

Aus der
Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie & Biomaterialbanken,
Sektionsleitung: Prof. Dr. Dr. med. J.K. Habermann,
der Klinik für Chirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Tobias Keck
der Universität zu Lübeck

**Vergleichende Proteomanalyse zwischen Colitis Ulcerosa assoziierten und
sporadischen kolorektalen Karzinomen nach Laser Capture Mikrodissektion**

**Comparative proteomic analysis of Ulcerative Colitis associated and Sporadic Colorectal
Cancer after Laser Capture Microdissection**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

Vorgelegt von
Sophie L. G. Kollbeck
aus Dresden

Lübeck 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jens Habermann PhD
2. Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.rer.nat. Frank Köster

Tag der mündlichen Prüfung 7.5.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 7.5.2019

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

INHALTVERZEICHNISS

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	6
Summary	7
1 Einleitung	8
1.1 Einführung in die Thematik	8
1.2 Das sporadische kolorektale Karzinom (SCC)	9
1.3 Das Colitis Ulcerosa assoziierte Karzinom (UCC)	14
1.4 Das sporadische und Colitis Ulcerosa assoziierte kolorektale Karzinom im Vergleich	20
2 Ziel der Arbeit und Fragestellung	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Proben	23
3.2 Chemikalien und Materialien	25
3.3 Methoden	25
4 Ergebnisse	38
4.1 Eigenschaften der Gewebeproben	38
4.2 Ergebnisse der vergleichenden Proteomanalyse	38
4.3 Signalweganalyse	47
4.4 Validierung durch Western Blot und Immunhistochemie	55
5 Diskussion	58
5.1 Repräsentativität der Kohorten in Bezug auf ihre Merkmalsausprägung	59
5.2 Vorteile der Aufbewahrung und Analyse kryokonservierter Proben	59
5.3 Probengewinnung- Die Limitation der Laser Capture Mikrodissektion	60
5.4 Beurteilung des optimierten Arbeitsablaufes zur Charakterisierung von Zielproteinen durch 2-dimensionaler Multiplex-Fluoreszenz Gelelektrophorese und Massenspektrometrie	61

5.5	Darstellung und Interpretation der Expressionsmuster von SCC, UCC und deren aneuploiden und euploiden Subpopulationen	62
5.6	Potenzielle Zielproteine von Colitis Ulcerosa assoziierten Tumorzellen	65
5.7	Tumorheterogenität als Parameter für Prognose und Therapieerfolg	69
5.8	Zusammenfassung und Ausblick	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Anhang	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau des Dickdarms	9
Abbildung 2	Zeitlicher Ablauf vom Auftreten von Mutationen in entzündungsassoziierten und sporadischen kolorektalen Karzinogenese	21
Abbildung 3	Arbeitsablauf des experimentellen Teils	25
Abbildung 4	Schema der Laserdissektion	27
Abbildung 5	Tumorgewebe in Toluidin Blau	27
Abbildung 6	Schema der zweidimensionalen Gelelektrophorese	29
Abbildung 7	Hauptkomponenten Analyse - Outlier	40
Abbildung 8	Exemplarische Hauptkomponenten Analyse	40
Abbildung 9	Von der Auswahl der Proben bis zur Identifikation potentieller Zielproteine	41
Abbildung 10	Heatmap der Expressionsdaten SCC vs. UCC	52
Abbildung 11	exemplarisches Netzwerk UCC vs. SCC	53
Abbildung 12	exemplarisches Netzwerk SCC aneuploid vs. UCC aneuploid	54
Abbildung 13	Heatmap der Expressionsdaten SCC aneuploid s. UCC aneuploid	55
Abbildung 14	Western Blot der Targetproteine EB1 und HSP27	56
Abbildung 15	Immunhistochemische Evaluation von EB1	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht der untersuchten Proben	24
Tabelle 2	Arbeitsschritte der Toluidin-Färbung	26
Tabelle 3	Protokoll der Proteinaufreinigung	28
Tabelle 4	Vorbereitung der Gelstücke	33
Tabelle 5	Massenspektrometrische Daten der untersuchten Proben	42
Tabelle 6	Übersicht der 2-DE DIGE und IPA Ergebnisse	47

Abkürzungsverzeichnis

A	Aneuploid
Anova	Analysis of Variance
ANXA5	Annexin 5
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
C	Celsius
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-
CIN	Chromosomale Instabilität
CMS	Consensus molecular subtype
CRC	kolorektales Karzinom
DAI	Disease activity Index
E	Euploid
ED	Erstdiagnose
EB1	Microtubule-associated protein R/EB family, member 1; Synonyme: APC binding Protein EB1; MAPRE
EGFR	epidermal growth factor receptor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
HE	Hamatoxylin-Eosin
HGD	High Grade Dysplasie
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma
HSPB1/HSP27	Heat shock 27 kDA protein 1
HSP	Heat shock Protein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	Immobilisierter pH Gradient
IBD	Inflammatory Bowel Disease
LCM	Laser Capture Microdissection
LGD	Low Grade Dysplasie
LOH	Loss of herterozygosity
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption
MAPRE1	Siehe EB1
MS	Massenspektrometer
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MW	Molecular Weight / Molekulare Masse
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
PCA	Principal Component Analysis
PI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptid mass fingerprint
QC	Quality Check
SCC	Sporadic Colorectal Cancer /sporadisches Kolorektales Karzinom
SDS	Sodium-dodecylsulfat
TMA	Tissue Micro Array
TOF	Time of Flight
UCC	Colitis Ulcerosa assoziierter Darmkrebs
UICC	Union internationale contre le cancer
UC	Colitis Ulcerosa
UV	Ultra Violett
vgl.	Vergleiche
Vh	Voltstunden

Zusammenfassung

Patienten mit langjähriger Colitis Ulcerosa besitzen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Neoplasien des Darms. Diese sind durch die bestehenden intensiven und kostspieligen Überwachungsprogramme nur bedingt zu entdecken. Obwohl sich das sporadische kolorektale Karzinom (SCC) und Colitis Ulcerosa assoziierter Darmkrebs (UCC) maßgeblich in Morphologie und Tumorcharakteristika unterscheiden, waren vergleichende Proteomanalysen zwischen UCC und SCC bislang nur selten Gegenstand der Forschung. Die vorliegende Untersuchung dient der Identifikation und Validierung unterschiedlich exprimierter Proteine zwischen SCC und UCC. Ziel der Studie war es, neue Marker für Colitis Ulcerosa assoziierte Neoplasien zu identifizieren, um neue Einblicke in deren Karzinogenese und Progression zu gewinnen und somit neue Wege für Diagnose und Therapie zu ebnen.

Ein sorgfältig ausgesuchtes Kollektiv, bestehend aus 10 sporadischen und 10 Colitis Ulcerosa assoziierten kolorektalen Tumoren, wurde verwendet. Kanzeröse intestinale Tumorzellen wurden mittels Laser Capture Mikrodissektion gewonnen, deren Proteom isoliert und angereichert und mit Hilfe von 2-dimensionaler Multiplex-Fluoreszenz Gelelektrophorese verglichen. Unterschiedliche Proteinexpressionen wurden mit SameSpot®-Software detektiert und anschließend einer Principal Component Analyse unterzogen. Signifikante Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert und mittels Signalweganalyse evaluiert.

Im Vergleich von SCC- und UCC-Zellen konnten 199 unterschiedlich exprimierte Proteine entdeckt ($p < 0,05$), und davon mittels Massenspektrometrie 67 Proteine identifiziert werden. Darauf basierend wurden 3 Proteine [Microtubule-associated protein R/EB family, member 1 (EB1), Heat shock 27 kDA protein 1 (HSPB1), und Annexin 5 (ANXA5)] für eine weitere klinische Validierung mittels Western Blot ausgewählt. Die Expressionsdaten von EB1 konnten sowohl im Western Blot ($p = 0,0019$) als auch mittels Immunhistochemie im Vergleich zu normalem Kolongewebe validiert werden ($p = 0,0007$).

Diese Studie identifiziert signifikante Proteinunterschiede zwischen SCC und UCC und gibt somit neuartige Einsicht in Karzinogenese und Progression von SCC und UCC. EB1 scheint hierbei ein besonders vielversprechender Tumormarker zu sein.

Summary

Patients with long standing Ulcerative Colitis are at high risk of neoplastic development. UCCs are often difficult to detect in intensive and expensive surveillance programs. Furthermore, biological differences between Ulcerative Colitis associated carcinomas (UCC) and sporadic colorectal carcinomas (SCC) have not yet been thoroughly addressed on the protein level. This study aimed to identify and validate differentially expressed proteins between clinical samples of SCC and UCC to elucidate new insights of UCC/SCC carcinogenesis and progression to identify new diagnostic and therapeutic targets.

The material for analysis consisted of 10 samples of sporadic colorectal cancer and 10 samples of Ulcerative Colitis associated cancer. Proteins of cancerous intestinal tumor cells were obtained by Laser Capture Microdissection. The Proteome was isolated and enriched and further compared by multiplex-fluorescence two-dimensional gel electrophoresis. Differential protein expression was analyzed with SameSpot®-software and was followed by principal component analysis. Significant spots were identified by mass spectrometry and evaluated by Pathway Analysis.

Comparing the intact proteome of SCC and UCC cells, 199 differentially expressed proteins were detected ($p < 0.05$). Mass spectrometry identified 67 proteoforms. Hence three proteins [Microtubule-associated protein R/EB family, member 1 (EB1), Heat shock 27 kDA protein 1 (HSPB1), and Annexin 5 (ANXA5)] were chosen for further clinical validation with Western blotting. Differential expression of EB1 was validated by Western blotting ($p = 0.0019$) and by tissue microarray-based immunohistochemistry, where EB1-expression in SCC was compared to expression in normal colon tissue ($p = 0.0007$).

This study identified significant differences in protein expression of SCC compared to UCC while elucidating insights of SCC and UCC carcinogenesis and progression. Particularly, EB1 seems to have high potential as tumor biomarker.

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Patienten mit Colitis Ulcerosa haben ein erhöhtes Karzinomrisiko (Rosenquist et al., 1959; Svartz und Ernberg, 1949). Obwohl das Colitis Ulcerosa assoziierte kolorektale Karzinom (UCC) und das sporadische kolorektale Karzinom (SCC) aus dem gleichen Ursprungsgewebe entstehen, zeigt das UCC deutliche Unterschiede in Bezug auf Multifokalität, Art der Läsionen, Ausbreitung und Häufigkeit chromosomaler Instabilität und den zeitlichen Ablauf von Genmutationen (Scarpa et al., 2014). Heutige prognostische Marker des SCC sind nur bedingt auf UCCs anwendbar. Unzureichende Überwachungsmöglichkeiten mittels konventioneller Koloskopie, vielfach unrepräsentativen Biopsien, mangelnder Patientencompliance mit Abbruchraten von bis zu 25% und klinisch deutlich aggressiveren Tumoren im Vergleich zum SCC machen das UCC zu einer ganz besonderen klinischen Herausforderung. UCC spezifische Marker wären im Rahmen individualisierter Medizin von UC-Patienten daher von großer klinischer Bedeutung (Rutegård et al., 1988; Lennard-Jones et al., 1990; Löfberg et al., 1990; Lynch et al., 1993). Gegenwärtig sind allerdings keine verlässlichen Gewebe- oder Serummarker bekannt, die eine Aussage über Vorliegen, Remission, Rückfall oder unterschiedliches Therapieansprechen des UCCs zulassen. Somit erscheint ein besseres Verständnis der Unterschiede zwischen SCC und UCC und der Entstehung von UCCs notwendig zu sein. Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich eher auf Unterschiede auf Gen-Ebene und wurden hauptsächlich an paraffiniertem Gewebe oder seltener an Zellkulturen durchgeführt (Mikami et al., 2011). Welche Auswirkungen die gefundenen unterschiedlichen genetischen Expressionsmuster auf die Translation der Proteine haben, ist noch unklar, und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.2 Das sporadische kolorektale Karzinom (SCC)

1.2.1 Epidemiologie des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Das sporadische kolorektale Karzinom (SCC) ist in Deutschland, nach dem Mammakarzinom der Frau und dem Bronchialkarzinom des Mannes, das am häufigsten zum Tode führende Malignom. Es ist verantwortlich für mehr als 25.000 Todesfälle in der Bundesrepublik Deutschland mit höherer Inzidenz bei Männern (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2006).

1.2.2 Aufbau und Physiologie des Dickdarms

Die Darmschleimhaut erneuert sich dynamisch alle 5-6 Tage über Stammzellen an der Basis der Krypten, die zur Darmoberfläche wandern (vgl. **Abb. 1**) (Wright, 2000). Eine hohe Proliferationsrate und toxischer und mechanischer Stress im Darmlumen können bei Verlust der Regulationsmechanismen des Gleichgewichtszustandes (Homöostase) maligne Transformation begünstigen (Wright, 2000).

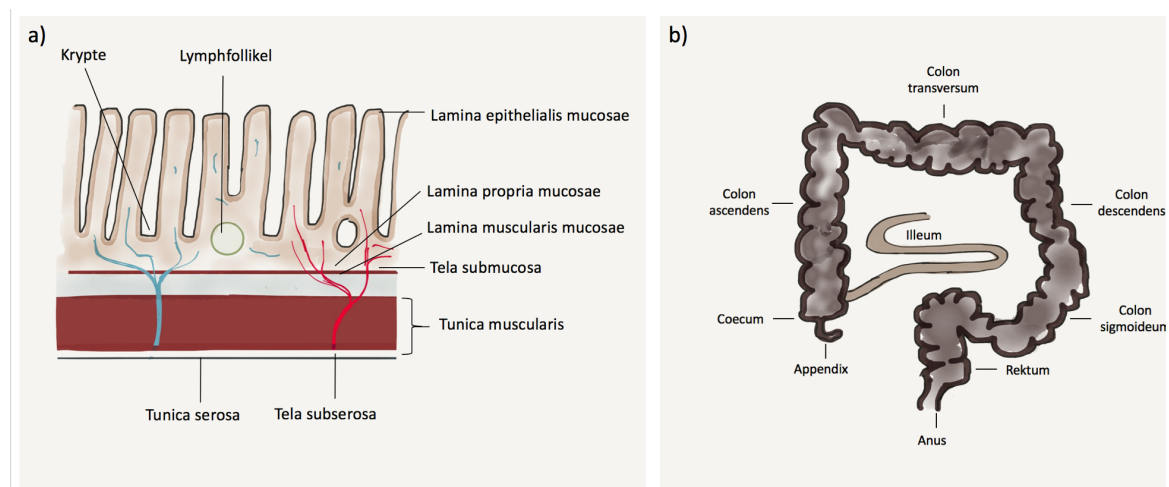


Abbildung 1a) Längsschnitt durch das schematisch dargestellte Darmrohr b) Der Dickdarm wird von oral nach aboral in folgende Abschnitte unterteilt: Blinddarm mit Wurmfortsatz (Coecum mit Appendix vermiformis), Grimmdarm (Colon) mit den Unterabschnitten C. ascendens, C. transversum, C. descendens und C. sigmoideum und dem Endabschnitt Rektum (Mastdarm) mit dem After (Anus).

1.2.3 Klinik des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom ist zunächst häufig symptomlos. Klinische Manifestationen zeigen sich meist erst in fortgeschrittenen Stadien (Stein et al., 1993). Dabei handelt sich um

Symptome, die nicht spezifisch und häufig nur subjektiv beurteilbar sind wie z.B. Änderung von Darmmotilität, Appetit, Schwäche, abdominale Schmerzen, Gewichtsverlust, gastrointestinale Blutungen oder Obstruktion der Darmwege (Majumdar et al., 1999). Die Untersuchung des Stuhls auf okkultes Blut (Hämoccult-Test) und das Durchführen regelmäßiger Darmspiegelungen (Koloskopie) sind derzeit die wichtigsten Screening-Methoden.

1.2.4 Risikofaktoren des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Eine positive Familienanamnese, die Entwicklung von Polypen/Adenomen, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (z.B. Colitis ulcerosa), Adipositas, Tabak- und Alkoholabusus, Stress sowie bestimmte Nahrungsmittel (Rotes Fleisch, raffinierter Zucker, obst- und gemüsearme Ernährung) erhöhen die Wahrscheinlichkeit an einem CRC zu erkranken. Regelmäßige, intensive körperliche Betätigung und die tägliche Einnahme von NSAR (non-steroidal anti-inflammatory Drugs) minimieren das Risiko. 5-30% der SCCs werden auf familiäre bzw. genetische Faktoren zurückgeführt (Askling et al., 2001; Jaspersen et al., 2010). Zu den wichtigsten Vertretern der hereditären Erkrankung gehören die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) und das Lynch-Syndrom (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma =HNPCC) (Forbes, 2008). Während bei dem HNPCC-Syndrom das Mismatch-Repair-System betroffen ist, handelt es sich bei der FAP um eine Mutation des *APC*-Tumorsuppressorgens und somit um eine obligate Präkanzerose. Das Kolon bei der FAP ist mit einer Vielzahl (>100) von Adenomen besiedelt. Aus diesen entwickeln sich bei zusätzlicher Inaktivierung des zweiten normalen *APC* Allels kolorektale Tumore (Gómez García und Knoers, 2009; Hernegger et al., 2002). Ferner zeigen hamartomatöse Polyposis-Syndrome wie familiäre juvenile Polyposis, Peutz-Jeghers-Syndrom und Cowden-Syndrom ebenfalls ein gesteigertes Risiko an CRC zu erkranken (van Hattem et al., 2008).

Zu den nicht-familiären Krankheiten, die mit der Entwicklung von CRC assoziiert sind, gehören chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa (UC). Während das Risiko beim M. Crohn weniger erhöht erscheint, entwickeln 3 von 10 UC Patienten nach längerem Krankheitsverlauf ein kolorektales Karzinom (Bernstein et al., 2001a) (siehe auch Abschnitt 2.2).

1.2.5 Karzinogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen durch genetische Läsionen einer einzelnen Zelle, die durch klonale Expansion einen Wachstumsvorteil erlangt. Es ist mehr als eine somatische Mutation erforderlich, damit es zur Krebsentstehung kommen kann (Campbell et al., 2009). Ein wesentliches Merkmal von Tumorzellen ist die genomische Instabilität.

Protoonkogene kodieren Proteine, welche das normale Zellwachstum und die Zellteilung stimulieren. Ein verändertes Protoonkogen, dann Onkogen genannt, kann entweder zu einer gesteigerten Expression des von ihm kodierten Proteins führen oder sich zu einer aktiveren Form desselben umwandeln. Durch Genamplifikation, eine erhöhte Zahl von Genkopien in einer Zelle, oder Punktmutation kann ein Protoonkogen in ein Onkogen übergehen.

Tumorsuppressorgene verschlüsseln Proteine, die normalerweise unkontrollierte Zellteilung unterdrücken. Jede Mutation, welche die normale Aktivität eines Tumorsuppressorgens verringert, kann durch die indirekte Stimulation des Wachstums zur Entstehung von Tumoren führen. Tumorsuppressorgene sind rezessive Gene, bei denen sich erst Defekte beider Allele phänotypisch manifestieren. Die meisten Onkogene verhalten sich dagegen dominant (Sherr, 2004). Ein Funktionsverlust kann auf der Deletion einer chromosomalen Region oder des gesamten Chromosoms beruhen (Loss of heterozygosity, LOH). Weitere Möglichkeiten sind die Mutation des Gens, vorgeschalteter Regulator-Sequenzen oder epigenetische Modifikation (z.B. Methylierung von Promotorsequenzen, Deacetylierung von Histonen).

Genetische Defekte, die auf chromosomaler Ebene detektierbar sind, werden als **chromosomale Instabilität (CIN)** bezeichnet, während **Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI)** die Störungen auf DNA-Ebene umschreiben (Ogino und Goel, 2008). Dienstmann et al. teilt das CRC anhand spezifischer klonaler, stromaler und immunogener Eigenschaften in 4 molekulare Subtypen (consensus molecular subtypes; CMS 1-4) ein (Dienstmann et al., 2017). Tumoren mit MSI, meist CMS 1, sind distinktiv mit Hypermuation und Hypermethylierung assoziiert. Tumoren mit CIN, CMS 2-4, entwickeln sich hingegen entsprechend des traditionellen Modells gemäß Vogelstein (Vogelstein et al., 1988) (siehe folgender Abschnitt 1.2.5.1). Fast alle MSI positiven Tumore (15% aller CRCs) gehören zum „immunsubtyp CMS1“ und weisen Hypermuation und Hypermethylierung auf. CIN positive kolorektale Tumore (85% aller CRC) lassen sich abhängig von spezifischen

genetischen Alterationen in CMS 2 („canonical subtype“), CMS3 („metabolic subtype“), und CMS4 („mesenchymal subtype“) unterteilen (Dienstmann et al., 2017).

1.2.5.1 Das Vogelsteinmodell: die Adenom-Karzinom-Sequenz

Fearon und Vogelstein beschrieben 1988 erstmals das Tumorprogressionsmodell für die Entwicklung des kolorektalen Karzinoms. Aufeinander folgende genetische Veränderungen (siehe **Abb. 2**) sind mit morphologischen Veränderungen der Kolonschleimhaut assoziiert (Vogelstein et al., 1988). Dieser morphologische Übergang von normaler Mukosa über das Adenom bis zum kolorektalen Karzinom bis hin zu möglichen Metastasen ist unter dem Begriff **Adenom-Karzinom-Sequenz** zusammengefasst. Dabei sind die Abweichungen entscheidend, welche regulatorische Mechanismen der genetischen Homöostase (Gleichgewicht) steuern (z.B. Zellzyklus Regulation, zelluläre Signalwege, Proliferation, Differenzierung, Wachstumshemmung und Apoptose). Tumore sind dabei das Ergebnis der Aktivierung von Onkogenen gepaart, mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Fearon und Vogelstein, 1990).

1.2.5.2 Gatekeeper-Pathway

Der Gatekeeper-Pathway (engl. Gatekeeper = Pförtner) wird im Wesentlichen durch die Mutation des Gatekeeper Gens *APC* (Adenomatöses Polyposis Coli) bestimmt. Der ***APC* Funktionsverlust** ist ein früher Mechanismus in der Entstehung von sporadischem Darmkrebs. Im normalen Kolonepithel reguliert das *APC*-Protein als Tumorsuppressorgen die Phosphorylierung von **β -Catenin** über Komplexbildung. Ist die β -Catenin-Bindungsstelle des β -Catenin/*APC*-Komplexes mutiert, wird die Phosphorylierung und somit die Degradation im Proteasom verhindert (Walther et al., 2008). β -Catenin kann nachfolgend in den Zellkern translozieren und dort zur Assoziation mit Transkriptionsfaktoren und Aktivierung von zellzyklusbeeinflussenden Genen und somit zur chromosomalen Instabilität führen (Fodde, 2002; Kobayashi et al., 2000; Miyamoto et al., 2004). ***Wnt*-Aktivierung** kann durch somatische Mutation in einem oder mehreren Genen ausgelöst werden. Die häufigste Mutation in diesem Zusammenhang sind mit etwa 60% Alterationen des *APC* Gens. Die konsekutive Aktivierung des *Wnt*-Signalings stimuliert die Proliferation und ist ein häufiges und frühes Ereignis in der Entwicklung von etwa 80% der kolorektalen Tumore (Yaeger et al., 2016).

Unter **chromosomaler Instabilität (CIN)** werden strukturelle und/oder numerische Abweichungen vom regulären diploiden Chromosomensatz ($2n$) verstanden. Sie finden sich bei 85% der SCCs (Ogino und Goel, 2008). CIN manifestiert sich als Punktmutation (Deletion, Insertion, Inversion), balancierte oder unbalancierte Translokation, oder Amplifikation (Lengauer et al., 1998). Liegt ein Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen oder chromosomaler Segmente und somit eine numerische Abweichung in diesem Chromosomensatz vor, so spricht man von **Aneuploidie**. Der normale, diploide Chromosomensatz des Menschen besteht aus 22 homologen Chromosomenpaaren plus zwei Geschlechtschromosomen. In zytometrischen Analyseverfahren konnte festgestellt werden, dass die überwiegende Anzahl der UCCs einen aneuploiden Chromosomensatz aufweist (Gerling et al., 2010). Dem genomischen Ungleichgewicht ist eine bedeutende Rolle während der Karzinogenese zuzuschreiben: Aneuploide Tumoren sind mit klinisch aggressiverem Tumorwachstum assoziiert und wurden in mehreren Studien als für das kolorektale Karzinom prognostisch relevant beurteilt (Kokal et al., 1986; Böttger et al., 1993; Yamamoto et al., 1998; Habermann et al., 2007). Wie bereits schon von Ried et al. beschrieben, sind in diesem Zusammenhang Aberrationen der Chromosomen 7, 8, 13, 17 und 20 beim kolorektalen Karzinom charakteristisch (Ried et al., 1996). Des weiteren zeigten Meyer et al., dass auch in der dem UCC angrenzenden Schleimhaut in 89% aneuploide Zellen zu finden sind, während diese nur in 5% der SCC Umgebungspräparate auftreten (Meyer et al., 2013a). Zudem wurde hier gezeigt, dass Aneuploidie unabhängig von Entzündung oder Dysplasie vorzukommen scheint.

Ein einzelner genetischer oder epigenetischer Defekt als initiiierendes Ereignis reicht nicht aus, um die maligne Transformation zu komplettieren. Es handelt sich um einen multifaktoriellen Mehrschrittprozess, der sekundäre Veränderungen mit Funktionsverlust/erhöhter Aktivität von weiteren Genen erforderlich macht (Fodde, 2002). 40% der Adenome, die in maligne Tumore übergehen, zeigen **Protoonkogen *k-ras* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*)** Mutationen (Fodde, 2002). Bei RAS handelt es sich um ein G-Protein, das ein Wachstumssignal von einem Wachstumsfaktor-Rezeptor auf der Plasmamembran der Zelle an eine Kaskade von Proteinkinasen weiterleitet. Am Ende wird als zelluläre Antwort ein Zellzyklus-stimulierendes Protein synthetisiert. Der Verlust der ***p53* Genfunktion** ist ein spätes Phänomen und entscheidend für die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom (Imai und Yamamoto, 2008). *P53* überwacht den Fortlauf des Zellzyklus durch die Initiierung von Zyklus-Stopp, Anschalten von DNA-Reparatur-Genen

oder der Aktivierung von Apoptose (Zelltod)-Genen, wenn DNA-Schäden auftreten (Campbell et al., 2009; Lane, 1992; Mercer, 1992).

1.2.5.3 Caretaker pathway

10-15% der sporadischen Karzinome, sowie das *HNPCC*-Syndrom entstehen über den Caretaker pathway (Ogino und Goel, 2008). Durch einen primären Verlust von Genen, die falsch replizierte Basenpaare reparieren (z.B. *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS2*, *hMSH6*) kommt es zu bleibenden DNA-Replikationsfehlern. Treten diese Fehler an repetitiven DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten) in Form von Längenveränderungen auf, so spricht man von **Mikrosatelliteninstabilität (MSI)**. MSI-Tumoren zeigen viele Unterschiede im Geno- und Phänotyp im Vergleich zu SCCs ohne MSI, unabhängig, ob hereditären oder sporadischen Ursprungs (Imai und Yamamoto, 2008).

1.2.6 Prävention des sporadischen kolorektalen Karzinoms

70% der kolorektalen Karzinome entwickeln sich nach 5-10 Jahren aus primär adenomatösen Polypen (Schulmann et al., 2002). Screening Maßnahmen, wie die digital rektale Untersuchung, die Untersuchung des Stuhls auf fäkales Blut (Hämoccult Test) sowie präventive endoskopische Untersuchungen werden in vielen Ländern ab dem 50.-60. Lebensjahr empfohlen und angewendet (Brenner et al., 2007). Durch die langsame Entwicklung kommt der frühzeitigen Entdeckung und Entfernung dieser prämaligen Läsionen durch Sigmoidoskopie und Koloskopie eine besondere Bedeutung zu. Tumormarker wie z.B. CEA, CA-19/9 oder Septin-9 werden bis jetzt weniger in der Primärdiagnostik als vielmehr für das Staging und die Verlaufskontrolle nach Tumorresektion genutzt.

1.3 Das Colitis Ulcerosa assoziierte Karzinom (UCC)

1.3.1 Colitis Ulcerosa

Unter der Bezeichnung Colitis Ulcerosa (UC) wird eine chronisch entzündliche ulzerierende Erkrankung des Dickdarms verstanden, die sich auf die oberflächlichen Schleimhautschichten des Organs beschränkt. Die Diagnose wird mit Hilfe von Probeentnahmen durch eine Ileokoloskopie gestellt (Hahne und Riemann, 2002). Histologisch zeigen sich mikroskopische Abszesse am Grund der Lieberkühn Krypten. Im

chronisch-fortgeschrittenen Stadium kommt es zur Zerstörung der Kryptenarchitektur und Infiltrationen von neutrophilen, eosinophilen Plasmazellen und Makrophagen in die Lamina propria der Darmschleimhaut (Mitsuhashi et al., 2005). UC involviert immer das Rektum. Die unterschiedliche Ausbreitung kann unterteilt werden in Proktitis (nur das Rektum ist betroffen), linksseitige Kolitis (Sigmoid ± Colon descendens) oder Pankolitis (das gesamte Kolon ist betroffen ± Backwash Ileitis). Dabei beginnt die UC meist im distalen Rektum (kaudal) und breitet sich retrograd nach proximal (oral) aus (Moum et al., 1999) (siehe **Abb. 1b**). Der Verlauf der einzelnen Entzündungsschübe ist sehr unterschiedlich. Von leichten Symptomen, wie intermittierenden rektalen schleimigen Blutungen (milde Proktitis) bis zu fulminanter Kolitis des gesamten Kolons mit Krämpfen, Gewichtsverlust, Gelenkschmerzen und Fieber können sich auch Stadien zeigen, die nicht mehr auf eine medikamentöse Behandlung ansprechen oder zur lebensbedrohlichen Darmperforation (toxisches Megakolon) führen. Die genaue Pathogenese ist unklar. Als Ursachen werden verschiedene Ansätze diskutiert: eine erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten (Carlson et al., 2002; Di Sabatino et al., 2012a; Pender und MacDonald, 2004) sowie die Rolle verschiedener Interleukine wie z.B. IL-6, IL-8 (Okayasu, 2012), IL-13, IL-5 (Fuss et al., 2004; Neurath et al., 2002), IL-17, IFN-gamma und TNF-alpha (Di Sabatino et al., 2012b). Die Anzahl der an UC Erkrankten in Europa wird auf 1,4 Millionen Menschen geschätzt (Sabatino et al., 2011). Allein in Deutschland stieg die Inzidenz von 240.000 zwischen 1980 bis 1984 (Timmer und Goebell, 1999) auf 390.000 Neuerkrankungen im Zeitraum von 2004 bis 2006 (Ott et al., 2008). UC tritt häufiger bei erwachsenen Männern als bei erwachsenen Frauen auf (M:F = 1,5:1), während bei Kindern häufiger Mädchen betroffen sind (Bernstein und Shanahan, 2008). Mit der Einführung von Steroiden in den 1950er Jahren und Immunmodulatoren in den 1970er Jahren konnte das Fortschreiten der Krankheit gemindert und die Lebensqualität verbessert werden; jedoch wurde noch keine kausale Therapie gefunden. Die Ziele der Therapie sind das Einleiten und der Erhalt der Remission sowie ein gutes Komplikationsmanagement. Als therapeutische Optionen stehen Kortikosteroide, Immunmodulatoren, Sulfonamide und Biologika zur Verfügung. Versagen konservative Maßnahmen, erfolgt die chirurgische Entfernung des gesamten Dickdarms (Kolektomie). Die Wahrscheinlichkeit für eine Kolektomie ist im ersten Jahr nach der Diagnose am höchsten. Nach 25 Jahren Erkrankungsdauer sind 20-30 % der Patienten kolektomiert worden (Langholz et al., 1994). Neuere Therapieansätze diskutieren auch die Rolle von intestinalen Bakterien (Ohkusa et al., 2003). Die Gesamtsterblichkeit bei UC ist nicht höher als die der normalen Bevölkerung. Allerdings ist die Mortalität unter den neu diagnostizierten Patienten und denen mit einem ausgedehnten Verlauf erhöht. Die meisten

Patienten sterben perioperativ (Palli u. a. 1998; Winther u. a. 2003). UC Patienten haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an einem Colitis Ulcerosa assoziiertem kolorektalen Karzinom (UCC) zu erkranken. Zur Früherkennung dieser Tumore werden regelmäßige Koloskopien mit Probiopsien durchgeführt. Limitierend sind die hohen Kosten, eine hohe falsch negative Rate bei Biopsien und die Schwierigkeit, eine eindeutige pathologische Diagnose bezüglich des Dysplasie-Grades zu stellen. Letzteres basiert auf der Tatsache, dass Biopsien von UC Patienten besonders in den entzündeten Bereichen per se höhere Mitose- und Apoptoseraten zeigen (Triantafillidis et al., 2009).

