

Aus der  
Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und  
Biomaterialbanken der Klinik für Chirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Prof. Dr. Timo Gemoll

# **Untersuchung der genomischen Instabilität beim kolorektalen Karzinom mittels bildgebender Massenspektrometrie**

Inauguraldissertation zu Erlangung der Doktorwürde der Universität zu  
Lübeck  
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Elena Theresa Miroll  
aus Heidelberg  
Lübeck 2021

- 1.Berichterstatter: Prof. Dr. Timo Gemoll
- 2.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Krüger

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2022

Zum Druck genehmigt.

Lübeck, den 07.02.2022

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

# Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
----------------------------	---

TABELLENVERZEICHNIS .....	VII
---------------------------	-----

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. ANATOMIE DES KOLONS.....	1
1.2. DAS KOLOREKTALE KARZINOM.....	3
1.2.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms .....	3
1.2.2. Entstehung kolorektaler Karzinome .....	4
1.2.2.1. Chromosomale Instabilität .....	6
1.2.2.2. Mikrosatelliteninstabilität .....	7
1.2.2.3. CpG-Insel-Methylierung .....	8
1.2.3. Klassifikation des kolorektalen Karzinoms .....	9
1.2.4. Diagnostik, Therapie und Prognose des kolorektalen Karzinoms .....	10
1.3. BIOMARKER .....	12
1.3.1 Tumorheterogenität und bildgebende Proteinanalytik .....	13
1.4. ZIELE DER ARBEIT .....	15
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
2.1. MATERIALIEN .....	16
2.1.1. Patientengewebe .....	19
2.2. METHODEN .....	21
2.2.1. Herstellung der Tissue Microarrays .....	21
2.2.2. Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation-bildgebende Massenspektrometrie .....	22
2.2.3. Statistische Auswertung der bildgebenden Massenspektrometrie .....	25
2.2.4. Proteinidentifikation .....	26

2.2.5.	Validierung durch immunhistochemische Färbung .....	29
2.2.6.	Auswertung der immunhistochemischen Färbung .....	31
2.2.6.1.	Software-gestützte Bestimmung der Immunpositivität .....	31
2.2.6.2.	Manuelle Bewertung der Immunintensität .....	32
2.2.6.3.	Statistische Auswertung der Immunpositivität .....	35
2.2.7.	Korrelationsanalyse .....	35
3.	ERGEBNISSE .....	36
3.1.	BILDGEBENDE MASSENSPEKTROMETRIE ZEIGT UNTERSCHIEDE IM PROTEOM .....	36
3.1.1.	Auswertbare Gewebeproben für das MALDI-IMS .....	36
3.1.2.	Intensitäten verschiedener m/z-Werte unterscheiden Ploidie und Gewebeart .....	38
3.1.2.1.	Vergleich zwischen Mukosa- und KRK-Gewebe .....	38
3.1.2.2.	Vergleich der Ploidie in kolorektalen Karzinomen .....	39
3.2.	IDENTIFIZIERUNG VON M/Z-WERTEN .....	40
3.2.1.	Keine Proteinzuordnung bei Mukosa- und KRK-Gewebe möglich ...	41
3.2.2.	Vier Proteine unterscheiden diploides von aneuploidem KRK- Gewebe .....	41
3.3.	VALIDIERUNG DER BILDGEBENDEN MASSENSPEKTROMETRIE MITTELS IMMUNHISTOCHEMISCHER FÄRBUNGEN .....	42
3.3.1.	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (UBE2N) zeigt signifikante Unterschiede in Trainings- und Validierungsset nach histologischer Färbung .....	42
3.3.2.	UBE2N Färbung korreliert mit Ploidie und Grading .....	50
3.3.3.	Färbung gegen Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (SPTBN1) kann Ergebnisse der bildgebende Massenspektrometrie im Trend bestätigen .....	51
4.	DISKUSSION .....	53
4.1.	BILDGEBENDE MASSENSPEKTROMETRIE (MALDI-IMS) .....	53

4.1.1.	Technische Limitierung und Entwicklung .....	54
4.1.2.	Unterscheidung weiterer klinischer Parameter .....	55
4.2.	IMMUNHISTOCHEMIE.....	55
4.2.1.	Differenzierung durch Immunhistochemie .....	56
4.2.2.	UBE2N korreliert mit dem Ploidiestatus und dem Grading.....	57
4.3.	GEWEBEKOLLEKTIV UND GEWEBEVERLUSTE.....	57
4.4.	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2 N .....	58
4.4.1.	UBE2N indiziert genomische Instabilität .....	61
4.4.2.	UBE2N als Therapieziel.....	61
4.5.	SPECTRIN BETA CHAIN, NON-ERYTHROCYTIC 1 .....	62
4.5.1.	Immunhistochemie kann bildgebende Massenspektrometrie im Trend bestätigen.....	63
4.5.2.	SPTBN1-Expression ist kongruent zur Literatur .....	63
4.6.	Ausblick UBE2N und bildgebende Massenspektrometrie .....	64
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	65
6.	LITERATURVERZEICHNIS .....	66
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VII
8.	ANHANG .....	X
8.1.	AMSTERDAM II-KLASSIFIKATION DES HEREDITÄREN NICHT-POLYPÖSEN KOLOREKTALEN KARZINOMS .....	X
8.2.	KLINISCHE DATEN DES TRAININGSSETS AUFGESCHLÜSSELT NACH PATIENTEN .....	X
8.3.	KLINISCHE DATEN DES VALIDIERUNGSSETS AUFGESCHLÜSSELT NACH PATIENTEN .....	XI
8.4.	PROTEINDATENBANK DES TRAININGSSETS.....	XII

<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>VIII</b>
---------------------------	-------------

