolle von Proteinmikroarrays.** A) Schematischer Aufbau eines Protein-Mikroarrays mit 19 x 20 Spots. Die hellen Spots sind die unterschiedlichen Proben, wohingegen die Referenzen (BSA-Cy5) als dunkle Spots dargestellt sind. Die untersuchten Proben (B) beinhalten Tumore (T) und Normalgewebe (N) aus Nierenzellkarzinomen (RCC), Colonkarzinomen (CCA) und Rektumkarzinomen (RCA). M1, M2 steht hier für Metastasen von Probe RCC190. JY, WILJON und LCL sind Zellysate, die durch biochemische Anwendungen (FACS, WB, MS) vorcharakterisiert wurden und zur Kontrolle der MHC-Quantifizierung gedruckt wurden.

Zur Anwendung kam diese Qualitätskontrolle bei Proteinmikroarrays deren schematischer Aufbau in Abbildung 17A dargestellt ist. 40 bzw. 80 Proben wurden in Sub-Arrays auf einem Zeptosens-Mikroarray-Substrat angeordnet. Diese Sub-Arrays beinhalten neben den in Abbildung 17B aufgelisteten Proben auch 3 Spalten, in denen ausschließlich ein Gemisch von BSA mit fluoreszenzmarkiertem BSA (BSA-Cy5) gedruckt wurde. Diese „Referenzen“ genannten Spots sind für die Fluoreszenzdetek-

tion der Protein-Mikroarrays unter Verwendung der Planaren Wellenleiter-Technologie unabdingbar.



**Abbildung 18: Proteinbestimmung von Protein-Mikroarrays zur Qualitätskontrolle.** Die immobilisierten Proben wurden nach Blockierung der Mikroarray-Substrate mit Tween-20 durch Inkubation mit NHS-Alexa-647 angefärbt. Die Abbildungen stellen Falschfarbenbilder nach dem Detektieren mit dem ZeptoREADER bei 635 nm dar. In (A) sind die Proben 1 – 40 und in (B) 41 – 80 immobilisiert worden. Die Proben wurden in Duplikaten in jeweils 4 Konzentrationen gedruckt. Die Druckkonzentrationen betragen 400-253-159-100  $\mu\text{g/ml}$ . Die relativen Fluoreszenz-Intensitäten ( $n = 3$ ) der Proben (Normalgewebe: graue Balken; Tumorgewebe: schwarze Balken) sind unter (C) als Median-normierte Signale aufgetragen. Die mittlere, prozentuale Standardabweichung über alle Proben betrug hierbei 8,2%.

Die Qualitätskontrolle der Protein-Mikroarrays ergab eine unerwartet heterogene Verteilung der Proteinsignale (Abbildung 18C). Die mittlere, prozentuale Standardabweichung über alle Proben betrug 8.6%. Die immobilisierte Proteinmenge unterschied

sich zwischen einzelnen, korrespondierenden Gewebeproben um mehr als den Faktor 2 (z.B. RCC45 oder RCC182), obwohl alle Proben vor der Herstellung der Protein-Mikroarrays auf die Druckkonzentration von 0.4 mg/ml eingestellt worden waren. Aus dem gezeigten Ergebnis ließ sich eine fehlerbehaftete Proteinkonzentrations-Bestimmung der Lysate vor dem Drucken, die anhand der beschriebenen und anerkannten Standardmethode (siehe 2.2.1) erfolgte, ableiten. Insbesondere scheint ein Einfluss durch den Blutgehalt der Proben möglich (siehe Diskussion 4.1).

Die ausgelesenen Proteinsignale wurden für weitere Berechnungen, d.h. zur Normierung der Antikörper-abhängigen Assay-Signale auf den tatsächlich immobilisierten Proteingehalt der Proben, auf den Median der untersuchten Proben normiert (dargestellt in Abbildung 18). Der Vorteil dieser Median-Normierung bestand darin, dass sich die erhaltenen Signale um den Wert 1 bewegten und somit eine spätere Quantifizierung von Proteinen nicht beeinträchtigte.

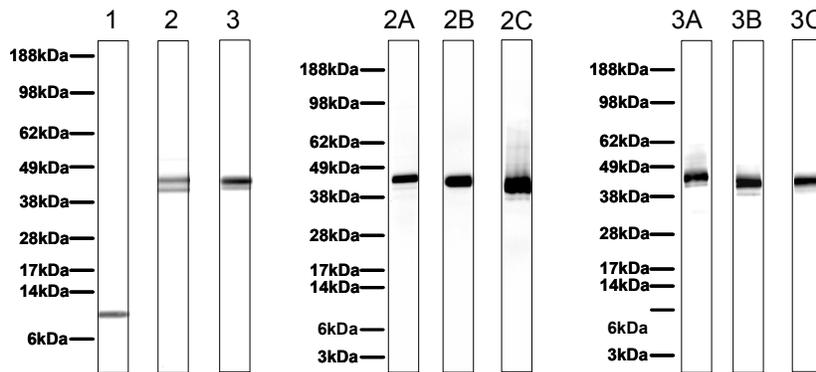
### **3.1.4 Antikörper-Charakterisierung**

Vor der Applikation eines Antikörpers zur Analyse der Proteinexpression auf den LySAT-Proteinmikroarrays erfolgte eine eingehende Charakterisierung der Bindemoleküle. Hierzu wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Zellkultur- und Gewebelysate im Western-Blot auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Membranen wurden anschließend in einzelne Streifen unterteilt und für die Bewertung der Spezifität der anti-MHC-Antikörper bzw. Tumor-Screening-Antikörper verwendet. Die Kriterien zur Bewertung der Bindungseigenschaften der Antikörper umfassten a) die Detektion von Proteinbanden mit korrektem (erwartetem) Molekulargewicht, b) das Erkennen einer unerwarteten Spezifität (Epitope in Protein-Banden in Bereichen eines nicht erwarteten Molekulargewichts), sowie c) die Gesamtzahl aller detektierten Banden einer Analyse. Zudem wurde die relative Stärke der Bandenfärbung interpretiert, um Aussagen über die Primärantikörper-Konzentrationen zu treffen, die zur Proteindetektion auf Protein-Mikroarrays verwendet werden sollten.

#### **3.1.4.1 Antikörper zur Detektion und Quantifizierung von MHC Klasse I**

Zum Nachweis von MHC-Molekülen der Klasse I im Western-Blot und auf Protein-Mikroarrays wurden in der vorliegenden Arbeit drei Antikörper ausgewählt und eingesetzt. Der anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin Antikörper erkannte die MHC Klasse I-Untereinheit  $\beta$ 2-Mikroglobulin in ungebundener und auch in komplexierter Form. Die gegen die

schwere Kette der MHC Klasse I-Subtypen (HLA-A,B,C) gerichteten Antikörper HCA2 (anti-HLA-A) sowie HC10 (anti-HLA-B,C) detektierten ausschließlich die nicht an  $\beta$ 2-Mikroglobulin gebundene, schwere Kette von MHC Klasse I (Stam 1986).



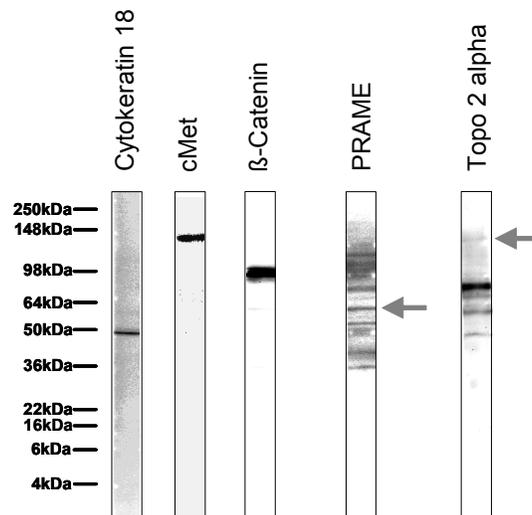
**Abbildung 19: Western-Blot-Streifen zur Charakterisierung von MHC Klasse I-spezifischen Antikörpern.** Auf einem aufgetrennten Lysat von Nierenzellen (Normalgewebe) wurden die Antikörper (1) anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin, (2) HCA2 (anti-HLA-A) und (3) HC10 (anti-HLA-B,C) hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht. Ein Western-Blot-Streifen repräsentierte die per LDS-PAGE aufgetrennte Menge von ca. 15 $\mu$ g Protein in Lysat. Die Antikörper HCA2 und HC10 wurden zusätzlich auf folgenden Zelllysaten untersucht: (A) A431, (B) HeLa, (C) Jurkat.

Die Charakterisierung der MHC Klasse I-spezifischen Antikörper wurde durchgeführt, um die Eignung der Antikörper zur Proteinexpressionsanalyse und MHC-Quantifizierung zu untersuchen. Anhand der Ergebnisse (Abbildung 19) wurde deutlich, dass die ausgewählten Antikörper anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin (12 kDa), anti-HLA-A (43 kDa) und anti-HLA-B,C (43 kDa) eine starke Bande am erwarteten Molekulargewicht zeigten. Es wurde in keinem Fall eine unerwartete Spezifität nachgewiesen. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die Charakterisierung in Gewebelysaten oder Lysaten von Zellkulturproben durchgeführt wurde. Die untersuchten Antikörper konnten folglich als „geeignet“ charakterisiert werden. Die erkennbare Doppelbande bei der Charakterisierung von anti-HLA-A und anti-HLA-B,C wurde bereits bei der Generierung dieser Antikörper beschrieben (Stam 1986).

#### 3.1.4.2 Antikörper zur Detektion von Tumormarkern

Zum Nachweis von Tumormarkern in Gewebelysaten wurden in der vorliegenden Arbeit die in Tabelle 7 aufgeführten Antikörper ausgewählt und im Western-Blot und auf Protein-Mikroarrays eingesetzt. Es wurden verschiedene monoklonale als auch polyclonale Primärantikörper unterschiedlicher Spezies verwendet.

Wie schon unter 3.1.4.1 dargestellt, wurden alle Primärantikörper mittels Western-Blot-Analyse auf vorgefertigten Membran-Streifen hinsichtlich ihrer spezifischen Erkennung des Zielproteins charakterisiert. Zudem konnten über die relative Bandenstärke erste Aussagen über die einzusetzenden Antikörper-Konzentrationen auf Protein-Mikroarrays getroffen werden.



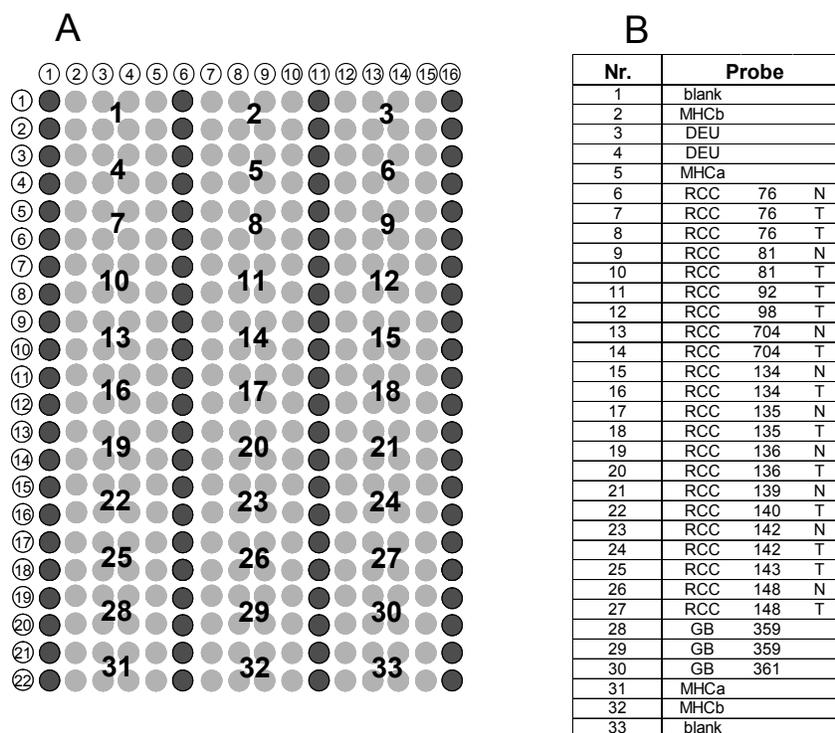
**Abbildung 20: Western-Blot-Streifen zur Charakterisierung von Tumor-Screening-Antikörpern.** Auf einem aufgetrennten Lysat von Nierenzellen (Normalgewebe) wurden die Antikörper anti-Zytokeratin-18, anti-cMet, anti- $\beta$ -Catenin, anti-PRAME und anti-Topo 2 alpha hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht. Die gezeigten Antikörper repräsentieren eine Auswahl der durchgeführten Antikörper-Charakterisierungen (5 von 30). Die grauen Pfeile (PRAME- und Topo 2 alpha-Streifen) markieren das Molekulargewicht, an dem eine Antigen-spezifische Bande erwartet wurde. PRAME = *antigen preferentially expressed in melanoma*, Topo 2 alpha = Topoisomerase 2 alpha.

Als Auswahlkriterium für die Verwendung der Bindemoleküle zur Proteinexpressionsanalyse und Proteinquantifizierung auf Protein-Mikroarrays galt die Detektion einer spezifischen Bande am erwarteten Molekulargewicht (hier gezeigt am Beispiel anti-Zytokeratin-18, anti-cMet und anti- $\beta$ -Catenin). Antikörper, die mehrere Banden und oder Banden an nicht-erwartetem Molekulargewicht (hier dargestellt am Beispiel anti-PRAME und anti-Topo 2 alpha) zeigten, wurden nicht verwendet. Der graue Pfeil neben diesen Western-Blot-Streifen markiert das Molekulargewicht, an dem Antigen-spezifische Banden erwartet wurden. Die anti-PRAME-Inkubation zeigte jedoch neben der erwarteten noch zahlreiche, unspezifische Banden. Die anti-Topo 2 alpha-Inkubation ließ keine spezifische, sondern ausschließlich unspezifische Banden erkennen. Nach der Charakterisierung im Western-Blot erfolgte die Optimierung der Antikörperkonzentration für den Einsatz auf den Protein-Mikroarrays. Aus Abbildung

20 konnte die im Western-Blot eingesetzte Konzentration für die Antikörper anti-Zytokeratin-18, anti-cMet und anti- $\beta$ -Catenin somit direkt für die Mikroarray-Experimente verwendet werden.

### 3.2 Anwendung der Reverse-Screening-Plattform (Quantifizierung von MHC Klasse I)

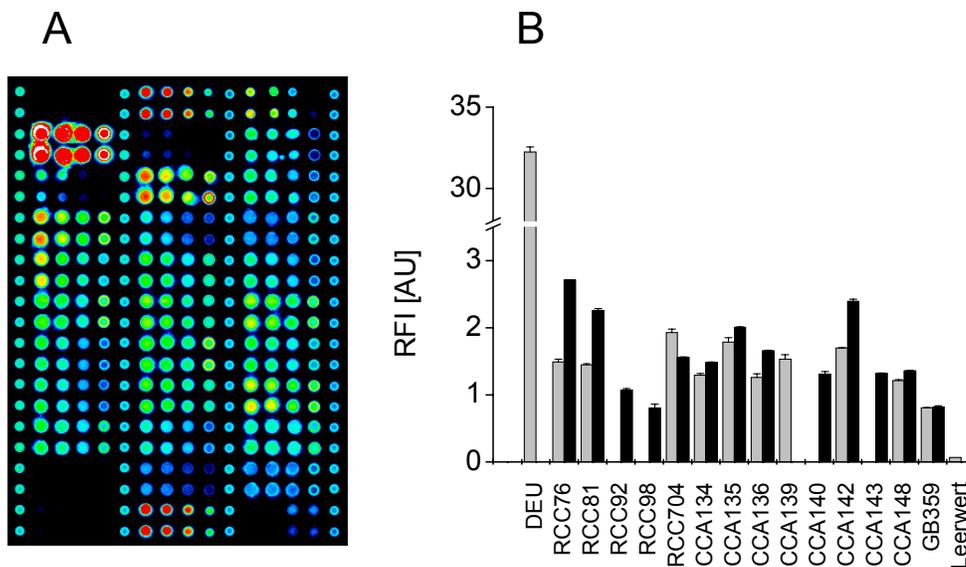
Nach Abschluss der Methodenentwicklung, die insbesondere die Einführung der Planaren Wellenleiter-Technologie zur Sensitivitätssteigerung, Qualitätskontrolle der Protein-Mikroarrays zur Normierung der immobilisierten Proteinmenge und Nachweis der Spezifität der Bindemoleküle umfasste, sollte in diesem Teil der Doktorarbeit in einer größeren Probenanzahl die Anwendbarkeit der Plattform demonstriert werden. Über die Verwendung rekombinant synthetisierter MHC-Monomere zur Generierung von Eichreihen erfolgte die Quantifizierung der MHC Klasse I-Proteine hierbei in teilweise bereits charakterisierten Zellkultur- und Gewebelysaten, die unter nativen Bedingungen lysiert worden waren. Gleichzeitig wurden Nierenzellkarzinome und Glioblastome untersucht. Die Proben wurden in einem 16 x 22 Spots großen Protein-Mikroarray angeordnet (siehe Abbildung 21A,B).



**Abbildung 21: Array-Anordnung zur Quantifizierung von MHC Klasse I in CHAPS-Lysaten.** (A) Schematischer Aufbau eines Protein-Mikroarrays mit 16 x 22 Spots. Die Proben wurden in Duplikaten in jeweils 4 Konzentrationen gedruckt. Die Druckkonzentrationen betragen 400-253-159-100 µg/ml. Die hellen Spots kennzeichnen die unterschiedlichen Proben, wohingegen die Referenzen (BSA-Cy5) als dunkle Spots dargestellt sind. Die untersuchten Proben (B) beinhalten Zellkulturproben (DEU) so-

wie Tumore (T) und Normalgewebe (N) aus Nierenzellkarzinomen (RCC), GB = glioblastoma (Glioblastom).

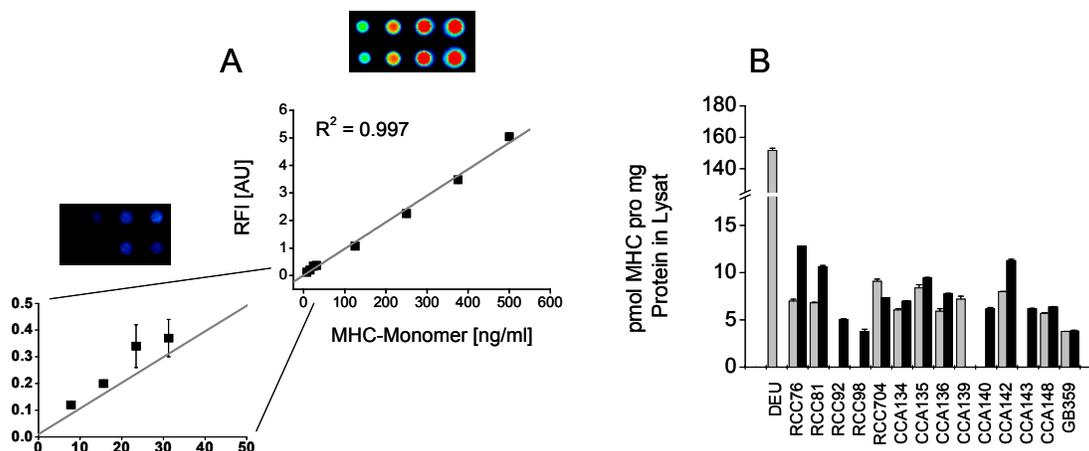
Das von den *CodeLink*-Mikroarray-Substraten auf die Zeptosens-Mikroarray-Substrate übertragene Reverse-Screening-System zeigte in den ersten Etablierungs-Experimenten nach Inkubation der Protein-Mikroarrays mit dem Primärantikörper anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin eine Dynamik von ca. 100 der detektierbaren Signale. In Abbildung 22A wurden die auf das Falschfarben-Spektrum übertragenen Signale (schwach blau und grün für schwächere Signale bis rot und weiß für starke Signale) sowie in Abbildung 22B die Rohwerte des Experiments dargestellt. Erwartungsgemäß ergab sich für die MHC-überexprimierende Zellkulturprobe DEU das stärkste Signal (weiße und rote Farbe der Spots im Falschfarbenbild ergaben  $> 30$  RFI in der graphischen Auftragung der Rohwerte). Auch alle weiteren untersuchten Proben wiesen eine Signalstärke auf, die deutlich über dem Leerwert lag. Entgegen der gängigen Lehrmeinung (z.B. Atkins 2004) konnte in acht von neun Tumorproben gleichviel oder signifikant mehr MHC-Signal als in den korrespondierenden Normalgeweben nachgewiesen werden.



**Abbildung 22: Nachweis von MHC in CHAPS-Lysaten.** (A) Inkubation der Protein-Mikroarrays mit Kaninchen-anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin (Erstantikörper) und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab (Zweitantikörper). Die Abbildung stellt ein Falschfarbenbild nach dem Detektieren des Protein-Mikroarrays mit dem ZeptoREADER bei 635 nm dar. (B) Darstellung der Rohwerte, d.h. ein Signalbalken gibt das zusammengefasste Signal von 8 Spots wieder, deren unterschiedliche Konzentrationen für die Auswertung herausgerechnet wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 8 Spots.

Die Weiterentwicklung der Reverse-Screening-Methode auf der Zeptosens-Plattform auch die Möglichkeit einer quantitativen Messung von Proteinen beinhalten. Die untersuchten Protein-Mikroarrays enthielten neben den verschiedenen Zellkultur- und Gewebelysaten auch Verdünnungsreihen von MHC-Monomeren (HLA-A), über die eine Quantifizierung von MHC Klasse I durchgeführt werden sollte. Zur Analyse der MHC-Verdünnungsreihe wurden die MHC-Signale mittels linearer Regression ausgewertet. Die auf die immobilisierte Proteinmenge normierten Assay-Signale der Proben wurden anschließend über die Standardkurve quantifiziert.

Die in Abbildung 23A dargestellte lineare Regression der Standardreihe der MHC-Monomere zeigte eine sehr gute Linearisierbarkeit der Signale, die sich bis zu den kleinsten Konzentrationen von  $c(\text{MHC-Monomer}) = 7.8 \text{ ng/ml}$  bestätigte. Der Korrelationskoeffizient betrug  $R^2 = 0.997$ . Der dynamische Bereich erstreckte sich über den gesamten, untersuchten Konzentrationsbereich von  $> 2.5$  Zehnerpotenzen. Die Nachweisgrenze konnte mit  $< 8 \text{ ng/ml}$  MHC Klasse I-Monomer bestimmt werden. Die MHC-Signale der untersuchten Lysate wurden über die Eichreihe in MHC-Gehalt der Proben – angegeben in pmol MHC pro mg Protein in Lysat – umgerechnet.

