

Untersuchung der differenziellen Aktivierung  
von zellulären Signalübertragungswegen  
in Maus-Lebertumoren mit Mutationen im  
*Ha-ras*-, *B-raf*- oder *Ctnnb1*-Onkogen  
mit Protein-Mikroarray-basierten Methoden

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von

Thomas Knorpp



Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2008

Dekan: Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Stevanović

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schwarz

# Danke!

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Stevanović für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit. Herrn Prof. Dr. Michael Schwarz danke ich herzlichst für die sehr fruchtbaren Diskussionen und Hilfestellungen.

Herzlicher Dank gilt Dr. Markus F. Templin für die vielfältige Unterstützung und hervorragende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Dr. Thomas O. Joos, Dr. Dieter Stoll und Dr. Michael Pawlak danke ich für stete Anregungen und gute Diskussionen.

Desweiteren danke ich Markus für viele Gespräche und gute Denkanstöße über diese Arbeit hinaus, Thomas für seine immer interessierte und fordernde Art und Dieter neben seinem steten Interesse für ungezählte gute Unterhaltungen.

Der großen Schar aktueller und ehemaliger Laborkollegen danke ich für den unkomplizierten Umgang, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die immerwährende Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Besonders danke ich meinen Bürokollegen Berthold Gierke, Dr. Oliver Pötz und Michael Hartmann für die gute Zeit, die ich in 407b hatte.

Berthold und meinem ehemaligen Laborkollegen Dr. Stefan Kramer danke ich für die Einführung in die Technologie des Planaren Reversen Protein-Mikroarray. Berthold danke ich zudem für unsere gemeinsame Zeit im Labor und Reinraum.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schwarz in der Toxikologie der Uni Tübingen danke ich für die gute Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank geht an Frau Elke Zabinsky, Frau Johanna Mahr und Frau Silvia Vetter für ihre stete und spontane Hilfsbereitschaft. Den Doktorandenkollegen Albert Braeuning, Philip Marx-Stölting und Benjamin Rignall danke ich für die zahlreichen guten Diskussionen und den regen Austausch.

Vielen Dank meinen Freunden für die Bereicherung meines Lebens außerhalb des Labors, sowie für das ständige Interesse und (Un-)Verständnis für meine Arbeit, und die Unterstützung in vielerlei Hinsicht. Meinen Eltern gebührt herzlicher Dank für ihre Ratschläge und Entscheidungen, ohne die dieser Werdegang nicht möglich gewesen wäre!

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Frau Stefanie, die einen nicht unwesentlichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat, für ihr Verständnis, ihre Geduld und große Nachsicht. Vorallem aber danke ich ihr für all die Dinge, die das Leben lebenswert machen. Ich weiß, es war nicht immer leicht für uns!



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>17</b>
1.1	Veränderung regulatorischer Prozesse bei der Krebsentstehung	17
1.2	Der Erk/MAPK-Signalweg	20
1.3	Der Wnt-Signalweg	22
1.4	Nagerleber als Tumormodell	24
1.5	Methoden zur Expressionsanalyse	25
1.6	Planare Reverse Protein-Mikroarray-Technologie	28
1.7	Aufgabenstellung	31
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>33</b>
2.1	Material, Geräte und Software	33
2.2	Reagenzien und Chemikalien	35
2.3	Antikörper	38
2.4	Gewebeproben	43
2.4.1	Tiermodell für Ha- <i>ras</i> - und B- <i>raf</i> -mutierte Maus-Lebertumore	43
2.4.2	Tiermodell für <i>Ctnnb1</i> -mutierte Maus-Lebertumore	44
2.4.3	Liste der Lebergewebeproben	45
2.5	Zelllinienproben	47
2.6	Mikroarray-Methoden	48
2.6.1	Planare Reverse Protein-Mikroarrays	48
2.6.1.1	Herstellung von Protein-Mikroarrays	48
2.6.1.2	Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge	49
2.6.1.3	Immunoassay auf Protein-Mikroarray	49
2.6.1.4	Detektion, Bildauswertung und Datenanalyse	50
2.6.1.5	Fehlerfortpflanzung	52
2.6.2	Mikrosphären-basierte Protein-Mikroarrays	52
2.6.2.1	Kopplung von Proteinen und Peptiden auf Mikrosphären	53

2.6.2.2	Durchführung von Immunoassays zur Bestimmung von Antikörperspezifitäten	54
<b>2.7</b>	<b>Methoden zur Auswertung von Daten aus Mikroarray-Experimenten</b>	<b>55</b>
2.7.1	Grafische Darstellung	55
2.7.2	Multivariate Datenanalysen	55
2.7.2.1	Clusteranalysen	55
2.7.2.2	Statistische Verfahren	56
<b>2.8</b>	<b>Methoden zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers</b>	<b>57</b>
2.8.1	Auswahl von Peptiden zur Immunisierung	57
2.8.2	Kopplung von Peptiden an Trägerproteine	59
2.8.3	Aufreinigung der Antikörper aus Serum	60
2.8.3.1	Herstellung der Affinitätsmatrix	60
2.8.3.2	Affinitätschromatografie	60
2.8.3.3	Gelfiltrationschromatografie	60
<b>2.9</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>61</b>
2.9.1	Denaturierende Lyse von Gewebe- und Zelllinienproben	61
2.9.2	Proteinbestimmung nach Bradford	61
2.9.3	Gelelektrophorese	61
2.9.4	Western Blot	62
2.9.4.1	Proteintransfer auf Membranen	62
2.9.4.2	Protein Nachweis	62
2.9.4.3	Peptid Konkurrenz zum Spezifitätsnachweis	63
2.9.4.4	Western Blot für die Charakterisierung von Antikörpern	63
2.9.5	Fluoreszenz-Markierung von Proteinen	64
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Nachweis des G-Protein-gekoppelten Rezeptors</b>	<b>49</b>
3.1.1	Generierung eines polyklonalen Kaninchenantikörpers	67
3.1.1.1	Immunisierungsstrategie: Auswahl von Peptidepitopen	67
3.1.1.2	Immunisierung mit an Trägerprotein gekoppelten Peptiden	68
3.1.1.3	Aufreinigung der Antikörper über Affinitätschromatografie	68
3.1.2	Nachweis der Reaktivität und Spezifität der Antikörper	69
<b>3.2</b>	<b>Planare Reverse Protein-Mikroarrays</b>	<b>72</b>
3.2.1	Charakterisierung von Antikörpern für die Verwendung in Planaren Reversen Protein-Mikroarrays	75
3.2.1.1	Western Blot zur Charakterisierung von Antikörpern	75



---

3.2.1.2	Beurteilung der Spezifität und Qualität der Antikörper	75
3.2.2	Nachweis der im Mikrosport immobilisierten Proteinmenge	78
3.2.3	Proteinexpressionsanalyse	79
3.2.3.1	Vergleich von <i>Ctnnb1</i> , <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren	80
3.2.3.1.1	Statistische Analyse der Expressionswerte: <i>Ctnnb1</i> Mutationen	84
3.2.3.1.2	Statistische Analyse der Expressionswerte: <i>Ha-ras</i> und <i>B-raf</i> Mutationen	87
3.2.3.1.3	Statistische Analyse der Expressionswerte: <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierte Tumorgewebe	89
3.2.3.2	Vergleich von <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren	91
3.2.3.2.1	Einfluss des P53 <sup>ki</sup> Hintergrundes auf die Proteinexpression	98
3.2.3.2.2	Statistische Analyse der Proteinexpression der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumor- und Normalgewebe	100
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>110</b>
4.1	Methodik der Proteinexpressionsanalyse	111
4.2	Ergebnisse der Proteinexpressionsanalysen	113
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>126</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>137</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>AKADEMISCHE LEHRER</b>	<b>172</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>173</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Mehrstufenmodell der Kanzerogenese.	19
Abbildung 1.2 Vereinfachte Darstellung des Erk/MAPK-Signalweges.	21
Abbildung 1.3 Vereinfachte Darstellung des Wnt-Signalweges.	23
Abbildung 1.4 Schematischer Aufbau von Forward Phase und Reverse Phase Protein-Mikroarrays.	27
Abbildung 1.5 Proben- und Sub-Array-Anordnung auf einem Mikroarray-Substrat.	30
Abbildung 1.6 Schematischer Aufbau eines Dünnschichtwellenleiters.	31
Abbildung 3.1 Schemazeichnung von Interaktionen in dieser Arbeit analysierter Proteine.	66
Abbildung 3.2 Mikrosphären-basierter Protein-Mikroarray zum Reaktivitätsnachweis eines polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Gpr49-Antikörpers.	70
Abbildung 3.3 Western Blot mit Peptidkompetition zum Reaktivitätsnachweis eines polyklonalen Kaninchen-anti-Gpr49-Antikörpers.	71
Abbildung 3.4 Flussdiagramm zur Veranschaulichung des experimentellen Vorgehens.	73
Abbildung 3.5 Darstellung der Probenanordnung auf dem Planaren Reversen Protein-Mikroarray.	74
Abbildung 3.6 Western Blot zur Charakterisierung von Antikörpern.	77
Abbildung 3.7 Nachweis der im Mikrosplot auf dem Mikroarray-Substrat immobilisierten Proteinmenge.	78
Abbildung 3.8 Grafische Darstellung der Proteinexpressionswerte von <i>Ctnnb1</i> -, <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren nach hierarchischer Clusteranalyse.	82
Abbildung 3.9 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ctnnb1</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.	84
Abbildung 3.10 Darstellung einiger der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ctnnb1</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe in Balkendiagrammen.	86
Abbildung 3.11 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.	88
Abbildung 3.12 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.	90
Abbildung 3.13 Darstellung einiger der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe in Balkendiagrammen.	91

---

Abbildung 3.14 Grafische Darstellung der Proteinexpressionswerte von <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren nach hierarchischer Clusteranalyse.	95
Abbildung 3.15 Darstellung eines differenziell exprimierten Proteins der Gruppe der $P53^{wt/wt}$ und $P53^{ki/wt}$ <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe im Balkendiagramm.	99
Abbildung 3.16 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.	102
Abbildung 3.17 Western Blot des STAT 3 [1] Antikörpers auf Proben der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.	103
Abbildung 3.18 Western Blot einiger differenziell exprimierter Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.	104
Abbildung 3.19 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.	106
Abbildung 3.20 Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe in Balkendiagrammen.	106
Abbildung 3.21 Western Blot einiger differenziell exprimierter Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe.	109
Abbildung 4.1 Schemazeichnung einiger Interaktionen analysierter Proteine.	115

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Primärantikörper	38
Tabelle 2.2 Sekundärantikörper	42
Tabelle 2.3 Maus-Lebergewebeproben des Tiermodells für <i>Ctnnb1</i> -mutierte Tumore.	45
Tabelle 2.4 Maus-Lebergewebeproben des Tiermodells für <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierte Tumore.	45
Tabelle 3.1 Sequenzen der Peptide zur Generierung eines anti-Maus-Gpr49-Antikörpers.	68
Tabelle 3.2 Maus-Lebergewebeproben zur Proteinexpressionsanalyse der <i>Ctnnb1</i> -, <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren.	81
Tabelle 3.3 Antikörper zur Proteinexpressionsanalyse der <i>Ctnnb1</i> -, <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren.	81
Tabelle 3.4 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der <i>Ctnnb1</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.	85
Tabelle 3.5 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.	87
Tabelle 3.6 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe.	89
Tabelle 3.7 Maus-Lebergewebeproben zur Proteinexpressionsanalyse der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren.	93
Tabelle 3.8 Antikörper zur Proteinexpressionsanalyse der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Tumoren.	94
Tabelle 3.9 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der $P53^{wt/wt}$ und $P53^{ki/wt}$ <i>Ha-ras</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe.	99
Tabelle 3.10 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der $P53^{wt/wt}$ und $P53^{ki/wt}$ <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe.	99
Tabelle 3.11 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.	101
Tabelle 3.12 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der <i>Ha-ras</i> - und <i>B-raf</i> -mutierten Maus-Lebertumorgewebe.	105
Tabelle 8.1 Daten der in Kapitel 3.2.3.1 dargestellten Proteinexpressionsanalyse.	138
Tabelle 8.2 Daten der in Kapitel 3.2.3.2 dargestellten Proteinexpressionsanalyse.	147

## Abkürzungen und Nomenklatur

ANOVA	Varianzanalyse ( <i>Analysis of Variance</i> )
AU	Willkürliche Einheiten ( <i>arbitrary units</i> )
Bis-Tris	[Bis(2-Hydroxyethyl)imino]-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
DEN	Diethylnitrosamin
DHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ECL	<i>enhanced chemiluminescent</i>
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	Antigenbindendes Antikörperfragment ( <i>fragment antigen binding</i> )
Fc	Kristallisierbares Fragment ( <i>fragment cristallisation</i> )
FKS	Fötales Kälberserum
Fm.	Format
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Fz	Frizzled
GAP	<i>GTPase-activating proteins</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
gt	Ziege
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Deionisiertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanosulfonsäure)
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
Hrst.	Hersteller
IgA	Immunglobulin A
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>

IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
ki	<i>knock in</i>
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
Klon.	Klonalität
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
LEF	<i>lymphoid enhancer-binding factor</i>
LRP	<i>low density lipoprotein-related protein</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimid Ester
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
MFI	Median der Fluoreszenzintensitäten
min	Minute(n)
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ms	Maus
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
mt	mutiert
MW	Mittelwert
n.b.	nicht bestimmt
NC	Nitrocellulose
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PCB	Polychloriertes Biphenyl
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PRPM	Planarer Reverser Protein-Mikroarray
PVDF	Polyvinylidenfluorid
P/S	Penicillin / Streptomycin
rb	Kaninchen
RFI	relative Fluoreszenzsignale
RFLP	Restriktions Fragmentlängen Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	<i>rounds per minute</i>
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natrium-Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMPB	Succinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrat
Spz.	Spezies
sulfo-MBS	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimid Ester
sulfo-NHS	N-hydroxysulfosuccinimid

sulfo-SMPB	Sulfosuccinimidyl 4-[p-maleimidophenyl]butyrat
TBS	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>Tris buffered saline</i> )
TBST	Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit 0.1 % (v/v) Tween20
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TCF	<i>T cell-specific transcription factor</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UV	Ultraviolett
Vd.	Verdünnung
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
z.B.	zum Beispiel

Zur Vereinfachung des Sprachgebrauchs wurde im Text dieser Arbeit die Formulierung Proteinexpression synonym zu gemessener Proteinmenge verwendet. Dies geschah im Wissen, dass Expression üblicherweise im Kontext der mRNA Transkription verwendet wird.

Namen von Proteinen (Antigenen) richten sich nach den von der Signal Transduction Knowledge Environment der American Association for the Advancement of Science verwendeten Bezeichnungen und Synonyme (URL: <http://stke.sciencemag.org/cm> (Stand: 08.02.2008)).

Namen von Genen richten sich nach den vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) in der Entrez Gene Datenbank verwendeten Bezeichnungen (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene> (Stand: 01.05.2008)).

Als Dezimaltrennzeichen wurde in dieser Arbeit der Punkt verwendet.

Soweit sinnvoll und vorhanden sind in dieser Arbeit deutsche Fachbegriffe verwendet worden. Sofern keine geeigneten deutschen Fachbegriffe genutzt werden konnten oder deutsche Begriffe keine eindeutige Bezeichnung darstellten, wurden englische Fachbegriffe verwendet. Diese sind, ebenso wie alle anderen Begriffe aus Fremdsprachen, kursiv geschrieben.





# 1 Einleitung

## 1.1 Veränderung regulatorischer Prozesse bei der Krebsentstehung

In jedem mehrzelligen Organismus wird nach abgeschlossener Ontogenese die Zellzahl konstant gehalten. Aus diesem Grund unterliegen alle Prozesse, die zur Veränderung der Zellzahl führen würden, seien es proliferative oder apoptotische, einer engen Kontrolle und sind über eine Vielzahl von Stimuli reguliert. Die hohe Zahl der regulativen Einflüsse und Prozesse, die sich in einem permanenten Fließgleichgewicht befinden, bedeutet, dass Zellen während der Krebsentstehung von einer größeren Zahl dieser Einflüsse unabhängig werden müssen. Dieser Übergang von kontrolliertem zu unkontrolliertem Wachstum wird im Mehrstufenmodell der Kanzerogenese aufgegriffen. Diese beginnt mit der Initiation, von der angenommen werden kann, dass sie durch Veränderung der Erbinformation erfolgt. Die Initiation führt, sofern die Zellen nicht mittels Apoptose oder von Makrophagen eliminiert werden, zur Entstehung von Tumor-Vorläuferzellen. Aus diesen heraus entstehen mittels weiterer Mutationen und den dabei erlangten Selektionsvorteilen dann benigne Tumorzellen. Diese haben unter steter Vermeidung ihrer Elimination die Möglichkeit erlangt, sich über eine zunehmende Zahl von Regulationsmechanismen hinwegzusetzen. Insgesamt sechs dieser Veränderungen werden als notwendig für malignes Wachstum angesehen (Hanahan und Weinberg, 2000). Dies sind:

- Erlangung der Unabhängigkeit von Proliferationssignalen
- Vermeidung der Apoptose
- Unempfindlichkeit gegenüber Antiproliferationssignalen
- Unbegrenztes Zellteilungsvermögen
- Metastatisierungsfähigkeit
- Anregung der Angiogenese

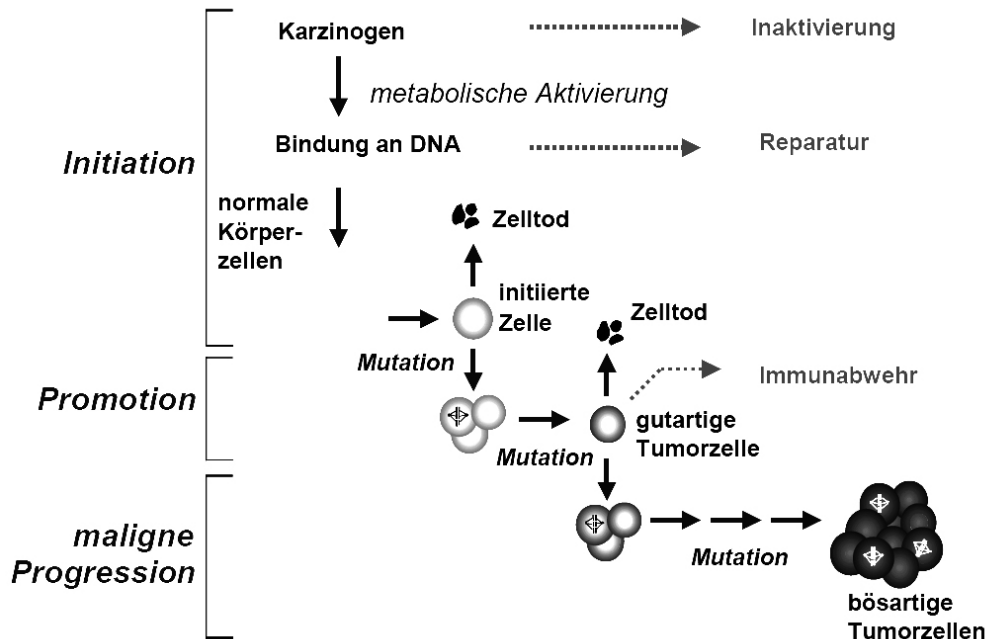
Diese sechs Regulationsmechanismen stellen jeder für sich eine für Tumor-Vorläuferzellen hinreichend hohe Hürde dar, so dass ohne deren Überwindung keine Tumorentstehung möglich ist. Aus diesem Grund treten in Tumoren immer zahlreiche Modifikationen gleichzeitig auf. So werden zur Erlangung der Unabhängigkeit von Proliferationssignalen Wachstumsfaktoren von den Tumorzellen selbst gebildet, Wachstumsfaktorrezeptoren überexprimiert oder mit diesen interagierende Proteine, wie die Ras Proteine, in einer permanent aktivierenden Weise mutiert (Bigbee *et al.*, 2007; Mimeault und Batra, 2007).

Die Fähigkeit zur Proliferation wird aber nicht nur über stimulierende sondern auch über hemmende Einflüsse reguliert, so dass auch die für die Gewebemöostase zwingend notwendigen Antiproliferations-signale in Tumoren dereguliert sein müssen. Diesen Einflüssen können sich Tumorzellen durch Expressionsveränderung von Signalproteinen der Wachstumsfaktorsignalwege oder Zellzyklus-regulierender Proteine entziehen. Auf molekularer Ebene werden diese Effekte meistens durch das Retinoblastomprotein und seine Interaktionspartner reguliert (Lara und Paramio, 2007; Sherr und Roberts, 2004).

Haben die Zellen das Gleichgewicht dieser Einflüsse zugunsten der Proliferation verschoben, so steht der unbegrenzten Zellteilung auf regulatorischer Ebene nichts mehr im Weg. Jedoch tritt bei häufiger Zellteilung einer der wesentlichsten Mechanismen, die zur Seneszenz von Zellen führen, die Verkürzung der Telomere, auf. Um dies zu kompensieren kann die Aktivität des Enzyms Telomerase erhöht werden, das die Strangenden der DNA an den Chromosomen für eine höhere Zahl von Replikationen instand hält (Sedivy, 1998; Shay und Wright, 2005). Um proapoptotische Einflüsse, die der Tumorentstehung entgegenstehen zu vermeiden, treten häufig Mutationen des Tumorsuppressorgens *P53* auf (Cagatay und Ozturk, 2002; Soussi, 2007). Als Ergebnis dieser Umgehung apoptotischer Stimuli und der in der Summe proliferativ wirkenden Effekte tritt klonale Vermehrung der Tumorzellen auf. Neben der reinen Verdrängung von umgebenden Zellen durch stete Zellteilung und Wachstum sind Tumorzellen aber auch häufig zur Metastasierung, also der Bildung sekundärer Tumore an anderen Stellen im Organismus, in der Lage. Dieser Prozess erfordert die Veränderung der Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen. Erfolgen kann dies durch die verringerte Expression von Zelladhäsionsmolekülen sowie der vermehrten Expression von zum Beispiel Matrix-Metalloproteinasen, die enzymatisch auf bestehende Zell-Umgebungskontakte einwirken.

Neben all diesen Mechanismen, die den Zellen die Fähigkeiten vermitteln sich zu Tumorzellen zu entwickeln und zu einem vielzelligen Tumor zu vermehren, wächst mit zunehmender Zellzahl auch der metabolische Umsatz dieses Zellhaufens. Somit ist der Tumor für die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung auf die Stimulation der Angiogenese angewiesen. Diese kann über vermehrte Gefäßbildungsinduktion, beispielsweise durch verstärkte Expression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*), und verminderte Expression von Gefäßbildungsinhibitoren, wie Thrombospondin-1, bewirkt werden (Hanahan und Weinberg, 2000). Schlußendlich hat der Organismus die Möglichkeit auf diese Zelle, oder den daraus entstandenen Zellhaufen regulativ einzuwirken, verloren. Eine Apoptoseinduktion ist nicht mehr möglich. Damit ist eine autonome Zellpopulation entstanden, die sich zum soliden malignen Tumor und eventuell zu sekundären Tumoren entwickeln kann.

Sämtliche zuvor beschriebenen Veränderungen in den Tumorzellen, die im Laufe vieler Wochen, Monate oder Jahre in Tumor-Vorläuferzellen vonstatten gehen, basieren auf einer Vielzahl von Modifikationen der intrazellulären Regulations- und Signaltransduktionsmechanismen. Deren Grundlage liegt zwar in den mutationsbedingten Veränderungen der DNA, am Ende sind es aber doch die aufgrund dieser genetischen Informationen erzeugten Proteine, die Einfluss auf die intrazellulären Prozesse nehmen.



**Abbildung 1.1 Mehrstufenmodell der Kanzerogenese.**

Die durch DNA-Schädigung erfolgende Initiation, hier dargestellt nach metabolischer Aktivierung eines Präkarzinogens, löst die Veränderung normaler Körperzellen zu Tumor-Vorläuferzellen aus. Werden diese nicht mittels Apoptose oder von Makrophagen eliminiert, entstehen aus den Zellen mittels weiterer Mutationen zuerst benigne und schließlich maligne Tumorzellen. Diese wachsen durch klonale Vermehrung zum Tumor aus. (Abbildung freundlicherweise von Prof. Dr. M. Schwarz zur Verfügung gestellt.)

Diese Veränderungen unterliegen im zeitlichen Verlauf der Tumorentstehung, ausgehend vom präneoplastischen Gewebe hin zum soliden Tumor, einem steten Wandel, der entsprechend der Anhäufung von Mutationen und der daraufhin veränderten Expression und Regulation von Proteinen erfolgt. Die veränderten Expressionsmuster von mRNA und Proteinen dienen in der Diagnostik, sei es in Biopsien oder in Körperflüssigkeiten, als molekulare Marker. Sie erlauben Aussagen über den Status und Verlauf der Krebserkrankung und bieten zudem eine Möglichkeit der Therapiekontrolle (Sidransky, 2002). Die heute hierbei eingesetzten Tumormarker können neben Expressionsmustern der Proteine, deren modifizierte Formen und mRNA, jedoch auch die DNA selbst oder veränderte

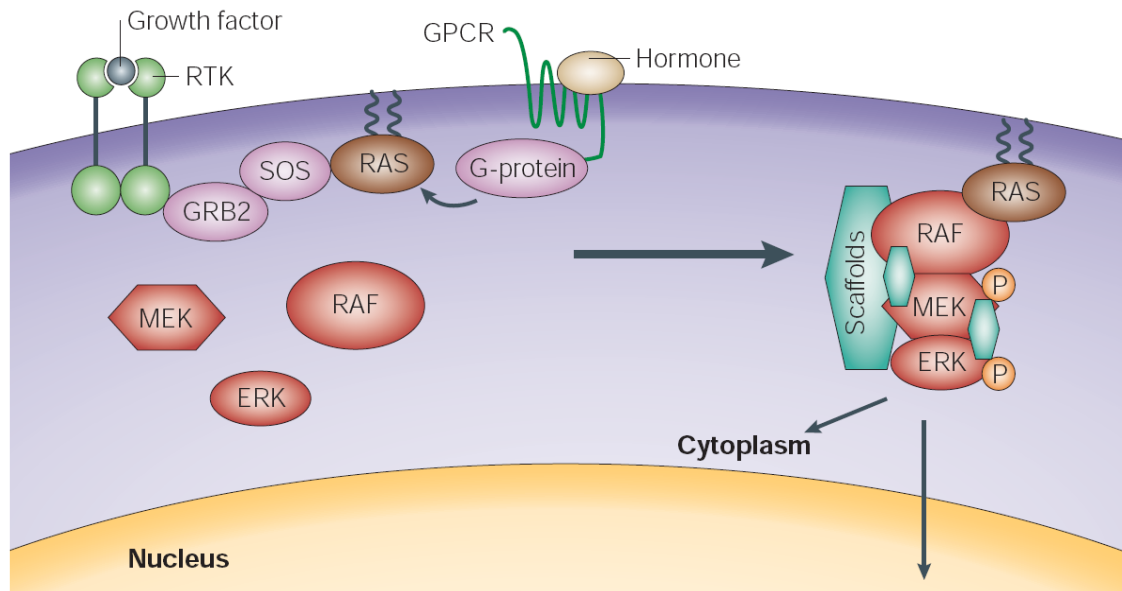
Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Angiogenese sein, die in der Lage sind, die krankhaften Veränderungen in qualitativer oder quantitativer Weise zu beschreiben. Die Verwendung dieser Marker bedeutet jedoch nicht, dass die regulatorischen Auswirkungen der zugrundeliegenden genetischen Modifikationen und damit die Veränderungen in den extrem komplexen Netzwerken der Signaltransduktionswege der Zellen bekannt und verstanden sind.

### 1.2 Der Erk/MAPK-Signalweg

Der Erk/MAPK-Signaltransduktionsweg ist in viele zelluläre Prozesse, von Zellwachstum und Zell-Zyklusregulation über Apoptose hin zur Differenzierung, involviert. Dabei übermittelt der Signalweg extrazelluläre Stimuli mittels Rezeptor-Tyrosin-Kinasen an eine phosphorylierungsabhängige Signalkaskade mit über 160 intrazellulären Substraten (Yoon und Seger, 2006). Zu den Liganden der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, wie HGF (*hepatocyte growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) und NGF (*nerve growth factor*) deren Interaktion zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras führt. Die Aktivierung der mittels Farnesylresten in der intrazellulären Zellmembran verankerten Ras Proteine erfolgt durch Bindung von GTP, wobei dieser Prozess in den Zellen durch GTP-Austauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) katalysiert wird. Über die enzymatische Hydrolyse des GTP zu GDP wird das Signal unter der Katalyse der GTPase-aktivierenden Proteine (*GTPase-activating proteins*, GAP) beendet (Campbell *et al.*, 1998). In Folge der Ras abhängigen Rekrutierung von Raf an die Zellmembran wird über die Kinaseaktivität von Raf die Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, die über die Aktivierung weiterer Kinasen (MEK und Erk) schlußendlich eine Vielzahl von Substraten phosphoryliert (Dhillon *et al.*, 2007).

Die Rolle des Erk/MAPK-Signalweges bei der Regulation des Zellwachstums ermöglicht es Tumoren, durch aktivierende Mutationen in Proteinen dieses Signalweges Proliferationsvorteile zu erlangen. Daher gehört er zu den in humanen Tumoren häufig verändert gefundenen Signalwegen und bietet sich als Angriffspunkt therapeutischer Ansätze an (Downward, 2003). Neben diesem werden ebenso die Regulationswege der IGF (*Insulin-like growth factor*), Wnt, TGF  $\alpha$  und  $\beta$  (*transforming growth factor*) Wachstumsfaktoren als im Sinne der Progression von Tumoren verändert gefunden. Wachstumsfaktoren üben ihre multiplen Einflüsse über membrangebundene Rezeptoren auf zytoplasmatische Komponenten aus und führen zur Aktivierung von Signalkaskaden. Genetische Veränderungen, die hier eine Rolle spielen, wirken sich auf die Wachstumsfaktoren selbst, deren Rezeptoren oder die Mitglieder der Signaltransduktionswege aus. Diese werden mit den für Tumoren essentiellen Veränderungen in Verbindung gebracht und tragen neben der

Erlangung des Proliferationsvorteils auch zu antiapoptotischen Mechanismen, der Angiogenesesteuerung und einem invasiven Wachstumsverhalten bei (Breuhahn *et al.*, 2006; Dhillon *et al.*, 2007).



**Abbildung 1.2 Vereinfachte Darstellung des Erk/MAPK-Signalweges.**

Die Ligandenbindung an Wachstumsfaktor- oder Hormon-Rezeptoren führt zur Aktivierung des membrangebundenen kleinen G-Proteins Ras. Dies erfolgt durch Austausch von GDP zu GTP und vermittelt durch die Rekrutierung von Raf an die Zellmembran die Aktivierung der Phosphorylierungskaskade. Dabei wird Erk als zentraler Effektor durch die Kinaseaktivität von MEK phosphoryliert und vermittelt eine Vielzahl von regulatorischen Einflüssen (Abbildung aus (Wellbrock *et al.*, 2004)).

Im hier eingesetzten Tumormodell, murinen Lebertumoren, sind mit den Protoonkogenen Ha-ras und B-raf zwei zentrale intrazelluläre Effektoren der Signaltransduktion häufig von aktivierenden Mutationen betroffen. In beiden Fällen macht dies die physiologische Rezeptorstimulation überflüssig und führt zu einer dauerhaften Aktivierung des Signalweges. In den Maus-Lebertumoren wird im Ha-ras-Gen vornehmlich eine Mutation in Codon 61 gefunden (Buchmann *et al.*, 1991; Jaworski *et al.*, 2005a; Kalkuhl *et al.*, 1998). Auch in humanen Tumoren (Dickdarm, Pankreas und Schilddrüse) wird Codon 61 mutiert gefunden, dort treten aber zudem Mutationen in den Codons 12 und 13 des Ki-ras-Gens auf (Bos, 1989). Die aufgrund der Mutationen in Codon 61 anstatt von Glutamin zumeist gefundenen Aminosäuren sind Lysin, Arginin oder Leucin. Dies führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität des Ras Proteins, das daraufhin nicht mehr zur Spaltung von GTP zu GDP in der Lage ist und in einem daueraktivierten Zustand vorliegt (Bos, 1989).

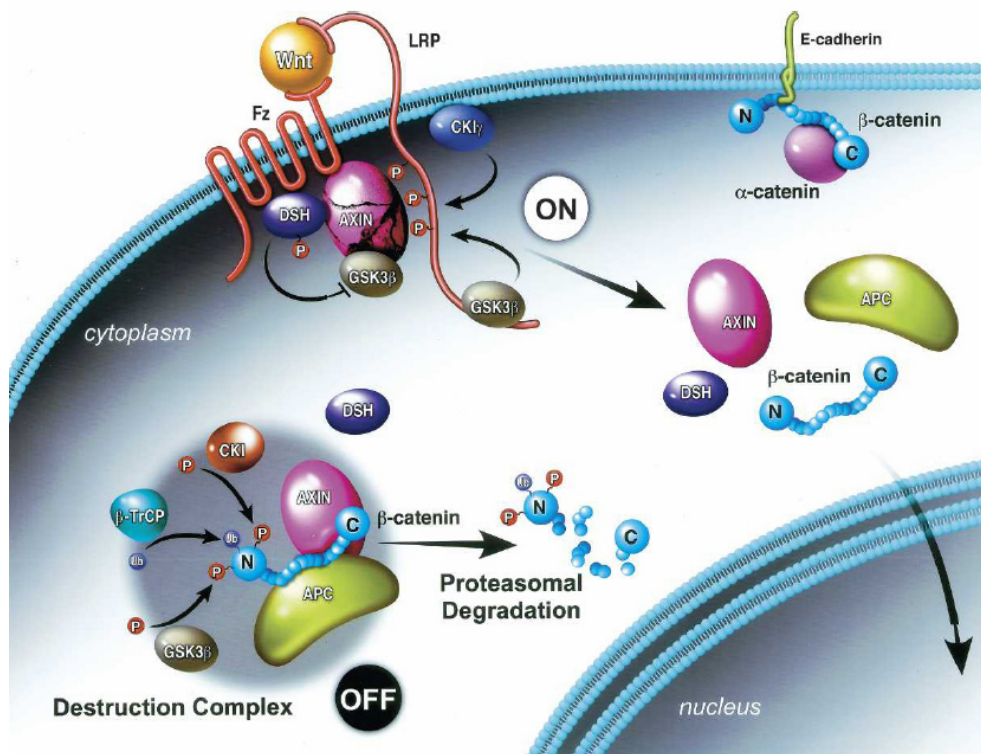
Mit der Mutation von *B-raf* in den Maus-Lebertumoren betrifft dies die direkt unterhalb von Ras gelegene Ebene der Signaltransduktionskaskade, und ebenso wie die *Ha-ras* Mutation ist auch die im Gen für *B-raf* gefundene Mutation im Codon 624 aktivierend. Hierbei wird im *B-raf* das im Aktivierungssegment der Kinase gelegene Valin gegen Glutamat ausgetauscht. Dies simuliert die durch aktivierende Phosphorylierung des Threonins an Position 623 erzeugte negative Ladung auf unphysiologische Weise und es resultiert eine phosphorylierungsunabhängige Aktivierung der Kinaseaktivität. Die an dieser Position gefundenen Veränderungen machen auch in Tumoren des Menschen (Sarkom, Melanom, Kolonkarzinom, Ovarialkarzinom) mit mehr als 75 % den überwiegenden Teil der *B-raf* Mutationen aus (Davies *et al.*, 2002). *B-raf* ist ein Mitglied der Raf Familie, die aus den drei Proteinen A-, B- und C-Raf besteht und für deren drei korrespondierende Gene sich Homologe in allen Wirbeltieren finden. *B-raf* ist das einzige Mitglied, das in Tumoren häufig in aktivierend mutierter Form gefunden wird (Wellbrock *et al.*, 2004).

### 1.3 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist ein evolutionär hoch konservierter Signaltransduktionsweg, der an der Zell-Zellinteraktion, Zellpolarität, Zellbewegung, Regulation der Proliferation, Organ- und Embryonalentwicklung wesentlichen Anteil hat (Gordon und Nusse, 2006; van Amerongen und Berns, 2006; Witze *et al.*, 2008). In aktuellen Studien wurde auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase im adulten Organismus sowie der Pluripotenz von Stammzellen gezeigt (Blank *et al.*, 2008; Reya und Clevers, 2005).

Beim Wnt-Signalweg werden der kanonische und der nicht-kanonische Ast unterschieden, die beide über die gleichen Rezeptoren und Liganden aktiviert werden, sich jedoch auf der Ebene des intrazellulären Mediators Dishevelled verzweigen und über unterschiedliche Effektoren wirken. Im kanonischen Teil des Wnt-Signalweges, welcher der weit besser verstandene ist, werden die regulatorischen Effekte durch das Protein  $\beta$ -Catenin bewirkt. Dieses transloziert bei erhöhter zytoplasmatischer Konzentration in den Kern und reguliert dort die Expression der Zielgene durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der *T cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor 1* (TCF/LEF) Familie. Die Kontrolle dieser Aktivität erfolgt bei fehlender Rezeptorstimulation über einen permanenten proteasomalen Abbau des durch kontinuierliche Proteinbiosynthese erzeugten Effektors  $\beta$ -Catenin. Der Degradationskomplex wird aus Proteinen gebildet, zu denen Axin-1 und -2, das adenomatöse Polyposis Coli Protein (APC), die Caseinkinase 1  $\alpha$  (CK 1  $\alpha$ ) und die Glykogensynthasekinase 3  $\beta$  (GSK3  $\beta$ ) gehören. Das in einer definierten Reihenfolge an vier bestimmten Serin/Threonin-Resten am N-terminalen Ende phosphorylierte  $\beta$ -Catenin wird durch die E3-Ubiquitinligase  $\beta$ -TrCP erkannt, daraufhin polyubiquityliert und proteasomal abgebaut (Aberle *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002). Nach Bindung

der Liganden Wnt an die 7-Transmembran-Rezeptoren Frizzled erfolgt in Kombination mit dem Korezeptor LRP die phosphorylierungsabhängige Aktivierung von Dishevelled (Cadigan und Liu, 2006). Die daraus folgende Inhibierung des Komplexes aus Axin, APC und GSK3  $\beta$  verhindert die initiiierende Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und es erfolgt kein proteasomaler Abbau, was zu Erhöhung der zytoplasmatischen Konzentration und Translokation in den Kern führt (Gordon und Nusse, 2006). Im Kern verdrängt  $\beta$ -Catenin das inhibitorische Protein Groucho von TCF und es kommt zur Ausbildung eines Protein-komplexes mit Transkriptions-aktivierender Wirkung (Willert und Jones, 2006). Zu den über 20 Zielgenen des kanonischen Astes gehören unter anderem c-Myc, Cyclin D1 und E-Cadherin (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003; Dihlmann und von Knebel Doeberitz, 2005; Nelson und Nusse, 2004) (für eine umfangreiche aktuelle Liste siehe auch <http://www.stanford.edu/~nusse/wntwindow.html>).



**Abbildung 1.3 Vereinfachte Darstellung des Wnt-Signalweges.**

In Abwesenheit des Rezeptorliganden Wnt führt die Bindung von  $\beta$ -Catenin an den Degradationskomplex bestehend aus APC, Axin, CK 1 und GSK3  $\beta$  zur Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und proteasomalem Abbau. Nach Bindung von Wnt an die Rezeptoren Frizzled (Fz) und LRP wird die Ausbildung des Degradationskomplexes gehemmt.  $\beta$ -Catenin akkumuliert, transloziert in den Kern und reguliert dort die Expression der Zielgene durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie. In seiner zweiten Funktion wirkt  $\beta$ -Catenin als Bindeglied mit an der Vermittlung von Zell-Zellkontakten und der Interaktion mit Aktin als Teil des Zytoskeletts (Abbildung aus (Willert und Jones, 2006)).

Neben dieser transkriptionellen Funktion hat das *Armadillo repeat protein*  $\beta$ -Catenin im Rahmen der Ausbildung der Zell-Zelladhäsion noch eine zweite Aufgabe. Als Bindungspartner von E-Cadherin und  $\alpha$ -Catenin wirkt es an einem Komplex als Bindeglied mit, der sowohl die Verbindung benachbarter Zellen miteinander als auch die Interaktion mit Aktin als Teil des Zytoskeletts gewährleistet.

Mutationsbedingte Veränderungen einer der Komponenten des Degradationskomplexes, führen in verschiedenen Tumoren zur Hyperaktivierung des Wnt-Signalweges, und zu einer konstitutiven transkriptionellen Aktivierung der Zielgene. Dies stellt für Tumore einen Weg zur Erlangung der Unabhängigkeit von Wachstumssignalen dar. So sind in fast 80 % aller humanen kolorektalen Karzinome Mutationen im *Apc*-Gen nachzuweisen. Für hepatozelluläre Karzinome wurden *Ctnnb1* Mutationen in 20-40 % der Fälle sowie Axin-1 und -2 Mutationen in 3-10 % beschrieben (Giles *et al.*, 2003). Mutationen in *Ctnnb1*, die zu meist die Phosphorylierungsstellen von  $\beta$ -Catenin betreffen, treten zudem in kolorektalen Karzinome und zahlreichen anderen Tumoren auf (Behrens und Lustig, 2004; Polakis, 2000)

### 1.4 Nagerleber als Tumormodell

Zur Erforschung molekularer Mechanismen der beim Menschen auftretenden Krankheiten werden Tiermodelle eingesetzt. Als ein für Leberkrebs geeignetes Modell hat sich die Nagerleber herausgestellt. Hier werden sowohl die Prozesse spontaner als auch chemisch induzierter Kanzerogenese studiert. In beiden Fällen entstehen initiierte präneoplastische Tumovorläuferzellen, aus denen expandierende Herde monoklonalen Ursprungs hervorgehen. Der Prozess der klonalen Expansion lässt sich durch tumorpromovierende Substanzen beeinflussen. Diese sind für sich nicht in der Lage Genschädigungen oder Genmutationen auszulösen, begünstigen jedoch die Proliferationsfähigkeit der initiierten Zellen und führen damit bei bereits vorhandenen Genschädigungen zur vermehrten und schnelleren Entstehung von Tumoren. Zu den Tumorpromotoren für Nager gehört auch das Antiepileptikum Phenobarbital, für das gezeigt werden konnte, dass es in Leber und Schilddrüse die Krebsentstehung nach erfolgter Initiation promoviert. Ein möglicher Mechanismus dieses promovierenden Effekts ergab sich aus Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass Phenobarbital als Lebertumorpromotor in der Lage ist, die Apoptose transformierter Zellen zu unterbinden. Die so veränderten präneoplastischen Hepatozyten sind daraufhin in der Lage, sich ungehemmt zu vermehren (Bursch *et al.*, 1992).

Bei einmaliger Applikation des leberspezifischen chemischen Präkanzerogens Diethylnitrosamin zur Initiation, gefolgt von chronischer Gabe des Tumorpromotors Phenobarbital, entwickeln sich in den Lebern von Mäusen Tumore, die in bis zu 80 % der Fälle Mutationen im *Ctnnb1*-Gen tragen, das für  $\beta$ -Catenin codiert, wohingegen in 30-50 % der Le-



bertumore Mutationen in *Ha-ras* oder *B-raf* vorkommen, wenn kein Phenobarbital gegeben wird (Aydinlik *et al.*, 2001; Jaworski *et al.*, 2005a). Mutationen im *B-raf*-Gen wurden auch beim Menschen gefunden. In Melanomen kommen *B-raf* Mutationen mit einer Häufigkeit von rund 60 % vor (Davies *et al.*, 2002). Die das *Ctnnb1* betreffenden Mutationen treten in rund 40 % der humanen Lebertumore auf (Breuhahn *et al.*, 2006; Giles *et al.*, 2003). Die Protoonkogene *Ha-ras*, *B-raf* und *Ctnnb1* fallen aufgrund der Auswirkungen ihrer aktivierenden Mutationen hauptsächlich in die eingangs erläuterte Kategorie der Veränderungen zur Erlangung der „Unabhängigkeit von Proliferationssignalen“. Diese spielt bei der für malignes Wachstum notwendigen Unabhängigkeit von mindestens sechs Kontrollmechanismen des Organismus für das klonale Wachstum der Tumorzellen eine entscheidende Rolle.

## 1.5 Methoden zur Expressionsanalyse

Unterschiede zwischen zellulären Zuständen, so auch beim Übergang vom Normalgewebe zum Tumor, schlagen sich in Veränderungen der Genexpression nieder. Diese veränderte Expression ist auf der Ebene der mRNA und auf der Ebene der Proteine als Endprodukt detektierbar.

Als erste Methode, die eine vollständige Expressionsanalyse ermöglichte, wurden mRNA-Mikroarrays entwickelt. Mit diesen sind vergleichende Analysen auch dynamischer Prozesse in mehreren Proben, seien es behandelte versus unbehandelte Zellkulturen oder Tumor versus Normalgewebeproben, möglich. Tausende von immobilisierten Fängeroligonukleotiden binden im Rahmen einer Hybridisierung cDNA, die aus der Proben-mRNA erhalten wurde. Dabei erfolgt die Identifikation der gebundenen cDNA aufgrund der Ortsposition auf dem Mikroarray, während die nach Detektion der Bindung erhaltenen Signale ein Maß für die Expressionshäufigkeit sind. Die Anwendung dieser Technologie, die eine komplette Transkriptomanalyse liefern kann, erfolgt heute routinemäßig und die Ergebnisse geben einen sehr guten und umfassenden Einblick in die Veränderungen der Expressionsmuster.

mRNA-Expressionsanalysen haben aber, wie in den letzten Jahren zunehmend gezeigt werden konnte, das Problem, dass die hierbei gefundenen Expressionsmuster nicht zwingend mit denen der Proteine übereinstimmen. Jedoch stellen diese in fast allen Fällen schlußendlich die Effektoren der biologischen Funktionen dar. Dieser Beobachtung liegt zugrunde, dass die mRNA zwar als molekulare Matrize zur Proteinbiosynthese dient und diese ohne sie nicht möglich wäre, jedoch dieser Prozess durch eine Vielzahl an Regulatoren auf Translationsebene kontrolliert wird. Darüber hinaus nehmen posttranslationale Modifikationen und die Degradation der Proteine eine wesentliche Rolle ein, die durch

mRNA-Expressionsanalysen nicht bestimmt werden können (Gygi *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2007).

Daher müssen Expressionsanalysen, die der Untersuchung von veränderten zellulären Zuständen dienen, auf Proteinebene erfolgen und sollten als Ziel den Nachweis aller Proteine und ihrer posttranslationalen Modifikationen haben. Dazu bedarf es Methoden, die neben der Identifikation der Proteine auch zur Bestimmung des Expressions- und Modifikationsgrades in der Lage sind. Dies erfolgt massgeblich aufgrund von zwei Prinzipien. Zum einen über die spezifische Interaktion der Proteine mit Bindemolekülen, meist Antikörpern, und zum anderen durch massenspektrometrische Verfahren.

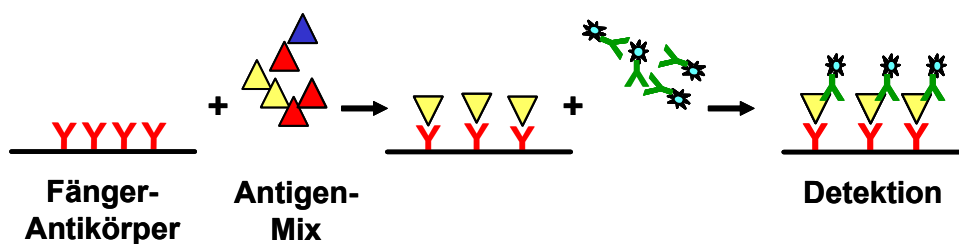
Letztere besitzen zumindest theoretisch die Fähigkeit alle Proteine in einer Probe nachzuweisen, auch ohne Vorwissen über die in der Probe enthaltenen Proteine. Zur Proteomanalyse komplexer Proben werden zwei Ansätze unterschieden, die beide in der Lage sind mehrere tausend Proteine in einem Experiment zu identifizieren. Beim sogenannten *peptide mass fingerprinting* werden die Proteine mittels 2-D-Gel-MS-Analyse identifiziert. Nach Auftrennung im 2-D-Gel werden Spots ausgestanzt, die enthaltenen Proteine proteolytisch verdaut und mittels Massenspektrometrie deren Fragmentmassen bestimmt. Durch Abgleich mit *in silico* erhaltenen Fragmentmassen können so die Ursprungproteine identifiziert werden. Die Methode stößt an ihre Grenzen, wenn es um die Identifizierung sehr saurer bzw. sehr basischer, niedermolekularer oder sehr hochmolekularer, schwerlöslicher oder nur in sehr geringen Konzentrationen in der Probe vorkommender Proteine geht (Gygi *et al.*, 2000). Der als *shotgun proteomics* bezeichnete zweite Ansatz besteht darin, die Proteine der Probe im ersten Schritt vollständig proteolytisch zu verdauen. Anschließend werden die Peptide mittels mehrdimensionaler chromatografischer Methoden aufgetrennt und massenspektrometrisch per MS/MS-Analyse untersucht. Aus den dabei erhaltenen Molekularmassen der Peptide und den zusätzlich über die Fragmentierung erhaltenen Informationen werden mittels bioinformatischer Verfahren die Ursprungproteine bestimmt.

Neben der Problematik hinsichtlich der Quantifizierung oder dem Vergleich von Expressionsmustern mehrerer Proben ist vor allem die bei beiden massenspektrometrischen Methoden benötigte Proteinmenge (ca. 0.5 mg) ein Problem. Vor allem bei der Verwendung von Tumoren als Ausgangsmaterial, noch dazu wenn diese aus tierexperimentellen Studien stammen, treten schnell Limitationen auf.

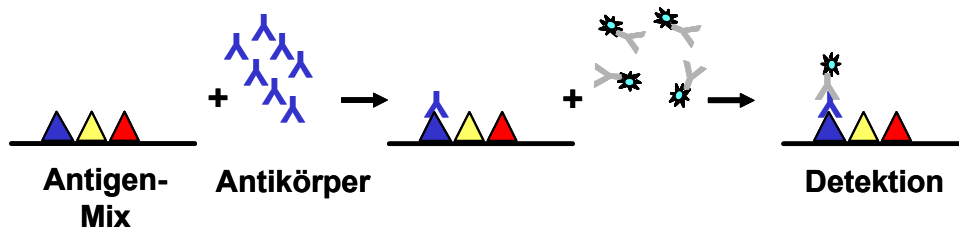
Im Gegensatz zu den Methoden, die ohne Vorwissen auskommen, müssen bei Expressionsanalysen, welche Bindemoleküle zur Detektion verwenden, die zu untersuchenden Proteine vorab bekannt sein. Der Western Blot ist die wohl weit verbreitetste Methode dieser Art der Proteinexpressionsanalyse, bei der nach elektrophoretischer Auftrennung Bindemoleküle zur Detektion und die dabei erhaltenen Bandenintensitäten als Quantifizie-

Grundlage verwendet werden. Neben der um eine Dimension erweiterten Methode des 2-D-Gels basieren auch viele weitere Methoden, wie der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), auf der Verwendung von spezifischen Bindemolekülen. Aufgrund der Tatsache, dass nicht gegen alle Proteine und deren posttranslational modifizierte Formen Bindemoleküle zur Verfügung stehen, sind diese Methoden für die vollständige Proteomanalyse nicht geeignet. Des Weiteren sind auch vergleichende Proteomanalyse über hunderte von Proben mit den meisten Methoden nicht möglich (Stoll *et al.*, 2004; Templin *et al.*, 2002).

### Forward Phase Protein-Mikroarray



### Reverse Phase Protein-Mikroarray



**Abbildung 1.4 Schematischer Aufbau von Forward Phase und Reverse Phase Protein-Mikroarrays.**

Protein-Mikroarrays können in zwei Arten unterteilt werden. Beim *Forward Phase*-Array werden Bindemoleküle (z.B. Antikörper) auf Mikroarray-Substraten immobilisiert. Nach Inkubation mit der zu untersuchenden Probe wird unter Verwendung eines zweiten Antigen-spezifischen Bindemoleküls ein Immunosandwich zur Detektion des Analyten gebildet. Im Falle des *Reverse Phase*-Arrays werden die Proteine der Probe selbst auf das Substrat aufgebracht. Nach Bindung eines Antigen-spezifischen Bindemoleküls (z.B. Antikörper) erfolgt die Detektion meist über einen zweiten Spezies-spezifischen Sekundärantikörper. Zur Detektion werden Chemolumineszenz- oder Farbpräzipitat-basierte, sowie Fluoreszenz-basierte Ausleseverfahren verwendet (Abbildung modifiziert nach (Kramer, 2006)).

Protein-Mikroarrays, die als hoch parallelisierte und miniaturisierte Festphasenassays ebenfalls in diese Kategorie gehören, unterliegen je nach Assayformat zwar auch der Limitierung durch fehlende Bindemoleküle, können aber in einigen Fällen auch mit nur einem Antigen-spezifischen Bindemolekül auskommen. Zudem sind sie zur parallelen Untersuchung vieler hundert Proben in der Lage und bilden somit eine sehr gute Ergänzung zu den bestehenden Proteomanalysemethoden (Zhu und Snyder, 2003). Protein-Mikroarrays können nach rein technischen Gesichtspunkten auf zwei Arten unterteilt werden. Zum einen dienen planare oder kugelförmige Substrate als Unterlage und zum anderen werden entweder Bindemoleküle bzw. Interaktionspartner auf diesen immobilisiert oder die Proteine der Probe. Im Falle der Immobilisierung von Bindemolekülen bzw. Interaktionspartnern spricht man von *Forward Phase-Arrays*, bei denen in einer Probe gleichzeitig eine Vielzahl von Analyten detektiert wird. Hierunter fallen beispielsweise Antikörperarrays, die durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Lysaten oder in einem miniaturisierten Sandwich-ELISA Format zur parallelen Bestimmung vieler Analyten verwendet werden (Miller *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006). Von *Reverse Phase-Arrays* spricht man, wenn die Probe selbst auf dem Substrat immobilisiert wird. Bei diesem Format werden in bis zu 600 Proben gleichzeitig die Expressionswerte je eines Analyten untersucht (Akkiprik *et al.*, 2006; Nishizuka *et al.*, 2003a).

Eine Kategorisierung der Protein-Mikroarrays nach anderen Gesichtspunkten unterscheidet die Arrays mit der Zielsetzung der Detektion und Quantifizierung von denen zum funktionellen Studium von Proteinen. Bei Protein-Mikroarrays der zweiten Kategorie besteht die immobilisierte Probe aus bekannten oder potentiellen Interaktionspartnern, zum Beispiel rekombinanten Proteinen oder Interaktionsdomänen (Poetz *et al.*, 2005; Stiffler *et al.*, 2006). Dies erlaubt die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen im genomweiten Maßstab. Darüberhinaus können nach dem gleichen Prinzip auch Interaktionen mit Oligosacchariden, niedermolekularen Substanzen oder DNA-Molekülen untersucht werden (MacBeath, 2002; Templin *et al.*, 2003).

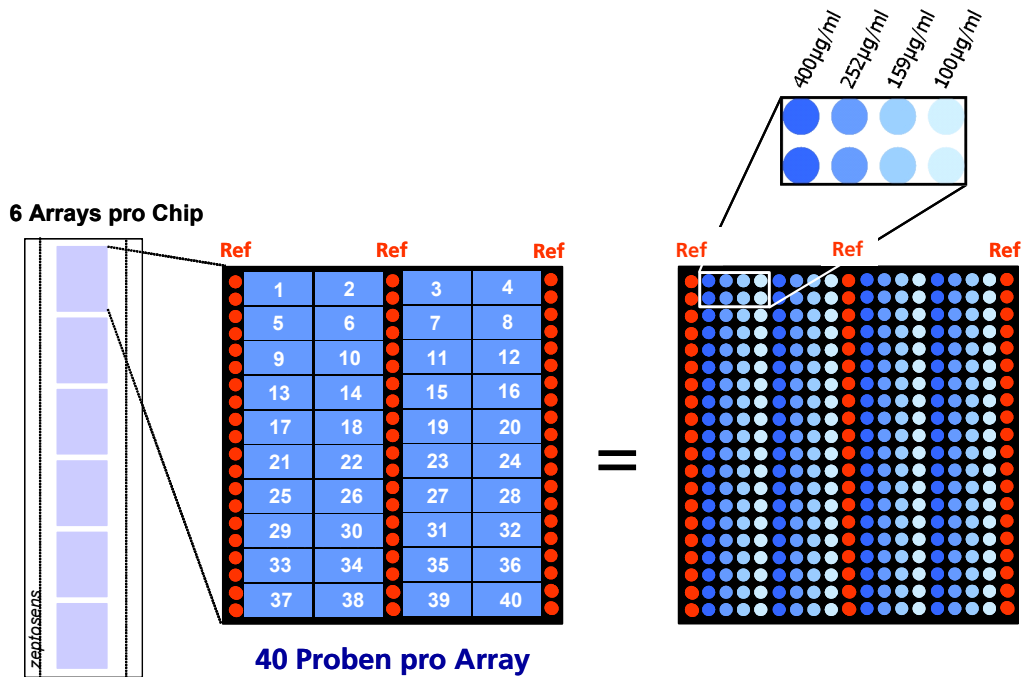
### **1.6 Planare Reverse Protein-Mikroarray-Technologie**

Planare Reverse Protein-Mikroarrays basieren auf der Immobilisierung der gesamten komplexen Probe auf einem flachen Substrat, wobei die Probenkodierung über die XY-Position erfolgt. Hierzu werden die lysierten Zellkulturen oder Gewebe mithilfe von Mikroarray-Systemen auf Mikroarray-Substrate gedruckt. Häufig werden modifizierte Glasoberflächen als feste Phasen verwendet. Die zu untersuchenden Zielmoleküle können mittels eines Antigen-spezifischen Fängermoleküls detektiert werden. In einem Experiment wird dabei die Expression eines Analyten in vielen Proben gleichzeitig bestimmt. Mittels vergleichender Proteinexpressionsanalysen in Tumor- und Normalgeweben können so un-

terschiedlich exprimierte oder aktivierte Proteine detektiert werden und bei bekannten genetischen Veränderungen deren Auswirkungen bestimmt werden.

Mit dieser Technologie wurden zahlreiche Studien zur Untersuchung von veränderten Proteinexpressionsmustern, sowohl in Zellkulturproben als auch in Gewebeproben, durchgeführt. Zum Studium der Kanzerogenese wurden Expressionsmuster von Signaltransduktionswegen in verschiedenen Krebsarten analysiert, so in Prostatakrebs (Grubb *et al.*, 2003), in Brustkrebs (Akkiprik *et al.*, 2006) und in Gliomen (Jiang *et al.*, 2006). Gewebeproben von Ovarialkarzinomen wurden mikrodisssektiert und charakterisiert (Jones *et al.*, 2002; Sheehan *et al.*, 2005; Wulfskuhle *et al.*, 2003). Die unterschiedliche zonale Expression und Aktivierung von Signalwegsproteinen in Tumoren wurde untersucht (Paweletz *et al.*, 2001), wie auch Expressionsmuster in stammzellartigen Zellen aus Brustkrebs (Zhou *et al.*, 2007). Neben stimulierten Jurkatzellen (Chan *et al.*, 2004) wurden ganze Banken von Zelllinien hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Expressionsmuster untersucht; so wurden die NCI-60-Zelllinien auf die Expression von mehr als 50 Proteinen hin analysiert (Nishizuka *et al.*, 2003a). Die Suche nach neuen diagnostischen Markern für Kolon- oder Eierstockkrebs (Jones *et al.*, 2002; Nishizuka *et al.*, 2003b), sowie die Bestimmung von Autoantikörpern im Falle von Autoimmunkrankheiten (Balboni *et al.*, 2006; Hueber *et al.*, 2002), waren weitere Anwendungsgebiete. Des Weiteren wurden Apoptose-Proteine in Lymphoma-Proben detektiert (Zha *et al.*, 2004), das mitochondriale Proteom untersucht (Herrmann *et al.*, 2003) und ein großer Probensatz von Serumproben wurde auf den IgA-Gehalt untersucht (Janzi *et al.*, 2005). Diese Breite der Anwendungen und die Vielfalt der eingesetzten Proben zeugt von der Flexibilität dieser Technologie.

Viele dieser Studien waren auf Nitrozellulose-beschichteten Mikroarray-Substraten mit nachfolgender, chemolumineszenter oder Farbpräzipitat-basierter Signaldetektion durchgeführt worden. Diese Detektionsverfahren, insbesondere bedingt durch den hohen intrinsischen Hintergrund der verwendeten Mikroarray-Substrate, führen zu einer eingeschränkten Sensitivität bei der Detektion niedrig konzentrierter Analyten (wie z.B. phosphorylierter Proteine oder Transkriptionsfaktoren) und zu einer limitierten Dynamik des Assays.



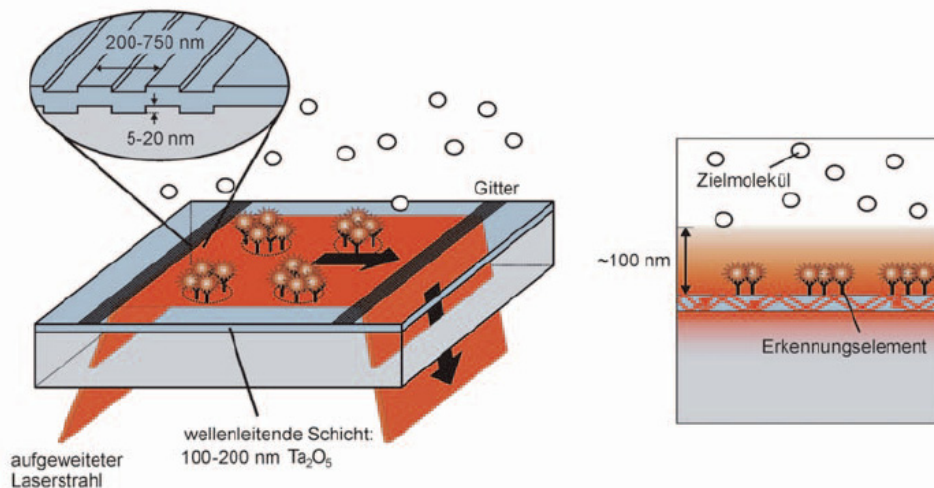
**Abbildung 1.5 Proben- und Sub-Array-Anordnung auf einem Mikroarray-Substrat.**

Anordnung der 40 Proben auf einem Sub-Array. Jede Probe wird durch acht Spots, Duplikate von vier Verdünnungsstufen (Konzentrationen wie rechts oben angegeben), repräsentiert. Ein Mikroarray-Substrat umfasst sechs identische Sub-Arrays (links dargestellt) (Abbildung freundlicherweise von Dr. M. Pawlak zur Verfügung gestellt und modifiziert).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Planaren Reversen Protein-Mikroarray-System wurden spezielle Mikroarray-Substrate und Ausleseverfahren der Firma Zeptosens (Witterswil, Schweiz) verwendet (Pawlak *et al.*, 2002a). Diese Substrate besitzen eine hydrophobe Oberflächenstruktur von selbst ausgerichteten Alkylphosphaten auf Tantalpentoxid, welches aus der Dampfphase heraus auf dem Glasgrundträger abgeschieden wurde (Textor *et al.*, 2000). Die über hydrophobe Wechselwirkung immobilisierten Proteine werden in Form denaturierend lysierter Proben mittels eines piezoelektrischen Mikroarrays aufgebracht. Dabei können 40 Proben in sechs identischen Sub-Arrays je Substrat angeordnet werden, wobei jede Probe durch acht Spots, Duplikate von vier Verdünnungsstufen, repräsentiert ist (Abbildung 1.5).

Die Fluoreszenzdetektion der Antikörperbindung erfolgt mittels planarer Wellenleitertechnologie über die an den Längsseiten eingeätzten Beugungsgitter. Dabei wird monochromatisches Licht in die 150-300 nm dünne transparente und hochbrechende Schicht aus Tantalpentoxid eingekoppelt. Durch diese Lichtleitung wird ein evaneszentes Feld gebildet, das eine Eindringtiefe von einigen 100 nm in das über der Oberfläche befindliche wässrige Medium besitzt. Innerhalb dieser Schicht befindet sich das Fluorophor des Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpers, der den mit den Proteinen der Probe interagierenden Primärantikörper bindet. Diese Konstellation führt zu einem sehr geringen intrinsi-

schen Hintergrund und sehr hoher Sensitivität (Duveneck *et al.*, 1997; Heyse *et al.*, 1995). Von dem rund 5x7 mm großen Feld eines einzelnen Sub-Arrays wird mit einer 12 bit CCD-Kamera ein Vollbild aufgenommen. Diese ist zusammen mit den beiden Anregungslasern (635 nm und 532 nm) im Mikroarray-Auslesegerät verbaut. Der Aufbau dieser Dünnschichtwellenleiter ist in Abbildung 1.6 dargestellt.



**Abbildung 1.6 Schematischer Aufbau eines Dünnschichtwellenleiters.**

Das monochromatische Laserlicht wird in das Beugungsgitter der wellenleitenden Schicht des Mikroarray-Substrats eingekoppelt, durchläuft dieses und wird auf der anderen Seite wieder ausgekoppelt (linker Teil der Abbildung). Das sich dabei bildende evaneszente Feld über dem Wellenleiter hat eine Ausleuchtungstiefe von 100-300 nm und regt nur die Fluorophore der direkt mit der Oberfläche interagierenden Detektionsantikörper an (rechter Teil der Abbildung). Über die CCD-Kamera im Mikroarray-Auslesegerät wird die emittierte Fluoreszenz gemessen (Abbildung aus (Kramer, 2006) verändert nach (Pawlak *et al.*, 2002b)).

## 1.7 Aufgabenstellung

Mutationen, die zu Veränderungen in Proteinen in Signaltransduktionswegen führen, sind häufig auslösend für die Tumorbildung. Die Übertragung und Integration von Signalen bildet aufgrund der Fülle der regulatorischen Geschehnisse in der Zelle ein komplexes Netzwerk und so wirken sich durch Mutation veränderte Aktivierungszustände eines Signalweges auf eine Vielzahl von Prozessen aus. In dieser Dissertation sollte in vergleichenden Analysen verschiedener Tumor- und Normalgewebe der Grad der Expression und Modifikation von Proteinen bestimmt werden. Im Mittelpunkt der Bemühungen stand dabei die Aufklärung der veränderten Regulation und Aktivierung, sowie die Bestimmung der vielfältigen Vernetzungen und des Übersprechens von Signaltransduktionswegen.

Um solche Effekte zu erfassen, ist eine weitreichende Analytik notwendig, die in der Lage ist, die Aktivierungszustände einer großen Anzahl von signalübertragenden Proteinen aus verschiedenen Signalwegen quantitativ oder semiquantitativ zu bestimmen. Hierzu konnten hoch parallelisierte und miniaturisierte Festphasenassays in Form von Mikroarrays verwendet werden. Durch die Verwendung solcher Reverser Protein-Mikroarrays bestand die Möglichkeit zur Bestimmung der Expression und Modifikation von über 100 Analyten aus 40 Proben heraus. Hierzu sollten rund 60 neue Antikörper-basierte Assaysysteme etabliert werden.

Als Ausgangsmaterial konnten genetisch charakterisierte Tumore, die in einem Maus-Lebertumormodell erhalten wurden, eingesetzt werden. Diese tragen definierte Mutationen in zentralen Regulatoren des Erk/MAPK- und Wnt-Signalweges. Die im Erk/MAPK-Signalweg mutierten Gene von *Ha-ras* und *B-raf* kodieren für permanent aktive Proteine, und führen daher zu einer autonomen Aktivierung des Signalweges. Das dritte in Maus-Lebertumoren durch Genmutation veränderte Protein  $\beta$ -Catenin ist der zentrale Effektor des Wnt-Signalweges. Dieser wird in vielen verschiedenen Tumoren des Menschen konstitutiv aktiv. In vergleichenden Analysen sollten die aufgrund der Mutationen unterschiedlich veränderten Expressionsmuster der Proteine und ihrer modifizierten Formen bestimmt werden. Dies sollte zwischen Tumor- und Normalgewebe, aber auch zwischen Tumorge-  
weben mit unterschiedlicher Mutation geschehen, um damit Hinweise auf die Vernetzung von Signaltransduktionswegen zu erhalten.