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Anatomie des Kolons. ....	1
Abbildung 2. Histologischer Aufbau des Kolons.....	2
Abbildung 3. Häufigste Tumoren.....	3
Abbildung 4. Erkrankungsraten nach Altersgruppen und Geschlecht für das KKR.....	4
Abbildung 5. Histologische Einteilung von Kolonadenomen.....	5
Abbildung 6. Entstehungswege eines kolorektalen Karzinoms. ....	5
Abbildung 7. Häufigkeit der Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms bei Erstdiagnose in Deutschland 2015-2016. ....	11
Abbildung 8. Ablauf der Massenspektrometrie.....	23
Abbildung 9. Matrix-Ionisation. ....	23
Abbildung 10. Markierung der Histologie zweier Gewebeproben des Trainingssets in SCiLS.....	25
Abbildung 11. Aufbau LTQ Orbitrap Massenspektrometer.....	27
Abbildung 12. Elektrospray-Ionisation.. ....	28
Abbildung 13. Gemessene Gewebeausschnitte. ....	32
Abbildung 14. Farbeintensitäten der Färbung von SPTBN1.....	33
Abbildung 15. Farbeintensitäten der Färbung mit UBE2N.....	34
Abbildung 16. Gewebezuoordnung nach HE-Färbung des Trainingssets.....	37
Abbildung 17. Immunpositivität des mit Anti-UBE2N gefärbten Trainingssets. ....	43
Abbildung 18. ROC-Kurve zwischen diploidem und aneuploidem KKR-Gewebe nach Färbung gegen UBE2N und Intensitätsbestimmung im Trainingskollektiv.....	44
Abbildung 19. Grenzwert zur Diskriminierung von diploiden und aneuploiden KKR anhand der UBE2N-Färbung des Trainingssets. ....	45
Abbildung 20. Dichotomisierte Scores von diploiden und aneuploiden KKR- Gewebe, sowie von Mukosa- und dem gesamten KKR-Gewebe des mit UBE2N gefärbten Trainingssets.....	46

Abbildung 21. Die UBE2N-Immunpositivität diploider KRK-Gewebe ist höher als die von aneuploiden KRK-Geweben.....	47
Abbildung 22. ROC-Kurve des Validierungskollektivs.....	49
Abbildung 23. Dichotomisierte Scores des Validierungssets von diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe sowie von Mukosa- und den gesamten KRK-Geweben. ....	50
Abbildung 24. Immunpositivität des mit Anti-SPTBN1 gefärbten Trainingskollektivs.....	52



## Tabellenverzeichnis

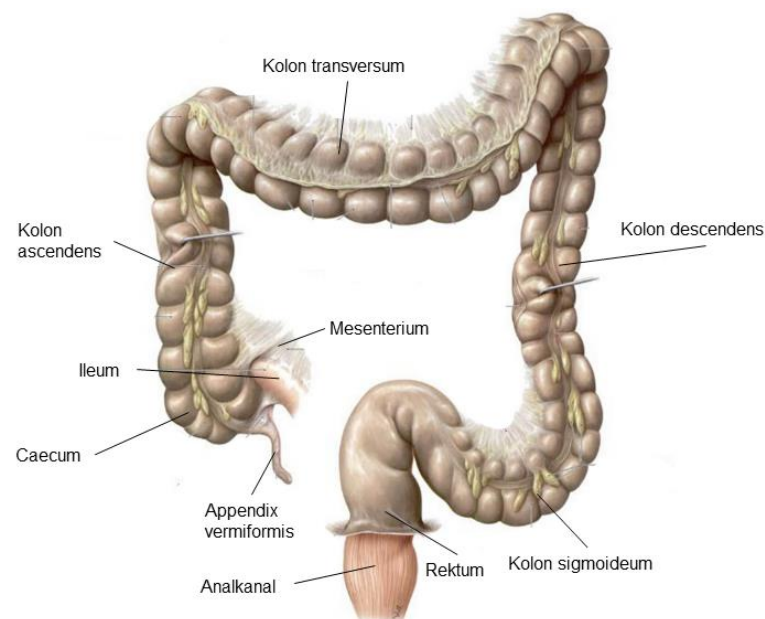
Tabelle 1. TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.....	9
Tabelle 2. UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.....	10
Tabelle 3. Biomarker für das KRK in klinischer Anwendung.).....	13
Tabelle 4. Auflistung verwendeter Chemikalien.....	16
Tabelle 5. Auflistung verwendeter Lösungen.....	17
Tabelle 6. Auflistung verwendete Kits .....	17
Tabelle 7. Auflistung verwendeter Antikörper.....	17
Tabelle 8. Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle 9. Auflistung verwendeter Geräte.....	18
Tabelle 10. Auflistung verwendeter Software.....	19
Tabelle 11. Übersicht der klinischen Daten im Trainingsset.....	20
Tabelle 12. Übersicht der klinischen Daten zu der im Validierungsset enthaltenen Gewebeproben.. .....	21
Tabelle 13. Untersuchte klinische Parameter und deren Dichotomisierung. ....	26
Tabelle 14. Scoringssystem zur Bewertung der Färbeintensität jeder Gewebeprobe. ....	32
Tabelle 15. Übersicht der ausgewerteten Gewebeproben sowie der prognostischen Untergruppen.. .....	38
Tabelle 16. Diskriminierende m/z-Werte zwischen Mukosa und KRK.....	39
Tabelle 17. Diskriminierende m/z-Werte zwischen diploiden und aneuploiden KRK. ....	40
Tabelle 18. Identifizierte Proteine, deren MALDI-IMS m/z-Werte im Gruppenvergleich der Ploidie unterschiedliche Signalintensitäten zeigten.....	42
Tabelle 19. Kreuztabelle zur Bewertung des Grenzwertes.....	45
Tabelle 20. Kreuztabelle zur Bewertung des Grenzwertes 0,1957 bei Färbung des Validierungssets von UBE2N.....	48
Tabelle 21. Kreuztabelle zur Bewertung des Grenzwertes 0,2066 bei Färbung des Validierungssets von UBE2N.....	49

Tabelle 22. Klinische Daten des Trainingssets.....	X
Tabelle 23. Klinische Daten des Validierungssets. ....	XI

