

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität Göttingen

(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun, Prof. Dr. med. P. Ströbel)

FRET-Bildgebung
zum Nachweis der Phosphorylierung der
anaplastic lymphoma kinase (ALK)
im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Tabea Wagner

aus

Einbeck

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. P. Ströbel

Ko-Referent: Prof. F. Wouters-Bunt

Drittreferent: Prof. Dr. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 05.06.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*FRET-Bildgebung zum Nachweis der Phosphorylierung der anaplastic lymphoma kinase (ALK)*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

1. Einleitung	1
1.1. Das Bronchialkarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Histo-Pathologische Einteilung	1
1.1.3 Karzinogenese des Bronchialkarzinoms	2
1.2 ALK	3
1.2.1 Die <i>anaplastic lymphoma kinase</i>	3
1.2.2 Struktur der Kinase-Domäne von ALK	3
1.2.3 Aktivitätsregulierung von Rezeptortyrosinkinasen	4
1.2.4 ALK-abhängige Signalwege	5
1.3 Die Translokation der <i>anaplastic lymphoma kinase</i> im Adenokarzinom der Lunge	6
1.3.1 Erstbeschreibung der EML4-ALK-Translokation	6
1.3.2 Therapie der EML4-ALK positiven Adenokarzinome der Lunge	7
1.3.3 Aktuelle Verfahren zum Nachweis von EML4-ALK in der Routinediagnostik	9
1.4 Konfokale Lasermikroskopie	10
1.4.1 Definition von Fluoreszenz	10
1.4.2 Das konfokale Mikroskop	11
1.4.3 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)	11
1.4.4 Nachweis des FRET mittels <i>Acceptor Photobleaching</i>	14
1.4.5 Messung der Phosphorylierung mittels FRET-Bildgebung	14
1.5 Ziel der Studie	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1. Geräte	16
2.1.2 Computersoftware	17
2.1.3 Materialien	17
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.5 Puffer und Medien	20
2.1.6 Kits	21
2.1.7 Antikörper	21
2.1.8 Zelllinien	23
2.2 Methoden	24

2.2.1 Zellbiologische Methoden	24
2.2.1.1 Kulturbedingungen	24
2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	24
2.2.1.3 Expansion der Zellen.....	25
2.2.1.4 Zellzahlbestimmung	25
2.2.1.5 Inhibition von adhärenen Zellen.....	25
2.2.1.6 Zellyse von adhärenen Zellen zur Westernblot-Analyse.....	25
2.2.1.7 Erstellen von Zytospins.....	26
2.2.1.8 Erstellen von Zell-Ausstrichen	26
2.2.1.9 Erstellen von Zytoblocks	26
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.2.2.1 Proteinkonzentrationsmessung	27
2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.2.2.3 Westernblot-Analyse.....	28
2.2.2.4 Immunopräzipitation.....	28
2.2.2.5 MTS-Assays	29
2.2.3 Färbemethoden.....	29
2.2.3.1 Entwässerung und Paraffineinbettung.....	29
2.2.3.2 Antigendemaskierung.....	30
2.2.3.3 Immunhistochemie	30
2.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbungen mit auf Coverslips gewachsenen Zellen	31
2.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbungen mit Zytospins und Ausstrichen	31
2.2.3.6 Immunfluoreszenzfärbungen an Zytoblockpräparaten.....	32
2.2.3.7 Immunfluoreszenzfärbung mit Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe.....	33
2.2.4 Konfokale Lasermikroskopie mit Olympus Fluoview 1000	33
2.2.4.1 Konfokale Lasermikroskopie an fixierten Zellen.....	33
2.2.4.2 Konfokale Lasermikroskopie an fixierten Gewebeschnitten.....	34
2.2.4.3 Auswertung mittels ImageJ	34
2.2.4.4 Auswertung mittels Scidavis.....	35
2.2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	36
3. Ergebnisse	37
3.1 ALK-Status in Zellkulturmodellen des NSCLC.....	37
3.2 Inhibition der ALK-Aktivität in den Zelllinien H2228 und H3122	40
3.3 Etablierung der FRET-Bildgebung	44
3.3.1 Testung der Fluorophorkompatibilität im Zellmodell.....	44

3.3.2 FRET-Nachweis in ALK-positiven Zellmodellen.....	47
3.3.3 Kontrolle der FRET-Bildgebung im ALK-negativen Zellmodell	49
3.4 Anwendung der FRET-Bildgebung auf inhibierte Zellen.....	50
3.5 Etablierung der FRET-Bildgebung an Zytopins, Ausstrichen und Zytoblocks	52
3.6 Etablierung der FRET-Bildgebung an Lungengewebe	56
3.6.1 Ermittlung der optimalen Vorbehandlung und Färbung.....	56
3.6.2 Immunfluoreszenz Darstellung von ALK und Phosphotyrosin in FFPE-Gewebe.....	61
3.6.3 Optimierung der Immunfluoreszenz von FFPE-Gewebe mit roten Fluorophoren.....	64
3.7 Anwendung des FRET-Pärchens Cy®3/Cy®5 in der konfokalen FRET-Bildgebung... 65	
3.7.1 <i>Acceptor Photobleaching</i> im Zellmodell mit Cy®3/Cy®5	65
3.7.2 <i>Acceptor Photobleaching</i> an FFPE-Gewebe mit Cy®3/Cy®5	66
3.8 Anwendung weiterer FRET-Pärchen	67
3.8.1 Kombinationen roter Fluorophore in Zellkulturmodellen.....	67
3.8.2 Rote Alexa Fluor® Fluorophore am FFPE-Gewebeschnitt	68
4. Diskussion	70
4.1 Die Inhibition der Aktivität von ALK.....	70
4.2 Etablierung der FRET-Bildgebung am Zellmodell.....	71
4.3 FRET-Bildgebung in zytologischen Diagnostikverfahren	73
4.4 FRET-Bildgebung an FFPE-Gewebe	75
5. Zusammenfassung	80
6. Literaturverzeichnis	82

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden als Vortrag vorgestellt:

T. Wagner-Gueya, H. Bohnenberger, S. Küffer, A. Emmert, B. Danner, H.-U. Schildhaus, F. Wouters, P. Ströbel, G. Bunt.

FRET-imaging as a functional biomarker for ALK-activity in Non-Small Cell Lung Cancer.

Nominierung für den Doktorandenpreis der 99. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V., Frankfurt am Main, 2015.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	konz	konzentriert
AKT	Protein-Kinase B	KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinass</i>
Apost	Akzeptor nach dem Bleichen	MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
Appe	Akzeptor vor dem Bleichen	mRNA	<i>messenger-Ribonucleinacid</i>
ATP	Adenosintriphosphat	NPM	Nucleophosmin
BCR-ABL	<i>Breakpoint-cluster-region-Abelson</i>	NSCLC	<i>Non-small-cell-lung-cancer</i> , nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
ddH₂O	doppelt deionisiertes Wasser	NON-ROI	<i>Non-Region of Interest</i> , Nichtgebleichter Bereich einer Zelle beim <i>Acceptor Photobleaching</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	p-	Phospho-
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i>	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Dpost	Donor nach dem Bleichen	PLC	Phospholipase C
Dpre	Donor vor dem Bleichen	raf	<i>proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	ROI	<i>Region of Interest</i> , Gebleichter Bereich einer Zelle beim <i>Acceptor Photobleaching</i>
EML4	<i>echinoderm micotubule associated protein-like 4</i>	ROS1	Genlokus für <i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>	RTK	Rezeptortyrosinkinase
FCS	fetales Kälber-Serum	SCLC	<i>Small Cell Lung Cancer</i> , kleinzelliges Bronchialkarzinom
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer	STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>	US	<i>United States</i>
IgG	Immunglobulin G	WB	Westernblot
inv	Inversion	WD-Repeat	<i>beta-transducin</i>
JAK	Januskinase	z.B.	zum Beispiel

Physikalische Einheiten					
c	centi	rpm	<i>rounds per minute</i>	τ	<i>lifetime</i> der Fluorophore
m	milli	A	Ampere	k^2	relative Orientierung der Dipole, dimensionslos
μ	micro	V	Volt	J	Grad der Überlappung des Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrum
n	nano	g	Erdbeschleunigung	n^{-4}	medianer refraktiver Index
m	Meter	°C	Grad Celsius	QY_D	Fluoreszenzquantenausbeute
l	Liter	RT	Raumtemperatur		
M	molar	h	Stunden		
k	Kilo	Da	Dalton		

1. Einleitung

1.1. Das Bronchialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Maligne Neoplasien der Lunge gehören zu den führenden Todesursachen weltweit (Siegel et al. 2014). Jährlich erkranken 1,8 Millionen und sterben 1,6 Millionen Menschen an Bronchialkarzinomen (International Agency for Research on Cancer 2012). Die Prognose von Lungenkarzinomen ist schlecht: Fast 60% aller Fälle sind inoperabel, 40% der Erstdiagnosen befinden sich bereits im Stadium IV und die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei unter 15% (Bob und Bob 2012; Herold 2014).

1.1.2 Histo-Pathologische Einteilung

Maligne epitheliale Tumoren der Bronchien oder der Lunge, sogenannte Bronchialkarzinome, werden histologisch in kleinzellig (SCLC) und nicht-kleinzellig (NSCLC) unterteilt, da diese Unterscheidung unter anderem prognostisch und therapeutisch von großer Wichtigkeit ist (Riede und Schaefer 2001). Der häufigste diagnostizierte Typ ist das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (80%). Dieses wird histologisch in weitere Subtypen unterteilt: differenziert wird zwischen Plattenepithelkarzinomen (30% aller Bronchialkarzinome), Adenokarzinomen (30%), großzelligen Karzinomen (10%), Karzinoiden (2%) und weiteren selteneren Subtypen (siehe Abb. 1) (Bob und Bob 2012).

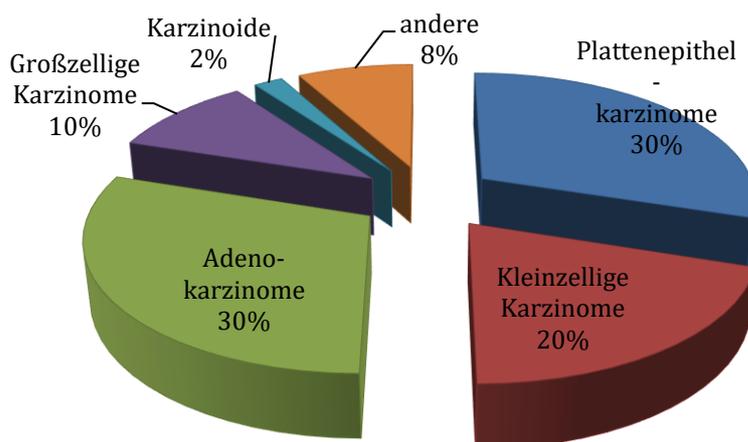


Abb. 1: Anteile der Bronchialkarzinomsubtypen in Prozent. Dargestellt ist die prozentuale Aufteilung der wichtigsten histologischen Subtypen der Bronchialkarzinome. Die epidemiologischen Daten sind modifiziert nach Angaben von Bob und Bob (2012, S. 422).

1.1.3 Karzinogenese des Bronchialkarzinoms

Die Ursachen der Entstehung von Neoplasien sind vielfältig und in genetischen und epigenetischen Faktoren begründet. Die Lunge ist ein häufiger Locus von Primärtumoren, da sie als Organ der Atemwege fortlaufend mit Noxen und Reizen konfrontiert wird, welche die zellulären Strukturen schädigen (Riede und Schaefer 2001).

Die Hauptursache des Bronchialkarzinoms ist in der Inhalation schädigender Noxen wie Tabakrauch (85% der Fälle), beruflicher Karzinogene wie Asbest (8%) und Luftverschmutzung (3%) begründet (Bob und Bob 2012). Die fortwährende Exposition dieser schädigenden Noxen, die unter anderem die Epithelzellen der konduktiven und respiratorischen Atemwege schädigen, führt zu genetischen Mutationen der betroffenen Zellen, die sich mit der Zeitspanne der Exposition summieren (Hanahan und Weinberg 2011).

Der Anteil nicht-rauchabhängiger Lungenkarzinome wird in der europäischen Bevölkerung auf 15%, in der asiatischen Bevölkerung auf bis zu 32,4% geschätzt (Yano et al. 2011). Die primäre Ursache der Tumorentstehung ist bei Nichtrauchern häufig unklar, jedoch finden sich gehäuft bestimmte genetische Mutationen (siehe Abb. 2), wie z.B. in 10-20% der Fälle Mutationen des *Epidermal Growth Factor Receptors* (EGFR) im Adenokarzinom der Lunge. Der Signalweg des EGFR kann bei nachgewiesener EGFR-Mutation medikamentös blockiert werden, welches zum klinischen Ansprechen des Tumors führt (Cooper et al. 2013). Ein weiterer Nichtraucher-assoziiertes molekularer Subtyp des Adenokarzinoms ist die 2007 entdeckte Translokation zwischen dem *echinoderm microtubule associated protein-like 4* (EML4) und der *anaplastic lymphoma kinase* (ALK), welche in 3-5% der Fälle nachzuweisen ist (Sakai et al. 2013). Diese Translokation führt zur onkogenen Aktivierung der Kinasedomäne von ALK (Soda et al. 2007). Seit 2011 werden spezifische Medikamente in der onkologischen Therapie gegen die EML4-ALK-Aktivität eingesetzt.

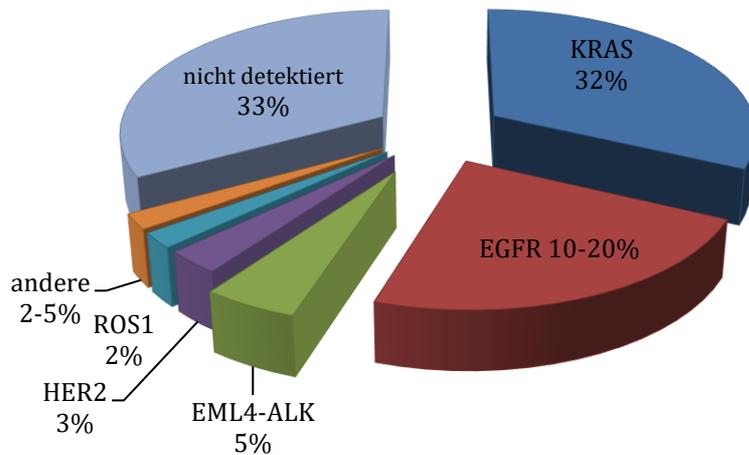


Abb. 2: Übersicht detektierter Mutationen im Adenokarzinom der Lunge. Diese prozentuelle Übersicht verdeutlicht den Anteil bekannter Mutationen im Adenokarzinom der Lunge. Das Diagramm ist modifiziert nach Angaben von Cooper et al. (2013, S. 479-490) und Sakai et al. (2013).

1.2 ALK

1.2.1 Die *anaplastic lymphoma kinase*

Die *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) gehört zu der Insulinrezeptorsuperfamilie und ist ein Oberflächenrezeptor mit Kinaseaktivität (Lemmon und Schlessinger 2010). ALK wird hauptsächlich während der embryologischen Entwicklung als wichtiger Wachstumsfaktor des Nervensystems exprimiert. Die genauen Mechanismen ihrer Aktivierung beim Erwachsenen sind bisher unbekannt. Zudem wurde ALK-mRNA in Testes, Cerebrum, Intestinaltrakt, Prostata und Colon und in schwacher Expression im Nervensystem erwachsener Säugetiere nachgewiesen (Morris et al. 1994).

1.2.2 Struktur der Kinase-Domäne von ALK

Die Kinase-Domäne von ALK besteht aus einer kurzen N-terminalen Schleife, die sich zusammensetzt aus α -Helices und β -Faltblättern, und einer längeren C-terminalen Schleife (siehe Abb. 3) (Karlsson et al. 1993, Roskoski 2013). Die N-terminale Schleife beinhaltet unter anderem eine regulatorische α C-Helix, welche in aktiver oder ruhen-der Position vorhanden sein kann. Ebenfalls ist in dieser Schleife ein Glycin-reicher und ein ATP-Phosphat-bindender Anteil vorhanden. Die lange C-terminale Schleife

besteht hauptsächlich aus α -Helices, inklusive des katalytischen Anteils und des aktivierenden Segments. Das aktivierende Segment beeinflusst vor allem die Substrataffinität und die katalytische Effizienz, da es sich neben der C-terminalen Schleife zusätzlich aus Anteilen der N-terminalen Schleife und des Adenin-Anteils eines ATP zusammensetzt (Taylor et al. 2012).

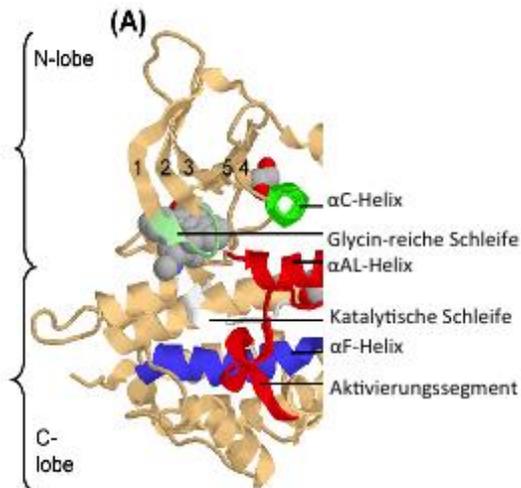


Abb. 3: Die Struktur der ALK. Die Struktur stellt das nicht-aktive Enzym dar. N-lobe= N-terminale Schleife; C-lobe= C-terminale Schleife. Die N-terminale Schleife beinhaltet die regulatorische α C-Helix, einen Glycin-reichen und einen ATP-bindenden Anteil. Die C-terminale Schleife beinhaltet den katalytischen Anteil und das aktivierende Segment. Abbildung adaptiert nach Roskoski (2013).

1.2.3 Aktivitätsregulierung von Rezeptortyrosinkinasen

Protein-Kinasen regulieren eine Vielzahl von Zellprozessen, wie z.B. die Apoptose von Zellen, den Zellzyklus, das Zytoskelett, Zelldifferenzierung und –entwicklung, die Immunantwort, die Funktion des Nervensystems und die Transkription (Alonso et al. 2004). Folglich spielen sie eine sehr bedeutende regulatorische Rolle in der Zellbiologie.

Die Familie der humanen Protein-Kinasen besteht aus 518 Genen, was sie zu einer der größten Genfamilien macht (Manning et al. 2002). Die Proteine dieser Genfamilie werden aufgrund ihrer phosphorylierten –OH-Gruppen in Serin-/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Kinase-ähnliche Proteine unterteilt. Kinasen können auf verschiedene Weisen aktiviert werden und greifen positiv oder negativ regulierend in zelluläre Prozesse ein. Eine Möglichkeit der Aktivierung ist die Phosphorylierung der Kinasen selbst. Phosphorylierte Protein-Kinasen initiieren die Signaltransduktion über verschiedene Signalkaskaden. In gesunden Zellen dephosphorylieren die Protein-Phosphatasen die Kinasen und sorgen somit dafür, dass die Phosphorylierung der Protein-Kinasen ein reversibler und regulierter Prozess ist (Alonso et al. 2004).

Im Gegensatz hierzu sind in Tumorzellen konstitutiv aktive Tyrosinkinase wie ALK nachweisbar. Eine Möglichkeit der Aktivierung konstitutiv aktiver Tyrosinkinase ist die Mutation, die zu erhöhter dysregulierter Kinaseaktivität und damit zu schnellerer Teilung, unkontrolliertem Wachstum und Überleben der Tumorzellen führt (Hanahan und Weinberg 2011).

Durch Dimerisierung von Tyrosinkinase wird die für die Kinaseaktivität wichtige *trans*- und Autophosphorylierung in zwei Phasen initiiert (Lemmon und Schlessinger 2010, Roskoski 2013): Die erste Phase beschreibt die *trans*-Autophosphorylierung, in der Tyrosinreste innerhalb der aktivierenden Domäne der Kinase in einer festgelegten Reihenfolge phosphoryliert werden. Die zweite Phase bezieht sich auf Phosphotyrosinreste, die mit Signalmolekülen interagieren (Schlessinger und Lemmon 2010).

Eine für onkogene Kinase beschriebene Eigenschaft von ALK ist die Autoinhibition der Kinase-Domäne durch die regulierende α C-Helix und die Blockade der Substratbindestelle durch das aktivierende Segment (Huse und Kuriyan 2002). Daher wird angenommen, dass die Phosphorylierung des aktivierenden Segments von benachbarten ALK-Proteinen katalysiert wird, dessen Voraussetzung die Dimerisierung von ALK ist. Die Phosphorylierung der Kinasedomäne durch Dimerisierung von ALK ist eine wichtige Voraussetzung für die konstitutive Aktivierung von *Downstream*-Signalwegen (Roskoski 2013).

Die Phosphorylierung und Autophosphorylierung an den jeweiligen Domänen der ALK ist in diesem Zusammenhang eine Voraussetzung für die Interaktion mit anderen Partnern der Signalkaskade (Roskoski 2013).

1.2.4 ALK-abhängige Signalwege

ALK ist seit über 20 Jahren als onkogener Fusionspartner von Nucleophosmin (NPM) im anaplastischen großzelligen Lymphom, einem hochmalignen peripheren T-Zell-Lymphom, bekannt (Morris et al. 1994). NPM-ALK ist eine membranständige Tyrosinkinase bestehend aus 1030 extrazellulären Aminosäuren und 563 intrazellulären Aminosäuren, inklusive der katalytischen Kinasedomäne (Lee et al. 2010). Autokrine und parakrine Stimulation, sowie Dimerisierung und *trans*-Autophosphorylierung der Kinasedomäne von ALK führen zu einer Aktivierung von Signaltransduktionswegen (Palmer et al. 2009). Bis heute wurden über 24 weitere ALK-Fusionsproteine beschrieben (Tabbó et al. 2012).

Als Signalwege von ALK wurden vor allem der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg (MAP-Kinase-Signalweg), der JAK/STAT-Signalweg, der PI3-Kinase/AKT-Signalweg und der PLC- γ -Signalweg beschrieben (Roskoski 2013). Der PLC- γ -Signalweg sowie Ras/Raf/ERK1/2-Signalwege senden proliferative Signale an den Zellkern und sorgen somit für Zellteilung und -wachstum. Der JAK/STAT- und PI3K/AKT-Signalweg verstärkt die anti-apoptotischen Signale an den Zellkern (Chiarle et al. 2008, Roskoski 2013).

1.3 Die Translokation der *anaplastic lymphoma kinase* im Adenokarzinom der Lunge

1.3.1 Erstbeschreibung der EML4-ALK-Translokation

Im Adenokarzinom der Lunge wurde ALK als Translokationspartner des *echinoderm microtubule associated protein-like 4* (EML4) beschrieben (Soda et al. 2007). Eine Inversion im Chromosom 2 (*inv(2)(p21p23)*) in 3-5% der Adenokarzinome führt dazu, dass die N-terminale Region von EML4 mit der Kinasedomäne von ALK fusioniert und somit ein zytoplasmatisches Fusionsprotein entsteht (Soda et al. 2007). Bis dato wurden verschiedene Fusionsvarianten von EML4-ALK im Adenokarzinom der Lunge beschrieben. Das Fusionstranskript Variante 1 kennzeichnet die Variante, bei welcher EML4 nach Exon 13 unterbrochen wurde und gleichzeitig vor Exon 21 von ALK invertiert fusioniert wurde (siehe Abb. 4). Mittels weiterer Analysen wurde ein Produkt beschrieben, in dem Intron 20 von EML4 invertierte und mit Intron 20 von ALK fusionierte, bezeichnet als EML4-ALK Variante 2 (Soda et al. 2007).

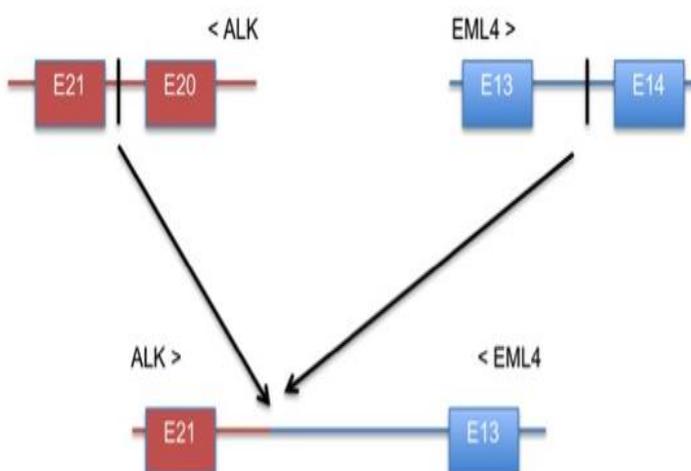


Abb. 4: Splicingvariante EML4-ALK (Variante 1). Diese Übersicht eines Ausschnittes von Chromosom 2 stellt die Splicingvariante 1 von EML4-ALK, einem 4-kilobase (4kb) großem Produkt, dar. Die Sequenzen 297 bp vor Exon 21 von ALK fusionieren mit 3,6kb nach Exon 13 von EML4, modifiziert nach Soda et al. (2007).

Die Häufigkeit der EML4-ALK Translokation liegt bei 24.000 Neuerkrankungen pro Jahr gemessen an 1,8 Millionen Neuerkrankungen von Lungenkarzinomen weltweit (International Agency for Research on Cancer 2012). Die Prävalenz von 5% scheint auf den ersten Blick selten verglichen z.B. mit der Prävalenz von BCR-ABL, welche in über 90% der Mutationen in Zellen der Chronisch Myeloischen Leukämie nachweisbar ist (An et al. 2010). Angesichts der Häufigkeit von Lungenkarzinomen ist jedoch die absolute Häufigkeit der BCR-ABL Mutation vergleichsweise gering verglichen mit 24.000 Neuerkrankten aufgrund von EML4-ALK (International Agency for Research on Cancer 2012).

Aufgrund der hohen Prävalenz von Lungentumoren ist daher der genaue Nachweis der EML4-ALK-Translokation von großer Bedeutung, da ALK-spezifische Inhibitoren für eine gezielte Therapie eingesetzt werden können.

1.3.2 Therapie der EML4-ALK positiven Adenokarzinome der Lunge

Die chirurgische Resektion des Tumors ist für nicht-metastasierte nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome das wichtigste Therapieverfahren (Collins et al. 2007). Es werden jedoch viele Diagnosen erst im metastasierten Stadium gestellt, da die anfänglichen Symptome sehr unspezifisch sind. In diesen Fällen nimmt die Chemotherapie eine wichtige Rolle ein. Mit dem Fortschritt der medizinischen Möglichkeiten ist es von großer Bedeutung und großem Interesse, eine individuell auf den Patienten angepasste, gezielte Therapieplanung zu entwickeln. In diesem Zusammenhang hat die Entdeckung der EML4-ALK-Translokation 2007 zu Forschung hinsichtlich gezielter, ALK-spezifischer Tyrosinkinaseinhibitoren geführt (Steuer und Ramalingam 2014).

Aktuell wird der ALK-Inhibitor Crizotinib (Xalkori®, Pfizer) als Erstlinientherapeutikum adjuvant im Stadium IV eingesetzt (Bergethon et al. 2012). Die hohe Selektivität von Crizotinib führte dazu, dass ein effektives und verlängertes Therapieansprechen mit gleichzeitig geringer Toxizität und wenig Nebenwirkungen verzeichnet werden konnte (Christensen et al. 2007, Gridelli et al. 2014). In den Jahren 2007-2011 wurde die Therapie mit Crizotinib an 149 Patienten mit EML4-ALK Nachweis in einer Phase III Studie getestet. In 90% der Fälle wurde eine Abnahme der Tumorgröße verzeichnet. 60,8% der Patienten sprachen auf die Therapie nach durchschnittlich 7-9 Wochen Therapiedauer an. Ebenfalls beobachtet wurde eine verlängerte mediane Überlebenszeit von bis zu 12 Monaten, was folglich dazu führte, dass Crizotinib 2011 auf dem US-

amerikanischen Markt und bald darauf auf dem europäischen Markt zugelassen wurde.

In einer Studie mit 18 Patienten, die nach positivem EML4-ALK-Nachweis mit Crizotinib behandelt wurden, trat im Median nach 10,5 Monaten eine Crizotinibresistenz ein. Hierbei war bei 28%, also bei fünf Patienten, der Grund der Crizotinibresistenz durch Nachweis einer sekundären Mutation oder Genamplifizierung erklärbar (Katayama et al. 2012). Aktuell sind mehrere Resistenzmechanismen bekannt, die in ALK-positiven nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu Crizotinibresistenz führen. In vielen Fällen konnten sekundäre Mutationen der ALK-Kinase-Domäne sowie Amplifikationen des ALK-Lokus nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite konnten in einigen Proben keine dieser sekundären Mutationen oder Amplifikationen nachgewiesen werden, sodass man von Mutationen in Interaktionspartnern von ALK ausgeht, welche die Signaltransduktion wiederum verstärken und somit zu Tumorprogression führen (Choi et al. 2010; Sasaki et al. 2010; Katayama et al. 2012; Doebele et al. 2012; Awad und Shaw 2014).

2014 wurde der ALK-spezifische Inhibitor Ceritinib (ZYKADIA™, Novartis), auch genannt LDK378, auf dem US-amerikanischen Markt zugelassen. Vorausgegangen war eine Studie von 114 Patienten mit EML4-ALK-positiven nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, von denen 80 Patienten in vorherigen Therapieversuchen mit Crizotinib behandelt und resistent worden waren. Mit einem Ansprechen von 58% aller 114 Patienten auf die Therapie mit LDK378 und einer medianen progressionsfreien Zeit von 7 Monaten ist diese Rate mit der von Crizotinib vergleichbar. Unter den Patienten, die gegen Crizotinib eine Resistenz entwickelten, konnte anschließend in 56% ein Ansprechen auf Ceritinib verzeichnet werden. Bei einer Therapie mit LDK378 ist zu beachten, dass eine höhere Toxizität postuliert wird, sodass auf Nebenwirkungen bei Herzinsuffizienz, Arrhythmien, Long-QT-Syndrom, Elektrolytentgleisungen, Lebererkrankungen und Diabetes mellitus verstärkt geachtet werden muss (Shaw et al. 2014). Um gezielte Aussagen über Effektivität und Prognose der Therapie mit LDK378 treffen zu können, sind langfristige klinische Studien nötig, die verschiedene Patientenkohorten mit und ohne vorherige Chemotherapie und anschließender Ceritinibgabe analysieren (Cooper et al. 2014).

Die Daten aus den Crizotinib- und Ceritinibstudien zeigen, dass der molekularpathologische Nachweis der EML4-ALK Translokation entscheidend für den Therapieerfolg

ist, da vor allem Patienten mit nachgewiesener Translokation von einer gezielten Therapie profitieren.

1.3.3 Aktuelle Verfahren zum Nachweis von EML4-ALK in der Routinediagnostik

EML4-ALK-Translokationen im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen sind häufig mit klinischen Aspekten wie Nichtraucherstatus, weibliches Geschlecht, junges Alter, sowie muzinösen und siegelringzelligen Adenokarzinomen in Zusammenhang gebracht worden (Rodig et al. 2009; Shaw et al. 2009; Kwak et al. 2010). Diese Korrelationen sind jedoch nicht spezifisch, sodass molekulare Nachweisverfahren als Screeningmethoden angewendet werden müssen. In der Routinediagnostik findet der Nachweis von EML4-ALK hauptsächlich an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben statt (Klopfleisch et al. 2011). Dabei werden vor allem die Immunhistochemie (IHC), Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) und neuerdings das *Next Generation Sequencing* angewendet. Zum Nachweis des ALK-Status im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom beschreibt die US-amerikanische Gesundheitsorganisation die Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit assay, Abbott Molecular Inc.) und die Immunhistochemie als Goldstandard (Riely et al. 2011, Pekar-Zlotin et al. 2015). Mittels FISH werden fluoreszierende Sonden an die bekannten Translokationspunkte von EML4-ALK der DNA der zu untersuchenden Zellen hybridisiert. Diese Sonden fluoreszieren entweder getrennt voneinander rot und grün, wenn eine ALK-Translokation vorliegt, oder bilden ein gelbes Fusionssignal, wenn keine Translokation vorliegt. Um anschließend die Probe als ALK-positiv zu klassifizieren, müssen $\geq 15\%$ der Tumorzellkerne getrennte grüne und rote Fluoreszenzsignale aufweisen (Shaw et al. 2009).

Die Immunhistochemie wurde in den letzten Jahren in der ALK-Status-Diagnostik nur selten in Erwägung gezogen, da die nicht ausreichend etablierten Färbemethoden von EML4-ALK-Fusionsproteinen zu falsch-negativen Ergebnisse führt (Minca et al. 2013). Neuere Studien zeigen, dass die Optimierung der immunhistochemischen Färbung sowie verbesserte Antikörpersysteme zu einer höheren Sensitivität und Spezifität dieser Methode führen, die mit der FISH zu vergleichen ist (Takeuchi et al. 2009; Mino-Kenudson et al. 2010).

Nachweise mittels PCR-Amplifikationen könnten als alternative Screeningmethode angesehen werden, da sie objektive und quantitative Aussagen über den ALK-Status

treffen, bieten jedoch aufgrund der verschiedenen EML4-ALK Varianten eine Unsicherheit hinsichtlich der Sensitivität (Wallander et al. 2012).

Eine weitere Methode stellt das *Next Generation Sequencing* dar, mit der Proben aus Adenokarzinomen auf EML4-ALK-Translokationen untersucht werden können (Pekar-Zlotin et al. 2015).