## 2 Experimenteller Teil

### 2.1 Material, Geräte und Software

#### Material

Filtereinheit	Ultrafree-MC ( Durapore, 0.65 $\mu\text{m}$ ), Millipore, Billerica, MA, USA
Filterpapier	Gel-Blotting-Papier, Whatman, Maidstone, Kent, UK
FPLC-Säulen	HiTrap NHS-aktivierte Säulen (aktivierte Sepharose High Performance) und HiPrep <sup>TM</sup> 26/10 Desalting Säule, General Electric Healthcare, Buckinghamshire, England
Membranfilter	Millex-SV (PVDF, 5 $\mu\text{m}$ ), Millipore, Billerica, MA, USA
Mikroarray-Substrat	ZeptoMARK Protein Microarray Chip, Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz
Mikrosphären	Carboxylierte Mikrosphären L100, Luminex, Austin, TX, USA
Mikrotiterplatten	96 und 384 Kavitäten, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; 96 Kavitäten, Abgene (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Mikrotiter-Filterplatte	96 Kavitäten (1.2 $\mu\text{m}$ Durapore PVDF), Millipore, Billerica, MA, USA
Nitrocellulose-Membran	Protran (0.2 $\mu\text{m}$ ), Whatman, Maidstone, Kent, UK
Plastikwaren	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen; Starlab GmbH, Ahrensburg; Rainin (Mettler-Toledo GmbH), Giessen; Neo-Lab, Heidelberg; Sorenson, Salt Lake City, UT, USA; Nal-gene (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Polyacrylamid-Gele	NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gele, 1 mm Dicke, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
PVDF-Membran	Immobilon-P (PVDF, 0.45 $\mu\text{m}$ ), Millipore, Billerica, MA, USA
Wassersensitives Papier	WSP, QUANTIFOIL Instruments GmbH, Jena

#### Geräte

Durchlaufkühler	Ministat 125 cc2, Huber Kältemaschinenbau GmbH, Offenburg; Multistar, Fryka, Esslingen
FPLC	BioLogic HR Workstation, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Geldokumentation	Kodak Image Station 440 CF mit Steuerungssoftware Kodak Digital Science V3.0.0, Kodak Eastman, Rochester, NY, USA

Gelelektrophorese-System	XCell Sure Lock Mini Cell, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Heizblock	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
Laminar Flow Werkbank	KVF 6.18, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Luftbefeuchter	B250, Brune Luftbefeuchtung Proklima GmbH, Aglasterhausen
Mikroarrayer	Nanoplotter NP2 mit Steuerungssoftware NpC16 Version 2.14, GeSiM mbH, Großberkmannsdorf
Mikroarray-Auslesegerät	ZeptoREADER F3000 mit ZeptoCARRIER und Steuerungssoftware ZeptoReader V1,21,0,2, Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz
Mikroarray-Blockierstation	ZeptoFog, Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz
Mikro-Dismembrator	Mikro-Dismembrator U mit Schüttelbehälter und Mahlkugeln aus Chromstahl, Sartorius, Göttingen
Mikrosphären-Auslesegerät	Luminex L100 mit Steuerungssoftware IS 2.2, Luminex, Austin, TX, USA
Orbitalschüttler	KL-2, Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Pipettier-Roboter	Genesis RSP 100 mit Steuerungssoftware Gemini Version 3.40 SP2, TECAN, Hombrechtikon, Schweiz
Pipettoren	Gilson, Middleton, WI, USA
pH-Meter	pH Meter 766, Knick, Berlin
Reaktionsgefäßeschüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranlage	MembraPure, MembraPure GmbH, Bodenheim
Schüttler	Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Spannungsquelle	Power Ease 500, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA PowerPac Basic, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Spektrometer	Fluostar OPTIMA mit Steuerungssoftware Fluostar OPTIMA V1.32 R2, BMG Labtech GmbH, Offenburg
Spritzenpumpe	Model 22, Harvard Apparatus; Holliston, MA, USA
Taumelroller	RM5, Assistent, Sondheim
Tischzentrifuge	5415D und 5417R, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	RK 31, Bandelin, Berlin
Vakuum-Absaugstation	Millipore, Billerica, MA, USA
Vakuumpumpe	Laboprot, KnF Neuberger, Freiburg
Waage	Explorer E12140, OHAUS, Pine Brook, NJ, USA
Wärmeschrank	BF115, Binder GmbH, Tuttlingen
Western Blot Systeme	XCell II Blot Module, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Mini-Protean II Blot Module, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Zentrifugen	Rotanta / RPC, Hettich, Tuttlingen

## Software

Bildbearbeitung	Adobe Photoshop 7.0 und CS2, Adobe Systems Incorp., San Jose, CA, USA ImageJ 1.37v, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Clusteranalyse	TIGR MeV (Multi Experiment Viewer) Version 3.1, The Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA
Datenanalyse allgemein	Origin V6.0, Microcal, Northampton, MA, USA; Excel 2003, Microsoft, Redmond, WA, USA
Mikroarrayauswertung	ZeptoVIEW, Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz
Protein Sequenzanalyse	Protean 4.00, DNASTar, Madison, WI, USA
Statistische Datenanalyse	R, Version 2.4.0, <a href="http://www.r-project.org">http://www.r-project.org</a> (Stand: 18.01.2008)

## 2.2 Reagenzien und Chemikalien

### Reagenzien

#### Affinitätschromatografie

Aktivierungslösung	1 mM Salzsäure
Deaktivierungspuffer I	500 mM Ethanolamin, 500 mM Natriumchlorid, pH 8.3
Deaktivierungspuffer II	100 mM Acetat, 500 mM Natriumchlorid, pH 8.3
Elutionspuffer	100 mM Citrat, pH 2.5
Belegungspuffer	200 mM Natriumhydrogencarbonat, 500 mM Natriumchlorid, pH 8.3
Neutralisierungspuffer	2 M HEPES, pH 9
Reinigungslösung	6 M Guanidiniumchlorid

#### Gelelektrophorese und Western Blot

Antioxidanzmittel	NuPAGE Antioxidant, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Antikörper-Kompetitions-puffer	0.1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA in PBS
ECL Entwicklungsreagenz	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
Laufpuffer	NuPAGE MOPS SDS Running Buffer und NuPAGE MES SDS Running Buffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ponceau S-Lösung	0.1 % (w/v) Ponceau S in 5 % Essigsäure in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Protein-Größenstandard	SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Probenpuffer	NuPAGE LDS Samplebuffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Reduktionsmittel	NuPAGE Sample Reducing Agent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Stripping Reagenz	Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution, Millipore, Billerica, MA, USA
Transferpuffer-NC	NuPAGE Transferpuffer, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Transferpuffer-PVDF	10x (250 mM Tris, 1.92 M Glycin in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> )
TBS	10 mM Tris, 150 mM Natriumchlorid in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , pH 7.4
TBST	0.1 % (v/v) Tween20 in 1 x TBS
TBST 1 % BSA	1 % (v/v) BSA in 1 x TBST
TBST 3 % BSA	3 % (v/v) BSA in 1 x TBST

### Planarer Reverser Protein-Mikroarray

Assaypuffer	CAB1 (BSA-basiert), Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz
Blockierungspuffer	BB1 (BSA-basiert), Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz
Blockierungspuffer Tween	50 mM Imidazol, 150 mM Natriumchlorid, 1 % (v/v) Tween20 in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> , pH 7.4
Druckpuffer	CLB2 (CLB1 : CSBL1 = 1 : 10)
Labelingpuffer	50 mM Natriumhydrogencarbonat, 0.1 % (v/v) Tween20 in PBS, pH 9.3
Lysepuffer	CLB1, Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz
Verdünnungspuffer	CSBL1, Zeptosens – a Division of Bayer (Schweiz) AG, Witterswil, Schweiz

### Mikrosphären-basierter Mikroarray

Aktivierungspuffer	100 mM Natriumhydrogenphosphat, pH 6.2
Kopplungspuffer	50 mM MES, pH 5.0
Lagerungslösung	10 mg/ml BSA in PBS
Waschlösung	0.05 % (v/v) Tween20 in PBS

### Allgemein

Bradford Reagenz	Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
PBS	137 mM Natriumchlorid, 2.7 mM Kaliumchlorid, 8.1 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 1.8 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 7.0

**Chemikalien**

Ammoniumacetat	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
Acetonitril	Merck KGaA, Darmstadt
BSA	Albumin Fraktion V (Protease-frei), Carl Roth, Karlsruhe
Citrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
EDC	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanolamin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
Guanidiniumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Imidazol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
KLH	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
MES	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
NHS-Alexa647	Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit und Alexa Fluor 647 Succinimidyl Ester, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
sulfo-MBS	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
sulfo-NHS	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
sulfo-SMPB	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Waltham, MA, USA
TCEP	Fluka (Sigma-Aldrich), St. Louis, MO, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tween20	Merck KGaA, Darmstadt

Sollten weitere Chemikalien verwendet worden sein, die versehentlich in dieser Auflistung nicht aufgeführt sind, so wurden diese von Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Alle Chemikalien hatten jeweils den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

## 2.3 Antikörper

In der folgenden Tabelle der Primärantikörper sind neben den Angaben zum Antikörper selbst auch die verwendeten Verdünnungen aufgelistet. Da eine wesentliche Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit darin bestand die bestehenden sowie neu hinzugekommenen Antikörper zu etablieren, ergaben sich zum Teil geänderte Inkubationsbedingungen. Daher sind neben der als optimal im Western Blot etablierten Verdünnung auch die in den beiden hier dargestellten Planaren Reversen Protein-Mikroarray-Experimenten jeweils verwendeten Verdünnungen aufgeführt. Verdünnungen sind nur angegeben wenn die Antikörper in den entsprechenden Experimenten auch verwendet wurden.

**Tabelle 2.1 Primärantikörper**

Namen der Antigene richten sich nach den von der Signal Transduction Knowledge Environment der American Association for the Advancement of Science verwendeten Bezeichnungen und Synonyme (URL: <http://stke.sciencemag.org/cm> (Stand: 08.02.2008)). Alle in den Bezeichnungen der Antigene verwendeten griechischen Buchstaben können in der Arbeit durch lateinische ersetzt sein und werden synonym verwendet. Die Bezeichnung der Phosphorylierungsstellen entspricht den vom Hersteller angegebenen, zumeist humanen Aminosäurepositionen. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Abkürzungen: Spz. - Spezies, Klon. - Klonalität, Hrst. - Hersteller, Vd. - Verdünnung, WB - Western Blot, PRPM 1 - Planares Reverses Protein-Mikroarray-Experiment in Kapitel 3.2.3.1, PRPM 2 - Planares Reverses Protein-Mikroarray-Experiment in Kapitel 3.2.3.2, rb - Kaninchen, ms - Maus, gt - Ziege, mAk - monoklonaler Antikörper, BD - BD Biosciences, Biom - Biomol, Bios - Biosource, Calb - Calbiochem, Cha - Dr. Chambrey, Chem - Chemicon, CST - Cell Signaling Technology, Epi - Epitomics, Kni - PD Dr. Knippschild, NMI - in dieser Arbeit erzeugt, R&D - R&D Systems, SC - Santa Cruz, Sig - Sigma-Aldrich, Sch - Prof. Dr. M. Schwarz, Ups - Upstate, Zym - Zymed.

Antigen	Spz.	Klon.	Hrst.	Vd.	Vd.	Vd.
				WB	PRPM 1	PRPM 2
14-3-3 ζ δ	rb		CST	1000		250
β-Actin	ms	mAk	Sig	10000		
AFP	rb	mAk	Epi	5x10 <sup>5</sup>		500
Akt [1]	rb	mAk	CST	1000		250
Akt [2]	rb		CST	1000	500	250
Akt - phospho T308	rb		CST	1000	500	250
Akt - phospho S473	rb		CST	1000	500	250
Akt Substrate - phospho S/T	rb		CST	1000	500	250
AMPK α	rb		CST	1000		500
AMPK α - phospho T172	rb		CST	1000	500	250

Antigen	Spz.	Klon.	Hrst.	Vd. WB	Vd. PRPM 1	Vd. PRPM 2
APC	rb		CST	1000		250
ATM/ATR Substrate - phospho S/T	rb		CST	1000	500	250
Bad	rb		CST	1000		250
Bad - phospho S112	ms	mAk	CST	2000		250
Bax	rb		CST			250
E-Cadherin	gt		R&D	2500	2500	2000
N-Cadherin [1]	rb		Calb	1000	2000	
N-Cadherin [2]	ms	mAk	BD	2500	250	250
N-Cadherin [N]	rb		CST	1000		
Caspase 3	rb		CST	1000		250
Caspase 3 - gespalten D175	rb		CST	1000		250
Caspase 7	rb		CST			250
Caspase 7 - gespalten D198	rb		CST			250
$\beta$ -Catenin [1]	ms	mAk	BD		1000	
$\beta$ -Catenin [2]	rb		Ups		1000	
$\beta$ -Catenin [3]	rb		Bios	1000	1000	500
$\beta$ -Catenin - phospho S45	rb		CST	1000		250
$\beta$ -Catenin - phospho T41/S45	rb		CST	1000	200	250
$\beta$ -Catenin - phospho S33/37/T41	rb		CST	1000	200	250
CK 1 $\alpha$	rb		CST	1000		250
CK 1 $\delta$	ms	mAk	Kni	4000		1000
CK 2 $\alpha$	rb		CST	1000		250
Connexin 26	ms	mAk	Zym	1000	500	
CREB	rb	mAk	CST	1000	500	250
CREB - phospho S133 [1]	rb		CST	1000	500	250
CREB - phospho S133 [2]	rb	mAk	CST	1000		100
Cyclin D1	ms	mAk	CST	1000		250
Cyclin E2	rb		CST	1000		250
Cyclin E2 [N]	rb	mAk	Epi	500		250
Cyp 1A1	rb		Sch.		5000	
Cyp 1A2	rb		Sch.		2500	
Cyp 2B1	rb		Sch.		2500	
Cyp 2C6	rb		Sch.		2500	
Cyp 2E1	rb		Sch.		2500	
Decorin	ms	mAk	R&D		1000	
EGFR [1]	rb		CST	1000	500	
EGFR [2]	rb	mAk	Epi	5000		250

<b>Antigen</b>	<b>Spz.</b>	<b>Klon.</b>	<b>Hrst.</b>	<b>Vd. WB</b>	<b>Vd. PRPM 1</b>	<b>Vd. PRPM 2</b>
EGFR - phospho Y845	rb		CST			250
EGFR - phospho Y1173	ms	mAk	Biom			100
Elk-1	rb		CST	1000		250
Elk-1 - phospho S383 [1]	rb		CST	1000	500	250
Elk-1 - phospho S383 [2]	rb		R&D	1000		500
Erk 1	rb		CST	1000		250
Erk 2	rb		CST	1000		250
Erk 1/2	rb		CST	1000	500	250
Erk 1/2 - phospho T202/Y204	rb		CST	1000	500	250
c-Fos	rb		CST	250		250
Glutaminsynthetase	rb		Sig	10000	1x107	25000
Gpr49 P2 T1	rb		NMI	3830		750
GSK3 $\beta$	rb		CST	1000	500	250
GSK3 $\beta$ - phospho S9	rb		CST	1000	500	250
HGF	gt		R&D	500		200
Histon H3	rb		CST	1000	500	250
Histon H3 - acetyliert K9	rb		CST			250
Histon H3 - phospho S10	rb		CST			250
Histon H3 - acetyliert K18	rb		CST			250
Histon H3 - acetyliert K23	rb		CST			250
Histon H3 - acetyliert K9 & phospho S10	rb		CST			250
IGFBP-1	gt		SC	200	200	
IGFBP-3	rb		SC		200	
I $\kappa$ B	rb		CST	1000		250
I $\kappa$ B - phospho S32	rb		CST	1000		250
JNK/SAPK	rb	mAk	CST	1000	500	250
JNK/SAPK - phospho T183/Y185	rb		CST	1000	500	250
c-Jun	rb	mAk	CST	1000	500	250
c-Jun - phospho S63 [1]	rb	mAk	CST	1000		250
c-Jun - phospho S63 [2]	rb		CST		500	
c-Jun - phospho S73	rb		CST	1000	500	250
Ki-67	rb		SC	1000	200	200
MDM2	rb		Chem	500		125
MDM2 - phospho S166	rb		CST	1000		250
MEK 1 [1]	rb		CST	1000		250
MEK 2 [2]	rb		CST	1000		250



<b>Antigen</b>	<b>Spz.</b>	<b>Klon.</b>	<b>Hrst.</b>	<b>Vd. WB</b>	<b>Vd. PRPM 1</b>	<b>Vd. PRPM 2</b>
MEK 1/2 - phospho S217/221	rb		CST	1000	500	250
c-Met [1]	gt		R&D	500		250
c-Met [2]	rb		SC	1000	200	
c-Met - phospho Y1230/1234/1235	rb		Bios	1000		250
c-Met - phospho Y1349	rb	mAk	CST	1000		250
MKK 3/6 - phospho S189/207	rb	mAk	CST	1000		250
MKK 4 - phospho S257/T261	rb		CST	1000		250
MKK 7 - phospho S271/T275	rb		CST	1000		250
mTOR	rb		CST	1000		250
mTOR - phospho S2448	rb		CST	1000		250
mTOR - phospho S2481	rb		CST	1000		250
c-Myc [1]	rb		CST	1000		250
c-Myc [2]	ms	mAk	SC	1000	200	
c-Myc - phospho T58/S62	rb	mAk	Epi	1000		500
p38/MAPK	rb		CST	1000	500	250
p38/MAPK - phospho T180/Y182	rb		CST	1000	500	250
p53 [1]	ms	mAk	Calb	1000	100	
p53 [2]	ms	mAk	Calb	1000	100	500
p53 [3]	gt		R&D	500		500
p53 - phospho S6	rb		CST	1000	500	250
p53 - phospho S15	rb		CST	1000	500	250
p53 - phospho S20	rb		CST	1000	500	250
p53 - phospho S392	rb		CST	1000	500	250
PAK 1/2/3	rb		CST	1000		250
PAK 1/2/3 - phospho S141	rb		Bios	1000		500
PAK1/2 - phospho Ser144/Ser141 [N]	rb		CST	1000		
PDK 1	rb		CST	1000		500
PDK 1 - phospho S241	rb		CST	1000	500	250
PI3K p85	rb		CST	1000		250
PI3K p85/p55 - phospho p85	rb		CST	1000		250
PKA C (α Kinase Untereinheit)	rb		CST	1000		500
PKA C (α Kinase Untereinheit) - phospho T197	rb		CST	1000		250
PKA C (α & β Kinase Untereinheit) - phospho T197	rb		Bios	1000		500
PTEN	rb		CST	1000		500

<b>Antigen</b>	<b>Spz.</b>	<b>Klon.</b>	<b>Hrst.</b>	<b>Vd.</b> <b>WB</b>	<b>Vd.</b> <b>PRPM 1</b>	<b>Vd.</b> <b>PRPM 2</b>
PTEN - phospho S380	rb		CST	1000	500	250
b-Raf	rb		Ups	500		250
b-Raf - phospho S445	rb		CST	1000	500	250
c-Raf	rb		CST	1000		250
c-Raf - phospho S259	rb		CST	1000	500	250
c-Raf - phospho S338	rb		CST	1000	500	250
Ha-Ras [1]	rb	mAk	Ups	1000		500
Ha-Ras [2]	ms	mAk	SC		200	
Rb	ms	mAk	CST	1000		250
Rb - phospho S807/811	rb		CST	1000		250
RhBG	rb		Cha	10000		1000
RSK 1/2/3	rb		CST	1000	250	250
RSK 1 - phospho S380	rb		CST	1000	500	250
RXR	rb		SC		500	
STAT 1	rb		CST	1000		250
STAT 1 - phospho Y701	rb		CST	1000		250
STAT 3 [1]	rb		CST	1000	500	500
STAT 3 [2]	rb	mAk	CST	1000		250
STAT 3 - phospho Y705 [1]	rb		CST	1000	500	
STAT 3 - phospho Y705 [2]	ms	mAk	CST	1000		250
STAT 3 - phospho S727	rb		CST	1000		250
STAT 5	rb		CST	1000		250
STAT 5 - phospho Y694	rb	mAk	CST	1000		250
STAT 6	rb		CST	1000		250

**Tabelle 2.2 Sekundärantikörper**

Abkürzungen: Spz. - Spezies, Fm. - Format, Hrst. - Hersteller, Vd. - Verdünnung, JIR - Jackson Immuno Research, Inv - Invitrogen.

<b>Antigen</b>	<b>Spz. (Fm.)</b>	<b>Konjugation</b>	<b>Hrst.</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Vd.</b>
Kaninchen-IgG (H+L)	Esel (IgG)	Meerrettichperoxidase	JIR	Western Blot	2000
Maus-IgG (H+L)	Ziege (IgG)	Meerrettichperoxidase	JIR	Western Blot	5000
Ziege-IgG (H+L)	Esel (IgG)	Meerrettichperoxidase	JIR	Western Blot	5000
Kaninchen-IgG (Fc)	Ziege (Fab)	Alexa Fluor 647	Inv	Protein-Mikroarray	500
Maus-IgG (Fc)	Ziege (Fab)	Alexa Fluor 647	Inv	Protein-Mikroarray	500

Antigen	Spz. (Fm.)	Konjugation	Hrst.	Anwendung	Vd.
Ziege-IgG (Fc)	Ziege (Fab)	Alexa Fluor 647	Inv	Protein-Mikroarray	500
Kaninchen-IgG	Esel (IgG)	Phycoerythrin	Inv	Protein-Mikroarray	250

## 2.4 Gewebeproben

Im Rahmen der Arbeit wurden Proteinexpressionsanalysen von Maus-Lebertumoren mit Mutationen in den Genen für *Ctnnb1*, *Ha-ras* und *B-raf* durchgeführt. Diese Tumoren wurden aus zwei Tierexperimenten erhalten, die bereits im Vorfeld durchgeführt worden waren. Die Proben, sowie die Ergebnisse der Mutationsbestimmungen, wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Michael Schwarz, Abteilung Toxikologie, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Tübingen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.4.1 Tiermodell für *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierte Maus-Lebertumore

Der Tierversuch zur Erzeugung der Lebergewebeproben wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt und in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen zum Tierschutz in der Arbeitsgruppe von Professor Michael Schwarz, Abteilung Toxikologie, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Tübingen durchgeführt.

Aus einem bereits früher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Tierexperiment stand Maus-Lebertumormaterial mit *Ha-ras* und *B-raf* Mutationen zur Verfügung. In diesem Experiment war der Einfluss des in Mensch und Maus unterschiedlichen zentralen Bereichs des p53 Proteins auf die Häufigkeit und Art der Mutationen untersucht worden. Dieser Bereich des Proteins interagiert mit der DNA und weist im Gegensatz zur Maus in Lebertumoren des Menschen sehr häufig Mutationen auf. Die Fragestellung ob sich dieser unterschiedliche zentrale Bereich auf die Art und Häufigkeit von Tumoren oder deren Mutationen auswirkt, wurde in einem transgenen Tiermodell angegangen. Den Mäusen waren im *P53*-Gen die für den zentralen Bereich codierenden Exone 4-9 gegen die entsprechenden Bereiche des humanen *P53*-Gens ausgetauscht worden (Luo *et al.*, 2001). Das *P53* Allel mit dem humanen *knock in* wird zukünftig als  $P53^{ki}$  und der Maus Wildtyp als  $P53^{wt}$  bezeichnet.

Die transgenen Mäuse wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Monica Hollstein, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg zur Verfügung gestellt, und dienten als Ausgangspunkt der weiteren Zucht. Die Tiere hatten einen C57BL/6 Hinter-

grund und wurden zum Transfer in die C3H/HeJCrI Mauslinie nach Embryonentransfer über sechs Generationen mit C3H/HeJCrI Mäusen (Charles River, Sulzfeld) verpaart. Die F6 Generation wurde Bruder Schwester verpaart und die männlichen Nachkommen im Tumorinitiationsexperiment eingesetzt. Im Rahmen des von Johanna Mahr durchgeführten Tierversuchs wurden in jeweils 15 männlichen C3H/HeJCrI Mäusen mit homozygotem P53<sup>ki</sup> Allel (P53<sup>ki/ki</sup>), heterozygotem P53<sup>ki</sup> Allel (P53<sup>ki/wt</sup>) und homozygotem P53<sup>wt</sup> Allel (P53<sup>wt/wt</sup>) Lebertumore initiiert. Im Alter von 2 Wochen wurde den Tieren intraperitoneal eine Einmaldosis Diethylnitrosamin (10 µg/g Körpergewicht) injiziert. Nach der Entwöhnung wurden die Tiere für 35 Wochen ohne weitere Behandlung gehalten. Nach der Tötung wurden die Lebern entfernt. Makroskopisch erkennbare Tumore wurden präpariert, in Reaktionsgefäße gegeben und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C (Jaworski *et al.*, 2005b). Die Mutationsbestimmung der in diesem Tierversuch präparierten Tumore wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Maike Jaworski durchgeführt (Jaworski, 2004). Dabei wurden die Gene für *Ha-ras* und *B-raf* auf Mutationen untersucht. Nach der Extraktion genomischer DNA und PCR basierter Amplifikation wurden die Mutationsanalysen mittels Pyro-Sequenzierung, DHPLC, RFLP und klassischer Dideoxynukleotid-Sequenzierung durchgeführt. Hierbei wurden für *Ha-ras* Mutationen im Codon 61 und für *B-raf* im Codon 624 gefunden (Jaworski *et al.*, 2005a).

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben sowie der hierzu ermittelte Mutationsstatus sind in Tabelle 2.4 ersichtlich.

### 2.4.2 Tiermodell für *Ctnnb1*-mutierte Maus-Lebertumore

Der Tierversuch zur Erzeugung der Lebergewebeproben wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Howard P. Glauert, University of Lexington, Kentucky, USA nach Genehmigung durch die zuständigen Behörden und in Übereinstimmung mit den geltenden gesetzlichen Bestimmungen zum Tierschutz durchgeführt.

Er diente zur Charakterisierung der promovierenden Wirkung von PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl), einem Tumorpromotor vom Phenobarbital Typ, in einem Maus-Lebertumormodell. Hierzu wurden männliche B6129SF2/J Mäuse im Alter von 9 Wochen mit einer intraperitonealen Einmaldosis Diethylnitrosamin (90 µg/g Körpergewicht) initiiert. Zur Promotion wurde, nach 2 Wochen Behandlungspause, einer Gruppe von Tieren 20 mal zweiwöchentlich eine intraperitoneale Injektion PCB 153 gelöst in Maiskeimöl (300 nmol/g Körpergewicht) verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten 27 mal zweiwöchentlich eine intraperitoneale Injektion Maiskeimöl. Im Alter von 64 Wochen, 15 Wochen nach der letzten PCB 153 Injektion, wurden die Tiere getötet. Die Lebern wurden entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Transfer in die Arbeitsgruppe Schwarz wurden makroskopisch erkennbare Tumore präpariert, in Reaktionsgefäße ge-

geben und bei -80 °C gelagert. Die Mutationsbestimmung der in diesem Tierversuch präparierten Tumore wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Julia Strathmann durchgeführt (Strathmann, 2006). Dabei wurden die Gene für *Ctnnb1*, *Ha-ras* und *B-raf* auf Mutationen untersucht. Nach der Extraktion genomischer DNA und PCR-basierter Amplifikation wurden die Mutationsanalysen mittels RFLP (*Ha-ras* und *B-raf*) und klassischem Dideoxynukleotid Sequenzierung (*Ctnnb1*) durchgeführt. In den Tumoren wurde nur je eine Mutation in einem der Gene gefunden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben sowie der hierzu ermittelte Mutationsstatus sind in Tabelle 2.3 ersichtlich.

### 2.4.3 Liste der Lebergewebeproben

**Tabelle 2.3 Maus-Lebergewebeproben des Tiermodells für *Ctnnb1*-mutierte Tumore.**

Im Bezeichner steht C für *Ctnnb1* mutiert und N für Normalgewebe.

Abkürzungen: DEN - Diethylnitrosamin, n.b. - nicht bestimmt, wt - Wildtyp.

Bezeichner	Genotyp	Behandlung	Mutation	Codon	Basen
C 34aT2	wt/wt	DEN + PCB 153	<i>Ctnnb1</i>	33	TCT->CCT
C 34aT1	wt/wt	DEN + PCB 153	<i>Ctnnb1</i>	37	TCT->CCT
C 34aT3	wt/wt	DEN + PCB 153	<i>Ctnnb1</i>	35	ATC->AGC
C 31dT1	wt/wt	DEN + PCB 153	<i>Ctnnb1</i>	32	GAT->GGT
C 33b [1]	wt/wt	DEN + PCB 153	n.b.	-	-
C 33b [2]	wt/wt	DEN + PCB 153	n.b.	-	-
N 36	wt/wt	-	-	-	-
N 37	wt/wt	-	-	-	-
N 38	wt/wt	-	-	-	-
N 39	wt/wt	-	-	-	-
N 40	wt/wt	-	-	-	-

**Tabelle 2.4 Maus-Lebergewebeproben des Tiermodells für *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierte Tumore.**

Im Bezeichner steht B für *B-raf* mutiert, H für *Ha-ras* mutiert und N für Normalgewebe.

Abkürzungen: DEN - Diethylnitrosamin, ki - *knock in*, wt - Wildtyp.

Bezeichner	Genotyp	Behandlung	Mutation	Codon	Basen
B 11T6	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 13T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 29T2	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG

Bezeichner	Genotyp	Behandlung	Mutation	Codon	Basen
B 29T4	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 39T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 45T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 45T2	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 50T3	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 62T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 62T2	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 66T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
B 75T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>B-raf</i>	624	GTG->GAG
H 1T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CGA
H 1T2	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 2T4	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 8T1	P53 <sup>ki/ki</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CGA
H 11T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 16T5	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CGA
H 21T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CTA
H 21T3	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 33T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CGA
H 37T7	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CGA
H 37T10	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CGA
H 38T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 39T2	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 55T4	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CTA
H 61T4	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 66T3	P53 <sup>ki/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->CGA
H 78T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
H 79T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	DEN	<i>Ha-ras</i>	61	CAA->AAA
N 3	wt/wt	-	-	-	-
N 6	P53 <sup>wt/wt</sup>	-	-	-	-
N 7	P53 <sup>wt/wt</sup>	-	-	-	-
N 9	wt/wt	-	-	-	-
N 10	wt/wt	-	-	-	-
N 12	wt/wt	-	-	-	-
N 16	wt/wt	-	-	-	-
N 17	wt/wt	DEN	-	-	-
N 19	wt/wt	DEN	-	-	-
N 20	wt/wt	DEN	-	-	-
N 24	wt/wt	DEN	-	-	-

## 2.5 Zelllinienproben

Im Rahmen der Arbeit wurden zur Charakterisierung von Antikörpern in größerem Umfang Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde neben Lysat aus Maus-Lebergewebe auch Lysat aus Maus-Lebertumorzelllinien verwendet. Diese Proben sowie die Informationen zu den Zelllinien wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor Michael Schwarz, Abteilung Toxikologie, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Tübingen für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte durch Silvia Vetter. Die Proben wurden als trockene Zellpellets in Reaktionsgefäßen erhalten, die bei -80 °C gelagert wurden.

### 55.1c

Beschreibung:	Sublinie, die aus einem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus gewonnen wurde.
Zelltyp:	Maus-Hepatom
Referenzen:	(Kress <i>et al.</i> , 1992)
Erhalten von:	Dr. Kress, Tübingen
Wachstumsbedingungen:	37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , DMEM/F12 mit 10 % FKS und 1 % P/S (nach (Kress <i>et al.</i> , 1992) MX-82 mit 10 % FKS)
Untersuchte Mutationen:	
Gen	Mutationsstatus
<i>Ctnnb1</i>	heterozygote Deletion von Exon 3
<i>Ha-ras</i>	Codon 61: wt/wt
<i>P53</i>	wt/wt

### 70.4

Beschreibung:	Sublinie, die aus einem Lebertumor einer DEN-induzierten C57BL/6J-Maus gewonnen wurde.
Zelltyp:	Maus-Hepatom
Referenzen:	(Kress <i>et al.</i> , 1992)
Erhalten von:	Dr. Kress, Tübingen
Wachstumsbedingungen:	37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> , DMEM/F12 mit 10 % FKS und 1 % P/S (nach (Kress <i>et al.</i> , 1992) MX-82 mit 10 % FKS)
Untersuchte Mutationen:	
Gen	Mutationsstatus
<i>Ctnnb1</i>	wt/wt
<i>Ha-ras</i>	Codon 61: wt/wt
<i>P53</i>	Codon 135: mt/wt, Codon 138: wt/mt

## 2.6 Mikroarray-Methoden

### 2.6.1 Planare Reverse Protein-Mikroarrays

#### 2.6.1.1 Herstellung von Protein-Mikroarrays

Planare Reverse Protein-Mikroarrays wurden mittels des kontaktlosen, piezoelektrischen Mikroarrayers Nanoplotter NP2 auf dem Mikroarray-Substrat ZeptoMARK Protein Microarray Chip (Zeptosens, Witterswil, Schweiz) erzeugt. Die Oberflächenstruktur der Substrate besteht aus einer Monolage von selbst ausgerichteten Alkylphosphaten auf Tantalpentoxid (Textor *et al.*, 2000), welche die Proteinimmobilisierung über hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht. An den Längsseiten sind zur Fluoreszenzdetektion mittels planarer Wellenleitertechnologie Beugungsgitter eingätzt (Heyse *et al.*, 1995; Pawlak *et al.*, 2002a).

Die unter denaturierenden Bedingungen erzeugten Lysate der Gewebeproben werden nach Proteinbestimmung mit Lysepuffer auf die 10-fache für den Druck notwendige Proteinkonzentration von 4 mg/ml eingestellt und in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten vorgelegt. Darin werden sie mittels eines Pipettier-Roboters mit Verdünnungspuffer 1:10 verdünnt und unter gleichzeitiger weiterer Verdünnung mit Druckpuffer in eine Mikrotiterplatte mit 384 Kavitäten transferiert. Somit werden mit dem Lysat jeder verwendeten Probe 8 Kavitäten in der Mikrotiterplatte mit 384 Kavitäten belegt, da für jede der vier Verdünnungsstufen (0.4, 0.25, 0.16, 0.1 mg/ml) zwei Kavitäten mit je 25 µl befüllt werden. Referenzlösung aus 0.1 mg/ml BSA und 1:40000 verdünntem BSA-Alexa647 in Verdünnungspuffer wird jeweils frisch angesetzt, filtriert und in zwei Kavitäten der Mikrotiterplatte (384 Kavitäten) werden je 30 µl vorgelegt. Hierfür wird eine frisch angesetzte Lösung von 10 mg/ml BSA in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und ein Aliquot des BSA-Alexa647 (2.9.5) verwendet. Die Filtration erfolgte durch Filtereinheiten mit 0.65 µm Porengröße. Die so vorgelegten Lösungen werden vom Mikroarrayer mittels zweier Mikrodispenser auf die Mikroarray-Substrate aufgebracht, wobei je Spot ein Tropfen von ca. 400 pl abgesetzt wird. Der Druckvorgang findet in einer Lamina Flow Werkbank unter Reinraumbedingungen (Reinraumklasse 100) bei ~65 % relativer Luftfeuchtigkeit und 20 °C Raumtemperatur statt. Auf jedem Mikroarray-Substrat werden sechs identische Sub-Arrays mit 19 Spalten und 20 Zeilen, also 380 Spots, aufgebracht (Abbildung 1.5 und Abbildung 3.5). Da im Mikroarrayer zwei Mikrodispenser im simultanen Modus eingesetzt sind, werden je drei Sub-Arrays vom gleichen Mikrodispenser erzeugt; jeder dieser Sub-Arrays besteht aus bis zu 40 verschiedenen Lysaten.

Der Abstand von Spotmitte zu Spotmitte beträgt in x-Richtung 280 µm und in y-Richtung 300 µm; der Durchmesser der einzelnen Spots beträgt ungefähr 150 µm. Nach Beendigung des Druckvorgangs werden die Mikroarray-Substrate auf dem temperierbaren Tab-



lett des Mikroarrays auf 37 °C erwärmt und für eine Stunde bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Anschließend werden sie in die Mikroarray-Blockierstation (Zeptosens) überführt. Hierin wird Blockierungspuffer oder Blockierungspuffer Tween für 30 Minuten bei Raumtemperatur durch einen Ultraschallgeber vernebelt und mittels Druckluft gleichmäßig verteilt. Die vollständig benetzten Substrate werden nach abspülen mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und trocken blasen mit Stickstoff lichtgeschützt bei +4-8 °C gelagert.

### 2.6.1.2 Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge

Um die auf dem Mikroarray-Substrat immobilisierten Proteine zu visualisieren werden die Proteine im Mikrosport mittels NHS-Alexa647, einer aminoreaktiven Aktivester Variante des Fluorophors Alexa647, markiert.

Mit Blockierungspuffer Tween blockierte Mikroarray-Substrate werden mit der bedruckten Seite nach oben in den ZeptoCARRIER (Zeptosens), der bis zu sechs Mikroarray-Substrate aufnehmen kann, eingelegt. Eine Fluidikstruktur unterteilt die auf den Mikroarray-Substraten befindlichen sechs identischen Sub-Arrays in räumlich getrennte Inkubationsfelder, die daraufhin separat mit den notwendigen Lösungen inkubiert werden können. Zur Benetzung der Oberflächen der Substrate und der Fluidik werden die Inkubationsfelder mit Labelingpuffer befüllt und einige Minuten vorinkubiert. Zur Anfärbung der Proteine wird ein 12 µl Aliquot des Farbstoffs (0.2 mg/ml NHS-Alexa647 in wasserfreiem DMSO) mit 1.2 ml Labelingpuffer versetzt und je Inkubationsfeld 200 µl aufgegeben. Die Inkubation erfolgt unter Lichtabschluss für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Aliquots des Farbstoffs wurden unter Inertgas-Atmosphäre hergestellt und in luftdichten Lagerungsgefäßen mit Trocknungsmittel zum Ausschluss von Feuchtigkeit lichtgeschützt bei -70 °C gelagert. Zum Stoppen der Färbung wird dreimal mit 200 µl TBST gespült. Das Mikroarray-Substrat wird ausgebaut, mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen, mit Stickstoff trocken geblasen, mit einer frischen Fluidikstruktur wieder in den ZeptoCARRIER eingebaut und erneut mit Labelingpuffer befüllt. Im Ablauf des Assays wird bei bereits befüllten Inkubationskammern vor dem Aufgeben neuer Lösung die vorhandene Lösung mittels einer Absaugvorrichtung entfernt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm erfolgt im Mikroarray-Auslesegerät für 1.0 Sekunde bei Graufilterstufen von 0.025 bis 0.5 mittels einer 12 bit CCD-Kamera und generiert 16 bit Graustufenbilder.

### 2.6.1.3 Immunoassay auf Protein-Mikroarray

Die Immunodetektion auf Reverse Phase Protein-Mikroarrays folgt im Wesentlichen den Abläufen beim Dot Blot oder Western Blot.

Bis zu sechs mit Blockierungspuffer blockierte Mikroarray-Substrate werden mit der bedruckten Seite nach oben in den ZeptoCARRIER (Zeptosens) eingelegt und mit einer Flu-

idikstruktur versehen. Diese unterteilt die je sechs Sub-Arrays jedes Substrates in räumlich getrennte Inkubationsfelder, die separat mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden. Zur Benetzung der Oberfläche der Mikroarray-Substrate werden die Sub-Arrays zuerst mit Assaypuffer befüllt und einige Minuten vorinkubiert. Zur Primärantikörper-Inkubation werden je Inkubationsfeld 100 µl des entsprechenden, in Assaypuffer verdünnten, Antikörpers aufgegeben und für 12-16 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Zum Spülen werden zweimal 200 µl Assaypuffer verwendet. Zur Sekundärantikörper-Inkubation werden je Inkubationsfeld 100 µl des entsprechenden in Assaypuffer verdünnten Spezies-spezifischen Antikörpers aufgegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Zum Spülen werden erneut zweimal 200 µl Assaypuffer verwendet und dann nochmals mit 200 µl Assaypuffer befüllt. Im Ablauf des Assays wird bei bereits befüllten Inkubationskammern vor dem Aufgeben neuer Lösung die vorhandene Lösung mittels einer Absaugvorrichtung entfernt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm erfolgt im Mikroarray-Auslesegerät für 0.5 bis 16 Sekunden bei Graufilterstufen von 0.01 bis 1.0 mittels einer 12 bit CCD-Kamera und generiert 16 bit Graustufenbilder.

### 2.6.1.4 Detektion, Bildauswertung und Datenanalyse

Die Detektion der Fluoreszenzsignale auf den in dieser Arbeit verwendeten Mikroarray-Substraten erfolgt über an den Längsseiten eingeätzte Beugungsgitter mittels Planarer Wellenleitertechnologie (Heyse *et al.*, 1995; Pawlak *et al.*, 2002a). Hierbei entsteht über dem Mikroarray-Substrat ein nur 100-300 nm hohes, starkes Anregungsfeld (Evanescentes Feld). Dadurch werden nur die Fluorophore der direkt an die Oberfläche gebundenen Sekundärantikörper angeregt. Frei in der Lösung befindliche Fluorophor-tragende Sekundärantikörper oder andere eigenfluoreszente Komponenten tragen nicht zum emittierten Licht bei. Dieses wird durch eine 12 bit CCD-Kamera als Vollbild der Fläche des Inkubationsfeldes in Form einer 16 bit Tiff Datei abgespeichert. Dabei kann die Detektionszeit zwischen 0.1 und 30 Sekunden und die Graufilterstufen zwischen 0.01 und 1.0 verändert werden. Die Bildauswertung erfolgt mit der Software zur Arrayauswertung und generiert den um den lokalen Hintergrund korrigierten Mittelwert der relativen Fluoreszenzeinheiten für jeden Spot (Durchmesser 170 µm).

Jede Probe wird bei dem unter 2.6.1 beschriebenen Ansatz zur Herstellung der Planaren Reversen Protein-Mikroarrays durch acht Spots (vier Verdünnungsstufen in Duplikaten) repräsentiert, die zu einem für die Probe spezifischen Signalwert zurückgerechnet werden. Das System der Signalauslese über eingekoppeltes Laserlicht bedingt eine Dämpfung der Anregung, die mit Hilfe der drei Referenzreihen für jede Zeile individuell korrigiert wird. Eindeutig durch äußere Einflüsse, wie Verschmutzungen, Kratzer, Überblend- oder Hintergrundeffekte, veränderte Signalwerte einzelner Spots werden entfernt. Aus den Mit-

telwerten der Duplikate wird eine lineare Regressionanalyse durchgeführt und aus den konzentrationsabhängigen Werten werden konzentrationsunabhängige Werte berechnet. Deren Mittelwert ergibt den probenspezifischen Assaysignalwert mit zugehöriger Standardabweichung. Um Primärantikörper-unspezifische Effekte zu eliminieren, werden die probenspezifischen Assaysignalwerte um den entsprechenden Leerwert korrigiert. Hierfür werden die probenspezifischen Assaysignalwerte des ohne Primärantikörper inkubierten Immunoassays subtrahiert. Da die Signalwerte fehlerbehaftet sind, werden die neuen Standardabweichungen mittels Fehlerfortpflanzung (2.6.1.5) ermittelt. Die miteinander verrechneten probenspezifischen Assaysignalwerte stimmen dabei in Graufilter- und Belichtungszeit sowie im verwendeten Sekundärantikörper und dessen Verdünnung überein. Negative Assaysignalwerte, deren Betrag im Bereich des Hintergrundes liegt, werden in positiver Form in der weiteren Auswertung berücksichtigt. Dies geschieht, um das Hintergrundsignal nicht als nicht bestimmt aus der Auswertung eliminieren zu müssen. Aus den probenspezifischen Assaysignalwerten der Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge (2.6.1.2) werden Proteinnormalisierungsfaktoren berechnet. Innerhalb jedes Sub-Arrays wird der Median der Assaysignalwerte gebildet und alle probenspezifischen Werte durch diesen geteilt, so dass Faktoren erhalten werden. Für die drei jeweils vom gleichen Mikrodispenser gedruckten Sub-Arrays wird aus diesen Median-zentrierten Faktoren der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und somit Mikrodispenser-spezifische Proteinnormalisierungsfaktoren erhalten. Alle um Primärantikörper-unspezifische Effekte bereinigte probenspezifischen Assaysignalwerte werden durch die entsprechenden probenspezifischen Proteinnormalisierungsfaktoren des gleichen Mikrodispensers dividiert. Da die verrechneten Werte fehlerbehaftet sind, werden die neuen Standardabweichungen mittels Fehlerfortpflanzung (2.6.1.5) ermittelt.

Um faktorielle Unterschiede in den Assaysignalwerten verschiedener Assays besser erfassen zu können und gleichzeitig die gemeinsame grafische Darstellung der Werte zu ermöglichen, werden die um Primärantikörper-unspezifische Effekte bereinigten und durch die Proteinnormalisierungsfaktoren korrigierten, probenspezifischen Assaysignalwerte für jeden Assay getrennt durch den entsprechenden Median aller Normalgewebeproben-Signalwerte dividiert. Die so erhaltenen Median-zentrierten Signalwerte werden aus Gründen einfacherer Darstellung und Bewertung der Ergebnisse durch Logarithmierung zur Basis 2 umgerechnet, was zur äquidistanten Darstellung gleicher faktorieller Veränderung führt.

Zur Bewertung des relativen Phosphorylierungsstatus einer Probe werden Verhältnisse gebildet. Dazu werden die Assaysignalwerte der Phosphoform eines Proteins dividiert durch die Assaysignalwerte der nicht-phosphorylierten Form des gleichen Proteins. Es werden die, um die Primärantikörper-unspezifischen Effekte bereinigten, probenspezi-

fischen Assaysignalwerte verwendet. Diese Verhältnisse dienen der Darstellung des Anteils an phosphoryliertem Protein.

### 2.6.1.5 Fehlerfortpflanzung

Da bei der Berechnung der, um die Primärantikörper-unspezifischen Effekte bereinigten und durch die Proteinnormalisierungsfaktoren korrigierten, probenspezifischen Assaysignalwerte drei verschiedene fehlerbehaftete Größen miteinander verrechnet werden, ist eine Fehlerfortpflanzung zur Bestimmung des resultierenden Fehlers notwendig.

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

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

**Formel 2.1: Berechnung des Fehlers in Abhängigkeit einer fehlerbehafteten Größe.**

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

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

**Formel 2.2: Berechnung des Fehlers in Abhängigkeit mehrerer fehlerbehafteter Größen.**

## 2.6.2 Mikrosphären-basierte Protein-Mikroarrays

Zur Analyse von Mikrosphären-basierten Mikroarrays wird das Luminex L100 System (Software IS 2.2) verwendet. Die Durchführung der Assays erfolgt unter Standardbedingungen, 80  $\mu$ l Probe werden in einer maximalen Messzeit von 80 Sekunden je Kavität gemessen. Zur Auswertung der Reporterfluoreszenz wird der Median von 100 Ereignissen gebildet.

### 2.6.2.1 Kopplung von Proteinen und Peptiden auf Mikrosphären

Zur Belegung mit Proteinen werden Polystyrol-Mikrosphären der Firma Luminex mit carboxylierter Oberfläche verwendet. Diese werden mit EDC und sulfo-NHS aktiviert und über die Lysin Seitenketten mit Proteinen belegt. Die Kopplung von Peptiden auf diese mit Trägerprotein belegten Mikrosphären erfolgt nach erneuter Aktivierung mittels des heterobifunktionalen Kopplungsreagenz sulfo-SMPB.

In einem Ansatz werden  $2.5 \times 10^6$  Mikrosphären (200  $\mu$ l der Ausgangssuspension) gekoppelt, dazu wird die Ausgangssuspension 2 Minuten mit 10000 g zentrifugiert, der Niederschlag kurz sonifiziert und 10 Sekunden gemischt. Die 200  $\mu$ l Suspension werden in einer Ultrafree-MC Filtereinheit kurz zentrifugiert, und zweimal mit 120  $\mu$ l Aktivierungspuffer gemischt und wieder zentrifugiert. Nach Zugabe von 120  $\mu$ l Aktivierungspuffer wird 10 Sekunden sonifiziert und 20  $\mu$ l einer Lösung von 25 mg/ml EDC und 25 mg/ml sulfo-NHS in Aktivierungspuffer zugegeben. Die Filtereinheit wird nach dem Mischen für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt auf dem Reaktionsgefäßeschüttler bei 1000 rpm inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wird zweimal 400  $\mu$ l Kopplungspuffer zugegeben, gemischt und erneut kurz zentrifugiert. Die Belegung mit Protein erfolgt durch Zugabe von 250  $\mu$ l Proteinlösung in Kopplungspuffer (BSA 0.1 mg/ml, KLH 0.2 mg/ml, IgG 0.05 mg/ml) und Inkubation nach dem Mischen für 120 Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt auf dem Reaktionsgefäßeschüttler bei 1000 rpm. Nach kurzer Zentrifugation wird zweimal (bei IgG-Kopplung viermal) 400  $\mu$ l Waschlösung zugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert, gefolgt von zweimal 400  $\mu$ l PBS Zugabe, wieder gemischt und kurz zentrifugiert. Zur Lagerung werden die Mikrosphären in drei Schritten mit je 100  $\mu$ l PBS 0.05 % Natriumazid aus den Filtereinheiten in Reaktionsgefäße überführt und bei +4-8 °C aufbewahrt.

Die zur Kopplung an die mit BSA belegten Mikrosphären verwendeten Peptide werden unter Berücksichtigung der Synthesereinheit als 600  $\mu$ M Lösung in 40 % Acetonitril in PBS angesetzt. Zu 120  $\mu$ l dieser Peptidlösung werden zur Reduktion eventuell vorhandener Disulfidbrücken 240  $\mu$ l einer 300  $\mu$ M TCEP in PBS Lösung gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Reaktionsgefäßeschüttler inkubiert.  $5 \times 10^5$  Mikrosphären werden aus der Suspension nach 2 Minuten 10000 g Zentrifugation, kurzer Sonifikation und 10 Sekunden mischen in eine Vertiefung einer Mikrotiter-Filterplatte mit 96 Kavitäten, in der bereits 200  $\mu$ l PBS vorgelegt sind, transferiert. Durch Anlegen eines Unterdrucks auf einer Vakuum-Absaugstation wird die Lösung abgesaugt, mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen und erneut abgesaugt. Zusätzlich zu 50  $\mu$ l PBS werden 50  $\mu$ l einer 3.2 mM sulfo-SMPB-Lösung in 10 % DMSO in PBS zugegeben und bei Raumtemperatur mit 1400 rpm für 60 Minuten auf einem Reaktionsgefäßeschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200  $\mu$ l PBS werden 100  $\mu$ l der reduzierten Peptidlösung zu den Mikrosphären gegeben

und bei Raumtemperatur mit 1400 rpm für 60 Minuten auf einem Reaktionsgefäßeschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl PBS werden die Mikrosphären mit zweimal 100 µl Lagerungslösung mit 0.05 % Natriumazid aus der Mikrotiter-Filterplatte in Reaktionsgefäße überführt und bei +4-8 °C gelagert.

Zur Quantifizierung der Ausbeute an Mikrosphären wird nach beiden Schritten eine Zählung mit Hilfe des Luminex L100 durchgeführt. Dazu wird in den Reaktionsgefäßen 1 Minute mit 10000 g zentrifugiert, durch Ultraschallbehandlung vereinzelt und 10 Sekunden gemischt. Mit Lagerungslösung wird eine 1:500 Verdünnung hergestellt, gut gemischt und im Duplikat aus je 100 µl gemessen (50 µl Probenvolumen, Messzeit 80 Sekunden, minimale Mikrosphärenanzahl 10000). Aus der gemessenen Anzahl kann die Konzentration an Mikrosphären je µl der erhaltenen Suspension ermittelt werden.

### 2.6.2.2 Durchführung von Immunoassays zur Bestimmung von Antikörperspezifitäten

Die mit Trägerprotein oder mit Peptid beladenen Mikrosphären-Suspensionen werden für 1 Minute bei 10000 g zentrifugiert, kurz sonifiziert und 10 Sekunden gemischt. Dann werden von jeder eingesetzten Population 1300 Mikrosphären pro Assaypunkt in Lagerungslösung zu einer gemeinsamen Stammlösung vereint und mit Lagerungslösung auf 30 µl Lösung je 1300 Mikrosphären aufgefüllt. Die zu vermessenden Proben werden in Lagerungslösung vorverdünnt und zu den in den Kavitäten einer Mikrotiter-Filterplatte mit 96 Kavitäten vorgelegten 30 µl der gemeinsamen Mikrosphären Stammlösung zugegeben. Nach Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 650 rpm auf einem Reaktionsgefäßeschüttler wird durch Anlegen eines Unterdrucks auf einer Vakuum-Absaugstation die Lösung abgesaugt, dreimal mit 100 µl PBS gewaschen und abgesaugt. Die Inkubation mit dem Detektionsantikörper (2 µg/ml Esel-anti-Kaninchenantikörper gekoppelt mit Phycoerythrin in Lagerungslösung) erfolgt für 45 Minuten bei Raumtemperatur und 650 rpm auf einem Reaktionsgefäßeschüttler. Vor der Detektion wird nach Absaugen dreimal mit 100 µl PBS gewaschen, abgesaugt und 100 µl Lagerungslösung zugegeben. Direkt nach vorsichtigem Mischen wird das Fluoreszenzsignal im Luminex L100 ausgelesen. Die Steuerungssoftware bildet zur Auswertung der Reporterfluoreszenz aus den mindestens 100 Ereignissen jeder Mikrosphären Population den Median und gibt diesen als Median der Fluoreszenzintensitäten (MFI) aus.

## 2.7 Methoden zur Auswertung von Daten aus Mikroarray-Experimenten

### 2.7.1 Grafische Darstellung

Um sehr große Datensätze (hier mehr als 5000 Datenpunkte) grafisch anschaulich darstellen zu können, werden *Heat Maps* verwendet. Hierbei werden die Zahlenwerte der Datenpunkte anhand einer Farbskala in Farben transferiert, die dann in einer xy-Achsen Auftragung der Proben gegen die Analyten mit ihren korrespondierenden Farben dargestellt werden. Zu dieser zweidimensionalen Darstellung von Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit wenn nicht anders angegeben die Software TIGR MeV (Version 3.1) verwendet.

### 2.7.2 Multivariate Datenanalysen

#### 2.7.2.1 Clusteranalysen

Unter Clusteranalyse versteht man verschiedene multivariate Verfahren der Datenanalyse zur Ermittlung von Gruppen (Clustern) zusammengehöriger Objekte aus einer Grundmenge von numerisch beschriebenen Objekten. Die Objekte können beispielsweise Datensätze von Messwerten oder Bildpunkte sein, in denen geordnete Ansammlungen oder Hierarchien gefunden werden sollen. Dafür verwendete Algorithmen können hierarchisch oder partitionierend sein. Je nach Algorithmus muss eine Distanzfunktion zur Bestimmung des Abstands zweier Elemente  $d(a,b)$  bekannt sein. Die baumartig strukturierten Ergebnisse von hierarchischen Clusteranalysen werden üblicherweise in Form von *Heat Maps* (2.7.1) dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde wenn nicht anders angegeben die Software TIGR MeV (Version 3.1) zur Erstellung von Clusteranalysen verwendet, bei denen die euklidische Distanz (Formel 2.3) als Maßstab für die Ähnlichkeit und die vollständige Verknüpfung (complete linkage) als Clustering Methode verwendet wurden, da sich diese Kombination als besonders geeignet zur Darstellung logarithmierter Daten erwiesen hat (D'Haeseleer, 2005).

$$d_{ab} = \sqrt{\sum_c (e_{ac} - e_{bc})^2}$$

Formel 2.3 Formel der Euklidischen Distanzfunktion

### 2.7.2.2 Statistische Verfahren

Ziel der Statistik ist es, Massendaten zu reduzieren und zu komprimieren, um Gesetzmäßigkeiten und Strukturen in den Daten sichtbar zu machen. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich die statistischen Verfahren der Varianzanalyse eingesetzt. Daneben wurden Tests der Wahrscheinlichkeitsverteilung angewandt, da die Normalverteilung häufig eine notwendige aber nicht hinreichende Bedingung für die Festlegung der zulässigen Art der Varianzanalyse-Verfahren darstellt.

Normalverteilung wurde im Rahmen dieser Arbeit in der Software R mit dem auch für kleine Probenumfänge zulässigen Testverfahren nach Anderson-Darling getestet.

$$A^2 = -n - S$$

$$S = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (2i - 1) [\ln(\Phi_{(i)}) + \ln(1 - \Phi_{(n+1-i)})]$$

**Formel 2.4 Anderson-Darling Test auf Normalverteilung.**

Varianzanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit in der Software R für  $n=2$  mit dem Wilcoxon Rangsummentest oder für  $n>2$  mit dem Kruskal Wallis Rangsummentest durchgeführt, da für keine der untersuchten Probengruppen die notwendige Bedingung der Normalverteilung für alle bestimmten Analyten gezeigt werden konnte, die für die klassischen Methoden der Varianzanalyse wie Students T-Test ( $n=2$ ) oder ANOVA ( $n>2$ ) notwendig gewesen wäre, und es sich in allen Fällen um nicht verbundene Proben handelte.

Nicht-parametrische Rangsummentests weisen mit einer hohen Sensitivität, bei gleichzeitiger Nichtbeachtung der realen absoluten Abstände oder Schwankungen, Unterschiede zwischen Probengruppen nach. Daher wurden alle in dieser Arbeit mittels Rangsummentest für entsprechende Signifikanzgrenzen als signifikant bestimmte Analyten über die Betrachtung der Rohwerte in Balkendiagrammen kontrolliert und gegebenenfalls entfernt.



$$T_w = \frac{W - W_0}{\sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}}$$

**Formel 2.5 Wilcoxon Rangsummentest zur nicht-parametrischen Varianzanalyse für zwei Proben.**

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \left( \sum_{i=1}^l \frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(n+1)$$

**Formel 2.6 Kruskal Wallis Rangsummentest zur nicht-parametrischen Varianzanalyse für mehr als zwei Proben.**

## 2.8 Methoden zur Generierung eines polyklonalen Antikörpers

### 2.8.1 Auswahl von Peptiden zur Immunisierung

Die Auswahl der Peptide zur Immunisierung erfolgt anhand der bekannten Proteinsequenz. Für die Generierung Western Blot tauglicher Antikörper erfolgt sie mit der Zielsetzung lineare Peptide mit der Länge von 10 bis 20 Aminosäuren zu definieren. Die Peptid-Auswahl muss mehrere Einflussfaktoren berücksichtigen. Bei Transmembranproteinen sind die Transmembrandomänen aufgrund der häufig hohen Homologie dieser Bereiche innerhalb von Proteinfamilien eine mögliche Quelle von Kreuzreaktivitäten und sind daher zu vermeiden. Gegebenenfalls stören posttranslationale Modifikationen die Antigen-Antikörper-Interaktion und entsprechende Sequenzen sollten nicht verwendet werden. Neben diesen, die Spezifität der Antikörper beeinflussenden Faktoren, ist die Antigenizität der Peptide Grundvoraussetzung für die Entstehung von Antikörpern entsprechender Reaktivität und muss bei der Auswahl berücksichtigt werden. Schlußendlich muss das gewählte Peptid für das interessierende Protein spezifisch sein, also in keinem weiteren Protein des interessierenden Organismus vorkommen. Zusätzlich wird auf die Synthetisierbarkeit und Löslichkeit in wässrigen Systemen geachtet, sowie auf das nicht Vorhandensein von Cystein in der Sequenz.

Wenn Teile der benötigten Informationen für das interessierende Protein nicht als fundierte wissenschaftliche Erkenntnisse verfügbar sind, werden die im folgenden gelisteten Vorhersage-Algorithmen verwendet. Nach Kategorien geordnet sind immer die Eigennamen der Anwendungen sowie die sie zur Verfügung stellenden Institutionen mit einheitlicher Quellenanzeige (URL) genannt. Basierend auf diesen Informationen erfolgt dann die PeptidAuswahl.

### **Transmembran Bereiche**

MEMSAT3	PSIPRED (protein structure prediction server), UCL Bioinformatics, URL: <a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html</a> (Stand: 11.01.2008)
PredictProtein	Columbia University Bioinformatics Center, URL: <a href="http://www.predictprotein.org">http://www.predictprotein.org</a> (Stand: 11.01.2008)
Conserved Domain Search	NCBI (National Center for Biotechnology Information), URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml</a> (Stand: 11.01.2008)

### **Modifikationen der Proteinsequenz**

MEMSAT3, PredictProtein und Prosite	ExpASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server, Swiss Institute of Bioinformatics, URL: <a href="http://www.expasy.ch/prosite">http://www.expasy.ch/prosite</a> (Stand: 11.01.2008)
NetNGlyc	Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, URL: <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc</a> (Stand: 11.01.2008)

### **Antigenizität**

Antigenic	EMBL-EBI (The European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute), URL: <a href="http://srs.ebi.ac.uk">http://srs.ebi.ac.uk</a> (Stand: 11.01.2008)
Predicting Antigenic Peptides	Molecular Immunology Foundation Bioinformatics, URL: <a href="http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html">http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html</a> (Stand: 11.01.2008)
Protean 4.00	DNASStar, Madison, WI, USA

### **Einmaligkeit der Sequenz im Zielorganismus**

Blastp nearly exact match	NCBI (National Center for Biotechnology Information), URL: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi</a> (Stand: 11.02.2008)
---------------------------	--

### 2.8.2 Kopplung von Peptiden an Trägerproteine

Die ausgewählten Peptide werden für die Immunisierung kovalent an ein hochmolekulares Trägerprotein gekoppelt. Die Kopplung mittels heterobifunktionaler Kopplungsreagenzien erfolgt über die Sulfhydrylgruppe des Peptides an Aminogruppen des Trägerproteins. Bei der Synthese werden die ausgewählten Peptide N-terminal um zwei 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure-Moleküle sowie als N-terminal endständiger Aminosäure um ein zusätzliches Cystein verlängert. Der C-Terminus wird amidiert. Die zwei 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure-Reste dienen einerseits einer erhöhten Löslichkeit in wässrigen Systemen und andererseits begünstigt die leichtere Zugänglichkeit der Peptidsequenz aufgrund des größeren Abstandes die Antikörper-Peptid-Interaktion. Die C-terminale Amidierung der Peptide verhindert das Auftreten einer physiologisch am Protein nicht vorhandenen negativen Ladung. Bei der Immunisierung sind nur die bei der Synthese erzeugten Peptide voller Länge von Interesse. Daher wird im Rahmen der Synthese nach jedem Aminosäurekopplungsschritt eine Acetylierung durchgeführt, wobei nicht umgesetzte Vorstufen für die weiteren Aminosäurekopplungsschritte blockiert werden. Aus dem selben Grund geschieht die Einbringung der N-terminalen Aminosäure Cystein als letzter Schritt der Synthese. Durch die Kopplung der Peptide mittels der Sulfhydrylgruppe des N-terminalen Cysteins erreicht man, neben einer definierten räumlichen Kopplung über den N-Terminus, gleichzeitig eine Aufreinigung der Peptide, da die acetylierten Abbruchsequenzen aus der Synthese nicht gekoppelt werden können.

Um das Trägerprotein KLH zu präaktivieren wird 60 mg KLH (10 mg/ml gelöst in PBS) ( $M_r = 400$  kDa, d.h. 150 nmol) mit dem ~425 fachen molaren Überschuß an sulfo-MBS (~65  $\mu\text{mol}$  (~27mg) gelöst in 600  $\mu\text{l}$  PBS) umgesetzt. Dies wird der KLH-Lösung langsam unter schütteln in sechsmal 100  $\mu\text{l}$  zugegeben und auf dem Taumelroller für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation mit 4200 g für 5 Minuten wird aus dem Überstand das nicht gekoppelte Kopplungsreagenz mittels Gelfiltrationschromatografie abgetrennt (2.8.3.3).

Je Peptid werden ~10 mg aktiviertes KLH (25 nmol) vorgelegt und ~10 mg Peptid (~5  $\mu\text{mol}$ ) in 1 ml 10 % DMSO in 1 M HEPES pH 7.4, d.h. ein ~200 facher molarer Überschuß, zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Taumelroller inkubiert. Zur Lagerung bei +4-8 °C und zum Transport werden 0.01 % Natriumazid zugegeben. In dieser Form werden die Konjugate zur Immunisierung eingesetzt.

### 2.8.3 Aufreinigung der Antikörper aus Serum

#### 2.8.3.1 Herstellung der Affinitätsmatrix

Als Ausgangspunkt dienen fertig gepackte 1 ml Säulen, deren Matrix N-Hydroxysuccinimid aktivierte Sepharose über die aminoreaktiven Gruppen mit einem Trägerprotein belegt werden. Zur Kopplung von Peptiden an diese mit Trägerprotein belegte Matrix werden Peptide ohne Cystein innerhalb der Primärsequenz aber N-terminalem Cystein und amidiertem C-Terminus verwendet. Die Kopplung mittels heterobifunktionaler Kopplungsreagenzien erfolgt über die Sulfhydrylgruppe des Peptides an Aminogruppen des Trägerproteins.

Die Belegung der Säule erfolgt mittels einer Spritzenpumpe nach den Angaben des Herstellers, wobei die N-Hydroxysuccinimid aktivierte Sepharose nach Aktivierung mittels Aktivierungslösung mit 5 ml 20 % BSA in Belegungspuffer belegt und nach Deaktivierung mit Deaktivierungspuffer I und Deaktivierungspuffer II mit PBS gespült wird. Anschließend werden ~18 µmol sulfo-SMPB (~8 mg gelöst in 100 µl DMSO und 1000 µl PBS) zur Aktivierung des BSA für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf die Säule gegeben und anschließend mit PBS gewaschen. Die in 1 ml 5 mM EDTA in PBS gelösten ~5 µmol Peptid (~10 mg) werden mit 10 µl einer 250 mM TCEP in 5 mM EDTA in PBS Lösung (~2.5 µmol) für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Reaktionsgefäßeschüttler reduziert und zur Kopplung bei +4-8 °C über Nacht auf die Säule gegeben. Nach erneutem Spülen mit PBS wird die Säule in PBS 0.01 % Natriumazid bei +4-8 °C gelagert.

#### 2.8.3.2 Affinitätschromatografie

Zur Affinitätschromatografie mittels FPLC werden ~10 ml des aliquotierten Kaninchenserums aufgetaut und 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit einem Fluss von 0.2 ml/min auf die entsprechende mit PBS befüllte Affinitätssäule (2.8.3.1) gegeben. Nach dem Spülen mit 25 ml PBS (1 ml/min) werden die nächsten 20 Fraktionen von je 1 ml gesammelt, in die jeweils 150 µl Neutralisierungspuffer vorgelegt ist. Dazu werden 7 ml Elutionspuffer, 10 ml PBS und 7 ml Reinigungslösung sowie 10 ml PBS mit je 1 ml/min über die Säule gepumpt. Die Hauptfraktionen werden vereinigt und mittels Gelfiltrationschromatografie (2.8.3.3) in PBS umgepuffert.

#### 2.8.3.3 Gelfiltrationschromatografie

Auf der in der FPLC mit einem Fluss von 10 ml/min mit PBS betriebenen Gelfiltrationssäule werden die Proben aufgetrennt und in je 1 ml Fraktionen gesammelt, von denen die Hauptfraktionen vereinigt werden.

## 2.9 Biochemische Methoden

### 2.9.1 Denaturierende Lyse von Gewebe- und Zelllinienproben

Die tiefgefrorenen, soliden Gewebeproben, sowie die Zelllinienproben werden bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um ein Auftauen der Proben während der Prozedur zu verhindern, werden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Ebenso werden alle verwendeten Geräte in flüssigem Stickstoff vorgekühlt.

Die Gewebe werden in Kryovials eingewogen, mit einer Mahlkugel versehen und für 90 Sekunden in einem Schüttelbehälter mittels eines Mikro-Dismembrators bei 2000 rpm pulverisiert. Zur Lyse wird der achtfache Überschuss an denaturierendem Lysepuffer zugegeben und die Kryovials für 30 Minuten auf einem Taumelroller inkubiert bevor das Ly-sat in Standard Reaktionsgefäße überführt wird.

Zu den trockenen Zellpellets der Zelllinienproben wird je  $1\text{ }\mu\text{l}$  Lysepuffer auf  $5 \times 10^4$  Zellen zugegeben. Die Standard Reaktionsgefäße werden im Reaktionsgefäßeschüttler bei  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 1400 rpm für 30 Minuten inkubiert.

Die Lysate in den Standard Reaktionsgefäßen werden bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten mit 16000 g zentrifugiert. Die Überstände werden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lysate sowie die Pellets werden bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der zu untersuchenden Lysate wird mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Die Bestimmung wird in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei werden in einer Verdünnungsreihe Rinder Serumalbumin als Standardprotein im Bereich von  $25\text{ }\mu\text{g/ml}$  bis  $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ , sowie ein Reagenzien-Leerwert mitgeführt. Je  $10\text{ }\mu\text{l}$  des Standards und der Lysate (in einer Verdünnung von 1:20) werden mit  $300\text{ }\mu\text{l}$  Bradford Reagenz versetzt und nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Spektrometer bei  $570\text{ nm}$  die Absorption gemessen.

### 2.9.3 Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wird das Prinzip der diskontinuierlichen denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Experimentell wurde die Gelelektrophorese in dieser Arbeit mit dem Lithiumdodecylsulfat-NuPAGE-Gelelektrophorese-System der Firma Invitrogen durchgeführt. Die aufzutrennenden Proben werden entsprechend der zu ladenden Proteinmenge und des Volumens mit 4x Probenpuffer und 1:10 mit 10x Reduktionsmittel versetzt. Alle gemeinsam auf einem Gel aufgetragenen Proben werden zudem bei

gleichem Volumen auf einen konstanten Anteil Lysepuffer eingestellt. Zur Denaturierung wird 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Es werden 4-12 % Bis-Tris-Polyacrylamid-Gradientengele (Dicke 1 mm) mit den MES oder MOPS Laufpuffern verwendet. Der inneren Kammer werden 500 µl Antioxidanz zugesetzt. Während der Elektrophorese beträgt die Spannung konstant entweder 150 oder 200 V. Die Stromstärke ergibt sich zu 40-120 mA. Die Laufzeit beträgt ca. 50 oder 70 Minuten. Zur Größenreferenzierung werden in mindestens einer Spur 5 µl eines Protein-Größenstandard aufgetragen.

### 2.9.4 Western Blot

#### 2.9.4.1 Proteintransfer auf Membranen

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden zur weiteren Analyse in einer Blot-Apparatur elektrophoretisch auf eine Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer auf Nitrocellulose Membranen erfolgt in Transferpuffer-NC mit 10 % Methanol für eine Stunde bei konstant 30 V. Die Stromstärke ergibt sich zu ca. 150 mA. Der Transfer auf PVDF Membranen erfolgt in 1x Transferpuffer-PVDF mit 20 % Methanol für eine Stunde bei konstant 100 V. Die Stromstärke ergibt sich zu ca. 390 mA.

#### 2.9.4.2 Protein Nachweis

Die reversible Färbung der Proteine mit Ponceau S auf den Western Blot Membranen dient der Transferkontrolle. Die Membranen werden für 5 Minuten auf einem Orbitalschüttler in Ponceau S-Lösung inkubiert und mehrfach mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Gegebenenfalls wird die Färbung mit der Kodak Image Station 440 CF dokumentiert. Durch mehrfaches Waschen in TBST werden die Membranen vollständig entfärbt.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wird die Membran mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur liegend in einer Wanne auf einem Orbitalschüttler in TBST 3 % BSA inkubiert. Anschließend wird zweimal für je 5 Minuten mit TBST gewaschen. Erfolgt die Antikörper-Inkubation nicht umgehend, so werden die Membranen zwischen Filterpapieren getrocknet und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Vor der Verwendung werden sie in TBST rehydriert.

Zur Antikörper-Inkubation wird die Membran mit 4 ml entsprechend verdünntem Primärantikörper in TBST 1 % BSA über Nacht bei +4-8 °C auf einem Taumelroller in einem 50 ml Gefäß inkubiert. Es folgt ein Spülen und fünf Waschschrte für je 5 Minuten mit 10 ml TBST. Die Membran wird dann mit 4 ml entsprechend verdünntem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Zweitantikörper in TBST 1 % BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumelroller in einem 50 ml Gefäß inkubiert. Es folgt ein Spülen und fünf Waschschrte für je 5 Minuten mit 10 ml TBST. Zur Detektion wird die Membran mit 4 ml ECL

Entwicklungslösung für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumelroller in einem 50 ml Gefäß inkubiert. Die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase oxidiert das zyklische Diacylhydrazid Luminol unter Lichtemission ( $\lambda = 425 \text{ nm}$ ), die mit der Kodak Image Station 440 CF dokumentiert wird. Die Bildauswertung erfolgt mit ImageJ und Adobe Photoshop.

Zur Inkubation weiterer Antikörper auf einer bereits verwendeten Western Blot Membran, zum Beispiel zur Ladekontrollfärbung mittels  $\beta$ -Actin, wird die Membran direkt nach der Dokumentation der ECL-basierten Lichtemission weiter behandelt. Es folgt ein Spülen und drei Waschschritte für je 5 Minuten mit 10 ml TBST. Die Membran wird dann bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 20 ml der Stripping Reagenz auf einem Taumelroller inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit je 10 ml TBST wird zur erneuten Blockierung unspezifischer Bindungen zweimal für 5 Minuten in 10 ml TBST 3 % BSA auf dem Taumelroller inkubiert. Nachfolgend wird die erneute Antikörper-Inkubation wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 2.9.4.3 Peptid Konkurrenz zum Spezifitätsnachweis

Zur Konkurrenz der spezifischen Antikörperbindung werden Peptide verwendet, die als 1 mg/ml Lösung in Antikörper-Konkurrenzpuffer angesetzt werden. Dabei bezieht sich die Konzentration auf den Anteil des gewünschten Peptides, korrigiert anhand der in der Synthese erzielten Reinheit. Je Ansatz werden 0.25  $\mu\text{g}$  Antikörper in 100  $\mu\text{l}$  1 % BSA in TBST mit 10  $\mu\text{l}$  der 1 mg/ml Konkurrenzlösung oder dem entsprechenden Volumen Antikörper-Konkurrenzpuffer ohne Peptid für 90 Minuten im Reaktionsgefäßeschüttler bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Zur Antikörper-Inkubation werden die Ansätze in 2.5 ml 1 % BSA in TBST gegeben und entsprechend 2.9.4.2 weiter behandelt.