1.3.2 Epidemiologie des Colitis Ulcerosa assoziierten kolorektalen Karzinoms

Patienten mit Colitis Ulcerosa haben ein erhöhtes Karzinomrisiko (Rosenquist et al., 1959; Svartz und Ernberg, 1949). Der Anteil der mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziierten Karzinome aller pro Jahr auftretenden kolorektaler Karzinome wird auf 2% geschätzt (Triantafillidis et al., 2009). Eine Metaanalyse von Eaden et al. verglich die Ergebnisse von 116 Studien mit ca. 55.000 UC Patienten, von denen 1.700 mit kolorektalem Karzinom diagnostiziert wurden. Hier stieg das kumulative Risiko 10 Jahre nach der Diagnose von 2% auf 8% nach 20 Jahren und auf 18% nach 30 Jahren an (Eaden et al., 2001a). Einige Studien beschreiben ein kaum erhöhtes Risiko für UC Patienten (Bernstein et al., 2001b; Winther et al., 2004). In den letzten Jahren ist die Inzidenz von UCCs durch präventive endoskopische Überwachung und fortschrittliche Behandlungsmethoden zurückgegangen. Dennoch ist das UCC der primäre Grund für frühzeitiges Versterben bei diesen Patienten (Lakatos und Lakatos, 2008). Selbst nach Kolektomie besteht ein erhöhtes Risiko für ein UCC in dem analen Übergangsbereich zwischen Pouch und Analkanal. Dieses Risiko steigt, wenn noch rektale Mukosa vorhanden ist oder eine illeoanale Pouchanastomose angelegt wurde (O’Riordain et al., 2000).

1.3.3 Risikofaktoren des Colitis Ulcerosa assoziierten kolorektalen Karzinoms

Als Risikofaktoren für die Entwicklung von UCCs konnten das Vorliegen von Pseudopolypen, Strikturen und Backwash Ileitis identifiziert werden (Haskell et al., 2005; M. D. Rutter et al., 2004; Velayos et al., 2006, Heuschen et al., 2001). Eine längere Dauer der Kolitis (Ekbohm et al., 1990), eine größere Ausbreitung (Itzkowitz und Yio, 2004; Rutter et al., 2004; Sugita et al., 1993) und das Vorhandensein von anderen entzündlichen

Manifestationen wie z.B. primär sklerosierende Cholangitis¹ gehen ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für UCCs einher und unterstützen die Hypothese, dass Inflammation zur Karzinogenese prädispositioniert. Zusätzlich wurde gezeigt, dass antiinflammatorische Medikamente die Entwicklung von UCCs reduzieren können (Triantafyllidis et al., 2009). Patienten mit einer Proktitis haben im Vergleich zur Normal-Population ein um 70% gesteigertes Risiko, an kolorektalen Karzinomen zu erkranken. Patienten mit einer Pankolitis entwickeln Darmkrebs eine Dekade eher als Patienten mit nur linksseitiger Kolitis (Greenstein et al., 1979). Auch sind sie deutlich jünger (25,4 Jahre) bei Diagnosestellung als die Patienten mit linkseitiger Kolitis (36,6 Jahre). 35 Jahre nach Erstdiagnose liegt bei Proktitis ein 1,7-faches, bei linksseitiger Kolitis ein 2,8-faches und bei Pankolitis ein 14,8-faches erhöhtes UCC Risiko vor (Leidenius et al., 1997). Eine familiäre Vorbelastung und Erstmanifestation im jungen Lebensalter weisen auf ein gesteigertes UCC Risiko hin (Lakatos und Lakatos, 2008).

1.3.4 Karzinogenese des Colitis Ulcerosa assoziierten kolorektalen Karzinoms

Die Mechanismen der neoplastischen Transformation aus chronisch entzündlichem Gewebe sind nicht vollständig verstanden und wahrscheinlich multifaktoriell. Studien über experimentelle Modelle der Kolonkarzinogenese gehen davon aus, dass **entzündungs-getriggerte Zytokine** entweder direkt oder indirekt das unkontrollierte Wachstum von Zellen steuern (Monteleone et al., 2012). **Bakterieninduzierte Besiedlung** potenziert möglicherweise die Tumorfomation. In Experimenten an Mäusen konnte gezeigt werden, dass spezifische bakterielle Infektionen zur kolorektalen Karzinogenese beitragen können (Yang und Pei, 2006).

1.3.4.1 Entzündungsassoziierte Karzinogenese

In verschiedenen Organen (z.B. Speiseröhre, Magen, Dickdarm, Leber, Gallenblase, Schilddrüse, Lunge, Uterus) kann sich ein maligner Tumor im Rahmen chronischer Entzündungen entwickeln. Das Colitis Ulcerosa assoziierte Karzinom (UCC) folgt in seiner Entwicklung nicht der Adenom-Karzinom-Sequenz. (Willenbacher, 1996). Die von Riddel et al. beschriebene Kolitis–Dysplasie-Karzinom-Sequenz unterscheidet sich von der *de novo* Entwicklung und dem Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz des SCC (Okayasu, 2012;

¹ Unter Primärer sklerosierender Cholangitis (PSC) ist eine extra- und intrahepatisch auftretende progressive chronisch-entzündliche Erkrankung mit folgendem chronischen Gallestau und schließlich Leberzirrhose zu verstehen. Das Risiko für UCC bei PSC im Vergleich mit UC Patienten ohne PSC ist 3-5fach erhöht (Schürmann et al., 2000).

Riddell et al., 1983; Vogelstein et al., 1988). Dysplasie bezeichnet epitheliale Veränderungen die unverwechselbar neoplastisch und damit Vorstufen von invasiven Karzinomen sind. Zuerst entstehen flache und breitflächig erhabenen dysplastische Läsionen im Sinne einer niedrig-gradigen Dysplasie (von "no dysplasie" zu "low grade dysplasie" = LGD), welche in eine höher-gradige Dysplasie ("high grade dysplasie"= HGD) und schließlich in das invasive Adenokarzinom übergehen. Riddell geht davon aus, dass es durch die Entzündung zu einem erhöhten epithelialen Umsatz der Zellen der Darmschleimhaut kommt, welcher neoplastische Transformation begünstigt. Für HGD empfiehlt er die Kolektomie. Bei vorliegender LGD sollten im Verlauf weiter Biopsien gewonnen werden (Riddell et al., 1983). Grizzle et al. entwickelte die Dysplasie-Karzinom-Sequenz weiter und postulierte, dass entzündungs-assoziierte Tumore das Ergebnis von langer, kontinuierlicher Zerstörung, Entzündung und Reparatur („**longstanding, continous damage, inflammation and repair** = **LOCDIR**“) des Gewebes sind. LOCDIR ändert zelluläre Charakteristika des Epithels, was zum Verlust der zellulären Differenzierung und Entwicklung von Atypien und Mutationen an verschiedenen Stellen führen kann. Bei Colitis Ulcerosa zeigen sich erste Dysregulationen von Mikrosatelliten-Reparatur-Enzymen innerhalb eines Jahres nach Erstdiagnose (Grizzle et al., 2010). Mit der zellulären Atypie erfolgt wahrscheinlich der Übergang von niedrig- zu höher-gradiger Dysplasie. Nach 10 oder mehr Jahren können sich Karzinome ohne typische exophytische Merkmale entwickeln (Triantafillidis et al., 2009).

1.3.5 Potenzielle Biomarker des Colitis Ulcerosa assoziierten kolorektalen Karzinoms

Ein Biomarker kann zum einen der Früherkennung von Vorstufen des UCCs (Dysplasie) und zum anderen der sicheren Diagnostik von bereits malignen Läsionen dienen. Die Analyse eines Biomarkers kann beispielsweise aus einer Gewebebiopsie erfolgen. Diskutiert werden sowohl die Untersuchung von Mikro-RNAs in Stuhlproben oder als auch die Bestimmung verschiedener Marker im Blut (z.B. *mSEPT9*, *NEUROG1*, *THBD* und *C9orf50*) (Zhen et al., 2018). Da die vorliegende Studie kolorektale Gewebeproben untersucht, konzentriert sich der folgende Abschnitt auf eine Übersicht der im Kolongewebe nachzuweisenden Biomarker. Insgesamt scheinen eher Tumorsuppressor-Gene als Mutations- oder Methylierungs-Signalwege eine Rolle in der UCC Tumorgenese zu spielen (Willenbacher et al., 1999). Das unterstützt die Hypothese, dass chromosomale Alterationen eine grundlegende Rolle in der UCC Genese spielen. So lässt sich bei UCC Patienten vermehrt **chromosomale Instabilität (CIN)** finden. Sie ist mit längerer Krankheitsdauer und einem hohen Grad an Entzündung assoziiert. Interessant ist, dass CIN bereits auftritt, bevor

neoplastische Läsionen vorliegen (Ishitsuka et al., 2001). In Kolonbiopsien können aneuploide Veränderungen bereits 1-2,5 Jahre vor dem Nachweis von Schleimhautdysplasien und bereits 11 Jahre vor der Diagnose des UCC's nachgewiesen werden (Fozard et al., 1986; Rubin et al., 1992; Holzmann et al., 1998; Habermann et al., 2003). Eine neuere Metaanalyse aus unserer Arbeitsgruppe legt nahe, dass die kombinierte Analyse von Aneuploidie und Dysplasie der Einzelanalyse der beiden Marker überlegen ist (Meyer et al., 2017).

Als potentielle genetische Marker für das UCC werden der Nachweis von Mutationen bzw. die Überexpression folgender Gene diskutiert: *APC* (Inhibition des *Wnt*-Signalwegs), *Bcl-xl* (Apoptosesuppression), *Ptgs2* (Inflammationsaktivierung und Apoptoseinhibition), *iNos* (Apoptoseinhibition durch NO-Produktion), *TP53*, *Tnfrsf6* (Apoptose) und *smad 3* (Komponente des *Wnt*-Signalwegs) (Scarpa et al., 2014). Watanabe et al. konnten 20 Gene identifizieren, welche in nicht-malignen Proben und UCC Proben unterschiedlich exprimiert waren. Hierunter konnten auch einige Karzinom-assoziierte Gene wie z.B. *GBP4*, *SAMSNI*, *NOD27*, *NOL3*, *CYP27B1*, *RUNX3* und *CYP27B1* identifiziert werden (Watanabe et al., 2011). In mehr als 10% der Kolitis-assoziierten Tumore sind Alterationen der Gene *MYC*, *IDH1*, *K-ras*, *smad4* und *GNAS* zu finden (Meyer et al., 2017). Aberrante DNA-Methylierung scheint ebenfalls eine Rolle in der UCC-Genese zu spielen. Kommt es durch die Hypermethylierung eines Promoters zu einer Inaktivierung, können epitheliale Zellen mit genomischem Schaden akkumulieren (Kuester et al., 2010). Eine erhöhte Expression von DNA-Methyltransferase-1 in nicht neoplastischer Mukosa wird als frühes Ereignis in der UCC-Genese beobachtet (Fujii et al., 2010). Die Gene *APC*, *CDH13*, *MGMT*, *MLH1* und *RUNX3* weisen eine Hypermethylierung in nicht-neoplastischer Mukosa von UCC Patienten im Vergleich zu UC-Patienten ohne Karzinom auf. Eine Methylierung der Gene *ITGA4* und *TFPI2* lässt sich im UCC, aber nicht im Normalgewebe nachweisen (Gerecke et al., 2015).

Individuelle Komponenten der naiven und adaptiven Immunabwehr stehen ebenfalls im Fokus, die UCC-Karzinogenese wie z.B. Interleukin-6 und -23 (Atreya und Neurath, 2005; Fantini und Pallone, 2008), Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) (Schottelius und Dinter, 2006) und Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF- α) (Triantafillidis et al., 2009).

Auf Proteinebene hingegen könnten laminin-5 γ 2 Ketten und Cyclin A Expression (Habermann et al., 2001), Toll-like Rezeptor 4 (Fukata et al., 2007), β -Catenin und CD-44 Expression (Mikami et al., 2000), Claudin-1 und Claudin-2 (Weber et al., 2008) eine Rolle spielen.

1.4 Das sporadische und Colitis Ulcerosa assoziierte kolorektale Karzinom im Vergleich

1.4.1 Klinik

UCC-Patienten sind bei ED jünger und zeigen eine zufällige Verteilung der Tumore über das gesamte Kolon. Die Rate an simultanen Tumoren ist höher als bei SCCs. Ein UCC entwickelt sich häufiger aus einer flachen, nicht polypoiden Dysplasie zum invasiven Adenokarzinom (Xie und Itzkowitz, 2008). Im Vergleich zum sporadischen kolorektalen Karzinom sind Tumore, die auf der Basis von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entstehen, durch eine schlechtere Prognose charakterisiert (Delaunoit et al., 2006; Greenstein et al., 1986; Harpaz und Talbot, 1996). UCCs scheinen zudem schlechter differenziert zu sein, wenn das Karzinom die Submukosa oder tiefere Schichten infiltriert (Gerling et al., 2010; Mikami et al., 2011). Während bei sporadischen kolorektalen Karzinomen 40% der Tumore durch Screeningverfahren aufgefunden werden können, werden bei UCCs nur 12% durch die gleichen Maßnahmen als Frühkarzinom entdeckt (Itzkowitz, 2003).

1.4.2 Genomische Alterationen bei SCC und UCC

Es gibt mehrere Studien, die sich mit dem genetischen Vergleich von UCC und SCC beschäftigen. Während genomische Instabilität im UCC bereits im normalen Mukosagewebe auftritt, ist sie beim SCC nicht in normaler Schleimhaut nachweisbar (Stoler et al., 1999). Habermann et al. zeigte ein SCC spezifisches Muster von CIN in SCC, welches grundsätzlich mit dem bei UCC vergleichbar zu sein scheint. Allerdings scheinen Amplifikationen häufiger in UCCs als in SCCs aufzutreten (Habermann et al., 2003). CGH-Analysen von Aust et al zeigten Verluste auf Chromosom 8p, 17p und 18q und Zugewinne auf 8q, 13q und 20q. Chromosom 5q zeigte häufiger Verluste in UCCs als in SCCs. Veränderungen auf Chromosom 8 (gain und loss) sind mit dem Tumorstadium bei UCCs assoziiert (Aust et al., 2000). Im Gegensatz zur normalen Kolonmukosa zeigt entzündetes Schleimhautgewebe bereits genetische Alterationen bevor Dysplasien oder Karzinome histologisch nachweisbar sind. Es wird vermutet, dass oxidativer Stress die Regulation von Tumorsuppressorgenen (wie z.B. *p53*-, *DNA mismatch repair*- und *DNA base excision-repair*-Genen) beeinflusst. Dafür spricht auch, dass der Grad der Inflammation und die Dauer der Erkrankung das kumulative Risiko für Dysplasie und UCC erhöhen (Nieminen et al., 2014). Während fast alle UCCs aneuploid sind, tritt Aneuploidie bei SCCs mit deutlich niedrigerer Frequenz auf (Gerling et al., 2010). Auch Yeager et al. beschreiben, dass sich

genomische Alterationen in SCCs und UCCs in Frequenz und zeitlichem Auftreten unterscheiden (**Abb. 2**) (Yaeger et al., 2016).

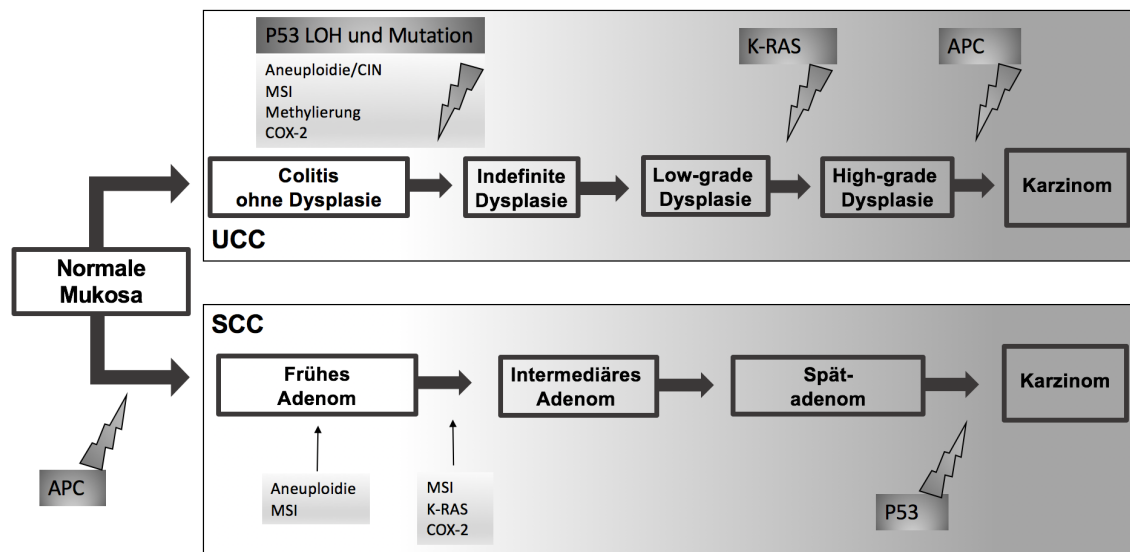


Abbildung 2 Zeitlicher Ablauf vom Auftreten von Mutationen in entzündungsassoziiierter und sporadischer kolorektaler Karzinogenese. LOH: Loss of heterozygosity; MSI: Mikrosatelliteninstabilität; COX-2 Cyclooxygenase 2; APC: Adenomatöses Polyposis Coli (Abb. Modifiziert nach Scarpa M et al., 2014)

Zu den frühen Ereignissen in der UCC-Entstehung gehört die oxidative Schädigung der DNA und die DNA-Methylierung, welche zu einer Inhibition von Tumorsuppressoren, der frühen Mutation von *p53* sowie Aneuploidie und MSI führen können. Mutationen in *APC* und *K-ras* hingegen sind im UCC später zu finden als im SCC (Fujimori et al., 1994; Greenwald et al., 1992).

1.4.3 Unterschiede auf Proteinniveau

Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich eher auf Unterschiede auf Genebene und wurden hauptsächlich an paraffiniertem Gewebe oder- seltener- an Zellkulturen durchgeführt. Welche Auswirkungen die gefundenen unterschiedlichen genetischen Expressionsmuster auf die Translation der Proteine haben, ist noch unklar. Bisher konnten reduzierte Expressionsmuster in der extrazellulären Domäne von CD4 (Oberflächenmarker von Immunzellen), Laminin 5 α (Marker für Membran Disruption) und sialyl Lewis x-Protein (Zelloberflächen Antigen assoziiert mit schlechter Prognose) in UCCs im Vergleich zu SCCs festgestellt werden (Mikami et al., 2011). Proteinanalysen könnten eine klinisch relevante, ggfls. kostengünstigere und weniger invasive (z.B. über Blutentnahmen) Alternative sein, um spezifische Veränderungen festzustellen. Eine weitverbreitete Technik zur Identifizierung von unterschiedlich exprimierten Proteinen ist die 2-dimensionale

Gelelektrophorese (2-DE) mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung. Die Herausforderung besteht darin, eine ausreichende Repräsentativität des zu analysierenden Gewebes zu erreichen. Häufig wird die Proteinanalytik an einer Mischung aus malignen und gesunden Zellen durchgeführt, so dass ggfls. geringfrequente Gen- und/oder Proteinalterationen nicht detektiert werden. Dennoch tumorspezifische Alterationen zu kennen ist besonders wichtig, um zukünftige Krebstherapien auf diese spezifische Veränderungen zuschneiden zu können.

2 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Um ein besseres Verständnis der Unterschiede zwischen SCC und UCC und der Entstehung von UCCs zu erlangen, wurden für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen erarbeitet:

- **Wie kann der Arbeitsablauf zur Gewinnung von „repräsentativem (homogenem) malignen Gewebe“ aus SCC und UCC mittels Laser Capture Microdissektion optimiert werden?**
- **Zeigen sich im intra- und interindividuellen Vergleich des Proteoms zwischen sporadischen und Colitis Ulcerosa assoziierten Tumorzellen und in Bezug auf deren genomische Instabilität signifikante Unterschiede in der 2-dimensionalen Gelelektrophorese?**
- **Welche potentiellen Markerproteine für UCC und SCC können mittels Massenspektrometrie und darauffolgender Signalweganalyse identifiziert werden?**
- **Welche dieser Markerproteine könnten als potentielle diagnostische Marker oder therapeutische Ziele dienen und lassen sich diese mittels weiterer Verfahren (z.B. Western Blot und immunhistochemischer Untersuchung) validieren?**

3 Material und Methoden

3.1 Proben

3.1.1 Probengewinnung

Die verwendeten Proben wurden im Zeitraum von 1995 bis 2012 im Rahmen operativer Eingriffe in der Klinik für Chirurgie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, gewonnen. Die Proben und Daten wurden entsprechend des Ethikvotums verwendet (Ethikvotum Nr. 07-124). Jede Probe wurde direkt nach der operativen Entnahme von einem Pathologen zugeschnitten, spätestens 30 min nach Entnahme in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Verwendung bei Minus 170 °C gelagert.

3.1.2 Patientenkollektiv

In die Studie eingeschlossen wurden kolorektale Karzinome von Patienten, bei denen die Diagnose Colitis Ulcerosa als klinisch und histopathologisch gesichert galt. Insgesamt konnten 10 solcher Frischgewebeproben gesammelt werden. Als Kontrollgruppe wurden aus der Biobank (von 763 eingegangenen Proben zwischen 1995 und 2012) 10 sporadische kolorektale Karzinome (SCC) ausgewählt, bei denen eine hereditäre Genese aufgrund HNPCC, Mikrosatelliteninstabilität (MSI) oder FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis) ausgeschlossen werden konnte. Zur Probenselektion wurden Alter, Geschlecht, TNM- und UICC-Stadium, Grading und Ploidiestatus berücksichtigt (siehe **Tabelle 1**). Bei der Paarung („Matching“) der Colitis Ulcerosa assoziierten Darmkrebs (UCC)-Proben mit den SCC-Proben wurde besonders auf eine Übereinstimmung von TNM- und UICC-Klassifikation geachtet.

Für die Validierung mittels Western Blot wurden 7 der UCC-Proben, 10 SCCs sowie 6 im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnene Normalgewebeproben der sporadischen Karzinome genutzt (**siehe Tabelle 1**). Für die folgenden immunhistochemischen Färbungen wurde ein TMA (Tissue Micro Array) mit 60 SCCs und 30 Normalgewebeproben verwendet. Dieser wurde von Herrn Prof. Dr. M.Sc. Timo Gemoll, Frau Dr. M.Sc. Sarah Strohkamp und Frau Katharina Schillo im Rahmen naturwissenschaftlicher und medizinischer Doktorarbeiten aufgebaut und zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1 Übersicht der untersuchten Proben. Aufgeführt sind die Tumorprobennummer und in Klammern die Nummer des jeweiligen Matching-Partners, das Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Entnahme, die Fläche an ausgeschnittenem Gewebe durch LCM, sowie die Proteinkonzentration.

Probennummer	Tumorentität	Alter (Jahren)*	Geschlecht	TNM	Grading	UICC Stadium	Ploidie Stadium	Fläche (x10 ⁻⁶ mm2)	Proteinkonzentration (µg/µl)	Normalgewebe vorhanden
136 (187)	UCC	64	m	T3N0Mx	2	2	Aneuploid	84	6	nein
203 (363)	UCC	79	w	T3N1M0	2	3	Aneuploid	82	7	nein
217 (726)	UCC	36	m	T3N0Mx	3	2	Aneuploid	46	4	nein
253 (400)	UCC	32	m	T2N1M0	3	3	Aneuploid	95	4	nein
320 (306)	UCC	37	m	T3N0M0	2	2	Aneuploid	91	4	nein
370 (845)	UCC	39	m	T3N2M0	x	3	Aneuploid	85	5	nein
711 (460)	UCC	38	m	T2N0Mx	2	1	Euploid	87	7	nein
954 (830)	UCC	35	w	T3N1Mx	2	3	Euploid	82	5	nein
980 (286)	UCC	25	w	T3N1Mx	2	3	Aneuploid	82	8	nein
1303(666)	UCC	52	w	T4N3Mx	3	3	Euploid	11	2	nein
187 (136)	SCC	82	m	T3N0M0	2	2	Aneuploid	82	11	ja
286 (980)	SCC	32	w	T3N0M0	2	2	Aneuploid	84	9	nein
306 (320)	SCC	59	m	T3N0M0	2	2	Aneuploid	85	10	ja
363 (203)	SCC	50	w	T3N1M0	2	3	Aneuploid	83	10	ja
400 (253)	SCC	63	m	T2N0Mx	2	1	Aneuploid	81	14	nein
460 (711)	SCC	82	m	T2N0M0	2	1	Euploid	78	9	nein
666 (1303)	SCC	78	w	T4N1M0	2	3	Euploid	82	10	ja
726 (217)	SCC	81	w	T3N0M0	2	2	Aneuploid	65	8	nein
830 (954)	SCC	90	w	T3N1M0	2	3	Euploid	83	9	ja
845 (370)	SCC	72	w	T3N0Mx	3	2	Aneuploid	86	9	ja

*Patientenalter bezieht sich auf Entnahmezeitpunkt der Probe. Abkürzungen: x=Information ist unbekannt. m=männlich, w=weiblich, LCM=Laser Capture Mikrodisektion.

3.2 Chemikalien und Materialien

Eine ausführliche Auflistung der genutzten Chemikalien, Antikörper, Materialien, Geräte und Software findet sich im Anhang III a.-g.

3.3 Methoden

Eine Übersicht über die durchgeführten Schritte der Untersuchungen ist in **Abb.3** dargestellt. Die Proben wurden aus Stickstoff aufgetaut und im Kryostaten geschnitten. Relevante Zellareale wurden mit Hilfe eines Lasers vom restlichen Gewebe separiert, die Proteine isoliert, weiterverarbeitet und schließlich mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgestochen und im Massenspektrometer identifiziert.

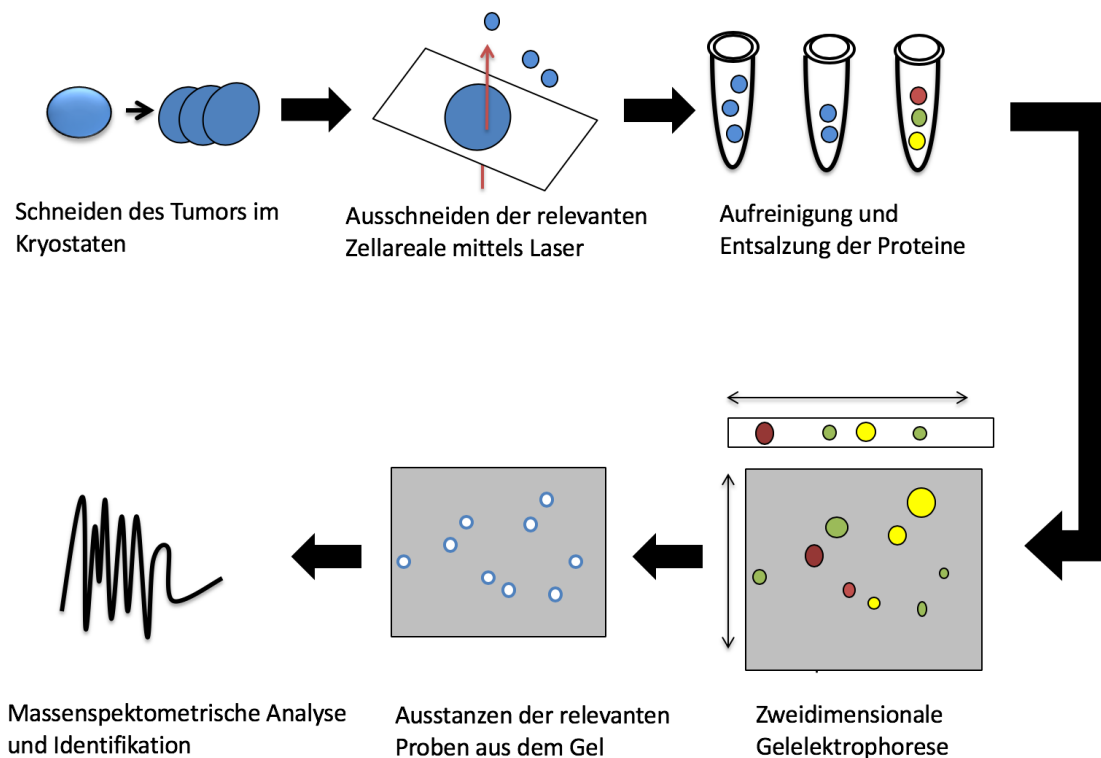


Abbildung 3 Arbeitsablauf des experimentellen Teils

3.3.1 Vorbereitung der Proben

Nach Einbettung des Gewebes in das Gefriermedium wurden mit Hilfe eines Kryostaten bei Minus 20°C 40 µm dicke Gewebeschnitte auf folienbeschichtete Objektträger übertragen. Die 40 µm Schnitte für die Laser Capture Mikrodissektion (LCM) wurden mit Toluidin nach dem in **Tabelle 2** dargestellten Schema gefärbt. Toluidin eignet sich besonders, um

kolorektales Tumorgewebe bei der LCM kenntlich zu machen, ohne die darauffolgende Verarbeitung oder die benötigten chemischen Reaktionen zu stören.