# 1. Einleitung

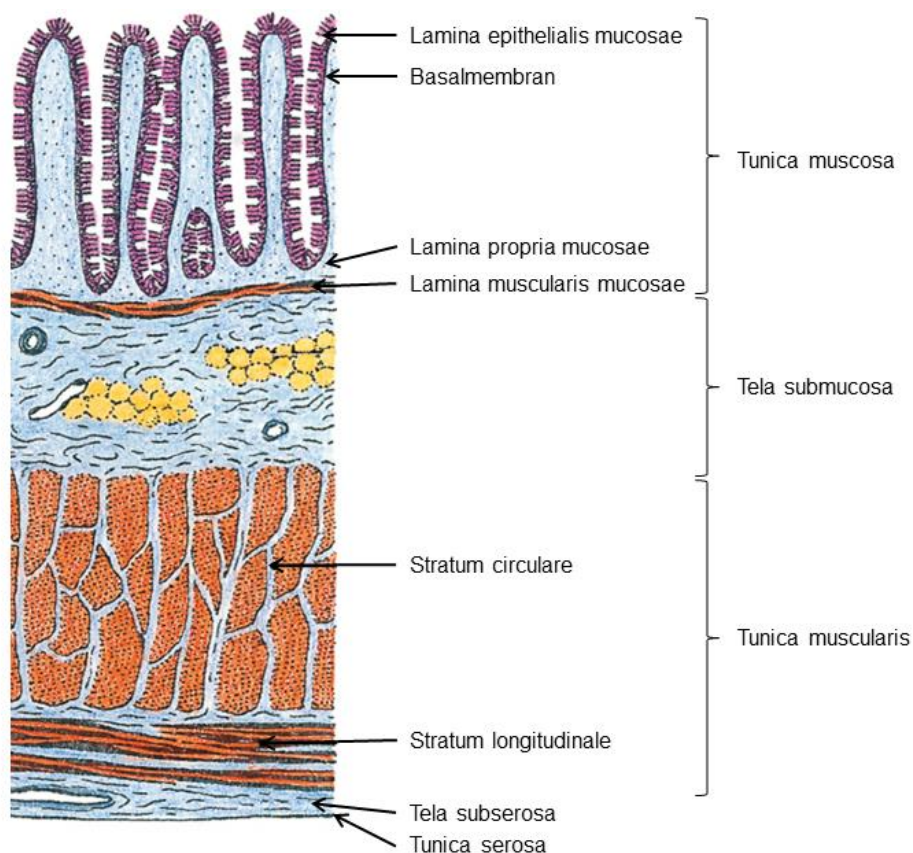
## 1.1. Anatomie des Kolons

Das Kolon ist ein Teil des menschlichen Verdauungstraktes, der mit der Mundhöhle (Cavum oris) beginnt und über den Rachen (Pharynx) sowie die Speiseröhre (Ösophagus) zunächst in den Magen (Gaster) führt. Dort wird die Nahrung mit Hilfe von Säure und Enzymen bereits teilweise aufgeschlüsselt und dann portioniert in den Darm (Intestinum) weitergeleitet, welcher aus Dünndarm (Intestinum tenue) und Dickdarm (Intestinum crassum) besteht. Im Dünndarm wird der saure Speisebrei, unter anderem durch das zusammen mit der Galle eingeleitete Pankreassekret, neutralisiert. Weiterhin wird ein großer Teil der im Speisebrei enthaltenen Nährstoffe und Ionen in die Darmschleimhaut aufgenommen. Der Dickdarm schließt sich an den Dünndarm an und besteht aus dem Blinddarm (Caecum) mit dem Wurmfortsatz (Appendix vermiformis), dem Grimmdarm (Kolon) und dem Mastdarm (Rektum) (Abbildung 1). Der Appendix vermiformis ist vor allem immunologisch relevant und führt mit zahlreichen Lymphfollikeln eine Art „Wächterfunktion“ am Übergang von Dünndarm zum Dickdarm aus (<https://www.amboss.com/de/library#xid=rK0f3S&anker=Z2fca41c82a5e0c7584e006cb695f9395> 2020; Schünke et al. 2012).



**Abbildung 1. Anatomie des Kolons.** Der Speisebrei gelangt durch die Bauhin'sche Klappe aus dem Ileum in das Caecum. Von dort wird er durch Kolon ascendens, Kolon transversum und Kolon descendens ins Kolon sigmoideum und schließlich in das Rektum befördert. Über den Analkanal verlässt er den Körper schließlich als Stuhl. Modifiziert nach (Schünke et al. 2012).

Histologisch betrachtet besteht das Kolon von extraluminal nach luminal aus den Gewebeschichten Tunica serosa, Tela subserosa, Tunica muscularis, Tela submucosa und Tunica mucosa. Die Tunica serosa entspricht dabei einem peritonealen Überzug und ist nur in den intraperitonealen Abschnitten vorhanden. Die darunter gelegene Tela subserosa ist eine fett- und bindegewebige Verschiebeschicht, die die Beweglichkeit des Darms ermöglicht. Die Tunica muscularis besteht aus zwei Muskelschichten, dem Stratum longitudinale und dem Stratum circulare, die zusammen die Peristaltik des Dickdarms zum Transport des Darminhaltes gewährleisten. Darüber liegt die Submukosa, die neben Fettgewebe vor allem Blutgefäße, Lymphgefäße und Nerven enthält. Zuletzt folgt die Tunica Mucosa (Mukosa), die aufgeteilt ist in Lamina muscularis mucosae, Lamina propria mucosae und Lamina epithelialis mucosae (Epithel). Das luminal gelegene, einschichtige, hochprismatische Epithel wird zur Lamina propria mucosae hin von der Basalmembran abgegrenzt und enthält neben den Epithelzellen auch Becherzellen, die Muzine sezernieren (Abbildung 2; Ulfig 2005; Schmidt et al. 2017).