#### 2.9.4.4 Western Blot für die Charakterisierung von Antikörpern

Für die Antikörpercharakterisierung werden bei der Gelelektrophorese Gele mit einer Spur für den Protein-Größenstandard und einer großen Probentasche (400  $\mu\text{g}$  Protein) angefertigt (2.9.3). Nach Western Blot auf Nitrocellulose (2.9.4.1) und Ponceau S Färbung werden die Membranen blockiert (2.9.4.2). Oben und unten durch Linien markiert und in rund 30  $\sim$ 1.5 mm schmale Streifen geschnitten werden die Membranen nach dem Trocknen bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Um für die Antikörpercharakterisierung auf mehreren Proben gleichzeitig inkubieren zu können, werden mehrere Streifen von verschiedenen Gelen in definierter Reihenfolge nebeneinander auf eine Folie geklebt und mit Antikörpern inkubiert (2.9.4.2). Die Inkubation wird in 15 ml Gefäßen durchgeführt. Es werden 2.5 ml Primär- und Sekundärantikörperlösung sowie ECL Entwicklungsreagenz verwendet. Gewaschen wird mit je 5 ml.

Da den Nitrocellulose Streifen Markierungen für die Protein-Größenstandards fehlen, werden die erhaltenen Bildinformationen mittels ImageJ und Adobe Photoshop unter Verwendung der Markierungslinien und dem nach der Ponceau S Färbung erzeugten Bild grafisch mit entsprechenden Markierungen versehen.

### **2.9.5 Fluoreszenz-Markierung von Proteinen**

Zur Markierung von Proteinen mit dem Fluorophor Alexa647 wird der aminoreaktive Aktivester NHS-Alexa647 verwendet.

Um BSA mit einem mehrfachen, molaren Farbstoffüberschuß zu modifizieren, wurden 500 µl einer 2 mg/ml BSA-Lösung mit 50 µl eines 1 M Natriumbicarbonat Puffers versetzt. Die Lösung wurde zu einem Aliquot des aminoreaktiven Farbstoffes NHS-Alexa647 (Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit, Invitrogen) gegeben. Die Reaktion erfolgte für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter stetigem Rühren. Nicht reagierter, freier Farbstoff wurde mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule abgetrennt. Das Eluat (~520 µl in PBS) wurde in Aliquots von 10 µl bei -20 °C gelagert.

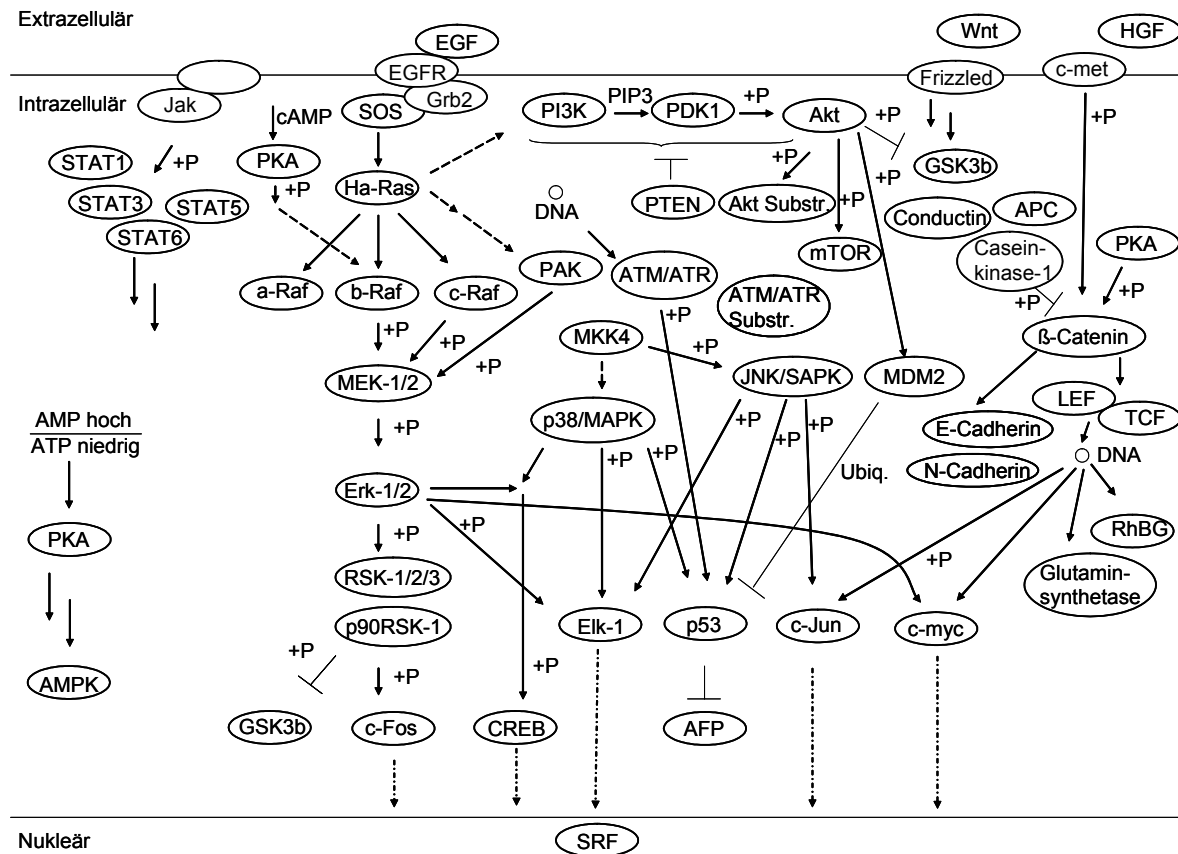


### 3 Ergebnisse

Veränderungen an der Erbinformation einzelner Zellen und damit auch Veränderungen der exprimierten Proteine sind ein initialer Schritt bei der Entstehung von Tumoren. Im Laufe der Krebsentstehung erlangen die initiierten Zellen die Fähigkeit mindestens sechs zelluläre Prozesse zu deregulieren. Hierzu werden in den Tumorzellen die Expression und posttranslationalen Modifikationen von Proteinen verändert, was sich auf regulatorische Prozesse auswirkt. Diese Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe auf Proteinebene zu detektieren ist notwendig, um die Auswirkungen von genetischen Veränderungen auf die komplexen zellulären Regulationsmechanismen zu erfassen und deren Interaktionen zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Proteinen und ihrer modifizierten Formen in murinen Lebertumor- und Lebernorgangewebe untersucht. Die Gewebeproben wurden in einem Maus-Lebertumormodell mittels chemischer Mutagenese und zum Teil mit nachfolgender Promotion erzeugt. Die erhaltenen Tumore wiesen Mutationen in den Genen für *Ctnnb1*, *Ha-ras* und *B-raf* auf. Diese Proteine sind zentrale Komponenten zweier wichtiger Signaltransduktionswege, im Falle von Ha-Ras und B-Raf des Erk/MAPK-Signalweges und bei  $\beta$ -Catenin des Wnt-Signalweges. Daher lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den an der Signaltransduktion des Erk/MAPK- und des Wnt-Signalweges beteiligten Proteinen. Um eine breite Abdeckung der wichtigen Signaltransduktionswege zu erhalten, wurden darüber hinaus Analyten aus dem Jak/STAT-, p38/MAPK-, JNK/SAPK- und mTOR-Signalweg, sowie Zell-Zellinteraktions- und Proliferationsmarker betrachtet.

Die Expressionsanalyse einer großen Anzahl von Proteinen, hier bis zu 116 Analyten in einem Experiment, aus den murinen Lebertumoren stellt spezielle Anforderungen an die verwendete Methode. Die Expressionsanalyse im Western Blot erfordert eine größere Menge an Probenmaterial und ist somit in ihrer Fähigkeit, eine hohe Anzahl an Analyten zu bestimmen, limitiert. Zudem schränkt die geringe Sensitivität und schlechte Linearität der Methode die Aussagekraft der Ergebnisse ein. Die Verwendung der dem Dot Blot ähnlichen miniaturisierten Methode des Planaren Reversen Protein-Mikroarrays erlaubt hingegen eine sehr sensitive und über einen großen Bereich lineare Bestimmung der Proteinexpression, auch aus kleinsten Probenmengen heraus. Zudem ermöglicht sie eine parallele Analyse mehrerer Dutzend Proben in einem Experiment in semiquantitativer Weise. In Abbildung 3.1 ist ein Großteil der untersuchten Proteine und deren Interaktionen in einer vereinfachten schematischen Darstellung abgebildet.



**Abbildung 3.1 Schemazeichnung von Interaktionen in dieser Arbeit analysierter Proteine.**

Vereinfachte schematische Darstellung der meisten in der Proteinexpressionsanalyse untersuchten Proteine und einer Vielzahl ihrer Interaktionen. Pfeile ( $\downarrow$ ) bedeuten aktivierende und Striche mit Querbalken ( $\perp$ ) bedeuten inhibierende Einflüsse. Phosphorylierungen sind durch +P symbolisiert. Die Namen der Proteine richten sich nach den von der „Signal Transduction Knowledge Environment“ der „American Association for the Advancement of Science“ verwendeten Bezeichnungen und Synonyme (URL: <http://stke.sciencemag.org/cm> (Stand: 08.02.2008)).

Der Planare Reverse Protein-Mikroarray mußte im Rahmen dieser Arbeit für die Verwendung von Geweben und der damit auftretenden Heterogenität der Probenmatrix angepasst werden. Hierzu wurde eine Methode zur Bestimmung der tatsächlich auf dem Mikroarray-Substrat immobilisierten Proteinmenge entwickelt, um eine Normalisierung der Signale zu ermöglichen.

Bei Proteinexpressionsanalysen spielt die Spezifität der eingesetzten Fänger-moleküle eine entscheidende Rolle für die erhaltenen Ergebnisse und deren Aussagekraft. Daher wurden alle im Rahmen dieser Arbeit neu hinzugekommenen Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität charakterisiert. In einem Fall wurde ein Antikörper selbst hergestellt, da kein geeigneter verfügbar war.

## 3.1 Nachweis des G-Protein-gekoppelten Rezeptors 49

*Cttnb1*-mutierte Lebertumore des Menschen und der Maus weisen auf mRNA-Ebene eine Reihe von verändert exprimierten Genen auf. Dazu zählen neben der Glutaminsynthetase und dem Rhesus Blutgruppe B Glycoprotein (RhBG) auch der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 49 (Gpr49). Dieser Rezeptor, für den weder Funktion noch Ligand bekannt sind, wurde als signifikant, um Faktoren von 10-13, aufregulierter Analyt gefunden (Stahl *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2003). Im Rahmen der Proteinexpressionsanalyse von Maus-Lebertumoren war neben den in *Cttnb1*-mutierten Tumoren etablierten Markerproteinen Glutaminsynthetase (Christa *et al.*, 1994; Loeppen *et al.*, 2002) und RhBG (Stahl *et al.*, 2005) auch die Gpr49-Expression von großem Interesse. Da für den Nachweis mittels Western Blot oder des Planaren Reversen Protein-Mikroarrays kein für murines Gewebe tauglicher Antikörper zur Verfügung stand, wurde ein polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Gpr49 erzeugt.

### 3.1.1 Generierung eines polyklonalen Kaninchenantikörpers

#### 3.1.1.1 Immunisierungsstrategie: Auswahl von Peptidepitopen

Bei der Auswahl von zur Immunisierung geeigneten Peptidepitopen müssen mehrere Kriterien berücksichtigt werden. Spezifische Antikörper für das gewünschte Protein können nur dann entstehen, wenn das gewählte Peptidepitop für dieses Protein einmalig ist. Posttranslationale Modifikationen der primären Aminosäuresequenz *in vivo* würden Einfluss auf die Antigen-Antikörper-Interaktion eines gegen die lineare primäre Aminosäuresequenz gebildeten Antikörpers nehmen, und sind zu vermeiden. Ein grundsätzlicher Anspruch an das gewählte Peptidepitop ist dessen Antigenizität, die maßgeblich für die ausgelöste Immunantwort ist.

Unter Berücksichtigung dieser Kriterien wurden zur Generierung Western Blot tauglicher Antikörper drei kurze Peptide, mit 10 bis 20 Aminosäuren Länge, aus der Sequenz des Gpr49 ausgewählt (2.8.1). Aufgrund der notwendigen Einmaligkeit wurden die erwarteten Bereiche der Transmembrandomänen des Gpr49 (McGuffin *et al.*, 2000; Rost *et al.*, 2004), die eine Region mit sehr hoher Ähnlichkeit in der Familie der Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren darstellt, von vornherein ausgeschlossen. Bei der Auswahl wurden bekannte und mit *in silico* Methoden bestimmte posttranslational modifizierbare Bereiche (Hulo *et al.*, 2006; Rost *et al.*, 2004) vermieden. Aus den verbleibenden Bereichen wurden aufgrund der Antigenizitätsvorhersage (Kolaskar und Tongaonkar, 1990) drei Peptide ausgesucht, wobei zusätzlich noch die Synthetisierbarkeit und Löslichkeit der Peptide in wässrigen Systemen Einfluss auf die Auswahl nahmen. Die zugrunde gelegte Sequenz des Gpr49 war der Eintrag „LGR5\_MOUSE“ (Akzessionsnummer

„Q9Z1P4“, Version 1 vom 1. Mai 1999, UniProt Datenbank des Schweizer Instituts für Bioinformatik (SIB)). Anhand dieser Sequenz mit einer Länge von 907 Aminosäuren wurden die drei Peptide ausgewählt. Diese sind in Tabelle 3.1 mit ihrer Aminosäuresequenz, der Position der Sequenz im Protein und dem in dieser Arbeit verwendeten Bezeichner dargestellt.

**Tabelle 3.1 Sequenzen der Peptide zur Generierung eines anti-Maus-Gpr49-Antikörpers.**

Bezeichner, Aminosäuresequenzen sowie Position im Protein der zur Immunisierung in Kaninchen ausgewählten Peptide des G-Protein-gekoppelten Rezeptor 49 der Maus (UniProt, Eintrag: LGR5\_MOUSE, Version 1).

Bezeichner	Sequenzposition	Sequenz
Gpr49(316-330)	316-330	SHITEFPHLTGTATL
Gpr49(870-887)	870-887	SFTHASIAYDLPSTSGAS
Gpr49(888-904)	888-904	PAYPMTESCHLSSVAFV

### 3.1.1.2 Immunisierung mit an Trägerprotein gekoppelten Peptiden

Zur Immunisierung werden die Peptide an ein hochmolekulares Trägerprotein gekoppelt. Dazu wurden die Peptidsequenzen in Tabelle 3.1 in C-terminal amidierter und am N-Terminus um zwei 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure-Reste und ein Cystein verlängerter Form synthetisiert (Arbeitsgruppe Dr. Dieter Stoll, NMI). Die zwei 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure-Reste dienen einer verbesserten Löslichkeit in wässrigen Systemen und als Abstandhalter der eigentlichen Peptidsequenz vom Trägerprotein mit dem Zweck einer verringerten sterischen Hinderung der Antikörperbindung. C-terminale Amidierung von Peptiden führt zum physiologisch korrekten nicht geladenen Zustand der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure. Über die Sulfhydrylgruppe des N-terminalen Cystein wurden die Peptide mittels des heterobifunktionalen Kopplungsreagenz MBS an *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH) als Trägerprotein gekoppelt (2.8.2). Diese Konjugate wurden zur Immunisierung eingesetzt (Pineda - Antikörper-Service (Berlin)).

### 3.1.1.3 Aufreinigung der Antikörper über Affinitätschromatografie

Bei der Generierung von Antikörpern mit an Trägerproteinen gekoppelten Peptiden werden, im Rahmen der Immunantwort, Antikörper gegen die Peptide, das Trägerprotein, das Kopplungsreagenz sowie Kombinationen daraus gebildet. Diese Kreuzreaktivitäten gegen unerwünschte Epitope können durch affinitätschromatografische Aufreinigung der gewünschten, nur das Immunisationspeptid erkennenden, Antikörper vermieden werden. Daher wird bei der Säulenbelegung das Trägerprotein sowie das Kopplungsreagenz gewechselt.

Die erhaltenen Kaninchenserum wurden daher über eine Affinitätssäule aufgereinigt, die die zur Immunisierung verwendeten Peptide trägt. Für zwei der drei Peptide (Gpr49(316-330) und Gpr49(870-887)) wurden Affinitätssäulen hergestellt. Basierend auf N-Hydroxysuccinimid aktivierter Sepharose wurde Rinderserumalbumin als Trägerprotein gebunden und dann mittels einer alternativen Kopplungschemie (SMPB) mit den auch zur Immunisierung verwendeten Peptiden belegt (2.8.3.1). Für Gpr49(888-904) ließ sich aufgrund von Löslichkeitsproblemen des Peptids keine Affinitätssäule herstellen, daher wurde auf eine Aufreinigung dieser Seren verzichtet.

Die Affinitätssäulen wurden zur Aufreinigung der je drei Seren pro Peptid verwendet (2.8.3.2). Nach Elution der gebundenen Antikörper durch pH-Wertsveränderung auf pH 2.5 wurden die vereinigten Hauptfraktionen über Gelfiltrationschromatografie in PBS umgepuffert (2.8.3.3). Die Lagerung der Antikörperlösungen erfolgte nach Zusatz von 50 % (v/v) Glycerol bei -20°C.

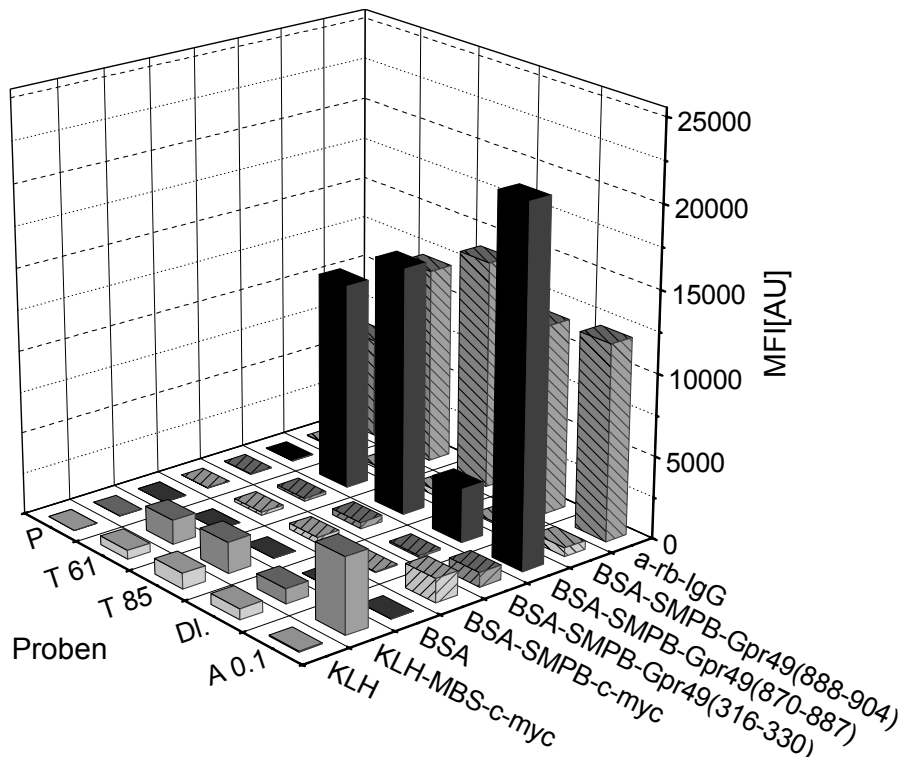
### 3.1.2 Nachweis der Reaktivität und Spezifität der Antikörper

Zum Nachweis der Generierung und Aufreinigung der Antikörper wurden die Serumproben und die erhaltenen affinitätsgereinigten Antikörperlösungen auf Reaktivität mit verschiedenen Kombinationen aus Trägerprotein, Kopplungsreagenz und Peptid hin untersucht. Zur Bestimmung der Reaktivitäten wurde ein multiplexes Assaysystem verwendet, bei dem farbkodierte Mikrosphären als feste Phase zum Einsatz kommen.

Die Trägerproteine (KLH oder BSA) oder ein gegen Kaninchen-IgG gerichteter Antikörper wurden über aminoreaktive Gruppen auf den Mikrosphären immobilisiert. Kombinationen jeweils eines der drei Gpr49 oder eines Kontrollpeptides (Aminosäuren 410-419 des humanen c-myc) wurden mit einem der heterobifunktionalen Kopplungsreagenzien (MBS oder SMPB) auf die Trägerproteine gebunden (2.6.2.1). Die so belegten Mikrosphären wurden in einem gemeinsamen Ansatz in den zu bestimmenden Lösungen inkubiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die gebundenen Antikörper mit einem Fluoreszenzmarkierten, gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper detektiert (2.6.2.2).

Abbildung 3.2 zeigt die Reaktivitäten für ein Tier, das mit Peptid 2 immunisiert wurde. Verschiedene Seren, von vor der Immunisierung (P), vom Immunisierungstag 61 (T61), vom Immunisierungstag 85 (T85) und dem Durchlauf der Affinitätssäule (DI.), wurden eingesetzt. Die erhaltenen Signalwerte zeigen, dass im Laufe der Immunisierung die Reaktivität gegen das eingesetzte Peptid Gpr49(870-887) deutlich ansteigt. So ist im Präimmunsersum keine, in den beiden weiteren Seren der Immunisierungstage 61 und 85 jedoch eine sehr starke Reaktivität gegen das BSA-SMPB-Gpr49(870-887) Konjugat zu finden. Diese nimmt im Durchlauf der Affinitätssäule aufgrund der Bindung dieser Antikörper an die Affinitätsmatrix drastisch ab und findet sich in der eluierten Antikörperlösung wieder. Dies

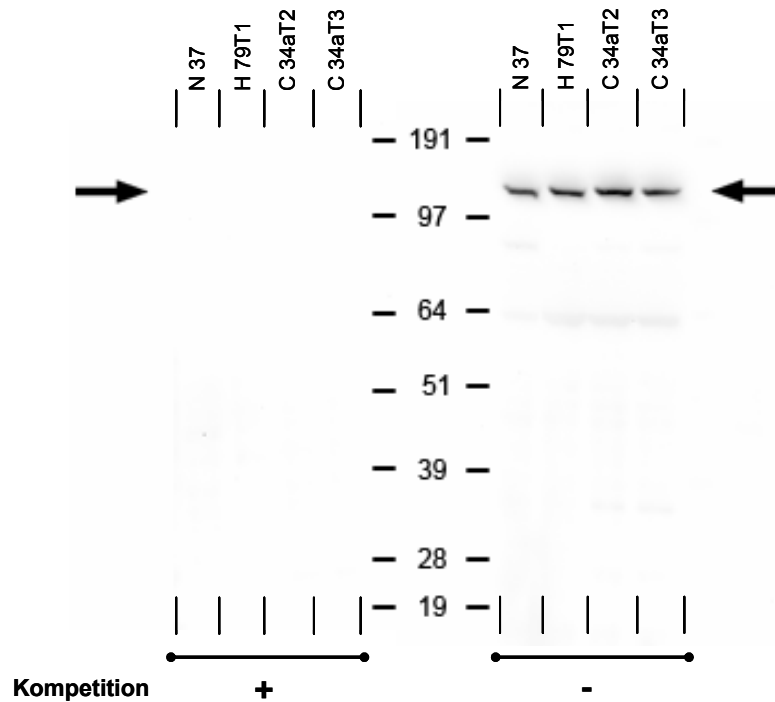
bedeutet eine erfolgreiche Aufreinigung. Obwohl sich keine Reaktivitäten gegen das Trägerprotein BSA an sich zeigen, werden Antikörper mit Reaktivitäten gegen das Kopplungsreagenz SMPB, wohl aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu dem bei der Immunisierung verwendeten MBS, bei der Affinitätsreinigung mit aufgereinigt. Dies zeigt sich auch an den detektierten Signalen der mit Kontrollpeptiden belegten Mikrosphären (z.B. BSA-SMPB-c-myc). Gleiches gilt für das zur Immunisierung eingesetzte Trägerprotein KLH, das zwar im Rahmen der Immunisierung auch Reaktivitäten erzeugt, aber in der mit MBS-c-myc konjugierten Form deutlich stärkere Signale liefert. Während die Reaktivität gegen KLH nach Affinitätsreinigung nicht mehr zu detektieren war, nahm die KLH-MBS-c-myc Reaktivität zu. Somit scheint das Kopplungsreagenz MBS ein potentes Immunogen zu sein. Die gegen MBS gebildeten Antikörper werden über SMPB mit aufgereinigt.



**Abbildung 3.2 Mikrosphären-basierter Protein-Mikroarray zum Reaktivitätsnachweis eines polyklonalen Kaninchen-anti-Maus-Gpr49-Antikörpers.**

Bestimmung der Reaktivitäten gegen verschiedene Kombinationen aus Trägerprotein (KLH, BSA), Kopplungsreagenz (MBS, SMPB) und Peptiden in Seren eines mit BSA-SMPB-Gpr49(870-887) immunisierten Kaninchens. Die auf Mikrosphären gekoppelten Kombinationen wurden in Seren, von vor der Immunisierung (P), vom Immunisierungstag 61 (T61) und 85 (T85), dem Durchlauf der Affinitätssäule (DI.) und des affinitätsgereinigten Eluats (A 0.1) inkubiert. Die Seren (P, T61, T85, DI.) wurden 1:100000 verdünnt und die affinitätsgereinigte Antikörperlösung (A 0.1) wurde mit 0.1 µg/ml verwendet. Die mit dem Antikörper gegen Kaninchen-IgG belegten Mikrosphären dienen zur Kontrolle der eingesetzten Serummenge. Gebundene Kaninchenantikörper wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Esel-anti-Kaninchenantikörpern detektiert.

Zusätzlich zu dieser Mikrosphären-basierten Kontrolle der erhaltenen Reaktivitäten wurden die aufgereinigten Antikörper auch im Western Blot getestet. Hierzu wurden die Antikörper einmal mit und einmal ohne dem zur Immunisierung verwendeten Peptid vorinkubiert und im Western Blot nach Inkubation auf Maus-Lebergewebebeurproben detektiert.



**Abbildung 3.3 Western Blot mit Peptidkompetition zum Reaktivitätsnachweis eines polyklonalen Kaninchen-anti-Gpr49-Antikörpers.**

Inkubation eines affinitätsgereinigten polyklonalen anti-Maus-Gpr49-Antikörpers eines mit BSA-SMPB-Gpr49(870-887) immunisierten Kaninchens im Western Blot. Der Antikörper wurde nach Vorinkubation mit oder ohne dem zur Immunisierung verwendeten Konkurrenzpeptid eingesetzt. Pfeile kennzeichnen das Molekulargewicht der erwarteten Bande bei 120 kDa. Je Spur wurden 10 µg Protein der Lysate von Maus-Lebernorgewebe (N 37), Ha-*ras*-mutiertem (H 79T1) und *Ctnnb1*-mutiertem (C 34aT2, C 34aT3) Maus-Lebertumorgewebe auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Nach Inkubation der Antikörper wurde Lumineszenz detektiert.

Zum Nachweis der Reaktivitäten der aufgereinigten Antikörper gegen denaturiert vorliegendes Gpr49 wurde Mausgewebe lysiert, mittels SDS-PAGE (2.9.3) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert (2.9.4.1). Hierbei handelte es sich um ein Lebernorgewebe (N 37), einen Ha-*ras*-mutierten (H 79T1) und zwei *Ctnnb1*-mutierte Lebertumore (C 34aT2 und C 34aT3). Die Antikörperinkubation erfolgte nach Vorinkubation der Antikörper mit oder ohne dem zur Immunisierung verwendeten Peptid (2.9.4.3). Abbildung 3.3 zeigt das Ergebnis dieser Inkubation des Antikörpers gegen Gpr49(870-887). Im Falle der Inkubation ohne vorherige Konkurrenz mit dem Immunisationspeptid detektiert der Antikörper

eine Bande bei der erwarteten Laufhöhe des Gpr49 von rund 120 kDa, sowie eine sehr schwache Nebenbande bei rund 63 kDa. Im Falle der Competition mit dem Peptid zeigt sich keines der beiden Signale mehr. Damit ist der generierte Antikörper Western Blot tauglich. Die Expressionsergebnisse, der hier verwendeten Proben, zeigten jedoch nicht die in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren auf mRNA-Ebene erwartete Überexpression von Gpr49 um rund Faktor 10, und stehen somit in Widerspruch zu diesen Ergebnissen (Stahl *et al.*, 2005).

## 3.2 Planare Reverse Protein-Mikroarrays

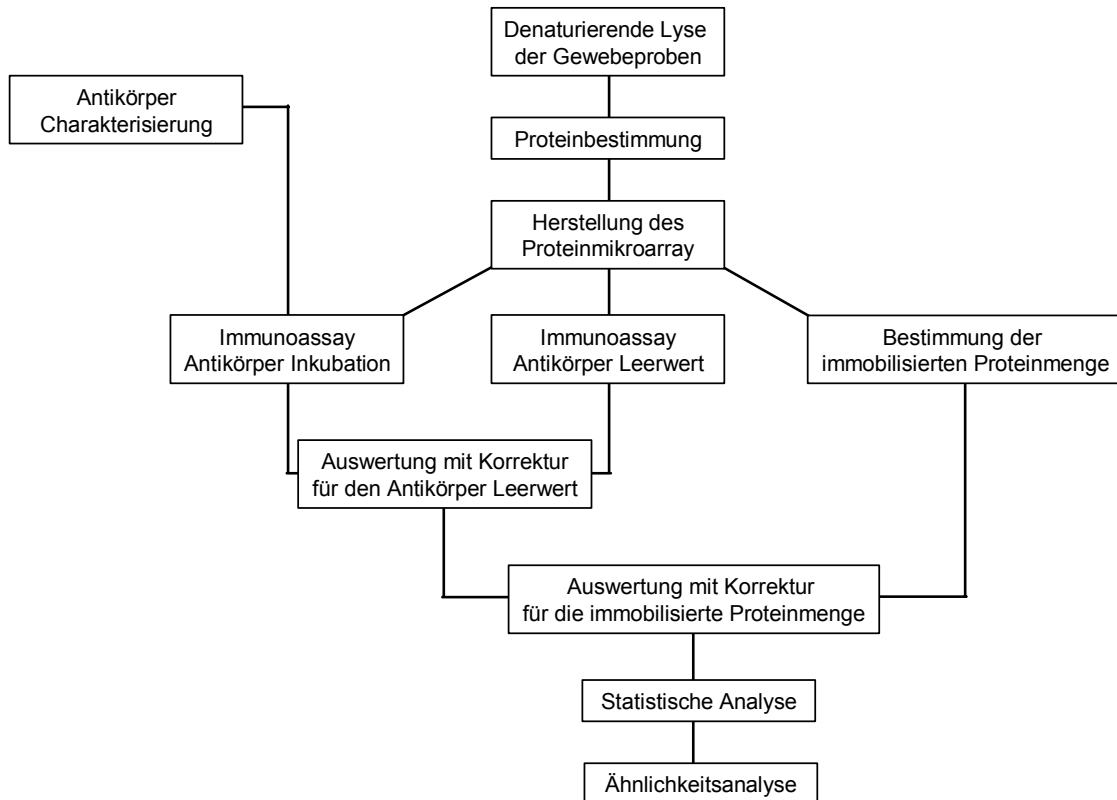
In dem jeweils nur in sehr geringen Mengen vorhandenen Material muriner Lebertumor- und Lebernorgewebe wurde die Expression von Proteinen und ihren modifizierten Formen (hauptsächlich phosphorylierte Formen) untersucht. Die in dieser Arbeit verwendete Methode des Planaren Reversen Protein-Mikroarrays erlaubte die notwendige Parallelität und Durchsatzfähigkeit, die zur Bestimmung einer großen Anzahl von Analyten (>100) aus 40 Gewebeproben notwendig ist. Die untersuchten Tumore wiesen Mutationen in den Genen für *Ctnnb1*, *Ha-ras* und *B-raf* auf. Diese Proteine sind zentrale Komponenten zweier wichtiger Signaltransduktionswege, im Falle von Ha-Ras und B-Raf des Erk/MAPK-Signalweges und bei  $\beta$ -Catenin des Wnt-Signalweges. Zur Analyse der veränderten Proteinexpression in diesen Tumor- und Normalgeweben bedurfte es ausgehend von den bereits etablierten Methoden zweier wesentlicher Anpassungen.

So wurde eine Methode zur Bestimmung der auf dem Mikroarray-Substrat tatsächlich immobilisierten Proteinmenge entwickelt. Bei der Verwendung von Gewebe und insbesondere von Tumoren als Probenmaterial für die Proteinexpressionsanalyse ist die große Heterogenität der Proben von besonderer Bedeutung. Neben Unterschieden in den intrazellulären Bestandteilen der Tumorzellen entsteht diese durch den Grad der Vaskularisierung sowie die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Die Proteinimmobilisierung auf der Oberfläche des Mikroarray-Substrates basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen. Die von Probe zu Probe unterschiedlichen Verhältnisse von zum Beispiel Protein zu lipophilen Verbindungen in den Lysaten bei gleicher absoluter Proteinkonzentration würde somit zur Immobilisierung unterschiedlicher Anteile des Proteins auf dem Mikroarray-Substrat führen. Verfälschte Proteinexpressionswerte wären die Folge. Die Varianzen bei der Proteinbestimmung der Lysate und die im Rahmen der Probenvorbereitung sich aufpotenzierenden Pipettierfehler sind nicht zu vernachlässigen und können Schwankungen bis zu 20 % bedingen. Die immobilisierte Proteinmenge kann daher deutlich unterschiedlich sein und Schwankungen um bis 50 % unterliegen. Zur Bestimmung korrekter Expressionswerte von Proteinen und ihrer modifizierten Formen bedarf es der Bestimmung der



auf dem Mikroarray-Substrat tatsächlich immobilisierten Proteinmenge und einer darauf basierenden Korrektur der in den Immunoassays erhaltenen Signale.

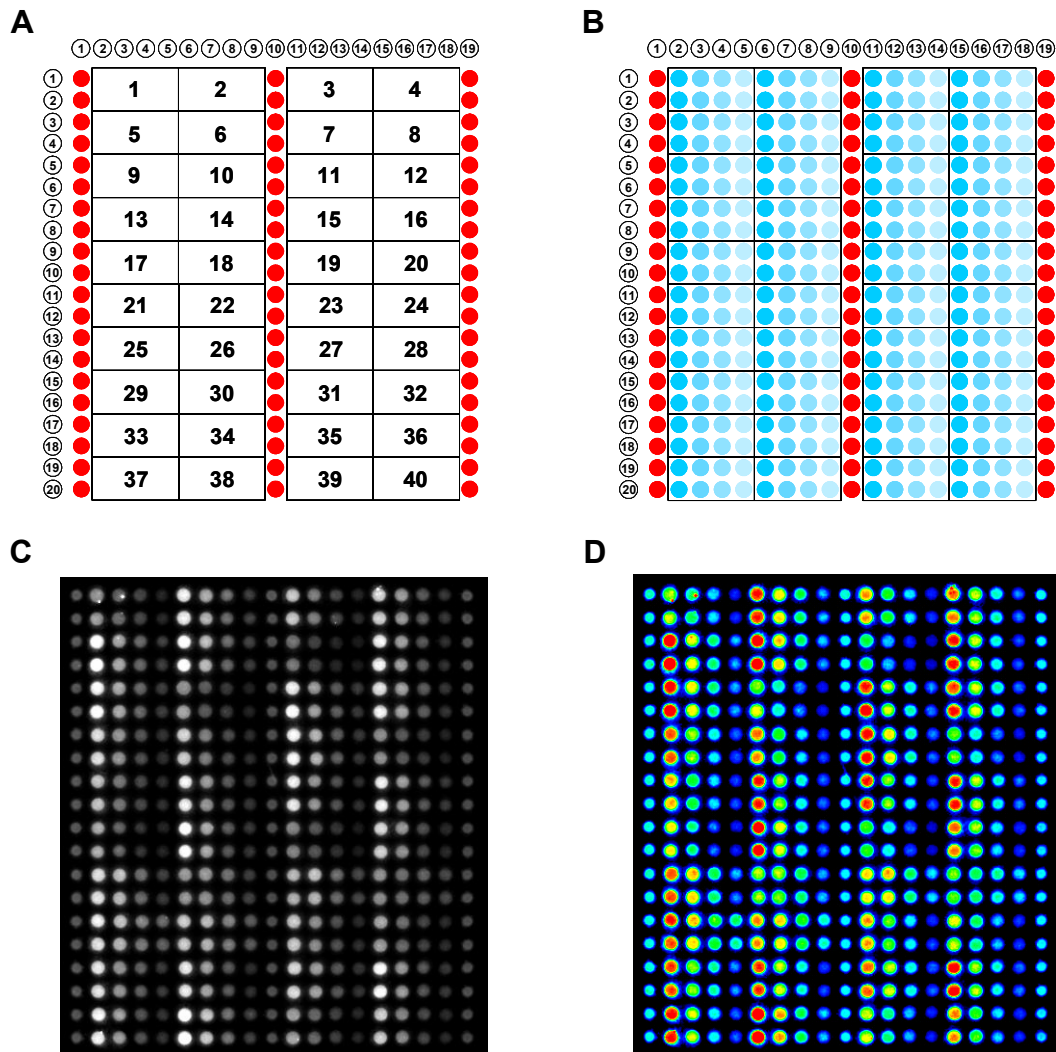
In Abbildung 3.4 ist die experimentelle Vorgehensweise der Proteinexpressionsanalyse mittels Planarer Reverser Protein-Mikroarrays als Flussdiagramm dargestellt.



**Abbildung 3.4 Flussdiagramm zur Veranschaulichung des experimentellen Vorgehens.**

Für die Proteinexpressionsanalyse mittels Reverser Protein-Mikroarrays ist die Qualität der verwendeten Antikörper von entscheidender Bedeutung. Anders als im Western Blot erfolgt bei dieser miniaturisierten Form eines Dot Blots keine Auftrennung anhand des Molekulargewichts. Der Schwerpunkt der in dieser Arbeit untersuchten Analyten lag auf den an der Signaltransduktion des Erk/MAPK- und des Wnt-Signalweges beteiligten Proteine. Da hierfür kaum charakterisierte Antikörper vorhanden waren, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit erstmals eingesetzten Antikörper mittels Western Blot auf ihre Spezifität hin charakterisiert.

In Abbildung 3.5 ist schematisch die Anordnung der 40 Proben auf einem Feld des Planaren Reversen Protein-Mikroarrays dargestellt. Des Weiteren zeigt die Abbildung ein Graustufenbild des Mikroarray-Substrates nach Antikörper-Inkubation und ein der Anschaulichkeit halber daraus generiertes Bild in Falschfarbendarstellung, in dem die Graustufen farbskaliert dargestellt sind (von hohen Grauwerten in rot über gelb, grün und blau zu niedrigen Grauwerten in türkis).



**Abbildung 3.5** Darstellung der Probenanordnung auf dem Planaren Reversen Protein-Mikroarray.

(A) Schematische Darstellung der Anordnung der 40 Proben auf einem Array-Feld von 19 x 20 Mikrospots. In rot dargestellt die Referenzen. (B) Jede Probe wird im Duplikat in vier Verdünnungsstufen (400, 252, 159, 100 µg/ml) aufgebracht. (C) Graustufenbild eines mit Antikörper inkubierten Sub-Arrays und (D) daraus generiertes Falschfarbendarstellung, in dem die Graustufen farbskaliert dargestellt sind (von hohen Grauwerten in rot über gelb, grün und blau zu niedrigen Grauwerten in türkis).

### 3.2.1 Charakterisierung von Antikörpern für die Verwendung in Planaren Reversen Protein-Mikroarrays

Beim Planaren Reversen Protein-Mikroarray erfolgt anders als im Western Blot keine Größenauffrennung der Analytmoleküle. Die Spezifität der zur Detektion der immobilisierten Proteine verwendeten Antikörper ist von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft der bestimmten Expressionswerte. So wurden alle im Rahmen dieser Arbeit neu eingesetzten Antikörper im Western Blot auf einer Lebernorgangewebeprobe einer C3H/HeJCrI Maus und zwei Maus-Lebertumorzelllinienproben (55.1c und 70.4) hinsichtlich ihrer Reaktivität charakterisiert. Aufgrund der benötigten Probenmaterialmenge konnten keine Maus-Lebertumorproben eingesetzt werden; die Lebertumorzelllinie 55.1c spiegelt jedoch mit der heterozygoten Mutation des *Ctnnb1* den Fall der mutierten Maus-Lebertumore wieder. Mit der im *P53*-Gen homozygot mutierten Lebertumorzelllinie 70.4 wurde die Diversität der verwendeten Proben und damit die Aussagekraft der Charakterisierung der Antikörper weiter erhöht.

#### 3.2.1.1 Western Blot zur Charakterisierung von Antikörpern

Zur Generierung der für die Antikörpercharakterisierung benötigten Western Blots wurden von jeder der drei denaturierend lysierten Proben (2.9.1) mehrere SDS-PAGE-Gele mit einer Spur für den Protein-Größenstandard und einer großen Probentasche angefertigt (2.9.4.4). Die erhaltenenen Membranen wurden im Bereich der Probentasche in ~1.5 mm breite Streifen geschnitten. Jeweils drei Streifen, für jede Probe einer, wurden gemeinsam in der Antikörperlösung inkubiert. Die Detektion erfolgte über die Lichtemission der mit Meerrettichperoxidase-gekoppelten Spezies-spezifischen Zweitantikörper. Die erhaltenen Bilder wurden anhand der oben und unten angebrachten Markierungen mittels Bildauswertung mit den Protein-Größenstandards versehen (2.9.4.4).

#### 3.2.1.2 Beurteilung der Spezifität und Qualität der Antikörper

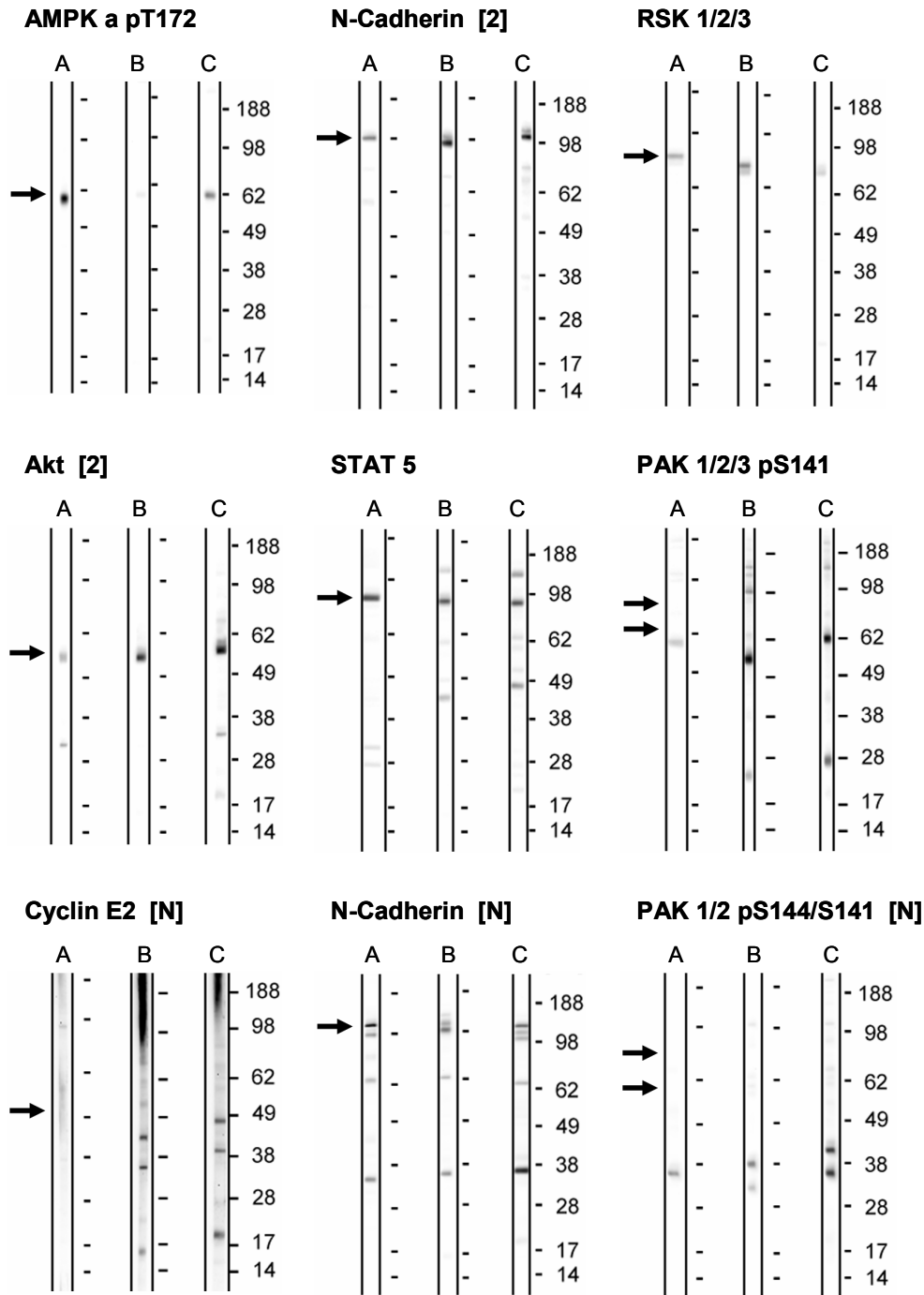
Die Verwendung von SDS-PAGE-Gelen mit einer breiten Probentasche, und die Möglichkeit rund 30 ~1.5 mm breite Nitrocellulosestreifen aus jedem Gel zu erhalten, erlauben die Inkubation einer großen Anzahl von Antikörpern auf identischem Probenmaterial. Dies macht die vergleichende Auswertung verschiedener, gegen das gleiche Antigen gerichteter Antikörper, deutlich leichter interpretierbar und aussagekräftiger.

Als Kriterien für die Bewertung der Antikörper wurden die Zahl und die Intensität der Proteinbanden und das Molekulargewicht herangezogen. Die Anzahl und Intensität zusätzlicher Proteinbanden, die bei einem anderen als dem erwarteten Molekulargewicht zu finden waren, spielte bei der Bewertung eine zentrale Rolle. Für die Einstufung der Ergebnisse wurden Kategorien eingerichtet: 1.) Antikörper mit erwarteten Proteinbanden des

korrekten Molekulargewichtes; nennenswerte Nebenbanden sind nicht zu sehen, 2.) wie 1.) aber mit einer oder mehreren schwachen zusätzlichen Nebenbanden, 3.) Antikörper ohne spezifische Proteinbande aber mit nennenswerten Nebenbanden, oder wie 2.) aber mit einer in der Summe aus Anzahl und Intensität der Nebenbanden dominierenden Signalintensität in den nicht spezifischen Banden und 4.) Antikörper, die auch bei sehr langen Detektionszeiten weder ein Signal beim erwarteten Molekulargewicht noch nennenswerte Nebenbanden lieferten. In dieser vierten Kategorie fanden sich besonders häufig Phosphorylierungs-spezifische Antikörper, die nach dieser Klassifikation zwar spezifisch waren, aber mangels phosphorylierter Proteine keine spezifische Proteinbande zeigen konnten. Die in Kategorie 3 eingestuften Antikörper wurden nicht im Planaren Reversen Protein-Mikroarray verwendet. In diesem einem miniaturisierten Dot Blot ähnlichen System wird nur ein Summensignal detektiert, hierbei kann keine Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Interaktion erfolgen. Antikörper der Kategorie 1, 2 und 4 wurden eingesetzt und im Rahmen der Auswertung der Planaren Reversen Protein-Mikroarrays entsprechend der Kategoriezugehörigkeit besonders achtsam kontrolliert.

Insgesamt wurden 155 Antikörper charakterisiert, von diesen kamen daraufhin 113 in den hier dargestellten Planaren Reversen Protein-Mikroarray-Experimenten zum Einsatz. Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse von Antikörper-Inkubationen auf den drei Mausproben mit Einstufungen in die Kategorien 1 bis 3. Im Falle der oberen drei Antikörper (AMPK a pT172, N-Cadherin [2], RSK 1/2/3) handelt es sich um die Kategorie 1, die zweite Zeile (Akt [2], STAT 5, PAK 1/2/3 pS141) stellt Ergebnisse der Kategorie 2 und die untersten drei Inkubationen (Cyclin E2 [N], N-Cadherin [N], PAK 1/2 pS144/S141 [N]) Ergebnisse der Kategorie 3 dar.

Zusätzlich zur Klassifizierung der Antikörper über Western Blot wurde die für die Inkubation eingesetzte Antikörpermenge in Relation zur Intensität des detektierten Signals gesetzt und hieraus die Verdünnung des Antikörpers für die Verwendung auf dem Planaren Reversen Protein-Mikroarray abgeleitet.



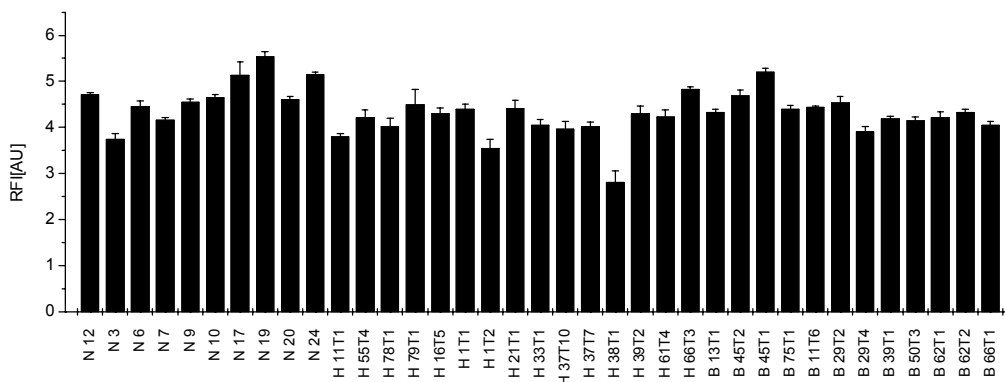
**Abbildung 3.6 Western Blot zur Charakterisierung von Antikörpern.**

(A) Maus-Lebernorgane (C3H/HeJCrI) und zwei Maus-Lebertumorzelllinien (B) 55.1c und (C) 70.4 Lysate wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Nach Inkubation der Antikörper wurde Lumineszenz detektiert. Die in der ersten Zeile dargestellten Ergebnisse entsprechen der besten Antikörper-Charakterisierungskategorie 1, die zweite Zeile stellt die mittlere Kategorie 2 und die dritte Zeile die schlechteste Kategorie 3 dar. Pfeile kennzeichnen das Molekulargewicht der erwarteten Bande(n). Die Molekulargewichte der Protein-Größenstandards sind in kDa angegeben. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

### 3.2.2 Nachweis der im Mikrospot immobilisierten Proteinmenge

Wie oben beschrieben musste aufgrund der Verwendung von Gewebe- und Tumorproben eine Nachweismethode zur Detektion der auf den Mikroarray-Substraten immobilisierten Proteinmenge etabliert werden. Die Integration dieses Nachweises in den Assayablauf sowie der Aufbau eines Immunoassay Systems mit integrierter Fehlerkorrektur für die unterschiedlichen immobilisierten Porteinmengen wurde umgesetzt. Damit wurde ein für die Proteinimmobilisierung intern kontrolliertes Assaysystem mit probenspezifischen Korrekturfaktoren aufgebaut.

Als Nachweis wurde ein Assay etabliert, bei dem nach dem Drucken und der Blockierung der Oberfläche eine kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an reaktiven Aminofunktionen vorgenommen wird (2.6.1.2). Somit konnte bei der Bestimmung der immobilisierten Proteinmengen, wie auch bei der Detektion der Immunoassaysignale, das gleiche Fluoreszenz-basierte Ausleseverfahren verwendet werden. Die Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge findet im Prozessablauf zum selben Zeitpunkt wie der Immunoassay auf dem Mikroarray-Substrat statt. Dies bedeutet, dass alle für den Immunoassay relevanten Einflussgrößen im Rahmen der Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge erfasst werden. Somit werden diese auch im Rahmen der integrierten Fehlerkorrektur berücksichtigt und kompensiert (2.6.1.4).



**Abbildung 3.7 Nachweis der im Mikrospot auf dem Mikroarray-Substrat immobilisierten Proteinmenge.**

Die in den Mikrospots immobilisierten Proteinmengen wurden nach Blockierung des Mikroarray-Substrates mit Tween-basiertem Blockierungspuffer durch Umsetzung mit aminoreaktivem Fluoreszenzfarbstoff (NHS-Alexa647) angefärbt. Die für die 37 Proben erhaltenen relativen Fluoreszenzsignale (RFI) dieser Proteinmengenbestimmung sind dargestellt. Von der Probe H 38T1 sind 35 % weniger Protein und von der Probe N 19 29 % mehr Protein als im Durchschnitt immobilisiert worden.

In Abbildung 3.7 ist das Ergebnis des Nachweises der immobilisierten Proteinmenge für 37 verschiedene Gewebeproben der in Kapitel 3.2.3.2 dargestellten Proteinexpressionsanalyse dargestellt. Dabei ist deutlich die Varianz der immobilisierten Proteinmenge zu erkennen. So ist von der Probe H 38T1 35 % weniger Protein und von der Probe N 19 29 % mehr Protein als im Durchschnitt immobilisiert worden.

### 3.2.3 Proteinexpressionsanalyse

In Maus-Lebertumoren wurde die Expression von Proteinen und ihren phosphorylierten oder aktivierten Formen im Vergleich zu Normalgewebe bestimmt. Die Gewebeproben waren in zwei experimentellen Studien erzeugt worden (Kapitel 2.4) und umfassten drei Klassen von Mutationen (*Ha-ras*, *B-raf*, *Ctnnb1*). Daher lag der Schwerpunkt der untersuchten Analyten auf den an der Signaltransduktion des Erk/MAPK- und des Wnt-Signalweges beteiligten Proteinen.

In der Proteinexpressionsanalyse kamen nach der Durchführung der Immunoassays, und Inkubation der Antikörper, rechnerische, grafische und statistische Methoden zur Auswertung zum Einsatz. Aus der Auswertung mit integrierter Fehlerkorrektur wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normalisierte und Hintergrund-korrigierte Antigen-spezifische Expressionswerte erhalten. Im Falle von Proteinen, für die Expressionswerte der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form vorlagen, konnten Verhältnisse aus phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Expressionswerten berechnet werden. Diese dienten in der Auswertung als ein indirektes Maß für die relative Aktivität eines Antigens. Bei der Visualisierung einer großen Anzahl von Expressionswerten in einem gemeinsamen Diagramm müssen sehr stark unterschiedliche Signalhöhen dargestellt werden. Ebenso soll die Darstellung die relativen Veränderungen der vermehrten oder verminderten Expression in Form von Faktoren darstellen. Um dies zu ermöglichen, wurde der Median der Signale der Normalgewebeproben für jeden Analyten berechnet und die Signale aller Proben dieses Analyten darauf zentriert. Des Weiteren wurden die Median-zentrierten Expressionswerte logarithmiert zur Basis 2 ( $\log_2$ ), was eine faktorielle und damit äquidistante Darstellung von Expressionsveränderungen bewirkt. Nach Umwandlung der Werte in eine Farbskala wurden die Daten in Form von *Heat Maps* (zweidimensionale grafische Darstellung von Daten) dargestellt. Diese Form der Darstellung dient auch zur Visualisierung von Clusteranalysen. In dieser Arbeit wurden hierarchische Clusteranalysen erstellt, bei denen die euklidische Distanz als Maßstab für die Ähnlichkeit und die vollständige Verknüpfung als Clustering Methode verwendet wurden. So werden die Daten aufgrund von Ähnlichkeiten angeordnet und Proben und Analyten großer Ähnlichkeit kommen dicht beieinander zu liegen. Diese Art der Darstellung setzt keinerlei Arbeits-hypothese voraus. Um genauere Informationen zu den für diese Gruppierung verantwortlichen Proteinexpressionswerten zu erhalten, wurde das statistische Verfahren der Vari-

anzanalyse eingesetzt. Hierbei wird festgestellt, ob die Varianzen zwischen Gruppen signifikant größer sind als die Varianzen in den Gruppen und die Expressionswerte für die Diskriminierung der Gruppen ursächlich sind. Da in keinem der Fälle für alle Expressionswerte Normalverteilung nachgewiesen werden konnte (Test nach Anderson-Darling), mussten für die Varianzanalysen nicht-parametrische Tests verwendet werden. So wurden für zwei Gruppen der Wilcoxon Rangsummentest und für mehr als zwei Gruppen der Kruskal Wallis Rangsummentest durchgeführt. Da nicht-parametrische Varianzanalysen aufgrund der Nichtbeachtung der realen Abstände der probenspezifischen Signalwerte sehr sensitiv sind und rasch falsch positive Werte auftreten können, wurden die Schwellenwerte entsprechend der jeweiligen Probenumfänge mit  $p < 0.05$  oder  $p < 0.01$  festgesetzt.

Die Vorgehensweise zur grafischen Darstellung und die statistische Verfahrensweise wurde für alle nachfolgenden Experimente in gleicher Weise eingesetzt.

#### 3.2.3.1 Vergleich von *Ctnnb1*, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren

In den ersten Proteinexpressionsanalysen wurde grundlegend untersucht, ob und wie *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierte Lebertumore sich im Phosphorylierungsgrad von Signaltransduktionsmolekülen voneinander unterscheiden. Hierzu wurden relativ kleine Probengruppen von jeweils 4-6 Tumoren untersucht (Tabelle 3.2). Die Tumore wurden auf Mutationen (*Ctnnb1*, *Ha-ras* und *B-raf*) untersucht und trugen jeweils nur je eine Mutation in einem der Gene. Die Expressionsanalyse zielte auf eine gute Abdeckung des Erk/MAPK- und Wnt-Signalweges ab.

Die im Proteinmikroarray generierten Proteinexpressionswerte wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normalisiert und Hintergrund-korrigiert. Für Proteine, die als Gesamt- und als Phosphoform nachgewiesen wurden, wurde ein relativer Phosphorylierungsgrad (phosphorylierter zu gesamt Expressionswert) berechnet. Zur visuellen Darstellung der 85 erhaltenen Expressionswerte wurde der Median der Signale aller Proben für jeden Analyten berechnet und die Signale aller Proben dieses Analyten darauf zentriert, zur Basis 2 logarithmiert und nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) in einer *Heat Map* dargestellt (Abbildung 3.8).

Bei der Betrachtung fällt das Zusammenfallen der *Ctnnb1*-mutierten Tumore in einer Gruppe auf. Die *Ha-ras*- und die *B-raf*-mutierten Tumoren bilden insgesamt drei Gruppen. Eine davon ist heterogen und besteht aus jeweils einem Tumor beider Gruppen während die anderen beiden nur *Ha-ras*- oder *B-raf*-mutierte Tumore enthalten. Ebenso werden alle Normalgewebeproben in einer separaten Gruppe dargestellt. Das bedeutet, dass bereits die einfache hierarchische Clusteranalyse über alle 85 erhaltenen Expressionswerte in der Lage ist, Probengruppen zu bilden, die mit den bestimmten Mutationen sehr gut übereinstimmen.



**Tabelle 3.2 Maus-Lebergewebeproben zur Proteinexpressionsanalyse der *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren.**

Im Bezeichner steht B für *B-raf* mutiert, C für *Ctnnb1* mutiert, H für *Ha-ras* mutiert und N für Normalgewebe.

Bezeichner	Array Position	Bezeichner	Array Position	Bezeichner	Array Position
C 31dT1	8	N 39	7	H 78T1	17
C 33b [1]	9	N 40	10	H 79T1	19
C 33b [2]	11	B 13T1	22	N 3	13
C 34aT1	6	B 45T1	26	N 6	23
C 34aT2	3	B 45T2	24	N 7	25
C 34aT3	1	B 75T1	27	N 9	15
N 36	2	H 11T1	12	N 10	18
N 37	4	H 21T3	14	N 12	20
N 38	5	H 55T4	16	N 16	21

**Tabelle 3.3 Antikörper zur Proteinexpressionsanalyse der *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren.**

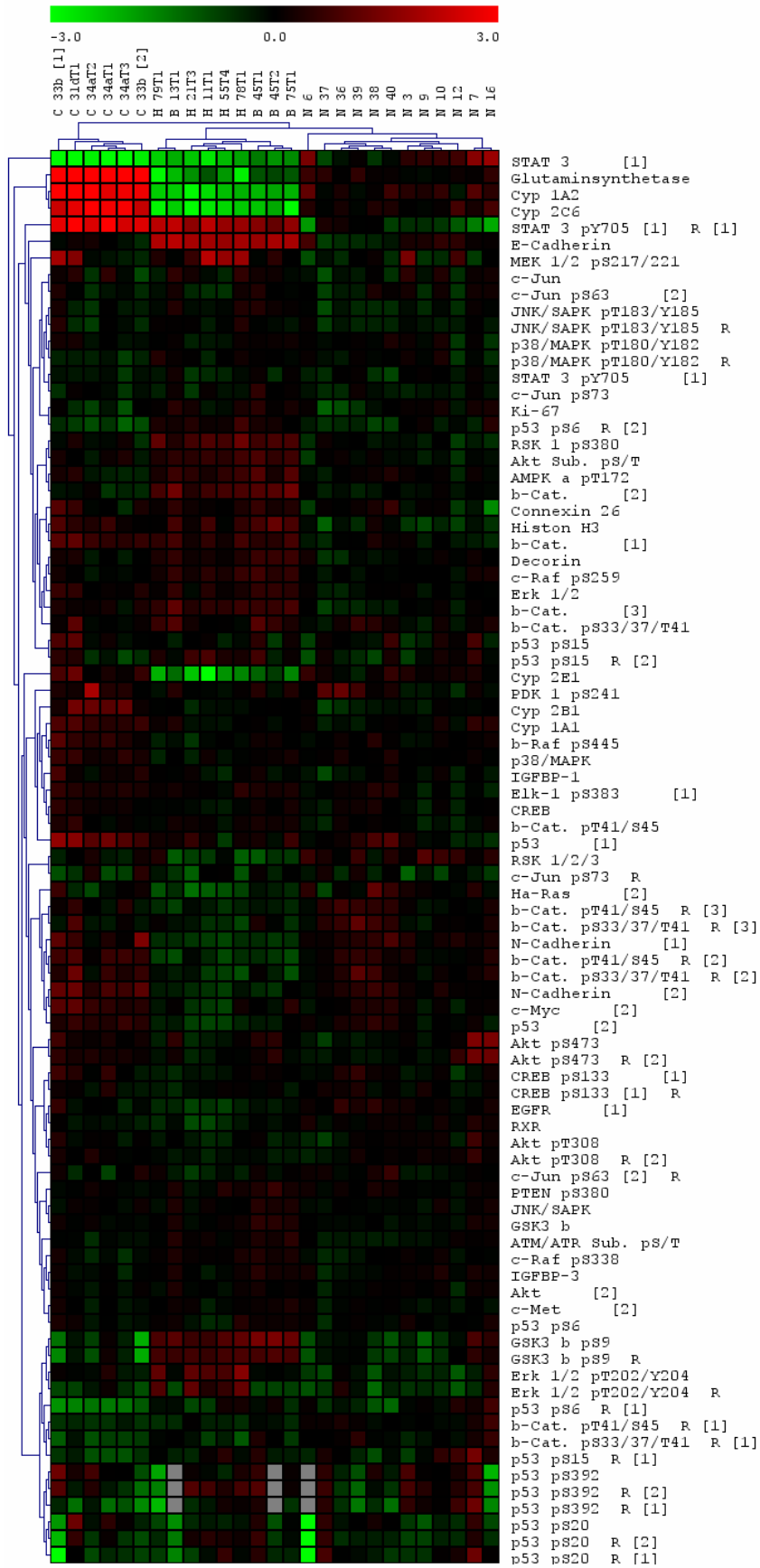
Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Antigen		
Akt [2]	Cyp 2E1	p38/MAPK
Akt pT308	Decorin	p38/MAPK pT180/Y182
Akt pS473	EGFR [1]	p53 [1]
Akt Sub. pS/T	Elk-1 pS383 [1]	p53 [2]
AMPK a pT172	Erk 1/2	p53 pS6
ATM/ATR Sub. pS/T	Erk 1/2 pT202/Y204	p53 pS15
E-Cadherin	Glutaminsynthetase	p53 pS20
N-Cadherin [1]	GSK3 b	p53 pS392
N-Cadherin [2]	GSK3 b pS9	PDK 1 pS241
b-Cat. [1]	Histon H3	PTEN pS380
b-Cat. [2]	IGFBP-1	b-Raf pS445
b-Cat. [3]	IGFBP-3	c-Raf pS259
b-Cat. pT41/S45	JNK/SAPK	c-Raf pS338
b-Cat. pS33/37/T41	JNK/SAPK pT183/Y185	Ha-Ras [2]
Connexin 26	c-Jun	RSK 1/2/3
CREB	c-Jun pS63 [2]	RSK 1 pS380
CREB pS133 [1]	c-Jun pS73	RXR

Antigen		
Cyp 1A1	Ki-67	STAT 3 [1]
Cyp 1A2	MEK 1/2 pS217/221	STAT 3 pY705 [1]
Cyp 2B1	c-Met [2]	
Cyp 2C6	c-Myc [2]	

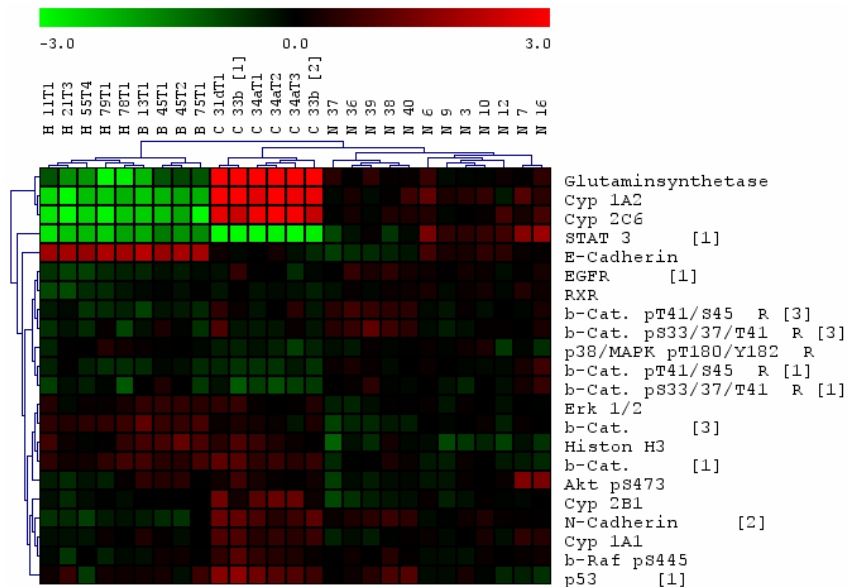
**Abbildung 3.8 Grafische Darstellung der Proteinexpressionswerte von *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren nach hierarchischer Clusteranalyse.**

Expressionswerte aller analysierten Proteine und ihrer modifizierten Formen sowie die berechneten relativen Phosphorylierungsgrade (phosphorylierter zu gesamt Expressionswert) sämtlicher Proben sind gezeigt. Die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Waagrecht sind die 27 Proben (6x *Ctnnb1*-, 5x *Ha-ras*-, 4x *B-raf*-mutierte Maus-Lebertumore und 12x Maus-Lebernorgangewebe) und senkrecht die 85 Expressionswerte aufgetragen. Graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.



### 3.2.3.1.1 Statistische Analyse der Expressionswerte: *Ctnnb1* Mutationen

Abbildung 3.8 zeigt die hierarchische Clusteranalyse aller erhaltenen 85 Expressionswerte, und hier wird die Ähnlichkeit aller *Ctnnb1*-mutierten Tumore sichtbar. Um genauere Informationen zu den für diese Gruppierung (*Ctnnb1*-mutierte Tumore und Normalgewebe) verantwortlichen Proteinexpressionswerten zu bekommen, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Die mit einem Schwellenwert von  $p < 0.05$  bestimmten Analyten sind in Tabelle 3.4 gelistet. Deren Median-zentrierte und zur Basis 2 logarithmierte Expressionswerte wurden nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) in einer *Heat Map* dargestellt (Abbildung 3.9). Dabei zeigt sich neben der aufgrund der Statistik durchaus erwarteten Entstehung getrennter Gruppen für die *Ctnnb1*-mutierten Tumor und Normalgewebe auch eine Trennung der *B-raf* von den *Ha-ras* Proben. Da *Heat Maps* Hilfsmittel zur grafischen Darstellung sind, werden in Abbildung 3.10 für einige der signifikanten Analyten Balkendiagramme der spezifischen Expressionswerte dargestellt.