Trotz der genauen Nachweisverfahren mittels FISH und Immunhistochemie und anschließender Therapie mit Crizotinib sind nicht alle EML4-ALK-positiven Bronchialkarzinome sensitiv für diese Therapie: Obwohl die Therapie nach FISH-Nachweis erfolgt, liegt die objektivierte Antwortrate von Crizotinib bei 56%. 31% der Patienten bleiben in einem stabilen Zustand. 12% der Patienten zeigen eine Krankheits-Progression trotz Therapie (Bang 2011).

Der Phosphorylierungsstatus von ALK könnte ein wichtiger Parameter für die Prädiktion des Therapieansprechens sein, da er Rückschlüsse auf die Kinaseaktivität von ALK gibt. Ein Tumor mit starker ALK-Aktivität spricht hypothetisch vermutlich besser auf eine Therapie mit Crizotinib oder Ceritinib an. Die Quantifizierung der ALK-Aktivität einer Probe durch Bestimmung ihres Phosphorylierungsstatus könnte somit ein alternatives Verfahren für die Therapieplanung mit ALK-Inhibitoren darstellen. .

1.4 Konfokale Lasermikroskopie

1.4.1 Definition von Fluoreszenz

Fluoreszenz entsteht durch die Absorption von kurzwelligem Licht und Emission von längerwelligem Licht. Durch Anregung mit Licht absorbieren bestimmte Elektronen die Lichtphotonen und gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau. Dieser Zustand dauert nur wenige Nanosekunden und die Elektronen fallen auf ihren ursprünglichen Energiegrundzustand zurück. Hierbei setzen sie die freiwerdende Energie als Fluoreszenzlicht frei. Das so emittierte Licht ist etwas energieärmer und besitzt eine um 20-50nm längere Wellenlänge, welches auch als „Stokes-Differenz“ bezeichnet wird (http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/definition/1_einleitung.htm).

Aufgrund dieser „Stokes-Differenz“ ist es möglich, Fluoreszenz darzustellen, da anregende Wellenlängen und die fluoreszierenden Wellenlängen voneinander abgrenzbar sind. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen können Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorophore) mit Antikörpern gekoppelt werden, die spezifisch gegen das zu detektierende Protein

gerichtet sind. Eine gute Möglichkeit zur Visualisierung von Fluoreszenzen ist die Darstellung mittels konfokaler Lasermikroskopie.

1.4.2 Das konfokale Mikroskop

Das konfokale Mikroskop besteht aus einem zentralen optischen Mikroskop, einem oder mehreren elektronischen Detektoren, diversen Lasersystemen, inklusive der Möglichkeit der Auswahl verschiedener Wellenlängen, und einem Computer zur Visualisierung der elektronischen Information. Im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop, welches Gewebe, Zellen, Organellen und Proteinkomplexe bis 200 nm auflösen kann, kann ein konfokales Mikroskop Proteininteraktionen unter 100 nm sowie Molekülinteraktionen unter 10 nm auflösen und darstellen (Sun et al. 2011). Eine Besonderheit des konfokalen Mikroskops ist, dass keine Durchlichttechnik verwendet wird, sondern die *Pinhole*-Technik, die es dem Benutzer erlaubt, die gewünschte Schnittebene der Probe darzustellen. Zur Darstellung mittels konfokaler Lasermikroskopie können Proben mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörpersystem, welches gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, markiert werden. Die an die Probe gebundenen Fluorophore besitzen spezifische Absorptions- und Emissionsspektren. Diese Fluorophore können durch das Lasersystem des konfokalen Mikroskops angeregt werden und ihre emittierende Fluoreszenz kann mittels Detektoren aufgenommen werden. Die resultierenden Informationen werden mittels Computer dargestellt. So können hochauflösende Bilder von Zellen oder Gewebeproben von Patienten hergestellt werden. Diese Fluoreszenzmessung bietet einerseits den Nachweis des jeweils zu detektierenden Proteins, da dieses mit fluoreszierenden Antikörpern markiert wurde, und andererseits eine Möglichkeit zu Messung von Proteininteraktionen mittels Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)-Bildgebung, welche am konfokalen Mikroskop durchgeführt werden kann.

1.4.3 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)

Der Förster Resonanz Energie Transfers (FRET), auch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer genannt, beruht auf einer 1946 erstmalig von Theodor Förster publizierten Theorie, die eine nicht-radioaktive Interaktion zwischen Molekülen beschreibt. Im Detail postulierte T. Förster, dass ein im Fluoreszenzstadium angeregter Donor einen Teil seiner Energie auf einen fluoreszierenden Akzeptor mittels Dipol-Dipol-Interaktion überträgt. T. Förster errechnete den Abstand von 1-10 nm, in dem FRET wahrschein-

lich sei und beschrieb somit die Theorie, um quantitative Messungen über Protein-Protein-Interaktion zu etablieren (Clegg et al. 2006).

Die Interaktion kann zwischen Proteinen gemessen werden, die mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind. Ein Fluorophor wird als Donor bezeichnet, da er einen Teil seiner Energie bei Abgabe seines Fluoreszenzlichtes auf den anderen Fluorophor, den Akzeptor, überträgt. Dieses geschieht, wenn sich die Dipolradien der jeweiligen Fluorophore ausreichend dicht beieinander befinden und das Emissionsspektrum des Donors in das Absorptionsspektrum des Akzeptors hineinreicht. Dieser Prozess wird in **Abb.5** verdeutlicht: Ein Fluorophor X wird durch eine bestimmte Wellenlänge von Licht in einen angeregten Zustand gehoben, in dem er nur wenige ns verbleibt. Während er in den stabileren Grundzustand zurückfällt, gibt er die überschüssige Energie als sichtbares Fluoreszenzlicht ab. Ist in unmittelbarer Nähe ein Akzeptor vorhanden, gibt der Donor einen Teil seiner Energie an den Akzeptor ab. Dadurch ist die Energie des Fluoreszenzlichtes des Donors vermindert verglichen mit seinem Fluoreszenzlicht ohne Akzeptor (**Abb. 4**). Auch die Fluoreszenz *lifetime* τ des Donors ist in Anwesenheit des Akzeptors gemindert, da ein Teil der Energie der Fluoreszenz auf den Akzeptor übertragen wird. Ist der Akzeptor nicht vorhanden, ist die *lifetime* τ unverändert normal.

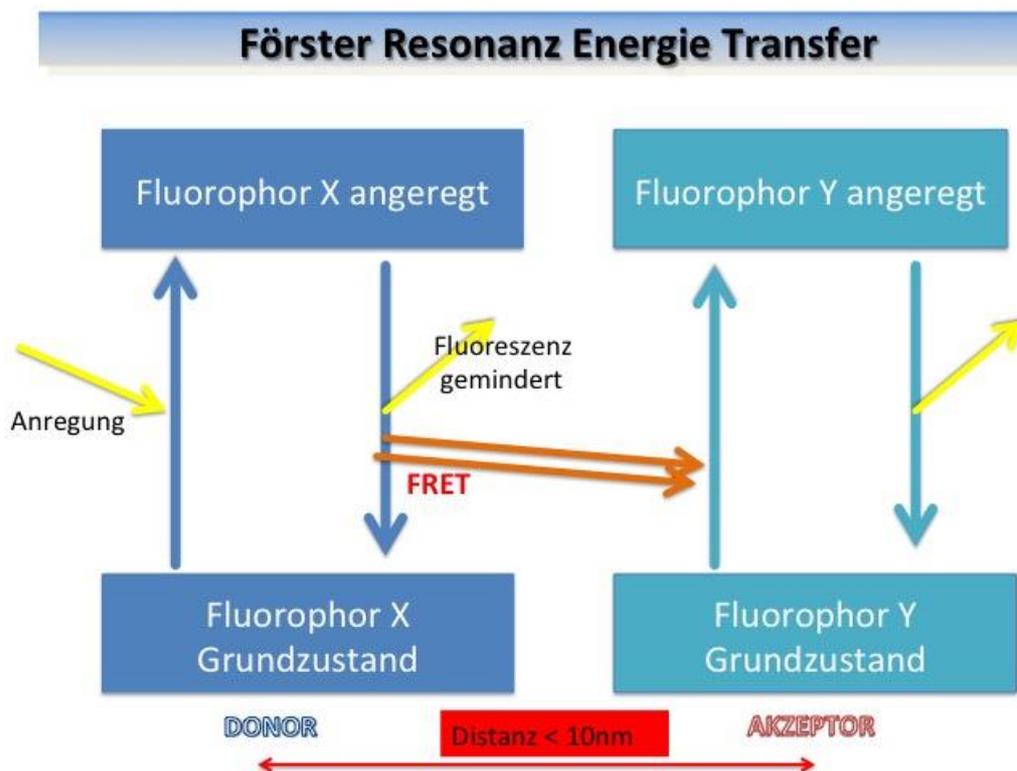


Abb. 5: Schema zum Förster Resonanz Energie Transfer: Dieses Diagramm stellt schematisch die Energieübertragung dar, welche durch FRET beschrieben wird. Wird ein Fluorophor

X angeregt (linker Pfeil), wird er in einen instabilen, energiereichen Zustand gehoben, der nur wenige Nanosekunden anhält. Während er in den stabileren Grundzustand zurückfällt, gibt er die überschüssige Energie als sichtbares Fluoreszenzlicht ab. Befindet sich nun in unmittelbarer Nähe unter 10 nm ein weiterer Fluorophor Y, kann ein Teil der Energie von Fluorophor X auf Fluorophor Y übertragen werden (mittlere orangene Pfeile). Daher wird X als Donor und Y als Akzeptor bezeichnet. Diese Energieübertragung wird als FRET bezeichnet.

Aus dieser Theorie leiten sich die Formeln ab, um einerseits die FRET-Effizienz (E) zu messen und andererseits den Abstand zu ermitteln, an dem die Hälfte der Energie des Donors (R_0) im angeregten Zustand auf den Akzeptor übertragen wird.

$$\text{a) } E = \frac{1}{1+(R/R_0)^6} \quad \text{oder} \quad r = R_0 \left[\left(\frac{1}{E} \right) - 1 \right]^{1/6}$$

Formel a): FRET-Effizienz. Die FRET-Effizienz ist umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Radius zwischen den Dipolen. R= Distanz in Angström, E= Effizienz (Szalóki et al. 2013), r = Radius.

R_0 ist die Distanz, an der die Hälfte der Energie des Donors an den Akzeptor transferiert wurde ($E=50\%$). Diese Distanz kann anhand von Formel b) berechnet werden. Da die Effizienz des Energietransfers umgekehrt proportional zu der 6. Potenz der Distanz zwischen den Molekülen ist, ist der FRET in einem Bereich von 1-10nm limitiert. Daher ist die örtliche Nähe ein wichtiger Parameter. Die Annäherung von Molekülen von unter 10nm ist in der Biologie am wahrscheinlichsten, wenn z.B. Proteine mit ihren Bindungspartnern interagieren. Die FRET-Effizienz in % ist demnach als Marker für die Interaktion von Fluorophoren zu verstehen.

$$\text{b) } R_0 = 0,211 [k^2 n^{-4} QY_D J]^{1/6}$$

Formel b): Distanz, bei der 50% der FRET-Effizienz erreicht sind (R_0). k^2 ist dimensionslos und beschreibt die relative Orientierung zwischen den Dipolen der Donoremission und der Akzeptorabsorption. k^2 kann nie 0 sein, wenn ein FRET entstehen soll und ein größeres k^2 steigert die Wahrscheinlichkeit von FRET. k^2 bewegt sich in einem Rahmen von 0 bis 4. n^{-4} ist der mediane refraktive Index. QY_D beschreibt die Fluoreszenzquantenausbeute, J beschreibt den Grad der Überlappung zwischen Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrum.

Aus Formel b) ist ersichtlich, dass nicht nur der Abstand zwischen zwei Fluorophoren ausschlaggebend für einen erfolgreichen FRET ist, sondern auch die fluoreszierenden FRET-Partner nach der Überlappung des Donoremissions- und Akzeptorabsorptionsspektrums ausgesucht werden müssen. Dahingehend wurden modernisierte organische Fluorophore entwickelt, die verbesserte Photo- und pH-Stabilität sowie breitere Überlappungen der Spektren aufweisen (Wallrabe und Periasamy 2005).

1.4.4 Nachweis des FRET mittels *Acceptor Photobleaching*

Zum Nachweis eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer am konfokalen Laser-mikroskop wird der Akzeptorfluorophor mittels wellenlängenspezifischer, hoher Laserexposition eliminiert (=Bleichen). Hieraus entsteht eine Intensivierung der Donorintensität, da der Donor folglich keine Energie mehr an dem Akzeptor abgeben kann. Die Basis des FRET wurde somit durch die Laserexposition zerstört. War im Vorfeld FRET vorhanden, lässt sich nach Eliminierung des Akzeptors eine Steigerung der Donorintensität ermitteln (Kenworthy 2001; Day et al. 2003). Diese Differenz der Donorintensität kann mit der FRET-Effizienz korreliert werden.

1.4.5 Messung der Phosphorylierung mittels FRET-Bildgebung

Tyrosinkinasen können mittels Phosphorylierung aktiviert werden. Zur Messung des Phosphorylierungsstatus einer Kinase kann mittels FRET die kovalente Bindung von Phospho-Resten an die Tyrosinkinasedomäne gemessen werden. Wenn die Kinase mit einem spezifischen, Fluorophor-gekoppelten Antikörper und phosphorylierte Tyrosine jeweils mit einem spezifischen, Fluorophor-gekoppelten Antikörper markiert werden, kann hieraus ein FRET-Paar resultieren. Das Emissionsspektrum des Fluorophors der Kinase muss mit dem Absorptionsspektrum des Fluorophors des Phosphotyrosins überlappen. Außerdem muss der Abstand zwischen den Antikörpern weniger als 10nm betragen. Durch die kovalente Bindung der Phosphoreste an den Tyrosinen ist diese extreme Nähe theoretisch gegeben. Die an sie gebundenen Antikörper können auf der anderen Seite diese Nähe durch eine ungünstige Orientierung zueinander aufheben. Daher ist die Testung verschiedener Antikörpersysteme im Vorfeld eines FRET-Experiments von großer Bedeutung. Wenn alle Bedingungen gegeben sind, kann FRET gemessen werden. In dieser Studie soll das Kinase-Fluorophor den Donor und das Phosphotyrosin-Fluorophor den Akzeptor darstellen. Wenn die Kinase phosphoryliert ist, erzeugen die Antikörper der Phosphotyrosine zusammen mit den Antikörper der Kinase ein FRET-Signal.

1.5 Ziel der Studie

Lungenkrebs gehört zu den Erkrankungen mit der höchsten Mortalität weltweit (International Agency for Research on Cancer 2012). Mutationen in Subtypen der Bronchialkarzinomen stellen therapeutische Angriffspunkte dar. Die Translokation von EML4-ALK im Adenokarzinom der Lunge kann medikamentös spezifisch behandelt werden. Daher ist der genaue molekularpathologische Nachweis von EML4-ALK im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ein wichtiger Schritt in der gezielten onkologischen Therapie von erkrankten Patienten. Aktuell erfolgt der Nachweis dieser Translokation mittels FISH als Goldstandard in pathologischen Instituten. Jedoch sind nicht alle ALK-positiven Adenokarzinome sensitiv auf die Therapie. Die quantitative Messung der ALK-Aktivität mittels FRET-Bildgebung könnte theoretisch zu verbesserten Vorhersagen über das Therapieansprechen verhelfen.

In der vorgelegten Dissertation sollten einerseits anhand von Zelllinien die benötigten Färbungen und das System der konfokale Lasermikroskopie etabliert werden und andererseits die ALK-Phosphorylierungsrate mit und ohne Zugabe von Inhibitoren wie Crizotinib und LDK378 gemessen werden. Des Weiteren sollten in dieser Studie die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Zellmodell auf Patientengewebe übertragen werden.

Mittels Übertragung der Methodik der FRET-Bildgebung auf Patientengewebe sollte die Basis geschaffen werden, mit der im klinischen Kontext Patientenproben auf ALK-spezifische Phosphorylierung und das Therapieansprechen untersucht werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Geräte

Akkupipettierhilfe Akujet	Brand, Wertheim
Autoklav	Systemec, Linden
Blotwippe Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Blotapparatur Trans-Blot Turbo™	BIO-RAD, Hercules, Californien
Blotenwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Dielheim
Einbettautomat Excelsior ES	Thermo Scientific, Bremen
Feinwaage R160P	Sartorius, Göttingen
FusionFX Vilber Lourmat	peqlab, VWR GmbH, Erlangen
Keyence-Messmikroskop	Keyence, Neu-Isenburg
Konfokales Laser-Mikroskop FV1000	Olympus, Southend on the Sea
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Göttingen
Mikrotom Microm HM430	Thermo Scientific, Bremen
MTS infinite M200PRO	TECAN, Schweiz
Muse® Cell Counter	Millipore Corporation, Californien
Paraffin-Einbettssystem TES 99	Medite, Burgdorf
pH-Meter	Schott Instruments, Mainz
Probenroller	ASID BONZ, Herrenberg
Sicherheitswerkbank HeraSafe Typ H	Heraeus, Hanau
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tissue-Tek® SCA, Eindeckungsautomat	Sakura, Staufen
Wasserbad	Heraeus, Hanau
Zellkultur-Inkubator	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge PerfectSpin Mini	GFL Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge Cytospin 4	Thermo Scientific, Bremen

2.1.2 Computersoftware

Excel 2010, Microsoft, Redmond, Washington	Statistik, Erstellung von Diagrammen
FluoView 4.0, Olympus, UK	Detektion von Fluoreszenz (konfokale Lasermikroskopie)
Fusion FX, peqlab, Erlangen	Detektion von Chemilumineszenz
i-control™ – Microplate Reader Software 1.10.4.0, Tecan Group Ltd., Schweiz	Zellviabilitätsmessungen
ImageJ 1.42, NIH, Bethesda, Maryland	Auswertung der Bilder der konfokalen Laser-Mikroskopie
Magellan™ - Data Analysis Software, Tecan Group Ltd., Schweiz	Proteinkonzentrationsmessung
SciDAVis, 2014 SourceForge, Dice Holdings Inc. Company, New York, USA	Statistische Auswertung der Daten aus ImageJ

Tabelle 1: Verwendete Software

2.1.3 Materialien

BD Eclipse Needle	Franklin Lakes, New Jersey
Cellclip Edelstahl JC 390	Tharmac, Waldsolms
Deckgläschen Durchmesser 15mm, rund	Menzel, Braunschweig
Deckgläschen Durchmesser 24x30mm	Menzel, Braunschweig
Deckgläschen Durchmesser 30x40mm	Menzel, Braunschweig
Filtercards, weiß	Thermo Scientific, Bremen
Flachbodenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Kanüle 5ml	Braun, Melsungen
Kapseln „Slimsette Tissue Cassettes“	Thermo Scientific, Bremen
Kryo-Röhrchen	Thermo Scientific, Bremen
Mini-size Transfer Stacks, 7.1cm x 8.5cm (Trans-Blot Turbo™)	BIO-RAD, Hercules, Californien
Mini-size Nitrocellulose, 7.1cm x 3.5cm (Trans-Blot Turbo™)	BIO-RAD, Hercules, Californien
NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel	novex® by lifetechnologies™, Carlsbad, Californien
Objektträger Süssefrost weiß	Süsse Labortechnik, Gudensberg

2. Material und Methoden

Parafilm (4 In. x 125ft. Roll)	Bemis flexible packaging, Wisconsin
Pinzette Dumont	Roth, Karlsruhe
Pipetten (2.5/20/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (5/10/25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Shandon Coverplate™	Thermo Scientific, Bremen
Slide-Rack für 15 Coverplates	Thermo Scientific, Bremen
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
TPX-Kammern, JC 406	Tharmac, Waldsolms
Verschlussröhrchen (1.5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
VP 200	ASSCON, Königsbrunn
XCell SecureLock™ für SDS-Page- Proteinauftrennung	Invitrogen, Carlsbad, Californien
Zellkratzer	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Plastikware	Greiner, Nunc, Falcon
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Albumin Fraktion V (BSA)	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Crizotinib	Sigma, St. Louis, Missouri
Dimethylsulfoxid	Sigma, St. Louis, Missouri
Emsure® Aceton	Merck, Darmstadt
Fixogum	Marabu, Stuttgart
Glycin	Sigma, St. Louis, Missouri
Gelatine (Schweinehaut)	Sigma, St. Louis, Missouri
Hämatoxylin	Dako, Dänemark
HCL	Merck, Darmstadt
Histogel	Active Biochem, Bonn
LDK378 (Ceritinib)	lifetechnologies™, Californien
L-Glutamin	lifetechnologies™, Californien

2. Material und Methoden

Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Missouri
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Missouri
n-Dodecyl- β -D-maltosid	Sigma-Aldrich, Missouri
NP40	Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich, Missouri
NuPAGE MES SDS Running Buffer	novex® by lifetechnologies™, Carlsbad, Californien
Penicillin/Streptomycin	Sigma, St. Louis, Missouri
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin
Protein-A/G-Agarose	SCBT, Santa Cruz, Californien
Protein Assay Reagent, DC	BIO-RAD, Berkeley, Californien
Proteinmarker (vorgefärbt, #26619)	Thermo Scientific, Bremen
Re-Blot Plus Strong Solution	Millipore, Temecula, Californien
Rnase-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden
Roti®-Load 1, reduzierend	Roth, Karlsruhe
RPMI-1640-Medium	Gibco, Darmstadt
SSC-Waschpuffer	Abbott Molecular, Illinois
Target Retrieval Solution, pH9	Dako Denmark A/S, Glostrup
Tergitol® solution Typ NP40, 70% in H ₂ O	Sigma, St. Louis, Missouri
Trans-Blot® Turbo™	BIO-RAD, Berkeley, Californien
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, St. Louis, Missouri
Trypsin	Gibco, Darmstadt
VP2000 Pretreatment Reagent	Abbott Molecular, Illinois
VP2000 Proteasebuffer	Abbott Molecular, Illinois
Vysis Protease I	Abbott Molecular, Illinois

2.1.5 Puffer und Medien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Medien in doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. FCS wurde für 20 Minuten bei 56° C hitzeinaktiviert und bei -20° C gelagert. Alle Puffer und Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT gelagert.

Antigendemaskierungslösung, (pH9)	10% Target Retrieval Solution (Dako, Dänemark) in ddH ₂ O
Block-Puffer	5% BSA in TBS-T
Blot-Transfer-Puffer	20% Trans-Blot® Turbo™ 5x konz. Transferpuffer, 60% ddH ₂ O, 20% Ethanol
Citrat-Puffer Lösung A	21g Citronensäure-Monohydrat/1000 ml ddH ₂ O
Citrat-Puffer Lösung B	29.4g tri-Natriumcitrat-Dihydrat/1000 ml ddH ₂ O
Citrat-Puffer pH6	1.8% Lösung A, 8.2% Lösung B in ddH ₂ O
Einfriermedium	hitzeinaktiviertes FCS, 10% (v/v) DMSO, 4° C
Eisacetone	Aceton bei -20° C
Formaldehyd 4%	4g Formaldehyd in 100 ml PBS
Formaldehyd 4.5%	4.5g Formaldehyd in 100 ml PBS
HCL	0.2 Molar in ddH ₂ O
PBS	37.5 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 8.6 mM Na ₂ HPO ₄
PBS-Gel	Gelatine 0.5g/200 ml PBS
Permeabilisationspuffer	Triton™ X-100 1,06g/ml in PBS
Quenchpuffer	Glycin (>99,0% NT), 0.5g/100 ml PBS
RPMI-Medium	RPMI, 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin
SSC-Waschpuffer	2-fach konzentrierter SSC-Waschpuffer, 0.3% NP40 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0,1% (v/v)
TBS-T	Tween-20
Trypsin/EDTA-Lösung	PBS, 0.05% (w/v) Trypsin, 0.02% (w/v) EDTA, 4°C 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 2% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail, 0,5% NP40, Lauryl 0,2%
Zell-Lysepuffer	

2.1.6 Kits

CellTiter 96® AQueous One	Promega Corporation, Wisconsin
Dako REAL™ Detection System (Alkaline Phosphatase/RED/ Rabbit/Mouse)	Dako Denmark A/S, Glostrup
Muse™ Count&Viability Kit	Millipore Corporation, Californien
Western Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer, Waltham, Michigan

2.1.7 Antikörper

Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung wurden in PBS-Gel in angegebener Konzentration eingesetzt. Antikörper zur Westernblot-Analyse (WB) wurden in TBS-T mit 5% BSA in angegebener Konzentration eingesetzt.

Antikörper	Spezies	Hersteller	Anwendung und Verdünnung
Alexa Fluor®488 Full length IgG-anti- Kaninchen IgG	Ziege	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Darmstadt	Immuncytofluoreszenz, Immunhistofluoreszenz sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Alexa Fluor®488 Full length IgG-anti- Maus-IgG	Ziege	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Darmstadt	Immuncytofluoreszenz, Immunhistofluoreszenz sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Alexa Fluor®555 Full length IgG-anti- Kaninchen IgG	Ziege	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Darmstadt	Immuncytofluoreszenz, sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Alexa Fluor®647 Full length IgG-anti- Maus-IgG	Ziege	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Darmstadt	Immuncytofluoreszenz, sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
anti-Aktin	Maus	Sigma, St. Louis, Mis- souri	WB 1:2000

2. Material und Methoden

anti-ALK	Kaninchen	Cell Signaling, Boston	Immuncytofluoreszenz, Immunhistofluoreszenz Primärantikörper, Ver- dünnung wie jeweils angegeben ; WB 1:1000
anti-Maus- Immunglobulin/HRP	Kaninchen	Dako, Glostrup	WB, sekundärer Antikörper 1: 2000
anti-Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen	Cell Signaling, Boston	WB 1:1000
anti-Phosphotyrosin (4G10)	Maus	Merck Millipore, Darm- stadt	Immuncytofluoreszenz, Immunhistofluoreszenz Primärantikörper, Ver- dünnung wie jeweils angegeben WB 1:1000
anti-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen	Cell Signaling, Boston	WB 1:1000
anti-Rabbit- Immunglobulin/HRP	Ziege	Dako, Dänemark	WB, sekundärer Antikörper 1: 2000
Cy®3 F(ab') ₂ -Fragment anti- Kaninchen F(ab') ₂ - Fragment	Ziege	Jackson Immu- noResearch Inc., West Grove, Pennsylvania	Immuncytofluoreszenz, sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Cy®3 F(ab') ₂ -Fragment anti- Maus- F(ab') ₂ - Fragment	Ziege	Jackson Immu- noResearch Inc., West Grove, Pennsylvania	Immuncytofluoreszenz, sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Cy®3 F(ab') ₂ -Fragment anti- Maus-IgG	Ziege	Jackson Immu- noResearch Inc., West Grove, Pennsylvania	Immuncytofluoreszenz, sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Cy®3 F(ab') ₂ -Fragment anti- Maus-IgG	Ziege	Jackson Immu- noResearch Inc., West Grove, Pennsylvania	Immuncytofluoreszenz, sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben

Cy®3 Full-length-IgG anti- Maus-IgG	Ziege	Jackson Immu- noResearch Inc., West Grove, Pennsylvania	Immuncytofluoreszenz, Immunhistofluoreszenz sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Cy®3 Full-length-IgG anti- Kaninchen-IgG	Ziege	Jackson Immu- noResearch Inc., West Grove, Pennsylvania	Immuncytofluoreszenz, Immunhistofluoreszenz sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Cy®3 Full-length-IgG anti- Kaninchen-IgG	Ziege	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, Darmstadt	Immuncytofluoreszenz, sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben
Cy®5 Full-length-IgG anti- Maus-IgG	Ziege	Jackson Immu- noResearch Inc., West Grove, Pennsylvania,	Immuncytofluoreszenz, Immunhistofluoreszenz sekundärer Antikörper, Verdünnung wie jeweils angegeben

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

2.1.8 Zelllinien

NCI-H2228

Die humane Zelllinie NCI-H2228 [H2228] (ATCC® CRL-5935™) wurde 1989 etabliert und stammt aus einem Lungenadenokarzinom eines weiblichen Patienten ohne Rauchervergangenheit. Diese Zelllinie weist eine EML4-ALK Translokation auf (Variante 3) und wurde in dieser Studie zur Etablierung der konfokalen Lasermikroskopie genutzt (Rikova et al. 2007).

NCI-H3122

Die Variante 3 ist ein 86 kDa grosses Protein, welches Exon 1-6 von EML4 und Exon 20-29 von ALK beinhaltet (www.atlasgeneticsoncology.org, Choi et al. 2008).

Die humane Zelllinie NCI-H3122 (auch: MGH:1180; COSMIC:1240190) wurde aus einem Adenokarzinom eines männlichen Patienten kultiviert und weist eine EML4-ALK-Translokation auf. Zusätzlich zu der Zelllinie H2228 wurde H3122 in dieser Studie

zur Etablierung der konfokalen Lasermikroskopie zum Nachweis der Phosphorylierung von ALK genutzt.

H3122 exprimiert die Variante 1 von den beschriebenen EML4-ALK Translokationen (Rho et al. 2013). Die Variante 1 von EML4-ALK ist ein 120 kDa grosses Protein, welches Exon 1-13 von EML4 und Exon 20-29 von ALK beinhaltet.

HCC827

Die humane Zelllinie HCC827 (ATCC® CRL-2868™) wurde aus dem Gewebe einer an einem Adenokarzinom erkrankten Patientin kultiviert und weist eine EGFR-Mutation (E746-A740 Deletion) auf (Okamoto et al. 2010). Diese Zelllinie ist EML4-ALK negativ und wurde in dieser Studie als Kontrollzelllinie gegenüber oben genannten Zelllinien genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Die in 2.1.8 beschriebenen adhärennten Zelllinien wurden in RPMI-1640-Medium (Gibco) mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin bei 37° C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ausgehend von der jeweiligen Dichte in den Zellkulturboxen und der unterschiedlichen Teilungsrate der Zellen wurde alle zwei bis vier Tage eine Verdünnung oder Expansion durchgeführt.

2.2.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur längeren Einlagerung wurden circa 1×10^7 Zellen abzentrifugiert (400 g, 5 Minuten) und die Zellen in 1 ml hitzeinaktiviertem FCS mit 10% DMSO aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und zuerst zwei Stunden in einem Isopropanol-Einfriergefäß bei -80° C, danach bei -140° C eingefroren. Zur erneuten Verwendung wurden die Zellen in einem 37° C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml des entsprechenden Mediums verdünnt, abzentrifugiert und anschließend in frischem Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.3 Expansion der Zellen

Zur Verdünnung oder Expansion der Zellen auf weitere Zellkulturflaschen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und je nach Größe der Flaschen mit 2-4 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 Minuten bei 37° C zur Ablösung der Zellen inkubiert. Das Trypsin wurde mittels RPMI-Medium nach 5 Minuten inaktiviert. Im Anschluss wurden 75-90% der Zelllösung verworfen und 10-25% blieben in der Zellkulturbox zur erneuten Proliferation zurück. Zur Expansion von Zellen wurde ein Teil der beschriebenen Zelllösung (ca. 1.5×10^6 Zellen) auf neue Kulturflaschen verteilt. Abschließend wurden die Zellkulturflaschen mit 5-20ml Medium aufgefüllt.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Mit dem Muse® Count & Viability Assay Kit wurde am Muse® Cell Counter die Zellviabilität der jeweiligen Proben bestimmt. Bei einer geschätzten Zellzahl der Probe von ca. 1×10^6 Zellen/ml wurden 50 µl der Zellsuspension mit 450 µl Count&Viability Reagent vermischt und mittels Flowcytometer Muse® gemessen.

2.2.1.5 Inhibition von adhärennten Zellen

Um die Zellen mit dem gewünschten Inhibitor zu behandeln, wurden 10 ml Zelllösung in Petrischalen ausgesät. Bei erreichter Dichte von 70-80% wurde das Medium abgesaugt. Direkt im Anschluss wurden 5 ml des in DMSO und RPMI-Medium gelösten Inhibitors in gewünschter Konzentration in die Petrischalen gegeben und für 0,5 bis 6 Stunden bei 37° C inkubiert.

2.2.1.6 Zelllyse von adhärennten Zellen zur Westernblot-Analyse

Zur Lyse von adhärennten Zellen wurden diese im Vorfeld auf Petrischalen gewachsenen Zellen auf Eis gestellt und zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend in 1ml PBS mittels Zellkratzer abgekratzt, so dass sich die adhärennten Zellen vom Boden der Petrischalen lösen. Die daraus resultierende PBS-Zelllösung wurde in 1,5 ml Eppendorf-Cups transferiert und für 4 Minuten bei 4° C und 400 g abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, die Proben erneut für 4 Minuten bei 4° C und 400 g abzentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 65 µl-90 µl des Lysepuffers versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit und 4° C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup transferiert. Vor Hinzufügen des Roti-Loads erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung (siehe 2.2.2.1).

45-75 µl des erhaltenem Lysats wurden im Verhältnis 4:1 mit Roti-Load versetzt und für 5 Minuten bei 95° C denaturiert und anschließend bei -20° C eingefroren.

2.2.1.7 Erstellen von Zytospins

Zur Herstellung eines Zytospins mit adhärenen Zellen wurden diese im Vorfeld für 5 Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, mit Medium inaktiviert und in 10 ml Zellkulturröhrchen überfüllt. Um einen auswertbaren Zytospin mit den Zelllinien H3122, H2228 und HCC827 zu erstellen wurde eine Zellzahl von 2.5×10^5 bis 3.5×10^5 Zellen/ml benötigt. Dafür wurden TPX- auf Objektträger mittels Cellclip befestigt. 500 µl der Zellsuspension wurden in die TPX-Kammern pipettiert und bei Raumtemperatur und 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Zwischen Objektträger und TPX-Kammern befand sich ein Filterpapier mit kreisrunder Aussparung, durch welche die Zellen während der Zentrifugation auf den Objektträger gepresst wurden. Nach Entfernen des Cellclips und des Filterpapiers war ein kreisrunder Zytospin zu erkennen, welcher 24 Stunden bei Raumtemperatur zur weiteren Verarbeitung trocknete.