Tabelle 2 Arbeitsschritte der Toluidin-Färbung

Schritt	Zeit	Vorgang
1.	1 min	75% Ethanol
2.	1 min	DEPC
3.	1,5 min	Toluidin-Blau
4.	2x30 sec	DEPC
5.	2x30 sec	100 % Ethanol

3.3.2 Laser Capture Mikrodisektion

Bereits in den 70er Jahren beschrieb Isenberg die Grundlagen der UV Laser Technik (Isenberg et al. 1976). Emmert-Buck et al. postulierten schließlich die Methode der Laser Capture Mikrodisektion (LCM) (Emmert-Buck et al., 1996). Mit dem genutzten LCM Laser (Zeiss Axiovert 200M, PALM® Microbeam) lassen sich über die PALM® RoboSoftware (Carl Zeiss AG) computergesteuert Areale von einzelnen Zellen oder homogenen Zellverbänden im Mikrometerbereich zielgerichtet über das Mikroskop anwählen und berührungslos ausschneiden (**Abb. 4 +5**). Es wurde mit folgenden Einstellungen gearbeitet: RoboCut; Focus 63-64; Energy 79-84; LPC 100. So war es möglich, die Tumorzellen, die durch die Toluidin-Färbung kenntlich gemacht wurden, von der Extrazellulärmatrix und dem Normalgewebe zu trennen. Nach dem Schneiden katapultiert der Laser die ausgeschnittenen Bereiche in den Deckel eines Reagenzgefäßes (**Abb. 4 a)-c)**), welcher durch das vorherige Auftragen von 5 µl Mineralöl (Trinity Biotech) eine adhäsive Innenfläche erhielt. Vorangegangene Versuche ergaben, dass pro Probe ein Zellvolumen von mindestens 3,2 Milliarden µm³ benötigt wird, um ausreichend Material für die weiteren Analysen zu erhalten. Bei einer Schnittdicke von 40 µm wurde somit eine Fläche von jeweils 75 Millionen µm² pro Probe ausgeschnitten (**Abb. 5**). Bis zur weiteren Aufreinigung und Analyse lagerten die Zellen in 10 µl RLT+ Puffer (QIAGEN; 10:1 vermengt mit β-Mercaptoethanol) bei Minus 80°C.

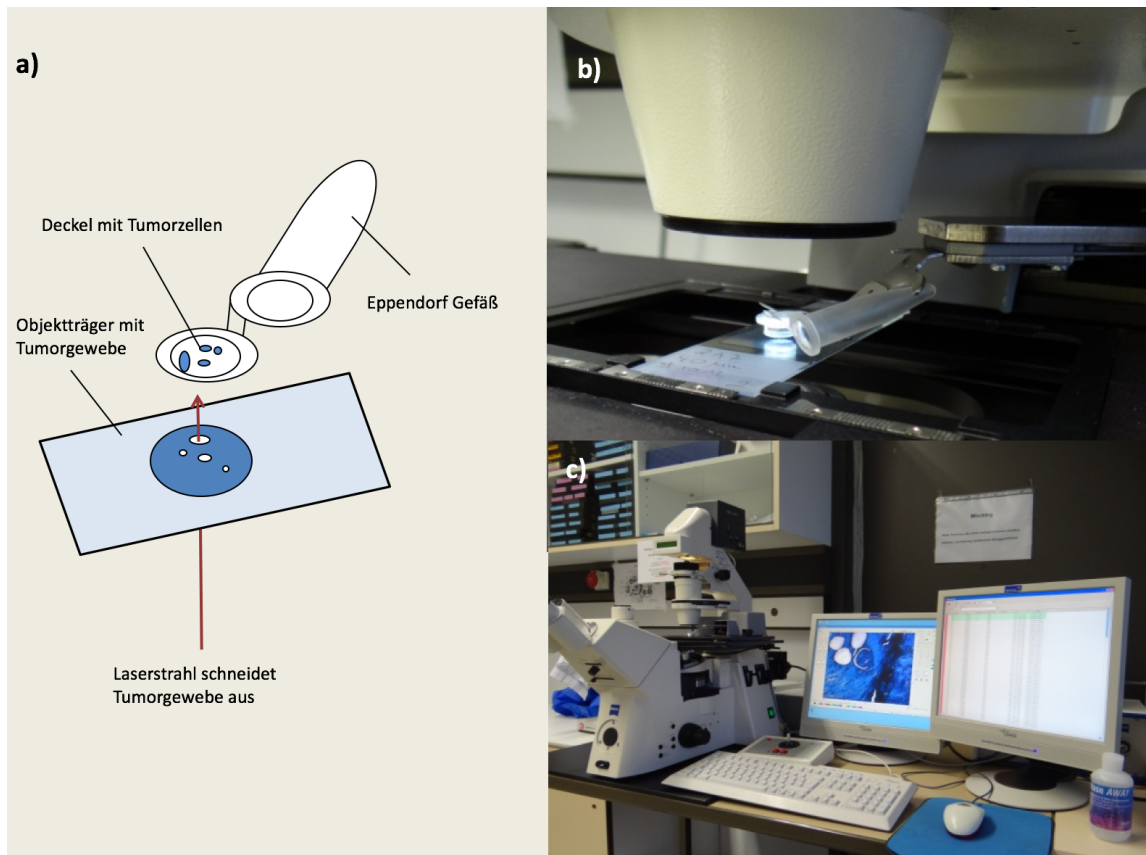


Abbildung 4 a) Schemazeichnung der Laserdissektion: Der Laserstrahl schneidet Tumorgewebe aus und katapultiert es in ein eingespanntes Eppendorf-Gefäß b). Dieses fängt ausgeschnittene Zellstücke im Deckel auf. c) Arbeitsplatz des Palm Microbeams.

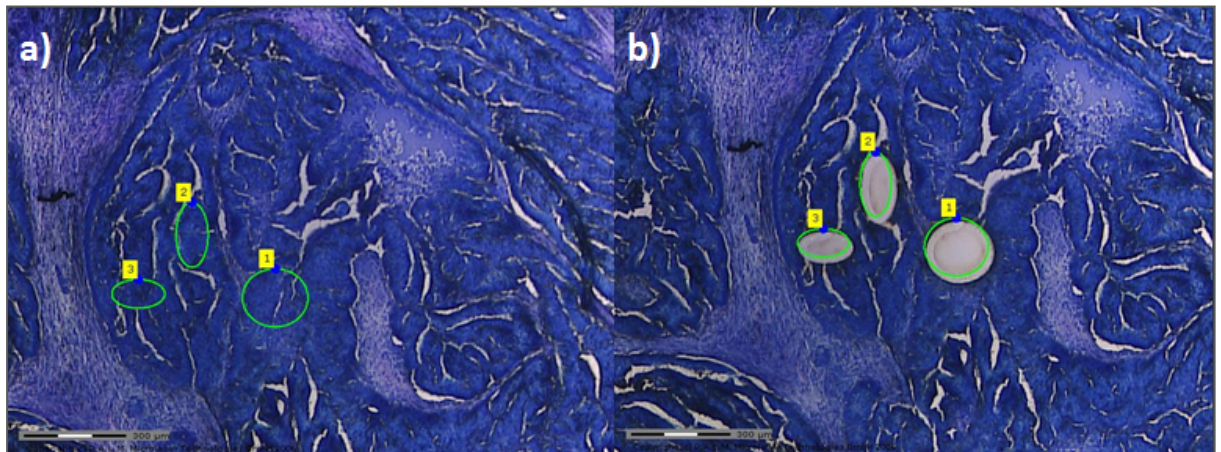


Abbildung 5 Tumorgewebe in Toluidin Blau: a) vor dem Schneiden wird die Fläche markiert (grün). b) Ansicht nach dem Ausschneiden und Hochkatapultieren des Tumorgewebes.

3.3.3 Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen

Die Proteine wurden mit Hilfe eines kombinierten Extraktionsprotokolls, welches auf dem AllPrep DNA/RNA Micro Kit plus (QIAGEN) und dem AllPrep Minikit (QIAGEN) basiert, nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zunächst konnten gemäß Anleitung des Micro Kits

über verschiedene Filtersäulen und mehrere Zentrifugationsschritte DNA und RNA separiert werden.

Tabelle 3 beschreibt den genauen Ablauf der Proteingewinnung. Das erste Eluat der RNA-Säule wurde im Verhältnis 1:1 mit APP-Puffer (AllPrep Minikit) gemischt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und das verbleibende Proteinpellet so lange gewaschen, bis nur noch eine leichte blaue Färbung des Toluidin-Farbstoffes zu sehen war. Nach dem erneuten Herunterzentrifugieren des Pellets wurde der Überstand abgenommen und das Proteinpellet nach kurzem Antrocknen in 100 µl Aufbereitungspuffer gelöst und bei Minus 80 C° eingefroren oder direkt aufbereitet.

Tabelle 3 Protokoll der Proteinaufreinigung Schritt 1 bis 8.

1. Eluat RNA Säule 1:1 mit APP-Puffer	5. Zentrifugieren bei 16.000 rcf (2min)
2. Zentrifugieren bei 16.000 rcf (10 min)	6. Überstand abnehmen und Pellet antrocknen
3. Überstand abnehmen	7. Mit 100µl Aufbereitungspuffer vortexen
4. Proteinpellet mit 1ml Ethanol (100%)	8. Einfrieren bei -80 C° oder direkt entsalzen

3.3.3.1 Entsalzung der Proteine

Mit dem ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (BIO-RAD) wurden die Proteine laut Protokoll des Herstellers gereinigt bzw. entsalzen. Die Aufreinigung der Proteine vermeidet spätere Streifen, Hintergrundfärbung und andere Artefakte auf den Gelen der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Dabei hat das verwendete Kit keinen Einfluss auf die isoelektrischen Eigenschaften der Proteine. Die Proteine werden quantitativ ausgefällt, während ionische Detergenzien, Salze, Nukleinsäuren und Lipide ausgewaschen werden. Nach der Entsalzung lagerten die Proben in 20 µl DIGE Puffer bei Minus 80° C.

3.3.3.2 Proteingehaltsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung der einzelnen Proben wurde das Protein Quantitation Kit (Invitrogen) verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Als Standard diente eine Stammlösung mit 2,0 mg Ovalbumin (Invitrogen), welches in 200 µl TBS-Puffer gelöst wurde. Mit DIGE-Puffer wurde die Ovalbuminlösung zu absteigenden Konzentrationen verdünnt (5mg/ml - 2,5mg/ml - 1mg/ml - 0,5mg/ml - 0,25mg/ml - 0,125mg/ml - 0,0625mg/ml - 0,03125mg/ml). Die Proben wurden 1:10 mit DIGE-Puffer verdünnt und je 1 µl des Probengemischs auf das mitgelieferte Filterpapier Whatman™ Grade 5 (GE Healthcare) aufgetragen. Per Immunfluoreszenz (EZQ® protein quantitation reagent) wurden der Standard und die Proben gefärbt. Mit dem Fluoreszenzscanner Typhoon™ FLA 9000 wurden die Gele eingescannt und mittels Image Quant TL Array Software (GE Healthcare)

verglichen. Da die Konzentrationen des Standards bekannt waren, konnten die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proteinproben ermittelt werden (siehe **Anhang IV; Tab. 1**).

3.3.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Bei der erstmals von O'Farrell beschriebenen zweidimensionalen Gelelektrophorese handelt es sich um eine sehr effiziente Technik zur Separation komplexer Gemische intakter Proteine (O'Farrell 1975). Die Methode besteht nach der Proteinmarkierung aus zwei aufeinanderfolgenden Separationsschritten (**Abb. 6**).

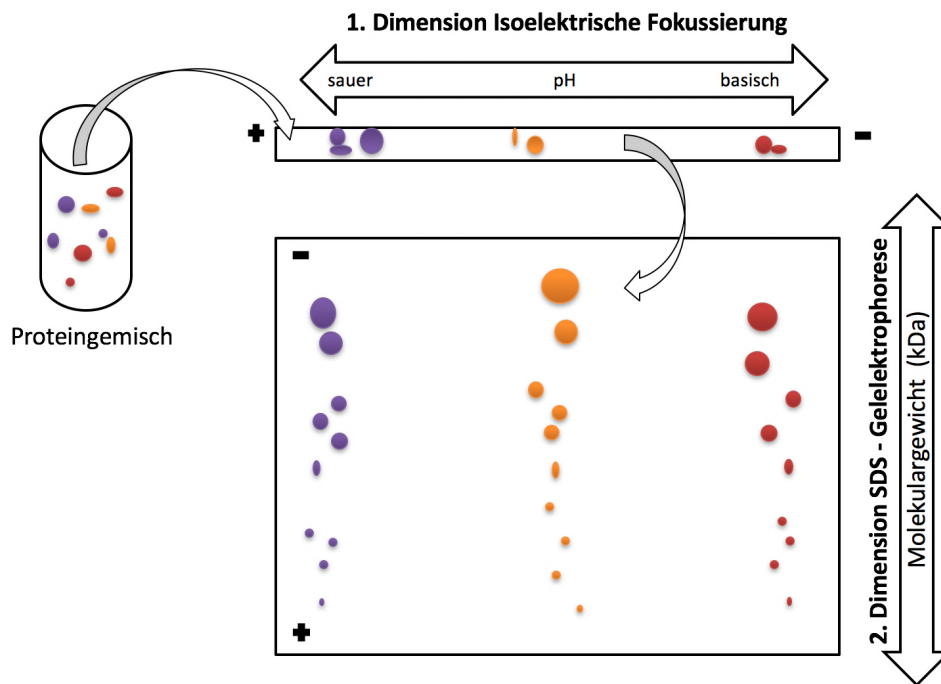


Abbildung 6 Schema der zweidimensionalen Gelelektrophorese. 1. Isoelektrische Fokussierung (IEF): Zunächst erfolgte die IEF durch die unterschiedlichen Ladungseigenschaften des Proteins bzw. seines isoelektrischen Punktes (IEP). Der IEP ist abhängig von Anzahl und Art der unterschiedlich positiv und negativ geladenen Aminosäuren des Proteins und für jedes Protein charakteristisch. Am IEP ist die Nettoladung des Proteins gleich Null. Auf einem Gel mit immobilisiertem pH Gradient (IPG) wandert das Protein bis zum pH-Bereich seines IEP, wird elektrisch neutral und bewegt sich im von außen angelegten elektrischen Feld dann weder zur Kathode noch zur Anode. **2. Auftrennung nach Molekulargewicht:** Auf dem SDS (Sodium-dodecylsulfat)-Polyacrylamidgel erfolgte die Auftrennung nach Molekulargewicht orthogonal zur 1. Dimension. Die Proteine werden durch SDS Moleküle negativ geladen und wandern in Richtung Anode. Die Eigenladung wird überdeckt. Je größer ein Protein ist, desto mehr SDS lagert es an und desto negativer ist die Ladungsverteilung. Größere Polypeptide haben mehr Wechselwirkung mit der Matrix des Gels und wandern langsamer als die kleineren Proteine, wodurch eine vertikale Aufteilung entsteht.

3.3.4.1 Fluoreszenzmarkierung

Zu Beginn wurden die Proben mit den Hochleistungs-Fluoreszenzfarbstoffen G-Dye100, G-Dye200 und G-Dye300 des Refraction-2D™ Labeling Kits (NH DyeAGNOSTICS) laut Protokoll des Herstellers markiert. Die im Kit enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe verfügen über einen aktivierten NHS-Ester, welcher eine kovalente Bindung mit dem Lysin Rest von Aminosäuren eingeht (**Anhang IV; Tab.3**). G-Dye100 wurde gewählt, um den internen Standard zu markieren, der zu gleichen Teilen aus allen Proben bestand (**Anhang IV; Tab.2**).

3.3.4.2 Erster Trennschritt: Isoelektrische Fokussierung

Auf den verwendeten GE IPG Streifen (GE Healthcare) war ein pH-Gradient (IPG) von pH 4 bis pH 7 immobilisiert. Ein Proteingemisch von insgesamt 150 µg (je 50µg einer markierten SCC-, mit 50µg einer markierten UCC-Probe und weiteren 50µg des G-Dye 100 markierten internen Standards) wurde mit Rehydrierungspuffer in 450µl solubilisiert, in die einzelnen Probenreservoirs der Protean IEF Cell (BioRad) vorgelegt und mit 24 cm langen Gelstreifen mit der Gel Seite nach unten bedeckt. Um Austrocknung und Auskristallisation auf den Strips zu vermeiden, wurden sie mit 2 ml Plus one DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare BioScience) bedeckt und über Nacht bei 50 Volt aktiv rehydriert. Danach erfolgte die Fokussierung bei konstanten 20° C in der IEF-Kammer für 7h, in denen insgesamt 57.720 Vh erreicht wurden. Nach der Fokussierung wurden die IPG-Streifen in einer Plastikhülle eingeschweißt und bis zur SDS-Gelelektrophorese bei Minus 80° C gelagert.

3.3.4.3 Zweiter Trennschritt: SDS-Gelelektrophorese

Vor der Übertragung der IPG Streifen auf das SDS-Gel müssen größere Mengen an CHAPS entfernt werden, da diese sonst die Bindung von SDS an die fokussierten Proteine verhindern. Die Equilibrierung erfolgte mit je 20 ml Equilibrationspuffer (SERVA) gemischt mit 7,2g Urea. Zur Reduzierung von Schwefeldoppelbindungen und Alkylierung freier Thiole wurden im ersten Durchgang (je 15 min) 50 mg DTT und im zweiten Lauf 125 mg IAA (Iodacetamid) pro Streifen hinzugefügt. Das verwendete 2D HPE™ Large GEL NF- (SERVA) bestand aus 12,5 % Polyacrylamid und maß 255 x 200 x 0,65 mm. Das industriell gefertigte Gel eignet sich aufgrund seiner geringen Dicke besonders für den Versuchsaufbau. Hierdurch können in der zweiten Dimension hohe Voltzahlen erreicht werden, welche die Proteine auf kleinstem Volumen auftrennen. Auf die Keramikplatte wurde 4 ml Kühlflüssigkeit (SERVA) verteilt, welches vor Überhitzung schützt. Darauf wurde das Gel gelegt. Die IPG Streifen wurden in der Einsenkung des SDS-Gels platziert. Die

Elektrophorese wurde für 6h 50 min und mit einer konstanten Temperatur von 13,8°C durchgeführt, bis der Kontrollfarbstoff den Unterrand der Gele erreicht hatte. Die genauen Laufeigenschaften zeigt **Tabelle 4 in Anhang IV**. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Millipore abgespült und direkt digitalisiert.

3.3.5 Digitalisierung und Auswertung

Nach der Aufreinigung und Auftrennung der Proteine durch die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden die Gele softwaregestützt miteinander verglichen. Jeder Spot auf dem Gel stellt ein Protein dar. Liegen verschiedene Isoformen eines Proteins vor, so kann dasselbe Protein an unterschiedlichen Stellen des Gels auftreten. Einzelne signifikante Spots können vom Gel extrahiert und durch Massenspektrometrie identifiziert werden. Die Gele wurden in 16-bit Graustufentiefe mit dem Fluoreszenzscanner Typhoon™ FLA 9000 und der dazugehörigen Software (vs.1.2 GE Healthcare) eingescannt. Der Scanner misst die Absorptionswerte des Gels auf Pixel-Ebene und wandelt die analoge Vorlage in eine digitale, vom Computer interpretierbare Form um. Für eine optimale Differenzierung der Spots wurden die Voltzahlen so gewählt, dass für jedes Gel in jedem einzelnen Kanal (Cy2 für Dye100, Cy3 für Dye200 und Cy5 für Dye300) mindestens 60.000 Graustufenwerte erreicht wurden. Nach dem Einscannen wurden die Gele mit 250ml Fixierungslösung für 2 x 30 min fixiert. Die eingescannten Abbilder der Gele wurden in Progenesis SameSpot 4.5 (Nonlinear Dynamics) eingepflegt. Diese Software unterstützt den Benutzer bei der Auswertung der Gele. Diese gliedert sich in folgende Schritte:

Qualitätsprüfung → Spot-Detektion → Paarung & Bearbeitung → Datenanalyse

Im ersten Schritt, der **Qualitätsprüfung**, können durch die Anwendung verschiedener Werkzeuge wie Schneiden, Spiegeln und Rotieren die Abbilder der Gele so optimiert werden, dass sie miteinander verglichen werden können. Die Software kontrolliert in diesem Schritt auch das Format, die Kompression, die Sättigung, die Grauskala und den dynamischen Bereich der Graustufen. Im experimentellen Aufbau wurde jeder Probe ein Fluoreszenzfarbstoff zugeordnet (**Anhang IV; Tab. 3**). Für den nachfolgenden Schritt, die Ausrichtung der Gele, wurde ein Referenzbild mit möglichst klarem Spotmuster und guter Proteinseparation ausgewählt. Für diesen Schritt wurde der Kanal Cy 2 des internen Standards verwendet. Da der interne Standard gleichermaßen aus UCC- und SCC-Proben bestand, wurden so alle möglich exprimierten Proteinspots beider Gruppen erfasst. Das Programm verbindet die Position eines Spots des Referenzgels mit den äquivalenten Spots

jedes einzelnen anderen Gels. Jedem Spot wurde - je nach Lage auf dem Gel- eine Nummer zugewiesen. Da Elektrophorese-bedingte Schwankungen die gleiche Positionierung der Spots nicht immer zulassen, um die Gelabbilder exakt miteinander vergleichen zu können, muss die Variation der Positionen der Spots minimiert werden. Die Software nutzt dafür Vektoren, um verschobenen Spots virtuell übereinander zu legen. Ziel ist es, dass ein Proteinspot auf dem einen Gel die gleiche virtuelle Position erhält, wie das gleiche Protein auf einem anderen Gel des Sets. Anschließend wurden die Gele auf ihre Vektoren manuell überprüft.

3.3.6 Ausstanzen signifikant exprimierter Proteinspots

Zum Starten des Stanz-Vorgangs wurden auf dem Gel Referenzpunkte zu Weitergabe der Koordinaten an das Stanzgerät appliziert. Die signifikanten Proteinspots aller Gruppenvergleiche wurden mit dem Ettan Spot Picker (GE Healthcare) softwaregesteuert ausgestanzt und geordnet auf eine Mikrotiterplatte übertragen. Anschließend wurde je Vertiefung 50 µl destilliertes Wasser hinzugefügt, um ein Austrocknen der ausgestanzten Gelstücke zu verhindern.

3.3.7 Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung von Biomolekülen auf Grundlage der Molekülmassenbestimmung. Das Prinzip der in dieser Arbeit genutzten MALDI (Matrix-assoziierte Laser Desorption/ Ionisation)-TOF/TOF (Tandem Time of Flight)-Massenspektrometrie besteht auf einer Laser-induzierten Reaktion, durch welche die Peptidfragmente explosionsartig die Matrix verlassen und dabei ionisieren. In Abhängigkeit von ihrer Größe durchfliegen sie in unterschiedlichen Zeiten ein Vakuum und treffen zuletzt auf eine Detektorplatte, welche die spezifischen Flugzeiten in ein Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) umwandelt. Das dadurch gemessene Spektrum ergibt einen für jedes Protein einzigartigen PMF (*peptid mass fingerprint*). Eine weitere massenspektrometrische Untersuchung (TOF/TOF) schloss sich bei ausreichender Peptidmenge an. Hier regt eine Argon-gefüllte Kollisionszelle die Ionen zu einem weiteren Zerfall (*Collision Induced Dissociation*) an. Die so entstandenen Aminosäuren können erneut anhand ihrer spezifischen Flugzeit identifiziert werden. Die mitangegebene MS Coverage beschreibt die Überlappung von beobachteten zu theoretischen Aminosäuren des identifizierten Proteins (Matched Peaks) (Walker 2005). Durch das Abgleichen mit vorhandenen Informationen der Datenbank (MASCOT Version 2.2 (Matrix Science Ltd, London, UK)) konnten die einzelnen Proteine über ihren PMF identifiziert werden.

3.3.7.1 Extraktion der Peptide

Zur Vorbereitung wurden die ausgestanzten Gelstücke dreimal mit Ammoniumbicarbonat und darauffolgend mit dem Verdauungspuffer Acetonitril (50%) in Ammoniumbicarbonat gewaschen (**Tab. 4**). Bei jedem Waschschrift wurde inkubiert und nachher 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Gelstücke mit Acetonitril (100%) entwässert und erneut bei Raumtemperatur inkubiert und im letzten Schritt für 15 min bei offenem Deckel getrocknet.

Tabelle 4 Vorbereitung der Gelstücke

Schritt	Zeit	Vorgang
1.		Waschen in 25mM Ammoniumbicarbonat
2.	10 min	Inkubation
3.	5 min	Zentrifugation (200 x g)
4.		Waschen in 50% Acetonitril in 25mM Ammoniumbicarbonat.
5.	10 min	Inkubation
6.	5 min	Zentrifugation (200 x g)
Insgesamt 3 Mal Wiederholung Schritt 1.-6.		
7.		Entwässern in 100 % Acetonitril
8.		Inkubation 10 min bei Raumtemperatur
9.	5 min	Zentrifugation (200 x g)
10.	15 min	Trocknen bei offenem Deckel

Vor der Analyse wurden die behandelten Gelstücke mit 7µl aktivierter Trypsinlösung (3,5ng/µl Trypsin) (Promega) versetzt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Insgesamt wurden die Peptide 4h bei 37°C verdaut und mit Hilfe von 10µl 1% TFA (30 min bei Raumtemperatur) aus den Gelstücken extrahiert.

3.3.7.2 MALDI-Targetbelegung

Die zu untersuchenden Proben wurden direkt nach der Gewinnung auf einen vorgefertigten AnchorChip™ MALDI Target (HCCA-Matrix; Bruker Daltonics) pipettiert. Der AnchorChip™ dient als metallischer Probenhalter, auf dem die Analytmoleküle in einer kristallisierenden Matrix gelöst werden. Diese Matrix hat eine hohe Absorption auf der Wellenlänge des Lasers, wodurch bei Bestrahlung gasförmige Ionen freigesetzt werden können. Nach dem Antrocknen der Proben auf dem MALDI-Target wurden 4 µl einer 0,1% TFA- sowie 10 mM Ammoniumphosphat monobasische Lösung auf die noch feuchte Probe gegeben und zusammen quantitativ abgenommen. Abschließend wurde das gesamte MALDI-Target nochmals mit der 0,1% TFA, 10 mM Ammoniumphosphat monobasische Lösung großflächig gespült.

3.3.7.3 Identifizierung der Proteine

Zur Identifizierung der Peptide wurde das getrocknete MALDI-Target in das UltraFlex TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics) eingeschleust und im Reflektormodus gemessen. Der Prozess wurde mit Hilfe der Software Compass® (Bruker Daltonics) gesteuert. Die Proben wurden im Automatik-Modus mit 25 kV Beschleunigungsspannung im positiven Ionenmodus vermessen. Die Datenanalyse erfolgte im Automatikmodus mittels BiTools 3.2 (Bruker Daltonics). Als Datenbankbrowser wurde eine lokale Version von MASCOT Vs. 2.2 (Matrix Science Ltd, London, UK) verwendet. Zur Analyse der generierten Proteinspektren wurde die Datenbank SwissProt (<http://ca.expasy.org/sprot/>) mit der humanen sub-Datenbank (Version Sprot_57.8, 20401 Proteineinträge) herangezogen. Die Fehlertoleranz für die MS/MS-Massen betrug 0,5 Da.

3.3.7.4 Signalweganalyse

Ingenuity® Pathway Analysis (Ingenuity® Systems) unterstützt als Software den Anwender bei der Analyse und Organisation von Datensets auf der Basis aktueller Forschung. Über Algorithmen können die eigenen Ergebnisse innerhalb von komplexen biologischen oder chemischen Systemen analysiert oder einzelne Komponenten in ein bekanntes System eingeordnet werden. Für die IPA® Analyse wurden nur signifikant identifizierte Proteine (Mascot Score >49 definiert als $p \leq 0,05$) verwendet, bei denen die theoretische Masse und der IEP mit den Lageparametern der 2-DE DIGE übereinstimmten. Proteine, die in einem Vergleich sowohl über- als auch unterexprimiert waren, wurden ausgeschlossen. Mit Hilfe der Software wurde eine Core-Analyse durchgeführt. Dafür wurden die Bezeichnung des Proteins als ID und der Expressionsunterschied (Foldchange), als „Observation Ratio“ aus Progenesis importiert. Niedriger exprimierte Proteine erhielten den reziproken Wert des Expressionsunterschiedes. Es wurden nur direkte Verbindungen zwischen den Proteinen beachtet. Kandidaten-Proteine mit Assoziation zum Karzinom und/ oder zur Inflammation wurden im Folgenden einer Pubmed-basierten Literaturrecherche unterzogen. Hier wurden folgende Suchkriterien genutzt: (“x”[tiab]) AND (cancer[tiab] OR tumor[tiab] OR carcinoma[tiab]) AND Humans[Mesh] AND English[lang]), wobei “x” für das jeweilig Kandidatenprotein stand.

3.3.8 Validierung anhand des quantitativem Fluoreszenz-basierten multiplex Western Blots

Microtubule-associated protein (**EB1**), Heat Shock 27 kDA Protein 1 (**HSP27**) und Annexin 5 (**ANXA5**) wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit an der Universität zu Lübeck durch

Frau G. Hö mittels Western Blot und Immunfluoreszenz evaluiert (Hö, G-G.T – Bachelorarbeit, Molecular Life Science, Lübeck, 2015).