**Abbildung 3.9 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der *Ctnnb1*-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.**

Expressionswerte aller nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundenen Proteine ( $p < 0.05$ ) sind gezeigt. Die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Waagrecht sind die 27 Proben (6x *Ctnnb1*-, 5x *Ha-ras*-, 4x *B-raf*-mutierte Maus-Lebertumore und 12x Maus-Lebernorgane) und senkrecht die 22 Expressionswerte aufgetragen. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phosfo, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

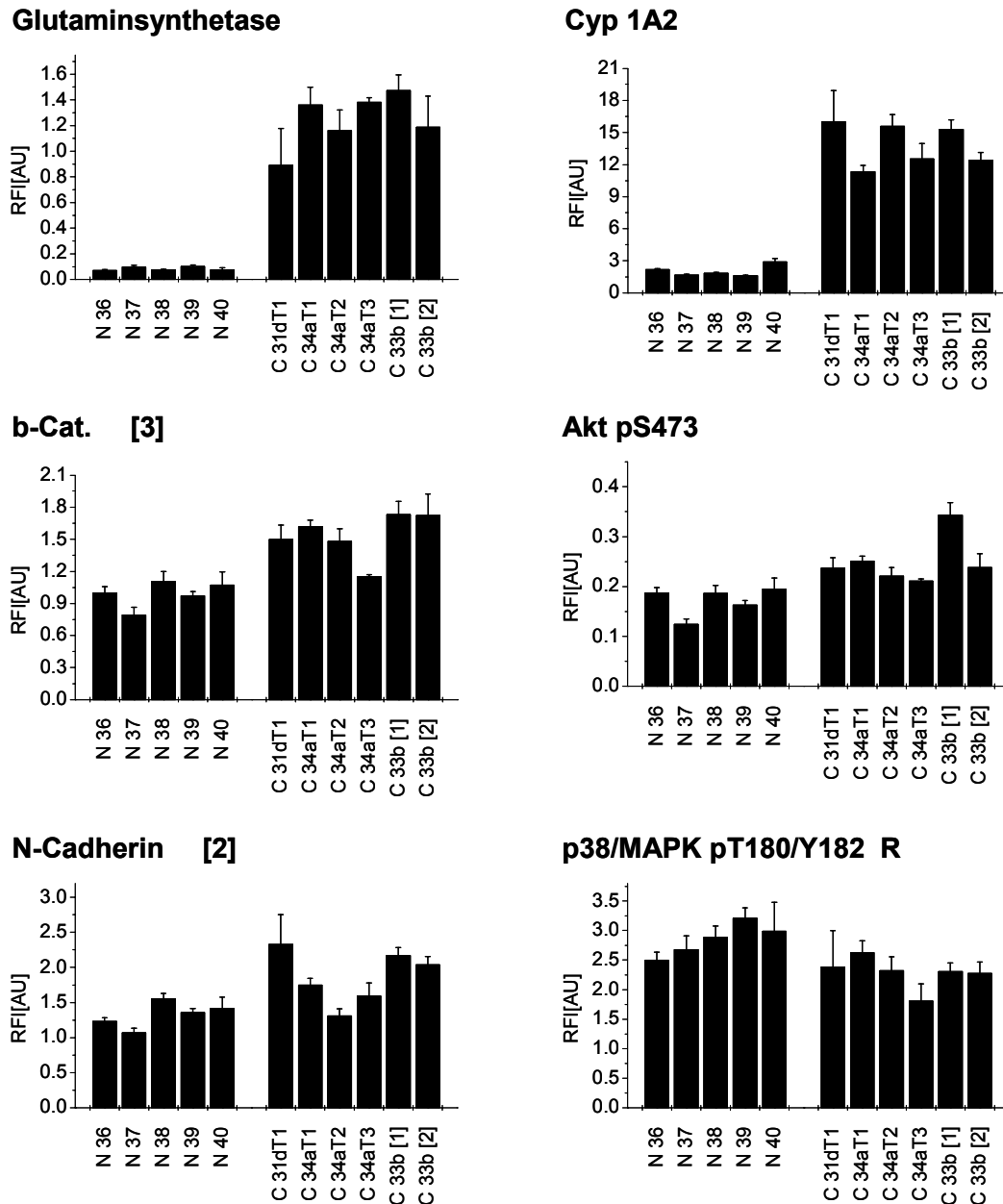
**Tabelle 3.4 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der *Ctnnb1*-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.**

Nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.05$ ) sind mit ihren p-Werten dargestellt. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Analyt	p-Wert	Analyt	p-Wert
Akt pS473	0.0062	Cyp 2B1	0.0062
E-Cadherin	0.0176	Cyp 2C6	0.0062
N-Cadherin [2]	0.0285	EGFR [1]	0.0446
b-Cat. [1]	0.0062	Erk 1/2	0.0176
b-Cat. [3]	0.0062	Glutaminsynthetase	0.0062
b-Cat. pT41/S45 R [1]	0.0062	Histon H3	0.0176
b-Cat. pS33/37/T41 R [1]	0.0062	p38/MAPK pT180/Y182	0.0106
b-Cat. pT41/S45 R [3]	0.0446	p53 [1]	0.0285
b-Cat. pS33/37/T41 R [3]	0.0446	b-Raf pS445	0.0285
Cyp 1A1	0.0062	RXR	0.0285
Cyp 1A2	0.0062	STAT 3 [1]	0.0062

Bei den in der Varianzanalyse als signifikant gefundenen Analyten finden sich mit den beiden Cadherinen (N- und E-Cadherin), den beiden Cytochrom P450-Isoformen (Cyp 1A2 und 2C6) und der Glutaminsynthetase einige bereits schon als verändert exprimiert bekannte Proteine (Loeppen *et al.*, 2005; Loeppen *et al.*, 2002; Poetz, 2005). Die erhöhte Expression von  $\beta$ -Catenin in den Tumoren ist plausibel, da durch die Mutationen für den Abbau notwendige Aminosäuren verändert sind (Polakis, 2000). Neben diesen Proteinen finden sich weitere als verändert exprimiert, die bisher nicht beschrieben wurden und damit von großem Interesse sind.

Aufgrund der hier beobachteten Expressionsunterschiede zwischen den *Ctnnb1*-mutierten Tumor- und Normalgeweben wurde dieser Aspekt der unterschiedlichen Proteinexpression im Rahmen der Diplomarbeit von Sarah Mühl (Muehl, 2007) unter meiner Anleitung fortgesetzt. Dabei wurden in 80 Maus-Lebergewebeproben Proteinexpressionswerte der in dieser Arbeit verwendeten, sowie weiterer zusätzlicher Analyten mit Schwerpunkt auf dem Wnt-Signalweg untersucht.



**Abbildung 3.10 Darstellung einiger der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der *Ctnnb1*-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe in Balkendiagrammen.**

Spezifische Expressionswerte von sechs nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundenen Proteine ( $p < 0.05$ ) sind dargestellt. In den Balkendiagrammen werden die für die sechs *Ctnnb1*-mutierten Maus-Lebertumor- und fünf Normalgewebeprobe erhaltenen relativen Fluoreszenzsignale (RFI) aufgetragen. Den Analytennamen nachstehende Bezeichnung: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

3.2.3.1.2 Statistische Analyse der Expressionswerte: Ha-*ras* und B-*raf* Mutationen

Neben der Gruppe *Ctnnb1*-mutierter Tumore, die in der hierarchischen Clusteranalyse auffällig war (Abbildung 3.8), waren auch die Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Proben in jeweils eigenen Gruppen zu finden. Diese, mit einer Ausnahme, klare Unterscheidung wurde in der *Heat Map* der hierarchischen Clusteranalyse der signifikanten Analyten der *Ctnnb1*-mutierten Tumore (Abbildung 3.9) in Form jeweils mutationsspezifischer Gruppen noch deutlicher.

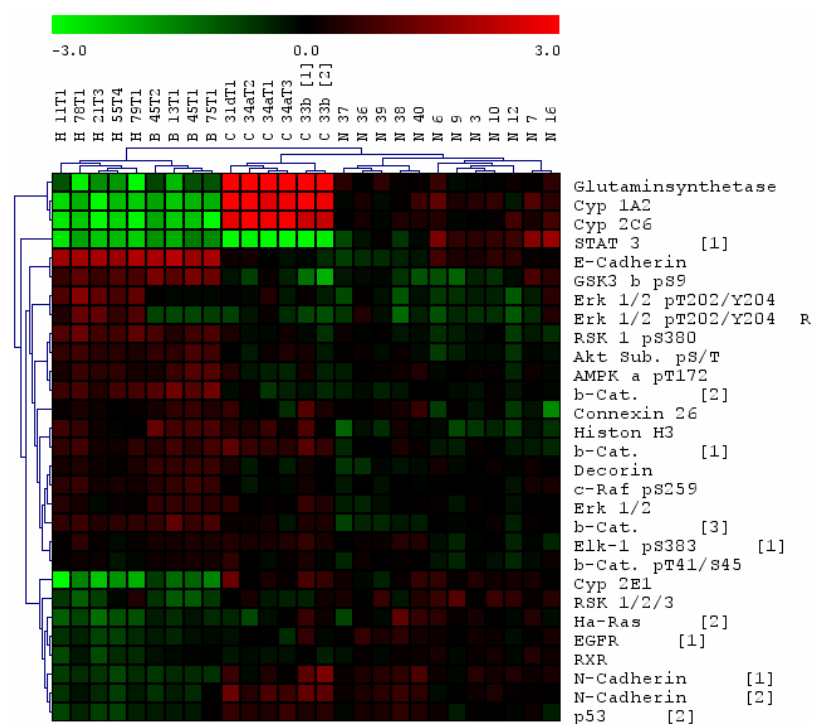
Statistisch signifikante Analyten, die für diese Zuordnung verantwortlich sind, wurden wie zuvor beschrieben mittels Varianzanalyse ( $p < 0.01$ ) bestimmt und sind in Tabelle 3.5 gelistet.

**Tabelle 3.5 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.**

Nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Kruskal Wallis Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind mit ihren p-Werten dargestellt. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Analyt	p-Wert	Analyt	p-Wert
Akt Sub. pS/T	0.0030	Elk-1 pS383 [1]	0.0062
AMPK a pT172	0.0030	Erk 1/2	0.0053
E-Cadherin	0.0033	Erk 1/2 pT202/Y204	0.0033
N-Cadherin [1]	0.0030	Erk 1/2 pT202/Y204 R	0.0078
N-Cadherin [2]	0.0069	Glutaminsynthetase	0.0027
b-Cat. [1]	0.0033	GSK3 b pS9	0.0037
b-Cat. [2]	0.0014	Histon H3	0.0014
b-Cat. [3]	0.0020	p53 [2]	0.0063
b-Cat. pT41/S45	0.0073	c-Raf pS259	0.0079
Connexin 26	0.0029	Ha-Ras [2]	0.0014
Cyp 1A2	0.0027	RSK 1/2/3	0.0066
Cyp 2C6	0.0030	RSK 1 pS380	0.0027
Cyp 2E1	0.0017	RXR	0.0039
Decorin	0.0044	STAT 3 [1]	0.0017
EGFR [1]	0.0022		

Abbildung 3.11 zeigt die Expressionswerte dieser Analyten in einer *Heat Map* nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) der Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte. Die Anordnung der Proben stellt vier Gruppen dar, in denen jeweils nur Normalgewebe oder *Ctnnb1*, *Ha-ras*- oder *B-raf*-mutierte Tumore vorkommen. Einige Proteine des Erk/MAPK-Signaltransduktionsweges werden als in ihrer Expression signifikant verändert gefunden (*Ha-Ras*, Erk 1/2 pT202/Y204, RSK 1/2/3, RSK 1 pS380 und Elk-1 pS383), was aufgrund der analysierten Mutationen sinnvoll erscheint. Von großem Interesse ist ein Wert, der in der Lage ist, die *Ha-ras*- von den *B-raf*-mutierten Tumoren zu unterscheiden (Erk 1/2 pT202/Y204).



**Abbildung 3.11 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.**

Expressionswerte aller nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Kruskal Wallis Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind gezeigt. Die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Waagrecht sind die 27 Proben (6x *Ctnnb1*-, 5x *Ha-ras*-, 4x *B-raf*-mutierte Maus-Lebertumore und 12x Maus-Lebernorgane) und senkrecht die 29 Expressionswerte aufgetragen. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, g R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.



### 3.2.3.1.3 Statistische Analyse der Expressionswerte: Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierte Tumorgewebe

In allen bisher durchgeführten statistischen Betrachtungen mit anschließender hierarchischer Clusteranalyse wurden die Ha-*ras*-mutierten Tumore immer in einer von den B-*raf*-mutierten Tumoren getrennten Gruppe dargestellt (Abbildung 3.9, Abbildung 3.11). Daher sind insbesondere die Analyten interessant, die in der Lage sind, die beiden Probenruppen zu diskriminieren.

Um festzustellen, bei welchen Analyten die Varianzen zwischen den beiden Gruppen größer sind als die Varianzen innerhalb der Proben der gleichen Gruppe, wurden diese mittels Varianzanalyse ( $p < 0.05$ ) bestimmt. Dabei wurden die 21 in Tabelle 3.6 gelisteten Analyten gefunden.

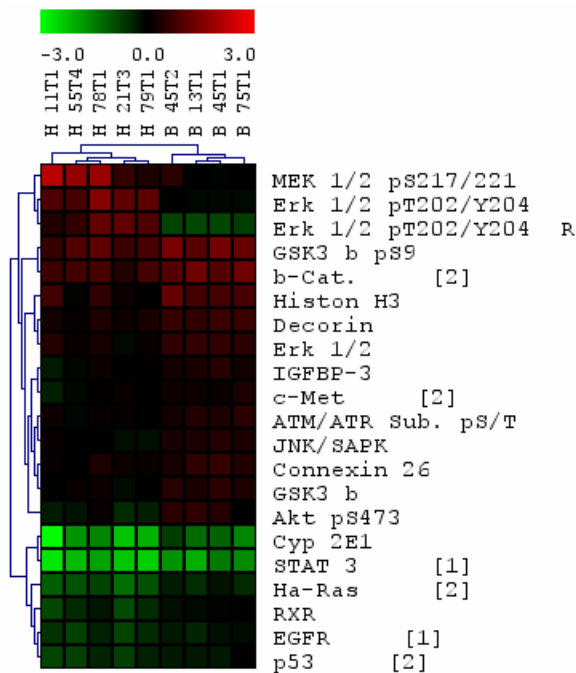
**Tabelle 3.6 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Maus-Lebertumorgewebe.**

Nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.05$ ), sind mit ihren p-Werten dargestellt. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Analyt	p-Wert	Analyt	p-Wert
Akt pS473	0.0275	GSK3 b pS9	0.0275
ATM/ATR Sub. pS/T	0.0143	Histon H3	0.0143
b-Cat. [2]	0.0143	IGFBP-3	0.0143
Connexin 26	0.0275	JNK/SAPK	0.0143
Cyp 2E1	0.0275	MEK 1/2 pS217/221	0.0275
Decorin	0.0143	c-Met [2]	0.0143
EGFR [1]	0.0275	p53 [2]	0.0143
Erk 1/2	0.0143	Ha-Ras [2]	0.0143
Erk 1/2 pT202/Y204	0.0143	RXR	0.0143
Erk 1/2 pT202/Y204 R	0.0143	STAT 3 [1]	0.0275
GSK3 b	0.0143		

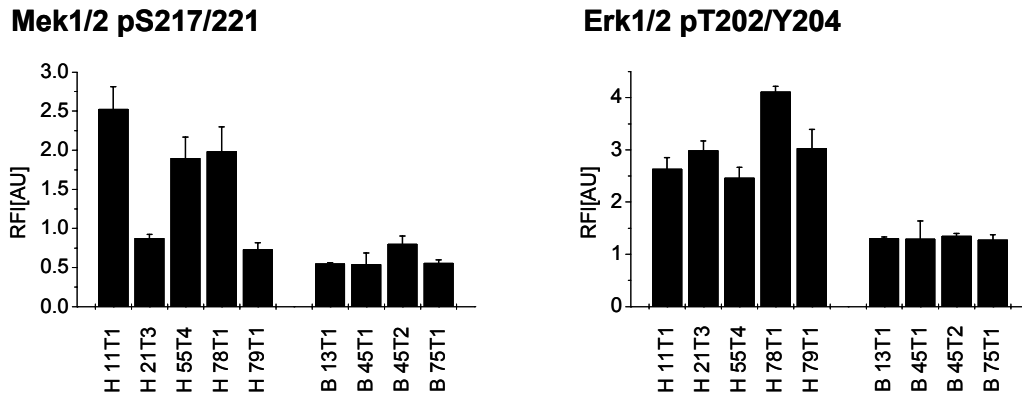
Zur grafischen Darstellung der Expressionswerte wurden deren Werte Median-zentriert und zur Basis 2 logarithmiert. Nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) wurden sie in einer *Heat Map* dargestellt (Abbildung 3.12), wobei nur die vier B-*raf*- sowie die fünf Ha-*ras*-mutierten Tumorproben verwendet wurden. Dabei zeigte sich die aufgrund der Varianzanalyse erwartete Gruppierung in Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierte Tumore. Neben der Darstellung der Median-zentrierten und logarithmierten

Werte, sind in Abbildung 3.13 für einige der signifikanten Analyten Balkendiagramme der spezifischen Expressionswerte dargestellt. Neben den im vorhergehenden Kapitel bereits als unterschiedlich zwischen den zwei Mutationen beschriebenen Proteinen, darunter Erk1/2 pT202/Y204, wird hier nun zusätzlich Mek1/2 pS217/221 gefunden. Dies erscheint plausibel, stellt es doch das Bindeglied zwischen B-Raf und Erk 1/2 dar. Die Balkendiagramme für Erk1/2 pT202/Y204 und Mek1/2 pS217/221 zeigen deutlich die signifikanten Unterschiede. Daneben werden zahlreiche weitere interessante Analyten gefunden.



**Abbildung 3.12 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.**

Expressionswerte aller nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.05$ ) sind gezeigt. Die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Waagrecht sind die fünf Ha-ras- und vier B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebe und senkrecht die 21 Expressionswerte aufgetragen. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.



**Abbildung 3.13** Darstellung einiger der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Maus-Lebertumorgewebe in Balkendiagrammen.

Spezifische Expressionswerte von zwei nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundenen Proteinen ( $p < 0.05$ ) sind dargestellt. In den Balkendiagrammen werden die für die fünf *Ha-ras*- und vier *B-raf*-mutierten Maus-Lebertumorgewebeprobe erhaltenen relativen Fluoreszenzsignale (RFI) aufgetragen. Den Analytenamen nachstehender Bezeichner: p - phospho.

Damit zeigt dieses Experiment, in dem *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierte Tumoren untersucht wurden, signifikante Unterschiede, die typisch für die gefundenen Mutationen sind. Dies ist umso bemerkenswerter, da sich dieses trotz einer sehr kleinen Anzahl von Proben der drei verschiedenen Tumorguppen statistisch robust nachweisen ließ. Die Expressionsunterschiede spiegeln damit die Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumoren wieder. Sie können Hinweise auf die fehlgeleiteten Regulationsmechanismen geben.

Vor allem die gefundenen Unterschiede in den phosphorylierten Formen von Erk 1/2 und Mek 1/2 für die *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Maus-Lebertumore führten zu einer Fokussierung auf diese Proben. So wurde in einem auf diesen Ergebnissen aufbauenden Folgeexperiment der Erk/MAPK-Signalweg charakterisiert.

### 3.2.3.2 Vergleich von *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren

In dem zuvor beschriebenen Experiment konnten in *Ctnnb1*-, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Lebertumoren Expressionsunterschiede in Signalproteinen und anderen in Tumoren exprimierten Proteinen gezeigt werden. Die mittels des Planaren Reversen Protein-Mikroarray durchgeführten Analysen zeigten auffällige Unterschiede in der Aktivität des Erk/MAPK-Signalweges, gemessen anhand der Phosphorylierung einiger seiner wichtigsten Mitglieder (Erk1/2 und Mek1/2), auf.

Daher wurde in einer zweiten großen Proteinexpressionsanalyse auf die *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Maus-Lebertumore fokussiert. Insgesamt 10 Normal- und 30 Tumorgewebeproben (12 *B-raf*- und 18 *Ha-ras*-mutierte) wurden eingesetzt. Die Lebertumoren waren in einem Maus-Tiermodell mittels chemischer Initiation erzeugt worden. Eine Mutationsanalyse der Tumore für *Ha-ras* und *B-raf* zeigte, dass jeder der untersuchten Tumore jeweils nur je eine Mutation in einem der beiden Gene trägt. Bei den eingesetzten Tieren handelte es sich um transgene Mäuse, denen im *P53*-Gen die Exone 4-9 gegen die entsprechenden Bereiche des humanen *P53*-Gens ausgetauscht worden waren (Luo *et al.*, 2001). Mensch und Maus unterscheiden sich in diesen Bereichen, die der Interaktion mit der DNA dienen. Da auch die Häufigkeit der Mutationen in *P53* zwischen Mensch und Maus stark unterschiedlich sind, sollte der Einfluss dieser Bereiche auf die Häufigkeit der Lebertumoren und die Art der Mutationen analysiert werden (Jaworski *et al.*, 2005b). Die in diesem Tiermodell erhaltenen Lebertumoren umfassten drei genetische Hintergründe. Bei diesen handelte es sich um heterozygotes  $P53^{ki}$  Allel ( $P53^{ki/wt}$ ) (n=13), homozygotes  $P53^{wt}$  Allel ( $P53^{wt/wt}$ ) (n=16) und homozygotes  $P53^{ki}$  Allel ( $P53^{ki/ki}$ ) (n=1) (Tabelle 3.7).

Für diese Proteinexpressionsanalyse konnte auf eine viel größere Anzahl von Antikörpern zurückgegriffen werden. Zudem waren alle im Rahmen dieser Arbeit erstmalig verwendeten Antikörper im Zuge der Antikörpercharakterisierung auf ihre Eignung für den Planaren Reversen Protein-Mikroarray hin untersucht worden. Hierbei lag der Fokus vorrangig auf der Ergänzung der bestimmbareren Analyten, der besseren Abdeckung und Detailauflösung des Erk/MAPK-Signalweges, sowie auf der Vervollständigung der Analyten-Paare aus phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Antigenen. Die häufig hohe Zahl an vorhandenen Phosphorylierungsstellen führte dazu, dass im Immunoassay eine große Zahl Phospho-spezifische Antikörper verwendet wurden (Tabelle 3.8).

Nach Bestimmung der auf dem Planaren Reversen Protein-Mikroarray-Substrat immobilisierten Proteinmenge wurden im Immunoassay Antikörper auf den Arrays inkubiert. So wurden auf die immobilisierte Proteinmenge normalisierte und Hintergrund-korrigierte Antigen-spezifische Expressionswerte erhalten. Sofern möglich, wurde zusätzlich die relative Aktivität eines Antigens aus phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Expressionswerten errechnet.

Bei der Auswertung wurden drei Proben nicht berücksichtigt. Eine der Proben (H 8T1) ist mit dem genetischen Hintergrund  $P53^{ki/ki}$  nur einmal im Probensatz vorhanden, und somit sind die hier erhaltenen Werte schwer zu interpretieren. Zwei andere Proben (H 2T4, H 31T3, beide  $P53^{wt/wt}$ ) wurden entfernt, da sich diese in einer überwiegenden Mehrzahl der Analyten auffällig verhielten und sich keine formal korrekte Vorgehensweise zur Korrektur oder Kompensation umsetzen ließ. Die Ursache dieser probenspezifischen Unterschiede war nicht zu ergründen.

In einem ersten Schritt zur visuellen Darstellung der 173 erhaltenen Expressionswerte der 37 Proben wurden die auf den Median der Normalgewebeproben zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) in einer *Heat Map* dargestellt (Abbildung 3.14). Bei der Betrachtung fällt die vollständige Abtrennung der Normalgewebeproben in einer Gruppe auf. Die *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumorgewebe bilden jeweils mehrere, zumeist nur aus Proben einer Mutationsart bestehende Gruppen. Das bedeutet, dass bereits die schlichte hierarchische Clusteranalyse über alle 173 erhaltenen Expressionswerte in der Lage ist, Probengruppen zu bilden, die mit den bestimmten Mutationen sehr gut übereinstimmen.

**Tabelle 3.7 Maus-Lebergewebeproben zur Proteinexpressionsanalyse der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren.**

Im Bezeichner steht B für *B-raf* mutiert, H für *Ha-ras* mutiert und N für Normalgewebe.

Bezeichner	Genotyp	Array Position	Bezeichner	Genotyp	Array Position
B 11T6	P53 <sup>wt/wt</sup>	11	H 33T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	24
B 13T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	14	H 37T7	P53 <sup>ki/wt</sup>	15
B 29T2	P53 <sup>wt/wt</sup>	8	H 37T10	P53 <sup>ki/wt</sup>	6
B 29T4	P53 <sup>wt/wt</sup>	22	H 38T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	13
B 39T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	28	H 39T2	P53 <sup>ki/wt</sup>	35
B 45T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	36	H 55T4	P53 <sup>wt/wt</sup>	30
B 45T2	P53 <sup>wt/wt</sup>	5	H 61T4	P53 <sup>ki/wt</sup>	38
B 50T3	P53 <sup>ki/wt</sup>	29	H 66T3	P53 <sup>ki/wt</sup>	40
B 62T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	34	H 78T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	12
B 62T2	P53 <sup>ki/wt</sup>	37	H 79T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	27
B 66T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	3	N 3	wt/wt	1
B 75T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	19	N 6	P53 <sup>wt/wt</sup>	7
H 1T1	P53 <sup>ki/wt</sup>	31	N 7	P53 <sup>wt/wt</sup>	10
H 1T2	P53 <sup>ki/wt</sup>	9	N 9	wt/wt	16
H 2T4	P53 <sup>wt/wt</sup>	18	N 10	wt/wt	17
H 8T1	P53 <sup>ki/ki</sup>	25	N 12	wt/wt	23
H 11T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	2	N 17	wt/wt	26
H 16T5	P53 <sup>wt/wt</sup>	20	N 19	wt/wt	32
H 21T1	P53 <sup>wt/wt</sup>	4	N 20	wt/wt	33
H 21T3	P53 <sup>wt/wt</sup>	21	N 24	wt/wt	39

**Tabelle 3.8 Antikörper zur Proteinexpressionsanalyse der Ha-ras- und B-raf-mutierten Tumoren.**

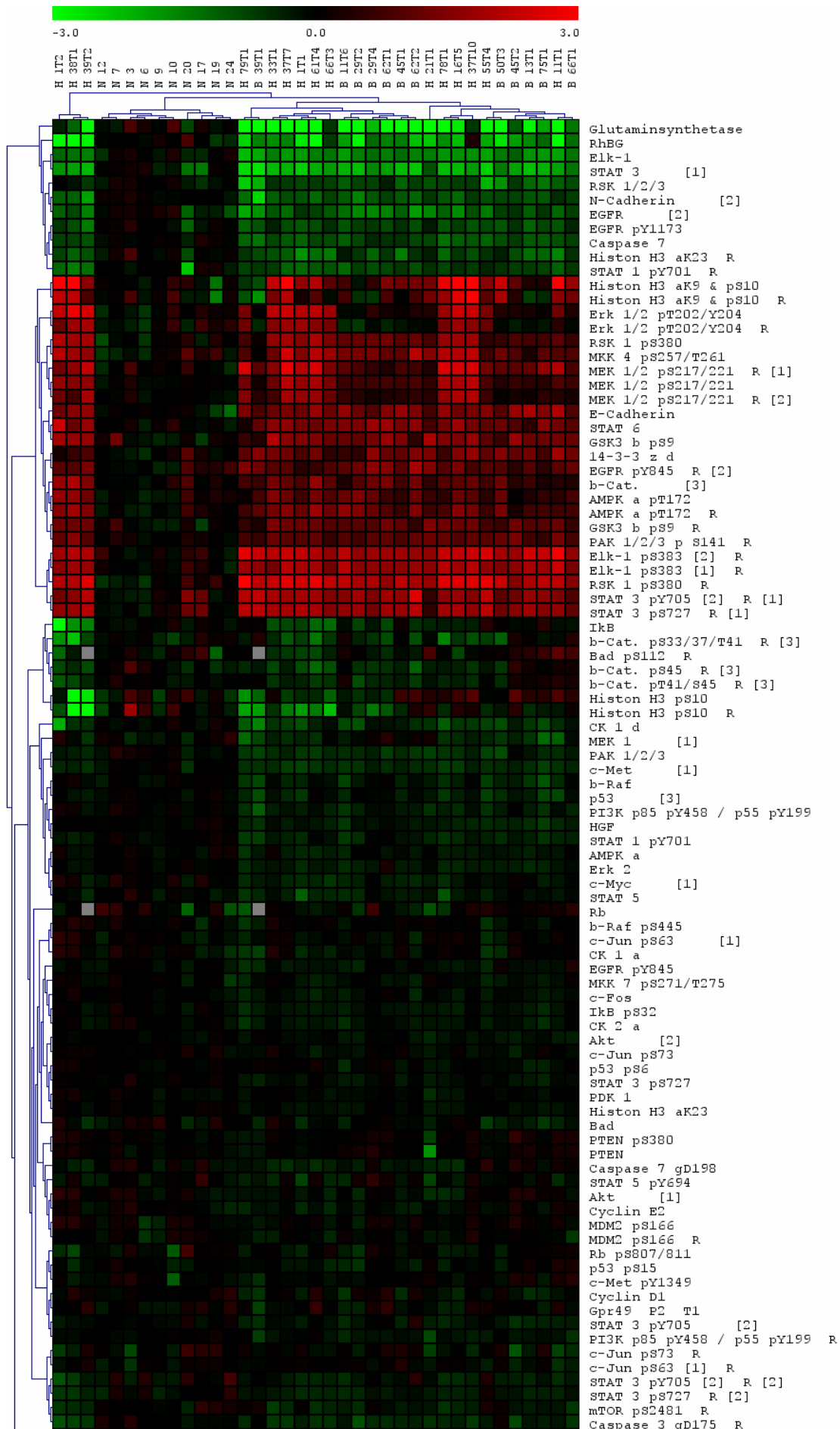
Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, g - gespalten, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Antigen		
14-3-3 z d	Erk 2	p38/MAPK
AFP	Erk 1/2	p38/MAPK pT180/Y182
Akt [1]	Erk 1/2 pT202/Y204	p53 [3]
Akt [2]	c-Fos	p53 pS6
Akt pT308	Glutaminsynthetase	p53 pS15
Akt pS473	Gpr49 P2 T1	p53 pS20
Akt Sub. pS/T	GSK3 b	p53 pS392
AMPK a	GSK3 b pS9	PAK 1/2/3
AMPK a pT172	HGF	PAK 1/2/3 pS141
APC	Histon H3	PDK 1
ATM/ATR Sub. pS/T	Histon H3 aK9	PDK 1 pS241
Bad	Histon H3 pS10	PI3K p85
Bad pS112	Histon H3 aK18	PI3K p85 pY458 / p55 pY199
Bax	Histon H3 aK23	PKA C (a Kin. Ue.)
E-Cadherin	Histon H3 aK9 & pS10	PKA C (a Kin. Ue.) pT197
N-Cadherin [2]	IkB	PKA C (a & b Kin. Ue.) pT197
Caspase 3	IkB pS32	PTEN
Caspase 3 gD175	JNK/SAPK	PTEN pS380
Caspase 7	JNK/SAPK pT183/Y185	b-Raf
Caspase 7 gD198	c-Jun	b-Raf pS445
b-Cat. [3]	c-Jun pS63 [1]	c-Raf
b-Cat. pS45	c-Jun pS73	c-Raf pS259
b-Cat. pT41/S45	Ki-67	c-Raf pS338
b-Cat. pS33/37/T41	MDM2	Ha-Ras [1]
CK 1 a	MDM2 pS166	Rb
CK 1 d	MEK 1 [1]	Rb pS807/811
CK 2 a	MEK 2 [2]	RhBG
CREB	MEK 1/2 pS217/221	RSK 1/2/3

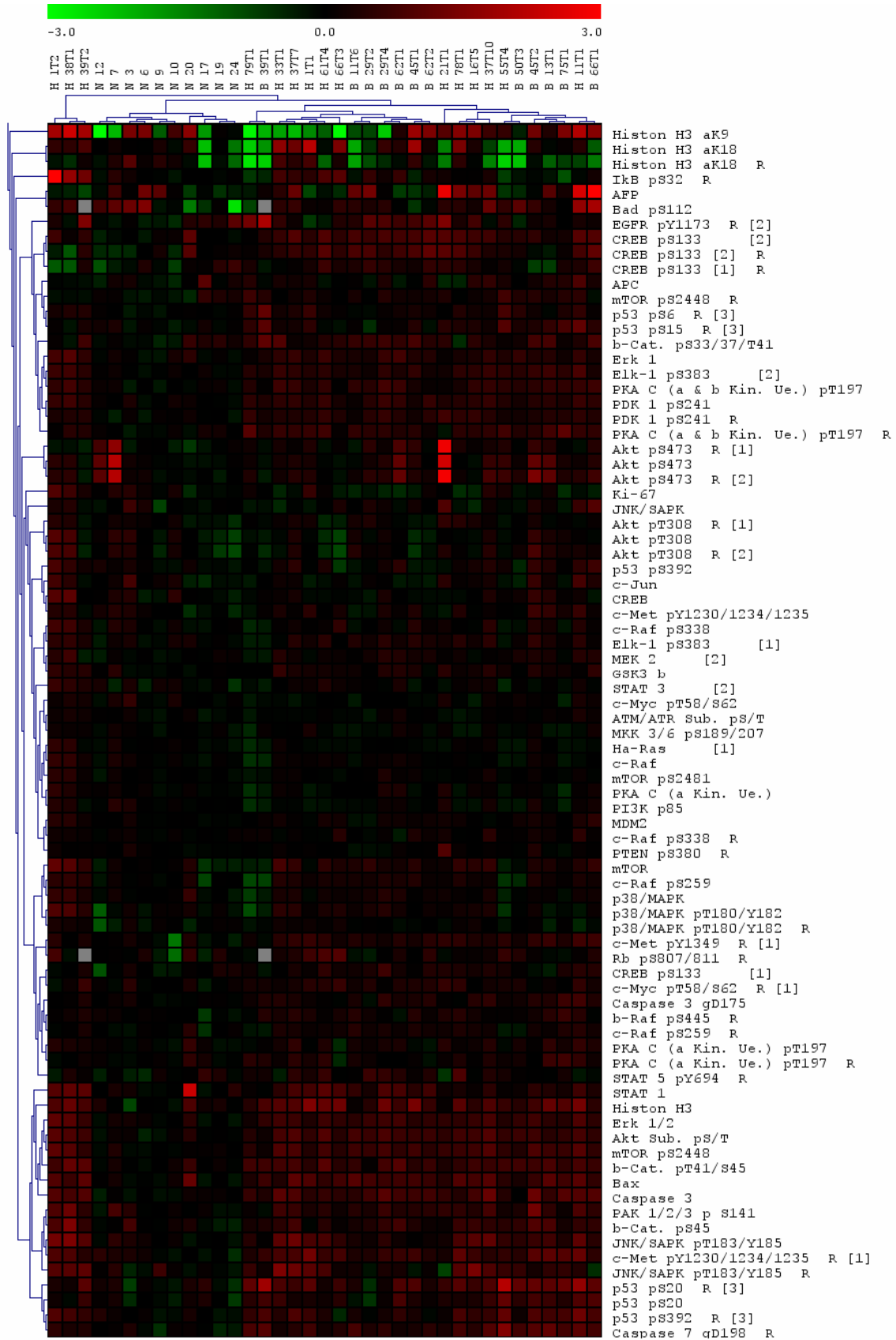
Antigen		
CREB pS133 [1]	c-Met [1]	RSK 1 pS380
CREB pS133 [2]	c-Met pY1230/1234/1235	STAT 1
Cyclin D1	c-Met pY1349	STAT 1 pY701
Cyclin E2	MKK 3/6 pS189/207	STAT 3 [1]
EGFR [2]	MKK 4 pS257/T261	STAT 3 [2]
EGFR pY845	MKK 7 pS271/T275	STAT 3 pY705 [2]
EGFR pY1173	mTOR	STAT 3 pS727
Elk-1	mTOR pS2448	STAT 5
Elk-1 pS383 [1]	mTOR pS2481	STAT 5 pY694
Elk-1 pS383 [2]	c-Myc [1]	STAT 6
Erk 1	c-Myc pT58/S62	

**Abbildung 3.14 Grafische Darstellung der Proteinexpressionswerte von Ha-ras- und B-raf-mutierten Tumoren nach hierarchischer Clusteranalyse.**

Expressionswerte aller analysierten Proteine und ihrer modifizierten Formen sowie die berechneten relativen Phosphorylierungsgrade (phosphorylierter zu gesamt Expressionswert) sämtlicher Proben sind gezeigt. Die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Waagrecht sind die 37 Proben (15x Ha-ras-, 12x B-raf-mutierte Maus-Lebertumore und 10x Maus-Lebernorgane) und senkrecht die 173 Expressionswerte aufgetragen. Graue Felder entsprechen nicht erfassten Werten. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, g - gespalten, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.







### 3.2.3.2.1 Einfluss des P53<sup>ki</sup> Hintergrundes auf die Proteinexpression

In einer ersten Analyse wurden die Expressionsdaten auf den Einfluss des heterogenen genetischen Hintergrundes der Proben (P53<sup>ki/wt</sup> und P53<sup>wt/wt</sup>) analysiert. Für das Tiermodell wurde bereits gezeigt, dass die Regulation von p53 nach UV-vermittelter Schädigung der DNA in Fibroblasten sich nicht durch den genetischen Status des P53 (P53<sup>ki/Ki</sup> oder P53<sup>wt/wt</sup>) beeinflussen lässt. Ebenso wenig verändert sich die spontane Tumorentstehungsrate (Luo *et al.*, 2001) und auch nach Diethylnitrosamin-basierter Induktion zeigen sich keine Unterschiede (Jaworski *et al.*, 2005b). In dieser Analyse sollte also festgestellt werden, ob es Proteinexpressionswerte innerhalb der Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Lebertumorgruppen gibt, die in der Lage sind, die genetischen Hintergründe zu diskriminieren.

Die mittels Varianzanalyse mit einem Schwellenwert von  $p < 0.01$  bestimmten Analyten sind für Ha-*ras* in Tabelle 3.9 und für B-*raf* in Tabelle 3.10 gelistet. Dabei ist zu beachten, dass bei 173 betrachteten Analyten und einem p-Wert von  $< 0.01$  rein statistisch rund zwei Analyten als falsch positiv gefundene Werte in Kauf genommen werden.

Somit stellen die zwei in den beiden Fällen gefundenen Analyten höchstwahrscheinlich keine echten Unterschiede dar. Bei der Betrachtung der jeweils zwei als signifikant gefundenen Analyten fällt zudem auf, dass beide in der Ha-*ras* Probengruppe und einer der beiden in der B-*raf* Probengruppe gefundenen Expressionswerte Verhältnisse darstellen. Diese relativen Aktivitäten eines Antigens werden als Verhältnis der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Expressionswerte berechnet. Bei allen drei relativen Aktivitäten zeigte sich, dass die Expressionswerte der phosphorylierten Antigene lediglich Signalthöhen im Bereich des Hintergrundes lieferten. Daher sind die Verhältnisse anfällig für große faktorielle Unterschiede, die nur scheinbar relevant sind. Betrachtet man die Probensignalwerte der drei Verhältnisse unter diesen Gesichtspunkten, so legt dies abermals nahe, dass sie nur artifizielle Funde ohne jede biologische Relevanz darstellen.

In Abbildung 3.15 sind in einem Balkendiagramm die spezifischen Expressionswerte des Analyten „mTOR pS2448“ dargestellt. Auch hier zeigt sich trotz des kleinen und statistisch signifikanten p-Wertes eine erstaunliche Ähnlichkeit in der Verteilung der Signalwerte der beiden Gruppen.

**Tabelle 3.9 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der P53<sup>wt/wt</sup> und P53<sup>ki/wt</sup> Ha-ras-mutierten Maus-Lebertumorgewebe.**

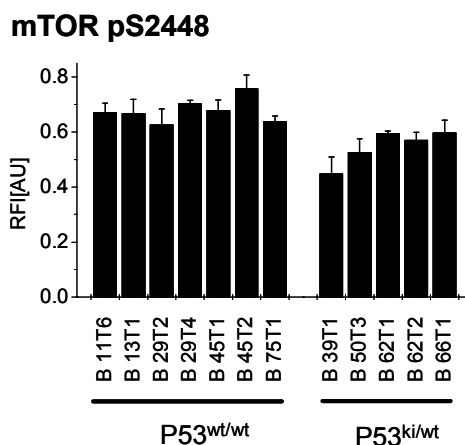
Nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind mit ihren p-Werten dargestellt. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Analyt	p-Wert	Analyt	p-Wert
b-Cat. pS45 R [3]	0.0055	Rb pS807/811 R	0.0060

**Tabelle 3.10 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der P53<sup>wt/wt</sup> und P53<sup>ki/wt</sup> B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebe.**

Nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind mit ihren p-Werten dargestellt. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte.

Analyt	p-Wert	Analyt	p-Wert
mTOR pS2448	0.0045	Rb pS807/811 R	0.0082



**Abbildung 3.15 Darstellung eines differenziell exprimierten Proteins der Gruppe der P53<sup>wt/wt</sup> und P53<sup>ki/wt</sup> B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebe im Balkendiagramm.**

Spezifische Expressionswerte eines nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundenen Proteins ( $p < 0.01$ ) sind dargestellt. In den Balkendiagrammen werden die für die sieben P53<sup>wt/wt</sup> und die fünf P53<sup>ki/wt</sup> der B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebeproben erhaltenen relativen Fluoreszenzsignale (RFI) aufgetragen. Den Analytenamen nachstehender Bezeichner: p - phospho.

### 3.2.3.2.2 Statistische Analyse der Proteinexpression der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumor- und Normalgewebe

Die im Kapitel 3.2.3.1 gezeigten Proteinexpressionen erlaubten eine Unterscheidung der drei Gruppen von Maus-Lebergeweben, *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierte Tumore, sowie Normalgewebe. Ausgehend von diesem Ergebnis war im Rahmen der Charakterisierung von Antikörpern die Zahl der erfassbaren Analyten, vor allem hinsichtlich des Erk/MAPK-Signalweges, erweitert worden. Hierbei lag der Fokus vorrangig auf der Ergänzung der Analyten-Paare aus phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Antigenen. Somit wurde für die hier beschriebene Proteinexpressionsanalyse neben der Bestätigung der in 3.2.3.1.2 beschriebenen Expressionsunterschiede eine detailliertere Aussage über weitere Unterschiede, oder auch Gemeinsamkeiten, erwartet. In einer ersten visuellen Darstellung aller 173 erhaltenen Expressionwerte der 37 Proben, in Form einer hierarchischen Clusteranalyse (Abbildung 3.14), wurden die Normalgewebe bereits in einer vollständig abgetrennten Gruppe dargestellt. Auch die *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumorgewebe bilden zwar jeweils mehrere, jedoch zumeist nur aus Proben einer Mutationsart bestehende Gruppen.

Für diese Zuordnung verantwortliche, statistisch signifikante Analyten wurden mittels Varianzanalyse ( $p < 0.01$ ) bestimmt und sind in Tabelle 3.11 gelistet. Dabei fällt auf, dass es sich bei den 25 gefundenen Analyten beinahe ausschließlich um direkt bestimmte Proteinexpressionswerte handelt. Es sind nur vier Verhältnisse, die als ein indirektes Maß für die relative Aktivität eines Antigens dienen, enthalten. Von diesen sind drei bereits durch einen weiteren an der Berechnung des Verhältnisses beteiligten Analyten repräsentiert. Diese differenziell exprimierten Analyten wurden auf Ähnlichkeit in einer hierarchischen Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) untersucht. Hierzu wurden die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte in einer *Heat Map* nach hierarchischer Clusteranalyse dargestellt (Abbildung 3.16).

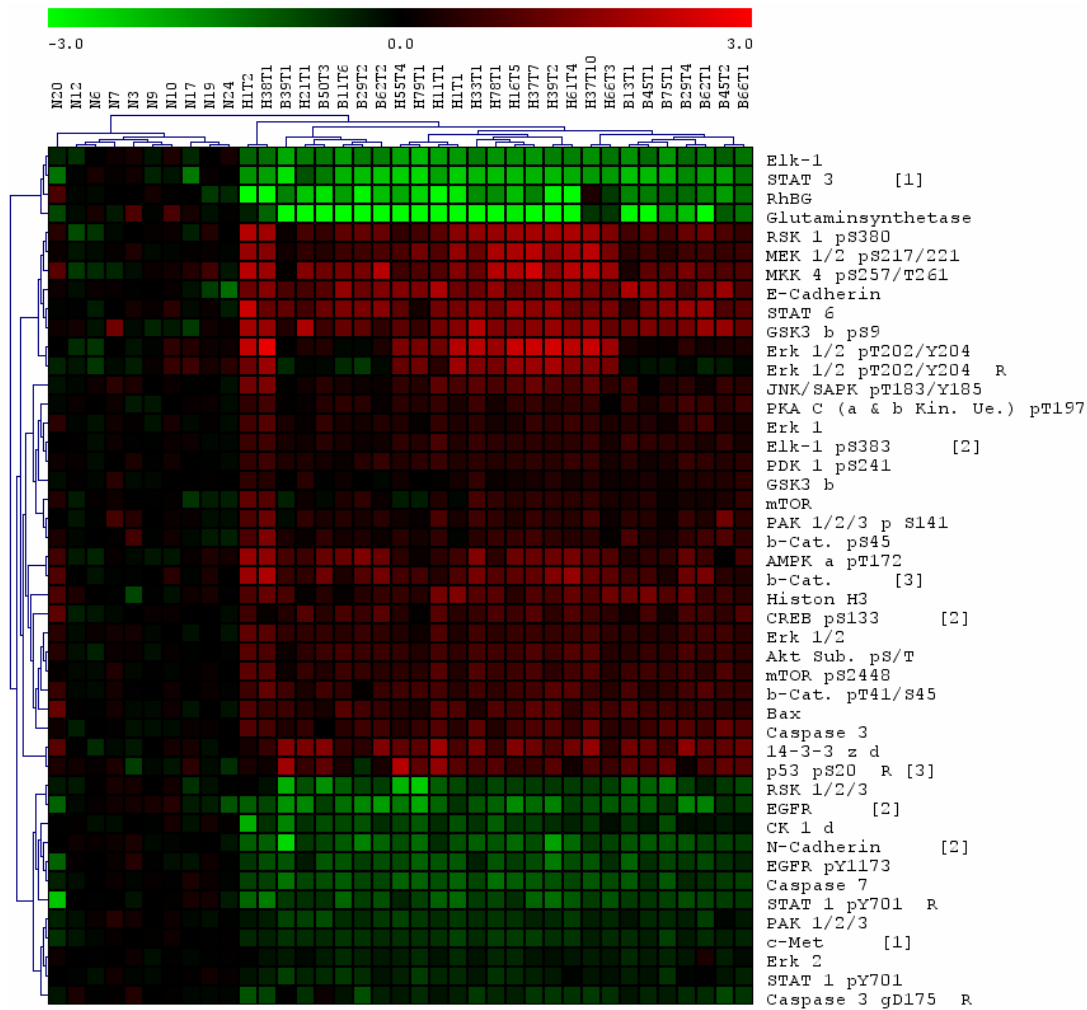
Die Gruppierung der Proben in der hierarchischen Clusteranalyse aufgrund von Ähnlichkeiten in den Expressionsmustern der statistisch signifikanten Analyten, führt zur Entstehung zweier Hauptgruppen (Abbildung 3.16). Eine davon setzt sich nur aus den Normalgeweben und die andere nur aus Tumoren zusammen. Die Tumorgruppe zerfällt in vier Untergruppen, bei denen zwei ausschließlich aus *Ha-ras*-mutierten Tumoren bestehen. Zwei weitere Untergruppen setzen sich bis auf drei *Ha-ras*-mutierte Tumoren in der absoluten Mehrzahl aus *B-raf*-mutierten Tumoren zusammen. Für die Proteinexpression entstehen vier Hauptgruppen. Zwei dieser Gruppen zeigen Proteine, die in den Tumoren geringer exprimiert werden als im Normalgewebe. Die weiteren zwei bilden Analyten, die in den Tumoren stärker exprimiert werden als im Normalgewebe. In der Anordnung der

Analyten ist keine Sortierung nach einem direkten biologischen Mechanismus zu erkennen.

**Tabelle 3.11 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.**

Nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Kruskal Wallis Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind mit ihren p-Werten dargestellt. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, g - gespalten, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Analyt	p-Wert	Analyt	p-Wert
14-3-3 z d	0.0001	GSK3 b	0.0035
Akt Sub. pS/T	0.00002	GSK3 b pS9	0.00003
AMPK a pT172	0.0003	Glutaminsynthetase	0.00004
Bax	0.001	Histon H3	0.0003
E-Cadherin	0.00002	JNK/SAPK pT183/Y185	0.00001
N-Cadherin [2]	0.00002	MEK 1/2 pS217/221	0.0000004
Caspase 3	0.00004	c-Met [1]	0.0002
Caspase 3 gD175 R	0.0001	MKK 4 pS257/T261	0.00003
Caspase 7	0.00001	mTOR	0.0051
b-Cat. [3]	0.0001	mTOR pS2448	0.00002
b-Cat. pS45	0.0036	p53 pS20 R [3]	0.0012
b-Cat. pT41/S45	0.0001	PAK 1/2/3	0.0001
CK 1 d	0.00004	PAK 1/2/3 p S141	0.0041
CREB pS133 [2]	0.0014	PDK 1 pS241	0.00004
EGFR [2]	0.0006	PKA C (a & b Kin. Ue.) pT197	0.0003
EGFR pY1173	0.0007	RhBG	0.00005
Elk-1	0.00002	RSK 1/2/3	0.0001
Elk-1 pS383 [2]	0.00001	RSK 1 pS380	0.000003
Erk 1	0.0006	STAT 1 pY701	0.0001
Erk 2	0.0002	STAT 1 pY701 R	0.0007
Erk 1/2	0.0001	STAT 3 [1]	0.00004
Erk 1/2 pT202/Y204	0.000003	STAT 6	0.00003
Erk 1/2 pT202/Y204 R	0.000004		



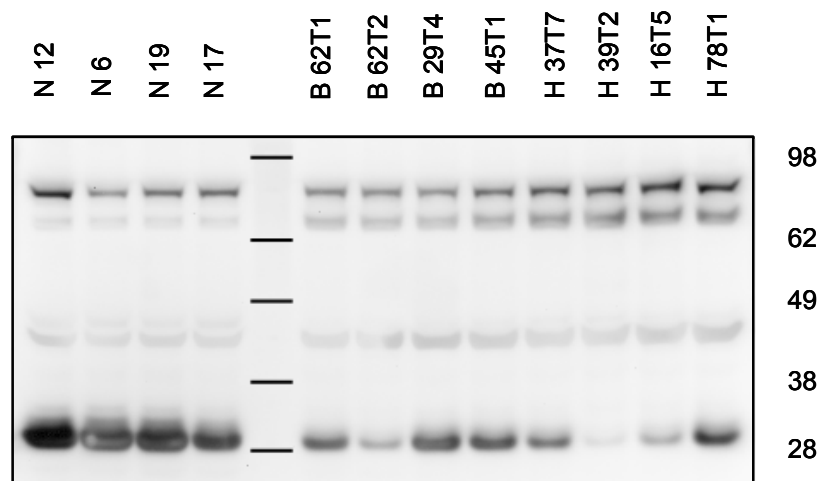
**Abbildung 3.16 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.**

Expressionswerte aller nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Kruskal Wallis Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind gezeigt. Die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Waagrecht sind die 37 Proben (15x Ha-ras-, 12x B-raf-mutierte Maus-Lebertumore und 10x Maus-Lebernorgangewebe) und senkrecht die 45 Expressionswerte aufgetragen. Den Analytennamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, g - gespalten, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Zur Verifizierung der gefundenen Expressionsunterschiede wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierzu wurden vier Proben jeder Gruppe, Ha-ras- und B-raf-mutierte Tumore sowie Normalgewebe, eingesetzt.

Die Western Blot-Analyse wurde mit insgesamt sieben Antikörpern gegen die als signifikant gefundenen Analyten, sowie mit anti- $\beta$ -Actin als Kontrollprotein durchgeführt. Die

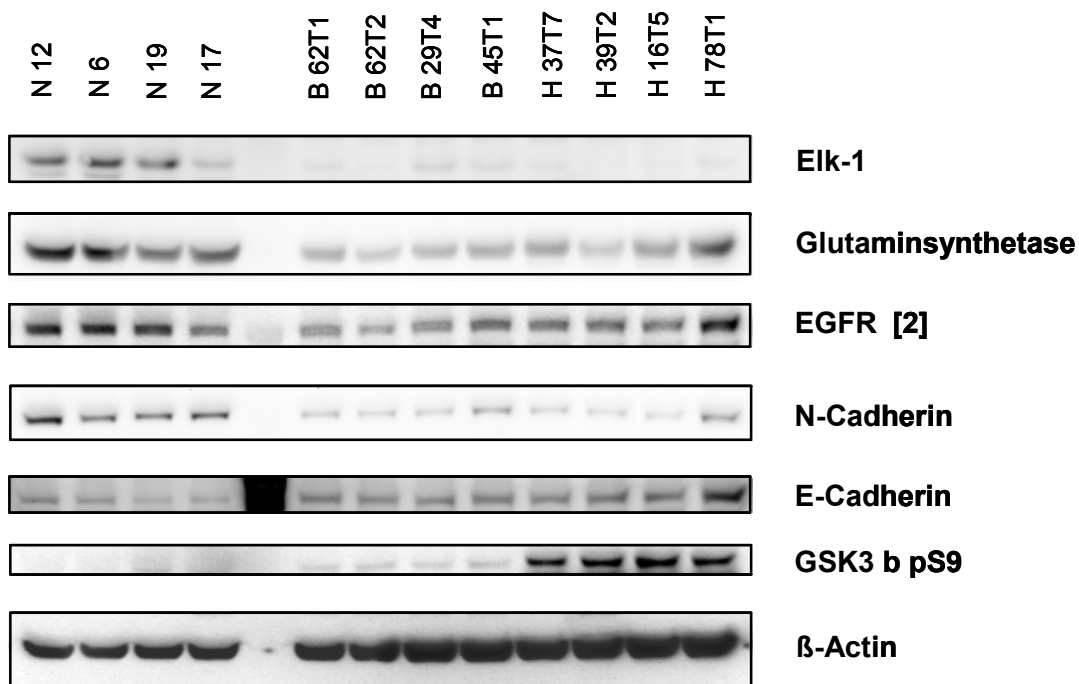
eingesetzten Antikörper waren die gleichen, die zuvor auch im Planaren Reversen Protein-Mikroarray verwendet worden waren. Die dort bestimmten Expressionsunterschiede für Elk1, Glutaminsynthetase, EGFR [2] und N-Cadherin (Abbildung 3.18) wurden im Western Blot bestätigt. Für diese vier Analyten ist eine deutlich stärkere Proteinexpression in den Normalgeweben im Vergleich zu den Tumorgeweben zu beobachten. E-Cadherin wurde als in den Tumorgeweben vermehrt exprimiert gefunden, was sich, wenn auch nicht ganz so deutlich, im Western Blot ebenfalls zeigen ließ (Abbildung 3.18). Für GSK3 b pS9 wurde eine deutlich erhöhte Proteinexpression der Tumor- gegenüber den Normalgewebeprouben festgestellt. Allerdings konnte diese im Western Blot (Abbildung 3.18) nur für die Ha-*ras*-mutierten Tumore bestätigt werden. Die B-*raf*-mutierten Tumore zeigen dies nicht in der erwarteten Deutlichkeit. Zwar deutet sich eine leichte Erhöhung im Vergleich zum Normalgewebe an, diese erreicht aber das Signalniveau der Ha-*ras*-mutierten Tumore bei weitem nicht. Die für STAT 3 [1] gefundene deutlich verringerte Proteinexpression in den Tumor- gegenüber den Normalgewebeprouben konnte im Western Blot nicht bestätigt werden. Die Intensitäten der spezifischen Banden deuten vielmehr eine vermehrte Expression von STAT 3 in den Tumorgeweben an (Abbildung 3.17). Ursächlich für die im Planaren Reversen Protein-Mikroarray gefundenen Proteinexpressionsunterschiede ist wohl die vor allem in den Normalgeweben zu erkennende starke Nebenbande.



**Abbildung 3.17 Western Blot des STAT 3 [1] Antikörpers auf Proben der Gruppe der Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.**

Jeweils 20 µg der je vier Lysate der Gruppen der Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebeprouben wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf PVDF transferiert. Nach Inkubation des STAT 3 [1] Antikörpers wurde Lumineszenz detektiert. Die erwarteten Banden sind bei 79 kDa Stat3β und bei 86 kDa Stat3α. Die Molekulargewichte der Protein-Größenstandards sind in kDa angegeben. Den Analytenamen nachstehender Bezeichner: [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Für fünf weitere statistisch signifikante Analyten (Mek1/2 pS217/221, Erk1/2 pT202/Y204, JNK/SAPK pT183/Y185, RSK 1 pS380 sowie RSK 1/2/3) werden die zur Verifizierung durchgeführten Western Blot-Analysen in Abbildung 3.21 dargestellt. Sie werden im Rahmen der Darstellung der Ergebnisse der statistischen Betrachtung der zwei Tumorgruppen im folgenden ausführlich erläutert. Jedoch kann hier schon festgestellt werden, dass sich alle in der Proteinexpressionsanalyse gefundenen Unterschiede zwischen den Probengruppen, die im Western Blot nochmals betrachtet wurden, bestätigen ließen.



**Abbildung 3.18 Western Blot einiger differenziell exprimierter Proteine der Gruppe der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebe.**

Jeweils 20  $\mu$ g der je vier Lysate der Gruppen der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebeprouben wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf PVDF transferiert. Nach Inkubation der Antikörper wurde Lumineszenz detektiert. Dargestellt sind die spezifischen Banden der Antikörper. Es wurden keine relevanten Nebenbanden detektiert. Zusätzlich wurde  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle inkubiert. Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

Die zuvor beschriebene statistische Analyse der Expressionswerte der Ha-ras- und B-raf-mutierten Tumor- und Normalgewebe zeigt, dass eine Unterscheidung von Maus-Lebertumoren mit Mutationen in Ha-ras oder B-raf aufgrund der Expression von Proteinen und ihrer Modifikation möglich ist.



Die Frage nach den Analyten, welche in der bereits gezeigten Ähnlichkeitsanalyse eine Differenzierung dieser beiden Probengruppen ermöglichen, soll mittels Varianzanalyse beantwortet werden. Diese ist jedoch ein deutlich stringenteres Verfahren als die Ähnlichkeitsanalyse, da hierbei die Varianz innerhalb der Probengruppen mit den Varianzen zwischen den Probengruppen verglichen wird. Ausreißer in Analyten einzelner Proben, die bei der Ähnlichkeitsanalyse in der Summe der betrachteten Analyten vernachlässigt würden, können in der Varianzanalyse, da hier jeder Analyt separat betrachtet wird, zum Nichterreichen der Schwellenwerte führen.

Signifikante Unterschiede ( $p < 0.01$ ) zwischen den beiden Gruppen der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumore sind in Tabelle 3.12 gelistet. Alle vier so als signifikant gefundenen Analyten stellen Expressionswerte von phosphorylierten Proteinen dar. Die so identifizierten Analyten wurden einer Ähnlichkeitsanalyse unterzogen. Dazu wurden die Medianzentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte in einer *Heat Map* nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) dargestellt (Abbildung 3.19). Dabei ist zu beachten, dass die angewandte Umwandlung der Werte in eine Farbskala den Zahlenwerten, zugunsten einer besseren Visualisierung der Unterschiede, andere Farben als in allen bisher dargestellten *Heat Maps* zuweist.

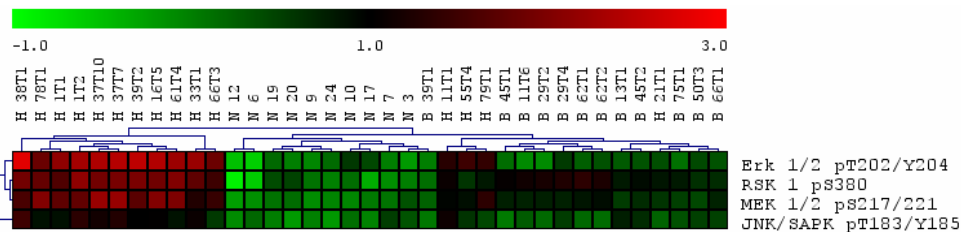
**Tabelle 3.12 Differenziell exprimierte Proteine der Gruppe der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Maus-Lebertumorgewebe.**

Nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind mit ihren p-Werten dargestellt. Den Analytenamen nachstehender Bezeichner: p - phospho.

Analyt	p-Wert	Analyt	p-Wert
Erk 1/2 pT202/Y204	0.00002	MEK 1/2 pS217/221	0.0001
JNK/SAPK pT183/Y185	0.0003	RSK 1 pS380	0.0034

Die auf Ähnlichkeiten in den Expressionsmustern, der als statistisch signifikant gefundenen Analyten, beruhende hierarchische Clusteranalyse ordnet die Proben drei Hauptgruppen zu. Davon setzt sich eine nur aus *Ha-ras*-mutierten Tumoren zusammen, während die Gruppe der Normalgewebe eine *B-raf*-mutierte Tumorprobe enthält. Die Gruppe, in der alle weiteren *B-raf*-mutierten Tumore zusammenfallen, beinhaltet vier *Ha-ras*-mutierte Tumore. Von diesen sind jedoch drei in einer eigenen Untergruppe angeordnet.

Für alle vier signifikanten Analyten wurden in Balkendiagrammen die spezifischen Expressionswerte aller 37 Proben der phosphorylierten Proteine dargestellt (Abbildung 3.20).



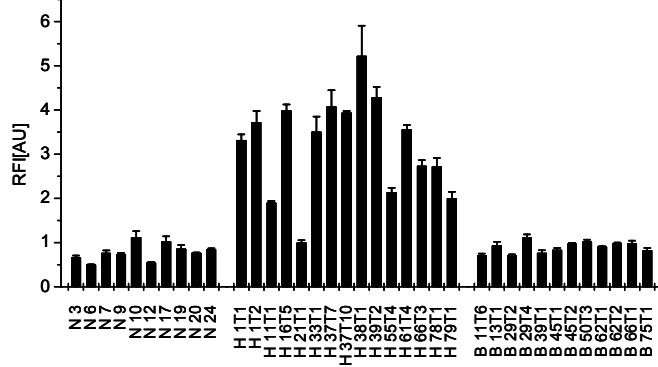
**Abbildung 3.19 Grafische Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebe nach hierarchischer Clusteranalyse.**

Expressionswerte aller nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundene Proteine ( $p < 0.01$ ) sind gezeigt. Die Median-zentrierten und zur Basis 2 logarithmierten Werte sind nach hierarchischer Clusteranalyse (euklidische Distanz, vollständige Verknüpfung) entsprechend der Farbkodierung dargestellt. Waagrecht sind die 37 Proben (15x Ha-ras-, 12x B-raf-mutierte Maus-Lebertumore und 10x Maus-Lebernorgewebe) und senkrecht die vier Expressionswerte aufgetragen. Den Analytenamen nachstehender Bezeichner: p - phospho.

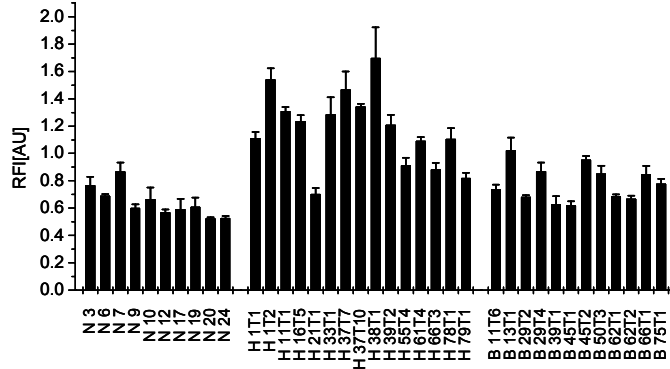
**Abbildung 3.20 Darstellung der differenziell exprimierten Proteine der Gruppe der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebe in Balkendiagrammen.**

Spezifische Expressionswerte der vier nach Varianzanalyse der Proteinexpressionswerte (Wilcoxon Rangsummentest) als statistisch signifikant unterschiedlich exprimiert gefundenen Proteine ( $p < 0.01$ ) sind dargestellt. In den Balkendiagrammen werden die für die 37 Proben (15x Ha-ras-, 12x B-raf-mutierte Maus-Lebertumore und 10x Maus-Lebernorgewebe) erhaltenen relativen Fluoreszenzsignale (RFI) aufgetragen. Den Analytenamen nachstehender Bezeichner: p - phospho.

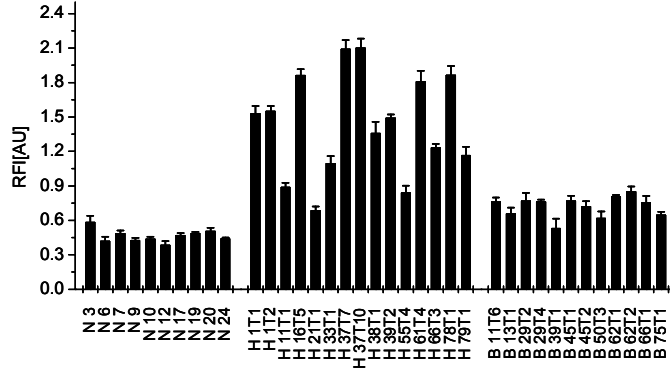
**Erk 1/2 pT202/Y204**



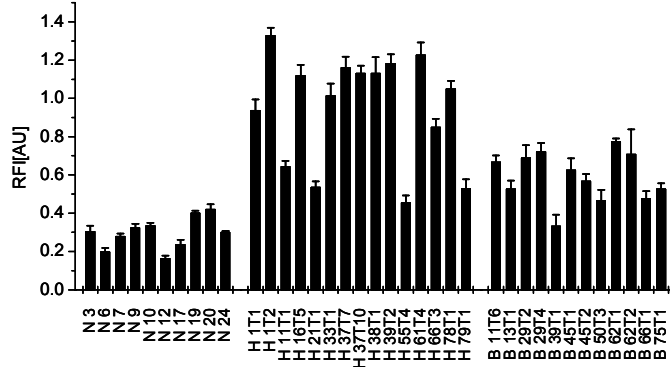
**JNK/SAPK pT183/Y185**



**MEK 1/2 pS217/221**

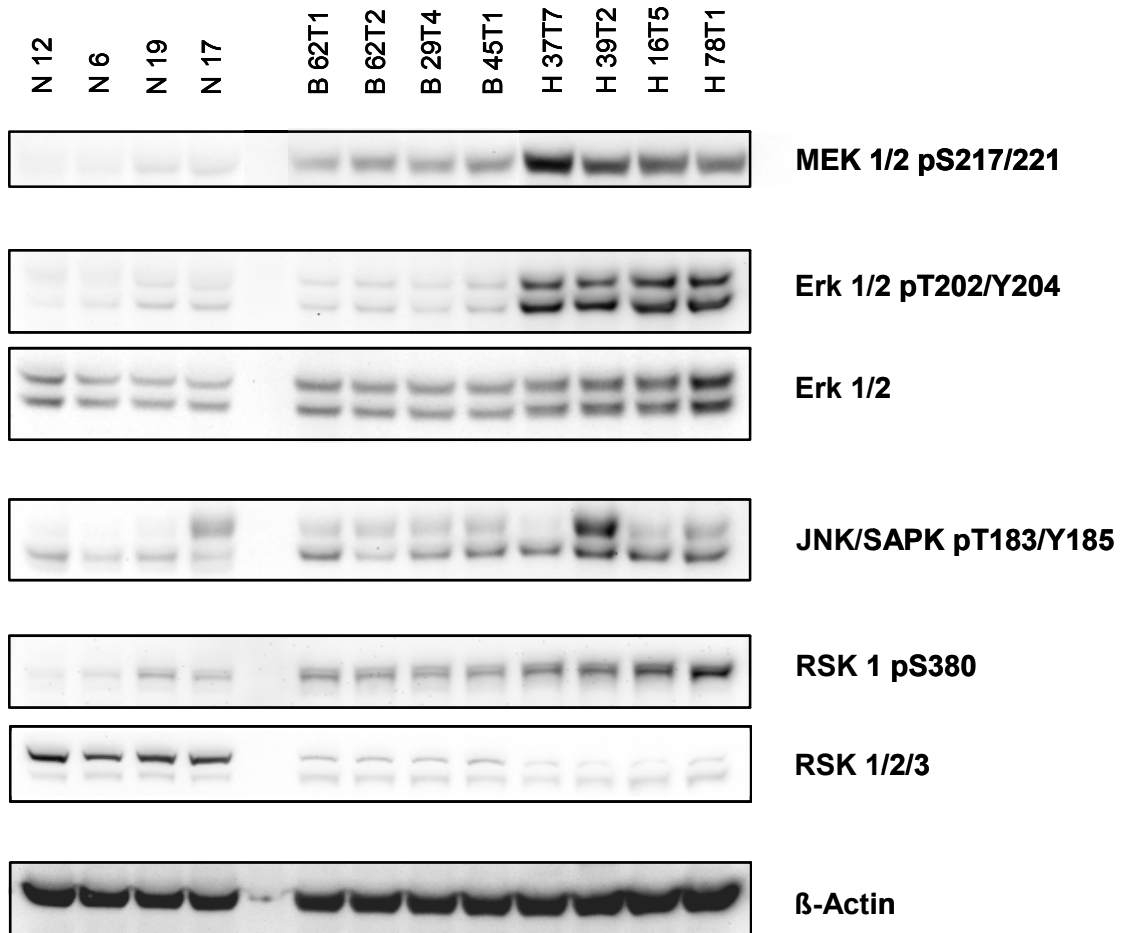


**RSK 1 pS380**



Zur Verifizierung der im Planaren Reversen Protein-Mikroarray gefundenen signifikanten Expressionsunterschiede der *Ha-ras* und *B-raf* Probengruppen wurden Western Blot Experimente durchgeführt. Jeweils vier repräsentative Proben der drei Probengruppen (*Ha-ras*, *B-raf*, Normal) wurden eingesetzt.

Die auch im Planaren Reversen Protein-Mikroarray verwendeten Antikörper aller vier, als signifikant gefundenen Analyten, sowie zwei Antikörper korrespondierender, nicht-phosphorylierter Antigene und anti- $\beta$ -Actin als Kontrollprotein, wurden inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 dargestellt und bestätigen in allen vier Fällen die gefundenen Unterschiede der Proteinexpression zwischen den *Ha-ras*- und den *B-raf*-mutierten Maus-Lebertumoren. So zeigen sich für Mek1/2 pS217/221, Erk1/2 pT202/Y204, JNK/SAPK pT183/Y185 und RSK 1 pS380 die jeweils höchsten Expressionen in den *Ha-ras*-mutierten Lebertumorproben. Die Normalgewebeproben weisen in alle Fällen die geringsten Expressionen und die *B-raf* Proben Expressionen zwischen den beiden anderen Gruppen auf. Für RSK 1/2/3 bestätigt sich, dass wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt (Abbildung 3.16), die Expression in den Tumoren deutlich geringer ist als im Normalgewebe, sich zwischen diesen aber nicht unterscheidet. Erk1/2 zeigt eine leicht erhöhte Expression in den Tumoren, welche den im vorhergehenden Kapitel gezeigten Expressionsveränderungen entspricht (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.21 Western Blot einiger differenziell exprimierter Proteine der Gruppe der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumorgewebe.**

Jeweils 20  $\mu$ g der je vier Lysate der Gruppen der Ha-ras- und B-raf-mutierten Maus-Lebertumor- und Normalgewebeprouben wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf PVDF transferiert. Nach Inkubation der Antikörper wurde Lumineszenz detektiert. Dargestellt sind die spezifischen Banden der Antikörper. Es wurden keine relevanten Nebenbanden detektiert. Zusätzlich wurde  $\beta$ -Actin als Ladekontrolle inkubiert. Den Analytenamen nachstehender Bezeichner: p - phospho.