2.2.1.8 Erstellen von Zell-Ausstrichen

Zur Herstellung eines Zell-Ausstriches mit adhärenen Zellen wurden diese im Vorfeld für 5 Minuten mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, mit Medium das Trypsin inaktiviert und in 10 ml Zellkulturröhrchen überführt. Um einen auswertbaren Ausstrich zu erhalten, wurde eine Zellzahl von 2.5×10^5 bis 3.5×10^5 Zellen/ml benötigt. Diese wurden in den Röhrchen für 4 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf 500 µl verworfen. 500 µl davon wurden aufgenommen und mittels Pipette wurde ein Tropfen der abzentrifugierten Zellen auf einen Objektträger gegeben und mittels eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Ein Ausstrich musste zur weiteren Bearbeitung 24 Stunden bei Raumtemperatur trocknen.

2.2.1.9 Erstellen von Zytoblocks

Das Erstellen von Zytoblocks erfolgte nach einem Protokoll von G.M. Varsegi und V. Shidham. Zur Erstellung von Zytoblocks wurden 5ml der jeweiligen Zellen (mindestens 3×10^6 pro 5 ml) in Flachboden-Röhrchen aus Glas zur Zentrifugation überführt. Diese Röhrchen wurden zur Zentrifugation in passende Plastikgefäße gestellt und 5 Minuten bei 1800 g zentrifugiert, danach wurden die kleinen Glasröhrchen entnommen und der Überstand verworfen. Mittels einer Plastikpipette wurde ein Marker hinzugefügt. Der Marker wurde aus einem 2x2 mm großem Schnitt einer in Tinte getränkten Bananen-

schale hergestellt und diente beim Schneiden der Paraffinblöcke zur Kennzeichnung der Ebene, in der sich die Zellen befinden. Auf die Zellen und den Marker wurden 1 ml Histogel gegeben und der Deckel des Glasröhrchens geschlossen. In das größere Plastikröhrchen wurden 2,5 ml 45° C warmes ddH₂O gegeben und das Glasröhrchen hineingestellt. Das Ganze wurde erneut bei 1800 g 5 Minuten zentrifugiert. Das Glasröhrchen wurde vorsichtig entnommen und 15 Minuten bei 4° C gekühlt, bis sich das Histogel verfestigte.

Um abschließend das Präparat aus dem Glasröhrchen zu entfernen, wurde dieses mit ddH₂O unterspritzt und in Kapseln zur Fixierung mit 4%-Formaldehyd überführt und in Paraffin gegossen (Varsegi GM, Shidham V 2009).

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinkonzentrationsmessung

In 96-Well-Platten wurden Triplikate von je 2 µl des Lysats pipettiert und mit je 20 µl des DC™ Protein Assay Reagent A und S (im Verhältnis 50:1 angesetzt) und anschließend mit je 200 µl des DC™ Protein Assay Reagent B (alle von BIO-RAD) versetzt. Die 96-Well-Platte wurde für 10 Minuten schüttelnd inkubiert. Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte mittels Absorptionmessgerät Magellan™ (Tecan) bei 560 nm und resultierte in der mittleren Proteinkonzentration der jeweiligen Triplikate angegeben in µg/µl, so dass die für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gewünschte Menge von 30 µg errechnet werden konnte.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von Proteinlysaten aus den oben beschriebenen Zelllinien nach Proteingröße verwendet (Laemmli 1970). Die im Vorfeld lysierten Zellproben wurden erneut bei 95° C für 5 Minuten zur Denaturierung aufgekocht und anschließend in die Kammern eines Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gels überführt (Nu Page Tris-Bis). Für die Elektrophorese wurde in vertikalen Gelkammern (invitrogen™) ein Strom mit 60 V für 15 Minuten zum Sammeln der Probe und für weitere 60 Minuten mit 120 V zum Auftrennen angelegt. Als Größenvergleich wurden 5 µl eines vorgefärbten Proteinmarkers (#26619, Thermo Scientific) verwendet.

2.2.2.3 Westernblot-Analyse

Für die Westernblot-Analyse von Proteingemischen wurden diese wie in 2.2.2.2 beschrieben aufgetrennt und die Proteine auf Nitrocellulosemembranen in Blot-Kammern von BIO-RAD übertragen. Dafür wurde eine mit Transferpuffer getränkte Filtermembran auf die Anode gelegt und darauf nacheinander die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und eine weitere in Transferpuffer getränkte Filtermembran platziert. Die Kathode wurde auf den Stapel gedrückt und ein Strom von 1.0 A und 25 V für 30 Minuten angelegt. Danach wurde die Membran für eine Stunde mit Blockingbuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Proteine zu besetzen. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4° C. Nach dreimaligem Waschen der Membran am nächsten Tag mit TBS-T für je 5 Minuten wurde sie mit einem sekundären, an Meerschweinchen-Peroxidase (HRP) gekoppelten Antikörper, der an den primären Antikörper bindet, bei RT eine Stunde inkubiert. Es folgten weitere Waschschritte mit TBS-T, bevor die Membran mit Western Lightning® Plus-ECL inkubiert wurde. Die Chemilumineszenz, welche bei Inkubation mit ECL entstand, wurde über das Fusion FX System von peqlab mit einer Beleuchtungszeit von 0,5 – 10 Minuten digital festgehalten.

Zur Detektion weiterer Antikörper auf derselben Membran wurde die Peroxidase des sekundären Antikörpers durch Inkubation mit Re-Blot Plus für 15 Minuten inaktiviert. Die Detektion eines weiteren Proteins in der Membran verlief wie oben beschrieben.

2.2.2.4 Immunopräzipitation

Zur Immunopräzipitation von Proteinen wurden 2×10^7 inhibierte oder nicht inhibierte Zellen lysiert (wie in 2.2.1.6 beschrieben) und das resultierende geklärte zelluläre Ly-sat über Nacht mit dem Präzipitations-Antikörper (ALK, 1:100) und danach für 1 h mit 30 µl Protein-A/G-Agarose (SCBT, Santa Cruz, Kalifornien) bei 4° C auf einem Schüttler inkubiert. Die Proben wurden drei Mal für 4 Minuten bei 250 g und 4° C zentrifugiert und das resultierende Pellet jeweils mit 0.5 ml Lysepuffer gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgekocht und erneut zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend der Westernblotanalyse zugeführt.

2.2.2.5 MTS-Assays

Zur Zellviabilitätsmessung wurden je 1000 Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und mit aufsteigenden Inhibitorkonzentrationen von 0 $\mu\text{M}/\text{ml}$ bis 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ versehen. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurde dem Verdünnungsmedium ebenfalls DMSO zugesetzt, um einen Einfluss von DMSO auf die Zellen auszuschließen. Die Platten wurden jeweils 0, 48, 72 und 96 Stunden inkubiert und nach der jeweiligen Zeitspanne mit 20 $\mu\text{l}/\text{Well}$ MTS-Reagenz versehen und 1-4 Stunden inkubiert, um stündlich die Absorption bei 490nm mittels i-control™ von Tecan messen zu können, welche proportional zur mitochondrialen Aktivität ist. Die erhaltenen Emissionswerte, die die Zellviabilität widerspiegeln, wurden per Excel gemittelt und mit den jeweiligen DMSO-Kontroll-Werten normalisiert. Aus den normalisierten Werten von insgesamt vier Wiederholungen wurde einerseits die Standardabweichung bestimmt und der T-Test berechnet, sowie andererseits die Diagramme erstellt.

2.2.3 Färbemethoden

In dieser Studie wurden von Patienten stammende Proben verwendet, die im Rahmen medizinisch indizierter diagnostischer oder therapeutischer Prozeduren gewonnen worden waren und deren Gebrauch vorab durch die Ethik-Kommission der Universität Göttingen genehmigt wurde (Ethiknummer 1-2-08, Antragsnummer DOK_117_015). Nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten wurden die gewonnenen Proben dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen zugeführt.

2.2.3.1 Entwässerung und Paraffineinbettung

Entwässerung und Paraffineinbettung erfolgte durch die Routineabteilung des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Zur Herstellung von Proben für die Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz wurden die Zytoblockproben und die Gewebeproben in einem Einbettautomat (Thermo Scientific) für 16h in einer aufsteigenden Alkoholreihe (75%-100% Ethanol) und abschließend mit Xylol entwässert. Anschließend wurden diese Proben in dem TES 99 Automaten (Medite) in flüssiges Paraffin gegossen und ausgehärtet, sodass ein fester Paraffinblock entstand, der mit dem Mikrotom (Thermo Scientific) geschnitten wurde. Die bis maximal 4 μm dicken Schnitte wurden auf Superfrost+ Objektträger aufgezogen. Vor den Färbungen wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-75%) rehydriert und mit den folgenden Färbeprotokollen behandelt.

2.2.3.2 Antigendemaskierung

In der Aufbereitung von Proben mittels Formalinfixation und Paraffineinbettung kann es zu strukturellen Antigenänderungen kommen, welche die Immunreaktivität herabsetzen (Shi et al. 2011). Die Proben wurden für die folgenden Färbungen nach einer absteigenden Alkoholreihe der Antigendemaskierung mittels Hitzebehandlung zugeführt. Die Hitzebehandlung funktioniert mit Hilfe eines im Dampfgerar erwärmten Puffers. Der pH-Wert dieses Puffers ist abhängig von seiner Zusammensetzung. Bei pH6 erfolgt die Vorbehandlung mit Citrat-Puffer und dauert 40 Minuten. Bei pH9 erfolgt die Vorbehandlung mit der Target Retrieval Solution (Dako Denmark A/S) und dauert 20 Minuten. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten in ein Eiswasserbad zur Abkühlung gestellt.

2.2.3.3 Immunhistochemie

1 µM dicke, auf Superfrost+ Objektträger aufgezogene Gewebeschnitte wurden 10 Minuten in Xylol und mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Antigendemaskierung erfolgte bei pH6 (40 Minuten) oder pH9 (20 Minuten). Nach einem Eiswasserbad von 10 Minuten wurden die Schnitte unter ddH₂O in die Halterungen (Coverplates™ und Slide-Racks, Thermo Scientific) zur manuellen Färbung eingespannt und mittels Zugabe von je 500 µl ddH₂O auf korrekte Position überprüft. Danach wurden sie mit je 500 µl PBS gewaschen, 5 Minuten bei RT mit je 500 µl Quench-Puffer und 5 Minuten bei RT mit je 500 µl Permeabilisationspuffer behandelt. Anschließend erfolgte das Blocken mit PBS-Gel für 15 Minuten bei RT. Die primären Antikörper wurden in PBS-Gel angesetzt und je 150 µl pro Schnitt appliziert und eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3 Mal mit PBS-Gel gewaschen und 4 Tropfen Link (sekundärer Antikörper) hinzugefügt und für 15 Minuten inkubiert, erneut 3 Mal mit PBS-Gel gewaschen und für 30 Minuten mit Label (Enzym) inkubiert. Nach erneuten Waschsritten erfolgt die Inkubation mit Chromogen Red für 20 Minuten. Danach wurden die Schnitte den Halterungen entnommen und mit ddH₂O gespült und mit Hämalaun gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und eingedeckelt.

2.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbungen mit auf Coverslips gewachsenen Zellen

Im Vorfeld der Immunzytofluoreszenzfärbungen wurden 60.000 Zellen pro Deckgläschen (rund, Durchmesser 15 mm, autoklaviert) in 12-Well-Platten ausgesät und 48 Stunden unter Zellkulturbedingungen mit 1 ml Medium/Well inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen 30 Minuten mit 4%-Formaldehyd inkubiert. Danach erfolgte das Waschen mit je 1ml Quench-Puffer/Well (5 Minuten Inkubation bei RT) zur Eliminierung unspezifischer Bindestellen und anschließend mit je 1ml Permeabilisationspuffer/Well (5 Minuten Inkubation bei RT). Im Anschluss wurden die Zellen mit je 1 ml PBS-Gel/Well gewaschen und bei RT für 15 Minuten inkubiert.

Für das Inkubieren mit den spezifischen primären Antikörpern wurde eine vor Licht geschützte (mit Aluminiumfolie umwickelte) Plastikbox präpariert: In der Box wurde ein Parafilmstreifen von ca. 20cm Länge fixiert, indem zwischen Boden und Parafilm 2ml ddH₂O gegeben wurde. Ebenfalls wurden zwei mit ddH₂O getränkte Tücher in die Box gelegt, damit die Proben nicht austrockneten. Bevor die Deckgläschen in der Box platziert wurden, wurden diese an ein Tuch vorsichtig angehalten und die überschüssige Flüssigkeit entfernt. Die Antikörper wurden in PBS-Gel angesetzt und pro Deckgläschen ein Tropfen von 25µl auf den Parafilm gegeben. Die Deckgläschen wurden mit den Zellen nach unten auf die Tropfen gelegt und für eine Stunde inkubiert.

Im Anschluss wurden die Deckgläschen mittels 150 µl PBS-Gel vom Parafilm getrennt und in die 12-Well-Platten überführt. Danach wurden die Proben mit PBS-Gel gewaschen.

Die Parafilmbox wurde erneut zur Inkubation des sekundären Antikörpers verwendet. Die sekundären fluoreszierenden Antikörper wurden in der Verdünnung 1:1000 in PBS-Gel gelöst und auf den Parafilm pipettiert. Darauf wurden wiederum die Coverslips platziert.

Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Proben drei Mal mit PBS-Gel und zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 10 µl Mowiol pro Deckgläschen auf Objektträgern fixiert und bei 4° C gelagert.

2.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbungen mit Zytospins und Ausstrichen

Nach Erstellen von Zytospins und Ausstrichen wurden diese über Nacht bei RT getrocknet und am nächsten Tag 10 Minuten mit Eisacetone bei -20° C fixiert. Zur Färbung wurden die Objektträger liegend in geeigneten Boxen platziert. Die Reihenfolge

der Pufferapplikation erfolgte analog 2.2.3.4. Die Proben wurden 2 Mal mit je 500 µl PBS gewaschen, 5 Minuten mit je 500 µl Quench-Puffer und anschließend 5 Minuten mit je 500 µl Permeabilisationspuffer inkubiert.

Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte ebenfalls auf liegenden Objektträgern. Die primären Antikörper wurden in der Verdünnung 1:100 in PBS-Gel gelöst und je 150 µl antikörperversetztes PBS-Gel auf die Proben gegeben. Die Objektträger wurden wieder mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Nach einer Stunde wurden die Proben 3 Mal mit 500µl PBS gewaschen. Danach erfolgte die zweite Inkubation mit den sekundären Antikörpern in der Verdünnung 1:1000 in PBS-Gel. Hier wurden ebenfalls 150µl appliziert und eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 500 µl PBS-Gel und 2 Mal mit 500 µl PBS gewaschen.

Mit Deckgläschen von 34x40 mm Größe und 40 µl Mowiol konnten die Zytospins und Ausstriche eingedeckelt und bei 4° C aufbewahrt werden.

2.2.3.6 Immunfluoreszenzfärbungen an Zytoblockpräparaten

Das Erstellen von Zytoblockpräparaten, wie unter 2.2.1.9 beschrieben, resultierte in FFPE-Zellpräparaten, die im Vorfeld einer Färbung 10 Minuten in Xylol und absteigender Alkoholreihe deparaffiniert und rehydriert wurden. Danach erfolgte die Antigendekmaskierung mittels Citratpuffer bei pH6 für 40 Minuten. Die Objektträger wurden anschließend 10 Minuten in einem Eiswasserbad gekühlt und unter ddH₂O in Halterungen (Slide-Racks, Thermo Scientific) eingespannt. Die Proben wurden 2 Mal mit je 500 µl PBS gewaschen, 5 Minuten mit je 500 µl Quench-Puffer und anschließend 5 Minuten mit je 500 µl Permeabilisationspuffer inkubiert.

Die primären Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung in PBS-Gel gelöst und je 150 µl antikörperversetztes PBS-Gel auf die Proben gegeben. Die Objektträger wurden wieder mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Nach einer Stunde wurden die Proben 3 Mal mit 500 µl PBS gewaschen. Danach erfolgte die zweite Inkubation mit den sekundären Antikörpern in der angegebenen Verdünnung in PBS-Gel. Hier wurden ebenfalls 150 µl appliziert und eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3 Mal mit 500 µl PBS-Gel und 2 Mal mit 500 µl PBS gewaschen.

Mit Deckgläschen von 34x40 mm Größe und 40 µl Mowiol konnten die Färbungen der Zytoblöcke eingedeckelt und bei 4° C aufbewahrt werden.

2.2.3.7 Immunfluoreszenzfärbung mit Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben

FFPE-Gewebe wurde 10 Minuten in Xylol deparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Die Vorbehandlung verlief wie in 2.2.3.1 beschrieben. Anschließend wurden die Objektträger in Halterungen (Slide-Racks) eingespannt und mittels Applikation von jeweils 500 µl ddH₂O auf korrekten Sitz überprüft.

Die Proben wurden zweimal mit je 500 ml PBS gewaschen, 5 Minuten mit je 500 µl Quench-Puffer und anschließend 5 Minuten mit je 500 µl Permeabilisationspuffer inkubiert.

Die primären Antikörper wurden in der Verdünnung 1:100 in PBS-Gel gelöst und je 150 µl antikörperversetztes PBS-Gel auf die Proben gegeben. Die Objektträger wurden wieder mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Nach einer Stunde wurden die Proben dreimal mit 500 µl PBS gewaschen. Danach erfolgte die zweite Inkubation mit den sekundären Antikörpern in der Verdünnung 1:1000 in PBS-Gel. Hier wurden ebenfalls 150 µl appliziert und eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden die Proben 3 Mal mit 500 µl PBS-Gel und 2 Mal mit 500 µl PBS gewaschen.

Mit Deckgläschen von 34x40mm Größe und 40 µl Mowiol wurden die Gewebefärbungen eingedeckelt und bei 4° C aufbewahrt werden.

2.2.4 Konfokale Lasermikroskopie mit Olympus Fluoview 1000

2.2.4.1 Konfokale Lasermikroskopie an fixierten Zellen

Die in 2.2.3 erstellten Fluoreszenzproben wurden der konfokalen Lasermikroskopie am Olympus Fluoview 1000 zugeführt. Das Protokoll zum Vorgehen am konfokalen Mikroskop stammt von Prof. F. Wouters (Abteilung für Neuropathologie) und Dr. G. Bunt (Molecular Optical and Live Cell Imaging).

Da Cy[®]3- und Cy[®]5- sowie Alexa Fluor[®]488-, -555-, -647-konjugierte Fluorophore verwendet wurden, wurden Lasersysteme benutzt, die die Cy[®] Fluorophore und die Alexa Fluorophore spezifisch anregen und mit den dazugehörigen Detektoren die Informationen auf das Fluoview-Computersystem übertragen. Zur gewünschten Größeneinstellung wurde ein Öl-Objektiv mit 60-facher Vergrößerung benutzt und anschließend mittels Zoom des Computerprogramms zusätzlich 4-fach vergrößert. Dieser Zoom des Fluoviewprogramms mit 4-facher Vergrößerung wurde genutzt, um jeweils einzelne Zellen zu betrachten. Mittels Feintrieb konnte die gewünschte Ebene innerhalb einer Zelle eingestellt werden. Zur Filterung der Information und zum Verhindern

einer Signalvermischung wurden bei der Bildaufnahme die Funktionen „*Kalman*“ und „*Sequential*“ gewählt. Die Laserintensität wurde abschließend angepasst und betrug zwischen 5% und 15%. Die Detektorsensitivität wurde ergänzend zum Laser eingestellt. Die Blende war 125 mm weit geöffnet. Zum Erstellen hochauflösender Bilder wurde eine Belichtungszeit pro Pixel von 40 μs bei einer Größe von 1024x1024 gewählt. Die so erstellten Bilder wurden als Tiff-Datei exportiert.

Bleichen des Akzeptors

Der Unterschied zu der normalen Bilderfassung ist, dass der den Akzeptor anregende Laser einen in der Zelle ausgewählten Bereich für 25 Sekunden lang bleicht.

Die Belichtungszeit war 12.5 μs /Pixel bei einer Größe von 256x256. Zur Filterung der Information und zum Verhindern einer Signalvermischung wurden ebenfalls bei der Bildaufnahme die Funktionen „*Kalman*“ und „*Sequential*“ gewählt. Die Blende war maximal (800 mm) geöffnet. Mit dem auf den jeweiligen Akzeptorfluorophor (Cy[®]3/Cy[®]5/Alexa Fluor[®]647) eingestellten Hauptscanner wurde der ausgewählte Bereich 25 Sekunden lang mit 100% Laserintensität so gebleicht, dass das Akzeptorfluorophor (Cy[®]3/Cy[®]5/Alexa Fluor[®]647) zerstört wurde. Dadurch wurde eine Bilderreihe der Zelle vor und nach dem Bleichen hergestellt, welche als Tiff-Datei exportiert wurde. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ. Es wurden pro Versuch 5 Zellen ausgewertet.

2.2.4.2 Konfokale Lasermikroskopie an fixierten Gewebeschnitten

Die Bildgebung und die Akzeptoreliminierung erfolgte ähnlich der zytologischen Präparate. Gewebeschnitte zeigen eine hohe Autofluoreszenz und folglich ein stärkeres Hintergrundsignal, sodass die Lasereinstellungen und die Detektorsensitivität sowie die Weite der Blende angepasst werden mussten. Beim Bleichen des Akzeptors wurden fünf Zellen zufällig ausgewählt, um die FRET-Effizienz der Tumorzellen in einem Schnitt zu überprüfen.

2.2.4.3 Auswertung mittels ImageJ

Die Auswertung der Bilder der Akzeptoreliminierung mit ImageJ erfolgte nach einem Protokoll von Prof. F. Wouters (Abteilung für Neuropathologie) und Dr. G. Bunt (Molecular Optical and Live Cell Imaging), um die FRET-Effizienz der Versuchsreihe zu ermitteln. Alle Bilder einer Akzeptoreliminierung, also die Donor-Bilder und die Ak-

zeptor-Bilder vor und nach dem Bleichen (hier: Donor-pre, Donor-post, Akzeptor-pre, Akzeptor-post), konnten gleichzeitig in ImageJ geöffnet werden. Die vier Bilder wurden in 32-bit-Bildtypen umgewandelt. Danach wurde ein Filter mit einem Median von 0.5 Pixeln angewendet und das Hintergrundsignal in allen Bildern bestimmt. Das Hintergrundsignal wurde von den Bildern subtrahiert. Danach wurde die Differenz aus Donor-pre und Donor-post (hier: Diff.) gebildet. Zur Begrenzung der Donor-post-Zelle, um alle Informationen außerhalb der Zelle auszuschließen, wurde eine Funktion in ImageJ ausgewählt („*Threshold*“), durch die der Hintergrund und die Zelle manuell begrenzt wurden. Danach wurde der Quotient aus dem ersten Differenzbild (Diff.) und der bearbeiteten Donor-post-Zelle errechnet ($\text{Diff./Donor-post} = \text{FRET der gesamten Zelle}$). Dieses Bild spiegelte die FRET-Effizienz der gesamten Zelle wider und konnte graphisch dargestellt werden. Die so erhaltene histogrammische Liste wurde exportiert und in Scidavis überführt. Über die Differenz zwischen Akzeptor-post und Akzeptor-pre konnte eine Maske des gebleichten Areals erstellt werden. Diese Maske wurde mit dem FRET-Bild der gesamten Zelle multipliziert, sodass alle Informationen außerhalb des gebleichten Areals (kurz: ROI, *Region of Interest*) wegfallen und nur die FRET-Effizienz des gebleichten Areals dargestellt wird. Diese wurde ebenfalls in einer Liste exportiert und in Scidavis eingetragen: Die ermittelten Informationen der Bilder der FRET-Effizienz der gesamten Zelle und der FRET-Effizienz des begrenzten Areals wurden mit einer Spanne von 256 Bins zwischen -0.2 und 0.5 in Listen exportiert und zur weiteren Auswertung in Scidavis eingefügt.

2.2.4.4 Auswertung mittels Scidavis

Die aus ImageJ erhaltenen Listen wurden nach FRET-Effizienz der gesamten Zelle (hier genannt FRETgesamt) und nach FRET-Effizienz des begrenzten Areals (hier genannt FRETroi) geordnet in Scidavis eingefügt. Zur graphischen Darstellung wurden alle Spalten der Versuchsreihe von je fünf Zellen addiert, die nur Informationen aus der gebleichten Region beinhalten und anschließend durch die Gesamtsumme geteilt:

$$\text{a) } ((\text{col}^{\text{FRETroi1}})+(\text{col}^{\text{FRETroi2}})+\dots+(\text{col}^{\text{FRETn}}))/\text{Summe}$$

Formel a) berechnet die mittlere FRET-Effizienz aller gebleichten Areale.

$$\text{b) } (((\text{col}^{\text{FRETgesamt1}})-(\text{col}^{\text{FRETroi1}}))+((\text{col}^{\text{FRETgesamt2}})-(\text{col}^{\text{FRETroi2}}))+\dots((\text{col}^{\text{FRETgesamt}n}-(\text{col}^{\text{FRETroin}})))/\text{Summe}$$

Aus Formel b) kann somit die mittlere FRET-Effizienz der Zellebereiche außerhalb des gebleichten Areals ermittelt werden, welche bei 0% liegen sollte.

Die Kurven konnten zusätzlich mittels Gaußanpassung dargestellt werden.

2.2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde vom FISH-Labor des Instituts für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen (Prof. Dr. Schildhaus), durchgeführt.

Das Protokoll der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verteilt sich auf zwei Tage. Am ersten Tag wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte auf Superfrost+ Objektträger gezogen und über Nacht im VP 2000 bei 56° C entparaffiniert, mit 0.2M HCL behandelt und mit SSC-Waschpuffer aufgereinigt. Die Applikation von 1 µl Sonde erfolgte in 7 µl Hybridisierungspuffer und 2 µl ddH₂O. Es wurden 3-20 µl Sonde auf den Schnitt gegeben, mit Deckgläschen versehen und mit Fixogum fixiert. Am zweiten Tag wurden die Deckgläschen abgenommen und die Proben im VP 2000 für 2 Minuten mit Post-Hybridisierungspuffer bei 72° C aufgereinigt, anschließend mit SSC-Waschpuffer und ddH₂O behandelt und eine Minute in 96% Ethanol gelegt. Nach anschließendem Trocknen der Schnitte wurden 15 µl DAPI appliziert und die Objektträger mit Deckgläschen (24x32mm) versehen. Die Auswertung erfolgte durch Zählung roter und grüner Sondersignale sowie gelber Mischsignale der Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop. Liegen in über 15% der gezählten Zellen einzeln fluoreszierende grüne und rote Sonden vor, gilt die EML4-ALK Translokation als bestätigt. Gelbe Mischsignale von rot und grün sind als negativer Nachweis zu werten.

3. Ergebnisse

3.1 ALK-Status in Zellkulturmodellen des NSCLC

Ziel dieser Studie war es, einen validen FRET-Assay zur Bestimmung des Phosphorylierungsstatus von ALK zu etablieren und somit die Basis zu schaffen, den ALK-Status im Gewebe von Lungenkarzinomen nachzuweisen. Dazu wurde im Vorfeld die ALK-Phosphorylierungsstatusbestimmung in Zellkulturmodellen des NSCLC durchgeführt. Die in 2.1.8 beschriebenen Zelllinien besitzen unterschiedliche EML4-ALK Varianten: NCI-H2228 exprimiert die Variante 3, NCI-H3122 die Variante 1. Diese Angaben konnten durch Westernblotanalysen bestätigt werden (Abb. 6).

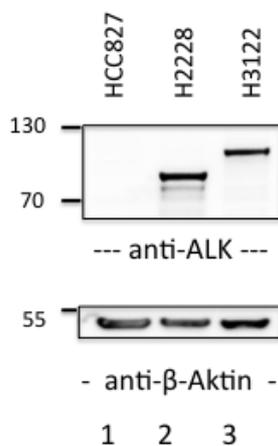


Abb. 6: Westernblotanalyse der ALK-Expression in den Zelllinien HCC827, NCI-H2228, -H3122. Die lysierten Zelllinien wurden per SDS-Page nach Proteingröße aufgetrennt und im anschließenden Westernblot mit ALK-Antikörpern markiert. Auf der linken Seite der Abbildung sind die jeweiligen kDa-Werte entsprechend des Proteinmarkers abgebildet. β -Aktin ist als Ladekontrolle abgebildet.

Die Zelllinie HCC827 ist ALK-negativ. Die Zelllinie H2228 zeigt das Signal der EML4-ALK Variante 3 bei 86kDa und H3122 die Variante 1 bei 117kDa.

Zusätzlich erfolgte ein genetischer Nachweis der ALK-Translokation mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH). H2228 sowie H3122 zeigten in über 15% der gezählten Zellen getrennt voneinander fluoreszierende rote und grüne Sonden und sind *per definitionem* somit als EML4-ALK positiv zu betrachten. HCC827 konnte als ALK-negative Zelllinie bestätigt werden. (Abb. 7).

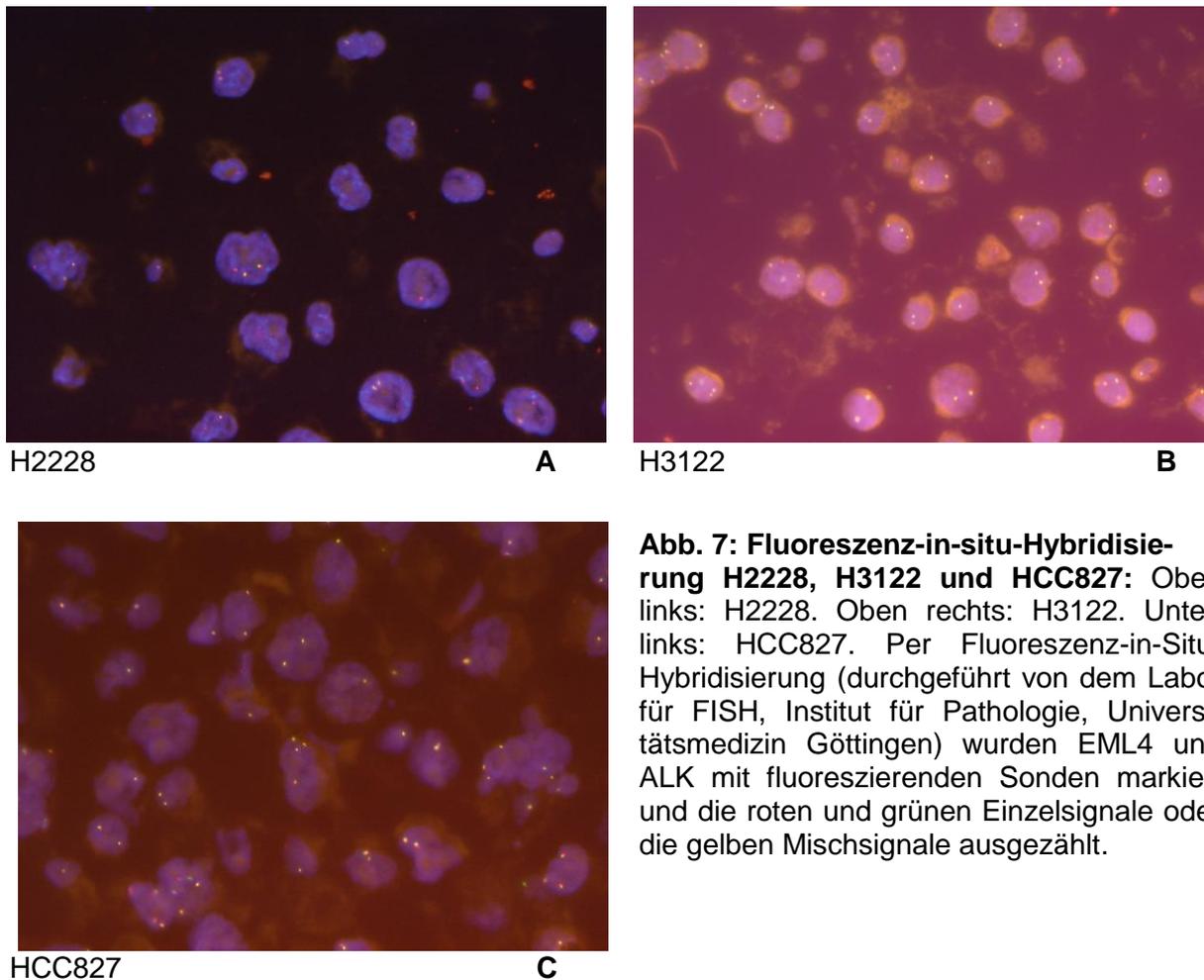


Abb. 7: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung H2228, H3122 und HCC827: Oben links: H2228. Oben rechts: H3122. Unten links: HCC827. Per Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (durchgeführt von dem Labor für FISH, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) wurden EML4 und ALK mit fluoreszierenden Sonden markiert und die roten und grünen Einzelsignale oder die gelben Mischsignale ausgezählt.

Durch die Fusion mit EML4, einem intrazellulären Protein, welches zur Stabilisierung der Mikrotubuli beiträgt, befindet sich das Fusionsprotein EML4-ALK im Zytoplasma. Um dieses zu visualisieren, wurden mit den Zelllinien Immuncytofluoreszenzfärbungen mit monoklonalen ALK-Antikörpern und polyklonalen Phosphotyrosin-Antikörpern (4G10) erstellt und diese mittels konfokaler Lasermikroskopie digitalisiert. Phosphotyrosine sind im Gegensatz zu ALK vermehrt membranständig lokalisiert. ALK ist durch die Fusion mit EML4 ausschließlich intrazellulär lokalisiert. Die Kontrollzelllinie HCC827 zeigte kein ALK-Signal (Abb. 8-10).