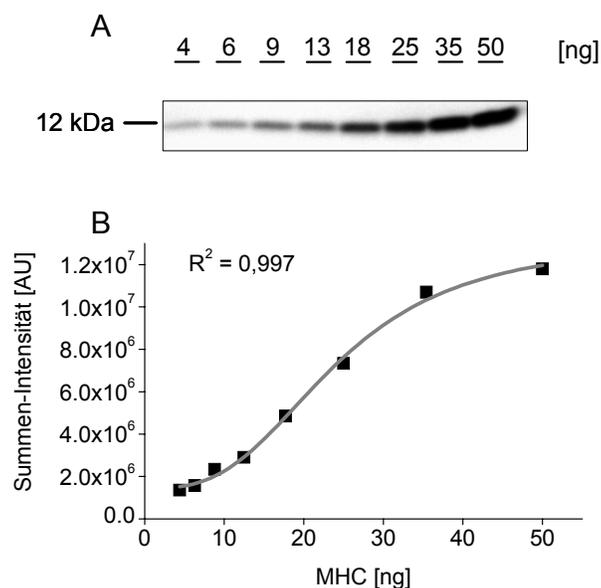


**Abbildung 23: Quantifizierung von MHC in CHAPS-Lysaten.** (A) Falschfarbendarstellung und lineare Regression der MHC-Monomer-Verdünnungsreihe (7,8 - 500 ng/ml). (B) MHC-Quantifizierung der untersuchten Lyse nach Inkubation der Protein-Mikroarrays mit anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin (konzentrationskorrigiert). Fluoreszenzdetektion im ZeptoREADER bei 635 nm über Ziege-anti-Kaninchen-Fab-Alexa647 (Zweitantikörper). graue Balken = Normalgewebe, schwarze Balken = Tumorgewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 8 Spots.

Die aus Abbildung 23B gewonnenen Resultate beschreiben einen MHC-Gehalt der Proben zwischen 3 und 12 pmol MHC pro mg Protein in Lysat. Die Zellkulturprobe

DEU zeigte erneut das stärkste Quantifizierungssignal (ca. 150 pmol MHC). Die Umrechnung dieses Signals auf die Anzahl der MHC-Moleküle pro Zelle ergab einen Wert von ca.  $1 \times 10^6$  Moleküle MHC Klasse I pro Zelle. Für diese Berechnung war die Anzahl an Zellen pro lysiertem DEU-Pellet bekannt.

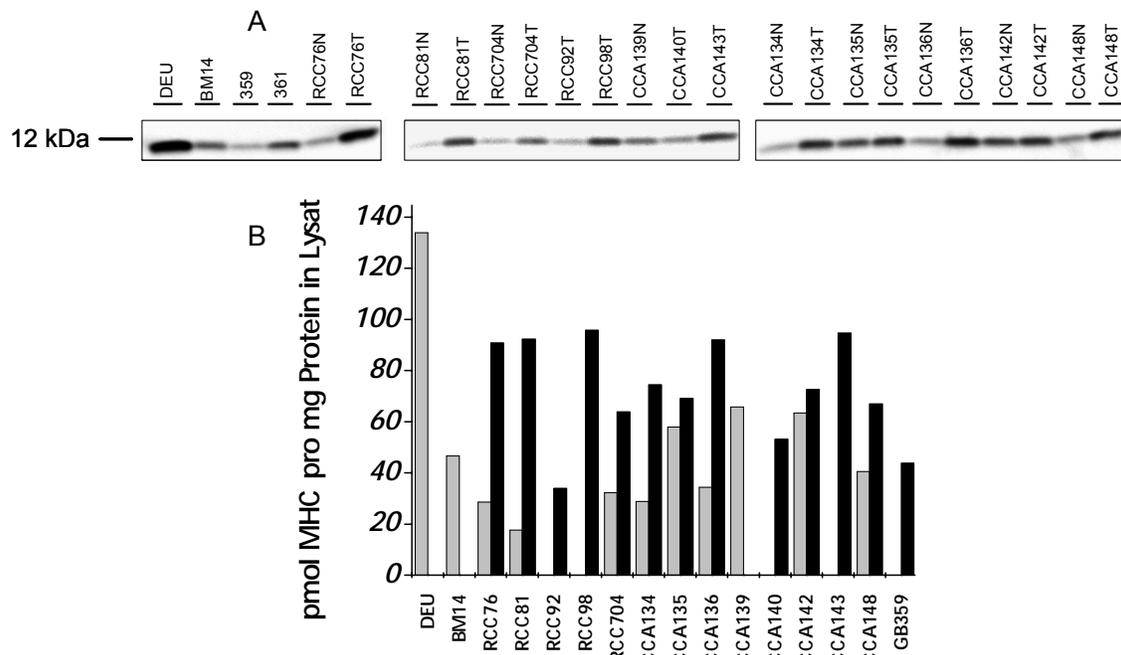
Die Ergebnisse der Reverse-Screening-Technologie auf Protein-Mikroarrays sollten anschließend mittels klassischer Western-Blot-Analyse evaluiert werden. Da Western-Blot-Analysen aufgrund des eingeschränkten dynamischen Bereichs und der eingeschränkten Reproduzierbarkeit höchstens für semiquantitative Analysen angewendet werden können, lag das Hauptaugenmerk dieser Analyse auf den ermittelten Signalverhältnissen. Zur Detektion von MHC Klasse I wurde der gleiche Antikörper wie für die Protein-Mikroarray-Experimente verwendet, der die an die schwere Kette von MHC Klasse I nicht-kovalent assoziierte Untereinheit  $\beta$ 2-Mikroglobulin (12 kDa) erkennt.



**Abbildung 24: Western-Blot-Analyse von MHC in CHAPS-Lysaten.** (A) Detektierte  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Bande bei 12 kDa. (B) Mehrparametrische Kurvenanpassung der Western-Blot-Signale zur Bestimmung der Nachweisgrenze. Die MHC-Monomere wurden in 8 Verdünnungsstufen (4 ng bis 50 ng pro Spur) aufgetragen und im Western-Blot über den Primärantikörper Kaninchen-anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin nachgewiesen. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte auf der Kodak Image Station. Die Nachweisgrenze konnte mit ca. 4 ng MHC pro Spur bestimmt werden.

Die im Western-Blot über  $\beta$ 2-Mikroglobulin detektierten MHC-Monomere wurden in 8 Verdünnungsstufen von 4 bis 50 ng pro Spur nachgewiesen. Der Signalverlauf wurde

über eine nicht-lineare Kurvenanpassung (4-parametrischer, logistischer Fit) angepasst (siehe Abbildung 24B), was einen Korrelationskoeffizienten von  $R^2 = 0.997$  ergab. Die Nachweisgrenze konnte in diesem Ansatz mit ca. 4 ng MHC pro Spur bestimmt werden. Der dynamische Bereich erstreckte sich ungefähr von 10 bis 30 ng MHC pro Spur. Zum Vergleich: die als Nachweisgrenze mittels Reverse-Screening bestimmte Menge MHC pro Spot auf einem Protein-Mikroarray betrug in den Etablierungsexperimenten weniger als 0.1 fg MHC pro Spot. Der dynamische Bereich der MHC-Nachweisreaktion auf dem planaren System verlief über mindestens 2 Zehnerpotenzen mit hoher Korrelationsgenauigkeit der linearen Anpassung.



**Abbildung 25: Quantifizierung von MHC in CHAPS-Lysaten mittels Western-Blot-Analyse.** Eine Auswertung erfolgte nach anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin-Inkubation und Lumineszenz-Detektion. Die Quantifizierung des Gehaltes an MHC erfolgte in Zellkulturzellen (DEU, BM14) sowie in Normal (N)- und Tumorgewebe (T) von Niere (RCC), Colon (CCA) und Hirn (GB 359, 361). A) Detektierte  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Banden bei 12 kDa. B) MHC-Quantifizierung der untersuchten Lysate. graue Balken: Normalgewebe, schwarze Balken: Tumorgewebe.

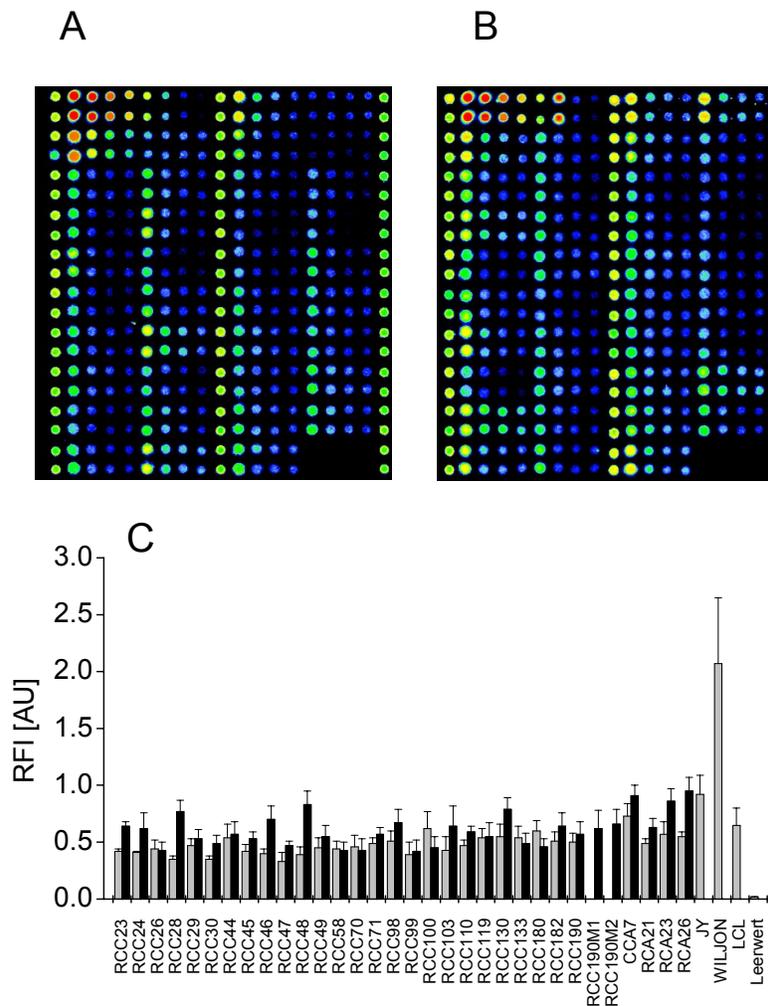
Es wurde über die nachgewiesene MHC-Standardreihe versucht, die mittels Western-Blot auf ihre MHC-Expression untersuchten Lysate der Organe Niere (RCC), Colon (CCA) und Hirn (GB) auf ihren absoluten MHC-Gehalt zu quantifizieren. Die Einheit der Signale wurde mit pmol MHC pro mg Protein in Lysat entsprechend zur Einheit der Protein-Mikroarray-Experimente gewählt (Abbildung 25). Die mithilfe der

Kodak Digital Science V3.0.0-Software (Kodak) ausgewerteten Graustufen-Intensitäten der Lysate zeigten durchweg um den Faktor 3 bis 6 stärkere Signale als im vergleichbaren planaren Assay (siehe Abbildung 23). Der bereits beschriebene zehnfache bis fünfzehnfache Überschuss der MHC-Expression der Zelllinie (DEU) zur konstitutiv MHC-exprimierenden Zelllinie BM14 konnte mit einem Faktor von ca. 3 nicht bestätigt werden. Durch die im Western-Blot limitierte Dynamik der quantitativen Proteinbestimmung zeigte sich hier die Überlegenheit der Protein-Mikroarrays. Der Trend einer erhöhten Expression von MHC Klasse I in Tumorgewebe im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgewebe ließ sich durch die Western-Blot-Quantifizierung bestätigen. Acht von neun Proben exprimierten mehr MHC im Tumor- als im Normalgewebe, womit eine zu den Protein-Mikroarray-Analysen qualitativ ähnliche Aussage getroffen werden konnte.

### 3.3 MHCquant - Quantifizierung von MHC Klasse I in Zell- und Gewebelysaten

#### 3.3.1 MHCquant mit einem anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörper

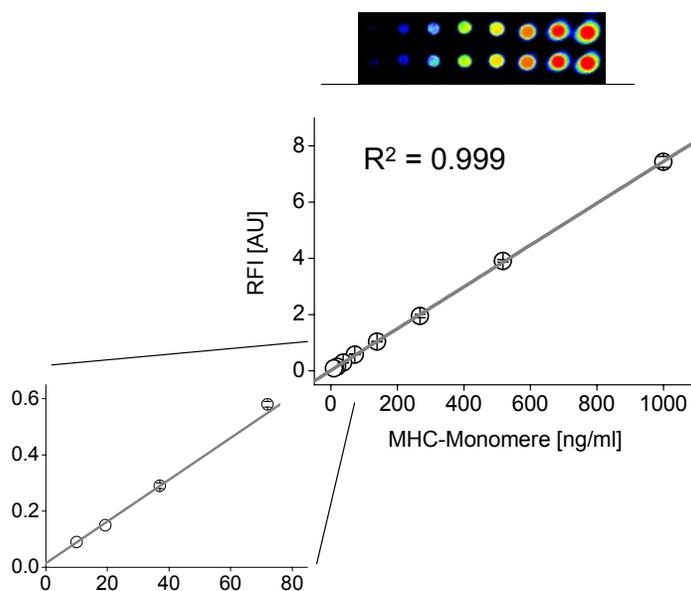
Die Reverse-Screening-Plattform wurde in den folgenden Experimenten zur Quantifizierung von MHC Klasse I in einem großen Satz von Resektaten (hauptsächlich aus der Niere stammend) angewendet. Nachdem die Etablierung der Reverse-Screening-Plattform erfolgreich abgeschlossen worden war, wurde nun der anti- $\beta$ 2-



**Abbildung 26: Nachweis von MHC Klasse I über  $\beta$ 2-Mikroglobulin in denaturierten Lysaten.** Die untersuchten Proben beinhalteten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen (RCC), Colonkarzinomen (CCA) und Rektumkarzinomen (RCA). M1, M2 steht hier für Metastasen von Probe RCC190. JY, WILJON und LCL sind Zelllysate, die zur Kontrolle der MHC-Quantifizierung gedruckt

wurden. Die Abbildungen stellen exemplarisch ausgewählte Falschfarbenbilder von Protein-Mikroarrays nach Inkubation mit Kaninchen-anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin (Erstantikörper) und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) und nach Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm dar. In (A) sind die Proben 1 – 40 und in (B) 41 – 80 immobilisiert worden. Die relativen Fluoreszenz-Intensitäten der Proben (Normalgewebe: graue Balken; Tumorgewebe: schwarze Balken) sind unter (C) aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

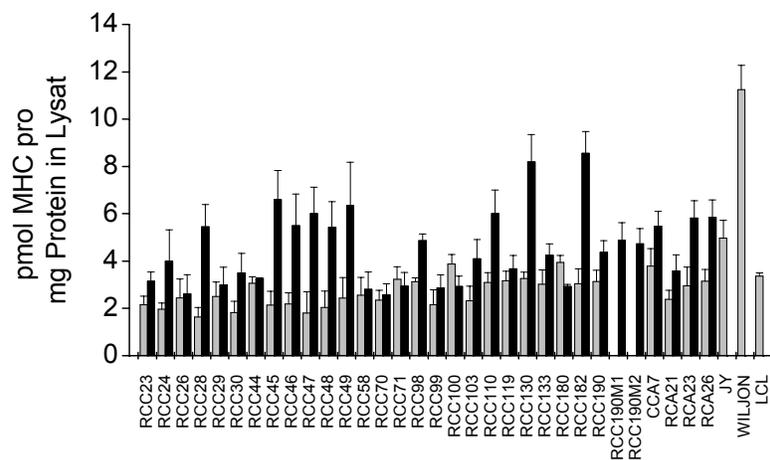
Mikroglobulin-Antikörper zur Analyse und Quantifizierung der MHC-Expression in 54 Nierenzellproben, 2 Colonproben, 6 Rektumproben und 3 Zellkulturproben (JY, WIL-JON, LCL) eingesetzt. Auf einem Zeptosens-Mikroarray-Substrat, das insgesamt 6 Sub-Arrays à 40 Proben enthielt, wurden für diese Studie 80 Proben in 2 x 3 gleichen Sub-Arrays angeordnet. Eine Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten über 80 Proben war folglich gleichbedeutend mit 6 ausgewerteten Sub-Arrays. Die hierzu verwendeten Proben wurden alle unter denaturierenden Bedingungen in einem Puffer (CLB1, Zeptosens) lysiert, der zusammen mit dem Druckpuffer (CSBL1, Zeptosens) speziell für die hydrophobe Oberfläche der Zeptosens-Mikroarray-Substrate optimiert war.



**Abbildung 27: MHCquant auf Protein-Mikroarrays durch  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Detektion.** Falschfarbenbild nach Inkubation der Arrays mit Kaninchen-anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin (Erstantikörper) und Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) und nach Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm. Dargestellt sind die 2 x 8 Spots der MHC-Monomer-Verdünnungsreihe (10 - 1000 ng/ml), die über eine lineare Regression (hier gezeigt mit einer vergrößerten Darstellung der niedrigeren Konzentrationsbereiche) ausgewertet wurde. Die gezeigten Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Abweichung vom Mittelwert der Duplikat-Spots.

Die Falschfarbenbilder (Abbildung 26A,B) der im roten Fluoreszenzkanal aufgenommenen Assay-Bilder veranschaulichen, dass für alle eingesetzten Proben auswertbare Signale detektiert werden konnten, die deutlich über dem Leerwert (Abbildung 26C) und innerhalb des Signalspektrums der jeweiligen MHC-Monomer-Verdünnungsreihe lagen. Somit konnte über die in 8 Verdünnungstufen eingesetzte MHC-Standardreihe eine Proteinquantifizierung vorgenommen werden.

Abbildung 27 zeigt die lineare Regression der MHC-Eichreihe, die mit hoher Korrelationsgenauigkeit ( $R^2 = 0.999$ ) durchgeführt werden konnte. Auch die niedrigsten, zum Herstellen der Protein-Mikroarrays verwendeten MHC-Monomer-Konzentrationen von weniger 20 ng/ml MHC pro Spot (entspricht weniger als 0.2 attomol MHC pro Spot) lagen nahezu perfekt auf der Regressionsgeraden. Der daraus resultierende dynamische Bereich erstreckte sich über > 3 Zehnerpotenzen. Für die Quantifizierung der insgesamt 80 Proben wurde die MHC-Verdünnungsreihe in jedem Sub-Array einzeln ausgewertet und nur auf die Proben dieses Sub-Arrays bezogen. Die Signale wurden in pmol MHC pro mg Protein in Lysat umgerechnet.



**Abbildung 28: MHC-Quantifizierung auf Protein-Mikroarrays durch  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Detektion.** Auftragung der über  $\beta$ 2-Mikroglobulin quantifizierten Signale. Fluoreszenzdetektion im ZeptoREADER bei 635 nm über Ziege-anti-Kaninchen-Fab-Alexa647 (normiert auf die immobilisierte Proteinmenge) ( $n = 3$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die untersuchten Proben beinhalten Tumore (schwarze Balken) und Normalgewebe (grau Balken) aus Nierenzellkarzinomen (RCC), Colonkarzinomen (CCA) und Rektumkarzinomen (RCA). M1, M2 steht hier für Metastasen von Probe RCC190. JY, WILJON und LCL sind Zelllysate, die zur Kontrolle der MHC-Quantifizierung gedruckt wurden.

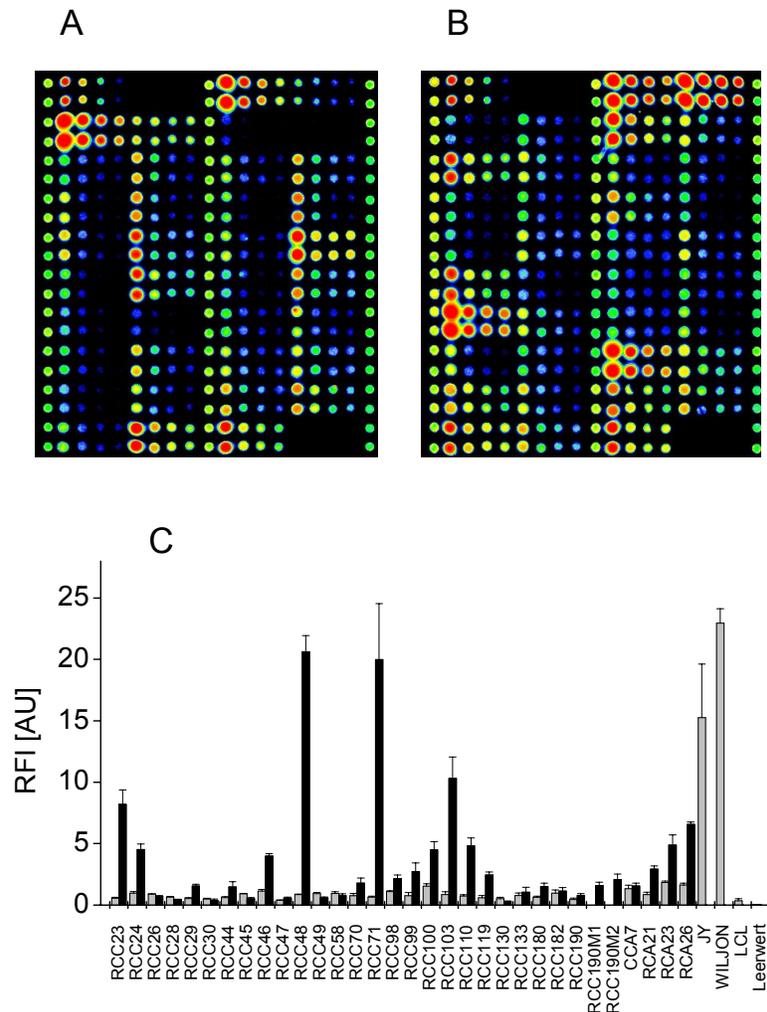
Der über  $\beta$ 2-Mikroglobulin nachgewiesene MHC-Gehalt der Normalgewebe bewegte sich in einem Bereich um 3 pmol MHC pro mg Protein in Lysat, was eine stabile, konstitutive Expression von MHC Klasse I bedeutete (Abbildung 28). Der MHC-Gehalt der Tumorgewebe schwankte dahingegen zwischen 3 bis 9 pmol MHC. 28 von 30 Probenpaaren wiesen im Tumorgewebe gleichviel oder mehr MHC-Gehalt auf als im Normalgewebe, davon 22 von 30 Probenpaaren signifikant mehr. Dieser Trend zeigte sich in den Colon- und Rektumproben ebenso wie in der weitaus größeren Population der Nierenzellproben. In den Lysaten der zwei untersuchten Proben von Metastasen des Nierenkarzinoms Nr.190 konnte ein der Tumorprobe vergleichbarer Gehalt an MHC Klasse I nachgewiesen werden.