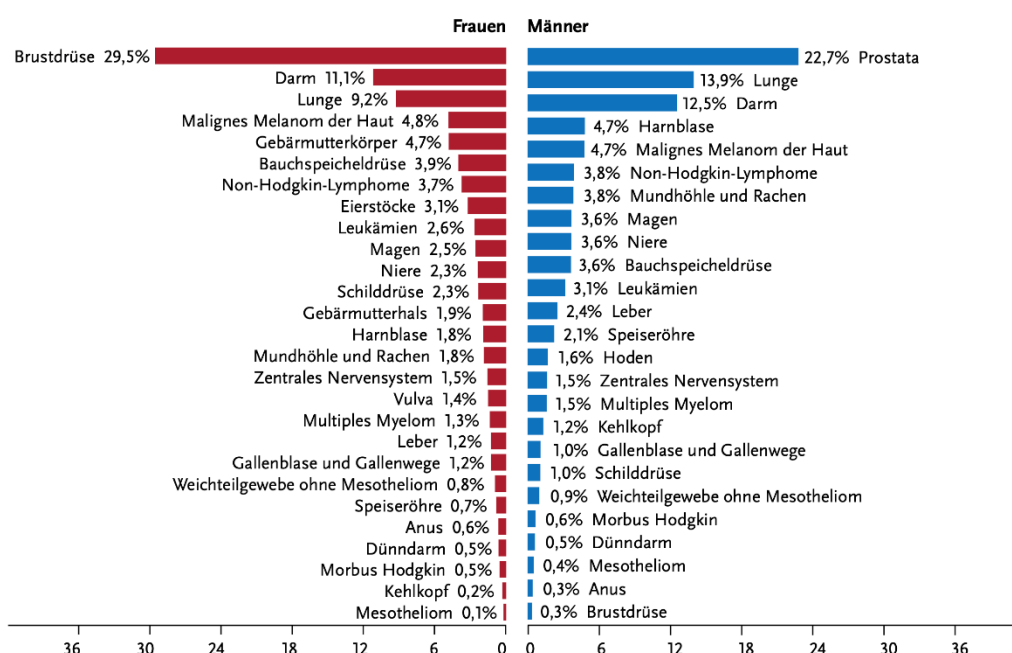


**Abbildung 2. Histologischer Aufbau des Kolons.** Die Lamina epithelialis mucosae ist luminal gelegen und hat als einzige direkten Kontakt mit dem Speisebrei. Nach extraluminal folgen die weiteren Schichten Lamina propria mucosae, Lamina muscularis mucosae, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tela subserosa. Die Tunica serosa grenzt das Kolon zur Bauchhöhle ab. Modifiziert nach Ulfig 2005.

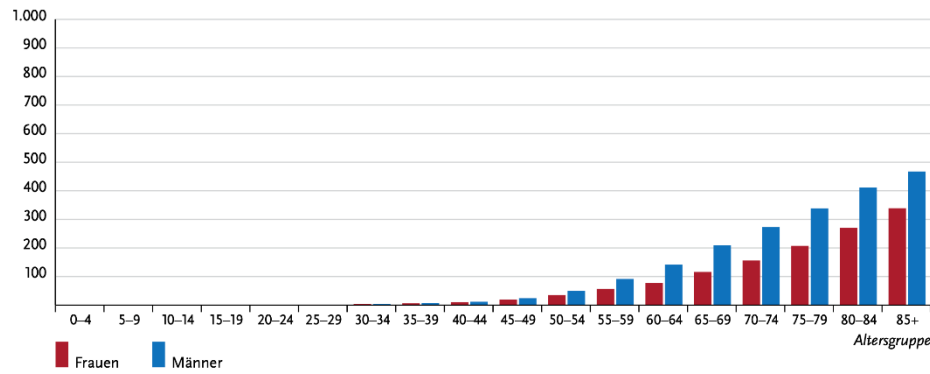
## 1.2. Das kolorektale Karzinom

### 1.2.1. Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist weltweit eines der häufigsten Malignome mit etwa 1,3 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr. Sowohl in Deutschland als auch global ist das KRK bei Männern das dritthäufigste Malignom nach dem Prostatakarzinom und dem Lungenkarzinom, bei Frauen das zweithäufigste nach dem Mammakarzinom (Abbildung 3, Torre et al. 2015; Ferlay et al. 2015). Laut Krebsreport des Robert Koch Instituts erkrankten weibliche Patienten mit durchschnittlich ca. 73 Jahre an einem KRK, männliche Patienten dagegen mit ca. 70 Jahren. Das KRK ist in Deutschland vor allem eine Erkrankung des älteren Menschen und aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung daher von hoher Relevanz (Abbildung 4). 2016 erkrankten in Deutschland 58.300 Patienten neu und etwa 25.000 verstarben am KRK. Patienten mit kolorektalem Tumor haben in Deutschland eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 63% (ZfKD und GEKID 2019).



**Abbildung 3. Häufigste Tumoren.** Auf der linken Seite sind in blau die Anteile der Tumoren bei Männern dargestellt, bei Frauen auf der rechten Seite in rot. Darmkrebs ist bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste Lokalisation. Bei Männern ist Darmkrebs nach Prostata- und Lungenkarzinom die dritthäufigste Lokalisation. Darmkrebs ist damit nach Lungenkrebs geschlechterübergreifend die häufigste Tumorkategorie. Alle Angaben in %. Nicht aufgeführt ist nicht-melanotischer Hautkrebs. Modifiziert nach Krebs in Deutschland für 2015/2016 und Krebs – Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2019 (ZfKD und GEKID 2019).



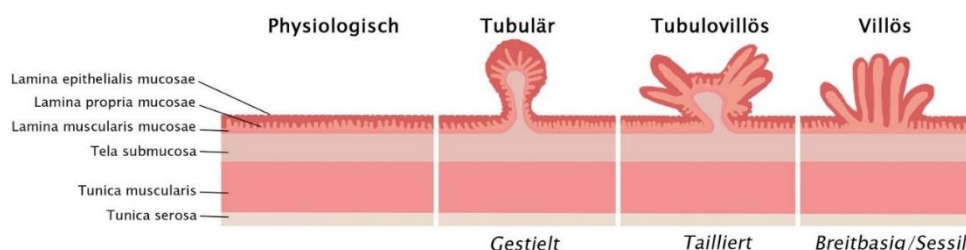
**Abbildung 4. Erkrankungsrate nach Altersgruppen und Geschlecht für das KKK.** Die Erkrankungsrate ist in Erkrankungen pro 100.000 Einwohner angegeben und bei Männern in blau, bei Frauen in rot dargestellt. Die mit dem Alter steigende Erkrankungsrate zeigt, dass das KKK eine Erkrankung ist, die vor allem ältere Menschen trifft. Abbildung modifiziert nach ZfKD und GEKID 2019.