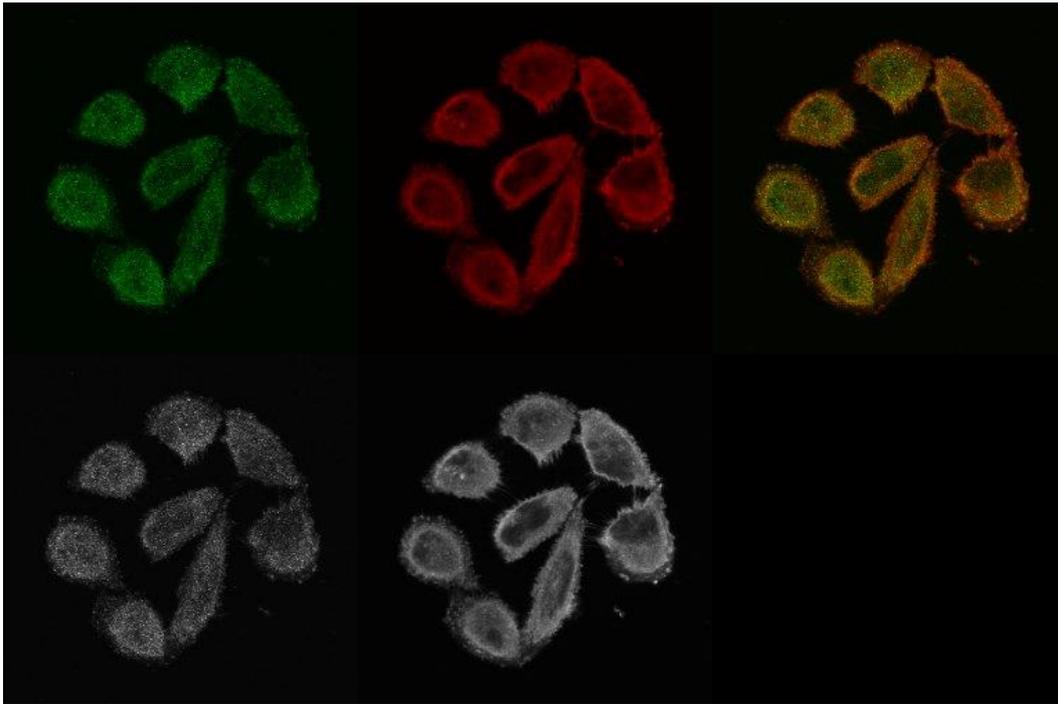


Abb. 8: Immunofluoreszenzfärbung von H2228: H2228-Zellen wurden mit anti-ALK und Alexa Fluor®488 sowie anti-Phosphotyrosin und Cy®3 markiert. ALK ist grün dargestellt, Phosphotyrosin rot. Abgebildet sind die einzelnen Fluoreszenzkanäle von Alexa Fluor®488 und Cy®3 in Farbe und in Graustufen, welche zusammgelegt das Zellbild ergeben. Von links nach rechts, oben: ALK in grün, Phosphotyrosin in rot, beide Kanäle übereinander gelegt. Von links nach rechts, unten: ALK in grau, Phosphotyrosin in grau.

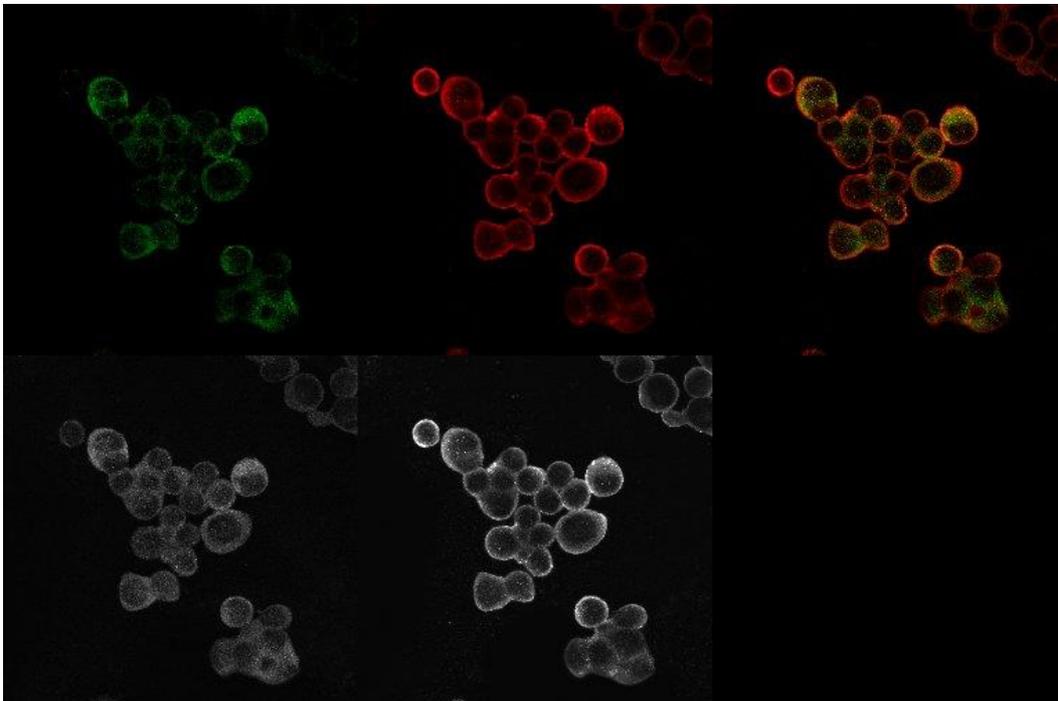


Abb. 9: Immunofluoreszenzfärbung von H3122: H3122-Zellen wurden mit anti-ALK und Alexa Fluor®488 sowie anti-Phosphotyrosin und Cy®3 markiert. ALK ist grün dargestellt, Phosphotyrosin rot. Abgebildet sind die einzelnen Fluoreszenzkanäle von Alexa Fluor®488 und Cy®3 in Farbe und in Graustufen, welche zusammgelegt das Zellbild ergeben. Von links nach rechts, oben: ALK in grün, Phosphotyrosin in rot, beide Kanäle übereinander gelegt. Von links nach rechts, unten: ALK in grau, Phosphotyrosin in grau.

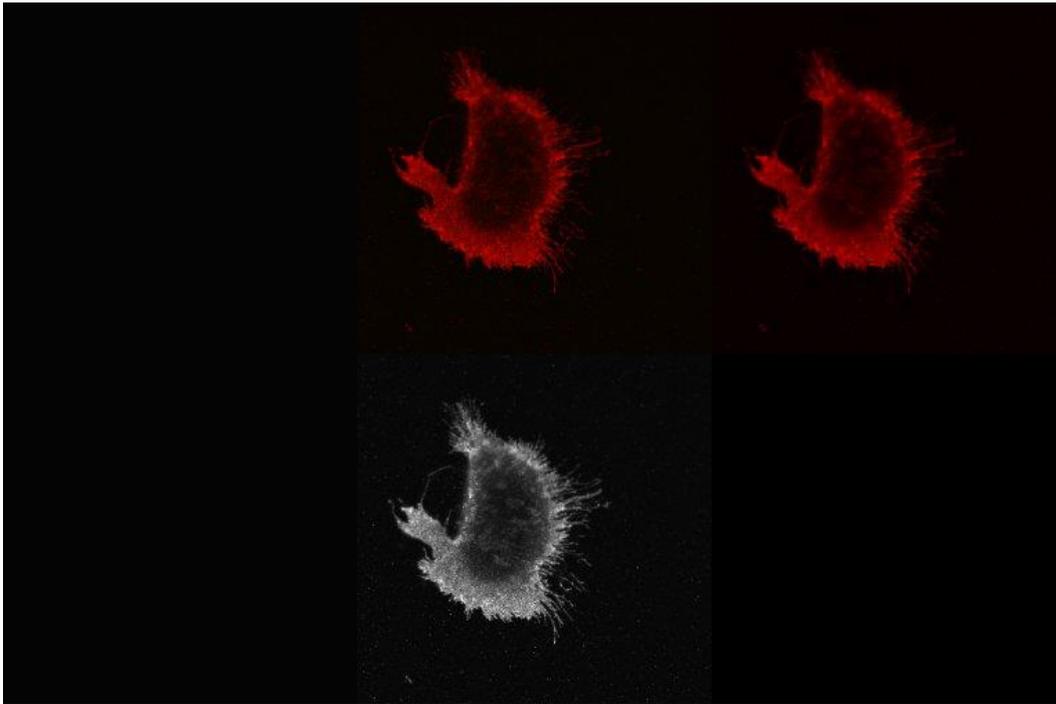


Abb. 10: Immunofluoreszenzfärbung von HCC827: HCC827-Zellen wurden mit anti-ALK und Alexa Fluor®488 sowie anti-Phosphotyrosin und Cy®3 markiert. ALK ist grün dargestellt, Phosphotyrosin rot. Abgebildet sind die einzelnen Fluoreszenzkanäle von Alexa Fluor®488 und Cy®3 in Farbe und in Graustufen, welche zusammengelegt das Zellbild ergeben. Von links nach rechts, oben: ALK in grün (hier negativ), Phosphotyrosin in rot, beide Kanäle übereinander gelegt. Von links nach rechts, unten: ALK in grau (hier negativ), Phosphotyrosin in grau.

3.2 Inhibition der ALK-Aktivität in den Zelllinien H2228 und H3122

Crizotinib und Ceritinib (LDK378) sind therapeutisch eingesetzte spezifische ALK-Inhibitoren. Zum Nachweis der Inhibition und Einfluss der Inhibitoren auf den Signalweg von ALK wurden Westernblots inhibierter Zellen erstellt.

Unter sechsständiger Inkubation der Zelllinien und anschließender Lyse und Westernblotanalyse konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren einen negativen Einfluss auf die Signalwege der ALK-positiven Zelllinien haben. Die Westernblotanalyse der Zelllinien unter Inhibition mit Crizotinib und Ceritinib zeigte eine verringerte Phosphorylierung von ERK (MAPK), einem Protein des ALK-aktivierten Signalweges, unter Inhibition mit 1 μ M Crizotinib und ebenfalls mit 1 μ M LDK378 in beiden Zelllinien, H2228 und H3122 (Abb. 11 und 12).

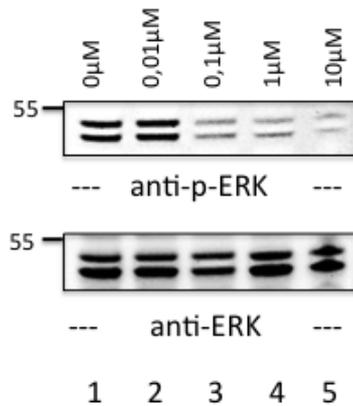
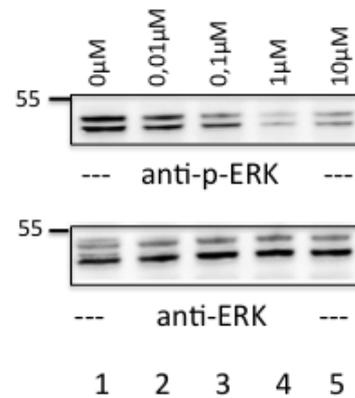
H2228: Inhibition mit Crizotinib (6h)H2228: Inhibition mit LDK378 (6h)

Abb. 11: MAPK-Signalweg der H2228-Zellen unter Inhibition von ALK: H2228-Zellen wurden sechs Stunden lang mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Crizotinib und Ceritinib (LDK378) inkubiert. Die Inhibitorkonzentration wurde in aufsteigender Reihe von 0 μM -10 μM (Position 1-5) getestet. DMSO-Menge ist in allen Proben angepasst, um einen Einfluss von DMSO auszuschließen.

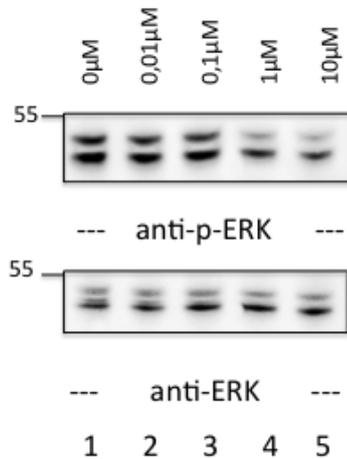
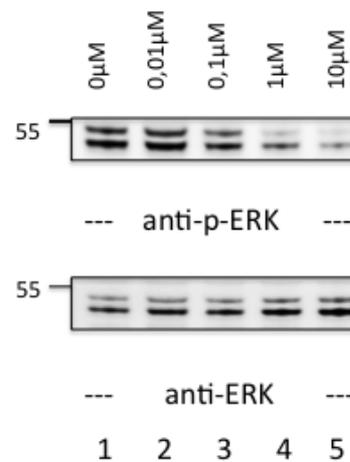
H3122: Inhibition mit Crizotinib (6h)H3122: Inhibition mit LDK378 (6h)

Abb. 12: MAPK-Signalweg der H3122-Zellen unter Inhibition von ALK: H3122-Zellen wurden sechs Stunden lang mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Crizotinib und Ceritinib (LDK378) inkubiert. Die Inhibitorkonzentration wurde in aufsteigender Reihe von 0 μM -10 μM (Position 1-5) getestet. DMSO-Menge ist in allen Proben angepasst.

H2228 zeigt bereits ein Ansprechen auf Crizotinib bei 0.1 μM und bei Ceritinib eher bei 1 μM (Abb. 11). H3122 spricht etwas besser auf die Inhibition unter Ceritinib an. Das Signal ist bei Crizotinib und Ceritinib jeweils bei 1 μM verringert (Abb. 12).

Kontrolliert wurden die Ergebnisse mit Westernblots von HCC827-Zellen, welche ebenfalls mit aufsteigenden Inhibitorkonzentrationen inkubiert wurden (Abb. 13). Im Gegensatz zu H2228 und H3122 spricht HCC827 auf die Inhibition mit den ALK-spezifischen Inhibitoren nicht an.

HCC827: Inhibition mit Crizotinib (6h)

HCC827: Inhibition mit LDK378 (6h)

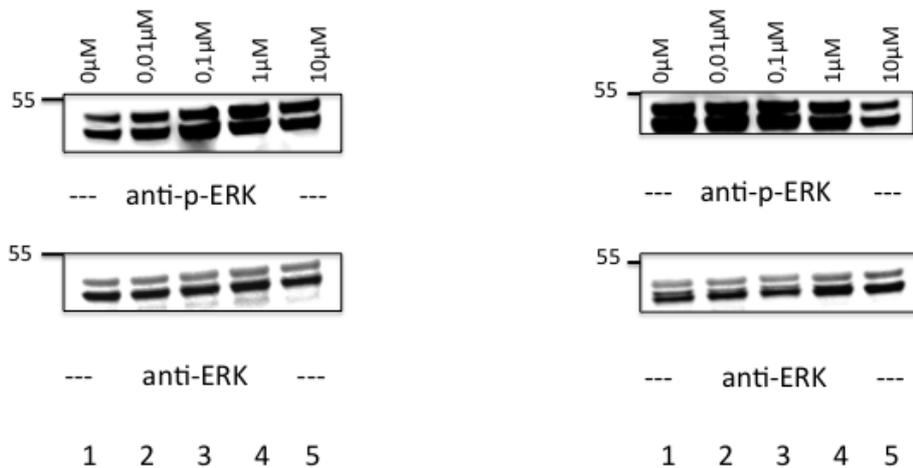


Abb. 13: MAPK-Signalweg in HCC827-Zellen unter Anwendung ALK-spezifischer Inhibitoren: HCC827-Zellen wurden sechs Stunden lang mit den Tyrosinkinaseinhibitoren Crizotinib und Ceritinib (LDK378) inkubiert. Die Inhibitorkonzentration wurde in aufsteigender Reihe von 0 μM -10 μM (Position 1-5) getestet. DMSO-Menge ist in allen Proben angepasst.

Anhand der Westernblots des MAPK-Signalwegs wurde eine optimale Inhibitorkonzentrationen von 1 μM in den Zellkulturmodellen festgelegt. Anschließend wurde ALK unter Inhibition immunopräzipitiert und mittels Westernblot auf Phosphorylierungsstatus untersucht.

Mittels Immunopräzipitation von ALK an nicht-inhibierten sowie inhibierten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition mit Crizotinib sowohl als auch mit Ceritinib in H3122 und H2228 zu einer Abnahme der Phosphorylierung von ALK führt (Abb. 14). Auf Position 4 und 5 ist das Signal der Phosphorylierung von H2228 unter Inhibition mit 1 μM Crizotinib und 1 μM Ceritinib sichtbar. Position 8 und 9 zeigen die verringerte Phosphorylierung von H3122 unter Inhibition mit 1 μM Crizotinib und 1 μM Ceritinib.

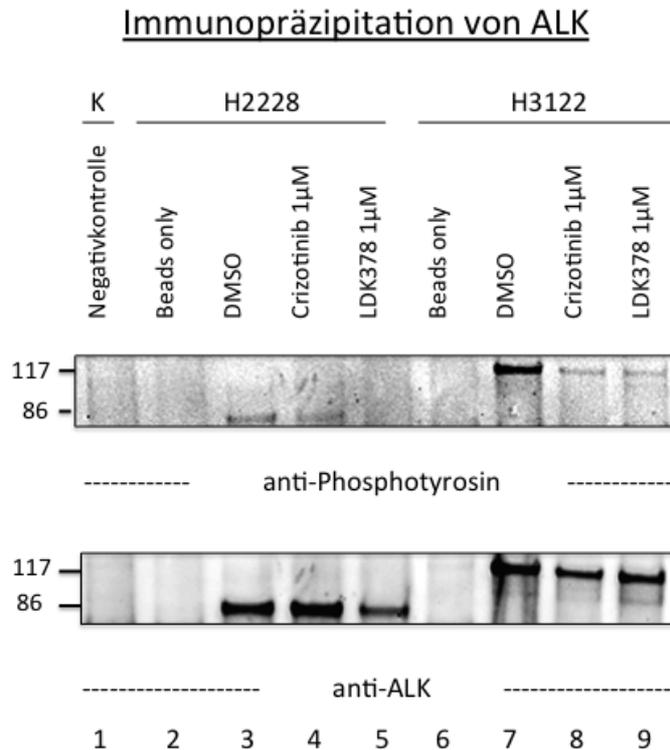


Abb. 14: Immunopräzipitation von ALK: Nach Lyse der Zellen HCC827, H2228 und H3122 konnte ALK immunopräzipitiert werden. Die an *Beads* gekoppelten Proteine wurden mit SDS-Page aufgetrennt und nach dem Westernblotprotokoll auf Phosphotyrosinreste der ALK überprüft. Als Negativkontrolle K ist HCC827 genutzt worden. Zur Kontrolle sind nicht-inhibierte Zellen mit DMSO abgebildet. Ganz links der Abbildung ist die jeweilige kDa Zahl der Bande dargestellt.

Die Charakterisierung der verschiedenen Zelllinien resultierte in der Bestätigung der ALK-Positivität in H2228 und H3122 und der ALK-Negativität in HCC827. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inhibition die Phosphorylierung von ALK verringert.

Weiterführend wurden Zellviabilitätsmessungen unter verschiedenen Inhibitorkonzentrationen erstellt, um die Wirkung der einzelnen Inhibitoren auf die Zelllinien zu objektivieren (Abb 15).

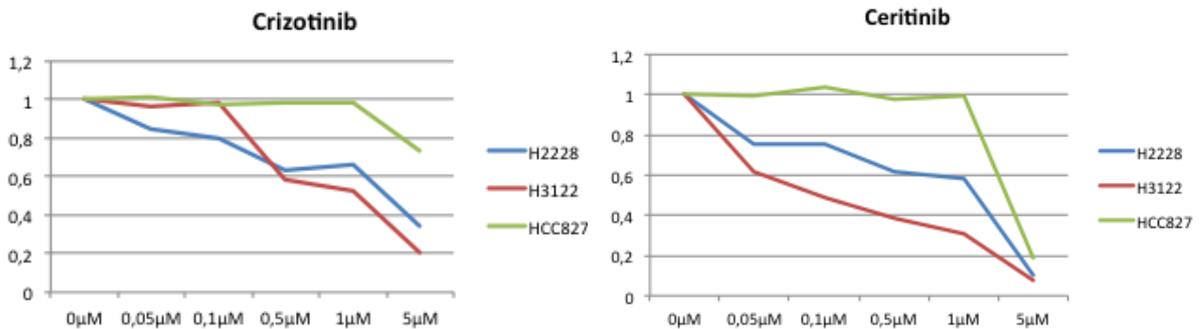


Abb. 15: MTS-Assay: Die Zelllinien H2228, H3122 und HCC827 wurden in aufsteigender Inhibitorkonzentration von Crizotinib (A) und Ceritinib (B) für 96h inkubiert und anschließend die überlebenden Zellen nach mitochondrialer Aktivität quantifiziert und relativiert.

Das Ansprechen der Zelllinien H2228, H3122 und HCC827 auf Crizotinib und Ceritinib in Viabilitäts-Assays von 96 Stunden Inkubationszeit zeigte, dass die Zelllinie H3122 stärker auf die Inhibition mit Ceritinib anspricht (bei 0,1 μM LDK378 $p=0,03$, bei 1 μM LDK378 $p=0,004$) (Abb. 15B), während H2228 bereits bei geringerer Crizotinibkonzentration ein negatives Wachstum zeigt (bei 0,1 μM Crizotinib $p=0,028$) (Abb. 15A). Die Kontrollzelllinie HCC827 wird erst durch die auf die hohen Konzentrationen von 5 μM Crizotinib (Abb.15A) und 5 μM Ceritinib (Abb. 15B) zurückzuführende Toxizität der Inhibitoren negativ reguliert.

3.3 Etablierung der FRET-Bildgebung

3.3.1 Testung der Fluorophorkompatibilität im Zellmodell

Mittels FRET-Bildgebung am konfokalen Lasermikroskop sollte die Phosphorylierung von ALK in den Zelllinien H2228 und H3122 nachgewiesen werden.

Der in 1.7.3 beschriebene FRET, also die Übertragung von Energie des Donors auf den Akzeptor, kann mittels *Acceptor Photobleaching* nachgewiesen werden. Die Akzeptorfluorophor-Antikörper, der hier an Phosphotyrosinantikörper gekoppelt sind, werden mittels hoher Laserexposition eliminiert. Wenn anschließend eine Intensivierung der Donorfluoreszenz der an ALK-Antikörper gekoppelten Fluorophore zu verzeichnen ist, ist der FRET Nachweis positiv (Kenworthy 2001; Day et al. 2003).

Zur Etablierung der Methodik wurde der FRET Nachweis primär an Positivkontrollen vollzogen. Hierzu wurden Proben erstellt, in denen die extreme Nähe der Antikörper zueinander sicher angenommen werden konnte. Dabei wurde a) die FRET-Effizienz zwischen zwei FRET-Pärchen (Cy@3 und Alexa Fluor@488) gemessen, die beide über

sekundäre Antikörper an ALK-Antikörper binden und b) die FRET-Effizienz zwischen ebendiesen Pärchen an 4G10 gemessen. So wurde in den Positivkontrollen keine Phosphorylierung von ALK nachgewiesen, sondern die FRET-Funktionalität der fluoreszierenden Antikörper. Abbildungen 16 (zu Punkt a) und 17 (zu Punkt b) sollen dieses schematisch verdeutlichen.

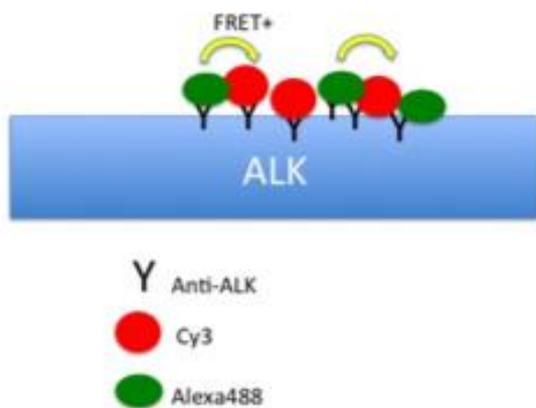


Abb. 16: Schema der Positivkontrolle ALK.

Cy[®]3-gekoppelte F(ab')₂-Fragment anti-Kaninchen F(ab')₂-Fragmente und Alexa Fluor[®]488 gekoppelte IgG anti-Kaninchen IgGs sind an anti-ALK IgGs (Kaninchen) gebunden.

Dadurch wird eine hohe Anzahl FRET-kompatibler Pärchen generiert.

Durch Bleichen von Cy[®]3 kann die zu erwartende FRET-Effizienz der folgenden Versuche eingeordnet werden.

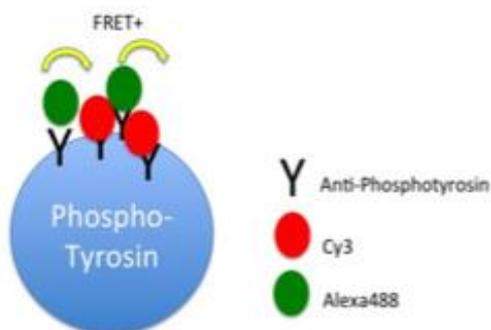
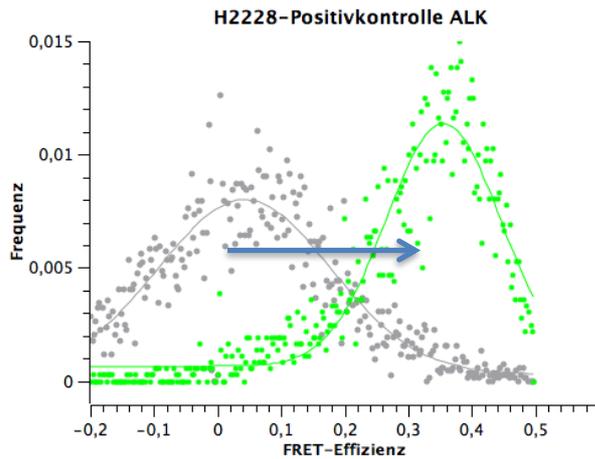


Abb. 17: Schema der Positivkontrolle Phosphotyrosin:

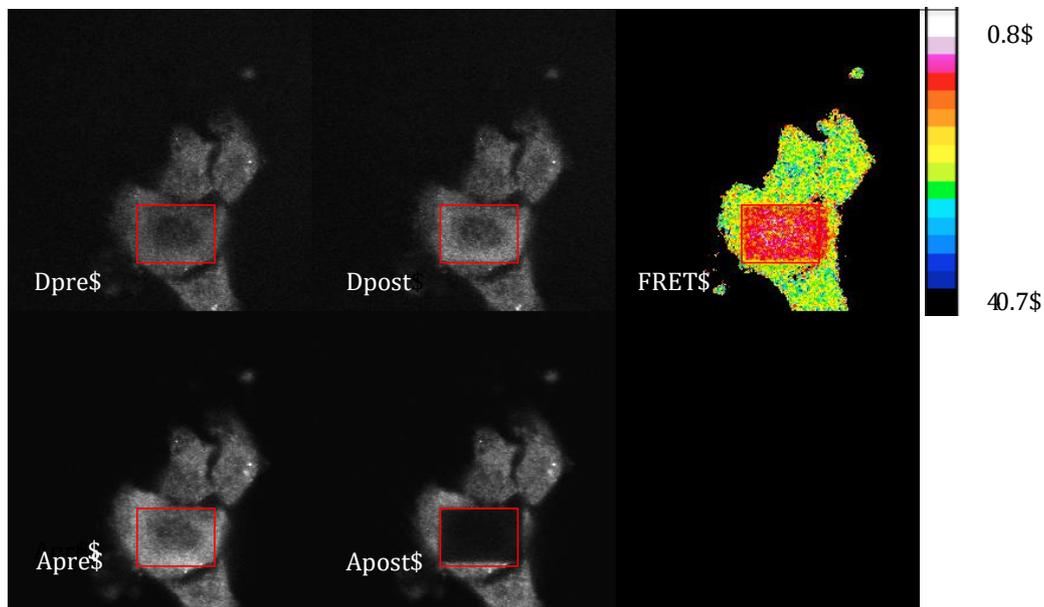
Cy[®]3-gekoppelte F(ab')₂-Fragment anti-Maus-F(ab')₂-Fragmente und Alexa Fluor[®]488 gekoppelte IgG anti-Maus IgGs sind an anti-Phosphotyrosin IgGs (Maus, auch: 4G10) gebunden. Dadurch wird eine hohe Anzahl FRET-kompatibler Pärchen generiert.

Mittels Immunofluoreszenzfärbungen wurden Proben entsprechend diesen Schemata hergestellt. Durch Eliminierung des Akzeptors Cy[®]3 mittels *Acceptor Photobleaching* in diesen Positivkontrollen wurde FRET zwischen Alexa Fluor[®]488 und Cy[®]3 nachgewiesen (Abb. 18 und 19).

**Abb. 18: Positivkontrolle ALK.**

Gefärbt wurde anti-ALK-IgG und ein Alexa Fluor®488-konjugierter IgG anti-Kaninchen IgG plus Cy®3-konjugierte $F(ab')_2$ -Fragment anti-Kaninchen $F(ab')_2$ Fragmente.

Die Bilderreihe stellt das Acceptor Photobleaching dar. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen. Das rot markierte Rechteck markiert den gebleichten Bereich. FRET=Falsch-Farben-Bild zur Darstellung der Intensitätsänderung. Ganz rechts ist hierzu die Skalierung abgebildet.



Wie im oben gezeigten Schema findet zwischen den an die Antikörper gekoppelten Fluorophore der ALK-Antikörper ein Fluoreszenz-Energie-Transfer statt, der mittels konfokaler Mikroskopie digitalisiert werden kann. Zwischen diesen Fluorophoren ist ein FRET von 0,23 Einheiten, also 23%, zu detektieren.

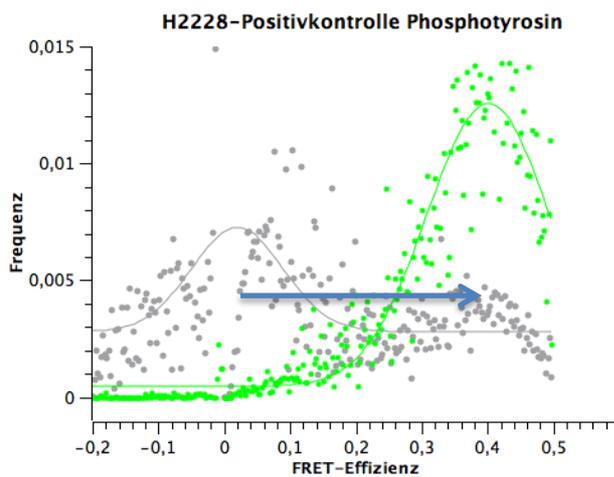
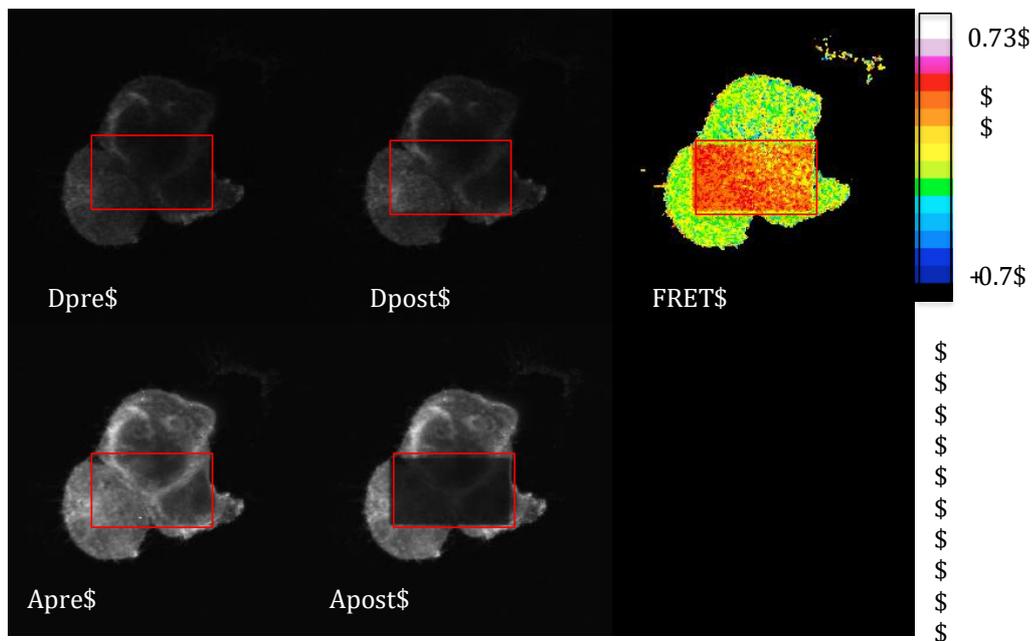


Abb. 19: Positivkontrolle Phosphotyrosin.

Gefärbt wurde anit-Phosphotyrosin (4G10) und Alexa Fluor®488-konjugierte IgG anti-Maus IgGs plus Cy®3-konjugierte F(ab')₂-Fragment anti-Maus F(ab')₂ Fragmente.

Die Bilderreihe stellt das Acceptor Photobleaching dar. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen. Das rot markierte Rechteck markiert den gebleichten Bereich. FRET= Falsch-Farben-Bild zur Darstellung der Intensitätsänderung. Ganz rechts ist hierzu die Skalierung abgebildet.



Zwischen diesen Fluorophoren der Phosphotyrosin-Kontrolle ist ein FRET von 0,40 Einheiten, also 40%, zu detektieren.