### 3.3.2 MHCquant mit einem anti-HLA-A-Antikörper

Die schon unter 3.3.1 verwendeten Protein-Mikroarrays zur Quantifizierung von MHC Klasse I über  $\beta$ 2-Mikroglobulin wurden in diesem Kapitel der Studie mit einem zweiten, MHC Klasse I-spezifischen Antikörper quantitativ untersucht. Neben der Detektion von MHC Klasse I über die nicht-kovalent an die schwere Kette assoziierte Unter-einheit  $\beta$ 2-Mikroglobulin bot sich generell die Möglichkeit, die Antigen-präsentierenden Zelloberflächenmoleküle über andere, unterscheidbare Strukturelemente nachzuweisen. Für MHC Klasse I wurden hierzu die unterschiedlichen Strukturen der HLA-Subtypen HLA-A, B oder C in Betracht gezogen. Der hier eingesetzte anti-HLA-A-Antikörper (HCA2) wurde in der Literatur als monoklonales Bindemolekül beschrieben, dass die schwere Kette von MHC Klasse I ausschließlich in freier, nicht mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin komplexierter Form, erkennen konnte (Stam 1986). Die Proben, die auf den Arrays zur Quantifizierung über HLA-A immobilisiert wurden, wurden ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen lasiert. Folglich sollte eine Detektion der frei vorliegenden schweren Kette von MHC Klasse I möglich sein. Da die zur Quantifizierung verwendete MHC-Monomer-Verdünnungsreihe zudem aus HLA-A-Monomeren bestand (Synthese beschrieben in (Walter 2003)), wurde nach einer Charakterisierung des Antikörpers im Western-Blot (siehe Abbildung 19) die Analyse der Lysate (Zellkulturproben sowie Tumor- und Normalgewebe aus den Organen Niere, Colon und Rektum) bezüglich ihres MHC-Gehaltes durchgeführt.

Die in Abbildung 29A,B dargestellten Falschfarbenbilder der Protein-Mikroarray-Inkubation mit anti-HLA-A zeigten ein breites Signalspektrum, das auf eine stark he-

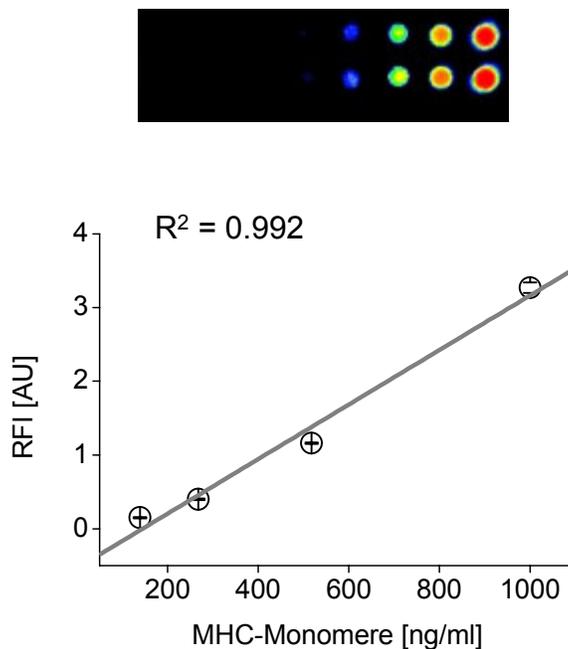
terogene Signalverteilung schließen ließ. Der Signalbereich erstreckte sich von schwach blauen Signalen einzelner Lysate bis zu stark roten Färbungen.



**Abbildung 29: Nachweis von MHC Klasse I über HLA-A in denaturierten Lysaten.** Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen (RCC), Colonkarzinomen (CCA) und Rektumkarzinomen (RCA). M1, M2 steht hier für Metastasen von Probe RCC190. JY, WILJON und LCL sind Zelllysate, die zur Kontrolle der MHC-Quantifizierung gedruckt wurden. Die Abbildungen stellen exemplarisch ausgewählte Falschfarbenbilder von Protein-Mikroarrays nach Inkubation mit Maus-anti-HLA-A (HCA2) (Erstantikörper) und Ziege-anti-Maus (IgG1)-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) und nach Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm dar. In (A) sind die Proben 1 – 40 und in (B) 41 – 80 immobilisiert worden. Die relativen Fluoreszenz-Intensitäten der Proben (Normalgewebe: graue Balken; Tumorgewebe: schwarze Balken) sind unter (C) aufgetragen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten. Das Signal des Leerwerts betrug  $0.029 \pm 0.004$ .

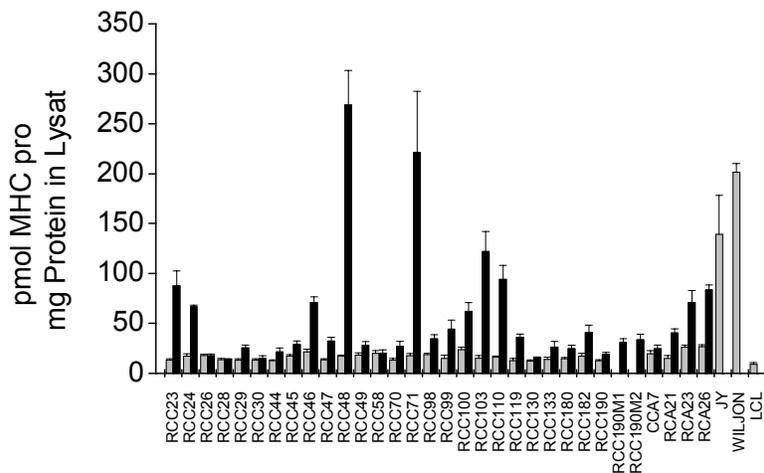
Die in Abbildung 29C aufgetragenen Assay-Rohwerte zeigten eine homogene MHC-Signalverteilung in den untersuchten Normalgeweben mit RFI-Werten

zwischen 0,6 und 1 RFI, wohingegen sich die MHC-Signale der Tumorgewebe zwischen 0,5 und 20 RFI bewegten. Die Tumorgewebe RCC23, 48, 71 und 103 stellten hierbei die stärksten Signale mit RFI-Werten  $> 8$  dar. Trotzdem konnten diese Proben über die Analyse der gedruckten 8 Proben-Spots (4 Verdünnungen in Duplikaten gedruckt) zuverlässig ausgewertet werden. Die detektierten Signale aller Proben lagen deutlich über dem Leerwert ( $0.029 \pm 0.004$  RFI). Die Zelllysate JY und WILJON, die als stark MHC-überexprimierende Zellen beschrieben wurden (Information S. Stevanović) zeigten entsprechend hohe Signale ( $\text{RFI} \geq 15$ ). Die bekanntermaßen wenig MHC Klasse I exprimierende Zelllinie LCL konnte mit einem Signal von  $0.33 \pm 0.18$  entsprechend niedrig nachgewiesen werden. Wie bei der Analyse der Protein-Mikroarrays über den anti- $\beta 2$ -Mikroglobulin-Antikörper, wurde auch bei der HLA-A-basierten Analyse in der großen Mehrzahl der Tumorproben mehr MHC-Signal festgestellt als im korrespondierenden Normalgewebe.



**Abbildung 30: MHC-Quantifizierung auf Protein-Mikroarrays durch HLA-A-Detektion.** Falschfarbenbild nach Inkubation der Arrays mit Maus-anti-HLA-A (HCA2) (Erstantikörper) und Ziege-anti-Maus (IgG 1)-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) nach Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm. Dargestellt sind die 2x 8 Spots der MHC-Monomer-Verdünnungsreihe (10 - 1000 ng/ml), die über eine lineare Regression (hier gezeigt die vier höchsten MHC-Konzentrationen von 139 bis 1000 ng/ml) ausgewertet wurde. Die gezeigten Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Abweichung vom Mittelwert der Duplikat-Spots.

Der anti-HLA-A-Antikörper detektierte von der MHC-Monomer-Standardreihe nur die vier höchsten, immobilisierten Konzentrationen zwischen 139 und 1000 ng/ml. Die im Vergleich zum anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörper geringere Sensitivität ließ trotzdem eine sehr gute Linearisierbarkeit der MHC-Verdünnungsreihe mit einem Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0,992$  zu. Der dynamische Bereich erstreckte sich von 139 bis 1000 ng/ml MHC (Abbildung 30).



**Abbildung 31: MHC-Quantifizierung auf Protein-Mikroarrays durch HLA-A-Detektion.** Auftragung der über HLA-A quantifizierten Signale. Fluoreszenzdetektion im ZeptoREADER bei 635 nm über Ziege-anti-Kaninchen-Fab-Alexa647 (normiert auf die immobilisierte Proteinmenge) ( $n = 3$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die untersuchten Proben beinhalten Tumore (schwarze Balken) und Normalgewebe (grau Balken) aus Nierenzellkarzinomen (RCC), Colonkarzinomen (CCA) und Rektumkarzinomen (RCA). M1, M2 steht hier für Metastasen von Probe RCC190. JY, WILJON und LCL sind Zelllysate, die zur Kontrolle der MHC-Quantifizierung gedruckt wurden.

Auch bei der Analyse des MHC-Gehaltes der 80 Zellkultur- und Gewebeproben mithilfe des anti-HLA-A-Antikörpers wurden die Proben jedes einzelnen Sub-Arrays auf die MHC-Eichreihe desselben Sub-Arrays bezogen. Insgesamt wurden 3 unabhängige Experimente zur graphischen Auftragung in Abbildung 31 ausgewertet. Die Normalgewebe der Organe Niere, Colon und Rektum zeigten eine homogene MHC-Expression um 15 - 20 pmol MHC pro mg Protein in Lysat. Die Tumorgewebe aller drei Organe zeigten in der Regel einen im Vergleich zum Normalgewebe erhöhten MHC-Gehalt, teilweise mit starken Signalen (vor allem die Proben RCC 48, 71 und 103 zeigten Werte  $> 100$  pmol MHC pro mg Protein in Lysat). Auch in den beiden Zellkulturlinien JY und WILJON konnte ein hoher MHC-Gehalt nachgewiesen wer-

den, der in mehrfachem Überschuss zur wenig MHC Klasse I-exprimierenden Zelllinie LCL lag. Die analysierten Metastasen der Nierenprobe RCC 190 bestätigten und übertrafen den Wert der Tumorprobe. Die dargestellten (durchweg kleinen) Fehlerbalken der quantifizierten Proben unterstrichen die hohe Genauigkeit der Messung von MHC Klasse I in diesem Satz Proben über den Nachweis von HLA-A. Somit konnte der Gehalt an MHC Klasse I in Gewebelysaten nicht nur über die MHC Klasse I-Untereinheit  $\beta$ 2-Mikroglobulin, sondern auch über die freie, schwere Kette von HLA-A in denaturierend lysierten Gewebeproben durchgeführt werden. Durch beide Antikörper konnten a) mehrere Konzentrationsstufen der immobilisierten MHC-Verdünnungsreihe sowie b) Antigen-Signale, die deutlich (immer ein Vielfaches des Leerwertes + 3 Standardabweichungen) über dem Leerwert lagen, in den einzelnen Proben nachgewiesen werden.

### **3.4 Protein- und mRNA-Expressionsanalyse von MHC Klasse I**

Die Quantifizierung des MHC Klasse I-Gehaltes in einem größeren Probenstet der Organe Niere, Colon und Rektum mittels Reverse-Screening-Technologie stellte nur einen Teil der Charakterisierung der Gewebeprouen dar. Zusätzlich zur absoluten Quantifizierung sollte mit verschiedenen MHC Klasse I-spezifischen Antikörpern die Expression der Zelloberflächenmoleküle auf Proteinebene und mRNA-Ebene vergleichend analysiert werden.

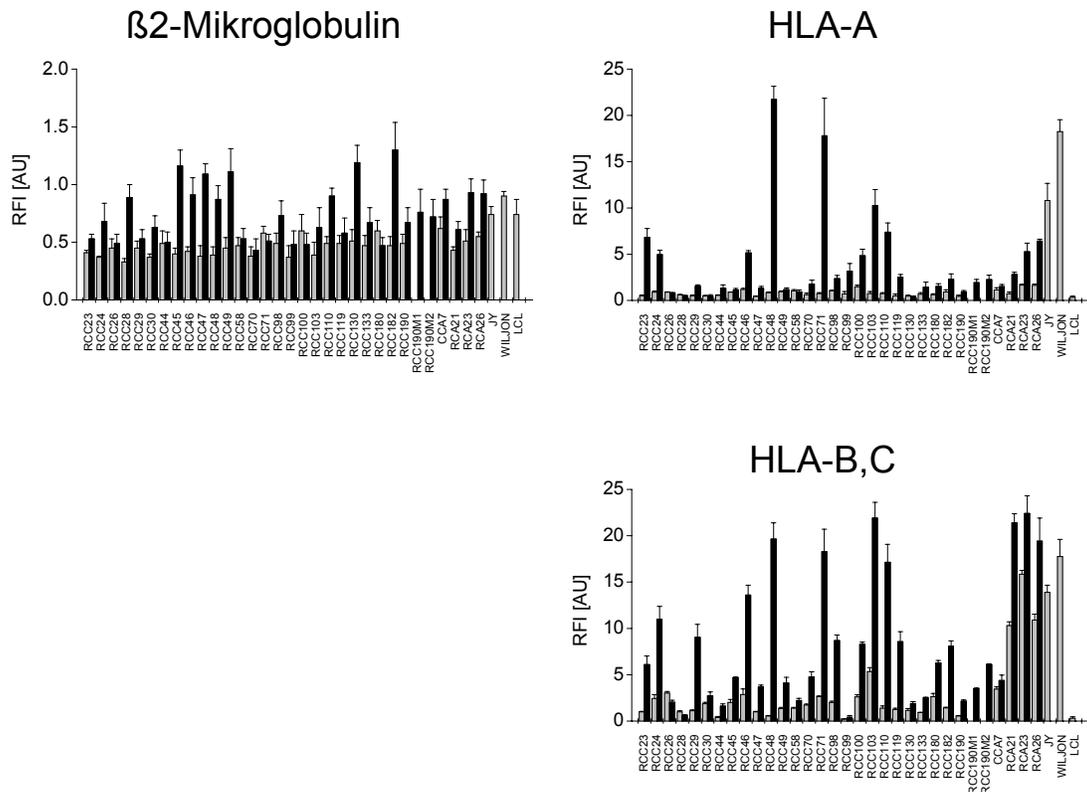
#### **3.4.1 Proteinexpressionsanalyse von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C**

Für die Proteinexpressionsanalyse wurde neben den bereits verwendeten anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin- und anti-HLA-A-Antikörpern ein anti-HLA-B,C-Antikörper hinzugezogen. Dieses auch mit HC10 bezeichnete Bindemolekül konnte Proteine der HLA-Subtypen B und C von MHC Klasse I über deren freie, nicht mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin komplexierte, schwere Kette nachweisen (Stam 1986).

Die Reverse-Screening-Plattform wurde in den folgenden Experimenten zur Untersuchung der Proteinexpression von MHC Klasse I in einem Set von 54 Nierenzellproben, 2 Colonproben, 6 Rektumproben und 3 Zellkulturproben (JY, WILJON, LCL) zu vergleichenden Studien der MHC Klasse I-Expression in Tumor- und Normalgewebe verwendet. Eine Auswertung von 3 unabhängigen Experimenten über 80 Proben war gleichbedeutend mit 6 ausgewerteten Sub-Arrays auf unterschiedlichen Zeptosens-Mikroarray-Substraten.

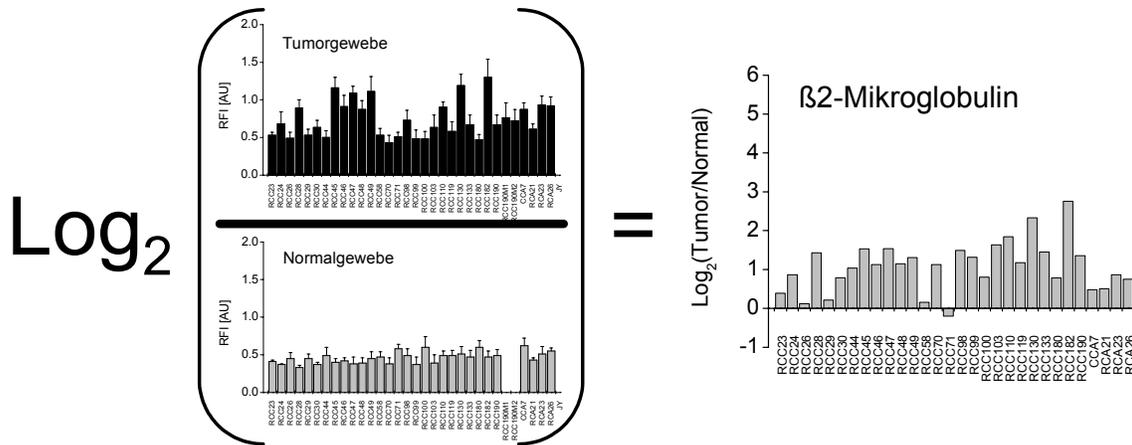
In Abbildung 32 sind - immer direkt nebeneinander dargestellt - die Proteinexpressionswerte von Tumor- und Normalgewebe der drei Organe Niere, Colon und Rektum gezeigt. Bezogen auf die drei untersuchten Antigene  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C fielen a) die bei gleicher Belichtungszeit durchweg niedrigeren detektierten Signale des  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Nachweises (verdeutlicht durch die um den Faktor 10 niedrigere RFI-Skala) sowie b) die starken Signalunterschiede der HLA-A- und HLA-B,C-Inkubationen auf. HLA-A und HLA-B,C gemeinsam waren die teilweise sehr hohen MHC-Signale in Tumorproben (mit Signalwerten > 20 RFI). Bis auf die Normalgewebe der Rektumproben der HC10-Inkubation konnten in keinen anderen Gewebelysaten Signale > 5 RFI nachgewiesen werden. Die Signale der Normalgewebe bei HLA-B,C-Nachweis zeigten teilweise deutlich höhere Werte als bei HLA-A. In den

drei untersuchten Zelllinien konnte durch  $\beta$ 2-Mikroglobulin nur ein minimaler Unterschied in der MHC Klasse I-Expression festgestellt werden, wohingegen durch HLA-A und HLA-B,C vergleichbar starke Unterschiede zwischen JY und WILJON (mit RFI-Werten von 10 - 15) und LCL (mit erwartet niedrigen RFI-Werten deutlich  $< 1$ ) gezeigt wurden.



**Abbildung 32: Proteinexpression von  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C auf Protein-Mikroarrays** durch Nachweis von MHC Klasse I über HLA-A, HLA-B,C und  $\beta$ 2-Mikroglobulin in denaturierten Lysaten. Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen (RCC), Colonkarzinomen (CCA) und Rektumkarzinomen (RCA). M1, M2 steht hier für Metastasen von Probe RCC190. JY, WILJON und LCL sind Zelllysate, die als Positiv-Kontrolle gedruckt wurden. Die Arrays wurden mit Maus-anti-HLA-A (HCA2), Maus-anti-HLA-B,C (HC10) und Kaninchen-anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin (Erstantikörper) und zur Detektion mit Ziege-anti-Maus (IgG 1)-Alexa647-Fab bzw. Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) zur Detektion der Fluoreszenz im Zepto-READER bei 635 nm inkubiert. Die relativen Fluoreszenz-Intensitäten der Proben (Normalgewebe: graue Balken; Tumorgewebe: schwarze Balken) sind auf die immobilisierte Proteinmenge normiert. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten.

Um die nachgewiesenen Proteinexpressionswerte anschaulich darzustellen und die Daten leichter interpretieren zu können, wurde zur Analyse der Proteinexpression folgende Auftragung gewählt:

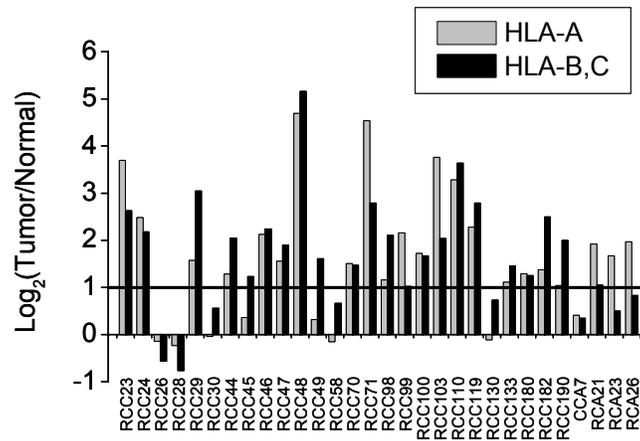


**Abbildung 33: Schematische Darstellung der Berechnung zur logarithmischen Auftragung der Proteinexpression.** Zur Auswertung der Proteinexpression – d.h. der Vergleich der Proteinexpression im Tumorgewebe bezogen auf die Proteinexpression im Normalgewebe - wurde eine logarithmische Auftragung zur Basis 2 angewendet, die eine äquidistante Darstellung positiver wie negativer Expressionsverhältnisse garantiert. Die gezeigten Signale sind alle vor ihrer logarithmischen Darstellung auf die tatsächlich immobilisierte Menge Protein auf den Mikroarray-Substraten normiert worden.

Die logarithmische Darstellung der Proteinexpressionsverhältnisse (Abbildung 33), angegeben in Signal des Tumor- zum Signal des Normalgewebes (hier gezeigt am Beispiel  $\beta$ 2-Mikroglobulin), ließ für den untersuchten Analyten eine homogene Signalverteilung in den Normalgewebeproben und eine heterogene Verteilung der Antigen-spezifischen Signale in den Tumorgewebeproben erkennen. Somit konnte der gezeigte Proteinexpressionsunterschied vor allem den Tumorsysaten zugeschrieben werden. Auch HLA-A und HLA-B,C zeigten eine relativ konstante Basisexpression von MHC Klasse I in den jeweiligen Normalgeweben sowie ein heterogenes, das Expressionsverhältnis bestimmende, Signalspektrum in den Tumorsysaten (gezeigt in Abbildung 32).