### 1.2.2. Entstehung kolorektaler Karzinome

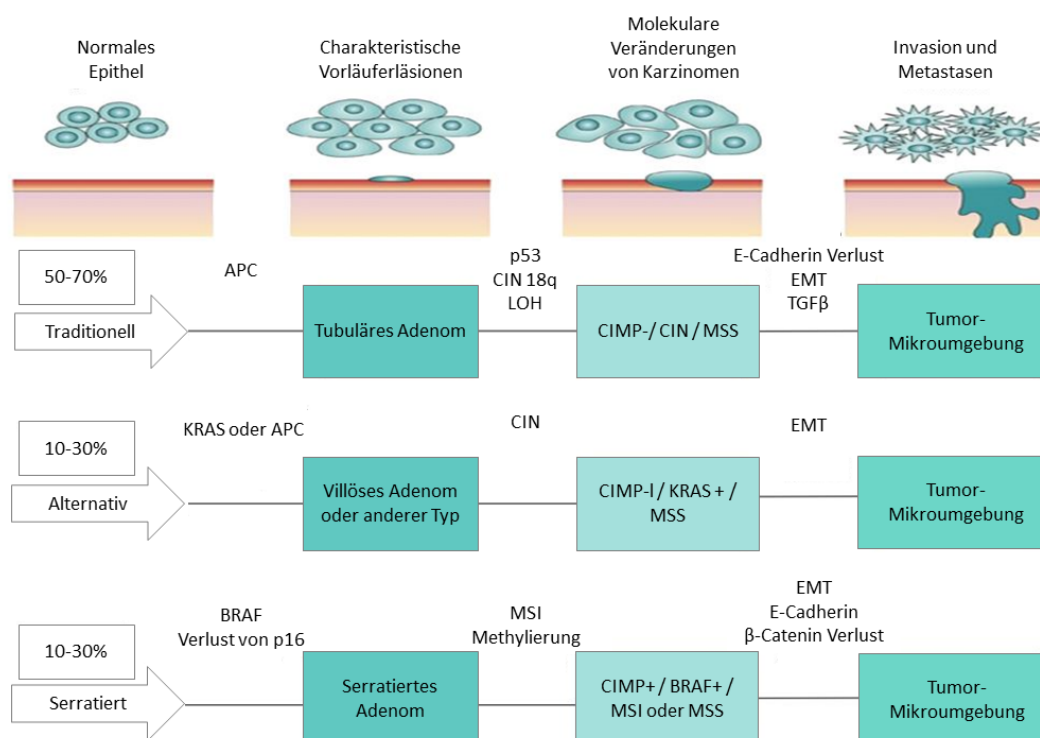
Tumoren wie das kolorektale Karzinom entstehen aus zuvor gesunden Kolonschleimhautzellen, die durch molekulare Veränderungen maligne entarten. Mutationen und epigenetische Ereignisse an zwei Arten von Genen sind für die Entartung einer Zelle und schließlich die Karzinomentstehung von besonderer Bedeutung: Tumorsuppressorgene und Protoonkogene.

Bei Tumorsuppressorgenen handelt es sich um Gene, die für Proteine kodieren, welche den Zellzyklus kontrollieren und bei Schäden entweder die Zellteilung verhindern, die Schäden reparieren oder die Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Ein Funktionsverlust dieser Gene kann zu einer erhöhten Zellteilungsgeschwindigkeit und Unterdrückung der Apoptose führen, was einen Wachstumsvorteil für die entartete Zelle bedeutet (Böcker et al. 2012b). Zu den typischen Vertretern von Tumorsuppressorgenen gehören z.B. *p53* und *Breast Cancer 1/2, early onset (BRCA1/2)* (Riede und Werner 2017b). Protoonkogene hingegen kodieren für Proteine, die Zellen dazu befähigen, sich schneller zu teilen bzw. sich besser ausbreiten und verteilen zu können. Dazu gehören vor allem Gene, die den Zellzyklus kontrollieren, die Zellen an ihrem Standort halten oder die für Wachstumsfaktoren kodieren. Durch eine Mutation kann die Funktion des Protoonkogens so verändert werden, dass es konsekutiv aktiviert ist und damit zu einem Onkogen wird. Zu den Protoonkogenen gehört unter anderem Rat sarcoma (Ras) (Riede und Werner 2017b). Generell kann ein Funktionsverlust von Genen durch unterschiedliche Formen von Mutationen wie z.B. Deletionen, Insertionen, Punktmutationen und Frameshiftmutationen, entstehen (Heinrich et al. 2014).

KRK entstehen aus den Epithelzellen oder Becherzellen der Lamina epithelialis mucosae des Kolons oder Rektums. Dabei entwickelt sich meist zunächst eine maligne Vorstufe, die als Adenom (tubulär, tubulovillös, villös), sessiles serratiertes Adenom oder traditionelles serratiertes Adenom eingeteilt werden kann (Abbildung 5). Hieraus entstehen KRKs auf unterschiedlichen Karzinogenesewegen, die eng mit chromosomaler Instabilität (CIN) und Mikrosatelliteninstabilität (MSI) assoziiert sind. Einschließlich der Cytosin-phosphatidyl-Guanin(CpG)-Insel-Methylierung (CIMP) werden insgesamt drei Hauptsignalwege beschrieben, deren Bestandteile in einem Tumor nebeneinander existieren können (Abbildung 6; Tannapfel et al. 2010; Nazemalhosseini Mojarad et al. 2013).



**Abbildung 5. Histologische Einteilung von Kolonadenomen.** Tubuläre Adenome (60-65%) sind deutlich häufiger als tubulovillöse (20-25%) oder villöse (5-10%) Adenome. Das Entartungsrisiko ist gegenläufig, villöse Adenome entarten deutlich häufiger (ca. 50%) als tubulovillöse (ca. 10%) oder tubuläre (ca. 4%) Adenome (<https://amboss.miamed.de/library#xid=qK0ChS&term=Verdauung>).



**Abbildung 6. Entstehungswege eines kolorektalen Karzinoms.** In der Karzinogenese des KRKs werden vor allem drei Wege unterschieden, denen unterschiedliche Vorläuferläsionen voraus gehen. Der traditionelle

Karzinogeneseweg wurde bereits 1990 von Fearon und Vogelstein beschrieben. Der alternative und der serratierte Weg wurden 1990 und 2007 postuliert (Jass, 2007; Longacre & Fenoglio-Preiser, 1990). In der Abbildung sind beispielhaft häufige Veränderungen aufgeführt. APC: adenomatous polyposis coli, CIN: chromosomale Instabilität, LOH: Loss of heterozygosity (Verlust der Heterozygotität), CIMP: CpG-island-Methylierung, MSS: Mikrosatellitenstabil, EMT: Epitheliale-Mesenchymale Transition, TGF $\beta$ : transforming growth factor-beta, KRAS: Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog, CIMP-I: CIMP-low, BRAF: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog, MSI: Mikrosatelliteninstabil. Modifiziert nach (Pancione et al. 2012).