3.3.2 FRET-Nachweis in ALK-positiven Zellmodellen

Der in 3.2.1 beschriebenen Versuchsaufbau wurde anschließend zum Nachweis der Phosphorylierung von ALK in den Zelllinien angewendet. Mittels Acceptor Photobleaching soll das FRET Signal zwischen einem Donorfluorophor und einem Akzeptorfluorophor überprüft werden. Voraussetzung hierfür ist, dass der Abstand der fluoreszierenden Antikörper zueinander <10 nm beträgt. Diese Tatsache ist manuell nicht zu

beeinflussen, sodass im Vorfeld eine Auswahl optimal färbender Antikörperkonstellationen (ohne Abbildung) erfolgte. Verglichen wurden Cy[®]3-konjugierte F(ab')₂-Fragment-anti-F(ab')₂-Fragmente, Cy[®]3-konjugierte F(ab')₂-Fragment-anti-IgG und Cy[®]3-konjugierte IgG-anti-IgG (siehe Tabelle 3).

	Donor	mit	Akzeptor
Variante 1	Alexa Fluor [®] 488-konjugierte IgG anti-Kaninchen IgG		Cy [®] 3-konjugierte F(ab') ₂ -Fragment anti-Maus F(ab') ₂ -Fragmente
Variante 2	Alexa Fluor [®] 488-konjugierte IgG anti-Kaninchen IgG		Cy [®] 3-konjugierte F(ab') ₂ -Fragment anti-Maus IgG
Variante 3	Alexa Fluor [®] 488-konjugierte IgG anti-Kaninchen IgG		Cy [®] 3-konjugierte IgG anti-Maus IgG

Tabelle 3

Das stärkste Fluoreszenzsignal mit dem geringsten Hintergrundsignal wurde durch Färbungen von Cy[®]3-konjugierten IgG-anti-IgG ermittelt.

Die folgenden FRET-Nachweise erfolgen mit der Variante 3 der Tabelle 3.

In den folgenden FRET-Experimenten der Zellen zeigte sich, dass bei direktem Vergleich der FRET-Effizienzen der beiden Zellen H3122 ein stärkeres FRET-Signal aufweist (Abb. 20a,b). H3122 zeigt im Mittel eine FRET-Effizienz von 19,14%, H2228 hingegen zeigt eine FRET-Effizienz von 13,03%.

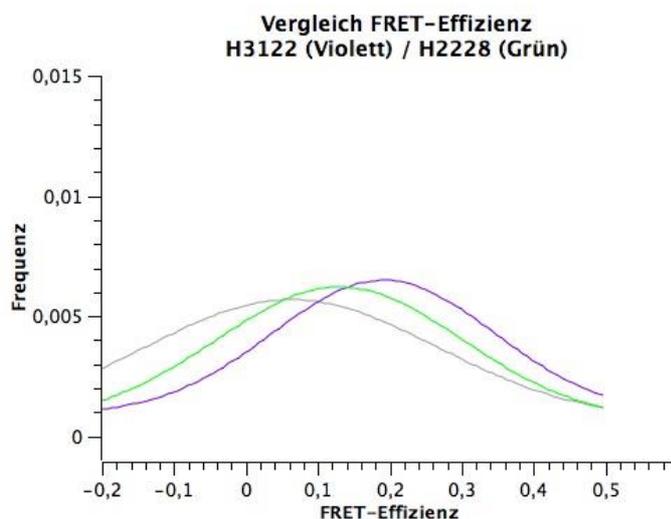


Abb. 20a: Vergleich der FRET-Effizienzen von H2228 und H3122. Die Dargestellt sind die gemittelten FRET-Effizienzen von H3122 (violett) und H2228 (grün). Die Kontrollregion ist in grau dargestellt. Die einzelnen Werte sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt.

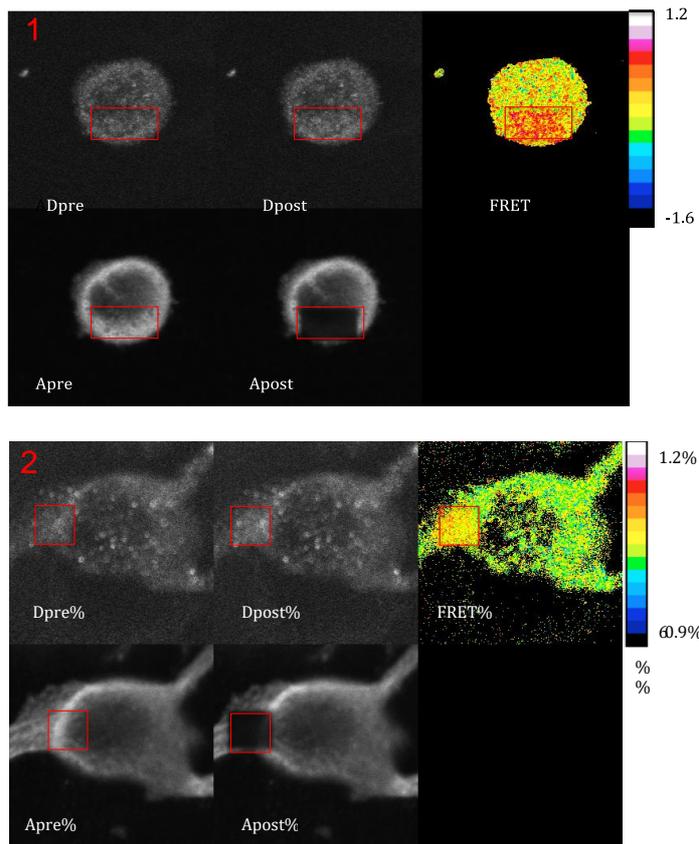


Abb. 20b: Bilderreihe zum FRET-Nachweis in H2228 (1) und H3122 (2): H2228-Zellen (Teil 1) und H3122-Zellen (Teil 2), welche jeweils separat auf Deckgläschen gewachsen waren, wurden immunocytofluoreszent gefärbt mit Alexa Fluor®488-konjugierten IgG anti-Kaninchen IgG und Cy®3-konjugierten IgG anti-Maus IgG. Die Bilderreihe stellt das *Acceptor Photobleaching* dar. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen.

Nach erfolgreicher Etablierung der Färbemethodik und Technik am konfokalen Mikroskop kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Phosphorylierung von ALK in den Zelllinien H2228 und H3122 mittels FRET gemessen werden kann

3.3.3 Kontrolle der FRET-Bildgebung im ALK-negativen Zellmodell

Im ALK-negativen Zellmodell wurden HCC827-Zellen mit den in 3.2.2 beschriebenen Antikörperkonstellationen immunocytofluoreszent gefärbt und auf ein FRET-Signal hin überprüft. Da HCC827 kein ALK exprimiert, dürfen anti-ALK Antikörper nicht binden, somit Alexa Fluor®488-konjugierte Antikörper ebenfalls nicht vorhanden sein. Da ohne Alexa Fluor®488 der Donor fehlt, darf kein FRET nachweisbar sein (Abb. 21).

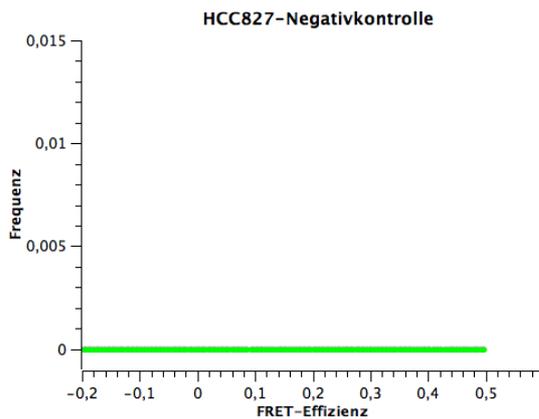


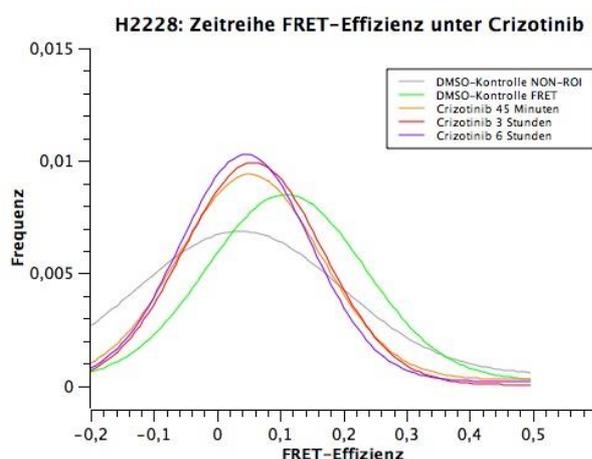
Abb. 21: Negativkontrolle: HCC827-Zellen wurden mittels Immuncytofluoreszenz gefärbt Alexa Fluor®488-konjugierten IgG anti-Kaninchen IgG und Cy®3-konjugierten IgG anti-Maus IgG.

Dieser Versuchsaufbau resultierte in einem negativen FRET-Nachweis. Somit wurde hiermit bestätigt, dass die Antikörper spezifisch binden und das FRET-Signal spezifisch ist.

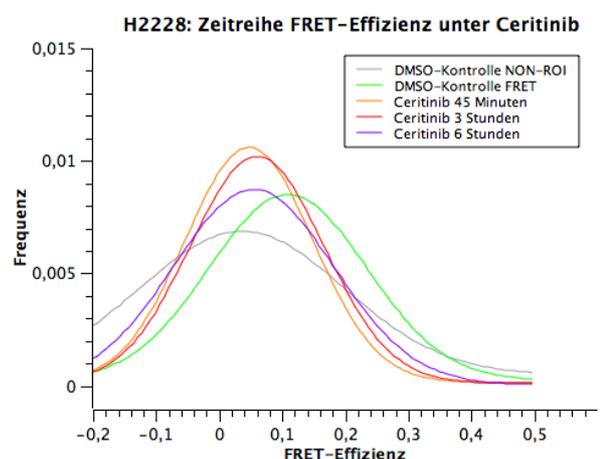
3.4 Anwendung der FRET-Bildgebung auf inhibierte Zellen

Wie einleitend beschrieben, sind Crizotinib und Ceritinib (LDK378) potente Inhibitoren von ALK. Wie in der Immunopräzipitation (Abb. 14) gezeigt, wird ALK unter Inhibition weniger stark phosphoryliert. Da, wie in 3.2 beschrieben, mittels FRET die Phosphorylierung von nicht-inhibierter ALK in den Zelllinien nachgewiesen werden kann, wurde dieser Versuchsaufbau auf inhibierte Zellen übertragen. Wenn die Phosphorylierung unter Inhibition verringert ist, muss dieses in einem Rückgang der FRET-Effizienz zu sehen sein.

Hierzu wurden die Zellen mit jeweils 1 μM Crizotinib oder 1 μM Ceritinib für unterschiedliche Zeitdauer inkubiert und anschließend per *Acceptor Photobleaching* auf die FRET-Effizienz nach Inhibition untersucht (Abb. 22a/b).



1



2

Abb. 22a: Abnahme der FRET-Effizienz unter Inhibition zu verschiedenen Zeitpunkten in H2228: H2228-Zellen wurden jeweils für 45 Minuten/ 3 Stunden/ 6 Stunden mit (1) 1 μM Crizotinib und (2) 1 μM Ceritinib inkubiert. Anschließend wurden diese immunfluoreszent gefärbt mit Alexa Fluor®488-konjugierten IgG anti-Kaninchen IgG und Cy®3-konjugierten IgG anti-Maus IgG und auf ihre FRET-Effizienz überprüft. Kontrollkurven : DMSO-Kontrolle NON-ROI als ungebleichte Kontrolle in grau, DMSO-Kontrolle FRET als Referenzwert der FRET-Effizienz der Probe in grün. Inkubationsreihe : (1) Crizotinib : 45 Minuten in orange, 3 Stunden in rot, 6 Stunden in violett. 2) Ceritinib : 45 Minuten in orange, 3 Stunden in rot, 6 Stunden in violett. Die einzelnen Werte sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt.

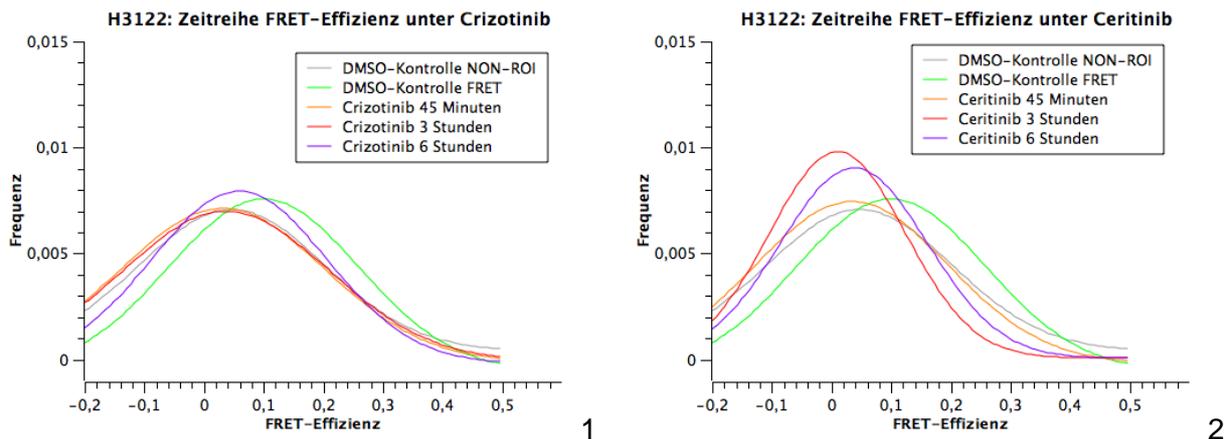


Abb. 22b: Abnahme der FRET-Effizienz unter Inhibition zu verschiedenen Zeitpunkten in H3122: H3122-Zellen wurden jeweils für 45 Minuten/ 3 Stunden/ 6 Stunden mit (1) 1 μM Crizotinib und (2) 1 μM Ceritinib inkubiert. Anschließend wurden diese immunfluoreszent gefärbt mit Alexa Fluor®488-konjugierten IgG anti-Kaninchen IgG und Cy®3-konjugierten IgG anti-Maus IgG und auf ihre FRET-Effizienz überprüft. Kontrollkurven : DMSO-Kontrolle NON-ROI als ungebleichte Kontrolle in grau, DMSO-Kontrolle FRET als Referenzwert der FRET-Effizienz der Probe in grün. Inkubationsreihe : (1) Crizotinib : 45 Minuten in orange, 3 Stunden in rot, 6 Stunden in violett. (2) Ceritinib : 45 Minuten in orange, 3 Stunden in rot, 6 Stunden in violett. Die einzelnen Werte sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt.

Bereits nach 45 Minuten Inkubationszeit mit Crizotinib oder Ceritinib war in beiden Zelllinien, H2228 und H3122, weniger FRET nachweisbar.

In der Zelllinie H2228 (Abb. 22a) war im Experiment eine FRET-Effizienz ohne Inhibitor von 10,89% nachweisbar und in der ungebleichten Kontrolle von 3,63%. Unter Crizotinib (Abb. 22a(1)) verringerte sich die FRET-Effizienz nach 45 Minuten auf 5,18%, nach 3 Stunden auf 5,7% und nach 6 Stunden auf 4,57%. In der Ceritinib-Reihe derselben Zelllinie (Abb. 22a(2)) war eine FRET-Effizienz unter Inhibition nach 45 Minuten von 4,74%, nach 3 Stunden von 6,00% und nach 6 Stunden von 5,46% nachweisbar.

In der Zelllinie H3122 (Abb. 22b) war in den nicht-inhibierten Zellen eine FRET-Effizienz von 10,03% nachweisbar und die Kontrollkurve lag bei 4,6%. Nach 45-minütiger Inkubation mit Crizotinib (Abb. 22b(1)) verringerte sich die FRET-Effizienz auf 3,16%, nach 3 Stunden auf 3,7% und nach 6 Stunden auf 5,91%. In derselben

Zelllinie verringerte sich die FRET-Effizienz unter Ceritinib (Abb. 22b(2)) nach 45 Minuten auf 3,4%, nach 3 Stunden auf 1% und nach 6 Stunden auf 3,75%.

Dies bedeutet, dass mittels FRET-Bildgebung gezeigt werden konnte, dass bereits nach 45 Minuten Inkubationszeit mit Inhibitor der Phosphorylierungsstatus von ALK verringert wurde und dass die Phosphorylierung mittels FRET gemessen werden kann.

3.5 Etablierung der FRET-Bildgebung an Zytospins, Ausstrichen und Zytoblocks

Zur Gewährleistung des Transfers der FRET-Bildgebung zur Anwendung in der Diagnostik Pathologischer Abteilungen wurden primär die zytologischen Methoden an den Zelllinien erprobt und auf FRET geprüft. Dazu wurden mit den in 2.1.8 beschriebenen Zelllinien Zytospins und Ausstriche erstellt, welche ebenfalls mittels des beschriebenen FRET-Assays auf den Phosphorylierungsstatus von ALK überprüft wurden (Abb. 23 bis 26).

In der Zelllinie H2228 war in den Zytospins eine mittlere FRET-Effizienz von 7,4% und in den Ausstrichen von 16,49% nachweisbar .

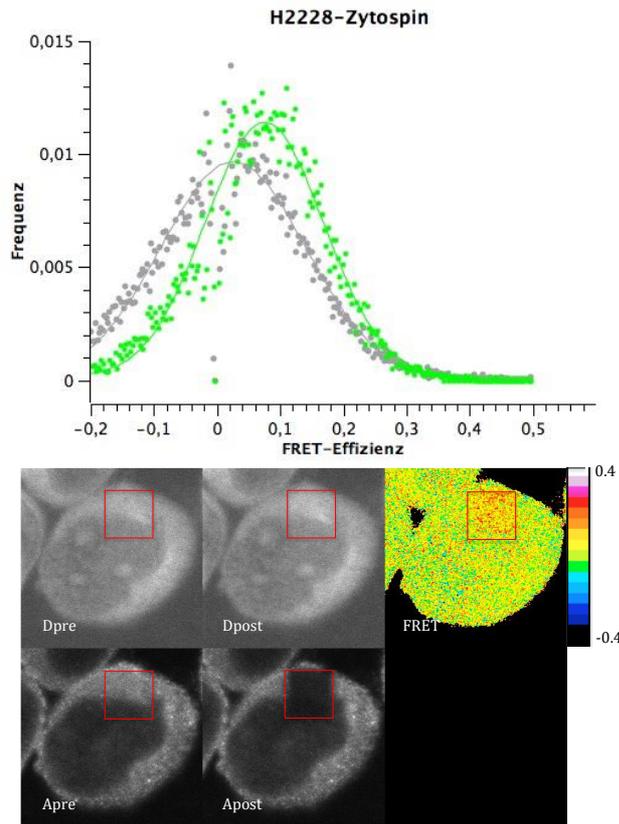


Abb. 23: Zytospin H2228: Zytospins von H2228 wurden Immunfluoreszenz mit anti-ALK-IgG+ Alexa Fluor®488-konjugierten IgG-anti-IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG + Cy®3-konjugierten IgG-anti-IgG gefärbt und auf FRET getestet. Grau= alle Werte außerhalb der gebleichten Region. Grün= alle Werte der gebleichten Region.

Unterer Teil:

Die Bilderreihe verdeutlicht das Acceptor Photobleaching. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen. FRET= Falsch-Farben Bild zur Darstellung der Intensitätsänderung. Hierzu ist ganz rechts die Skalierung abgebildet.

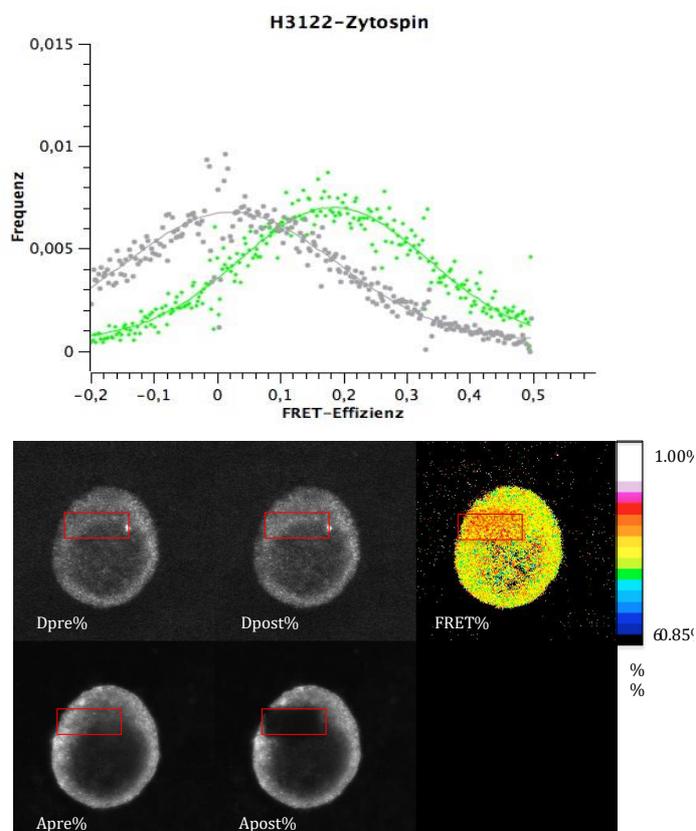


Abb. 25: Zytospin H3122: Zytospins von H3122 wurden Immunfluoreszenz mit anti-ALK-IgG+Alexa Fluor-konjugierten IgG-anti-IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG + Cy®3-konjugierten IgG-anti-IgG gefärbt und auf FRET getestet. Grau= alle Werte außerhalb der gebleichten Region. Grün= alle Werte der gebleichten Region.

Die Bilderreihe verdeutlicht das Acceptor Photobleaching. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen. FRET= Falsch-Farben Bild.

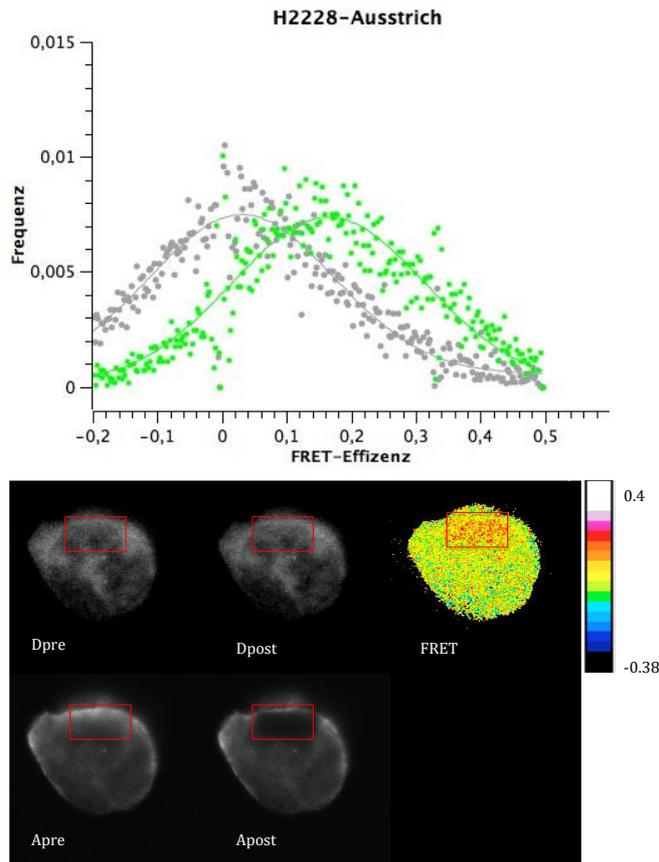


Abb. 24: Ausstrich H2228: Ausstriche von H2228 wurden Immunfluoreszenz mit anti-ALK-IgG+ Alexa Fluor®-konjugierten IgG-anti-IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG + Cy®3-konjugierten IgG-anti-IgG gefärbt und auf FRET getestet. Grau= alle Werte außerhalb der gebleichten Region. Grün= alle Werte der gebleichten Region.

Unterer Teil:

Die Bilderreihe verdeutlicht das Acceptor Photobleaching. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen. FRET= Falsch-Farben Bild zur Darstellung der Intensitätsänderung. Hierzu ist ganz rechts die Skalierung abgebildet.

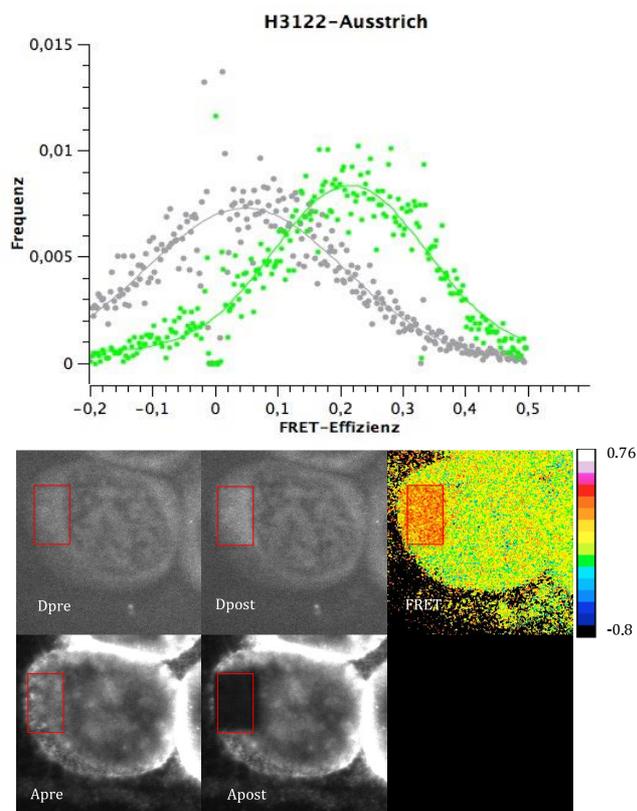


Abb. 26: Ausstrich H3122: Ausstriche von H3122 wurden Immunfluoreszenz mit anti-ALK-IgG+ Alexa Fluor®-konjugierten IgG-anti-IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG + Cy®3-konjugierten IgG-anti-IgG gefärbt und auf FRET getestet. Grau= alle Werte außerhalb der gebleichten Region. Grün= alle Werte der gebleichten Region.

Die Bilderreihe verdeutlicht das Acceptor Photobleaching. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen. FRET= Falsch-Farben Bild zur Darstellung der Intensitätsänderung. Hierzu ist ganz rechts die Skalierung abgebildet.

In der Zelllinie H3122 war im Mittel eine FRET-Effizienz der Zytospins von 18,51% und in den Ausstrichen von 21,5% nachweisbar.

Im zweiten Schritt wurden mit Agarose-Histogel Zytoblöcke der Zelllinien erstellt, die wie Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE-Gewebe) immunfluoreszent gefärbt und ausgewertet wurden (Abb. 27 und 28).

In Zytoblöcken von H2228 war eine FRET-Effizienz von 8,00% (Abb. 27) und in Zytoblöcken von H3122 von 12,87% (Abb. 28) nachweisbar.

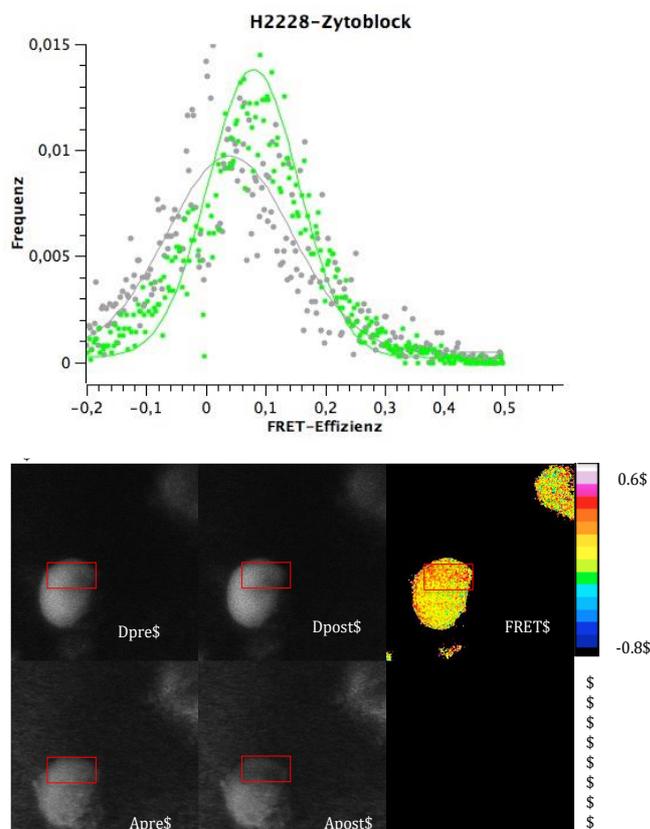


Abb. 27: Zytoblock H2228: Zytoblocks wurden Immunhistofluoreszenz mit anti-ALK-IgG+ Alexa Fluor®488-konjugierten IgG-anti-IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG + Cy®3-konjugierten IgG-anti-IgG gefärbt und auf FRET getestet.

Grau= alle Werte außerhalb der gebleichten Region. Grün= alle Werte der gebleichten Region.

Die Bilderreihe verdeutlicht das Acceptor Photobleaching. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen.

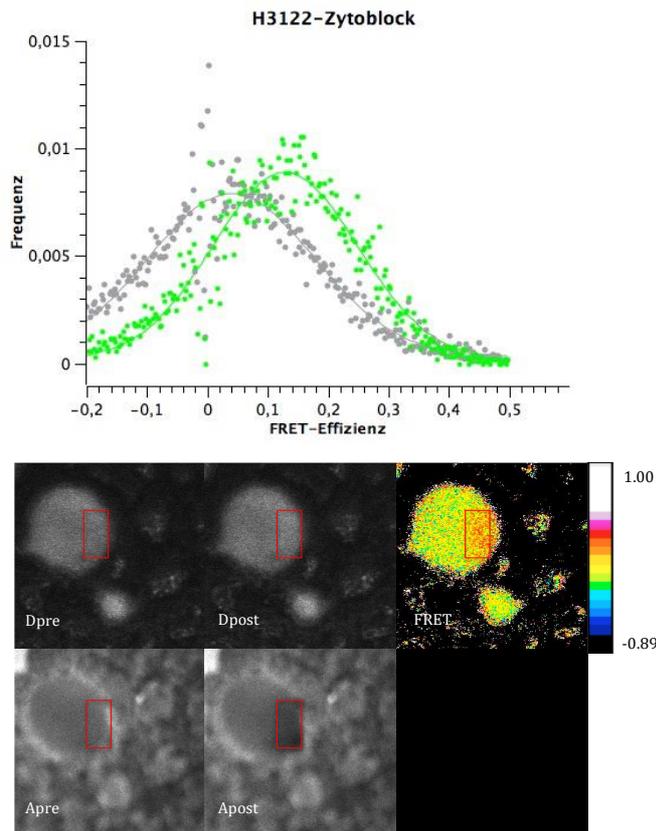


Abb. 28: Zytoblock H3122: Zytoblocke von H3122 wurden Immunhistofluoreszenz mit anti-ALK-IgG+ Alexa Fluor®-konjugierten IgG-anti-IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG + Cy®3-konjugierten IgG-anti-IgG gefärbt und auf FRET getestet.

Grau= alle Werte außerhalb der gebleichten Region. Grün= alle Werte der gebleichten Region. Die Bilderreihe verdeutlicht das Acceptor Photobleaching. Dpre: Donor vor dem Bleichen. Dpost: Donor nach dem Bleichen. Apre: Akzeptor vor dem Bleichen. Apost: Akzeptor nach dem Bleichen. FRET= Falsch-Farben Bild zur Darstellung der Intensitätsänderung. Hierzu ist ganz rechts die Skalierung abgebildet

Ein FRET-Nachweis ist demnach nicht nur an zytologischen Präparaten wie Ausstrichen und Zytospins, sondern auch an formalinfixierten Proben durchführbar.

Durch Nachweis des FRET in Zytoblocken konnte ein Einfluss von Formalin, Xylol und Paraffin auf die FRET-Bildgebung ausgeschlossen werden.

3.6 Etablierung der FRET-Bildgebung an Lungengewebe

3.6.1 Ermittlung der optimalen Vorbehandlung und Färbung

In 3.5 konnte gezeigt werden, dass der FRET-Nachweis an formalinfixierten Proben möglich ist. Wie beschrieben, sollte in dieser Studie die Basis geschaffen werden, um die FRET-Bildgebung im klinischen Kontext anhand von Gewebeproben anwenden zu können. Um dieses zu realisieren, wurde ein Gewebepblock eines Patienten mit ALK-positivem Adenokarzinom ausgesucht, anhand dessen die FRET-Bildgebung an Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebettetem Gewebe etabliert werden sollte. Primär wurde der entsprechende Tumorteil mittels FISH auf EML4-ALK überprüft (Abb. 29). In

über 15% der gezählten Zellen waren getrennt voneinander fluoreszierende Sonden nachweisbar. Somit gilt diese Probe als EML4-ALK positiv.

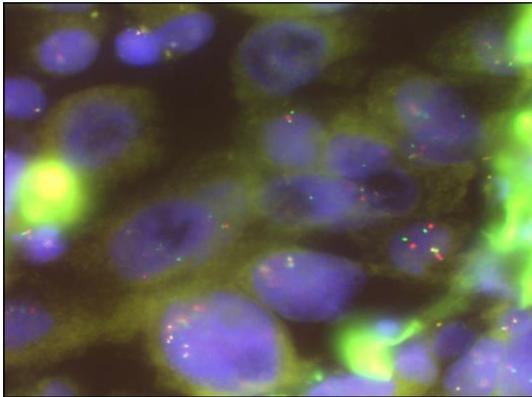


Abb. 29: FISH einer Patientenprobe: Das FFPE-Gewebe wurde auf dem Mikrotom geschnitten und von dem Labor für FISH der Universitätsmedizin Göttingen auf die EML4-ALK-Translokation überprüft (durchgeführt von FISH-Labor, Universitätsmedizin Göttingen).