In 26 Nierenprobenpaaren, einem Colonprobenpaar und drei Rektumgewebepaaren konnte über die Proteinexpressionsanalyse eine deutlich erhöhte Expression von MHC Klasse I in Tumoren im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgewebeproben nachgewiesen werden (Abbildung 34). Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die Analyse über  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A oder HLA-B,C durchgeführt wurde. Je nach Analyt fanden sich nur ein bis fünf von 30 Probenpaaren, in denen mehr MHC Klasse I-Expression im Normalgewebe zu finden war. Wurde der Wert ( $\pm$ ) 1 auf der logarithmischen Skala (gleichbedeutend mit 2-fach erhöhter bzw. erniedrigter Proteinexpression) als Schwellenwert definiert, ab dem ein Expressionsunterschied als

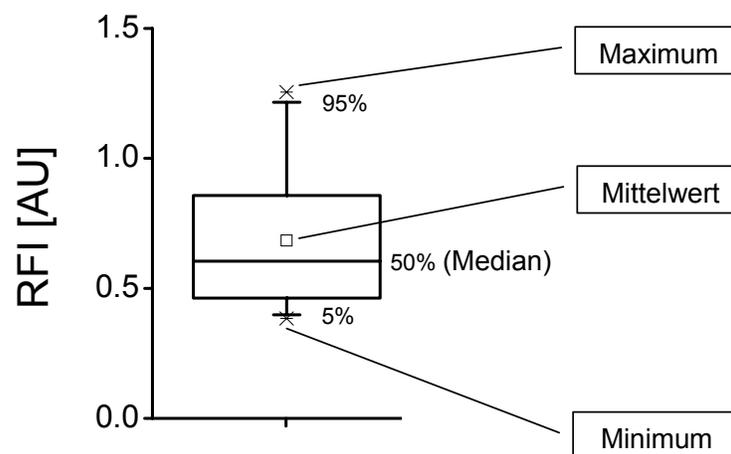




**Abbildung 35: Vergleich der Proteinexpression von HLA-A mit HLA-B,C.** Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen (RCC), Colonkarzinomen (CCA) und Rektumkarzinomen (RCA). Dargestellt sind Log<sub>2</sub>-Verhältnisse des Signals der Tumorprobe zum Signal der Normalgewebeprobe. Der horizontale, schwarze Balken gibt einen Schwellenwert von Log<sub>2</sub>(Tumor/Normal) = 1 an.

### 3.4.2 Signifikanzanalyse der Proteinexpression von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C in Normal- und Tumorgeweben der Niere

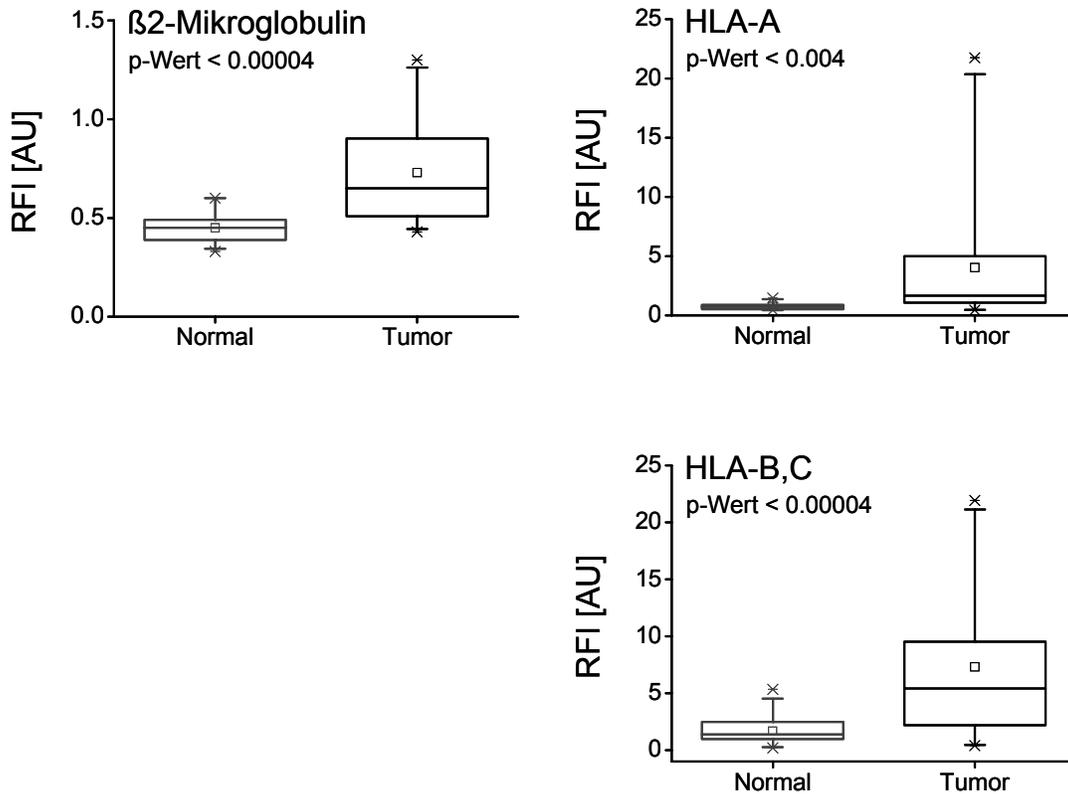
Zur Signifikanz-Auswertung, d.h. zur Beantwortung der Frage, mit welcher Wahrscheinlichkeit sich die untersuchten Gewebepopulationen (Normal versus Tumor) des Organs Niere signifikant von einander unterscheiden, wurden die Messwerte der unter 3.4.1 beschriebenen Proteinexpressionsanalysen in einem *Box and Whiskers plot* (siehe Abbildung 36) aufgetragen (Sachs 1996). Dabei wurden die Messwerte in zwei Gruppen eingeteilt: Normalgewebe der Niere (n = 26), korrespondierendes Tumorgewebe der Niere (n = 26). Zur statistischen Bewertung hinsichtlich der Signifikanz wurden gepaarte t-Tests mit den Gruppen untereinander durchgeführt. Die Ergebnisse der t-Tests sind in *Box and Whisker plots* als p-Wert vermerkt.



**Abbildung 36: Box and Whiskers Plot.** Im Diagramm sind die einzelnen Komponenten eines *Box and Whiskers Plot* erklärt. Die *Box* umfasst 50% aller Messwerte. Die Enden der senkrechten Balken (*Whiskers*) schließen 90% aller Messwerte ein. Die Kreuze unterhalb und oberhalb der Balken markieren die Extremwerte der Messung. Der Mittelwert ist durch ein kleines Quadrat in der *Box* dargestellt. Der Median ist innerhalb der *Box* mit einer durchgehenden, horizontalen Linie dargestellt.

Die Proteinexpressionsanalysen wurden im Folgenden statistisch interpretiert. Bei den 3 untersuchten Analyten  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C konnte mittels *Box and Whiskers Plots* und durch t-Test-Analysen mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p$  mindestens  $< 0.004$  festgestellt werden, dass sich die Population der untersuchten

Tumorgewebe hinsichtlich der MHC Klasse I-Expression signifikant von der Population der korrespondierenden Normalgewebe unterschied (dargestellt in Abbildung 37).

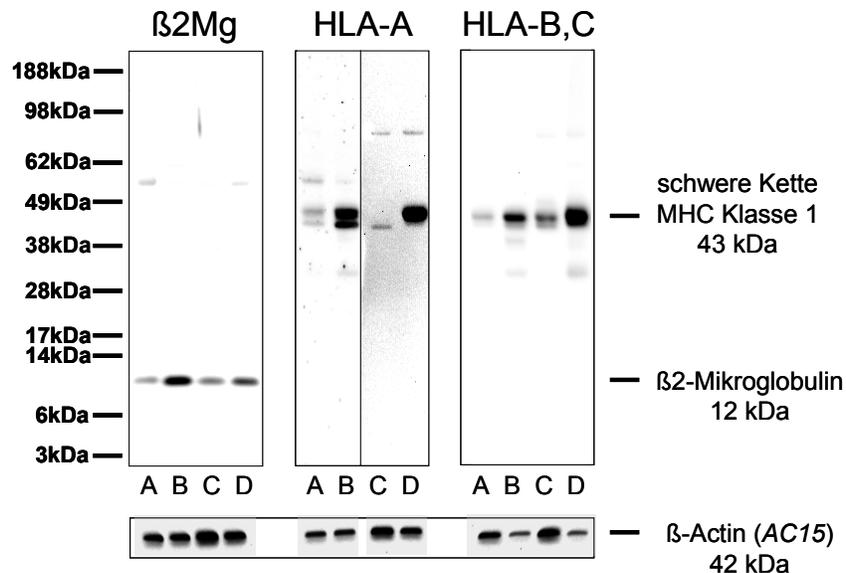


**Abbildung 37: Signifikanzanalyse der MHC Klasse I-Expression in Nierenzellproben über  $\beta 2$ -Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C.** Zur statistischen Auswertung sind die zwei Gruppen Normalgewebe (n = 26) und Tumorgewebe (n = 26) des Organs Niere in einem *Box and Whiskers Plot* dargestellt. Der horizontale Balken in der *Box* gibt den Median der gemessenen Quantifizierungs-Werte an. In der Abbildung ist der ermittelte p-Wert zur statistischen Signifikanzanalyse der beiden Gruppen angegeben.

Die Wahrscheinlichkeit der signifikanten Unterscheidung der zwei Populationen konnte bei der Untersuchung der  $\beta 2$ -Mikroglobulin- bzw. HLA-B,C-Expression mit  $p < 0.00004$  angegeben werden. Zudem wurde durch die gewählte Auftragung der Daten die Heterogenität der Signale und das Auftreten von extremen Signalen bei der Untersuchung von HLA-A und HLA-B,C deutlich.

### 3.4.3 Western-Blot-Analyse zur Protein-Expression von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C

Zur Überprüfung der mittels Reverse-Screening gewonnenen Aussagen zur MHC Klasse I-Proteinexpression wurden Western-Blot-Analysen mit ausgewählten Proben (RCC23 und 24, jeweils Normal- und Tumorgewebe) durchgeführt.

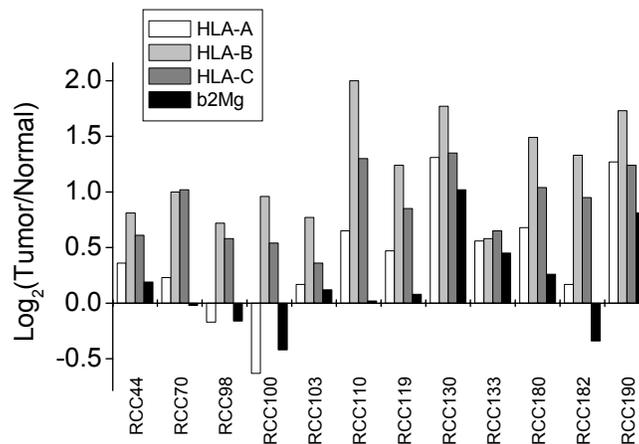


**Abbildung 38: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C in denaturierend lysierten Gewebelysaten.** Eine Auswertung erfolgte nach Inkubation der Primärantikörper anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2Mg), anti-HLA-A sowie anti-HLA-B,C und nachfolgender Lumineszenz-Detektion mittels HRP-gekoppeltem anti-Spezies-Antikörper. Die Proteinexpressionsanalyse erfolgte in Normal- und Tumorgeweben von Nierenproben (RCC): (A) 23N, (B) 23T, (C) 24N, (D) 24T. Im oberen Western-Blot sind die MHC-spezifischen Banden von HLA-A, HLA-B,C (43kDa) und  $\beta$ 2-Mikroglobulin (12 kDa) dargestellt, im unteren Western-Blot die korrespondierenden  $\beta$ -Actin-Banden bei 42 kDa als Ladungskontrolle (aufgenommen nach Strippen der Membranen).

Über die Analyse der MHC Klasse1-Expression im Western-Blot, durchgeführt mithilfe der anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin-, anti-HLA-A- und anti-HLA-B,C-Antikörper, konnten die Ergebnisse der Proteinexpressionsstudien, die durch Antikörper-Inkubationen auf Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays gewonnen wurden, bestätigt werden (Abbildung 38). Die drei Analyten zeigten eine deutliche Überexpression von MHC Klasse I in den Tumorgewebelysaten im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgewebelysaten. Das Resultat wurde im Falle der HLA-B,C-Analyse durch den schwächeren Actin-Nachweis in den Tumorslysaten, der als Ladekontrolle für dieses Experiment verwendet wurde, zusätzlich verdeutlicht.

### 3.4.4 mRNA-Expression von $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A, HLA-B und HLA-C

Zur Analyse der mRNA-Expression von MHC Klasse I in einem definierten Proben-satz von Nierenzellproben wurden Daten der Arbeitsgruppe Stevanović ausgewertet. Diese freundlicherweise zur Verfügung gestellten Expressionsdaten wurden durch Affymetrix-Analysen (durchgeführt von O. Schoor, AG Stevanović) von 12 Nierenprobenpaaren (d.h. normales und malignes Nierengewebe) gewonnen.

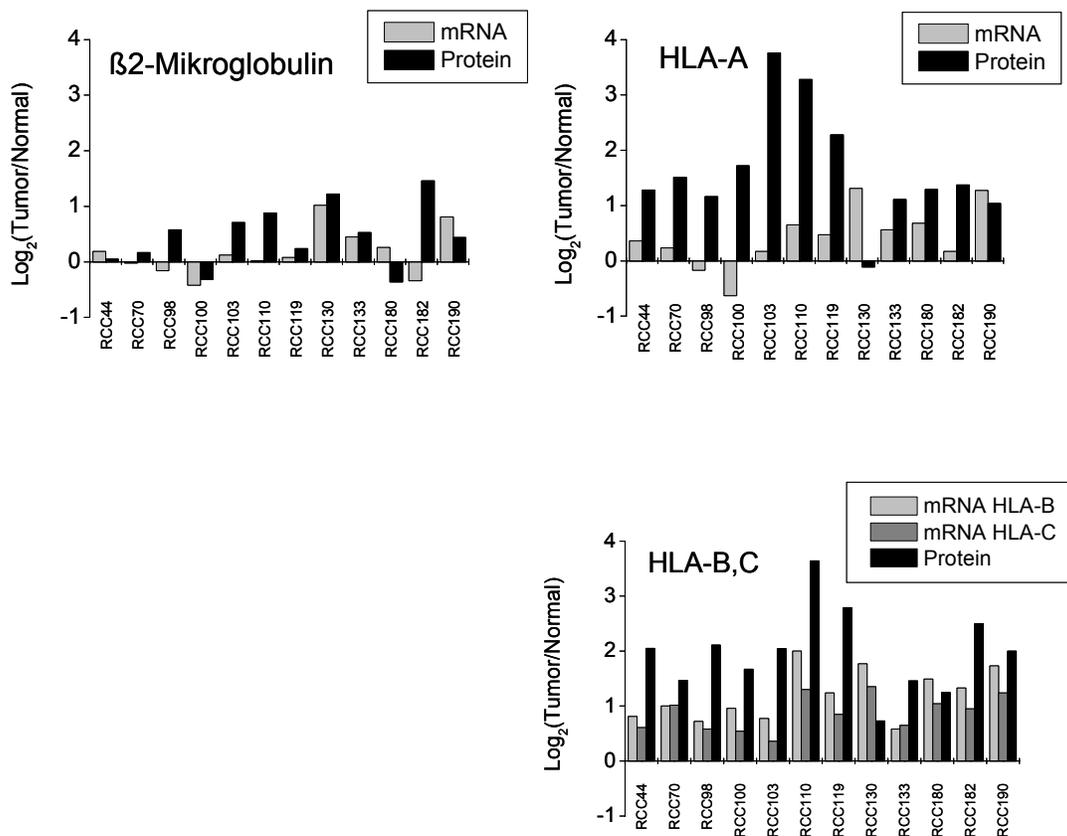


**Abbildung 39: mRNA-Expressionsanalyse von  $\beta$ 2-Mikroglobulin ( $\beta$ 2Mg), HLA-A, HLA-B und HLA-C**, basierend auf Affymetrix-Chip-Experimenten (Daten zur Auswertung von S. Stevanović zur Verfügung gestellt). Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen (RCC). Dargestellt sind die  $\text{Log}_2$ -Verhältnisse des Signals der Tumorprobe zum Signal der Normalgewebeprobe. Die mRNA-Expressionsdaten wurden zur Auswertung für diese Doktorarbeit freundlicherweise von S. Stevanović zur Verfügung gestellt.

Die untersuchten Proben wurden hinsichtlich der Expression von MHC Klasse I auf mRNA-Ebene analysiert. Mithilfe der verwendeten Affymetrix-Chip-Technologie konnte eine verstärkte Transkription der HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Gene nachgewiesen werden (mit bis zu 4-facher Hochregulation im Tumorgewebe verglichen mit der korrespondierenden Normalgewebeprobe; Abbildung 39). Die  $\beta$ 2-Mikroglobulin-bezogene Gentranskription war unverändert. Insgesamt konnte in 9 von 12 Proben eine teilweise deutliche Hochregulation vom MHC Klasse I-Gencluster ( $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A, HLA-B, HLA-C) gefunden werden. Für HLA-B und HLA-C wurde in 12 von 12 Probenpaaren eine deutlich hochregulierte mRNA-Expression nachgewiesen.

### 3.4.5 Expressionsanalyse von MHC Klasse I in Normal- und Tumorgeweben der Niere - Protein versus mRNA

Im nun folgenden Kapitel der Doktorarbeit sollte die Expression von MHC Klasse I auf Proteinebene (analysiert auf Protein-Mikroarrays) mit der Expression auf mRNA-Ebene (analysiert auf Affymetrix-Chips; durchgeführt von O. Schoor, AG Stevanović) verglichen werden.



**Abbildung 40: Vergleich von MHC Klasse I Protein- mit mRNA-Expression.** Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen (RCC). Dargestellt sind die Log<sub>2</sub>-Verhältnisse des Signals der Tumorseite zum Signal der Normalgewebeseite. In hellgrauen und dunkelgrauen Balken sind die mRNA-Werte aufgetragen, in schwarzen Balken die Protein-Werte. Die mRNA-Expressionsdaten wurden zur Auswertung für diese Doktorarbeit freundlicherweise von S. Stevanović zur Verfügung gestellt.

Bezogen auf die absolute Signalhöhe und die Tendenz zur Hochregulation von MHC Klasse I korrelierte die Proteinexpression von β2-Mikroglobulin in den auf Protein-Mikroarrays untersuchten 12 Probenpaaren gut mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalyse (Abbildung 40). Der Korrelationskoeffizient konnte mit  $R^2 = 0.19$

angegeben werden. 8 von 12 Probenpaare zeigten das gleiche Expressionsmuster, darunter 7 von 8 Paaren mit dem Nachweis zur Hochregulation von  $\beta$ 2-Mikroglobulin auf Protein- und mRNA-Ebene. In Probe RCC100 konnte eine verringerte Protein- und mRNA-Expression von  $\beta$ 2-Mikroglobulin gefunden werden.

Die HLA-A-Expression auf Proteinebene konnte mit deutlich stärkerer Hochregulation als die im Vergleich untersuchte mRNA-Expression angegeben werden. In 9 von 12 Probenpaaren war in den Tumorgewebeproben gleichviel oder mehr Protein und mRNA als in den Normalgewebeproben zu finden. In 3 von 12 Fällen unterschieden sich die Protein- von den mRNA-Expressionsverhältnissen bezüglich der Tendenz zur Hoch- bzw. Niederregulation. Der Korrelationskoeffizient von  $R^2 = -0.23$  verdeutlichte eine nur eingeschränkte Korrelation der mRNA- mit der Proteinexpression.

Bezogen auf HLA-B und HLA-C konnte eine vergleichbare mRNA-Expression der beiden Gene gefunden werden, die in allen Fällen mit der Proteinexpression korrelierte. In 12 von 12 Probenpaaren exprimierten die Tumorgewebe deutlich mehr MHC Klasse I-mRNA und -Protein als die Kontrollgewebe. 10 von 12 Probenpaare zeigten eine stärkere Protein- als mRNA-Hochregulation in den untersuchten Tumorslysaten. Die gute Korrelation der mRNA- mit der Proteinexpression ließ sich auch durch den Korrelationskoeffizienten nachweisen, der für den Vergleich von HLA-B (mRNA) mit HLA-B,C (Protein)  $R^2 = 0.47$  und für den Vergleich von HLA-C (mRNA) mit HLA-B,C (Protein)  $R^2 = 0.25$  betrug.

	Proteinexpression	mRNA-Expression
$\beta$ 2-Mikroglobulin		
HLA-A		
HLA-B,C		

**Abbildung 41: Darstellung der Expressionsverhältnisse von  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C auf Protein- und mRNA-Ebene.** Interpretiert wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Expressionsdaten.

Die in Tabelle 12 aufgeführten Protein- und mRNA-Expressionsverhältnisse sind in Abbildung 41 graphisch dargestellt. Zusammenfassend konnte eine unveränderte mRNA-Expression sowie eine leichte Hochregulation (bis maximal Faktor 2) auf Pro-

teinebene für die nicht-kovalent assoziierte MHC Klasse I-Untereinheit  $\beta$ 2-Mikroglobulin nachgewiesen werden. HLA-A zeigte auf Proteinebene eine teilweise deutliche Hochregulation der Expression. Auf der Ebene der mRNA-Expression konnte dieses Resultat in verminderter Ausprägung (mit Faktoren bis ca. 2.5) mit mäßiger Korrelation zur Proteinexpression nachvollzogen werden.

**Tabelle 12: Protein- und mRNA-Expressionsdaten von MHC Klasse I.** Rohdaten zur Expressionsanalyse von mRNA und Protein in Gewebelysaten von Nierenproben, dargestellt als Verhältnis Tumor- zu Normalgewebe (T/N) (nicht-logarithmisch). b2Mg =  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Grau unterlegte Zahlen der Protein-Expressions-Spalten zeigen einen Wert > 5, grau unterlegte Zahlen der mRNA-Expressions-Spalten einen Wert > 3 an. Die mRNA-Expressionsdaten wurden zur Auswertung für diese Doktorarbeit freundlicherweise von S. Stevanović zur Verfügung gestellt.

