
BACHELORARBEIT

Frau
Teresa Franke

**Die Optimierung einer
Multiplex-Färbung für
verschiedene Metastasen des
Melanoms**

Dresden, 2023

BACHELORARBEIT

Die Optimierung einer Multiplex-Färbung für verschiedene Metastasen des Melanoms

Autor:
Frau

Teresa Franke

Studiengang:
Biotechnologie

Seminargruppe:
BT20wM-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbel Wünschiers

Zweitprüfer:
Alexander Schulz, Ph.D.

weitere Betreuer:
Dana Westphal, Ph.D.

Einreichung:
Dresden, 15. Oktober 2023

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2023

Bibliographische Beschreibung:

Franke, Teresa: Die Optimierung einer Multiplex-Färbung für verschiedene Metastasen des Melanoms. - 2023. – 10 S., 97 S., 1 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer – und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2023

Englischer Titel

The optimization of multiplex staining for different melanoma metastases.

Kurzbeschreibung:

Der Inhalt dieser Arbeit befasst sich mit der Verbesserung und somit Optimierung einer Multiplex-Färbung für die Metastasen des malignen Melanoms, wobei das sogenannte CODEX-System verwendet wird. Wie bei vielen anderen Krebserkrankungen ist die Metastasierung ausschlaggebend für eine hohe Mortalität. Um besser gegen die Metastasen vorgehen zu können, ist ein Verständnis ihrer Mikroumgebung und somit auch die Wechselwirkungen zwischen Tumor und Normalgewebe notwendig. Mithilfe der Multiplex-Technologie kann diese Mikroumgebung durch die Markierung von bis zu 50 Markern gleichzeitig in einem Gewebeschnitt weitreichend dargestellt werden. Anhand von Markern für Phosphoproteine kann zudem die Aktivierung bestimmter Signalwege nachgewiesen werden, wie zum Beispiel die des MAPK-Signalwegs, welcher in malignen Melanomen aufgrund bestimmter Mutationen in diesem Signalweg oftmals hochreguliert ist.

Danksagung

Zunächst einmal möchte ich einen besonderen Dank an meine Gruppenleiterin Frau Dr. Westphal richten, sowie an meinen Betreuer Herrn Dr. Alexander Schulz für die ausführliche Einarbeitung, das Vertrauen und die stets motivierenden Worte, auch nach meinem krankheitsbedingten Ausfall für ein paar Wochen. Ebenfalls vielen Dank an Frau Prof. Dr. Friedegund Meier für die herzliche Aufnahme in die Gruppe, trotz der wenigen persönlichen Treffen.

Es hat mir viel Freude bereitet meine Bachelorarbeit über die letzten 6 Monate in der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatookologie anzufertigen und ich möchte mich somit auch bei den anderen netten Kolleginnen für das angenehme Arbeitsumfeld und die Unterstützung bedanken. Ich fühlte mich nie alleingelassen, auch wenn ich mal nicht weiterwusste.

Zudem vielen Dank an Herrn Professor Wünschiers, dass er die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und für die Übernahme der Erstkorrektur.

Ein weiterer Dank geht an meine Familie, meine Freunde und meinen Freund, welche mich mein ganzes Studium über begleitet haben und dabei immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme hatten.

In den letzten Monaten habe ich so viele neue wertvolle Erfahrungen sammeln können und bin gespannt, was in der Zukunft auf mich wartet.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1 Schwarzer Hautkrebs (Melanom).....	1
1.2 Hirnmetastasen im Vergleich zu anderen Organmetastasen	2
1.3 Melanom-Hirnmetastasen (MHM)	3
1.3.1 Ausbreitung der Metastasen ins Gehirn.....	3
1.3.2 Melanom-Hirnmetastasen und ihre metabolische Umgebung	5
1.3.3 Melanom-Hirnmetastasen und ihre Immunumgebung	6
1.3.4 Signalwege der Melanomzellen in der Mikroumgebung des Gehirns	7
1.4 Therapierungs- und Behandlungsmethoden.....	8
1.4.1 BRAF- und MEK-Inhibitoren	9
1.4.2 Immun-Checkpoint-Inhibitoren	10
1.5. Multiplex Färbung	13
1.5.1 Funktionsweise CODEX/PhenoCycler	14
1.5.2 Anwendung bei der Charakterisierung der Mikroumgebung von Melanomen und anderen Tumoren	15
1.5.3 Verschiedene Marker zur Anwendung in Multiplex-Färbungen.....	15
2 Zielstellung	18
3 Material	19
3.1 Chemikalien	19
3.2 Medien	21
3.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	21
3.4 Verbrauchsmaterial.....	24
3.5 Laborgeräte.....	24
3.6 Antikörper.....	25
4 Methoden	28
4.1 Zellkultur	28
4.1.1 Splitten	28
4.1.2 Aussäen der Zellen.....	28
4.1.3 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren	29

4.1.4 Transfektion der Zellen mit siRNA	29
4.1.5 Zellblockherstellung	30
4.2 Western Blot	31
4.2.1 Proteinisolation	31
4.2.2 SDS-PAGE	31
4.2.3 Western Blot	31
4.2.4 Immunoblot	32
4.3 Manuelle Immunhistochemische Färbung	33
4.3.1 Die Deparaffinierung und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe	33
4.3.2 Die Zugabe des primären Antikörpers	34
4.3.3 Die Zugabe des sekundären Antikörpers.....	34
4.3.4 Das Eindecken mit „ <i>Mounting-Solution</i> “ NucBlue.....	34
4.4 Konjugation von Antikörpern	34
4.4.1 Die Konjugation eines Antikörpers mit Akoya Kit.....	35
4.4.2 Die Konjugation eines Antikörpers ohne Akoya Reagenzien	36
4.4.3 Die Validierung des konjugierten Antikörpers mit der Gelelektrophorese....	36
4.5 Die CODEX Multiplexfärbung	37
4.5.1 Die Beschichtung der Deckgläser	37
4.5.2 Die Färbung des Gewebes I.....	38
4.5.3 Das Bleaching des Gewebes	38
4.5.4 Die Färbung des Gewebes II.....	38
4.5.5 Fixierung der Antikörper	39
4.5.6 Herstellung der Reporterplatte	40
4.5.7 Einstellungen am CODEX und Keyence Mikroskop.....	40
5 Ergebnisse.....	43
5.1 Western Blot der DDPoro26 Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren	43
5.2 Western Blot behandelter DDPoro65b Zellen und DDPoro26 Zellen für den Zellblock	45
5.3 Western Blot behandelter M10 und MCF7 Zellen mit Inhibitoren und siRNA	46
5.4 Western Blot transfizierter MCF7 Zellen mit siRNA unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien	47
5.5 Western Blot behandelter M10 und MCF7 Zellen mit Inhibitoren (Trametinib und Alpelisib).....	49
5.6 Western Blot behandelter M10, MCF7 und DDPoro65 Zellen mit Pervanadate.	50

5.7 Manuelle immunhistochemische Färbung von pAKT, pERK, pEGFR, pIFGR an den Zellblöcken DDPoro26 DMSO und DDPoro26 Inhibitors	52
5.8 Manuelle IHC von pAKT an den Zellböcken DDPoro26 DMSO und Inhibitors, des M10 Zellblocks und dem Gewebe einer Harnblasenmetastase	55
5.9 Manuelle IHC von pERK und (p)AKT an den Zellböcken MCF7 (DMSO und Trametinib + Alpelisib) sowie an den Zellblöcken M10 (DMSO und Trametinib + Alpelisib).....	58
5.10 Manuelle IHC von EGFR an den Zellböcken DDPoro26 DMSO und WM3734, sowie IGFR an den Zellblöcken M10 siIGFR und M10 siSCR	62
5.11 Manuelle IHC von (p)IGFR an den Zellblöcken MCF7 siIGFR und MCF7 siSCR	64
5.12 Manuelle IHC von (p)IGFR, pAKT und pERK an den Zellblöcken MCF7 (siIGFR + siSCR), sowie M10 und DDPoro65 (Pervanadate + Control).....	65
5.11 Konjugation der Antikörper MelanA, HMB45, Connexin43 und GRB10 sowie pAKT und AKT	69
5.12 CODEX Färbung an einer Harnblasenmetastase mit den Markern (p)ERK, (p)AKT, Ki67, CD3, CD8, CD20, CD34, CD68, HMB45, MelanA, Connexin43, GRB10, PAK1, GranzymB, PD-1, PD-L1	72
6 Diskussion	74
6.1 Western Blot der DDPoro26 Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren	74
6.2 Western Blot behandelter DDPoro65b Zellen und DDPoro26 Zellen für Zellblock	75
6.3 Western Blots behandelter MCF7 und M10 Zellen zur Herstellung von Positiv- und Negativkontrollen für pERK, (p)AKT sowie (p)IGFR.....	75
6.4 Western Blot behandelter M10, MCF7 und DDPoro65 Zellen mit Pervanadate .	78
6.5 Manuelle immunhistochemische Färbung von pAKT, pERK, pEGFR, pIFGR an den Zellblöcken DDPoro26 DMSO und DDPoro26 Inhibitors	79
6.6 Manuelle IHC von pERK und (p)AKT an alten und neu hergestellten Zellblöcken DDPoro26, M10 und MCF7 sowie an Gewebe einer Harnblasenmetastase	80
6.7 Manuelle IHC von EGFR und IGFR an alten und neu hergestellten Zellblöcken von DDPoro26, WM3734, M10 und MCF7	81
6.8 Manuelle IHC von pERK, pAKT und (p)IGFR an den Zellblöcken DDPoro65 und M10 mit Pervanadate behandelt sowie siRNA behandelten MCF7 Zellen	82
6.9 Konjugation der Antikörper MelanA, HMB45, Connexin43, GRB10, pAKT und AKT	82

6.10 CODEX Färbung an einer Harnblasenmetastase.....	84
7 Ausblick.....	86
8 Zusammenfassung.....	87
9 Summary.....	89
Literaturverzeichnis.....	91
Anhang.....	97
Selbstständigkeitserklärung.....	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chronisches Implantat einer Ratte für die 2-Photonen-Mikroskopie modifiziert nach (Koletar & Dorr, 2019)	4
Abbildung 2: Aktivierung und Inaktivierung der T-Zell Aktivität (Rausch & Hastings, 2017)	12
Abbildung 3: links: eingefärbtes Adenokarzinom, rechts: eingefärbtes Hirngewebe bei Alzheimer (URL-2)	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung 6-Well-Platten mit den Lösungen für die Antikörper Fixierung (Platte 1: S2 Lösung und PFA Fixierungslösung, Platte 2: 1x DPBS und Eis-kaltes Methanol, Platte 3: 1x DPBS und S4 Lösung)	39
Abbildung 5: links: "Spill Guard" als Auslaufschutz, rechts: "Stage Holder" mit eingespanntem Gewebedeckglas im Mikroskop platziert	41
Abbildung 6: Einstellungen am Keyence Mikroskop im "BZ-X800 Viewer"	42
Abbildung 7: DDPoro26 Zellen in Kultur nach unterschiedlichen Tagen und bei verschiedenen Vergrößerungen (4x, 10x und 20x)	43
Abbildung 8: Western Blot DDPoro26 direkte Lyse und Lyse nach Ablösen der Zellen, sowie mit und ohne Inhibitoren behandelt (pEGFR, pIGFR, pAKT, pERK, EGFR, IGFR, AKT und ERK)	44
Abbildung 9: Western Blot DDPoro26 und DDPoro65b mit Inhibitoren und ohne Inhibitoren behandelt (pEGFR, pIGFR, pAKT, pERK, EGFR, IGFR, AKT und ERK)	45
Abbildung 10: Western Blot M10 Zellen behandelt mit DMSO, Trametinib und Buparlisib, sowie mit siRNA behandelten MCF7 Zellen (EGFR, pIGFR, IGFR, pAKT, AKT, pERK, ERK)	46
Abbildung 11: Western Blot transfizierter MCF7 Zellen mit siRNA unter Verwendung von DharmaFECT, Lipofectamine RNAiMAX und INTERFERin	48
Abbildung 12: Western Blot behandelter M10 und MCF7 Zellen mit Trametinib und Alpelisib (pERK, ERK, pAKT, AKT)	49
Abbildung 13: Western Blot behandelter M10, MCF7 und DDPoro65 Zellen mit Pervanadate ((p)EGFR, (p)IGFR, (p)AKT, (p)ERK)	51
Abbildung 14: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pEGFR-Antikörpern von Cell Signaling und R&D Systems an DDPoro26 DMSO und Inhibitors Zellblöcken	52

Abbildung 15: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pIGFR-Antikörpern von Cell Signaling (#3021 und #3918) an DDPoro26 DMSO und Inhibitors	53
Abbildung 16: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pAKT-Antikörpern von Cell Signaling und R&D Systems an DDPoro26 DMSO und Inhibitors	54
Abbildung 17: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pERK-Antikörpern von Biolegend und R&D Systems an DDPoro26 DMSO und Inhibitors	55
Abbildung 18: Manuelle IF/IHC Färbung von pAKT (CS) an den Zellblöcken DDPoro26 Inhibitors und DDPoro26 DMSO	56
Abbildung 19: Manuelle IF/IHC von pAKT (CS) am M10 Zellblock	57
Abbildung 20: Manuelle IF/IHC von pAKT (CS) an einer Harnblasenmetastase	57
Abbildung 21: Manuelle IHF von AKT der Firmen Cell Signaling und R&D an M10 DMSO und Trametinib + Alpelisib	59
Abbildung 22: Manuelle IHF von pAKT der Firmen Cell Signaling und R&D an M10 DMSO und Trametinib + Alpelisib	60
Abbildung 23: Manuelle IHF von pERK der Firmen Biolegend und R&D an MCF7 DMSO und Trametinib + Alpelisib	61
Abbildung 24: Manuelle IF von EGFR (CS und R&D) an den Zellblöcken DDPoro26 und WM3734 DMSO	63
Abbildung 25: Manuelle IHF von IGFR (CS) an den Zellblöcken M10 siIGFR und M10 siSCR	64
Abbildung 26: Manuelle IHF von IGFR (CS) an den Zellblöcken MCF7 siIGFR und MCF7 siSCR	65
Abbildung 27: Manuelle IHF von pERK (R&D) an den Zellblöcken M10 Control und M10 Pervanadate	66
Abbildung 28: Manuelle IHF von pAKT (R&D) an den Zellblöcken M10 Control und M10 Pervanadate	66
Abbildung 29: Manuelle IHF von IGFR (R&D) an den Zellblöcken MCF7 siIGFR und MCF7 siSCR	67
Abbildung 30: Manuelle IHF von pIGFR (R&D) an den Zellblöcken DDPoro65 Control und DDPoro65 Pervanadate	67
Abbildung 31: Gel der Konjugation von MelanA, HMB45, Connexin43, GRB10 (A/B), pAKT und AKT (C) nach Coomassie- bzw. Silber-Färbung	69
Abbildung 32: Gel der Konjugation von EGFR nach der Silber-Färbung	71

Abbildung 33: CODEX Färbung der Harnblasenmetastase Region 3 (DAPI, CD34, MelanA/HMB45 und Ki67) Die Länge des Maßbalkens in weiß entspricht 100 µm. 72

Abbildung 34: CODEX Färbung der Harnblasenmetastase Region 4: A mit DAPI und AKT; B mit DAPI und PAK1; C mit DAPI, AKT, PAK1, CD34, MelanA/HMB45 und Ki67. Die Länge des Maßbalkens in weiß entspricht 100 µm. 73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung verschiedener Multiplex-Methoden nach (Tan & Nerurkar, 2020).....	14
Tabelle 2: Lösungen.....	19
Tabelle 3: Verwendete Medien.....	21
Tabelle 4: Molekularbiologische Reagenzien.....	21
Tabelle 5: Verbrauchsmaterial.....	24
Tabelle 6: Laborgeräte.....	24
Tabelle 7: Primärantikörper.....	25
Tabelle 8: Sekundärantikörper.....	27
Tabelle 9: Ablauf der Deparaffinierung und Rehydrierung mit den entsprechenden Inkubationszeiten (IZ).....	33
Tabelle 10: Herstellung des „ <i>Antibody Reduction Master Mix</i> “ für ein bis zwei Konjugationen.....	35
Tabelle 11: Volumina benötigter Reporter und <i>Plate Buffer</i> für Zyklen mit einem, zwei oder drei Antikörper.....	40

Abkürzungsverzeichnis

APZ	- antigenpräsentierende Zelle
BHS	- Blut-Hirn-Schranke
BZ	- Belichtungszeit
cPLA2	- <i>cytosolic phospholipases A2</i>
CTLA-4	- <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
EGFR	- <i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	- <i>extracellular-signal regulated kinase</i>
EZM	- extrazelluläre Matrix
FAPB7	- <i>fatty acid binding protein 7</i>
FFPE	- Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
HER2	- Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2
HLA	- humanes Leukozyten- Antigen
IF	- Immunofluoreszenz
IGFR	- <i>insulin like growth factor 1 receptor</i>
IHC	- Immunohistochemie
ITIM	- <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
ITSM	- Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes-Schaltmotiv
IZ	- Inkubationszeit
MAPK	- Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
mIHC	- multiplexe Immunohistochemie
mIF	- multiplexe Immunofluoreszenz
MHC	- <i>major histocompatibility complex</i>
MHM	- Melanomhirnmetastasen
NGF	- Nervenwachstumsfaktor
OXPPOS	- oxidative Phosphorylierung
PD-1	- <i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	- <i>programmed cell death-ligand 1</i>
PD-L2	- <i>programmed cell death-ligand 2</i>
PGE2	- Prostaglandin E2
PPAR	- Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
RB	- Retinoblastom
RT	- Raumtemperatur
RPPA	- <i>Reverse-Phase Protein-Arrays</i>

S100A7	- S100 calciumbindendes Protein A7
SHP-1	- Src-Homologieregion-2-Domäne-enthaltende Phosphatase-1
SHP-2	- Src-Homologieregion-2-Domäne-enthaltende Phosphatase-2
TCR	- T-Zell-Rezeptor
VEGF	- <i>vascular endothelial growth factor</i>
WB	- Western Blot
ZNS	- Zentralnervensystem

1. Einleitung

Zum jetzigen Zeitpunkt löst das Wort Krebs in vielen Menschen, besonders in Bewohnern von Industrieländern, Angst und Besorgnis aus. Krebs ist nach wie vor eine Bedrohung für die Gesundheit der Menschen. So bekommt jeder zweite Bürger in Deutschland mindestens einmal in seinem Leben die Diagnose Krebs gestellt und sogar jeder vierte stirbt an dieser Krankheit. Aus diesem Grund wird eine wirksame Bekämpfung immer bedeutsamer. Dass die Krebserkrankungen zunehmen, liegt dabei auch an der immer älter werdenden Gesellschaft, wodurch der Anteil der älteren Bevölkerung an der Gesamtbevölkerung stetig zunimmt. Das Positive ist jedoch, dass gleichzeitig auch die Überlebenschancen nach einer Krebsdiagnose steigen und diese in Deutschland sogar zu einer der höchsten in Europa zählt (Gröhe, 2016). Um diese Überlebenschancen noch weiter zu erhöhen, benötigt es jedoch die Verbesserung von Behandlungsmethoden sowie die Forschung an und Entwicklung von neuen Therapieansätzen. Doch um dort ansetzen zu können, braucht es sowohl ein besseres Verständnis der Tumore als auch deren Metastasen. Wobei zum Beispiel die Charakteristiken der Mikroumgebung des jeweiligen Tumors ein Ansatzpunkt darstellen könnten. Besonders die Metastasierung ist bei vielen Krebserkrankungen ausschlaggebend für eine hohe Mortalität, so auch bei dem malignen Melanom, welches vermehrt zu Hirnmetastasierungen neigt. In allen Stadien der Metastasierung spielt die Mikroumgebung und ihre Wechselwirkung zu den metastasierenden Zellen eine wichtige Rolle (Prukop, 2017-2021). Um die Zusammenhänge zwischen Mikroumgebung und Tumor bzw. dessen Metastasen zu charakterisieren, kann eine Multiplex-Immunhistochemie wertvolle Informationen liefern.

1.1 Schwarzer Hautkrebs (Melanom)

Die Anzahl an Neuerkrankungen von schwarzem Hautkrebs nimmt jährlich zu. Dabei erkrankten 2018 circa 22.890 Menschen am malignen Melanom. Männer sind häufiger als Frauen betroffen. Bei Frauen tritt das maligne Melanom im Durchschnitt im Alter von 62 Jahren auf, bei Männern liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 68 Jahren (Robert Koch-Institut, 2021).

Ein malignes Melanom entsteht aus den pigmentbildenden Zellen der Epidermis, den sogenannten Melanozyten. Über 90% der Melanome entwickeln sich primär in der Haut, da die Melanozyten hauptsächlich in der Basalzellreihe der Epidermis zu finden sind. Aber auch in den Schleimhäuten, sowie in der Retina des Auges und im Innenohr werden Melanozyten gefunden (Cerroni & Garbe, 2016). In ca. 70% der Fälle sorgen Mutationen in den RAF- oder RAS-Onkogenen, welche zu einer unkontrollierten Aktivierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase Wachstumssignalweges (MAPK) führen, dafür, dass Melanozyten entarten (Westphal & Wehner, 2021). Ein erstes Anzeichen eines Melanoms kann ein asymmetrischer, unscharf begrenzter Fleck sein, mit hellbraunen über dunkelbraunen bis hin zu schwarzen Farbnuancierungen. Zu Beginn nimmt das Wachstum horizontal zu, bevor es nach einer gewissen Zeit in das vertikale Wachstum übergeht. Die bekannte ABCD-Regel gibt folgende Warnzeichen an: Asymmetrie, Begrenzung (unregelmäßig bzw. unscharf), Colorit (heißt verschiedene Farbtöne) und Durchmesser (über 5 mm) (Cerroni & Garbe, 2016). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein malignes Melanom entwickelt, liegt bei einigen Menschen aufgrund bestimmter Risikofaktoren deutlich höher als bei anderen. Besonders stark wiederkehrende UV-Strahlung in Verbindung mit Sonnenbränden im Jugend- und Kindesalter gelten als Hauptursache späterer Melanome. Die UV-Belastung führt dabei zu einer vermehrten Bildung von Pigmentmalen. Ebenso erhöht ein regelmäßiger Besuch im Sonnenstudio das Risiko einer Erkrankung um 75%. Jedoch spielen auch genetische Veranlagungen eine wesentliche Rolle. Solche Risikofaktoren aufgrund genetischer Ausprägung wären zum Beispiel ein heller Hauttyp (Hauttyp I und II), rötliche oder blonde Haare, eine Neigung zu Sommersprossen, Sonnenbrandflecken sowie Angehörige mit einem malignen Melanom. Menschen mit mehreren individuellen Risikofaktoren können somit ein 120-fach erhöhtes Risiko besitzen, ein malignes Melanom auszubilden (URL-1).

Melanome werden in verschiedene Subtypen eingeteilt. Das wären das superfiziell spreitende Melanom, das noduläre Melanom (knotiger Typ, wächst schnell in die Tiefe), das lentigo-maligna-Melanom (wächst vorwiegend im Gesicht und am Kopf) sowie das

akral-lentiginöse Melanom (betrifft Finger und Zehen). Dabei kommt das superfiziell spreitende Melanom mit 57,4% am häufigsten vor und das akral-lentiginöse Melanom ist mit 4,0% am seltensten (Cerroni & Garbe, 2016). Für die Einteilung, in welchem Stadium sich das Melanom befindet, ist vor allem die Tumordicke nach Breslow ein wichtiges Kriterium. Es gibt die absolute vertikale Dicke des Tumorgewebes in Millimetern wieder, wobei von der Oberseite der Körnerschicht der Epidermis bis zur tiefsten nachweisbaren Tumorzelle gemessen wird. Auch die Eindringtiefe ist eine Messmethode für die Stadieneinteilung. Nach Clark unterteilt sich diese in 5 Stufen und misst, wie tief das Melanom in die Hautschichten eingedrungen ist (Krieter, 2019).

Metastasen des Melanoms können sich primär lymphogen, das heißt über das Lymphsystem, oder primär hämatogen, über den Blutkreislauf, verbreiten. Dabei begrenzen sich 2/3 aller Erstmetastasierungen auf die regionären Lymphabflusssysteme. Die Einteilung von Melanommetastasen erfolgt in vier Gruppen. Erstens in die Satellitenmetastasen, welche sich im Umkreis von 2 - 5 cm des Primärtumors befinden. Zweitens, in die In-Transit-Metastasen (ab 5 cm vom Primärtumor entfernt, befindet sich zwischen Primärtumor und regionalen Lymphknoten), drittens in die regionären Lymphknotenmetastasen und viertens in die Fernmetastasen, welche dabei häufig in Lunge, Leber und dem Gehirn zu finden sind (Cerroni & Garbe, 2016).

1.2 Hirnmetastasen im Vergleich zu anderen Organmetastasen

In unserem Körper ist das Gehirn das am besten geschützte Organ. Grund dafür ist die Blut-Hirn-Schranke (BHS), welche nur ausgewählte Moleküle von den Blutgefäßen in das Gehirn eindringen lässt. Bei zielgerichteten Therapien zeigte sich, dass Inhibitoren über Effluxpumpen der Endothelzellen wieder zurück in die Blutbahn geschleust werden. Darüber hinaus besitzt das Gehirn neben einer speziellen metabolischen Mikroumgebung, die durch verschiedene Signalwege bestimmt ist, auch eine einzigartige Immunumgebung. Diese ist geprägt durch die Mikroglia, welche einen Einfluss auf die Hirnmetastasen sowie Immuntherapien nehmen können. Mikroglia zählen zu den Gewebemakrophagen und bilden die Immunzellen des Gehirns. Ebenfalls eine große Rolle spielen die im Gehirn ansässigen Astrozyten. Sie versorgen die Neuronen und Endothelzellen mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen und können daher das Tumorwachstum begünstigen. Besonders in Bezug auf das Auftreten von Therapieresistenzen bei Hirnmetastasen sind die Erkenntnisse über die Mikroumgebung von großer Bedeutung. (Westphal & Wehner, 2021).

1.3 Melanom-Hirnmetastasen (MHM)

Die Entwicklung von Hirnmetastasen ist bei fortgeschrittenem Melanom die tödlichste Komplikation, wobei die Prognosen sehr schlecht stehen. 40 – 60% der Patienten zeigen im Laufe ihrer Erkrankung Anzeichen, dass eine Metastasierung in das Gehirn und somit in das zentrale Nervensystem erfolgt ist. Unbehandelt wachsen die Melanom-Hirnmetastasen (MHM) sehr schnell, wobei sich die Lebenszeit bei unbehandelten Patienten drastisch auf 3 – 4 Monate verkürzt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung von MHM für 54% der Todesfälle bei schwarzem Hautkrebs verantwortlich. Melanomzellen breiten sich über die Blutbahnen ins Gehirn aus, wobei sich die MHM besonders in den stark durchbluteten Regionen des Gehirns bilden. Davon verteilen sich 80% auf die Gehirnhälften, 5% im Hirnstamm und 15% im Kleinhirn (Phadke & Ozgun, 2021). Erste Symptome, die bei MHM auftreten sind Kopfschmerzen, neurologische Beeinträchtigungen sowie Krampfanfälle. Es gibt einige Risikofaktoren, die die Bildung von MHM erhöhen. Dazu gehört zum Beispiel die Angehörigkeit zum männlichen Geschlecht, Primärtumore in der Nähe von Hals und Kopf oder auch hohe Clark-Werte/Breslow Dicke des primären Melanoms (Phadke & Ozgun, 2021). Aber auch Mutationen in den Onkogenen BRAF (B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Threonin-Kinase) oder NRAS (N-Ras Proto-Onkogen, GTPase), die Aktivierung des Tumor-fördernden PI3K/AKT-Signalwegs sowie der Verlust des Tumorsuppressors PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) können das Risiko von Melanommetastasen im Gehirn erhöhen (Schöne, Gellrich, & Meier, 2022).

1.3.1 Ausbreitung der Metastasen ins Gehirn

Die Entwicklung von Fernmetastasen ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess. Diesem Prozess unterliegen auch Krebszellen des Melanoms, welche über die Blutgefäße ins Gehirn streuen. Dabei ist es nicht einfach, die Metastasierung ins Gehirn zu visualisieren. Fortschritte in der 2-Photonen- Mikroskopie und neue Methoden zur direkten Abbildung der Hirngefäße bieten hier jedoch neue Ansätze (Phadke & Ozgun, 2021). Als Versuchsorganismus wird hierbei oftmals die Maus verwendet, welche aufgrund ihrer geringen Schädeldichte und dem durchscheinenden Meningeal-Gewebe in Kombination mit dem undurchsichtigeren Kortikalis-Gewebe durch eine dünne Schädelpräparation eine gute Lichtdurchdringung ermöglichen. Außerdem wird der Schaden an dem darunterliegenden Parenchym, dem Grundgewebe, minimiert. Das Einsetzen eines Deckglases stabilisiert und schützt die ausgedünnte Region. Die

Abbildung 1 zeigt ein solches chronisches Implantat, hier in einer Ratte, zur Untersuchung der Hirnblutgefäße (Koletar & Dorr, 2019).

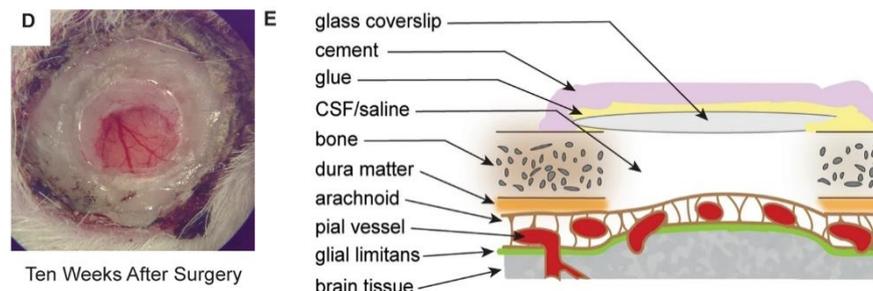


Abbildung 1: Chronisches Implantat einer Ratte für die 2-Photonen-Mikroskopie modifiziert nach (Koletar & Dorr, 2019)

Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen zeigten, dass die Melanomzellen passiv durch das Kreislaufsystem des Gehirns transportiert werden, bis sie die kleinen Mikrogefäße erreichen. Dort verbleiben die Zellen für eine gewisse Zeit in Ruhe, bevor sie dann aus den Gefäßen beginnen auszutreten (Phadke & Ozgun, 2021). Es kommt zur Extravasation, wobei die Tumorzellen sich am Endothel anhaften. Daraufhin bilden sich dynamische Kontakte, welche Veränderungen im Zytoskelett, eine transendotheliale Migration sowie die anschließende Invasion der Tumorzellen in die umgebende Matrix zur Folge haben (Chen & Whisler, 2013). Die Geschwindigkeit der Krebszellwanderung in das Hirnparenchym ist typischerweise sehr viel langsamer als bei anderen viszeralen Organen, weshalb sich Hirnmetastasen wahrscheinlich sehr viel später in der Tumorprogression entwickeln als Metastasen an anderen Stellen. Die meisten anfänglichen Mikrometastasen wachsen dabei entlang der äußeren Auskleidung der Blutgefäße.

Eine große Herausforderung für die Hirnmetastasen, ist das Durchdringen der schützenden BHS (Lyle & Lockman, 2016). Sie ist eine hochselektive und dichte Schnittstelle zwischen Blut und dem Parenchym des Gehirns und besteht aus einer physischen zellulären Barriere, Schichten von extrazellulärer Matrix (EZM) und Transportern für feste Stoffe und Medikamente. Die zelluläre Barriere setzt sich aus Endothelzellen zusammen, verbunden über *tight junctions*, die die passive Diffusion von Ionen und anderen polaren gelösten Stoffen zwischen den Endothelzellen verhindern. Die Endothelzellen werden dabei von einer eng assoziierten Schicht von Perizyten unterstützt, die zusammen mit Astrozyten eine perivaskuläre Hülle bilden (Abbott & Patabendige, 2010). Die Unterbrechung dieser Integrität, zum Beispiel durch die Erweiterung der Mikrogefäße, die Auslösung einer Entzündungsreaktion und die vermehrte Sekretion von gefäßbildungsfördernden Faktoren wie VEGF (vaskulärer

endothelialer Wachstumsfaktor) spielt bei der Bildung von MHM die Schlüsselrolle. Melanomzellen besitzen weitere Strategien, um die BHS zu stören. Dazu gehört die physische Störung der Barriere, indem die Zellen einen amöboiden, abgerundeten Phänotyp mit zellulären Ausstülpungen annehmen, wodurch sie die Endothelzellen auseinanderdrücken können. Die Barriere kann auch durch erhöhte Konzentrationen an pro-invasiven Integrinen (z.B. $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 4\beta 1$) gestört werden. Auch der Abbau der extrazellulären Matrix der BHS trägt zur Hirnmetastasenbildung bei (Phadke & Ozgun, 2021). Die Protease Cathepsin-S zum Beispiel, welche von den Tumorzellen selbst oder von anderen Wirtszellen wie Makrophagen sezerniert werden kann, unterbricht die BHS durch die Spaltung des *tight-junction*-Proteins JAM-B (Valiente & Obenaus, 2014).

Da Melanomzellen von der Neuralleiste abstammen gibt es Hinweise darauf, dass Chemokine oder vom Gehirn abgeleitete Liganden die Melanomzellen zum Gehirn locken. Dabei wurde eine hohe Konzentration des CCR4 Chemokinrezeptors mit einer hirsnspezifischen Metastasierung in Verbindung gebracht. Auch ein erhöhter Spiegel von p75^{NTR} und TrkC, beides Rezeptoren für Nervenwachstumsfaktoren (NGF) sowie NT-3 und welche von Astrozyten an der Stroma-Tumor-Grenzfläche sezerniert werden, sollen die Ansiedlung von Melanomzellen im Gehirn fördern (Phadke & Ozgun, 2021).

1.3.2 Melanom-Hirnmetastasen und ihre metabolische Umgebung

Von allen typischen Metastasierungsorganen weisen das Gehirn und das Zentralnervensystem (ZNS) ein einzigartiges Stoffwechsellmilieu auf, welches die Entwicklung des Tumors vorantreiben kann. Ein wesentlicher Faktor des Stoffwechsels im Gehirn ist die Abhängigkeit von einer hohen Glucoseoxidation, welche auf den hohen Energiebedarf der Zellen im ZNS zurückgeht. Im Gehirn herrscht auch ein hoher Fettgehalt, der höchste Fettgehalt aller Organe mit bis zu fast 50% Lipidanteil (Phadke & Ozgun, 2021). Der Fettgehalt des Gehirns besteht primär aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren und unterscheidet sich damit von dem des Fettgewebes. Für die Regulation des Fettstoffwechsels sind im Gehirn in erster Linie die Astrozyten verantwortlich. Neuste Erkenntnisse haben gezeigt, dass Melanomzellen, die ins Gehirn metastasieren, sich die fettreiche Mikroumgebung über den Proliferator-aktivierten Rezeptor Signalweg (PPAR) für ihr Wachstum zu Nutze machen. PPAR sind durch Fettsäuren aktivierte Transkriptionsfaktoren. In MHM kooptieren die Krebszellen die benachbarten Astrozyten, um ihnen Arachidonsäure und Metallsäure zur Verfügung zu stellen, welche wiederum den PPAR γ -Signalweg aktivieren und somit das Wachstum der Krebszellen

fördern. Eine Hemmung dieser Signalübertragung zeigt bei Mäusen ein verlangsamtes Wachstum der MHM. Die Bedeutung des Fettstoffwechsels für die Entstehung von Metastasen im Gehirn zeigt sich auch anhand der erhöhten Expression des fettsäurebindenden-Proteins 7 (FABP7), welches erforderlich ist, um den glykolytischen Phänotyp sowie die Speicherung von Fetttropfchen aufrechtzuerhalten (Phadke & Ozgun, 2021).