Speziell diese Probe wurde zur Etablierung der FRET-Bildgebung ausgewählt, da in den immunhistochemischen Färbungen der Abteilung für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen ein stark CK7-positiver Tumor sichtbar war (Abb. 30).

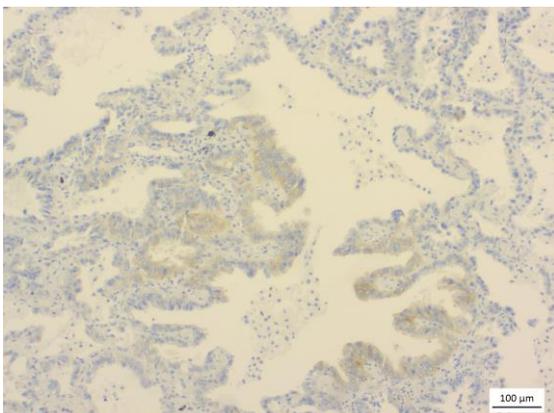
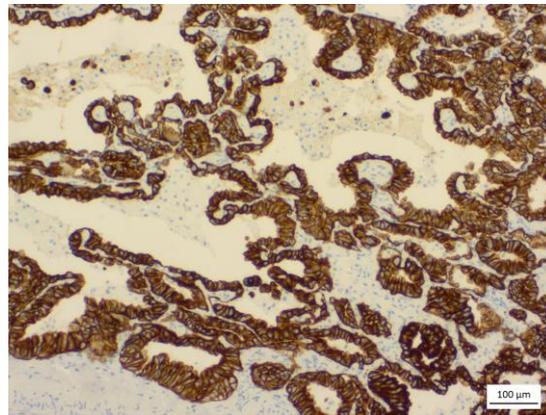
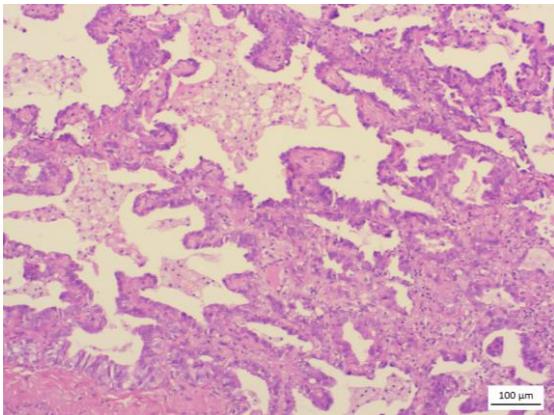
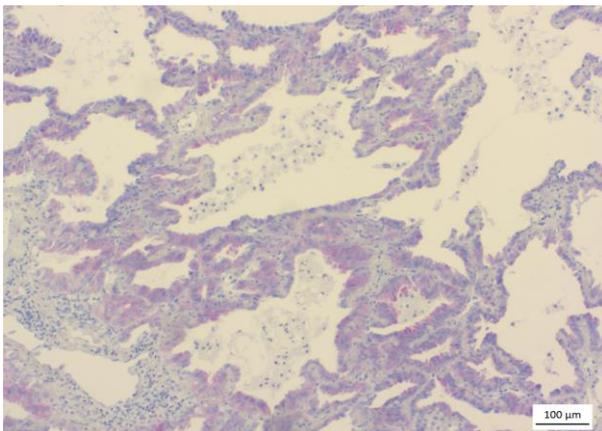


Abb. 30: Färbungen eines EML4-ALK positiv diagnostizierten Tumors: Die Färbungen der Routinediagnostik erstellt von der Abteilung für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen zeigen: Links oben: HE-Schnitt. Rechts oben: CK7. Links unten: Immunhistochemie ALK (Immunhistochemie durchgeführt von der Abteilung für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen).

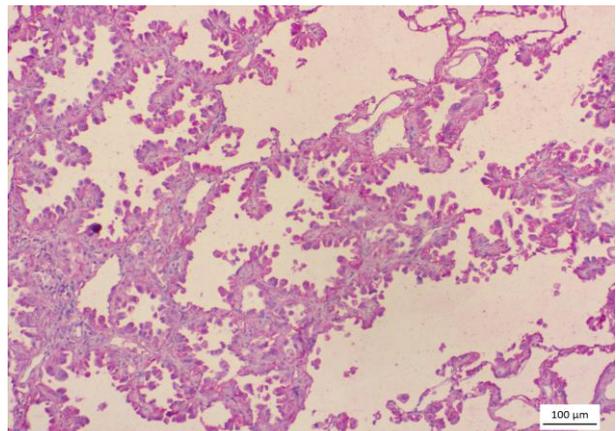
Da der Nachweis der EML4-ALK-Translokation positiv war, wurden anschließend verschiedene immunhistochemische Färbungen mit anti-ALK und anti-Phosphotyrosin durchgeführt, um das bestmögliche Färbeprotokoll zu ermitteln, welches die optimalen Vorbehandlungen zur Antikörperbindung enthält.

Dieses erfolgte in zwei Phasen: Die erste Phase diente zur Ermittlung der besten Antigendemaskierung. Die Antigendemaskierung kann im Dampfgerar bei pH6 oder pH9 erfolgen und dient zur Demaskierung von Antigenstellen, die durch die Behandlung mit Formalin und Paraffin maskiert wurden (vgl. Methodenteil 2.2.3.2). Daher wurden hier die Intensität der ALK- und Phosphotyrosinfärbungen nach Vorbehandlung in Citratpuffer pH6 mit der pH9-Vorbehandlung verglichen (Abb. 31). Getestet wurden 40 Minuten in Citratpuffer gegen 20 Minuten in pH9. Ebenfalls getestet wurde die automatische Modulvorbehandlung, wie sie in der Immunhistochemie zu diagnostischen Zwecken genutzt wird.

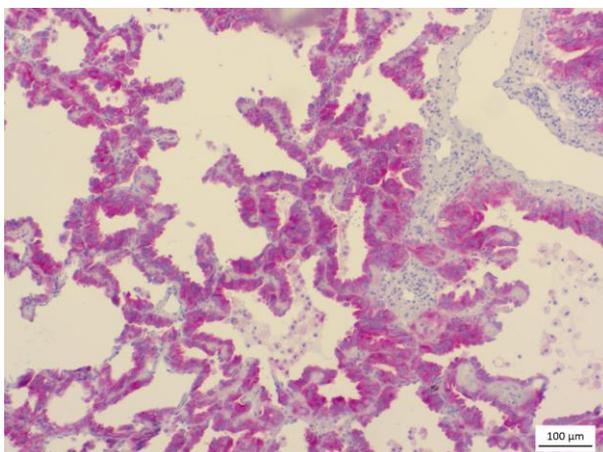
ALK 1:100: Citratpuffer



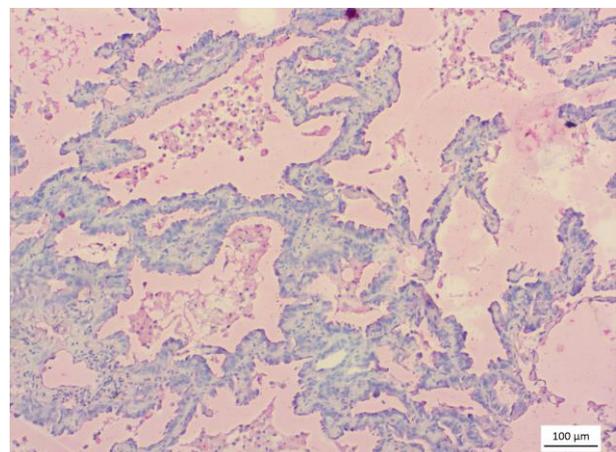
Phosphotyrosin 1:100: Citratpuffer



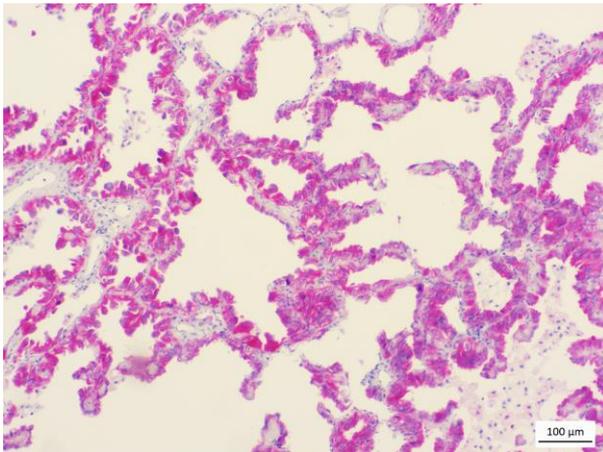
ALK 1:100: Modul *pH low*



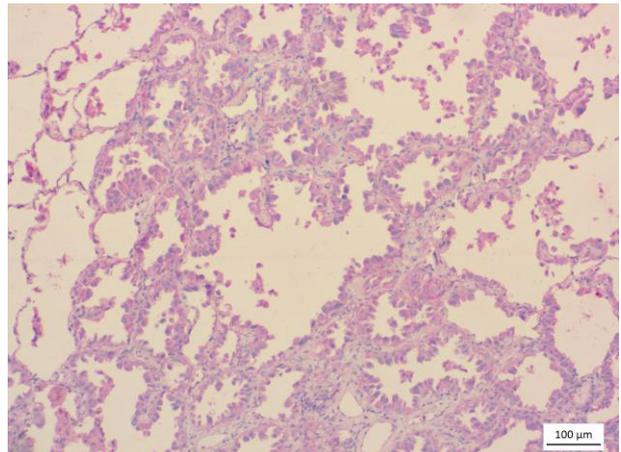
Phosphotyrosin 1:100: Modul *pH low*



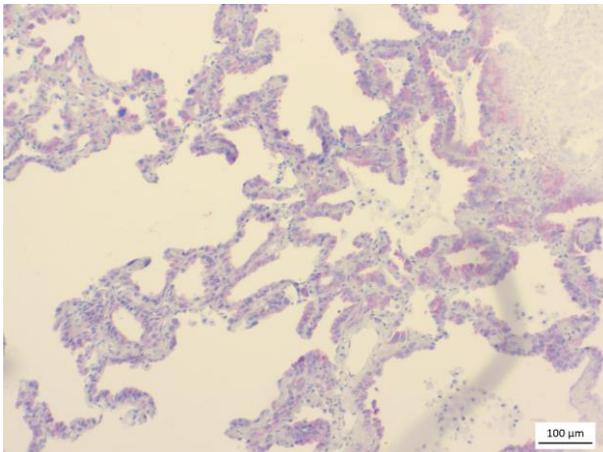
ALK 1:100: pH9



Phosphotyrosin 1:100: pH9



ALK 1:100: Modul *pH high*



Phosphotyrosin 1:100: Modul *pH high*

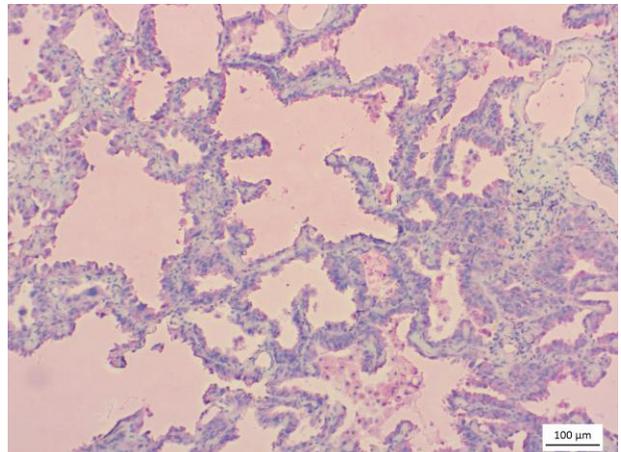
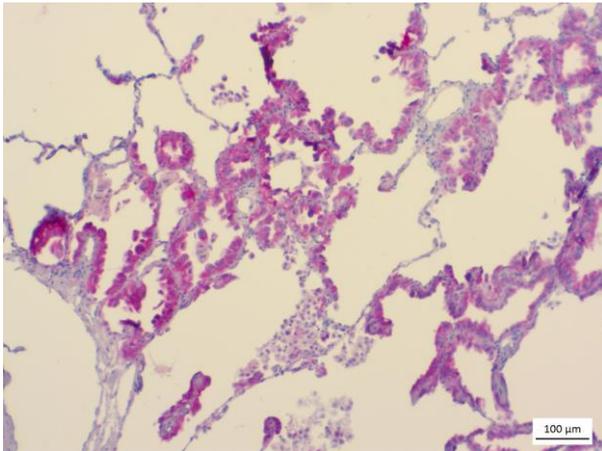


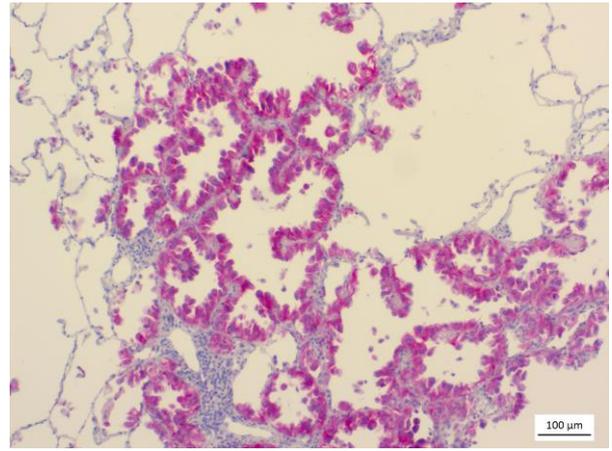
Abb. 31: IHC-Färbungen zum Vergleich Antigendemaskierung: Die verschiedenen Antigendemaskierungsoptionen wurden verglichen. Die Möglichkeiten der Vorbehandlung waren Citratpuffer und pH9 manuell oder im Modul gefärbt. Die jeweiligen Ausführungen sind unter den Bildern notiert. 10x Objektiv.

Aufgrund des stärkeren Signals für ALK bei pH9 (manuell) wurde diese Vorbehandlung ausgewählt.

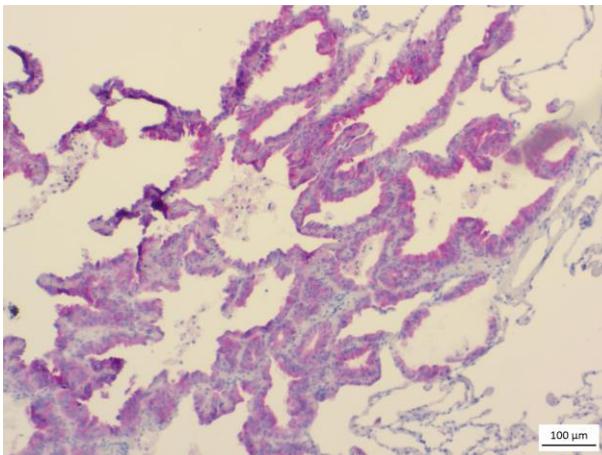
In der zweiten Phase wurde mit dieser Vorbehandlung die bestmögliche Antikörperkonzentration von anti-ALK-IgG ermittelt bei Inkubation des Antikörpers für eine Stunde gegen Inkubation über Nacht (Abb. 32).



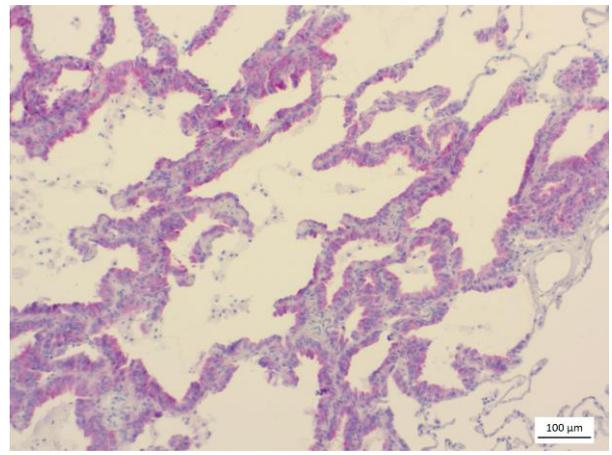
ALK: 1:100 / 1 Stunde



ALK: 1:100 / über Nacht



ALK: 1:50 / 1 Stunde

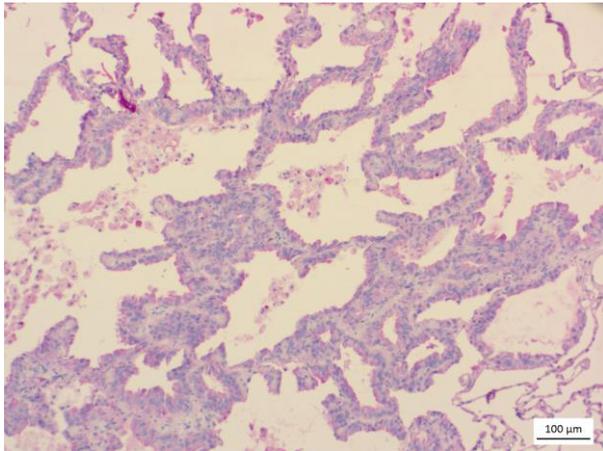


ALK: 1:50 / über Nacht

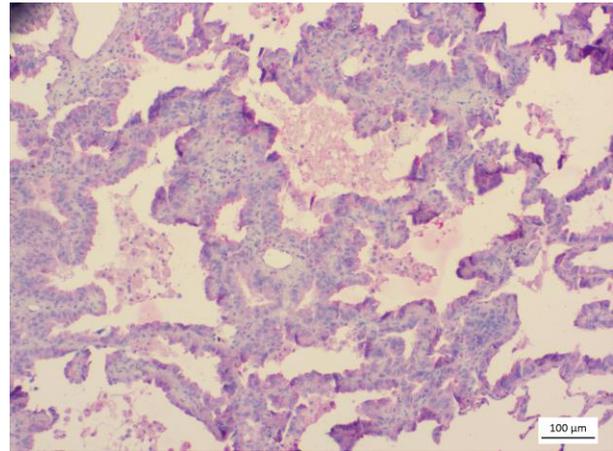
Abb. 32: Verdünnungsreihe ALK zu zwei verschiedenen Zeitpunkten: Immunhistochemisch wurde anti-ALK-IgG in den Verdünnungen 1:100 und 1:50 bei einer Inkubationszeit von jeweils einer Stunde und über Nacht verglichen. 10x Objektiv.

Da alle Konzentrationen und Inkubationszeiten ähnliche Resultate boten, wurde die Verdünnung 1:100 bei einer Stunde Inkubationszeit festgelegt.

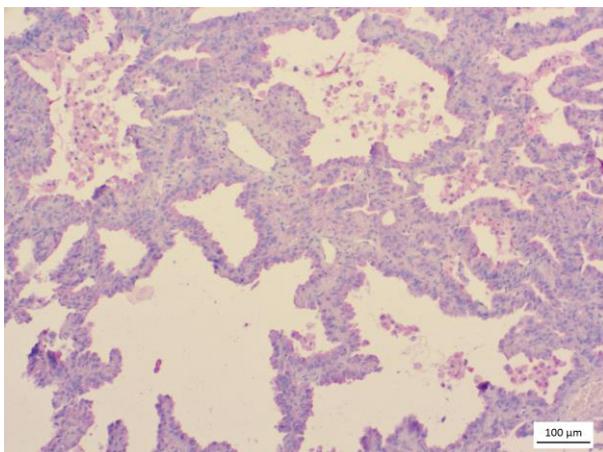
Gleichzeitig wurde mit dieser Vorbehandlung die bestmögliche Antikörperkonzentration von anti-Phosphotyrosin-IgG ermittelt bei Inkubation des Antikörpers für eine Stunde gegen Inkubation über Nacht (Abb. 33).



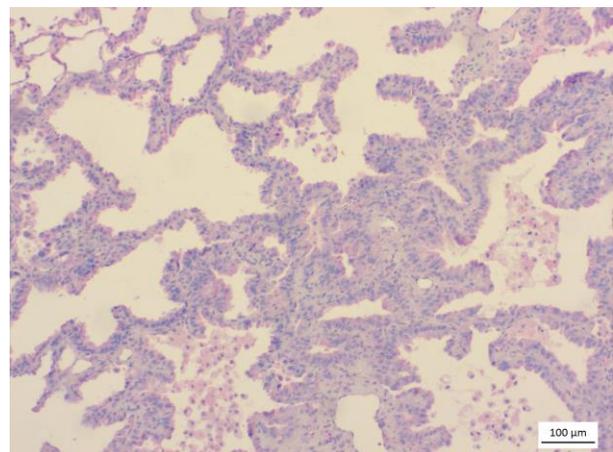
Phosphotyrosin: 1:100 / 1 Stunde



Phosphotyrosin: 1:100 / über Nacht



Phosphotyrosin: 1:50 / 1 Stunde



Phosphotyrosin: 1:50 / über Nacht

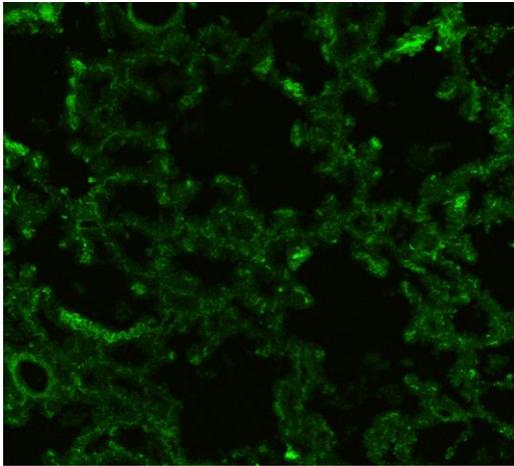
Abb. 33: Verdünnungsreihe Phosphotyrosin zu zwei verschiedenen Zeitpunkten: Immunhistochemisch wurde anti-Phosphotyrosin-IgG in den Verdünnungen 1:100 und 1:50 bei einer Inkubationszeit von jeweils einer Stunde und über Nacht verglichen. 10x Objektiv.

Da alle Konzentrationen und Inkubationszeiten ähnliche Resultate boten, wurde die Verdünnung vergleichend mit der ALK-Immunhistochemie bei 1:100 bei einer Stunde Inkubationszeit festgelegt.

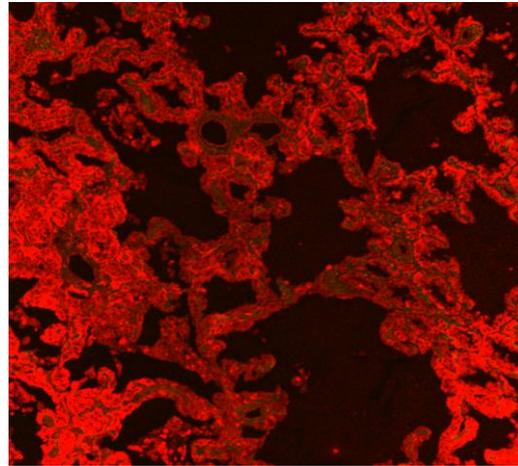
3.6.2 Immunfluoreszenz Darstellung von ALK und Phosphotyrosin in FFPE-Gewebe

Die immunhistochemischen Färbungen unterscheiden sich von den Immunfluoreszenzfärbungen insofern, als in der Immunfluoreszenz zwischen primärem und sekundärem Antikörper keine das Signal verstärkenden Biotin-Streptavidin-HRP-Kits genutzt werden, die sekundären Antikörper fluoreszent sind und das Gewebe selbst eine gewisse Autofluoreszenz besitzt. Folglich wurden die optimalen sekundäre Antikörperkonzentration ermittelt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von 1:100 bis 1:1000 des

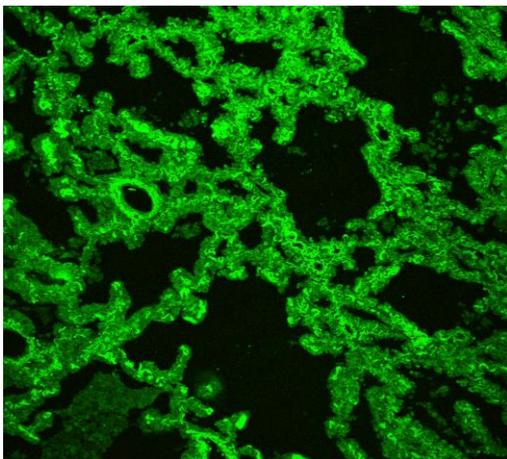
sekundären Antikörpers Alexa Fluor®488 für ALK und Cy®3 für Phosphotyrosin erstellt (Abb. 34, Zwischenschritte nicht abgebildet).



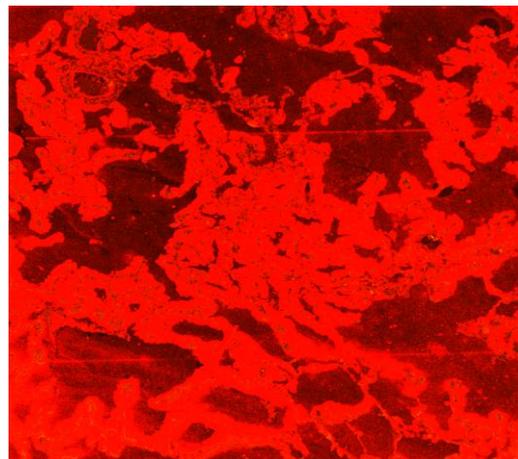
ALK + Alexa Fluor®488 1:1000



Phosphotyrosin + Cy®3 1:1000



ALK + Alexa Fluor®488 1:250



Phosphotyrosin + Cy®3 1:250

Abb. 34: Verdünnungsreihe der Fluorophore Alexa Fluor®488 und Cy®3: Mittels Immunhistofluoreszenz wurden Verdünnungsreihen der sekundären Antikörper Alexa Fluor®488 (grün) und Cy®3 (rot) erstellt. 10x Objektiv.

Die primären Antikörper wurden mit einer Verdünnung von 1:100 appliziert. Bei Konzentrationen des sekundären fluoreszierenden Antikörpers über 1:1000 steigt das Hintergrundsignal aufgrund unspezifischer Bindung der Fluorophore deutlich an. Konzentrationen von 1:1000 gewährleisten eine korrekte, starke Färbung. Deutlich zu sehen ist bei Alexa Fluor®488 1:250, dass das umliegende Kollagen intensiver fluoresziert.

Bei Betrachtung der gesamten Probe einschließlich nicht-tumorösen Anteilen ist jedoch auffällig, dass kein sichtbarer Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz zwischen Tumor und tumorfreiem Gewebe besteht (Abb. 35).

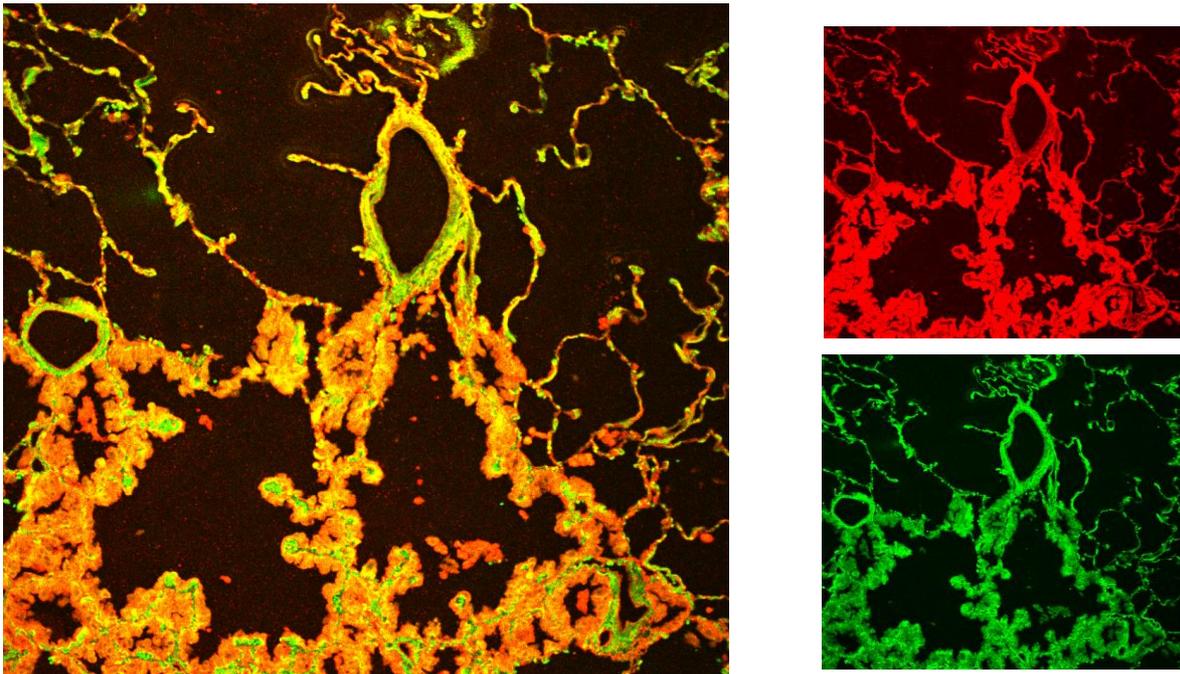


Abb. 35: Übergang Tumor zu gesundem Lungengewebe: 10x Vergrößerung. Phosphotyrosin in rot und ALK in grün. Im unteren Bildabschnitt ist der Tumor dieser Probe sichtbar, im oberen Abschnitt Tumor-freies Lungengewebe mit erhaltener Alveolarstruktur.

Abbildung 36 stellt obiges Gewebe vergrößert dar.

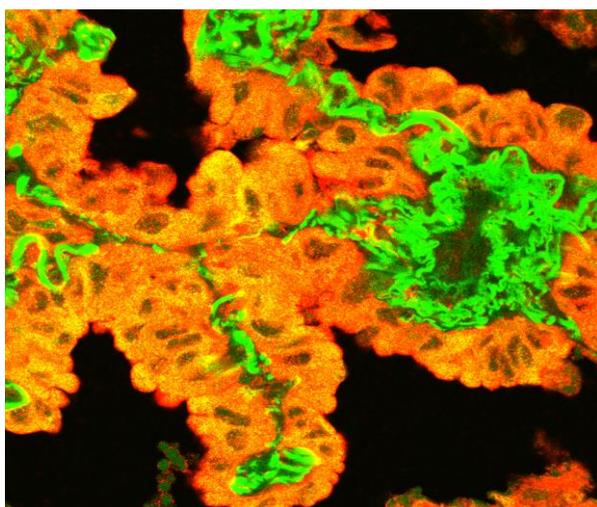


Abb. 36: Ausschnitt aus dem Tumor: Vergrößerung 60x Öl-Objektiv. Phosphotyrosin in rot und ALK in grün. 60x Vergrößerung.

Es ist nicht klar, ob das Signal auf Autofluoreszenz basiert. Zur Durchführung valider FRET-Experimente muss die spezifische Färbung des Gewebes gewährleistet sein. Unspezifische Gewebefärbungen und Autofluoreszenz können FRET-Ergebnisse ver-

fälschen. Daher soll bereits optisch ein Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz zwischen Tumor und Tumor-freier Lunge bestehen.

3.6.3 Optimierung der Immunfluoreszenz von FFPE-Gewebe mit roten Fluorophoren

Da die Immunhistofluoreszenzfärbungen mit Alexa Fluor®488 keine deutliche ALK-Färbung bieten, wurde Alexa Fluor®488 durch den roten Fluorophor Cy®3 und der ursprünglich an Phosphotyrosin bindende Cy®3 durch den tief rot fluoreszierenden Cy®5 ersetzt. Das Ziel des Einsatzes von rot fluoreszierenden Antikörpern ist es, die Detektion der Autofluoreszenz zu minimieren. Cy®3 besitzt eine maximale Anregung bei einer Wellenlänge von 550 nm und gibt Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 570 nm ab. Cy®5 besitzt eine maximale Anregung bei 650 nm und gibt Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von 670 nm ab (laut Herstellerinformation). Somit ist die unspezifische Detektion des Kollagens minimiert (Emissionsspektrum des Kollagens bei 305-450 nm beschrieben (Georgakoudi et al. 2002)).

Anhand des oben optimierten Färbeprotokolls wurden Immunhistofluoreszenzfärbungen mit Cy®3 erstellt (Abb. 37 und 38). Die Immunhistofluoreszenz von ALK, welche mit Cy®3-konjugiertem IgG anti-Kaninchen IgG durchgeführt wurde (Abb. 37), resultierte in einer spezifischen ALK-Färbung, da die Tumorzellen in ihrer Fluoreszenzintensität vom übrigen Lungengewebe abgrenzbar sind.

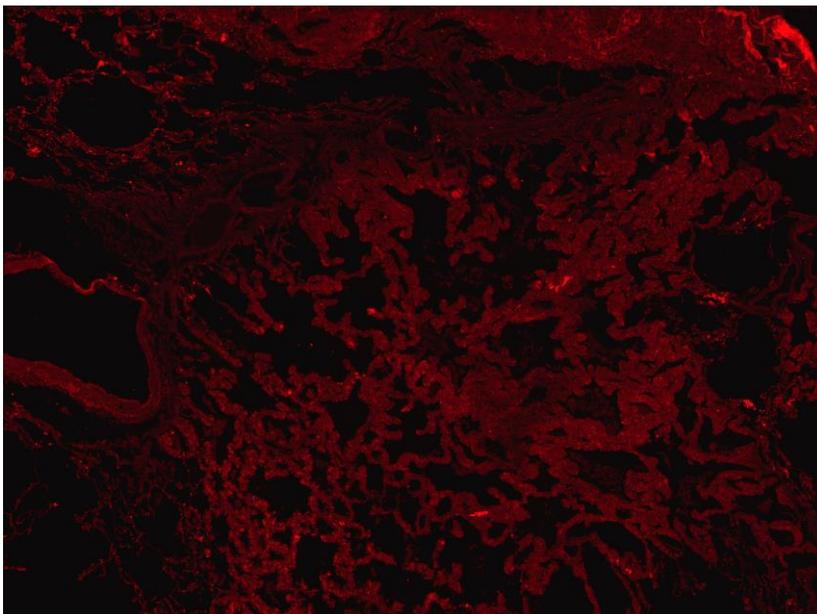


Abb. 37: Überblick Immunhistofluoreszenz ALK+Cy®3: Ausschnitt aus dem Tumorgewebe. 10x Vergrößerung. Immunhistofluoreszenzfärbung mit anti-ALK-IgG + Cy®3-konjugierter IgG anti-Kaninchen IgG. Dargestellt ist eine Aufnahme des Tumorgewebes zur Darstellung der Fluoreszenzintensität der Tumorzellen.