### 1.2.2.1. Chromosomale Instabilität

Chromosomale Instabilität (CIN) als ein Teil der Karzinogenese führt zu einer, im Vergleich zu gesunden Zellen, veränderten Anzahl an Chromosomen und Chromosomenteilen (Aneuploidie). Diese Veränderungen treten bei ca. 60% aller KRK schon in sehr frühen Stadien auf (Pino und Chung 2010). Chromosomal instabile Tumoren werden hierbei in hochgradig chromosomal instabile (CIN-high) und geringgradig instabile Tumoren unterschieden (CIN-low) (Watanabe et al. 2012). Klinisch ist die genomische Instabilität mit einer schlechten Prognose assoziiert: Je nach Stadium ergibt sich für Patienten mit diploiden KRK gegenüber denen mit aneuploiden KRK ein Vorteil im 5-Jahresüberleben von bis zu 15,7% (Sinicrope et al. 2006; Araujo et al. 2007). Für die Auswahl der Therapie von KRK ist der Ploidiestatus bisher nicht relevant (<https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html> 2019).

Auf molekularer Ebene kommt es durch Mutationen oder Fehlverteilung in gesunden kolorektalen Epithelzellen zu einem Verlust oder Zugewinn an Genen, wodurch sich die Anzahl der Chromosomen verändert (Aneuploidie). So entsteht aus einer gesunden kolorektalen Epithelzelle zunächst eine adenomatöse Zwischenstufe, die sich wiederum zu einem Adenokarzinom weiterentwickeln kann (sog. Adenom-Karzinom-Sequenz) (Fearon und Vogelstein 1990; Riede und Werner 2017a).

Im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz tritt je nach Phänotyp beispielsweise ein Funktionsverlust des *adenomatous polyposis coli* (APC)-Gens auf (Abbildung 6), wodurch  $\beta$ -Catenin in der Zelle akkumuliert und dort in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor die Zellproliferation aktiviert (Alberts et al. 2017). Die Mutation des APC-Gens kommt auch hereditär als Keimbahnmutation vor und verursacht die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP). Träger dieser Mutation entwickeln schon ab dem 10. Lebensjahr hunderte adenomatöse Polypen und haben im Laufe ihres Lebens ein Risiko von nahezu 100%, ein KRK zu entwickeln. Außerdem ist das Risiko für die Entstehung weiterer Tumore, die



bevorzugt im übrigen Verdauungstrakt, der Schilddrüse und im Bindegewebe auftreten, deutlich erhöht (Böcker et al. 2012a).

Ein weiteres häufig bei CIN-Tumoren mutiertes Protoonkogen ist *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS)*, welches über rat fibrosarcoma (RAF), Mitogen activated protein kinase (MAPK) und extracellular signal-regulated kinase (ERK) im Zellkern zu Änderungen der Proteinaktivität und Genexpression führt. Mutiertes *KRAS* benötigt keine Stimulation und ist konsekutiv aktiv, sodass die Zelle permanent zur Proliferation angeregt ist (Alberts et al. 2017).

#### 1.2.2.2. Mikrosatelliteninstabilität

Die Karzinogenese durch Mikrosatelliteninstabilität (MSI) betrifft 15-20% der gesamten KRK, wobei 3% der gesamten KRK hereditär mikrosatelliteninstabil und 12-17% sporadisch mikrosatelliteninstabil auftreten (Ward et al. 2001; Umar 2004).

Mikrosatelliten sind zwei bis sechs Basen lange DNA-Sequenzen, die sich in nicht-kodierenden DNA-Sequenzen wiederholen. Allen mikrosatelliteninstabilen KRK ist gemeinsam, dass innerhalb des DNA-mismatch-repair (MMR)-Systems Mutationen vorhanden sind, die dessen Funktion beeinträchtigen. In Tumoren mit defektem DNA-MMR System können natürlicherweise vorkommende Fehlpaarungen von Basen bei der Replikation der Zelle nicht korrigiert werden. Es kommt zu Punkt- und Frameshiftmutationen, sodass sich auch die Mikrosatelliten verändern, was namensgebend für diese Gruppe an KRK ist und detektiert werden kann (Wagner und Müller 2010a; Riede und Werner 2017a).

In sporadischen MSI KRK treten bis zu 75% der MMR-System-Defekte kombiniert mit CIMP auf (Samowitz et al. 2005; Nagasaka et al. 2008). Besonders häufig finden sich bei diesen MSI KRK Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen *human MutL homolog 1 (hMLH1)*, *pMS1 homolog 2(PMS2)* und *p16* (Boland und Goel 2010; Pancione et al. 2012). Sporadische MSI-KRK sind meist diploid, treten häufiger im rechtsseitigen als linksseitigen Kolon auf, und haben eine bessere Prognose als KRK mit intaktem MMR-System (Schlegel et al. 1995; Bocker et al. 1996). Sie werden im Kolon stadienabhängig bei kurativer Intention häufiger rein operativ therapiert, ohne adjuvante Chemotherapie. Palliativpatienten mit MSI-h KRK profitieren unter Umständen von einer Immunchemotherapie (<https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/021-007OL.html>).

Die Entstehung eines MMR-Defekts kann außerdem hereditär, durch Mutation oder durch CIMP (vgl. 1.2.2.3.) verursacht sein. Hereditäre MSI KRK werden als Lynch-Syndrom oder hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom (HNPCC) bezeichnet und weisen zumeist einen Defekt im *hMLH1* und/oder im *human MutS protein homolog 2 (hMSH2)* Gen auf (Dietmaier et al. 1997).

### 1.2.2.3. CpG-Insel-Methylierung

Zu den beiden beschriebenen Karzinogenesewegen kommt das spezielle Methylierungsmuster der CpG-Inseln in jedem KRK. CpG-Inseln sind Regionen im Genom, in denen das Dinukleotid Cytosin Guanin (CG) sehr häufig vorkommt (Wagener und Müller 2010b). Durch die Methylierung von Cytosin wird das Ablesen der DNA in diesem Bereich verhindert. Die Methylierungen sind gewebespezifisch und werden u.a. vererbt oder entstehen im Rahmen der Zellalterung. Dabei können auch fehlerhafte Methylierungen entstehen, die bevorzugt in Bereichen der Promotorregionen der DNA-mismatch-repair-Gene auftreten. Durch die Methylierung im Bereich der Promotoren können diese nicht mehr abgelesen werden, so dass den Zellen die mismatch-repair-Enzyme zur Korrektur fehlgepaarter Basen fehlen. Außerdem können Mutationen akkumulieren, wodurch auch Tumorsuppressorgene und Protoonkogene inaktiviert bzw. aktiviert werden (Böcker et al. 2012b). So wurden für CIMP assoziierte KRK Mutationen in den Onkogenen *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF)* und *KRAS* nachgewiesen (Samowitz et al. 2005; Bagci et al. 2016). BRAF kann von KRAS verstärkt aktiviert werden, sodass die RAF-MAPK-ERK-Kaskade aktiviert wird, womit sich die Proliferation, Zelldifferenzierung und Zellmotilität erhöht (Morkel et al. 2015). Die dauerhafte Aktivierung dieses Signalwegs generiert ein hohes kanzerogenes Potential.