## 4 Diskussion

Signaltransduktions- und Regulationsmechanismen sind in Tumoren dereguliert und vermitteln den Tumorzellen einen Selektionsvorteil. Die Veränderung von mindestens sechs zellulären Prozessen wird als notwendig für die Krebsentstehung betrachtet: (I) Erlangung der Unabhängigkeit von Proliferationssignalen, (II) Vermeidung der Apoptose, (III) Unempfindlichkeit gegenüber Antiproliferationssignalen, (IV) unbegrenztes Zellteilungsvermögen, (V) Metastatisierungsfähigkeit, (VI) Anregung der Angiogenese (Hanahan und Weinberg, 2000). Krebs stellt somit eine die Kommunikation in und zwischen Zellen betreffende Krankheit dar. Eine Möglichkeit zur Erlangung der erwähnten Unabhängigkeit von Proliferationssignalen sind aktivierende Mutationen in Proteinen von Signaltransduktionswegen, die eine Rezeptorstimulation überflüssig machen. Die Mutationen in den in dieser Arbeit untersuchten Maus-Lebertumoren betreffen die Gene von *Ha-ras* und *B-raf*, zwei am Beginn des Erk/MAPK-Signalweges gelegene Regulatoren, sowie *Ctnnb1*, den zentralen Effektor im Wnt-Signalweg. Alle drei Mutationen führen zu aktivierend wirkenden Proteinen, die in Signaltransduktionsprozessen auch ohne Liganden-Rezeptor-Interaktion aktiv sind. Alle drei betroffenen Gene sind auch in humanen Tumoren in mutierter Form gefunden worden. So treten in rund 20 % aller humanen Tumore aktivierende Punktmutationen in *ras*-Genen auf (Bos, 1989). Des Weiteren kommen *B-raf* Mutationen in menschlichen Melanomen mit einer Häufigkeit von rund 70 % vor (Davies *et al.*, 2002). Für *Ctnnb1*, das für  $\beta$ -Catenin, den zentralen Effektor des Wnt-Signalweges, kodierende Gen, liegt die Mutationshäufigkeit in humanen Lebertumoren bei rund 40 % (Breuhahn *et al.*, 2006; Giles *et al.*, 2003).

Die untersuchten Tumore entstammen einem Tiermodell in dem nach chemisch induzierter Mutagenese Lebertumore erhalten werden. Diese weisen in bis zu 50 % der Fälle Mutationen im Gen von *Ha-ras* und in bis zu 20 % Mutationen im Gen von *B-raf* auf (Jaworski *et al.*, 2005a). Bei zusätzlicher Tumorpromotion sind bis zu 80 % der Tumore im *Ctnnb1*-Gen mutiert und es werden weder *Ha-ras* noch *B-raf* Mutationen gefunden (Aydinlik *et al.*, 2001).

In diesen Maus-Lebertumoren wurden vergleichende Expressionsanalysen auf Proteinebene und Bestimmungen des Aktivierungsgrades von katalytisch oder regulativ aktiven Proteinen durchgeführt. Dies geschah nicht für einzelne Proteine sondern für eine große Zahl von Analyten, da es der Bestimmung von komplexen, durch die Modifizierung von Proteinen regulierten, Signaltransduktionswegen diene. Fokus war die Signaltransduktion des Erk/MAPK- und des Wnt-Signalweges. Darüber hinaus wurden Expressionswerte von Analyten aus dem Jak/STAT-, p38/MAPK-, JNK/SAPK- und mTOR-Signalweg sowie Zell-

Zellinteraktions- und Proliferationsmarker bestimmt, um die vielfältige Vernetzung und das Übersprechen der Signalwege zu erfassen. In einem experimentellen Ansatz wurden mit der Methode des Planaren Reversen Protein-Mikroarrays parallel in bis zu 40 Proben Expressionswerte von mehr als 100 Analyten untersucht. Das Ergebnis der Proteinexpressionsanalysen zeigte, dass sich nicht nur die Tumore mit unterschiedlicher Aktivität der beiden Signalwege (Wnt und Erk/MAPK) voneinander unterscheiden ließen, sondern sich auch Tumore mit Mutationen in den Genen für *Ha-ras* und *B-raf* signifikant voneinander unterscheiden.

## 4.1 Methodik der Proteinexpressionsanalyse

Die Bestimmung der Aktivität eines Systems wie der Signaltransduktion, welches zur Regulation zellulärer Vorgänge benötigt wird, erfordert die Untersuchung einer großen Zahl von Analyten. Dies ist notwendig, da die Signaltransduktion ein komplexes Netzwerk darstellt, in dem für die Informationsweiterleitung eine große Zahl verschiedener Signalwege verwendet wird. Jeder dieser einzelnen Signalwege setzt sich aus einer Vielzahl von Proteinen als Regulatoren und Effektoren zusammen, die zudem noch in zahlreichen modifizierten Formen vorkommen. Mittels dieser Modifikationen, zum Beispiel durch Phosphorylierung oder Spaltung, werden die Eigenschaften der Proteine und damit deren Aktivitäten verändert. Meist ist nicht die Gesamtmenge der Proteine ausschlaggebend für die regulatorische Aktivität, sondern das Vorkommen der aktivierten Formen. Zudem interagieren viele der Signalwege miteinander, so dass es zu einer Vernetzung bei der Regulation kommt. Somit muss bei einer Proteinexpressionsanalyse, die die Auswirkungen einer gezielten Veränderung in einem Signaltransduktionsweg zum Ziel hat, nicht nur die große Zahl der Proteine dieses Weges untersucht werden. Auch müssen die Mediatoren der interagierenden Signalwege bestimmt werden. Zusätzlich ist die große Zahl von regulatorischen Modifikationen der Proteine zu berücksichtigen, da damit erst eine Aussage über die Aktivität der Signaltransduktionswege möglich ist.

Zur Proteinexpressionsanalyse wird bei einer kleinen Anzahl von Analyten üblicherweise die Methode des Western Blot als Standard verwendet werden. Aufgrund des oben erläuterten Bedarfs, eine Vielzahl von Proteinen und modifizierten Formen bei der Betrachtung von Prozessen der Signaltransduktion zu bestimmen, ist diese Methode jedoch zu stark limitiert. So wurde die Methode des Planaren Reversen Protein-Mikroarray verwendet, die auch bereits zur Untersuchung von Signaltransduktionswegen nach der Stimulation von Zellen (Chan *et al.*, 2004) oder zum Vergleich von Tumorzelllinien (Akkiprik *et al.*, 2006; Nishizuka *et al.*, 2003a) verwendet worden war. Hier wurde die Methode zudem verwendet, da sie mit Materialmengen, die für den Western Blot viel zu gering wären, die Möglichkeit bietet, diese große Anzahl an Analyten, hier bis zu 116, auf ihre Expression hin zu

untersuchen. So reichen dafür in einem Proteinmikroarray-Experiment der hier beschriebenen Art rund 60 µg Protein aus, was im Western Blot für die Bestimmung von sechs Analyten benötigt würde. Die für eine vollständige Durchführung mittels Western Blot notwendigen Proteinmengen liegen also um ein vielfaches höher und wären zudem nicht für alle Proben vorhanden gewesen. Von der experimentellen Durchführung ist über den Western Blot eine vergleichende Proteinexpressionsanalyse über 40 Proben kaum anzufertigen. Dies stellt im Planaren Reversen Protein-Mikroarray kein Problem dar, da alle 40 Proben parallel in einem Assay vermessen werden. Zusätzlich weist der Mikroarray eine wesentlich bessere Sensitivität und einen größeren dynamischen Bereich auf. So ist diese Methode aufgrund des auf planarer Wellenleiter-Technologie basierenden Ausleseverfahrens in der Lage, eine so geringe Anzahl wie 500 Analytmoleküle in einem Spot nachzuweisen, in dem rund  $2 \times 10^8$  Moleküle immobilisiert sind (Pawlak *et al.*, 2002a). Daher ist es möglich, Expressionswerte für Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, c-Fos, c-Myc und Elk-1 direkt zu bestimmen. Diese Sensitivität erlaubt es zusammen mit dem großen dynamischen Bereich von nahezu sechs Größenordnungen einen sehr großen Umfang von Expressionswerten zu erfassen (Pawlak *et al.*, 2002a). Somit können die Expressionsmuster und deren Änderungen nicht nur von häufig exprimierten Proteinen detektiert werden, sondern auch von sehr gering vorkommenden Formen von Proteinen. Dies ist für die meist nur in geringen Mengen vorhandenen aktivierten Formen der Regulatoren notwendig. Neben der Sensitivität und Dynamik ist für die Aussagekraft und Glaubhaftigkeit der erhaltenen Expressionswerte aber vor allem die Robustheit der Methode wichtig. Diese hat auch entscheidenden Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse. Die Robustheit der mit Planaren Reversen Protein-Mikroarrays erhaltenen Expressionswerte lässt sich im Rahmen des Vergleichs von Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Tumoren (Kapitel 3.2.3.2) bei der Betrachtung der dort für die 10 Normalgewebeproben ermittelten Proteinwerte zeigen. Für die Expressionswerte dieser Proben sind aufgrund des Normalgewebestatus weitestgehend homogene Ergebnisse zu erwarten. Eben dies wird bei der Betrachtung der Expressionswerte der Gruppe der Normalgewebe deutlich. So werden in einer hierarchischen Clusteranalyse (Abbildung 3.14) die Proben in einer absolut homogenen Gruppe gefunden, in der über viele Analyten hinweg nur sehr kleine Schwankungen auftreten. Für die Qualität der erhaltenen Daten im Vergleich zum Western Blot spricht zudem, dass im Fall des Planaren Reversen Protein-Mikroarrays jede Probe in Form einer vierstufigen Verdünnungsreihe und in Duplikaten bestimmt wird, während im Western Blot Einpunkt-Messungen erfolgen. Zudem werden die Expressionswerte der 40 Proben zur gleichen Zeit ermittelt, so dass ohne Assay zu Assay Übertragung der Ergebnisse direkt ein semiquantitativer Vergleich über alle Proben hinweg möglich ist. Im direkten Vergleich der erhaltenen Ergebnisse zwischen Standard und neuer Methode, also Western Blot und Reverse Protein-Mikroarray, konnte repräsentativ mit zwölf Analyten



eine Verifizierung der Ergebnisse im Western Blot gezeigt werden. Einziges nennenswertes Manko ist die im miniaturisierten Dot Blot fehlende Größenauftrennung der Proteine, welche eine, wie in dieser Arbeit dargestellt, recht aufwendige Charakterisierung der zu verwendenden Antikörper hinsichtlich ihrer Spezifität notwendig macht, die an sich jedoch für den Western Blot ebenfalls notwendig ist.

Ausgehend von der Übertragbarkeit der Ergebnisse und der Robustheit stellt der Reverse Protein-Mikroarray also die Methode der Wahl, bei der parallelen Untersuchung einer hohen Anzahl an Analyten in vielen Proben, hier mehr als 100 Analyten in 40 Proben, dar.

## 4.2 Ergebnisse der Proteinexpressionsanalysen

Die in Maus-Lebertumoren durchgeführten Proteinexpressionsanalysen hatten das Ziel die Auswirkungen von Mutationen im Erk/MAPK- und Wnt-Signalweg auf die betroffenen Signalwege selbst, aber auch auf weitere Signalwege zu untersuchen. Aufgrund der zuvor dargestellten Komplexität der Signaltransduktion ist auch bei der Betrachtung von über 100 Analyten nur eine begrenzte Erfassung von Effekten dieser Mutationen möglich. Die Vielzahl an Signalwegen und die große Zahl an regulatorisch aktiven Proteinen, welche häufig in mehreren modifizierten Formen vorkommen, macht eine solche Analyse trotz der hohen Zahl an erfassten Analyten immer zu einem fokussierten Ansatz. So wurde in dieser Arbeit im wesentlichen auf den Erk/MAPK-Signalweg fokussiert, in dem sich mit den *Ha-ras* und *B-raf* Mutationen Veränderungen in zwei frühen Regulatoren fanden. Ein weiterer Schwerpunkt war der in *Ctnnb1*-mutierten Tumoren veränderte Wnt-Signalweg. Zusätzlich wurden weitere zentrale Signalwege, Jak/STAT, p38/MAPK, JNK/SAPK und mTOR analysiert, hier beschränkte sich die Analyse jedoch auf zentrale Regulatoren. Aufgrund der über 100 betrachteten Analyten konnte eine hohe Zahl differenziell exprimierter Proteine gefunden werden. Aus der Vielzahl an möglichen und der Zahl der untersuchten Signalwege und Proteine ergibt sich, dass nicht alle Veränderungen über mehrere stromaufwärts gelegene Regulatoren hinweg zum ursächlichen Stimulus zurückverfolgt werden können. Die Proteinexpressionsanalyse ermöglicht jedoch mit der Bestimmung einer Vielzahl von Proteinen und ihren regulatorisch modifizierten Formen einen breiten Einblick in die Signaltransduktion.

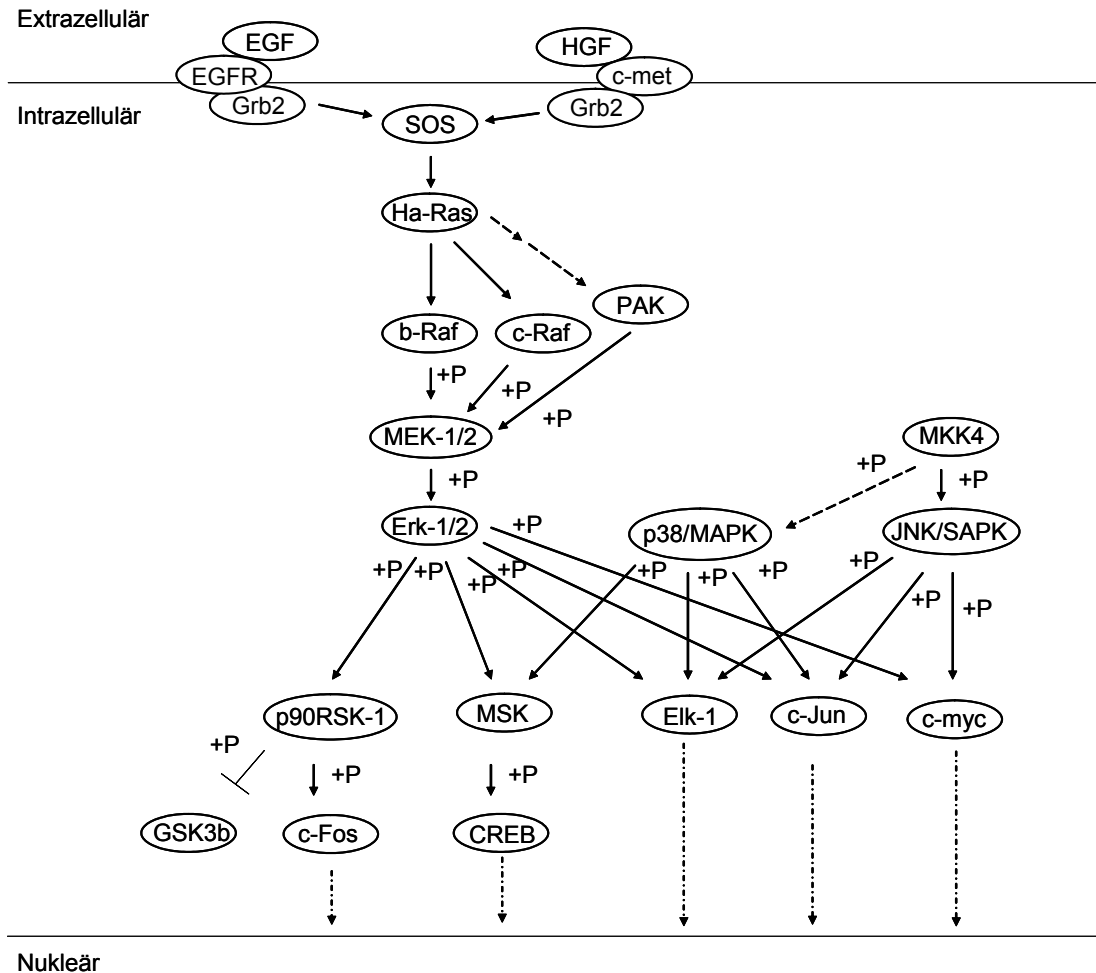
Ausgehend von hier ermittelten Phosphorylierungs- und Proteinexpressionswerten wurden hierarchische Clusteranalysen durchgeführt. Diese zeigten, dass die Veränderungen für die Maus-Lebertumoren geeignet waren, Tumor- und Normalgewebe eindeutig voneinander zu unterscheiden. Dabei traten eine Vielzahl gemeinsamer Unterschiede auf. So waren unter anderem die Expressionen von N- und E-Cadherin, der Glutaminsynthetase, EGFR, Erk 1/2 und Histon H3 in allen drei Arten von Tumoren gegenüber den Normalgeweben verändert.

Neben dieser Differenzierbarkeit gegenüber dem Normalgewebe waren die drei verschiedenen Tumorgruppen klar voneinander zu trennen. Dies stellt für *Ctnnb1*- versus *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierte Tumore ein bereits bekanntes Ergebnis dar. So wurden in mRNA-Expressionsanalysen für *Ctnnb1*- und *Ha-ras*-mutierte Maus-Lebertumore eindeutig unterschiedliche Expressionsmuster gezeigt. Hierbei wurde für die in einer Tumorgruppe gegenüber dem Normalgewebe verändert exprimierte mRNAs in der zweiten Tumorgruppe eine meist unverminderte oder gegensätzlich veränderte Expression gefunden (Stahl *et al.*, 2005). In Proteinexpressionsanalysen, basierend auf 2-D-Gel-MS-Technik, wurden für die in den zwei unterschiedlichen Signalwegen gefundenen Mutationen ebenfalls differenzielle Expressionsmuster bestimmt (persönliche Mitteilung Benjamin Rignall, Abteilung Toxikologie des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinik Tübingen).

Interessanterweise zeigten die in *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren, bei denen die aktivierenden Mutationen in zwei aufeinander folgenden Regulatoren des gleichen Signalweges (Erk/MAPK) liegen, deutliche Unterschiede im Expressionsmuster. Dies war unerwartet, da dies bisher weder mit der durchgeführten mRNA-Expressionsanalyse (Jaworski *et al.*, 2007) noch mit der auf 2-D-Gel-MS-Technik basierenden Proteinexpressionsanalyse, die jeweils mit den gleichen Proben durchgeführt worden waren, gezeigt werden konnte (persönliche Mitteilung Benjamin Rignall). Auch in der Literatur existieren keine Expressionsanalysen von Tumorgeweben mit diesen beiden Mutationen die entsprechende Effekte beschreiben. Daher wurde bei den durchgeführten Proteinexpressionsanalysen der Schwerpunkt massgeblich auf Proben dieser Tumorgruppen und auf entsprechende für diese Unterscheidung relevante Analyten gelegt.

Die bei der hierarchischen Clusteranalyse gebildeten Gruppen von Analyten, die hier für die Differenzierbarkeit der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren massgeblich sind, werden aufgrund von Distanzfunktionen, die einen Maßstab für die Ähnlichkeit darstellen, gebildet. Zur statistischen Bestimmung individueller differenziell zwischen den Probengruppen exprimierter Proteine müssen jedoch zusätzlich Varianzanalysen durchgeführt werden. Hierfür wurde die nicht-parametrische Varianzanalyse des Wilcoxon Rangsummentest ( $n=2$ ) verwendet. Dies war notwendig, da nicht für alle bestimmten Analyten die notwendige Bedingung der Normalverteilung gezeigt werden konnte. Diese wäre für die klassischen Methoden der Varianzanalyse wie Students T-Test ( $n=2$ ) oder ANOVA ( $n>2$ ) notwendig gewesen. Die auf diese Weise durchgeführte statistische Auswertung der Differenzierbarkeit der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren ergab vier signifikante Analyten. Dabei wurden aus dem Erk/MAPK-Signalweg drei Proteine ermittelt (MEK, Erk, RSK), die nach physiologischer Rezeptorstimulation über Ha-Ras und B-Raf in direkter Abfolge im Erk/MAPK-Signalweg aktiviert werden. Des Weiteren wurde die JNK/SAPK identifiziert, die das zentrale Protein des gleichnamigen Signalweges darstellt. Da diese vier Proteine in ihren aktivierten phosphorylierten Formen differenziell aktiviert auftraten, konnten diese

Expressionsunterschiede von keiner der beiden vorher eingesetzten Techniken detektiert werden. Im Fall der mRNA-Analyse werden logischerweise keine Proteinunterschiede detektiert und in der 2-D-Gel-MS-Analyse wurden nur die Punkte im 2-D-Gel massenspektrometrisch analysiert, welche über die Färbeintensitäten unterschiedliche Proteinmengen anzeigten, was aber aufgrund der unveränderten oder zu geringfügig veränderten Gesamtproteinmengen nicht der Fall war.



**Abbildung 4.1 Schemazeichnung einiger Interaktionen analysierter Proteine.**

Vereinfachte schematische Darstellung der in der Diskussion behandelten Proteine, die in der Proteinexpressionsanalyse untersucht worden waren. Pfeile ( $\downarrow$ ) bedeuten aktivierende und Striche mit Querbalken ( $\perp$ ) bedeuten inhibierende Einflüsse. Phosphorylierungen sind durch +P symbolisiert. Die Namen der Proteine richten sich nach den von der Signal Transduction Knowledge Environment der American Association for the Advancement of Science verwendeten Bezeichnungen und Synonyme (URL: <http://stke.sciencemag.org/cm> (Stand: 08.02.2008)).

Die drei Proteine MEK, Erk und RSK sind zentrale Elemente des Erk/MAPK-Signalweges, dessen Aktivität über die Phosphorylierung der beteiligten Proteine reguliert wird, und der

über Erk eine Vielzahl von Effekten auf Proteine der Zellmembran, des Zytoskeletts, zytosolische Enzyme und Transkriptionsfaktoren vermittelt (Dhillon *et al.*, 2007; Yoon und Seger, 2006). Die physiologische Aktivierung dieses Signalweges erfolgt durch Stimulation von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mittels einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren wie HGF (*hepatocyte growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*) und NGF (*nerve growth factor*), sowie durch Insulin, und wird über Ras und Raf weitergeleitet. Dabei wird in einer Ras-abhängigen Rekrutierung von Raf an die Zellmembran die Phosphorylierungskaskade in Gang gesetzt, woraufhin der Signalweg aktiviert wird.

Bei beiden im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Mutationen ist also eine Aktivierung auch ohne physiologische Rezeptor-Liganden-Interaktion gegeben. Für zwei der oben beschriebenen Wachstumsfaktoren (HGF und EGF) wurden Expressions- und Phosphorylierungsmuster der dazugehörigen Rezeptoren (c-Met und EGFR) untersucht. Beide Rezeptoren gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und wurden als in den Tumoren verändert exprimiert gefunden. Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) in seiner unphosphorylierten Form, sowie der an einer aktivierenden Autophosphorylierungsstelle, dem Tyrosin 1173 (Downward *et al.*, 1984), phosphorylierten Form, wurde als in den Tumoren geringer exprimiert gefunden. Das Verhältnis dieser Expressionswerte, also die relative Aktivität, ergab eine im Vergleich zum Normalgewebe unveränderte und geringe Aktivierung des EGF Rezeptors, welche durch den sehr geringen und ebenfalls unveränderten Expressionswert der an Tyrosin 845 phosphorylierten Form des EGF Rezeptors bestätigt wurde. Diese Phosphorylierungsstelle ist nicht primär aktivierend, ist aber in der Lage, aufgrund der Lokalisation in der katalytischen Domäne, den aktivierten Zustand zu stabilisieren (Jorissen *et al.*, 2003). Dieses Ergebnis korreliert mit mRNA-Expressionsanalysen der Arbeitsgruppe Schwarz, in denen in Tumoren des gleichen Tierversuchs eine verminderte EGFR Expression in sowohl Ha-*ras*- als auch B-*raf*-mutierten Tumoren gezeigt wurde (Jaworski *et al.*, 2007). Ebenso wie der EGFR wird auch c-Met, der Rezeptor des hepatozellulären Wachstumsfaktors (HGF), in seiner Gesamtproteinmenge als in den Tumoren vermindert exprimiert gefunden. Somit werden für zwei Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die über den gemeinsamen Effektor Ras zur Aktivierung des Erk/MAPK-Signalweges in der Lage sind, sowohl in den Ha-*ras*- als auch den B-*raf*-mutierten Maus-Lebertumoren verringerte Proteinnengen gefunden.

Als Auswirkungen der zur permanenten Aktivierung des kleinen G-Proteins Ha-Ras führenden Mutation würden Veränderungen in dessen direkten Substraten erwartet werden. Als Maß dafür kommt eine verstärkte Lokalisierung von Raf an der Zellmembran durch die Interaktion mit Ras, sowie die Phosphorylierung der zur Aktivierung notwendigen Aminosäuren in Frage. Im Rahmen der Expressionsanalyse wurde für die Proteine keine Differenzierung hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation vorgenommen. Für B-Raf und

C-Raf sowie für Ha-Ras selbst wurde keine veränderte Gesamtproteinmenge gefunden, wobei eine erhöhte katalytische Gesamtaktivität ohne erhöhte Expression der Kinasen möglich ist. Aktivierende Phosphorylierungsstellen von B-Raf konnten in der Proteinexpressionsanalyse nicht bestimmt werden. Die Signale des konstitutiv phosphorylierten Serin 464 im B-Raf der Maus (B-Raf pS445<sub>hu</sub>), stellen kein Maß für die Aktivität von B-Raf dar (Mason *et al.*, 1999) und waren auch im Vergleich von Tumor- zu Normalgewebe nicht verändert. Die Phosphorylierung von C-Raf an Serin 259, für die keine Unterschiede zwischen den Proben Gruppen gefunden wurde, führt zur Bindung von inhibitorischen Proteinen. Diese Bindung hemmt die Interaktion von C-Raf und Ras und somit die Aktivierung von C-Raf (Dhillon *et al.*, 2002; Light *et al.*, 2002). Die Aktivierung erfolgt nach Dephosphorylierung durch die Proteinphosphatase-2A (PP2A) und die Phosphorylierung von C-Raf an Serin 338. Dies ist die zur B-Raf Serin 464 homologe Phosphorylierungsstelle, die jedoch anders als in B-Raf nicht konstitutiv phosphoryliert vorliegt, sondern nach Ras Aktivierung phosphoryliert wird und für die Aktivität von C-Raf essentiell ist (Mason *et al.*, 1999; Wellbrock *et al.*, 2004). Für C-Raf pS338 wurde keine Veränderung im Grad der Phosphorylierung zwischen den Proben Gruppen gefunden, was auf eine unveränderte Aktivität hindeutet. Somit lässt sich auf der Ebene der B- und C-Raf Proteine mit den untersuchten Analyten in dieser Methode keine aktivierende Wirkung der Ha-ras Mutation nachweisen.

Diese Aktivierungskaskade im Erk-Signalweg ist von zentralem Interesse, so dass in unserem Labor ein alternativer Assay eingesetzt wurde, um weitere Informationen zur Phosphorylierung im Signalweg zu erhalten. Der eingesetzte Assay, ein parallelisierter Sandwich Immunoassay, erlaubte einen Teil der untersuchten Proben mit höherer Sensitivität auf B-Raf pS445, C-Raf, C-Raf pS338, MEK 1, MEK 2, MEK 1/2 pS217/221, Erk 1, Erk 1 pT202/Y204, Erk 2, Erk 2 pT185/Y187 und STAT1 zu untersuchen. Das Ergebnis zeigt, dass die gefundene Aktivierung der Proteine MEK, Erk und RSK in den Ha-ras mutierten Tumoren zumindest auch über C-Raf vermittelt wird.

Dieses Ergebnis, des von O. Pötz durchgeführten Versuchs deckt sich mit der in Melanozyten gezeigten Signaltransduktion im Falle von aktivierender *ras* Mutation. Hier wurde gezeigt, dass die Signalübertragung zu MEK nicht über B-Raf, sondern C-Raf verläuft (Dumaz *et al.*, 2006). Dabei wird aufgrund der Tatsache, dass die Aktivierung von B-Raf durch Ha-Ras viel stärker ist als die von C-Raf, die Möglichkeit diskutiert, dass eine Ha-Ras mutationsbedingte Aktivierung von B-Raf eventuell eine Erk Hyperaktivierung mit möglichem Zellzyklusarrest oder Seneszenz zur Folge hätte. Dies wäre im Rahmen der Tumorentstehung kontraindiziert, so dass C-Raf zur Erk/MAPK-Signalwegsaktivierung verwendet wird (Dhomen und Marais, 2007).

Aufgrund der kontinuierlichen Aktivierung von B-Raf im Falle der Mutation im Aktivierungssegment wurde keine veränderte Phosphorylierung des Proteins selbst erwartet und es wurde keine Veränderung in der Gesamtproteinmenge nachgewiesen. Im Falle der *B-raf* Mutation ist es zwangsläufig B-Raf, welches MEK und damit den Erk/MAPK-Signalweg aktiviert. Somit ergibt sich die Möglichkeit, dass die Auswirkungen der *Ha-ras* und *B-raf* Mutationen, obwohl sie beide den Erk/MAPK-Signalweg stimulieren, unterschiedlich ausfallen.

Beide Mutationen wirken sich über die Kinaseaktivität des Raf Proteins auf dessen direkte Substrate, die MEK Proteine, aus. Die detektierten Phosphorylierungsstellen der Proteine MEK 1/2 (MEK 1 Serin 217/221 und MEK 2 Serin 222/226) stellen dabei die durch Raf phosphorylierten und zur Aktivierung der MEK Kinaseaktivität benötigten Aminosäuren dar. So wird für MEK 1/2 pS217/221 ein in den Tumoren erhöhtes Vorkommen gefunden. Dies erlaubt zudem die Differenzierung der Gruppen der *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumore voneinander. Damit wird auf dieser Aktivierungsebene erstmals ein Unterschied zwischen den beiden Tumorgruppen offenbar, der auf eine unterschiedlich starke Aktivierung der Kinaseaktivität der Raf Proteine, oder auf eine weitere Regulation auf der Ebene der MEK Phosphorylierung hindeutet. Die differenzielle Expression von MEK 1/2 pS217/221 in den drei Proben Gruppen (*Ha-ras*, *B-raf* und Normal) konnte im Western Blot bestätigt werden. Für die Gesamtproteinmengen der MEK Proteine wurden mit den Antikörpern MEK 1 und MEK 2 keine Unterschiede in der Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe gefunden.

Die für MEK 1/2 gefundene Aktivierung zeigte sich auch in der Phosphorylierung der einzigen bekannten Substrate dieser Kinasen, den Proteinen Erk 1 und Erk 2. Die den beiden gemeinsamen Phosphorylierungsstellen (Erk 1 Threonin 203 und Tyrosin 205 und Erk 2 Threonin 183 und Tyrosin 185 (Erk 1/2 pT202/Y204<sub>hu</sub>)) weisen auf eine generelle Aktivierung in den Tumoren hin, da die Expressionswerte beider Tumorgruppen über denen des Normalgewebes liegen. Die Ergebnisse zeigen, wie im Fall des phosphorylierten MEK, Unterschiede für die Expressionswerte der in *Ha-ras*- oder *B-raf*-mutierten Tumore und spiegeln die unterschiedlich effektive Aktivierung des zentralen Regulators des Erk/MAPK-Signalweges (Erk) durch Ha-Ras und B-Raf wieder. Diese Effekte konnten im Western Blot mit dem Erk 1/2 pT202/Y204 Antikörper bestätigt werden. So ist die gefundene Aktivierung in den *Ha-ras*-mutierten Tumoren deutlich zu erkennen. Die Unterschiede zwischen den *B-raf*-mutierten Tumoren und den Normalgeweben fällt allerdings im Western Blot nicht so eindrucksvoll wie im Fall von MEK 1/2 pS217/221 aus, was aber aufgrund der kleinen Differenzen in den mit dem Mikroarray ermittelten Expressionswerten erklärbar ist.

Neben diesen aktivierenden Phosphorylierungen von Erk 1 und Erk 2 wurden auch Veränderungen in der Gesamtproteinmenge von Erk gefunden. Der bispezifische Antikörper Erk 1/2 und der Erk 1 spezifische Antikörper zeigten in den Tumoren eine erhöhte Expression, während der Erk 2 Antikörper eine verringerte Expression von Erk 2 anzeigt. Im Western Blot wird bei Verwendung des Erk 1/2 Antikörpers eine eher vermehrte Expression von Erk 1 und Erk 2 in den Tumoren aufgezeigt. Damit stimmt die mit den beiden Methoden unter Verwendung des gleichen Antikörpers gefundene erhöhte Expression von Erk 1/2 überein. Die Diskrepanz hinsichtlich des Ergebnisses, dass mit dem Erk 2 Antikörper im Planaren Reversen Protein-Mikroarray erhalten wurde, ist auf die offenbar nur bedingte Tauglichkeit des Antikörpers zurückzuführen, die bei Betrachtung der gemessenen nur sehr kleinen Signalwerte ersichtlich wird. Betrachtet man die relativen Aktivitäten der Erk-Proteine, also den Anteil von aktiviertem am gesamten Erk-Protein, so bleibt das Phänomen des in *Ha-ras*-mutierten Tumoren vermehrt aktivierten Erk 1/2 bestehen.

Aus der Vielzahl an Erk-Substraten wurden zwei zwischen den Gruppen signifikant unterschiedlich exprimiert gefunden. Dies ist der Transkriptionsfaktor Elk-1 und die 90kDa ribosomale S6 Kinase (RSK 1). Für beide Analyten wurde ein erhöhter Phosphorylierungsgrad gefunden.

Elk-1 gehört zur Familie der durch extrazelluläre Signale regulierten Transkriptionsfaktoren mit Ets Domäne, den *Ternary Complex Factors* (TCF). Gemeinsam mit *Serum Response Factor* (SRF) Dimeren bilden TCFs ternäre Komplexe mit dem *Serum Response Element* (SRE), einem in den Promotoren der Zielgene gelegenen strukturellen Interaktionselement. Die Phosphorylierung und somit transkriptionelle Aktivierung des TCFs Elk-1 kann durch die drei Familien der MAP Kinasen Erk, JNK und p38 erfolgen (Buchwalter *et al.*, 2004). Für die aktivierende Phosphorylierungsstelle an Serin 384 ist gezeigt worden, dass sie nach Wachstumsfaktor induzierter Aktivierung des Erk/MAPK-Signalweges über Erk phosphoryliert wird und für die transkriptionelle Aktivität von Elk-1 essentiell ist (Marais *et al.*, 1993). Die Phosphorylierung von Elk-1 an Serin 384 (Elk-1 pS383<sub>hu</sub>) wurde nachgewiesen, und zeigte in den Tumorgruppen einen erhöhten Phosphorylierungsgrad, der sich jedoch zwischen den Tumorgruppen *Ha-ras* und *B-raf* nicht unterschied. Zusätzlich wurde für Elk-1 eine verringerte Expression in diesen Tumoren gefunden. Dies konnte im Western Blot, sowie mit einem weiteren Elk-1 spezifischen Antikörper eines alternativen Herstellers bestätigt werden. Eine verringerte Zugänglichkeit des Epitops für den Gesamtprotein-Antikörper aufgrund der erhöhten Phosphorylierung kann ausgeschlossen werden, da die von den Elk-1 Antikörpern gebundenen Epitope nicht mit den Phosphorylierungsstellen übereinstimmen und die Antikörper zudem polyklonal waren. Jedoch ist zu erwähnen, dass bei Analysen von *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren auf mRNA-Ebene dieser Effekt nicht beobachtet worden war (Jaworski *et al.*, 2007; Stahl *et al.*, 2005).

Trotz der in den Tumoren gezeigten Aktivierung von Elk-1 konnte für das durch Elk-1 aktivierte prototypische *immediate early gene* c-Fos keine erhöhte Expression bestimmt werden. Für c-Jun das mit c-Fos zum Aktivator Protein-1 (AP-1) dimerisiert, und daraufhin als Transkriptionsfaktor wirkt, wurde ebenfalls keine veränderte Expression detektiert. Diese auf den ersten Blick widersprüchliche Beobachtung passt jedoch zum Ergebnis eines publizierten Zellkultur- und Tierexperiments. In diesem war gezeigt worden, dass Hepatozyten mit stabil transfiziertem und kontinuierlich exprimiertem c-Fos, und daraufhin aktiviertem AP-1, in Kombination mit aktivierend mutiertem Ha-ras nicht mehr proliferieren, und zudem verstärkt Zelltod auftritt. Bei *in vivo* Studien wuchsen nach subkutaner Applikation die in Ha-ras aktivierend mutierten und zusätzlich c-Fos überexprimierenden Tumore um mehr als 50 % langsamer als die nur in Ha-ras aktivierend mutierten (Mikula *et al.*, 2003). Somit könnte die nicht permanent erhöhte Expression von c-Fos und c-Jun in den untersuchten Tumoren einen Selektionsvorteil darstellen.

Das zweite Erk-Substrat das differenziell exprimiert gefunden wird ist die 90kDa ribosomale S6 Kinase (RSK 1). Die RSK Proteine bilden mit den Mitogen- und Stress-aktivierten Proteinkinasen (MSK) eine Familie von Proteinkinasen, die die Signaltransduktion stromabwärts der MAP Kinase Kaskaden vermitteln (beide sind zumeist Serinkinasen, die Phosphorylierung von Threonin ist nur zweimal gezeigt worden). In der Klasse der Säugtiere sind vier RSK-Gene (RSK 1-4) und zwei MSK-Gene (MSK 1-2) beschrieben. Anders als die RSK Proteine sind die MSK Proteine nicht nur Erk-Substrate sondern auch Substrate von p38. Die Proteine beider Gruppen setzen sich aus zwei Kinasedomänen verbunden durch eine Verknüpfungsdomäne zusammen, wobei die N-terminale Kinasedomäne für die Phosphorylierung der Substrate notwendig ist und die C-terminale bei der Aktivierung der N-terminalen eine Rolle spielt. Zur Aktivierung von RSK 1 sind insgesamt vier Phosphorylierungen notwendig. Damit müssen alle aktivierenden der insgesamt sechs vorhandenen Phosphorylierungsstellen modifiziert werden. Die dazu notwendige Phosphorylierungskaskade beginnt mit der Phosphorylierung von zwei Phosphorylierungsstellen durch Erk, dies sind Threonin 562 in der C-terminalen Kinasedomäne und Serin 352 in der Verknüpfungsdomäne. Daraufhin wird Serin 369 durch die C-terminale Kinaseaktivität phosphoryliert welches zusammen mit dem durch Erk phosphorylierten Serin 352 die N-terminale Kinase aktiviert. Diese Prozesse führen im letzten Schritt der Aktivierung zur Rekrutierung der *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1* (PDPK1), welche Serin 221 in der N-terminalen Kinasedomäne phosphoryliert. Zur großen Zahl an Substraten der RSKs gehören unter anderem auch einige in dieser Proteinexpressionsanalyse untersuchte Proteine (Bad, Fos und GSK3 $\beta$ ). (Frodin und Gammeltoft, 1999; Hauge und Frodin, 2006)

Die Erhöhung des Phosphorylierungsgrades der RSK 1 an Serin 369 (RSK 1 pS380<sub>hu</sub>) in den Tumoren kann also als Maß für deren Aktivierung betrachtet werden. Dabei unter-



schied sich die gefundene Phosphorylierung nicht nur zwischen Tumor- und Normalgewebe, sondern differenzierte die *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren. Dieser differenzielle Effekt wurde im Western Blot bestätigt und stellt nach Erk und MEK den dritten im Erk/MAPK-Signalweg linear in Reihe gelegenen Expressionswert dar, der sich in den beiden Mutationsarten unterscheidet. Wie beim Gesamtproteinexpressionswert von Elk-1 wurde auch für RSK 1/2/3 eine verringerte Expression in beiden Tumorgruppen bestimmt, die im Western Blot bestätigt werden konnte. Einen ursächlichen Zusammenhang hinsichtlich der Zugänglichkeit des Epitops zwischen den erhöhten Signalen des RSK 1 pS380 Antikörpers und der verringerten Gesamtexpression die mit dem RSK 1/2/3 Antikörper nachgewiesen wurde lässt sich ausschließen. Das Epitop des RSK 1/2/3 Antikörpers liegt im Bereich um die Aminosäure Aspartat 648 des Maus RSK 1. Dennoch bleibt anzumerken, dass auch für RSK ebenso wie zuvor für Elk-1 kein entsprechender Effekt bei Expressionsanalysen von *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren auf mRNA-Ebene beobachtet worden war (Jaworski *et al.*, 2007; Stahl *et al.*, 2005).

Die Expressionsanalysen dieser Arbeit umfassten auch Substrate der RSK Proteine. Dazu zählt die multifunktionale Proteinkinase GSK3 $\beta$ , das proapoptotische Protein Bad sowie der Transkriptionsfaktor c-Fos. Proteinexpressionswerte von c-Fos, jedoch nicht von dessen phosphorylierten Formen, waren in dieser Arbeit bestimmt worden. Daher kann über die RSK abhängige Phosphorylierung von c-Fos an Serin 362 und eine darüber stimulierte Promotion der Zellproliferation keine Aussage gemacht werden. Für das durch Phosphorylierung an Serin 112 inaktivierte proapoptotische Protein Bad wurden weder für Bad noch für Bad pS112 Expressionsunterschiede in den betrachteten Proben gefunden. Die multifunktionale Proteinkinase GSK3 $\beta$ , die in die Regulation vieler Prozesse, wie mRNA Transkription und Translation, metabolische Prozesse sowie Differenzierung eingreift, spielt auch bei der Regulation des Wnt-Signalweges eine wesentliche Rolle. Hierbei ist sie nach der Caseinkinase 1  $\alpha$  die zweite Kinase, die dessen zentralen Effektor, das  $\beta$ -Catenin, phosphoryliert und somit für die Ubiquitylierung und den folgenden proteasomalen Abbau markiert (Liu *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu c-Fos und Bad wurden für GSK3 $\beta$  Expressionsunterschiede gefunden. Die Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  durch RSK erfolgt an Serin 9 und wirkt inhibierend auf deren Kinaseaktivität. Sowohl die unphosphorylierte Form als auch für die an Serin 9 phosphorylierte Form der GSK3 $\beta$  wurde eine in beiden Tumorgruppen (*Ha-ras* und *B-raf*) gegenüber dem Normalgewebe erhöhte Expression gefunden, die sich aber nicht zwischen den beiden Tumorgruppen unterschied. Die vermehrte Expression in den Tumoren fiel in GSK3 $\beta$  zwar signifikant aber deutlich schwächer aus als für GSK3 $\beta$  pS9. Zudem konnte in diesem Fall die Überexpression mit dem Antikörper GSK3  $\beta$  pS9 im Western Blot mit jeweils vier repräsentativen Proben je Gruppe (Normal, *Ha-ras* und *B-raf*) nur für die *Ha-ras*-mutierten Tumore bestätigt werden.

Die Aktivierung der hier nicht untersuchten MSKs erfolgt nach einem ähnlichen Schema wobei für die initialen Phosphorylierungen Erk und p38 mit MSK interagieren können. Von den MSK Substraten wurden in der Expressionsanalyse die Proteine CREB und Histon H3 betrachtet. Im Falle des Proteins Histon H3, welches eines von vier Nucleosomenproteinen darstellt, waren sowohl für das Gesamtprotein als auch für mehrere modifizierte Formen Expressionswerte bestimmt worden. Dabei spielt das durch MSK phosphorylierte Histon H3 pS10 eine transkriptionsregulatorische Rolle, da die Phosphorylierung an Serin 10 Einfluss auf die Kondensation der Chromosomen hat. Jedoch konnte für Histon H3 pS10 keine differenzielle Phosphorylierung in den Probengruppen (Normal, Ha-*ras* und B-*raf*) gefunden werden. Dahingegen zeigte sich eine in beiden Tumorgruppen erhöhte Histon H3 Gesamtproteinmenge. Das *cyclic AMP response element binding* (CREB) Protein bindet als Transkriptionsfaktor nach Dimerisierung mit Interaktionspartnern an das *cyclic AMP response element* (CRE) seiner Zielgene und stimuliert deren Transkription. CREB wird über die Phosphorylierung an Serin 133 durch verschiedene Signalwegen, darunter der Erk/MAPK-Signalweg, aktiviert. Für den Analyten CREB pS133 wurden, bei unveränderter Gesamtmenge von CREB, in den Tumoren erhöhte aber zwischen den Gruppen der Tumoren (Ha-*ras* und B-*raf*) nicht unterschiedliche Expressionswerte gefunden.

Mit der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK/SAPK), dem zentralen Regulator des gleichnamigen Signalweges, wurde ein viertes Protein gefunden, das eine Unterscheidung zwischen den Ha-*ras* und B-*raf* Tumorgruppen erlaubt. Ebenso wie die bereits beschriebenen Proteine MEK, Erk und RSK wurde JNK/SAPK als in den Tumoren in phosphorylierter Form differenziell erhöht gefunden. Damit wird neben dem Erk/MAPK-Signalweg ein zweiter Mitogen-aktivierter Protein Kinase Signalweg aktiviert. Anders als der Erk/MAPK-Signalweg, der allgemein antiapoptotisch und stimulierend auf die Zellproliferation wirkt, gehört der JNK/SAPK-Weg zu den Zytokin- und Stress-aktivierten MAPK-Signalwegen, die antiproliferative und proapoptotische Effekte vermitteln. Dabei erfolgt die Zytokinvermittelte Aktivierung hauptsächlich über die Rezeptoren inflammatorischer Zytokine der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Familie wie TNF, IL-1 sowie Liganden von Fas, CD40 und CD27. Stressaktivierung wird durch eine große Zahl unterschiedlichster Stimuli wie osmotischen und hitzebedingten Schock, ionisierende Strahlung, Hypoxie, oxidativen Stress, DNA schädigende Agenzien sowie Proteinbiosynthese-Inhibitoren ausgelöst (Kyriakis und Avruch, 2001). Daraufhin kommt es wie bei allen Mitogen-aktivierten Protein Kinase Signalwegen über eine dreistufige Kinasekaskade zur Aktivierung der Effektor kinase und über deren Serin/Threonin Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zur Modulation der Expression von Zielgenen. Zu den Proteinen der ersten Stufe der Kaskade, den MAPK Kinase Kinasen (MAPKKK) gehören unter anderem die Proteine HPK1, MLK-3, MEKK1-4 und TPL-2 (Junttila *et al.*, 2008). Die zweite Aktivierungsstufe, die der MAPK

Kinasen (MAPKK), auf der die Effekte der MAPKKK zusammen laufen, wird im JNK/SAPK-Signalweg ebenso wie im Erk/MAPK-Signalweg durch nur zwei Proteine dargestellt. Dies sind MKK 4 und MKK 7. Erst ab dieser Ebene wurden im JNK/SAPK-Weg Expressions- und Phosphorylierungsmuster bestimmt. Für MKK 4 und MKK 7 wurde eine Aktivierung über den Nachweis der Phosphorylierung (MKK 4 pS257/T261 und MKK 7 pS271/T275) gemessen. Die für MKK 7 erhaltenen Werte ergaben keine unterschiedlichen Aktivierung zwischen den Probengruppen (Normal, Ha-*ras* und B-*raf*). Dagegen wurde für die aktivierenden Phosphorylierungsstellen von MKK 4 an Serin 257 und Threonin 261 eine erhöhte Phosphorylierung in den Tumoren gefunden. Die Phosphorylierungsmuster zeigen zudem generelle Unterschiede auch zwischen den beiden Tumorgruppen. Dabei ist jedoch die Heterogenität der Signale innerhalb der beiden Gruppen wesentlich höher als dies bei MEK, Erk, RSK und JNK der Fall war, so dass der Aktivierungsunterschied nicht als statistisch signifikant gefunden wurde. Jedoch geben diese für MKK 4 pS257/T261 ermittelten Werte einen klaren Hinweis auf eine differenzielle Aktivierung von MKK 4 in den Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Tumoren. Diese zwischen den beiden Tumorgruppen unterschiedliche Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges wird auf der dritten und letzten Stufe der Kinasekaskade für den Analyten JNK/SAPK pT183/Y185 wiederum als statistisch signifikant gefunden. Dieser Antikörper erfasst die aktivierten Formen aller drei Isoformen der c-Jun NH<sub>2</sub>-terminalen Kinase (JNK 1-3). Die Aktivierung der JNK Proteine erfolgt ausschließlich durch MKK 4 und MKK 7 wobei letztere hauptsächlich Threonin 183 und MKK 4 vor allem Tyrosin 185 phosphoryliert (Kyriakis und Avruch, 2001). Die Unterscheidbarkeit der zwei Tumorgruppen (Ha-*ras* und B-*raf*) ließ sich im Western Blot für JNK/SAPK pT183/Y185 reproduzieren. Zwar fallen die Unterschiede zwischen den Gruppen klein aus, sind aber klar zu erkennen.

Die JNK/SAPK weist eine Vielzahl von Substraten auf, unter denen sich sowohl nukleäre als auch nicht nukleäre Proteine finden. Zu den hier betrachteten nukleären Proteinen gehören c-Jun, Elk-1, c-Myc, p53, STAT 1 und STAT 3 und die nicht nukleären Proteine 14-3-3  $\zeta$ , Akt, RSK, Bad und Bax (Bogoyevitch und Kobe, 2006; Zhang *et al.*, 2001). Unterschiede durch JNK/SAPK Phosphorylierung wurden für RSK 1 pS380, c-Jun pS63, c-Jun pS73, Elk-1 pS383 und STAT3 pS727 untersucht. Änderungen wurden für RSK und Elk-1 gefunden. Für Elk-1 zeigte sich in Tumoren eine erhöhte Phosphorylierung an pS383 (pS384<sub>ms</sub>), die aber gleich in Ha-*ras* und B-*raf* Tumoren zu finden war. Für RSK 1 pS380 (pS369<sub>ms</sub>) hingegen war durch Unterschiede in der erhöhten Phosphorylierung in Tumoren eine Differenzierung zwischen den Ha-*ras*- und B-*raf*-mutierten Tumoren möglich. Die Auswirkungen dieser Unterschiede sind bereits im Rahmen der Aktivierung durch Erk diskutiert worden. Sowohl für RSK 1/2/3 als auch für Elk-1 wurde eine verringerte Gesamtproteinmenge gefunden, die bei der mRNA-Expressionsanalyse in Ha-*ras*-

und *B-raf*-mutierten Tumoren nicht beobachtet worden war (Jaworski *et al.*, 2007; Stahl *et al.*, 2005). Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse, dass trotz deutlicher und differenzieller Aktivierung der JNK/SAPK keines der typischen Substrate, allen voran c-Jun, in einer nach apoptotischem Stimulus zu erwartenden Art aktiviert gefunden wurde.

Typische Apoptosemarker wie Caspase 3 und Caspase 7 sowie deren durch Spaltung aktivierte Formen wurden analysiert. Für Caspase 3 war eine erhöhte Gesamtproteinmenge in den Tumoren zu detektieren, wohingegen für Caspase 7 eine verringerte Menge in Tumoren gefunden wurde. Für die aktivierten Formen der Caspasen ergab sich keine Änderung. Somit wurden auch auf der Ebene der Caspasen keine proapoptotischen Effekte nachgewiesen.

Bei den untersuchten Lebertumoren handelt es sich um etablierte und solide Tumore mit mehreren Millimetern Durchmesser, die im Falle der Mutationen in *Ha-ras* und *B-raf* über einen permanent aktivierten proliferationsstimulierenden Erk/MAPK-Signalweg verfügen. Umso weniger mag die ebenfalls gefundene Aktivierung des proapoptotischen JNK/SAPK-Signalweges in das erwartete Schema von Veränderungen passen. Da jedoch auf der Ebene der JNK/SAPK-Substrate keine klassischen Apoptose induzierenden Effekte beobachtet wurden scheinen diese nivelliert zu werden und der klonalen Vermehrung der Tumorzellen nichts entgegen zu setzen.

Die Betrachtung der gemeinsamen phosphorylierten Substrate der Kinasen aus dem Erk/MAPK- und JNK/SAPK-Signalweg zeigt interessante Differenzen. So entspricht die Phosphorylierung von RSK 1 an pS380 dem Muster (*Ha-ras* > *B-raf* > Normal) das für Erk 1/2 und JNK/SAPK gefunden wird. Für Elk-1 pS383 konnte gezeigt werden, dass trotz der gleichartigen Aktivierungsmuster der Kinasen Erk und JNK/SAPK (*Ha-ras* > *B-raf* > Normal) die Aktivierung des Zielproteins Elk-1 nicht dem für die beiden Kinasen gezeigten Muster folgt. Vielmehr scheint der Aktivierungsunterschied nivelliert zu werden, da für Elk-1 pS383 zwar in den Tumoren erhöhte Signale erhalten werden, diese zwischen den zwei Tumorguppen aber nicht unterscheidbar sind.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Muster aus *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren eine phosphorylierungsabhängige Aktivierung, die sich innerhalb der Erk/MAPK-Signalkaskade verfolgen lässt. So wird beginnend mit MEK, dem direkten Substrat der Raf Proteine, eine erhöhte Aktivierung in den Tumoren gefunden. Diese setzt sich über Erk und RSK hin zu CREB und Elk-1 in direkter Abfolge der jeweiligen Substrate der Kinasen fort. Ausgehend von den beiden, am Anfang des Signalweges gelegenen, aktivierend mutierten Regulatoren treten aber nicht nur diese, aufgrund der direkten Signaltransduktion nachzuvollziehenden Veränderung auf, es werden mit MKK 4 und JNK/SAPK auch Aktivierungen im JNK/SAPK-Signalweg, und damit ein Übersprechen in einen anderen MAPK-Signalweg, gefunden. Die regulatorische Verknüpfung der beiden

Signalwege, die zur Entstehung dieses Effekts führt, ließ sich mit den untersuchten Analyten nicht auflösen. In Zellkulturexperimenten wurde jedoch gezeigt, dass Ras in Abhängigkeit von gebundenem GTP in der Lage ist mit MEKK-1 zu interagieren und somit auch den JNK/SAPK-Signalweg direkt zu aktivieren (Russell *et al.*, 1995). Dies wird in epithelialen Zellen bestätigt, in denen aktiviertes Ras, aber nicht aktiviertes Raf, in der Lage ist, die JNK-vermittelte Phosphorylierung von c-Jun zu induzieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in diesen Experimenten keine Notwendigkeit zur Aktivierung der kleinen GTPase Rac besteht und die Effekte der Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges eher zur Transformation der Zellen durch Ras beitragen als dieser entgegen zu wirken (Pruitt *et al.*, 2002). Ein möglicher weiterer Mechanismus zur Ras-vermittelten Aktivierung der JNK/SAPK beruht auf der Beobachtung, dass nach Stimulation von Ras erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies in den Zellen gefunden wurden. Dieser, durch aktivierende Mutationen von Ras oder durch Wachstumsfaktoren ausgelöste Effekt wird über vermehrte Expression und Aktivierung von Nox-1, einer NADPH-Oxidase, vermittelt. Der siRNA-vermittelte Knockdown von Nox-1 führt zu massiv verminderter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und verringerter Tumorgroße in *ras*-mutierten Tumoren (Irani *et al.*, 1997; Mitsushita *et al.*, 2004; Thannickal *et al.*, 2000). Erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxid und Wasserstoffperoxid) werden in aktivierten Makrophagen als Folge der Aktivierung der NADPH-Oxidase nachgewiesen. Als Folge dessen tritt sowohl eine Aktivierung des Erk/MAPK- als auch des JNK/SAPK-Signalweges auf (Iles und Forman, 2002). Jedoch ist anzumerken, dass Nox-4 in einer mRNA-Expressionsanalyse als in *Ha-ras*-mutierten Tumoren um Faktor acht vermindert gefunden wurde (Stahl *et al.*, 2005).

Auswirkungen der Aktivierung der beiden MAPK-Signalwege auf der Ebene der Zielgene des Erk/MAPK- und JNK/SAPK-Signalweges konnten nicht nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass zumindest im Rahmen der in dieser Arbeit untersuchten Zielgene eine Nivellierung der differenziellen Aktivität der beiden Signalwege auftritt. Ebenso bleibt die Ursache für die differenzielle Aktivierung des Erk/MAPK- und JNK/SAPK-Signalweges in den *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren offen. Die Beobachtung, dass sich mit MEK, Erk und RSK zentrale Elemente des Erk/MAPK-Signalweges sowie mit JNK/SAPK der Effektor des gleichnamigen Weges unterschiedlich aktiviert fanden ist in dieser Form nicht beschrieben und deutet unterschiedliche regulatorische Effekte der zwei Mutationen an. Dieses Resultat lässt sich mit den gängigen Modellen zur Signaltransduktion nicht erklären. Das bisher nur in Zellkultur gezeigte Übersprechen einer von Ras ausgehenden Aktivierung des Erk/MAPK-Signalweges auf den JNK/SAPK-Signalweg wird hiermit erstmals in Lebertumoren der Maus gezeigt und damit bestätigt, auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus nicht aufgelöst werden konnte.

## 5 Zusammenfassung

Veränderungen in Signaltransduktions- und Regulationsmechanismen sind eine Voraussetzung für die Entstehung von Tumoren. Diese führen zur Deregulation von Signalwegen und machen eine Rezeptorstimulation zur Aktivierung überflüssig. Mutationsbedingte Veränderungen dieser Signalwege wurden in Lebertumoren, die in einem Tiermodell nach chemischer Kanzerogenese erhalten wurden, auf ihre Auswirkungen hinsichtlich der Aktivität und Wechselwirkungen zu anderen Signalwegen untersucht. Analysiert wurden Mutationen im Erk/MAPK- (*Ha-ras*- oder *B-raf*-Gene) und im Wnt-Signalweg (*Ctnnb1*), welche auch beim Menschen eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung einnehmen. Die betroffenen Proteine haben zentrale regulatorische Bedeutung bei der Aktivierung der Signalwege und üben einen großen Einfluss auf die Proteinexpression der betroffenen Zellen aus. Mit Protein-Mikroarrays wurden vergleichende Expressionsanalysen auf Proteinebene von katalytisch oder regulativ aktiven Proteinen durchgeführt. Auf diesen hoch parallelisierten und miniaturisierten Festphasenassays wurden Lysate von bis zu 40 Tumor- und Normalgeweben aufgebracht. Die Signalgenerierung erfolgte durch ein Antikörper-basiertes Fluoreszenzdetektionsverfahren. Über die Bestimmung der immobilisierten Proteinmenge auf der planaren Oberfläche der Mikroarray-Substrate wurde ein Verfahren zur Normierung des Assaysignals etabliert.

Die Bestimmung differenzieller Expression und Modifikation wurde für Proteine des Wnt- und Erk/MAPK-Signalweges, aber auch des Jak/STAT-, p38/MAPK-, JNK/SAPK- und mTOR-Signalweges, sowie Zell-Zellinteraktions- und Proliferationsmarker durchgeführt. Die Etablierung 60 weiterer Antikörper-basierter Assays ermöglichte eine semiquantitative Analyse von insgesamt 116 unterschiedlichen Analyten. Die gefundenen Proteinexpressionsmuster erlaubten eine klare Zuordnung der Proben in Tumore und Normalgewebe, sowie die Klassifizierung von *Ctnnb1*- oder *Ha-ras*- / *B-raf*-mutierten Tumoren. In mRNA-Expressionsmustern beobachtete Unterschiede zwischen *Ctnnb1*- oder *Ha-ras*- / *B-raf*-mutierten Tumoren, konnten auf Proteinebene bestätigt, sowie weitere zum Teil modifizierte Proteine differenziell gefunden werden. Anders als jedoch in mRNA-Expressionsanalysen konnten auch Unterschiede zwischen *Ha-ras*- und *B-raf*-mutierten Tumoren auf Proteinebene festgestellt werden. Während die Aktivität von zentralen Regulatoren (MEK, Erk, RSK) im Erk/MAPK- sowie JNK/SAPK im JNK/SAPK-Signalweg eindeutig verändert war, konnte ein messbarer Einfluss auf die Expression der durch diese Wege regulierten Zielgene nicht detektiert werden. Diese unterschiedlichen Aktivierungsmuster deuten auf zuvor nicht beschriebene differenzielle regulatorische Effekte der *Ha-ras* und *B-raf* Mutationen hin.

## 6 Literaturverzeichnis

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J* **16**: 3797-804.

Akkiprik M, Nicorici D, Cogdell D, Jia YJ, Hategan A, Tabus I, Yli-Harja O, Y D, Sahin A, Zhang W (2006). Dissection of signaling pathways in fourteen breast cancer cell lines using reverse-phase protein lysate microarray. *Technol Cancer Res Treat* **5**: 543-51.

Aydinlik H, Nguyen TD, Moennikes O, Buchmann A, Schwarz M (2001). Selective pressure during tumor promotion by phenobarbital leads to clonal outgrowth of beta-catenin-mutated mouse liver tumors. *Oncogene* **20**: 7812-6.

Balboni I, Chan SM, Kattah M, Tenenbaum JD, Butte AJ, Utz PJ (2006). Multiplexed protein array platforms for analysis of autoimmune diseases. *Annu Rev Immunol* **24**: 391-418.

Behrens J, Lustig B (2004). The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* **48**: 477-87.

Bigbee WL, Grandis JR, Siegfried JM (2007). Multiple cytokine and growth factor serum biomarkers predict therapeutic response and survival in advanced-stage head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* **13**: 3107-8.

Blank U, Karlsson G, Karlsson S (2008). Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* **111**: 492-503.

Bogoyevitch MA, Kobe B (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 1061-95.

Bos JL (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**: 4682-9.

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

Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P (2006). Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **25**: 3787-800.

Buchmann A, Bauer-Hofmann R, Mahr J, Drinkwater NR, Luz A, Schwarz M (1991). Mutational activation of the c-Ha-ras gene in liver tumors of different rodent strains: correlation with susceptibility to hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 911-5.

Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene* **324**: 1-14.

Bursch W, Oberhammer F, Schulte-Hermann R (1992). Cell death by apoptosis and its protective role against disease. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 245-51.

Cadigan KM, Liu YI (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* **119**: 395-402.

Cagatay T, Ozturk M (2002). P53 mutation as a source of aberrant beta-catenin accumulation in cancer cells. *Oncogene* **21**: 7971-80.

Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998). Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**: 1395-413.

Chan SM, Ermann J, Su L, Fathman CG, Utz PJ (2004). Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways. *Nat Med* **10**: 1390-6.

Christa L, Simon MT, Flinois JP, Gebhardt R, Brechot C, Lasserre C (1994). Overexpression of glutamine synthetase in human primary liver cancer. *Gastroenterology* **106**: 1312-20.

Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* **163**: 847-57.

D'Haeseleer P (2005). How does gene expression clustering work? *Nat Biotechnol* **23**: 1499-501.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-54.



Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* **26**: 3279-90.

Dhillon AS, Pollock C, Steen H, Shaw PE, Mischak H, Kolch W (2002). Cyclic AMP-dependent kinase regulates Raf-1 kinase mainly by phosphorylation of serine 259. *Mol Cell Biol* **22**: 3237-46.

Dhomen N, Marais R (2007). New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **17**: 31-9.

Dihlmann S, von Knebel Doeberitz M (2005). Wnt/beta-catenin-pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *Int J Cancer* **113**: 515-24.

Downward J (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**: 11-22.

Downward J, Parker P, Waterfield MD (1984). Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature* **311**: 483-5.

Dumaz N, Hayward R, Martin J, Ogilvie L, Hedley D, Curtin JA, Bastian BC, Springer C, Marais R (2006). In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* **66**: 9483-91.

Duveneck MJ, Pawlak M, Neuschäfer D, Bär E, Budach W, Pielas U, Ehrat M (1997). Novel bioaffinity sensors for trace analysis based on luminescence excitation by planar waveguides. *Sensors and Actuators B - Chemical* **38**: 88-95.

Frodin M, Gammeltoft S (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* **151**: 65-77.

Giles RH, van Es JH, Clevers H (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1653**: 1-24.

Gordon MD, Nusse R (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* **281**: 22429-33.

Grubb RL, Calvert VS, Wulkuhle JD, Paweletz CP, Linehan WM, Phillips JL, Chuaqui R, Valasco A, Gillespie J, Emmert-Buck M, Liotta LA, Petricoin EF (2003). Signal pathway profiling of prostate cancer using reverse phase protein arrays. *Proteomics* **3**: 2142-6.

Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9390-5.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**: 1720-30.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hauge C, Frodin M (2006). RSK and MSK in MAP kinase signalling. *J Cell Sci* **119**: 3021-3.

Herrmann PC, Gillespie JW, Charboneau L, Bichsel VE, Paweletz CP, Calvert VS, Kohn EC, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd (2003). Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer. *Proteomics* **3**: 1801-10.

Heyse S, Vogel H, Sanger M, Sigrist H (1995). Covalent attachment of functionalized lipid bilayers to planar waveguides for measuring protein binding to biomimetic membranes. *Protein Sci* **4**: 2532-44.

Hueber W, Utz PJ, Steinman L, Robinson WH (2002). Autoantibody profiling for the study and treatment of autoimmune disease. *Arthritis Res* **4**: 290-5.

Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Pagni M, Sigrist CJ (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **34**: D227-30.

Iles KE, Forman HJ (2002). Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunol Res* **26**: 95-105.

Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T, Goldschmidt-Clermont PJ (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**: 1649-52.

Janzi M, Odling J, Pan-Hammarstrom Q, Sundberg M, Lundeberg J, Uhlen M, Hammarstrom L, Nilsson P (2005). Serum Microarrays for Large Scale Screening of Protein Levels. *Mol Cell Proteomics* **4**: 1942-1947.

Jaworski M (2004). Bedeutung von p53, Ha-ras und B-raf bei der Hepatokanzerogenese in der Maus. *Diplomarbeit, Tübingen*.

Jaworski M, Buchmann A, Bauer P, Riess O, Schwarz M (2005a). B-Raf and Ha-ras mutations in chemically induced mouse liver tumors. *Oncogene* **24**: 1290-5.

Jaworski M, Hailfinger S, Buchmann A, Hergenbahn M, Hollstein M, Ittrich C, Schwarz M (2005b). Human p53 knock-in (hupki) mice do not differ in liver tumor response from their counterparts with murine p53. *Carcinogenesis* **26**: 1829-34.

Jaworski M, Ittrich C, Hailfinger S, Bonin M, Buchmann A, Schwarz M, Kohle C (2007). Global gene expression in Ha-ras and B-raf mutated mouse liver tumors. *Int J Cancer* **121**: 1382-5.

Jiang R, Mircean C, Shmulevich I, Cogdell D, Jia Y, Tabus I, Aldape K, Sawaya R, Bruner JM, Fuller GN, Zhang W (2006). Pathway alterations during glioma progression revealed by reverse phase protein lysate arrays. *Proteomics* **6**: 2964-71.

Jones MB, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF, 3rd (2002). Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* **2**: 76-84.

Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* **284**: 31-53.

Junttila MR, Li SP, Westermarck J (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* **22**: 954-65.

Kalkuhl A, Troppmair J, Buchmann A, Stinchcombe S, Buenemann CL, Rapp UR, Kaestner K, Schwarz M (1998). p21Ras downstream effectors are increased in activity or expression in mouse liver tumors but do not differ between ras-mutated and ras-wild-type lesions. *Hepatology* **27**: 1081-8.

Kolaskar AS, Tongaonkar PC (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* **276**: 172-4.

Kramer S (2006). Mikroarray-basierende Proteomanalyse zur Detektion tumorspezifischer Markerproteine in Nierenzellkarzinomen. *Dissertation, Tübingen*.

Kress S, König J, Schweizer J, Lohrke H, Bauer-Hofmann R, Schwarz M (1992). p53 mutations are absent from carcinogen-induced mouse liver tumors but occur in cell lines established from these tumors. *Mol Carcinog* **6**: 148-58.

Kyriakis JM, Avruch J (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-69.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.

Lara MF, Paramio JM (2007). The Rb family connects with the Tp53 family in skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* **46**: 618-23.

Light Y, Paterson H, Marais R (2002). 14-3-3 antagonizes Ras-mediated Raf-1 recruitment to the plasma membrane to maintain signaling fidelity. *Mol Cell Biol* **22**: 4984-96.

Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**: 837-47.

Loeppen S, Koehle C, Buchmann A, Schwarz M (2005). A beta-catenin-dependent pathway regulates expression of cytochrome P450 isoforms in mouse liver tumors. *Carcinogenesis* **26**: 239-48.

Loeppen S, Schneider D, Gaunitz F, Gebhardt R, Kurek R, Buchmann A, Schwarz M (2002). Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital. *Cancer Res* **62**: 5685-8.

Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM (2007). Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat Biotechnol* **25**: 117-24.

Luo JL, Yang Q, Tong WM, Hergenbahn M, Wang ZQ, Hollstein M (2001). Knock-in mice with a chimeric human/murine p53 gene develop normally and show wild-type p53 responses to DNA damaging agents: a new biomedical research tool. *Oncogene* **20**: 320-8.

MacBeath G (2002). Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* **32 Suppl**: 526-32.

Marais R, Wynne J, Treisman R (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**: 381-93.

Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R (1999). Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J* **18**: 2137-48.

McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**: 404-5.

Mikula M, Gotzmann J, Fischer AN, Wolschek MF, Thallinger C, Schulte-Hermann R, Beug H, Mikulits W (2003). The proto-oncoprotein c-Fos negatively regulates hepatocellular tumorigenesis. *Oncogene* **22**: 6725-38.

Miller JC, Zhou H, Kwekel J, Cavallo R, Burke J, Butler EB, Teh BS, Haab BB (2003). Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* **3**: 56-63.

Mimeault M, Batra SK (2007). Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. *Ann Oncol* **18**: 1605-19.

Mitsushita J, Lambeth JD, Kamata T (2004). The superoxide-generating oxidase Nox1 is functionally required for Ras oncogene transformation. *Cancer Res* **64**: 3580-5.

Muehl SM (2007). Expressionsanalyse  $\beta$ -Catenin-mutierter Tumore - Protein-Mikroarrays zur Detektion spezifischer Marker. *Diplomarbeit, Tübingen*.

Nelson WJ, Nusse R (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**: 1483-7.

Nishizuka S, Charboneau L, Young L, Major S, Reinhold WC, Waltham M, Kouros-Mehr H, Bussey KJ, Lee JK, Espina V, Munson PJ, Petricoin E, 3rd, Liotta LA, Weinstein JN (2003a). Proteomic profiling of the NCI-60 cancer cell lines using new high-density reverse-phase lysate microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14229-34.

Nishizuka S, Chen ST, Gwadry FG, Alexander J, Major SM, Scherf U, Reinhold WC, Waltham M, Charboneau L, Young L, Bussey KJ, Kim S, Lababidi S, Lee JK, Pittaluga S, Scudiero DA, Sausville EA, Munson PJ, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA, Hewitt SM, Raffeld M, Weinstein JN (2003b). Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Res* **63**: 5243-50.

Pawletz CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin IE, Liotta LA (2001). Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* **20**: 1981-9.

Pawlak M, Schick E, Bopp MA, Schneider MJ, Oroszlan P, Ehrat M (2002a). Zeptosens' protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis. *Proteomics* **2**: 383-93.

Pawlak M, Schneider M, Schick E, Kresbach GM, Ehrat M (2002b). DNA- und Protein-Mikroarrays –Höchste Empfindlichkeit durch Planare Wellenleitertechnologie. *Laborwelt* **3**: 44-48.

Poetz O (2005). Qualitative und quantitative Analyse von  $\beta$ -Catenin in *Catnb*-mutierten hepatozellulären Tumoren der Maus mit Array-basierten Methoden. *Dissertation, Tübingen*.