Zur Kontrolle wurde die ALK-Färbung mit einer ungefärbten Kontrolle verglichen (Abb. 38). Das noch sichtbare Lungengewebe ist auf die Autofluoreszenz des Gewebes zurückzuführen.

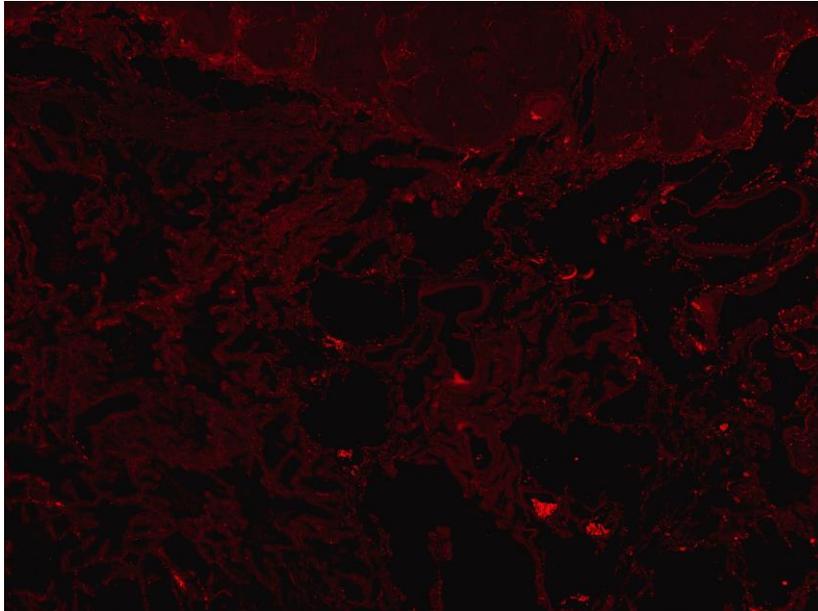


Abb. 38: Überblick Immunhistofluoreszenz ungefärbt: Gleicher Ausschnitt des Tumorgewebes wie in Abb. 37. 10x Vergrößerung. Darstellung reiner Autofluoreszenz bei Detektion analog des Wellenlängenbereichs von Cy[®]3.

3.7 Anwendung des FRET-Pärchens Cy[®]3/Cy[®]5 in der konfokalen FRET-Bildgebung

3.7.1 Acceptor Photobleaching im Zellmodell mit Cy[®]3/Cy[®]5

Zum Vergleich dieser Ergebnisse mit der FRET-Bildgebung am konfokalen Mikroskop wurde das *Acceptor Photobleaching* an H2228 und H3122 getestet, welche immunfluoreszent mit anti-ALK-IgG (Kaninchen) + Cy[®]3-konjugierte IgG anti-Kaninchen IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG (Maus) + Cy[®]5-konjugierte IgG anti-Maus IgG gefärbt waren (Abb. 39, 40).

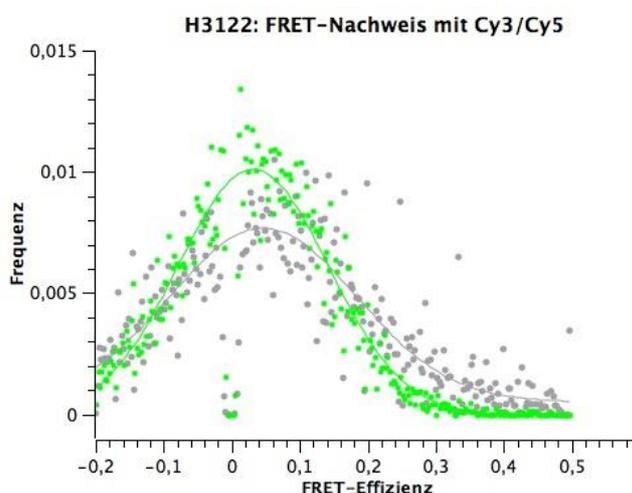


Abb. 39: FRET-Nachweis mittels Acceptor Photobleaching, H2228.

Graphisch dargestellt ist die FRET-Effizienz von H2228-Zellen, die immunfluoreszent gefärbt wurden mit anti-ALK-IgG (Kaninchen) + Cy[®]3-konjugierte IgG anti-Kaninchen IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG (Maus) + Cy[®]5-konjugierte IgG anti-Maus IgG. Grau: Nicht-gebleichte Region. Grün: Gebleichte Region.

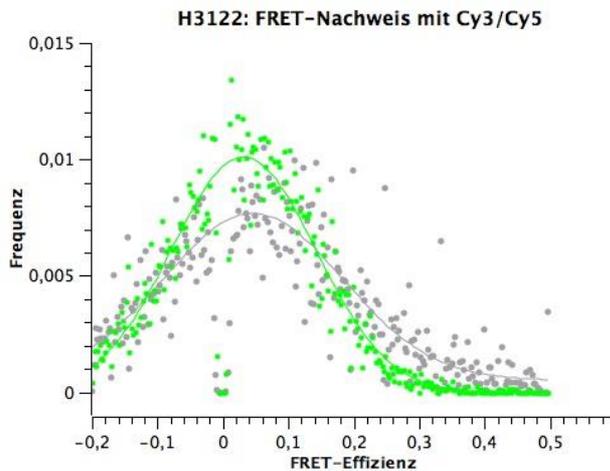


Abb. 40: FRET-Nachweis mittels Acceptor Photobleaching, H3122.

Graphisch dargestellt ist die FRET-Effizienz von H3122-Zellen, die immunfluoreszent gefärbt wurden mit anti-ALK-IgG (Kaninchen) + Cy[®]3-konjugierte IgG anti-Kaninchen IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG (Maus) + Cy[®]5-konjugierte IgG anti-Maus IgG. Grau: Nicht-gebleichte Region. Grün: Gebleichte Region.

Im Vergleich zu den FRET-Bildgebung mit Alexa Fluor[®]488/Cy[®]3 erzeugt das FRET-Paar Cy[®]3/Cy[®]5 eine deutlich schwächere FRET-Effizienz. Die FRET-Effizienz der nicht-gebleichten Region in der Grafik der H2228-FRET-Bildgebung (Abb. 39, graue Kurve) liegt bei 1,69%, während die FRET-Effizienz der gebleichten Region bei 4,36% liegt (Abb. 39, grüne Kurve). In der Zelllinie H3122 ist mit der konfokalen FRET-Bildgebung kein Nachweis mit dem Paar Cy[®]3/Cy[®]5 möglich. In der aktuellen Bildgebung mit Cy[®]3/Cy[®]5 liegt die FRET-Effizienz nach statistischer Analyse der nicht-gebleichten Region (Abb. 40, graue Kurve) bei 4,6%, wobei die FRET-Effizienz der gebleichten Region (Abb. 40, grüne Kurve) bei 3,16% liegt.

3.7.2 Acceptor Photobleaching an FFPE-Gewebe mit Cy[®]3/Cy[®]5

Mit dem Ziel, die Phosphorylierung von ALK in Patientenproben nachzuweisen, wurde das *Acceptor Photobleaching* anschließend an einem Tumorschnitt durchgeführt. Hierzu wurde der gleiche Tumorblock wie bei der Keyence-Messung verwendet.

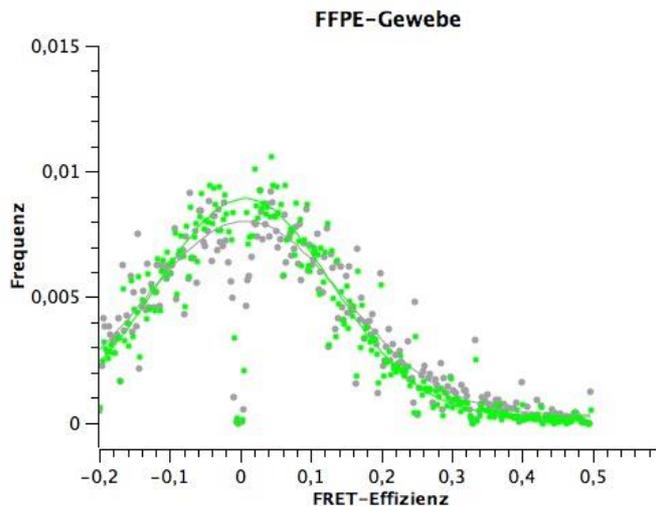


Abb. 41: FRET-Nachweis in FFPE-Gewebe. Graphisch dargestellt ist die FRET-Effizienz von Gewebe, das immunfluoreszent gefärbt wurde mit anti-ALK-IgG (Kaninchen) + Cy[®]3-konjugierte IgG anti-Kaninchen IgG und anti-Phosphotyrosin-IgG (Maus) + Cy[®]5-konjugierte IgG anti-Maus IgG. Grau: Nicht-gebleichte Region. Grün: Gebleichte Region.

Trotz korrekter Färbung und Evaluation blieb der FRET-Nachweis mit Cy[®]3/Cy[®]5 in FFPE-Gewebe negativ (Abb. 41). Die FRET-Effizienz liegt bei 0,6%, die der Kontrollkurve bei 0,7%.

Da der FRET-Nachweis mit Cy[®]3/Cy[®]5 kein signifikantes Ergebnis erzielte, wurden weitere Fluorophorpärchen im rot/tiefrotem Bereich getestet.

3.8 Anwendung weiterer FRET-Pärchen

3.8.1 Kombinationen roter Fluorophore in Zellkulturmodellen

Im Hinblick auf die Anwendung von Fluorophoren außerhalb des Wellenlängenbereichs des Kollagens wurden weitere Fluorophore auf ihre Anwendung in der FRET-Bildgebung getestet. Verwendet wurden Alexa-Farbstoffe im Wellenlängenbereich 555 nm und 647 nm sowie der bekannte Cy[®]5 und ein Cy[®]3 eines anderen Herstellers (siehe Tabelle 4). Die Verwendung dieser neuen Antikörperkonstellationen zeigte eine FRET-Effizienz von 3,58% (H3122, Alexa Fluor[®]555 und Cy[®]5) bis 4,34% (H2228, Alexa Fluor[®]555 und Cy[®]5).

Zelllinie	primäre Antikörper	sekundäre Antikörper	FRET-WERTE	FRET-WERTE
			NON-ROI %	ROI %
H2228	anti-ALK anti-Phosphotyrosin (4G10)	Alexa Fluor®555 und Alexa Fluor®647	-0,0007	3,87
		Alexa Fluor®555 und Cy®5	-0,0008	4,34
		Cy®3(life technologies) und Alexa Fluor®647	4,604	3,97
		Cy®3(life technologies) und Cy®5	5,104	4,35
H3122	anti-ALK anti-Phosphotyrosin (4G10)	Alexa Fluor®555 und Alexa Fluor®647	0,0341	4,31
		Alexa Fluor®555 und Cy®5	-0,0009	3,58
		Cy®3(life technologies) und Alexa Fluor®647	-0,0008	0,008
		Cy®3(life technologies) und Cy®5	5,435	4,42

Tabelle 4: FRET-Werte verschiedener Konstellationen sekundärer Antikörper. In tabellarischer Form aufgelistet sind in der äußeren rechten Spalte die FRET-Werte der einzelnen Kurven der geblichenen Regionen (ROI). Diesem gegenüber gestellt sind die Maximalwerte der Amplituden ohne FRET (NON-ROI). Der Tabelle sind ebenfalls die benutzten Antikörpervariationen zu entnehmen, mit denen H3122 und H2228 immunfluoreszent gefärbt wurden.

Ein FRET-Signal von 4% kann als positiver Nachweis betrachtet werden. Daher wurden exemplarische Gewebefärbungen durchgeführt.

3.8.2 Rote Alexa Fluor® Fluorophore am FFPE-Gewebeschnitt

Anknüpfend an die Ergebnisse aus 3.8.1 wurde die Kombination aus anti-ALK und anti-Phosphotyrosin (4G10) plus Alexa Fluor®555 und Alexa Fluor®647 exemplarisch an dem oben benutzten Gewebeschnitt des EML4-ALK positiven Lungenkarzinoms getestet. Hierzu wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit ebendiesen Kombinationen erstellt und unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet mit dem Ziel, ALK- und Phosphotyrosin-spezifische Färbungen zu generieren, um an den Zellen des Lungenkarzinoms FRET-Messungen durchzuführen.

Abbildung 42 zeigt hierzu die Übersicht der Immunfluoreszenzfärbung eines Tumorauschnittes. Die hier rot gezeigte Immunfluoreszenz von Phosphotyrosin und Alexa

Fluor®647 bezieht sich auf die Zellmembranen. Die grün dargestellte Immunfluoreszenz von ALK und Alexa Fluor®555 zeigt zytoplasmatische Signale mit Aussparung der Zellmembranen. Das Kollagen in dem Bereich der Septen ist auf die Autofluoreszenz des Gewebes zurückzuführen.

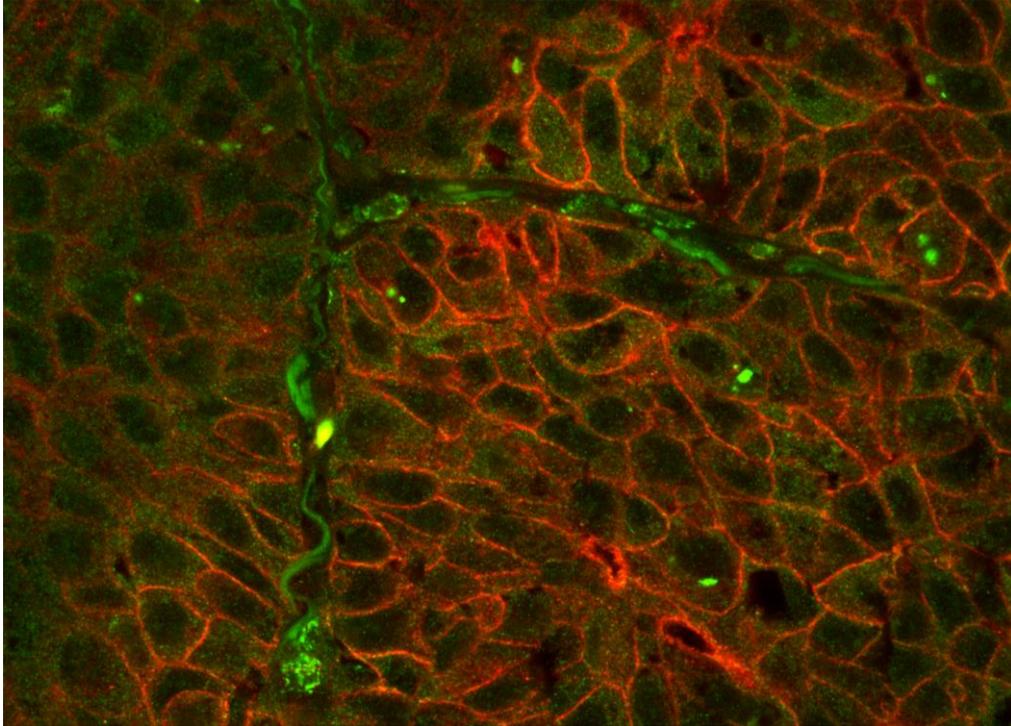


Abb. 42 Immunfluoreszenz mit Alexafarbstoffen: Gefärbt wurde anti-ALK plus Fluor®555 und anti-Phosphotyrosin plus Alexa Fluor®647. Phosphotyrosin wird in rot, ALK in grün dargestellt. Aufgenommen wurde das Bild am konfokalen Mikroskop mit einem 60x Öl-Objektiv.

Dieses Färbeergebnis wurde als spezifisch angesehen, da sich die Fluoreszenzsignale auf Zellmembran (Phosphotyrosin) und Zytoplasma (EML4-ALK) beschränken. Daher wurden anschließend an demselben Gewebeschnitt FRET-Messungen durchgeführt. Diese resultierten in einem negativen Ergebnis mit einer Differenz der Kontrollkurve zur FRET-Kurve von 0,6%.

4. Diskussion

Das Modell der personalisierten Medizin ist geprägt von fortwährenden Entdeckungen neuer onkogener Treibermutationen und Entwicklung gezielter Therapieoptionen. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung von Biomarkern zur Detektion geeigneter Patienten von größter Bedeutung. Biomarker können zum Beispiel funktionelle oder strukturelle Veränderungen eines Proteins sein. Da in onkogen aktiven Kinasen die Phosphorylierung eine zentrale Rolle einnimmt, kann die Phosphorylierung als ein funktioneller Biomarker genutzt werden, der neben der strukturellen Veränderung Aussagen über die Aktivität der Kinase zulässt. Das Ziel dieser Studie war es, mittels FRET-Bildgebung den Nachweis der Phosphorylierung der *anaplastic lymphoma kinase* im Adenokarzinom der Lunge zu ermöglichen.

4.1 Die Inhibition der Aktivität von ALK

Die in dieser Studie verwendeten Inhibitoren Crizotinib und Ceritinib sind in klinischen Studien erprobte, spezifische ALK-Tyrosinkinaseinhibitoren (Shaw et al. 2009; Shaw et al. 2014). Bereits publiziert wurden Inhibitionsstudien, die Crizotinib und Ceritinib im Zellmodell anhand der ALK-vermittelten Phosphorylierung von ERK in H2228- und H3122-Zellen verglichen. In der Studie von Friboulet et al. konnte in Westernblots gezeigt werden, dass H3122 und H2228 sensitiv auf die Inhibition mit Crizotinib und Ceritinib reagieren (Friboulet et al. 2014). Zur Festlegung der Inhibitorkonzentration mit der niedrigsten unspezifischen Toxizität wurde in dieser Studie die Inhibition der ALK-Aktivität in der Zellkultur ebenfalls mit Crizotinib und Ceritinib in kleinschrittigen Verdünnungsstufen durchgeführt. Mittels Westernblotanalysen konnte die geeignete Konzentration von 1 μM Crizotinib sowie 1 μM Ceritinib zur Inhibition der ALK-Aktivität in der Zellkultur ermittelt werden: die Anwendung von 1 μM Inhibitor erzielte das gewünschte Ergebnis der Verminderung der ALK-abhängigen Phosphorylierung von ERK1/2 (MAPK-Signalweg). Durch Kontrolle der Inhibitorkonzentrationen in der Kontrollzelllinie HCC827 wurde ein toxischer Effekt des Inhibitors bei 1 μM ausgeschlossen.

Diese Angaben wurden durch Viabilitätsmessungen bestätigt. Diese zeigten einen signifikanten Abfall der Zellaktivität bei 1 μM Crizotinib sowie 1 μM Ceritinib in H3122 und H2228 und keine Wirksamkeit in HCC827-Zellen.

Gleichzeitig deuten die Viabilitätsmessungen darauf hin, dass Crizotinib ein potenterer Inhibitor für H2228 und Ceritinib potenter in H3122 ist: die Zelllinie H3122 sprach stärker auf die Inhibition mit Ceritinib an, während das Ansprechen unter Crizotinib verzögert war. Mittels Immunopräzipitation konnte in dieser Studie weiterhin gezeigt werden, dass die Inhibitoren die Phosphorylierung von ALK vermindern. Besonders in der Zelllinie H3122 zeigte die Immunopräzipitation einen starken Rückgang der Phosphorylierung. Dies lässt annehmen, dass die Variante 1 (H3122) verglichen mit der Variante 3 (H2228) stärker phosphoryliert ist. Die Variante 1, welche von H3122 exprimiert wird, ist das erstmalig von Soda et al. 2007 beschriebene EML4-ALK-Fusionsprodukt im Adenokarzinom der Lunge. Da diese Variante eine instabile hydrophobe Region hat, die durch Hsp90 stabilisiert wird, gilt diese Variante als Konformations-instabil. Im Unterschied hierzu fehlt in der Variante 3 von EML4-ALK, welche von H2228 exprimiert wird, die Region der WD-40-Repeats (Richards et al. 2014). Vor diesem Hintergrund kann vermutet werden, dass in den Zelllinien die Aktivierung der Kinasen und ihrer Signalwege unterschiedlich stark von der Phosphorylierung abhängt.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten unter Crizotinib eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von ZNS-Metastasen aufweisen (Shaw et al. 2011; Shaw et al. 2013; Shaw et al. 2014). Da Crizotinib die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringt, kann im zentralen Nervensystem keine ausreichende Konzentration erreicht werden, und somit sind Hirnmetastasen bei bis zu 46% der mit Crizotinib behandelten Patienten das erste Zeichen der Krankheitsprogression (Costa et al. 2011; Chun et al. 2012; Metro et al. 2015). In Phase-I- und -II- Studien konnten Alectinib, Brigatinib und Lorlatinib als weitere ALK-spezifische Inhibitoren identifiziert werden, die die Blut-Hirn-Schranken passieren und die Überlebenszeit verbessern (Seto et al. 2013; Bauer et al. 2015; Rosell et al. 2016). Im Sinne dieser Studie zum Nachweis der Phosphorylierung wäre es interessant, die neuen Inhibitoren im FRET-Experiment mit dem hier etablierten Verfahren mit den Inhibitoren Crizotinib und Ceritinib im Zellmodell zu vergleichen.

4.2 Etablierung der FRET-Bildgebung am Zellmodell

Anhand der EML4-ALK-positiven Zelllinien NCI-H2228 und NCI-H3122 konnte ein Protokoll zur Detektion des FRET erstellt werden, welches den Nachweis der Phosphorylierung von ALK durch *Acceptor Photobleaching* ermöglicht. In dieser Studie wurde ein

Antikörpersystem benutzt, welches die optimale Orientierung der Fluorophore im Raum zueinander ermöglicht. Durch Kopplung der Fluorophore an sekundäre IgG-Antikörper, die an primäre IgG-Antikörper gebunden sind, wurde die FRET-Detektion ermöglicht. Durch die Immunfluoreszenzmarkierung von ALK mit IgG anti-IgG gekoppelten Alexa Fluor®488 und von Phosphotyrosinen mit IgG anti-IgG gekoppelten Cy®3 konnte der positive FRET-Nachweis zwischen Alexa Fluor®488 und Cy®3 erfolgen.

Da FRET nur unter der Voraussetzung stattfindet, dass die beiden Fluorophore weniger als 10 nm voneinander entfernt sind, gilt FRET als sensitiver Indikator für interagierende Moleküle. Aufgrund der großen Bedeutung der Nähe kann die Orientierung der sekundären Antikörper zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Diese Problematik wurde durch Testung verschiedener Antikörpersysteme im Vorfeld gelöst. Die Verwendung von Antikörpern zum Nachweis des FRET ermöglicht die Applikation auch an Gewebefärbungen.

Die Testung des Assays erfolgte an zwei Positivkontrollen: für den Nachweis von ALK wurden Alexa Fluor®488- und Cy®3-konjugierte Antikörper auf H2228-Zellen appliziert, deren ALK-Domänen mit Antikörpern markiert waren. Durch die Bindung beider Fluorophore an denselben primären Antikörper wurde eine hohe Fluorophorendichte und nahe Orientierung zu einander erreicht und somit FRET sehr wahrscheinlich. Im zweiten Schritt erfolgte die Testung an Phosphotyrosinen. Alexa Fluor®488- und Cy®3-konjugierte Antikörper wurden auf H2228-Zellen appliziert, deren Phosphotyrosine mit 4G10 markiert wurden. Diese Positivkontrollen resultierten in einem starken FRET-Signal, welches bestätigte, dass die Fluorophore als geeignete FRET-Pärchen eingesetzt werden konnten.

Mit den Alexa Fluor®488- und Cy®3-konjugierten Antikörpern wurde im Folgenden die FRET-Detektion im Zellmodell zur Messung der Phosphorylierung der ALK in den Zelllinien H3122 und H2228 durchgeführt. Wir begannen die Messung der Phosphorylierung der ALK in adhärierenden Zellen. Nach Findung der optimalen Antikörperkonzentration wurden die Einstellungen und die Vorgänge beim *Acceptor Photobleaching* an die Zelllinien angepasst. Ebenfalls wurde darauf geachtet, ein kräftiges Signal der Fluorophore, vor allem von Cy®3 als Akzeptor zu erhalten, um ein maximales FRET-Signal zu detektieren. Die Versuche an auf Deckgläschen gewachsenen Zellen ergab eine FRET-Effizienz in der Zelllinie H2228 im Mittel von 13,56% und in der Zelllinie H3122 im Mittel von 19,14%.

Wie in 4.1 beschrieben, sprechen die Zelllinien unterschiedlich stark auf die Inhibitoren an und sind unterschiedlich stark phosphoryliert. Die Anwendung der Inhibitoren wurde ebenfalls auf die FRET-Bildgebung übertragen. Bereits nach 45 minütiger Inkubation mit Crizotinib oder Ceritinib war der FRET-Nachweis negativ.

Anhand dieser Ergebnisse spiegelt die FRET-Bildgebung nicht nur den alleinigen Nachweis der Phosphorylierung von ALK wider, sondern auch das heutige Verständnis der Aktivitätsregulierung onkogener Tyrosinkinasen.

Neben der Immunopräzipitation ist somit auch die FRET-Bildgebung als Nachweismethode für die Inhibition der Phosphorylierung von ALK geeignet. Interessant wäre im klinischen Kontext der Nachweis unterschiedlich starker FRET-Effizienzen vor Therapie bzw. die Korrelation der FRET-Effizienz mit dem Therapieansprechen.

4.3 FRET-Bildgebung in zytologischen Diagnostikverfahren

Bekannt ist die Tatsache, dass Tests auf Medikamentensensitivität vor Behandlung Nutzen und Effekt der adjuvanten Chemotherapie in NSCLC-Patienten voraussagen können (Tanahashi et al. 2010; Miyazaki et al. 2016). Bis heute gibt es keine etablierten Verfahren in der Routinediagnostik, die den tatsächlichen Effekt des Therapeutikums bezogen auf den jeweiligen an einem Bronchialkarzinom erkrankten Patienten nachweisen können. Eine Studie von Miyazaki et al. an extrahierten Tumorzellen aus reseziertem Lungengewebe überprüfte deren Überlebenszeit unter Crizotinib in Viabilitätsmessungen und konnte vor Therapiebeginn ein Ansprechen auf den Inhibitor nachweisen (Miyazaki et al. 2016). Die Studie bezieht sich somit auf die alleinige Tatsache, dass ALK-positive NSCLC primär Crizotinib-sensitiv sind und berücksichtigt nicht die Tatsache, dass diese Therapie, wie bereits in 1.3.2 und 4.1 beschrieben, zu Resistenzen und Hirnmetastasen führt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob die Messung der ALK-Aktivität mittels FRET vor Therapiebeginn in Korrelation mit dem Therapieansprechen hier eine noch bessere Voraussage liefert. Zwischen Testverfahren in der Zellkultur und Testverfahren an Patientengewebe gibt es allerdings große Unterschiede im Hinblick auf die Durchführbarkeit. Zur Überbrückung der Lücke zwischen Durchführung der Testverfahren in Zellkultur und Gewebe wurden in dieser Studie Tests an Zytospins, Ausstrichen und in Paraffin gegossenen Zytoblöcken durchgeführt.

Das Erstellen und Auswerten gefärbter Zytospins und Ausstriche ist ein Standardverfahren in Pathologischen Labors. Daher wurden im Zellmodell Zytospins und Ausstri-

che von H2228, H3122 und HCC827 erstellt und diese immunfluoreszent mit Antikörpern, wie in 4.2 beschrieben, gefärbt. Im Gegensatz zu auf Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden die Zytospins und Ausstriche mit Eisacetone fixiert, dessen Einfluss auf die Färbung ausgeschlossen wurde. Der FRET-Nachweis war in Zytospins und Ausstrichen von H2228 und H3122 ebenfalls erfolgreich. Die Zelllinie H2228 wies in den Zytospins im Mittel eine FRET-Effizienz von 7,4% und in Ausstrichen von 16,94% auf. Die Zelllinie H3122 wies im Mittel eine FRET-Effizienz der Zytospins von 18,51% und in Ausstrichen von 21,50% auf.

Die FRET-Effizienzen bei Utilisation von Alexa Fluor®488/Cy®3 schwankten innerhalb der Zelllinie H2228 zwischen 7,4% (Zytospin H2228) und 16,94% (Ausstrich H2228). Innerhalb der Zelllinie H3122 schwankten sie zwischen 18,51% (Zytospin H3122) und 21,50% (Ausstrich H3122). Die FRET-Effizienzen der auf Deckgläschen gewachsenen Zellen lagen ebenfalls in diesem Bereich: H2228-Zellen hatten eine FRET-Effizienz von im Mittel 13,56% und H3122-Zellen von 19,14%. Es ist anzunehmen, dass diese Unterschiede darauf zurückzuführen sind, dass einerseits nur eine Auswahl von 5 Zellen der jeweiligen Proben gebleicht wurde und dass in der Probenherstellung minimale Abweichungen, z.B. in der Bindung der Antikörper, unterlaufen sein könnten oder auch ALK innerhalb einer Zelllinie unterschiedlich stark phosphoryliert ist. Diese Schwankungen könnten mittels FRET-FLIM-Mikroskopie ausgeglichen werden, da unter FLIM ein ganzer Ausschnitt unter dem Mikroskop gescannt werden kann.

Anhand eines Protokolls von Varsegi und Shidham wurden Zytoblocks der oben genannten Zellen unter Verwendung von Agarose erstellt und diese mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (Varsegi und Shidham 2009). Von diesen FFPE-Zytoblocks wurden Schnitte auf Objektträger gezogen und anschließend Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, um die Erkenntnisse aus dem Zellmodell auf FFPE-Gewebe zu übertragen. Dazu mussten die auf Objektträger gezogenen Zytoblockschnitte wie FFPE-Gewebe vorbehandelt werden. Für die Immunfluoreszenzfärbung der Zytoblocks wurden wie später in der Färbung von Geweben Antigendemaskierung, Waschschriffe und die Färbung durchgeführt. Dieses resultierte in einem positiven FRET-Nachweis, der mit den vorherigen Ergebnissen der Zellmodelle vergleichbar war. In Zytoblockpräparaten von H2228 wurde im Mittel eine FRET-Effizienz von 8,00% detektiert, in H3122-Zellen von 13,87%. Somit wurde ausgeschlossen, dass die Formalinfixierung und Paraffineinbettung sowie die Antigendemaskierung die FRET-Bildgebung unmöglich macht. Gleichzeitig ist auffällig, dass die FRET-Effizienz an Zy-

toblöcken im Vergleich zur Effizienz bei auf Deckgläschen gewachsenen Zellen und zytologischen Proben leicht vermindert ist.

Durch die FRET-Bildgebung an Zytoblocks wurde der Transfer zwischen Zellkultur und Gewebefärbungen erreicht.

4.4 FRET-Bildgebung an FFPE-Gewebe

Es gibt verschiedene Methoden, Proteinphosphorylierung nachzuweisen, wie zum Beispiel Tests basierend auf radioaktivem ATP, mittels Phospho-Antikörpern oder Fluoreszenzverfahren (Gou et al. 2015). Jin und Gou publizierten 2016 eine Zellkultur basierte *fluorescence detection in tube* Methode (FDIT), die die Stärke des Fluoreszenzsignals von markiertem Phospho-Protein zu der Phosphorylierungsrate der Probe korreliert und somit Aussagen über die Menge an phosphoryliertem Protein in Mikrogramm treffen kann (Jin X und Gou JY 2016). Diese Methode setzt voraus, dass Mikrogramm/Menge zu Aktivität korreliert. Auf der anderen Seite ist diese Methode nur in der Zellkultur überprüft worden. Über FRET-Messungen von phosphorylierten Kinasen, wie in dieser Studie, kann direkt die Phosphorylierungsrate der Kinase aus der FRET-Effizienz abgelesen werden. Dieses wurde erfolgreich in der Zellkultur, wie in 4.3 beschrieben, etabliert. Das Ziel dieser Methode wäre, Patientenkohorten mit bekanntem Therapieansprechen oder -versagen auf die FRET-Effizienz der jeweiligen ALK ihres Tumors zu untersuchen und anschließend FRET-Effizienz mit dem Therapieansprechen zu korrelieren.

Mittels Auswertung von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Immunhistochemie verschiedener Patienten-FFPE-Proben wurde für diese Studie ein Tumorblockpräparat ausgewählt, welches für die Gewebeschnitte zur Etablierung der FRET-Bildgebung an FFPE-Gewebe genutzt wurde. Zur Detektion der optimalen Antikörperkonzentrationen der primären Antikörper wurden verschiedene immunhistochemische Färbereihen an ebendiesem Präparat durchgeführt. Anschließend erfolgte der Übertrag des Protokolls der Immunhistochemie anti-ALK/anti-Phosphotyrosin auf die Immunfluoreszenzfärbung. Es wurde festgestellt, dass die Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper aus der Zellkultur ebenfalls optimal für Gewebefärbungen sind. Das in der Zellkultur verwendete Antikörpermodell zu Detektion des FRET bestehend aus den zwei primären Antikörpern plus die an die sekundären Antikörper konjugierten Fluorophore ermöglichte hier die Gewebepenetration und somit die FRET-Bildgebung an FFPE-Gewebe.