Die Definitionen von CIMP bei Tumoren sind sehr heterogen. Es gibt weder einheitliche Grenzen zwischen einem hohen Anteil an CpG-Insel Methylierung (CIMP-h) noch solche für einen geringen Anteil methylierter CpG-Inseln (CIMP-l). Eine Aussage zu Häufigkeit sowie Prognosevor- oder nachteilen dieser Patienten wird hierdurch erschwert (Toyota et al. 1999; Jia et al. 2016a). Bei größeren Studien konnten jedoch weder eindeutige Prognosevorteile noch -nachteile nachgewiesen werden (Jia et al. 2016b).

### 1.2.3. Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Die Klassifikation kolorektaler Karzinome erfolgt in TNM-Stadien (sog. Staging). Für diese Einteilung wird berücksichtigt, wie weit sich das Karzinom lokal ausgebreitet hat (T-Stadium) und ob Lymphknotenmetastasen (N-Stadium) oder Fernmetastasen (M-Stadium) vorhanden sind (Tabelle 1).

Auf Basis der TNM-Klassifikation wird die Stadieneinteilung nach der Union International contre le Cancer (UICC) vorgenommen, die schließlich als Grundlage für Therapieplanung und Prognose dient (Tabelle 2, vgl. 1.2.4.).

**Tabelle 1. TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.** Klassifikation kolorektaler Karzinome nach deren lokaler Ausbreitung (T-Stadium), Befall benachbarter Lymphknoten (N-Stadium) und Fernmetastasierung (M-Stadium). Zur Bestimmung des N-Stadiums müssen mindestens 12 regionale Lymphknoten entnommen und untersucht worden sein. Modifiziert nach TNM-Stadien der Union International contre le Cancer (UICC).

Stadium	Tumorausbreitung
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Subserosa oder nicht-peritoneal überzogenes perikolisches Gewebe oder perirektales Gewebe
T4a	Perforation des viszerale Peritoneums
T4b	Infiltration angrenzender Organe
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satelliten im umliegenden Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2a	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in > 7 regionären Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastasen beschränkt auf 1 Organ
M1b	Metastasen in mehr als 1 Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum mit oder ohne Metastasen in einem anderen Organ

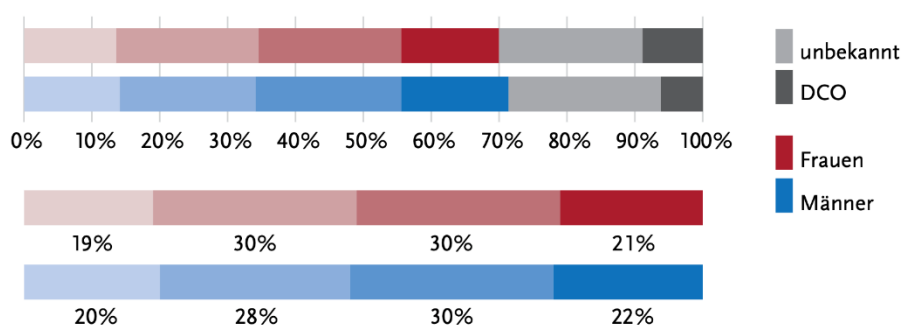
**Tabelle 2. UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms.** Die T-, N- und M-Stadien werden mit Hilfe der TNM-Klassifikation bestimmt und determinieren die Einteilung in die UICC-Stadien, welche als Basis für die Therapieauswahl dienen. UICC: Union International contre le Cancer. Modifiziert nach Barnes et al. 2016.

UICC 2017	T	N	M	Relatives 5-Jahres-Überleben
Stadium 0	Tis	N0	M0	>90%
Stadium I	T1/T2	N0	M0	>90%
Stadium II	T3/T4	N0	M0	>85%
Stadium IIA	T3	N0	M0	
Stadium IIB	T4a	N0	M0	
Stadium IIC	T4b	N0	M0	
Stadium III	jedes T	N1/N2	M0	>85%
Stadium IIIA	T1/T2	N1	M0	
	T1	N2a	M0	
Stadium IIIB	T3/T4	N1	M0	
	T2/T3	N2a	M0	>70%
	T1/T2	N2b	M0	
Stadium IIIC	T4	N2a	M0	>50%
	T3/T4a	N2b	M0	
	T4b	N1/N2	M0	
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	>10%
Stadium IVA	jedes T	jedes N	M1a	
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1b	

#### 1.2.4. Diagnostik, Therapie und Prognose des kolorektalen Karzinoms

Kolorektale Karzinome werden in Deutschland in der Regel entweder aufgrund der verursachten Symptomatik, wie Veränderungen des Stuhlgangs, Leistungsabfall und Gewichtsverlust, oder durch Früherkennungs- bzw. Screeningmaßnahmen entdeckt. Da die Symptomatik häufig erst spät auftritt und zudem vorwiegend unspezifisch ist, fällt dem Screening eine wichtige Rolle zu. Zu den am häufigsten durchgeführten Screeningmaßnahmen bei Personen ab 50 Jahren und Risikogruppen zählen der Stuhltest auf okkultes Blut und die Koloskopie (Herold 2018; <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html> 2019). Die Durchführung einer Koloskopie ist der Goldstandard unter den Screeningverfahren beim KRK, da hier, neben der hohen Spezifität und Sensitivität, im gleichen Untersuchungsgang eventuell vorhandene Polypen entnommen werden können (Siegel et al. 2017). Durch die Entnahme dieser KRK-Vorstufen kann deren Entartung und somit die Entstehung eines KRK verhindert werden. Jedoch bietet auch die Koloskopie keine absolute Sicherheit, da Herde übersehen werden können oder neue im Intervall bis zur nächsten Untersuchung auftreten können (S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“). Außerdem besteht neben dem Restrisiko von Blutungen oder

Darmperforationen bei Probenentnahme das allgemeine Narkoserisiko und die Nebenwirkungen der Vorbereitung auf die Koloskopie. Aufgrund der unspezifischen Symptomatik und der mäßigen Resonanz der Vorsorgekoloskopie in der Bevölkerung, werden KRK häufig erst in späten Stadien (UICC Stadium III und IV) entdeckt (Altenhofen 2016; Herold 2018). Daraus ergeben sich eingeschränkte Therapiemöglichkeiten und eine schlechtere Prognose als bei Detektion in frühen Stadien (Abbildung 7; Deliu et al. 2014; ZfKD und GEKID 2019).