Die Umgebung des Gehirns, insbesondere der Liquor und die interstitielle Flüssigkeit ist im Vergleich zum umgebenden Plasma an vielen Nährstoffen verarmt und besitzt nur einen geringen Anteil an Aminosäuren. Die Mikroumgebung des ZNS kann somit als rau bezeichnet werden, an welches sich hirnmetastasierende Krebsarten wie das Melanom erfolgreich anpassen müssen. Brustkrebsstudien zeigten, dass Zellen, die ins Gehirn metastasieren, den Stoffwechsel umprogrammieren, sodass besonders Glykolyse, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung von Bedeutung sind. Auch kommt es zur Hochregulierung des Pentophosphat-Systems und des Glutathion-Stoffwechsels, wodurch ein Schutz vor hohen Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) gebildet wird (Phadke & Ozgun, 2021). Es zeigt sich bei MHM eine Anreicherung der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Diese Abhängigkeit ist von klinischer Bedeutung, da niedermolekulare OXPHOS-Inhibitoren das Überleben von Mäusen mit Melanom-Xenotransplantaten in Untersuchungen verlängerten. Ebenfalls wurde die Umstellung auf OXPHOS mit einer Resistenz gegen BRAF/MEK-Inhibitoren in Verbindung gebracht, was erklären könnte, weshalb Patienten mit MHM bei einer BRAF-MEK-Inhibitor-Therapie trotzdem ein tendenziell kürzeres progressionsfreies Überleben als Patienten mit extrakraniellen Metastasen aufwiesen (Fischer & Jalali, 2019).

1.3.3 Melanom-Hirnmetastasen und ihre Immunumgebung

Das Gehirn und das Rückenmark stehen unter ständiger Immunüberwachung. Der primäre Immunschutz des Gehirns wird über die ansässigen Mikroglia geregelt, die mit Neuronen, Astrozyten und anderen Gliazellen kommunizieren. Mikroglia dienen der Immunabwehr und zählen zu den Gewebemakrophagen. In ihrem inaktiven Zustand exprimieren sie geringe Mengen an HLA-DR, ein Teil des MHC II-Komplexes. Kommt es jedoch zu pathologischen Veränderungen, können die Mikrogliazellen die Expression von MHC II, CD80, CD86, CD40, CD11a, CD54 und CD58 steigern und sind somit in der Lage, T-Zellen-Antigene zu präsentieren. Auch auf Infektionen können Mikrogliazellen reagieren und verhalten sich dabei in einer Makrophagen-ähnlichen Weise, was zur Freisetzung von Zytokinen (TNF- α , IFN- γ) und einer verstärkten Produktion von

Chemokinen führt. Daraufhin werden Immunzellen aus dem Blutkreislauf angelockt und rekrutiert. Andere periphere Immunzellen und meningeale dendritische Zellen untersuchen ebenfalls die Grenzfläche der Blut-Hirn-Schranke, um fremde Antigene zu erkennen. Trotz dieser Fähigkeiten auf infektiöse Ereignisse zu reagieren, befindet sich das Immunsystem des Gehirns meist im Ruhezustand. Diese Immunsuppression erfolgt zum Teil durch CD200, welches auf neuronalen Zellen exprimiert wird und mit dem CD200-Liganden auf den Mikroglia interagiert (Phadke & Ozgun, 2021). Außerdem unterdrückt die elektrische Aktivität von Neuronen die MHC-Expression auf Mikrogliazellen und Astrozyten (Neumann & Misgeld, 1998).

Es gibt Hinweise darauf, dass die im Gehirn ansässigen Immunzellen bei der Infiltration von Tumorzellen eine bestimmte Rolle einnehmen können. Studien bei Brustkrebs ergaben, dass Zellen im Primärtumor die Ansammlung an CD11b⁺Gr1⁺ myeloischen Zellen im ZNS induzieren, welche dann wiederum die entzündlichen Chemokine S100A8 und S100A9 exprimieren. Außerdem werden durch die myeloischen Zellen hohe Mengen des Chemokins CCL9 gebildet, welches, aufgrund eines TGF- β -abhängigen Mechanismus, zu einem verstärkten Wachstum bei Melanom und Brustkrebszellen führen soll. Untersuchungen ergaben weitere Erkenntnisse über die Mikroumgebung, wobei sich zeigte, dass Hirnmetastasen eine geringere T-Zell-Infiltration und Mikrogefäßdichte aufwiesen als extrakranielle Metastasen. Bei der Begrenzung der T-Zell-Infiltration ins Gehirn sollen aktivierte Mikrogliazellen von Bedeutung sein. Um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, verfügen Melanomzellen über mehrere Mechanismen. Diese Mechanismen sorgen wahrscheinlich auch für das geringe Ansprechen von Patienten mit MHM auf eine Immuntherapie. Kommt es zur tumoreigenen β -Catenin-Aktivierung in den Melanomzellen, wird die Akkumulation an dendritischen Zellen verringert und somit die Rekrutierung von T-Zellen unterdrückt. Ob diese Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems auch bei der Metastasierung von Melanomzellen ins Gehirn beteiligt sind, muss noch weiter erforscht werden (Phadke & Ozgun, 2021).

1.3.4 Signalwege der Melanomzellen in der Mikroumgebung des Gehirns

Der Großteil von kutanen Melanomen ist von dem MAPK-Signalweg abhängig. Diese Signalübertragung kann nach dem Erwerb einer aktivierenden Mutation in BRAF (ca. 50%) oder NRAS (ca. 15-20%) sowie dem Verlust von NF1- oder Rezeptortyrosinkinasen (RTK)-Signalen auftreten, und ist entscheidend für das Wachstum, das Überleben und die invasiven Eigenschaften von Melanomzellen.

Analysen des Signalverhaltens mittels *reversed-phase-protein-arrays* (RPPA) zeigten, dass die MHM zudem eine hohe Abhängigkeit vom PI3K/AKT-Signalweg besitzen. 60% der aus dem Gehirn stammenden Hirnproben wiesen eine reduzierte PTEN-Expression (Tumorsuppressor) auf und eine erhöhte PI3K/AKT-Phosphorylierung (Phadke & Ozgun, 2021). RPPAs sind Antikörper-basierte-Mikroarrays, welche Immunoassays an Tausenden von Proben gleichzeitig durchführen. Verwendet werden Gewebe- oder Zelllysate, Serum, Plasma oder andere Körperflüssigkeiten. Sie ergänzen die massenspektrometrische Profilerstellung und sind in der Lage, den relativen Anteil an der gesamten Proteinexpression sowie posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung als Maß für die Proteinaktivität zu quantifizieren (Coarfa & Grimm, 2021). Klinische Befunde in transgenen Mausmodellen bestätigten die Rolle von AKT bei der Hirnmetastasenbildung. Es zeigte sich, dass die Einführung von aktivierten AKT1 mit dem PTEN-Verlust zusammenwirkt und somit die Bildung von Metastasen im Gehirn fördert. Die E17 K AKT1 Mutante, eine der 3 Isoformen von AKT, trieb dabei die Bildung von MHM in Mäusen am effizientesten voran. Der therapeutische Nutzen durch eine gezielte Beeinflussung des PI3K-Signalweges (allein oder in Kombination mit BRAF-Inhibitoren) wurde an Mäusen bestätigt, welche menschliche Melanomzellen in ihr Gehirn xenotransplantiert bekamen (Phadke & Ozgun, 2021). Die Ergebnisse von Niessner et al. sprechen ebenfalls dafür und zeigten in Hirnmetastasen eine erhöhte Expression an aktivierten AKT, wohingegen die extrakraniellen Metastasen des selben Patienten ein schwaches bis negatives Ergebnis aufwiesen. Auch bestätigten ihre Ergebnisse, dass ein niedriges PTEN-Level, welches in MHM vorliegt, mit einer verstärkten Aktivierung von AKT einhergeht (Niessner & Forscher, 2013).

1.4 Therapierungs- und Behandlungsmethoden

Handelt es sich um einzelne Hirnmetastasen, können diese durch eine Resektion entfernt werden, insbesondere, wenn Symptome wie ein erhöhter Hirndruck oder eine drohende Verlegung der Liquorabflusswege vorliegen. Bei einer höheren Anzahl an Metastasen (ca. 3 - 4), mit einer Größe von 0,5 - 4 cm kann alternativ eine Strahlentherapie angewendet werden (Rauschenberg & Tabatabai, 2016).

Seit 2011 wurden neben diesen Behandlungen Fortschritte in anderen neuen Therapieansätzen des metastasierten Melanoms gemacht. Zum einen wurden zielgerichtete Therapien mit Kinaseinhibitor-Kombinationen angewendet. Diese zielten vor allem auf die mutierte RAF-Kinase und die im MAPK-Signalweg nachgeschaltete MEK-Kinase. Zum anderen wurden die Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Immuntherapien

angewendet. Diese richten sich einmal gegen den programmierten Zelltod-1-Rezeptor (PD-1) und das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA-4). Leider sprechen die Hirnmetastasen nicht so gut auf diese Therapien an, weshalb ein besseres Verständnis der molekularen und immunologischen Mechanismen von Nöten ist, um die Therapieresistenz von MHM zu verstehen (Westphal & Wehner, 2021).

1.4.1 BRAF- und MEK-Inhibitoren

BRAF-Mutationen sind die häufigsten Mutationen, die zu einer Überaktivierung des MAPK-Signalwegs führen. BRAF-aktivierende Mutationen findet man in mehr als der Hälfte von kutanen Melanomen, worunter die V600E-Mutation, mit rund 80-90% aller BRAF-Mutationen, die Häufigste ist. Die Zweithäufigste ist die V600K-Mutation, die bei etwa 8% der Melanome vorliegt. Die V600E-Mutation führt zu einer Substitution von Valin durch Glutaminsäure an der Aminosäureposition 600 im BRAF-Protein und erhöht dadurch die BRAF-Kinaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp um das 700-fache (Proietti & Skroza, 2020). Das BRAF-Protein wird durch die Mutation konstitutiv aktiviert und somit die nachgeschaltete MAPK-Signalgebung dysreguliert, was die Zellproliferation fördert, und die Apoptose hemmt. Auch auf die Immun-Mikroumgebung haben BRAF-Mutationen Auswirkungen. BRAF-mutierte Tumore schaffen eine immunsuppressive Umgebung, die die Präsentation von Tumorantigenen durch Antigen-präsentierende Zellen und das anschließende Binden von T-Zellen verhindert. BRAF^{V600E}-Zellen sorgen für eine Beeinträchtigung bei der Reifung von dendritischen Zellen und reduzieren deren Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung. Außerdem können sie der Erkennung durch Effektor-T-Zellen entgehen, beispielsweise durch eine Herunterregulierung der Expression von humanen Leukozyten-Antigen (HLA)-Klasse-I-Molekülen auf der Melanomzelloberfläche (Proietti & Skroza, 2020).

Für die Behandlung von Patienten mit BRAF^{V600}-mutierten fortgeschrittenen Melanomen sind bereits BRAF-Inhibitoren zugelassen. Dabei handelt es sich um Vemurafenib, Dabrafenib und Encorafenib. Die BRAF-Inhibitoren hemmen mutiertes BRAF-Protein und greifen somit in den MAPK-Signalweg ein, der für die Vermehrung und das Überleben von Melanomzellen verantwortlich ist. Studien haben gezeigt, dass Vemurafenib und Dabrafenib eine starke selektive Hemmung der Kinaseaktivitäten erreichen, indem sie die ERK-Phosphorylierung und die Zellproliferation blockieren, sodass ein G1-Zellzyklusstillstand und die Apoptose induziert wird. Vemurafenib inhibiert Zelllinien mit V600E, V600D und V600R Mutationen, und Dabrafenib Zelllinien mit den oben genannten Mutationen sowie einer V600K-Mutation. Zellen, die den BRAF-Wildtyp

oder Nicht-V600-Mutationen exprimieren, zeigen kein Ansprechen auf die Inhibitoren. Auch einige der immunsuppressiven Effekte, die mit der Mikroumgebung des BRAF-mutierten Tumors verbunden sind, können durch die BRAF-Inhibitoren umgekehrt werden. Zum Beispiel sorgen sie für eine Steigerung der Expression von immunstimulierenden Molekülen/Zytokinen und der Verringerung der Expression von immunsuppressiven Molekülen/Zytokinen. Die Infiltration von T-Zellen in die Tumorumgebung kann ebenfalls verstärkt werden. Es kommt auch zu einer verbesserten Erkennung von Melanomzellen durch das Immunsystem, wobei die BRAF-Inhibitoren z.B. die Expression von Melanom-Differenzierungsantigenen wie MART-1 oder auch von HLA-1 auf der Oberfläche von BRAF-mutierten Zellen erhöhen (Proietti & Skroza, 2020). MEK-Inhibitoren stellen eine neue therapeutische Option dar, die das Wachstum von BRAF- und NRAS-mutierten Melanomzellen hemmen und ihren Zelltod hervorrufen können. Dabei zeigte sich in präklinischen Modellen, dass BRAF- und NRAS-mutierte Melanomzellen gegenüber MEK-Inhibitoren eine höhere Empfindlichkeit aufweisen als gegenüber BRAF-Inhibitoren (Grimaldi & Simeone, 2017). In BRAF-Wildtypen wurde sogar bei der Behandlung mit BRAF-Inhibitoren (wie Vemurafenib) eine RAS-abhängige paradoxe Aktivierung des MAPK-Signalwegs festgestellt. Dies kann das Überleben von Nicht-BRAF^{V600}-Zellen begünstigen und sogar zu einer Arzneimittelresistenz führen (Proietti & Skroza, 2020). MEK-Inhibitoren können in Adenosintriphosphat (ATP)-kompetitive oder ATP-nicht-kompetitive Inhibitoren eingeteilt werden. Der erste zugelassene MEK-Inhibitor war Trametinib, später folgte Cobimetinib und Binimetinib (Grimaldi & Simeone, 2017). Die Kombination eines BRAF-Inhibitors mit einem MEK-Inhibitor, welcher die Kinasen, die im MAPK-Signalweg nach BRAF geschaltet sind, hemmt, verhindert die angesprochene paradoxe Reaktivierung des Signalwegs (Proietti & Skroza, 2020). Es wird die klinische Wirksamkeit verbessert und die Toxizität der BRAF-Inhibitor-Monotherapie verringert. Die Zugabe eines MEK-Inhibitors blockiert den „Fluchtweg“ des Tumors vor dem BRAF-Inhibitor und kann somit eine Resistenz verzögern (Grimaldi & Simeone, 2017).

1.4.2 Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Immun-Checkpoint-Inhibitoren haben das dysfunktionale Immunsystem als Ziel und sorgen dafür, dass CD8-positive T-Zellen wieder aktiviert werden, um Krebszellen abzutöten. Insbesondere die Checkpoint-Inhibitoren Anti-CTLA-4- und Anti-PD-1-Antikörper haben die Behandlung vieler Krebsarten, vor allem bei metastasierenden

Melanomen, revolutioniert (Carlini & Larkin, 2021). Sie waren die erste Therapiekategorie, die das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom steigerte.

Ein Inhibitor richtet sich wie erwähnt gegen das CTLA-4 (zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4), welches auf der Oberfläche von aktivierten und regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Während der Initialisierungsphase der Immunantwort hemmt CTLA-4 die T-Zell-Aktivierung. Es bindet an die B7-Liganden CD80 und CD86 auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZs), weist aber im Gegensatz zu seinen Homologen (wie CD28) eine viel höhere Affinität zu dem Liganden auf und liefert kein positives Signal. Die Interaktion zwischen CD28 und B7 wird somit kompetitiv durch CTLA-4 gehemmt und es kommt zur Abschwächung der ko-stimulatorischen Signalübertragung. Außerdem sollen Zellen, die CTLA-4 exprimieren, in der Lage sein, CD80 und CD86 von der APZ-Oberfläche abzufangen und abzubauen. Die durch CTLA-4 vermittelte T-Zellsuppression umfasst neben der Blockierung der Zellzyklusprogression in T-Zellen auch die Hemmung der Interleukin-2-Produktion. CTLA-4 wird im Gegensatz zu CD28 erst nach Aktivierung der T-Zellen exprimiert und ist streng reguliert. Es fungiert somit als T-Zell-hemmender Rückkopplungsmechanismus und spielt eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung der T-Zell-Immunantwort. Ohne die Expression von CTLA-4 entwickelten *Knockout*-Mäuse eine lymphoproliferative Störung, die zum Tod führte. Bei Krebserkrankungen soll CTLA-4 die T-Zell-vermittelte Antitumor-Immunantwort hemmen können, indem es die tumorspezifische T-Zell-Aktivierung abschwächt, bevor die T-Zellen den Tumor zerstören können. Einer der ersten CTLA-4-blockierenden Antikörper ist Ipilimumab, ein humaner monoklonaler Antikörper, der CTLA-4 bindet und somit die Interaktion zwischen ihm und den Liganden verhindert. Diese Blockade soll die T-Zell-vermittelte Antitumor-Immunantwort wieder verbessern.

Ein weiterer etablierter Inhibitor richtet sich gegen PD-1 (programmiertes Zelltod-Protein 1). Wie auch CTLA-4 wird PD-1 von aktivierten T-Zellen exprimiert und hat die Aufgabe die Aktivität von T-Zellen zu hemmen, wenn PD1 mit seinem Liganden (PD-L1) auf der interagierenden Zelle bindet. Es wird angenommen, dass PD-1 T-Zellen in einem späten Stadium im peripheren Gewebe hemmt. Bei Versuchen mit PD-1-defizienten Mäusen entwickelten diese eine Autoimmunität. PD-1 besitzt zwei Liganden, PD-L1 und PD-L2. Dabei wird PD-L1 konstitutiv auf vielen verschiedenen Immunzellen (wie T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen) exprimiert sowie auf nicht-hämatopoetischen Zellen (wie vaskuläre Endothelzellen) und auf Tumorzellen. Die Expression von PD-L1 kann auch durch Zytokine wie IFN- γ hochreguliert werden. PD-L2 wird hingegen auf APZs exprimiert und kann auf Krebszellen induziert werden. Die Hemmung der T-Zell-

Aktivierung funktioniert jedoch nicht über die Beeinträchtigung der CD28 – B7-Liganden-Interaktion, wie es bei CTLA-4 der Fall ist, sondern PD-1 beeinflusst negativ die T-Zell-Rezeptor (TCR)-Signalgebung. Das PD-1 Protein enthält ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes inhibitorisches Motiv (ITIM) sowie ein Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Schaltmotiv (ITSM). Kommt es zur Bindung von PD-1 an seine Liganden, wird die Phosphorylierung seiner ITIM- und ITSM-Domänen ausgelöst. Dies bewirkt die Expression von Phosphatase-1 (SHP-1) und Phosphatase-2 (SHP-2). Anschließend kommt es durch die Phosphatasen zur Dephosphorylierung der Mitglieder des TCR-Signalkomplexes. PD-1 hemmt somit die TCR-induzierte Proliferation und die Zytokinsekretion. Beim Melanom zeigte sich, dass die Expression von PD-L1 im Zusammenhang mit einer verminderten Antitumoraktivität von CD8⁺-T-Zellen steht. Bei Melanompatienten wurden häufig hohe Mengen an PD-1 festgestellt und aktivierte CD8-T-Zellen, die in den Tumor eindringen, wiesen häufig eine Funktionsbeeinträchtigung auf. Aus Ergebnissen zufolge fungiert die PD-1/PD-L1 Expression als eine Art Mechanismus, der dem Tumor die Umgehung des Immunsystems ermöglicht, so dass eindringende T-Zellen ihre eigene Unterdrückung durch die Produktion von Zytokinen induzieren können (Rausch & Hastings, 2017). Abbildung 2 veranschaulicht die Zusammenhänge zwischen APZ und T-Zelle, einmal ohne und einmal mit der Aktivität von CTLA-4 und PD-1, wobei es bei der T-Zelle mit exprimierten CTLA-4 und PD-1 zu der beschriebenen Hemmung der T-Zell-Aktivierung kommt.

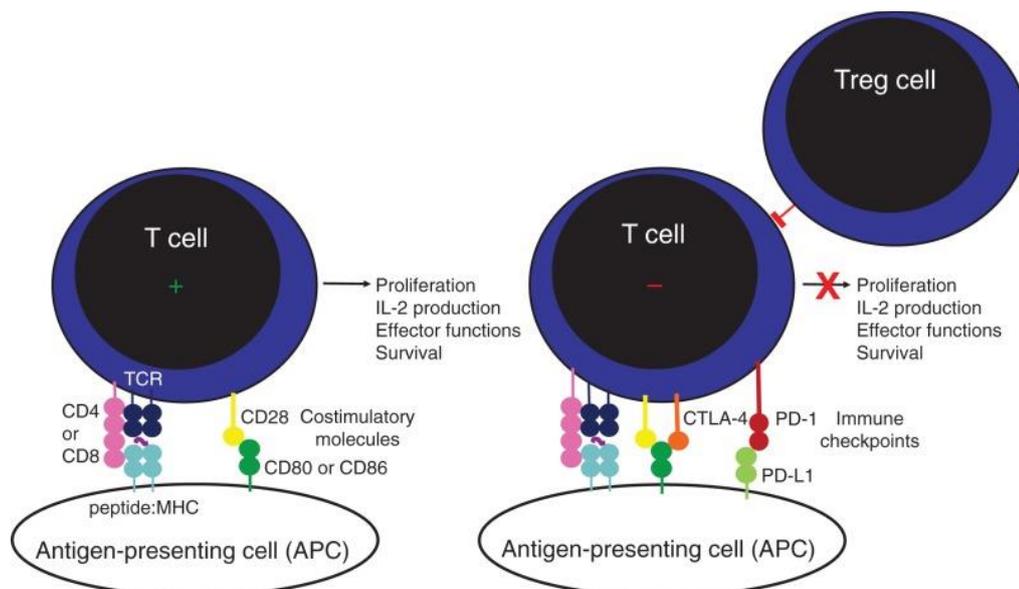


Abbildung 2: Aktivierung und Inaktivierung der T-Zell Aktivität (Rausch & Hastings, 2017)

Die Behandlung mit Anti-PD-1- bzw. Anti-PD-L1-Antikörpern stellt die Funktion erschöpfter T-Zellen wieder her. Ein zugelassenes Medikament, welches auf der PD-1 Blockade beruht, wäre Nivolumab. Nivolumab bindet PD-1 und hindert dessen Interaktion mit seinen Liganden. Dadurch wird der negative Einfluss auf den TCR-Signalkomplex verhindert und die Antitumor-T-Zellaktivität nicht unterdrückt (Rausch & Hastings, 2017).

1.5. Multiplex Färbung

Noch häufig wird in diagnostischen Verfahren der Gewebepathologie die herkömmliche Immunhistochemie (IHC) eingesetzt. Sie erlaubt jedoch nur die Markierung von maximal zwei Markern pro Gewebeschnitt und führt dazu, dass wichtige prognostische und diagnostische Informationen aus Patientenproben nicht gewonnen werden können. Multiplex-Immunhistochemie/Immunfluoreszenz (mIHC/IF)-Technologien hingegen, ermöglichen den Nachweis mehrerer Marker in einem einzigen Gewebeschnitt. In Kombination mit hochmultiplexen Gewebebildgebungstechnologien sind umfassende Untersuchungen der Zellzusammensetzung, des Funktionszustands und der Zell-Zell-Interaktionen durchführbar. Somit erhält man einen umfangreichen Überblick über die Verteilung der Marker und die Gewebezusammensetzung, was bei der Beantwortung wichtiger Fragen zur Pathogenese komplexer Erkrankungen hilfreich sein kann. Besonders in der Zeit der Krebsimmuntherapien gilt die mIHC als wichtiges Tool sowohl in der Forschung als auch bei klinischen Anwendungen (Tan & Nerurkar, 2020). Bei der Vorhersage, ob eine Behandlung mit Anti-PD-1 bzw. -PD-L1 erfolgreich war, konnte mit der mIHC eine bessere Leistung erbracht werden als mit PD-L1 IHC oder Genexpressionsprofilen. Dabei wurden verschiedene Multiplex-Methoden entwickelt und für die Beurteilung von Tumorproben verwendet (Tan & Nerurkar, 2020). Tabelle 1 fasst ausgewählte Methoden kurz zusammen. Nachfolgend wird vor allem das CODEX (*co-detection by indexing*) System von Akoya betrachtet.

Tabelle 1: Zusammenfassung verschiedener Multiplex-Methoden nach (Tan & Nerurkar, 2020)

	Vectra	DISCOVERY ULTRA	MIBI	Codex
Anbieter	Perkin Elmer/Akoya	Roche	IonPath	Akoya
Plexing	9+	5+	40+	40+
Antikörper- Konjugation	auf Fluoreszenzbasis	Fluoreszenzbasis und chromogene Basis	auf Metallbasis	<i>DNA- barcoding- basiert</i>
Auflösung	0,25 µm	Kein Scanner	0,38 µm	260 nm

1.5.1 Funktionsweise CODEX/PhenoCycler

CODEX ist eine Bildgebungstechnologie, die mehrere Parameter betrachtet und von Akoya Biosciences, Inc. vermarktet wird. Im Gegensatz zu herkömmlichen IHC-Methoden verwendet CODEX eine Hochdurchsatztechnologie, wobei mehr als 50 Biomarker gleichzeitig in einer einzigen Gewebeprobe nachgewiesen werden können. Des Weiteren kann CODEX auch Informationen über die relative Häufigkeit und die Expression der Biomarker auf räumlicher Ebene geben. Dafür werden Antikörper verwendet, die mit sogenannten „Barcodes“, einzigartigen Oligonukleotid-sequenzen, konjugiert werden. Anhand dieser Sequenz können komplementäre Sequenzen, welche mit einem farbstoffmarkierten Reporter gekoppelt sind, die konjugierten Antikörper sichtbar machen (Tan & Nerurkar, 2020). Insgesamt durchläuft man dabei immer 3 Arbeitsschritte (Färbung, Bildgebung und Analyse). Zunächst erfolgt die Färbung, wobei das Gewebe mit allen, für die Biomarker selektiven, Antikörpern inkubiert wird. Bei der Bildgebung werden in einem Zyklus jeweils drei verschiedene Reporter eingesetzt, welche dann mit den jeweiligen Barcodes der Antikörper hybridisieren, die komplementär zu ihrer Sequenz sind. Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops kann anschließend ein mikroskopisches Bild des angefärbten Gewebes aufgenommen werden. Danach werden die Reporter entfernt und im nächsten Zyklus neue Reporter mit anderen Barcodes verwendet. Dieser Vorgang wird so lang wiederholt bis alle Biomarker des Gewebes markiert und bildlich aufgenommen wurden (URL-2). Die Zyklen werden von einem vollautomatischen Fluidiksystem durchgeführt, die aufgenommenen Bilder gesammelt, und zum Schluss zusammengefügt, um eine Einzelzellauflösung zu erreichen. Es entstehen Bilder wie sie in Abbildung 3 zu sehen sind.

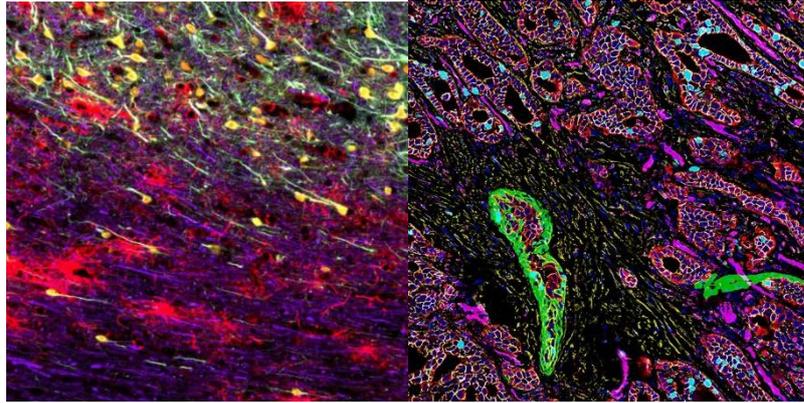


Abbildung 3: links: eingefärbtes Adenokarzinom, rechts: eingefärbtes Hirngewebe bei Alzheimer (URL-2)

Dabei wurde schon eine Kompatibilität des Systems mit Gewebetypen wie Milz, Tonsillen, Lymphknoten und FFPE (Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete)-Melanomen nachgewiesen (Tan & Nerurkar, 2020).

1.5.2 Anwendung bei der Charakterisierung der Mikroumgebung von Melanomen und anderen Tumoren

Immuntherapien und Präzisionsmedizin sind die Zukunft bei der Behandlung von Krebs. Daher spielen Biomarker, die den Tumor und dessen Mikroumgebung erkennen und beschreiben eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von neuen Strategien und neuen Behandlungsmethoden (Patel & Allen, 2022). Die Multiplex-Methoden erleichtern Untersuchungen der Heterogenität der Mikroumgebung innerhalb und zwischen verschiedenen Krebsarten (van Dam & Baars, 2022). Um mehr Informationen über die Unterschiede zwischen intra- und extrakraniellen Metastasen des Melanoms zu erhalten, können diese mittels multiplexer Immunfluoreszenzfärbungen analysiert werden und geben dadurch zum Beispiel Rückschlüsse über die Verteilung der Immunzellen sowie deren Aktivitätszustand (Westphal & Wehner, 2021).

1.5.3 Verschiedene Marker zur Anwendung in Multiplex-Färbungen

Für die Multiplex-Färbungen beziehungsweise auch für die allgemeine Immunhistochemie sind schon eine Vielzahl an Antikörpern, die gegen Biomarker gerichtet sind, etabliert. Besonders bekannte Biomarker sind dabei die sogenannten „Cluster of Differentiation“, kurz CD-Marker. Es handelt sich um Oberflächenmoleküle auf Leukozyten. Durch Reaktion über monoklonale Antikörper können diese gekennzeichnet werden (Cruse & Lewis, 2004). Zum Beispiel gibt es den CD3 Marker, welcher sich auf der Oberfläche von T-Lymphozyten in der Nähe des T-Zellrezeptors

(TCR) befindet. Der CD8 Marker bezieht sich ebenfalls auf T-Lymphozyten, jedoch handelt es sich hierbei um einen Co-Rezeptor des MHC-I-Komplexes auf cytotoxischen T-Killerzellen. T-Lymphozyten erkennen körperfremde Strukturen, wenn diese auf einer körpereigenen Zelle präsentiert werden. Cytotoxische T-Zellen sind bei der Abwehr von Krankheitserregern tätig und töten infizierte Zellen ab. Mithilfe des CD20 Markers können B-Lymphozyten gekennzeichnet werden. B-Zellen entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark und erkennen Erreger und körperfremde Stoffe, bei Aktivierung bilden sie gegen diese Fremdkörper Antikörper. Der CD34 Marker dient zur Markierung von endothelialen Zellen (innerste Zellschicht der Blutgefäße). Für die Sichtbarmachung von Makrophagen in immunhistochemischen Färbungen, welche zu den Leukozyten gehören, kommt vor allem der CD68 Marker zum Einsatz, wobei die Funktion des Markers noch nicht bekannt ist (Janeway & Travers, 2001). Um die Mikroumgebung vollumfassend darstellen zu können sind die CD-Marker aber nicht ausreichend, weshalb noch weitere Marker bei der Multiplex-Analyse zum Einsatz kommen. Um Melanozyten zu kennzeichnen, gibt es zwei verschiedene Marker, das wären MelanA und HMB45. Beide Marker sprechen auch auf melanozytäre Tumoren an (Dass & Huizenga, 2021). Um allgemein Zellen zu charakterisieren, die sich in der Proliferationsphase befinden, wird der Marker Ki67 verwendet. Die Marker PD-1 und PD-L1 spielen bei der Inaktivierung von T-Zellen eine Rolle und sind Ansatzpunkt für Immuntherapien. Connexin43 ist ein Marker für sogenannte Gap Junctions, spezielle interzelluläre Verbindungen, die das Zytoplasma zweier Zellen verbinden und somit einen Stoff- und Ionentransport ermöglichen. Handelt es sich um Gewebe aus dem Gehirn z.B. bei Hirnmetastasen, können weitere Marker verwendet werden, um die speziellen Zellen des Gehirns anzufärben. Mit TMEM119 können die Mikroglia gekennzeichnet werden, die Immunzellen des Gehirns. Für die Färbung von Astrozyten kann GFAP verwendet werden und NeuN dient als Marker für Neuronen (Lyck & Dalmau, 2008). Besonders von Interesse sind auch Marker für bestimmte Signalwege. Dabei ist aufgrund der BRAF- und NRAS-Mutationen in Melanomen oft der MAPK-Signalweg hochreguliert, welcher die Zellproliferation fördert. Mitwirkende Proteine, die als Marker dienen können, sind hierbei zum Beispiel EGFR (Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor EGF) oder auch ERK (Zhang & Liu, 2002). Ein weiterer Signalweg, welcher in entarteten Melanozyten oft überexprimiert wird, ist der PI3K/AKT-Signalweg. Dieser liefert anti-apoptotische Signale, wobei neben EGFR ein weiteres mitwirkendes Protein AKT (Protein Kinase B) wäre (Hemmings & Restuccia, 2012). Auch IGF1R ist oft in Melanomen überexprimiert und wirkt ebenfalls in beiden genannten Signalwegen mit.

Vor allem die phosphorylierte Variante dieser Proteine kann Aufschluss darüber geben, wie aktiv ein Signalweg in einem Gewebe bzw. in den Zellen ist. Das Feld der Multiplex-Analysen besitzt somit viel Potenzial zur Erforschung der Mikroumgebung von Melanommetastasen. Vergleiche zwischen intra- und extrakraniellen Metastasen dieser Analysen können zu einem besseren Verständnis der Therapieresistenzen von Hirnmetastasen führen sowie Erkenntnisse für neue Therapieansätze hervorbringen.

2 Zielstellung

Ziel ist die Optimierung einer Multiplex Färbung für die verschiedenen Metastasen des Melanoms. Dabei wird mit dem CODEX System gearbeitet. Es sollen neben den schon etablierten Markern vor allem neue Marker etabliert und getestet werden. Besonders phosphorylierte Proteine sind dabei von Interesse, da diese die Aktivierung eines bestimmten Signalweges widerspiegeln können. Im Vordergrund steht die Etablierung der Antikörper gegen IGFR, EGFR, ERK und AKT sowie deren Phosphoformen. Aus diesem Grund wurden zunächst Zelllinien ausgewählt, welche sich für Positiv- und Negativkontrollen eignen würden. Aus diesen Zelllinien wurden mehrere Zellblöcke hergestellt und mit Hilfe von Western Blots überprüft. Anhand von manuellen immunhistochemischen Färbungen sollten die Antikörper zunächst für ihre Nutzbarkeit im CODEX System, welches auf Fluoreszenz basiert, getestet werden. War dies erfolgreich, sollte die Konjugation des Antikörpers als letzter Schritt vor dem Einsatz im CODEX System erfolgen.

3 Material

Im folgenden Kapitel wird das erforderliche Equipment für die Versuche aufgelistet.