Anhand dieser Vorarbeit wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-ALK und Alexa Fluor®488-konjugierten Antikörpern und anti-Phosphotyrosin und Cy®3-konjugierten Antikörpern erstellt. Diese resultierten in einer hohen Autofluoreszenz des Kollagens des umliegenden Lungengewebes. Dieses kann darin begründet sein, dass sich die Autofluoreszenz des FFPE-Gewebes mit den Spektren der Fluorophore vermischt. Dies ist besonders bei grünen Fluorophoren, wie bei Alexa Fluor®488 (Emission bei 488 nm), der Fall, da das Emissionsspektrum des Kollagens bei 305-450 nm beschrieben ist und in den oben genannten Proben einen deutlichen Distraktor darstellte (Georgakoudi et al. 2002). Die Etablierung eines validen FRET-Experimentes kann nicht nur sehr störanfällig für falsch-negative Ergebnisse aufgrund von Photokonversion und Autofluoreszenz sein, sondern auch aufgrund zu schwacher Antikörperkonzentrationen oder zu schwacher Laser-/Detektoreinstellungen oder falscher Blenden-/Objektiveinstellungen (Kremers et al. 2009).

Trotz schrittweiser Ermittlung geeigneter Vorbehandlungsmethoden des FFPE-Gewebes und darauf aufbauender Ermittlung der optimalen Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper war die Etablierung der FRET-Bildgebung an FFPE-Gewebe mit Alexa Fluor®488 und Cy®3 nicht möglich.

Bereits publiziert wurde, dass durch den Einsatz roter Fluorophore, die eine tiefere Gewebepenetration gewährleisten können und nicht mit Kollagen interferieren, die Detektion der Autofluoreszenz umgangen werden könnte (Shen et al.; Wessels et al. 2010). Daher wurde das FRET-Paar Cy®3/Cy®5 für weitere Experimente benutzt. Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-ALK + Cy®3-konjugierten sekundären Antikörpern und anti-Phosphotyrosin + Cy®5-konjugierten sekundären Antikörpern resultierten in spezifischen Färberesultaten. Die Färbungen wurden optisch vergleichend am Keyence-Messmikroskop in Zusammenarbeit mit Dr. G. Bunt (Abteilung für Molecular Optical and Live Cell Imaging, Universitätsmedizin Göttingen) kontrolliert.

Anschließend wurde die konfokale FRET-Bildgebung mittels *Acceptor Photobleaching* von Cy®5, so wie sie primär mittels Cy®3 in der Zellkultur an H2228 und H3122 etabliert wurde, an dem Zellmodell getestet. Die Phosphorylierung von ALK konnte in H2228 unter Cy®3/Cy®5 mit einer FRET-Effizienz von ungefähr 4,36% nachgewiesen werden (im Vergleich lag die Kontrollkurve bei 1,69%). In H3122 blieb der Nachweis negativ, obwohl im Vorfeld diese Zelllinie eine stärkere FRET-Effizienz als H2228 mit dem FRET-Pärchen Alexa Fluor® 488/Cy®3 aufwies. Der Nachweis an FFPE-Gewebe war ebenfalls negativ. Um andererseits ein Vielfaches an Möglichkeiten zum

FRET-Nachweis an FFPE-Gewebeproben mittels *Acceptor Photobleaching* zu generieren, wurden in dieser Studie weitere Fluorophore im Zellmodell an H2228 und H3122 getestet, um verschiedene FRET-Pärchen im roten/tiefroten Wellenlängenbereich zu generieren. Es wurde ein Cy[®]3 Fluorophor eines anderen Herstellers jeweils mit Cy[®]5 und mit Alexa Fluor[®]647 kombiniert. Außerdem wurde Alexa Fluor[®]555 mit jeweils Alexa Fluor[®]647 und Cy[®]5 kombiniert. Die Konstellationen mit Alexa Farbstoffen generierten ein FRET-Signal von im Mittel 4% in den Zelllinien.

Phosphotyrosin (Alexa Fluor[®]647) zeigte ein an der Zellmembranen verstärktes Signal, ALK (Alexa Fluor[®]555) ein auf das Zytoplasma begrenztes Signal. Dennoch blieben die anschließenden FRET-Messungen erfolglos. Zwischen FRET-Messungen in der Zellkultur und FRET-Messungen an FFPE-Gewebe scheint es einen Faktor zu geben, der das FRET-Signal in FFPE-Geweben mindert. Trotz Spezifizierung der Färbung durch rot fluoreszierende sekundäre Antikörper muss weiterhin der Störfaktor der Autofluoreszenz in Betracht gezogen werden. Des Weiteren müssten Vorbehandlung und Färbeprotokoll mit den roten Fluorophoren optimiert werden. Außerdem ist zu bedenken, dass durch die Gewinnung der Proben während der Operation eine Ischämie im Tumor entstand, die den Phosphorylierungsstatus von ALK beeinflusst haben könnte. Dieser Einflussfaktor scheint in der Studie von Weitsman et al. nicht aufgetreten zu sein. 2016 publizierten Weitsman et al. eine FRET-FLIM-Mikroskopie-basierte Quantifizierung von HER2-HER3-Dimeren in 131 *Tissue-Microarray*-Proben von an Brustkrebs erkrankten Patientinnen. Eine HER2-HER3-Dimerisierung zeigte eine höhere Rate von Spätmetastasen 10 Jahre nach operativer Entfernung des Tumors. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass diese Rate nicht mit der HER2-Expression korreliert, sondern von dieser unabhängig ist und dass es keine Korrelation von HER2-Expression zu HER2-HER3-Dimerisation gibt (Weitsman et al. 2016). In ihrer FLIM-basierten Studie beschreiben Weitsman et al. ebenfalls die Problematik von Autofluoreszenz, die bekannterweise auch bei konfokaler Lasermikroskopie vorkommt. Da FLIM-Mikroskopie ein Vielfaches an Informationen, verglichen mit konfokaler Mikroskopie, miteinander verrechnen kann, hat die Gruppe um Weitsman im Vorfeld einen Algorithmus entwickelt, der diesen Störfaktor eliminiert (Barber et al. 2014, Weitsman et al. 2016). Das in der Studie von 2016 gemessene FRET-Signal zwischen HER2 und HER3 betrug 4%. Verglichen mit dieser ALK-Studie scheinen 4% wenig zu sein, aber diese 4% FRET konnten eine höhere Spätmetastasierungsrate zeigen.

2005 erschien erstmalig ein FRET-Experiment in der Literatur, welches EGFR-Phosphorylierungslevel in der Zellkultur sowie auch an Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen nachwies. Die Gruppe um Keese setzte ähnlich wie in dieser Studie Cy³/Cy⁵ ein und benutzte die Methodik des *Acceptor Photobleachings* am konfokalen Mikroskop, um in der Zellkultur die Phosphorylierung des EGFR nachzuweisen (Keese et al. 2005). Ebenfalls wurde in dieser Studie festgestellt, dass Fluorophore im grünen Bereich nicht für die FFPE-Bildgebung geeignet sind. Vergleichbar mit dem Ziel des Nachweises der Phosphorylierung von ALK im Adenokarzinom der Lunge zur Abschätzung des Therapieansprechens wurde in der Studie von Keese das Ziel gesetzt, EGFR-Phosphorylierungslevel im Kolorektalen Karzinom zu bestimmen, um das Therapieansprechen abzuschätzen. Nach erfolgreicher Etablierung in der Zellkultur wendete die Gruppe ihr Protokoll ebenfalls auf einen Patientengewebeschnitt an, um die Methodik am FFPE-Gewebe zu testen. So konnten sie im Zellmodell nachweisen, dass EGFR-Phosphorylierung invers zu EGFR-Expression korreliert, dass also eine hohe Expression des Rezeptors nicht gleichzusetzen ist mit hoher Aktivität der Kinase. Für FRET-Messungen an FFPE-Gewebe benutzte die Gruppe Chromophor-markierte Antikörper und übertrugen die Technik aus der Zellkultur exemplarisch auf das FFPE-Gewebe und erhielten eine Differenz in der FRET-Effizienz zwischen Tumor und tumorfreiem Gewebe von ungefähr 4%.

Diesen Gedanken weiterführend, publizierten Kong et al. eine Reihe von FRET-FLIM Experimenten mit Cy³/Cy⁵ mit dem Ziel, Patienten mit einer Überexpression oder sehr starken Phosphorylierung von EGFR im Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches zu identifizieren. Sie stellten fest, dass Patienten mit einer hohen EGFR-Phosphorylierung eine deutlich geringere Überlebenszeit hatten. Diese Gruppe führte die Versuche an FFPE-Gewebeproben durch (*Tissue-Microarray*). Kong et al. benutzten ebenfalls ausschließlich FRET-FLIM und nicht das *Acceptor Photobleaching* (Kong et al. 2006). Sie erhielten im Median eine FRET-Effizienz von 4.13% (0-14.70% in Tumorgeweben) in 130 Patientenproben und korrelierten hohe und niedrige FRET-Effizienzen in dieser Kohorte zu Überlebenszeit und progressionsfreier Zeit. Sie stellten fest, dass hohe FRET-Effizienzen der jeweiligen Tumorprobe zu korrelieren sind mit kürzeren progressionsfreien Intervallen des jeweiligen Tumors. FRET-Effizienzen konnten nicht mit der Überlebenszeit korreliert werden (Kong et al. 2006).

In der Literatur sind weitere Versuche der FRET-Bildgebung an FFPE-Gewebe bekannt. Eines der Experimente bezieht sich auf den erfolgreichen Nachweis von

EGFR/HER2-Dimerisierung mittels FRET-FLIM in der Zellkultur ebenfalls mit dem Ziel, dieses Verfahren auf Gewebe zu übertragen (Waterhouse et al. 2011).

Literaturquellen zeigen immer mehr den Nutzen der FLIM-Methode und ihrer Algorithmen. So wurde 2016 eine ausführliche Beschreibung eines FRET-FLIM-Experiments zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen publiziert, welche detaillierte Informationen zum Ablauf erhält (Margineanu et al. 2016). In dieser Studie wurde die FRET-FLIM-Mikroskopie nicht verwendet, da ihr Aufbau und die Durchführung sich größtenteils von der konfokalen Mikroskopie unterscheiden und im Hinblick auf die Anwendung in der Routinediagnostik sehr aufwendig sind.

Die Literatur zeigt, dass diese Studie zum Nachweis der Phosphorylierung von ALK an FFPE-Gewebe weitergeführt werden könnte, indem in weiteren Experimenten die FRET-Bildgebung anhand der FLIM-Mikroskopie optimiert und für die Routinediagnostik vereinfacht werden könnte. Außerdem können Färbeprotokoll und Vorbehandlungsschritte des FFPE-Gewebes im Hinblick auf die Nutzung roter Fluorophore weiter optimiert werden. Ebenso ließe sich in Betracht ziehen, Experimente auf die Optimierung der Laser- und Detektoreinstellungen sowie Bleachingvorgänge am konfokalen Mikroskop zu konzentrieren sowie die Präanalytik zu optimieren.

Anhand der in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse in der FRET-Bildgebung ließe sich einerseits die FRET-Bildgebung zum Nachweis der ALK-Aktivität in FFPE-Gewebe des Lungenkarzinoms fortführen, andererseits jedoch auch die FRET-Bildgebung in anderen Zellkulturen etablieren, um verschiedene Proteinaktivitäten oder -interaktionen zu messen. Die Ergebnisse aus den oben genannten Studien zeigen die besondere Bedeutung des Nachweises der Phosphorylierung und Aktivität der jeweiligen Kinase aus Patientenproben in der personalisierten Medizin, da im Brustkrebs (HER2-HER3-Dimerisierung) und kolorektalen Karzinom (EGFR-Phosphorylierung) bereits gezeigt werden konnte, dass nicht der alleinige Nachweis der Expression, sondern die gemessene Aktivität der jeweiligen Kinase maßgeblich die Tumoraggressivität bestimmt und daher maßgeblich für die Prognose is

5. Zusammenfassung

Die *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) ist eine onkogene Kinase u.a. bei T-Zell-Lymphomen und Adenokarzinomen der Lunge, die in diesen Tumoren durch Mutationen oder chromosomale Translokationen aktiviert wird. In diesen Tumoren besteht die Option einer molekular-zielgerichteten Therapie durch ALK-spezifische Inhibitoren. Das Therapieansprechen unter Inhibitorgabe variiert allerdings von komplettem Ansprechen bis hin zu Tumorprogression unter Therapie. Deshalb kann die ALK-Aktivität, gemessen anhand der Phosphorylierung, als ein relevanter Biomarker und Entscheidungsfaktor im Hinblick auf die Therapie angesehen werden. Die Phosphorylierung kann mittels Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) gemessen werden, der in dieser Studie mittels *Acceptor Photobleaching* nachgewiesen wurde. Das Ziel dieser Studie war, die Grundlagen für die Anwendung der FRET-Bildgebung in Geweben zu schaffen, um Patienten für gezielte Therapiestrategien zu selektionieren.

FRET kann zwischen zwei Fluorophoren entstehen, wenn sich diese in enger räumlicher Orientierung zueinander befinden. In dieser Studie wurde die ALK-Phosphorylierung in EML4-ALK-positiven Zelllinien (NCI-H2228 und NCI-H3122) gemessen, welche immunofluoreszent mit ALK und Alexa Fluor®488-konjugierten sekundären Antikörpern als Donor-Fluorophore und Phosphotyrosin und Cy®3-konjugierten sekundären Antikörpern als Akzeptoren gefärbt wurden. An diesen Zellen wurde am konfokalen Mikroskop das *Acceptor Photobleaching* durchgeführt, indem der Akzeptorfluorophor Cy®3 selektiv eliminiert wurde und dadurch einen Anstieg der Intensität von Alexa Fluor®488 messbar wurde. Dieser Anstieg der Donorfluoreszenz wurde hier zur Quantifizierung der FRET-Effizienz genutzt. Die Voraussetzung der extremen Nähe zwischen Akzeptor und Donor gewährleistet den selektiven Nachweis der ALK-Phosphorylierung.

In dieser Studie wurde anhand des *Acceptor Photobleachings* erfolgreich die Phosphorylierung von ALK nachgewiesen, und es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die FRET-Effizienz mit der ALK-Inhibition in den Zelllinien korreliert ist, welches die FRET-Bildgebung als einen möglichen Prädiktor in der ALK-Aktivitätsmessung zeigt. Mit den oben genannten Zelllinien wurden ebenfalls zytologische Proben, wie Zytospins, Ausstriche und Zytoblöcke, erstellt, mit denen der FRET-Nachweis reproduziert wurde und die Möglichkeit der Eingliederung in die Routinediagnostik zeigt.

Anhand der Zytoblöcke wurde der Transfer der FRET-Bildgebung an FFPE-Gewebe ermöglicht. Der letzte Transfer der Methode von fixierten Zellen in Zytoblöcken auf primär formalinfixierte Gewebe verlief allerdings erfolglos: mit verschiedenen Fluorophoren im roten und tiefroten Bereich konnte zwar eine mutmaßlich spezifische Doppelfärbung erreicht werden, der FRET-Nachweis mittels *Acceptor Photobleaching* im Gewebe verlief aber negativ.

Diese Studie stellt somit eine Methode da, die das Potential der FRET-Mikroskopie und ihrer Anwendung in der Zytologie als zukünftige Möglichkeit zum Nachweis der ALK-Phosphorylierung zeigt und bietet die Basis zur Fortführung der Etablierung des *Acceptor Photobleachings* an FFPE-Gewebe. Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob und bei welchen Fragestellungen die funktionelle Bestimmung z.B. einer Kinasaktivität dem Nachweis einer Genmutation oder Translokation als Biomarker für die Therapieprädiktion überlegen ist.

6. Literaturverzeichnis

- Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T (2004): Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell* 117(6), 699–711
- An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR Jr, Chen ZS (2010): BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Philadelphia Chromosome Positive Chronic Myeloid Leukemia: A Review. *Leukemia Res* 34(10), 1255–1268
- Awad MM, Shaw AT (2014): ALK Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer: Crizotinib and Beyond. *Clin Adv Hematol Onco* 12(7), 429–439
- Bang YJ (2011): The Potential for Crizotinib in Non-Small Cell Lung Cancer: A Perspective Review. *Ther Adv Med Oncol* 3(6), 279–291
- Barber PR, Tullis IDC, Rowley MI, Martins CD, Weitsman G, Lawler K, Coffey M, Woodman N, Gillett CE, Ng T: The Gray Institute open microsopes applied to radiobiology and protein interaction studies. 1. Auflage; S P I E - International Society for Optical Engineering, San Francisco 2014
- Bauer T, Solomon BJ, Besse B (2015): Clinical activity and safety of the ALK/ROS1 TKI inhibitor PF-06463922 in advanced NSCLC. *J Thor Oncol* 10, 239
- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R (2012): ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *J Clin Oncol* 30(8), 863–870
- Bob A, Bob K: Duale Reihe Innere Medizin. 3. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2012
- Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, Enomoto M, Hamada T, Haruta H (2008): Identification of Novel Isoforms of the EML4-ALK Transforming Gene in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 68(13), 4971-4976
- Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, Yatabe Y, Takeuchi K, Hamada T, Haruta H (2010): EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors. *New Engl J Med* 363(18), 1734–1739
- Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G (2008): The Anaplastic Lymphoma Kinase in the Pathogenesis of Cancer. *Cancer* 8(1), 11–23
- Christensen JG, Zou HY, Arango ME, Li Q, Lee JH, McDonnell SR, Yamazaki S, Alton GR, Mroczkowski B, Los G (2007): Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 6, 3314-22
- Chun SG1, Choe KS, Iyengar P, Yordy JS, Timmerman RD (2012): Isolated central nervous system progression on Crizotinib: an Achilles heel of non-small cell lung cancer with EML4-ALK translocation? *Cancer Biol Ther* 13(14), 1376-83

- Clegg RM, Geddes CD, Lakowicz JR: Reviews in Fluorescence. 3. Auflage; Springer Verlag, New York 2006
- Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE (2007): Lung Cancer: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician* 75(1), 56–63
- Cooper MR, Chim H, Chan H, Durand C (2014): Ceritinib: A New Tyrosine Kinase Inhibitor for NSCLC. *Ann Pharmacother J*; 49(1), 107-12
- Cooper WA, Lam DCL, O'Toole SA, Minna JD (2013): Molecular Biology of Lung Cancer. *J Thorac Dis* 5, 479–490
- Costa DB, Kobayashi S, Pandya SS, Yeo WL, Shen Z, Tan W, Wilner KD (2011): CSF concentration of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib. *J Clin Oncol* 29(15), 443-5
- Day RN, Voss TC, Enwright JF 3rd, Booker CF, Periasamy A, Schaufele F (2003): Imaging the Localized Protein Interactions between Pit-1 and the CCAAT/enhancer Binding Protein Alpha in the Living Pituitary Cell Nucleus. *Mol Endocrinol* 17(3), 333–345
- Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, Kondo KL, Linderman DJ, Heasley LE, Franklin WA (2012): Mechanisms of Resistance to Crizotinib in Patients with ALK Gene Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res* 18(5), 1472–1482
- Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, Michellys PY, Awad MM, Yanagitani N (2014): The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov* 4(6), 662-73
- Georgakoudi I, Jacobson BC, Müller MG, Sheets EE, Badizadegan K, Carr-Locke DL, Crum CP, Boone CW, Dasari RR, Van Dam J (2002): NAD(P)H and Collagen as in Vivo Quantitative Fluorescent Biomarkers of Epithelial Precancerous Changes. *Cancer Res* 62(3), 682–687
- Gou JY, Li K, Wu K, Wang X, Lin H, Cantu D, Uauy C, Dobon-Alonso A, Midorikawa T, Inoue K (2015): Wheat Stripe Rust Resistance Protein WKS1 Reduces the Ability of the Thylakoid-Associated Ascorbate Peroxidase to Detoxify Reactive Oxygen Species. *Plant Cell* 27(6), 1755-70
- Gridelli C, Peters S, Sgambato A, Casaluce F, Adjei AA, Ciardiello F (2014): ALK Inhibitors in the Treatment of Advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev* 40(2), 300–306
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 57-70
- Herold G: Innere Medizin. Gerd Herold (Verlag), Köln 2014
- Huse M, Kuriyan J (2002): The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282

- International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Zugriff am 08.05.2017
- Jin X, Gou JY (2016): A rapid and cost-effective fluorescence detection in tube (FDIT) method to analyze protein phosphorylation. *Plant Methods* 12, 43
- Karlsson R, Zheng J, Xuong N, Taylor SS, Sowadski JM (1993): Structure of the Mammalian Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase and an Inhibitor Peptide Displays an Open Conformation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49, 381–388
- Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, Jessop NA, Wain JC, Yeo AT (2012): Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Sci Transl Med* 4, 17
- Keese M, Magdeburg RJ, Herzog T, Hasenberg T, Offterdinger M, Pepperkok R, Sturm JW, Bastiaens PI (2005): Imaging Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation in Human Colorectal Cancer Cells and Human Tissues. *J Biol Chem* 280(30), 27826–27831
- Kenworthy AK (2001): Imaging Protein-Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *Methods* 24(3), 289–296
- Klopfleisch R, Weiss ATA, Gruber AD (2011): Excavation of a Buried Treasure--DNA, mRNA, miRNA and Protein Analysis in Formalin Fixed, Paraffin Embedded Tissues. *Histol Histopathol* 26(6), 797–810
- Kong A, Leboucher P, Leek R, Calleja V, Winter S, Harris A, Parker PJ, Larijani B (2006): Prognostic Value of an Activation State Marker for Epidermal Growth Factor Receptor in Tissue Microarrays of Head and Neck Cancer. *Cancer Res* 66(5), 2834–2843
- Kremers GJ, Hazelwood KL, Murphy CS, Davidson MW, Piston DW (2009): Photon conversion in orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 6(5), 355–358
- Kwak EL, Bang YL, Camidge DR (2010): Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *New Engl J Med* 363, 1693–1703
- Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lee CC, Jia Y, Li N, Sun X, Ng K, Ambing E, Gao MY, Hua S, Chen C, Kim S (2010): Crystal Structure of the ALK (anaplastic Lymphoma Kinase) Catalytic Domain. *Biochem J* 430(3), 425–437
- Lemmon MA, Schlessinger J (2010): Cell Signalling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 141, 1117–1134
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002): The Protein

- Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298(5600), 1912–1934
- Mano H (2008): <http://atlasgeneticsoncology.org//Tumors/inv2p21p23NSCCLungID5667.html>, Zugriff am 10.11.2015
- Margineanu A, Chan JJ, Kelly DJ, Warren SC, Flatters D, Kumar S, Katan M, Dunsby CW, French PMW (2016): Screening for protein-protein interactions using Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Sci Rep* 6, 28186
- Metro G, Lunardi G, Floridi P, Pascali JP, Marcomigni L, Chiari R, Ludovini V, Crinò L, Gori S (2015): CSF Concentration of Crizotinib in Two ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer Patients with CNS Metastases Deriving Clinical Benefit from Treatment. *J Thorac Oncol.* 10(5), 26-7
- Minca EC, Portier BP, Wang Z, Lanigan C, Farver CF, Feng Y, Ma PC, Arrossi VA, Pennell NA, Tubbs RR (2013): ALK status testing in non-small cell lung carcinoma: correlation between ultrasensitive IHC and FISH. *J Mol Diagn* 15(3), 341-6
- Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, Cohen DW, Johnson BE, Jänne PA (2010): A Novel, Highly Sensitive Antibody Allows for the Routine Detection of ALK-Rearranged Lung Adenocarcinomas by Standard Immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 16(5), 1561–1571
- Miyazaki R, Anayama T, Hirohashi K, Okada H, Kume M, Orihashi K (2016): In Vitro Drug Sensitivity Test to Predict Molecular Target Drug Responses in Surgically Resected Lung Cancer. *PLoS ONE* 11(4), e0152665
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer K, Shapiro DN, Look AT, Saltman DL (1994): Fusion of a Kinase Gene, ALK, to a Nucleolar Protein Gene, NPM, in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Science* 263, 1281–1284
- Okamoto W, Okamoto I, Tanaka K, Hatashita E, Yamada Y, Kuwata K, Yamaguchi H, Arai T, Nishio K, Fukuoka M (2010): TAK-701, a Humanized Monoclonal Antibody to Hepatocyte Growth Factor, Reverses Gefitinib Resistance Induced by Tumor-Derived HGF in Non-Small Cell Lung Cancer with an EGFR Mutation. *Mol Cancer Ther* 9(10), 2785–2792
- Palmer RF, Verneris E, Grabbe C, Hallberg B (2009): Anaplastic Lymphoma Kinase: Signalling in Development and Disease. *Biochem J* 420, 345–361
- Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L (2015): Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. *Oncologist* 20(3), 316-322
- Rho JK, Lee H, Park CS, Choi CM, Lee JC (2013): Sensitive Detection of EML4-ALK Fusion Oncoprotein of Lung Cancer by in Situ Proximity Ligation Assay. *Clin Chem Lab Med* 51(9), 1843–1848
- Richards MW, Law EW, Rennalls LP, Busacca S, O'Regan L, Fry AM, Fennell DA,

- Bayliss R (2014): Crystal Structure of EML1 Reveals the Basis for Hsp90 Dependence of Oncogenic EML4-ALK by Disruption of an Atypical B-Propeller Domain. *Proc Natl Acad Sci* 111(14), 5195–5200
- Riede UN, Schaefer HE: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage; Thieme Stuttgart 2001
- Riely GJ, Chaft JE, Ladanyi M, Kris MG (2011): Incorporation of Crizotinib into the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Cancer* 9(12), 1328–1330
- Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, Nardone J, Lee K, Reeves C, Li Y (2007): Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer. *Cell* 131(6), 1190–1203
- Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, Stubbs H, Law K, Lindeman N, Mark E (2009): Unique Clinicopathologic Features Characterize ALK-Rearranged Lung Adenocarcinoma in the Western Population. *Clin Cancer Res* 15(16), 5216–5223
- Rosell R, Gettinger SN, Bazhenova LA (2016): Brigatinib efficacy and safety in patients with Anaplastic Lymphoma Kinase –positive non-small cell lung cancer in phase I/II trial. European Lung Cancer Conference. Genf 2016: abstract 1330
- Roskoski R (2013): Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK): Structure, Oncogenic Activation, and Pharmacological Inhibition. *Pharmacol Res* 68(1), 68–94
- Sakai Y, Nakai T, Ohbayashi C, Imagawa N, Yanagita E, Satake R, Nitta A, Kajimoto K, Sakuma T (2013): Immunohistochemical Profiling of ALK Fusion Gene-Positive Adenocarcinomas of the Lung. *Int J Surg Pathol* 21(5), 476–482
- Sasaki T, Okuda K, Zheng W, Butrynski J, Capelletti M, Wang L, Gray NS, Wilner K, Christensen JG, Demetri G (2010): The Neuroblastoma-Associated F1174L ALK Mutation Causes Resistance to an ALK Kinase Inhibitor in ALK-Translocated Cancers. *Cancer Res* 70(24), 10038–10043
- Schlessinger J, Lemmon MA (2010): SH2 and PTB Domains in Tyrosine Kinases. *Cell* 141, 1117–1134
- Seto T, Kiura K, Nishio M, Nakagawa K, Maemondo M, Inoue A, Hida T, Yamamoto N, Yoshioka H, Harada M (2013): CH5424802 (RO5424802) for patients with ALK-rearranged advanced non-small-cell lung cancer (AF-001JP study): a single-arm, open-label, phase 1-2 study. *Lancet Oncol* 14(7), 590-8
- Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, Solomon B, Stubbs H, Admane S, McDermott U (2009): Clinical Features and Outcome of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 27(26), 4247–4253
- Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, Shapiro GI, Costa DB, Ou SH (2011): Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retro-

- spective analysis. *Lancet Oncol* 12(11),1004-12
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F (2013): Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 368(25), 2385-94
- Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DS, Felip E, Chow LQ, Camidge DR, Vansteenkiste J, Sharma S (2014): Ceritinib in ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 370(13), 1189–1197
- Shen Y, Lai T, Campbell RE (2015): Red fluorescent proteins (RFPs) and RFP-based biosensors for neuronal imaging applications. *Neurophotonics* 2(3), 031203
- Shi SR, Shi Y, Taylor CR (2011): Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades. *J Histochem Cytochem* 59(1), 13–32
- Siegel R, Ma J, Zou, Z, Jemal A (2014): *CA Cancer J Clin* 64(1), 9–29
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H (2007): Identification of the Transforming EML4-ALK Fusion Gene in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Nature* 448, 561-566
- Steuer CE, Ramalingam SS (2014): ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Mechanisms of Resistance and Emerging Treatment Options. *Cancer* 120, 2392–2402
- Sun Y, Wallrabe H, Seo SA, Periasamy A (2011): FRET Microscopy in 2010: The Legacy of Theodor Förster on the 100th Anniversary of His Birth. *Chemphyschem* 12(3), 462–474
- Szalóki N, Doan-Xuan QM, Szöllősi J, Tóth K, Vámosi G, Bacsó Z (2013): High Throughput FRET Analysis of Protein-Protein Interactions by Slide-Based Imaging Laser Scanning Cytometry. *Cytometry* 83(9), 818–829
- Tabbó F, Barreca A, Piva R, Inghirami G (2012): ALK Signaling and Target Therapy in Anaplastic Large Cell Lymphoma. *Front Oncol* 2, 41
- Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, Takada S, Ueno T, Yamashita Y, Satoh Y (2009): KIF5B-ALK, a Novel Fusion Oncokinase Identified by an Immunohistochemistry-Based Diagnostic System for ALK-Positive Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 15(9), 3143–3149
- Tanahashi M, Niwa H, Yukiue H, Suzuki E, Haneda H, Yoshii N (2010): Adjuvant Chemotherapy Based on the In Vitro Histoculture Drug Response Assay for Non-small Cell Lung Cancer Improves Survival. *J Thor Oncol*. 5, 1378-81
- Taylor SS, Keshwani MM, Steichen JM, Kornev AP (2012): Evolution of the Eukaryotic Protein Kinases as Dynamic Molecular Switches. *Phil Trans* 367, 2517–2528

- Varsegi GM, Shidham V (2009): Cell Block Preparation from Cytology Specimen with Predominance of Individually Scattered Cells. <http://www.jove.com/video/1316/cell-block-preparation-from-cytology-specimen-with-predominance>, Zugriff am 10.11.2015
- Wallander ML, Geiersbach KB, Tripp SR, Layfield LJ (2012): Comparison of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, Immunohistochemistry, and Fluorescence in Situ Hybridization Methodologies for Detection of Echinoderm Microtubule-Associated Proteinlike 4-Anaplastic Lymphoma Kinase Fusion-Positive Non-Small Cell Lung Carcinoma: Implications for Optimal Clinical Testing. *Arch Pathol Lab Med* 136(7), 796–803
- Wallrabe H, Periasamy A (2005): Imaging Protein Molecules Using FRET and FLIM Microscopy. *Curr Opin Biol* 16(1), 19–27
- Waterhouse BR, Gijzen M, Barber PR, Tullis ID, Vojnovic B, Kong A (2011): Assessment of EGFR/HER2 Dimerization by FRET-FLIM Utilizing Alexa-Conjugated Secondary Antibodies in Relation to Targeted Therapies in Cancers. *Oncotarget* 2(9), 728–736
- Weitsman G, Barber PR, Nguyen LK, Lawler K, Patel G, Woodman N, Kelleher MT, Pinder SE, Rowley M, Ellis PA (2016): HER2-HER3 dimer quantification by FLIM-FRET predicts breast cancer metastatic relapse independently of HER2 IHC status. *Oncotarget* 5, 1012-1026
- Wessels JT, Yamauchi K, Hoffman RM, Wouters FS (2010): Advances in Cellular, Subcellular, and Nanoscale Imaging in Vitro and in Vivo. *Cytometry* 77(7), 667–676
- Yano T, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Maehara Y (2011): Non-Small Cell Lung Cancer in Never Smokers as a Representative “Non-Smoking-Associated Lung Cancer”: Epidemiology and Clinical Features. *Int J Clin Oncol* 16(4), 287–293

Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich an meinen Doktorvater, Prof. Dr. med. Philipp Ströbel richten, der mir die Möglichkeit der experimentellen Forschung in seiner Abteilung gab.

Für den Anstoß zu dieser Disseration, die Motivation, die Weitergabe seiner Kenntnisse und die fortwährende Unterstützung möchte ich mich im Besonderen bei meinem Betreuer, Dr. Hanibal Bohnenberger, bedanken, dessen starkes Engagement für die Entstehung dieser Studie mitverantwortlich ist.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Gertrude Bunt und Prof. Dr. Fred S. Wouters für die Einführung in die Konfokale Mikroskopie, FRET-Bildgebung und für die Bereitstellung und Durchführung der FLIM-Experimente bedanken.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls dem Laborleiter der Abteilung, Stefan Küffer, der stets vor Ort als Ansprechpartner mit Rat zur Seite stand. Ebenfalls möchte ich mich in diesem Sinne bei allen Mitarbeitern des Labors und der Abteilung für die Organisation und ihren Rat bedanken sowie bei dem Labor für FISH, Prof. Dr. Schildhaus und allen weiteren Mitarbeitern für ihre Unterstützung.

An die Klinik für Thorax- und Herzchirurgie, speziell an PD Dr. Bernd Danner und Dr. Alexander Emmert, richte ich meinen Dank für die Bereitstellung der Gewebeproben.

Abschließend möchte ich mich bei der Gesellschaft für Pathologie e.V. bedanken, die mir den Zutritt zur 99. Jahrestagung der Gesellschaft für Pathologie 2015 in Frankfurt am Main ermöglichte und meinen Vortrag für den Doktorandenpreis nominierte.