Probe	Protein-Expression			mRNA-Expression			
	HLA-A	HLA-B,C	b2Mg	HLA-A	HLA-B	HLA-C	b2Mg
	T/N	T/N	T/N	T/N	T/N	T/N	T/N
RCC44	2.44	4.14	1.04	1.29	1.75	1.52	1.14
RCC70	2.85	2.77	1.13	1.17	2.00	2.02	0.98
RCC98	2.24	4.31	1.49	0.89	1.65	1.50	0.90
RCC100	3.29	3.17	0.80	0.65	1.95	1.46	0.75
RCC103	13.65	4.11	1.64	1.13	1.71	1.28	1.08
RCC110	9.71	12.48	1.85	1.57	3.99	2.47	1.01
RCC119	4.87	6.90	1.18	1.38	2.37	1.81	1.06
RCC130	0.92	1.66	2.33	2.48	3.41	2.55	2.02
RCC133	2.13	2.74	1.45	1.47	1.49	1.57	1.36
RCC180	2.43	2.38	0.78	1.60	2.81	2.06	1.20
RCC182	2.57	5.67	2.76	1.12	2.51	1.93	0.79
RCC190	2.04	3.99	1.36	2.40	3.32	2.36	1.75
RCC23	13.03	6.21	1.31				
RCC24	5.59	4.53	1.82				
RCC26	0.91	0.68	1.09				
RCC28	0.85	0.59	2.69				
RCC29	2.97	8.31	1.16				
RCC30	0.97	1.48	1.73				
RCC45	1.28	2.34	2.88				
RCC46	4.36	4.73	2.18				
RCC47	2.94	3.73	2.91				
RCC48	25.82	35.84	2.22				
RCC49	1.25	3.05	2.48				
RCC58	0.90	1.59	1.12				
RCC71	23.27	6.92	0.87				
RCC99	1.31	2.03	1.31				
CCA7	1.33	1.27	1.39				
RCA21	3.79	2.08	1.41				
RCA23	3.19	1.41	1.82				
RCA26	3.93	1.78	1.69				

Für HLA-B,C konnte die stärkste Proteinüberexpression gezeigt werden (mit starken Ausreißern bis maximal Faktor 36 mehr HLA-B,C-Proteinexpression im Tumor- zum Normalgewebe). Auch auf der mRNA-Ebene konnte (mit Werten bis maximal Faktor 4) eine deutliche Überexpression von HLA-B,C (hier vor allem HLA-B) gezeigt wer-

den, die aber nicht in gleichem Maße die Extreme der Proteinregulation widerspiegelte.

Die dargestellten Daten widersprechen der gängigen Lehrmeinung, dass sich Tumorgewebe einer Immunreaktion durch verminderte MHC-Expression entziehen (Seliger 2000). Es konnte in dieser Studie auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene gezeigt werden, dass in der großen Mehrzahl der untersuchten Nierenprobenpaare eine teilweise sehr deutliche Hochregulation von MHC Klasse I in den Tumorgeweben zu finden war. Diese Daten wurden durch Experimente gewonnen, die zur mRNA-Expressionsanalyse die Affymetrix-Chip-Technologie und für die Proteinexpressionsanalyse die neuartige, sorgfältig etablierte Reverse-Screening-Technologie verwendeten. Hierbei wurden immer drei unabhängige Experimente ausgewertet, nachdem die untersuchten Protein-Mikroarrays auf die tatsächlich immobilisierte Proteinmenge normiert und die verwendeten Bindemoleküle hinsichtlich ihrer Spezifität charakterisiert worden waren. Somit wurden zwei hochwertige, valide Technologien miteinander verknüpft, um die Expression von MHC Klasse I analysieren zu können.

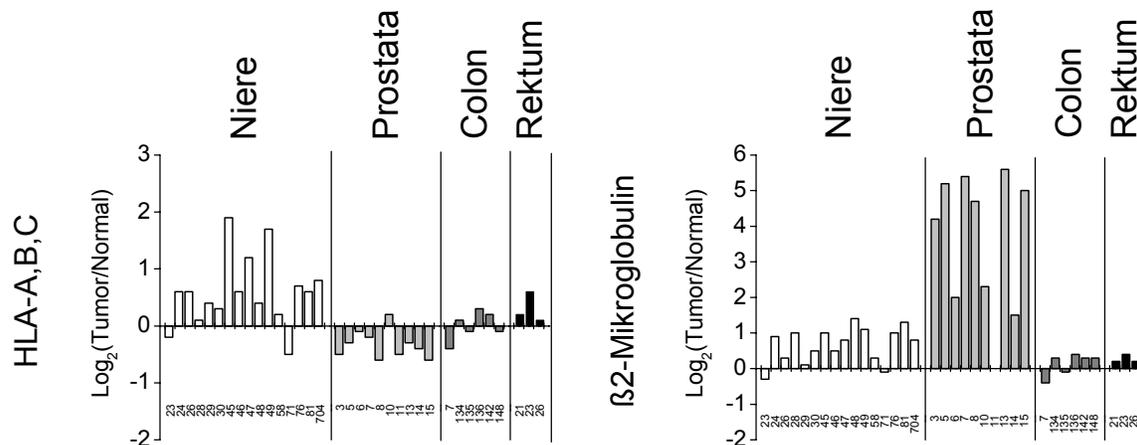
### **3.5 Tumor-Screening**

Die bereits zur Quantifizierung von Proteinen eingesetzte Reverse-Screening-Plattform (gezeigt in Kapitel 3.3 dieser Studie) wurde in diesem Teil der Doktorarbeit verwendet, um Tumor-assoziierte Antigene (Tumormarker) in einem großen Proben-satz auf ihre Expression in Tumor- und dem korrespondierenden Normalgewebe zu untersuchen. Durch diese Tumor-Screening genannte Applikation wurden Tumormarker analysiert, die über die Charakterisierung von Peptiden erforscht wurden, die MHC-Proteine auf der Zelloberfläche von Geweben präsentierten. Die exprimierten, an der Zelloberfläche verankerten MHC-Proteine tragen Peptide unterschiedlicher Länge von zytosolisch oder endosomal abgebauten Proteinen, die durch Immunopräzipitationstechniken aufgereinigt und durch Massenspektrometrie analysiert wurden. Über die Peptidsequenz konnte in einem nächsten Schritt auf Proteine rückgeschlossen werden, die entweder Tumor-spezifische Antigene (wenn sie ausschließlich in Tumoren zu finden waren) oder Tumor-assoziierte Antigene (wenn sie neben den Normalgewebe auch in Tumoren zu finden waren) genannt wurden (Stevanović 2002). Die hier untersuchten Tumormarker waren Tumor-assoziierte Antigene, die in der Arbeitsgruppe Stevanović identifiziert wurden. Durch die Anwendung der Reverse-Screening-Technologie wurden ihre Proteinexpressionsmuster in Tumor- und Normalgeweben untersucht. Eine notwendige Voraussetzung war auch hier die Spezifität der eingesetzten Antikörper einerseits sowie die durch Verwendung der Zeptosens-Technologie erreichte Sensitivität der Untersuchungen, da die Tumormarker oft in sehr geringen Konzentrationen in den Gewebelysaten vorliegen.

#### **3.5.1 Tumor-Screening von MHC Klasse I-Proteinen**

In einem ersten Screening-Ansatz wurden in einem Satz von 16 Nierenprobenpaaren (jeweils Tumor- und korrespondierendes Normalgewebe), 10 Prostataprobenpaaren, 6 Colonprobenpaaren und 3 Rektumprobenpaaren die Proteine HLA-A,B,C und  $\beta$ 2-Mikroglobulin untersucht. Da die Probengrößen der Prostatakarzinomgewebe sehr klein waren, wurde als Kontrollgewebe histologisch klassifiziertes Gewebe der Samenblase eingesetzt. Die Proteine HLA-A,B,C und  $\beta$ 2-Mikroglobulin sind nicht als „klassische“ Tumormarker beschrieben. Dennoch wurde die Analyse gerade dieser MHC Klasse I-Proteine als interessant angesehen, da sie a) in vorgehenden Kapiteln

dieser Studie absolut quantifiziert und b) als potentielle Marker einer malignen Zelltransformation betrachtet wurden.



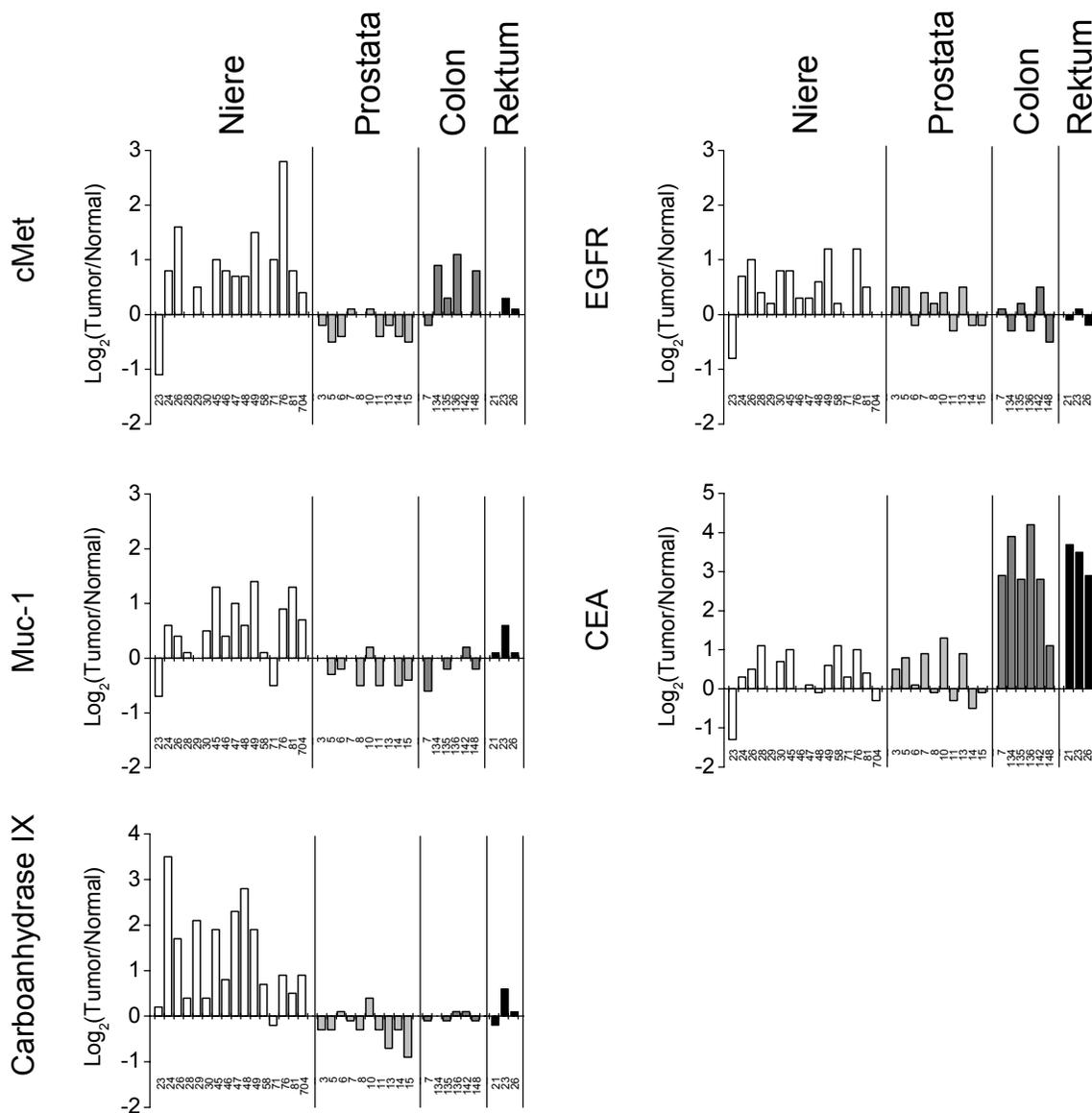
**Abbildung 42: Tumor-Screening von HLA-A,B,C und β2-Mikroglobulin.** Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, Colonkarzinomen und Rektumkarzinomen. Die Arrays wurden mit Maus-anti-HLA-A,B,C (w6/32) bzw. Kaninchen-anti-β2-Mikroglobulin (Erstantikörper) und zur Detektion mit Ziege-anti-Maus (IgG 1)-Alexa647-Fab bzw. Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) zur Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm inkubiert. Die logarithmisch zur Basis 2 dargestellten Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisse der Tumorgewebeproben zu den Normalgewebeproben sind auf die immobilisierte Proteinmenge normiert.

Durch die Expressionsanalyse von HLA-A,B,C in den untersuchten 70 Gewebeproben wurde deutlich, dass die Proteine HLA-A, HLA-B und HLA-C eine unauffällige Expression in Prostata, Colon und Rektum zeigen (Abbildung 42). In den Nierenproben zeigte sich eine tendenzielle Überexpression mit Log<sub>2</sub>-Werten bis ca. 2, was einer 4-fachen Überexpression von HLA-A,B,C in Tumor- verglichen mit den korrespondierenden Normalgeweben bedeutete. Das nicht-kovalent an MHC Klasse I-assoziierte Protein β2-Mikroglobulin konnte mit einer schwachen Tendenz zur Überexpression in Nierentumoren, einer unauffälligen Expression in Colon- und Rektumproben und einer sehr deutlichen Überexpression in den untersuchten Prostata Tumoren charakterisiert werden. Dieses Ergebnis bedeutet entweder, dass die Proteinexpression von β2-Mikroglobulin in der Prostata um einen Faktor 5-50 höher ist als in der Samenblase, oder dass β2-Mikroglobulin als potentieller Tumormarker in Prostatageweben identifiziert wurde.



### 3.5.3 Tumor-Screening membranständiger Proteine

In die Tumor-Screening-Analyse wurden auch Zellmembranproteine aufgenommen, die von ihrer Struktur her als membranverankerte (CEA (auch CEACAM5 genannt)) oder transmembrane Proteine (EGFR (*endothelial growth factor receptor*), cMet, Carboanhydrase IX, Muc-1) charakterisiert wurden.



**Abbildung 44: Tumor-Screening von cMet, EGFR, Muc-1, Carboanhydrase IX und CEA (CEA-CAM5).** Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, Colonkarzinomen und Rektumkarzinomen. Die Arrays wurden mit Kaninchen-anti-cMet, Kaninchen-anti-EGFR, Kaninchen-anti-Carboanhydrase IX, Kaninchen-anti-CEA bzw. Maus-anti-Muc-1 (Erstantikörper) und zur Detektion mit Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab bzw. Ziege-anti-Maus (IgG 1)-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) zur Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm inkubiert. Die logarithmisch zur Basis 2 dargestellten Fluoreszenzintensitäts-

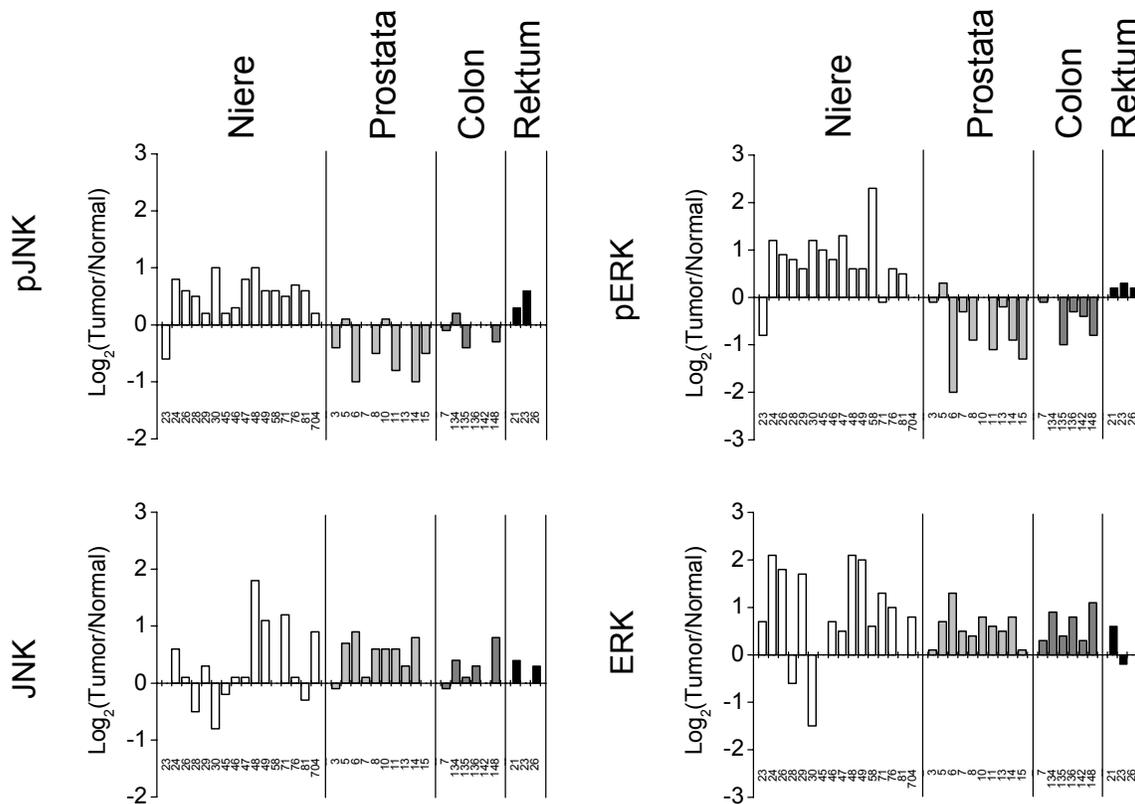
Verhältnisse der Tumorgewebeproben zu den Normalgewebeproben sind auf die immobilisierte Proteinmenge normiert.

Die Rezeptortyrosinkinase cMet zeigte eine unauffällige Proteinexpression in den Geweben von Prostata und Rektum (siehe Abbildung 44). In den Tumoren der Niere und des Colons konnte eine nahezu eindeutige Überexpression von cMet (12 von 16 Probenpaare der Niere sowie 4 von 6 Probenpaare des Colons) nachgewiesen werden. Die Expressionstudie von EGFR in Tumor- und Normalproben der Organe Prostata, Colon und Rektum zeigte eine heterogene, in der Summe unauffällige Tendenz. Dahingegen konnte für die Tumoren der Niere in den denaturiert auf Protein-Mikroarrays immobilisierten Gewebelysaten eine schwache Tendenz zur Überexpression (mit Werten bis zu Faktor 2.3) festgestellt werden. Das membrangebundene, glykosylierte Phosphoprotein Muc-1 zeigte nur in den Nierenproben eine auffällige Expressionstendenz – hier wurde eine schwache Überexpression von Muc-1 in 13 von 16 Proben gefunden. Das Karzinoembryonale Antigen CEA zeigte eine heterogene, in der Summe unauffällige Proteinexpression in den Proben der Organe Niere und Prostata. Dahingegen konnte für die Colon- und Rektumkarzinomproben, mit bis zu 16-facher Überexpression, CEA als deutlicher Tumormarker charakterisiert werden. Die als Tumor-assoziiertes Isoenzym der Niere bekannte Carboanhydrase IX konnte im Tumor-Screening als eindeutig Nierenzellkarzinom-abhängiges Protein klassifiziert werden. Die Expressionswerte der Nierentumoren zeigten eine bis zu 12-fache Überexpression im Vergleich zu den Kontrollgeweben der Niere. Die Proteinexpression in den Organen Prostata, Colon und Rektum konnte als unauffällig beschrieben werden.

### 3.5.4 Tumor-Screening von Signalproteinen

Die Konformation von Signalproteinen kann durch Phosphorylierung / Dephosphorylierung, direkte Protein-Interaktion, Nukleotid-Bindung, Acetylierung oder Interaktion mit Ionen verändert werden, die daraufhin das von extrazellulär kommende Signal (z.B. ausgelöst durch Wachstumsfaktoren wie EGF (*endothelial growth factor*) oder Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )) in den Zellkern weiterleiten und dadurch Prozesse der Zelldifferenzierung oder Zellproliferation einleiten. Zwei Beispiele für Signalproteine waren in dieser Arbeit ERK (*extracellular signal-related kinase*) und JNK (Jun-Kinase) aus dem MAP-Kinase-Weg, die durch Phosphorylierung reguliert werden. In dieser Studie wurden neben dem Gesamtgehalt der Gewebelysate an

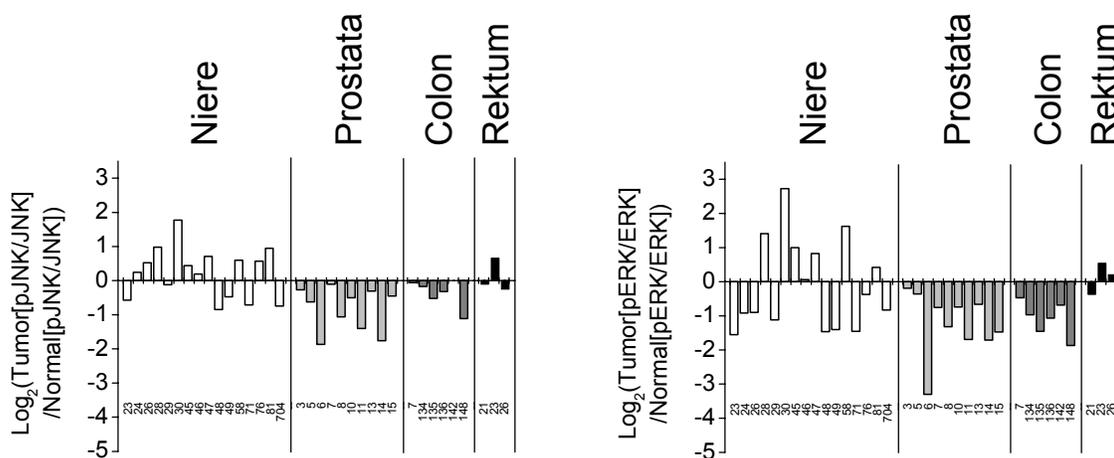
ERK bzw. JNK auch die jeweiligen phosphorylierten Formen bezüglich ihrer Protein-expressionsmuster analysiert.



**Abbildung 45: Tumor-Screening von pospho-JNK, JNK, pospho-ERK und ERK.** Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, Colonkarzinomen und Rektumkarzinomen. Die Arrays wurden mit Kaninchen-anti-pJNK, Kaninchen-anti-JNK, Kaninchen-anti-pERK bzw. Kaninchen-anti-ERK (Erstantikörper) und zur Detektion mit Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) zur Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm inkubiert. Die logarithmisch zur Basis 2 dargestellten Fluoreszenzintensitäts-Verhältnisse der Tumorgewebeprobe zu den Normalgewebeprobe sind auf die immobilisierte Proteinmenge normiert.

Durch die Tumor-Screening-Analyse von JNK (Abbildung 45) konnte nur in den Prostatakarzinomproben eine eindeutige Proteinexpressionstendenz (in diesem Falle zur leichten Überexpression) nachgewiesen werden. Die Proben der Organe Niere, Colon und Rektum zeigten ein heterogenes, nicht zu Minder- oder Überexpression deutbares Signalspektrum. Phosphoryliertes JNK (pJNK) zeigte ebenso heterogene Signale in den Prostata-, Colon- und Rektumproben, jedoch eine schwache, aber nahezu eindeutige Tendenz der Proteinüberexpression in den Tumorsproben der Nierengewebeprobe. 15 von 16 Nierentumoren exprimierten mehr pJNK als ihre kor-

respondierenden Normalgewebe. Für ERK konnte in den Prostata- und Colontumoren eine eindeutige, bis zu 3-fache Überexpression nachgewiesen werden. Die Signale der Nierentumore erstreckten sich von fast 4-facher Überexpression hin zu 3-facher Mindereexpression. 12 von 16 Probenpaare wiesen die Tendenz auf, mehr ERK im Tumor- als im Normalgewebe zu exprimieren. Phosphoryliertes ERK (pERK) wurde in nahezu eindeutiger Tendenz zur Mindereexpression in den Tumorgeweben der Organe Prostata und Colon detektiert. Die Rektumproben zeigten eine unauffällige pERK-Proteinexpression, wohingegen die Nierentumoren in 13 von 16 Fällen bis zu 5-mal mehr pERK exprimierten als die Kontrollgewebe.