Poetz O, Ostendorp R, Brocks B, Schwenk JM, Stoll D, Joos TO, Templin MF (2005). Protein microarrays for antibody profiling: Specificity and affinity determination on a chip. *Proteomics*.

Polakis P (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* **14**: 1837-51.

Pruitt K, Pruitt WM, Bilter GK, Westwick JK, Der CJ (2002). Raf-independent deregulation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases are critical for Ras transformation. *J Biol Chem* **277**: 31808-17.

Reya T, Clevers H (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**: 843-50.

Rost B, Yachdav G, Liu J (2004). The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **32**: W321-6.

Russell M, Lange-Carter CA, Johnson GL (1995). Direct interaction between Ras and the kinase domain of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK1). *J Biol Chem* **270**: 11757-60.

Sedivy JM (1998). Can ends justify the means?: telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9078-81.

Shay JW, Wright WE (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**: 867-74.

Sheehan KM, Calvert VS, Kay EW, Lu Y, Fishman D, Espina V, Aquino J, Speer R, Araujo R, Mills GB, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd, Wulfkuhle JD (2005). Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. *Mol Cell Proteomics* **4**: 346-55.

Sherr CJ, Roberts JM (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**: 2699-711.

Sidransky D (2002). Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**: 210-9.

Smith L, Watson MB, O'Kane SL, Drew PJ, Lind MJ, Cawkwell L (2006). The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol Cancer Ther* **5**: 2115-20.

Soussi T (2007). p53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* **26**: 2145-56.

Stahl S, Ittrich C, Marx-Stoelting P, Kohle C, Altug-Teber O, Riess O, Bonin M, Jobst J, Kaiser S, Buchmann A, Schwarz M (2005). Genotype-phenotype relationships in hepatocellular tumors from mice and man. *Hepatology* **42**: 353-61.

Stiffler MA, Grantcharova VP, Sevecka M, MacBeath G (2006). Uncovering quantitative protein interaction networks for mouse PDZ domains using protein microarrays. *J Am Chem Soc* **128**: 5913-22.

Stoll D, Bachmann J, Templin MF, Joos TO (2004). Microarray technology: an increasing variety of screening tools for proteomic research. *Targets* **3**: 24-31.

Strathmann J (2006). Onkogen-Mutationen und daraus resultierende Veränderungen der Proteinexpression in Lebertumoren PCB 77- und PCB 153-behandelter Mäuse. *Diplomarbeit, Tübingen*.

Templin MF, Stoll D, Schrenk M, Traub PC, Vohringer CF, Joos TO (2002). Protein microarray technology. *Trends Biotechnol* **20**: 160-6.

Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Potz O, Kramer S, Joos TO (2003). Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* **3**: 2155-66.

Textor M, Ruiz L, Hofer R, Rossi A, Feldman K, Hähner G, Spencer ND (2000). Structural Chemistry of Self-Assembled Monolayers of Octadecylphosphoric Acid on Tantalum Oxide Surfaces. *Langmuir* **16**: 3257-3271.

Thannickal VJ, Day RM, Klinz SG, Bastien MC, Larios JM, Fanburg BL (2000). Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1. *FASEB J* **14**: 1741-8.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4.

van Amerongen R, Berns A (2006). Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends Genet* **22**: 678-89.

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 875-85.

Willert K, Jones KA (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* **20**: 1394-404.

Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT, Ahn NG (2008). Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science* **320**: 365-9.

Wulfkuhle JD, Aquino JA, Calvert VS, Fishman DA, Coukos G, Liotta LA, Petricoin EF, 3rd (2003). Signal pathway profiling of ovarian cancer from human tissue specimens using reverse-phase protein microarrays. *Proteomics* **3**: 2085-90.

Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, Hirohashi S (2003). Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology* **37**: 528-33.

Yoon S, Seger R (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**: 21-44.

Zha H, Raffeld M, Charboneau L, Pittaluga S, Kwak LW, Petricoin E, 3rd, Liotta LA, Jaffe ES (2004). Similarities of prosurvival signals in Bcl-2-positive and Bcl-2-negative follicular lymphomas identified by reverse phase protein microarray. *Lab Invest* **84**: 235-44.

Zhang Y, Zhong S, Dong Z, Chen N, Bode AM, Ma W (2001). UVA induces Ser381 phosphorylation of p90RSK/MAPKAP-K1 via ERK and JNK pathways. *J Biol Chem* **276**: 14572-80.

Zhou J, Wulfkuhle J, Zhang H, Gu P, Yang Y, Deng J, Margolick JB, Liotta LA, Petricoin E, 3rd, Zhang Y (2007). Activation of the PTEN/mTOR/STAT3 pathway in breast cancer stem-like cells is required for viability and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 16158-63.

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



## 7 Publikationsliste

Marx-Stoelting P, Mahr J, Knorpp T, Schreiber S, Templin MF, Ott T, Buchmann A, Schwarz M (2008). Tumor promotion in liver of mice with a conditional Cx26 knockout. *Toxicol Sci* **103**: 260-7.

## 8 Anhang

### **Tabelle 8.1 Daten der in Kapitel 3.2.3.1 dargestellten Proteinexpressionsanalyse.**

Dargestellt sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der auf die immobilisierte Proteinmenge normalisierten und Hintergrund-korrigierten Antigen-spezifischen Expressionswerte. Im Falle von Proteinen, für die Expressionswerte der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form vorlagen sind Verhältnisse aus phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Expressionswerten dargestellt. Bei den Werten handelt es sich um relative Fluoreszenzintensitäten (RFI). Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, g - gespalten, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

	C 31dT1	C 33b [1]	C 33b [2]	C 34aT1	C 34aT2	C 34aT3	N 36	N 37	N 38	N 39	N 40	B 13T1	B 45T1	B 45T2	B 75T1
Akt [2]	MW 1.993	2.411	2.239	2.176	1.754	1.814	1.997	1.562	2.265	2.002	2.190	2.672	2.520	2.080	2.253
	SD 0.179	0.171	0.264	0.085	0.137	0.031	0.120	0.140	0.190	0.096	0.247	0.348	0.173	0.342	0.222
Akt pS473	MW 0.237	0.343	0.238	0.251	0.221	0.211	0.187	0.124	0.186	0.163	0.195	0.302	0.278	0.290	0.203
	SD 0.021	0.025	0.028	0.010	0.017	0.004	0.011	0.011	0.016	0.009	0.022	0.039	0.020	0.050	0.020
Akt pS473 R [2]	MW 0.119	0.142	0.106	0.116	0.126	0.116	0.093	0.079	0.082	0.082	0.089	0.113	0.110	0.139	0.090
	SD 0.015	0.015	0.018	0.006	0.014	0.003	0.008	0.010	0.010	0.006	0.014	0.021	0.011	0.033	0.013
Akt pT308	MW 0.500	0.728	0.565	0.571	0.571	0.435	0.458	0.324	0.561	0.588	0.592	0.549	0.585	0.412	0.460
	SD 0.045	0.052	0.066	0.022	0.045	0.007	0.036	0.029	0.047	0.026	0.067	0.071	0.040	0.068	0.046
Akt pT308 R [2]	MW 0.251	0.302	0.252	0.263	0.326	0.240	0.229	0.207	0.248	0.294	0.270	0.205	0.232	0.198	0.204
	SD 0.032	0.031	0.042	0.015	0.036	0.006	0.023	0.026	0.029	0.019	0.043	0.038	0.023	0.046	0.029
Akt Sub. pS/T	MW 2.530	3.065	2.072	2.815	2.088	3.234	2.802	2.622	2.785	2.302	2.312	3.673	4.687	3.797	4.245
	SD 0.227	0.217	0.243	0.110	0.160	0.057	0.169	0.235	0.233	0.114	0.260	0.478	0.320	0.624	0.418
AMPK $\alpha$ pT172	MW 1.259	1.130	0.708	0.719	0.781	0.692	0.920	0.735	1.045	0.994	1.206	1.510	1.853	1.138	1.845
	SD 0.113	0.081	0.083	0.028	0.061	0.012	0.055	0.067	0.087	0.067	0.136	0.197	0.127	0.187	0.182
ATM/ATR Sub. pS/T	MW 0.880	0.885	0.803	0.863	0.626	0.805	0.747	0.702	0.709	0.733	0.712	1.206	1.147	1.060	1.286
	SD 0.161	0.040	0.048	0.048	0.045	0.093	0.029	0.043	0.033	0.037	0.082	0.034	0.311	0.053	0.105
E-Cadherin	MW 4.179	3.437	2.609	3.622	4.342	3.220	2.540	2.214	2.751	2.577	3.057	16.666	12.743	14.588	14.426
	SD 0.765	0.153	0.152	0.198	0.311	0.365	0.100	0.131	0.131	0.100	0.352	0.405	3.453	0.664	1.172
N-Cadherin [1]	MW 1.014	1.343	1.773	0.811	0.589	0.665	0.798	0.694	0.935	0.863	1.186	0.452	0.446	0.405	0.428
	SD 0.186	0.060	0.104	0.046	0.043	0.076	0.037	0.042	0.045	0.039	0.121	0.121	0.021	0.021	0.038
N-Cadherin [2]	MW 2.325	2.168	2.037	1.751	1.309	1.591	1.233	1.069	1.553	1.360	1.415	0.770	0.687	0.641	0.985
	SD 0.426	0.113	0.120	0.096	0.101	0.188	0.049	0.065	0.076	0.054	0.163	0.018	0.186	0.028	0.079
$\beta$ -Cat. [1]	MW 1.232	1.157	0.874	0.832	0.912	0.791	0.552	0.405	0.712	0.558	0.614	0.988	0.791	0.780	1.002
	SD 0.227	0.098	0.053	0.048	0.075	0.092	0.025	0.025	0.039	0.024	0.072	0.023	0.214	0.035	0.087
$\beta$ -Cat. [2]	MW 0.960	0.915	0.767	0.693	1.149	0.803	0.964	0.825	0.901	0.812	1.083	2.669	2.103	2.158	2.662
	SD 0.086	0.066	0.090	0.028	0.090	0.014	0.058	0.080	0.075	0.038	0.123	0.360	0.146	0.356	0.272
$\beta$ -Cat. [3]	MW 1.498	1.729	1.722	1.617	1.481	1.149	0.998	0.792	1.107	0.970	1.073	2.976	2.153	2.119	2.456
	SD 0.134	0.124	0.202	0.063	0.116	0.020	0.060	0.072	0.092	0.041	0.121	0.390	0.148	0.348	0.244
$\beta$ -Cat. pT41/S45	MW 0.413	0.351	0.266	0.256	0.278	0.300	0.315	0.204	0.298	0.279	0.285	0.325	0.341	0.318	0.329
	SD 0.038	0.028	0.031	0.010	0.022	0.006	0.019	0.018	0.028	0.019	0.033	0.044	0.026	0.053	0.032
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [1]	MW 0.336	0.303	0.304	0.308	0.305	0.380	0.571	0.505	0.419	0.499	0.464	0.330	0.432	0.408	0.328
	SD 0.069	0.035	0.040	0.021	0.035	0.045	0.043	0.058	0.046	0.040	0.076	0.045	0.121	0.070	0.043
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [2]	MW 0.431	0.383	0.346	0.370	0.242	0.374	0.327	0.248	0.331	0.343	0.263	0.122	0.162	0.147	0.123
	SD 0.055	0.041	0.058	0.021	0.027	0.010	0.028	0.033	0.042	0.028	0.042	0.023	0.017	0.035	0.018
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [3]	MW 0.276	0.203	0.154	0.159	0.188	0.261	0.316	0.258	0.270	0.287	0.265	0.109	0.159	0.150	0.134
	SD 0.035	0.022	0.026	0.009	0.021	0.007	0.027	0.033	0.034	0.023	0.043	0.021	0.016	0.035	0.019
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41	MW 0.469	0.242	0.241	0.219	0.208	0.207	0.258	0.180	0.305	0.349	0.254	0.435	0.450	0.343	0.277
	SD 0.043	0.019	0.028	0.009	0.016	0.006	0.017	0.017	0.027	0.025	0.029	0.058	0.032	0.057	0.028
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41 R [1]	MW 0.380	0.209	0.276	0.263	0.228	0.262	0.466	0.444	0.429	0.626	0.414	0.441	0.569	0.439	0.277
	SD 0.079	0.024	0.036	0.018	0.026	0.031	0.037	0.052	0.044	0.052	0.068	0.059	0.159	0.075	0.037
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41 R [2]	MW 0.488	0.265	0.315	0.317	0.181	0.257	0.267	0.218	0.339	0.430	0.235	0.163	0.214	0.159	0.104
	SD 0.063	0.028	0.052	0.018	0.020	0.009	0.024	0.029	0.041	0.036	0.038	0.031	0.021	0.037	0.015
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41 R [3]	MW 0.313	0.140	0.140	0.136	0.141	0.180	0.258	0.227	0.360	0.360	0.237	0.146	0.209	0.162	0.113
	SD 0.040	0.015	0.023	0.008	0.016	0.006	0.023	0.029	0.033	0.030	0.038	0.027	0.021	0.038	0.016
Connexin 26	MW 1.136	1.440	0.905	0.734	0.695	0.504	0.715	0.764	0.898	0.801	1.147	1.071	1.132	0.880	0.961
	SD 0.208	0.102	0.053	0.042	0.056	0.059	0.030	0.046	0.043	0.041	0.132	0.025	0.306	0.041	0.084

	C_31dT1	C_33b [1]	C_33b [2]	C_34aT1	C_34aT2	C_34aT3	N_36	N_37	N_38	N_39	N_40	B_13T1	B_45T1	B_45T2	B_75T1
CREB	MW	0.345	0.395	0.267	0.303	0.312	0.308	0.216	0.338	0.316	0.277	0.266	0.315	0.269	0.330
	SD	0.032	0.029	0.031	0.013	0.025	0.019	0.022	0.029	0.016	0.032	0.035	0.022	0.045	0.033
CREB pS133 [1]	MW	0.163	0.198	0.098	0.181	0.117	0.155	0.112	0.135	0.181	0.129	0.086	0.136	0.129	0.120
	SD	0.015	0.016	0.012	0.012	0.009	0.009	0.010	0.012	0.010	0.015	0.013	0.014	0.021	0.012
CREB pS133 [1] R	MW	0.471	0.501	0.368	0.599	0.381	0.504	0.519	0.399	0.571	0.466	0.322	0.433	0.477	0.364
	SD	0.061	0.054	0.062	0.047	0.043	0.043	0.071	0.049	0.042	0.077	0.065	0.053	0.112	0.052
Cyp 1A1	MW	2.634	2.593	2.199	1.912	2.087	1.252	1.047	1.352	1.103	1.453	1.783	1.440	1.250	1.387
	SD	0.483	0.118	0.134	0.106	0.151	0.052	0.063	0.088	0.054	0.170	0.081	0.390	0.064	0.120
Cyp 1A2	MW	15.975	15.286	12.417	11.313	15.564	2.166	1.653	1.839	1.607	2.877	0.332	0.394	0.454	0.407
	SD	2.924	0.881	0.724	0.615	1.115	0.085	0.099	0.088	0.065	0.331	0.019	0.109	0.029	0.036
Cyp 2B1	MW	4.876	2.287	2.136	3.959	4.514	1.294	1.059	1.623	1.509	1.698	1.928	1.891	1.952	1.928
	SD	0.894	0.111	0.130	0.219	0.327	0.058	0.069	0.086	0.069	0.202	0.059	0.513	0.094	0.158
Cyp 2C6	MW	110.503	86.867	83.955	122.720	144.762	20.082	16.423	21.937	16.087	21.358	3.109	3.368	4.225	2.146
	SD	20.226	4.004	4.900	6.672	10.367	0.785	0.974	1.034	0.648	2.459	1.108	0.915	0.200	0.184
Cyp 2E1	MW	19.049	14.635	12.552	9.934	8.188	7.564	9.357	8.674	6.113	12.379	3.356	3.588	4.964	2.702
	SD	3.491	0.755	0.751	0.563	0.605	1.000	0.322	0.439	0.326	1.434	0.226	0.985	0.281	0.273
Decorin	MW	8.982	8.486	7.083	7.157	5.877	4.924	4.694	6.182	6.763	6.607	10.854	11.521	11.236	11.673
	SD	1.644	0.381	0.413	0.389	0.421	0.192	0.278	0.292	0.263	0.760	0.254	3.118	0.497	0.951
EGFR [1]	MW	2.190	3.793	2.349	2.454	1.766	3.811	2.553	3.656	3.121	2.970	1.838	2.195	2.009	2.264
	SD	0.198	0.269	0.277	0.096	0.198	0.231	0.231	0.305	0.136	0.335	0.265	0.152	0.330	0.223
Eik-1 pS383 [1]	MW	2.873	3.291	2.668	2.644	2.649	2.362	2.114	2.930	2.383	2.875	2.547	2.736	2.583	2.706
	SD	0.527	0.146	0.160	0.147	0.190	0.093	0.127	0.140	0.155	0.337	0.075	0.740	0.116	0.217
Eik 1/2	MW	3.540	3.749	3.155	2.593	2.413	1.787	1.865	2.484	2.146	2.475	3.673	3.629	3.609	3.404
	SD	0.648	0.186	0.184	0.141	0.173	0.286	0.069	0.112	0.117	0.082	0.288	0.982	0.161	0.272
Eik 1/2 pT202/Y204	MW	1.335	1.474	1.080	1.803	1.277	1.449	0.755	0.682	1.198	1.199	1.303	1.288	1.343	1.269
	SD	0.244	0.066	0.063	0.104	0.093	0.056	0.045	0.039	0.046	0.138	0.031	0.349	0.059	0.102
Eik 1/2 pT202/Y204 R	MW	0.357	0.346	0.319	0.671	0.506	0.424	0.791	0.255	0.536	0.462	0.333	0.343	0.351	0.362
	SD	0.092	0.023	0.026	0.053	0.052	0.068	0.043	0.033	0.029	0.076	0.011	0.131	0.022	0.041
Glutaminsynthetase	MW	0.891	1.471	1.186	1.360	1.161	0.071	0.098	0.074	0.102	0.075	0.015	0.035	0.039	0.034
	SD	0.286	0.122	0.244	0.139	0.161	0.036	0.007	0.007	0.013	0.016	0.004	0.007	0.007	0.008
GSK3 β	MW	0.521	0.609	0.496	0.490	0.582	0.495	0.500	0.538	0.501	0.452	0.865	0.779	0.739	0.683
	SD	0.047	0.044	0.058	0.020	0.045	0.030	0.045	0.045	0.032	0.051	0.088	0.053	0.123	0.067
GSK3 β pS9	MW	0.090	0.042	0.025	0.115	0.062	0.081	0.097	0.088	0.069	0.100	0.053	0.218	0.280	0.249
	SD	0.009	0.008	0.003	0.005	0.005	0.001	0.007	0.008	0.006	0.005	0.007	0.020	0.048	0.025
GSK3 β pS9 R	MW	0.173	0.068	0.050	0.234	0.107	0.157	0.175	0.128	0.199	0.118	0.328	0.360	0.390	0.365
	SD	0.023	0.013	0.009	0.013	0.012	0.004	0.018	0.022	0.015	0.021	0.061	0.035	0.091	0.051
Histone H3	MW	2.958	3.999	2.148	3.344	2.713	1.842	0.940	2.481	1.478	1.985	3.702	3.731	4.817	3.805
	SD	0.298	0.305	0.252	0.156	0.249	0.063	0.129	0.092	0.234	0.064	0.482	0.277	1.007	0.399
IGFBP-1	MW	0.708	1.151	0.865	0.735	0.566	0.720	0.539	0.658	0.562	0.764	0.628	0.753	0.543	0.621
	SD	0.130	0.055	0.050	0.041	0.041	0.082	0.022	0.021	0.031	0.025	0.088	0.204	0.024	0.051
IGFBP-3	MW	1.327	1.685	1.473	1.546	1.372	1.086	1.047	1.408	1.358	1.583	1.897	2.074	1.774	1.735
	SD	0.119	0.120	0.172	0.060	0.107	0.020	0.078	0.118	0.058	0.178	0.247	0.144	0.293	0.172
JNK/SAPK	MW	0.340	0.273	0.353	0.313	0.332	0.280	0.272	0.292	0.305	0.294	0.399	0.426	0.381	0.390
	SD	0.031	0.021	0.041	0.012	0.026	0.005	0.024	0.024	0.014	0.033	0.052	0.029	0.063	0.038
JNK/SAPK pT183/Y185	MW	0.305	0.483	0.318	0.410	0.262	0.343	0.215	0.286	0.289	0.283	0.532	0.536	0.452	0.427
	SD	0.028	0.035	0.037	0.016	0.020	0.021	0.019	0.024	0.014	0.032	0.069	0.037	0.074	0.042

	C_31dT1	C_33b [1]	C_33b [2]	C_34aT1	C_34aT2	C_34aT3	N_36	N_37	N_38	N_39	N_40	B_13T1	B_45T1	B_45T2	B_75T1
JNK/SAPK pT183/Y185 R	MW 0.898	1.765	0.901	1.313	0.788	1.175	1.083	0.790	0.982	0.947	0.963	1.334	1.259	1.186	1.094
	SD	0.115	0.185	0.073	0.087	0.029	0.093	0.101	0.116	0.063	0.155	0.246	0.122	0.276	0.153
c-Jun	MW 0.083	0.068	0.033	0.068	0.040	0.056	0.053	0.031	0.062	0.049	0.040	0.088	0.071	0.068	0.056
	SD	0.008	0.009	0.004	0.003	0.001	0.004	0.004	0.005	0.005	0.007	0.012	0.007	0.012	0.006
c-Jun pS63 [2]	MW 0.204	0.267	0.148	0.178	0.139	0.193	0.169	0.123	0.261	0.166	0.221	0.247	0.276	0.208	0.201
	SD	0.019	0.021	0.008	0.011	0.006	0.010	0.011	0.022	0.011	0.025	0.033	0.019	0.035	0.020
c-Jun pS63 [2] R	MW 2.466	3.957	4.471	2.019	3.506	3.451	3.189	3.982	4.217	3.394	5.457	2.809	3.905	3.049	3.586
	SD	0.322	0.636	0.778	0.390	0.118	0.292	0.685	0.513	0.399	1.104	0.532	0.458	0.724	0.549
c-Jun pS73	MW 0.253	0.163	0.211	0.218	0.234	0.153	0.169	0.167	0.213	0.266	0.189	0.263	0.347	0.238	0.250
	SD	0.023	0.013	0.009	0.018	0.003	0.010	0.015	0.018	0.013	0.022	0.035	0.024	0.039	0.025
c-Jun pS73 R	MW 3.057	2.407	6.370	2.465	5.885	2.732	3.197	5.426	3.432	5.455	4.675	2.989	4.909	3.478	4.471
	SD	0.397	0.392	1.107	0.654	0.069	0.292	0.927	0.418	0.605	0.947	0.564	0.578	0.824	0.681
Ki-67	MW 1.370	2.038	1.947	1.649	1.143	0.995	1.033	0.880	1.732	1.259	1.957	2.744	2.768	2.050	2.370
	SD	0.132	0.147	0.228	0.089	0.017	0.062	0.082	0.145	0.063	0.221	0.359	0.192	0.337	0.234
MEK 1/2 pS217/221	MW 1.618	2.127	0.409	0.481	0.519	0.443	0.393	0.490	0.615	0.563	0.387	0.545	0.539	0.798	0.555
	SD	0.301	1.049	0.027	0.038	0.050	0.017	0.029	0.029	0.026	0.045	0.019	0.146	0.108	0.045
c-Met [2]	MW 7.535	8.966	6.932	7.578	5.888	6.326	7.239	5.817	7.422	8.061	7.841	8.527	8.322	8.471	9.626
	SD	1.379	0.429	0.404	0.412	0.718	0.281	0.344	0.359	0.335	0.901	0.202	2.256	0.387	0.782
c-Myc [2]	MW 1.043	0.989	0.664	0.702	0.754	0.619	0.499	0.484	0.619	0.623	0.658	0.503	0.480	0.422	0.689
	SD	0.193	0.097	0.041	0.039	0.072	0.023	0.034	0.030	0.026	0.077	0.017	0.130	0.019	0.056
p38/MAPK	MW 0.650	0.670	0.512	0.497	0.481	0.617	0.513	0.442	0.432	0.426	0.545	0.425	0.444	0.461	0.511
	SD	0.119	0.030	0.030	0.027	0.034	0.020	0.026	0.020	0.017	0.063	0.011	0.120	0.020	0.041
p38/MAPK pT180/Y182	MW 1.549	1.545	1.166	1.305	1.117	1.114	1.280	1.183	1.247	1.366	1.630	1.387	1.387	1.424	1.468
	SD	0.284	0.069	0.068	0.071	0.080	0.126	0.073	0.059	0.055	0.188	0.034	0.375	0.063	0.118
p38/MAPK pT180/Y182 R	MW 2.382	2.305	2.275	2.625	2.321	1.805	2.496	2.677	2.886	3.205	2.990	3.261	3.124	3.089	2.870
	SD	0.617	0.147	0.189	0.202	0.235	0.137	0.230	0.193	0.178	0.487	0.119	1.196	0.194	0.326
p53 [1]	MW 0.817	0.885	0.447	0.675	0.552	0.530	0.303	0.279	0.499	0.375	0.548	0.313	0.326	0.243	0.441
	SD	0.150	0.042	0.026	0.038	0.042	0.017	0.019	0.024	0.018	0.064	0.008	0.089	0.011	0.037
p53 [2]	MW 1.546	1.266	1.360	1.283	1.331	1.554	1.221	0.934	1.459	1.243	1.284	0.812	0.809	0.794	1.017
	SD	0.283	0.063	0.097	0.096	0.179	0.056	0.072	0.071	0.063	0.175	0.019	0.219	0.035	0.084
p53 pS6	MW 0.770	0.852	0.619	0.674	0.575	0.572	0.669	0.473	0.657	0.728	0.628	0.774	0.763	0.760	0.779
	SD	0.141	0.052	0.036	0.038	0.041	0.026	0.028	0.036	0.051	0.072	0.018	0.206	0.034	0.067
p53 pS6 R [1]	MW 0.823	0.719	1.160	0.877	0.919	0.920	2.060	1.573	1.196	1.781	1.021	2.165	2.164	2.753	1.650
	SD	0.213	0.062	0.096	0.070	0.151	0.140	0.141	0.088	0.160	0.167	0.079	0.830	0.175	0.199
p53 pS6 R [2]	MW 0.435	0.502	0.382	0.461	0.381	0.314	0.511	0.470	0.409	0.537	0.435	0.834	0.874	0.841	0.716
	SD	0.113	0.044	0.035	0.037	0.039	0.031	0.046	0.030	0.049	0.078	0.029	0.334	0.053	0.086
p53 pS15	MW 0.155	0.135	0.071	0.083	0.067	0.064	0.073	0.066	0.062	0.066	0.119	0.056	0.104	0.046	0.083
	SD	0.029	0.008	0.005	0.005	0.007	0.004	0.006	0.005	0.008	0.014	0.006	0.028	0.003	0.009
p53 pS15 R [1]	MW 0.190	0.152	0.159	0.123	0.122	0.120	0.240	0.288	0.124	0.176	0.217	0.180	0.319	0.189	0.187
	SD	0.050	0.011	0.014	0.010	0.013	0.018	0.028	0.011	0.022	0.036	0.020	0.123	0.013	0.026
p53 pS15 R [2]	MW 0.100	0.106	0.052	0.064	0.050	0.041	0.060	0.086	0.043	0.053	0.093	0.070	0.129	0.058	0.081
	SD	0.026	0.008	0.005	0.005	0.007	0.004	0.009	0.004	0.007	0.017	0.008	0.050	0.004	0.011
p53 pS20	MW 0.142	0.017	0.045	0.064	0.052	0.062	0.051	0.086	0.070	0.060	0.060	0.018	0.077	0.030	0.057
	SD	0.027	0.005	0.004	0.005	0.007	0.003	0.006	0.007	0.008	0.009	0.007	0.022	0.005	0.008
p53 pS20 R [1]	MW 0.174	0.019	0.101	0.125	0.095	0.117	0.170	0.308	0.141	0.159	0.110	0.059	0.237	0.126	0.130
	SD	0.046	0.006	0.011	0.010	0.019	0.013	0.030	0.015	0.023	0.021	0.023	0.093	0.021	0.021

	C-31dT1	C-33b [1]	C-33b [2]	C-34aT1	C-34aT2	C-34aT3	N-36	N-37	N-38	N-39	N-40	B-13T1	B-45T1	B-45T2	B-75T1
p53 pS20 R [2]	MW 0.092	0.014	0.033	0.066	0.039	0.040	0.042	0.092	0.048	0.048	0.047	0.023	0.096	0.038	0.056
	SD	0.004	0.004	0.005	0.004	0.006	0.003	0.010	0.005	0.009	0.009	0.009	0.037	0.007	0.009
p53 pS392	MW 0.040	0.081	0.018	0.034	0.057	0.033	0.025	0.048	0.043	0.017	0.027		0.051		0.036
	SD	0.010	0.007	0.003	0.004	0.004	0.001	0.004	0.003	0.005	0.008		0.015		0.006
p53 pS392 R [1]	MW 0.049	0.092	0.040	0.051	0.104	0.063	0.084	0.173	0.085	0.047	0.050		0.156		0.082
	SD	0.015	0.009	0.005	0.011	0.010	0.006	0.019	0.008	0.014	0.017		0.063		0.016
p53 pS392 R [2]	MW 0.026	0.064	0.013	0.027	0.043	0.021	0.021	0.052	0.029	0.014	0.021		0.063		0.036
	SD	0.008	0.006	0.003	0.004	0.003	0.001	0.006	0.003	0.004	0.007		0.026		0.007
PDK 1 pS241	MW 0.596	0.647	0.507	0.686	2.064	0.683	1.194	1.052	0.544	0.867	0.636	0.696	0.697	0.451	0.676
	SD	0.054	0.048	0.060	0.029	0.016	0.104	0.104	0.047	0.071	0.072	0.103	0.054	0.076	0.067
PTEN pS380	MW 1.461	1.401	1.359	1.557	1.725	1.419	1.681	1.396	1.855	1.481	1.744	1.899	1.925	2.345	1.788
	SD	0.137	0.111	0.159	0.066	0.032	0.101	0.130	0.158	0.091	0.200	0.251	0.137	0.388	0.177
b-Raf pS445	MW 0.257	0.352	0.186	0.259	0.234	0.220	0.195	0.170	0.233	0.174	0.179	0.154	0.196	0.195	0.169
	SD	0.023	0.026	0.022	0.010	0.004	0.012	0.016	0.019	0.012	0.021	0.020	0.014	0.032	0.017
c-Raf pS259	MW 1.261	1.454	1.226	1.194	1.018	1.136	1.242	1.015	1.241	1.063	1.185	1.877	2.118	1.691	1.874
	SD	0.113	0.103	0.144	0.047	0.020	0.075	0.091	0.104	0.052	0.134	0.244	0.145	0.278	0.185
c-Raf pS338	MW 0.650	0.853	0.655	0.653	0.512	0.478	0.543	0.509	0.708	0.608	0.723	0.901	0.949	0.820	0.887
	SD	0.058	0.061	0.077	0.026	0.009	0.033	0.046	0.059	0.028	0.082	0.117	0.066	0.135	0.088
Ha-Ras [2]	MW 119.946	261.945	186.488	145.455	91.221	169.312	173.071	93.508	358.557	152.837	254.222	113.741	140.703	130.044	116.181
	SD	21.979	27.182	10.921	7.965	19.246	6.723	5.592	17.023	6.169	29.365	2.832	38.076	6.643	11.966
RSK 1/2/3	MW 0.857	0.642	0.980	0.693	1.046	0.645	0.823	1.044	0.698	1.328	1.118	0.398	0.401	0.559	0.527
	SD	0.157	0.030	0.058	0.044	0.074	0.062	0.062	0.035	0.051	0.131	0.017	0.109	0.025	0.046
RSK 1 pS380	MW 0.596	0.442	0.321	0.446	0.428	0.549	0.462	0.533	0.394	0.475	0.430	0.825	0.798	0.863	0.870
	SD	0.109	0.022	0.019	0.024	0.031	0.018	0.032	0.023	0.020	0.051	0.016	0.216	0.038	0.070
RSK 1 pS380 R	MW 0.696	0.689	0.328	0.643	0.409	0.850	0.561	0.511	0.565	0.358	0.385	1.570	1.991	1.544	1.653
	SD	0.180	0.047	0.028	0.054	0.137	0.048	0.043	0.043	0.020	0.064	0.079	0.765	0.097	0.197
RXR	MW 1.210	1.502	1.116	1.250	1.327	1.259	1.554	1.265	1.587	1.370	1.616	1.339	1.410	1.271	1.417
	SD	0.108	0.108	0.131	0.050	0.108	0.093	0.117	0.133	0.058	0.182	0.175	0.097	0.209	0.140
STAT 3 [1]	MW 1.595	2.216	2.447	1.851	2.361	1.879	14.895	9.570	11.191	18.311	16.098	4.147	6.303	5.175	5.509
	SD	0.145	0.157	0.287	0.072	0.184	0.033	0.867	0.941	0.775	1.833	0.542	0.443	0.867	0.544
STAT 3 pY705 [1]	MW 0.320	0.331	0.338	0.350	0.321	0.241	0.391	0.268	0.256	0.407	0.218	0.451	0.420	0.265	0.406
	SD	0.029	0.024	0.040	0.015	0.025	0.010	0.024	0.022	0.019	0.025	0.059	0.031	0.046	0.040
STAT 3 pY705 [1] R [1]	MW 0.201	0.150	0.138	0.189	0.136	0.128	0.026	0.028	0.023	0.022	0.014	0.109	0.067	0.051	0.074
	SD	0.026	0.015	0.023	0.011	0.006	0.002	0.004	0.003	0.001	0.002	0.020	0.007	0.012	0.010

	H 11T1	H 21T3	H 55T4	H 78T1	H 79T1	N 3	N 6	N 7	N 9	N 10	N 12	N 16
Akt [2]	MW 2.077	2.012	1.851	2.315	1.906	2.283	2.128	2.386	2.086	2.312	1.492	2.343
	SD 0.159	0.092	0.153	0.079	0.283	0.130	0.449	0.100	0.186	0.272	0.237	0.024
Akt pS473	MW 0.164	0.143	0.176	0.218	0.160	0.219	0.172	0.581	0.173	0.207	0.223	0.557
	SD 0.013	0.007	0.015	0.008	0.024	0.013	0.036	0.026	0.016	0.024	0.036	0.004
Akt pS473 R [2]	MW 0.079	0.071	0.095	0.094	0.084	0.096	0.081	0.244	0.083	0.089	0.149	0.238
	SD 0.009	0.005	0.011	0.005	0.018	0.008	0.024	0.015	0.011	0.015	0.034	0.003
Akt pT308	MW 0.382	0.448	0.404	0.540	0.451	0.587	0.400	0.917	0.602	0.621	0.423	0.627
	SD 0.029	0.022	0.033	0.019	0.067	0.033	0.085	0.038	0.054	0.073	0.067	0.004
Akt pT308 R [2]	MW 0.184	0.222	0.218	0.233	0.237	0.257	0.188	0.384	0.288	0.269	0.284	0.268
	SD 0.020	0.015	0.025	0.011	0.050	0.021	0.056	0.023	0.045	0.045	0.064	0.003
Akt Sub. pS/T	MW 3.882	3.551	3.531	4.329	3.230	2.338	1.557	2.407	1.962	2.304	1.660	2.261
	SD 0.296	0.162	0.291	0.147	0.481	0.133	0.328	0.101	0.175	0.272	0.263	0.020
AMPK $\alpha$ pT172	MW 1.137	1.325	1.368	1.523	1.148	1.022	0.869	1.034	0.939	0.990	0.681	0.865
	SD 0.087	0.060	0.113	0.052	0.171	0.058	0.184	0.044	0.084	0.116	0.108	0.006
ATM/ATR Sub. pS/T	MW 1.026	0.961	0.861	0.976	0.885	0.792	0.922	0.945	0.775	0.846	0.991	0.976
	SD 0.092	0.060	0.075	0.024	0.110	0.036	0.077	0.077	0.097	0.029	0.036	0.045
E-Cadherin	MW 13.786	14.131	12.557	14.064	15.333	4.541	6.382	3.974	4.573	5.407	5.248	3.874
	SD 1.167	0.853	1.080	0.345	1.891	0.163	0.525	0.323	0.567	0.175	0.184	0.180
N-Cadherin [1]	MW 0.390	0.410	0.359	0.442	0.443	0.860	0.706	0.720	0.600	0.752	0.822	0.787
	SD 0.033	0.026	0.032	0.013	0.055	0.031	0.061	0.059	0.076	0.038	0.033	0.037
N-Cadherin [2]	MW 0.639	0.687	0.584	0.835	0.778	1.098	0.881	1.013	0.945	1.237	1.023	0.994
	SD 0.054	0.044	0.050	0.020	0.096	0.039	0.073	0.081	0.117	0.037	0.036	0.044
$\beta$ -Cat. [1]	MW 0.842	0.662	0.659	0.979	0.832	0.613	0.466	0.456	0.444	0.571	0.468	0.407
	SD 0.071	0.043	0.057	0.023	0.103	0.023	0.039	0.037	0.055	0.017	0.017	0.018
$\beta$ -Cat. [2]	MW 1.772	1.442	1.862	1.963	1.901	0.933	1.096	1.043	0.973	1.134	0.904	1.008
	SD 0.136	0.071	0.153	0.067	0.283	0.053	0.234	0.064	0.087	0.133	0.145	0.016
$\beta$ -Cat. [3]	MW 1.991	1.825	1.925	2.201	1.988	1.358	1.372	1.435	1.292	1.480	1.054	1.352
	SD 0.152	0.083	0.159	0.075	0.296	0.077	0.290	0.062	0.116	0.174	0.168	0.011
$\beta$ -Cat. pT41/S45	MW 0.296	0.313	0.235	0.311	0.261	0.269	0.235	0.254	0.203	0.246	0.200	0.311
	SD 0.023	0.015	0.020	0.011	0.039	0.015	0.050	0.011	0.018	0.029	0.032	0.003
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [1]	MW 0.352	0.473	0.357	0.317	0.314	0.439	0.504	0.558	0.457	0.430	0.427	0.766
	SD 0.041	0.038	0.043	0.014	0.061	0.030	0.116	0.051	0.070	0.053	0.071	0.035
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [2]	MW 0.167	0.217	0.126	0.158	0.137	0.289	0.214	0.244	0.209	0.217	0.221	0.309
	SD 0.018	0.015	0.015	0.008	0.029	0.023	0.065	0.019	0.026	0.036	0.050	0.006
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [3]	MW 0.149	0.172	0.122	0.141	0.131	0.198	0.171	0.177	0.157	0.166	0.190	0.230
	SD 0.016	0.011	0.014	0.007	0.028	0.016	0.052	0.011	0.020	0.028	0.043	0.003
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41	MW 0.222	0.259	0.228	0.209	0.351	0.200	0.207	0.240	0.170	0.257	0.184	0.279
	SD 0.018	0.012	0.019	0.010	0.052	0.012	0.044	0.010	0.016	0.030	0.029	0.004
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41 R [1]	MW 0.264	0.391	0.346	0.213	0.422	0.327	0.444	0.526	0.382	0.449	0.394	0.686
	SD 0.031	0.031	0.041	0.012	0.082	0.023	0.102	0.048	0.059	0.055	0.064	0.032
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41 R [2]	MW 0.125	0.180	0.123	0.106	0.184	0.215	0.189	0.230	0.174	0.226	0.204	0.277
	SD 0.014	0.012	0.014	0.006	0.039	0.018	0.057	0.017	0.022	0.038	0.046	0.006
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41 R [3]	MW 0.112	0.142	0.119	0.095	0.176	0.147	0.151	0.167	0.131	0.173	0.175	0.206
	SD 0.013	0.009	0.014	0.006	0.037	0.012	0.045	0.010	0.017	0.029	0.039	0.003
Connexin 26	MW 0.774	0.827	0.739	0.922	0.791	0.621	0.447	0.611	0.762	0.769	0.452	0.234
	SD 0.066	0.053	0.064	0.022	0.098	0.022	0.037	0.049	0.095	0.023	0.017	0.011

	H.11T1	H.21T3	H.55T4	H.78T1	H.79T1	N.3	N.6	N.7	N.9	N.10	N.12	N.16
CREB	MW	0.256	0.219	0.256	0.264	0.263	0.252	0.276	0.197	0.289	0.205	0.281
	SD	0.018	0.018	0.012	0.009	0.039	0.014	0.052	0.019	0.034	0.033	0.003
CREB pS133 [1]	MW	0.099	0.104	0.104	0.124	0.096	0.098	0.106	0.107	0.129	0.075	0.138
	SD	0.008	0.006	0.006	0.005	0.017	0.006	0.005	0.010	0.016	0.013	0.002
CREB pS133 [1] R	MW	0.432	0.406	0.406	0.471	0.363	0.389	0.382	0.542	0.447	0.365	0.492
	SD	0.049	0.029	0.029	0.056	0.084	0.031	0.133	0.073	0.077	0.087	0.009
Cyp 1A1	MW	1.231	1.210	1.183	1.394	1.525	1.374	2.032	1.275	1.690	1.231	1.871
	SD	0.106	0.082	0.104	0.067	0.192	0.062	0.126	0.160	0.056	0.045	0.086
Cyp 1A2	MW	0.290	0.226	0.369	0.408	0.327	2.403	3.477	2.216	2.626	1.437	2.493
	SD	0.029	0.024	0.036	0.033	0.045	0.086	0.319	0.276	0.082	0.054	0.115
Cyp 2B1	MW	1.681	1.360	1.725	1.728	1.875	1.668	2.067	1.489	2.008	1.848	1.900
	SD	0.147	0.093	0.155	0.061	0.234	0.066	0.176	0.189	0.079	0.075	0.115
Cyp 2C6	MW	2.468	2.068	2.890	3.244	2.244	17.113	22.535	16.004	17.825	29.246	29.703
	SD	0.221	0.150	0.256	0.109	0.286	0.603	1.859	1.982	0.546	1.039	1.425
Cyp 2E1	MW	0.831	1.608	2.409	2.712	1.893	10.531	12.340	8.621	9.221	9.623	7.911
	SD	0.162	0.244	0.256	0.203	0.294	0.397	1.029	1.087	0.317	0.387	0.474
Decorin	MW	8.652	8.116	7.672	9.353	9.072	7.323	8.495	6.885	7.974	6.989	7.158
	SD	0.733	0.494	0.658	0.226	1.116	0.257	0.700	0.827	0.242	0.245	0.318
EGFR [1]	MW	1.647	1.442	1.477	1.892	1.775	2.917	2.795	2.565	2.731	2.245	3.014
	SD	0.129	0.075	0.123	0.065	0.264	0.165	0.610	0.230	0.323	0.356	0.024
Elk-1 pS383 [1]	MW	2.229	2.311	1.979	3.108	2.349	2.095	1.911	1.599	2.186	1.600	1.611
	SD	0.189	0.149	0.194	0.085	0.290	0.084	0.159	0.202	0.084	0.142	0.103
Erk 1/2	MW	3.278	2.219	2.605	2.941	2.563	2.564	2.553	2.422	2.401	2.118	2.351
	SD	0.278	0.148	0.223	0.078	0.316	0.093	0.210	0.193	0.249	0.073	0.105
Erk 1/2 pT202/Y204	MW	2.628	2.983	2.455	4.107	3.021	1.082	0.864	1.079	0.923	1.033	1.977
	SD	0.223	0.190	0.211	0.112	0.372	0.038	0.073	0.086	0.114	0.035	0.088
Erk 1/2 pT202/Y204 R	MW	0.793	1.333	0.930	1.384	1.163	0.399	0.309	0.422	0.435	0.293	0.815
	SD	0.095	0.123	0.113	0.053	0.203	0.020	0.037	0.076	0.019	0.015	0.052
Glutaminsynthetase	MW	0.035	0.021	0.020	0.010	0.009	0.066	0.111	0.064	0.067	0.077	0.102
	SD	0.003	0.002	0.002	0.001	0.005	0.004	0.024	0.012	0.010	0.019	0.002
GSK3 $\beta$	MW	0.520	0.485	0.577	0.610	0.541	0.502	0.525	0.473	0.509	0.465	0.622
	SD	0.041	0.022	0.048	0.021	0.080	0.029	0.111	0.042	0.060	0.074	0.004
GSK3 $\beta$ pS9	MW	0.165	0.170	0.206	0.231	0.192	0.079	0.054	0.047	0.071	0.096	0.153
	SD	0.013	0.008	0.017	0.008	0.029	0.005	0.012	0.005	0.009	0.015	0.002
GSK3 $\beta$ pS9 R	MW	0.318	0.351	0.357	0.379	0.356	0.158	0.104	0.100	0.140	0.206	0.246
	SD	0.035	0.023	0.042	0.018	0.075	0.013	0.031	0.013	0.023	0.046	0.003
Histon H3	MW	3.585	2.334	2.040	3.151	2.154	1.342	1.918	1.165	1.549	1.236	1.400
	SD	0.273	0.116	0.249	0.224	0.322	0.089	0.405	0.110	0.185	0.199	0.017
IGFBP-1	MW	0.539	0.706	0.463	0.672	0.664	0.645	0.547	0.558	0.721	0.488	0.534
	SD	0.046	0.045	0.040	0.030	0.082	0.023	0.045	0.071	0.027	0.017	0.032
IGFBP-3	MW	1.219	1.475	1.416	1.681	1.538	1.623	1.794	1.652	1.919	1.418	1.732
	SD	0.096	0.067	0.117	0.058	0.229	0.092	0.380	0.148	0.226	0.225	0.012
JNK/SAPK	MW	0.345	0.275	0.304	0.308	0.275	0.299	0.285	0.269	0.367	0.266	0.369
	SD	0.026	0.015	0.025	0.012	0.041	0.017	0.060	0.023	0.043	0.042	0.009
JNK/SAPK pT183/Y185	MW	0.353	0.367	0.380	0.530	0.371	0.363	0.393	0.285	0.377	0.277	0.391
	SD	0.028	0.017	0.032	0.018	0.055	0.021	0.083	0.026	0.044	0.044	0.003



	H 11T1	H 21T3	H 55T4	H 78T1	H 79T1	N 3	N 6	N 7	N 9	N 10	N 12	N 16
JNK/SAPK pT183/Y185 R	MW 1.024	1.334	1.252	1.718	1.351	1.214	1.380	1.328	1.088	1.027	1.043	1.059
	SD 0.113	0.095	0.147	0.087	0.285	0.098	0.412	0.079	0.138	0.171	0.234	0.028
c-Jun	MW 0.055	0.072	0.044	0.090	0.048	0.087	0.053	0.067	0.052	0.079	0.041	0.070
	SD 0.004	0.004	0.005	0.003	0.007	0.005	0.012	0.005	0.005	0.009	0.007	0.003
c-Jun pS63 [2]	MW 0.141	0.152	0.138	0.239	0.185	0.248	0.207	0.242	0.144	0.240	0.134	0.240
	SD 0.011	0.007	0.012	0.009	0.028	0.014	0.044	0.013	0.013	0.028	0.021	0.004
c-Jun pS63 [2] R	MW 2.556	2.129	3.148	2.673	3.874	2.847	3.898	3.626	2.753	3.046	3.244	3.416
	SD 0.278	0.157	0.467	0.138	0.835	0.230	1.188	0.324	0.366	0.510	0.748	0.157
c-Jun pS73	MW 0.255	0.150	0.205	0.207	0.183	0.177	0.205	0.248	0.196	0.206	0.182	0.200
	SD 0.021	0.007	0.018	0.007	0.027	0.010	0.043	0.012	0.010	0.025	0.029	0.002
c-Jun pS73 R	MW 4.609	2.091	4.685	2.311	3.843	2.040	3.862	3.715	3.740	2.613	4.388	2.850
	SD 0.521	0.154	0.693	0.118	0.821	0.165	1.174	0.306	0.491	0.441	1.010	0.128
Ki-67	MW 1.617	2.323	1.778	2.452	2.064	2.117	2.093	2.313	2.088	2.331	1.616	2.409
	SD 0.152	0.105	0.148	0.085	0.307	0.120	0.442	0.098	0.187	0.274	0.256	0.015
MEK 1/2 pS217/221	MW 2.523	0.873	1.894	1.981	0.726	1.492	0.293	0.347	0.368	0.394	0.959	0.553
	SD 0.293	0.053	0.275	0.317	0.093	1.089	0.026	0.028	0.064	0.013	0.130	0.027
c-Met [2]	MW 5.824	8.225	7.086	7.893	7.674	7.077	8.256	7.461	6.317	7.084	6.228	6.585
	SD 0.493	0.497	0.607	0.187	0.949	0.248	0.679	0.593	0.782	0.224	0.223	0.297
c-Myc [2]	MW 0.302	0.320	0.278	0.558	0.405	0.534	0.407	0.507	0.390	0.519	0.367	0.521
	SD 0.026	0.025	0.024	0.021	0.050	0.019	0.034	0.040	0.048	0.016	0.013	0.023
p38/MAPK	MW 0.480	0.320	0.365	0.411	0.316	0.420	0.411	0.471	0.414	0.422	0.430	0.412
	SD 0.041	0.024	0.032	0.010	0.039	0.015	0.034	0.037	0.051	0.013	0.015	0.021
p38/MAPK pT180/Y182	MW 1.078	0.990	1.111	1.435	1.275	1.449	1.345	1.360	1.205	1.597	0.823	0.856
	SD 0.091	0.062	0.096	0.034	0.157	0.051	0.111	0.108	0.149	0.048	0.032	0.045
p38/MAPK pT180/Y182 R	MW 2.245	3.098	3.044	3.493	4.036	3.451	3.273	2.891	2.908	3.782	1.915	2.077
	SD 0.270	0.303	0.372	0.120	0.703	0.171	0.381	0.325	0.509	0.161	0.101	0.153
p53 [1]	MW 0.307	0.421	0.169	0.310	0.318	0.328	0.248	0.212	0.249	0.263	0.200	0.184
	SD 0.027	0.026	0.016	0.008	0.039	0.012	0.022	0.017	0.031	0.008	0.008	0.010
p53 [2]	MW 0.565	0.587	0.585	0.733	0.757	1.044	1.115	1.111	0.796	1.009	0.945	0.776
	SD 0.049	0.036	0.050	0.017	0.093	0.041	0.092	0.088	0.098	0.030	0.034	0.035
p53 pS6	MW 0.485	0.594	0.515	0.941	0.728	0.816	0.734	0.670	0.688	0.628	0.680	0.834
	SD 0.041	0.044	0.045	0.024	0.090	0.030	0.060	0.054	0.085	0.021	0.029	0.037
p53 pS6 R [1]	MW 1.460	1.326	2.794	2.867	2.127	2.252	2.562	2.800	2.512	2.148	3.161	4.113
	SD 0.177	0.131	0.359	0.101	0.370	0.115	0.307	0.318	0.442	0.101	0.187	0.296
p53 pS6 R [2]	MW 0.793	0.951	0.805	1.215	0.893	0.708	0.571	0.533	0.785	0.560	0.668	0.975
	SD 0.097	0.094	0.100	0.042	0.155	0.038	0.067	0.060	0.138	0.026	0.038	0.063
p53 pS15	MW 0.078	0.072	0.055	0.067	0.073	0.047	0.043	0.130	0.055	0.091	0.077	0.055
	SD 0.007	0.009	0.007	0.004	0.010	0.002	0.004	0.010	0.007	0.003	0.003	0.011
p53 pS15 R [1]	MW 0.253	0.172	0.327	0.216	0.229	0.142	0.175	0.612	0.222	0.346	0.387	0.296
	SD 0.031	0.024	0.051	0.013	0.042	0.008	0.022	0.070	0.039	0.017	0.023	0.061
p53 pS15 R [2]	MW 0.137	0.123	0.094	0.092	0.096	0.045	0.039	0.117	0.069	0.090	0.082	0.070
	SD 0.017	0.017	0.014	0.006	0.017	0.003	0.005	0.013	0.012	0.004	0.005	0.014
p53 pS20	MW 0.048	0.043	0.045	0.051	0.034	0.038	0.002	0.088	0.029	0.047	0.041	0.033
	SD 0.004	0.008	0.012	0.003	0.010	0.002	0.005	0.008	0.004	0.003	0.003	0.011
p53 pS20 R [1]	MW 0.157	0.101	0.266	0.163	0.105	0.114	0.008	0.418	0.116	0.178	0.206	0.178
	SD 0.020	0.019	0.074	0.011	0.033	0.008	0.019	0.050	0.023	0.012	0.016	0.059

	H.11T1	H.21T3	H.55T4	H.78T1	H.79T1	N.3	N.6	N.7	N.9	N.10	N.12	N.16
p53 pS20 R [2]	MW 0.085	0.073	0.077	0.069	0.044	0.036	0.002	0.080	0.036	0.046	0.044	0.042
	SD 0.011	0.014	0.021	0.005	0.014	0.002	0.004	0.010	0.007	0.003	0.003	0.014
p53 pS392	MW 0.031	0.037	0.024	0.041	0.009	0.060		0.064	0.035	0.033	0.040	0.008
	SD 0.003	0.008	0.012	0.003	0.003	0.002		0.006	0.005	0.001	0.003	0.011
p53 pS392 R [1]	MW 0.102	0.087	0.144	0.133	0.027	0.183		0.301	0.139	0.127	0.202	0.041
	SD 0.013	0.020	0.071	0.010	0.010	0.009		0.036	0.025	0.007	0.018	0.061
p53 pS392 R [2]	MW 0.056	0.062	0.042	0.056	0.011	0.057		0.057	0.044	0.033	0.043	0.010
	SD 0.007	0.014	0.020	0.004	0.004	0.003		0.007	0.008	0.002	0.004	0.014
PKD1 pS241	MW 0.489	0.504	0.458	0.542	0.452	0.416	0.507	0.590	0.423	0.477	0.355	0.468
	SD 0.040	0.023	0.038	0.021	0.068	0.026	0.107	0.025	0.038	0.056	0.057	0.008
PTEN pS380	MW 1.407	1.272	2.023	1.728	1.440	1.474	1.722	1.697	1.420	1.466	1.309	1.615
	SD 0.122	0.063	0.167	0.068	0.228	0.085	0.364	0.071	0.129	0.173	0.207	0.014
b-Raf pS445	MW 0.162	0.112	0.174	0.159	0.132	0.150	0.157	0.182	0.154	0.188	0.172	0.196
	SD 0.012	0.005	0.014	0.006	0.020	0.009	0.033	0.008	0.014	0.022	0.027	0.003
c-Raf pS259	MW 1.756	1.444	1.529	1.930	1.435	1.228	1.209	1.466	1.226	1.220	1.058	1.508
	SD 0.134	0.071	0.126	0.068	0.214	0.071	0.255	0.062	0.111	0.143	0.168	0.021
c-Raf pS338	MW 0.740	0.765	0.736	0.875	0.750	0.777	0.646	0.705	0.695	0.800	0.607	0.689
	SD 0.057	0.036	0.061	0.030	0.112	0.044	0.136	0.030	0.062	0.094	0.096	0.005
Ha-Reas [2]	MW 76.324	65.815	84.108	94.836	83.585	197.541	233.926	221.846	178.565	161.232	154.333	147.786
	SD 6.468	9.942	8.497	3.331	10.622	7.264	19.261	19.190	22.672	5.355	5.476	9.300
RSK 1/2/3	MW 0.530	0.502	0.796	0.385	1.104	0.885	1.358	0.900	1.689	1.359	1.255	1.168
	SD 0.045	0.045	0.070	0.037	0.149	0.045	0.112	0.072	0.211	0.059	0.047	0.069
RSK 1 pS380	MW 0.917	0.822	0.823	1.150	1.038	0.431	0.325	0.383	0.373	0.476	0.291	0.324
	SD 0.078	0.050	0.071	0.027	0.128	0.015	0.027	0.031	0.046	0.015	0.013	0.022
RSK 1 pS380 R	MW 1.731	1.638	1.034	2.985	0.940	0.487	0.239	0.426	0.221	0.350	0.232	0.278
	SD 0.207	0.177	0.127	0.293	0.172	0.030	0.028	0.048	0.039	0.019	0.013	0.025
RXR	MW 0.808	0.783	1.013	1.211	1.019	1.606	1.794	1.914	1.334	1.706	1.371	1.653
	SD 0.062	0.036	0.090	0.041	0.152	0.096	0.379	0.081	0.127	0.201	0.218	0.012
STAT 3 [1]	MW 2.577	3.415	3.742	4.494	3.131	24.689	46.415	51.869	25.897	26.864	29.023	61.034
	SD 0.206	0.161	0.320	0.153	0.466	1.465	9.866	2.283	2.334	3.215	4.610	0.423
STAT 3 pY705 [1]	MW 0.270	0.244	0.288	0.353	0.322	0.379	0.299	0.419	0.403	0.389	0.317	0.338
	SD 0.021	0.011	0.024	0.012	0.048	0.022	0.063	0.018	0.036	0.046	0.050	0.004
STAT 3 pY705 [1] R [1]	MW 0.105	0.072	0.077	0.079	0.103	0.015	0.006	0.008	0.016	0.014	0.011	0.006
	SD 0.012	0.005	0.009	0.004	0.022	0.001	0.002	0.001	0.002	0.002	0.002	0.000

**Tabelle 8.2 Daten der in Kapitel 3.2.3.2 dargestellten Proteinexpressionsanalyse.**

Dargestellt sind Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der auf die immobilisierte Proteinmenge normalisierten und Hintergrund-korrigierten Antigen-spezifischen Expressionswerte. Im Falle von Proteinen, für die Expressionswerte der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Form vorlagen sind Verhältnisse aus phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Expressionswerten dargestellt. Bei den Werten handelt es sich um relative Fluoreszenzintensitäten (RFI). Den Analytenamen nachstehende Bezeichner: p - phospho, g - gespalten, R - Verhältnis des vorstehenden Analyten und der Totalproteinexpressionswerte, [ ] - Antikörpernummerierung mehrfach erfasster Analyten.

	B 11T6	B 13T1	B 29T2	B 29T4	B 39T1	B 45T1	B 45T2	B 50T3	B 62T1	B 62T2	B 66T1	B 75T1	H 1T1	H 1T2
14-3-3 ζ δ	MW 0.115	0.193	0.108	0.241	0.228	0.168	0.166	0.225	0.171	0.213	0.186	0.132	0.139	0.090
	SD 0.006	0.024	0.007	0.023	0.020	0.015	0.006	0.005	0.008	0.017	0.016	0.010	0.009	0.024
AFP	MW 0.075	0.068	0.086	0.035	0.037	0.022	0.032	0.024	0.021	0.026	0.280	0.040	0.019	0.028
	SD 0.004	0.006	0.003	0.003	0.004	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.021	0.002	0.001	0.002
Akt [1]	MW 0.923	1.207	0.673	0.995	0.812	0.771	1.184	0.941	0.985	0.865	0.819	1.028	0.764	1.346
	SD 0.062	0.115	0.054	0.091	0.073	0.050	0.050	0.024	0.063	0.043	0.079	0.049	0.046	0.075
Akt [2]	MW 0.275	0.294	0.270	0.324	0.361	0.340	0.265	0.279	0.320	0.279	0.262	0.308	0.298	0.332
	SD 0.015	0.028	0.020	0.025	0.032	0.019	0.012	0.012	0.012	0.012	0.021	0.015	0.013	0.021
Akt pT308	MW 0.936	0.978	0.734	0.914	0.647	0.567	1.205	0.810	0.805	0.632	0.749	0.903	0.756	1.559
	SD 0.049	0.092	0.019	0.068	0.058	0.029	0.048	0.027	0.014	0.016	0.056	0.048	0.029	0.088
Akt pS473	MW 0.076	0.157	0.094	0.108	0.072	0.109	0.178	0.090	0.176	0.080	0.107	0.098	0.096	0.112
	SD 0.004	0.015	0.009	0.010	0.008	0.010	0.022	0.007	0.021	0.004	0.009	0.005	0.010	0.012
Akt Sub. pS/T	MW 4.052	3.198	3.671	4.266	2.582	3.611	3.818	3.762	3.764	3.743	3.387	3.434	3.431	4.715
	SD 0.203	0.300	0.083	0.316	0.233	0.195	0.124	0.102	0.069	0.095	0.251	0.163	0.131	0.258
AMPK α	MW 0.107	0.112	0.146	0.143	0.121	0.137	0.122	0.128	0.125	0.122	0.152	0.127	0.106	0.172
	SD 0.007	0.011	0.008	0.013	0.011	0.015	0.004	0.005	0.003	0.008	0.011	0.016	0.007	0.010
AMPK α pT172	MW 1.657	0.906	1.994	1.580	1.241	1.036	0.721	1.637	1.155	1.677	1.267	1.059	1.197	2.416
	SD 0.083	0.087	0.045	0.124	0.117	0.081	0.024	0.061	0.028	0.068	0.094	0.052	0.047	0.158
APC	MW 0.040	0.052	0.033	0.049	0.036	0.038	0.044	0.038	0.032	0.055	0.047	0.051	0.046	0.037
	SD 0.002	0.004	0.003	0.001	0.006	0.003	0.003	0.003	0.001	0.003	0.004	0.002	0.002	0.002
ATM/ATR Sub. pS/T	MW 0.650	0.734	0.575	0.720	0.664	0.669	0.663	0.714	0.794	0.697	0.743	0.703	0.652	0.754
	SD 0.049	0.082	0.054	0.071	0.062	0.053	0.047	0.025	0.063	0.034	0.072	0.046	0.075	0.057
Bad	MW 0.172	0.178	0.225	0.237	0.164	0.209	0.199	0.172	0.250	0.213	0.202	0.142	0.159	0.291
	SD 0.009	0.015	0.021	0.005	0.015	0.012	0.013	0.015	0.009	0.012	0.016	0.005	0.007	0.011
Bad pS112	MW 0.150	0.128	0.135	0.149	0.105	0.070	0.165	0.226	0.106	0.102	0.421	0.109	0.117	0.163
	SD 0.009	0.015	0.010	0.013	0.006	0.006	0.009	0.007	0.014	0.008	0.031	0.007	0.008	0.012
Bax	MW 1.373	1.409	1.185	1.104	1.111	1.163	1.057	0.831	1.142	1.077	1.019	1.152	1.293	1.325
	SD 0.069	0.113	0.111	0.018	0.130	0.065	0.069	0.082	0.019	0.055	0.080	0.037	0.059	0.036
E-Cadherin	MW 1.488	1.833	1.076	0.886	0.828	1.533	1.579	0.893	1.327	1.268	0.854	1.325	1.087	1.071
	SD 0.074	0.147	0.100	0.105	0.094	0.086	0.104	0.094	0.022	0.064	0.067	0.043	0.049	0.030
N-Cadherin [2]	MW 0.293	0.303	0.212	0.302	0.105	0.295	0.356	0.346	0.359	0.271	0.373	0.302	0.314	0.284
	SD 0.015	0.029	0.005	0.022	0.014	0.016	0.012	0.015	0.008	0.007	0.028	0.015	0.013	0.016
Caspase 3 gD175	MW 0.076	0.080	0.056	0.091	0.080	0.076	0.083	0.071	0.075	0.083	0.081	0.101	0.068	0.063
	SD 0.004	0.008	0.003	0.007	0.008	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.006	0.005	0.003	0.005
Caspase 3	MW 1.226	1.330	1.458	1.796	1.122	1.439	2.078	0.874	1.486	1.503	1.724	1.751	1.219	1.714
	SD 0.085	0.129	0.033	0.146	0.102	0.117	0.073	0.022	0.037	0.041	0.137	0.134	0.046	0.098
Caspase 7 gD198	MW 0.053	0.067	0.046	0.067	0.049	0.052	0.077	0.067	0.049	0.051	0.064	0.052	0.047	0.054
	SD 0.004	0.006	0.006	0.003	0.005	0.004	0.006	0.005	0.003	0.004	0.005	0.003	0.004	0.004
Caspase 7	MW 0.388	0.396	0.466	0.599	0.322	0.551	0.507	0.436	0.549	0.470	0.487	0.397	0.363	0.489
	SD 0.020	0.032	0.044	0.011	0.046	0.031	0.033	0.041	0.010	0.024	0.038	0.013	0.017	0.013
β-Cat. [3]	MW 1.342	1.747	2.111	2.582	1.708	1.833	1.477	2.598	2.867	2.741	1.404	1.324	1.985	3.684
	SD 0.067	0.164	0.049	0.199	0.156	0.099	0.048	0.077	0.053	0.119	0.106	0.062	0.080	0.217
β-Cat. pS45	MW 0.037	0.056	0.039	0.046	0.039	0.039	0.059	0.045	0.053	0.034	0.045	0.036	0.029	0.056
	SD 0.002	0.005	0.001	0.003	0.004	0.002	0.002	0.004	0.001	0.001	0.003	0.002	0.001	0.003
β-Cat. pT41/S45	MW 0.066	0.080	0.046	0.075	0.073	0.060	0.072	0.074	0.087	0.069	0.069	0.064	0.060	0.072
	SD 0.003	0.007	0.001	0.006	0.007	0.003	0.003	0.005	0.002	0.002	0.005	0.003	0.003	0.004
β-Cat. pS33/37/T41	MW 0.394	0.454	0.399	0.421	0.556	0.452	0.444	0.293	0.381	0.352	0.462	0.282	0.293	0.271
	SD 0.021	0.043	0.009	0.031	0.050	0.024	0.014	0.010	0.007	0.009	0.034	0.014	0.011	0.015

	B 11T6	B 13T1	B 29T2	B 29T4	B 39T1	B 45T1	B 45T2	B 50T3	B 62T1	B 62T2	B 66T1	B 75T1	H 1T1	H 1T2
CK 1 $\alpha$	MW 0.045 SD 0.002	0.050 0.004	0.042 0.004	0.046 0.008	0.029 0.008	0.056 0.003	0.058 0.004	0.034 0.006	0.041 0.001	0.039 0.002	0.051 0.004	0.049 0.002	0.035 0.002	0.067 0.002
CK 1 $\delta$	MW 26.221 SD 1.761	30.235 4.217	24.302 0.947	42.228 3.421	16.121 1.459	39.400 2.137	38.623 2.480	25.239 1.087	41.010 2.854	32.812 2.417	41.554 3.251	25.240 12.308	24.694 1.927	11.315 6.802
CK 2 $\alpha$	MW 0.795 SD 0.040	0.906 0.074	0.978 0.092	1.111 0.844	0.905 0.122	1.025 0.060	1.046 0.070	1.049 0.113	1.097 0.034	0.928 0.050	1.127 0.089	0.794 0.046	0.920 0.044	1.160 0.033
CREB	MW 0.642 SD 0.032	0.926 0.087	0.572 0.014	0.844 0.062	0.718 0.066	0.634 0.033	1.053 0.035	0.772 0.035	0.683 0.013	0.624 0.015	0.583 0.043	0.718 0.034	0.635 0.024	1.360 0.079
CREB pS133 [1]	MW 0.085 SD 0.004	0.059 0.006	0.092 0.002	0.122 0.009	0.063 0.010	0.076 0.004	0.067 0.002	0.077 0.002	0.087 0.002	0.099 0.002	0.100 0.007	0.092 0.004	0.079 0.003	0.069 0.004
CREB pS133 [2]	MW 0.266 SD 0.014	0.172 0.016	0.237 0.008	0.274 0.023	0.198 0.018	0.264 0.021	0.220 0.007	0.207 0.008	0.258 0.007	0.310 0.012	0.291 0.022	0.176 0.008	0.211 0.008	0.248 0.014
Cyclin D1	MW 0.759 SD 0.038	0.787 0.074	1.329 0.029	1.247 0.093	0.756 0.070	0.801 0.041	1.013 0.033	1.332 0.044	1.523 0.030	1.378 0.033	1.111 0.082	0.849 0.041	0.920 0.035	1.078 0.059
Cyclin E2	MW 0.103 SD 0.005	0.110 0.010	0.088 0.002	0.112 0.008	0.096 0.009	0.089 0.005	0.141 0.005	0.101 0.008	0.102 0.002	0.086 0.002	0.124 0.009	0.095 0.005	0.079 0.003	0.121 0.007
EGFR [2]	MW 0.077 SD 0.004	0.088 0.007	0.062 0.006	0.062 0.001	0.056 0.008	0.087 0.005	0.126 0.008	0.113 0.012	0.065 0.001	0.053 0.003	0.112 0.009	0.123 0.004	0.124 0.006	0.087 0.003
EGFR pY845	MW 0.174 SD 0.009	0.194 0.016	0.163 0.015	0.215 0.004	0.154 0.024	0.193 0.011	0.196 0.013	0.243 0.026	0.214 0.004	0.226 0.011	0.277 0.022	0.189 0.006	0.187 0.009	0.195 0.006
EGFR pY1173	MW 0.397 SD 0.020	0.348 0.033	0.475 0.012	0.494 0.028	0.400 0.038	0.532 0.028	0.526 0.018	0.387 0.033	0.432 0.010	0.418 0.011	0.580 0.044	0.444 0.023	0.381 0.015	0.515 0.029
Elk-1	MW 0.488 SD 0.025	0.528 0.043	0.626 0.059	0.728 0.024	0.438 0.056	0.728 0.042	0.811 0.056	0.651 0.060	0.632 0.012	0.621 0.033	0.684 0.054	0.508 0.024	0.496 0.023	0.785 0.022
Elk-1 pS383 [1]	MW 1.080 SD 0.055	1.021 0.083	0.953 0.090	1.153 0.048	0.671 0.088	1.129 0.075	1.221 0.080	0.898 0.106	0.966 0.021	1.019 0.060	0.881 0.070	0.874 0.038	0.960 0.053	1.176 0.034
Elk-1 pS383 [2]	MW 0.793 SD 0.041	1.063 0.086	0.722 0.071	0.937 0.021	0.790 0.074	0.960 0.055	0.995 0.067	0.894 0.104	0.815 0.028	0.747 0.039	0.784 0.063	0.915 0.029	0.855 0.040	1.038 0.042
Erk 1	MW 0.429 SD 0.022	0.475 0.045	0.420 0.009	0.554 0.041	0.428 0.040	0.459 0.025	0.455 0.015	0.534 0.019	0.603 0.012	0.466 0.012	0.423 0.031	0.399 0.020	0.448 0.017	0.608 0.033
Erk 2	MW 0.681 SD 0.034	0.689 0.065	0.745 0.017	0.810 0.060	0.779 0.072	0.776 0.040	0.763 0.025	0.768 0.036	1.222 0.026	0.794 0.019	0.890 0.066	0.719 0.034	0.681 0.026	0.955 0.052
Erk 1/2	MW 8.029 SD 0.425	8.107 0.799	9.025 0.295	9.458 0.892	8.490 0.778	7.814 0.539	9.631 0.337	8.649 0.298	9.743 0.453	8.396 0.582	8.195 0.612	7.774 0.451	7.355 0.331	12.333 0.709
Erk 1/2 pT202/Y204	MW 0.711 SD 0.036	0.923 0.092	0.708 0.022	1.100 0.082	0.758 0.071	0.831 0.044	0.961 0.032	1.011 0.054	0.898 0.016	0.970 0.031	0.966 0.072	0.815 0.057	3.312 0.132	3.718 0.254
c-Fos	MW 0.107 SD 0.005	0.120 0.010	0.121 0.011	0.139 0.002	0.114 0.014	0.135 0.008	0.130 0.009	0.131 0.016	0.150 0.002	0.099 0.005	0.127 0.010	0.110 0.004	0.113 0.005	0.138 0.004
Glutaminsynthetase	MW 0.101 SD 0.035	0.277 0.024	0.057 0.041	0.437 0.064	0.183 0.029	0.180 0.203	0.989 0.290	0.236 0.020	0.243 0.044	0.970 0.037	0.966 0.158	0.536 0.034	0.060 0.071	1.601 1.468
Gpr49 P2 T1	MW 1.122 SD 0.056	1.545 0.145	1.116 0.025	1.789 0.132	0.872 0.084	1.300 0.068	1.478 0.051	1.547 0.036	2.156 0.050	1.506 0.037	1.354 0.100	1.453 0.056	1.453 0.055	1.468 0.080
GSK3 $\beta$	MW 0.650 SD 0.033	0.675 0.054	0.586 0.026	0.766 0.014	0.585 0.074	0.719 0.041	0.764 0.050	0.569 0.075	0.770 0.024	0.545 0.028	0.843 0.074	0.659 0.022	0.688 0.033	0.851 0.033
GSK3 $\beta$ pS9	MW 0.243 SD 0.012	0.258 0.021	0.228 0.021	0.281 0.007	0.141 0.024	0.299 0.017	0.364 0.024	0.174 0.023	0.373 0.007	0.157 0.008	0.251 0.020	0.259 0.015	0.312 0.014	0.404 0.012
HGF	MW 0.387 SD 0.019	0.422 0.034	0.543 0.051	0.517 0.013	0.407 0.049	0.531 0.032	0.462 0.030	0.446 0.043	0.567 0.011	0.493 0.026	0.488 0.039	0.364 0.012	0.542 0.025	0.608 0.017