3.1 Chemikalien

Tabelle 2: Lösungen

Chemikalie	Zusammensetzung
1x Laufpuffer	1x Tris/Glycine 0,1% SDS
5x Tris/Glycine	125 mM Tris 960 mM Glycine
1x <i>wash</i> TBS-T	1x TBS 0,05% Tween-20
10x TBS	0,2 M Tris 5 M NaCl
10% SDS	100 g SDS pellets 1 l Wasser
2x Lämmli Puffer	125 mM Tris\HCl, pH 6,8 4% SDS 10% Glycerol 0,02% Bromphenolblau 5% β -Mercaptoethanol
Blockierungslösung	5% Milchpulver in TBS-T
Primärantikörper Lösung	Antikörper 1:1000 5% BSA/TBS-T
Sekundärantikörper Lösung	Antikörper 1:3000 5% Milchpulver in TBS-T
<i>Destain Solution</i>	50 ml Essigsäure 150 ml Ethanol 300 ml ddH ₂ O
1x TBS/0,025% Tween	1x TBS 0,025% Tween20
TCEP Lösung	1x DPBS 0,5 M EDTA (pH 8,0) <i>Bond-Breaker</i> TCEP (pH 7,0)

<i>Bleaching Solution</i>	24,5 ml 1x PBS 360 µl 35% H ₂ O ₂ 125 µl 1 M NaOH
S1 Lösung	5 ml 500 mM EDTA (pH 8,0) 50 ml 10x DPBS 2,5 g BSA 445 ml ddH ₂ O
S2 Lösung	250 ml S1 Lösung 30,5 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ 19,5 ml 1 M NaH ₂ PO ₄ 25 ml 5 M NaCl 175 ml ddH ₂ O pH 6,8 – 7,0 mit NaOH
S4 Lösung	50 ml 5 M NaCl 450 ml S1 Lösung
B1	10 mg IgG aus Mausserum in 10 ml S2 Lösung
B2	10 mg IgG aus Rattenserum in 10 ml S2 Lösung
B3	10 mg/ml Sheared Salmon Sperm DNA in ddH ₂ O
BC4 (Mix aller Reporter Oligonukleotide ohne Fluorophor Reporter)	1 µl 5 mM BC4 in 100 µl TE Puffer
CODEX Blockierungslösung	312 µl S2 Lösung 20 µl B1 20 µl B2 20 µl B3 28 µl BC4
H2 Puffer	30 ml 5 M NaCl 10 ml 1 M Tris (pH 7.5) 943 µl TritonX-100 2,03 g MgCl ₂ *6H ₂ O 960 ml ddH ₂ O
PFA Fixierungslösung	0,5 ml 16% PFA (Paraformaldehyd) 4,5 ml S4 Lösung

Finale Fixierungslösung	10 µl BS3 500 µl 1x DPBS
<i>Plate Buffer</i>	Für 40 Zyklen: 10 ml H2 Puffer 0,5 ml B3 16,7 µl Hoechst3342 (20 mM)

3.2 Medien

Tabelle 3: Verwendete Medien

Medium	Hersteller	Artikelnummer
DermaLifeK	Lifeline cell technologies (Sitz: Frederick, USA)	LL-0007
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific, Gibco (Sitz: Waltham, USA)	31985047
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Gibco	61870-010

3.3 Molekularbiologische Reagenzien

Tabelle 4: Molekularbiologische Reagenzien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
0,1% Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (Sitz: St. Louis, USA)	P8920
Accutase	Fisher Scientific (Sitz: Schwerte, Deutschland)	15323609
AR9 Buffer (10x)	PerkinElmer (Sitz: Waltham, USA)	AR900250ML
Antibody Diluent with Background Reducing Components - DAKO	DAKO (Sitz: Carpinteria, USA)	S3022
Antibody Stabilizer	Candor Bioscience GmbH (Sitz: Wangen, Deutschland)	131 050
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M3148
Bond-Breaker Solution, Neutral pH	TCEP Thermo Fisher Scientific	77720

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	B0126
Bovine Serum Albumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH (Sitz: Heidelberg, Deutschland)	11930
Buparlisib	Selleckchem (Sitz: Köln, Deutschland)	S2247
CODEX® Conjugation Kit	AKOYA Biosciences (Sitz: Marlborough, USA)	232194
Erbitux (Cetuximab)	Merck KGaA (Sitz: Darmstadt, Deutschland)	EMEA/H/C/000558
Essigsäure	Merck KGaA	33209
DharmaFECT™	Horizon Discovery (Sitz: Waterbeach, United Kingdom)	T-2001
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Sitz: Karlsruhe, Deutschland)	P030
DMSO	Sigma-Aldrich	472301
DPBS	Thermo Fisher Scientific, Gibco	14190094
EDTA	Merck KGaA	108417
EGF	R&D Systems (Sitz: Minneapolis, USA)	236-EG
Ethanol 99,8%, vergällt	VWR International (Sitz: Radnor, USA)	20821.310
FBS (Fetal Bovine Serum)	Thermo Fisher Scientific, Gibco	10270106
Formaldehyd 4%	SAV Liquid Production GmbH (Sitz: Flintsbach a. Inn, Deutschland)	FN-5000-4-1
Glycerol 99,5% bidestilled	VWR International (Sitz: Radnor, USA)	24388.295
Glycine	PanReac Appllichem GmbH (Sitz: Darmstadt, Deutschland)	131340
HBSS	Thermo Fisher Scientific, Gibco	14175
HIER T-EDTA Buffer pH 9,0 (10 X)	ZYTOMED Systems (Sitz: Berlin, Deutschland)	ZUC029-500

HistoGel	Thermo Fisher Scientific	HG-4000-012
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific	62249
IGF	R&D Systems	291-G1
IgG aus Mausserum	Sigma-Aldrich	I5381
IgG aus Rattenserum	Sigma-Aldrich	I4131
INTERFERin	Polyplus (Sitz: Illkirch-Graffenstaden, Frankreich)	409-01
Lipofectamine RNAiMax	Life Technologies (Sitz: Carlsbad, USA)	13778-075
Methanol	VWR International	20847.307
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3957
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG	K300
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG	6771.3
<i>Nonfat dried milk powder</i>	PanReac Applichem GmbH	A0830
NVPAEW541	Cayman Chemical (Sitz: Ann Arbor, USA)	13641
Mounting solution (für Fluoreszenz) NucBlue™	Invitrogen (Sitz: Waltham, USA)	REF P36983
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	MAN0011772
Paraformaldehyd 16%	Electron Microscopy Sciences (Sitz: Hatfield, USA)	15710
Roticlear	Carl Roth GmbH + Co. KG	A538.5
Rotiphorese® Blau R	Carl Roth GmbH + Co. KG	3074.1
Salzsäure (HCl)	Klinik-Apotheke	
SDS-Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG	CN30
Sheared Salmon Sperm DNA	Invitrogen	AM9680
siRNA IGFR	Life Technologies	S7211
siRNA Non-targeting Pool (scramble)	Dharmacon (Sitz: Lafayette, USA)	D-001810-10-20

Super Signal West Pico PLUS	Thermo Fisher Scientific	#34080
Super Signal West Dura Extended	Thermo Fisher Scientific	#34075
Trametinib	Selleckchem	S3673
TRIS Base	Sigma-Aldrich	T1503
TritonX-100	Carl Roth GmbH + Co. KG	3051
Trypan Blue Solution (0,4%)	Thermo Fisher Scientific, Gibco	15250061
Trypsin-EDTA (0,5%)	Thermo Fisher Scientific, Gibco	15400-054
Tween20	SERVA Electrophoresis GmbH	370470.01
VECTABOND® Reagent	Vector Laboratories Inc. (Sitz: Newark, USA)	SP-1800-7
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 35%	Klinik-Apotheke	

3.4 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Artikelnummer
Cover Slips	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH	K12460
Microscope Slides	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH (Sitz: Edermünde, Deutschland)	11270
Mini-Protean-TGX-Precast Gels 4-20%	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Sitz: Hercules, USA)	#456095
Trans-Blot Turbo, 0.2 µm Nitrocellulose	Bio-Rad Laboratories, Inc.	1704159

3.5 Laborgeräte

Tabelle 6: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
-20 °C Gefrierschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH (Sitz: Biberach an der Riß, Deutschland)
4 °C Kühlschrank	Liebherr-International Deutschland GmbH

ChemiDoc™ MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
CODEX® (CO-Detection by indexing)	AKOYA Biosciences (Sitz: Kalifornien, USA)
Dampfgarer	BRAUN Kornberg (Sitz: Taunus, Deutschland)
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare (Sitz: Chicago, USA)
Heizblock	VWR International (Sitz: Delaware Valley, USA)
Keyence Mikroskop BZ-X800E	Keyence Corporation (Sitz: Neu-Insenburg, Deutschland)
Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
PapPen	Sigma Aldrich
Pipetboy	INTEGRA (Sitz: Biebertal, Deutschland)
Pipet-Lite XLS	RAININ (Sitz: Gießen, Deutschland)
PowerPacBasic	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Trans-Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
WMF Lono Multifunktionskocher	WMF (Sitz: Geislingen an der Steige, Deutschland)

3.6 Antikörper

Tabelle 7: Primärantikörper

Antikörper	Firma	Artikelnummer	Quelle	Methode und Verdünnung
CD3	DAKO	A0452	rabbit	CODEX (1:100)
CD8	Thermo Fisher Scientific	14-0085-82	mouse	CODEX (1:100)
CD20	Thermo Fisher Scientific	14-0202-82	mouse	CODEX (1:100)
CD34	Novus Biologicals (Sitz: Wiesbaden, Deutschland)	NBP1-34713	mouse	CODEX (1:100)
CD68	Biologend (Sitz: San Diego, USA)	375602	mouse	CODEX (1:100)
Connexin43	Biologend	849602	mouse	CODEX (1:50)

GranzymB	Novus Biologicals	NBP2-59678	rabbit	CODEX (1:100)
GRB10	Thermo Fisher Scientific	PA5-32239	rabbit	CODEX (1:50)
HMB-45	Biologend	911504	mouse	CODEX (1:100)
Ki67	BD Bioscience (Sitz: Haryana, Indien)	556003	mouse	CODEX (1:100)
MelanA	Novus Biologicals	NBP2-33148	mouse	CODEX (1:100)
PAK1	Sigma Aldrich	HPA003565	rabbit	CODEX (1:50)
PD1	Biologend	367402	mouse	CODEX (1:100)
PD-L1	Biologend	329702	mouse	CODEX (1:100)
p-IGF1R	Cell Signaling Technology (Sitz: Danvers, USA)	#3918	rabbit	IHC (1:50)
p-IGF1R	Cell Signaling Technology	#3021	rabbit	WB (1:1000) IHC (1:50)
p-IGF1R	R&D Systems (Sitz: Minneapolis, USA)	AF2507	rabbit	IHC (1:20)
IGF1R	Cell Signaling Technology	#3027	rabbit	WB (1:1000)
IGF1R	R&D Systems	MAB391	mouse	IHC (1:50)
p-EGFR	Cell Signaling Technology	#3777	rabbit	WB (1:1000) IHC (1:50)
p-EGFR	R&D Systems	MAB3570	mouse	IHC (1:50)
EGFR	Cell Signaling Technology	#4267	rabbit	WB (1:1000)
p-AKT	Cell Signaling Technology	#4060	rabbit	WB (1:1000) IHC (1:20)
p-AKT	R&D Systems	AF887	rabbit	IHC (1:20) CODEX (1:50)
AKT	Cell Signaling Technology	#4691	rabbit	WB (1:1000) IHC (1:100)
AKT	R&D Systems	MAB2055	mouse	IHC (1:100) CODEX (1:50)
p-ERK	Cell Signaling Technology	#4376	rabbit	WB (1:1000)
p-ERK	BioLegend	675502	mouse	IHC (1:100)
p-ERK	R&D Systems	AF1018	rabbit	IHC (1:20) CODEX (1:50)
ERK	Cell Signaling Technology	#9102	rabbit	WB (1:1000)
ERK	R&D Systems	MAB1576	mouse	CODEX (1:50)
GAPDH	Cell Signaling Technology	#2118	rabbit	WB (1:1000)

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Artikel- nummer	Quelle	Isotyp	Methode und Verdünnung
α -MausAF488	Invitrogen	A21124	Goat	IgG γ 1	IHC (1:200)
α -KaninchenAF647	Invitrogen	A21244	Goat	IgG	IHC (1:200)
α -ZiegeAF488	Invitrogen	A11055	Donkey	IgG	IHC (1:200)
α -Kaninchen	Amersham Biosciences (Sitz: Amersham, Großbritannien)	NA 934	Donkey	IgG	WB (1:3000)

4 Methoden

Der folgende Abschnitt befasst sich mit den durchgeführten Versuchen und deren Anleitungen.

4.1 Zellkultur

Für die nachfolgenden Versuche wurden Zellen der DDPoro26 Zelllinie, sowie DDPoro65 Zellen verwendet, welche aus einem Porokarzinom stammen. Für einige Experimente wurden zudem die Brustkrebszelllinie MCF7 und die Zelllinie M10 aus einer Melanom-Hirnetastase verwendet. Die Zellen wuchsen in DLK-Medium (DDPoro26 und DDPoro65), beziehungsweise in RPMI-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (MCF7, M10) und wurden bei 37 °C bei 5% CO₂ inkubiert.

4.1.1 Splitten

Bei ca. 80% Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit HBSS (DDPoro26, DDPoro65, M10) oder DPBS (MCF7) gewaschen. Für das Ablösen von DDPoro Zellen wurde Accutase verwendet, wobei die Zellen für maximal 30 min bei 37 °C inkubiert werden. Für die M10 und MCF7 Zellen hingegen wurde Trypsin in HBSS/DPBS zum Ablösen benutzt, wobei die Inkubationszeit zwischen 3 – 6 min variierte. Nachdem die Zellen sich gelöst haben, wurde mit Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurde für 3 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine T75 beziehungsweise T175 transferiert und weiteres frisches Medium hinzugefügt, sodass die T75 insgesamt 12 ml Medium und die T175 insgesamt 25 ml Medium enthielt.

4.1.2 Aussäen der Zellen

Um die Zellen für eine Behandlung vorzubereiten wurde ein Teil von Ihnen ausgesät. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde anschließend wieder entfernt und 2 ml Accutase/Trypsin zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37 °C. Danach wurde durch Zugabe von 8 ml DLK-/RPMI-Medium die Enzym-Aktivität gestoppt und die Lösung mit den Zellen wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 300 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde daraufhin mit 4 ml PBS resuspendiert. Für die Zählung wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypan Blau vermischt. Es wurden ca. 2×10^5 Zellen (Anzahl der Zellen kann von Versuch zu Versuch variieren, $1,5 \times 10^5$

Zellen oder $2,5 \times 10^5$ Zellen möglich) pro Well in 2 ml DLK-/RPMI-Medium ausgesät. Die restlichen Zellen der Suspension wurden auf eine T75/T175 Flasche gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden zum Schluss bei 37 °C für 24 h inkubiert.

4.1.3 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Für die Behandlung der DDPoro26/DDPoro65 Zellen mit den Inhibitoren wurde das Medium im ersten Well abgesaugt und 2 ml neues Medium mit 20 µl Cetuximab (5 mg/ml), 2 µl Trametinib (1 mM) und 1 µl NVP-AEW541 (10 mM) zugegeben. Zur Kontrolle wurde beim zweiten Well ebenfalls das Medium gewechselt und zu den 2 ml Medium wurden 3 µl DMSO hinzugefügt. Danach wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte wieder ein Mediumwechsel in beiden Wells. Beiden Gruppen wurden 2 ml Medium, versetzt mit 2 µl EGF (100 µg/ml) und 1 µl IGF (100 µg/ml), hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Behandlung der M10 und MCF7 Zelllinien wurden die Inhibitoren Trametinib (1 mM), Buparlisib (5 mM), sowie Alpelisib (30 mM) verwendet. Dabei wurde das Medium zunächst abgesaugt und durch 1 ml RPMI-Medium mit 1 µl Trametinib bzw. 1 µl Alpelisib oder 2 µl Buparlisib ersetzt. Als Kontrolle wurde bei 2 Wells ebenfalls das Medium gewechselt und zu 1 ml Medium wurden 2 µl DMSO hinzugefügt. Die Inkubationszeit variierte je Inhibitor und Experiment zwischen 2, 4 und 24 h.

4.1.4 Transfektion der Zellen mit siRNA

Anstatt Zellen mit Inhibitoren zu behandeln, können Zellen auch mit siRNA transfiziert werden. Die eingeschleuste siRNA bindet dabei komplementär an die Zielsequenz und sorgt somit für deren Abbau und einem Knock-Down des darin codierten Proteins. Dafür wurden zunächst $2,5 \times 10^5$ Zellen der MCF7 Zelllinie in jedes Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Für das Einschleusen der siRNA in die Zellen wurden verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet, darunter DharmaFECT 1, Lipofectamine RNAiMAX und INTERFERin. Bei der Verwendung von DharmaFECT 1 wurden zunächst drei 1,5 ml Röhrrchen vorbereitet. In das Erste wurden 190 µl serumfreies RPMI-Medium plus 10 µl siSCR gegeben. In das Zweite wurden ebenfalls 190 µl serumfreies RPMI-Medium hinzugefügt sowie 10 µl siIGF1R. Das dritte Röhrrchen enthielt 390 µl serumfreies RPMI-Medium und 10 µl DharmaFECT 1. Alle Röhrrchen wurden gevortext und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden jeweils 200 µl aus dem 3. Röhrrchen zu den Röhrrchen 1 und 2 hinzugegeben und nochmals für 20 min bei RT inkubiert. Aus jedem Well wurde das Medium abgesaugt und 800 µl frisches RPMI-Medium mit 10% FBS vorgelegt. In je zwei Wells wurde dann 200 µl aus Röhrrchen 1 und in zwei andere

Wells 200 μ l aus Röhrchen 2 tropfend hinzu pipettiert und durch Schwenken kurz vermischt. Bei der Behandlung mit Lipofectamine wurden 2 Röhrchen mit 190 μ l Opti-MEM vorbereitet, in welche 10 μ l siIGF1R bzw. 10 μ l siSCR hinzugefügt wurde. Außerdem wurden in einem 3. Röhrchen 382 μ l Opti-MEM mit 18 μ l Lipofectamine RNAiMAX vermischt. Danach wurden direkt je 200 μ l dieser Lösung zu den Röhrchen 1 und 2 hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Das Medium in den Wells wurde verworfen und 1,6 ml frisches RPMI-Medium vorgelegt und 400 μ l der Transfektionslösung tropfend hinzu pipettiert. Auch bei Verwendung von INTERFERin wurden zunächst 2 Röhrchen vorbereitet. Jedes Röhrchen enthielt 190 μ l serumfreies RPMI-Medium sowie 10 μ l siIGF1R bzw. 10 μ l siSCR. Beiden Röhrchen wurden direkt 10 μ l INTERFERin hinzugegeben, die Lösungen gevortext und herunterzentrifugiert. Pro Well wurde das alte Medium gegen 1,8 ml frisches Medium ausgetauscht und 200 μ l Transfektionslösung tropfend hinzu pipettiert. Nach allen Transfektionen erfolgte eine Inkubation bei 37 $^{\circ}$ C für 48 h.

4.1.5 Zellblockherstellung

Für die Zellblockherstellung wurden die behandelten Zellen geerntet, dabei wurde nach der Inkubation das Medium verworfen, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und das PBS wieder abgesaugt. Für das Ablösen der DDPoro26/DDPoro65 Zellen wurde 1 ml der „*detach solution*“ hinzugegeben, bestehend aus 500 μ l Accutase, 500 μ l EDTA (10 mM), 1 μ l EGF und 0,5 μ l IGF. Die Zellen plus Lösung wurden bei 37 $^{\circ}$ C für ca. 20 min inkubiert. Um die M10 und MCF7 Zellen von ihrer Oberfläche zu lösen, wurden 500 μ l Accutase hinzugegeben und bei 37 $^{\circ}$ C zwischen 2 - 6 min inkubiert. Daraufhin folgte das Resuspendieren der Zellsuspensionen mit 2 ml Medium und die Lösung wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 3 min bei 4 $^{\circ}$ C und 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, sodass nur das Pellet übrigblieb. Währenddessen wurde für den Zellblock das benötigte Histogel auf 70 $^{\circ}$ C für 20 min erhitzt, sodass es flüssig wurde. Nachdem die Zellen pelletiert waren, wurden sie mit 20 μ l Restflüssigkeit durch Pipettieren resuspendiert und daraufhin 300 μ l des vorgewärmten Histogels hinzugegeben. Die Mischung wurde zehnmal rauf und runter pipettiert, bevor dann für 5 min bei 300 g und 4 $^{\circ}$ C zentrifugiert wurde. Danach wurden 4 ml 4%-iges Formalin dazugegeben und bei Raumtemperatur für mindestens 30 min inkubiert. Bevor die Zellblöcke für Experimente verwendet wurden, wurde der Zellblock aus dem 15 ml Röhrchen mithilfe einer Nadel herausgeholt und halbiert. Anschließend kamen 1 - 2 Tropfen Hämatoxylin hinzu, um die Zellblöcke zu färben. Die Blöcke wurden für 24 h in

4%-igem Formalin gelagert und das Formalin bis zur Bearbeitung in der Pathologie durch PBS ausgetauscht, wo die Blöcke entwässert und eingekapselt werden.

4.2 Western Blot

4.2.1 Proteinisolation

Vor Beginn der Proteinisolation mittels 2x Lämmli-Puffer, musste dieser unter dem Abzug auf 95 °C vorerhitzt werden. Währenddessen wurden die behandelten Zellen geerntet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und das PBS wieder entfernt. Anschließend wurde den DDPor26/DDPor65 Zellen 1 ml der „*detach solution*“, bestehend aus 500 µl Accutase, 500 µl 10 mM EDTA und 0,5 µl IGF, hinzugegeben, die die Zellen von ihrer Oberfläche ablösen sollen. Dazu wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Für das Ablösen der M10 und MCF7 Zellen wurden 500 µl Accutase hinzugegeben und zwischen 2 – 6 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension durch Zugabe von 2 ml Medium resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Es wurde für 3 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand wieder abgesaugt. Für die folgende Proteinextraktion mit dem Lämmli-Puffer wurde unter dem Abzug gearbeitet. Zu dem Zellpellet wurden nun 80 µl des vorgewärmten 2x Lämmli-Puffers gegeben und durch hoch und runter pipettieren resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 1,5 ml Röhrchen transferiert und bei 95 °C für 10 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde durch Vortexen die Suspension nochmal durchmischt und schließlich bei -20 °C eingefroren.

4.2.2 SDS-PAGE

Für die Western Blots aller Versuche wurden die MiniProtean TGX Gele (4-20%) verwendet. Diese wurden der Verpackung entnommen und anschließend das grüne Tape an der Unterseite sowie der Kamm an der Oberseite entfernt. Das Gel wurde in die dafür vorgesehene Vorrichtung eingespannt und in der Gel Box platziert. Der Behälter wird bis zur entsprechenden Markierung (2 oder 4 Gele) mit Laufpuffer befüllt. Danach wurden die Taschen zunächst mit Laufpuffer gespült und daraufhin mit 4 µl Protein Leiter und mit ca. 15 - 25 µl der einzelnen Proben befüllt. Nach Schließen des Deckels und Anschluss an den PowerPac HC wurde die Spannung für 80 min auf 120 V gesetzt.

4.2.3 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde die Gelkammer entfernt und aufgebrochen, sodass das Gel auf einer Seite haften blieb. Bevorzugt wird dabei die Seite, wo die einzelnen

Taschen nummeriert sind. Für den Western Blot wurde dann das TransBlot Turbo System verwendet. Dafür wurde die Membran auf dem Anodenstack in der Kassette platziert und das Gel vorsichtig auf die Membran gelegt. Mit Hilfe eines Rollers wurden restliche Luftblasen zwischen Gel und Membran entfernt und der Kathodenstack von oben platziert. Die Kassette wurde geschlossen und verriegelt und anschließend wurde das System nach dem vorgesehenen Protokoll gestartet. Nach 3 min ist der Blot-Vorgang beendet und die Membran kann zum Beispiel für Immunoblots verwendet werden. Dabei sollte der Proteinmarker auf der Membran zu sehen sein.

4.2.4 Immunoblot

Für den Immunoblot wird die Membran zunächst mit einer geeigneten Blockierungslösung blockiert. Dabei wurde entweder eine 5%-ige Milchpulver/TBS-T Lösung oder eine 5%-ige BSA/TBS-T Lösung verwendet. Während der Inkubationszeit befand sich die Membran in der Blockierungslösung auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Nach dem Blockvorgang wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend für die spezifischen Antikörper in die benötigten Abschnitte mithilfe eines Skalpells und einem Lineal zerschnitten. Es folgte die Inkubation des primären Antikörpers. Die primären Antikörper wurden dabei meist in einem Verhältnis von 1:1000 mit 5%-iger BSA/TBS-T Lösung verdünnt (siehe Tabelle 7). Inkubiert wurde hierbei über Nacht bei 4 °C. Vor der Inkubation der sekundären Antikörper, wurde die Membran wieder dreimal für 5 min in TBS-T gewaschen. Die sekundären Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:3000 mit 5%-iger Milchpulver/TBS-T Lösung verdünnt (siehe Tabelle 8). Die Inkubationszeit für die sekundären Antikörper betrug 1 h bei Raumtemperatur. Nach Inkubation wurde auch hier die Membran wieder mit TBS-T gewaschen, diesmal fünfmal für 5 min. Daraufhin folgte die Detektion. Dafür wurde zunächst mit SuperSignal West Pico (detektiert 1 pg Protein) gearbeitet und bei geringer Sichtbarkeit der Banden anschließend Dura Extended Duration (detektiert 250 fg Protein) verwendet. Für eine vereinfachte Verteilung der Lösung auf der Membran wurde diese auf eine Klarsichtfolie gelegt. Die Lösung wurde hinzugegeben und eine zweite Klarsichtfolie auf die Membran gelegt. Mit einem Tuch wurden Luftblasen und Restflüssigkeit entfernt und mithilfe des GE Healthcare LAS detektiert. Die Belichtungszeit variierte von Protein zu Protein. Die Detektion wurde beendet, sobald das Bild überbelichtet war (erkennbar an einer Rotfärbung der Banden).

4.3 Manuelle Immunhistochemische Färbung

Zunächst wurden für die Färbungen verschiedener Zellblöcke (z.B. DDPoro26) sowie Gewebe im Institut für Pathologie mit einem Mikrotom in 2 µm dünne Paraffinschnitte geschnitten und auf einen Objektträger übertragen.

4.3.1 Die Deparaffinierung und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe

Die Schnitte wurden anschließend bei 70 °C für 25 Minuten inkubiert. Anschließend folgte die Deparaffinierung und Rehydrierung in RotiClear, Alkohol und ddH₂O. Dieser Ablauf ist in der Tabelle 9 veranschaulicht.

Tabelle 9: Ablauf der Deparaffinierung und Rehydrierung mit den entsprechenden Inkubationszeiten (IZ)

	Chemikalie	IZ
1.	RotiClear Reagent	10 min
2.	RotiClear Reagent	10 min
3.	100% EtOH	5 min
4.	100% EtOH	5 min
5.	90% EtOH	5min
6.	70% EtOH	5 min
7.	50% EtOH	5 min
8.	ddH ₂ O	5 min
9.	ddH ₂ O	5 min

Mit Hilfe des RotiClears wurde das restliche Paraffin von den Gewebeschnitten entfernt und in der absteigenden Alkoholreihe wurde das Gewebe rehydriert. Während die Schnitte in der Alkoholreihe inkubierten, wurde der „Antigen-retrieval Buffer“ mit ddH₂O 1:10 verdünnt und anschließend auf ca. 100 °C in einem Dampfgarer erhitzt. Nachdem die Schnitte den letzten Schritt der Alkoholreihe abgeschlossen haben, wurden die Schnitte in den heißen „Antigen-retrieval Buffer“ gegeben und für 20 Minuten gekocht. Der „Buffer“ hat die Aufgabe, das Gewebe oder die Zellen für die primären Antikörper zugänglicher zu machen, indem er die Zellmembran permeabilisiert. Nach dem Kochen im „Antigen-retrieval Buffer“ wurden die Schnitte bei RT für zehn Minuten abgekühlt und mit ddH₂O und TBS jeweils für zwei Minuten gewaschen. Zum Schluss wurde mit einem PapPen das Gewebe auf dem Objektträger umkreist. Der PapPen dient als „Liquid

blocker“ und soll verhindern, dass die Antikörperlösungen vom Gewebe und dem Objektträger herunterlaufen.

4.3.2 Die Zugabe des primären Antikörpers

Nachdem das Gewebe für die Antikörper vorbereitet wurde, folgte nun die Inkubation der spezifischen primären Antikörper. Vor der Zugabe der Antikörper wurden die Schnitte nochmals in TBS/0.025%Tween für zwei Minuten gewaschen. Währenddessen wurden die primären Antikörperlösungen mit Zugabe des Antikörper- „*Diluent*“ in verschiedenen Verdünnungen hergestellt. Anschließend wurden 200 µl der Antikörperlösung auf das Gewebe pipettiert und entweder für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert.

4.3.3 Die Zugabe des sekundären Antikörpers

Nach Beendigung der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Schnitte wieder in TBS/0.025%Tween für zwei Minuten gewaschen. Auch für die sekundären Antikörper wurden diese mit dem Antikörper- „*Diluent*“ im Verhältnis 1:200 verdünnt. Anschließend wurden wieder 200 µl der sekundären Antikörperlösung auf das Gewebe pipettiert und für 30 bzw. 60 Minuten bei Raumtemperatur in einer dunklen Feuchtkammer inkubiert. Der sekundäre Antikörper trägt ein spezifisches Fluorophor und bindet an den primären Antikörper, sodass bei Anregung einer bestimmten Wellenlänge eine Fluoreszenz entstehen kann. Würde die Inkubation nicht in Dunkelheit stattfinden käme es zum Verblässen des Fluorophors.

4.3.4 Das Eindecken mit „*Mounting-Solution*“ NucBlue

Die Schnitte wurden nach Ende der Inkubationszeit wieder mit TBS/0.025%Tween zweimal für zwei Minuten gewaschen. Zuletzt wurde zu den Schnitten ein Tropfen der „*Mounting-Solution*“ NucBlue hinzugegeben und diese mit Deckgläschen blasenfrei eingedeckt. Vor dem Mikroskopieren mussten die Schnitte noch für 1 - 2 h oder über Nacht im Dunkeln getrocknet werden. Nach Trocknung konnte mithilfe des Keyence-Mikroskops mit der „BZ-X800 Viewer“ Software mikroskopiert werden. Mit der „BZ-X800 Analyzer“ Software wurde zum Schluss der Maßstab eingefügt.

4.4 Konjugation von Antikörpern

Die Konjugation spezieller Antikörper ist notwendig, um mithilfe des Phenocyclers Multiplex-Färbungen durchführen zu können. Dafür wurden die Antikörper mit einem spezifischen Barcode konjugiert, indem eine kovalente Bindung zwischen Antikörper und

Barcode entsteht. Eine anschließende Qualitätskontrolle mit Hilfe der Gelelektrophorese zeigt, ob die Konjugation erfolgreich war.

4.4.1 Die Konjugation eines Antikörpers mit Akoya Kit

Für diese Konjugation wurden die speziellen Reagenzien des CODEX Conjugation Kits von AKOYA verwendet. Dabei wurden zunächst 500 µl „Filter Blocking Solution“ in einen *molecular weight cut-off* (MWCO)-Filter gegeben und für zwei Minuten bei 12,000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen, sowie auch die Flüssigkeit im Filter entfernt. Anschließend wurde das zuvor berechnete Volumen des Antikörpers (Verhältnis 2:1 Barcode zu Antikörper) in den MWCO-Filter pipettiert. Bei Volumen von weniger als 100 µl wurde das Volumen durch Zugabe von 1x PBS auf 100 µl erhöht. Danach wurde bei 12,000 g für 8 Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Währenddessen wurde der „*Antibody Reduction Master Mix*“ hergestellt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Herstellung des „*Antibody Reduction Master Mix*“ für ein bis zwei Konjugationen

	Anzahl der Konjugationen	
	1	2
„Reduction Solution 1“	6,6 µl	13,2 µl
„Reduction Solution 2“	275 µl	550 µl
Gesamtvolumen	286,1 µl	563,2 µl

Nach der Herstellung des Master Mix, wurden 260 µl auf den Filter pipettiert, für einige Sekunden gevortext, damit sich Master Mix und Antikörper vermischen und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Dabei durfte die 30-minütige Inkubationszeit nicht überschritten werden, da der Antikörper sonst irreversible Schäden erleiden kann. Nach der Inkubation wurde der Filter wieder bei 12,000 g für 8 Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nachfolgend wurden 450 µl der „*Conjugation Solution*“ in den Filter pipettiert und erneut für acht Minuten bei 12,000 g zentrifugiert. Zeitgleich wurde die „*CODEX® Barcode Solution*“ vorbereitet, indem die Barcodes in 400 µl 1x PBS aufgelöst wurden. Dieser Schritt wurde in der Gasphase von flüssigem Stickstoff durchgeführt. Die „*Barcode Solution*“ wurde auf den Filter pipettiert, das Gefäß verschlossen und kurz gevortext. Anschließend folgte eine Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde ein Aliquot, welches 1 µg Antikörper entspricht, aus dem Filter mit der enthaltenden „*CODEX® Barcode Solution*“ und dem

Antikörper entnommen und in ein 0,2 ml PCR-Tube überführt. Dieses Aliquot wurde im Schritt 4.5.3 zur Validierung benötigt. Die Antikörperlösung wurde nun bei 12,000 g für 8 Minuten zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 450 µl „*Purification Solution*“ auf den Filter gegeben und wieder für 8 min bei 12,000 g zentrifugiert. Dieser Schritt der Aufreinigung wurde anschließend noch zwei Mal wiederholt. Im letzten Schritt wurde ein neues Sammelgefäß verwendet und ein individuelles Volumen „*Antibody Storage Solution*“ in den Filter pipettiert, so dass die Konzentration des konjugierten Antikörpers bei 0,5 mg/ml lag. Der Filter wurde in das neue Sammelgefäß invertiert, damit die Antikörper in das Sammelgefäß eluiert werden konnten. Ein letztes Mal wurde der Filter bei 3,000 g für zwei Minuten zentrifugiert und in ein Gefäß mit Schraubverschluss überführt.

4.4.2 Die Konjugation eines Antikörpers ohne Akoya Reagenzien

Für diese Konjugation wurden nicht die spezifischen Akoya Reagenzien verwendet. Die Arbeitsschritte liefen gleich ab nur wurden dabei andere Lösungen und andere Volumina verwendet. In Schritt 1 wurde anstatt der „*Filter Blocking Solution*“ mit PBS-Tween Lösung geblockt. Enthält der Antikörper Glycerol wurden zwei weitere Waschschrte mit 400 µl PBS durchgeführt. Für die Antikörper Reduktion wurde statt des „*Antibody Reduction Master Mix*“ eine TCEP-Lösung verwendet. Die Lösung setzt sich aus 990 µl 1xPBS, 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 5 µl *Bond-Breaker* TCEP (pH 7,0) zusammen. Von dieser Lösung wurden 360 µl auf den Filter gegeben. Nach der gleichen Inkubationszeit von 30 min wurde die „*Conjugation Solution*“ durch 400 µl Buffer C ersetzt und für 8 min bei 12,000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmal wiederholt, bevor die Barcode Lösung hinzugegeben wurde und die Inkubation von 2 h folgte. Für die Aufreinigung wurde anschließend anstatt der „*Purification Solution*“ dreimal mit 450 µl *high-salt* PBS gewaschen. Zum Schluss folgte dann noch die Zugabe von dem entsprechenden Volumen der *Antibody Stabilizer Solution*.

4.4.3 Die Validierung des konjugierten Antikörpers mit der Gelelektrophorese

Für die Qualitätskontrolle wurden das Aliquot des konjugierten Antikörpers, 1 µg des unkonjugierten Antikörpers (welcher als Kontrolle diente), eine Proteinleiter (die als Molekulargewichtsstandard diente) und der 2x Lämmli Puffer benötigt. Als Erstes wurden die unkonjugierten und konjugierten Antikörper in einem hitzebeständigen Eppendorfgefäß mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Darauffolgend wurden die Lösungen mit 5 µl 5x Lämmli Puffer gemischt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 25 µl ergab, und bei 95 °C für fünf Minuten gekocht. Währenddessen wurde die Gelelektrophorese

vorbereitet, indem der Kamm aus dem fertig zur Verfügung gestelltem Gel vorsichtig herausgenommen und das Klebeband an der Unterseite entfernt wurde. Nun konnte das Gel in den Spannrahmen eingeschlossen und in den Tank, welcher mit Laufpuffer bis zur entsprechenden Markierung gefüllt war, eingesetzt werden. In die erste Geltasche wurden 4 µl der Proteinleiter und in die nächsten Geltaschen 25 µl der unkonjugierten und konjugierten Antikörper pipettiert. Das Gel lief bei 120 V für 65 min. Anschließend wurden die Banden mit Rotiphorese® Blau über Nacht gefärbt. Am nächsten Tag wurde mit einer Entfärbelösung die überschüssige Rotiphorese® entfernt und mit dem Gerät ChemiDoc™ MP Imaging System Fotos vom Gel aufgenommen. Optional wurde für eine höhere Sensitivität eine Silberfärbung nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt und zum Schluss wieder mit dem ChemiDoc™ MP Imaging System Bilder gemacht.