**Abbildung 46: Verhältnisse der Proteinexpression von phospho-JNK zu JNK bzw. phospho-ERK zu ERK in Tumor- zu Normalgeweben.** Die untersuchten Proben beinhalten Tumore und Normalgewebe aus Nierenzellkarzinomen, Prostatakarzinomen, Colonkarzinomen und Rektumkarzinomen. Die Arrays wurden mit Kaninchen-anti-pJNK, Kaninchen-anti-JNK, Kaninchen-anti-pERK bzw. Kaninchen-anti-ERK (Erstantikörper) und zur Detektion mit Ziege-anti-Kaninchen-Alexa647-Fab (Zweitantikörper) zur Detektion der Fluoreszenz im ZeptoREADER bei 635 nm inkubiert. Logarithmisch zur Basis 2 dargestellt sind die Expressionsverhältnisse (phosphoryliert zu nicht-phosphoryliert) der Tumorgewebeproben zu den Normalgewebeproben, basierend auf den in Abbildung 45 aufgetragenen Daten.

Um Aussagen über den Phosphorylierungsgrad von JNK und ERK im Vergleich Tumor- zu Normalgewebe geben zu können, wurde die in Abbildung 46 gezeigte Darstellung gewählt. Für JNK konnte in den Nieren- und Rektumproben ein heterogenes, unauffälliges Phosphorylierungsmuster nachgewiesen werden. Dahingegen zeigten die Prostata- und Colontumoren im Vergleich zu den Kontrollgeweben eine eindeutige Tendenz zu verminderter JNK-Phosphorylierung mit Werten bis zu Faktor 4. Für ERK zeigte sich ein insgesamt vergleichbares Bild, die geringere Phosphorylierung der Prostata- und Colontumoren konnte im Vergleich mit den Normalgeweben

---

mit Werten bis zu Faktor 10 niedrigerer Phosphorylierung deutlicher angegeben werden. Die Heterogenität des Phosphorylierungsmusters von ERK in den untersuchten Nierengewebelysaten zeigte sich noch stärker als bei der Analyse der JNK-Phosphorylierung.

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung einer sensitiven Reverse-Screening-Plattform

Protein-Mikroarrays entwickeln sich neben der 2D-Gel / MS-Technologie als eine wichtige Methode zur Analyse des menschlichen Proteoms und finden bereits Anwendung in der qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen (Espina 2003). Diese Technologie kann zur Analyse posttranslationaler Modifikationen von Proteinen und damit zum Verstehen der Signaltransduktion oder Signalnetzwerken beitragen, sie kann über Expressionsanalysen in einer großen Zahl klinischer Proben Biomarker identifizieren und sie kann über das Detektieren von Biomarkern die Diagnose kanzerogener Erkrankungen und die Entwicklung von Therapeutika beschleunigen (Hanash 2003). Einige der genannten Aspekte sollten in dieser Doktorarbeit durch die Entwicklung einer Protein-Mikroarray-Plattform neu betrachtet werden, da unter Verwendung von Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays eine Screening-Technologie aufgebaut wurde, die Gewebeproben (Tumorsektate und Kontrollgewebe) mit hoher Sensitivität auf Markerproteine untersuchen und Proteine über Standardreihen absolut quantifizieren kann.

Um die Reverse-Screening-Plattform aufzubauen, wurden verschiedene Mikroarray-Substrate evaluiert. Da die Oberflächen zur Immobilisierung von Proteinen mit Puffersystemen kompatibel sein sollten, die - aufgrund der gewählten Lysemethode - Detergenzien oder Amino-reaktive Bestandteile enthielten, wurden die Experimente zum Methodenaufbau nur auf *CodeLink*-Substraten weitergeführt. Nur diese Standard-Mikroarray-Substrate konnten hinsichtlich der Protein-Anbindung, der Linearität der Mess-Signale und der Nachweisgrenze überzeugen.

Die Plattform wurde durch Untersuchungen zum Modellmolekül MHC Klasse I in vorcharakterisierten Zellkulturproben (DEU und BM14) auf den *CodeLink*-Substraten aufgebaut. Die in einem Mikroarrayformat auf den Substraten angeordneten Proben wurden mit dem MHC Klasse I-spezifischen polyklonalen Antikörper anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin inkubiert und über ein Fluoreszenz-basiertes Detektionssystem im konfokalen Laser-Scanner ausgelesen. Die Signale der zur Bestimmung des MHC-Gehaltes in einer Verdünnungsreihe immobilisierten MHC Klasse I-Moleküle konnten

bis zu einer Nachweisgrenze von 40 ng/ml detektiert werden, was einer Sensitivität von ca. 100 000 Molekülen pro Spot entsprach (siehe Abbildung 14).

Die Quantifizierungsanalysen der Zelllinien DEU und BM14 zeigten für die konstitutiv MHC-exprimierenden BM14 ca. 100 000 MHC-Moleküle pro Zelle und für die MHC-überexprimierenden DEU ca.  $2 \times 10^6$  Moleküle MHC pro Zelle. Der physiologische Bereich der MHC-Expression normaler Zellen liegt zwischen 50 000 bis 100 000 Molekülen pro Zelle (Yewdell 2003), eine starke Überexpression kann Werte bis zu  $10^6$  Moleküle MHC pro Zelle ergeben (McCluskey 1999). Der Assay zur MHC-Quantifizierung zeigte somit eine Sensitivität für ca. 1 Zelle.

Die RPPM-Technologie wurde in einem nächsten Schritt mit der Detektionsplattform der Firma Zeptosens verknüpft, um eine Sensitivitätssteigerung zu erreichen, die auch die Analyse sehr gering konzentrierter Tumormarker ermöglicht. Die auf diese Plattform übertragenen Experimente zum Methodenaufbau erbrachten den Nachweis, dass durch den Einsatz der Planaren Wellenleiter-Technologie im Vergleich zur konfokalen Laser-Scanner-Technologie Sensitivitätssteigerungen um ungefähr Faktor 5 erreicht werden (3.1.2). Somit konnte die Sensitivität der Nachweisreaktion und die Linearität der Mess-Signale unter Verwendung der PWG-Technologie im Vergleich zu den *CodeLink*-Ergebnissen in den Etablierungs-Experimenten deutlich verbessert werden.

Ein wichtiger Punkt für die Etablierung der Reverse-Screening-Plattform war die Qualitätskontrolle der Protein-Mikroarrays (3.1.3). Aus der mRNA-Expressionsanalyse können routinemäßig Ergebnisse hoher Qualität und Vertrauenswürdigkeit durch Einsatz verschiedener Strategien - wie z.B. die vergleichende Analyse zweier, mit unterschiedlichen Farben, markierter Proben oder die *perfect match / mismatch*-Strategie - (Lipshutz 1999) gewonnen werden. Des Weiteren werden die erhaltenen Signale auf die Expression so genannter *housekeeping genes* bezogen und auf ihre Validität überprüft. Für Protein-Mikroarrays wurden bis heute nur wenige Strategien zur Qualitätssicherung entwickelt. Andersson et al. stellten eine interne Normalisierung der in Zellkulturproben detektierten Signale über die vergleichende Analyse zweier, mit unterschiedlichen Farben, markierter Proben (s.o.) auf Protein-Mikroarrays (Forward-Phase-System) vor (Andersson 2005). Chan et al. normierten die Signalintensität jedes Spots ihres vorgestellten RPPM-Screening-Systems auf das korrespondierende  $\beta$ -Aktinsignal der untersuchten Zellkulturproben, das über ei-

nen zweiten Fluoreszenzkanal detektiert wurde. Nishizuka et al. färbten die verwendeten Nitrozellulose-beschichteten Standard-Mikroarray-Substrate zur Markierung der Proteine der Zellkulturproben mit einem Fluorophor an, das anschließend zur Analyse der Totalproteinmenge pro Spot im konfokalen Laserscanner ausgelesen wurde (Nishizuka 2003). Vorversuche während dieser Doktorarbeit zeigten jedoch, dass über die Analyse von Proteinen, die als stabil exprimiert gelten, wie z.B. Aktin oder Tubulin, keine reproduzierbaren, homogenen Ergebnisse zur internen Normalisierung der Assay-Signale erzielt werden konnten. Im Vergleich zu den drei genannten Ansätzen wurde das während dieser Doktorarbeit aufgebaute Reverse-Screening-System erstmalig zur Analyse von Gewebelysaten entwickelt, die im Vergleich zu Zellkulturproben eine viel heterogenere Matrix darstellen. Im Gegensatz zu einer definierten Ausstattung an Proteinen und einer Kultivierung unter optimierten Bedingungen im Falle von Zellkulturproben wurden hier Lysate von klinischen Resektaten gewonnen, die ganz unterschiedliche histologische Merkmale aufweisen. So wurde die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte Lyse auf das Vorkommen vielfältiger Probenbestandteile - wie z.B. Extrazellulärmatrix, Lipide, Bindegewebe, Blutbestandteile - angepasst. Zur Analyse der tatsächlich auf den Protein-Mikroarrays immobilisierten Proteinmenge wurde daraufhin ein Proteinfärbungsverfahren entwickelt, das direkt auf dem Substrat nach dem Drucken der Mikroarrays durchgeführt wird und die Proteine über ihre primären Aminogruppen mit einem Fluorophor markiert. Das durch die Antikörper-Inkubationen erhaltene Assay-Signal wurde nach dem Assay in der Auswertung auf das Protein-Signal normiert.

Obwohl die auf den RPPMs untersuchten Gewebelysate vor dem Drucken auf die gleiche Konzentration eingestellt wurden, konnte in korrespondierenden Tumor- und Normalgewebeproben teilweise eine Abweichung der immobilisierten Proteinmenge um mehr als den Faktor 2 detektiert werden. Die schon beschriebene Matrix-Heterogenität könnte hierfür der Grund sein. Vor allem der teilweise recht hohe Blutgehalt der analysierten Gewebe, der eine erkennbare Färbung der Proben von gelblich-orange bis rot-braun bedingte, dürfte das durch Verwendung der etablierten Coomassie-Proteinbestimmungsmethode erzielte erste Ergebnis der Probenprotein-konzentration verfälscht haben. Die hohe Qualität der neuentwickelten Fluoreszenzbasierten Qualitätskontrolle konnte mit einer mittleren, prozentualen Standardabweichung über alle Proben von 8.6% bestätigt werden (siehe Abbildung 18). Es fiel auf, dass die Ausreißer in allen Fällen Tumorgewebe waren. Ein Grund hierfür

könnten eine im Vergleich zum Kontrollgewebe stärkere histologische Heterogenität sein. Gerade die in Tumoren vermehrt stattfindenden Prozesse zur Gefäßneubildung (Angiogenese) und ein daraus resultierender höherer Blutgehalt sollten hier in Betracht gezogen werden (Rundhaug 2005).

Da die interessierenden Analyten in den Spots der Protein-Mikroarrays durch Antikörper detektiert werden, war es notwendig, eine eingehende Charakterisierung der Bindemoleküle durchzuführen (3.1.4). Auf Western-Blot-Streifen von aufgetrennten repräsentativen Gewebelysaten wurden die Antikörper zur MHC-Quantifizierung und zum Tumor-Screening auf ihre Spezifität getestet. Alle zur Quantifizierung verwendeten MHC Klasse I-spezifischen Antikörper zeigten die erwartete Spezifität, d.h. die Detektion einer Bande am erwarteten Molekulargewicht. Die für das Tumor-Screening eingesetzten Antikörper konnten nicht in allen Fällen die gesetzten Qualitätskriterien erfüllen (siehe Abbildung 20). Das Erkennen einer spezifischen Bande am erwarteten Molekulargewicht in einer repräsentativen Probe bedeutet nicht, dass nicht in anderen Proben unerwartete und unerwünschte Spezifitäten (z.B. Kreuzreaktionen mit anderen Mitgliedern der jeweiligen Proteinfamilie) gefunden werden könnten. Diese potentiellen Probleme sind jedoch analog auch auf anderen Expressionsanalyse-Plattformen wie cDNA-, Oligo- oder Antikörper-Mikroarrays zu finden. Über eine weitergehende Charakterisierung der Antikörper auf 2D-Western-Blots könnte die Spezifität der Antikörper, auch gerade zwischen unterschiedlichen posttranslationalen Proteinmodifikationen, entsprechend definiert werden (Nishizuka 2003).

Nach Abschluss der Methodenentwicklung wurde die Anwendbarkeit der Reverse-Screening-Plattform in einem Probensatz von 5 Nierenprobenpaaren, 8 Colonprobenpaaren und zwei Glioblastomproben getestet (3.2). Über die MHC-Standardreihe wurden die Proben auf ihren MHC-Gehalt bestimmt. Die Kontrolle (DEU) und die untersuchten Gewebelysate erbrachten die erwarteten Resultate. Der MHC-Gehalt konnte für jede der Proben über die untersuchten 8 Spots (4 Verdünnungsstufen in Duplikaten) mit sehr kleiner Varianz bestimmt werden (siehe Abbildung 23). Hierdurch konnte die hohe Genauigkeit der Quantifizierung unterstrichen werden.

Die Resultate der MHC-Quantifizierung auf Protein-Mikroarrays wurden durch vergleichende Western-Blot-Analysen validiert. Die hohe Genauigkeit der quantitativen Aussagen der Protein-Mikroarrays konnte so nur eingeschränkt nachvollzogen werden (siehe Abbildung 25). Da sich durch den in Western-Blot-Analysen bekannter-

maßen eingeschränkten dynamischen Bereich und der eingeschränkten Reproduzierbarkeit Quantifizierungswerte mit höherer Variabilität und geringer Spezifität ergaben, widersprachen die Messergebnisse physiologischen MHC-Expressionswerten um ein Mehrfaches. Bezogen auf die Beobachtung der in 8 von 9 Tumorgeweben erhöhten MHC-Expression konnten die Protein-Mikroarray-Resultate aber qualitativ bestätigt werden. Zusammenfassend lässt sich darstellen, dass die aufgebaute Technologie-Plattform unter Verwendung von Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays qualitativ und quantitativ hochwertige Analysen von Gewebeproben ermöglicht. Der Ablauf zur Durchführung eines Reverse-Screening lässt sich in folgenden Schritten zusammenfassen:

- Auswahl und Charakterisierung der Antikörper.
- Qualitätskontrolle der Protein-Mikroarrays. Normierung der Assay-Signale auf die tatsächlich immobilisierte Proteinmenge.
- Anordnung der Proben in einem definierten Layout. 8 Spots repräsentieren eine Probe. 4 Verdünnungsstufen simulieren eine Detektion über einen eingeschränkten dynamischen Bereich. Referenzspots gleichen die Abschwächung des Laserlichts aus und erhöhen die Detektionsqualität durch Kompensation der Intra- und Inter-Array-Varianzen.
- Screening der Biomarker in den ausgewählten Proben mittels vorcharakterisierter Antikörper.
- Validierung der Ergebnisse - zumindest in der Phase der Methodenentwicklung - durch etablierte biochemische Methoden (Western-Blot, FACS, Mikrosphären-basierte Systeme).
- Auswertung der Datensätze mittels definierter Auswertungs-Makros unter Einberechnung der Fehlerfortpflanzung. Durchführung von Cluster-Analysen.

## **4.2 MHCquant - Bestimmung des MHC-Gehaltes von Zell- und Gewebeproben**

Nach Abschluss der Methodenentwicklung und Validierung der neuartigen Reverse-Screening-Plattform wurde die Technologie zur Quantifizierung des MHC-Gehaltes in einem größeren Probensatz angewendet. Tumor- und Normalgewebe aus Nieren-

zellkarzinomen, Colonkarzinomen und Rektumkarzinomen sowie Zellysate von 3 verschiedenen MHC Klasse I-exprimierenden Linien wurden in einer 3-fach-Bestimmung auf die im jeweiligen Lysat enthaltene Menge an MHC Klasse I quantifiziert (3.3.). Der schon vorher verwendete anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin-Antikörper, der die nicht-kovalent an MHC Klasse I assoziierte Untereinheit  $\beta$ 2-Mikroglobulin erkennt, wurde im ersten Teil dieser Experimente eingesetzt. Jede Probe wurde auf drei auf unterschiedlichen Zeptosens-Mikroarray-Substraten lokalisierten Sub-Arrays gemessen, auf die Proteinmenge normiert und über die in jedem Sub-Array enthaltene MHC-Monomer-Eichreihe quantifiziert. Die Eichreihen konnten über eine lineare Regression in allen Fällen mit sehr guter Korrelation ( $R^2 = 0.999$ ; siehe Abbildung 27) angepasst werden. Die über die Eichreihe quantifizierten Messergebnisse lagen im erwarteten Bereich zwischen 3 und 12 pmol MHC pro mg Protein in Lysat (siehe Abbildung 28). Des Weiteren zeigten die über die drei Experimentwiederholungen bestimmten Standardabweichungen eine insgesamt geringe Ausprägung. Die Normalgewebe konnten mit einer relativ homogenen Signalverteilung um 3 pmol MHC pro mg Protein in Lysat nachgewiesen werden, wo hingegen die Tumorgewebe in ihrer Signalthöhe zwischen 3 und 12 pmol MHC schwankten. Auffällig war die Beobachtung, dass in 28 von 30 Probenpaaren gleichviel oder mehr MHC Klasse I quantifiziert werden konnte.

Die Quantifizierung von MHC Klasse I wurde im zweiten Teil der MHCquant-Experimente mit einem weiteren, MHC Klasse I-spezifischen Antikörper durchgeführt. Der von H. Ploegh entwickelte monoklonale Antikörper (Stam 1986; Stam 1990) erkennt (nachgewiesen im Western-Blot; siehe Abbildung 19) nur die nicht an  $\beta$ 2-Mikroglobulin gebundene, freie schwere Kette von MHC I. Da die Protein-Mikroarrays ausschließlich Proben enthielten, die durch denaturierte Lyse hergestellt wurden, konnte der Antikörper zur Quantifizierung von MHC Klasse I über die Erkennung des HLA-A-Subtypus eingesetzt werden. Ebenso wie für die Quantifizierungsanalyse über  $\beta$ 2-Mikroglobulin wurde jede Probe in drei auf unterschiedlichen Zeptosens-Mikroarray-Substraten lokalisierten Sub-Arrays gemessen, die zudem HLA-A-Monomere zur Bestimmung des MHC-Gehaltes enthielten. Der auch HCA2 genannte Antikörper zeigte eine geringere Spezifität für die immobilisierten MHC-Monomere. Der dynamische Bereich erstreckte sich über insgesamt nur 4 Verdünnungsstufen, die sich aber mit sehr guter Korrelation ( $R^2 = 0.992$ ; siehe Abbildung 30) linear anpassen ließen. Wie schon bei der Analyse von  $\beta$ 2-Mikroglobulin zeigten die 30 unter-

suchten Normalgewebe eine stabile MHC-Expression um 15-20 pmol MHC pro mg Protein in Lysat, wo hingegen die Tumoren teilweise sehr starke Signale (bis zu 270 pmol MHC) zeigten. Insgesamt zeigten alle Tumorgewebe der drei Organe Nieren, Colon und Rektum gleichviel oder mehr MHC-Gehalt als die korrespondierenden Kontrollgewebe. Von den drei untersuchten Zelllinien zeigten die bekanntermaßen MHC-überexprimierenden Linien JY und WILJON eine ausgeprägte MHC-Expression, die MHC niedrig exprimierende Linie LCL bestätigten ebenfalls die hierzu erhaltenen Informationen von S. Stevanović.

Die Qualität der Quantifizierungsexperimente unterstreicht die Verwendungsmöglichkeit der MHCquant-Plattform zur genauen Charakterisierung von Patientengeweben bezüglich der Expression von MHC Klasse I-Proteinen als eine wichtige Voruntersuchung zur Durchführung von Peptid-Vakzinierungen (Stevanović 2002; Singh-Jasuja 2004). So können nicht nur Aussagen über die zu findenden HLA-Subtypen, sondern auch über den absoluten MHC-Gehalt der Zellen gewonnen werden.

Da MHC Klasse I-Moleküle nur in vollständig assembliertem, peptidbeladenem Zustand auf der Zelloberfläche exprimiert werden, warfen die Experimente zur  $\beta$ 2-Mikroglobulin- und HLA-A-Quantifizierung weiterführende Fragen auf. Warum weisen nahezu alle Tumorproben mehr MHC Klasse I auf als die Kontrollproben (über  $\beta$ 2-Mikroglobulin und HLA-A quantifiziert)? Warum kann in Tumorproben teilweise bis zu 30-fach mehr HLA-A als im Normalgewebe nachgewiesen werden? Welche Rolle spielt die Stöchiometrie von  $\beta$ 2-Mikroglobulin zu der jeweiligen schweren Kette aufgrund der gewonnenen Ergebnisse?

Die gängige Lehrmeinung beschreibt die Niederregulation von MHC Klasse I in Tumorzellen als einen Mechanismus, um sich dem Immunsystem zu entziehen. Die zugrunde liegenden Mechanismen lassen sich folgendermaßen aufteilen: a) Defekte in Komponenten der Antigen-Prozessierungsmaschinerie (Proteasom) - beobachtet in Lungen-, Prostata- und Nierenzellkarzinomen, b) Defekte der Peptid-Transporter TAP-1 oder TAP-2 (engl. TAP = *transporter associated with antigen processing*), c) MHC Klasse I Haplotyp-Verlust - beobachtet in Melanom- und Colonkarzinomzellen, d)  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Mutationen oder -Deletionen (Khong 2002; York 2003). Die beschriebenen Mechanismen können einen partiellen oder vollständigen Verlust eines MHC Klasse I Allels, Haplotypus oder Genlokus zur Folge haben. Des Weiteren kann

durch Proteindefekte (zur Antigenprozessierung oder Peptidbeladung) eine verminderte MHC-Expression begründet werden (Dunn 2002). Die in dieser Doktorarbeit durch Quantifizierung des MHC-Gehaltes auf Proteinebene herausgefundenen Ergebnisse widersprechen diesen Thesen. In der Literatur wird eine Hochregulation von MHC Klasse I bezogen auf Hepatitis C-Virus-infizierte Leberzellen beschrieben (durch TAP-1-Hochregulation bedingt). Die Leberzellen konnten sich nachfolgend über eine signifikant niederregulierte, zytotoxische Aktivität der Natürlichen Killerzellen der Immunantwort entziehen (Herzer 2003). So können die gewonnenen Resultate der Quantifizierungen Ausdruck noch zu erforschender Immunregulationen sein, die die Tumorzellen über MHC Klasse I-spezifische Hochregulation befähigen, die Aktivität der zytotoxischen CD8-T-Zellen sowie der NK-Zellen zu inhibieren und somit das weitere Wachstum des Tumors zu gewährleisten.