Für die Western Blot-Analyse wurde dieselbe Patientenkohorte (UCC n =9; SCC n =10), welche bereits in der 2-DE Analyse genutzt wurde, sowie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnene Normalgewebeproben (n=6) der sporadischen Karzinome genutzt. Der quantitative Western Blot wurde mit Normalisierung gegen das Gesamtproteom durchgeführt, nachdem dieses mit G-Dye-300-Fluoreszenzfarbstoff (NH Dyeagnostic) gemäß den Empfehlungen des Herstellers markiert wurde. Die Separation nach Größe erfolgte durch eine SDS-Page-Trägermatrix (Bio-Rad Laboratories) bei konstanten 200V für 35 min in einer Criterion™ Vertical Electrophoresis Zelle (BIO-RAD). Die markierten Proteine wurden anschließend auf eine feste Trägermembran (Immobilon®-FL PVDF, 0.45 µm, Merck Millipore) mittels Trans-Blot®Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories) übertragen. Die Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 2 % Amersham ECL-Block (GE Healthcare) behandelt, um Proteinbindungsstellen der Membran zu sättigen und so unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach der Inkubation erfolgte die Bindung des Primärantikörpers (anti-ANXA5, anti-rabbit, 1:1000; anti-EB1, anti-mouse, 1:100; anti-HSPB1, anti-mouse, 1:1000) gelöst in 1 × TBS mit 0.1 % Tween-20 (pH 7.6, Cell Signaling) über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den Cy3-markierten sekundären Antikörpern (goat-anti-mouse oder goat-anti-rabbit; Amersham ECL™ Plex CyDye-Conjugated Antibodies, GE Healthcare) inkubiert. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran im Fluoreszenzscanner (GE Healthcare) eingelesen. Die Auswertung der Membran erfolgte mittels Image Quant. Jede spezifische Antikörper-Protein-Bande (532 nm Kanal) wurde gegen das totale Protein normalisiert (648nm Kanal). Zwei UCC-Proben zeigten insuffiziente Proteinmengen für die Validierung mittels Western Blots und wurden somit von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.3.9 Immunhistochemische Färbung einer gesunden Kontrollgruppe und sporadischer kolorektaler Karzinome

Da EB1 auf Grund der Ergebnisse des Western Blots Biomarkerpotential aufwies, wurde es an einer größeren klinischen Kohorte mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Hierfür wurde ein Tissue Microarray (TMA) mit verschiedenen Gewebeproben von SCC- und Normalgewebe des Kolons verwendet. Der TMA verfügt über 60 SCC- und 30 Normalgewebeproben und wurde bereits von Herrn Prof. Dr. M.Sc. Timo Gemoll publiziert (Gemoll et al. 2011). Aus dem formalinfixierten, paraffinierten TMA wurden 4 µm Schnitte

hergestellt und entparaffiniert. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem primären monoklonalen EB1-Antikörper (anti-EB1, anti-mouse, 1:10.000) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Färbung wurde über die Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode durchgeführt und mit Hämatoxylin gegengefärbt (Hsu et al. 1981). Als Chromogen wurde eine DAB-Substratlösung (DAB) hinzugegeben, welche zu einer dunkelbraunen Färbung des Zielantigens EB1 führte. Immunpositivität für EB1 wurde durch ein automatisiertes Computersystem mittels Pixelzählung analysiert. Die einzelnen Schnitte wurden mittels digitaler Mikroskopie (3D HISTECH INTAS) eingescannt und die histologisch repräsentative Region anschließend mittels Image Scope (Aperio,) quantitativ beurteilt. Immunpositivität des molekularen Markers wurde mittels Variablen von 1 (gering), 2 (mäßig) und 3 (stark) beschrieben.

3.3.10 Statistik und Auswertung

3.3.10.1 Varianzanalyse der 2-DE DIGE Daten

Je nach Gruppenvergleich wurde für jeden Spot eine **Varianzanalyse** (Analysis of Variance=ANOVA) durchgeführt. Als Nullhypothese galt, dass das jeweilige Protein in beiden Gruppen eines Vergleiches gleichstark exprimiert wurde. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ festgelegt. Da die Laufeigenschaften der Proteine am Rand der Gele stark durch Streifenbildung und Ausfällung beeinflusst werden, wurden Proteinpräzipitationen an der Anode und Kathode nicht ausgewertet.

3.3.10.2 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (Principal Components Analyse-PCA) ist ein Verfahren der multivariaten Statistik und unterstützt die Identifizierung von statistischen Ausreißern. Die Expressionsdaten der einzelnen Gele werden hier als Punkt in ein mehrdimensionales Koordinatensystem zusammengefasst und in einem zweidimensionalen Raum dargestellt. So können „Gleichheit“ und „Verschiedenheit“ der zu vergleichenden Gruppen in einem PCA Plot graphisch untersucht werden.

Zur Erstellung der Heatmaps wurden die Expressionsdaten der identifizierten Proteine in die Software GProX Graphical Proteomics Data Explorer (Sourceforge) eingespeist.

3.3.10.3 Statistische Auswertung des Western Blots

Die statistische Analyse der Western Blot Analyse wurde mittels GraphPad Prism® (GraphPad Software) durchgeführt. Da eine nichtparametrische Verteilung der Gruppen

vorlag und die Gruppen unabhängig voneinander zu betrachten waren, wurden die Signifikanzen zweier Gruppen mittels zweiseitigem U-Test und zwischen mehreren ungebundenen Gruppen mittels zweiseitigem Kruskal-Wallis-Test ermittelt.

3.3.10.4 TMA-Beurteilung

Die Ergebnisse der manuellen TMA-Beurteilung wurden mittels χ^2 -Verteilungstests auf Signifikanz geprüft. Für die Analyse von EB1 als Prognosefaktor wurde eine Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier ausgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei allen Tests als $p \leq 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Eigenschaften der Gewebeproben

Die UCCs dieser Studie wurden mit den vorliegenden SCCs gepaart und weisen somit vergleichbare Eigenschaften bezüglich des TNM-Stadiums auf (vgl. **Tab. 1**). Die SCC-Proben zeigten differenzierteres Gewebe als die UCC Proben. Patienten der UCC-Gruppe waren bei Tumorentnahme signifikant jünger ($43,7 \pm 15,65$) als SCC Patienten ($68,9 \pm 16,97$; $p=0,004$). 40% der UCC-Patienten waren weiblich (4 von 10) verglichen mit 60% in der SCC Gruppe (6 von 10). Unter den aneuploiden Proben gab es mehr männliche ($n=8$), unter den euploiden mehr weibliche Patienten ($n=4$). Nur 20 % ($n=2$) der gesammelten UCC-Proben wurden bereits im T2-Stadium operiert. Die restlichen Tumore waren bei Entnahme bereits als T3- ($n=7$) bzw. T4-Stadium ($n=1$) klassifiziert. Bei 50% aller Proben waren bereits Lymphknoten befallen ($N>0$).

4.2 Ergebnisse der vergleichenden Proteomanalyse

Die kolorektalen Proben von SCC- und UCC-Patienten wurden aus Stickstoff aufgetaut und im Kryostaten geschnitten. Relevante Zellareale wurden mit Hilfe eines Lasers vom restlichen Gewebe separiert, die Proteine isoliert, weiterverarbeitet und schließlich mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt, verglichen und signifikante Proteine aus dem Gel ausgestochen und im Massenspektrometer identifiziert.

4.2.1 Probenverarbeitung und Proteingehalt

Ziel der experimentellen Voruntersuchungen war, pro Tumor genügend Material für die darauffolgenden Analysen zu erhalten. Getestet wurden unterschiedliche Schnittdicken sowie verschiedene Kits zur simultanen Isolation von RNA, DNA und Proteinen. Effizient zeigte sich eine Schnittdicke von 40 μm sowie die in Material und Methoden beschriebene Weiterverarbeitung der Proben. Im Vorfeld wurde ermittelt, dass im Durchschnitt ca. 0,082 mm^3 Gewebe pro Probe mit Hilfe des LCM-Lasers gewonnen werden muss, um nachfolgend genügend DNA, RNA und Proteine extrahieren zu können. Die nach der Aufreinigung gemessene Proteinkonzentration variierte zwischen 4,3 und 14,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($\sigma_{\text{UCC}}= 5,4\mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 1,75$; $\sigma_{\text{SCC}}=9,91 \mu\text{g}/\mu\text{l} \pm 1,75$).

4.2.2 Gruppierung und Vergleiche

Für die vergleichenden Proteomanalysen von UCCs und SCCs wurden folgende Gruppen gegenübergestellt und ausgewertet:

- **UCC vs. SCC (Vergleich 1)**
- **Euploid vs. Aneuploid (Vergleich 2)**
- **Euploide UCC vs. Aneuploide UCC (Vergleich 3)**
- **Euploide SCC vs. Aneuploide SCC (Vergleich 4)**
- **Euploide SCC vs. Euploide UCC (Vergleich 5)**
- **Aneuploide SCC vs. Aneuploide UCC (Vergleich 6)**

Tabelle 5 im Abschnitt 4.2.4 gibt eine Übersicht darüber, wie viele unterschiedliche Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten und zeigt den Anteil der einzigartigen Proteine. Einige Proteine liegen als unterschiedliche Isoform vor, welche sich als eigener Punkt auf dem 2-DE DIGE Gel darstellt. Es handelt sich um leichte bis größere Unterschiede eines Proteins, welche z.B. durch posttranskriptionale oder posttranslationale Modifikationen verursacht werden können.

4.2.3 Hauptkomponentenanalyse

Der durch die Hauptkomponenten Analyse (Principal Component Analyse; PCA) erzeugte Graph fasst die gesammelten Informationen der Expressionsdaten jedes Proteinpunktes zusammen und hilft, die Verbindungen der einzelnen Gruppen zu identifizieren. Die PCAs der Subvergleiche zeigen jeweils eine gute Separation der verglichenen Gruppen. Exemplarisch ist in **Abbildung 8** der PCA-Plot des Vergleiches UCC vs. SCC dargestellt. Die Daten der Probe 1303 wurden in dieser Analyse als statistische Ausreißer identifiziert und aufgrund ihrer sehr unterschiedlichen Eigenschaften von der weiteren Datenanalyse ausgeschlossen (**Abb. 7**).

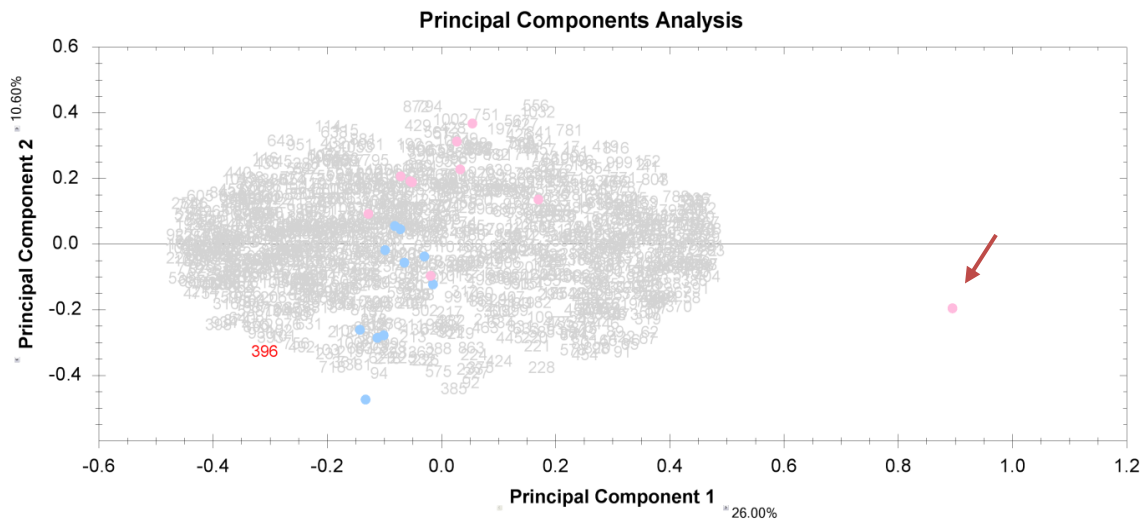


Abbildung 7 Der PCA Plot des Vergleichs SCC (blau) vs. UCC (rosa) zeigt die Expressionsvarianz (farbige Punkte) aller detektierten Proteinspots (graue Zahlen) aller Gele. Während die Gele auf der linken Seite eine Gruppierung aufweisen, liegt der Spot für das Gel 1303 (roter Pfeil) des Graphen als statistischer Ausreißer vor.

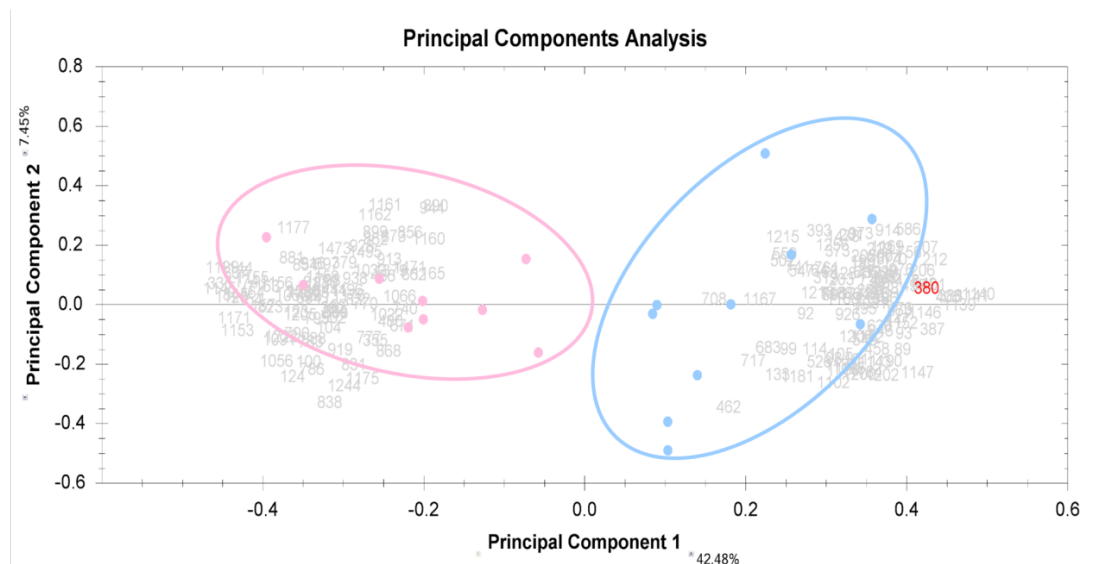


Abbildung 8 Der PCA Plot der signifikant unterschiedlichen Proteine im Vergleich UCCs vs. SCCs zeigt eine gute Separation zwischen UCCs (rosa) und SCCs (blau). In grau dargestellt ist die Varianz der einzelnen Spots. Die farbigen Punkte repräsentieren die Expressionsvarianz der Spots eines jeden Gels.

4.2.4 Identifizierte Proteine

Ziel der 2-DE DIGE-Gelanalyse war es, Unterschiede in der Proteinexpression von UCCs und SCCs, sowie euploiden und aneuploiden Tumoren nachzuweisen. Von 1.030 detektierten Proteinpunkten zeigten 987 einen Expressionsunterschied zwischen den Gelen. Davon zeigten sich 317 Spots in allen Vergleichen statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die Foldchange variierte zwischen 1,18 und 2,95. Der Arbeitsablauf ist in **Abbildung 9** dargestellt.

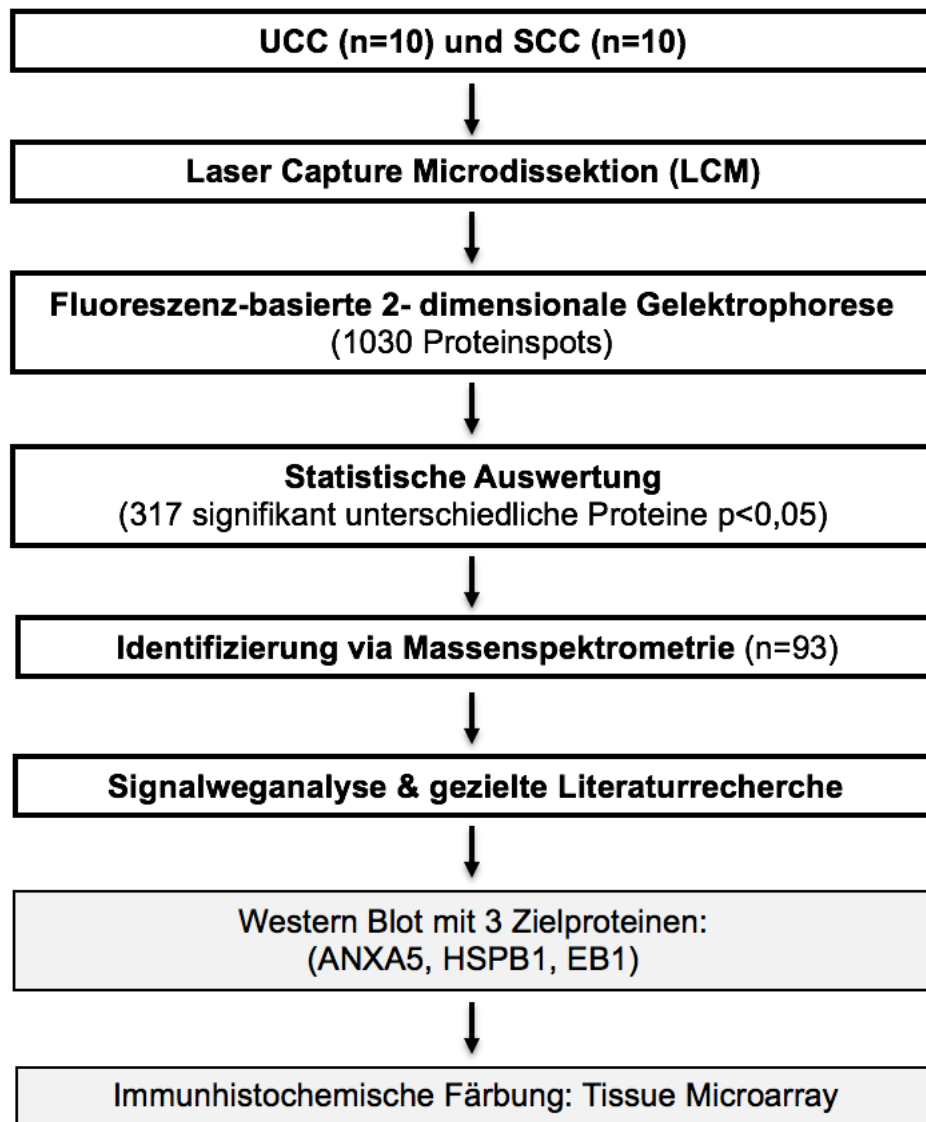


Abbildung 9 Übersicht des Arbeitsablaufs von der Auswahl der Proben bis zur Identifikation potentieller Zielproteine. Die in Verbindung mit dieser Arbeit durchgeführten Schritte sind in fett hervorgehoben.

93 Proteine (29,3%) konnten per MALDI-Massenspektrometrie identifiziert werden. Eine Übersicht aller identifizierten Proteine und deren massenspektrometrischen Eigenschaften findet sich, sortiert nach Spotnummer, in **Tabelle 5**.

Tabelle 5 Massenspektrometrische Daten der identifizierten Proteine (Mascotscore >49) aus allen Vergleichen: UCC vs. SCC (1), Euploid vs. Aneuploid (2), Euploid UCC vs. Aneuploid UCC (3), SCC Euploid vs. SCC Aneuploid (4), Euploid UCC vs. Euploid SCC (5), Aneuploid UCC vs. Aneuploid SCC (6). Neben den SwissProt-Namen sind das Molekulargewicht (MW), der isoelektrische Punkt (IEP) sowie weitere massenspektrometrische Daten gelistet. Für die Vergleiche UCC vs. SCC (1) und UCC Aneuploid vs. SCC Aneuploid (6) sind die Foldchange und p-Werte der einzelnen Proteinspots aufgeführt.

Spotnummer	Name	Chromosomale Lokalisation*	Protein MW	IEP	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Matched MS Peaks	p-Wert (1)	Foldchange (1) **	p-Wert (6)	Foldchange ∞ (6)	Vergleich
89	HSP74	5q31.1	95127	5,0	54	26	11	8/26			0,013	1,56	5
98	MVP	6p11.2	99551	5,2	137	62	25	20/55	0,014	1,18	0,017	1,21	1
101	MVP	6p11.2	99551	5,2	87	32	17	10/21	0,010	1,31	0,020	1,41	1
104	UBA1	Xp11.23	118858	5,4	77	19	18	16/60	0,022	0,83	0,002	0,75	1
114	GANAB	11q12.3	107263	5,7	66	30	15	13/32	0,023	1,23			1
205	HS90B	6p12	83554	4,8	205	95	21	13/20	0,013	1,97	0,024	2,00	1
208	HS90B	6p12	83554	4,8	69	26	16	9/23	0,016	1,76			1
212	HS90B	6p12	83554	4,8	86	51	26	15/47	0,006	2,07	0,003	2,43	3
319	HSP7C	11q24.1	71082	5,2	240	170	29	18/39	0,018	1,18			1
335	ALBU	4q13.3	71317	5,9	188	145	38	19/33	0,000	0,56	0,005	0,55	1
337	ALBU	4q13.3	71317	5,9	179	138	21	15/37	0,001	0,56	0,011	0,56	1
393	CH60	2q33.1	61187	5,6	59	13	20	9/32	0,028	1,47	0,049	1,56	1
401	CH60	2q33.1	61187	5,6	128	77	44	23/84	0,002	1,77	0,022	1,75	1

Spotnummer	Name	Chromosomale Lokalisation*	Protein MW	IFP	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Matched MS Peaks	P-Wert (1)	Foldchange (1) **	P-Wert (6)	Foldchange _∞ (6)	Vergleich
405	CH60	2q33.1	61187	5,6	102	73	13	7/88	0,001	2,01	0,020	1,89	1
447	TBB5	6p21.33	50095	4,6	103	2	41	19/77					3 4 5 6
458	TBA1C	12q13.12	50548	4,8	52	0	30	10/81					2
462	ALDH2	12q24.2	56859	6,8	82	19	28	11/42	0,035	1,25			1
472	KLH26	19p13.11	69179	6	55	15	10	4/5			0,024	1,51	3 4 5 6
476	RUVB2	19p13.3	51296	5,4	135	78	50	19/62	0,018	1,31	0,039	1,38	1
477	HV105	n.f.	13790	9,2	49	17	25	04/33					4
478	GSHB	20q11.2	52523	5,6	71	23	21	9/27	0,001	1,55	0,003	1,64	1
479	ATPB	12q13.13	56525	5,1	115	93	15	6/84					4
486	TBB5	n.f.	50095	4,6	67	21	19	8/29					1
495	ARP3	2q14.1	47797	5,5	113	59	28	11/31	0,004	1,18	0,002	1,26	1
502	OPA1	3q28-q29	112131	8,6	57	19	9	8/13	0,026	1,22			1
541	K1C18	11.p 51.1	48029	5,2	88	58	47	22/102					2
542	SAHH	20q11.22	48255	5,9	66	18	21	10/43	0,001	1,42	0,026	1,42	1
559	SUCB1	13q12.2-q13.3	50627	7,7	56	14	19	8/32	0,046	1,27			1
642	HNRPC	14q11.2	33707	4,8	69	25	17	5/22			0,003	1,75	3
645	HNRPC	14q11.2	33707	4,8	80	27	12	4/31	0,012	1,37	0,001	1,65	1
671	CYTSA	22q11.23	124925	5,4	58	11	15	14/45	0,033	0,83			1
699	RM01	n.f.	37113	9,5	57	14	29	7/31					2 3
716	IPYR	10q11.1-q24	33095	5,5	60	13	34	11/76	0,023	1,35	0,001	1,59	1
731	OTUB1	11q13.1	31493	4,7	68	36	29	7/30					3
740	ANXA4	n.f.	36088	5,8	81	30	33	12/45					1

Spotnummer	Name	chromosomale Lokalisation*	Protein MW	IEP	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Matched MS Peaks	p-Wert(1)	Foldchange (1) **	p-Wert (6)	Foldchange _∞ (6)	Vergleich
755	ECH1	19q13.1	36136	9,2	73	37	25	8/21	0,001	1,65	0,001	1,86	3
758	MARE1	20q11.1-q11.23	30151	4,9	68	25	46	8/40	0,001	1,65	0,001	1,86	1
768	PSA1	11p15.1	29822	6,2	70	32	31	6/28	0,016	0,71	0,003	0,59	2
786	CATD	11p15.5	45037	6,1	94	56	26	14/43	0,049	0,85	0,004	0,63	1
790	GSTO1	10q25.1	27833	6,3	72	20	29	8/31	0,004	0,7	0,004	0,63	1
798	ECHM	10q26.2-q26.3	31823	9,4	59	16	26	6/27	0,042	0,81	0,006	0,70	1
831	NDUS3	11p11.11	30337	7,8	84	18	43	12/97	0,032	0,76	0,044	1,49	1
862	GSTP1	11q3	23569	5,3	67	30	39	6/26	0,008	1,62	0,012	0,81	1
863	COMT	22q11.21	30474	5,2	59	8	30	7/46	0,049	1,25	0,017	0,31	1
873	PARK7	10q25-q26	20050	6,4	53	7	56	09/78	0,032	1,44	0,023	1,71	1
919	APT	16q24	19767	5,7	77	33	31	4/9	0,020	1,45	0,002	0,57	1
973	NDKA	17q21.3	17309	5,8	80	40	57	9/46	<0.0001	0,6	0,002	0,57	1
976	NDKA	17q21.3	17309	5,8	159	36	55	8/18	<0.0001	1,97	0,001	2,05	1
1129	ALBU	4q13.3	71317	5,9	104	62	31	16/55	<0.0001	2,1	0,002	2,16	1
1140	CH60	2q33.1	61187	5,6	97	50	38	14/49	0,000	1,6	0,006	1,39	1
1141	CH60	2q33.1	61187	5,6	90	43	9	3/3	0,000	0,63	0,006	0,58	1
1143	ALDH2	12q24.2	56859	6,8	102	55	30	12/37	0,000	0,59	0,002	0,59	1
1144	ALBU	4q13.3	71317	5,9	194	125	53	25/65	0,001	1,27	0,001	1,31	1
1145	ALBU	4q13.3	71317	5,9	185	143	46	22/54	0,001	1,43	0,007	1,45	1
1146	TBB4B	9q34	50255	4,6	130	3	45	25/99	0,001	1,27	0,001	1,31	1
1147	TBB4B	9q34	50255	4,6	241	41	68	42/107	0,001	1,27	0,001	1,25	1
1152	HSP7C	11q24.1	71082	5,2	124	77	38	27/98	0,001	1,27	0,031	1,25	1

Spotnummer	Name	chromosomale Lokalisation*	Protein MW	IEP	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Matched MS Peaks	p-Wert(1)	Foldchange(1)**	p-Wert(6)	Foldchange _∞ (6)	Vergleich
1154	K1C19	17q21.2	44079	4,9	104	36	50	20/108	0,007	0,75	0,028	0,72	1
1155	ALBU	4q13.3	71317	5,9	217	135	48	28/65	0,002	0,59	0,016	0,62	1
1158	GCC2	2q12.3	196872	5	59	9	10	14/34	0,007	0,64	0,023	0,61	1
1160	GRP78	9q33.3	72402	4,9	112	60	38	22/102	0,011	0,72			1
1161	GRP78	9q33.3	72402	4,9	72	32	24	12/45	0,009	0,65			1
1162	GRP78	9q33.3	72402	4,9	180	121	44	26/78	0,003	0,65			1
1168	K1C16	17q21.2	51578	4,8	111	28	38	16/72	0,001	1,48	0,001	1,65	1
1169	CH60	2q33.1	61187	5,6	63	7	9	3/18	0,002	1,79	0,005	2,09	1
1175	GSTP1	11q13	23569	5,3	115	44	55	10/39	0,024	0,69	0,030	0,65	1
1176	GSTP1	11q13	23569	5,3	70	28	40	6/24	0,010	0,77			1
1180	ANXA3	4q21.21	36524	5,5	110	73	31	13/50	0,013	1,28			1
1186	ANXA5	4q27	35971	4,8	60	10	32	9/60	0,002	0,63	0,010	0,63	1
1189	U520	2q11.2	246006	5,7	58	24	12	16/41	0,005	1,53			1
1190	TBA1B	12q13.12	50804	4,8	105	1	52	23/108	0,007	1,27	0,019	1,28	1
1196	DYST	6p12.1	865259	5	92	11	9	54/85	0,025	0,76	0,013	0,70	1
1200	ANXA4	2p13.3	36088	5,8	208	160	66	29/72					5
1202	TBA1B	12q13.12	50804	4,8	159	25	60	25/86	0,011	1,41			1
1206	1433B	8q23.1	28179	4,6	169	109	41	12/47	0,019	1,23	0,041	1,25	1
1210	ALBU	4q13.3	71317	5,9	133	91	29	18/41	0,021	0,67			1
1222	ACTB	7p22	42052	5,2	115	0	30	13/99	0,023	0,72	0,049	0,68	1
1242	HS90B	6p12	83554	4,8	139	74	34	30/95	0,032	1,71			1
1261	HSPB1	7q11.23	22826	6	90	51	17	3/5	0,007	0,71	0,027	0,73	1
1268	K1C18	11.p 51.1	48029	5,2	185	113	31	13/30					2

Spotnummer	Name ^o	chromosomale Lokalisation*	Protein MW	IEP	Mascot Score	Difference	MS Coverage	Matched MS Peaks	p-Wert(1)	Foldchange (1) **	p-Wert (6)	Foldchange (6) [∞]	Vergleich
1289	HSPB1	7q11.23	22826	6	59	11	38	6/34					3
1389	DPOD1	n.f.	125035	6,7	63	7	22	15/66			0,013	1,73	3
1429	PHB	17q21	29843	5,5	188	146	38	11/24					4
1432	RINI	11p15.5	51766	4,6	70	30	36	13/81					2
1457	K2C8	12q13	53671	5,4	138	82	50	30/103					3
1478	RSSA	3p22.2	32947	4,6	52	15	18	5/19	0,039	1,36			1
1489	PDIA6	2p25.1	48490	4,8	106	2	51	15/95			0,000	0,52	3
													4
													5
													6

^obezieht sich auf humane Proteine (_HUMAN)

* Chromosomenlokalisierung gemäß Information durch NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>; Februar 2016).

** Foldchange zeigt die Regulation des Proteins: Werte >1 repräsentieren ein höheres Level in SCC während Werte <1 ein niedrigeres Niveau in SCC Proben im Vergleich zu UCC Proben angeben

[∞] Foldchange zeigt die Regulation des Proteins: Werte >1 repräsentieren ein höheres Level in SCC während Werte <1 ein niedrigeres Niveau in SCC aneuploid Proben im Vergleich zu UCC aneuploid Proben angeben

4.3 Signalweganalyse

Insgesamt konnten 83 der 87 identifizierten Proteine (95,4%) in der IPA® Software-Datenbank identifiziert und somit analysiert werden. Netzwerke mit einem Score von > 5 wurden als signifikant definiert und sind in **Tabelle 6** dargestellt. Aufgrund der quantitativen Verteilung der Vergleichskollektive wurde im Folgenden der Fokus auf die Ergebnisse der Vergleiche **UCC vs. SCC** und **UCC Aneuploid vs. SCC Aneuploid** gelegt.