4.5 Die CODEX Multiplexfärbung

Für die CODEX Färbung wurden 5 µm dicke Schnitte benötigt, welche zuvor in der Pathologie angefertigt wurden. Dabei wurden verschiedene Gewebe präpariert wie z.B. das Gewebe einer Harnblasenmetastase. Die Schnitte wurden auf ein beschichtetes Deckglas übertragen.

4.5.1 Die Beschichtung der Deckgläser

Um die Deckgläser zu beschichten wurden zwei verschiedene Varianten durchgeführt. Dies soll für eine erhöhte Adhärenz des Gewebes an das Deckglas sorgen und somit verhindern, dass sich das Gewebe unter extremen Bedingungen, wie die hohen Temperaturen beim Kochen, vom Deckglas ablöst. Zunächst erfolgte die Beschichtung mit Vectabond. Hierfür wurden vier 50 ml Bechergläser vorbereitet, wobei das erste Glas 40 ml ddH₂O enthielt. Das zweite und dritte Becherglas wurden mit 35 ml Aceton befüllt. In das vierte Glas wurden 35 ml Aceton hinzugegeben sowie 700 µl Vectabond Reagenz und die Lösung für mindestens 5 min vermischt. Danach wurden maximal 5 Deckgläser zusammen in ein dafür vorgesehenes Metallrack platziert und für einige Sekunden in das erste Becherglas mit Wasser gestellt. Als nächstes wurde das Rack für 5 min in ein Glas mit Aceton gegeben. Anschließend kam es für 30 min in das Becherglas, welches Aceton und Vectabond enthielt. Zum Schluss wurden die Deckgläser nochmals für 30 sek in das vierte Glas mit frischem Aceton gestellt und daraufhin zum Trocknen auf ein KIMTECH Tuch gelegt. Jede Seite wurde für 5 min getrocknet. Diese Schritte wurden für insgesamt 25 Deckgläser wiederholt und diese im Anschluss noch bei 70 °C gebacken, bevor sie bei Raumtemperatur aufbewahrt werden konnten.

Um die Deckgläser mit Poly-L-Lysin zu beschichten wurde in jedes Well einer 6-Well-Platte 2 ml 0,1% Poly-L-Lysin gegeben. Die Deckgläser wurden so im Well platziert, dass die gesamte Fläche mit Flüssigkeit bedeckt war. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Deckgläser gewendet und für einen weiteren Tag inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser insgesamt siebenmal mit ddH₂O gewaschen, zum Trocknen in eine Box gestellt und mit einem Papiertuch überdeckt, sodass sie keinem Staub ausgesetzt waren.

4.5.2 Die Färbung des Gewebes I

Die Deckgläser mit dem Gewebe wurden anschließend bei 70 °C für 25 Minuten erhitzt. Es folgte die Deparaffinierung und Rehydrierung in RotiClear, Alkohol und ddH₂O. Dies entspricht dem in Tabelle 9 im Kapitel 4.3.1 dargestellten Ablauf.

Während der Alkoholreihe, wurde der „*Antigen-retrieval Buffer*“ hergestellt. Dazu wurden 4 ml HIER EDTA Puffer (pH 9,0) mit 36 ml ddH₂O vermischt und der Puffer im Multifunktionskocher auf 100 °C erhitzt. Nach dem letzten Schritt der Alkoholreihe wurden die Schnitte in den heißen „*Antigen-retrieval Buffer*“ gegeben und für 20 Minuten gekocht. Nach dem Kochen wurden die Schnitte bei RT für zehn Minuten abgekühlt und daraufhin für 10 min in TBS Tween 0,025% auf einem Schüttler gewaschen.

4.5.3 Das Bleaching des Gewebes

Durch das Bleachen kann eine übermäßige Autofluoreszenz des FFPE Gewebes reduziert werden. Dafür wurde für jede Gewebeprobe in ein Well einer 6-Well-Platte 5 ml der „*Bleaching Solution*“ hinzugegeben und die Deckgläser darin platziert. Über und unter die Platte wurden zwei LED Lampe platziert und die Platte mit dem höchsten Belichtungsgrad für 45 min bei 4 °C bestrahlt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Deckgläser für 3 min in 5 ml 1x PBS gelegt und dieser Waschschrift viermal wiederholt.

4.5.4 Die Färbung des Gewebes II

Für die Färbung des Gewebes wurde nach dem Bleachen pro Probe 400 µl CODEX Blockierungslösung vorbereitet, sowie der Antikörper Cocktail, welcher jeweils alle Antikörper für den CODEX Run beinhaltet. Das Volumen des Antikörper Cocktails wurde auf 400 µl mit Blockierungslösung aufgefüllt und durch herauf und herunter pipettieren vermischt. Die Volumina der Antikörper variierten dabei aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen (1:25, 1:50, 1:100). Das Deckgläschen mit dem Gewebe wurde aus dem PBS vom Bleaching in eine Feuchtigkeitskammer überführt und daraufhin wurden

400 µl des Antikörper Cocktails am Rand des Deckglases hinzugegeben. Inkubiert wurde bei 4 °C über Nacht.

4.5.5 Fixierung der Antikörper

Für die Fixierung der Antikörper an das Gewebe, damit diese während der vielen Waschritte im CODEX Run nicht abschwimmen, wurden mehrere 6-Well-Platten mit verschiedenen Lösungen hergestellt. In Abbildung 4 sind die einzelnen Wells mit den entsprechenden Volumina und Art der Lösung abgebildet.

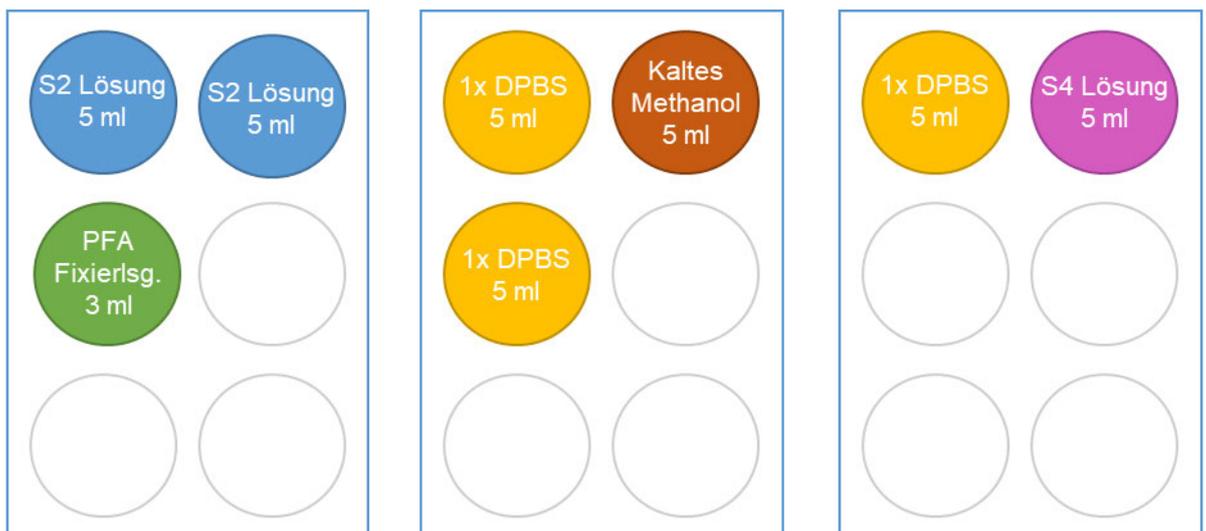


Abbildung 4: Schematische Darstellung 6-Well-Platten mit den Lösungen für die Antikörper Fixierung (Platte 1: S2 Lösung und PFA Fixierungslösung, Platte 2: 1x DPBS und Eis-kaltes Methanol, Platte 3: 1x DPBS und S4 Lösung)

Zunächst wurde das Deckglas mit dem Gewebe für 2 min bei RT in dem ersten Well mit S2 Lösung inkubiert. Dieser Schritt wurde im nächsten Well mit S2 Lösung wiederholt. Danach wurde das Deckglas in das Well mit der PFA Fixierungslösung überführt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation in der PFA Lösung, wurde das Deckglas in das erste Well der zweiten 6-Well-Platte mit 1x DPBS platziert. Diese 6-Well-Platte wurde auf Eis gelegt um das vorher heruntergekühlte Methanol vor dem Erwärmen zu bewahren. Nach 1 min wurde das Deckglas für 5 min im Methanol inkubiert und danach wieder in 1x DPBS gegeben, wo es für eine weitere Minute inkubiert wurde. Währenddessen wurde die Finale Fixierungslösung vorbereitet und nach Ablauf der Inkubationszeit insgesamt 380 µl dieser Lösung an den Rand des Deckglases hinzu pipettiert. In der Feuchtigkeitskammer wurde dann für 20 min bei RT inkubiert. Zum Schluss wurde das Deckglas mit dem Gewebe nochmals für eine Minute in 1x DPBS gewaschen und bis zur Verwendung im CODEX in das Well mit S4 Lösung überführt.

4.5.6 Herstellung der Reporterplatte

Als Grundlage für alle Zyklen der Reporterplatte wurde zunächst der *Plate Buffer* hergestellt. Für jeden Zyklus wurde ein schwarzes 1,5 ml Röhrchen benötigt und mit einer Nummer beschriftet, welche dem jeweiligen Zyklus entsprach. Die Zyklen Anzahl kann variieren je nachdem wie viele verschiedene Antikörper in einem Run verwendet werden. In jedem Run beinhalten der erste und letzte Zyklus nur den *Plate Buffer* und dienen als Blank, welcher in der Prozessierung später als Abgleich für die Autofluoreszenz dient. Jedes 1,5 ml Röhrchen benötigte insgesamt ein Volumen von 250 μ l. In jedes Röhrchen, bis auf die Blanks, wurden je 10 μ l pro Reporter vorgelegt und auf 250 μ l mit *Plate Buffer* aufgefüllt. Damit eine Blasenbildung verhindert wird, wurde durch rauf und runter pipettieren die Lösung gemischt. Tabelle 11 veranschaulicht die Zusammensetzung aus *Plate Buffer* und Reporter für Zyklen mit einem, zwei oder drei Antikörpern. Für jeden Antikörper wird in einem Zyklus je nach verwendetem Oligonukleotid ein anderer Reporter benötigt (Cy3, Cy5 oder Cy7).

Tabelle 11: Volumina benötigter Reporter und *Plate Buffer* für Zyklen mit einem, zwei oder drei Antikörpern

	1 Antikörper im Zyklus	2 Antikörper im Zyklus	3 Antikörper im Zyklus
<i>Plate Buffer</i>	240 μ l	230 μ l	220 μ l
Reporter	10 μ l	20 μ l	30 μ l
Gesamt	250 μ l	250 μ l	250 μ l

In die Wells einer 96 Well-Platte wurden anschließend 244 μ l der vorbereiteten Lösungen in der Reihenfolge der Zyklusnummer luftblasenfrei hinzu pipettiert und mit einer Silberfolie die Wells versiegelt.

4.5.7 Einstellungen am CODEX und Keyence Mikroskop

Nach Herstellung der Reporterplatte konnte die Färbung mit dem CODEX-System starten. Dazu wurde zunächst mit Hilfe eines leeren Deckglases das Programm „*Clean Instrument Wash*“ durchgeführt um die Schläuche des Systems zu reinigen. Im CODEX wurde anschließend das Experiment vorbereitet. Bevor das Keyence Mikroskop für die Färbung verwendet werden konnte, musste dieses umgebaut werden. Dabei wurden alle Objektive entfernt und nur das 20x PlanApo Objektiv an Position 3 eingebaut. In den ersten Kanal kam der DAPI Filter mit einer Belichtungszeit (BZ) von 10 ms, in den

zweiten Kanal der Cy7 Filter mit einer BZ von 500 ms, in den dritten Kanal der Cy3 Filter mit einer BZ von 350 ms und in den vierten Kanal der Cy5 Filter mit einer BZ von 350 ms. Um zu verhindern, dass auslaufende Flüssigkeit in das Mikroskop kommt, wurde zudem der „*Spill Guard*“ im Mikroskop platziert (siehe Abbildung 5). Nach dem Umbau wurde mit dem Einspannen des Deckglases in den „*Stage Holder*“ fortgefahren, welches das Gewebe enthält. Bevor das Deckglas mit dem „*Stage Holder*“ im Mikroskop platziert wurde (siehe Abbildung 5), wurden auf das Gewebe 700 μ l H₂ Puffer mit Hoechst hinzugegeben und in der Codex Software wurde das Programm „*wait and wash tissue*“ ausgewählt.

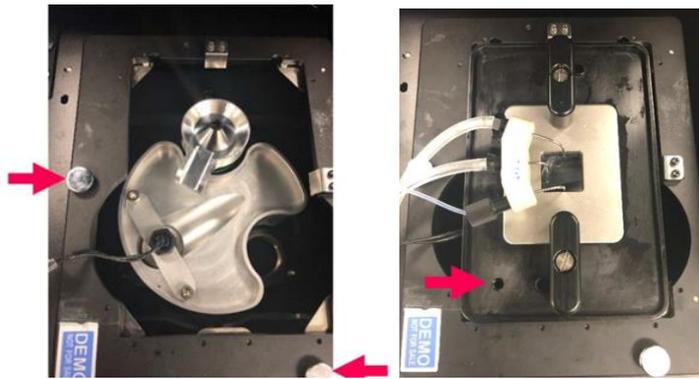


Abbildung 5: links: "Spill Guard" als Auslaufschutz, rechts: "Stage Holder" mit eingespanntem Gewebedeckglas im Mikroskop platziert

Nach Platzierung des „*Stage Holders*“ ins Mikroskop wurde mit den Einstellungen in der Keyence Software „BZ-X800 Viewer“ fortgefahren. Es wurden verschiedene Regionen im Gewebe ausgewählt und die folgenden Einstellungen aus Abbildung 6 übernommen.

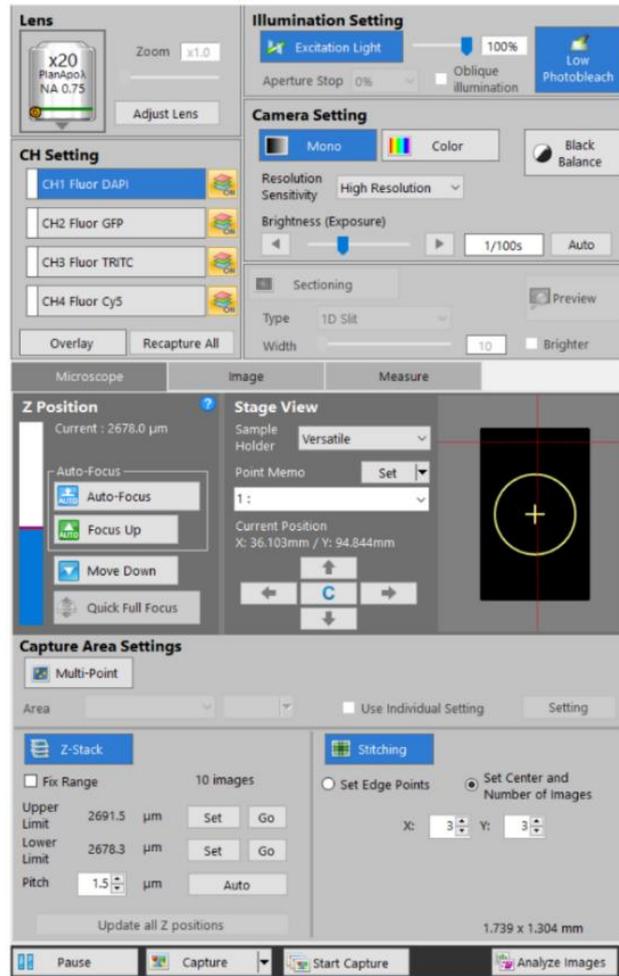


Abbildung 6: Einstellungen am Keyence Mikroskop im "BZ-X800 Viewer"

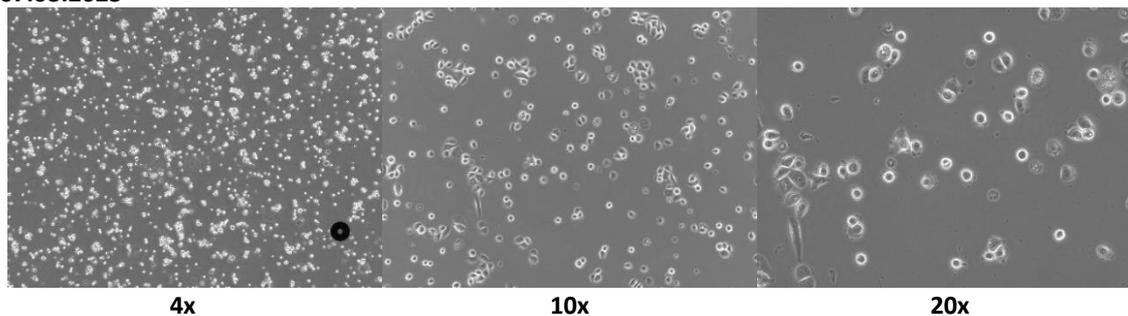
Nachdem alle Einstellungen vorgenommen wurden, wurde der Run gestartet. Nach Beendigung des Runs wurden die erzeugten Daten gespeichert und schließlich in der „CODEX Processor“ Software prozessiert, sodass die Daten mit Hilfe der „QuPath“ Software ausgewertet werden konnten.

5 Ergebnisse

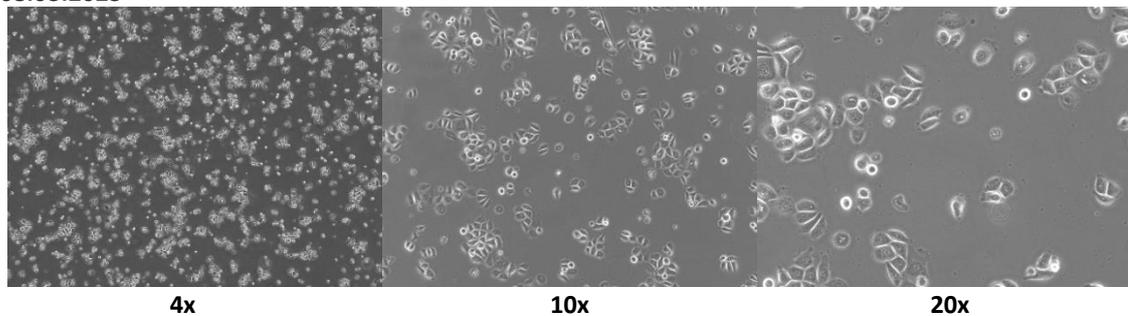
Die nachfolgenden Versuche dienten dazu, über die Behandlung der Zellen mit Inhibitoren oder durch Transfektion mit siRNA die Phosphorylierung von EGFR, IGFR, AKT und ERK herunter zu regulieren und dies zunächst in einem Western Blot erkenntlich zu machen. Es folgt die Darstellung der Ergebnisse der Western Blots, welche die Eignung der Zellen zur Herstellung von Positiv- und Negativkontrollen in Form von Zellblöcken überprüft.

5.1 Western Blot der DDPoro26 Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren

07.03.2023



08.03.2023



09.03.2023

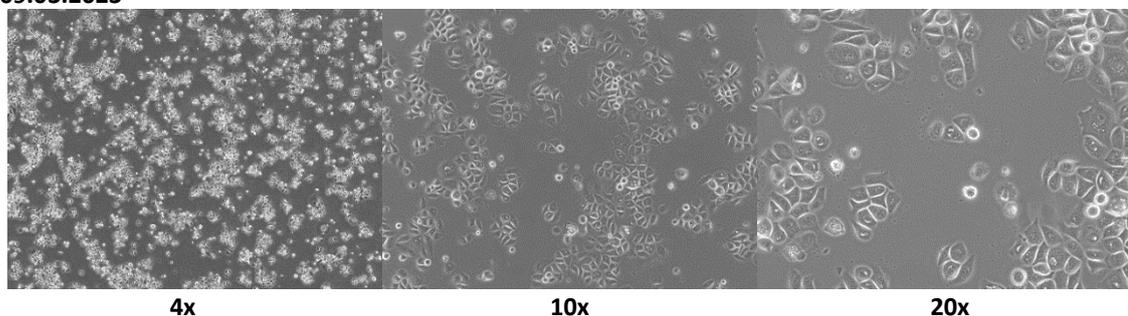


Abbildung 7: DDPoro26 Zellen in Kultur nach unterschiedlichen Tagen und bei verschiedenen Vergrößerungen (4x, 10x und 20x)

Nach dem Aussäen der Zellen in die 4 Wells einer 6-Well-Platte wurde an den darauffolgenden Tagen Bilder der Zellen gemacht (Abbildung 7). Die Zellen zeigen allgemein eine eher rundliche Form, vor allem am ersten Tag nach dem Aussäen. Am

zweiten und dritten Tag sieht man deutlich mehr Zellen und die Zellen bilden sich zu Zellkolonien, wie in Abbildung 7 bei 20-facher Vergrößerung erkennbar ist. Ihre rundliche Form läuft spitzer zu als an Tag 1.

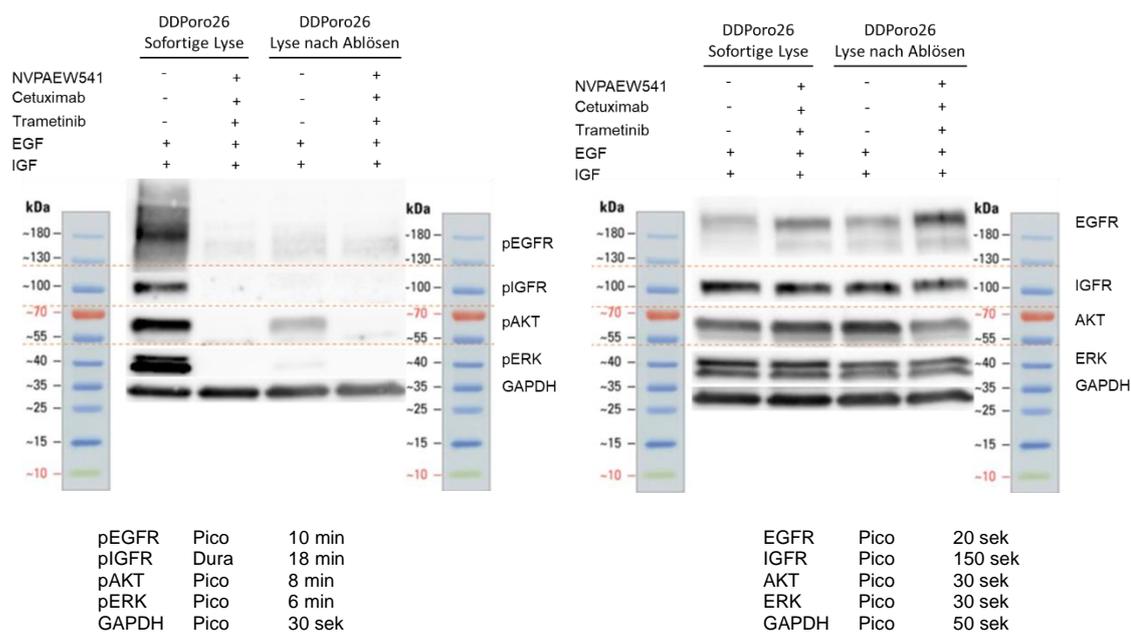


Abbildung 8: Western Blot DDPoro26 direkte Lyse und Lyse nach Ablösen der Zellen, sowie mit und ohne Inhibitoren behandelt (pEGFR, pIGFR, pAKT, pERK, EGFR, IGFR, AKT und ERK)

Abbildung 8 zeigt nun die Ergebnisse des Western Blots der Proben der DDPoro26 Zellen, jeweils einmal mit DMSO (linke Spalte, Positivkontrolle) und einmal mit Inhibitoren (rechte Spalte, Negativkontrolle) behandelt. Die verwendeten Inhibitoren waren NVPAEW541 (gegen pIGFR), Cetuximab (gegen pEGFR) und Trametinib (MEK-Inhibitor gegen pERK). Desweiteren liegt eine Unterscheidung vor, ob die Zellen direkt lysiert wurden oder die Lyse erst nach dem enzymatischen Ablösen der Zellen erfolgte. Die linke Membran zeigt die Phosphoproteine und die rechte Membran die unphosphorylierten Proteine. Bei den unphosphorylierten Proteinen zeigen alle Proben Banden für alle getesteten Proteine (EGFR, IGFR, AKT und ERK). Die Intensitäten sind dabei sowohl in den Proben direkt lysiert und lysiert nach Ablösen als auch in der Unterscheidung zwischen Inhibitor behandelt und ohne Inhibitoren ähnlich. Bei den Phosphoproteinen sind nur in der ersten Probe (direkt lysiert und ohne Inhibitoren) deutliche Banden sichtbar. Die zweite Probe ohne Inhibitoren und einer Lyse nach dem Ablösen zeigt hingegen nur sehr schwache Banden. Beide Proben mit Inhibitoren weisen keine Phosphoproteinbanden auf. Der letzte Membranabschnitt zeigt neben Phospho-ERK und ERK (Doppelbande) noch GAPDH als Ladekontrolle, wobei alle GAPDH-Banden eine gleiche Intensität ihrer Banden aufweisen. Somit können unterschiedliche

Proteinkonzentrationen bei der Ladung ausgeschlossen werden. Aus diesem Experiment gingen keine Zellblöcke hervor.

5.2 Western Blot behandelter DDPoro65b Zellen und DDPoro26 Zellen für den Zellblock

Für diesen Versuch wurde neben den Proben der DDPoro26 Zellen zur der Herstellung eines Zellblocks auch Proben der DDPoro65b Zelllinie verwendet. Von den vier Zellproben ist jeweils eine Probe jeder Zelllinie mit den in Abbildung 9 verzeichneten Inhibitoren behandelt. Es sind die gleichen Inhibitoren wie im Versuch 5.1. Somit ergibt sich eine Positivkontrolle (DMSO) und eine Negativkontrolle (mit Inhibitoren).

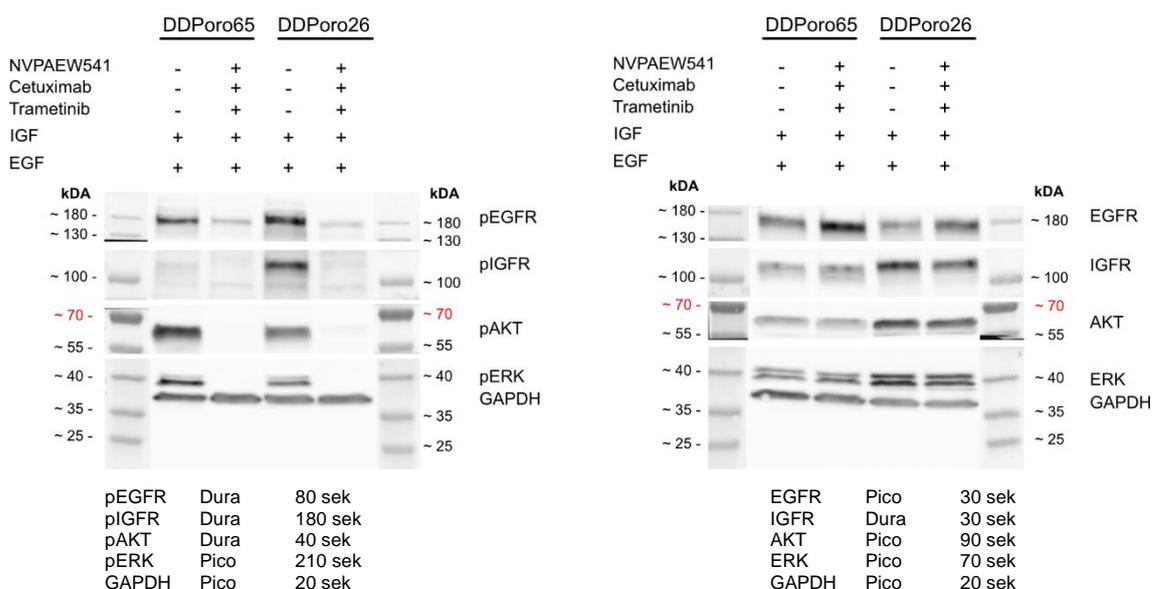


Abbildung 9: Western Blot DDPoro26 und DDPoro65b mit Inhibitoren und ohne Inhibitoren behandelt (pEGFR, pIGFR, pAKT, pERK, EGFR, IGFR, AKT und ERK)

Auf der linken Seite in Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Phospho-Proteine zu sehen und auf der rechten Seite, die der unphosphorylierten Proteine. Für die Phosphoproteine sind bei den DMSO-Proben jeweils auf der erwarteten Höhe die Phosphoproteine zu erkennen, wobei die Intensitäten der Banden von pIGFR und pEGFR bei DDPoro26 stärker sind als bei DDPoro65b. Die Proben mit Inhibitoren zeigen hingegen nur ein leichtes (pEGFR, pIGFR, pAKT) beziehungsweise stark reduziertes Signal (pERK) der Banden. Bei den unphosphorylierten Proteinen ist zu sehen, dass die Inhibitoren keinen Einfluss auf das Signal der Banden haben und es sind in allen Proben Banden zu erkennen. DDPoro26 zeigt dabei intensivere Banden als DDPoro65. Auf dem Membranabschnitt von GAPDH sind außerdem Restsignale von pERK und ERK erkennbar, welche auf dem gleichen Abschnitt zuvor angefärbt wurden. GAPDH zeigt in

jeder Probe eine ähnliche Intensität seiner Banden und dient wieder als Ladekontrolle. Nach diesem Versuch wurden aus den DDPoro26 DMSO und Inhibitor Zellen Zellblöcke hergestellt.

5.3 Western Blot behandelter M10 und MCF7 Zellen mit Inhibitoren und siRNA

Zur Erstellung weiterer Kontrollen, um die Phosphoformen von AKT, ERK und IGFR, sowie Gesamt-IGFR detektieren zu können, wurden die Zelllinien MCF7 und M10 verwendet. Dabei wurden die M10 Zellen unabhängig voneinander einmal mit Trametinib und einmal mit Buparlisib behandelt. Die Inkubationszeit betrug dabei für Trametinib 2 h und 24 h. Buparlisib wurde für 24 h inkubiert. An den MCF7 Zellen wurde eine Transfektion mit siRNA für einen IGFR Knockdown durchgeführt, wobei für 48 h inkubiert wurde. Als Transfektionsreagenz diente DharmaFECT. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse des Western Blots zu sehen.

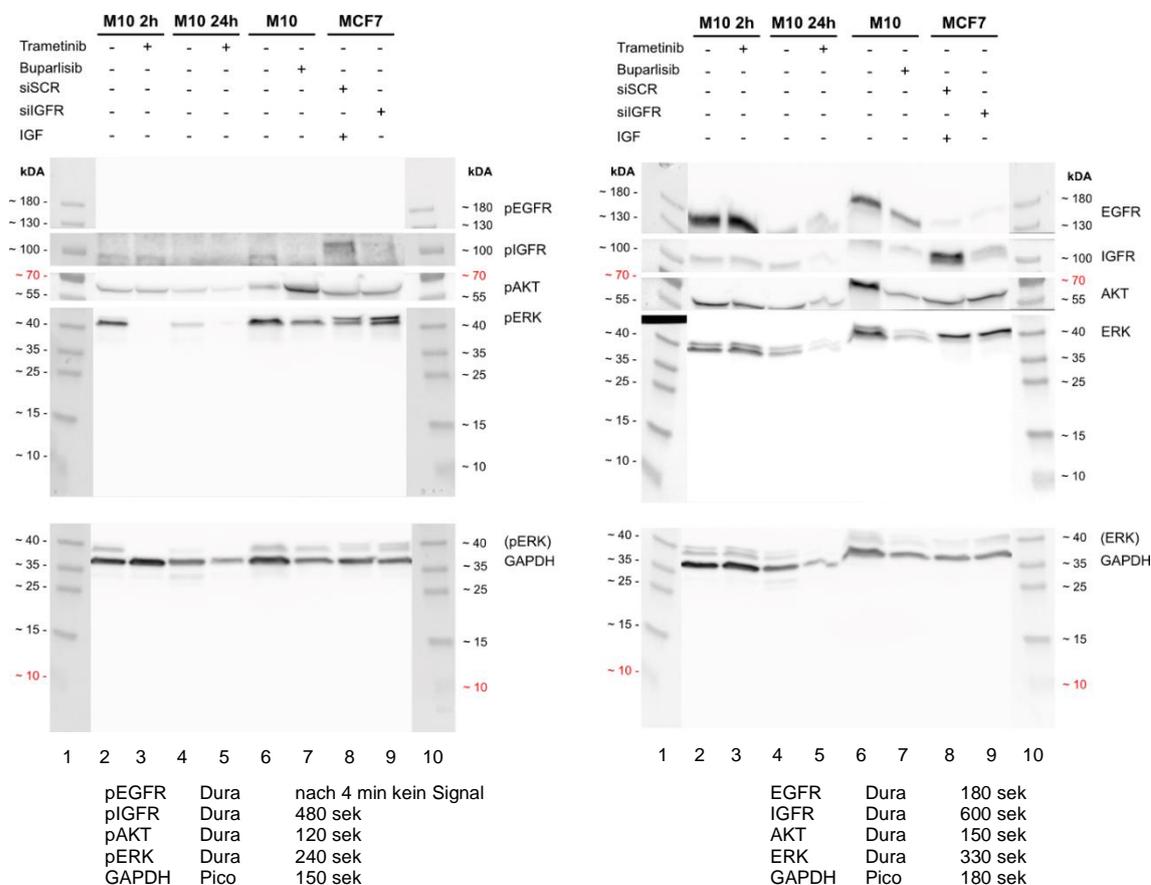


Abbildung 10: Western Blot M10 Zellen behandelt mit DMSO, Trametinib und Buparlisib, sowie mit siRNA behandelten MCF7 Zellen (EGFR, pIGFR, IGFR, pAKT, AKT, pERK, ERK)

Auffällig beim Betrachten der Blots ist, dass ein Gel während des SDS-PAGE unregelmäßig gelaufen ist (Membran mit unphosphorylierten Proteinen) und die Banden somit verwaschen sind, bzw. nicht in ihrer erwarteten Region liegen. Dadurch liegen die Banden besonders bei der M10 24 h DMSO Kontrolle am untersten Rand des Membranabschnitts und sind nicht vollständig sichtbar. Wie schon in vorherigen Versuchen, ist bei den unphosphorylierten Proteinen kein Unterschied zwischen den Intensitäten der Banden von DMSO und Inhibitor (Negativkontrolle) zu erkennen. Die mit siSCR und siIGFR behandelten MCF7 Zellen weisen jedoch einen Unterschied zwischen den IGFR Banden auf. Die siIGFR Probe zeigt ein geringeres Signal als die siSCR Probe. Auf dem Membranabschnitt der phosphorylierten Seite ist bei pEGFR in keiner Probe eine Bande sichtbar. Diese Banden waren bei dem Experiment jedoch nicht von Bedeutung, da keine Inhibitoren gegen EGFR eingesetzt wurden. Die mit Trametinib behandelten M10-Zellen zeigten in der Inhibitor Probe bei 2 h sowie bei 24 h ein stark vermindertes Signal der pERK Banden im Vergleich zur jeweiligen DMSO Kontrolle. Dabei ist der Unterschied bei 2-stündiger Inkubation stärker als bei 24 h. Die mit Buparlisib behandelten M10 Zellen zeigen im Vergleich zur DMSO Kontrolle ein stärkeres Signal an pAKT. pIGFR besitzt in allen Proben ein allgemein niedriges Signal, trotzdem ist bei den MCF7 Proben ein leichter Unterschied in den Intensitäten der siSCR und siIGFR Kontrolle sichtbar. Wie auch bei IGFR zeigt pIGFR in der siIGFR Probe eine schwächere Bande als die siSCR Probe. Betrachtet man GAPDH als Ladekontrolle ist zudem eine ungleichmäßige Proteinkonzentration der einzelnen Proben zu erkennen. Aus diesem Versuch sind die Zellblöcke MCF7 siSCR und siIGFR hervorgegangen

5.4 Western Blot transfizierter MCF7 Zellen mit siRNA unter Verwendung verschiedener Transfektionsreagenzien

Die Transfektion der MCF7 Zellen wurde mit den Transfektionsreagenzien INTERFERin und Lipofectamine RNAiMAX wiederholt. Die Proben aus 5.3 (mit DharmaFECT) sowie eine untransfizierte Probe wurden zum Vergleich mit aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zu sehen.