Da nur assemblierte MHC-Komplexe - mit Peptid beladen - auf der Zelloberfläche exprimiert werden, ermöglichen die geringen absoluten Unterschiede der  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Quantifizierung es den Tumorzellen nur eingeschränkt, über die starke Hochregulation von HLA-A mehr MHC Klasse I-Moleküle zu präsentieren. Folglich könnten auch intrazelluläre Signalwege beeinflusst sein, die die HLA-A-Synthese unabhängig von der  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Synthese fördern und somit die großen, stöchiometrischen Unterschiede erklären könnten.

### **4.3 Protein- und mRNA-Expressionsanalyse von MHC Klasse I**

Die der Quantifizierung von MHC Klasse I zugrunde liegenden Proteinexpressions-signale wurden mit Analysen zur mRNA-Expression verglichen, die von O. Schoor in der Arbeitsgruppe Stevanović durchgeführt wurden. Neben den MHC I-spezifischen Antikörpern anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin und anti-HLA-A wurden zudem Protein-Mikroarrays auf die Expressionssignale von HLA-B,C durch einen auch HC10 genannten anti-HLA-B,C-Antikörper gewonnen (Stam 1986). Die Proteine wurden über eine logarithmische Darstellung ( $\text{Log}_2$ -Verhältnisse Expressionssignal Tumor- zu Normalgewebe) bezüglich ihrer Proteinexpressionsmuster ausgewertet (3.4.1.). Es zeigte sich bei  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C übereinstimmend, dass die Expressionsauffälligkeiten auf Proteinebene durch die mehr oder minder starke Signalheterogenität der Tumorproben bedingt war (Abbildung 32). Die jeweiligen Normalgewebeproben zeigten ein - über die große Mehrzahl der Proben betrachtet - stabiles Expressi-

onsmuster. Bezogen auf die erhaltenen logarithmischen Proteinexpressionsdarstellungen konnte für die drei untersuchten Proteine eine fast eindeutige Tendenz zur Überexpression von MHC Klasse I in den Tumorgewebe der Organe Niere, Colon und Rektum gezeigt werden. Vergleicht man insbesondere die Expressionsmuster von HLA-A und HLA-B,C, so konnte mit einer Korrelation von  $R^2 = 0.75$  eine erstaunliche Übereinstimmung der Proteinexpression in den untersuchten 30 Probenpaaren nachgewiesen werden. Hier konnte in 22 von 30 Fällen eine biologisch signifikante Proteinüberexpression (mit mehr als 2-fach erhöhter Expression in den Tumorgeweben im Vergleich zu den Kontrollgeweben) detektiert werden.

Die durch gepaarte t-Tests durchgeführten Signifikanzanalysen (siehe Abbildung 37) bestätigten mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0.004$  eine in Tumorgeweben zum korrespondieren Normalgewebe unterschiedliche MHC Klasse I-Expression auf Proteinebene. In den untersuchten Fällen wurde die Unterschiedlichkeit eindeutig mit der Tendenz zur Überexpression beschrieben. Die durch Western-Blot-Analysen validierten Ergebnisse lassen sich wie unter 4.2 andiskutieren. Neben der Bestimmung des MHC-Gehaltes der Proben wurde in dieser Doktorarbeit auch durch Proteinexpressionsanalysen gezeigt, dass durch die Überexpression von unterschiedlichen Strukturen von MHC Klasse I den Tumorzellen ein noch nicht beschriebener Selektionsvorteil gegeben sein könnte, der es ihnen ermöglichen könnte, sich dem Immunsystem zu entziehen, obwohl die Gewebe mehr Erkennungsmerkmale exprimieren können und damit potentiell empfänglicher für eine T-Zell-Antwort werden.

Die durch Proteinexpressionsanalysen auf Protein-Mikroarrays erhaltenen Ergebnisse der MHC Klasse I-Expression ließen sich in den vergleichend in der Arbeitsgruppe Stevanović durchgeführten mRNA-Expressionsprofilen mit Einschränkungen nachvollziehen (siehe Abbildung 40). Übereinstimmend konnte in dem untersuchten Probenatz von 24 Nierzellkarzinomproben auf der mRNA- und der Proteinebene ein Trend zur Hochregulation von MHC Klasse I gefunden werden. In ca. 75% der Proben entsprach die Tendenz der Transkriptionsanalysen den Proteinexpressionsmustern. Die mRNA-Resultate zeigten sich aber in deutlich schwächerer Ausprägung. Hieraus kann geschlossen werden, dass sich die auf Proteinebene teilweise sehr starke Überexpression insbesondere von HLA-A und HLA-B,C nicht vollständig auf die Regulation der MHC Klasse I-Gentranskription zurückführen lässt. Vielmehr könnten spätere Prozesse, die den Abbau und die Akkumulation der schweren Kette

von MHC I betreffen, eine wichtige Rolle spielen. Da über die Reverse-Screening-Technologie, bei der denaturierte Lysate von zermörserten Gesamtgewebestücken immobilisiert werden, keine Erkenntnisse über die Lokalisation der stark überexprimierten schweren Kette gewonnen werden können, könnten a) Fraktionierungstechniken (Einteilung der Proben durch bestimmte Lysemethoden in eine Kern-, Zytosol- und Membranfraktion) oder b) histologische Untersuchungen (Immunhistochemische Analysen der Proteinverteilung in Schnitten der untersuchten Gewebe) entscheidende Hinweise zur Aufklärung dieser Beobachtung geben.

## 4.4 Tumor-Screening

### 4.4.1 Tumor-Screening von Tumor-assoziierten Antigenen

Die Gruppe der über Reverse-Screening untersuchten Proteinmarker wurde über HLA-Epitop-Analysen in der Arbeitsgruppe Stevanović identifiziert und enthielt neben zytosolischen und nukleären Proteinen auch membranständige Tumor-assoziierte Antigene. Die in einem ersten Tumor-Screening untersuchten MHC Klasse I-Proteine HLA-A,B,C und  $\beta$ 2-Mikroglobulin erbrachten zwei auffällige Ergebnisse: a) das mit dem anti-HLA-A,B,C-Antikörper (w6/32) durchgeführte Screening in den 70 Gewebeproben aus Nierenzell-, Prostata, Colon- und Rektumkarzinomen zeigte in den Nierentumorgeweben eine tendenziell höhere Proteinexpression (bis zu Faktor 4) als in den korrespondierenden Normalgeweben, b) in Prostatakarzinomen konnte über  $\beta$ 2-Mikroglobulin eine stark erhöhte Expression (bis zu Faktor 50) im Vergleich zu den Kontrollgeweben der Samenblase detektiert werden. Die Resultate des HLA-A,B,C-Screenings spiegeln - in abgeschwächter Ausprägung - die Ergebnisse der HLA-A bzw. HLA-B,C-Analysen (3.4.1) wider.  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Überexpression konnte in dieser Studie als Beleg für entweder a) stark unterschiedliche Proteinexpression von  $\beta$ 2-Mikroglobulin in Prostata und Samenblase oder b) einen über vergleichende Proteinexpressionsanalysen mittels Reverse-Screening-Technologie identifizierten Tumormarker gelten (siehe Abbildung 42).

$\beta$ -Catenin vermittelt die Adhäsion zwischen Zellen und reguliert normales Zellwachstum- und -verhalten. Prozesse verschiedener Stadien der Embryogenese, Wundheilung und Tumormetastasierung sind durch die Assemblierung und Deassemblierung vom Adhäsionsproteinen reguliert. Verschiedene Mutationen, die abnormale Zellpro-

liferation und Tumorprogression bedingen, werden in Colon- und Ovarialkarzinomen gefunden (Wright 1999; Grady 2002). Durch die in dieser Doktorarbeit durchgeführte Tumor-Screening-Analyse konnte eine deutliche Tendenz zur Überexpression von  $\beta$ -Catenin in Prostata-, Colon- und Rektumproben detektiert werden. Somit kann  $\beta$ -Catenin in diesen Tumorgeweben als potentielles Markerprotein gelten. Das nukleäre Protein Ki67, das als Proliferationsmarker solider Tumoren beschrieben wurde (Zellweger 2005), konnte nur bedingt als Tumormarker über die Proteinexpressionsanalyse auf Protein-Mikroarrays nachgewiesen werden (siehe Abbildung 43). Über die schwache Tendenz zur Überexpression in den Rektum- und Nierenzellkarzinomen wurde die Rolle von Ki67-Expression in der malignen Progression der Gewebe bestätigt (Rey 1998).

Unter den membranständigen Proteinen konnte in den 70 Gewebeproben CEA (*carcinoembryonic antigen*) eindeutig als Tumormarker in Colon- und Rektumkarzinomen und Carboanhydrase IX eindeutig als Tumormarker in Nierenzellkarzinomen nachgewiesen werden (siehe auch „genetische Marker des RCC“ in (Michael 2003)). CEA wurde von der FDA (engl. FDA = *Food and Drug Administration*, USA) als Krebsbiomarker im Monitoring der Therapie von Colontumoren zugelassen (Ludwig 2005). Die Rezeptortyrosinkinase cMet konnte in Nierenzell- und Colontumoren über eine auf Proteinebene nachgewiesene Überexpressionstendenz als potentieller Marker beschrieben werden (siehe auch (Schag 2004)). Muc-1 zeigte einen schwachen Trend zur Überexpression in Nierenzellkarzinomen (siehe Abbildung 44), bestätigte aber damit die Klassifizierung als Tumormarker für hämatologische Krebserkrankungen (Brossart 2001) in dieser Studie als Tumormarker in einem noch nicht beschriebenen Organ. EGFR ist wie CEA von der FDA als Krebsbiomarker für die Therapie von Colontumoren zugelassen. Die über Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays analysierten EGFR-Proteinexpressionsmuster zeigten in den Colontumoren aber keine Auffälligkeiten, nur in den Nierenzellkarzinomen konnte ein schwacher Trend zur Überexpression detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die neu entwickelte Reverse-Screening-Plattform hervorragend für die Proteinexpressionsanalyse von Gewebelysaten angewendet werden kann. Es konnten in dieser Doktorarbeit einige bekannte Tumormarker auf dieser Technologie-Plattform bestätigt werden, die somit neue Einblicke

in die Proteinexpression der über HLA-Epitop-Analysen identifizierten Tumor-assoziierten Antigene ermöglicht.

#### 4.4.2 Tumor-Screening von Signaltransduktionsmolekülen

Eine der Hauptanwendungen der Proteomics-Technologie ist die Charakterisierung von Protein-Netzwerken und die Signaltransduktion zwischen und innerhalb von Netzwerken. Die Analyse von Signaltransduktionswegen ist besonders für die Pharmakotherapie und zur Entwicklung neuer Medikamente von großem Interesse. Der Informationsfluss in der Zelle wird durch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt und insbesondere Phosphorylierungen ermöglichen die Signalweiterleitung intrazellulärer Signale (Petricoin 2002).

In dieser Doktorarbeit wurden die Kinasen JNK (Jun-Kinase) und ERK (*extracellular signal related kinase*) auf ihre Phosphorylierungsmuster und den Grad der Phosphorylierung in Tumor- zu Normalgewebe untersucht. JNK ist eine im MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg durch Stress-Signale (Ceramide, UV-Strahlung, inflammatorische Zytokine) aktivierbare Kinase, die, wenn sie nach Aktivierung als phosphoryliertes Dimer vorliegt, in den Kern transloziert und die Gentranskription durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren (z.B. c-jun oder ATF-2) beeinflusst (Paul 1997). ERK ist ebenfalls eine Kinase im MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg, die aber von extrazellulären Signalen wie Wachstumsfaktoren (z.B. EGF), Zytokinen, Hormonen und Neurotransmittern durch Phosphorylierung aktiviert wird (Cobb 1999).

Die Expressionsprofile der nicht-phosphorylierten Formen der Kinasen JNK und ERK zeigten ein zur Überexpression tendierendes Muster, vor allem die Nierenzellkarzinome konnten mit bis zu Faktor 4 höherer Proteinexpression bestimmt werden. Eine Tendenz zur Überexpression konnte für die phosphorylierten Kinasen pJNK und pERK nur in den Nierenzellkarzinomen detektiert werden. Die Proben der Organe Prostata, Colon und Rektum zeigten einen Trend zur Niederexpression der aktivierten Proteine in den untersuchten Tumorgeweben (siehe Abbildung 45).

Um aus diesen Ergebnissen Aussagen über den Phosphorylierungsgrad der Kinasen im Vergleich Tumor- zu Normalgewebe treffen zu können, wurden die einzelnen Phosphorylierungsverhältnisse (T/N) gegeneinander aufgetragen (Abbildung 46) und logarithmiert. Eine Auftragung der phosphorylierten zur nicht-phosphorylierten Form von JNK oder ERK ausschließlich bezogen auf die Tumorgewebe oder die Normal-

gewebeproben hätte hier keinen Aufschluss über den Grad der Aktivierung geben können, da in allen Proben eine (teilweise sehr deutliche) Niederregulation der phosphorylierten im Vergleich zur nicht-phosphorylierten Form nachgewiesen werden konnte (Daten in dieser Studie nicht gezeigt). Für die Stress-induzierbare Kinase JNK konnte kein eindeutiger Trend im Phosphorylierungsmuster für die Nieren- und Rektumproben, aber Hinweise zur geringeren Phosphorylierung in den Prostata- und Colontumoren erhalten werden. Für die durch Wachstumssignale aktivierbare Kinase ERK zeigte sich ein vergleichbares Bild. Der Trend zur geringeren Phosphorylierung der Prostata- und Colontumoren konnte in stärkerer Ausprägung nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte eine schwächere Phosphorylierung der untersuchten Tumorgewebe im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben festgestellt werden. Da Tumorzellen in der Lage sind, das zell-autonome Programm zur Begrenzung der Zellmultiplikation außer Kraft zu setzen (Hanahan 2000), ist ein zwar im Vergleich zu normalem Gewebe verlangsamtes, aber stetiges Wachstum der Tumoren durch den geringeren Phosphorylierungsgrad der untersuchten Kinasen denkbar.

Die Reverse-Screening-Plattform konnte somit erfolgreich zur Phosphorylierungsanalyse einer größeren Zahl von Tumorgeweben eingesetzt werden. Auch in diesem Falle war die durch die Kombination der Reverse-Phase-Protein-Mikroarrays mit der Zeptosens-Technologie erzielte Sensitivität der Signaldetektion ein großer Vorteil, da die Signalunterschiede teilweise sehr gering ausfielen und nur über eine akkurate, mit geringen Standardabweichungen operierende Detektionsmethode eine signifikante Unterscheidung der Aktivierungsform der Proteine ermöglicht wurde. Alle in dieser Doktorarbeit analysierten Proteinexpressionsmuster wurden entsprechend der protokollierten Vorgehensweise (siehe 4.1) durchgeführt, die durch Antikörperspezifitätsanalysen, Qualitätskontrollen der Protein-Mikroarrays etc. eine hohe Reproduzierbarkeit und Spezifität der gewonnenen Ergebnisse gewährleistet. Ein kombinierter Ansatz der HLA-Epitop- und der mRNA-Expressionsanalyse zur Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen mit der Proteinexpressionsanalyse auf der in dieser Doktorarbeit etablierten Reverse-Screening-Plattform könnte es ermöglichen, a) identifizierte Tumormarker zu validieren, b) neue Tumormarker zu erkennen und c) Patienten-individuelle Vakzinierungskandidaten nachzuweisen.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine Assay-Technologie aufgebaut, die parallelisierte und miniaturisierte Systeme zur sensitiven Quantifizierung und Expressionsanalyse von Proteinen in Zellkultur- und Gewebelysaten verwendet. Hierzu wurden Lysate von Geweberesektaten in einem Mikroarray-Format auf planaren Substraten angeordnet. Der Nachweis der Analyten erfolgte über ein Fluoreszenzdetektionsverfahren, das zur Sensitivitätssteigerung mit der Planaren Wellenleitertechnologie kombiniert wurde. Über neu entwickelte Verfahren zur Qualitätskontrolle der Protein-Mikroarrays konnte eine hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit der gemessenen Signale erreicht werden.

Mit geringen Mengen an Probenmaterial wurde ein größerer Satz klinischer Proben auf den Gehalt an MHC Klasse I-Molekülen über zwei verschiedene MHC I-Strukturelemente ( $\beta$ 2-Mikroglobulin und HLA-A) absolut quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die erzielte Sensitivität der Signaldetektion große Vorteile in der Anwendung der Technologie bietet. So konnten die zur Quantifizierung immobilisierten Standardverdünnungsreihen über einen großen dynamischen Bereich mit hoher Linearität und niedriger Nachweisgrenze detektiert werden. Es konnte über die MHC Klasse I-Quantifizierungsanalysen ein noch unbekanntes Phänomen der Überexpression von HLA-A und  $\beta$ 2-Mikroglobulin in den untersuchten Tumorgeweben beschrieben werden. Dieses Ergebnis wurde qualitativ in Western-Blot-Analysen nachvollzogen. Vergleichend durchgeführte mRNA-Expressionsanalysen von  $\beta$ 2-Mikroglobulin, HLA-A und HLA-B,C konnten die beobachtete Überexpression in schwächerer Ausprägung bestätigen.

Die Reverse-Screening-Technologie wurde des Weiteren zur Charakterisierung der Proteinexpression von Tumor-assoziierten Antigen eingesetzt, die über HLA-Epitop-Analysen identifiziert wurden. Es konnten bereits bekannte Tumormarker bestätigt und neue Tumormarker-Kandidaten nachgewiesen werden. Die sinnvolle Kombination von HLA-Epitop-Analysen und Mikroarray-basierten Proteinexpressionsanalysen zur Validierung und Identifizierung von Tumormarkern wurde aufgezeigt. Die Applikation der neu etablierten Plattform für Phosphorylierungsstudien in Tumor- und Normalgeweben konnte überzeugend dargestellt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. 1997. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* 16:3797-804.
- Admon, A., Barnea, E. and Ziv, T. 2003. Tumor antigens and proteomics from the point of view of the major histocompatibility complex peptides. *Mol Cell Proteomics* 2:388-98.
- Aksoy, S., Szumlanski, C. L. and Weinshilboum, R. M. 1994. Human liver nicotinamide N-methyltransferase. cDNA cloning, expression, and biochemical characterization. *J Biol Chem* 269:14835-40.
- Anderson, G. R., Stoler, D. L. and Brenner, B. M. 2001. Cancer: the evolved consequence of a destabilized genome. *Bioessays* 23:1037-46.
- Andersson, O., Kozlowski, M., Garachtchenko, T., Nikoloff, C., Lew, N., Litman, D. J. and Chaga, G. 2005. Determination of relative protein abundance by internally normalized ratio algorithm with antibody arrays. *J Proteome Res* 4:758-67.
- Anna, C. H., Iida, M., Sills, R. C. and Devereux, T. R. 2003. Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 190:135-45.
- Antoniou, A. N., Powis, S. J. and Elliott, T. 2003. Assembly and export of MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 15:75-81.
- Artigiani, S., Barberis, D., Fazzari, P., Longati, P., Angelini, P., van de Loo, J. W., Comoglio, P. M. and Tamagnone, L. 2003. Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases. *J Biol Chem* 278:10094-101.
- Atkins, D., Ferrone, S., Schmahl, G. E., Storkel, S. and Seliger, B. 2004. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol* 171:885-9.
- Berger, M., Bergers, G., Arnold, B., Hammerling, G. J. and Ganss, R. 2005. Regulator of G-protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 105:1094-101.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. and Vande Woude, G. F. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:915-25.
- Bok, R. A. and Small, E. J. 2002. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat Rev Cancer* 2:918-26.
- 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.
- Brossart, P., Schneider, A., Dill, P., Schammann, T., Grunebach, F., Wirths, S., Kanz, L., Buhning, H. J. and Brugger, W. 2001. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 61:6846-50.

- Buhler, H. and Schaller, G. 2005. Transfection of keratin 18 gene in human breast cancer cells causes induction of adhesion proteins and dramatic regression of malignancy in vitro and in vivo. *Mol Cancer Res* 3:365-71.
- Chan, S. M., Ermann, J., Su, L., Fathman, C. G. and Utz, P. J. 2004. Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways. *Nat Med* 10:1390-6.
- Chipping Forecast II. 2002. *Nature Genetics Suppl.* 32:461-552.
- Christensen, M. O., Larsen, M. K., Barthelmes, H. U., Hock, R., Andersen, C. L., Kjeldsen, E., Knudsen, B. R., Westergaard, O., Boege, F. and Mielke, C. 2002. Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol* 157:31-44.
- Cismowski, M. J., Takesono, A., Ma, C., Lizano, J. S., Xie, X., Fuernkranz, H., Lanier, S. M. and Duzic, E. 1999. Genetic screens in yeast to identify mammalian nonreceptor modulators of G-protein signaling. *Nat Biotechnol* 17:878-83.
- Cobb, M. H. 1999. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71:479-500.
- Conchello, J. A. and Lichtman, J. W. 2005. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods* 2:920-31.
- Dal Cin, P. 2003. Genetics in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 13:463-6.
- Drobnjak, M., Osman, I., Scher, H. I., Fazzari, M. and Cordon-Cardo, C. 2000. Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clin Cancer Res* 6:1891-5.
- Duchateau, P. N., Pullinger, C. R., Cho, M. H., Eng, C. and Kane, J. P. 2001. Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res* 42:620-30.
- Duchateau, P. N., Pullinger, C. R., Orellana, R. E., Kunitake, S. T., Naya-Vigne, J., O'Connor, P. M., Malloy, M. J. and Kane, J. P. 1997. Apolipoprotein L, a new human high density lipoprotein apolipoprotein expressed by the pancreas. Identification, cloning, characterization, and plasma distribution of apolipoprotein L. *J Biol Chem* 272:25576-82.
- Duffy, M. J., Maguire, T. M., Hill, A., McDermott, E. and O'Higgins, N. 2000. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2:252-7.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. and Schreiber, R. D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-8.
- Duveneck, M. J., Pawlak, M., Neuschäfer, D., Bär, E., Budach, W., Pielers, U. and Ehrat, M. 1997. Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides. *Sensors and Actuators B - Chemical* 38:88-95.
- Ekins, R. P. 1989. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal* 7:155-68.
- El-Amraoui, A. and Petit, C. 2005. Usher I syndrome: unravelling the mechanisms that underlie the cohesion of the growing hair bundle in inner ear sensory cells. *J Cell Sci* 118:4593-603.