Tabelle 6 (siehe nächste Seite) Übersicht der 2-DE DIGE und IPA Ergebnisse der einzelnen Vergleichsgruppen. Es wird die Anzahl der signifikanten und per Massenspektrometrie identifizierten Proteine aufgeführt. Des Weiteren werden assoziierte Erkrankungen und Störungen sowie molekulare Funktionen aufgeführt (Stand 27.07.2016). UCC: Colitis Ulcerosa assoziiertes Karzinom; SCC: Sporadisches kolorektales Karzinom; A: Aneuploid; E: Euploid

Vergleich	Signifikant (identifiziert)	Einzigartig	Expres- sion	Netzwerke	Score	Krankheiten und Störungen	p-Wert	Anzahl der Moleküle	Molekulare und zelluläre Funktionen	p-Wert	Anzahl der Moleküle
UCC vs. SCC	196(67)	43	hoch 22 niedrig 21	Post-Translationale Modifikation, Proteinfaltung, neurologische Erkrankungen Gastrointestinale Erkrankungen, Erkrankungen d. hepatischen Systems, Metabolische Erkrankungen Zellsignal, zelluläre Zusammensetzung und Organisation, dermatologische Erkrankungen	60 32 8	Krebs Organismale Verletzung und Abnormalitäten Neurologische Erkrankungen Psychologische Störungen Gastrointestinale Erkrankungen	<0,0122 <0,0122 <0,0116 <0,0103 <0,0103	34 38 24 21 27	Zellwachstum und Proliferation Zelluläre Bewegung Post-Translationale Modifikation Proteinfaltung DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	<0,0103 <0,0103 <0,0082 <0,0008 <0,0103	29 21 11 6 13
E SCC vs. A SCC	44(9)	8	3 5	Gene Expression, Zell-Zyklus, DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	12	Infektiöse Erkrankungen Störungen d. endokrinen Systems Gastrointestinale Erkrankungen Metabolische Erkrankungen Ernährungsstörungen	<0,0313 <0,0069 <0,0069 <0,0320 <0,0080	4 2 2 3 1	Zelluläre Entwicklung Zellsignale Zelltod und - überleben Zellmorphologie Zellstruktur & - organisation	<0,04969 <0,0013 <0,0365 <0,0058 <0,0137	4 1 4 1 1

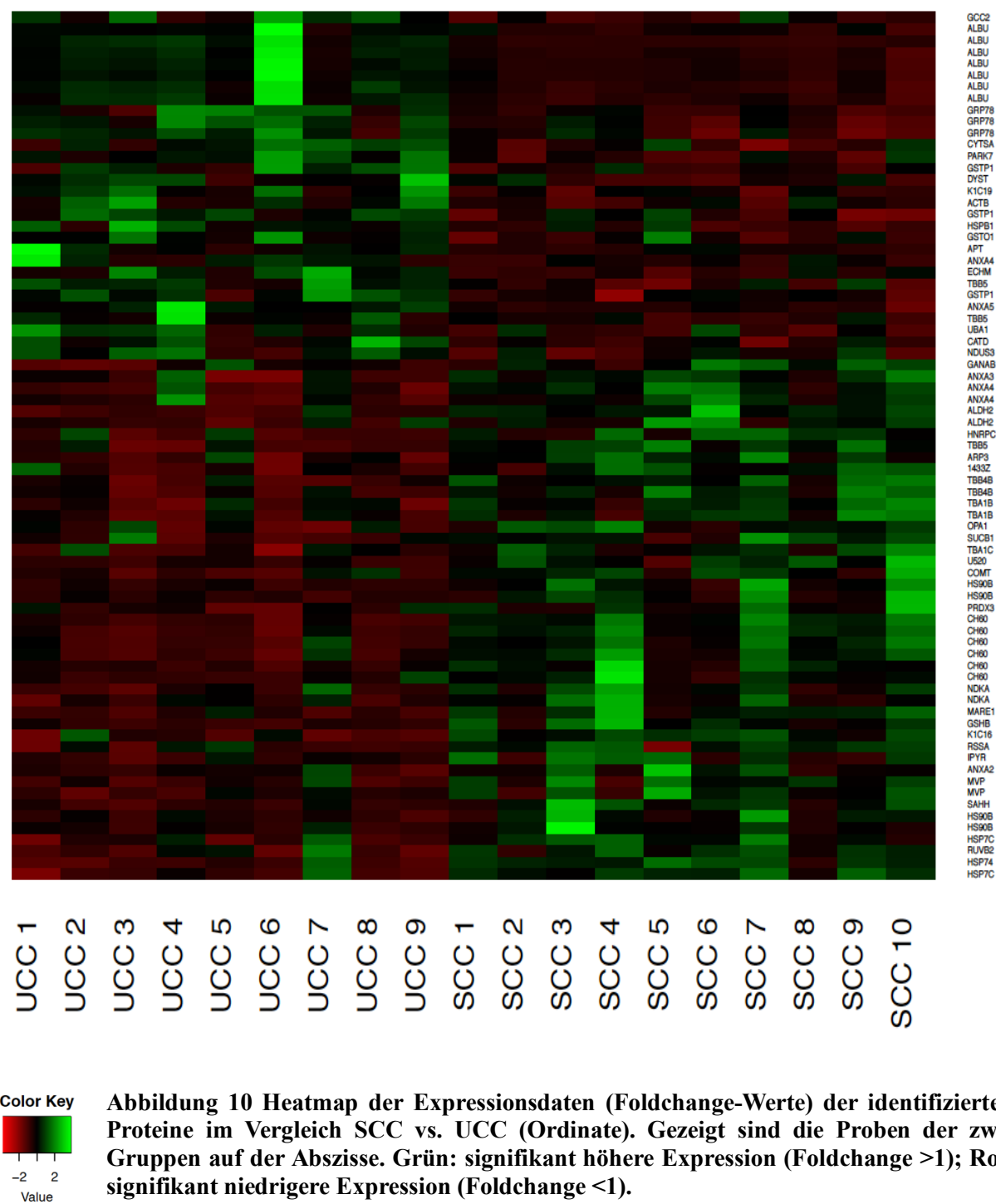
Vergleich	Signifikant (identifiziert)	Einzigartig			Expression	Netzwerke	Score	Krankheiten und Störungen	p-Wert	Anzahl der Moleküle	Molekulare und zelluläre Funktionen	p-Wert	Anzahl der Moleküle
		hoch	niedrig	10									
E UCC vs. A UCC	46(15)	14	4	10	DNA Replikation, Rekombination und Reparatur, Zelltod und –überleben, Krebs	25	Krebs	<0,0500	9	Zellfunktion und Aufrechterhaltung	<0,0260	3	
						Organismale Verletzung und Abnormalitäten	<0,0500	9	Zellzyklus	<0,0436	3		
						Erkrankungen d. reproduktiven Systems	<0,0492	6	Zelluläre Zusammensetzung und Organisation	<0,0145	3		
						Störungen v. verbindendem Gewebe	<0,0338	5	Zelluläre Entwicklung	<0,0231	1		
						Entwicklungsstörungen	<0,0224	3	Zelluläres Wachstum und Proliferation	<0,0231	7		
A vs. E	28(7)	6	2	4	Zelluläre Entwicklung, zelluläres Wachstum und Proliferation, Zelltod und Überleben	10	Dermatologische Erkrankungen und Konditionen	<0,0418	2	Zelluläre Zusammensetzung und Organisation	<0,0031	1	
						Störungen d. endokrinol. Systems	<0,0397	2	Zelluläre Beeinträchtigung	<0,0281	1		
						Gastrointestinale Erkrankungen	<0,0162	3	Zelluläre Entwicklung	<0,0327	1		
						Metabolische Erkrankungen	<0,0097	2	Zelluläres Wachstum und Proliferation	<0,0003	1		
						Infektiöse Erkrankungen	<0,0225	3	Zelluläre Funktion und Erhaltung	<0,0131	1		

Vergleich	Signifikant (identifiziert)	Einzigartig	Expression		Netzwerke	Score	Krankheiten und Störungen	p-Wert	Anzahl der Moleküle	Molekulare und zelluläre Funktionen	p-Wert	Anzahl der Moleküle
			hoch	niedrig								
E UCC vs. E SCC	41(13)	12 8 4			Zelltod und –überleben, metabolische Erkrankungen, Neurologische Erkrankungen	25	Krebs	<0,0464	11	Zelltod und –überleben	<0,0432	8
							Organismale Verletzung und Abnormalitäten	<0,0495	11	Post-Translationale Modifikation	>0,0094	4
							Endokrines System Störungen	<0,0411	4	Proteinfaltung	<0,0094	2
							Gastrointestinale Erkrankungen	<0,0483	8	Aminosäure Metabolism	<0,0094	1
							Inflammatorische Erkrankungen	<0,0381	5	Zelluläre Beeinträchtigung	<0,0062	3
A UCC vs. A SCC	178(51)	36 21 15			Post-Translational Modifikation, Protein Folding, Krebs Zelluläre Bewegung, Zelltod und – Überleben, Embryonale Entwicklung Zellzyklus, Zelltod und –überleben, DNA Replikation, Rekombination und Reparatur	25	Krebs	<0,0333	30	Zelltod und –überleben	<0,0342	18
							Organismale Verletzung und Abnormalitäten	<0,0333	32	Post-Translationale Modifikation	<0,0223	9
							Neurologische Erkrankungen	<0,0296	18	Proteinfaltung	<0,0003	4
							Psychologische Störungen	<0,0205	15	Zelluläres Wachstum und Proliferation	<0,0251	18
							Gastrointestinale Erkrankungen	<0,0296	20	Zellulärer Zusammenhalt und Organisation	<0,0278	13

4.3.1 Sporadisches kolorektale Karzinom (SCC) versus Colitis Ulcerosa assoziiertes kolorektales Karzinom (UCC)

Die Proteinexpression wurde zwischen UCCs (n=9) und SCCs (n=10) verglichen. Insgesamt wurden 199 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine gefunden. Von den signifikanten Proteinen (ANOVA $<0,05$) konnten 67 massenspektrometrisch identifiziert werden. Dies entspricht mit einem Anteil von 38% der höchsten Identifikationsrate unter den Vergleichen. **Tabelle 5** gibt eine Übersicht über die identifizierten Proteine. In **Abbildung 10** sind die Expressionsdaten der Proteine in einer „Heatmap“ visualisiert. Basierend auf diesen 43 einzigartigen Proteinen wurden in Bezug auf die direkten Interaktionen und die Regulation der Peptide drei Netzwerke [„posttranslationale Modifikation, Protein Faltung, Neurologische Erkrankungen“ (Score 60), „Gastrointestinale Erkrankungen, systemische hepatische Erkrankungen, metabolische Erkrankungen“ (Score 32) und „Zellsignale, zellulärer Zusammenhalt und Organisation, dermatologische Erkrankungen“ (Score 8)] gefunden. Das erstere Netzwerk ist in **Abbildung 11** dargestellt. Als signifikant assoziierte Krankheiten und Störungen konnten „Krebs“ mit 34 und „Störungen des Organismus und Abnormitäten“ mit 38 Proteinen sowie „gastrointestinale Erkrankungen“ mit 27 Proteinen ($p<0,01$) assoziiert werden. Spot #1262, als Heat shock protein beta (Fold 3,4), # 919, als APT (Fold 3,2) und die Spots #1141 und #1169, beide als CH60 (Fold 2,2/2,1) identifiziert, zeigten die höchsten Foldchange Werte in diesem Vergleich. 89% der Proteine sind im Cytoplasma lokalisiert. Es wurde eine unterschiedliche Expression bei Proteinen gefunden, die im Zusammenhang mit zellulärem Wachstum, posttranslationaler Modifikation, Proteinfaltung und DNA Replikation und Reparatur ($p<0,01$) stehen, aber auch eine Rolle bei zellulärer Bewegung und Proliferation spielen. Interessanter Weise konnten 18 Proteine mit einer immunologischen Funktion und 19 Proteine ($p<0,0394$) mit einer inflammatorischen Funktion zugeordnet werden. Betrachtet man die molekularen Funktionen, welche von den gefundenen Proteinen ausgeübt werden, dann stehen katalytische (n=14) und strukturbildende Proteine (n=12) wie zum Beispiel Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 (Mapre 1) oder Tubulin alpha-1B chain (TBA1B), Tubulin beta-4B chain (TUBB4B) sowie verschiedenen Keratine im Vordergrund. Vier Proteine sind mit der Bindung von Nukleinsäuren, weitere vier Proteine (MVP, U520, GSTO1, HNRPC) mit der Bindung von Proteinen (GSTO1, DYST, MAPRE1, OPA1) involviert. Ein Protein (Glutathione S-Transferase omega-1) verfügt über regulatorische Aktivität im Rahmen der Translation. Desweiteren konnten durch einen IPA[®] Biomarker-Filter für Kolonkarzinome 37 Zielproteine identifiziert werden: ACTB, ACTR3, AHCY, ALDH2, ANXA3, **ANXA5**, ATP5B, COMT, **CTSD**, DST, ECHS1, GANAB,

GCC2, GSS, GSTO1, GSTP1, HNRNPC, HSP90AB1, HSPA8, HSPB1, HSPD1, KRT16, KRT19, **EB1**, MVP, **NME1**, PPA1, PRDX3, PSMA6, SNRNP200, SPECC1L, SUCLA2, TUBA1B, TUBB4B, UBA1, YWHAZ. Ein Großteil dieser gefundenen Proteine unterstützt metabolische Prozesse (n=23).



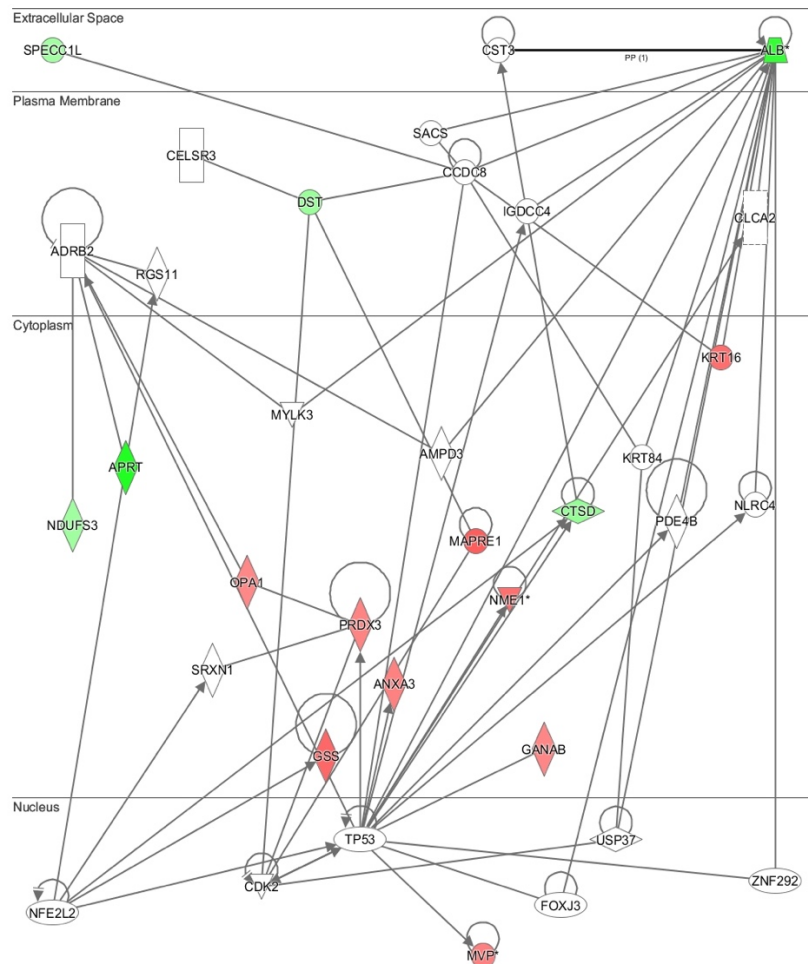


Abbildung 11 stellt exemplarisch für den Vergleich UCC vs. SCC das Netzwerk „Gastrointestinale Erkrankungen, systemische hepatische Erkrankungen, metabolische Erkrankungen“ (Score 32) dar. Als zentraler Knotenpunkt ist unter anderem EB1 (MAPRE1) dargestellt. Grüne Färbung weist auf eine Foldchange <1, eine rote Farbe auf eine Foldchange >1 hin.

Zwei Proteine sind in die Regulation des Zytoskeletts durch Rho GTPase (ACTB, TUBB4B) involviert. HSPA8 und HSPA5, beides Chaperone, gehören zum Apoptosesignalweg. Sortiert man die unterschiedlich regulierten Proteine nach der entsprechenden Genlokalisierung, so sind die meisten Gene auf den Chromosomen 2, 4, 10, 11 und 22 lokalisiert.

4.3.2 Aneuploide UCCs vs. aneuploide SCCs

Die Proteinexpression wurde zwischen aneuploiden UCCs (n=7) und aneuploiden SCCs (n=7) verglichen. Ziel war es, zu zeigen, dass SCCs und UCCs mit gleichem Ploidiestatus eine unterschiedliche Proteinregulation aufweisen. Insgesamt wurden 178 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine gefunden. Dies entspricht nach dem Vergleich UCC vs. SCC den meisten Unterschieden in den durchgeführten Vergleichen.

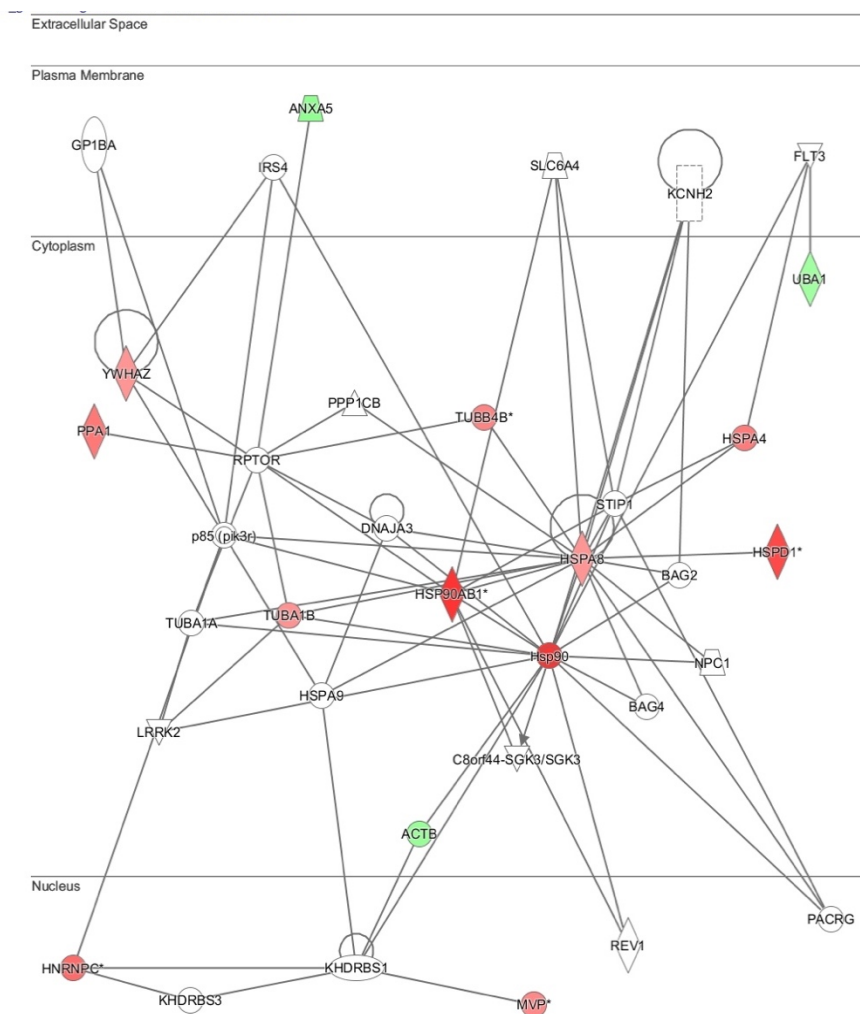


Abbildung 12 zeigt das Netzwerk "Krebs, posttranslationale Modifikation, Proteinfaltung" (Score 25) im Vergleich SCC aneuploid vs. UCC aneuploid. Rot und Grün indizieren eine höhere bzw. niedrige Expression der Proteine in den jeweiligen Gruppen. Ein Großteil der gefundenen Proteine liegt im Zytoplasma. Als zentrale Knotenpunkte können HSPA8, HSP90AB1 und Hsp90 beobachtet werden.

Von den signifikanten Proteinen (ANOVA < 0,05) konnten 53 (30 %) massenspektrometrisch identifiziert werden, darunter 31 einzigartige Proteine. 21 Proteine zeigten sich bei SCCs, 15 bei UCCs höher exprimiert; dies ist ebenfalls in **Abbildung 13** als Heatmap dargestellt. Basierend auf den 21 Proteinen konnten zwei signifikante Netzwerke gefunden werden (Score > 5) (**Abb.12**). Weitere interessante verknüpfte Funktionen waren Zellwachstum und Proliferation (n=18; p<0,0251), zellulärer Zusammenhalt und Organisation (n=13; p<0,0278), Proteinfaltung (n=4 p>0,0003) und posttranslationale Modifikation (n=9; p<0,0223) (vgl. **Tab. 6**). Auffällig ist, dass gehäuft Proteinexpressionsunterschiede von

Genen lokalisiert auf 20q11 (*MAPRE1*; *SAHH*, *GSHB*), 2q (*ARP3*; *CH60*; *PDIA6*) und 6p (*HS90B*, *DYST*, *MVP*) vorliegen.

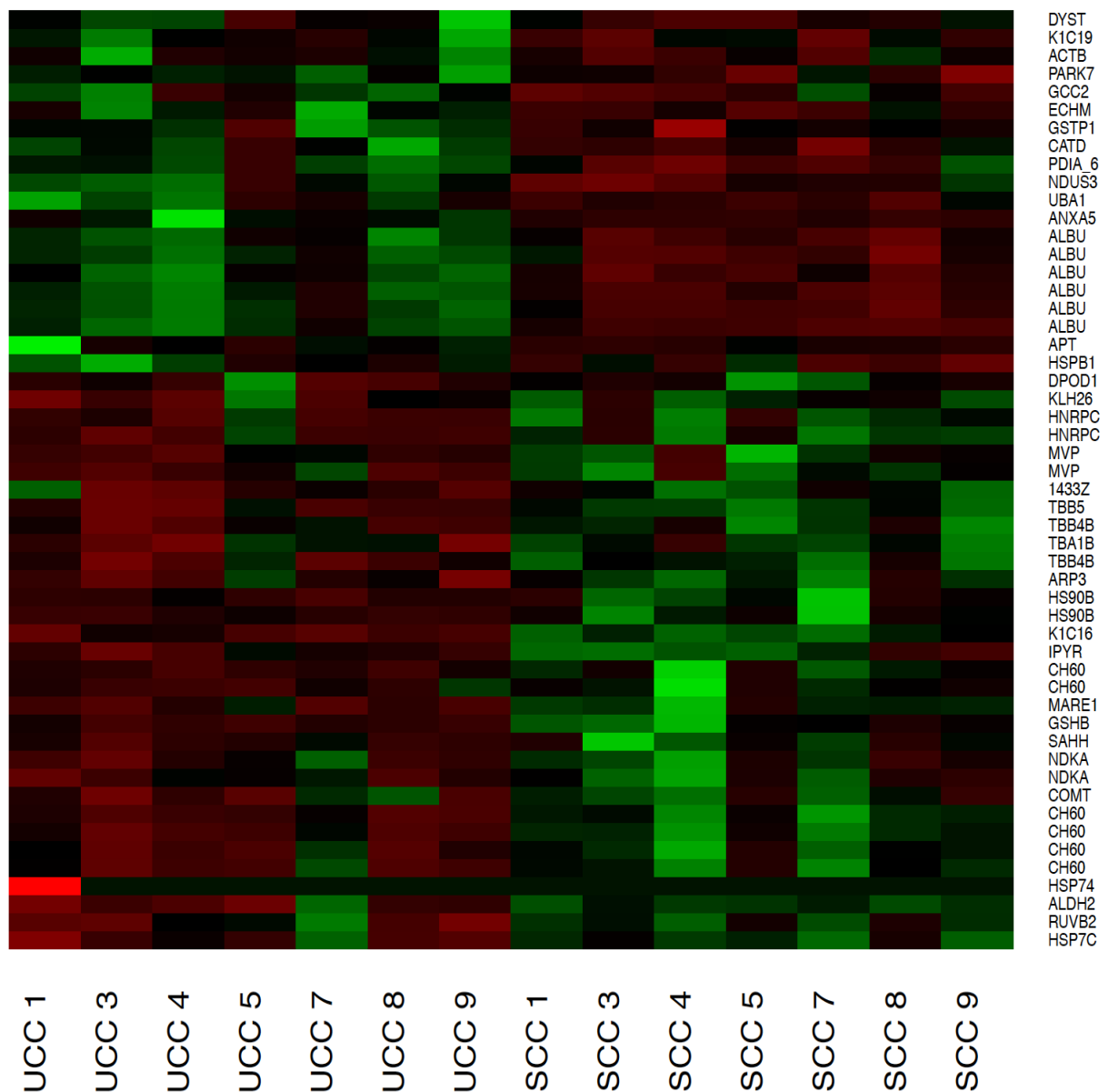


Abbildung 13 Heatmap der via Massenspektrometrie identifizierten signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine im Vergleich UCC aneuploid vs. SCC aneuploid; hier auf der Ordinate dargestellt und auf der Abszisse gegen die einzelnen Proben aufgetragen. Höher exprimierte Proteine sind in Grün (Foldchange >1) und niedriger exprimierte Proteine in Rot dargestellt (Foldchange <1).

4.4 Validierung durch Western Blot und Immunhistochemie

Anhand statistischer Auswertung, Signalweganalyse und Literaturrecherche konnten drei Schlüsselproteine, R/EB family, member 1 (EB1), Annexin 5 (ANXA5A) und Heat shock 27kDA protein 1 (HSPB1) für die Validierung mittels Western Blot ausgewählt werden. Die

Ergebnisse des, durch Frau G. Hò durchgeführten, Western Blots bestätigen die nachgewiesene Regulation für EB1 und HSPB1 der 2-DE DIGE-Analyse (Hò, G.-Bachelorarbeit, Molecular Life Science, Lübeck, 2015). EB1 war signifikant höher in SCCs als in UCCs exprimiert ($p=0,0019$). Im Vergleich zum Normalgewebe zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den UCCs ($p>0,05$), jedoch eine signifikant niedrigere Expression von EB1 im Vergleich zu SCCs ($p=0,0005$) (**Abb. 14**).

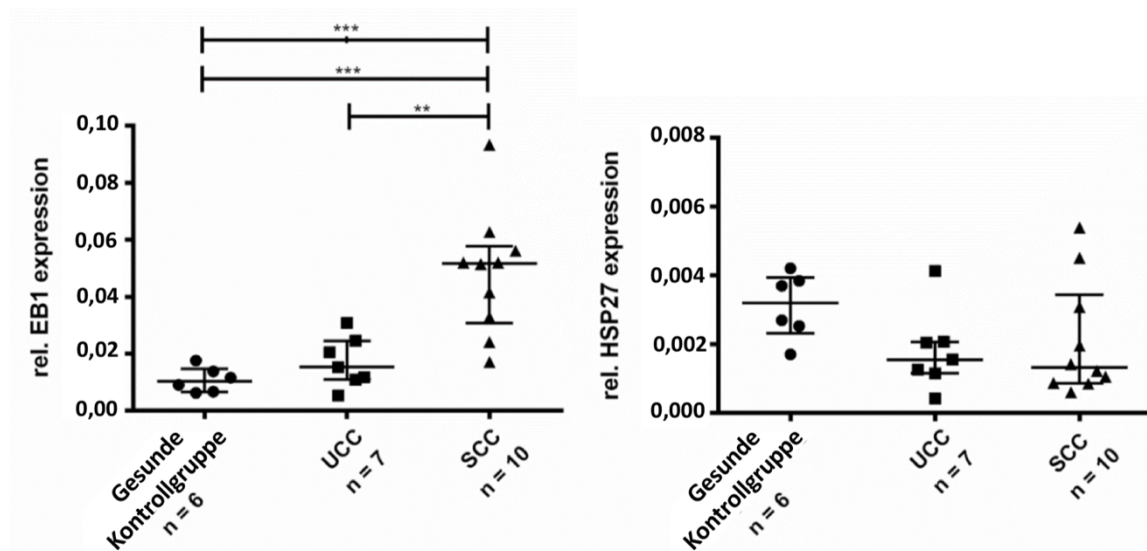


Abbildung 14 Western Blot der Targetproteine EB1 (links) und HSP27 (rechts). EB1 ist signifikant niedriger in gesunden Kontrollen exprimiert während HSP27 einen Trend zu höherer Expression in der gesunden Kontrollgruppe zeigt (***: $0,0001<p<0,001$; **: $0,001<p<0,01$). Punkte, Kreise und Dreiecke stellen die relative Proteinexpression jeder Probe sowie den Median und den interquartilen Abstand jeder Gruppe dar.

Heat shock protein 27 zeigte einen Trend, niedriger im SCC als im UCC exprimiert zu sein. Das Protein wies ebenfalls einen Trend höherer Werte in der gesunden Kontrollgruppe im Vergleich zu UCCs und SCCs auf. Beide Vergleiche waren nicht signifikant. Die 2-DE DIGE Expression von ANXA A5 konnte nicht im Western Blot bestätigt werden.

Um die EB1 Expression im SCC weiter zu evaluieren, wurde das Expressionsverhalten des Proteins an einem Tissue-Microarray bestehend aus normaler Mukosa (n=30) und SCC (n=60) immunhistochemisch durch Frau G. Hò validiert (Hò, G.-Bachelorarbeit, Molecular Life Science, Lübeck, 2015). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 15** dargestellt. Die Zweigruppenvergleiche mittels U-Test waren signifikant ($p=0,0007$).