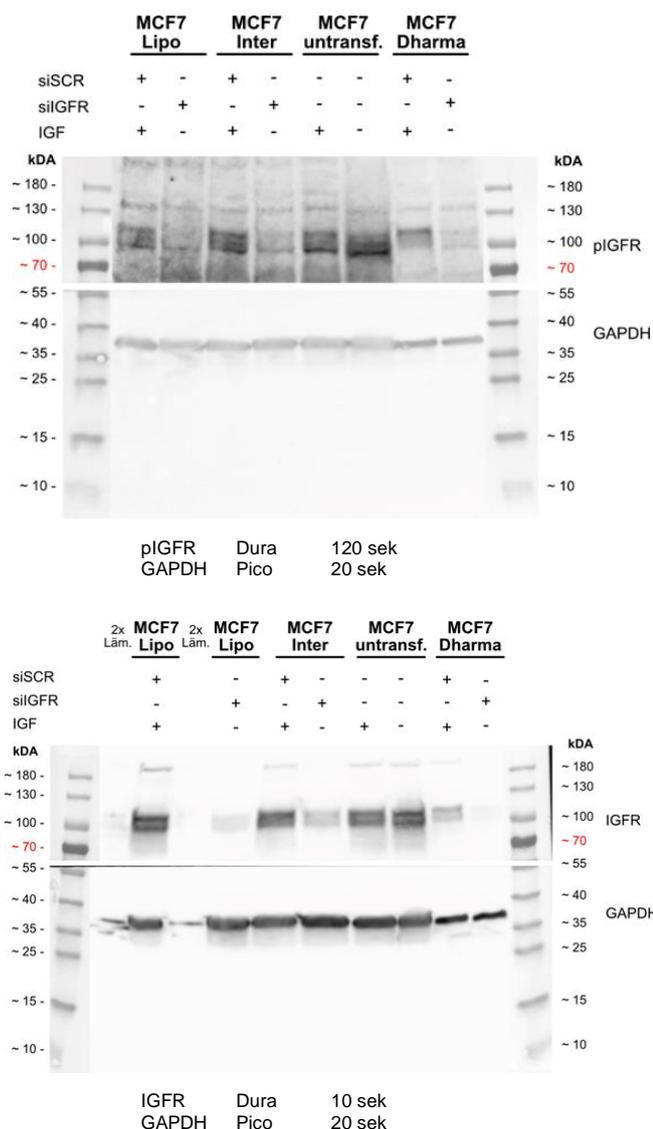


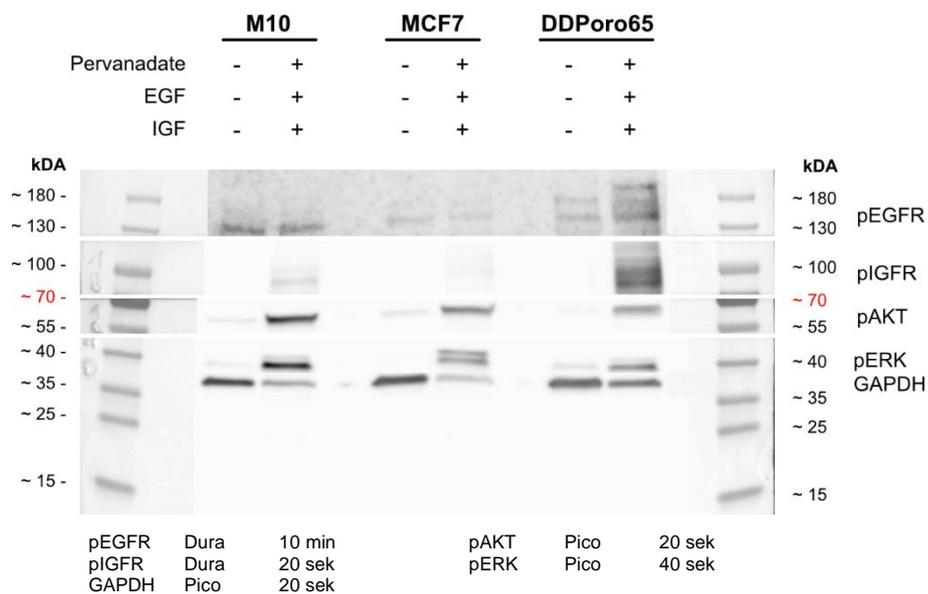
Abbildung 11: Western Blot transfizierter MCF7 Zellen mit siRNA unter Verwendung von DharmaFECT, Lipofectamine RNAiMAX und INTERFERin

Die erste Membran zeigt die Ergebnisse von pIGFR. In allen mit siIGFR behandelten Zellen ist im Vergleich zu den Proben mit siSCR ein abgeschwächtes Signal wahrnehmbar, trotz starkem Hintergrund. Die untransfizierte Probe zeigt mit Stimulation und ohne Stimulation von IGF ein Signal, welche sich nicht stark in ihrer Intensität unterscheiden. Die GAPDH Banden zeigen eine ähnliche Bandenintensität. In der zweiten Membran sind die IGFR Ergebnisse veranschaulicht. Hierbei ist zwischen dem Marker, der ersten Probe (MCF7 Lipo siSCR) und der zweiten Probe (MCF7 Lipo siIGFR), jeweils eine Tasche während des Ladens nur mit 2x Lämmli geladen worden, weil die erste Probe (MCF7 Lipo siSCR) während des Beladens in die anliegenden Taschen überlief. Auch hier sind Unterschiede zwischen siSCR- und siIGFR-behandelter Zellen in jeder Probe zu erkennen. Am stärksten scheint der Unterschied zwischen MCF7 siSCR und siIGFR zu sein, bei dem als Transfektionsreagenz Lipofectamine

als die M10 DMSO Probe. pAKT zeigt in beiden Zelllinien für den PI3K-Inhibitor ein umgekehrtes Ergebnis. Die Inhibitor Kontrolle zeigt im Gegensatz zur DMSO Kontrolle ein verstärktes Bandensignal. GAPDH besitzt für jede Probe eine ähnliche Intensität der Banden. Aus diesem Versuch gingen die Zellblöcke MCF7 DMSO und Trametinib + Alpelisib sowie M10 DMSO und Trametinib + Alpelisib hervor.

5.6 Western Blot behandelter M10, MCF7 und DDPoro65 Zellen mit Pervanadate

Für die Herstellung von Positiv- und Negativkontrollen für pAKT und pERK, sowie für pIGFR, wurden die Zelllinien M10, MCF7 und DDPoro65 mit Pervanadate behandelt. Pervanadate ist ein Phosphatase-Hemmer und soll somit das Signal der Phosphoproteine in den mit Pervanadate behandelten Zellen steigern (Positivkontrolle). Zusätzlich wurden die Pervanadate behandelten Zellen mit EGF und IGF stimuliert. Als Negativkontrolle galten die unbehandelten Zellen. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse des Western Blots der Phosphoproteine sowie der unphosphorylierten Proteine aufgezeigt.



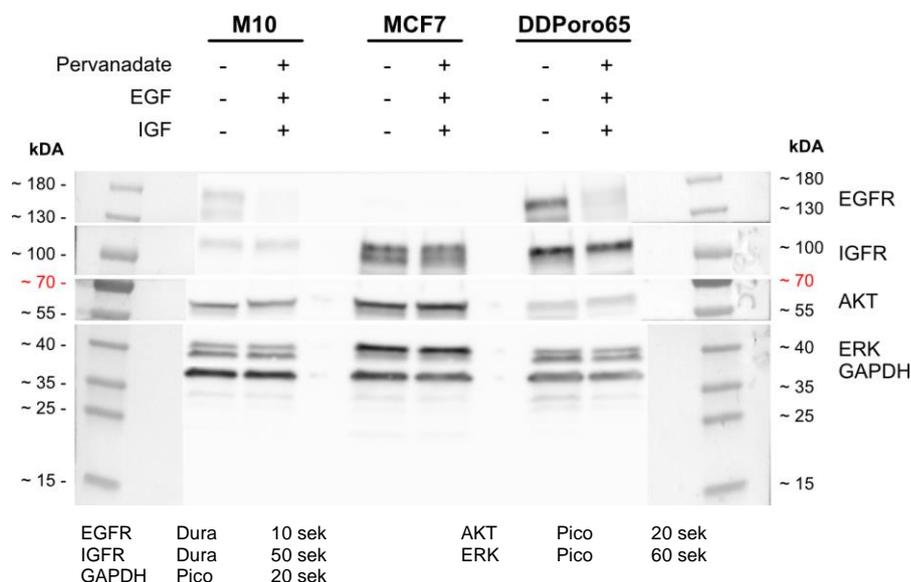


Abbildung 13: Western Blot behandelter M10, MCF7 und DDPoro65 Zellen mit Pervanadate ((p)EGFR, (p)IGFR, (p)AKT, (p)ERK)

Die obere Membran veranschaulicht die Ergebnisse der Phosphoproteine. pEGFR erreichte dabei auch nach 10 min und mit sensitiverem Dura-Substrat keine Detektion von Banden, weshalb die Detektion abgebrochen wurde. Das Signal weist jedoch die höchste Intensität bei DDPoro65 auf. Im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen (siehe 5.2 und 5.4), wo die Belichtungszeit immer bei mindestens 2 min lag, zeigt pIGFR hier schon nach 20 sek Belichtungszeit mit Dura ein starkes Signal in der Pervanadate Probe. Besonders stark ist dieses Signal in der DDPoro65 Zelllinie. Auch pAKT und pERK zeigen in allen Zelllinien in der Pervanadate Probe ein stärkeres Bandensignal als in der unbehandelten Probe. Die unphosphorylierten Proteine zeigen in der Pervanadate und der unbehandelten Probe keinen Unterschied in ihrer Bandenintensität. Auffällig ist, dass MCF7 keine Banden bei EGFR besitzt und M10 jeweils schwache Signale bei EGFR und IGFR aufweist. GAPDH zeigt als Ladekontrolle eine relativ gleichmäßige Proteinkonzentration. In den Pervanadate Proben von M10 und MCF7 erscheint die Intensität der GAPDH Banden jedoch schwächer als in den unbehandelten Proben. Nach diesem Versuch wurden von jeder verwendeten Zelllinie jeweils die Zellblöcke Control und Pervanadate hergestellt.

5.7 Manuelle immunhistochemische Färbung von pAKT, pERK, pEGFR, pIFGR an den Zellblöcken DDPoro26 DMSO und DDPoro26 Inhibitors

Bevor die Antikörper für den CODEX verwendet werden können, wurden sie mit Hilfe der aus den Western Blots überprüften Positiv- und Negativkontrollen auf ihre Spezifität und ihre Funktionalität in der Immunfluoreszenz getestet.

Die folgenden Abbildungen 14 – 17 zeigen die Ergebnisse der manuellen immunhistochemischen Färbung an den Zellblöcken DDPoro26 DMSO und DDPoro26 Inhibitors. Dabei wurden jeweils zwei Antikörper verschiedener Firmen bzw. unterschiedlicher Artikelnummer gegen die Phosphoproteine von EGFR, IGFR, AKT und ERK getestet.

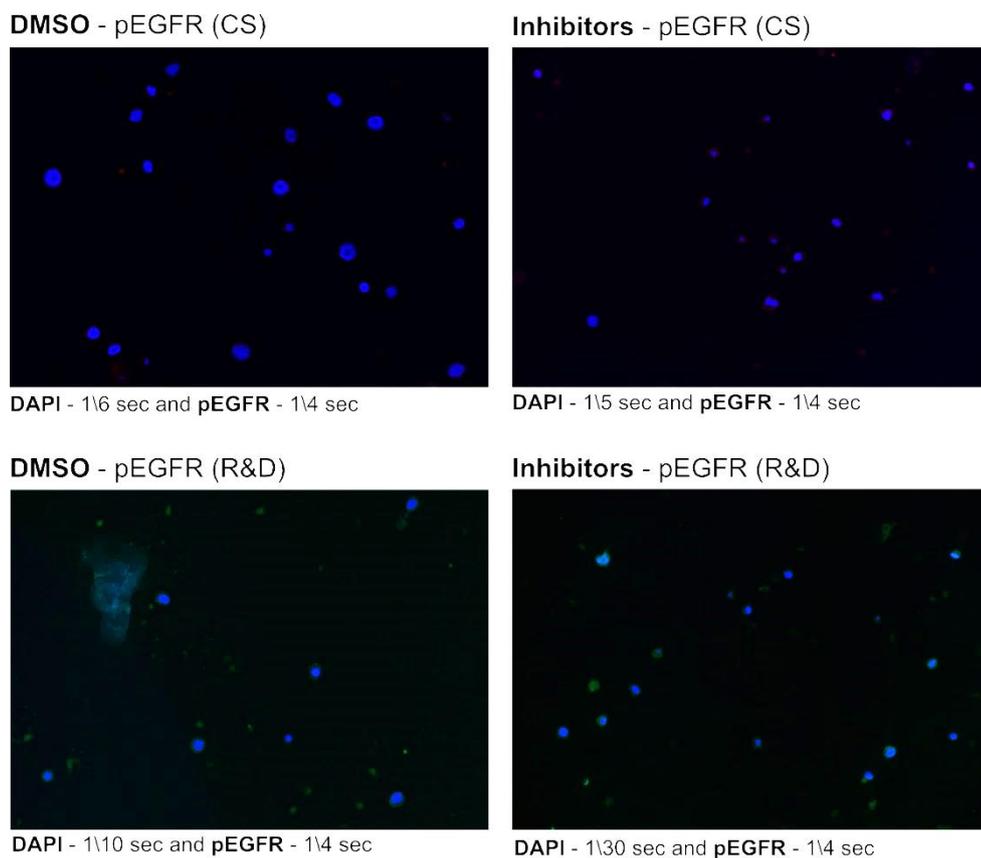


Abbildung 14: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pEGFR-Antikörpern von Cell Signaling und R&D Systems an DDPoro26 DMSO und Inhibitors Zellblöcken

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Phospho-EGFR Färbung zu sehen. Dabei wurde der pEGFR-Antikörper von Cell Signaling sowie der pEGFR-Antikörper von R&D Systems getestet. Alle vier Bilder zeigen nur das Overlay an, bestehend aus der DAPI-Färbung, hier in blau zu erkennen, und der pEGFR-Antikörper Färbung, bei R&D in grün

und bei Cell Signaling in rot sichtbar. Bei beiden Antikörpern sind die Zellkerne gut sichtbar. Die Belichtungszeiten für die Kernfärbung variieren dabei und sind insgesamt bei Cell Signaling höher als bei R&D. Die pEGFR-Färbungen wurden alle bei einer Belichtungszeit von 1/4 Sekunde aufgenommen. Diese Belichtungszeit wurde zuvor als längste festgelegt, da bei noch längeren Belichtungszeiten unspezifische Signale durch Autofluoreszenz auftreten können. Dabei sind die Signale von Cell Signaling fast nicht zu erkennen. R&D zeigt zwar etwas stärkere Signale, besitzt jedoch auch einen stärkeren Hintergrund. Zwischen Inhibitor- und DMSO-Kontrolle zeigen sich bei beiden Antikörpern keine Unterschiede.

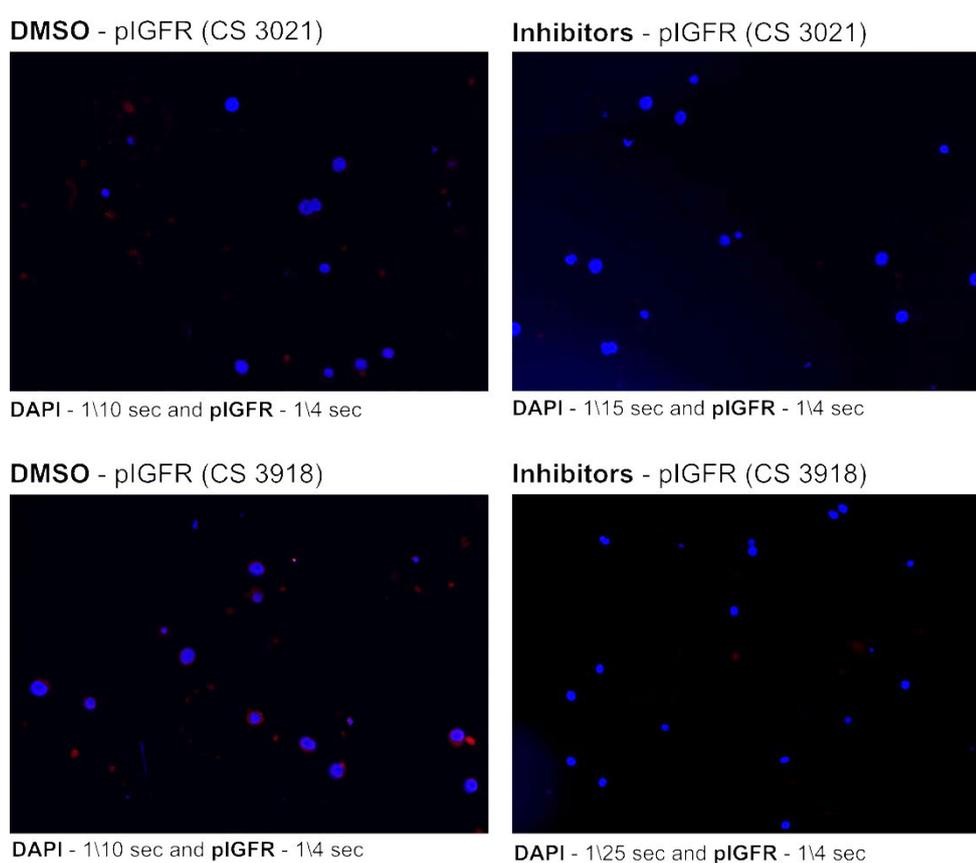
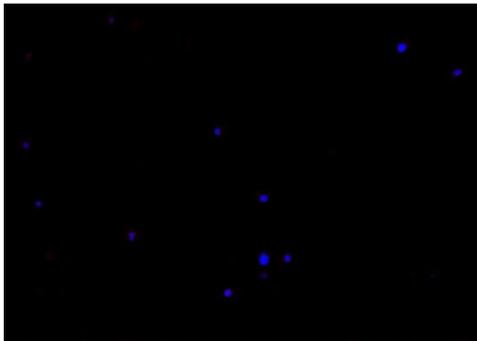


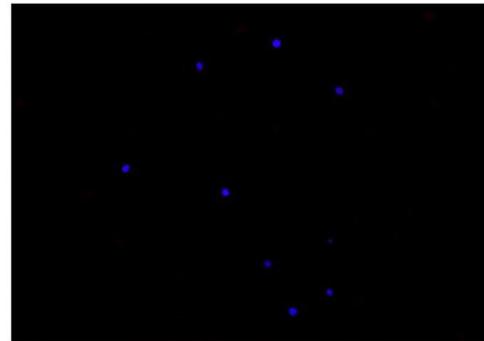
Abbildung 15: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pIGFR-Antikörpern von Cell Signaling (#3021 und #3918) an DDPoro26 DMSO und Inhibitors

Die Ergebnisse von der pIGFR-Färbung sind in Abbildung 15 dargestellt. Auch hier sind die Zellkerne in blau gut sichtbar und die Belichtungszeiten liegen zwischen 1/10 sek und 1/25 sek. Beide Antikörper sind diesmal von Cell Signaling, wobei unterschiedliche Artikelnummern verwendet wurden, #3021 und #3918. Beide Antikörper wurden mit dem sekundären Antikörper α -rabbitAF647 inkubiert, welcher unter Fluoreszenz rot erscheint.

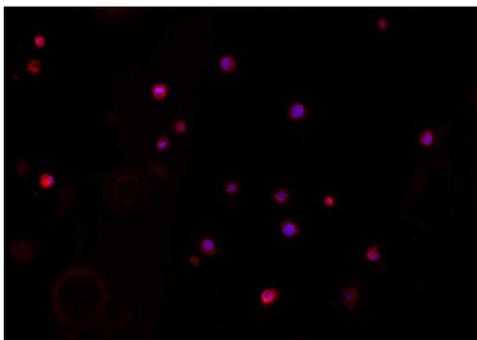
Die Färbungen besitzen wieder eine maximale Belichtungszeit von 1/4 sek. Der Vergleich zeigt, dass beide Antikörper insgesamt kaum ein Signal zeigen, wobei sich zumindest bei pIGFR #3918 ein Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen DMSO- und Inhibitor-Kontrolle andeutet.

DMSO - pAKT (CS)

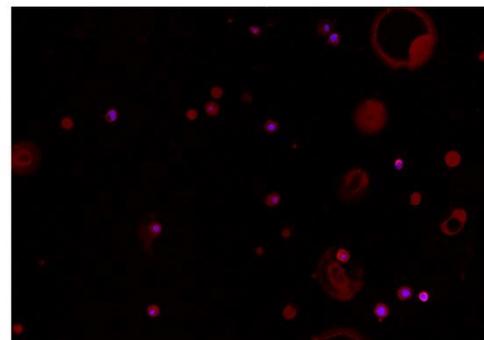
DAPI - 1\15 sec and pAKT - 1\4 sec

Inhibitors - pAKT (CS)

DAPI - 1\20 sec and pAKT - 1\4 sec

DMSO - pAKT (R&D)

DAPI - 1\15 sec and pAKT - 1\4 sec

Inhibitors - pAKT (R&D)

DAPI - 1\20 sec and pAKT - 1\4 sec

Abbildung 16: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pAKT-Antikörpern von Cell Signaling und R&D Systems an DDPoro26 DMSO und Inhibitors

In Abbildung 16 sind auf den ersten Blick deutliche Unterschiede zwischen den beiden getesteten Antikörpern von Phospho-AKT erkennbar. Der Antikörper von R&D Systems zeigt eine im Vergleich zum Cell Signaling Antikörper starke Färbung. Auch hier ist die Belichtungszeit wieder für 1/4 sek gewählt. Dafür sind auch die Hintergrundsignale bei R&D vergleichsweise hoch. Die Zellkerne sind bei beiden Färbungen wieder gut sichtbar. Ein Unterschied zwischen den beiden Kontrollen ist, ähnlich wie bei den vorherigen Färbungen, auch hier nicht vorhanden.

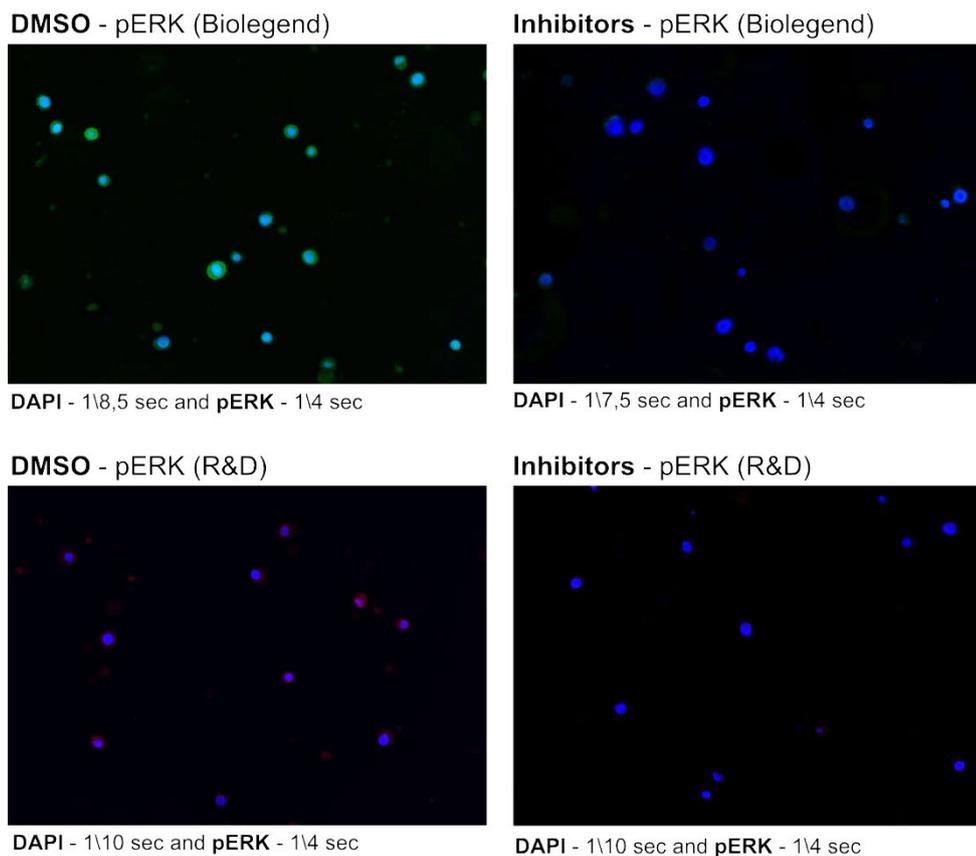


Abbildung 17: Manuelle immunhistochemische Färbung mit pERK-Antikörpern von Biolegend und R&D Systems an DDPoro26 DMSO und Inhibitors

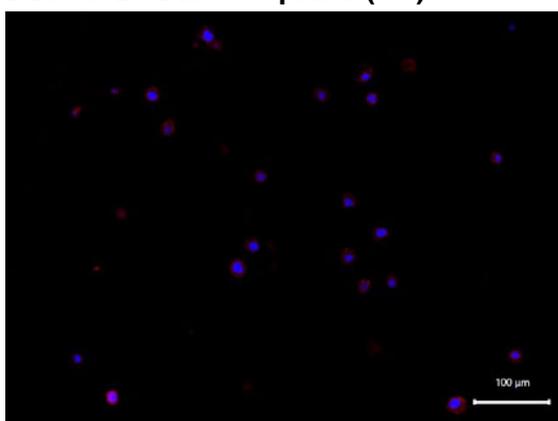
Die letzte Antikörperfärbung dieses Versuchs wurde mit Phospho-ERK durchgeführt. Hier wurden Antikörper der Firmen Biolegend und R&D Systems verwendet. In beiden Fällen sind die Zellkerne gut sichtbar. Auffällig ist die Färbung des Antikörpers von Biolegend in Abbildung 17 in grün. Beide Antikörperfärbungen wurden wieder bei 1/4 sek belichtet. Biolegend zeigt dabei stärkere Signale als R&D Systems. Aber auch R&D Systems besitzt im Vergleich zu den vorherigen Antikörpern eine zwar schwache, aber sichtbare Färbung (rot). Beide Antikörper weisen dabei einen Unterschied zwischen DMSO und Inhibitors auf. Die DMSO-Kontrolle zeigt Signale, die Inhibitor-Kontrolle zeigt besonders bei Biolegend keine Signale.

5.8 Manuelle IHC von pAKT an den Zellböcken DDPoro26 DMSO und Inhibitors, des M10 Zellblocks und dem Gewebe einer Harnblasenmetastase

Da die Färbungen aus 5.7 überwiegend nicht die Ergebnisse aus dem Western Blot bestätigen, und oft kein Unterschied zwischen DMSO und Inhibitor Zellblock erkennbar

war, wurden die Antikörper mit anderen Zellblöcken und Gewebeschnitten überprüft. Der M10 Zellblock sowie die Harnblasenmetastase erwiesen sich dabei in früheren Versuchen als gute Positivkontrollen für Phospho-AKT. Die Abbildungen 18 – 20 zeigen die Ergebnisse aus der manuellen Färbung, wobei zunächst nur der pAKT Antikörper von Cell Signaling getestet wurde. Es ist jeweils das Overlay zu sehen, welches die Bildaufnahmen der DAPI Färbung (blau) und der pAKT Färbung (rot) vereint. Zudem wurde zeitgleich eine klassische Rot-Braun-Färbung mit dem gleichen Antikörper in der Pathologie durchgeführt.

DDPoro26 DMSO – pAKT (CS)

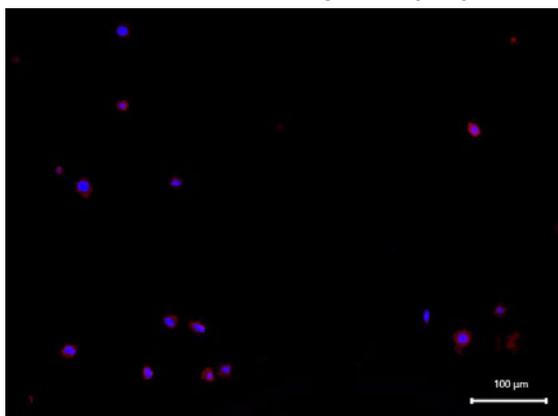


Overlay: 1/50 sek DAPI, 1/4 sek pAKT

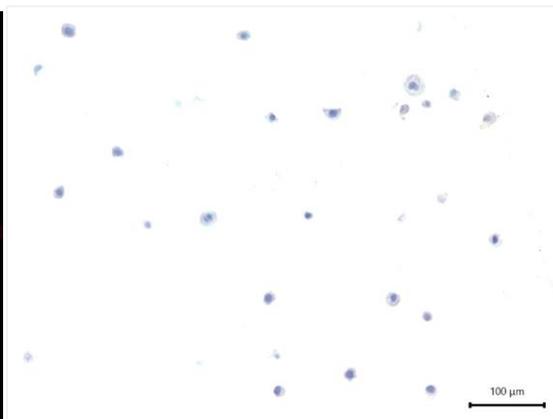


Rot-Braun-Färbung

DDPoro26 Inhibitors – pAKT (CS)



Overlay: 1/30 sek DAPI, 1/4 sek pAKT



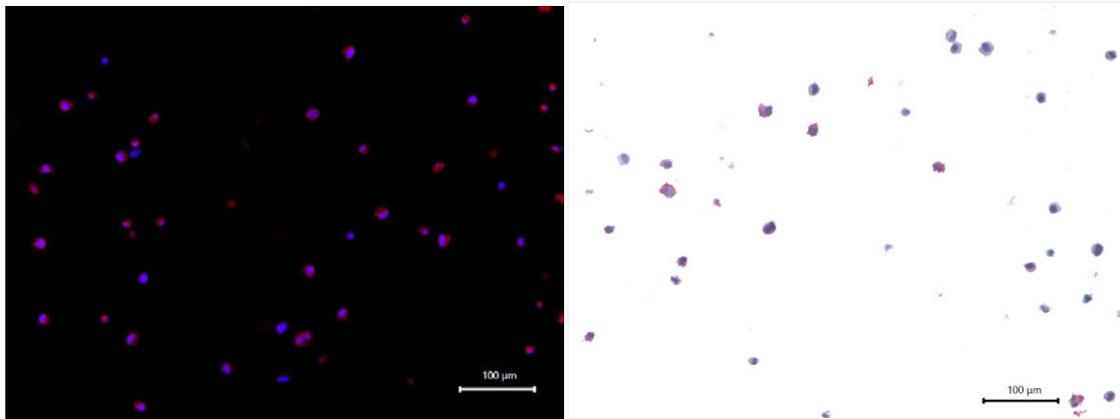
Rot-Braun-Färbung

Abbildung 18: Manuelle IF/IHC Färbung von pAKT (CS) an den Zellblöcken DDPoro26 Inhibitors und DDPoro26 DMSO

Für einen Vergleich wurden, wie in Abbildung 18 zu sehen, nochmals Färbungen an den Zellblöcken DDPoro26 DMSO und Inhibitors durchgeführt. Es sind jeweils die Overlay Bilder zu betrachten. Die Belichtungszeit beträgt dabei wieder 1/4 Sekunde für die pAKT Färbung und 1/30 bzw. 1/50 sek für DAPI. In beiden Färbungen, Immunfluoreszenz

sowie Rot-Braun-Färbung sind um den Zellkern herum im Zytoplasma Signale zu sehen, welche sich jedoch zwischen Inhibitor und DMSO Zellblock in ihrer nicht Intensität unterscheiden.

M10 – pAKT (CS)



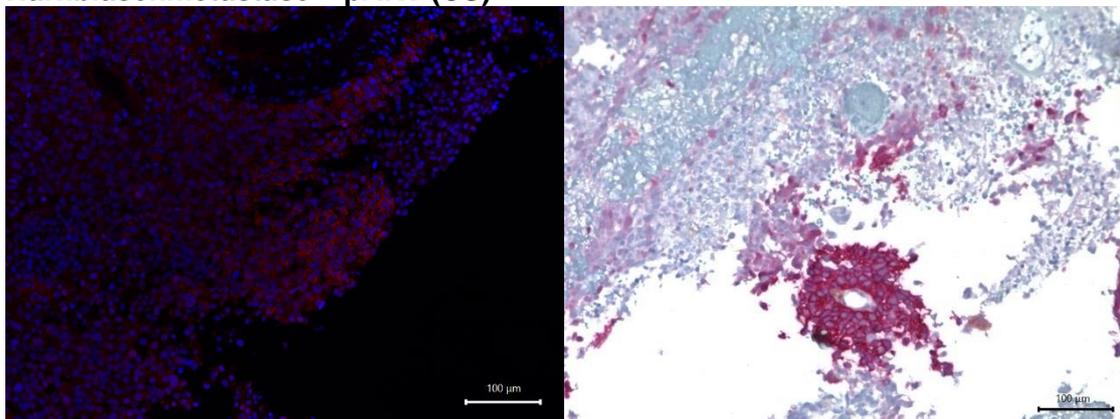
Overlay: 1/20 sek DAPI, 1/4 sek pAKT

Rot-Braun-Färbung

Abbildung 19: Manuelle IF/IHC von pAKT (CS) am M10 Zellblock

Der M10 Zellblock zeigt bei gleicher Belichtungszeit von 1/4 sek bei pAKT im Vergleich zu den DDPoro26 Blöcken eine intensivere Färbung, sowohl in der Immunfluoreszenz als auch in der Rot-Braun-Färbung der Pathologie (siehe Abbildung 19). Die DAPI-Färbung weist hierbei eine Belichtungszeit von 1/20 sek auf.

Harnblasenmetastase – pAKT (CS)



Overlay: 1/10 sek DAPI, 1/4 sek pAKT

Rot-Braun-Färbung

Abbildung 20: Manuelle IF/IHC von pAKT (CS) an einer Harnblasenmetastase

Auch das Gewebe der Harnblasenmetastase soll, wie zu Beginn erwähnt, eine starke Expression von pAKT besitzen und somit eine intensivere Färbung als die DDPoro26 Zellblöcke aufweisen. Die Immunfluoreszenz Ergebnisse in Abbildung 20 unterschieden sich dabei von den Ergebnissen der Rot-Braun-Färbung und wiesen in der IF insgesamt

ein schwächeres Signal auf als in der Rot-Braun-Färbung. Die Belichtungszeit beträgt hier für pAKT 1/4 sek und für DAPI 1/10 sek. Außerdem zeigen Gesamtaufnahmen des Gewebes bzw. auch die Abschnitte, welche in Abbildung 20 zu sehen sind, dass nur Zellen vereinzelter Regionen des Gewebes pAKT positiv sind.