- Epping, M. T., Wang, L., Edel, M. J., Carlee, L., Hernandez, M. and Bernards, R. 2005. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 122:835-47.
- Espina, V., Mehta, A. I., Winters, M. E., Calvert, V., Wulfkuhle, J., Petricoin, E. F., 3rd and Liotta, L. A. 2003. Protein microarrays: molecular profiling technologies for clinical specimens. *Proteomics* 3:2091-100.
- Ewen, M. E. and Lamb, J. 2004. The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. *Trends Mol Med* 10:158-62.
- Flad, T., Spengler, B., Kalbacher, H., Brossart, P., Baier, D., Kaufmann, R., Bold, P., Metzger, S., Bluggel, M., Meyer, H. E., Kurz, B. and Muller, C. A. 1998. Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method. *Cancer Res* 58:5803-11.
- Grady, W. M. and Markowitz, S. D. 2002. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:101-28.
- Griffin, T. J., Gygi, S. P., Ideker, T., Rist, B., Eng, J., Hood, L. and Aebersold, R. 2002. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1:323-33.
- Grubb, R. L., Calvert, V. S., Wulkuhle, J. D., Paweletz, C. P., Linehan, W. M., Phillips, J. L., Chuaqui, R., Valasco, A., Gillespie, J., Emmert-Buck, M., Liotta, L. A. and Petricoin, E. F. 2003. Signal pathway profiling of prostate cancer using reverse phase protein arrays. *Proteomics* 3:2142-6.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. and Aebersold, R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19:1720-30.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Hanash, S. 2003. Disease proteomics. *Nature* 422:226-32.
- Herrmann, P. C., Gillespie, J. W., Charboneau, L., Bichsel, V. E., Paweletz, C. P., Calvert, V. S., Kohn, E. C., Emmert-Buck, M. R., Liotta, L. A. and Petricoin, E. F., 3rd. 2003. Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics* 3:1801-10.
- Herzer, K., Falk, C. S., Encke, J., Eichhorst, S. T., Ulsenheimer, A., Seliger, B. and Krammer, P. H. 2003. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol* 77:8299-309.
- Heyse, S., Vogel, H., Sanger, M. and Sigrist, H. 1995. Covalent attachment of functionalized lipid bilayers to planar waveguides for measuring protein binding to biomimetic membranes. *Protein Sci* 4:2532-44.
- Hofmann, S., Gluckmann, M., Kausche, S., Schmidt, A., Corvey, C., Lichtenfels, R., Huber, C., Albrecht, C., Karas, M. and Herr, W. 2005. Rapid and sensitive identification of major histocompatibility complex class-I associated tumor peptides by nanoLC MALDI MS/MS. *Mol Cell Proteomics*
- Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R. C., Bruford, E. A., Khodiyar, V. K., Lush, M. J., Povey, S., Talbot, C. C., Jr., Wright, M. W., Wain, H. M., Trowsdale, J., Ziegler, A. and Beck, S. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5:889-99.

- Igney, F. H. and Krammer, P. H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-88.
- Ii, M., Yamamoto, H., Adachi, Y., Maruyama, Y. and Shinomura, Y. 2006. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:20-7.
- Ivanov, S. V., Kuzmin, I., Wei, M. H., Pack, S., Geil, L., Johnson, B. E., Stanbridge, E. J. and Lerman, M. I. 1998. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12596-601.
- Janzi, M., Odling, J., Pan-Hammarstrom, Q., Sundberg, M., Lundeberg, J., Uhlen, M., Hammarstrom, L. and Nilsson, P. 2005. Serum Microarrays for Large Scale Screening of Protein Levels. *Mol Cell Proteomics* 4:1942-1947.
- Jones, M. B., Krutzsch, H., Shu, H., Zhao, Y., Liotta, L. A., Kohn, E. C. and Petricoin, E. F., 3rd. 2002. Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2:76-84.
- Kaelin, W. G., Jr. 2002. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2:673-82.
- Kassem, H., Sangar, V., Cowan, R., Clarke, N. and Margison, G. P. 2002. A potential role of heat shock proteins and nicotinamide N-methyl transferase in predicting response to radiation in bladder cancer. *Int J Cancer* 101:454-60.
- Kessler, J. H., Beekman, N. J., Bres-Vloemans, S. A., Verdijk, P., van Veelen, P. A., Kloosterman-Joosten, A. M., Vissers, D. C., ten Bosch, G. J., Kester, M. G., Sijts, A., Wouter Drijfhout, J., Ossendorp, F., Offringa, R. and Melief, C. J. 2001. Efficient identification of novel HLA-A(\*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med* 193:73-88.
- Khong, H. T. and Restifo, N. P. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005.
- Kikuno, R., Nagase, T., Nakayama, M., Koga, H., Okazaki, N., Nakajima, D. and Ohara, O. 2004. HUGE: a database for human KIAA proteins, a 2004 update integrating HUGEppi and ROUGE. *Nucleic Acids Res* 32 Database issue:D502-4.
- Kirkali, Z. and Lekili, M. 2003. Renal cell carcinoma: new prognostic factors? *Curr Opin Urol* 13:433-8.
- Koga, H., Shimada, K., Hara, Y., Nagano, M., Kohga, H., Yokoyama, R., Kimura, Y., Yuasa, S., Magae, J., Inamoto, S., Okazaki, N. and Ohara, O. 2004. A comprehensive approach for establishment of the platform to analyze functions of KIAA proteins: generation and evaluation of anti-mKIAA antibodies. *Proteomics* 4:1412-6.
- Kramer, S., Joos, T. O. and Templin, M. F. 2005. Protein Microarrays. In *Current Protocols in Protein Science* (J. E. Coligan, B. M. Dunn, D. W. Speicher and P. T. Wingfield, eds.) pp. 23.5.1 - 23.5.18.
- Krüger, T., Schoor, O., Lemmel, C., Kraemer, B., Reichle, C., Dengjel, J., Weinschenk, T., Müller, M., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Rammensee, H. G. and Stevanović, S. 2005. Lessons to be learned from primary renal cell carcinoma.

- mas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*
- Kusano, K., Berres, M. E. and Engels, W. R. 1999. Evolution of the RECQ family of helicases: A drosophila homolog, Dmblm, is similar to the human bloom syndrome gene. *Genetics* 151:1027-39.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lemmel, C. and Stevanović, S. 2003. The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods* 29:248-59.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. and Lockhart, D. J. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21:20-4.
- Little, A. M. and Parham, P. 1999. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet* 1:105-23.
- Ludwig, J. A. and Weinstein, J. N. 2005. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 5:845-56.
- MacBeath, G. 2002. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 32 Suppl:526-32.
- Maecker, B., von Bergwelt-Baildon, M. S., Sherr, D. H., Nadler, L. M. and Schultze, J. L. 2005. Identification of a new HLA-A\*0201-restricted cryptic epitope from CYP1B1. *Int J Cancer* 115:333-6.
- McCluskey, J. and Peh, C. A. 1999. The human leucocyte antigens and clinical medicine: an overview. *Rev Immunogenet* 1:3-20.
- Michael, A. and Pandha, H. S. 2003. Renal-cell carcinoma: tumour markers, T-cell epitopes, and potential for new therapies. *Lancet Oncol* 4:215-23.
- Mitra, A. K., Celia, H., Ren, G., Luz, J. G., Wilson, I. A. and Teyton, L. 2004. Supine orientation of a murine MHC class I molecule on the membrane bilayer. *Curr Biol* 14:718-24.
- Natarajan, K., Li, H., Mariuzza, R. A. and Margulies, D. H. 1999. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet* 1:32-46.
- Nathan, P. D. and Eisen, T. G. 2002. The biological treatment of renal-cell carcinoma and melanoma. *Lancet Oncol* 3:89-96.
- Nelson, C. A. and Fremont, D. H. 1999. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev Immunogenet* 1:47-59.
- Nishizuka, S., Charboneau, L., Young, L., Major, S., Reinhold, W. C., Waltham, M., Kouros-Mehr, H., Bussey, K. J., Lee, J. K., Espina, V., Munson, P. J., Petricoin, E., 3rd, Liotta, L. A. and Weinstein, J. N. 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* 100:14229-34.
- Oya, M. and Murai, M. 2003. Renal cell carcinoma: relevance of pathology. *Curr Opin Urol* 13:445-9.
- Paschen, A., Eichmüller, S. and Schadendorf, D. 2004. Identification of tumor antigens and T-cell epitopes, and its clinical application. *Cancer Immunol Immunother* 53:196-203.

- Paul, A., Wilson, S., Belham, C. M., Robinson, C. J., Scott, P. H., Gould, G. W. and Plevin, R. 1997. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal* 9:403-10.
- Pawelec, G. 2004. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? *Cancer Immunol Immunother* 53:262-74.
- Paweletz, C. P., Charboneau, L., Bichsel, V. E., Simone, N. L., Chen, T., Gillespie, J. W., Emmert-Buck, M. R., Roth, M. J., Petricoin, I. E. and Liotta, L. A. 2001. Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* 20:1981-9.
- Pawlak, M., Schick, E., Bopp, M. A., Schneider, M. J., Oroszlan, P. and Ehrat, M. 2002a. Zeptosens' protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis. *Proteomics* 2:383-93.
- Pawlak, M., Schneider, M., Schick, E., Kresbach, G. M. and Ehrat, M. 2002b. DNA- und Protein-Microarrays –Höchste Empfindlichkeit durch Planare Wellenleiter-technologie. *Laborwelt* 3:44-48.
- Petricoin, E. F., Zoon, K. C., Kohn, E. C., Barrett, J. C. and Liotta, L. A. 2002. Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality. *Nat Rev Drug Discov* 1:683-95.
- Poetz, O., Schwenk, J. M., Kramer, S., Stoll, D., Templin, M. F. and Joos, T. O. 2005. Protein microarrays: catching the proteome. *Mech Ageing Dev* 126:161-70.
- Puranam, K. L. and Blackshear, P. J. 1994. Cloning and characterization of RECQL, a potential human homologue of the Escherichia coli DNA helicase RecQ. *J Biol Chem* 269:29838-45.
- Ransohoff, D. F. 2003. Cancer. Developing molecular biomarkers for cancer. *Science* 299:1679-80.
- Renkvist, N., Castelli, C., Robbins, P. F. and Parmiani, G. 2001. A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* 50:3-15.
- Rey, A., Lara, P. C., Redondo, E., Valdes, E. and Apolinario, R. 1998. KI67 proliferation index in tumors of the upper urinary tract as related to established prognostic factors and long-term survival. *Arch Esp Urol* 51:204-10.
- Rhodes, D. A. and Trowsdale, J. 1999. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet* 1:21-31.
- Rundhaug, J. E. 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9:267-85.
- Sachs, L. 1996. Angewandte Statistik. In, eds.) pp. 149 ff.
- Sadovnikova, E., Jopling, L. A., Soo, K. S. and Stauss, H. J. 1998. Generation of human tumor-reactive cytotoxic T cells against peptides presented by non-self HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 28:193-200.
- Schag, K., Schmidt, S. M., Muller, M. R., Weinschenk, T., Appel, S., Weck, M. M., Grunebach, F., Stevanović, S., Rammensee, H. G. and Brossart, P. 2004. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res* 10:3658-66.

- Schmidt, S. M., Schag, K., Muller, M. R., Weinschenk, T., Appel, S., Schoor, O., Weck, M. M., Grunebach, F., Kanz, L., Stevanović, S., Rammensee, H. G. and Brossart, P. 2004. Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res* 64:1164-70.
- Schmitz, M., Diestelkoetter, P., Weigle, B., Schmachtenberg, F., Stevanović, S., Ockert, D., Rammensee, H. G. and Rieber, E. P. 2000. Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res* 60:4845-9.
- Schrohl, A. S., Holten-Andersen, M., Sweep, F., Schmitt, M., Harbeck, N., Foekens, J. and Brunner, N. 2003. Tumor markers: from laboratory to clinical utility. *Mol Cell Proteomics* 2:378-87.
- Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T. and Huber, C. 2000. Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 56:327-36.
- Shastri, N., Schwab, S. and Serwold, T. 2002. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 20:463-93.
- Sheehan, K. M., Calvert, V. S., Kay, E. W., Lu, Y., Fishman, D., Espina, V., Aquino, J., Speer, R., Araujo, R., Mills, G. B., Liotta, L. A., Petricoin, E. F., 3rd and Wulfkuhle, J. D. 2005. Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol Cell Proteomics* 4:346-55.
- Sidransky, D. 2002. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2:210-9.
- Singh-Jasuja, H., Emmerich, N. P. and Rammensee, H. G. 2004. The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53:187-95.
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I. and Trapani, J. A. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2:293-9.
- Stahl, S., Ittrich, C., Marx-Stoelting, P., Kohle, C., Altug-Teber, O., Riess, O., Bonin, M., Jobst, J., Kaiser, S., Buchmann, A. and Schwarz, M. 2005. Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology* 42:353-61.
- Stam, N. J., Spits, H. and Ploegh, H. L. 1986. Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol* 137:2299-306.
- Stam, N. J., Vroom, T. M., Peters, P. J., Pastoors, E. B. and Ploegh, H. L. 1990. HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy. *Int Immunol* 2:113-25.
- Stevanović, S. 2002. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer* 2:514-20.

- Stoll, D., Bachmann, J., Templin, M. F. and Joos, T. O. 2004. Microarray technology: an increasing variety of screening tools for proteomic research. *Targets* 3:24-31.
- Templin, M. F., Stoll, D., Schrenk, M., Traub, P. C., Vohringer, C. F. and Joos, T. O. 2002. Protein microarray technology. *Trends Biotechnol* 20:160-6.
- Templin, M. F., Stoll, D., Schwenk, J. M., Potz, O., Kramer, S. and Joos, T. O. 2003. Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* 3:2155-66.
- Textor, M., Ruiz, L., Hofer, R., Rossi, A., Feldman, K., Hähner, G. and Spencer, N. D. 2000. Structural Chemistry of Self-Assembled Monolayers of Octadecylphosphoric Acid on Tantalum Oxide Surfaces. *Langmuir* 16:3257-3271.
- van den Elsen, P. J., Holling, T. M., Kuipers, H. F. and van der Stoep, N. 2004. Transcriptional regulation of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16:67-75.
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R. and Friend, S. H. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-6.
- Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D. P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., Moguilevsky, N., Dieu, M., Kane, J. P., De Baetselier, P., Brasseur, R. and Pays, E. 2003. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422:83-7.
- Viret, C. and Janeway, C. A., Jr. 1999. MHC and T cell development. *Rev Immunogenet* 1:91-104.
- Vissers, J. L., De Vries, I. J., Schreurs, M. W., Engelen, L. P., Oosterwijk, E., Figdor, C. G. and Adema, G. J. 1999. The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 59:5554-9.
- Walter, S., Herrgen, L., Schoor, O., Jung, G., Wernet, D., Buhning, H. J., Rammensee, H. G. and Stevanović, S. 2003. Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres. *J Immunol* 171:4974-8.
- Watts, C. and Powis, S. 1999. Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet* 1:60-74.
- Wei, X., Xu, H. and Kufe, D. 2005. Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell* 7:167-78.
- Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K. H., Wernet, D., Stevanović, S. and Rammensee, H. G. 2002. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* 62:5818-27.
- Worzfeld, T., Puschel, A. W., Offermanns, S. and Kuner, R. 2004. Plexin-B family members demonstrate non-redundant expression patterns in the developing

- mouse nervous system: an anatomical basis for morphogenetic effects of Sema4D during development. *Eur J Neurosci* 19:2622-32.
- Wright, K., Wilson, P., Morland, S., Campbell, I., Walsh, M., Hurst, T., Ward, B., Cummings, M. and Chenevix-Trench, G. 1999. beta-catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int J Cancer* 82:625-9.
- Wulfkuhle, J. D., Aquino, J. A., Calvert, V. S., Fishman, D. A., Coukos, G., Liotta, L. A. and Petricoin, E. F., 3rd. 2003. Signal pathway profiling of ovarian cancer from human tissue specimens using reverse-phase protein microarrays. *Proteomics* 3:2085-90.
- Yewdell, J. W., Reits, E. and Neefjes, J. 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3:952-61.
- York, I. A., Mo, A. X., Lemerise, K., Zeng, W., Shen, Y., Abraham, C. R., Saric, T., Goldberg, A. L. and Rock, K. L. 2003. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity* 18:429-40.
- Zellweger, T., Ninck, C., Bloch, M., Mirlacher, M., Koivisto, P. A., Helin, H. J., Mihatsch, M. J., Gasser, T. C. and Bubendorf, L. 2005. Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. *Int J Cancer* 113:619-28.
- Zha, H., Raffeld, M., Charboneau, L., Pittaluga, S., Kwak, L. W., Petricoin, E., 3rd, Liotta, L. A. and Jaffe, E. S. 2004. Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Lab Invest* 84:235-44.

## 7 Publikationsliste

- \* Kramer S, Knorpp T, Gierke B, Hartmann M, Pawlak M, Joos TO, Stevanović S, Templin MF (2006). Precise quantitative determination of protein expression in renal cell carcinoma by a highly sensitive, internally controlled protein microarray platform (in Vorbereitung).
- Kramer S, Joos TO, Templin MF. Current Protocols of Protein Science. 2005. John Wiley & Sons, New York, pp. 23.5.1 - 23.5.18. Protein Microarrays.
- Poetz O, Schwenk JM, Kramer S, Templin MF and Joos TO (2005). Protein Microarrays: Catching the Proteome. Mechanisms of Ageing and Development 126(1): 161 – 170.
- Kramer S and Templin MF. Targets. 2004 Aug; 4(2):132-33. Drug development in the era of proteomics.
- Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Poetz O, Kramer S and Joos TO (2003). Protein Microarrays: Promising tool for proteomic research. Proteomics 3: 2155 – 2166.

Teile dieser Arbeit sind in die mit \* markierten Publikationen eingegangen.

## 8 Akademische Lehrer

Dr. Bayer	Dr. Hovemann	Dr. Schild
Dr. Bisswanger	Dr. Jung	Dr. Schneider
Dr. Bock	Dr. Kalbacher	Dr. Schwarz
Dr. Bohley	Dr. Lindner	Dr. Schumann
Dr. Breyer-Pfaff	Dr. Madeo	Dr. Sheldrick
Dr. Buchmann	Dr. Mayer	Dr. Stevanović
Dr. Dietzel-Meyer	Dr. Mecke	Dr. Voelter
Dr. Dringen	Dr. Müller	Dr. Voigt
Dr. Eisele	Dr. Münzel	Dr. Weber
Dr. Gauglitz	Dr. Overath	Dr. Weingärtner
Dr. Haas	Dr. Pfaff	Dr. Werringloer
Dr. Hagenmaier	Dr. Poralla	Dr. Weser
Dr. Hamprecht	Dr. Probst	Dr. Wesselborg
Dr. Hemetsberger	Dr. Rammensee	Dr. Wiesinger
Dr. Heumann	Dr. Reutter	Dr. Wittinghofer

## 9 Danksagung

Prof. Dr. Stefan Stevanović danke ich herzlichst für die Überlassung des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung während der Durchführung dieser Doktorarbeit. Prof. Dr. Michael Schwarz danke ich für fruchtbare Diskussionen und Hilfestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Templin für die hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit in fachlicher und menschlicher Hinsicht. Dr. Thomas Joos, Dr. Dieter Stoll und Dr. Michael Pawlak danke ich für ihre tolle Unterstützung zur Anfertigung dieser Arbeit.

Für die großartige Arbeitsatmosphäre und fruchtbare Unterstützung bei jeglichen Berufs- und Lebensfragen danke ich meinen Kollegen Berthold Gierke (mein TeamZepto - Team mate), Michael Hartmann (lord of array-manufacturing), Thomas Knorpp und Dr. Oliver Pötz (beadking pötz) von Raum 407b. Herzlicher Dank gilt meinem langjährigen Kollegen und Büroge nossen Dr. Jochen M. Schwenk (joey) für seinen fachlichen Rat und das kritische Lesen des Manuskripts. Ich danke Dr. Stefan Pabst (poppee) für die fruchtbare Zusammenarbeit und das kritische Lesen des Manuskripts. Herzlichen Dank an alle weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppe Biochemie am NMI für ihren unterstützenden Beitrag zu meiner Arbeit.

Patricia Hrstic, Oliver Schoor und Steffen Walter aus der Arbeitsgruppe Stevanović danke ich für die ausgezeichnete Kooperation und die Bereitstellung der Zellpellets, mRNA-Expressionsdaten und MHC-Monomere. Bei Prof. Dr. Stevanović möchte ich mich für die Bereitstellung der Tumorproben bedanken.

Meinen Freunden gebührt Dank für Ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht, die das Leben außerhalb und innerhalb des Labors wunderbar bereicherte. Meinen Eltern gebührt herzlichster Dank für ihre stetige Unterstützung.

Meiner Frau Stephanie und meinen Kindern Leander und Joelle danke ich einfach - für alles, was das Leben lebenswert macht.

## 10 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

#### **Stefan Kramer**

geboren am 31.10.1971 in Menden (Sauerland)

verheiratet mit Stephanie Kramer, 2 Kinder (4 und 6 Jahre)

### AUSBILDUNG

seit Juli 2005	Postgraduate Study Course zum Master of Science in Pharmaceutical Medicine, Universität Duisburg/Essen.
Dezember 2002 - Januar 2006	Promotion im Fach Biochemie. Betreuer: Prof. Dr. S. Stevanović, Abteilung Immunologie, Interfakultäres Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, in Kooperation mit Dr. M. F. Templin, Abteilung Assay Development, Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut an der Universität Tübingen (NMI), Reutlingen. Titel: "Mikroarray-basierende Proteomanalyse zur Detektion tumorspezifischer Markerproteine beim Nierenzellkarzinom".
Januar 2002 - September 2002	Diplomarbeit. Betreuer: Prof. Dr. M. Schwarz, Abteilung Toxikologie, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen, in Kooperation mit Prof. Dr. S. Wesselborg, Abteilung für Molekulare Gastroenterologie, Universitätsklinikum Tübingen. Titel: "Untersuchungen zur Rolle des pH-Wertes für die Caspase-Aktivierung und Apoptose-Induktion".
Oktober 1999 - November 2002	Biochemie-Hauptstudium, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
Oktober 1996 - September 1999	Biochemie-Grundstudium, Ruhr-Universität Bochum.
Oktober 1993 - September 1996	Ausbildung zum Krankenpfleger, Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke.
Juli 1991 - September 1992	Zivildienst in der Behindertenhilfe Stuttgart.
05.06.1991	Abitur (Allgemeine Hochschulreife) am Walram-Gymnasium Menden.