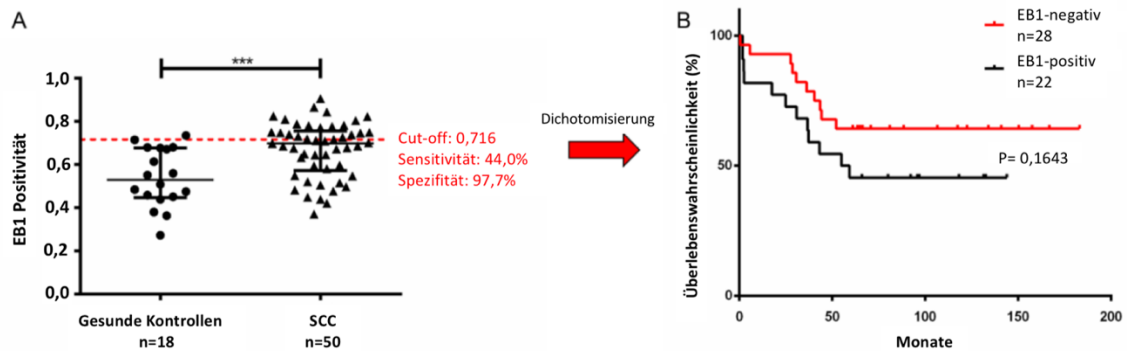


Abbildung 15 TMA basierte immunhistochemische Evaluation von EB1 von normaler und CRC Mukosa. Die rote gestrichelte Linie repräsentiert den Cut-off Wert für die normale Mukosa und CRC Vergleich mit der höchsten Sensitivität und Spezifität (links). Nach Dichotomisierung der Proben basierend auf der höchsten Sensitivität und Spezifität zwischen normaler Mukosa und SCC zeigt sich eine EB1-abhängige Überlebenskurve (rechts). *: $p < 0,001$; n: Anzahl der Stenzen**

Um die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit zu bestimmen, wurden die Karzinome in EB1-positive (EB1-Positivität $> 0,716$) und EB1-negative (EB1-Negativität $< 0,716$) unterteilt. Dieser Schwellenwert von 0,716 wurde mittels Grenzwertoptimierungskurve erstellt. Dabei wurde eine Spezifität von 97,4% und eine Sensitivität von 44,0% erreicht. Die Kaplan-Meier-Analyse konnte keinen signifikanten Unterschied bezüglich der EB1-Expression für das Gesamtüberleben der Kolonkarzinompatienten ermitteln ($p = 0,168$; Hazard-Ration: 1,803; 95% CI: 0,778 – 4,176). Patienten ohne EB1-Positivität weisen jedoch im Vergleich zu Patienten mit EB1-Positivität einen Trend auf, länger zu überleben (Hò, G.-Bachelorarbeit, Molecular Life Science, Lübeck, 2015)

5 Diskussion

Das sporadische (SCC) und das Colitis Ulcerosa assoziierte kolorektale Karzinom (UCC) scheinen durch ähnliche, aber nicht dieselben biologischen Abläufe initiiert zu werden: so unterscheiden sich auch genomische Alterationen in SCCs und UCCs in Frequenz und zeitlichem Auftreten (Yaeger et al., 2016). Welche Auswirkungen die gefundenen unterschiedlichen genetischen Expressionsmuster auf die Translation der Proteine haben, ist bislang noch unklar und nur in wenigen Studien untersucht (Mikami et al., 2011). Klinische Untersuchungen konnten zeigen, dass UCC Patienten bei der Erstdiagnose jünger sind und eine zufälliger Verteilung der Tumore über das gesamte Kolon aufzeigen. Patienten mit UCCs haben eine höhere Rate an simultanen Tumoren und durchlaufen häufig eine Entwicklung aus einer flachen, nicht polypoiden Dysplasie zum invasivem Adenokarzinom (Xie und Itzkowitz, 2008). In zytometrischen Analysen konnte festgestellt werden, dass die überwiegende Anzahl der UCCs einen aneuploiden Chromosomensatz aufweist (Gerling et al., 2010). Der genomischen Instabilität ist eine bedeutende Rolle während der Karzinogenese zuzuschreiben: aneuploide Tumoren sind mit klinisch aggressiverer Tumorprogression assoziiert und Aneuploidie wurde in mehreren Studien als für das kolorektale Karzinom prognostisch relevant beurteilt (Kokal et al., 1986; Böttger et al., 1993; Yamamoto et al., 1998; Habermann et al., 2007). Aufgrund deutlich verbesserter anti-inflammatorischer Therapiemöglichkeiten ist insgesamt aber mit einem zahlenmäßigen Rückgang des UCCs zu rechnen (Triantafyllidis et al., 2009). Jedoch lässt sich Darmkrebs – insbesondere bei UC-Patienten welche therapierefraktär sind – schwierig diagnostizieren, da eine schwerwiegende Entzündung der Darmschleimhaut die Erkennung von malignen Läsionen mit dem Koloskop erschwert. Weiterhin gilt das UCC als die häufigste zum Tode führende Ursache bei UC Patienten. Die heutigen prognostischen Marker des SCC sind allerdings nur bedingt auf UCCs anwendbar. Ziel dieser Studie war es daher, Unterschiede des Proteoms zwischen sporadischen und Colitis Ulcerosa assoziierten Tumorzellen (SCC vs. UCC) sowie deren Bezug zur genomischen Instabilität (Aneuploidie vs. Euploidie) darzustellen. Das bessere Verständnis der Unterschiede zwischen SCC und UCC sowie die weitere Untersuchung signifikanter Markerproteine kann langfristig der Weiterentwicklung von Tumormarkern dienen, welche eine Aussage über Remission, Rückfall oder das Therapieansprechen eines UCCs bzw. SCCs zulassen.

5.1 Repräsentativität der Kohorten in Bezug auf ihre Merkmalsausprägung

In dieser Arbeit zeigt sich ein signifikanter Altersunterschied zwischen der SCC- und der UCC-Kohorte ($p=0,004$), wobei Patienten der UCC-Gruppe deutlich jünger waren. Dies ist damit zu erklären, dass UCCs bereits bei jüngeren Patienten auftreten, während Patienten mit sporadischen kolorektalen Karzinomen ein höheres Inzidenzalter haben (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2006). Das Durchschnittsalter der untersuchten SCC-Patienten betrug 69 Jahre und entspricht damit etwa dem bei vergleichbaren Untersuchungen (Mattar et al., 2011). Damit können sowohl die UCC- als auch die Kontrollgruppe bezüglich der Altersstruktur als repräsentativ angesehen werden. Um signifikante Unterschiede bezüglich TNM-Stadium, G-Status und Ploidie-Gehalt zu vermeiden, wurden SCCs und UCCs bezüglich dieser Kriterien gepaart. Interessant wäre die Evaluation zusätzlicher Informationen z.B. zu Erkrankungsdauer, MAYO-Score oder Montreal-Kriterien sowie medikamentöser Behandlung der UCC-Patienten gewesen, welche leider nicht dokumentiert vorlagen. Es bleibt daher zu beachten, dass Medikament und besonders auch Kortikosteroide die Genexpression und somit eventuell auch die Proteinexpression im Tumor beeinflussen können und somit einen Einfluss auf die hier durchgeführten Analysen haben könnten (Almon et al., 2007). Um eine Aussage über die Relevanz der gefundenen Zielproteine in der Genese von UCCs und deren Potential als mögliche Biomarker zu treffen, sollte in zukünftigen Untersuchungen auch die Expression im umgebenden Normalgewebe von UCCs evaluiert werden. Kritisch zu bewerten ist die geringe Fallzahl des Studienkollektivs, die den anspruchsvollen Einschlusskriterien dieser Studie geschuldet ist, und eine Validierung an größeren Kohorten sinnvoll erscheinen lässt.

5.2 Vorteile der Aufbewahrung und Analyse kryokonservierter Proben

Hervorzuheben ist der besondere Arbeitsablauf der vorliegenden Arbeit. Ziel war es, die Gewinnung allein von repräsentativen Tumorzellen von SCCs und UCCs zu optimieren, um möglichst nur die Tumorzellen und nicht etwa Bindegewebszellen oder auch normale Epithelzellen bzgl. der Proteinexpressions-Unterschiede zu analysieren. Die Aufbereitung der Proben erfolgte aus frisch gefrorenen Gewebestücken. Im Gegensatz zu Formalin-fixiertem Gewebe bleibt das Material durch diese Aufbewahrung nativ und wird lediglich durch die Temperaturveränderung konserviert. Die für Formalin typisch auftretenden Querverbindungen von Proteinen, RNA und DNA können durch dieses Verfahren zum

Großteil verhindert werden (Klockenbusch et al., 2012). Die frisch-gefrorenen Proben sind als Goldstandard für klinische Proteomanalysen anzusehen (Tanca et al., 2012). Im Vergleich zum SCC lässt sich in den Colitis-assoziierten Proben ein geringerer Proteingehalt erkennen ($5,4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vs. $9,91\mu\text{g}/\text{l}$). Die UCC-Proben zeigten sich nach Färbung und Mikrotomschnitt im mikroskopischen Bild etwas poröser als das Vergleichsgewebe. Nekrotisierende Areale waren häufiger im UCC vorzufinden. Zerfallene Proteine in diesen Zonen waren für die Analyse nicht mehr zugänglich und wurden für alle nachfolgenden Analysen ausgeschlossen.

5.3 Probengewinnung- Die Limitation der Laser Capture Mikrodissektion

Um Analysefehler durch Gewebheterogenität zu umgehen und um Veränderungen im Proteom von malignen und gesunden Zellen akkurat darzustellen, wurden die Proben mittels Laser gestützter Mikrodissektion (LCM) aufbereitet. Die dabei eingesetzte Technologie des Laserskalpells/Laserkatapults ermöglicht sowohl das Schneiden als auch den Transport der Zellen. Durch Anwendung dieser Methode konnte das Zellmaterial berührungslos und kontaminationsfrei in ein Auffanggefäß überführt und anschließend für verschiedene Analysen genutzt werden. Alternativ können Tumorzellen mittels manueller Mikrodissektion separiert werden. Dieses Verfahren ist jedoch weniger exakt und kann nur für Tumorzellen genutzt werden, welche in einem größeren Verbund vorliegen. Die Anwendung der Lasertechnologie hingegen erlaubt auch die Separation kleinerer Tumorgebiete bzw. einzelner Zellen, so dass insgesamt eine genauere und umfassendere Gewebeernte und Tumorrepräsentativität erreicht werden. In diesem Kontext sollte jedoch der erhebliche zeitliche Aufwand nicht ungenannt bleiben, da für die Aufarbeitung einer einzelnen Probe mittels LCM Laser zwischen 12 und 25 Stunden benötigt werden. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass bislang publizierte Daten keine Proteinanalyse von frisch gefrorenen SCC- und UCC-Proben mit einer derartig hohen Tumorrepräsentativität beschreiben.

5.4 Beurteilung des optimierten Arbeitsablaufes zur Charakterisierung von Zielproteinen durch 2-dimensionale Multiplex-Fluoreszenz Gelelektrophorese und Massenspektrometrie

Da die frisch gefrorenen UCC-Proben ein bislang einzigartiges Kollektiv ausmachen, bedurfte es eines Verfahrens mit möglichst hoher Reproduzierbarkeit. Die 2-DE DIGE-Methode ist hochauflösend, reproduzierbar und ermöglicht einen hohen Durchsatz, welcher quantitative Proteomdaten für hundert bis tausend Proteine produziert. Einer der einzigartigen Vorteile der 2-DE DIGE-Methode liegt in der Möglichkeit, das gewonnene Proteom als 2-DE DIGE Bild digital zu speichern und somit für weitere Analysen nutzbar zu machen (Kondo und Hirohashi, 2007). Darüber hinaus ermöglicht sie die anschließende massenspektrometrische Proteinidentifikation direkt aus den dargestellten Proteinspots. Diese Kombination aus LCM, 2-DE DIGE und MS kann deshalb als vielversprechendes Werkzeug im Feld der Analyse des Tumorproteoms verstanden werden (Kondo und Hirohashi, 2007). Vergleicht man die insgesamt detektierten Spots (n=1030) mit ähnlichen Publikationen, ist die Gesamtzahl der detektierten Proteine in unserer Studie niedriger. Typische proteombasierte 2-DE DIGE Studien detektieren zwischen 400 und 1500 Spots, berichten jedoch über weniger (10-40) unterschiedlich regulierte und identifizierte Proteine (Petrak et al., 2008). Yutaka Sugihara et al. konnten bei 59 SCC Proben im Vergleich mit Normalgewebe 3.458 Proteine darstellen (Sugihara et al., 2012). Von 110 signifikanten Spots konnten hier 67 identifiziert werden; dies entspricht einer höheren Identifikationsrate als im Vergleich zu dieser Arbeit (60,9% vs. 29,3%).

Zu diskutieren ist, ob die teilweise lange Lagerungszeit (1-25 Jahre) die Probenqualität beeinträchtigt hat und somit zu einem geringeren Ertrag an Proteinen geführt hat. Als zusätzliche Ursache für die Diskrepanz könnte auch die Hitzeentwicklung durch den LCM-Laser denkbar sein, wodurch es zu einer Denaturierung der Proteine kommen kann. Das Herunterstellen des Energielevels des Lasers wurde in dieser Studie auf 79-84% des Maximums eingestellt, um unnötige Wärmeentwicklung zu vermeiden. Bei geringeren Energieniveaus konnte der Laser die ausgewählten Bereiche nicht mehr sauber ausschneiden. Auf den 2-DE DIGE Gelen selbst war keine Degradation zu beobachten. Insgesamt wurden jedoch 52 von 1.030 detektierten Proteinspots von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da diese zu wenig Material beinhalteten. Da unsere Analysen als erste Arbeit ganz bewusst Gewebeproben mit höchster Tumorzellrepräsentativität untersuchten, kann die geringere Anzahl detektierter Proteine auch an der – im Vergleich zu anderen

Arbeiten ohne LCM – geringeren Variabilität an untersuchten Zelltypen (nur Tumorzellen im Vergleich zu einem Gemisch aus Tumorzellen, normalen Epithelzellen und Stromazellen) begründet liegen. Die Art der verwendeten histologischen Färbung, die Aufreinigungsschritte und Auftrennung sind weitere Faktoren, welche Einfluss auf die Probenqualität und -ausbeute nehmen können. Im Gegensatz zur klassischen Silberfärbung wird bei der fluoreszenz-basierten Methode deutlich weniger Protein benötigt und eine bessere Proteinauftrennung beobachtet. Durch die fluoreszenzbasierte Färbung wird sichergestellt, dass die Intensität der stärksten Spots nicht gesättigt ist, so dass eine Disparität über einen breiten dynamischen Bereich besteht (Kondo et al., 2003). Zusätzlich gelingt durch die Kontrollfärbung (gemischter Standard aus allen Proben) eine quantitative Normalisierung der Spots auf den verschiedenen Gelen. Durch die Massenspektrometrie-basierte Identifikation wurden 67 Proteoformen, davon 43 einzigartige Proteine, gefunden. Die Principal Component Analyse zeigt eine gute Separation der Proteine in allen untersuchten Gruppenvergleichen. Diese Ergebnisse unterstützten die initiale Hypothese, dass sich UCCs und SCCs, aneuploide und euploide, aneuploide SCCs und euploide SCCs, aneuploide UCCs und euploide UCCs, aneuploide SCCs und aneuploide UCCs sowie euploide SCCs und euploide UCCs anhand ihres Proteinexpressionsmusters unterscheiden lassen. Interessanterweise konnte eine Untersuchung von Petrak et al. 15 Proteine identifizieren, welche in 13-31% aller 2-DE-Analysen unabhängig von der Probenentität unterschiedlich exprimiert auftreten. In unserer Untersuchung finden sich von dieser Liste vier Proteine wieder (Annexin A4, Heat shock Protein 27, ATP synthase beta subunit und 78kDa glucose-regulated Protein). Während diese Proteine einerseits universelle Sensoren repräsentieren könnten, kann die häufige Identifikation auch auf ein technisches Artefakt, die Limitation bzw. einen Bias der verwendeten Methode hinweisen (Petrak et al., 2008).

5.5 Darstellung und Interpretation der Expressionsmuster von SCC, UCC und deren aneuploiden und euploiden Subpopulationen

SCCs und UCCs zeigen deutliche morphologische Unterschiede; die Ursachen hierfür sind weitestgehend unbekannt. Histologisch scheint die Mehrheit der sporadischen Tumore des Kolons der Adenom-Karzinom-Sequenz zu folgen und auf diesem Weg schrittweise genetische Mutationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen zu akquirieren (Fearon und Vogelstein, 1990). Der UCC-Progress findet häufig über eine Abfolge von low- (LGD) zu high-grade Dysplasie (HGD) bis zum Karzinom statt und ist bezüglich der zeitlichen

Abfolge und der Voraussetzungen der genetischen und epigenetischen Veränderungen weniger gut erforscht (Humphries et al., 2012).

Die vorliegende Untersuchung weist nach, dass sich UCCs und sporadischer Darmkrebs anhand von ihren Proteinexpressionsmustern unterscheiden lassen. Die Analysen führten des Weiteren zur Identifikation einer beträchtlichen Anzahl an Proteinen, welche möglicherweise direkt oder indirekt an der unterschiedlichen Manifestation von SCCs und UCCs beteiligt sind. Die meisten dieser Proteine waren im Cytoplasma lokalisiert. Interessanterweise richten sich nahezu alle aktuell zugelassenen Tumormedikamente gegen intrazelluläre Proteine. Nur wenige Autoren haben sich bislang mit einem Vergleich von SCCs und UCCs auseinandergesetzt, obwohl die Entschlüsselung des Proteinportfolios einer Tumorzelle die Chancen erhöht, neue Angriffspunkte für zielgerichtete Karzinomtherapien zu finden. Araki et al. haben UCC-Zelllinien den SCC-Zelllinien gegenübergestellt und hier zwar insgesamt mehr Proteinspots detektiert (2000 vs. 987 in der vorliegenden Arbeit), jedoch deutlich weniger signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine (n=67) nachgewiesen (Araki et al., 2009). Von diesen wurden nur sechs Proteine identifiziert: ein zytoskeletttales Protein (β Aktin), Heat-Shock Protein 47kDA, ein Signaltransduktionsfaktor sowie zwei Enzyme des Acetyl-Coenzym A-Metabolismus und des Folsäurestoffwechsels. Keines dieser Proteine wurde in unserer Studie identifiziert. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Untersuchungen von Araki et al. lediglich an Zelllinien durchgeführt wurden und diese Ergebnisse oftmals nicht direkt auf humane Gewebezellen übertragbar sind. Kolorektale Tumorzelllinien werden aus malignen Tumoren, z.B. Adenokarzinomen gewonnen. Normale epitheliale Zelllinien existieren nicht, wodurch das Erheben vergleichender Studien aktuell nicht möglich ist. In isolierten Zellkulturen fehlt die Interaktion von Tumorzellen und Nicht-Tumorzellen wie z.B. stromalen Zellen (Fibroblasten und Immunzellen). Der optimierte Arbeitsablauf mit Frischgewebe half in der vorliegenden Studie, einen näheren Bezug zur tatsächlichen in-vivo Beschaffenheit des Tumorgewebes herzustellen.

Das Proteom von SCCs und UCCs unterscheidet sich laut IPA® in Proteinen, die eine Rolle bei der zellulären Bewegung sowie dem Zellwachstum und der Proliferation spielen (p-Wert >0,01). Im Rahmen der Tumorgenese trägt die Hemmung der Regulation der Proliferation zum Wachstum des Gewebes bei. Zelluläre Mobilität ist die Grundlage für Metastasen-Bildung, wobei die Gruppe der strukturbildenden Proteine, im speziellen EB1 und Tubulin alpha-1B, hierbei besonders interessant ist. Abweichungen von Zytoskelettproteinen konnten bereits bei Proteomanalysen zwischen UCC-Patienten mit Dysplasie und ohne

Dysplasie nachgewiesen werden. Hier waren fast alle gefundenen zytoskelettalen Proteine im Dysplasiegewebe überexprimiert (May et al., 2011). Die Beobachtung solcher Änderungen auch in nicht-dysplastischem Gewebe lässt vermuten, dass diese bereits in sehr frühem Stadium der UCC-Entwicklung ohne Dysplasie auftreten. Hervorzuheben sind ebenfalls Nukleinsäure bindende Proteine wie z.B. das major vault protein (MVP). Eine Bindung an Nukleinsäuren kann über verschiedene Wirkmechanismen unter anderem zu genomischer Instabilität führen (Berger et al., 2009). Dies spielt in der Entwicklung des SCCs eine bedeutende Rolle, tritt jedoch in UCCs und SCCs zu verschiedenen Zeitpunkten der Genese auf (Scarpa et al., 2014). Eine signifikant unterschiedliche Proteinexpression konnte ebenfalls in sämtlichen Subgruppenvergleichen nachgewiesen werden. Hier zeigten sich sowohl Differenzen zwischen euploiden und aneuploiden Tumoren innerhalb der unterschiedlichen Entitäten (Euploid SCC vs. Aneuploid SCC: 44 signifikante Proteine; Euploid UCC vs. Aneuploid UCC: 46 signifikante Proteine) sowie auch innerhalb der gleichen Entität mit unterschiedlichem Ploidiestatus (Euploid UCC vs Euploid SCC: 41 signifikante Proteine; Aneuploid UCC vs Aneuploid SCC: 178 signifikante Proteine). In der Arbeit vorausgegangenen zytometrischen Analysen konnte festgestellt werden, dass die überwiegende Anzahl der UCCs eine nukleäre Aneuploidie bzw. genomische Instabilität aufweist (Meyer et al., 2013). Der genomischen Instabilität ist eine bedeutende Rolle während der Karzinogenese zuzuschreiben: aneuploide Tumoren sind mit einem klinisch aggressiveren Tumorwachstum assoziiert und Aneuploidie wurde in mehreren Studien als für das kolorektale Karzinom prognostisch relevant beurteilt (Kokal et al., 1986; Böttger et al., 1993; Yamamoto et al., 1998; Habermann et al., 2007). Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass sich Aneuploidie unterschiedlich auf die Expression des Proteoms von SCC und UCC auswirkt oder SCCs und UCCs das Proteom aneuploider Tumoren unterschiedlich beeinflussen. So scheinen Chromosomenaberrationen entitätsspezifisch und mit einem unterschiedlichen zeitlichen Auftreten stattzufinden (Scarpa et al., 2014). Aneuploidie tritt im UCC sehr früh auf und ist anschließend auf einem stabilen Niveau persistent (Habermann et al., 2003). Die konstante Präsenz kann durch das maximal tolerierte Ausmaß an genetischem Schaden einer Zelle und der dynamischen Rate der Zellteilung im entzündlichen Kolon erklärt werden (Scarpa et al., 2014). Diese Arbeit konnte darüber hinaus erstmals Unterschiede in der Proteinexpression zwischen aneuploiden und euploiden Kolonkarzinomen unabhängig von ihrer Assoziation mit UCC oder SCC nachweisen. Genomische Instabilität im SCC konnte auf Proteomlevel bereits mit der Expression von HDAC2 (histone dacetylase2) und TXNL1 (thioredoxin-like 1) assoziiert werden (Gemoll et al., 2011). Es ist davon auszugehen, dass auch das UCC assoziierte

Proteom, ebenso wie sein Genom und Transkriptom, Ploidie assoziierte Biomarker beinhaltet, welche zur individuellen Prognose-Abschätzung eines Patienten genutzt werden könnten. Neun Proteine (DPOD1, ECH1, HNRPC, Hs90B, HSPB1, K2C8, OTUB1, RSSA und TBB4B) zeigen in dieser Studie signifikante Expressionsunterschiede zwischen aneuploiden und euploiden UCCs und könnten deshalb als potentielle Ploidiemarker für das UCC dienen. DOPD1 und HPRC sind zudem auch zwischen aneuploidem UCC und aneuploidem SCC signifikant unterschiedlich exprimiert. Unabhängig vom Vergleich aneuploider oder euploider Tumore innerhalb der UCC und SCC Gruppe findet man eine signifikante Assoziation der unterschiedlich exprimierten Proteine zu Krebserkrankungen. Einige der Targets wurden bereits in Hinblick auf die Beeinflussung der Neogenese, den Ausgang der Erkrankung oder das Metastasierungsverhalten beschrieben und werden im Abschnitt 1.6 weiter erläutert

Interessant sind ebenfalls die Parallelen zur Arbeit von Habermann et al., welche die genomischen Instabilitäten von SCC, UCC und Metastasen vergleicht (Habermann et al., 2003). GANAB, GSTP1, und NADH Dehydrogenase liegen auf Chromosom 11, auf dem bereits Habermann et al. Sequenzgewinne beim UCC im Vergleich zum sporadischen Karzinom beschreiben. NDKA, K1C16 und K1C19 liegen auf Chromosom 17q, auf welchem sich ebenfalls ein Sequenzgewinn bei Habermann et al. finden ließ. HS90B (höher exprimiert in SCC) und MVP auf Chromosom 6p (höher exprimiert in SCC) zeigen eine umgekehrte Expression zu den Ideogrammen beschrieben bei Habermann et al.. Eine mögliche Erklärung ist, dass der Sequenzgewinn zu einem Funktionsverlust bzw. einer Inhibierung dieser Proteine führt.

Nach IPA[®] und systematischer Pubmed-basierter Literaturrecherche wurden Annexin A 5, Catepsin D, Heat shock Protein 27 und APC binding Protein EB1 auf Grund ihrer Funktionen und Assoziation zur Karzinogenese und Entzündung für eine weitere Diskussion und weiterführende Analysen ausgewählt.

5.6 Potentielle Zielproteine von Colitis Ulcerosa assoziierten Tumorzellen

Microtubule-associated protein (**EB1**), Heat Shock27kDA Protein 1(**HSP27**) und Annexin 5 (**ANXA5**) wurden auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit durch Frau Toni Hö im Rahmen ihrer Bachelorarbeit in unserer Arbeitsgruppe an der Universität zu Lübeck evaluiert (Hö, G. -Bachelorarbeit, Molecular Life Science, Lübeck, 2015). Die Evaluation erfolgte mittels

Western Blot an derselben Patientenkohorte, welche bereits in der 2-DE DIGE Analyse genutzt wurde, sowie an sechs Normalgewebeproben der sporadischen Karzinome aus der vorliegenden Arbeit. Die Ergebnisse bestätigten die in der Gelelektrophorese beschriebenen Häufigkeitsverteilungen von EB1 und HSP27 (**Abb. 14**). Im Gegensatz zu vorherigen Studien konnten auch höhere Level von HSP27 in normaler Kolonschleimhaut nachgewiesen werden. Das gemessene EB1-Proteinniveau der gesunden Kontrollen zeigte hier einen nicht signifikanten Trend, weniger exprimiert zu sein als im UCC und eine signifikant niedrigere Expression im SCC. Die Proteinkonzentration von HSP27 war im SCC weniger hoch als im UCC und zeigte sich im gesunden Gewebe im Trend höher exprimiert. Da EB1 auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ein Biomarkerpotential aufweist, wurde es in einer größeren klinischen Kohorte immunhistochemisch per Tissue Microarray weiter analysiert. Nach Einteilung in EB1-positive und EB1-negative SCC-Tumoren konnte das Gesamtüberleben mit der Expression von EB1 assoziiert werden (**Abb. 15**). Basierend auf den summierten Ergebnissen konnte EB1 als SCC-spezifischer Tumormarker verifiziert und HSP27 mit einem Trend zu einem allgemeinen Tumormarker für UCCs und SCCs identifiziert werden.

Annexin A5 (ANXA A5) ist ein membranbindendes Protein und stellt einen hoch spezifischen Liganden für Phosphatidylserine dar. Die Exposition von Phosphatidylserine an der Oberfläche der Zelle wirkt als „Erkennungs-Signal“ apoptotischer und nekrotischer Zellen für Phagozyten (Munoz et al., 2007). In vivo kann Annexin A5 durch die hochaffine Bindung von Phosphatidylserin die Aufnahme einer apoptotischen Zelle durch Makrophagen verhindern. Annexine sind signifikant in SCCs überexprimiert und könnten in Zukunft als potentielle Tumormarker dienen. Annexin A5 ist in der UCC-Gesamtgruppe und in der Fraktion der aneuploiden UCCs überexprimiert. Dies lässt vermuten, dass hierdurch die Phagozytose von bereits geschädigten Zellen, welche im Rahmen von chronischer Inflammation auftreten, verhindert und folglich die Zellteilung von Zellen mit beeinträchtigtem Erbmateriale unterstützt wird. Das Ergebnis für Annexin 5 im Western Blot war inkongruent mit den 2-DE DIGE Daten. Im Western Blot zeigte Annexin A5 eine Tendenz zu einer erhöhten Expression in SCCs, welche jedoch nicht signifikant war. Im Normalgewebe zeigte sich Annexin A5 signifikant höher exprimiert als im Tumorgewebe. Dieses Ergebnis widerspricht den Aussagen der Literatur, wo Annexin A5 in kolorektalen Karzinomen eine potentielle Tumormarkerfunktion auf Grund seiner Überexpression zugeschrieben wird (Munoz et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte sein, dass die Spotintensität nicht die Gesamtmenge des individuellen Proteins

darstellt oder post-translationale Modifikationen die Proteinseparation verändert haben. Dieser Sachverhalt demonstriert die kritischen Limitationen von Gel-basierter Proteomik.

Catepsin D, eine Endopeptidase, degradiert intrazelluläre und endozytosierte Proteine sowie Proteine der extrazellulären Matrix und des basalen Epithels. Hierfür benötigt das Protein einen sauren pH-Wert, welcher zum Beispiel durch Entzündungsvorgänge entstehen kann. In der 2-DE-DIGE konnte eine Überexpression im UCC im Vergleich zum SCC nachgewiesen werden. Catepsin D hat sowohl eine anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Funktion und ist in vielen Tumorentitäten, wie z.B. Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Blasenkarzinom und malignem Melanom überexprimiert. Catepsin D wird von malignen Zellen sezerniert und wird als autokriner Wachstumsfaktor mit pro-invasiven und pro-metastatischen Eigenschaften beschrieben (Benes et al., 2008). In der Tumorumgebung („microenvironment“) stimuliert Catepsin D das übermäßige Wachstum von Fibroblasten und Tumorangiogenese (Masson et al., 2010). Eine gesteigerte Konzentration von Catepsin D in UC ist mit einem erhöhten Risiko für Darmkrebs assoziiert (Galandiuk et al., 1993) und könnte die erhöhten Expressionswerte im UCC im Vergleich zum SCC erklären.