	B_11T6	B_13T1	B_29T2	B_29T4	B_39T1	B_45T1	B_45T2	B_50T3	B_62T1	B_62T2	B_66T1	B_75T1	H_1T1	H_1T2
Histon H3	MW 5.194	11.148	6.675	11.895	8.904	12.967	8.162	6.696	7.912	7.598	6.955	9.565	14.019	9.236
	SD 0.268	0.938	0.627	0.216	1.633	0.906	0.542	0.882	0.135	0.425	0.551	0.493	0.641	0.253
Histon H3 ak9	MW 0.001	0.003	0.001	0.000	0.001	0.008	0.006	0.002	0.003	0.007	0.007	0.006	0.001	0.009
	SD 0.000	0.000	0.001	0.000	0.003	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
Histon H3 pS10	MW 0.007	0.011	0.006	0.006	0.004	0.014	0.017	0.008	0.006	0.014	0.012	0.011	0.006	0.007
	SD 0.000	0.001	0.001	0.000	0.003	0.001	0.001	0.003	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000
Histon H3 ak18	MW 0.022	0.083	0.059	0.137	0.026	0.319	0.121	0.022	0.118	0.104	0.042	0.094	0.400	0.131
	SD 0.001	0.017	0.006	0.029	0.003	0.026	0.008	0.002	0.016	0.029	0.006	0.020	0.042	0.017
Histon H3 ak23	MW 0.134	0.144	0.136	0.166	0.153	0.146	0.138	0.165	0.161	0.160	0.147	0.133	0.133	0.169
	SD 0.007	0.012	0.013	0.004	0.018	0.009	0.009	0.015	0.006	0.008	0.012	0.004	0.007	0.008
Histon H3 ak9 & pS10	MW 0.003	0.003	0.002	0.003	0.001	0.005	0.004	0.010	0.006	0.005	0.007	0.003	0.007	0.017
	SD 0.000	0.000	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000	0.003	0.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000
IkB	MW 0.017	0.018	0.011	0.016	0.020	0.021	0.017	0.020	0.010	0.013	0.016	0.026	0.011	0.001
	SD 0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001
IkB pS32	MW 0.379	0.394	0.428	0.467	0.384	0.414	0.427	0.440	0.423	0.395	0.495	0.346	0.399	0.527
	SD 0.020	0.032	0.041	0.016	0.049	0.024	0.028	0.048	0.011	0.023	0.039	0.020	0.020	0.015
JNK/SAPK	MW 0.243	0.268	0.304	0.270	0.215	0.282	0.309	0.215	0.220	0.239	0.473	0.201	0.206	0.298
	SD 0.012	0.025	0.013	0.020	0.020	0.015	0.010	0.016	0.010	0.006	0.035	0.010	0.011	0.018
JNK/SAPK pT183/Y185	MW 0.735	1.020	0.679	0.868	0.627	0.619	0.952	0.850	0.684	0.667	0.845	0.776	1.108	1.536
	SD 0.037	0.096	0.016	0.065	0.061	0.033	0.031	0.061	0.017	0.024	0.063	0.038	0.049	0.085
c-Jun	MW 0.127	0.166	0.156	0.150	0.147	0.127	0.229	0.113	0.120	0.119	0.188	0.129	0.118	0.251
	SD 0.006	0.016	0.003	0.011	0.014	0.007	0.007	0.006	0.004	0.003	0.014	0.006	0.005	0.014
c-Jun pS63 [1]	MW 0.160	0.178	0.196	0.159	0.165	0.193	0.205	0.145	0.152	0.130	0.176	0.162	0.152	0.260
	SD 0.008	0.017	0.004	0.012	0.015	0.010	0.007	0.008	0.003	0.003	0.013	0.008	0.006	0.014
c-Jun pS73	MW 0.144	0.149	0.136	0.171	0.146	0.175	0.122	0.148	0.163	0.144	0.144	0.179	0.145	0.169
	SD 0.007	0.014	0.003	0.013	0.014	0.009	0.004	0.009	0.003	0.004	0.011	0.008	0.006	0.009
Ki-67	MW 0.134	0.207	0.155	0.134	0.175	0.145	0.164	0.155	0.126	0.199	0.141	0.125	0.276	0.345
	SD 0.014	0.030	0.024	0.007	0.018	0.013	0.019	0.016	0.007	0.022	0.014	0.012	0.021	0.012
MDM2	MW 0.214	0.272	0.211	0.277	0.261	0.263	0.290	0.275	0.275	0.274	0.345	0.240	0.233	0.331
	SD 0.011	0.026	0.006	0.021	0.024	0.014	0.009	0.011	0.006	0.007	0.026	0.012	0.009	0.018
MDM2 pS166	MW 0.204	0.226	0.161	0.239	0.172	0.190	0.266	0.225	0.244	0.247	0.188	0.197	0.201	0.287
	SD 0.010	0.021	0.004	0.018	0.016	0.010	0.009	0.007	0.005	0.007	0.014	0.009	0.008	0.016
MEK 1 [1]	MW 0.368	0.300	0.427	0.509	0.260	0.430	0.352	0.290	0.628	0.507	0.420	0.195	0.345	0.608
	SD 0.020	0.024	0.043	0.019	0.058	0.031	0.023	0.056	0.025	0.031	0.034	0.007	0.016	0.019
MEK 2 [2]	MW 0.277	0.329	0.314	0.368	0.223	0.319	0.343	0.332	0.357	0.329	0.353	0.258	0.254	0.369
	SD 0.014	0.026	0.030	0.007	0.033	0.018	0.023	0.039	0.007	0.017	0.028	0.010	0.012	0.010
MEK 1/2 pS217/221	MW 0.761	0.657	0.768	0.763	0.532	0.769	0.720	0.618	0.809	0.848	0.753	0.646	1.528	1.551
	SD 0.038	0.054	0.072	0.018	0.083	0.044	0.047	0.061	0.013	0.047	0.059	0.029	0.069	0.044
c-Met [1]	MW 0.334	0.359	0.344	0.419	0.342	0.400	0.403	0.370	0.357	0.365	0.389	0.303	0.298	0.376
	SD 0.017	0.029	0.032	0.009	0.040	0.023	0.027	0.043	0.007	0.019	0.031	0.010	0.015	0.012
c-Met pY1230/1234/1235	MW 1.932	3.519	2.019	2.933	2.460	3.037	3.830	2.290	2.511	2.161	2.565	2.774	3.309	3.132
	SD 0.097	0.282	0.189	0.049	0.334	0.170	0.252	0.292	0.042	0.111	0.202	0.089	0.150	0.090
c-Met pY1349	MW 0.249	0.323	0.239	0.270	0.184	0.271	0.340	0.239	0.263	0.286	0.362	0.220	0.253	0.284
	SD 0.012	0.026	0.022	0.005	0.027	0.015	0.022	0.031	0.004	0.015	0.029	0.007	0.012	0.009
MKK 3/6 pS189/207	MW 1.218	1.188	1.327	1.294	1.505	1.511	1.534	1.350	1.639	1.277	1.633	1.182	1.725	1.593
	SD 0.061	0.095	0.124	0.022	0.194	0.085	0.101	0.141	0.034	0.068	0.129	0.046	0.090	0.044
MKK 4 pS257/261	MW 0.203	0.096	0.204	0.210	0.081	0.170	0.149	0.193	0.171	0.348	0.151	0.161	0.225	0.350
	SD 0.010	0.009	0.021	0.011	0.019	0.014	0.010	0.031	0.010	0.025	0.012	0.006	0.015	0.012

	B 11T6	B 13T1	B 29T2	B 29T4	B 39T1	B 45T1	B 45T2	B 50T3	B 62T1	B 62T2	B 66T1	B 75T1	H 1T1	H 1T2
MKK 7 pS271/T275	MW SD	0.535 0.027	0.611 0.057	0.576 0.011	0.549 0.073	0.524 0.029	0.545 0.036	0.489 0.054	0.505 0.009	0.462 0.024	0.631 0.050	0.478 0.016	0.496 0.023	0.661 0.018
mTOR	MW SD	0.619 0.035	0.709 0.067	0.586 0.023	0.369 0.066	0.663 0.039	0.620 0.041	0.450 0.047	0.573 0.013	0.534 0.030	0.742 0.064	0.527 0.021	0.458 0.025	1.067 0.036
mTOR pS2448	MW SD	0.671 0.034	0.666 0.058	0.703 0.012	0.447 0.062	0.678 0.038	0.757 0.050	0.526 0.049	0.594 0.010	0.570 0.029	0.596 0.047	0.638 0.020	0.531 0.025	0.854 0.024
mTOR pS2481	MW SD	0.109 0.005	0.108 0.009	0.136 0.002	0.097 0.011	0.117 0.007	0.117 0.008	0.108 0.010	0.114 0.002	0.103 0.003	0.104 0.008	0.102 0.003	0.106 0.005	0.152 0.004
c-Myc [1]	MW SD	0.571 0.029	0.752 0.060	0.773 0.013	0.633 0.091	0.590 0.033	0.867 0.057	0.717 0.075	0.615 0.021	0.566 0.029	0.755 0.059	0.615 0.020	0.550 0.025	1.002 0.037
c-Myc pT58/S62	MW SD	0.091 0.005	0.114 0.009	0.110 0.002	0.102 0.011	0.104 0.006	0.116 0.008	0.123 0.013	0.110 0.002	0.103 0.005	0.123 0.010	0.084 0.003	0.105 0.005	0.122 0.003
p38/MAPK	MW SD	0.930 0.052	0.885 0.074	1.114 0.039	0.672 0.129	0.850 0.051	0.891 0.059	0.797 0.107	1.046 0.035	0.925 0.061	0.953 0.076	0.743 0.035	0.773 0.039	1.256 0.034
p38/MAPK pT180/Y182	MW SD	1.172 0.076	0.889 0.077	1.302 0.123	0.824 0.134	1.045 0.067	1.199 0.081	1.025 0.133	1.229 0.038	1.186 0.085	1.150 0.091	0.983 0.037	1.116 0.056	2.007 0.067
p53 [3]	MW SD	0.966 0.049	1.047 0.084	1.276 0.034	0.711 0.109	1.023 0.067	1.138 0.075	0.927 0.088	1.266 0.041	1.236 0.064	1.221 0.105	0.752 0.030	0.850 0.039	1.314 0.047
p53 pS6	MW SD	0.814 0.043	0.877 0.085	1.257 0.111	1.264 0.112	0.975 0.053	1.084 0.038	1.071 0.029	1.327 0.026	1.215 0.044	1.171 0.090	0.883 0.055	1.147 0.044	1.330 0.073
p53 pS15	MW SD	0.027 0.001	0.042 0.004	0.025 0.001	0.035 0.003	0.033 0.002	0.037 0.002	0.029 0.003	0.037 0.001	0.029 0.001	0.046 0.003	0.038 0.002	0.032 0.001	0.035 0.002
p53 pS20	MW SD	0.034 0.002	0.062 0.006	0.042 0.003	0.065 0.006	0.049 0.003	0.067 0.003	0.054 0.004	0.069 0.001	0.042 0.001	0.073 0.006	0.051 0.002	0.047 0.002	0.044 0.004
p53 pS392	MW SD	0.025 0.001	0.038 0.004	0.027 0.001	0.025 0.002	0.024 0.001	0.043 0.002	0.021 0.003	0.041 0.001	0.024 0.001	0.047 0.003	0.029 0.001	0.028 0.001	0.052 0.003
PAK 1/2/3	MW SD	0.224 0.011	0.274 0.022	0.230 0.022	0.188 0.005	0.232 0.013	0.309 0.020	0.174 0.023	0.195 0.003	0.204 0.010	0.268 0.021	0.230 0.008	0.203 0.009	0.273 0.008
PAK 1/2/3 p S141	MW SD	5.250 0.264	5.605 0.459	6.120 0.179	3.494 0.564	5.191 0.299	9.819 0.646	4.784 0.466	5.079 0.096	5.374 0.321	5.596 0.441	4.225 0.147	4.743 0.221	7.167 0.200
PDK 1	MW SD	0.055 0.003	0.068 0.006	0.055 0.002	0.061 0.006	0.057 0.003	0.060 0.002	0.056 0.004	0.062 0.001	0.061 0.002	0.061 0.005	0.053 0.003	0.055 0.003	0.069 0.004
PDK 1 pS241	MW SD	0.945 0.047	1.218 0.115	1.200 0.026	1.124 0.106	1.027 0.055	1.178 0.040	1.033 0.038	1.299 0.024	1.347 0.033	1.265 0.094	1.108 0.070	1.155 0.044	1.339 0.074
PI3K p85	MW SD	0.428 0.021	0.431 0.035	0.432 0.041	0.363 0.052	0.430 0.024	0.561 0.037	0.383 0.048	0.506 0.008	0.447 0.023	0.531 0.042	0.352 0.011	0.386 0.018	0.611 0.018
PI3K p85 pY468 / p65 pY199	MW SD	1.369 0.069	1.652 0.135	1.596 0.149	0.970 0.172	1.730 1.103	2.083 1.138	1.656 0.152	1.915 0.033	1.735 0.106	1.575 0.124	1.405 0.057	1.652 0.076	2.496 0.085
PKA C (α Kin. Ue.)	MW SD	0.437 0.026	0.402 0.040	0.439 0.018	0.354 0.032	0.393 0.028	0.459 0.016	0.458 0.014	0.550 0.014	0.434 0.024	0.498 0.043	0.310 0.018	0.362 0.018	0.633 0.047
PKA C (α Kin. Ue.) pT197	MW SD	0.052 0.003	0.064 0.006	0.048 0.002	0.045 0.004	0.041 0.002	0.045 0.002	0.052 0.004	0.054 0.001	0.037 0.001	0.055 0.004	0.051 0.003	0.043 0.002	0.058 0.003
PKA C (α & β Kin. Ue.) pT197	MW SD	0.888 0.044	0.940 0.088	0.842 0.019	0.629 0.061	0.734 0.038	0.867 0.028	0.822 0.019	0.980 0.018	0.657 0.016	1.006 0.075	0.903 0.043	0.767 0.029	0.895 0.050
PTEN	MW SD	3.174 0.161	3.503 0.282	3.361 0.314	2.434 0.448	2.776 1.455	3.282 0.216	2.653 0.372	3.135 0.051	2.859 0.153	3.438 0.271	3.015 0.102	2.575 0.117	3.305 0.177
PTEN pS380	MW SD	1.268 0.064	1.529 0.123	1.376 0.130	1.074 0.157	1.287 0.074	1.925 0.127	1.184 0.134	1.533 0.033	1.335 0.086	1.606 0.127	1.246 0.048	1.226 0.057	1.683 0.046

	B 11T6	B 13T1	B 29T2	B 29T4	B 39T1	B 45T1	B 45T2	B 50T3	B 62T1	B 62T2	B 66T1	B 75T1	H 1T1	H 1T2
b-Raf	MW 0.962	1.061	1.352	1.575	0.917	1.266	1.336	1.245	1.723	1.515	1.576	0.819	1.220	1.721
	SD 0.055	0.087	0.128	0.037	0.135	0.071	0.088	0.118	0.043	0.079	0.125	0.042	0.058	0.054
b-Raf pS445	MW 0.136	0.152	0.160	0.167	0.128	0.178	0.160	0.137	0.157	0.170	0.159	0.135	0.158	0.186
	SD 0.007	0.015	0.015	0.005	0.023	0.011	0.011	0.015	0.004	0.020	0.013	0.011	0.008	0.005
c-Raf	MW 0.847	1.012	1.008	1.021	0.689	1.016	1.064	0.825	1.084	0.919	0.954	0.793	1.000	1.423
	SD 0.044	0.082	0.096	0.020	0.083	0.060	0.072	0.081	0.024	0.053	0.078	0.029	0.047	0.041
c-Raf pS269	MW 2.093	1.977	2.072	2.256	1.031	2.310	2.239	1.253	2.164	1.920	2.011	1.848	1.967	2.473
	SD 0.105	0.162	0.194	0.047	0.273	0.132	0.152	0.135	0.069	0.105	0.159	0.097	0.093	0.078
c-Raf pS338	MW 0.664	0.881	0.740	0.842	0.599	1.001	0.981	0.670	0.686	0.793	0.788	0.631	0.759	1.262
	SD 0.033	0.071	0.069	0.015	0.104	0.056	0.064	0.072	0.011	0.042	0.062	0.021	0.034	0.035
Ha-Ras [1]	MW 1.512	1.678	1.625	1.646	1.363	1.587	1.925	1.395	1.629	1.520	1.569	1.456	1.570	2.435
	SD 0.076	0.135	0.152	0.031	0.196	0.089	0.127	0.149	0.034	0.085	0.126	0.053	0.073	0.067
Rb	MW 0.182	0.182	0.109	0.268		0.140	0.161	0.186	0.157	0.125	0.229	0.193	0.143	0.133
	SD 0.010	0.018	0.010	0.020		0.007	0.008	0.005	0.009	0.007	0.018	0.010	0.008	0.014
Rb pS807/811	MW 0.015	0.020	0.012	0.022	0.018	0.016	0.019	0.015	0.020	0.020	0.021	0.020	0.014	0.013
	SD 0.001	0.002	0.000	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001
RhBG	MW 0.111	0.134	0.055	0.172	0.140	0.146	0.113	0.064	0.141	0.085	0.163	0.176	0.060	0.005
	SD 0.006	0.013	0.012	0.016	0.013	0.009	0.004	0.007	0.003	0.003	0.014	0.008	0.009	0.004
RSK 1/2/3	MW 0.248	0.223	0.303	0.309	0.125	0.235	0.332	0.162	0.414	0.316	0.284	0.198	0.294	0.541
	SD 0.015	0.023	0.034	0.021	0.026	0.028	0.026	0.016	0.019	0.068	0.023	0.011	0.020	0.025
RSK 1 pS380	MW 0.666	0.526	0.688	0.721	0.332	0.625	0.567	0.466	0.774	0.707	0.476	0.526	0.937	1.327
	SD 0.036	0.044	0.067	0.045	0.061	0.062	0.037	0.055	0.016	0.131	0.039	0.031	0.057	0.042
STAT 1	MW 1.066	0.934	0.851	1.339	0.697	0.994	1.018	0.778	1.287	1.215	0.903	0.838	1.239	1.432
	SD 0.053	0.075	0.079	0.023	0.083	0.055	0.067	0.079	0.021	0.063	0.071	0.027	0.056	0.039
STAT 1 pY701	MW 0.252	0.310	0.279	0.387	0.239	0.346	0.336	0.282	0.396	0.344	0.308	0.265	0.285	0.341
	SD 0.013	0.025	0.026	0.007	0.023	0.019	0.022	0.030	0.008	0.017	0.024	0.009	0.013	0.009
STAT 3 [1]	MW 1.248	1.113	1.153	1.759	0.846	1.172	1.415	1.973	1.457	1.061	2.087	1.256	1.005	1.616
	SD 0.063	0.105	0.027	0.167	0.077	0.065	0.049	0.664	0.026	0.029	0.161	0.064	0.038	0.089
STAT 3 [2]	MW 2.223	2.172	2.159	2.043	1.691	1.784	1.903	2.186	2.599	2.086	2.042	1.906	2.335	3.332
	SD 0.111	0.204	0.049	0.152	0.151	0.098	0.063	0.089	0.086	0.105	0.151	0.090	0.091	0.183
STAT 3 pY705 [2]	MW 3.072	3.128	3.599	4.224	2.950	3.271	2.924	3.616	4.513	5.734	3.394	3.259	3.467	3.551
	SD 0.154	0.295	0.079	0.319	0.275	0.169	0.095	0.145	0.083	0.181	0.252	0.166	0.132	0.195
STAT 3 pS727	MW 0.309	0.314	0.307	0.348	0.292	0.307	0.320	0.369	0.411	0.367	0.349	0.285	0.320	0.408
	SD 0.016	0.030	0.007	0.027	0.031	0.017	0.010	0.011	0.010	0.011	0.026	0.016	0.012	0.022
STAT 5	MW 0.183	0.231	0.186	0.254	0.188	0.207	0.265	0.234	0.227	0.216	0.248	0.238	0.122	0.260
	SD 0.012	0.022	0.005	0.019	0.019	0.011	0.009	0.009	0.004	0.004	0.019	0.012	0.005	0.014
STAT 5 pY694	MW 0.101	0.122	0.163	0.207	0.117	0.119	0.146	0.132	0.163	0.152	0.125	0.152	0.080	0.114
	SD 0.006	0.012	0.004	0.015	0.011	0.006	0.006	0.008	0.005	0.009	0.009	0.007	0.005	0.007
STAT 6	MW 1.454	0.755	1.407	1.855	1.150	1.387	1.000	1.268	1.884	1.612	1.076	1.592	1.358	2.729
	SD 0.163	0.086	0.108	0.221	0.102	0.148	0.058	0.044	0.141	0.198	0.097	0.157	0.116	0.172



	H 2T4	H 8T1	H 11T1	H 16T5	H 21T1	H 21T3	H 33T1	H 37T7	H 37T10	H 38T1	H 39T2	H 55T4	H 61T4	H 66T3
14-3-3 ζ δ	MW 0.184 SD 0.015	0.245 0.021	0.283 0.014	0.216 0.019	0.206 0.014	0.075 0.010	0.198 0.023	0.185 0.018	0.251 0.006	0.116 0.024	0.141 0.008	0.166 0.007	0.191 0.007	0.111 0.008
AFP	MW 0.057 SD 0.003	0.042 0.004	0.196 0.005	0.072 0.003	0.229 0.016	0.031 0.003	0.047 0.005	0.078 0.008	0.081 0.002	0.026 0.004	0.019 0.001	0.022 0.003	0.030 0.001	0.024 0.001
Akt [1]	MW 1.215 SD 0.083	0.933 0.094	1.022 0.082	0.701 0.051	0.642 0.046	0.856 0.088	0.809 0.091	0.982 0.095	1.067 0.047	1.283 0.174	0.896 0.079	0.968 0.049	0.893 0.071	0.690 0.064
Akt [2]	MW 0.358 SD 0.022	0.258 0.026	0.268 0.010	0.315 0.015	0.244 0.027	0.233 0.024	0.333 0.036	0.307 0.030	0.283 0.006	0.312 0.042	0.340 0.022	0.310 0.025	0.309 0.016	0.325 0.017
Akt pT308	MW 1.206 SD 0.071	0.879 0.073	0.822 0.020	0.724 0.023	0.806 0.061	0.590 0.061	0.747 0.073	1.005 0.092	0.982 0.009	1.409 0.187	0.659 0.068	0.723 0.042	0.559 0.077	0.459 0.071
Akt pS473	MW 0.075 SD 0.005	0.082 0.013	0.090 0.005	0.073 0.004	0.443 0.083	0.078 0.008	0.095 0.013	0.101 0.013	0.124 0.008	0.110 0.017	0.068 0.006	0.123 0.014	0.077 0.008	0.071 0.006
Akt Sub. pS/T	MW 3.793 SD 0.221	3.725 0.308	4.102 0.100	3.820 0.119	3.344 0.226	2.442 0.255	4.086 0.397	4.445 0.406	4.530 0.037	4.362 0.578	3.795 0.207	3.507 0.186	4.555 0.095	3.183 0.150
AMPK α	MW 0.138 SD 0.008	0.117 0.010	0.123 0.003	0.117 0.005	0.143 0.010	0.041 0.004	0.166 0.016	0.115 0.011	0.119 0.001	0.128 0.017	0.127 0.007	0.127 0.006	0.107 0.002	0.117 0.008
AMIPK α pT172	MW 1.299 SD 0.077	1.437 0.118	1.012 0.025	1.677 0.063	1.143 0.078	0.585 0.066	2.063 0.209	1.647 0.151	1.470 0.013	2.261 0.300	1.705 0.099	1.004 0.052	1.848 0.044	1.367 0.070
APC	MW 0.038 SD 0.002	0.054 0.006	0.073 0.003	0.054 0.001	0.028 0.002	0.062 0.003	0.047 0.003	0.044 0.002	0.058 0.002	0.036 0.003	0.035 0.001	0.048 0.007	0.034 0.002	0.038 0.001
ATM/ATR Sub. pS/T	MW 0.815 SD 0.056	0.752 0.098	0.843 0.058	0.620 0.044	0.613 0.064	0.666 0.068	0.689 0.079	0.665 0.087	0.715 0.054	0.820 0.120	0.771 0.076	0.689 0.065	0.704 0.057	0.647 0.050
Bad	MW 0.159 SD 0.007	0.263 0.029	0.170 0.008	0.257 0.008	0.177 0.010	0.276 0.021	0.289 0.023	0.240 0.011	0.239 0.009	0.211 0.015	0.151 0.004	0.138 0.004	0.209 0.011	0.216 0.008
Bad pS112	MW 0.216 SD 0.014	0.062 0.014	0.361 0.018	0.126 0.009	0.152 0.015	0.062 0.007	0.154 0.018	0.167 0.019	0.250 0.027	0.188 0.028		0.160 0.014	0.116 0.007	0.159 0.014
Bax	MW 1.645 SD 0.076	1.025 0.114	1.412 0.066	1.195 0.032	0.922 0.053	0.888 0.037	0.866 0.053	1.461 0.065	1.372 0.049	1.096 0.097	1.437 0.033	0.957 0.082	1.014 0.051	1.165 0.034
E-Cadherin	MW 0.783 SD 0.036	1.001 0.111	1.853 0.086	1.099 0.029	0.788 0.047	1.323 0.055	1.065 0.064	1.208 0.045	1.210 0.043	1.340 0.097	1.489 0.038	1.316 0.095	1.576 0.082	1.068 0.031
N-Cadherin [2]	MW 0.704 SD 0.041	0.256 0.024	0.424 0.012	0.261 0.009	0.387 0.030	0.189 0.019	0.279 0.027	0.326 0.030	0.383 0.004	0.282 0.038	0.163 0.015	0.322 0.016	0.261 0.006	0.357 0.017
Caspase 3 gD175	MW 0.072 SD 0.004	0.092 0.008	0.106 0.003	0.085 0.003	0.065 0.005	0.057 0.006	0.083 0.008	0.077 0.007	0.091 0.001	0.065 0.009	0.079 0.004	0.069 0.006	0.064 0.002	0.060 0.003
Caspase 3	MW 1.272 SD 0.076	1.587 0.132	1.715 0.067	1.514 0.061	1.330 0.093	0.518 0.060	1.830 0.179	1.656 0.151	2.038 0.026	1.544 0.205	1.714 0.094	1.169 0.048	1.343 0.030	1.240 0.058
Caspase 7 gD198	MW 0.055 SD 0.004	0.054 0.006	0.068 0.004	0.040 0.002	0.044 0.004	0.051 0.003	0.042 0.004	0.041 0.003	0.061 0.004	0.046 0.006	0.042 0.003	0.048 0.004	0.041 0.004	0.045 0.001
Caspase 7	MW 0.437 SD 0.020	0.451 0.050	0.429 0.020	0.384 0.010	0.464 0.025	0.282 0.013	0.469 0.028	0.393 0.015	0.403 0.014	0.484 0.035	0.426 0.011	0.367 0.049	0.463 0.024	0.445 0.014
β-Cat. [3]	MW 3.273 SD 0.218	3.326 0.273	1.444 0.035	2.270 0.084	1.555 0.107	1.347 0.139	2.795 0.280	2.378 0.223	2.466 0.089	4.405 0.588	3.032 0.172	1.859 0.094	3.600 0.090	2.249 0.108
β-Cat. pS45	MW 0.041 SD 0.002	0.056 0.005	0.046 0.001	0.048 0.001	0.033 0.003	0.064 0.007	0.043 0.004	0.052 0.005	0.045 0.000	0.086 0.012	0.045 0.002	0.043 0.003	0.042 0.001	0.033 0.002
β-Cat. pT41/S45	MW 0.064 SD 0.004	0.083 0.007	0.078 0.002	0.071 0.002	0.055 0.004	0.072 0.008	0.074 0.007	0.076 0.007	0.069 0.001	0.099 0.013	0.088 0.005	0.073 0.004	0.089 0.002	0.060 0.003
β-Cat. pS33/37/T41	MW 0.292 SD 0.017	0.383 0.032	0.327 0.008	0.363 0.011	0.361 0.025	0.138 0.014	0.494 0.048	0.281 0.026	0.319 0.003	0.220 0.029	0.428 0.023	0.277 0.019	0.340 0.007	0.355 0.017

	H 2T4	H 8T1	H 11T1	H 16T5	H 21T1	H 21T3	H 33T1	H 37T7	H 37T10	H 38T1	H 39T2	H 55T4	H 61T4	H 66T3
CK 1 α	MW 0.061	0.036	0.047	0.051	0.049	0.027	0.063	0.063	0.051	0.062	0.046	0.031	0.042	0.037
	SD	0.004	0.002	0.002	0.003	0.001	0.004	0.002	0.005	0.005	0.001	0.005	0.002	0.001
CK 1 δ	MW	27.890	32.388	30.110	31.643	12.467	31.226	28.741	29.587	32.050	32.459	27.384	35.934	42.676
	SD	1.830	2.860	1.290	2.336	4.480	3.055	3.701	1.269	4.249	2.627	1.819	2.063	2.554
CK 2 α	MW	1.053	1.030	0.979	0.968	0.519	1.100	0.974	1.121	1.235	0.964	0.897	0.985	0.945
	SD	0.050	0.113	0.045	0.053	0.027	0.071	0.040	0.042	0.090	0.025	0.078	0.053	0.035
CREB	MW	1.046	0.877	0.775	0.685	0.619	0.743	0.819	0.873	1.455	0.688	0.722	0.634	0.662
	SD	0.061	0.081	0.019	0.021	0.064	0.072	0.075	0.007	0.193	0.039	0.050	0.014	0.031
CREB pS133 [1]	MW	0.116	0.090	0.104	0.087	0.058	0.075	0.090	0.096	0.075	0.091	0.089	0.109	0.085
	SD	0.007	0.008	0.003	0.003	0.006	0.007	0.008	0.001	0.010	0.005	0.008	0.002	0.004
CREB pS133 [2]	MW	0.188	0.179	0.304	0.247	0.137	0.232	0.293	0.251	0.163	0.216	0.203	0.289	0.216
	SD	0.011	0.015	0.007	0.010	0.014	0.023	0.027	0.002	0.022	0.012	0.015	0.007	0.014
Cyclin D1	MW	0.724	1.176	0.991	0.829	0.554	1.167	1.233	1.136	1.528	1.283	1.020	1.536	1.039
	SD	0.042	0.097	0.025	0.026	0.057	0.113	0.113	0.099	0.203	0.071	0.044	0.032	0.049
Cyclin E2	MW	0.181	0.104	0.130	0.100	0.062	0.095	0.107	0.127	0.132	0.092	0.098	0.099	0.079
	SD	0.011	0.009	0.003	0.003	0.006	0.009	0.010	0.001	0.017	0.005	0.007	0.002	0.004
EGFR [2]	MW	0.076	0.055	0.083	0.060	0.085	0.093	0.079	0.099	0.106	0.065	0.070	0.111	0.092
	SD	0.004	0.006	0.004	0.002	0.003	0.006	0.003	0.004	0.008	0.002	0.005	0.006	0.003
EGFR pY845	MW	0.195	0.189	0.192	0.178	0.138	0.207	0.176	0.193	0.226	0.192	0.156	0.188	0.189
	SD	0.011	0.023	0.010	0.005	0.006	0.012	0.008	0.009	0.017	0.006	0.021	0.011	0.006
EGFR pY1173	MW	0.552	0.376	0.393	0.472	0.188	0.599	0.423	0.392	0.417	0.289	0.430	0.422	0.539
	SD	0.032	0.036	0.019	0.015	0.020	0.059	0.039	0.005	0.056	0.030	0.034	0.010	0.028
Eik-1	MW	0.691	0.591	0.456	0.535	0.239	0.626	0.506	0.542	0.700	0.618	0.458	0.620	0.674
	SD	0.032	0.061	0.021	0.016	0.010	0.039	0.020	0.019	0.051	0.017	0.025	0.032	0.022
Eik-1 pS383 [1]	MW	1.332	0.854	1.160	0.952	0.609	0.800	1.116	1.179	1.234	1.020	0.715	1.155	0.837
	SD	0.062	0.094	0.054	0.032	0.026	0.050	0.045	0.042	0.091	0.030	0.068	0.062	0.030
Eik-1 pS383 [2]	MW	1.098	0.926	1.186	0.920	0.850	1.013	0.930	1.013	0.991	0.902	0.956	0.918	0.790
	SD	0.064	0.107	0.064	0.030	0.035	0.064	0.041	0.040	0.095	0.044	0.077	0.067	0.024
Erk 1	MW	0.661	0.591	0.534	0.437	0.271	0.509	0.544	0.526	0.699	0.509	0.449	0.567	0.444
	SD	0.039	0.045	0.013	0.014	0.028	0.050	0.050	0.004	0.093	0.028	0.027	0.012	0.021
Erk 2	MW	0.981	0.752	0.826	0.705	0.483	0.830	0.822	0.775	0.844	0.858	0.764	0.805	0.808
	SD	0.057	0.064	0.020	0.022	0.050	0.081	0.075	0.010	0.112	0.047	0.045	0.017	0.038
Erk 1/2	MW	10.604	9.780	10.862	8.937	3.838	9.704	9.185	10.263	11.777	8.756	7.505	9.418	8.396
	SD	0.716	0.821	0.296	0.506	0.416	1.154	0.877	0.342	1.617	0.579	0.370	0.367	0.565
Erk 1/2 pT202/Y204	MW	2.215	4.144	1.890	3.979	1.760	3.500	4.067	3.931	5.212	4.279	2.128	3.556	2.727
	SD	0.135	0.342	0.048	0.147	0.185	0.349	0.378	0.043	0.696	0.249	0.107	0.104	0.137
c-Fos	MW	0.145	0.135	0.118	0.108	0.079	0.135	0.124	0.139	0.163	0.140	0.110	0.102	0.119
	SD	0.007	0.015	0.006	0.003	0.003	0.008	0.005	0.005	0.012	0.003	0.009	0.005	0.004
Glutaminsynthetase	MW	157.863	0.350	0.097	0.303	0.431	0.123	0.172	1.344	0.906	0.078	0.260	0.154	1.331
	SD	108.683	0.078	0.103	0.017	0.020	0.041	0.141	0.836	0.078	0.020	0.043	0.010	0.684
Gpr49 P2 T1	MW	1.787	1.796	1.887	1.152	0.875	1.356	1.365	1.787	1.538	2.053	1.707	2.246	1.434
	SD	0.104	0.147	0.047	0.037	0.092	0.132	0.124	0.017	0.204	0.113	0.070	0.048	0.067
GSK3 β	MW	0.687	0.717	0.602	0.668	0.448	0.877	0.716	0.789	0.785	0.789	0.670	0.682	0.654
	SD	0.033	0.084	0.031	0.020	0.018	0.053	0.032	0.033	0.062	0.029	0.071	0.041	0.022
GSK3 β pS9	MW	0.237	0.321	0.270	0.300	0.141	0.463	0.328	0.366	0.362	0.362	0.225	0.304	0.245
	SD	0.011	0.035	0.013	0.008	0.006	0.028	0.013	0.013	0.026	0.010	0.028	0.016	0.008
HGF	MW	0.500	0.535	0.434	0.454	0.228	0.560	0.482	0.456	0.614	0.610	0.430	0.509	0.461
	SD	0.023	0.059	0.020	0.012	0.010	0.035	0.018	0.016	0.044	0.014	0.035	0.026	0.016

	H 2T4	H 8T1	H 11T1	H 16T5	H 21T1	H 21T3	H 33T1	H 37T7	H 37T10	H 38T1	H 39T2	H 55T4	H 61T4	H 66T3
Histon H3	MW 13.749	6.648	12.728	6.865	5.153	5.018	9.774	9.416	9.274	11.330	8.681	7.576	11.154	12.053
	SD	0.637	0.613	0.195	0.282	0.284	0.600	0.451	0.393	0.833	0.343	0.816	0.684	0.369
Histon H3 ak9	MW 0.010	0.006	0.010	0.007	0.005	0.001	0.001	0.001	0.004	0.013	0.009	0.004	0.001	0.000
	SD	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000	0.002	0.000	0.000
Histon H3 pS10	MW 0.015	0.003	0.015	0.013	0.011	0.006	0.009	0.005	0.016	0.001	0.001	0.008	0.006	0.004
	SD	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000
Histon H3 ak18	MW 0.756	0.039	0.121	0.109	0.031	0.022	0.283	0.212	0.052	0.129	0.160	0.022	0.081	0.242
	SD	0.072	0.006	0.006	0.002	0.002	0.069	0.008	0.002	0.015	0.022	0.006	0.046	0.099
Histon H3 ak23	MW 0.147	0.156	0.137	0.138	0.129	0.104	0.159	0.139	0.152	0.162	0.142	0.159	0.144	0.141
	SD	0.007	0.019	0.007	0.006	0.004	0.010	0.008	0.009	0.013	0.007	0.012	0.009	0.006
Histon H3 ak9 & pS10	MW 0.006	0.015	0.015	0.017	0.005	0.008	0.010	0.016	0.029	0.020	0.006	0.006	0.008	0.004
	SD	0.000	0.002	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001
IkB	MW 0.011	0.005	0.017	0.014	0.014	0.016	0.010	0.010	0.015	0.006	0.007	0.026	0.008	0.008
	SD	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001
IkB pS32	MW 0.414	0.446	0.411	0.378	0.418	0.261	0.437	0.410	0.469	0.503	0.416	0.404	0.388	0.409
	SD	0.019	0.049	0.019	0.013	0.011	0.030	0.016	0.017	0.036	0.010	0.029	0.020	0.017
JNK/SAPK	MW 0.283	0.249	0.379	0.176	0.463	0.175	0.175	0.234	0.275	0.322	0.218	0.226	0.236	0.300
	SD	0.017	0.025	0.011	0.006	0.018	0.017	0.021	0.008	0.044	0.017	0.020	0.008	0.014
JNK/SAPK pT183/Y185	MW 1.317	1.325	1.307	1.231	0.700	0.634	1.281	1.464	1.340	1.695	1.207	0.912	1.089	0.880
	SD	0.077	0.109	0.033	0.049	0.066	0.129	0.136	0.023	0.227	0.075	0.056	0.032	0.051
c-Jun	MW 0.162	0.131	0.255	0.161	0.204	0.143	0.166	0.161	0.174	0.204	0.132	0.129	0.131	0.154
	SD	0.009	0.011	0.009	0.005	0.015	0.016	0.015	0.002	0.027	0.007	0.008	0.005	0.007
c-Jun pS63 [1]	MW 0.207	0.170	0.203	0.201	0.203	0.117	0.203	0.199	0.188	0.238	0.189	0.121	0.162	0.179
	SD	0.012	0.014	0.005	0.006	0.014	0.020	0.018	0.002	0.032	0.010	0.017	0.003	0.008
c-Jun pS73	MW 0.176	0.149	0.160	0.171	0.131	0.083	0.189	0.165	0.137	0.174	0.177	0.146	0.126	0.147
	SD	0.010	0.013	0.004	0.005	0.009	0.018	0.015	0.001	0.023	0.010	0.013	0.003	0.007
Ki-67	MW 0.139	0.209	0.162	0.135	0.176	0.283	0.133	0.163	0.242	0.293	0.216	0.215	0.190	0.146
	SD	0.020	0.027	0.025	0.019	0.030	0.014	0.012	0.009	0.022	0.011	0.011	0.011	0.005
MDM2	MW 0.302	0.261	0.303	0.246	0.279	0.178	0.281	0.252	0.229	0.331	0.272	0.246	0.290	0.280
	SD	0.018	0.024	0.008	0.008	0.020	0.027	0.024	0.007	0.044	0.016	0.017	0.008	0.014
MDM2 pS166	MW 0.314	0.259	0.242	0.200	0.199	0.155	0.188	0.225	0.253	0.286	0.228	0.212	0.232	0.176
	SD	0.018	0.021	0.006	0.006	0.013	0.018	0.021	0.002	0.038	0.012	0.014	0.005	0.008
MEK 1 [1]	MW 0.359	0.417	0.209	0.326	0.541	0.103	0.360	0.316	0.360	0.428	0.300	0.337	0.312	0.445
	SD	0.017	0.046	0.010	0.014	0.004	0.025	0.013	0.013	0.031	0.007	0.048	0.016	0.023
MEK 2 [2]	MW 0.288	0.292	0.369	0.252	0.284	0.192	0.367	0.308	0.282	0.452	0.214	0.290	0.300	0.295
	SD	0.013	0.032	0.017	0.007	0.010	0.022	0.012	0.010	0.033	0.005	0.024	0.015	0.009
MEK 1/2 pS217/221	MW 0.817	1.264	0.887	1.861	0.683	0.730	1.095	2.090	2.098	1.358	1.490	0.840	1.808	1.231
	SD	0.038	0.140	0.041	0.056	0.037	0.066	0.081	0.083	0.100	0.034	0.062	0.094	0.036
c-Met [1]	MW 0.456	0.359	0.343	0.316	0.357	0.244	0.363	0.311	0.401	0.393	0.352	0.349	0.336	0.364
	SD	0.021	0.041	0.016	0.010	0.026	0.022	0.012	0.014	0.029	0.015	0.027	0.019	0.011
c-Met pY1230/1234/1235	MW 4.533	2.250	3.671	2.290	1.973	1.795	2.901	2.454	2.536	3.199	2.158	2.376	2.334	2.806
	SD	0.209	0.257	0.171	0.061	0.120	0.174	0.094	0.092	0.232	0.064	0.231	0.127	0.082
c-Met pY1349	MW 0.296	0.226	0.332	0.227	0.299	0.144	0.278	0.255	0.286	0.214	0.243	0.217	0.264	0.232
	SD	0.014	0.025	0.016	0.006	0.017	0.006	0.017	0.010	0.011	0.006	0.017	0.013	0.007
MKK 3/6 pS189/207	MW 1.437	1.354	1.301	1.180	1.520	0.712	1.395	1.441	1.533	1.530	1.523	1.290	1.363	1.225
	SD	0.066	0.149	0.060	0.032	0.083	0.085	0.055	0.054	0.111	0.035	0.085	0.069	0.039
MKK 4 pS257/T261	MW 0.264	0.222	0.152	0.332	0.228	0.154	0.184	0.432	0.368	0.279	0.250	0.129	0.346	0.276
	SD	0.013	0.024	0.007	0.016	0.013	0.015	0.023	0.014	0.021	0.010	0.014	0.021	0.014

	H 2T4	H 8T1	H 11T1	H 16T5	H 21T1	H 21T3	H 33T1	H 37T7	H 37T10	H 38T1	H 39T2	H 55T4	H 61T4	H 66T3
MKK 7 pS271/T275	MW SD	0.593 0.027	0.529 0.025	0.548 0.015	0.667 0.038	0.314 0.013	0.629 0.038	0.602 0.023	0.553 0.020	0.650 0.047	0.540 0.013	0.442 0.039	0.448 0.023	0.485 0.015
mTOR	MW SD	0.991 0.047	0.636 0.030	0.679 0.031	0.547 0.030	0.363 0.020	0.861 0.064	0.729 0.037	0.740 0.026	0.979 0.072	0.719 0.019	0.332 0.031	0.704 0.038	0.612 0.030
mTOR pS2448	MW SD	0.709 0.034	0.816 0.038	0.669 0.019	0.628 0.041	0.470 0.020	0.775 0.046	0.743 0.029	0.789 0.028	0.807 0.058	0.580 0.020	0.585 0.067	0.694 0.039	0.553 0.016
mTOR pS2481	MW SD	0.129 0.006	0.111 0.005	0.112 0.003	0.102 0.007	0.069 0.003	0.116 0.007	0.116 0.005	0.128 0.005	0.151 0.011	0.116 0.003	0.103 0.008	0.105 0.005	0.099 0.003
c-Myc [1]	MW SD	0.815 0.038	0.657 0.034	0.653 0.018	0.638 0.046	0.412 0.020	0.679 0.041	0.572 0.022	0.758 0.029	0.908 0.068	0.589 0.022	0.604 0.044	0.585 0.043	0.506 0.024
c-Myc pT58/S62	MW SD	0.139 0.006	0.103 0.006	0.089 0.002	0.135 0.008	0.086 0.004	0.104 0.006	0.095 0.004	0.122 0.004	0.138 0.010	0.129 0.003	0.044 0.010	0.109 0.006	0.109 0.003
p38/MAPK	MW SD	1.131 0.057	0.927 0.046	0.949 0.028	0.938 0.059	0.355 0.016	1.016 0.084	1.031 0.040	1.014 0.038	1.292 0.096	1.013 0.032	0.634 0.077	0.954 0.055	0.910 0.040
p38/MAPK pT180/Y182	MW SD	1.682 0.079	1.135 0.125	1.248 0.040	1.121 0.062	0.457 0.019	1.507 0.109	1.450 0.063	1.324 0.049	1.952 0.146	1.445 0.058	0.709 0.085	1.298 0.071	1.356 0.061
p53 [3]	MW SD	0.966 0.045	1.222 0.034	1.044 0.028	1.122 0.061	0.541 0.023	1.180 0.071	0.967 0.037	1.193 0.045	1.146 0.084	1.077 0.028	0.792 0.071	1.318 0.071	1.220 0.037
p53 pS6	MW SD	1.181 0.069	2.063 0.027	1.115 0.039	0.996 0.068	0.520 0.055	1.229 0.121	1.140 0.104	1.151 0.009	1.332 0.178	1.216 0.066	0.406 0.046	1.353 0.028	1.080 0.051
p53 pS15	MW SD	0.038 0.002	0.036 0.004	0.037 0.001	0.041 0.003	0.022 0.002	0.037 0.004	0.032 0.003	0.035 0.001	0.026 0.003	0.034 0.002	0.037 0.003	0.034 0.001	0.028 0.001
p53 pS20	MW SD	0.059 0.004	0.061 0.002	0.048 0.002	0.048 0.004	0.029 0.003	0.061 0.006	0.045 0.004	0.060 0.001	0.036 0.005	0.060 0.003	0.086 0.004	0.044 0.001	0.053 0.002
p53 pS392	MW SD	0.024 0.002	0.029 0.002	0.034 0.001	0.026 0.002	0.025 0.003	0.034 0.003	0.040 0.004	0.038 0.001	0.042 0.006	0.033 0.002	0.033 0.003	0.036 0.001	0.018 0.001
PAK 1/2/3	MW SD	0.280 0.013	0.218 0.025	0.215 0.006	0.192 0.011	0.189 0.008	0.225 0.014	0.244 0.009	0.253 0.009	0.255 0.019	0.234 0.006	0.188 0.023	0.201 0.010	0.236 0.007
PAK 1/2/3 p S141	MW SD	7.231 0.334	5.433 0.598	7.143 0.337	5.663 0.320	2.325 0.098	6.417 0.393	5.983 0.237	6.709 0.245	9.189 0.664	5.463 0.128	4.494 0.346	5.295 0.269	4.328 0.132
PDK 1	MW SD	0.060 0.004	0.055 0.002	0.061 0.002	0.042 0.004	0.046 0.005	0.062 0.006	0.064 0.006	0.063 0.001	0.072 0.010	0.058 0.003	0.063 0.005	0.058 0.002	0.052 0.003
PDK 1 pS241	MW SD	1.191 0.069	1.448 0.119	1.395 0.034	1.123 0.076	0.831 0.086	1.264 0.123	1.289 0.118	1.343 0.012	1.476 0.196	1.210 0.066	1.151 0.055	1.368 0.028	1.052 0.050
P13K p85	MW SD	0.499 0.023	0.442 0.049	0.496 0.023	0.571 0.036	0.241 0.010	0.438 0.027	0.436 0.016	0.542 0.020	0.584 0.043	0.406 0.009	0.389 0.040	0.399 0.020	0.419 0.012
P13K p85 pY458 / p55 pY199	MW SD	1.889 0.087	1.762 0.195	1.907 0.089	1.428 0.078	0.859 0.038	1.629 0.107	1.825 0.069	1.877 0.071	2.362 0.182	1.798 0.041	1.398 0.095	1.903 0.102	1.578 0.046
PKA C (α Kin. Ue.)	MW SD	0.698 0.042	0.552 0.051	0.479 0.023	0.560 0.042	0.159 0.017	0.478 0.057	0.460 0.046	0.465 0.018	0.558 0.079	0.469 0.034	0.374 0.018	0.399 0.019	0.434 0.029
PKA C (α Kin. Ue.) pT197	MW SD	0.054 0.003	0.055 0.002	0.066 0.002	0.059 0.004	0.031 0.003	0.051 0.005	0.064 0.006	0.059 0.002	0.054 0.007	0.051 0.003	0.041 0.004	0.056 0.001	0.031 0.002
PKA C (α & β Kin. Ue.) pT197	MW SD	1.020 0.059	1.032 0.085	0.945 0.028	0.655 0.045	0.494 0.045	1.013 0.098	0.940 0.086	0.932 0.007	1.064 0.141	0.842 0.046	0.865 0.036	0.909 0.019	0.625 0.029
PTEN	MW SD	2.730 0.155	3.067 0.347	2.835 0.075	0.869 0.049	1.315 0.065	2.959 0.178	2.758 0.143	3.286 0.122	3.375 0.273	2.992 0.108	2.591 0.384	2.741 0.150	2.819 0.084
PTEN pS380	MW SD	1.292 0.060	1.332 0.147	1.292 0.077	0.769 0.043	0.688 0.032	1.458 0.092	1.282 0.048	1.577 0.057	1.570 0.113	1.413 0.032	1.211 0.132	1.260 0.064	1.307 0.044

	H 2T4	H 8T1	H 11T1	H 16T5	H 21T1	H 21T3	H 33T1	H 37T7	H 37T10	H 38T1	H 39T2	H 55T4	H 61T4	H 66T3
b-Raf	MW 1.310	1.572	1.169	1.299	1.351	0.555	1.560	1.207	1.600	1.881	1.514	0.997	1.561	1.448
	SD 0.060	0.173	0.056	0.041	0.076	0.023	0.099	0.045	0.057	0.136	0.039	0.078	0.092	0.046
b-Raf pS445	MW 0.175	0.200	0.166	0.158	0.180	0.083	0.197	0.173	0.173	0.220	0.199	0.108	0.170	0.181
	SD 0.008	0.022	0.008	0.005	0.010	0.005	0.013	0.008	0.006	0.016	0.006	0.023	0.009	0.007
c-Raf	MW 1.139	0.982	0.881	0.915	0.926	0.504	1.043	1.013	0.958	1.413	1.095	0.787	1.053	1.022
	SD 0.054	0.108	0.041	0.024	0.051	0.040	0.064	0.041	0.035	0.102	0.033	0.057	0.056	0.037
c-Raf pS259	MW 2.307	1.872	2.175	1.969	1.901	1.115	2.357	2.204	1.969	2.608	2.419	1.159	2.136	2.119
	SD 0.110	0.206	0.102	0.066	0.104	0.050	0.154	0.095	0.070	0.193	0.097	0.133	0.112	0.081
c-Raf pS338	MW 1.063	0.831	0.987	0.717	0.851	0.590	0.775	0.839	1.044	1.244	0.926	0.634	0.793	1.101
	SD 0.049	0.092	0.046	0.019	0.048	0.024	0.046	0.032	0.037	0.090	0.023	0.054	0.043	0.033
Ha-Ras [1]	MW 2.028	1.541	1.484	1.716	1.478	0.925	1.863	1.689	1.831	2.351	1.568	1.416	1.512	1.535
	SD 0.094	0.170	0.069	0.046	0.081	0.038	0.113	0.065	0.065	0.113	0.037	0.078	0.078	0.048
Rb	MW 0.203	0.099	0.193	0.177	0.085	0.136	0.183	0.170	0.209	0.164	0.214	0.214	0.132	0.147
	SD 0.013	0.012	0.008	0.009	0.009	0.014	0.020	0.018	0.005	0.024	0.014	0.014	0.008	0.008
Rb pS807/811	MW 0.030	0.021	0.021	0.015	0.018	0.006	0.020	0.016	0.016	0.011	0.018	0.019	0.018	0.022
	SD 0.002	0.002	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.003	0.000	0.001
RhBG	MW 8.124	0.064	0.044	0.087	0.081	0.094	0.128	0.140	0.531	0.037	0.055	0.100	0.040	0.251
	SD 0.473	0.006	0.009	0.004	0.008	0.010	0.014	0.014	0.004	0.011	0.010	0.005	0.005	0.012
RSK 1/2/3	MW 0.545	0.315	0.245	0.315	0.273	0.074	0.354	0.322	0.320	0.459	0.333	0.120	0.323	0.309
	SD 0.028	0.035	0.012	0.022	0.015	0.003	0.025	0.012	0.014	0.034	0.012	0.006	0.016	0.014
RSK 1 pS380	MW 0.815	1.182	0.643	1.117	0.536	0.465	1.013	1.160	1.131	1.131	1.182	0.455	1.225	0.849
	SD 0.040	0.130	0.030	0.057	0.030	0.026	0.064	0.057	0.040	0.083	0.047	0.038	0.067	0.044
STAT 1	MW 1.837	1.006	1.189	0.767	0.798	0.655	1.003	1.277	1.016	1.576	1.504	0.757	1.472	1.276
	SD 0.085	0.111	0.055	0.020	0.045	0.027	0.060	0.049	0.036	0.114	0.034	0.061	0.074	0.038
STAT 1 pY701	MW 0.388	0.330	0.292	0.287	0.297	0.187	0.333	0.306	0.338	0.308	0.332	0.308	0.386	0.351
	SD 0.018	0.036	0.014	0.008	0.016	0.008	0.020	0.011	0.012	0.023	0.008	0.021	0.020	0.010
STAT 3 [1]	MW 1.580	1.160	1.405	1.167	2.748	0.956	1.186	1.243	1.519	1.453	1.192	0.994	1.305	1.520
	SD 0.107	0.096	0.035	0.036	0.191	0.115	0.115	0.114	0.018	0.192	0.068	0.073	0.033	0.071
STAT 3 [2]	MW 2.465	2.499	2.435	2.386	1.884	1.955	2.124	2.345	2.447	3.032	2.688	1.547	2.763	2.362
	SD 0.145	0.205	0.061	0.076	0.129	0.201	0.215	0.215	0.019	0.402	0.158	0.081	0.102	0.118
STAT 3 pY705 [2]	MW 3.551	3.736	3.354	3.419	3.355	1.794	3.962	3.908	3.840	3.838	3.980	4.170	4.214	3.765
	SD 0.207	0.315	0.083	0.106	0.227	0.186	0.384	0.356	0.029	0.509	0.218	0.191	0.086	0.177
STAT 3 pS727	MW 0.375	0.409	0.354	0.349	0.303	0.225	0.343	0.358	0.372	0.381	0.397	0.348	0.391	0.341
	SD 0.023	0.034	0.009	0.011	0.020	0.024	0.034	0.033	0.003	0.051	0.022	0.020	0.010	0.017
STAT 5	MW 0.311	0.231	0.217	0.210	0.228	0.113	0.238	0.201	0.239	0.241	0.187	0.199	0.192	0.193
	SD 0.018	0.019	0.005	0.007	0.015	0.012	0.023	0.018	0.002	0.032	0.010	0.017	0.004	0.009
STAT 5 pY694	MW 0.174	0.155	0.098	0.110	0.080	0.097	0.101	0.155	0.169	0.163	0.106	0.128	0.160	0.102
	SD 0.010	0.019	0.004	0.004	0.007	0.011	0.012	0.014	0.002	0.022	0.007	0.008	0.004	0.005
STAT 6	MW 1.043	2.242	1.324	1.879	0.918	0.208	1.602	1.662	1.348	1.213	1.808	1.125	1.231	1.396
	SD 0.096	0.225	0.119	0.174	0.085	0.024	0.206	0.198	0.021	0.166	0.165	0.046	0.092	0.137

	H.78T1	H.79T1	N.3	N.6	N.7	N.9	N.10	N.12	N.17	N.19	N.20	N.24
14-3-3 ζδ	MW 0.122	0.159	0.062	0.053	0.069	0.076	0.089	0.074	0.091	0.066	0.157	0.076
	SD	0.005	0.007	0.002	0.006	0.004	0.012	0.004	0.011	0.008	0.007	0.003
AFP	MW 0.091	0.028	0.035	0.082	0.055	0.070	0.035	0.031	0.032	0.022	0.027	0.027
	SD	0.005	0.003	0.003	0.004	0.003	0.005	0.001	0.005	0.003	0.001	0.001
Akt [1]	MW 0.650	0.804	1.170	0.859	1.158	0.775	0.996	1.014	0.849	0.771	1.117	0.791
	SD	0.067	0.046	0.108	0.039	0.093	0.138	0.054	0.107	0.103	0.076	0.033
Akt [2]	MW 0.286	0.337	0.337	0.304	0.333	0.351	0.322	0.338	0.293	0.293	0.307	0.335
	SD	0.026	0.027	0.030	0.007	0.027	0.043	0.015	0.047	0.044	0.012	0.010
Akt pT308	MW 0.756	0.699	1.134	0.785	1.142	0.665	0.974	0.844	0.645	0.575	0.786	0.469
	SD	0.060	0.039	0.096	0.023	0.099	0.130	0.037	0.099	0.066	0.020	0.013
Akt pS473	MW 0.079	0.090	0.093	0.086	0.358	0.077	0.077	0.171	0.071	0.069	0.069	0.083
	SD	0.010	0.008	0.009	0.002	0.041	0.005	0.011	0.011	0.009	0.002	0.002
Akt Sub. pS/T	MW 3.937	3.100	2.512	1.748	2.540	2.023	2.450	2.023	2.252	2.348	3.156	2.242
	SD	0.294	0.191	0.212	0.048	0.204	0.099	0.327	0.302	0.271	0.081	0.060
AMPK α	MW 0.115	0.096	0.168	0.142	0.149	0.127	0.140	0.144	0.127	0.174	0.149	0.169
	SD	0.009	0.005	0.014	0.007	0.014	0.006	0.020	0.019	0.021	0.005	0.007
AMPK α pT172	MW 1.021	0.769	0.648	0.522	0.750	0.594	0.586	0.567	0.757	0.909	1.225	0.834
	SD	0.077	0.065	0.056	0.012	0.060	0.029	0.078	0.103	0.105	0.034	0.023
APC	MW 0.029	0.052	0.046	0.036	0.045	0.033	0.028	0.030	0.079	0.037	0.040	0.046
	SD	0.002	0.003	0.005	0.003	0.002	0.001	0.003	0.003	0.001	0.003	0.001
ATM/ATR Sub. pS/T	MW 0.571	0.565	0.769	0.622	0.691	0.591	0.684	0.697	0.571	0.628	0.743	0.671
	SD	0.066	0.058	0.077	0.025	0.060	0.043	0.093	0.084	0.078	0.028	0.028
Bad	MW 0.221	0.224	0.275	0.262	0.203	0.317	0.228	0.180	0.193	0.291	0.165	0.225
	SD	0.008	0.013	0.028	0.030	0.011	0.024	0.017	0.007	0.008	0.010	0.006
Bad pS112	MW 0.149	0.062	0.260	0.306	0.229	0.092	0.102	0.184	0.072	0.112	0.039	0.017
	SD	0.014	0.012	0.023	0.007	0.019	0.009	0.014	0.028	0.016	0.008	0.007
Bax	MW 1.332	0.865	0.627	0.666	0.806	0.625	0.772	0.700	0.586	0.694	1.574	0.579
	SD	0.049	0.078	0.065	0.065	0.045	0.036	0.064	0.067	0.018	0.096	0.015
E-Cadherin	MW 1.492	1.248	0.440	0.490	0.480	0.448	0.478	0.398	0.383	0.269	0.493	0.182
	SD	0.056	0.107	0.046	0.048	0.027	0.026	0.022	0.037	0.008	0.031	0.005
N-Cadherin [2]	MW 0.307	0.251	0.774	0.662	0.692	0.568	0.586	0.685	0.601	0.613	0.616	0.514
	SD	0.023	0.020	0.065	0.019	0.056	0.078	0.031	0.086	0.071	0.016	0.014
Caspase 3 gD175	MW 0.061	0.070	0.073	0.062	0.068	0.057	0.059	0.062	0.065	0.064	0.061	0.060
	SD	0.005	0.005	0.006	0.001	0.005	0.008	0.003	0.010	0.007	0.002	0.002
Caspase 3	MW 1.159	1.362	0.756	0.870	0.901	0.776	0.792	0.684	0.946	0.945	0.990	0.872
	SD	0.088	0.034	0.064	0.047	0.077	0.108	0.049	0.108	0.109	0.029	0.038
Caspase 7 gD198	MW 0.043	0.052	0.077	0.060	0.073	0.047	0.068	0.058	0.078	0.052	0.053	0.050
	SD	0.003	0.004	0.008	0.007	0.006	0.005	0.005	0.006	0.004	0.005	0.002
Caspase 7	MW 0.328	0.371	0.786	0.833	0.914	0.894	0.817	0.736	1.039	0.906	0.635	0.797
	SD	0.013	0.027	0.080	0.082	0.051	0.038	0.067	0.052	0.027	0.039	0.021
β-Cat. [3]	MW 2.142	1.845	1.028	0.905	1.015	1.054	1.477	1.060	1.023	1.333	2.035	1.068
	SD	0.163	0.129	0.087	0.020	0.081	0.199	0.047	0.125	0.156	0.067	0.030
β-Cat. pS45	MW 0.048	0.037	0.053	0.031	0.031	0.030	0.035	0.029	0.028	0.025	0.038	0.024
	SD	0.004	0.007	0.004	0.001	0.003	0.001	0.001	0.004	0.003	0.001	0.001
β-Cat. pT41/S45	MW 0.064	0.074	0.043	0.040	0.052	0.044	0.049	0.041	0.043	0.048	0.069	0.042
	SD	0.005	0.007	0.004	0.001	0.004	0.002	0.002	0.010	0.006	0.002	0.001
β-Cat. pS33/37/141	MW 0.179	0.375	0.234	0.239	0.271	0.192	0.213	0.235	0.333	0.357	0.397	0.295
	SD	0.013	0.035	0.020	0.006	0.022	0.028	0.011	0.047	0.041	0.010	0.008

	H 78T1	H 79T1	N 3	N 6	N 7	N 9	N 10	N 12	N 17	N 19	N 20	N 24
CK 1 $\alpha$	MW 0.055	0.031	0.053	0.055	0.064	0.044	0.053	0.041	0.037	0.042	0.053	0.033
	SD	0.002	0.005	0.005	0.004	0.003	0.002	0.004	0.005	0.001	0.003	0.001
CK 1 $\delta$	MW 21.983	22.876	48.013	42.199	42.918	46.558	56.723	50.078	41.238	55.981	46.895	50.009
	SD	1.690	0.686	4.059	1.691	3.466	7.869	8.364	5.229	6.520	1.774	1.893
CK 2 $\alpha$	MW 0.959	0.766	1.364	1.124	1.371	1.132	1.158	1.007	1.191	1.224	1.014	0.966
	SD	0.035	0.069	0.140	0.112	0.082	0.058	0.095	0.094	0.042	0.064	0.037
CREB	MW 0.636	0.641	0.922	0.544	0.866	0.598	0.985	0.703	0.668	0.624	0.695	0.535
	SD	0.049	0.043	0.078	0.012	0.069	0.132	0.031	0.101	0.072	0.018	0.014
CREB pS133 [1]	MW 0.094	0.083	0.088	0.074	0.072	0.059	0.062	0.038	0.074	0.092	0.078	0.090
	SD	0.007	0.004	0.008	0.002	0.006	0.008	0.002	0.009	0.011	0.002	0.003
CREB pS133 [2]	MW 0.274	0.153	0.150	0.123	0.137	0.162	0.162	0.115	0.149	0.148	0.318	0.135
	SD	0.022	0.011	0.013	0.004	0.011	0.008	0.022	0.022	0.017	0.008	0.004
Cyclin D1	MW 0.964	0.864	1.243	1.135	1.038	1.133	1.113	1.075	1.171	1.379	1.154	1.562
	SD	0.072	0.023	0.105	0.025	0.083	0.149	0.060	0.106	0.092	0.114	0.081
Cyclin E2	MW 0.092	0.080	0.146	0.110	0.129	0.110	0.117	0.099	0.106	0.092	0.114	0.081
	SD	0.007	0.007	0.012	0.003	0.010	0.005	0.016	0.013	0.011	0.003	0.002
EGFR [2]	MW 0.085	0.047	0.225	0.202	0.220	0.233	0.255	0.175	0.151	0.148	0.085	0.095
	SD	0.003	0.005	0.023	0.020	0.012	0.014	0.016	0.013	0.004	0.005	0.002
EGFR pY845	MW 0.186	0.148	0.223	0.223	0.227	0.189	0.220	0.186	0.220	0.215	0.179	0.176
	SD	0.008	0.013	0.024	0.022	0.013	0.011	0.017	0.013	0.006	0.012	0.005
EGFR pY1173	MW 0.390	0.350	1.077	0.801	0.862	0.776	0.693	0.832	0.676	0.901	0.351	0.775
	SD	0.031	0.071	0.091	0.019	0.069	0.093	0.046	0.116	0.104	0.011	0.021
Elk-1	MW 0.523	0.377	2.119	1.729	1.980	1.473	2.240	1.829	1.272	1.769	1.283	2.156
	SD	0.019	0.025	0.221	0.186	0.133	0.131	0.129	0.034	0.066	0.087	0.124
Elk-1 pS383 [1]	MW 1.125	0.651	1.018	0.730	0.925	0.777	0.992	0.670	0.793	0.856	1.010	0.768
	SD	0.044	0.059	0.104	0.072	0.052	0.046	0.062	0.065	0.023	0.062	0.021
Elk-1 pS383 [2]	MW 0.935	0.875	0.635	0.578	0.720	0.630	0.715	0.668	0.723	0.608	0.652	0.612
	SD	0.043	0.077	0.070	0.058	0.047	0.046	0.062	0.044	0.033	0.052	0.021
Erk 1	MW 0.421	0.371	0.364	0.303	0.403	0.297	0.422	0.333	0.326	0.367	0.500	0.318
	SD	0.031	0.028	0.031	0.007	0.032	0.056	0.015	0.044	0.042	0.013	0.009
Erk 2	MW 0.701	0.681	1.094	0.956	0.992	0.859	0.961	0.979	0.916	0.947	1.085	0.994
	SD	0.052	0.054	0.093	0.026	0.080	0.129	0.045	0.127	0.109	0.029	0.027
Erk 1/2	MW 8.317	6.499	6.682	6.220	6.695	5.395	5.708	5.148	4.950	5.630	8.040	4.843
	SD	0.644	0.281	0.569	0.220	0.560	0.780	0.275	0.579	0.670	0.273	0.193
Erk 1/2 pT202/Y204	MW 2.710	1.996	0.652	0.492	0.758	0.729	1.110	0.532	1.017	0.851	0.754	0.842
	SD	0.203	0.155	0.058	0.011	0.061	0.096	0.149	0.125	0.098	0.020	0.024
c-Fos	MW 0.126	0.100	0.135	0.141	0.148	0.128	0.142	0.133	0.139	0.126	0.139	0.114
	SD	0.005	0.013	0.014	0.014	0.008	0.007	0.012	0.017	0.003	0.008	0.003
Glutaminsynthetase	MW 0.155	0.106	3.909	2.515	1.683	2.002	3.840	1.897	2.526	1.818	1.164	2.148
	SD	0.039	0.010	1.016	0.099	0.801	1.527	1.375	1.571	1.141	0.611	1.227
Gpr49 P2 T1	MW 1.123	1.587	1.569	1.275	1.521	1.276	1.277	1.214	1.896	1.440	1.749	2.046
	SD	0.084	0.039	0.134	0.034	0.123	0.171	0.075	0.216	0.166	0.045	0.060
GSK3 $\beta$	MW 0.639	0.572	0.529	0.546	0.801	0.537	0.573	0.591	0.581	0.600	0.519	0.580
	SD	0.027	0.060	0.054	0.045	0.045	0.028	0.054	0.046	0.023	0.037	0.016
GSK3 $\beta$ pS9	MW 0.299	0.164	0.097	0.090	0.266	0.079	0.086	0.125	0.066	0.123	0.121	0.114
	SD	0.011	0.022	0.010	0.009	0.015	0.004	0.012	0.009	0.003	0.007	0.003
HGF	MW 0.492	0.454	0.601	0.580	0.634	0.565	0.620	0.589	0.693	0.715	0.548	0.616
	SD	0.018	0.029	0.062	0.059	0.036	0.030	0.058	0.024	0.020	0.034	0.025