5.9 Manuelle IHC von pERK und (p)AKT an den Zellböcken MCF7 (DMSO und Trametinib + Alpelisib) sowie an den Zellblöcken M10 (DMSO und Trametinib + Alpelisib)

Bei dieser manuellen Färbung ging es darum, die Zellblöcke der MCF7 und M10 Zellen, welche zuvor mit Trametinib und Alpelisib behandelt wurden, auf pERK sowie pAKT und AKT zu testen. Aufgrund der Ergebnisse aus dem Western Blot in 5.6 wurden die MCF7 Zellblöcke als Positiv- und Negativkontrolle für pERK ausgewählt und die M10 Zellen für die Färbung von pAKT und AKT. Für jedes Protein wurden jeweils zwei verschiedene Antikörper verwendet und es sind jeweils die Overlays aus DAPI und Antikörperfärbung zu sehen.

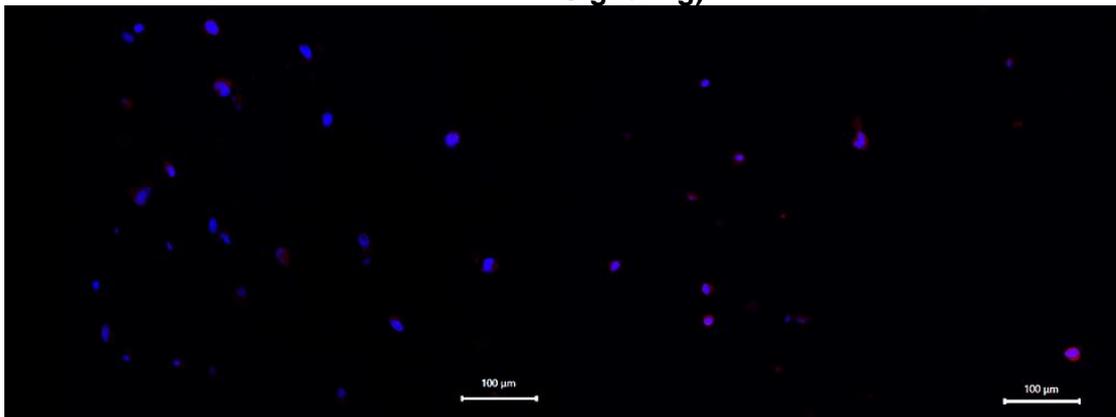
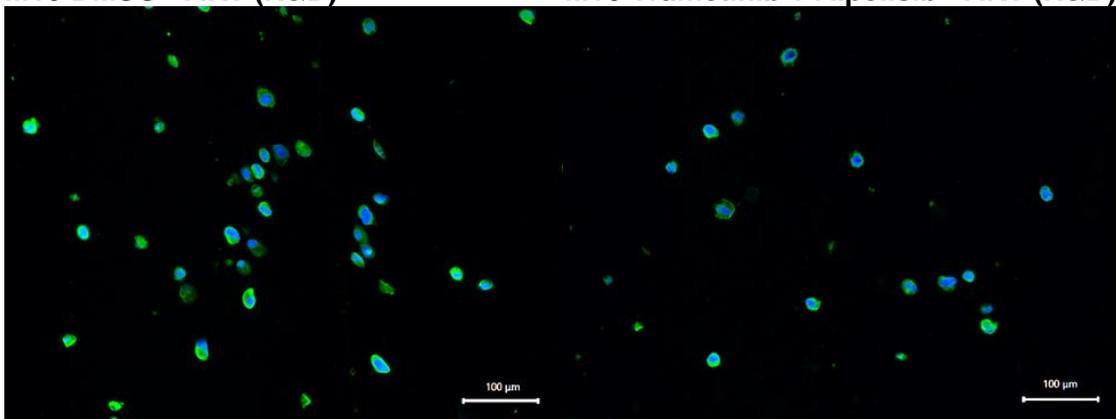
M10 DMSO - AKT (Cell Signaling)**M10 Trametinib + Alpelisib - AKT (Cell Signaling)****Overlay – DAPI 1/30 sek, AKT 1/10 sek****Overlay – DAPI 1/30 sek, AKT 1/10 sek****M10 DMSO - AKT (R&D)****M10 Trametinib + Alpelisib - AKT (R&D)****Overlay – DAPI 1/30 sek, AKT 1/10 sek****Overlay – DAPI 1/30 sek, AKT 1/10 sek**

Abbildung 21: Manuelle IHF von AKT der Firmen Cell Signaling und R&D an M10 DMSO und Trametinib + Alpelisib

Die AKT Färbung (Abbildung 21) erwies sich vor allem bei dem Antikörper von R&D als erfolgreich. Zum Vergleich wurden alle Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von 1/10 sek aufgenommen. Für diese BZ (Belichtungszeit) weist der Cell Signaling Antikörper nur sehr geringe Signale auf. Der Antikörper von R&D zeigt bei gleicher BZ insgesamt starke Signale.

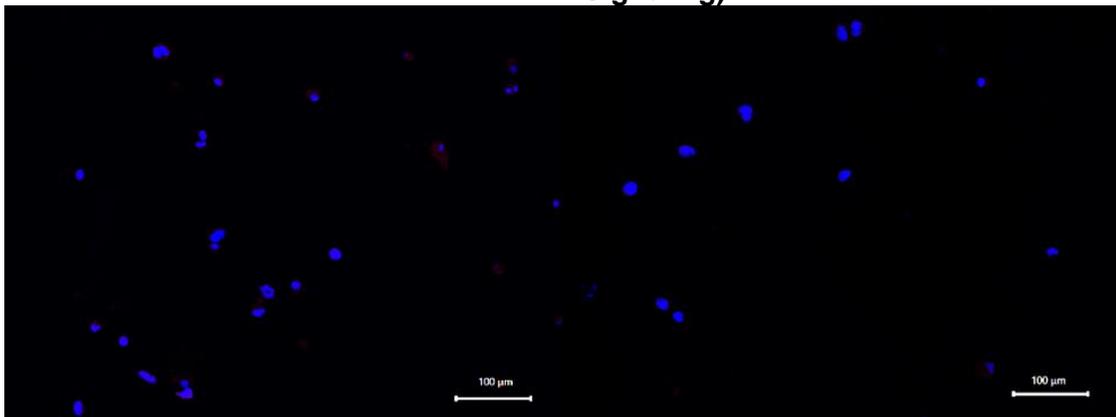
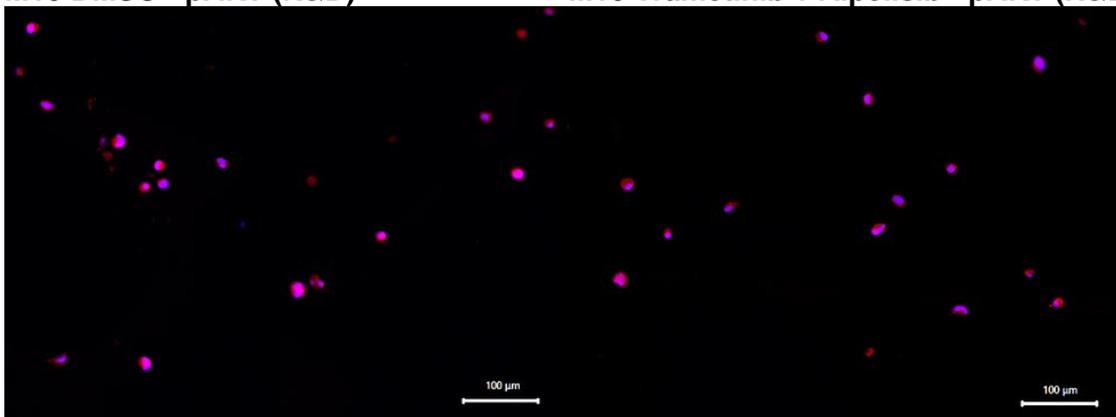
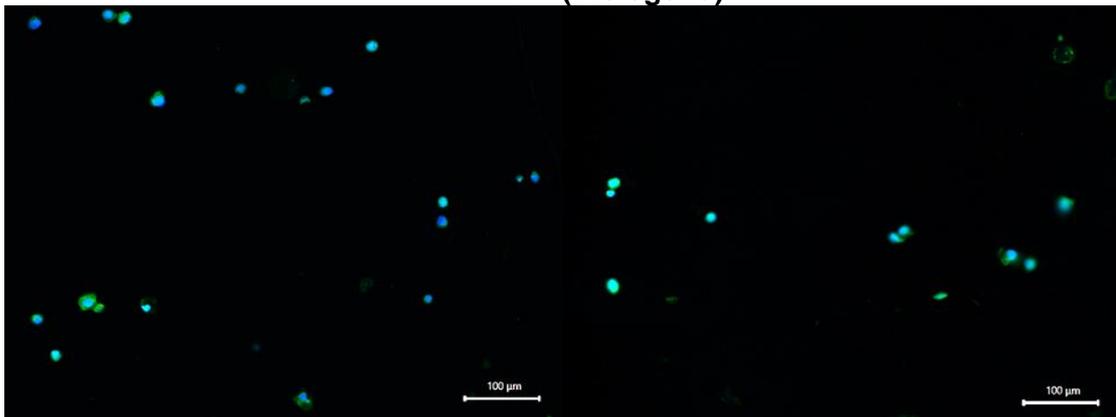
M10 DMSO - pAKT (Cell Signaling)**M10 Trametinib + Alpelisib - pAKT (Cell Signaling)****Overlay – DAPI 1/30 sek, pAKT 1/10 sek****Overlay – DAPI 1/30 sek, pAKT 1/10 sek****M10 DMSO - pAKT (R&D)****M10 Trametinib + Alpelisib - pAKT (R&D)****Overlay – DAPI 1/30 sek, pAKT 1/10 sek****Overlay – DAPI 1/30 sek, pAKT 1/10 sek**

Abbildung 22: Manuelle IHF von pAKT der Firmen Cell Signaling und R&D an M10 DMSO und Trametinib + Alpelisib

Die pAKT Färbung (Abbildung 22) zeigt mit dem Antikörper von R&D intensivere Signale als mit dem Antikörper von Cell Signaling, zum besseren Vergleich wurde wieder die gleiche BZ von 1/10 sek verwendet. Bei beiden Proben ist zudem kein Unterschied zwischen DMSO und Inhibitor Zellblock zu erkennen, bzw. sind bei der Färbung mit dem Cell Signaling Antikörper keine Signale wahrnehmbar.

MCF7 DMSO - pERK (Biolegend)

MCF7 Trametinib + Alpelisib - pERK (Biolegend)

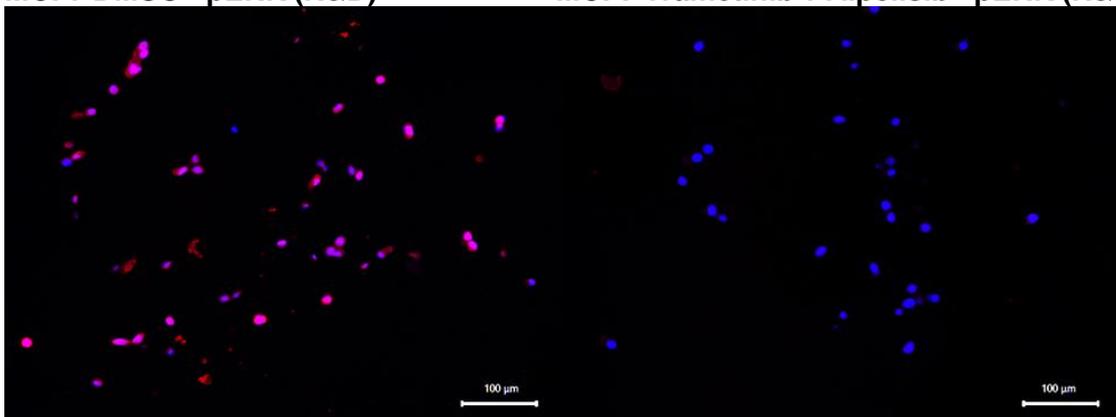


Overlay – DAPI 1/30 sek, pERK 1/4 sek

Overlay – DAPI 1/30 sek, pERK 1/4 sek

MCF7 DMSO - pERK (R&D)

MCF7 Trametinib + Alpelisib - pERK (R&D)



Overlay – DAPI 1/30 sek, pERK 1/4 sek

Overlay – DAPI 1/30 sek, pERK 1/4 sek

Abbildung 23: Manuelle IHF von pERK der Firmen Biolegend und R&D an MCF7 DMSO und Trametinib + Alpelisib

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der pERK Färbung an den MCF7 Zellblöcken mit den Antikörpern von Biolegend und R&D zu sehen. Auch hier wurde die Belichtungszeit von 1/4 sek für alle Aufnahmen übernommen. Beide Antikörper weisen laut Färbung pERK positive Zellen auf. Biolegend zeigt dabei in beiden Proben, DMSO und mit Inhibitoren, gleichstarke Signale und entspricht damit nicht dem Western Blot Resultat aus 5.6. R&D besitzt stattdessen zwischen DMSO und Inhibitor Kontrolle einen deutlichen Unterschied. MCF7 DMSO zeigt sehr starke Signale wohingegen MCF7 Trametinib + Alpelisib keine Signale aufweist.

5.10 Manuelle IHC von EGFR an den Zellböcken DDPoro26 DMSO und WM3734, sowie IGFR an den Zellblöcken M10 siIGFR und M10 siSCR

Für diesen Versuch wurde statt den phosphorylierten Proteinen von IGFR und EGFR, siehe 5.7, die unphosphorylierten Varianten der Proteine an verschiedenen Zellblöcken gefärbt. Dabei ist DDPoro26 DMSO als Positivkontrolle für EGFR angesetzt und WM3734 DMSO als Negativkontrolle. WM3734 und DDPoro26 zeigten in vorherigen Experimenten deutliche Unterschiede an der Expression von EGFR im Western Blot. Für EGFR wurden die Antikörper der Firmen Cell Signaling und R&D Systems getestet. Bei den M10 Blöcken handelt es sich um ältere Präparate, bei denen mit den Zellen vor der Zellblockherstellung eine Transfektion mit siRNA durchgeführt wurde. In diesem Versuch gilt der siSCR Block als Positivkontrolle und der siIGFR Block als Negativkontrolle. Es sind jeweils die Overlays zu sehen, welche die DAPI Färbung sowie die antikörperspezifischen Färbungen vereint.

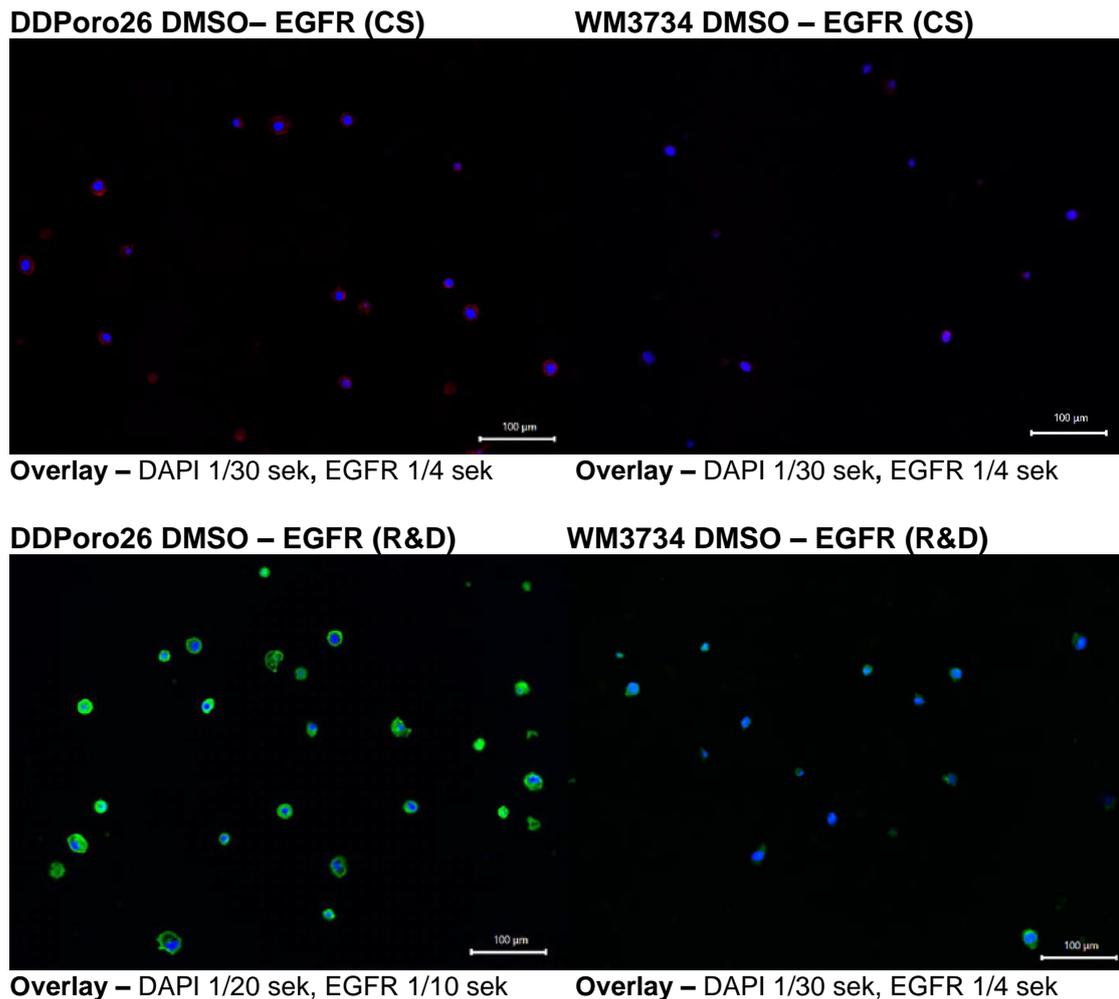


Abbildung 24: Manuelle IF von EGFR (CS und R&D) an den Zellblöcken DDPoro26 und WM3734 DMSO

Im direkten Vergleich lässt sich aus Abbildung 24 entnehmen, dass der Antikörper von R&D insgesamt eine intensivere Färbung aufweist als der Antikörper von Cell Signaling. Dabei zeigt der R&D EGFR Antikörper bei der DDPoro26 DMSO Kontrolle mit einer Belichtungszeit von 1/10 sek ein sehr starkes Signal. Betrachtet man die Intensitäten zwischen DDPoro26 DMSO und WM3734 DMSO ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. WM3734 besitzt sowohl bei dem Cell Signaling Antikörper als auch bei dem R&D Antikörper nur schwache Signale.

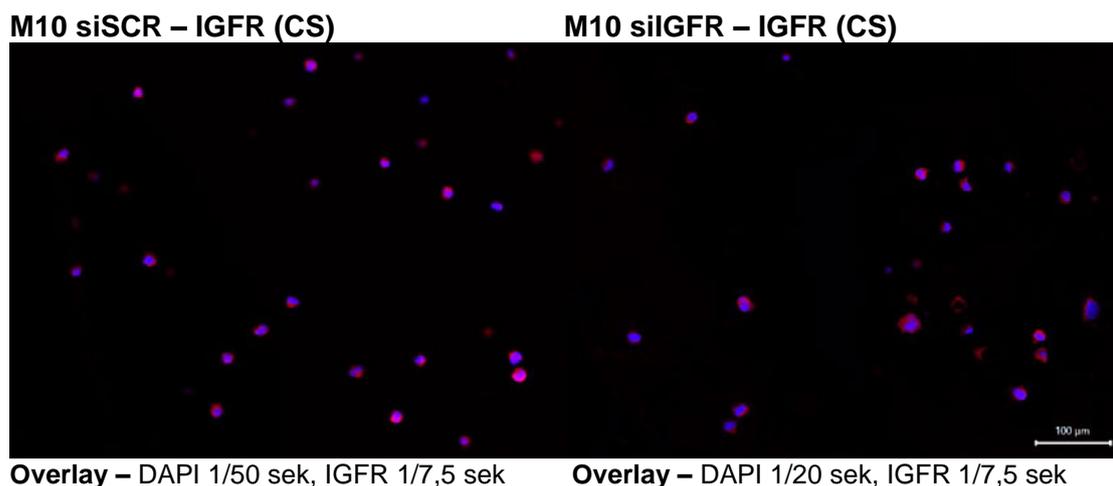


Abbildung 25: Manuelle IHF von IGFR (CS) an den Zellblöcken M10 siIGFR und M10 siSCR

In den Ergebnissen der IGFR Färbung an den mit siRNA behandelten M10 Zellblöcken in Abbildung 25 sind in beiden Proben IGFR positive Zellen sichtbar und die Intensitäten unterscheiden sich nicht. Nach den Erwartungen vor dem Versuch, sollten aufgrund des Knockdowns durch die siRNA in dem M10 siIGFR Zellblock keine Signale an IGFR zu sehen sein, was hier jedoch nicht bestätigt wird. Die Belichtungszeit beträgt 1/7,5 sek für IGFR und 1/20 bzw. 1/50 sek für DAPI.

5.11 Manuelle IHC von (p)IGFR an den Zellblöcken MCF7 siIGFR und MCF7 siSCR

Für diese Färbung wurden die neu hergestellten MCF7 Zellblöcke verwendet, welche mit siRNA und dem Transfektionsreagenz Lipofectamine behandelt wurden. Es wurde pIGFR und IGFR gefärbt, jeweils mit dem Antikörper von Cell Signaling. Die Färbung von pIGFR zeigte keine Signale. In Abbildung 26 sind aus diesem Grund nur die Ergebnisse der IGFR Färbung dargestellt. Beide Bilder zeigen das Overlay aus DAPI- und IGFR-Färbung.

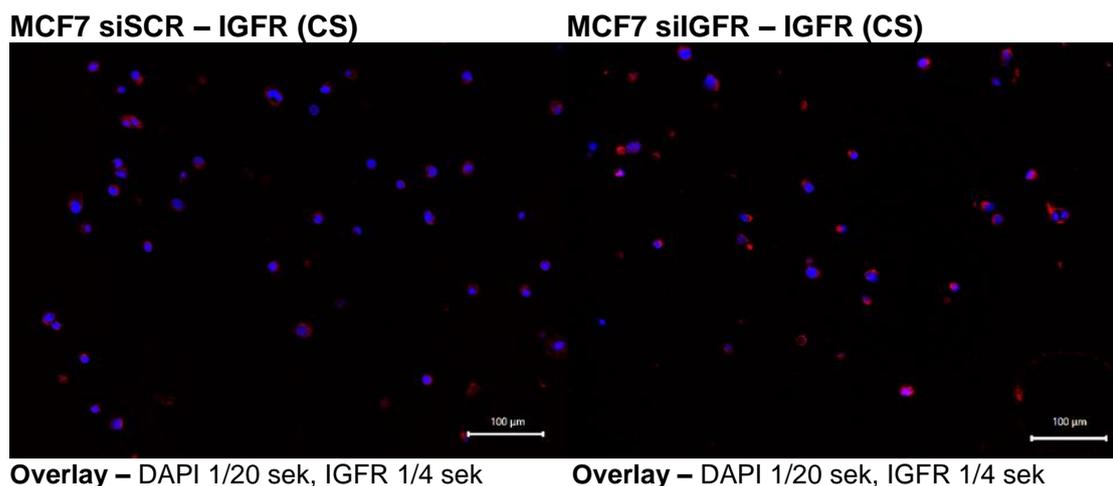


Abbildung 26: Manuelle IHF von IGFR (CS) an den Zellblöcken MCF7 siIGFR und MCF7 siSCR

Aufgrund des siRNA Knockdowns sollten in der siIGFR keine bzw. schwache Signale zu sehen sein. Gegensätzlich dazu sind jedoch sowohl in der siSCR und in der siIGFR Probe IGFR positive Zellen vorhanden. Dabei weist die siIGFR Probe sogar eine intensivere Signalstärke auf. Die Belichtungszeit beträgt 1/4 sek für die IGFR Färbung.

5.12 Manuelle IHC von (p)IGFR, pAKT und pERK an den Zellblöcken MCF7 (siIGFR + siSCR), sowie M10 und DDPoro65 (Pervanadate + Control)

Diese Färbung an den mit Pervanadate behandelten DDPoro65 Zellblöcken, welche eine Stabilisierung der Phosphoproteine bewirkt, sowie der MCF7 Zellblöcke siIGFR und siSCR diente vor allem der Überprüfung der neuen Antikörper für pIGFR und IGFR von dem Hersteller R&D Systems für ihre Eignung in der IHC. Aber auch die Antikörper für pAKT und pERK von R&D wurden mitlaufend an den neuen M10 Pervanadate Zellblöcken gefärbt. Die Ergebnisse der Färbung sind in den folgenden Abbildungen 27-30 zu sehen, dabei handelt es sich um das Overlay aus DAPI- und Antikörper-Färbung.

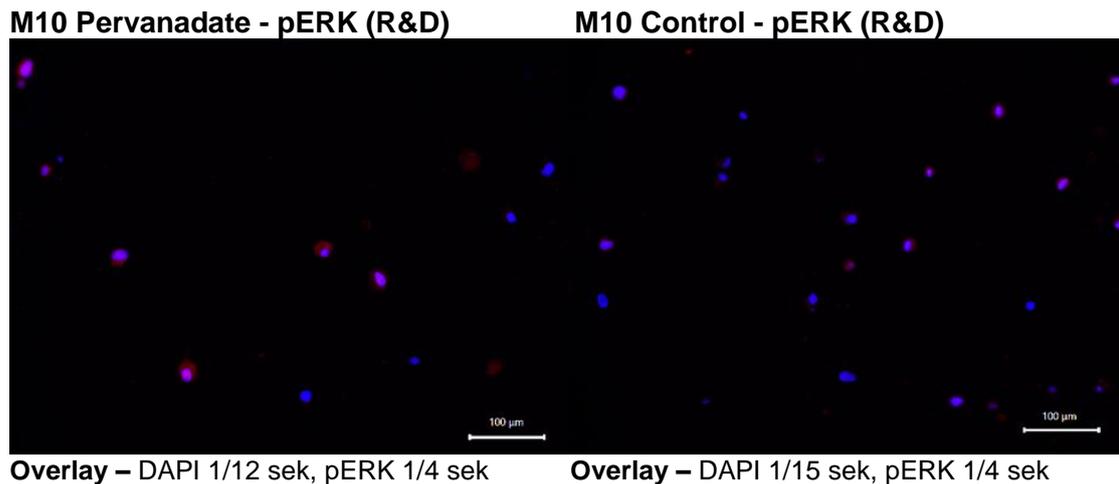


Abbildung 27: Manuelle IHF von pERK (R&D) an den Zellblöcken M10 Control und M10 Pervanadate

Die Ergebnisse der pERK Färbung zeigen zwischen M10 Pervanadate und Kontrolle keinen großen Unterschied in ihrer Signalstärke. Insgesamt sind die Signale für eine Belichtungszeit von 1/4 sek auch bei der Pervanadate Probe nicht von starker Intensität geprägt.

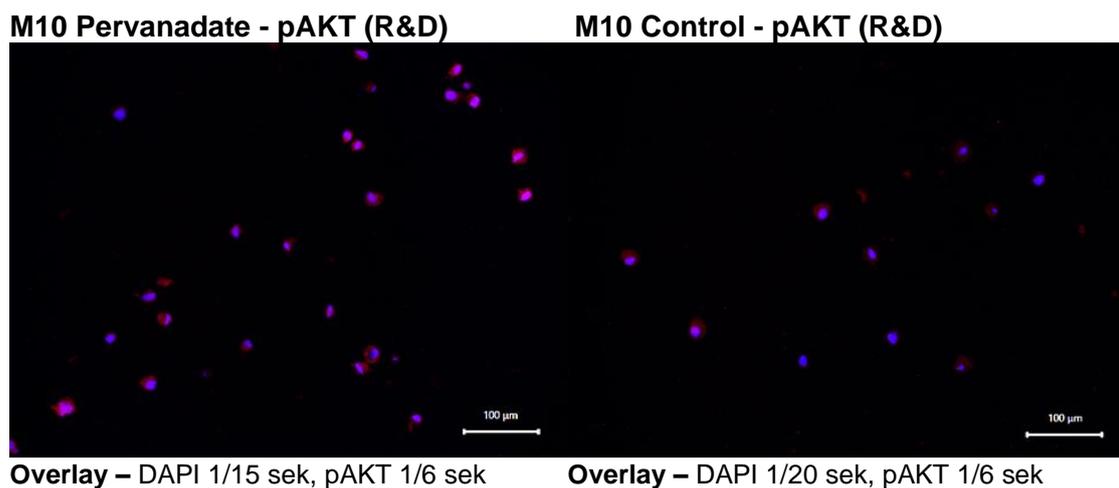


Abbildung 28: Manuelle IHF von pAKT (R&D) an den Zellblöcken M10 Control und M10 Pervanadate

Auch die pAKT Färbung mit dem Antikörper von R&D Systems zeigt zwischen Pervanadate und Kontroll-Zellen keinen deutlichen Unterschied in der Stärke der Signale. Es scheint sogar, dass M10 Control eine etwas stärkere Intensität der Färbung aufzuweisen hat. Dabei wurde hier für 1/6 sek belichtet.

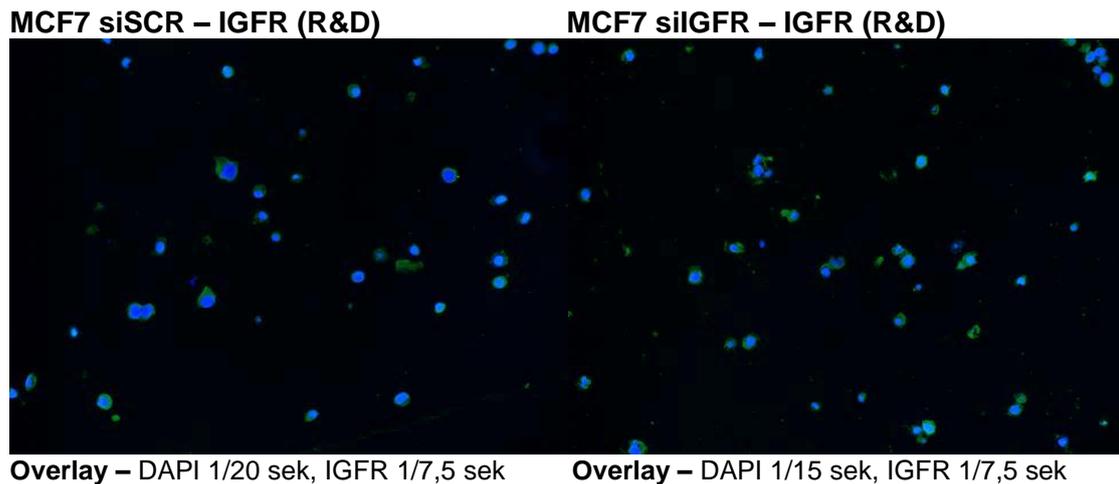


Abbildung 29: Manuelle IHF von IGFR (R&D) an den Zellblöcken MCF7 siIGFR und MCF7 siSCR

Für diese Färbung wurde der neue IGFR Antikörper der Firma R&D Systems verwendet. Es zeigt sich bei 1/7,5 sek BZ kein großer Unterschied zwischen siIGFR und siSCR Probe, dafür ist die BZ bei gleicher Stärke der Signale höher als im Versuch 5.11, wo der IGFR Antikörper der Firma Cell Signaling an den MCF7 Zellblöcken verwendet wurde.

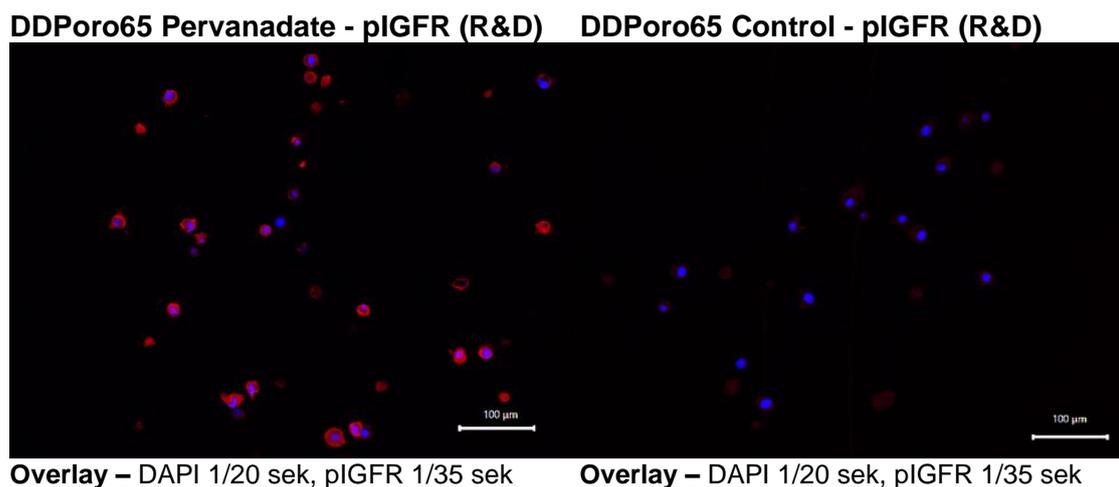


Abbildung 30: Manuelle IHF von pIGFR (R&D) an den Zellblöcken DDPoro65 Control und DDPoro65 Pervanadate

Für die Färbung von pIGFR wurden aufgrund der Western Blot Ergebnisse aus 5.6 die Zellblöcke DDPoro65 Pervanadate und Kontrolle ausgewählt. Dabei handelt es sich bei dem pIGFR Antikörper um einen neuen Antikörper der Firma R&D Systems. Auffällig ist der Unterschied zwischen Kontrolle und Pervanadate Probe. Die Pervanadate Probe besitzt bei einer vergleichsweise geringen Belichtungszeit von 1/35 sek eine sehr starke intensive Färbung der Zellen. Dabei liegt die BZ der Antikörper-Färbung erstmals unter

der DAPI Färbung. Selbst die Kontroll-Probe erreichte bei einer BZ von 1/15 sek eine hohe Signalstärke (siehe Anhang 1).

5.11 Konjugation der Antikörper MelanA, HMB45, Connexin43 und GRB10 sowie pAKT und AKT

Konnte die Nutzbarkeit und Spezifität der Antikörper in der Immunhistochemie festgestellt werden, wurden diese Antikörper mit dem für die Multiplexfärbung benötigten Oligonukleotid konjugiert.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen anhand einer Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie Färbung, und wenn nötig einer Silber-Färbung, ob die Konjugation der Antikörper MelanA, HMB45, Connexin43, GRB10, pAKT, AKT und EGFR erfolgreich war. Es sind jeweils der unkonjugierte und konjugierte Antikörper nebeneinander aufgetragen. Ein Shift der Banden zeigt eine erfolgreiche Konjugation an, da die konjugierten Antikörper ein höheres Molekulargewicht aufweisen.