Heat shock Protein 27 (HSPB1/HSP27) gehört zur Familie der kleinen Heat Schock Proteine (small HSP). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, welche durch Hitze und andere Umwelteinflüsse induziert werden. Die Proteinkonzentration von HSP27 war im SCC niedriger als im UCC und zeigte sich im gesunden Gewebe im Trend höher exprimiert. Während eines nicht gestressten Zustands unterstützt HSP27 die strukturelle Stabilität von Aktin Mikrofilamenten des Zytoskeletts (Doshi et al., 2010). Das Protein transloziert bei Stressinduktion vom Cytoplasma in den Zellkern und schützt hier als Chaperon die Zelle vor Proteinaggregation. Die anti-apoptotischen Eigenschaften von HSP27 weisen auf eine wichtige tumorigene Rolle in malignen Tumoren, z.B. des Magens, der Brust, der Eierstöcke und der Prostata, hin (Calderwood et al., 2006). Im Meningeom konnte die Überexpression von HSP27 bereits mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden (Assimakopoulou, 2000).

HSP27 kann unter anderem über Dephosphorylierung an seinen drei Serin-Enden Oligomere von bis zu 1000 kDa bilden. Dies erhöht die Affinität und Aktivität des Chaperons (Bruey et al., 2000; Thériault et al., 2004) und als Folge auch seine antiapoptotischen Eigenschaften (Oya-Ito et al., 2006). Die HSP27-Konzentrationen lagen im Normalgewebe über dem Niveau von SCC und UCC, was damit zu erklären ist, dass durch die Bildung der aktiveren

Oligomerform im Karzinom weniger einzelne HSP27-Moleküle gemessen werden konnten als im Normalgewebe. Interessanter Weise konnte HSP27 bislang nicht im UCC evaluiert werden. Experimentelle Depletion von HSP27 lässt vermuten, dass das Protein als Inhibitor der Caspaseaktivierung eine essentielle Rolle im extrinsischen Apoptoseweg spielt (Garrido et al., 2006). Es ist denkbar, dass der höhere Zellstress, dem UC-Patienten durch chronisch-rezidivierende Entzündungen ausgesetzt sind, eine Ursache für die höheren HSP27-Spiegel im UCC im Vergleich zum SCC ist (Monteleone et al., 2012). Ein anderer Erklärungsansatz ist, dass die Hochregulation von HSP27 mit dem Auftreten von Mutationen im *TP53* Gen assoziiert ist (Alexandrova und Marchenko, 2015). Diese Mutation stellt das am häufigsten alterierte Gen im UCC (83%) und ein frühes Ereignis in der Karzinogenese des UCCs dar (Yaeger et al., 2016; Yashiro, 2014). *TP53* Mutationen sind auch in nicht-dysplastischen Arealen und in dysplastischen Bereichen von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zu finden, während sie in der Karzinogenese sporadischer kolorektaler Karzinome erst bei fortgeschrittenen Adenomen auftreten (Brentnall et al., 1994; Greenwald et al., 1992). *P53* Signaling ist in ca. 60% der SCCs alteriert, jedoch nahezu universell in Tumoren verändert, welche mit entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind (Yaeger et al., 2016). Cooks et al. konnten am Tiermodell zeigen, dass ein frühes Auftreten von *P53* Mutationen im entzündlichen Kolon die Progression zum Karzinom fördert und die Entwicklung von UCCs akzeleriert (Cooks et al., 2013). Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese der biologisch unterschiedlichen Entstehungswege von UCCs und SCCs und geben gleichzeitig einen Erklärungsansatz für eine mögliche Hochregulation von HSP27 im UCC.

EB1 (Synonyme: APC binding Protein EB1; MAPRE) wurde initial als Bindeprotein des Tumorsuppressorgens *APC* (*adenomatous polyposis coli*) entdeckt. EB1 liegt auf Chromosom 20q11, einem Bereich, in welchem Habermann et al. bereits einen chromosomalen Gewinn (20q11-20q13) in sowohl SCCs als auch UCCs beschrieben haben. Von einer erhöhten EB1 Expression wurde zuvor in Tumoren der Leber (Kondo et al., 2003; Orimo et al., 2008), des Magens (Nishigaki et al., 2005), des Ösophagus (Wang et al., 2005) und der Brust berichtet (Dong et al., 2010). Eine Überexpression im SCC ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die APC-EB1-Interaktion reguliert die Chromosomenausrichtung in der Mitosespindel und somit die Zellproliferation (Green et al., 2005; Zhang et al., 2009). In der 2-DE DIGE Analyse dieser Studie konnten signifikant höhere Expressionen im SCC im Vergleich zum UCC gefunden werden. Im SCC werden *APC* Mutationen als frühes Ereignis während der Karzinogenese beobachtet. Eine Erklärung

für die höheren Expressionsspiegel an EB1 im SCC könnte eine durch diese Mutationen gestörte Bindung von APC-EB1 sein, was in der Folge zu einer höheren Konzentration an ungebundenem EB1 im SCC führt. Somit könnte die Dysregulation von APC-EB1, z.B. durch eine *APC*-Mutation und/oder EB1-Überexpression, Spindeldefekte und abnormale chromosomale Teilung fördern, was folglich die Karzinogenese und Tumorprogression initiieren bzw. fördern könnte. Die Aufhebung der APC-EB1 Bindung wurde bereits früher postuliert (Fodde et al., 2001; Su et al., 1995; Tirnauer und Bierer, 2000), ist allerdings für das UCC noch nicht beschrieben. Hier ist bekannt, dass neue *APC*-Mutationen erst in späten Stadien der Erkrankung auftreten. Es ist folglich zu erwarten, dass noch eine aktive APC-EB1 Interaktion und somit weniger ungebundenes, detektierbares EB1-Protein vorliegt. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass sich die Karzinogenese des UCCs von der des SCCs unterscheidet.

5.7 Tumorheterogenität als Parameter für Prognose und Therapieerfolg

Um die Ergebnisse dieser Studie einzuordnen, muss beachtet werden, dass kolorektale Karzinome in Bezug auf Genom, Epigenom, Transkriptom und Immuninfiltration inter- und intra-tumorale Heterogenitäten aufweisen. Da die Kohorte an frisch gefrorenen UCCs der vorliegenden Untersuchung zwar die größte ihrer Art, aber dennoch gering in ihrer Anzahl ist, kann es sein, dass bestimmte Unterschiedlichkeiten nicht entdeckt wurden. Während die Untersuchung die inter-tumorale Heterogenität verschiedener Patienten und Patientengruppen beleuchtet, vergleicht sie keine intra-tumorale Heterogenität. Hierzu wäre die Untersuchung von mehreren verschiedenen Lokalisationen eines Primärtumors und/ oder des peritumoralem Gewebes notwendig gewesen. Es wird vermutet, dass das zeitliche Auftreten einer Mutation determiniert, ob die Mutation in allen Klonen und während des Tumorwachstums persistiert. Subklonale Expansion scheint selten in späten Tumorstadien aufzutreten (Sottoriva et al., 2015). Der überwiegende Teil der hier genutzten Tumorproben lag in einem fortgeschrittenen Tumorstadium vor (80% T3 oder T4).

Die Tumorheterogenität rückt aktuell bei der Therapie von Darmkrebs in den Vordergrund. Fluoropyrimidine, Oxaliplatin und Irinotecan stellen das klassische Fundament der neo- und adjuvanten Chemotherapie dar. Ihre sequentielle Anwendung resultiert in einem medianen Überleben von 18 bis 20 Monaten (Cremolini et al., 2015). Die zusätzliche Applikation von Antikörpertherapien kann das Überleben auf bis zu 30 Monate steigern. Diese zielgerichteten Therapien [z.B. VEGF-Inhibitoren (Vascular endothelial growth factor) oder

EGFR- Inhibitoren (epidermal growth factor receptor)] können jedoch in ihrer Wirksamkeit von genomischen Aberrationen bzw. der Heterogenität des kolorektalen Tumors beeinträchtigt werden. So ist beispielsweise eine Anti-EGFR Therapie (Cetuximab oder Panitumumab) nur sinnvoll, wenn keine MAPK Genmutation vorliegt, da diese eine natürliche Resistenz der Karzinomzellen gegenüber der Behandlung bedingt. Die vorliegende Identifikation von Unterschieden im Proteom von UCCs und SCCs könnte in Zukunft einer besseren Auswahl von zielgerichteten Therapien heterogener Karzinome dienen. Eine hohe Expression von HSP27 in Brust-, Gebärmutter- und Magenkarzinom konnte bereits mit vermehrter Metastasenbildung, schlechter Prognose und Resistenz für Chemo- und Radiotherapie assoziiert werden (Brondani Da Rocha et al., 2004; Ciocca et al., 1993; Vargas-Roig et al., 1998). Unter anderem wird dieser Effekt damit erklärt, dass HSP27 die durch Chemotherapeutika induzierte Apoptose von Tumorzellen verhindern und somit den Therapieeffekt vermindern kann. Folglich ist die Neutralisierung von HSPs eine attraktive Strategie in der künftigen Tumorthherapie. HSP27 war in der vorliegenden Arbeit im UCC höher reguliert als im SCC, jedoch insgesamt niedriger exprimiert im Normalgewebe. Verschiedene Substanzen zur Inhibierung des HSP27 Proteins werden aktuell beschrieben: eine Hemmung des HSP27 Proteins durch Phosphorothioat-HSP27-antisense-oligonukleotide (ASOs) konnte experimentell Apoptoseraten verbessern und die Tumorprogression im Prostatakarzinom verzögern (Garrido et al., 2006; Rocchi et al., 2004). Taxol, ein Inhibitor der HSP27 Expression, wurde als Substanz vorgeschlagen, um die Therapieresistenz gegenüber Etoposid, Colcemid und Vincristin in der Behandlung von Ovarial- und uterinen Karzinomzellen zu vermindern. HSP27 erleichtert im Zellstress den Übergang von der G0/G1-Phase in die Synthesephase. Dies ermöglicht der Zelle eine schnellere Proliferation nach Beendigung des Stressors (Parcellier et al., 2006). Interessant wäre zu untersuchen, ob die Inhibierung von HSP27 ebenfalls einen klinischen Effekt für UCCs hat und ob HSP27 bereits im UC Normalgewebe und/oder in Dysplasien bei Colitis Ulcerosa hochreguliert ist. Dies würde darauf hinweisen, dass HSP27 die Proliferation gestresster Zellen bzw. Zellen mit bereits genomischen Aberrationen unterstützt und so zur Entstehung bzw. Progression des UCCs beitragen kann.

Neuere Publikationen postulieren jedoch einen „multi-molekularen, multi-therapeutischen“-Ansatz für das kolorektale Karzinom anhand der Einteilung in vier molekulare Subtypen: CMS 1 bis 4 (Consensus molecular subtypes nach Dienstmann et al., 2017). Dienstmann et al. gehen davon aus, dass jeder CMS Subtyp in Zukunft unterschiedliche Behandlungsempfehlungen erfordern wird. Interessant ist die Unterscheidung des hoch

immunogenen CMS 1 und des inflammatorischen CMS 4. Bei CMS1 mit Mikrosatelliteninstabilität und Hypermuation ist die zytotoxische Wirkung von T-Zellen via PDL1-Rezeptor inhibiert. Der entzündliche Subtyp (CMS4) entsteht durch chronische Inflammation wie sie bei Colitis Ulcerosa auftritt. Es wird vermutet, dass das Mikromilieu von diesen Tumoren durch immunsuppressive Chemokine (z.B. *TGF-β*) zytotoxische Immunzellen inhibiert und die Proliferation von Suppressorimmunzellen unterstützt. Diese Hypothese könnte den klinisch aggressiven Verlauf von UCCs erklären (Cremolini et al., 2015). Vor dem geschilderten Hintergrund wird offensichtlich, dass die Tumorerheterogenität in Bezug auf SCCs und UCCs weiteren Aufschluss über zielgerichtete Therapien geben kann und dass an einer größeren Kohorte weiter untersucht werden sollte. Hierbei wäre es besonders interessant, ob und wie sich die molekularen Subtypen CMS 1-4 auf das Proteom auswirken.

5.8 Zusammenfassung und Ausblick

Es gibt etwa drei Möglichkeiten, den natürlichen Verlauf eines kolorektalen Karzinoms zu beeinflussen. Die erste Möglichkeit ist die Erkennung des Tumors in einem frühen Stadium (z.B. als Adenom), was den höchsten Einfluss auf Inzidenz und Verlauf der Erkrankung hat. Im Anschluss an die Resektion des Tumors kann, als zweite Option, eine Chemotherapie erfolgen. Drittens stehen neben der traditionellen Chemotherapie neue biologische Zieltherapien (Target- und Checkpointtherapien) zur Verfügung. Der deutliche Unterschied in der Proteinexpression zwischen UCC und SCC könnte helfen, das Therapieansprechen solcher Zieltherapien vorherzusagen. Deshalb ist es notwendig, die hier detektierten unterschiedlich exprimierten Proteine und ihre Regelkreisläufe weiter zu untersuchen. Durch die vergleichende Proteinanalyse von SCC und UCC konnten interessante Einblicke in die molekularbiologischen Eigenschaften des kolorektalen Karzinoms gewonnen werden. Die für die vorliegende Arbeit entwickelte Methode zur Proteinisolation und -analyse stellt einen optimierten Weg dar, welcher auch zur Analyse weiterer molekularbiologischer Untersuchungen des Kolons verwendet werden kann. Durch diese Arbeit konnten drei Zielproteine [Microtubule-associated protein R/EB family, member 1 (EB1), Heat shock 27 kDa protein 1 (HSPB1), und Annexin 5 (ANXA5)] als unterschiedlich exprimierte Marker zwischen UCCs und SCCs ermittelt werden. In der weiteren klinischen Validierung konnten die Expressionsdaten von EB1 sowohl im Western Blot als auch via TMA validiert werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich UCCs und SCCs anhand ihres Proteinexpressionsprofils unterscheiden lassen. Die vorliegende Studie ist die erste ihrer Art,

welche systematisch unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen UCCs und SCCs analysiert und identifiziert hat und dabei einen optimierten Arbeitsablauf mit hoher Tumorrepräsentativität nutzte. Die Ergebnisse zeigen neue Einblicke in die Unterschiede der zwei Entitäten, mögliche Wege der Karzinogenese sowie des Progresses des UCCs und könnten nach weiterer Evaluation neuen diagnostischen oder therapeutischen Ansätzen dienen.

6. Literaturverzeichnis

- Alexandrova, E.M., Marchenko, N.D., 2015. Mutant p53 – Heat Shock Response Oncogenic Cooperation: A New Mechanism of Cancer Cell Survival. *Front. Endocrinol.* 6.
- Almon, R.R., DuBois, D.C., Jusko, W.J., 2007. A microarray analysis of the temporal response of liver to methylprednisolone: a comparative analysis of two dosing regimens. *Endocrinology* 148, 2209–2225.
- Araki, K., Mikami, T., Yoshida, T., Kikuchi, M., Sato, Y., Oh-ishi, M., Kodera, Y., Maeda, T., Okayasu, I., 2009. High expression of HSP47 in ulcerative colitis-associated carcinomas: proteomic approach. *Br. J. Cancer* 101, 492–497.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2006. Krebs in Deutschland 5 überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, 32-35. Gesellschaft der epidemiologische Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken.
- Askling, J., Dickman, P.W., Karlén, P., Broström, O., Lapidus, A., Löfberg, R., Ekbom, A., 2001. Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 120, 1356–1362.
- Assimakopoulou, M., 2000. Human meningiomas: immunohistochemical localization of progesterone receptor and heat shock protein 27 and absence of estrogen receptor and PS2. *Cancer Detect. Prev.* 24, 163–168.
- Atreya, R., Neurath, M.F., 2005. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 28, 187–196.
- Aust, D.E., Willenbacher, R.F., Terdiman, J.P., Ferrell, L.D., Chang, C.G., Moore, D.H., 2nd, Molinaro-Clark, A., Baretton, G.B., Loehrs, U., Waldman, F.M., 2000. Chromosomal alterations in ulcerative colitis-related and sporadic colorectal cancers by comparative genomic hybridization. *Hum. Pathol.* 31, 109–114.
- Benes, P., Vetvicka, V., Fusek, M., 2008. Cathepsin D—Many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68, 12–28.
- Berger, W., Steiner, E., Grusch, M., Elbling, L., Micksche, M., 2009. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 43–61.
- Bernstein, C.N., Blanchard, J.F., Kliewer, E., Wajda, A., 2001a. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 91, 854–862.
- Bernstein, C.N., Shanahan, F., 2008. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* 57, 1185–1191.
- Böttger, T.C., Potratz, D., Stöckle, M., Wellek, S., Klupp, J., Junginger, T., 1993. Prognostic value of DNA analysis in colorectal carcinoma. *Cancer* 72, 3579–3587.
- Brenner, H., Hoffmeister, M., Arndt, V., Haug, U., 2007. Gender differences in colorectal cancer: implications for age at initiation of screening. *Br. J. Cancer* 96, 828–831.
- Brentnall, T.A., Crispin, D.A., Rabinovitch, P.S., Haggitt, R.C., Rubin, C.E., Stevens, A.C., Burner, G.C., 1994. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 107, 369–378.
- Brentnall, T.A., Pan, S., Bronner, M.P., Crispin, D.A., Mirzaei, H., Cooke, K., Tamura, Y., Nikolskaya, T., JeBailey, L., Goodlett, D.R., McIntosh, M., Aebersold, R., Rabinovitch, P.S., Chen, R., 2009. Proteins That Underlie Neoplastic Progression of Ulcerative Colitis. *Proteomics Clin. Appl.* 3, 1326.
- Brondani Da Rocha, A., Regner, A., Grivicich, I., Pretto Schunemann, D., Diel, C., Kovaleski, G., Brunetto De Farias, C., Mondadori, E., Almeida, L., Braga Filho, A., Schwartzmann, G., 2004. Radioresistance is associated to increased Hsp70 content in human glioblastoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 25, 777–785.

- Broomé, U., Lindberg, G., Löfberg, R., 1992. Primary sclerosing cholangitis in ulcerative colitis--a risk factor for the development of dysplasia and DNA aneuploidy? *Gastroenterology* 102, 1877–1880.
- Bruey, J.M., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A.P., Solary, E., Garrido, C., 2000. Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Oncogene* 19, 4855–4863.
- Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., Ciocca, D.R., 2006. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem. Sci.* 31, 164–172.
- Campbell, N.A., Kratochwil, Anselm, Lazar, T., Reece, J.B., 2009. *Biologie*. (Kapitel 18.5), Hrsg. Pearson Studium, München.
- Carlson, M., Raab, Y., Sevéus, L., Xu, S., Hällgren, R., Venge, P., 2002. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. *Gut* 50, 501–506.
- Ciocca, D.R., Oesterreich, S., Chamness, G.C., McGuire, W.L., Fuqua, S.A., 1993. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J. Natl. Cancer Inst.* 85, 1558–1570.
- Cooks, T., Pateras, I.S., Tarcic, O., Solomon, H., Schetter, A.J., Wilder, S., Lozano, G., Pikarsky, E., Forshew, T., Rosenfeld, N., Rozenfeld, N., Harpaz, N., Itzkowitz, S., Harris, C.C., Rotter, V., Gorgoulis, V.G., Oren, M., 2013. Mutant p53 prolongs NF- κ B activation and promotes chronic inflammation and inflammation-associated colorectal cancer. *Cancer Cell* 23, 634–646.
- Delaunoy, T., Limburg, P.J., Goldberg, R.M., Lymp, J.F., Loftus, E.V., Jr, 2006. Colorectal cancer prognosis among patients with inflammatory bowel disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 4, 335–342.
- Dienstmann, R., Vermeulen, L., Guinney, J., Kopetz, S., Tejpar, S., Tabernero, J., 2017. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 17, nrc.2016.126.
- Di Sabatino, A., Biancheri, P., Rovedatti, L., Macdonald, T.T., Corazza, G.R., 2012a. Recent advances in understanding ulcerative colitis. *Intern. Emerg. Med.* 7, 103–111.
- Di Sabatino, A., Biancheri, P., Rovedatti, L., MacDonald, T.T., Corazza, G.R., 2012b. New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 18, 368–371.
- Dong, X., Liu, F., Sun, L., Liu, M., Li, D., Su, D., Zhu, Z., Dong, J.-T., Fu, L., Zhou, J., 2010. Oncogenic function of microtubule end-binding protein 1 in breast cancer. *J. Pathol.* 220, 361–369.
- Doshi, B.M., Hightower, L.E., Lee, J., 2010. HSPB1, actin filament dynamics, and aging cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1197, 76–84.
- Eaden, J.A., Abrams, K.R., Mayberry, J.F., 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 48, 526–535.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., Adami, H.O., 1990. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N. Engl. J. Med.* 323, 1228–1233.
- Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., Liotta, L.A., 1996. Laser capture microdissection. *Science* 274, 998–1001.
- Fantini, M.C., Pallone, F., 2008. Cytokines: from gut inflammation to colorectal cancer. *Curr. Drug Targets* 9, 375–380.
- Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H., Clevers, H., 2001. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* 3, 433–438.

- Fodde, R., 2002. The APC gene in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 38, 867–871.
- Forbes, G.M., 2008. Colorectal cancer screening tests: pros and cons, and for whom? *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 197–205.
- Fozard, J.B., Quirke, P., Dixon, M.F., Giles, G.R., Bird, C.C., 1986. DNA aneuploidy in ulcerative colitis. *Gut* 27, 1414–1418.
- Fuchs, C.S., Giovannucci, E.L., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Speizer, F.E., Willett, W.C., 1994. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 331, 1669–1674.
- Fujii, S., Katake, Y., Tanaka, H., 2010. Increased expression of DNA methyltransferase-1 in non-neoplastic epithelium helps predict colorectal neoplasia risk in ulcerative colitis. *Digestion* 82, 179–186.
- Fujimori, T., Satonaka, K., Yamamura-Idei, Y., Nagasako, K., Maeda, S., 1994. Non-involvement of ras mutations in flat colorectal adenomas and carcinomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 57, 51–55.
- Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A.S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A.J., Subbaramaiah, K., Cooper, H.S., Itzkowitz, S.H., Abreu, M.T., 2007. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 133, 1869–1881.
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., Mannon, P., Strober, W., 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 113, 1490–1497.
- Galandiuk, S., Miseljic, S., Yang, A.-R., Early, M., McCoy, M.D., Wittliff, J.L., 1993. Expression of Hormone Receptors, Cathepsin D, and HER-2/neu Oncoprotein in Normal Colon and Colonic Disease. *Arch. Surg.* 128, 637–642.
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Zermati, Y., Schmitt, E., Kroemer, G., 2006. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 2592–2601.
- Gemoll, T., Roblick, U.J., Szymczak, S., Braunschweig, T., Becker, S., Igl, B.-W., Bruch, H.-P., Ziegler, A., Hellman, U., Difilippantonio, M.J., Ried, T., Jörnvall, H., Auer, G., Habermann, J.K., 2011. HDAC2 and TXNL1 distinguish aneuploid from diploid colorectal cancers. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 68, 3261–3274.
- Gerecke, C., Scholtka, B., Löwenstein, Y., Fait, I., Gottschalk, U., Rogoll, D., Melcher, R., Kleuser, B., 2015. Hypermethylation of ITGA4, TFPI2 and VIMENTIN promoters is increased in inflamed colon tissue: putative risk markers for colitis-associated cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 141, 2097–2107.
- Gerling, M., Meyer, K.F., Fuchs, K., Igl, B.W., Fritzsche, B., Ziegler, A., Bader, F., Kujath, P., Schimmelpenninck, H., Bruch, H.-P., Roblick, U.J., Habermann, J.K., 2010. High Frequency of Aneuploidy Defines Ulcerative Colitis-Associated Carcinomas: A Comparative Prognostic Study to Sporadic Colorectal Carcinomas. *Ann. Surg.*
- Gómez García, E.B., Knoers, N.V.A.M., 2009. Gardner's syndrome (familial adenomatous polyposis): a cilia-related disorder. *Lancet Oncol.* 10, 727–735.
- Green, R.A., Wollman, R., Kaplan, K.B., 2005. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol. Biol. Cell* 16, 4609–4622.
- Greenstein, A.J., Sachar, D.B., Smith, H., Pucillo, A., Papatestas, A.E., Kreel, I., Geller, S.A., Janowitz, H.D., Aufses, A.H., Jr, 1979. Cancer in universal and left-sided ulcerative colitis: factors determining risk. *Gastroenterology* 77, 290–294.
- Greenstein, A.J., Slater, G., Heimann, T.M., Sachar, D.B., Aufses, A.H., Jr, 1986. A comparison of multiple synchronous colorectal cancer in ulcerative colitis, familial polyposis coli, and de novo cancer. *Ann. Surg.* 203, 123–128.

Greenwald, B.D., Harpaz, N., Yin, J., Huang, Y., Tong, Y., Brown, V.L., McDaniel, T., Newkirk, C., Resau, J.H., Meltzer, S.J., 1992. Loss of heterozygosity affecting the p53, Rb, and mcc/apc tumor suppressor gene loci in dysplastic and cancerous ulcerative colitis. *Cancer Res.* 52, 741–745.

Grizzle, W.E., Srivastava, S., Manne, U., 2010. The biology of incipient, pre-invasive or intraepithelial neoplasia. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* 9, 21–39.

Habermann, J., Lenander, C., Roblick, U.J., Krüger, S., Ludwig, D., Alaiya, A., Freitag, S., Dümbgen, L., Bruch, H.P., Stange, E., Salo, S., Tryggvason, K., Auer, G., Schimmelpenninck, H., 2001. Ulcerative colitis and colorectal carcinoma: DNA-profile, laminin-5 gamma2 chain and cyclin A expression as early markers for risk assessment. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 751–758.

Habermann, J.K., Upender, M.B., Roblick, U.J., Krüger, S., Freitag, S., Blegen, H., Bruch, H.P., Schimmelpenninck, H., Auer, G., Ried, T., 2003. Pronounced chromosomal instability and multiple gene amplifications characterize ulcerative colitis-associated colorectal carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* 147, 9–17.

Habermann, J.K., Paulsen, U., Roblick, U.J., Upender, M.B., McShane, L.M., Korn, E.L., Wangsa, D., Krüger, S., Duchrow, M., Bruch, H.-P., Auer, G., Ried, T., 2007. Stage-specific alterations of the genome, transcriptome, and proteome during colorectal carcinogenesis. *Genes. Chromosomes Cancer* 46, 10–26.

Hahne, M., Riemann, J.F., 2002. [Inflammatory bowel diseases: diagnosis (including new procedures for small intestine examination)]. *Praxis* 91, 2023–2028.

Harpaz, N., Talbot, I.C., 1996. Colorectal cancer in idiopathic inflammatory bowel disease. *Semin. Diagn. Pathol.* 13, 339–357.

Haskell, H., Andrews, C.W., Jr, Reddy, S.I., Dendrinos, K., Farraye, F.A., Stucchi, A.F., Becker, J.M., Odze, R.D., 2005. Pathologic features and clinical significance of “backwash” ileitis in ulcerative colitis. *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 1472–1481.

Hernegger, G.S., Moore, H.G., Guillem, J.G., 2002. Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. *Dis. Colon Rectum* 45, 127–134; discussion 134–136.

Heuschen, U.A., Hinz, U., Allemeyer, E.H., Stern, J., Lucas, M., Autschbach, F., Herfarth, C., Heuschen, G., 2001. Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 120, 841–847.

Hö G-G.T - Analytischer Vergleich der Proteinexpression von EB1, Hsp 27 und AnxA5 zwischen normaler Darmmukosa, sporadischem kolorektalen Karzinom und Colitis ulcerosa-assoziiertem kolorektalen Karzinom-Bachelor-Arbeit, Lübeck, 2015

Holzmann, K., Klump, B., Borchard, F., Hsieh, C.J., Kühn, A., Gaco, V., Gregor, M., Porschen, R., 1998. Comparative analysis of histology, DNA content, p53 and Ki-ras mutations in colectomy specimens with long-standing ulcerative colitis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 76, 1–6.

Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H., 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 29, 577–580.

Humphries, A., Jawad, N., Ignjatovic, A., East, J., Leedham, S., 2012. Carcinogenesis in Ulcerative Colitis.

Imai, K., Yamamoto, H., 2008. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29, 673–680.

Isenberg, G., Bielser, W., Meier-Ruge, W., Remy, E., 1976. Cell surgery by laser micro-dissection: a preparative method. *J. Microsc.* 107, 19–24.

Ishitsuka, T., Kashiwagi, H., Konishi, F., 2001. Microsatellite instability in inflamed and neoplastic epithelium

in ulcerative colitis. *J. Clin. Pathol.* 54, 526–532.

Itzkowitz, S., 2003. Colon carcinogenesis in inflammatory bowel disease: applying molecular genetics to clinical practice. *J. Clin. Gastroenterol.* 36, S70–74; discussion S94–96.

Itzkowitz, S.H., Yio, X., 2004. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G7–17.

Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., Burt, R.W., 2010. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058.

Klockenbusch, C., O'Hara, J.E., Kast, J., 2012. Advancing formaldehyde cross-linking towards quantitative proteomic applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 1057–1067.

Kobayashi, M., Honma, T., Matsuda, Y., Suzuki, Y., Narisawa, R., Ajioka, Y., Asakura, H., 2000. Nuclear translocation of beta-catenin in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 82, 1689–1693.

Kokal, W., Sheibani, K., Terz, J., Harada, J.R., 1986. Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *JAMA* 255, 3123–3127.

Kondo, T., Seike, M., Mori, Y., Fujii, K., Yamada, T., Hirohashi, S., 2003. Application of sensitive fluorescent dyes in linkage of laser microdissection and two-dimensional gel electrophoresis as a cancer proteomic study tool. *PROTEOMICS* 3, 1758–1766.

Kondo, T., Hirohashi, S., 2007. Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nat. Protoc.* 1, 2940–2956.

Kuester, D., Guenther, T., Biesold, S., Hartmann, A., Bataille, F., Ruemmele, P., Peters, B., Meyer, F., Schubert, D., Bohr, U.R., Malfertheiner, P., Lippert, H., Silver, A.R.J., Roessner, A., Schneider-Stock, R., 2010. Aberrant methylation of DAPK in long-standing ulcerative colitis and ulcerative colitis-associated carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 206, 616–624.

Lakatos, P.-L., Lakatos, L., 2008. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 3937–3947.

Lane, D.P., 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.

Langholz, E., Munkholm, P., Davidsen, M., Binder, V., 1994. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 107, 3–11.

Leidenius, M.H., Färkkilä, M.A., Kärkkäinen, P., Taskinen, E.I., Kellokumpu, I.H., Höckerstedt, K.A., 1997. Colorectal dysplasia and carcinoma in patients with ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 32, 706–711.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.

Lennard-Jones, J.E., Melville, D.M., Morson, B.C., Ritchie, J.K., Williams, C.B., 1990. Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 31, 800–806

Löfberg, R., Broström, O., Karlén, P., Tribukait, B., Ost, A., 1990. Colonoscopic surveillance in long-standing total ulcerative colitis--a 15-year follow-up study. *Gastroenterology* 99, 1021–1031.