	H.78T1	H.79T1	N.3	N.6	N.7	N.9	N.10	N.12	N.17	N.19	N.20	N.24
Histon H3	MW 10.113	6.600	2.763	4.906	4.793	4.803	4.285	6.189	5.562	5.915	9.153	4.820
	SD 0.504	0.491	0.289	0.511	0.271	0.345	0.197	0.583	0.232	0.248	0.560	0.132
Histon H3 ak9	MW 0.007	0.000	0.006	0.006	0.001	0.001	0.004	0.000	0.001	0.002	0.000	0.002
	SD 0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000
Histon H3 pS10	MW 0.010	0.002	0.015	0.011	0.007	0.005	0.010	0.005	0.007	0.010	0.014	0.005
	SD 0.001	0.002	0.002	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.003	0.000	0.001	0.000
Histon H3 ak18	MW 0.237	0.016	0.091	0.087	0.100	0.108	0.081	0.089	0.018	0.087	0.136	0.034
	SD 0.012	0.002	0.019	0.008	0.022	0.010	0.005	0.009	0.003	0.009	0.025	0.000
Histon H3 ak23	MW 0.135	0.137	0.159	0.157	0.178	0.139	0.156	0.159	0.175	0.173	0.157	0.167
	SD 0.007	0.011	0.019	0.016	0.011	0.009	0.008	0.015	0.014	0.007	0.010	0.005
Histon H3 ak9 & pS10	MW 0.014	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.001	0.003	0.002
	SD 0.001	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000
IkB	MW 0.015	0.020	0.017	0.020	0.017	0.018	0.023	0.019	0.021	0.020	0.016	0.016
	SD 0.001	0.002	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001
IkB pS32	MW 0.396	0.331	0.492	0.510	0.597	0.454	0.505	0.447	0.552	0.479	0.405	0.429
	SD 0.015	0.028	0.051	0.052	0.037	0.030	0.026	0.043	0.037	0.016	0.025	0.016
JNK/SAPK	MW 0.212	0.203	0.394	0.294	0.242	0.141	0.239	0.209	0.213	0.247	0.228	0.240
	SD 0.019	0.021	0.034	0.008	0.019	0.007	0.032	0.010	0.031	0.028	0.006	0.006
JNK/SAPK pT183/Y185	MW 1.102	0.817	0.765	0.687	0.864	0.599	0.662	0.566	0.590	0.607	0.521	0.527
	SD 0.083	0.042	0.065	0.015	0.069	0.029	0.089	0.025	0.078	0.070	0.013	0.016
c-Jun	MW 0.155	0.120	0.255	0.146	0.165	0.161	0.179	0.145	0.105	0.131	0.113	0.130
	SD 0.012	0.011	0.022	0.003	0.013	0.008	0.024	0.006	0.019	0.015	0.003	0.003
c-Jun pS63 [1]	MW 0.197	0.133	0.200	0.183	0.188	0.189	0.181	0.136	0.137	0.174	0.147	0.154
	SD 0.015	0.014	0.017	0.004	0.015	0.009	0.024	0.006	0.019	0.020	0.004	0.004
c-Jun pS73	MW 0.145	0.148	0.154	0.158	0.159	0.170	0.158	0.166	0.160	0.196	0.198	0.140
	SD 0.011	0.011	0.013	0.005	0.013	0.008	0.021	0.008	0.022	0.023	0.005	0.004
Ki-67	MW 0.123	0.202	0.245	0.198	0.237	0.171	0.215	0.183	0.169	0.164	0.128	0.173
	SD 0.008	0.017	0.025	0.019	0.013	0.010	0.010	0.017	0.006	0.007	0.009	0.004
MDM2	MW 0.270	0.242	0.282	0.236	0.247	0.234	0.247	0.246	0.226	0.234	0.246	0.231
	SD 0.020	0.017	0.025	0.006	0.020	0.011	0.033	0.011	0.031	0.027	0.007	0.007
MDM2 pS166	MW 0.193	0.191	0.241	0.133	0.239	0.156	0.255	0.183	0.217	0.197	0.246	0.188
	SD 0.014	0.016	0.020	0.003	0.019	0.008	0.034	0.008	0.030	0.023	0.006	0.005
MEK 1 [1]	MW 0.308	0.193	0.328	0.403	0.496	0.384	0.446	0.536	0.474	0.525	0.331	0.645
	SD 0.013	0.021	0.034	0.040	0.028	0.025	0.021	0.055	0.037	0.022	0.020	0.038
MEK 2 [2]	MW 0.308	0.226	0.255	0.276	0.289	0.237	0.252	0.217	0.265	0.301	0.275	0.292
	SD 0.012	0.023	0.027	0.027	0.016	0.014	0.012	0.020	0.025	0.008	0.017	0.008
MEK 1/2 pS217/221	MW 1.864	1.164	0.582	0.417	0.484	0.425	0.436	0.384	0.470	0.488	0.505	0.440
	SD 0.081	0.077	0.060	0.041	0.027	0.024	0.020	0.035	0.020	0.013	0.031	0.011
c-Met [1]	MW 0.313	0.353	0.515	0.488	0.555	0.536	0.588	0.434	0.520	0.512	0.350	0.533
	SD 0.013	0.030	0.053	0.049	0.032	0.034	0.029	0.041	0.038	0.013	0.021	0.021
c-Met pY1230/1234/1235	MW 3.073	2.020	3.005	2.536	3.158	2.329	2.345	2.785	2.074	2.287	1.626	1.691
	SD 0.113	0.185	0.308	0.248	0.175	0.135	0.111	0.255	0.171	0.063	0.111	0.044
c-Met pY1349	MW 0.258	0.222	0.353	0.288	0.325	0.274	0.126	0.239	0.252	0.279	0.261	0.239
	SD 0.009	0.017	0.036	0.028	0.018	0.016	0.007	0.023	0.013	0.007	0.016	0.006
MKK 3/6 pS189/207	MW 1.183	1.022	1.497	1.394	1.620	1.234	1.424	1.307	1.322	1.500	1.439	1.202
	SD 0.043	0.102	0.153	0.137	0.090	0.073	0.067	0.120	0.124	0.041	0.088	0.033
MKK 4 pS257/T261	MW 0.333	0.147	0.069	0.054	0.056	0.085	0.089	0.048	0.103	0.130	0.159	0.064
	SD 0.015	0.021	0.007	0.005	0.003	0.005	0.004	0.005	0.012	0.004	0.010	0.002



	H 78T1	H 79T1	N 3	N 6	N 7	N 9	N 10	N 12	N 17	N 19	N 20	N 24
MKK 7 pS271/T275	MW 0.608	0.429	0.599	0.607	0.693	0.621	0.578	0.536	0.583	0.613	0.473	0.373
	SD 0.023	0.044	0.062	0.060	0.039	0.036	0.027	0.050	0.045	0.016	0.029	0.011
mTOR	MW 0.730	0.383	0.488	0.506	0.550	0.476	0.510	0.385	0.318	0.379	0.646	0.376
	SD 0.028	0.034	0.050	0.051	0.031	0.029	0.024	0.041	0.031	0.012	0.040	0.011
mTOR pS2448	MW 0.645	0.565	0.374	0.369	0.522	0.397	0.384	0.374	0.425	0.440	0.423	0.406
	SD 0.028	0.058	0.042	0.036	0.029	0.023	0.020	0.034	0.031	0.011	0.027	0.010
mTOR pS2481	MW 0.106	0.091	0.107	0.111	0.121	0.100	0.109	0.090	0.102	0.108	0.108	0.098
	SD 0.004	0.010	0.011	0.011	0.007	0.006	0.005	0.008	0.009	0.003	0.007	0.003
c-Myc [1]	MW 0.534	0.550	0.865	0.806	1.050	0.744	0.981	0.678	1.009	0.760	0.636	0.753
	SD 0.023	0.051	0.090	0.079	0.060	0.043	0.046	0.063	0.058	0.026	0.043	0.023
c-Myc pT58/S62	MW 0.107	0.091	0.167	0.107	0.135	0.102	0.135	0.099	0.112	0.102	0.108	0.115
	SD 0.004	0.009	0.017	0.010	0.008	0.006	0.006	0.009	0.011	0.003	0.007	0.003
p38/MAPK	MW 0.884	0.506	0.797	0.833	0.967	0.817	0.861	0.769	0.747	0.829	1.281	0.679
	SD 0.033	0.086	0.083	0.084	0.057	0.051	0.045	0.078	0.050	0.030	0.086	0.026
p38/MAPK pT180/Y182	MW 1.228	0.563	1.214	0.908	0.976	1.123	1.127	0.492	0.943	1.131	1.254	0.918
	SD 0.047	0.067	0.126	0.098	0.063	0.080	0.054	0.046	0.088	0.032	0.081	0.036
p53 [3]	MW 0.859	0.977	1.474	1.286	1.418	1.368	1.303	1.208	1.398	1.527	1.128	1.232
	SD 0.032	0.059	0.151	0.132	0.081	0.081	0.073	0.130	0.044	0.040	0.069	0.084
p53 pS6	MW 0.972	1.179	1.191	1.080	1.145	1.050	1.177	1.157	1.089	1.258	1.166	1.158
	SD 0.074	0.029	0.102	0.044	0.092	0.053	0.158	0.077	0.129	0.147	0.030	0.041
p53 pS15	MW 0.029	0.034	0.037	0.037	0.044	0.036	0.028	0.038	0.038	0.037	0.031	0.035
	SD 0.002	0.004	0.003	0.001	0.004	0.002	0.004	0.002	0.006	0.004	0.001	0.001
p53 pS20	MW 0.047	0.053	0.028	0.039	0.046	0.036	0.031	0.041	0.049	0.038	0.044	0.024
	SD 0.004	0.006	0.003	0.001	0.004	0.002	0.004	0.002	0.008	0.004	0.001	0.001
p53 pS392	MW 0.032	0.028	0.035	0.030	0.031	0.026	0.026	0.035	0.026	0.027	0.033	0.024
	SD 0.002	0.003	0.003	0.001	0.002	0.001	0.003	0.002	0.004	0.003	0.001	0.001
PAK 1/2/3	MW 0.210	0.203	0.382	0.357	0.439	0.330	0.360	0.283	0.304	0.289	0.246	0.317
	SD 0.008	0.019	0.040	0.038	0.028	0.021	0.018	0.028	0.021	0.008	0.015	0.016
PAK 1/2/3 p S141	MW 5.645	4.144	5.295	3.756	6.808	3.873	4.198	3.228	4.171	3.405	3.770	3.440
	SD 0.215	0.258	0.545	0.377	0.379	0.223	0.193	0.300	0.155	0.087	0.233	0.105
PDK 1	MW 0.052	0.052	0.065	0.060	0.071	0.052	0.062	0.062	0.057	0.054	0.055	0.060
	SD 0.004	0.004	0.006	0.002	0.006	0.003	0.008	0.003	0.009	0.006	0.001	0.002
PDK 1 pS241	MW 1.176	1.260	1.094	0.785	0.865	0.856	1.008	0.932	0.875	0.852	0.970	0.804
	SD 0.088	0.032	0.093	0.019	0.069	0.042	0.135	0.043	0.113	0.098	0.025	0.021
PI3K p85	MW 0.403	0.314	0.576	0.462	0.624	0.439	0.484	0.442	0.453	0.448	0.437	0.455
	SD 0.017	0.021	0.059	0.045	0.035	0.025	0.022	0.041	0.039	0.012	0.027	0.013
PI3K p85 pY458 / p55 pY199	MW 1.631	1.409	2.296	2.071	2.561	1.948	2.283	1.941	2.125	2.296	1.918	1.982
	SD 0.064	0.082	0.236	0.213	0.142	0.112	0.105	0.217	0.078	0.059	0.118	0.055
PKA C (α Kin. Ue.)	MW 0.377	0.294	0.442	0.469	0.495	0.395	0.413	0.456	0.407	0.422	0.468	0.409
	SD 0.030	0.021	0.038	0.018	0.045	0.020	0.056	0.025	0.048	0.051	0.014	0.015
PKA C (α Kin. Ue.) pT197	MW 0.047	0.041	0.040	0.046	0.046	0.041	0.038	0.047	0.048	0.038	0.067	0.039
	SD 0.003	0.006	0.004	0.001	0.004	0.002	0.005	0.002	0.007	0.004	0.002	0.001
PKA C (α & β Kin. Ue.) pT197	MW 0.731	0.809	0.492	0.603	0.676	0.507	0.611	0.666	0.659	0.670	0.573	0.553
	SD 0.055	0.021	0.042	0.013	0.054	0.025	0.082	0.030	0.076	0.077	0.015	0.015
PTEN	MW 2.822	2.340	2.410	2.942	3.271	2.577	2.928	2.723	2.640	2.922	3.009	2.534
	SD 0.119	0.326	0.278	0.289	0.183	0.149	0.134	0.252	0.281	0.077	0.197	0.071
PTEN pS380	MW 1.385	1.081	1.337	1.410	1.508	1.181	1.315	1.290	1.147	1.298	1.268	1.114
	SD 0.051	0.107	0.139	0.140	0.086	0.071	0.062	0.121	0.107	0.033	0.078	0.036

	H.78T1	H.79T1	N.3	N.6	N.7	N.9	N.10	N.12	N.17	N.19	N.20	N.24
b-Raf	MW 1.126	1.050	1.678	1.441	1.740	1.479	1.796	1.320	1.726	1.735	1.621	1.607
	SD 0.045	0.063	0.173	0.255	0.105	0.086	0.085	0.290	0.058	0.065	0.099	0.120
b-Raf pS445	MW 0.160	0.106	0.171	0.158	0.200	0.158	0.185	0.155	0.112	0.175	0.167	0.145
	SD 0.006	0.012	0.018	0.016	0.013	0.009	0.009	0.021	0.013	0.005	0.010	0.005
c-Raf	MW 0.981	0.632	1.070	0.967	1.175	0.901	1.015	0.842	0.825	0.984	0.889	0.913
	SD 0.038	0.066	0.110	0.103	0.067	0.054	0.051	0.094	0.071	0.030	0.057	0.031
c-Raf pS259	MW 2.248	0.979	1.715	1.826	1.946	1.648	1.755	1.505	1.010	1.780	2.222	1.742
	SD 0.083	0.055	0.176	0.178	0.112	0.095	0.083	0.138	0.035	0.049	0.142	0.056
c-Raf pS338	MW 0.755	0.539	0.937	0.730	0.987	0.669	0.848	0.633	0.654	0.751	0.665	0.770
	SD 0.029	0.048	0.096	0.071	0.055	0.038	0.039	0.058	0.055	0.021	0.041	0.020
Ha-Ras [1]	MW 1.775	1.167	1.623	1.680	2.017	1.695	1.791	1.519	1.499	1.581	1.702	1.414
	SD 0.066	0.113	0.166	0.166	0.112	0.100	0.083	0.141	0.113	0.041	0.105	0.039
Rb	MW 0.110	0.082	0.172	0.226	0.245	0.158	0.153	0.270	0.157	0.215	0.073	0.084
	SD 0.013	0.007	0.015	0.005	0.020	0.009	0.021	0.012	0.024	0.026	0.008	0.003
Rb pS807/811	MW 0.014	0.015	0.024	0.017	0.015	0.017	0.009	0.018	0.020	0.020	0.033	0.020
	SD 0.001	0.004	0.002	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.006	0.002	0.001	0.001
RhBG	MW 0.126	0.070	0.415	0.379	0.406	0.482	0.418	0.389	0.405	0.253	0.759	0.292
	SD 0.011	0.003	0.035	0.009	0.033	0.024	0.056	0.017	0.047	0.031	0.020	0.008
RSK 1/2/3	MW 0.298	0.099	0.635	0.542	0.638	0.536	0.618	0.434	0.358	0.465	0.431	0.518
	SD 0.015	0.006	0.065	0.053	0.036	0.031	0.029	0.040	0.031	0.012	0.026	0.014
RSK 1 pS380	MW 1.048	0.528	0.304	0.198	0.279	0.324	0.334	0.163	0.236	0.401	0.420	0.300
	SD 0.043	0.048	0.031	0.020	0.015	0.020	0.016	0.015	0.025	0.012	0.026	0.008
STAT 1	MW 0.867	0.761	0.825	0.650	0.864	0.675	0.701	0.707	0.627	0.714	3.753	0.984
	SD 0.032	0.059	0.085	0.063	0.048	0.039	0.032	0.065	0.053	0.020	0.232	0.026
STAT 1 pY701	MW 0.265	0.245	0.385	0.350	0.470	0.370	0.396	0.388	0.413	0.461	0.405	0.428
	SD 0.010	0.018	0.039	0.034	0.026	0.021	0.018	0.036	0.019	0.012	0.025	0.011
STAT 3 [1]	MW 1.148	0.907	6.226	6.559	5.762	4.062	4.564	5.258	2.003	5.844	2.127	5.524
	SD 0.090	0.082	0.527	0.794	0.940	0.460	0.651	0.779	0.341	1.348	0.081	0.943
STAT 3 [2]	MW 2.229	1.921	2.636	1.578	1.582	2.431	2.431	2.554	1.984	2.199	1.998	1.403
	SD 0.166	0.144	0.223	0.036	0.127	0.119	0.325	0.112	0.253	0.254	0.051	0.037
STAT 3 pY705 [2]	MW 3.078	3.306	4.051	4.383	4.361	4.018	3.912	4.307	3.788	4.291	5.322	4.822
	SD 0.231	0.097	0.343	0.100	0.349	0.196	0.523	0.215	0.452	0.495	0.139	0.143
STAT 3 pS727	MW 0.330	0.317	0.476	0.372	0.376	0.362	0.419	0.363	0.375	0.428	0.386	0.383
	SD 0.025	0.024	0.041	0.014	0.031	0.020	0.056	0.020	0.055	0.050	0.011	0.016
STAT 5	MW 0.130	0.169	0.354	0.281	0.266	0.211	0.284	0.265	0.259	0.211	0.240	0.236
	SD 0.010	0.016	0.030	0.009	0.025	0.010	0.038	0.015	0.035	0.024	0.006	0.009
STAT 5 pY694	MW 0.131	0.106	0.148	0.109	0.146	0.130	0.148	0.110	0.210	0.144	0.133	0.119
	SD 0.010	0.014	0.013	0.005	0.012	0.007	0.020	0.006	0.026	0.017	0.005	0.004
STAT 6	MW 1.350	0.623	0.627	0.414	0.526	0.561	0.736	0.515	0.479	0.566	0.502	0.413
	SD 0.141	0.023	0.058	0.029	0.062	0.048	0.112	0.048	0.055	0.072	0.034	0.032

	B_11T6	B_13T1	B_29T2	B_29T4	B_39T1	B_45T1	B_45T2	B_50T3	B_62T1	B_62T2	B_66T1	B_75T1	H_1T1	H_1T2
Akt pS473 R [1]	MW 0.082	0.130	0.139	0.109	0.088	0.141	0.150	0.095	0.179	0.093	0.131	0.095	0.126	0.083
	SD 0.004	0.003	0.016	0.008	0.006	0.012	0.018	0.007	0.023	0.006	0.009	0.001	0.013	0.008
Akt pS473 R [2]	MW 0.275	0.534	0.348	0.333	0.199	0.321	0.673	0.321	0.550	0.288	0.410	0.317	0.324	0.337
	SD 0.008	0.012	0.038	0.018	0.013	0.026	0.081	0.028	0.066	0.016	0.019	0.004	0.031	0.034
Akt pT308 R [1]	MW 1.015	0.811	1.090	0.919	0.797	0.735	1.017	0.861	0.817	0.730	0.915	0.878	0.989	1.159
	SD 0.048	0.015	0.084	0.050	0.014	0.029	0.036	0.024	0.050	0.024	0.057	0.024	0.046	0.021
Akt pT308 R [2]	MW 3.399	3.325	2.722	2.822	1.794	1.668	4.554	2.899	2.514	2.264	2.864	2.928	2.535	4.692
	SD 0.083	0.052	0.196	0.067	0.022	0.039	0.180	0.132	0.080	0.082	0.085	0.075	0.062	0.153
AMPK $\alpha$ pT172 R	MW 15.467	8.058	13.676	11.048	10.235	7.588	5.930	12.814	9.244	13.710	8.349	8.353	11.270	14.032
	SD 0.555	0.285	0.665	0.594	0.364	0.885	0.067	0.548	0.197	0.978	0.134	0.996	0.612	0.598
Bad pS112 R	MW 1.641	1.886	1.426	1.160		1.254	1.775	1.471	0.950	1.138	2.408	2.207	0.817	0.593
	SD 0.017	0.057	0.046	0.031		0.028	0.036	0.067	0.059	0.047	0.018	0.034	0.037	0.030
$\beta$ -Cat. pS45 R [3]	MW 0.027	0.032	0.019	0.018	0.023	0.021	0.040	0.017	0.018	0.012	0.032	0.027	0.015	0.015
	SD 0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
$\beta$ -Cat. pS33/37/41 R [3]	MW 0.294	0.260	0.189	0.163	0.325	0.247	0.300	0.113	0.133	0.128	0.329	0.213	0.148	0.074
	SD 0.005	0.003	0.002	0.004	0.007	0.004	0.001	0.004	0.001	0.005	0.005	0.003	0.002	0.002
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [3]	MW 0.049	0.046	0.022	0.029	0.043	0.033	0.048	0.028	0.030	0.025	0.049	0.048	0.030	0.020
	SD 0.000	0.000	0.000	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.000
b-Raf pS445 R	MW 0.142	0.143	0.118	0.106	0.140	0.141	0.120	0.110	0.091	0.112	0.101	0.165	0.129	0.108
	SD 0.004	0.008	0.003	0.003	0.027	0.003	0.001	0.011	0.002	0.012	0.002	0.014	0.003	0.002
c-Jun pS73 R	MW 1.135	0.895	0.873	1.140	0.995	1.380	0.536	1.311	1.354	1.208	0.768	1.387	1.232	0.673
	SD 0.010	0.008	0.006	0.005	0.052	0.017	0.004	0.090	0.035	0.011	0.008	0.008	0.022	0.001
c-Jun pS63 [1] R	MW 1.257	1.067	1.260	1.060	1.124	1.525	0.895	1.281	1.267	1.096	0.936	1.253	1.287	1.037
	SD 0.011	0.007	0.005	0.005	0.047	0.007	0.005	0.085	0.030	0.010	0.009	0.007	0.023	0.001
c-Met pY1349 R [1]	MW 0.745	0.892	0.696	0.651	0.523	0.674	0.830	0.654	0.757	0.792	0.932	0.720	0.887	0.780
	SD 0.008	0.011	0.007	0.008	0.074	0.007	0.005	0.089	0.008	0.008	0.005	0.008	0.021	0.019
c-Met pY1230/1234/1235 R [1]	MW 5.784	9.716	5.876	7.066	7.004	7.568	9.360	6.275	7.220	5.972	6.602	9.062	11.597	8.597
	SD 0.070	0.125	0.061	0.090	0.894	0.083	0.048	0.840	0.063	0.067	0.042	0.099	0.269	0.165
c-Myc pT58/S62 R [1]	MW 0.159	0.151	0.183	0.142	0.162	0.177	0.133	0.172	0.178	0.182	0.163	0.137	0.192	0.121
	SD 0.002	0.001	0.007	0.001	0.020	0.003	0.001	0.018	0.006	0.001	0.002	0.001	0.004	0.003
c-Raf pS259 R	MW 2.472	1.954	2.057	2.209	1.495	2.273	2.104	1.519	1.997	2.088	2.107	2.330	1.968	1.738
	SD 0.037	0.041	0.049	0.036	0.392	0.052	0.049	0.146	0.063	0.072	0.047	0.106	0.035	0.031
c-Raf pS338 R	MW 0.785	0.871	0.734	0.824	0.869	0.985	0.922	0.812	0.633	0.863	0.826	0.796	0.759	0.887
	SD 0.011	0.010	0.016	0.009	0.147	0.019	0.015	0.078	0.010	0.028	0.018	0.017	0.009	0.007
CREB pS133 [2] R	MW 0.415	0.186	0.414	0.324	0.276	0.417	0.209	0.268	0.377	0.497	0.499	0.244	0.332	0.182
	SD 0.004	0.002	0.012	0.014	0.007	0.025	0.001	0.013	0.008	0.015	0.006	0.003	0.004	0.004
CREB pS133 [1] R	MW 0.132	0.063	0.162	0.145	0.088	0.120	0.063	0.100	0.128	0.158	0.172	0.128	0.125	0.051
	SD 0.001	0.001	0.002	0.000	0.011	0.000	0.001	0.004	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001
EGFR pY845 R [2]	MW 2.265	2.200	2.614	3.461	2.730	2.224	1.550	2.160	3.302	4.298	2.476	1.545	1.505	2.237
	SD 0.020	0.009	0.045	0.035	0.478	0.008	0.017	0.227	0.028	0.028	0.006	0.003	0.010	0.054
EGFR pY1173 R [2]	MW 6.731	6.110	10.474	9.588	20.663	8.723	5.704	3.785	8.360	10.553	5.653	5.033	3.215	6.227
	SD 0.043	0.044	0.135	0.126	2.491	0.056	0.058	0.403	0.093	0.094	0.081	0.064	0.020	0.149
Elk-1 pS383 [2] R	MW 1.626	2.014	1.152	1.287	1.803	1.318	1.227	1.373	1.291	1.204	1.146	1.803	1.724	1.323
	SD 0.031	0.042	0.041	0.041	0.173	0.024	0.029	0.136	0.041	0.028	0.025	0.061	0.022	0.040
Elk-1 pS383 [1] R	MW 2.214	1.934	1.521	1.584	1.532	1.550	1.506	1.381	1.529	1.641	1.288	1.721	1.935	1.499
	SD 0.035	0.045	0.031	0.075	0.204	0.058	0.031	0.140	0.026	0.060	0.015	0.078	0.063	0.018
Erk1/2 pT202/Y204 R	MW 0.089	0.114	0.078	0.116	0.089	0.106	0.100	0.117	0.092	0.116	0.118	0.105	0.450	0.301
	SD 0.002	0.005	0.003	0.007	0.003	0.005	0.001	0.006	0.004	0.008	0.001	0.007	0.012	0.013

	B 11T6	B 13T1	B 29T2	B 29T4	B 39T1	B 45T1	B 45T2	B 50T3	B 62T1	B 62T2	B 66T1	B 75T1	H 1T1	H 1T2
GSK3 $\beta$ pS9 R	MW 0.374 SD 0.002	0.382 0.007	0.390 0.009	0.367 0.007	0.241 0.042	0.416 0.005	0.476 0.003	0.306 0.045	0.485 0.014	0.288 0.012	0.298 0.012	0.393 0.018	0.453 0.008	0.474 0.014
Histon H3 pS10 R	MW 0.001 SD 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.000 0.000	0.001 0.000	0.002 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.002 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000
Histon H3 ak18 R	MW 0.004 SD 0.000	0.007 0.001	0.009 0.000	0.012 0.002	0.003 0.001	0.025 0.002	0.015 0.000	0.003 0.000	0.015 0.002	0.014 0.004	0.006 0.001	0.010 0.002	0.029 0.003	0.014 0.002
Histon H3 ak23 R	MW 0.026 SD 0.001	0.013 0.000	0.020 0.001	0.014 0.000	0.017 0.003	0.011 0.001	0.017 0.000	0.025 0.003	0.020 0.001	0.021 0.001	0.021 0.000	0.014 0.001	0.009 0.000	0.018 0.001
Histon H3 ak9 & pS10 R	MW 0.001 SD 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.001 0.000	0.002 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.001 0.000	0.000 0.000	0.002 0.000
Ikb pS32 R	MW 22.488 SD 0.580	22.255 2.158	39.797 3.698	29.850 2.113	19.195 2.302	19.639 2.704	24.695 1.127	22.293 2.301	40.535 5.025	31.155 1.650	30.201 1.570	13.264 0.729	36.493 1.288	948.829 987.137
JNK/SAPK pT183/Y185 R	MW 3.028 SD 0.028	3.801 0.033	2.234 0.081	3.213 0.030	2.916 0.142	2.198 0.030	3.079 0.011	3.959 0.386	3.110 0.139	2.790 0.074	1.785 0.021	3.858 0.060	5.379 0.254	5.151 0.138
MDM2 pS166 R	MW 0.956 SD 0.009	0.833 0.007	0.764 0.012	0.862 0.012	0.659 0.023	0.723 0.005	0.916 0.006	0.817 0.032	0.889 0.011	0.902 0.017	0.544 0.001	0.824 0.011	0.863 0.009	0.867 0.003
MEK 1/2 pS217/221 R [1]	MW 2.069 SD 0.046	2.192 0.049	1.799 0.070	1.500 0.054	2.044 0.497	1.788 0.083	2.044 0.011	2.131 0.395	1.288 0.046	1.674 0.069	1.795 0.031	3.322 0.121	4.433 0.063	2.553 0.042
MEK 1/2 pS217/221 R [2]	MW 2.748 SD 0.031	1.998 0.042	2.442 0.037	2.070 0.038	2.386 0.420	2.413 0.027	2.102 0.013	1.864 0.197	2.269 0.020	2.582 0.065	2.131 0.010	2.507 0.093	6.012 0.058	4.206 0.036
mTOR pS2481 R	MW 0.175 SD 0.005	0.177 0.005	0.155 0.002	0.233 0.008	0.262 0.045	0.177 0.003	0.189 0.001	0.239 0.021	0.199 0.003	0.192 0.004	0.140 0.005	0.194 0.007	0.232 0.007	0.142 0.003
mTOR pS2448 R	MW 1.084 SD 0.028	1.089 0.029	0.883 0.011	1.200 0.042	1.210 0.229	1.023 0.018	1.221 0.005	1.170 0.100	1.037 0.018	1.067 0.024	0.803 0.028	1.211 0.028	1.160 0.035	0.800 0.017
p38/MAPK pT180/Y182 R	MW 1.261 SD 0.061	1.005 0.041	1.318 0.043	1.283 0.059	1.226 0.268	1.230 0.046	1.346 0.022	1.285 0.193	1.176 0.046	1.282 0.084	1.207 0.017	1.323 0.053	1.444 0.045	1.598 0.030
p53 pS6 R [3]	MW 0.828 SD 0.015	0.829 0.022	0.807 0.011	0.929 0.049	1.952 0.242	1.045 0.018	0.990 0.016	1.199 0.069	1.002 0.030	0.982 0.029	0.931 0.037	1.104 0.047	1.372 0.038	1.034 0.028
p53 pS15 R [3]	MW 0.028 SD 0.000	0.040 0.001	0.018 0.000	0.028 0.001	0.054 0.007	0.035 0.000	0.034 0.001	0.033 0.004	0.028 0.001	0.023 0.000	0.037 0.001	0.047 0.001	0.038 0.000	0.028 0.001
p53 pS20 R [3]	MW 0.034 SD 0.000	0.058 0.001	0.019 0.000	0.031 0.001	0.101 0.013	0.052 0.000	0.061 0.002	0.060 0.006	0.052 0.001	0.034 0.000	0.058 0.002	0.063 0.002	0.066 0.000	0.034 0.003
p53 pS392 R [3]	MW 0.025 SD 0.000	0.035 0.001	0.020 0.000	0.025 0.001	0.038 0.005	0.025 0.000	0.039 0.001	0.023 0.003	0.031 0.001	0.020 0.000	0.037 0.001	0.037 0.001	0.033 0.000	0.040 0.000
RSK 1 pS380 R	MW 2.682 SD 0.114	2.361 0.162	2.269 0.157	2.332 0.206	2.643 0.647	2.659 0.354	1.709 0.076	2.872 0.311	1.870 0.085	2.233 0.613	1.678 0.045	2.661 0.181	3.186 0.211	2.452 0.101
PAK 1/2/3 p S141 R	MW 23.462 SD 0.132	20.420 0.347	20.484 0.167	24.525 0.653	18.549 3.122	22.420 0.315	31.769 0.999	27.480 3.283	26.092 0.282	26.395 0.852	20.865 0.149	18.404 0.334	23.317 0.244	26.274 0.244
PKD 1 pS241 R	MW 17.188 SD 0.046	21.149 0.509	21.729 0.482	24.219 0.700	18.577 0.853	18.145 0.313	19.581 0.486	18.382 1.332	21.105 0.345	21.914 0.262	20.654 0.788	20.763 0.888	20.901 0.740	19.435 0.420
PI3K p85 pY458 / p55 pY199 R	MW 3.202 SD 0.016	3.834 0.067	3.697 0.054	3.829 0.168	2.676 0.508	4.021 0.086	3.711 0.033	4.328 0.477	3.781 0.021	3.883 0.141	2.964 0.005	3.987 0.098	4.283 0.035	4.084 0.090
PKA C ( $\alpha$ Kin. Ue.) pT197 R	MW 0.118 SD 0.004	0.159 0.008	0.109 0.005	0.097 0.005	0.127 0.005	0.104 0.005	0.098 0.002	0.115 0.009	0.098 0.005	0.086 0.004	0.111 0.005	0.164 0.007	0.118 0.004	0.091 0.005
PKA C ( $\alpha$ & $\beta$ Kin. Ue.) pT197 R	MW 2.030 SD 0.063	2.341 0.086	1.917 0.068	1.951 0.103	1.778 0.075	1.870 0.094	1.891 0.027	1.796 0.037	1.783 0.085	1.513 0.074	2.020 0.088	2.913 0.110	2.120 0.068	1.413 0.071
PTEN pS380 R	MW 0.400 SD 0.004	0.437 0.005	0.409 0.006	0.421 0.009	0.441 0.088	0.464 0.006	0.587 0.004	0.446 0.064	0.489 0.007	0.467 0.020	0.467 0.003	0.413 0.010	0.476 0.005	0.509 0.023

	B 11T6	B 13T1	B 29T2	B 29T4	B 39T1	B 45T1	B 45T2	B 50T3	B 62T1	B 62T2	B 66T1	B 75T1	H 1T1	H 1T2
Rb pS807/811 R	MW SD	0.047 0.050	0.043 0.001	0.054 0.001		0.053 0.000	0.057 0.002	0.071 0.007	0.066 0.001	0.076 0.002	0.069 0.001	0.048 0.001	0.089 0.003	0.093 0.008
STAT 1 pY701 R	MW SD	0.236 0.000	0.328 0.002	0.289 0.001	0.343 0.031	0.348 0.000	0.330 0.001	0.362 0.035	0.307 0.003	0.283 0.004	0.341 0.000	0.316 0.001	0.230 0.000	0.238 0.001
STAT 3 pY705 [2] R [2]	MW SD	1.436 0.005	1.527 0.015	2.134 0.036	2.126 0.049	1.918 0.037	1.619 0.012	1.666 0.079	1.786 0.051	2.812 0.136	1.695 0.009	1.816 0.035	1.492 0.016	1.071 0.006
STAT 3 pY705 [2] R [1]	MW SD	2.558 0.013	2.979 0.028	2.478 0.152	4.249 0.133	2.918 0.062	2.178 0.025	1.845 0.623	3.188 0.016	5.531 0.130	1.658 0.035	2.755 0.074	3.467 0.017	2.209 0.006
STAT 3 pS727 R [2]	MW SD	0.139 0.001	0.144 0.003	0.170 0.004	0.173 0.011	0.172 0.004	0.168 0.001	0.169 0.007	0.158 0.005	0.176 0.008	0.171 0.002	0.150 0.004	0.137 0.002	0.122 0.001
STAT 3 pS727 R [1]	MW SD	0.247 0.002	0.282 0.006	0.198 0.013	0.346 0.022	0.262 0.007	0.226 0.003	0.187 0.063	0.282 0.005	0.346 0.007	0.167 0.004	0.227 0.008	0.319 0.002	0.252 0.001
STAT 5 pY694 R	MW SD	0.553 0.026	0.528 0.020	0.873 0.017	0.814 0.004	0.574 0.014	0.548 0.015	0.562 0.037	0.720 0.018	0.703 0.018	0.506 0.015	0.641 0.015	0.656 0.032	0.437 0.009
Caspase 3 gD175 R	MW SD	0.062 0.003	0.060 0.001	0.038 0.002	0.051 0.003	0.053 0.003	0.040 0.001	0.081 0.004	0.050 0.001	0.056 0.001	0.047 0.001	0.058 0.003	0.056 0.001	0.037 0.002
Caspase 7 gD198 R	MW SD	0.136 0.006	0.169 0.005	0.098 0.008	0.112 0.004	0.093 0.005	0.153 0.004	0.130 0.009	0.089 0.005	0.108 0.006	0.132 0.003	0.132 0.006	0.130 0.008	0.111 0.007

	H_2T4	H_8T1	H_11T1	H_16T5	H_21T1	H_21T3	H_33T1	H_37T7	H_37T10	H_38T1	H_39T2	H_55T4	H_61T4	H_66T3
Akt pS473 R [1]	MW SD	0.088 0.013	0.088 0.008	0.104 0.009	0.689 0.121	0.091 0.001	0.117 0.012	0.103 0.010	0.117 0.009	0.086 0.007	0.075 0.007	0.127 0.014	0.086 0.011	0.103 0.011
Akt pS473 R [2]	MW SD	0.211 0.010	0.317 0.046	0.335 0.019	1.812 0.356	0.335 0.005	0.285 0.029	0.331 0.032	0.439 0.031	0.353 0.030	0.199 0.015	0.398 0.050	0.249 0.028	0.218 0.017
Akt pT308 R [1]	MW SD	0.992 0.037	0.942 0.058	1.033 0.062	1.256 0.049	0.689 0.013	0.924 0.052	1.023 0.035	0.920 0.040	1.099 0.032	0.735 0.052	0.747 0.038	0.626 0.048	0.666 0.054
Akt pT308 R [2]	MW SD	3.371 0.066	3.408 0.216	3.069 0.092	3.300 0.314	2.538 0.048	2.245 0.106	3.279 0.115	3.468 0.071	4.520 0.133	1.938 0.071	2.330 0.187	1.806 0.084	1.412 0.029
AMPK $\alpha$ pT172 R	MW SD	9.395 0.126	12.296 0.122	8.210 0.122	7.998 0.085	14.285 0.688	12.465 0.443	14.316 0.212	12.374 0.132	17.632 0.308	13.466 0.318	7.940 0.352	17.205 0.252	11.706 0.639
Bad pS112 R	MW SD	1.535 0.032	1.155 0.045	2.938 0.077	2.502 0.056	0.877 0.056	0.949 0.057	0.868 0.044	1.285 0.115	1.133 0.045	1.470 0.102	0.747 0.052	0.773 0.026	1.049 0.057
$\beta$ -Cat. pS45 R [3]	MW SD	0.013 0.000	0.017 0.000	0.032 0.000	0.021 0.000	0.047 0.002	0.015 0.000	0.022 0.000	0.018 0.001	0.020 0.001	0.015 0.000	0.023 0.001	0.012 0.000	0.014 0.000
$\beta$ -Cat. pS33/37/41 R [3]	MW SD	0.089 0.003	0.115 0.002	0.226 0.001	0.160 0.003	0.102 0.002	0.177 0.004	0.118 0.003	0.129 0.005	0.050 0.001	0.141 0.002	0.149 0.009	0.094 0.001	0.158 0.002
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [3]	MW SD	0.020 0.001	0.025 0.001	0.054 0.001	0.031 0.000	0.053 0.002	0.027 0.001	0.032 0.001	0.028 0.001	0.023 0.000	0.029 0.000	0.039 0.002	0.025 0.000	0.027 0.000
b-Raf pS445 R	MW SD	0.133 0.001	0.127 0.001	0.142 0.002	0.133 0.002	0.149 0.007	0.126 0.005	0.143 0.004	0.108 0.001	0.117 0.001	0.131 0.003	0.108 0.024	0.109 0.004	0.125 0.004
c-Jun pS73 R	MW SD	1.089 0.007	1.144 0.042	0.627 0.017	1.064 0.003	0.581 0.004	1.139 0.006	1.024 0.015	0.786 0.008	0.850 0.005	1.345 0.102	1.137 0.102	0.957 0.029	0.957 0.001
c-Jun pS63 [1] R	MW SD	1.279 0.008	1.303 0.037	0.793 0.021	1.249 0.003	0.824 0.007	1.227 0.006	1.231 0.018	1.081 0.009	1.167 0.006	1.434 0.016	0.944 0.075	1.233 0.036	1.165 0.002
c-Met pY1349 R [1]	MW SD	0.662 0.005	0.649 0.023	0.951 0.012	0.724 0.012	0.578 0.018	0.777 0.011	0.843 0.012	0.710 0.011	0.574 0.020	0.698 0.025	0.803 0.075	0.806 0.021	0.654 0.003
c-Met pY1230/1234/1235 R [1]	MW SD	10.138 0.022	6.464 0.279	10.519 0.095	7.321 0.128	7.234 0.239	8.110 0.115	8.104 0.135	6.302 0.302	8.570 0.167	6.201 0.249	6.837 0.818	7.128 0.231	7.910 0.035
c-Myc pT58/S62 R [1]	MW SD	0.170 0.001	0.153 0.006	0.206 0.005	0.137 0.001	0.209 0.006	0.153 0.000	0.165 0.003	0.161 0.003	0.152 0.003	0.219 0.007	0.166 0.017	0.187 0.010	0.215 0.008
c-Raf pS259 R	MW SD	2.025 0.032	1.906 0.010	2.469 0.023	2.152 0.045	2.212 0.154	2.261 0.064	2.175 0.058	2.055 0.022	1.845 0.030	2.210 0.085	1.473 0.192	2.029 0.043	2.074 0.067
c-Raf pS338 R	MW SD	0.933 0.009	0.846 0.008	1.121 0.007	0.784 0.002	1.169 0.079	0.743 0.009	0.828 0.014	1.090 0.010	0.880 0.003	0.846 0.019	0.806 0.084	0.753 0.019	1.077 0.024
CREB pS133 [2] R	MW SD	0.180 0.001	0.204 0.008	0.393 0.001	0.361 0.009	0.221 0.002	0.313 0.008	0.358 0.006	0.288 0.001	0.112 0.001	0.315 0.006	0.282 0.024	0.455 0.008	0.326 0.014
CREB pS133 [1] R	MW SD	0.110 0.000	0.103 0.005	0.134 0.000	0.128 0.000	0.093 0.003	0.101 0.000	0.110 0.000	0.109 0.000	0.051 0.000	0.132 0.002	0.123 0.012	0.171 0.001	0.129 0.002
EGFR pY845 R [2]	MW SD	2.555 0.082	3.454 0.221	2.307 0.063	2.953 0.038	1.617 0.004	2.229 0.015	2.222 0.061	1.958 0.058	2.130 0.045	2.956 0.059	2.237 0.325	1.689 0.041	2.067 0.018
EGFR pY1173 R [2]	MW SD	7.347 0.029	10.816 0.483	6.174 0.177	8.683 0.076	4.122 0.055	7.553 0.071	5.633 0.050	4.569 0.053	4.430 0.036	14.263 0.369	7.262 0.655	4.111 0.028	6.695 0.126
Eik-1 pS383 [2] R	MW SD	1.589 0.057	1.680 0.061	2.601 0.072	1.719 0.038	3.559 0.034	1.617 0.043	1.839 0.049	1.869 0.033	1.558 0.076	1.459 0.067	2.086 0.188	1.481 0.080	1.171 0.018
Eik-1 pS383 [1] R	MW SD	1.928 0.011	1.550 0.013	2.544 0.013	1.780 0.043	2.551 0.040	1.277 0.031	2.208 0.040	2.176 0.016	1.761 0.027	1.649 0.040	1.560 0.162	1.864 0.037	1.242 0.031
Erk 1/2 pT202/Y204 R	MW SD	0.209 0.008	0.424 0.008	0.174 0.002	0.445 0.023	0.459 0.019	0.361 0.026	0.443 0.015	0.383 0.013	0.443 0.018	0.489 0.021	0.284 0.012	0.378 0.015	0.325 0.017

	H 2T4	H 8T1	H 11T1	H 16T5	H 21T1	H 21T3	H 33T1	H 37T7	H 37T10	H 38T1	H 39T2	H 55T4	H 61T4	H 66T3
GSK3 $\beta$ pS9 R	MW 0.345	0.448	0.449	0.449	0.537	0.313	0.528	0.459	0.464	0.462	0.459	0.336	0.446	0.375
	SD 0.005	0.019	0.010	0.008	0.026	0.005	0.009	0.013	0.010	0.016	0.015	0.053	0.016	0.008
Histon H3 pS10 R	MW 0.001	0.000	0.001	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
	SD 0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Histon H3 ak18 R	MW 0.055	0.006	0.010	0.016	0.006	0.004	0.029	0.023	0.006	0.011	0.018	0.003	0.007	0.020
	SD 0.005	0.002	0.000	0.001	0.001	0.000	0.007	0.001	0.001	0.000	0.003	0.001	0.004	0.008
Histon H3 ak23 R	MW 0.011	0.023	0.011	0.020	0.025	0.021	0.016	0.015	0.016	0.014	0.016	0.021	0.013	0.012
	SD 0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.003	0.001	0.000
Histon H3 ak9 & pS10 R	MW 0.000	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.001	0.002	0.003	0.002	0.001	0.001	0.001	0.000
	SD 0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
IKB pS32 R	MW 38.274	97.252	24.458	26.534	29.954	16.149	45.143	39.335	32.079	87.614	63.926	15.621	48.596	52.472
	SD 0.904	7.497	0.776	1.041	0.879	0.748	2.576	2.303	0.415	20.095	9.337	1.632	4.853	6.550
JNK/SAPK pT183/Y185 R	MW 4.654	5.330	3.448	6.984	1.511	3.624	7.324	6.269	4.877	5.268	5.550	4.041	4.612	2.930
	SD 0.071	0.300	0.056	0.185	0.042	0.066	0.198	0.119	0.158	0.175	0.364	0.371	0.163	0.099
MDM2 pS166 R	MW 1.040	0.989	0.797	0.812	0.711	0.871	0.669	0.894	1.106	0.863	0.840	0.861	0.798	0.629
	SD 0.004	0.041	0.007	0.002	0.019	0.007	0.006	0.026	0.033	0.004	0.019	0.065	0.014	0.008
MEK 1/2 pS217/221 R [1]	MW 2.275	3.033	4.247	5.705	1.263	7.077	3.041	6.622	5.825	3.172	4.968	2.494	5.788	2.768
	SD 0.009	0.041	0.019	0.220	0.001	0.247	0.106	0.121	0.107	0.059	0.017	0.389	0.090	0.117
MEK 1/2 pS217/221 R [2]	MW 2.837	4.333	2.404	7.398	2.409	3.803	2.984	6.787	7.449	3.002	6.975	2.892	6.029	4.165
	SD 0.013	0.078	0.006	0.119	0.039	0.173	0.031	0.096	0.138	0.049	0.065	0.303	0.088	0.039
mTOR pS2481 R	MW 0.130	0.197	0.185	0.165	0.186	0.190	0.135	0.160	0.173	0.154	0.162	0.268	0.149	0.162
	SD 0.002	0.006	0.001	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006	0.002	0.003	0.002	0.029	0.003	0.006
mTOR pS2448 R	MW 0.715	1.086	1.282	0.986	1.148	1.295	0.900	1.019	1.066	0.824	0.808	1.531	0.986	0.903
	SD 0.013	0.026	0.010	0.038	0.041	0.052	0.040	0.036	0.006	0.014	0.023	0.207	0.029	0.035
p38/MAKP pT180/Y182 R	MW 1.487	1.224	0.943	1.472	1.194	1.286	1.483	1.406	1.305	1.510	1.426	1.118	1.360	1.490
	SD 0.035	0.012	0.014	0.041	0.036	0.022	0.067	0.034	0.021	0.038	0.056	0.186	0.048	0.070
p63 pS6 R [3]	MW 1.157	1.609	1.300	1.006	0.887	0.896	1.014	1.104	0.978	1.141	1.146	1.541	0.988	0.910
	SD 0.009	0.007	0.011	0.017	0.007	0.024	0.017	0.008	0.014	0.021	0.016	0.135	0.018	0.009
p63 pS15 R [3]	MW 0.037	0.028	0.058	0.033	0.037	0.038	0.031	0.031	0.030	0.023	0.032	0.052	0.025	0.023
	SD 0.001	0.002	0.002	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.000	0.001	0.006	0.001	0.000
p63 pS20 R [3]	MW 0.057	0.047	0.092	0.043	0.043	0.050	0.051	0.044	0.051	0.031	0.057	0.122	0.032	0.045
	SD 0.001	0.002	0.000	0.000	0.002	0.001	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.011	0.001	0.000
p63 pS392 R [3]	MW 0.023	0.023	0.052	0.031	0.023	0.043	0.028	0.039	0.032	0.036	0.031	0.046	0.026	0.015
	SD 0.001	0.002	0.002	0.000	0.001	0.002	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.005	0.001	0.000
RSK 1 pS380 R	MW 1.495	3.753	2.623	3.546	1.962	6.252	2.864	3.604	3.537	2.465	3.549	3.762	3.796	2.742
	SD 0.042	0.048	0.043	0.276	0.021	0.246	0.122	0.118	0.096	0.053	0.153	0.346	0.084	0.150
PAK 1/2/3 p S141 R	MW 25.837	24.950	32.077	23.473	29.528	12.322	28.473	24.593	26.563	36.015	23.947	23.947	26.348	18.375
	SD 0.107	0.673	0.348	0.060	0.532	0.132	0.404	0.338	0.346	0.283	0.201	3.371	0.373	0.168
PDK 1 pS241 R	MW 19.861	26.378	23.042	23.779	26.732	18.033	20.543	20.175	21.341	20.478	20.907	18.250	23.698	20.365
	SD 0.422	1.144	0.371	0.465	1.756	0.317	0.312	0.330	0.394	0.055	0.460	1.327	0.681	0.447
PI3K p85 pY458 / p55 pY199 R	MW 3.782	3.989	3.847	3.713	2.502	3.565	3.722	4.181	3.462	4.044	4.433	3.593	4.767	3.765
	SD 0.027	0.103	0.010	0.046	0.077	0.065	0.109	0.033	0.057	0.117	0.026	0.423	0.087	0.005
PKA C ( $\alpha$ Kin. Ue.) pT197 R	MW 0.077	0.100	0.145	0.101	0.105	0.198	0.107	0.139	0.126	0.096	0.109	0.109	0.140	0.071
	SD 0.001	0.006	0.002	0.004	0.003	0.005	0.008	0.006	0.006	0.005	0.005	0.010	0.006	0.003
PKA C ( $\alpha$ & $\beta$ Kin. Ue.) pT197 R	MW 1.460	1.868	2.081	1.879	1.170	3.116	2.118	2.041	2.006	1.906	1.798	2.311	2.281	1.441
	SD 0.022	0.077	0.030	0.067	0.039	0.069	0.148	0.087	0.076	0.093	0.085	0.066	0.100	0.067
PTEN pS380 R	MW 0.473	0.434	0.486	0.456	0.886	0.523	0.493	0.465	0.480	0.465	0.472	0.467	0.460	0.464
	SD 0.016	0.012	0.003	0.004	0.012	0.018	0.009	0.017	0.006	0.017	0.013	0.084	0.010	0.008

	H 2T4	H 8T1	H 11T1	H 16T5	H 21T1	H 21T3	H 33T1	H 37T7	H 37T10	H 38T1	H 39T2	H 55T4	H 61T4	H 66T3
Rb pS807/811 R	MW 0.123 SD 0.003	0.058 0.005	0.056 0.002	0.057 0.001	0.049 0.001	0.018 0.001	0.063 0.001	0.069 0.002	0.060 0.002	0.047 0.002		0.082 0.013	0.098 0.004	0.104 0.003
STAT 1 pY701 R	MW 0.211 SD 0.001	0.328 0.004	0.246 0.000	0.374 0.001	0.372 0.005	0.285 0.001	0.332 0.002	0.239 0.002	0.332 0.002	0.196 0.003	0.221 0.001	0.407 0.040	0.263 0.001	0.275 0.002
STAT 3 pY705 [2] R [2]	MW 1.459 SD 0.011	1.591 0.028	1.440 0.008	1.466 0.013	1.915 0.019	1.009 0.015	1.922 0.055	1.689 0.018	1.589 0.001	1.288 0.011	1.709 0.039	2.709 0.109	1.544 0.047	1.619 0.029
STAT 3 pY705 [2] R [1]	MW 2.276 SD 0.080	3.428 0.069	2.496 0.017	2.997 0.010	1.312 0.021	2.063 0.133	3.441 0.016	3.187 0.026	2.560 0.024	2.687 0.007	3.853 0.066	4.215 0.277	3.270 0.047	2.516 0.014
STAT 3 pS727 R [2]	MW 0.152 SD 0.003	0.164 0.002	0.145 0.001	0.146 0.002	0.161 0.002	0.115 0.003	0.161 0.005	0.153 0.002	0.152 0.000	0.126 0.002	0.148 0.004	0.225 0.012	0.141 0.005	0.145 0.004
STAT 3 pS727 R [1]	MW 0.237 SD 0.009	0.353 0.006	0.252 0.002	0.299 0.003	0.110 0.002	0.236 0.016	0.289 0.005	0.288 0.004	0.245 0.002	0.262 0.002	0.333 0.006	0.350 0.026	0.299 0.006	0.225 0.005
STAT 5 pY694 R	MW 0.560 SD 0.004	0.671 0.061	0.449 0.014	0.525 0.013	0.352 0.018	0.855 0.046	0.424 0.031	0.772 0.011	0.710 0.009	0.674 0.027	0.569 0.025	0.642 0.058	0.833 0.011	0.530 0.009
Caspase 3 gD175 R	MW 0.057 SD 0.001	0.058 0.002	0.062 0.002	0.056 0.001	0.049 0.002	0.109 0.006	0.045 0.001	0.046 0.001	0.045 0.001	0.042 0.001	0.046 0.001	0.059 0.004	0.048 0.001	0.048 0.001
Caspase 7 gD198 R	MW 0.126 SD 0.006	0.119 0.006	0.159 0.005	0.105 0.005	0.094 0.008	0.179 0.009	0.091 0.007	0.104 0.006	0.150 0.007	0.095 0.011	0.099 0.007	0.224 0.031	0.089 0.008	0.101 0.002



	H78T1	H79T1	N 3	N 6	N 7	N 9	N 10	N 12	N 17	N 19	N 20	N 24
Akt pS473 R [1]	MW 0.121	0.111	0.079	0.100	0.309	0.099	0.077	0.169	0.083	0.095	0.062	0.105
	SD	0.015	0.005	0.004	0.025	0.008	0.004	0.010	0.009	0.007	0.004	0.004
Akt pS473 R [2]	MW 0.275	0.316	0.275	0.283	1.076	0.219	0.238	0.506	0.242	0.200	0.225	0.248
	SD	0.030	0.040	0.016	0.002	0.088	0.009	0.025	0.036	0.010	0.008	0.004
Akt pT308 R [1]	MW 1.163	0.869	0.969	0.914	0.986	0.858	0.979	0.833	0.760	0.747	0.703	0.593
	SD	0.088	0.063	0.036	0.041	0.034	0.067	0.050	0.088	0.050	0.044	0.020
Akt pT308 R [2]	MW 2.643	2.465	3.364	2.583	3.429	1.897	3.022	2.495	2.204	1.576	2.568	1.399
	SD	0.149	0.260	0.087	0.051	0.117	0.052	0.027	0.337	0.060	0.071	0.017
AMPK $\alpha$ pT172 R	MW 8.862	8.020	3.849	3.665	5.048	4.610	4.184	3.929	5.966	5.226	8.226	4.922
	SD	0.156	0.762	0.092	0.152	0.072	0.182	0.066	0.174	0.622	0.226	0.162
Bad pS112 R	MW 1.342	1.398	1.750	1.250	1.391	1.035	1.549	1.280	2.333	0.622	1.958	1.373
	SD	0.032	0.053	0.025	0.077	0.029	0.056	0.037	0.150	0.035	0.038	0.033
$\beta$ -Cat. pS45 R [3]	MW 0.023	0.020	0.052	0.034	0.031	0.028	0.024	0.027	0.028	0.018	0.019	0.022
	SD	0.000	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000
$\beta$ -Cat. pS33/37/T41 R [3]	MW 0.084	0.204	0.227	0.264	0.267	0.183	0.144	0.222	0.326	0.268	0.195	0.276
	SD	0.001	0.022	0.002	0.003	0.002	0.003	0.004	0.031	0.005	0.004	0.004
$\beta$ -Cat. pT41/S45 R [3]	MW 0.030	0.040	0.042	0.044	0.051	0.041	0.033	0.039	0.042	0.036	0.034	0.039
	SD	0.000	0.004	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000	0.009	0.001	0.001	0.000
b-Raf pS445 R	MW 0.142	0.101	0.102	0.110	0.115	0.107	0.103	0.117	0.065	0.101	0.103	0.090
	SD	0.003	0.010	0.001	0.017	0.005	0.002	0.026	0.007	0.003	0.001	0.007
c-Jun pS73 R	MW 0.935	1.231	0.605	1.084	0.967	1.056	0.880	1.145	1.530	1.495	1.756	1.080
	SD	0.023	0.140	0.001	0.020	0.003	0.004	0.021	0.241	0.011	0.022	0.006
c-Jun pS63 [1] R	MW 1.269	1.107	0.785	1.255	1.139	1.174	1.012	0.940	1.313	1.326	1.299	1.184
	SD	0.031	0.152	0.010	0.006	0.015	0.004	0.007	0.210	0.010	0.016	0.008
c-Met pY1349 R [1]	MW 0.821	0.636	0.672	0.589	0.588	0.512	0.214	0.576	0.482	0.550	0.734	0.447
	SD	0.015	0.054	0.011	0.014	0.008	0.014	0.007	0.038	0.001	0.006	0.013
c-Met pY1230/1234/1235 R [1]	MW 9.772	5.785	5.723	5.190	5.708	4.346	3.967	6.470	3.964	4.501	4.578	3.169
	SD	0.176	0.566	0.073	0.124	0.080	0.120	0.173	0.407	0.045	0.138	0.091
c-Myc pT58/S62 R [1]	MW 0.200	0.166	0.193	0.133	0.129	0.137	0.138	0.146	0.110	0.134	0.170	0.152
	SD	0.005	0.018	0.003	0.002	0.002	0.002	0.002	0.012	0.003	0.007	0.002
c-Raf pS259 R	MW 2.293	1.547	1.604	1.887	1.657	1.831	1.729	1.789	1.223	1.808	2.500	1.907
	SD	0.027	0.137	0.023	0.081	0.034	0.040	0.114	0.104	0.034	0.065	0.056
c-Raf pS338 R	MW 0.770	0.853	0.876	0.754	0.841	0.743	0.835	0.752	0.792	0.763	0.749	0.843
	SD	0.012	0.096	0.011	0.033	0.011	0.014	0.048	0.090	0.014	0.014	0.019
CREB pS133 [2] R	MW 0.432	0.239	0.163	0.227	0.158	0.271	0.165	0.164	0.223	0.237	0.457	0.252
	SD	0.014	0.022	0.001	0.004	0.001	0.001	0.002	0.030	0.002	0.003	0.002
CREB pS133 [1] R	MW 0.148	0.129	0.096	0.136	0.083	0.098	0.063	0.053	0.110	0.147	0.112	0.169
	SD	0.002	0.010	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.012	0.001	0.001	0.002
EGFR pY845 R [2]	MW 2.186	3.120	0.991	1.107	1.032	0.814	0.863	1.062	1.456	1.450	2.104	1.843
	SD	0.047	0.327	0.037	0.010	0.020	0.010	0.016	0.140	0.012	0.046	0.025
EGFR pY1173 R [2]	MW 6.254	12.937	5.249	3.994	4.345	4.199	3.602	4.825	7.360	6.567	6.765	10.634
	SD	0.140	1.932	0.076	0.028	0.039	0.022	0.153	0.872	0.015	0.077	0.028
Elk-1 pS383 [2] R	MW 1.789	2.323	0.300	0.334	0.364	0.428	0.319	0.564	0.569	0.343	0.508	0.284
	SD	0.051	0.177	0.014	0.017	0.019	0.023	0.034	0.031	0.019	0.030	0.016
Elk-1 pS383 [1] R	MW 2.152	1.728	0.481	0.422	0.467	0.527	0.443	0.566	0.623	0.484	0.787	0.356
	SD	0.033	0.138	0.010	0.020	0.019	0.021	0.016	0.048	0.014	0.023	0.018
Erk 1/2 pT202/Y204 R	MW 0.326	0.307	0.098	0.079	0.113	0.135	0.194	0.103	0.205	0.151	0.094	0.174
	SD	0.007	0.025	0.003	0.002	0.003	0.006	0.003	0.011	0.005	0.002	0.006

	H.78T1	H.79T1	N 3	N 6	N 7	N 9	N 10	N 12	N 17	N 19	N 20	N 24
GSK3 β pS9 R	MW 0.467	0.287	0.184	0.165	0.332	0.147	0.150	0.212	0.113	0.205	0.233	0.197
	SD 0.011	0.042	0.009	0.003	0.001	0.003	0.003	0.004	0.018	0.006	0.008	0.002
Histon H3 pS10 R	MW 0.001	0.000	0.005	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001
	SD 0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
Histon H3 ak18 R	MW 0.023	0.002	0.033	0.018	0.021	0.022	0.019	0.014	0.003	0.015	0.015	0.007
	SD 0.001	0.000	0.006	0.001	0.004	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002	0.003	0.000
Histon H3 ak23 R	MW 0.013	0.021	0.058	0.032	0.037	0.029	0.036	0.026	0.031	0.029	0.017	0.035
	SD 0.001	0.002	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.000	0.001
Histon H3 ak9 & pS10 R	MW 0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SD 0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
IkB pS32 R	MW 26.543	16.420	29.772	25.847	36.008	25.110	22.022	23.167	25.775	24.382	25.950	26.640
	SD 1.638	1.364	0.541	0.894	1.889	0.970	0.523	0.719	3.153	1.646	1.096	1.056
JNK/SAPK pT183/Y185 R	MW 5.187	4.025	1.939	2.334	3.571	4.251	2.772	2.701	2.776	2.459	2.285	2.193
	SD 0.244	0.438	0.032	0.039	0.003	0.088	0.031	0.043	0.305	0.021	0.022	0.035
MDM2 pS166 R	MW 0.715	0.790	0.856	0.565	0.969	0.668	1.033	0.742	0.958	0.839	0.999	0.815
	SD 0.004	0.081	0.028	0.008	0.004	0.002	0.012	0.010	0.100	0.006	0.016	0.015
MEK 1/2 pS217/221 R [1]	MW 6.052	6.026	1.775	1.036	0.976	1.107	0.977	0.716	0.992	0.929	1.525	0.682
	SD 0.178	0.588	0.041	0.019	0.010	0.037	0.012	0.033	0.009	0.031	0.009	0.037
MEK 1/2 pS217/221 R [2]	MW 6.043	5.152	2.287	1.515	1.675	1.793	1.728	1.773	1.777	1.622	1.838	1.504
	SD 0.147	0.476	0.050	0.032	0.018	0.035	0.018	0.043	0.173	0.008	0.008	0.016
mTOR pS2481 R	MW 0.145	0.237	0.218	0.220	0.220	0.210	0.215	0.235	0.320	0.285	0.166	0.260
	SD 0.003	0.028	0.002	0.005	0.003	0.004	0.003	0.013	0.041	0.006	0.003	0.004
mTOR pS2448 R	MW 0.884	1.474	0.766	0.729	0.949	0.836	0.754	0.972	1.336	1.160	0.655	1.080
	SD 0.022	0.163	0.033	0.016	0.012	0.018	0.019	0.052	0.155	0.024	0.015	0.017
p38/MAPK pT180/Y182 R	MW 1.390	1.113	1.523	1.090	1.009	1.374	1.309	0.640	1.262	1.365	0.979	1.353
	SD 0.016	0.213	0.036	0.058	0.039	0.065	0.037	0.028	0.137	0.037	0.034	0.056
p53 pS6 R [3]	MW 1.145	1.325	0.712	0.812	0.859	0.742	0.882	0.915	0.872	0.829	0.901	0.895
	SD 0.017	0.032	0.008	0.038	0.014	0.016	0.029	0.070	0.032	0.017	0.005	0.060
p53 pS15 R [3]	MW 0.034	0.038	0.022	0.028	0.033	0.025	0.021	0.030	0.031	0.025	0.024	0.027
	SD 0.001	0.004	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.003	0.000	0.000	0.002
p53 pS20 R [3]	MW 0.055	0.060	0.017	0.029	0.034	0.025	0.023	0.032	0.039	0.025	0.034	0.019
	SD 0.000	0.006	0.001	0.001	0.001	0.000	0.001	0.002	0.005	0.000	0.001	0.001
p53 pS392 R [3]	MW 0.037	0.031	0.021	0.022	0.023	0.018	0.019	0.028	0.021	0.018	0.025	0.019
	SD 0.001	0.003	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.002	0.003	0.000	0.000	0.001
RSK 1 pS380 R	MW 3.516	5.350	0.479	0.364	0.437	0.604	0.539	0.374	0.658	0.863	0.973	0.579
	SD 0.143	0.381	0.003	0.009	0.003	0.017	0.011	0.006	0.086	0.014	0.011	0.007
PAK 1/2/3 p S141 R	MW 26.927	20.463	13.867	10.528	15.494	11.729	11.646	11.394	13.722	11.802	15.325	10.837
	SD 0.307	1.647	0.280	0.526	0.483	0.328	0.214	0.412	0.944	0.099	0.174	0.505
PKD 1 pS241 R	MW 22.832	24.023	16.915	12.987	12.234	16.590	16.196	14.956	15.467	15.773	17.775	13.290
	SD 1.022	1.820	0.268	0.209	0.057	0.294	0.071	0.203	2.064	0.059	0.156	0.075
PI3K p85 pY458 / p55 pY199 R	MW 4.050	4.485	3.986	4.480	4.105	4.434	4.718	4.392	4.689	5.120	4.386	4.359
	SD 0.103	0.191	0.064	0.150	0.024	0.022	0.023	0.281	0.403	0.057	0.021	0.067
PKA C (α Kin. Ue.) pT197 R	MW 0.124	0.138	0.091	0.099	0.092	0.103	0.092	0.104	0.117	0.091	0.143	0.096
	SD 0.004	0.021	0.003	0.003	0.004	0.002	0.002	0.004	0.011	0.003	0.003	0.003
PKA C (α & β Kin. Ue.) pT197 R	MW 1.942	2.749	1.113	1.287	1.365	1.283	1.479	1.461	1.619	1.589	1.224	1.352
	SD 0.060	0.186	0.020	0.042	0.058	0.019	0.037	0.052	0.053	0.051	0.020	0.035
PTEN pS380 R	MW 0.491	0.462	0.555	0.479	0.461	0.458	0.449	0.474	0.435	0.444	0.421	0.440
	SD 0.010	0.070	0.031	0.011	0.007	0.008	0.005	0.010	0.059	0.003	0.010	0.010

	H 78T1	H 79T1	N 3	N 6	N 7	N 9	N 10	N 12	N 17	N 19	N 20	N 24
Rb pS807/811 R	MW 0.057	0.049	0.052	0.066	0.055	0.043	0.022	0.054	0.040	0.070	0.081	0.052
	SD 0.002	0.013	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001	0.012	0.002	0.001	0.000
STAT 1 pY701 R	MW 0.306	0.322	0.466	0.538	0.544	0.548	0.564	0.548	0.659	0.646	0.108	0.435
	SD 0.002	0.023	0.005	0.002	0.002	0.004	0.001	0.004	0.059	0.007	0.001	0.003
STAT 3 pY705 [2] R [2]	MW 1.439	1.825	1.631	2.796	2.778	1.745	1.709	1.707	2.174	1.979	2.812	3.636
	SD 0.012	0.132	0.003	0.018	0.012	0.006	0.004	0.040	0.170	0.014	0.013	0.047
STAT 3 pY705 [2] R [1]	MW 2.794	3.865	0.690	0.673	0.763	1.045	0.910	0.829	2.045	0.745	2.642	0.924
	SD 0.069	0.343	0.002	0.080	0.109	0.107	0.045	0.119	0.267	0.149	0.075	0.156
STAT 3 pS727 R [2]	MW 0.148	0.165	0.181	0.236	0.238	0.149	0.173	0.142	0.199	0.195	0.193	0.273
	SD 0.001	0.017	0.002	0.007	0.006	0.004	0.003	0.005	0.023	0.005	0.003	0.009
STAT 3 pS727 R [1]	MW 0.287	0.349	0.076	0.057	0.065	0.089	0.092	0.069	0.187	0.073	0.182	0.069
	SD 0.007	0.039	0.001	0.007	0.009	0.009	0.005	0.010	0.029	0.015	0.006	0.012
STAT 5 pY694 R	MW 1.006	0.628	0.419	0.388	0.551	0.615	0.521	0.417	0.814	0.685	0.553	0.503
	SD 0.032	0.097	0.014	0.017	0.031	0.016	0.011	0.019	0.074	0.022	0.018	0.016
Caspase 3 gD175 R	MW 0.052	0.051	0.097	0.071	0.075	0.073	0.074	0.090	0.068	0.068	0.061	0.069
	SD 0.001	0.004	0.002	0.004	0.002	0.001	0.002	0.005	0.007	0.001	0.001	0.002
Caspase 7 gD198 R	MW 0.131	0.140	0.098	0.072	0.080	0.052	0.083	0.078	0.075	0.057	0.084	0.063
	SD 0.007	0.009	0.001	0.004	0.005	0.002	0.005	0.002	0.007	0.005	0.006	0.002

## 9 Akademische Lehrer

Prof. Albert	Prof. Hamprecht	Prof. Quast
Prof. Bardele	Prof. Hanack	Prof. Rammensee
Dr. Bayer	Dr. Iglauer	Prof. Reutter
Prof. Bisswanger	Prof. Jäger	Dr. Sarrazin
Prof. Bock	Dr. Kalbacher	Prof. Schild
Prof. Bohley	Prof. Lindner	Prof. Schwarz
Prof. Breyer-Pfaff	Prof. Madeo	Prof. Selzer
Dr. Buchmann	PD Dr. Maier	Prof. Stevanović
Prof. Dringen	Prof. Mayer	Prof. Strähle
Prof. Duszenko	Prof. Mecke	Prof. Süßmuth
Prof. Eisele	PD Dr. Münzel	PD Dr. Verleysdonk
Prof. Fröhlich	Prof. Ninnemann	Prof. Wagner
Prof. Gauglitz	Prof. Oberhammer	Prof. Weber
Prof. Grabmayr	Prof. Osswald	Prof. Werringloer
Dr. Günzl	Prof. Pommer	Prof. Weser
Prof. Häfelinger	Prof. Probst	Prof. Quast

## 10 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

**Thomas Knorpp**

geboren am 30. Mai 1978 in Böblingen

verheiratet mit Stefanie Knorpp

### AUSBILDUNG

Oktober 2004 - Juni 2008

**DOKTORARBEIT**

Dissertation im Fach Biochemie.

Titel: "Untersuchung der differentiellen Aktivierung von zellulären Signalübertragungswegen in Maus-Lebertumoren mit Mutationen im *Ha-ras*-, *B-raf*- oder *Ctnnb1*-Onkogen mit Protein-Mikroarray-basierten Methoden".

Betreuer: Prof. Dr. Stefan Stevanović, Abteilung Immunologie, Interfakultäres Institut für Zellbiologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen,  
in Kooperation mit Dr. Markus F. Templin, Abteilung Protein Profiling und Assayentwicklung, Naturwissenschaftliches und medizinisches Institut an der Universität Tübingen (NMI), Reutlingen.

Januar 2004 - August 2004

**DIPLOMARBEIT**

Titel: "Untersuchungen zum Einfluss von chronischem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress auf die Glutaminsynthetase in Astrogliazellen".

Betreuer: Prof. Dr. Ralf Dringen,  
Interfakultäres Institut für Biochemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

April 1999 - Dezember 2003

**STUDIUM**

Biochemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Januar 1998 - Februar 1999

**ZIVILDienst**

Deutsches Rotes Kreuz, Sindelfingen.

1. Juli 1997

**ABITUR**

Allgemeine Hochschulreife, Mildred-Scheel-Schule, Böblingen.