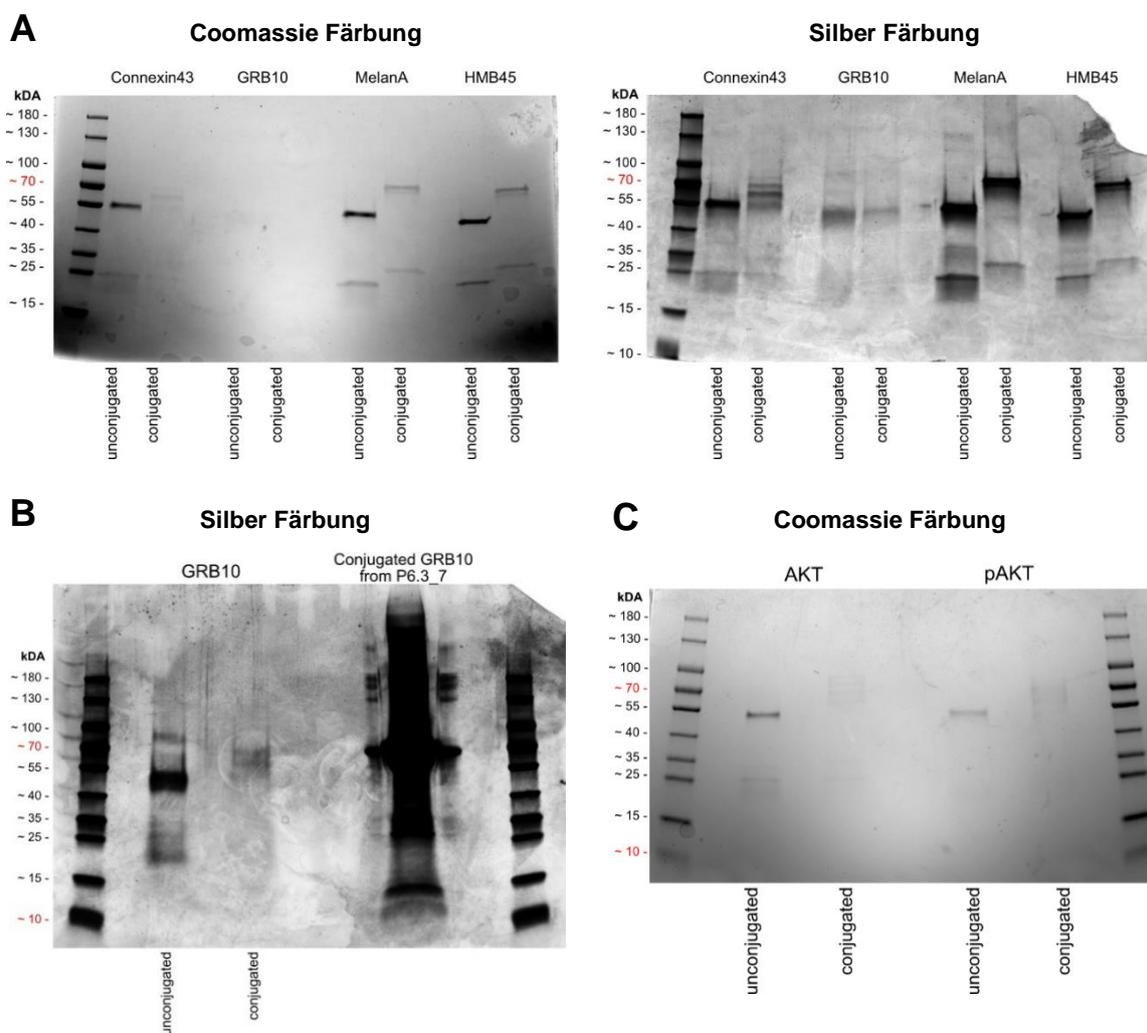


Abbildung 31: Gel der Konjugation von MelanA, HMB45, Connexin43, GRB10 (A/B), pAKT und AKT (C) nach Coomassie- bzw. Silber-Färbung

In Abbildung 31 sind alle Gelbilder zusammengefasst. In A ist die Coomassie- sowie Silberfärbung des Gels für die Validierung von MelanA, HMB45, GRB10 und Connexin43 abgebildet. In der Coomassie Färbung sind deutliche Banden von MelanA und HMB45, sowohl in unkonjugierter als auch in der konjugierten Probe zu erkennen. Die unkonjugierten oberen Banden liegen bei ca. 55 kDA (schwere Antikörperkette) und die unteren Banden bei ca. 25 kDA (leichte Antikörperkette). In der konjugierten Probe ist jeweils ein Shift der Banden zu erkennen, die oberen Banden liegen bei ca. 70-80 kDA und die unteren bei ca. 35 kDA. Connexin43 zeigt bei der Coomassie-Färbung ebenfalls Banden, hier sind die der konjugierten Probe jedoch nicht so intensiv wie bei MelanA und HMB45. GRB10 zeigt keine Banden in der Färbung mit Coomassie. Aus diesem Grund wurde für eine höhere Sensitivität die Silberfärbung durchgeführt. In der Silberfärbung sind die Banden von MelanA und HMB45 von noch stärkerer Intensität. Auch Connexin43 zeigt in der unkonjugierten Probe in der Silberfärbung stärkere Banden. Die untere Bande weist keinen Shift auf. Die obere Bande hingegen zeigt einen Shift der Bande und sogar eine Unterteilung dieser. GRB10 weist in der Silberfärbung zwar Banden auf, diese sind aber von geringer Intensität und es ist jeweils nur die obere Bande zu sehen und kein Shift erkennbar. In B wurde deshalb die Konjugation von GRB10 nochmals wiederholt, diesmal nach der Methode „Konjugation eines Antikörpers mit Akoya Kit“. Da in der Coomassie Färbung keine Banden zu sehen waren, ist nur die Silberfärbung in der Abbildung dargestellt. In dem Gel ist außerdem noch der nicht erfolgreich konjugierte GRB10 Antikörper der Konjugation aus A aufgetragen, dieser zeigt aufgrund der „*Antibody Stabilizer Solution*“, welche zusätzlich stabilisierende Proteine enthält, eine Vielzahl an unspezifischen Banden. In der Silberfärbung sind bei dem unkonjugierten Antikörper die obere und untere Bande sichtbar. Über der oberen zu erwartenden Bande ist zudem eine undefinierte Bande auf der Höhe von 100 kDA wahrnehmbar. Die konjugierte Probe zeigt im Gegensatz zur Coomassie-Färbung in der Silber-Färbung 2 schwächere Banden, die einen Shift zur unkonjugierten oberen Bande aufweisen und zwischen 55 und 70 kDA liegen. Bild C zeigt die Ergebnisse der Konjugation von pAKT und AKT. Hier waren nach der Färbung mit Coomassie in jeder Probe Banden sichtbar. Bei AKT unkonjugiert sind obere und untere Bande abgebildet, wobei die konjugierte Probe zu jeder Bande einen schwach erkennbaren geteilten Shift aufweist. Auch pAKT zeigt in der konjugierten Probe einen geteilten Shift zur oberen Bande der unkonjugierten Probe.

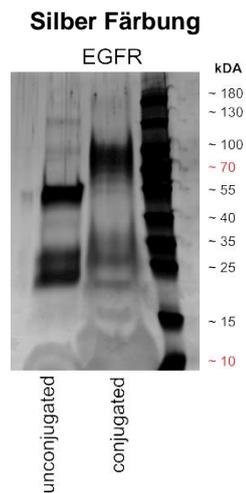


Abbildung 32: Gel der Konjugation von EGFR nach der Silber-Färbung

Auch der Antikörper gegen EGFR von der Firma R&D Systems wurde, wie in Abbildung 32 zu sehen ist, konjugiert und es ist ein deutlicher Shift in der Silber Färbung zwischen unkonjugierter und konjugierter Probe zu sehen. Diese Konjugation wurde dabei von Herrn Dr. med. André Sagerer durchgeführt.

5.12 CODEX Färbung an einer Harnblasenmetastase mit den Markern (p)ERK, (p)AKT, Ki67, CD3, CD8, CD20, CD34, CD68, HMB45, MelanA, Connexin43, GRB10, PAK1, GranzymB, PD-1, PD-L1

Nach der erfolgreichen Konjugation der Antikörper konnten diese nun in einem CODEX Lauf getestet werden. Hierfür wurde das Gewebe einer Harnblasenmetastase ausgewählt, welches auch in 5.8 verwendet wurde. Die CODEX Färbung beinhaltet nicht nur die neu etablierten pAKT, AKT, pERK und ERK Marker, sondern auch schon etablierte Marker bzw. Marker, die noch nicht in einem CODEX Lauf getestet wurden, aber auch konjugiert wurden. Dies sind Ki67, CD3, CD8, CD20, CD34, CD68, HMB45, MelanA, Connexin43, GRB10, PAK1, GranzymB, PD-1 sowie PD-L1. Insgesamt wurden sechs verschiedene Regionen des Gewebeschnitts aufgenommen. In den nächsten Abbildungen sind zwei dargestellt (Region 3 und Region 4), welche die besten Ergebnisse zeigten.

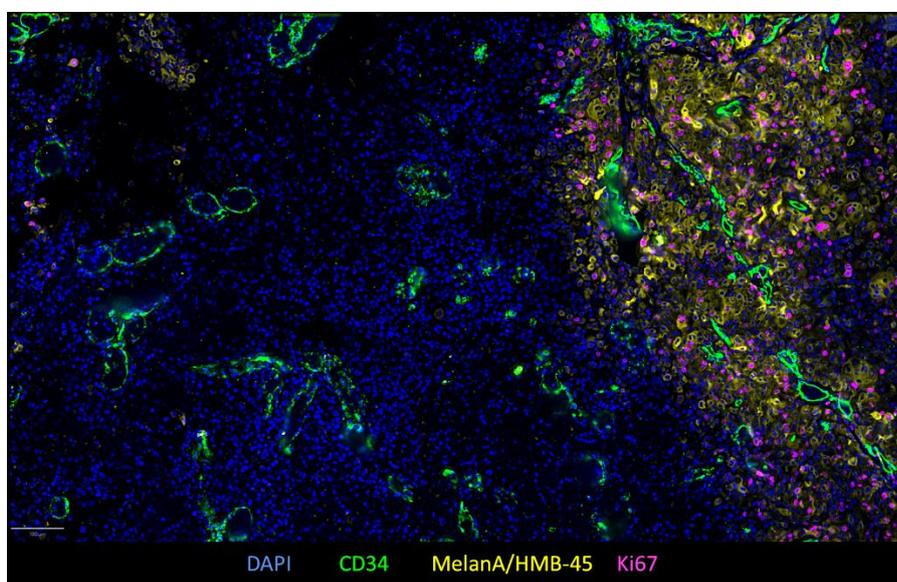


Abbildung 33: CODEX Färbung der Harnblasenmetastase Region 3 (DAPI, CD34, MelanA/HMB45 und Ki67) Die Länge des Maßbalkens in weiß entspricht 100 µm.

Zu sehen ist in Abbildung 33 die Region 3 mit den Markern CD34, MelanA/HMB45, Ki67, sowie DAPI für die Zellkerne. CD34 in grün kennzeichnet die Blutgefäße. MelanA und HMB45 in gelb dienen als Marker für Melanomzellen. Ki67 ist ein Proliferationsmarker und in magenta im Bild erkennbar. Auffällig ist, dass die MelanA und HMB45 positiven Zellen zudem vermehrt Ki67 positiv sind. Es ist anhand der Tumormarker außerdem eine Abgrenzung zu MelanA/HMB45 negativen Zellen sichtbar, wobei diese Zellen auch kein Ki67 aufweisen. CD34 ist im gesamten Gewebe der Region verteilt.

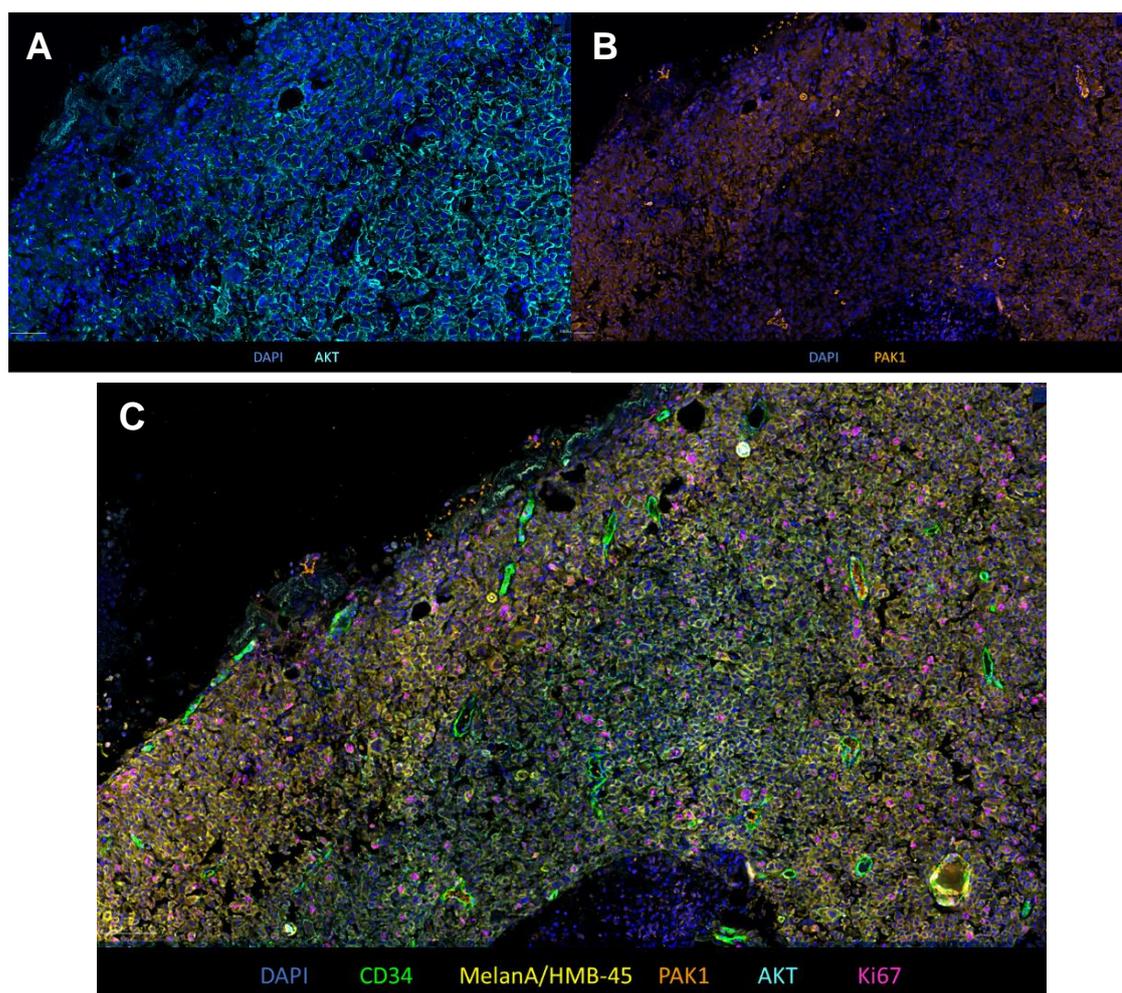


Abbildung 34: CODEX Färbung der Harnblasenmetastase Region 4: A mit DAPI und AKT; B mit DAPI und PAK1; C mit DAPI, AKT, PAK1, CD34, MelanA/HMB45 und Ki67. Die Länge des Maßbalkens in weiß entspricht 100 μ m.

In dieser Region 4 des Harnblasenmetastasengewebes (siehe Abbildung 34) sind 3 verschiedene Färbemuster zu sehen. In A ist nur DAPI und AKT im Gewebeschnitt dargestellt, dabei ist die Färbung besonders an der Zellmembran ausgeprägt. Auch PAK1 ist in B einzeln im Gewebe zusammen mit DAPI dargestellt, es deckt sich in C mit MelanA/HMB45 positiven Zellen ab, und scheint in der Tumorregion vermehrt vorzukommen. In C sind alle Marker dargestellt, welche in diesem CODEX Lauf erfolgreich gefärbt werden konnten. Es vereint DAPI, AKT, PAK1, CD34, MelanA/HMB45 und Ki67 miteinander. Auffallend ist wieder die hohe Anzahl an Ki67 positiven Zellen in der Tumorregion. CD34 ist wieder über die ganze Region verteilt und in seiner kreisförmigen bis länglichen Form in grün kenntlich. Die Marker pERK, ERK, pAKT, CD3, CD8, CD20, CD34, CD68, Connexin43, GRB10, GranzymB, PD-1 sowie PD-L1 zeigten in diesem Lauf keine spezifischen Signale.

6 Diskussion

Der folgende Abschnitt befasst sich mit der Analyse der Ergebnisse und der Erörterung möglicher Fehlerquellen.

6.1 Western Blot der DDPoro26 Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren

Die Ergebnisse des Western Blots mit den DDPoro26 Zellen zeigten, dass die direkte Lyse der Zellen zu einer höheren Menge an Phosphoproteinen führten als mit der Lyse nach dem Ablösen. Auf die Expression der unphosphorylierten Proteine hatte die Lyse nach dem Ablösen der Zellen keinen negativen Einfluss. Aber nicht nur die verschiedenen Lyseformen, sondern auch die Inhibitoren zeigten ihre erwartete Wirkung auf die Phosphoproteinmenge. Die Phosphorylierung von Proteinen ist wichtig für die Regulation zellulärer Prozesse, da Enzyme und Rezeptoren durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung entweder aktiviert oder inaktiviert werden. Insbesondere Proteinkinasen sind somit für die zelluläre Signaltransduktion verantwortlich, und ihre Überaktivität, Fehlfunktion oder Überexpression kann zum Beispiel bei Tumorerkrankungen festgestellt werden. Sogenannte Kinase-Inhibitoren können die Aktivität der Kinasen und somit deren Aktivierung bestimmter Signalwege herunterregulieren und bilden somit einen Ansatzpunkt für die Behandlung von Krebs (Ardito & Giuliani, 2017). Der Kinase Inhibitor NVP-AEW541 wirkt gegen IGF-1R, Cetuximab ist ein Inhibitor gegen den EGF-Rezeptor und bei Trametinib handelt es sich um einen MEK-Inhibitor. Da MEK im MAPK-Signalweg vor ERK geschaltet ist, wirkt sich dieser Inhibitor auch auf die Expression von pERK aus (Hoffner & Benchich, 2018). Im Blot sind daher bei den Proben mit Inhibitor bei den phosphorylierten Proteinen keine Banden bzw. nur schwache Banden zu sehen. Auf die unphosphorylierten Proteine haben die Inhibitoren keinen Einfluss, da die unphosphorylierte Variante auch vorliegt, wenn ein Signalweg nicht aktiv ist.

DDPoro26 ist eine Zelllinie, die aus einem Porokarzinom etabliert wurde. Porokarzinome sind seltene Hautkrebsformen und entstehen in den ekkrinen Schweißdrüsen. Da ihre Therapiemöglichkeiten noch sehr beschränkt sind, besitzen sie oftmals eine hohe Mortalität. Für die Etablierung der Antikörper gegen die phosphorylierten Proteine von besonders EGFR und ERK zeigten vorherige Tests mit einer anderen DDPoro Zelllinie, dass eine Hochregulierung des EGFR und MAPK-Signalwegs vorliegt und sich Porokarzinomzelllinien daher für Versuche mit diesen Antikörpern eignen (Westphal & Garzarolli, 2021). Für die Herstellung eines Zellblocks aus den DDPoro26 Zellen zeigt

der Western Blot nach diesem Protokoll jedoch noch keine Eignung. Für den Zellblock wird eine Lyse nach dem Ablösen der Zellen benötigt, wobei in diesem Fall die Zellen nach diesem Prozess keine Phosphoproteine mehr exprimieren. Daher wurde für die Zellblockherstellung das Protokoll angepasst und die Ergebnisse aus der Herstellung nochmals in einem Western Blot im nächsten Experiment veranschaulicht.

6.2 Western Blot behandelter DDPoro65b Zellen und DDPoro26 Zellen für Zellblock

Die Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass die Protokolländerung erfolgreich für die Zellblockherstellung war. Dabei wurde der Ablösevorgang optimiert, welcher im ersten Versuch wahrscheinlich die Ursache für die Ergebnisse im Western Blot war. Nachdem sich die Zellen im ersten Versuch nach einer 20-minütigen Inkubation mit EDTA nicht ablösten, wurde Accutase hinzugegeben. Im optimierten Protokoll wurde stattdessen die „*detach solution*“ verwendet, die neben EDTA und Accutase noch die Liganden IGF und EGF zur anhaltenden Stimulation enthielt, wie in Methode 4.1.3 beschrieben. Aufgetragen sind hier neben den Zellproben der DDPoro26 Zellblöcke (DDPoro26 DMSO und DDPoro26 Inhibitors) auch die Proben der DDPoro65 Zelllinie. Der Vergleich der beiden Linien macht deutlich, dass DDPoro26 besonders bei den phosphorylierten Varianten von IGFR und EGFR höhere Expressionen aufweist. Mit der GAPDH Detektion konnte dabei gezeigt werden, dass die Unterschiede in der Expressionsstärke nicht durch eine ungleiche Proteinkonzentration in den Taschen entstanden sind. Es zählt zu den sogenannten "*housekeeping proteins*", welche wichtig für grundlegende zelluläre Funktionen sind und daher ihre Expression in jedem Zelltyp eines Organismus erwartet wird (URL-3). Die Intensität einer Bande ist dabei direkt proportional zu der Konzentration des jeweiligen Proteins. Weist eine Bande ein starkes Signal auf, deutet dies ebenfalls auf eine erhöhte Menge in der Probe und somit auf eine verstärkte Expression im Organismus hin (URL-4). Bei DDPoro26 Inhibitors (schwache bis keine Bandensignale) sind die Phosphoproteine somit deutlich reduziert und bei der DMSO-Kontrolle stärker exprimiert. Aus diesem Grund stellen sich die Zellblöcke als gute Positiv- und Negativkontrolle für die Phosphoproteine heraus.

6.3 Western Blots behandelter MCF7 und M10 Zellen zur Herstellung von Positiv- und Negativkontrollen für pERK, (p)AKT sowie (p)IGFR

Für die Herstellung von weiteren Positiv- und Negativkontrollen gegen pERK, (p)AKT sowie (p)IGFR wurden verschiedene Versuche mit unterschiedlichen

Behandlungsmethoden durchgeführt. Dabei wurden immer die M10 und MCF7 Zellen verwendet. Die M10 Zellen entstammen einer Melanomhirnmetastase, wobei frühere immunhistochemische Analysen ergaben, dass im Gehirn der PI3K/AKT-Signalweg stärker aktiv ist als in extrakraniellen Metastasen. Diese Zelllinie eignet sich daher für die Untersuchung von pAKT. Aber auch AKT, ERK und phosphoryliertes ERK können nachgewiesen werden, weisen jedoch zu extrakraniellen Metastasen keinen signifikanten Unterschied im Expressionslevel auf (Niessner & Schmitz, 2016). Die MCF7 Zelllinie wurde bereits im Jahr 1970 etabliert und ist heute die Brustkrebszelllinie, die weltweit am besten erforscht ist. Eine ihrer wichtigsten Charakteristiken ist die Expression des Östrogenrezeptors (ER) Alpha (Lee & Oesterreich, 2015) und der damit verbundenen Überexpression an IGF1R, welche in ER-positiven Brusttumoren im Vergleich zum normalen Brustepithelgewebe 10- bis 14-fach höher ist (Mauro & Monica, 2001). Aus diesem Grund wurde für den IGF1R Knockdown die MCF7 Zelllinie verwendet. Die M10 Zellen erhielten, wie die DDPoro Zellen eine Behandlung mit dem Inhibitor Trametinib (MEK-Inhibitor), welcher schon bei den DDPoro Zelllinien eine deutliche Herunterregulierung von pERK erzielte. Auch die M10 Zellen sprachen auf diese Behandlung in gewünschter Form an, sodass im Western Blot zwischen Inhibitor- und DMSO-Kontrolle eine Reduzierung an pERK deutlich erkennbar war. Dabei belief sich die Behandlungszeit bei einer Probe auf 2 h und bei einer weiteren auf 24 h. Im direkten Vergleich war der Unterschied nach 2-stündiger Inkubationszeit stärker ausgeprägt als nach 24 h. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Inhibitor nach diesem längeren Zeitraum von 24 h fast vollständig abgebaut ist oder aufgrund verringerter Signaltransduktion das Protein wieder hochreguliert wird, um das Überleben der Zellen zu sichern. Beziehungsweise die Zellen aufgrund der Konfluenz durch eine ungleichmäßige Verteilung im Well die Aktivität der proliferationsfördernden Signalwege herunterfährt, sodass insgesamt weniger Phosphoproteine vorliegen. Zudem wurden die Zellen mit Buparlisib behandelt, einem PI3K-Inhibitor, der in anderen Forschungsergebnissen schon eine erfolgreiche Inhibierung der AKT-Phosphorylierung zeigte (Niessner & Schmitz, 2016). Daher sollte auch hier im Western Blot in der Inhibitor Kontrolle keine Bande zu sehen sein, bzw. eine Reduzierung ihrer Intensität. Bei Buparlisib zeigte sich jedoch ein umgekehrtes Ergebnis, die Inhibitor Probe weist ein stärkeres Signal und somit eine höhere Konzentration an pAKT auf als die DMSO-Probe. In dem Artikel von Niessner und Schmitz ist bei gleicher Konzentration von 10 µmol/l Buparlisib eine vollständige Reduzierung des Bandensignals in der M10 Zelllinie wahrnehmbar, weshalb dieses Ergebnis nicht erwartet wurde (Niessner & Schmitz,

2016). Das Vertauschen von DMSO und Inhibitor Probe kann dabei ausgeschlossen werden, da Alpelisib (ein weiterer PI3K-Inhibitor) in Kombination mit Trametinib in einem anderen Versuch bei den M10 sowie MCF7 Zellen das gleiche Ergebnis nach 4-stündiger Inkubation erzielte. Buparlisib zählt zu den Pan-Klasse I PI3K-Inhibitoren, welche alle vier Isoformen von p110 als Target besitzt. Alpelisib hingegen ist ein Isoformspezifischer PI3K-Inhibitor gegen p110 α . Durch seine Isoform Spezifität weist Alpelisib eine geringere Toxizität auf und ermöglicht eine höhere Dosierung. Da es wie gesagt aber nur gegen p110 α wirkt, könnte bei Alpelisib eine mögliche Ursache für das umgekehrte Ergebnis die Aktivierung der AKT/mTOR Signalgebung über p110 β sein (LoRusso, 2016). Für Buparlisib wäre ebenfalls ein Verbrauch des Inhibitors bzw. die erneute Hochregulierung des Proteins zur Überlebenssicherung für das Ergebnis denkbar, besonders, da die Inkubationszeit 24 h betrug. pERK wurde durch Trametinib in beiden Zelllinien wieder erfolgreich herunterreguliert, wobei hier auch die MCF7 Zellen mit einem deutlicheren Unterschied überzeugten. An den MCF7 Zellen wurde zudem der IGF1R Knockdown durchgeführt, wobei spezielle siRNA verwendet wurde. siRNA sind kurze (ca. 21 bp) einzelsträngige Oligonukleotide, welche komplementär zur mRNA-Zielsequenz sind, in diesem Fall zur IGF1R mRNA. Die siRNAs werden in den RNA-induzierten Silencing-Komplex kurz RISC eingebaut und zur Zielsequenz geleitet, wo es zur endgültigen Zerstörung der Ziel-RNA durch den RISC-Komplex kommt. Somit wird die Genexpression wirksam unterdrückt (Back & Manfredi, 2021). Die mit silIGR1R behandelten Zellen sollten somit sowohl keine Expression von pIGFR sowie IGFR im Western Blot aufweisen. Da der Knockdown auf DNA Ebene abläuft und nicht wie bei dem Einsatz von Inhibitoren, welche die Phosphorylierung von Proteinen beeinflussen, wird auch Gesamt-IGFR beeinflusst. Zum Vergleich wurden andere Zellen mit sogenannter „scrambled“ siRNA transfiziert, diese siRNA weist keine komplementären Sequenzen im Zielgenom auf und dient als Positivkontrolle (Han H. , 2018). Für die Transfektion, also das Einschleusen der siRNA in die Zellen, wurden drei verschiedene Transfektionsreagenzien verwendet: DharmaFECT, INTERFERin und Lipofectamine RNAiMax. Es handelt sich bei allen verwendeten Substanzen um Lipid-basierte Transfektionsreagenzien, wobei die siRNA in Liposomen eingeschlossen und über die Zellmembran aufgenommen wird (Carter & Shieh, 2015). Zunächst erfolgte die Transfektion mit DharmaFECT, wobei die Zellen nach der Inkubationszeit sichtlich geschädigt aussahen. Ein gutes Transfektionsreagenz versucht jedoch die höchstmögliche Transfektionseffizienz bei gleichzeitiger Minimierung der Zytotoxizität zu erreichen (URL-5). In einem weiteren Versuch wurden daher alle

Transfektionsreagenzien im Western Blot gegenübergestellt, sowie eine untransfizierte Probe. In jeder siIGFR Probe waren sowohl bei Gesamt-IGFR sowie pIGFR Restsignale zu erkennen, sodass kein kompletter Knockdown stattfand. Allgemein waren die pIGFR Signale ziemlich schwach mit einer 2 min Belichtungszeit. Die Transfektionseffizienz kann dabei von vielen Faktoren beeinflusst werden. Besonders RNA-Oligonukleotide sind anfällig für den Abbau durch exogene Ribonukleasen, welche sich in der Laborumgebung oder auch auf der Haut befinden. Auch die Zelldichte kann Einfluss haben. Sind die Zellen zu dicht bzw. die Zellzahl im Well sehr hoch, kann die Menge an hinzugegebener siRNA für einen effizienten Knockdown zu gering sein (URL-6). Für die Herstellung des Zellblocks war das Ergebnis von Lipofectamine RNAiMax sowohl für IGFR als auch pIGFR jedoch überzeugend.

6.4 Western Blot behandelter M10, MCF7 und DDPoro65 Zellen mit Pervanadate

Bei diesem Versuch wurde mit einer neuen Vorgehensweise an die Herstellung der Positiv- und Negativkontrollen herangegangen. Im Gegensatz zur Verwendung von Inhibitoren, welche die Signalwege herunterregulieren sollen und somit auch das Signal an Phosphoproteinen, wurde hierbei den Zelllinien MCF7, M10, sowie DDPoro65 Pervanadate verabreicht. Pervanadate ist ein häufig verwendeter Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP)-Inhibitor. Protein-Tyrosin-Phosphatasen sind für die Dephosphorylierung von Phosphotyrosylresten von Proteinen und Enzymen zuständig, womit der Tyrosylphosphorylierungszustand eines Proteins im Gleichgewicht zu den konkurrierenden Aktivitäten der Proteintyrosinkinase gehalten wird. Dabei sind für die Aufrechterhaltung der Enzymaktivität reduzierende Bedingungen notwendig, welche zumeist durch Thiolreagenzien gegeben werden. Aus diesem Grund sind Thiol-Oxidationsmittel starke PTP-Inhibitoren (Huyer & Liu, 1997). Das Pervanadate soll also die Dephosphorylierung der Phosphoproteine hemmen und somit das Signal im Western Blot erhöhen, um später als Positivkontrolle zu fungieren. Zum Vergleich wurden diesmal nur unbehandelte Zellproben verwendet, welche somit als Negativkontrolle dienen sollen. Bei allen Phosphoproteinen, bis auf pEGFR zeigte sich das erwartete Ergebnis, dass die mit Pervanadate behandelten Zellen ein deutlich höheres Signal aufwiesen als die unbehandelten. Besonders das Ergebnis von pIGFR war überzeugend und zeigte in der DDPoro65 Probe schon nach 50 sek Belichtungszeit (Bild nach 50 sek überbelichtet) ein starkes Signal, wobei in vorherigen Experimenten die BZ stetig über 2 min war. Bei pEGFR hat die Behandlung nicht angeschlagen, die Signale nach 10 min BZ waren sehr

schwach. Im Vergleich zwischen den unphosphorylierten Proteinen zeigte sich jedoch auch ein starker Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien in der Expression von Gesamt-EGFR und -IGFR. EGFR war in den MCF7 Zellen im WB nicht zu erkennen und M10 wies sowohl von EGFR als auch IGFR schwache Signale auf. Aufgrund der Signalerhöhung von pIGFR im Western Blot wird auch in den Färbungen ein stärkeres Signal erwartet.

6.5 Manuelle immunhistochemische Färbung von pAKT, pERK, pEGFR, pIFGR an den Zellblöcken DDPoro26 DMSO und DDPoro26 Inhibitors

Die manuelle immunhistochemische Färbung, die an Leerschnitten der Zellblöcke von DDPoro26 durchgeführt wurde, hatte nicht den gleichen Erfolg wie der Western Blot der Proben. Dieser stellte nämlich die Zellblöcke als sehr gute Positiv- und Negativkontrolle für die Phosphoproteine von AKT, ERK, EGFR und IGFR dar. Die Ergebnisse der Färbungen bestätigten dies jedoch nicht. Alle Färbungen wurden für einen Vergleich zwischen den beiden Kontrollen mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen, sodass Rückschlüsse auf die Funktionalität der Antikörper für immunhistochemische Färbungen gezogen werden können. Die Belichtungszeit ist dabei mit 1/4 sek für die spezifischen Färbungen recht hoch. Würde die Belichtungszeit weiter erhöht werden, wäre Autofluoreszenz eine Folge, welches dann fälschlicherweise als positives Ergebnis gedeutet werden könnte. Bei Autofluoreszenz handelt es sich jedoch um unspezifische Signale, die von biologischen Substraten ausgehen, welche mit Licht geeigneter Wellenlängen im UV-Vis Bereich angeregt wurden. Diese Biomoleküle, welche als endogene Fluorophore fungieren, kommen dabei in allen Organismen vor (Croce & Bottiroli, 2014). Neben den Antikörpern von Cell Signaling, die auch im Western Blot angewendet wurden, wurde noch jeweils ein weiterer Antikörper einer anderen Firma (R&D, Biolegend) oder einer anderen Artikelnummer für die Färbung verwendet. Einen deutlichen Unterschied der Antikörper konnte man bei der Färbung von ERK und AKT feststellen. Bei ERK zeigt der Biolegend Antikörper deutlich stärkere Signale als der von R&D. Bei AKT sind bei der Färbung mit dem R&D Antikörper intensivere Signale zu sehen als mit dem Cell Signaling Antikörper. Der Grund, dass manche Antikörper besser funktionieren, kann daran liegen, dass manche Antikörper laut Hersteller nicht für eine IHC geeignet sind; bzw. dies nicht angegeben wird. Das wäre zum Beispiel für den pEGFR-Antikörper von R&D Systems sowie für beide pIGFR-Antikörper von Cell Signaling der Fall. Aber auch die Cell Signaling Antikörper gegen pAKT und pERK sind für die IHC ungeeignet. Die insgesamt schwachen Färbungen können aber auch auf

Probleme bei der Durchführung hinweisen. Zum Beispiel können die Zellen während der Inkubation mit den Antikörpern durch Unachtsamkeit ausgetrocknet sein, aber auch das Fluorophor könnte durch zu viel Licht Schaden erlitten haben (URL-7). Ebenfalls könnte es der Fall sein, dass die Menge an Phosphoproteinen in den Zellblöcken nicht ausreichend ist, um sie mithilfe einer Fluoreszenzfärbung sichtbar zu machen. Bei Fluoreszenzfärbungen können die Signale im Gegensatz zur normalen IHC nicht amplifiziert werden. Zwar wäre eine Möglichkeit die Erhöhung der Belichtungszeit, dies geht jedoch wie erwähnt mit erhöhten Hintergrundsignalen und Autofluoreszenz einher. Bei der normalen IHC hingegen, kann durch die Reaktion von zum Beispiel HRP (*horseradish peroxidase*) mit einem chromogenen Substrat wie Diaminobenzidin (DAB) ein farbiges Produkt erzeugt werden, wobei dieser Vorgang so lange abläuft, bis er gestoppt wird und somit zu einer Signalamplifikation führt (Magaki & Hojat, 2019). Auffällig in fast allen Färbungen ist zudem, dass kein ersichtlicher Unterschied zwischen DDPoro26 DMSO und DDPoro26 Inhibitors feststellbar ist, obwohl der Western Blot eine eindeutige Differenz zeigte. Bei Betrachtung der beiden Methoden Western Blot und IF-IHC zeigt sich jedoch eine mögliche Ursache. In der IF-IHC eines Zellblockes werden in einem Bildausschnitt ca. 10 – 20 einzelne Zellen betrachtet, wohingegen der Western Blot ein Ergebnis aus der Lyse von mehreren 100.000 Zellen veranschaulicht. Ein geringer Unterschied wäre somit im Western Blot aufgrund der Menge an Zellen einfacher erkennbar als zwischen einzelnen Zellen in der IHC. Um einen Unterschied in der IHC zu erkennen, ist im Western Blot eine möglichst vollständige Reduzierung des gewünschten Proteins in der Negativkontrolle nötig, heißt es sollte keine Bande sichtbar sein.