Lynch, D.A., Lobo, A.J., Sobala, G.M., Dixon, M.F., Axon, A.T., 1993. Failure of colonoscopic surveillance in ulcerative colitis. *Gut* 34, 1075–1080.

Majumdar, S.R., Fletcher, R.H., Evans, A.T., 1999. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 3039–3045.

- Masson, O., Bach, A.-S., Derocq, D., Prébois, C., Laurent-Matha, V., Pattingre, S., Liaudet-Coopman, E., 2010. Pathophysiological functions of cathepsin D: Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity? *Biochimie* 92, 1635–1643.
- Mattar, M.C., Lough, D., Pishvaian, M.J., Charabaty, A., 2011. Current Management of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Gastrointest. Cancer Res. GCR* 4, 53–61.
- May, D., Pan, S., Crispin, D.A., Lai, K., Bronner, M.P., Hogan, J., Hockenbery, D.M., McIntosh, M., Brentnall, T.A., Chen, R., 2011. Investigating neoplastic progression of ulcerative colitis with label-free comparative proteomics. *J. Proteome Res.* 10, 200–209.
- Mercer, W.E., 1992. Cell cycle regulation and the p53 tumor suppressor protein. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2, 251–263.
- Meyer, K.-F., Nause, S.L., Freitag-Wolf, S., Krüger, S., Bruch, H.-P., Roblick, U.J., Habermann, J.K., 2013a. Aneuploidy characterizes adjacent non-malignant mucosa of ulcerative colitis-associated but not sporadic colorectal carcinomas: a matched-pair analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* 48, 679–687.
- Meyer, R., Freitag-Wolf, S., Blindow, S., Büning, J., Habermann, J.K., 2017. Combining aneuploidy and dysplasia for colitis' cancer risk assessment outperforms current surveillance efficiency: a meta-analysis. *Int. J. Colorectal Dis.* 32, 171–182.
- Mikami, T., Mitomi, H., Hara, A., Yanagisawa, N., Yoshida, T., Tsuruta, O., Okayasu, I., 2000. Decreased expression of CD44, alpha-catenin, and deleted colon carcinoma and altered expression of beta-catenin in ulcerative colitis-associated dysplasia and carcinoma, as compared with sporadic colon neoplasms. *Cancer* 89, 733–740.
- Mikami, T., Yoshida, T., Numata, Y., Kikuchi, M., Araki, K., Nakada, N., Okayasu, I., 2011. Invasive behavior of ulcerative colitis-associated carcinoma is related to reduced expression of CD44 extracellular domain: comparison with sporadic colon carcinoma. *Diagn. Pathol.* 6, 30.
- Mitsuhashi, J., Mikami, T., Saigenji, K., Okayasu, I., 2005. Significant correlation of morphological remodeling in ulcerative colitis with disease duration and between elevated p53 and p21 expression in rectal mucosa and neoplastic development. *Pathol. Int.* 55, 113–121.
- Miyamoto, S., Ichi, Endoh, Y., Hasebe, T., Ishii, G., Kodama, K., Goya, M., Ono, M., Saitoh, N., Chiba, T., Ochiai, A., 2004. Nuclear beta-catenin accumulation as a prognostic factor in Dukes' D human colorectal cancers. *Oncol. Rep.* 12, 245–251.
- Monteleone, G., Pallone, F., Stolfi, C., 2012. The dual role of inflammation in colon carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11071–11084.
- Moum, B., Ekbom, A., Vatn, M.H., Elgjo, K., 1999. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am. J. Gastroenterol.* 94, 1564–1569.
- Munoz, L.E., Frey, B., Pausch, F., Baum, W., Mueller, R.B., Brachvogel, B., Poschl, E., Rödel, F., von der Mark, K., Herrmann, M., Gaipl, U.S., 2007. The role of annexin A5 in the modulation of the immune response against dying and dead cells. *Curr. Med. Chem.* 14, 271–277.
- Neurath, M.F., Finotto, S., Glimcher, L.H., 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat. Med.* 8, 567–573.
- Nieminen, U., Jussila, A., Nordling, S., Mustonen, H., Färkkilä, M.A., 2014. Inflammation and disease duration have a cumulative effect on the risk of dysplasia and carcinoma in IBD: a case-control observational study based on registry data. *Int. J. Cancer* 134, 189–196.
- Nishigaki, R., Osaki, M., Hiratsuka, M., Toda, T., Murakami, K., Jeang, K.-T., Ito, H., Inoue, T., Oshimura, M., 2005. Proteomic identification of differentially-expressed genes in human gastric carcinomas. *Proteomics* 5, 3205–3213.

- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Ogino, S., Goel, A., 2008. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J. Mol. Diagn. JMD* 10, 13–27.
- Ohkusa, T., Okayasu, I., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., Sato, N., 2003. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 52, 79–83.
- Okayasu, I., Yoshida, T., Mikami, T., Mitsuhashi, J., Ichinoe, M., Yanagisawa, N., Tokuyama, W., Hana, K., Ishibashi, Y., 2011. Mucosal Remodeling and Alteration of Stromal Microenvironment in Ulcerative Colitis as Related to Colorectal Tumorigenesis, in: O'Connor, M. (Hrsg.), *Ulcerative Colitis - Epidemiology, Pathogenesis and Complications*, InTech,
- Okayasu, I., 2012. Development of ulcerative colitis and its associated colorectal neoplasia as a model of the organ-specific chronic inflammation-carcinoma sequence. *Pathol. Int.* 62, 368–380.
- Orimo, T., Ojima, H., Hiraoka, N., Saito, S., Kosuge, T., Kakisaka, T., Yokoo, H., Nakanishi, K., Kamiyama, T., Todo, S., Hirohashi, S., Kondo, T., 2008. Proteomic profiling reveals the prognostic value of adenomatous polyposis coli–end-binding protein 1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48, 1851–1863.
- O'Riordain, M.G., Fazio, V.W., Lavery, I.C., Remzi, F., Fabbri, N., Meneu, J., Goldblum, J., Petras, R.E., 2000. Incidence and natural history of dysplasia of the anal transitional zone after ileal pouch-anal anastomosis: results of a five-year to ten-year follow-up. *Dis. Colon Rectum* 43, 1660–1665.
- Ott, C., Obermeier, F., Thiel, S., Kemptner, D., Bauer, A., Schölmerich, J., Rogler, G., Timmer, A., 2008. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 20, 917–923.
- Oya-Ito, T., Liu, B.-F., Nagaraj, R.H., 2006. Effect of methylglyoxal modification and phosphorylation on the chaperone and anti-apoptotic properties of heat shock protein 27. *J. Cell. Biochem.* 99, 279–291.
- Palli, D., Trallori, G., Saieva, C., Tarantino, O., Edili, E., D'Albasio, G., Pacini, F., Masala, G., 1998. General and cancer specific mortality of a population based cohort of patients with inflammatory bowel disease: the Florence Study. *Gut* 42, 175–179.
- Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C., 2006. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1179–1181.
- Pender, S.L.F., MacDonald, T.T., 2004. Matrix metalloproteinases and the gut - new roles for old enzymes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 546–550.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., Vulpe, C.D., 2008. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8, 1744–1749.
- Riddell, R.H., Goldman, H., Ransohoff, D.F., Appelman, H.D., Fenoglio, C.M., Haggitt, R.C., Ahren, C., Correa, P., Hamilton, S.R., Morson, B.C., 1983. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum. Pathol.* 14, 931–968.
- Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schröck, E., Heselmeyer, K., du Manoir, S., Auer, G., 1996. Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* 15, 234–245.
- Risques, R.A., Lai, L.A., Brentnall, T.A., Li, L., Feng, Z., Gallaher, J., Mandelson, M.T., Potter, J.D., Bronner, M.P., Rabinovitch, P.S., 2008. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology* 135, 410–418.

- Rocchi, P., So, A., Kojima, S., Signaevsky, M., Beraldi, E., Fazli, L., Hurtado-Coll, A., Yamanaka, K., Gleave, M., 2004. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 64, 6595–6602.
- Rosenqvist, H., Ohrling, H., Lagercrantz, R., Edling, N., 1959. Ulcerative colitis and carcinoma coli. *Lancet* 1, 906–908.
- Rubin, C.E., Haggitt, R.C., Burmer, G.C., Brentnall, T.A., Stevens, A.C., Levine, D.S., Dean, P.J., Kimmey, M., Perera, D.R., Rabinovitch, P.S., 1992. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103, 1611–1620.
- Rutegård, J.N., Ahlgren, L.R., Janunger, K.G., 1988. Ulcerative colitis. Colorectal cancer risk in an unselected population. *Ann. Surg.* 208, 721–724.
- Rutter, M.D., Saunders, B.P., Wilkinson, K.H., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M.A., Williams, C.B., Price, A.B., Talbot, I.C., Forbes, A., 2004. Cancer surveillance in longstanding ulcerative colitis: endoscopic appearances help predict cancer risk. *Gut* 53, 1813–1816.
- Sabatino, A., Biancheri, P., Rovedatti, L., MacDonald, T.T., Corazza, G.R., 2011. Recent advances in understanding ulcerative colitis. *Intern. Emerg. Med.* 7, 103–111.
- Scarpa, M., Castagliuolo, I., Castoro, C., Pozza, A., Scarpa, M., Kotsafti, A., Angriman, I., 2014. Inflammatory colonic carcinogenesis: A review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 6774–6785.
- Sherr, C.J., 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235–246.
- Schottelius, A.J., Dinter, H., 2006. Cytokines, NF-kappaB, microenvironment, intestinal inflammation and cancer. *Cancer Treat. Res.* 130, 67–87.
- Schulmann, K., Reiser, M., Schmiegel, W., 2002. Colonic cancer and polyps. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16, 91–114.
- Schürmann, G., Ochman, S., Neurath, M.F., 2000. Das Colitis ulcerosa-assozierte Kolonkarzinom - Risikofaktoren, molekulare Pathogenese und Überwachung -. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* 125, 1045–1050.
- Soetikno, R.M., Lin, O.S., Heidenreich, P.A., Young, H.S., Blackstone, M.O., 2002. Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest. Endosc.* 56, 48–54.
- Sottoriva, A., Kang, H., Ma, Z., Graham, T.A., Salomon, M.P., Zhao, J., Marjoram, P., Siegmund, K., Press, M.F., Shibata, D., Curtis, C., 2015. A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat. Genet.* 47, 209–216.
- Stein, W., Farina, A., Gaffney, K., Lundeen, C., Wagner, K., Wachtel, T., 1993. Characteristics of colon cancer at time of presentation. *Fam. Pract. Res. J.* 13, 355–363.
- Stoler, D.L., Chen, N., Basik, M., Kahlenberg, M.S., Rodriguez-Bigas, M.A., Petrelli, N.J., Anderson, G.R., 1999. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15121–15126.
- Sugihara, Y., Taniguchi, H., Kushima, R., Tsuda, H., Kubota, D., Ichikawa, H., Sakamoto, K., Nakamura, Y., Tomonaga, T., Fujita, S., Kondo, T., 2012. Proteomic-based identification of the APC-binding protein EB1 as a candidate of novel tissue biomarker and therapeutic target for colorectal cancer. *J. Proteomics* 75, 5342–5355.
- Sugita, A., Greenstein, A.J., Ribeiro, M.B., Sachar, D.B., Bodian, C., Panday, A.K., Szporn, A., Pozner, J., Heimann, T., Palmer, M., 1993. Survival with colorectal cancer in ulcerative colitis. A study of 102 cases. *Ann. Surg.* 218, 189–195.

Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* 55, 2972–2977.

Svartz, Emberg, 1949. Cancer coli in cases of colitis ulcerosa. *Acta Med Scand.*

Tanca, A., Pagnozzi, D., Burrai, G.P., Polinas, M., Uzzau, S., Antuofermo, E., Addis, M.F., 2012. Comparability of differential proteomics data generated from paired archival fresh-frozen and formalin-fixed samples by GeLC–MS/MS and spectral counting. *J. Proteomics* 77, 561–576.

Thériault, J.R., Lambert, H., Chávez-Zobel, A.T., Charest, G., Lavigne, P., Landry, J., 2004. Essential role of the NH2-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J. Biol. Chem.* 279, 23463–23471.

Timmer, A., Goebell, H., 1999. Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany. *Z. Für Gastroenterol.* 37, 1079–1084.

Tirnauer, J.S., Bierer, B.E., 2000. EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J. Cell Biol.* 149, 761–766.

Triantafillidis, J.K., Nasioulas, G., Kosmidis, P.A., 2009. Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Risk Factors, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies. *Anticancer Res.* 29, 2727–2737.

van der Woude, C.J., Moshage, H., Homan, M., Kleibeuker, J.H., Jansen, P.L.M., van Dekken, H., 2005. Expression of apoptosis related proteins during malignant progression in chronic ulcerative colitis. *J. Clin. Pathol.* 58, 811–814.

van Dieren, J.M., Wink, J.C., Vissers, K.J., van Marion, R., Hoogmans, M.M.C.P., Dinjens, W.N.M., Schouten, W.R., Tanke, H.J., Szuhai, K., Kuipers, E.J., van der Woude, C.J., van Dekken, H., 2006. Chromosomal and microsatellite instability of adenocarcinomas and dysplastic lesions (DALM) in ulcerative colitis. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* 15, 216–222.

van Hattem, W.A., Brosens, L. a. A., de Leng, W.W.J., Morsink, F.H., Lens, S., Carvalho, R., Giardiello, F.M., Offerhaus, G.J.A., 2008. Large genomic deletions of SMAD4, BMPR1A and PTEN in juvenile polyposis. *Gut* 57, 623–627.

Vargas-Roig, L.M., Gago, F.E., Tello, O., Aznar, J.C., Ciocca, D.R., 1998. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *Int. J. Cancer* 79, 468–475.

Velayos, F.S., Loftus, E.V., Jr, Jess, T., Harmsen, W.S., Bida, J., Zinsmeister, A.R., Tremaine, W.J., Sandborn, W.J., 2006. Predictive and protective factors associated with colorectal cancer in ulcerative colitis: A case-control study. *Gastroenterology* 130, 1941–1949.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., Bos, J.L., 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.

Walker, J.M., *The Proteomic Protocols Handbook*, Humana Press Inc., 2005, Ort: New Jersey, University of Hertfordshire, 2005.

Walther, A., Houlston, R., Tomlinson, I., 2008. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 57, 941–950.

Wang, Y., Zhou, X., Zhu, H., Liu, S., Zhou, C., Zhang, G., Xue, L., Lu, N., Quan, L., Bai, J., Zhan, Q., Xu, N., 2005. Overexpression of EB1 in human esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) may promote cellular growth by activating beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 24, 6637–6645.

Watanabe, T., Kobunai, T., Yamamoto, Y., Ikeuchi, H., Matsuda, K., Ishihara, S., Nozawa, K., Iinuma, H., Kanazawa, T., Tanaka, T., Yokoyama, T., Konishi, T., Eshima, K., Ajioka, Y., Hibi, T., Watanabe, M., Muto, T.,

- Nagawa, H., 2011. Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Clin. Colorectal Cancer* 10, 134–141.
- Weber, C.R., Nalle, S.C., Tretiakova, M., Rubin, D.T., Turner, J.R., 2008. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 1110–1120.
- Willenbacher, R.F., 1996. Inflammatory bowel disease. *Semin. Gastrointest. Dis.* 7, 94–104.
- Willenbacher, R.F., Aust, D.E., Chang, C.G., Zelman, S.J., Ferrell, L.D., Moore, D.H., 2nd, Waldman, F.M., 1999. Genomic instability is an early event during the progression pathway of ulcerative-colitis-related neoplasia. *Am. J. Pathol.* 154, 1825–1830.
- Winther, K.V., Jess, T., Langholz, E., Munkholm, P., Binder, V., 2003. Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County. *Gastroenterology* 125, 1576–1582.
- Winther, K.V., Jess, T., Langholz, E., Munkholm, P., Binder, V., 2004. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2, 1088–1095.
- Wright, N.A., 2000. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* 81, 117–143.
- Xie, J., Itzkowitz, S.H., 2008. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 14, 378–389.
- Yaeger, R., Shah, M.A., Miller, V.A., Kelsen, J.R., Wang, K., Heins, Z.J., Ross, J.S., He, Y., Sanford, E., Yantiss, R.K., Balasubramanian, S., Stephens, P.J., Schultz, N., Oren, M., Tang, L., Kelsen, D., 2016. Genomic Alterations Observed in Colitis-Associated Cancers Are Distinct From Those Found in Sporadic Colorectal Cancers and Vary by Type of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 151, 278–287.e6.
- Yamamoto, T., Matsumoto, K., Iriyama, K., 1998. Prognostic significance of the DNA index in a colorectal cancer. *Surg. Today* 28, 792–796.
- Yang, L., Pei, Z., 2006. Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 12, 6741–6746.
- Yashiro, M., 2014. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 20, 16389–16397.
- Zhang, T., Zaal, K.J.M., Sheridan, J., Mehta, A., Gundersen, G.G., Ralston, E., 2009. Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion. *J. Cell Sci.* 122, 1401–1409.
- Zhen, Y., Luo, C., Zhang, H., 2018. Early detection of ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Gastroenterol. Rep.* 6, 83–92.

7. Anhang

I. Danksagungen

Ich möchte mich bei denjenigen bedanken, die mich begleitet und unterstützt haben:

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater und Mentor Herrn Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann für die Bereitstellung des Themas, die fachkundige Betreuung, und die großzügigen finanziellen Mittel, mit welchen ich meine Forschung betreiben durfte.

Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Tobias Keck als Direktor der Klinik für Chirurgie des UKSH Campus Lübeck für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien.

Einen großen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. M.Sc. Timo Gemoll für die effektive Betreuung, fachliche und freundschaftliche Unterstützung, das zügige Beantworten meiner Mails und seine Geduld aussprechen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls beim gesamten Team des chirurgischen Forschungslabors, für das unermüdliches Engagement und die angenehme Atmosphäre. Besonderer Dank gilt hier Frau Katja Klempt-Gießing für die Einarbeitung ins Labor und die fachliche Unterstützung bei Probenaufbereitung und -verarbeitung.

Meinen Großeltern Gisela und Klaus Breuel, die schon früh wissenschaftliches Interesse in mir weckten und Rolf und Regina Kollbeck für die herzliche Unterstützung bei allem, was ich tue.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und damit eine wundervolle Zeit in meinem Leben ermöglicht haben.

II. Ethikvotum

Die verwendeten Proben wurden im Zeitraum von 1995 bis 2012 im Rahmen operativer Eingriffe in der Klinik für Chirurgie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, gewonnen. Sie wurden entsprechend des Ethikvotums verwendet (Ethikvotum Nr. 07-124 am 12.03.2008).

III. Materialien

a. Chemikalien

10 µl RLT+ Puffer	QUIAGEN, Hilden, Deutschland
Aceton 100%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril (50%)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Amersham ECL-Block	GE Healthcare, BioScience, Freiburg, Deutschland
Ammoniumbicarbonat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Ammoniumphosphat	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland

CHAPS	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Cooling Fluid	SERVA, Heidelberg, Deutschland
DAB-Substratlösung	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
DEPC (RNase freies Wasser)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	BIO-RAD, München, Deutschland
Eosin G 0,5%, wässrig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Equilibrationspuffer	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut, 100%, 96%, 75%, 70% (vergällt)	JT Baker®, Avantor Performane Material B.V., Deventer, Niederlande
EUKITT®	O.Kindler, Freiburg, Deutschland
EZQ® protein quantitation reagent	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Hämatoxylin nach Mayer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	USB Corporation, Cleveland, USA
Iodacetamid (IAA)	BIO-RAD, München, Deutschland
Jung Tissue freezing Medium	Leica, Wetzlar, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Millipore /Mili-Q Wasser/MQ	Hergestellt aus Leitungswasser mit dem Q-POD™, Millipore, Billerica, MA, USA
Mineral Oil	Trinity Biotech, Hercules, CA, USA
Ovalbumin	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Pharmyllyte	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Plus one DryStrip Cover Fluid	GE Healthcare BioScience, Freiburg, Deutschland
PVDF Immobilon	Merck, Darmstadt, Deutschland
RNase Away®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
SDS Anoden Puffer	SERVA, Heidelberg, Deutschland
SDS Kathoden Puffer	SERVA, Heidelberg, Deutschland
SDS-Page-Trägermatrix (Criterion™ TGX™ precast Gel 4-12%)	BIO-RAD, München, Deutschland
TBS Puffer	BIO-RAD, München, Deutschland
Thioharnstoff	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Toluidin – Blau	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris (Tromethanol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsinlösung (3,5ng/ µl Trypsin) aktiviert	sequencing grade, Promega, Madison, WI USA
Tween-20	Cell Signaling, Danvers, USA
0,1%-SDS-Lösung	BIO-RAD, München, Deutschland

Xylol (reinst.)	J.T. Baker®, Awantor Performance Material B.V, Deventer, Niederlande
Zitronensäure (Citronensäure-Monohydrat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

b. Antikörper

anti-ANXA5 #TA307564 anti-rabbit	OriGene Technologies, Rockville, USA
anti-EB1 #SC-47704, anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
anti-HSPB1 Ab00314-1.1, anti-mouse	Absolute Antibody, Oxford, UK

c. Puffer und Lösungen

Aufbereitungspuffer	8M Urea (FW 60.06) (12g), 4%(w/v) CHAPS+ (1,0g), 2%Phamyllyte oder IPG Puffer (500µl), 40mM DTT(FW 154,2)(154 mg), Mili-Q Wasser (mindestens 16ml) 2,5ml Aliquots bei -80°C gelagert
DIGE Puffer	Tris 30mM (0,18g), Harnstoff 7M (21g), Thioharnstoff 2M (7,6g), CHAPS 4%(w/v) (2g) Zugabe von deionisiertem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50ml; pH 8,5 einstellen. 1 ml Aliquots bei -80°C lagern)
Equilibrationspuffer	SERVAa, Heidelberg, Deutschland
Fixierungslösung	1000ml Milli-q Wasser, 800ml Ethanol (100%), 20g Zitronensäure, 200ml Essigsäure (100%)
IPG Puffer	GE Healthcare BioScience, Freiburg, Deutschland
Rehydrierungspuffer	7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS, 2 % immobilisierter pH-Gradienten[IPG]-Puffer, 0,3 % Dithiothreitol [DTT] und einer Spur Bromphenolblau
RLT Puffer	Quiagen, Hilden, Deutschland
SDS Anoden Puffer	SERVA, Heidelberg, Deutschland
SDS Kathoden Puffer	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Stocklösung für Proteinquantifizierung	200µl TBS-Puffer 2,mg Ovalbumin, DIGE-Puffer
TBS Puffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

d. Kits

Micro Kit 50	QUIAGEN, Hilden, Deutschland
Micro Kit Plus	QUIAGEN, Hilden, Deutschland
Protein Quantifikation Kit	Invitrogen, Eugene, OR, USA
ReadyPrep 2-D Cleanup Kit	BIO-RAD, München, Deutschland
Refraction-2D™ Labeling Kits	NH DyeAGNOSTICS, Halle, Deutschland
RNase-Free DNase Set (50)	QUIAGEN, Hilden, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BIO-RAS, München, Deutschland

e. Materialien/ Verbrauchsmaterialien

2D HPE™ Large GEL NF	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Menzel Deckgläser 24x40mm/24x60mm	Thermo Fisher Scientific, Lommatzsch, Deutschland
Fibrewicks	SERVA, Heidelberg, Deutschland
GE IPG Streifen	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Objektträger Membranslides (Artnr. 46 20 215 883)	Zeiss, LLC, USA
Prespotted AnchorChip™ HCCA-Matrix	Bruker Daltonics, MA USA
Pipette 1000, 100, 10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
PVDF Immobilon®-FL	Merck Millipore, Billerica, USA
Whatman™ Grade 5 Filterpapier	BioScience, Freiburg, Deutschland

f. Geräte

Beckman Coulter Avanti J-25	BECKMAN INSTRUMENTS INC., Palo Alto, CA, USA
Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ettan™ Spot Picker 1.20	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Fluoreszenz Image Analyzer Typhoon™ FLA 9000	GE Healthcare BioScience, Freiburg, Deutschland
HPE (High Performance Electrophoresis) Flat Top	Gelcompany San Francisco, CA, USA
Kryostat CM 1850	Leica, Wetzlar, Deutschland
LCM Laser Zeiss Axiovert 200M	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, Deutschland
UltraFlex TOF/TOF Massenspektrometer	Bruker Daltonics, MA USA
Pannoramic Desk Scanner	3D HISTECH INTAS, Budapest, Ungarn
Criterion™ Vertical Electrophoresis Zelle	BIO-RAD, München, Deutschland
Protean IEF Cell	BIO-RAD, München, Deutschland
Q-POD™	Millipore, Billerica, MA, USA
Whatman™ Grade 5 Filterpapier	BioScience, Freiburg, Deutschland

g. Software

Biotools (Vs. 3.2)	Bruker Daltonics, MA USA
Compass® (Vs. 1.3)	Bruker Daltonics, MA USA
Fluoreszenz Image Software Typhoon™ FLA 9000	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, Deutschland
GraphPad Prism® (Vs. 6)	GraphPad Software, La Jolla, USA
GProX Graphical Proteomics Data Explorer (Vs. 2.12.0)	Sourceforge (http://gprox.sourceforge.net/download.html)
MASCOT (Vs. 2.2)	Matrix Science Ltd, London, UK
Microsoft Office Word (Vs. 2007)	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office Excel (Vs. 2007)	Microsoft, Redmond, USA
PALM® RoboSoftware	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena Deutschland

Pannoramic Scanner v. 1.14 Sp1 RTM	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Pannoramic Viewer v. 1.15.2 RTM	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
PANTHER (Vs. 10.0 (Release Date May 15, 2015))	(http://pantherdb.org/about.jsp 07.10.2015)
Progenesis SameSpots (Vs. 4.5)	Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK
SwissProt Datenbank (Vs. Sprot_57.8, 20401 protein entries)	SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Schweiz
Image Scope (Vs. 9.1)	Aperio, Vista, USA
Image Quant TL Array Software	GE Healthcare BioScience, Freiburg, Deutschland
IPA®(Interactive Pathway Analysis) (Analysis Creation Date: 2016-06-23, Build version: 220217, Content version: 16542223 (Release Date: 2013-05-13))	Ingenuity® Systems, Inc. Redwood City, CA

IV. Tabellen

Anhang Tabelle 1 ermittelte Konzentrationen (µg/µl) der einzelnen Proben

Probe UCC	980	954	320	136	370	711	253	203	217	1303
Ermittelte Konzentration	8,2	5,3	4,5	6,0	5,0	7,6	4,3	7,0	4,0	2,1
Probe SCC	286	830	306	187	845	460	400	363	726	666
Ermittelte Konzentration	9,2	8,7	9,7	11,1	8,6	8,7	14,3	10,3	7,9	10,6

Anhang Tabelle 2 Zusammensetzung des Internen Standards: Abhängig von der Konzentration der Probe wird je ein Teil zum internen Standard gegeben, so dass am Ende pro Probe das gleiche Volumen mit identischer Konzentration an Protein erreicht wird

Probe	Ermittelte Konzentration (µg/µl)	Volumen Probe (µl)	Volumen Puffer (µl)	Dye
980	8,2	6,10	3,90	G200
954	5,3	9,43	0,57	G200
320	4,5	11,11	0	G200
136	6,0	8,33	1,67	G200
370	5,0	10,00	0,00	G200
711	7,6	6,58	3,42	G300
253	4,3	11,63	0,00	G300
203	7,0	7,14	2,86	G300
217	4,0	12,50	4,0,00	G300
1303	2,1	19,0	0,00	G300
286	9,2	5,43	4,57	G300
830	8,7	5,75	4,25	G300
306	9,7	5,15	4,85	G300
187	11,1	4,50	45,50	G300
845	8,6	5,81	4,19	G300
460	8,7	5,75	4,25	G200
400	14,3	3,50	6,50	G200

363	10,3	4,85	5,15	G200
726	7,9	6,33	3,67	G200
666	10,6	4,72	5,28	G200

Anhang Tabelle 3 Exitationsschwellen der verschiedenen Kanäle und Fluoreszenzstoffe.

Kanal	Färbung/Fluoreszenz	Exitation(nm)	Emission(nm)	Probe
Cy 2	Dye 100	473	506	Standard
Cy 3	Dye 200	532	570	UCC
Cy 5	Dye 300	635	670	SCC

Tabelle 4 Einstellungen der Laufeigenschaften im Tower bei 15°C

Schri	Volt	Widerstand				Stromstärke				Zeit
		1 Gel	2 Gele	3 Gele	4 Gele	1 Gel	2 Gele	3 Gele	4 Gele	
1	100V	7mA	14mA	21mA	28mA	1W	2W	3W	4W	30min
2	200V	13mA	26mA	39mA	52mA	3W	6W	9W	12W	30min
3	300V	20mA	40mA	60mA	80mA	5W	10W	15W	20W	10min
Nach Schritt 3 Entfernung der IPG Streifen										
4	1500V	40mA	80mA	120mA	160mA	30W	60W	90W	120W	4h50min
6	1500V	45mA	90mA	135mA	180mA	40W	80W	120W	160W	50min

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Sophie L.G. Kollbeck

Geburtstag: 20.11.1987 in Dresden



Hochschulstudium

2007-2014 Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck

2009 1. Staatsexamen

2009-2014 Stipendiatin der Friedrich-Ebert-Stiftung

Juni 2014 2. Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

10/2014-10/2016 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

10/2016-10/2017 Assistenzärztin im Abdominalcenter K, Bisbjerg Hospital, Kopenhagen

Seit 11/2017 Assistenzärztin in der Viszeralchirurgie, Herlev Hospital, Kopenhagen

Zeitraum der Dissertation

2012-2016 medizinische Doktorandin in der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie & Biobanking

Leitung Prof. Dr. Dr. med. J.K. Habermann, Universität zu Lübeck und UKSH Campus Lübeck

Publikation

2017 EB1 protein alteration characterizes sporadic but not ulcerative colitis associated colorectal cancer Timo Gemoll,* Sophie L. Kollbeck*, Karl F. Karstens, Gia G. Hò, Sonja Hartwig, Sarah Strohkamp, Katharina Schillo, Christoph Thorns, Martina Oberländer, Kathrin Kalies, Stefan Lehr, Jens K. Habermann

Oncotarget 2017 Jul; 8(33):54939-54950. DOI: 10.18632/oncotarget.18978

**Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen und teilen sich die Erstautorenschaft.*

EKLÄRUNG

Diese Dissertation ist ohne fremde Hilfe angefertigt worden und es wurden keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt.

Lübeck, d. 10.07.2018

S.L.G. Kollbeck