6.6 Manuelle IHC von pERK und (p)AKT an alten und neu hergestellten Zellblöcken DDPoro26, M10 und MCF7 sowie an Gewebe einer Harnblasenmetastase

Bevor die Färbungen von pERK und (p)AKT an den neuen Zellblöcken getestet wurden, wurde zunächst eine Färbung von pAKT an den DDPoro26 Zellblöcken, einem alten M10 Block sowie einer Harnblasenmetastase durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Färbung von pAKT in dem M10 Block stärker war als in dem DDPoro26 DMSO Zellblock, auch gab es kaum keinen Unterschied zwischen DDPoro26 DMSO und Inhibitors. Parallel wurde eine Rot-Braun-Färbung in der Pathologie durchgeführt, wobei sich im Vergleich ebenfalls zeigte, dass M10 eine höhere pAKT-Expression besitzt als DDPoro26. Für die Harnblasenmetastase wurde aufgrund vorheriger Experimente ein

hohes Signal an pAKT erwartet. Dieses bestätigte sich in der Rot-Braun-Färbung, in der Fluoreszenzfärbung ist das Signal mit 1/4 sek jedoch sehr gering. Da die Rot-Braun-Färbung der Pathologie wie im letzten Abschnitt schon erwähnt mit einer Signalamplifikation einhergeht, ist das Ergebnis jedoch schwer vergleichbar. Die Testung der Zellblöcke mit einer Alpelisib und Trametinib Behandlung erwiesen sich als erfolgreich. Es wurden jeweils zwei Antikörper für AKT (R&D, CS), pAKT (R&D, CS) und pERK (R&D, Biologend) getestet. Aufgrund des Western Blots wurden für AKT und pAKT die M10 Zellblöcke verwendet und für pERK die Zellblöcke von MCF7. Besonders überzeugend waren für alle Färbungen die Antikörper der Firma R&D Systems. Für pAKT und AKT zeigte sich wie schon durch den Western Blot vermutet kein Unterschied zwischen DMSO und Trametinib + Alpelisib Block, trotzdem überzeugten anhand der Signalstärke die R&D Antikörper. pERK von Biologend wies im Gegensatz zum Western Blot ebenfalls keinen Unterschied zwischen DMSO und Inhibitors auf, wohingegen R&D einen deutlichen Unterschied zeigte. Aus diesen Ergebnissen heraus wurden für die Konjugation die Antikörper von R&D gegen AKT und pAKT ausgewählt. Für pERK sind bereits beide Antikörper konjugiert.

6.7 Manuelle IHC von EGFR und IGFR an alten und neu hergestellten Zellblöcken von DDPoro26, WM3734, M10 und MCF7

Da die Färbungen von pEGFR und pIGFR aus 5.7 sehr schwach ausfielen, wurde in weiteren Versuchen zunächst Gesamt-EGFR und -IGFR versucht zu färben, da diese ebenfalls für die CODEX-Färbung von Interesse wären. Für EGFR wurde dabei als Positivkontrolle DDPoro26 ausgewählt mit einer hohen Expression an EGFR und als Negativkontrolle die WM3734 Zelllinie, welche keine Expression an EGFR aufweist. WM3734 ist eine primäre, metastasierende Melanomzelllinie, welche aus einer Hirnmetastase gewonnen wurde. Sie besitzt die V600E spezifische Mutation an Codon 600 im BRAF-Gen (URL-8). Die Testung erfolgte mit zwei verschiedenen Antikörpern (CS und R&D), wobei sich der erwartete Unterschied zwischen DDPoro26 und WM3734 zeigte. Der R&D Systems Antikörper überzeugte dabei wieder mit seiner Signalstärke. Für Gesamt-IGFR wurde zunächst eine alte mit siRNA behandelte M10 Linie verwendet, wobei kein Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle zu erkennen war. Aus diesem Grund wurden die nach 5.4 neu hergestellten siRNA Zellblöcke aus der MCF7 Zelllinie getestet. Anhand der Western Blot Ergebnisse war ein Unterschied zwischen siSCR und siIGFR zu erwarten, welcher sich jedoch in der Färbung nicht bestätigte und die siIGFR Zellen sogar eine höhere Expression an IGFR zeigen. Ist der Knockdown zu

schwach, sind manche Zellen immer noch in der Lage, die Expression aufrechtzuerhalten und erscheinen in der IHC als IGFR positiv. Wie in 6.3 erläutert, gibt es verschiedene Gründe für eine geringere Transfektionseffizienz. In beiden Fällen wurden die Cell Signaling Antikörper verwendet, welche auch in den anderen Färbungen von (p)AKT oder ERK nicht überzeugten und auch hier wieder eine hohe Belichtungszeit von 1/4 sek aufwiesen.

6.8 Manuelle IHC von pERK, pAKT und (p)IGFR an den Zellblöcken DDPoro65 und M10 mit Pervanadate behandelt sowie siRNA behandelten MCF7 Zellen

In dieser letzten Färbung wurden die Zellblöcke der mit Pervanadate behandelten Zellen verwendet, sowie gleichzeitig die neuen IGFR und pIGFR Antikörper der Firma R&D Systems getestet. pERK und pAKT zeigten jedoch nicht die gewünschte Signalverstärkung in der Pervanadate Kontrolle, obwohl der Western Blot es erwarten lies. Die Belichtungszeiten mit 1/4 sek und 1/6 sek für pAKT sind immer noch ziemlich hoch. In den Experimenten mit den DMSO und Inhibitor Kontrollen, siehe 5.9, konnten genauso hohe Signale erzielt werden, bei gleicher bzw. sogar niedriger Belichtungszeit (siehe pAKT von R&D). Der neue R&D IGFR Antikörper hatte bei 1/7,5 sek intensive Signale und zeigt im Vergleich zum Cell Signaling Antikörper (1/4 sek BZ) am MCF7 Zellblock somit eine Verbesserung. Ein Unterschied zwischen siSCR und siIGFR Probe ist jedoch nicht erkennbar. Wie durch den Western Blot erwartet, sollte vor allem pIGFR eine deutliche Verbesserung in der Signalstärke aufweisen. Die Färbungen bestätigten dies, Pervanadate hat die Dephosphorylierung somit erfolgreich gehemmt. Der neue pIGFR Antikörper überzeugte nicht nur bei der Pervanadate Kontrolle, sondern auch bei der unbehandelten Kontrolle, wo erstmals für eine Antikörper-Färbung eine BZ von 1/15 sek erreicht wurde. Die Pervanadate Kontrolle erreichte eine BZ von 1/35 sek und besitzt zur unbehandelten Probe einen deutlichen Unterschied in der Intensität der Signale und somit in der Expression an pIGFR.

6.9 Konjugation der Antikörper MelanA, HMB45, Connexin43, GRB10, pAKT und AKT

Die Konjugation war bei MelanA, HMB45, Connexin43, AKT und pAKT nach dem ersten Versuch erfolgreich. Nach Wiederholung des Versuchs mit den Akoya Reagenzien konnte mithilfe der Gelelektrophorese auch bei GRB10 eine gelungene Konjugation festgestellt werden. Dabei ist nicht sicher, ob das Akoya Kit zu dem Erfolg geführt hat,

da die Konjugation von Connexin43 nach dem gleichen Protokoll ablief und schon im ersten Versuch erfolgreich war. Eventuell lag es an der geringen Konzentration von GRB10, welche im Gel beim konjugiertem sowie beim unkonjugiertem Antikörper zu sehen war. Dabei wurde zunächst stets eine Färbung mit Coomassie durchgeführt, eine einfache und schnelle Methode, um Proteine im Gel sichtbar zu machen (Sasse & Gallagher, 2009). Die anschließende Silber-Färbung war für die Überprüfung von GRB10 notwendig, welches nicht nur in der konjugierten Probe, sondern auch in der unkonjugierten Probe eine sehr geringe Konzentration aufwies. Mithilfe der Silberfärbung können im Gegensatz zur Coomassie-Färbung Proteinmengen im Nanogrammbereich detektiert werden (Bartsch & Arndt, 2012). Im Gel stellt die obere Bande die schwere Kette des Antikörpers dar und die untere Bande die leichte Kette. Wie in den Gelbildern der Experimente besonders gut bei MelanA und HMB45 erkennbar ist, zeichnen sich die konjugierten Antikörper durch einen Shift ihrer oberen bzw. auch unteren Bande aus. Dieser Shift hängt mit dem konjugierten Oligonukleotid, dem Barcode, zusammen, wodurch der konjugierte Antikörper im Gel langsamer läuft als der unkonjugierte. Der Vergleich zwischen der unkonjugierten Bande und der konjugierten Bande zeigt dabei einen ungefähren Unterschied von 15 kDA. Bei Connexin43 ist zudem eine Unterteilung im Shift (mehrere Banden) zu erkennen, was bedeuten kann, dass mehr als ein Barcode am Antikörper gebunden hat (Wiener & Kokotek, 2020).

Damit eine Konjugation zwischen Antikörper und Oligonukleotid stattfinden kann, muss der Antikörper reduziert werden. Eine Möglichkeit ist dabei eine Konjugation über eine reaktive Thiol-Gruppe (-SH). Antikörper besitzen oxidierte Thiol-Gruppen, welche als Disulfidbrückenbindungen (S-S) fungieren und für die spezifische Tertiärstruktur des Antikörpers sorgen. Für die Freilegung einer reaktiven Thiol-Gruppe als Grundlage für die Konjugation ist also die Reduktion der Disulfidbrückenbindungen notwendig (URL-7). Für diese Reduktion wurde TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) verwendet, eine Trialkylphosphinverbindung. Phosphine zeichnen sich durch ihre Stabilität in wässrigen Lösungen aus und reduzieren selektiv Disulfidbindungen. Zudem sind sie nicht reaktiv gegenüber anderen funktionellen Gruppen in Proteinen. Das TCEP, welches in diesen Experimenten verwendet wurde, besitzt einen neutralen pH-Wert. Ein weiteres oft verwendetes TCEP ist mit HCl (Salzsäure) versetzt. Durch den neutralen pH-Wert werden saure Hydrolysen sowie Kohlenhydratmodifikationen, die in Folge der starken Säurewirkung von TCEP HCl auftreten können, vermieden (URL-10). Im Protokoll wird für die TCEP-Reduktion eine genaue Inkubationszeit von 30 min angegeben. Durch die Reduktion von Disulfidbindungen, die wichtig für die Strukturhaltung sind, kann es bei

Überschreitung dieser Zeitangabe zur Destabilisierung des Antikörpers kommen. Instabile Antikörper können zu einer geringeren Produktionsausbeute führen, und es kann zur Einschränkung oder zum Verlust ihrer Funktion kommen (Ma & Ó'Fágáin, 2020).

Die erfolgreiche Konjugation der Antikörper ist dabei wichtig für den späteren Einsatz in den Multiplex-Färbungen mithilfe des CODEX-Systems. Die Detektion wird von der Proteinebene auf die DNA-Ebene übertragen und ermöglicht somit die Anwendung für Multiplex-Strategien, da die Zielspezifität der Antikörper durch die Oligonukleotidsequenzen kodiert werden (Wiener & Kokotek, 2020). Somit können in einem Gewebeschnitt mehr als 50 Marker gleichzeitig angefärbt werden.

6.10 CODEX Färbung an einer Harnblasenmetastase

Zum Abschluss dieser Arbeit wurden die neuen konjugierten Antikörper sowie schon vorher etablierte Antikörper an einer Harnblasenmetastase mit Hilfe des CODEX Systems gefärbt. Die vorherigen Experimente waren Ausgangspunkt zur Etablierung der neuen Marker, wie EGFR, pERK, AKT und pAKT. Schon vor der Färbung kam es jedoch zu einigen Problemen hinsichtlich der Anheftung des Gewebes an die Deckgläser. Um ein Ablösen des Gewebes zu vermeiden, besonders beim Kochen im „*Antigen-retrieval Buffer*“, wurden die Deckgläser wie im Methodenteil beschrieben mit zwei Reagenzien, einmal Vectabond und einmal mit Poly-L-Lysin beschichtet. Das Kochen bringt aufgrund der großen Hitzeeinwirkung ein hohes Risiko mit sich, dass sich das Gewebe löst. Kommt es zur teilweisen Ablösung, kann dies die Gewebemorphologie beeinflussen und bei einer vollständigen Ablösung sind mit dem Gewebe weitere Arbeitsschritte nicht möglich (Eckhard & O'Malley, 2019). In diesem Experiment löste sich das Gewebe jedoch schon vor dem Kochen. Grund dafür war höchstwahrscheinlich, dass das Gewebe für die Phosphofärbungen frisch geschnitten werden muss, und es dadurch jedoch nicht vollständig getrocknet wurde (URL-11). Nach dem Anbacken im Ofen für 25 min bei 70 °C konnte das Problem für das Harnblasenmetastasengewebe behoben werden.

Für diese Färbung wurden zufällig 6 verschiedene Regionen des Gewebes ausgewählt. Durch die Heterogenität von Tumoren können die Zellen im Tumor sich in ihren molekularen Signaturen unterscheiden, wodurch nicht alle Zellen beispielsweise pAKT exprimieren müssen (Dagogo-Jack & Shaw, 2018). Durch die Aufnahme mehrerer Regionen wird versucht, ein großer Bereich der Gewebeprobe abzudecken. Erfolgreich in diesem Lauf waren die Marker für MelanA/HMB45, Ki67, CD34, AKT und PAK1.

Region 3 veranschaulicht dabei einen möglichen Tumorrand, erkennbar an den MelanA und HMB45 positiven Zellen, welche sich im oberen rechten Rand des Ausschnitts sammeln. Auffällig ist zudem die vermehrte Anzahl an Ki67 positiven Zellen im Tumorgewebe, welche jedoch die gesteigerte Proliferation im Tumor widerspiegelt (Li & Jiang, 2015). In dem danebenliegenden Gewebe, wo laut Marker keine Tumorzellen vorhanden sind, befinden sich ebenfalls keine Ki67 markierten Zellen. Auch CD34 ist in Region 3 gut sichtbar und markiert die Blutgefäße, wobei keine Präferenz zwischen Tumorregion und Normalgewebsregion besteht. In Region 4 waren alle positiven Marker vorhanden. Dabei zeichnet sich durch MelanA und HMB45 wieder die Tumorregion ab. PAK1 (in orange sichtbar) ist ein Protein, welches zu den p21-aktivierten Kinasen zählt. Sie sind Knotenpunkte für verschiedene Signalwege, und interagieren zum Beispiel ebenfalls mit dem MAPK-Signalweg (Ong & Jubb, 2013). Die PAK1 positiven Zellen fokussieren sich zum Großteil auf die Tumorregion, auch wenn das Signal nicht so stark ist. Wie in der Literatur beschrieben, zeigt sich PAK1 im Zellplasma und an der Zellmembran (URL-12). AKT ist der einzige Marker, der von den neu etablierten Markern funktioniert hat. Dabei zeigt die Färbung jedoch eine starke Ausprägung an der Zellmembran, in der Theorie hingegen kommt AKT im Zellplasma vor (URL-13). Daher ist nicht eindeutig, ob es eine spezifische Färbung ist. Alle anderen Marker zeigten keine Färbung. Bei pAKT, pERK sowie ERK waren die Signale eventuell zu schwach oder wie bei ERK unklar, ob es sich um eine positive Färbung handelt oder nur Hintergrund- bzw. Autofluoreszenz-Signale. In den ausgewählten Regionen scheinen zudem keine T-Zellen (CD8, CD3), keine NK-Zellen oder aktivierten T-Zellen (Granzym B), keine B-Zellen (CD20) oder Makrophagen (CD68) vorhanden zu sein. Durch die Abwesenheit der T-Zellen sind somit auch keine PD1 und PD-L1 Signale zu sehen. Connexin43 zeigte zwar starke Signale, jedoch war auch hier unklar, ob es sich nur um Hintergrund handelte, da die Signale über alle Regionen gleich verteilt waren. Für manche Proteine, wie die Phosphoproteine, war das Signal aufgrund ihrer geringeren Expression für die Codex Färbung wahrscheinlich zu schwach (Black & Phillips, 2021).

7 Ausblick

Trotz der hohen Anzahl an durchgeführten Western Blots und manuellen Färbungen mit variierten Bedingungen, konnten zum Schluss noch nicht alle gewünschten Antikörper konjugiert und für die CODEX Färbung etabliert werden. Der neue Antikörper gegen Phospho-IGFR von R&D Systems stellte sich jedoch durch die Ergebnisse des Pervanadate Versuchs als nächster Kandidat für eine Konjugation heraus. Um die Unterschiede in den einzelnen Zellen für die Färbung zu vergrößern, könnte für die Positivkontrolle neben Pervanadate noch mit den stimulierenden Liganden EGF und IGF behandelt werden und für die Negativkontrolle, ein Knockdown durchgeführt werden, sowie eine Behandlung der Zellen mit Trametinib. Besonders schwierig ereignete sich auch die Suche nach einer geeigneten Positiv- und Negativkontrolle für Phospho-EGFR, da selbst im Pervanadate Versuch das Ergebnis im Western Blot nicht überzeugte. In dieser Hinsicht wären also weitere Versuche mit anderen Zelllinien notwendig, die eine hohe Expression an pEGFR aufweisen. Dies erweist sich für die Forschung an Melanomzelllinien jedoch als nicht einfach, da eine Vielzahl von Zelllinien zwar EGFR-positiv sind, jedoch nicht die aktivierte Form überexprimieren. Ein Experiment von Gross et al. zeigte, dass die Verwendung von Vemurafenib, einem BRAF-Inhibitor, in der SkMel5 Zelllinie eine Erhöhung der Phospho-EGFR Expression erzielte (Gross & Niemetz-Rahn, 2015). Eventuell würde dies auch bei anderen Zelllinien funktionieren. Nach der Konjugation des pIGFR und IGFR-Antikörpers wäre die Durchführung weiterer Multiplex-Färbungen wichtig, um eine schlussendliche Etablierung der Antikörper zu erreichen. Bei der hier durchgeführten CODEX-Färbung erwies sich der Nachweis der Phospho-Proteine im Gewebe immer noch als schwierig, da weder pAKT und pERK Signale zeigten. Zunächst könnte eine Anpassung an den Antikörperkonzentrationen vorgenommen werden, um Signale zu verstärken. In dem Paper von Simonson et al. wird durch die Verwendung spezieller Tyramid-konjugierter DNA-Barcodes und über Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper sogar versucht, der im CODEX System fehlenden Signalamplifikation entgegenzuwirken (Simonson & Valencia, 2022).

8 Zusammenfassung

Die Anzahl an Neuerkrankungen an schwarzem Hautkrebs nimmt jährlich zu und ist aufgrund der starken Metastasierungsrate oft mit einer hohen Mortalität verbunden. Häufig liegen dabei Mutationen in den RAF- oder RAS-Onkogenen vor, welche zu einer unkontrollierten Aktivierung des MAPK-Signalwegs und der Entartung von Melanozyten führen. Wichtige Mitspieler sind dabei Proteine wie EGFR, ERK aber auch das im PI3K/AKT-Signalweg agierende AKT. Liegt eine Aktivierung eines Signalweges vor, äußert sich dies in einer erhöhten Phosphorylierung mitwirkender Proteine. Das Herunterregulieren bestimmter beteiligter Proteine mithilfe von Inhibitoren wie BRAF- und MEK-Inhibitoren, bildet die Grundlage für Therapieansätze. Die bisherigen Versuche dienten dabei der Untersuchung der Phosphoproteine, sowie der Etablierung von Antikörpern gegen jene, mit dem Ziel, sie für den Einsatz in Multiplex-Färbungen zu verwenden. Dabei wurden besonders die phosphorylierten Varianten von EGFR, IGFR, ERK und AKT betrachtet. Nach mehreren Western Blots mit unterschiedlichen Behandlungen kamen verschiedene Zelllinien als gute Positiv- und Negativkontrollen in Frage, aus denen nachfolgend Zellblöcke hergestellt wurden. Für pERK und pAKT, sowie deren unphosphorylierten Form brachte die M10 Zelllinie überzeugende Ergebnisse, welche laut Literatur eine gesteigerte pAKT-Expression aufweist. Für Gesamt-IGFR konnte mithilfe einer Transfektion an MCF7 Zellen zwar ein erfolgreicher Knockdown im Western Blot erzielt werden, in der manuellen Färbung bestätigte sich dieses Ergebnis jedoch nicht. Besonders positiv wirkte sich der Pervanadate Versuch auf die Findung einer Positiv- und Negativkontrolle für pIGFR auf, welches in vorherigen Versuchen sowohl im Western Blot als auch in den Färbungen nur geringe Signale zeigte. Pervanadate schaffte es für alle Phosphoproteine, außer pEGFR, eine Signalverstärkung im Vergleich zur unbehandelten Probe zu erzielen. Der neue pIGFR Antikörper von R&D System konnte anhand der manuellen Färbung mit einem deutlichen Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten DDPoro65 Zellen sowie einer niedrigen Belichtungszeit (1/35 sek) überzeugen und ist somit ein Kandidat für eine Konjugation. Allgemein setzten sich für die untersuchten Proteine die R&D Antikörper gegenüber den Antikörpern von Cell Signaling durch. Erfolgreich konjugiert waren vor der ersten Multiplex-Färbung somit die Antikörper gegen pERK, ERK, pAKT, AKT, EGFR, MelanA, HMB45, Connexin43 und GRB10. Für die Multiplex-Färbung wurde das Gewebe einer Harnblasenmetastase verwendet. Erfolgreich waren die Marker MelanA/HMB45, Ki67, CD34 sowie AKT und PAK1. Dabei spiegelte die vermehrte

Anzahl an Ki67 positiven Zellen im Tumorgewebe die verstärkte Proliferation der Tumorzellen wider. Außer AKT wies keines der anderen Target-Proteine (pAKT, pERK und ERK) Signale auf. Aus diesem Grund sollten weitere Multiplex-Färbungen mit diesen Targets durchgeführt und eine eventuelle Anpassung an den Antikörper-Konzentrationen vorgenommen werden.

9 Summary

The number of new cases of melanoma is increasing annually and is often associated with high mortality due to the high metastasis rate. Often, mutations in the RAF or RAS oncogenes are present, which lead to an uncontrolled activation of the MAPK signaling pathway and to the malignant transformation of melanocytes. Important players in this process are proteins such as EGFR, ERK but also AKT involved in the PI3K/AKT-signaling pathway. If a signaling pathway is activated, it manifests itself in an increased phosphorylation of participating proteins. The downregulation of certain involved proteins with the help of inhibitors such as BRAF and MEK inhibitors form the basis for new therapeutic interventions. The experiments carried out in this study were aimed at the investigation of phosphoproteins, as well as the establishment of antibodies against them, with the goal of using them in multiplex staining. In particular, the phosphorylated variants of EGFR, IGFR, ERK and AKT were considered. After several Western blot experiments with different treatments, different cell lines were considered as good positive and negative controls. For pERK and pAKT, as well as their unphosphorylated forms, the M10 cell line gave convincing results, which, according to literature shows an increased pAKT expression. For total IGFR, a successful knockdown could be achieved by transfection of MCF7 cells in the Western blot experiments, but this result was not confirmed by manual staining. The Pervanadate experiment had a particularly positive effect on finding a positive and negative control for pIGFR, which showed only weak signals in previous experiments both, in the Western blot and in the IHC staining results. Pervanadate increased signal intensities for all phosphoproteins except pEGFR compared to the untreated sample. The new pIGFR antibody from R&D System was convincing based on manual IHC staining with a clear difference between untreated and treated DDPoro65 cells as well as a low exposure time (1/35 sec) and thus is a good antibody for conjugation. In general, R&D antibodies prevailed over Cell Signaling antibodies for the proteins studied. Thus, successfully conjugated antibodies before the first multiplex staining were against pERK, ERK, pAKT, AKT, EGFR, MelanA, HMB45, Connexin43 and GRB10. Tissue from a urinary bladder metastasis was used for multiplex staining. The markers MelanA/HMB45, Ki67, CD34, and AKT and PAK1 were successful. Here, the increased number of Ki67 positive cells in the tumor tissue reflected increased proliferation of tumor cells. Except for AKT, none of the other target proteins (pAKT, pERK, and ERK) exhibited signals. For this reason, further multiplex staining with

these targets should be performed with adjustments made to the antibody concentrations.

Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J., & Patabendige, A. A. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.*, 15-23.
- Ardito, F., & Giuliani, M. (2017). The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 271-280.
- Back, S., & Manfredi, J. J. (2021). Knockdown of Target Genes by siRNA In Vitro. *Methods in molecular biology*, 159–163.
- Bartsch, H., & Arndt, C. (2012). *Protein Electrophoresis*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Black, S., & Phillips, D. (2021). CODEX multiplexed tissue imaging with DNA-conjugated antibodies. *Nature protocols*, 3802–3835.
- Carlino, M. S., & Larkin, J. (2021). Immune checkpoint inhibitors in melanoma. *Lancet*, 1002–1014.
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). *Gene Delivery Strategies. Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)*.
- Cerroni, L., & Garbe, C. (2016). *Histopathologie der Haut*. Springer Berlin, Heidelberg.
- Chen, M. B., & Whisler, J. A. (2013). Mechanisms of tumor cell extravasation in an in vitro microvascular network platform. *Integr Biol (Camb)*.
- Coarfa, C., & Grimm, S. L. (2021). Reverse-Phase Protein Array: Technology, Application, Data Processing, and Integration. *Journal of biomolecular techniques : JBT(32(1))*, 15–29.
- Croce, A. C., & Bottiroli, G. (2014). Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry*.
- Cruse, J. M., & Lewis, R. E. (2004). CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. *Immunology Guidebook*, 47–124.
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*, 81–94.
- Dass, S. E., & Huizenga, T. (2021). Comparison of SOX-10, HMB-45, and Melan-A in Benign Melanocytic Lesions. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 1419–1425.
- Eckhard, A. H., & O'Malley, J. T. (2019). Mechanical Compression of Coverslipped Tissue Sections During Heat-induced Antigen Retrieval Prevents Section Detachment and Preserves Tissue Morphology. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 441–452.

- Fischer, G. M., & Jalali, A. (2019). Molecular Profiling Reveals Unique Immune and Metabolic Features of Melanoma Brain Metastases. *Cancer Discov*, 628–645.
- Grimaldi, A. M., & Simeone, E. (2017). MEK Inhibitors in the Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumors. *American journal of clinical dermatology*(18(6)), 745–754.
- Gröhe, H. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 - Grußwort. 3. Berlin.
- Gross, A., & Niemetz-Rahn, A. (2015). Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway. *Targ Oncol*, 77–84.
- Han, H. (2018). RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods in molecular biology*, 293–302.
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.
- Hoffner, B., & Benchich, K. (2018). Trametinib: A Targeted Therapy in Metastatic Melanoma. *Journal of the advanced practitioner in oncology*, 741–745.
- Huyer, G., & Liu, S. (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *The Journal of biological chemistry*, 843–851.
- Janeway, C. J., & Travers, P. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science.
- Koletar, M., & Dorr, A. (2019). Refinement of a chronic cranial window implant in the rat for longitudinal in vivo two-photon fluorescence microscopy of neurovascular function. *Scientific Reports*.
- Krieter, M. S. (2019). Das maligne Melanom. *MMW - Fortschritte der Medizin* (161), 42–50. doi:<https://doi.org/10.1007/s15006-019-0018-6>
- Lee, A. V., & Oesterreich, S. (2015). MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *Journal of the National Cancer Institute*.
- Li, L. T., & Jiang, G. (2015). Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports*, 1566–1572.
- LoRusso, P. M. (2016). Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Solid Tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 3803–3815.
- Lyck, L., & Dalmau, I. (2008). Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 201–221.

- Lyle, L. T., & Lockman, P. R. (2016). Alterations in Pericyte Subpopulations Are Associated with Elevated Blood–Tumor Barrier Permeability in Experimental Brain Metastasis of Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 5287–5299.
- Ma, H., & Ó’Fágáin, C. (2020). Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement. *Biochimie*(177), Pages 213-225.
- Magaki, S., & Hojat, S. A. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology*, 289–298.
- Mauro, L., & Monica, B. (2001). IGF-I Receptor-induced Cell-Cell Adhesion of MCF-7 Breast Cancer Cells Requires the Expression of Junction Protein ZO-1. *Journal of Biological Chemistry*, 39892-39897.
- Neumann, H., & Misgeld, T. (1998). Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: Involvement of the p75 neurotrophin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 5779-5784.
- Niessner, H., & Forscher, A. (2013). Targeting hyperactivation of the AKT survival pathway to overcome therapy resistance of melanoma brain metastases. *Cancer Medicine*, 76-85.
- Niessner, H., & Schmitz, J. (2016). PI3K Pathway Inhibition Achieves Potent Antitumor Activity in Melanoma Brain Metastases In Vitro and In Vivo. *Clin Cancer Res*, 5818–5828.
- Ong, C. C., & Jubb, A. M. (2013). P21-Activated Kinase 1 (PAK1) as a Therapeutic Target in BRAF Wild-Type Melanoma. *NCI: Journal of the National Cancer Institute*, 606–607.
- Patel, B., & Allen, S. (2022). Whole-slide Multispectral Imaging Reveals the Immune Subtypes of Melanoma Associated with the Tumor Microenvironment: An automated 7-color mIF assay. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* .
- Phadke, M., & Ozgun, A. (2021). Melanoma brain metastases: Biological basis and novel therapeutic strategies. *Experimental Dermatology Wiley*.
- Proietti, I., & Skroza, N. (2020). BRAF Inhibitors: Molecular Targeting and Immunomodulatory Actions. *Cancers*(12(7)).
- Prukop, P. D. (2017-2021). Die funktionelle Rolle der Astrogliose und Neuroinflammation in Hirnmetastasen des Malignen Melanoms. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) - Projektnummer 350030746.
- Rausch, M., & Hastings, K. (2017). Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Melanoma: From Basic Science to Clinical Application. In W. H. Ward, & J. M. Farma, *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Codon Publications.
- Rauschenberg, R., & Tabatabai, G. (2016). Hirnmetastasen des malignen Melanoms - Therapiebesonderheiten. *Die Dermatologie*.

- Robert Koch-Institut, u. d. (Hrsg.). (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. Berlin.
- Sasse, J., & Gallagher, S. R. (2009). Staining proteins in gels. *Current protocols in molecular biology*.
- Schöne, L., Gellrich, F., & Meier, F. (2022). Systemtherapie von Melanom-Hirnmastasen. *best practice onkologie*(17), 8-16.
- Simonson, P., & Valencia, I. (2022). Tyramide-conjugated DNA barcodes enable signal amplification for multiparametric CODEX imaging. *Commun Biol*, 627.
- Tan, W. C., & Nerurkar, S. N. (2020). Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer communications*, 135–153.
- Valiente, M., & Obenaus, A. (2014). Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Co-Option in Brain Metastasis. *Cell*, 1002-1016.
- van Dam, S., & Baars, M. (2022). Multiplex Tissue Imaging: Spatial Revelations in the Tumor Microenvironment. *Cancers*.
- Westphal, D., & Garzarolli, M. (2021). High tumour mutational burden and EGFR/MAPK pathway activation are therapeutic targets in metastatic porocarcinoma. *British Journal of Dermatology*.
- Westphal, D., & Wehner, R. (2021). e:Med-Juniorverbund: MelBrainSys – Modellbasierte Vorhersage und experimentelle Validierung neuer therapeutischer Interventionen für Melanom-Hirnmastasen, in: Lampertheim: ALPHA Informations-GmbH.
- Wiener, J., & Kokotek, D. (2020). Preparation of single- and double-oligonucleotide antibody conjugates and their application for protein analytics. *Scientific Reports*(10), 1457.
- Zhang, W., & Liu, H. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 9-18.
- URL-1 (04.10.2023)
Frau Dr. med. Andrea Forschner: Malignes Melanom: schwarzer Hautkrebs. ONKO Internetportal.
URL: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/hautkrebs/malignes-melanom-schwarzer-hautkrebs.html>

URL-2 (21.02.2023)

Akoya Biosciences: PhenoCycler – Rapid, Deep Spatial Phenotyping.

URL:

https://www.akoyabio.com/phenocycler/?_gl=1*grqcb*_up*MQ..*_ga*NDI2NjEyMjg4LjE2NzY3MzEyMDE.*_ga_2ZHTHLLMF2*MTY3NjczMTE5NC4xLjAuMTY3NjczMTE5NC4wLjAuMA.

URL-3 (09.06.2023)

The Human Protein Atlas: The housekeeping proteome.

URL: <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/housekeeping>

URL-4 (12.06.2023)

BIO-RAD: Blot Quantitation and Background.

URL: <https://www.bio-rad.com/de-de/applications-technologies/image-analysis-quantitation-for-western-blotting?ID=PQEERM9V5F6X>

URL-5 (14.09.2023)

ThermoFisher Scientific: Optimizing siRNA Transfection.

URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/guidelines-for-rna-transfection/optimizing-sirna-transfection.html>

URL-6 (14.09.2023)

ThermoFisher Scientific: Guidelines for RNA Transfection.

URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/guidelines-for-rna-transfection.html>

URL-7 (12.06.2023)

Abcam: Troubleshooting and using controls in IHC.

URL: <https://www.abcam.com/help/troubleshooting-and-using-controls-in-ihc-and-icc>

URL-8 (20.09.2023)

Rockland: WM3734 Viable Cells (1 million cells), Background.

URL: <https://www.rockland.com/categories/cell-lines-and-lysates/wm3734-viable-cells-1-million-cells-WM3734-01-0001/>

URL-9 (13.06.2023)

Abcam: Antibody–oligonucleotide (Ab–oligo) conjugate preparation and applications.

URL: <https://www.abcam.com/content/antibody-oligonucleotide-ab-oligo-conjugate-preparation-and-applications>

URL-10 (13.06.2023)

ThermoFisher Scientific: Datenblatt Bond-Breaker™ TCEP Solution, Neutral pH.

URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011394_BondBreaker_TCEPSolution_NeutralpH_UG.pdf

URL-11 (20.09.2023)

IHC World: Preventing Tissue Sections From Falling/Coming Off Slides

URL: https://www.ihcworld.com/_technical_tips/section_falloff_tips.htm

URL-12 (21.09.2023)

The Human Protein Atlas: PAK1.

URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000149269-PAK1/subcellular>

URL-13 (21.09.2023)

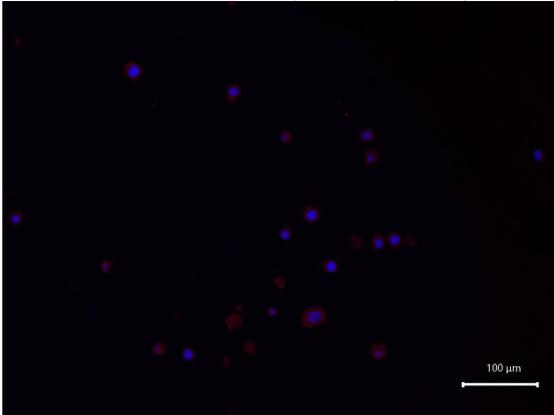
The Human Protein Atlas: AKT1

URL: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000142208-AKT1/subcellular>

Anhang

Anhang 1: IHF pIGFR (R&D) an DDPoro65 Control bei 1/15 sek BZ

DDPoro65 Control – pIGFR (R&D)



Overlay – DAPI 1/20 sek, pIGFR 1/15 sek

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 15.10.2023

A solid black rectangular box used to redact the signature of the author.

Teresa Franke