**Abbildung 7. Häufigkeit der Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms bei Erstdiagnose in Deutschland 2015-2016.** Die oberen beiden Balken entsprechen allen dokumentierten Fällen kolorektaler Karzinome. DCO steht hierbei für death certificate only (nur auf dem Todesschein), entspricht also den Patienten, die mit einem nicht diagnostizierten KRK gestorben sind. Die unteren beiden Balken stellen nur die zu Lebzeiten diagnostizierten KRK dar. I, II, III und IV entsprechen den Stadien der UICC-Klassifikation. Insgesamt wird ein Großteil der KRK in späten (III und IV) Stadien detektiert. Abbildung modifiziert nach ZfKD und GEKID 2019.

Bei einem dringenden Verdacht auf ein KRK werden zunächst weiterführende Untersuchungen durchgeführt, um den Tumor nach TNM klassifizieren zu können. Das hiervon abhängige weitere Vorgehen wird mit allen beteiligten Fachdisziplinen diskutiert, wobei Parameter wie Operabilität des Tumors, OP-Fähigkeit und der Patientenwunsch speziell berücksichtigt werden. Ein kurativer Therapieansatz beinhaltet immer die vollständige Resektion des Tumors, sowie der abführenden Lymphwege und kann mit neoadjuvanter (Chemotherapie vor einer Operation) oder adjuvanter Chemotherapie (Chemotherapie nach einer Operation) kombiniert werden. Ist eine Tumorsektion nicht möglich, besteht eine palliative Situation, in der eine alleinige Chemotherapie verabreicht werden kann. Als Chemotherapeutika werden beim KRK vorwiegend 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, Capecitabin und Irinotecan verwendet. In der palliativen Therapie können darüber hinaus Antikörper gegen vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal

growth factor receptor (EGFR) u.a. eingesetzt werden (Herold 2018). Bei einem Rektumkarzinom wird auch eine strahlentherapeutische Behandlung in Betracht gezogen (<https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html> 2019).

### 1.3.Biomarker

Als Biomarker werden DNA, RNA und Proteine bezeichnet, die objektiv messbar sind und als Indikator eines normalen biologischen Prozesses, eines pathogenen Vorgangs oder einer pharmakologischen Antwort auf eine therapeutische Intervention dienen (Biomarkers Definitions Working Group. 2001; Strimbu und Tavel 2010). Biomarker erlauben daher eine sachliche Aussage über normale oder pathologische Prozesse, sowie über das Ansprechen auf eine Therapie.

Biomarker werden bevorzugt im Blut oder in entnommenem (Gewebe-)Material bestimmt. Insgesamt sollten Biomarker leicht und präzise bestimmbar sein, und gleichzeitig eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen (Strimbu und Tavel 2010).

Die Bestimmung von Biomarkern bei Patienten mit Verdacht auf ein KRK oder diagnostiziertem KRK wird in Deutschland ebenso wie dessen Therapie an der Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) ausgerichtet (Tabelle 3; <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html> 2019).

Bei den aktuell verwendeten Biomarkern aus dem Gewebe wird vor allem die Genomebene betrachtet. Unklar ist bei diesen Genen jedoch, ob ihre Veränderungen den gesamten Tumor betreffen, da bei Biopsien nur ein Bruchteil des Tumors oder der Metastase abgebildet wird. Dies kann die Therapieauswahl fehlleiten, da bisher ein Marker für diese Inhomogenität innerhalb des Tumors, die sog. Tumorerheterogenität, fehlt (Wu et al. 2010). Weiter ist es nicht erwartbar, dass Mutationen im Genom sich auf Proteomebene und den eigentlichen Therapietargets widerspiegeln. In diesem Zusammenhang sind sensitive Verfahren zur orts aufgelösten Gewebeanalyse von Proteinen von zunehmender Bedeutung.

**Tabelle 3. Biomarker für das KRK in klinischer Anwendung.** Aufgeführt sind alle Biomarker, deren Bestimmung unter den in der zweiten Spalte aufgeführten Bedingungen in der aktuellen Leitlinie (2019) der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AMWF) empfohlen wird. KRK: Kolorektales Karzinom; CEA: Karzinoembryonales Antigen; RAS: Rat sarcoma; BRAF: v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B; 5-FU: Fluorouracil; Her2-neu: human epidermal growth factor receptor 2-neu (Chen et al. 2005; Domingo et al. 2005; Levy et al. 2008; Tran et al. 2011; Diaz et al. 2012; Misale et al. 2012; Douillard et al. 2013; Liu et al. 2014; Bokemeyer et al. 2015; Meulendijks et al. 2015; Sartore-Bianchi et al. 2016; Le et al. 2017).

<b>Biomarker</b>	<b>Zeitpunkt der Bestimmung</b>	<b>Material</b>	<b>Grund der Bestimmung</b>
CEA	Bei gesichertem KRK, gesicherten oder Verdacht auf Lebermetastasen, in der KRK-Nachsorge	Blut	Hinweis auf Rezidiv oder Metastasierung; Prognose vor Resektion hepatischer Metastasen
RAS-Gene	Bei metastasierten KRK oder palliativer Situation	Tumorgewebe, (zirkulierende Tumor-DNA)	Vermindertes Therapieansprechen von Panitumomab
BRAF-Gen	Bei metastasierten KRK oder palliativer Situation	Tumorgewebe	Prädiktor für schlechtes Überleben, Therapieintensivierung
Mikrosatellitenstatus (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2)	Bei palliativer Situation und Zweitlinientherapie	Tumorgewebe	Prädiktor für gutes Überleben
Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Aktivität	Bei palliativer Situation	Blut	Prädiktor für lebensgefährliche Neutropenie bei 5-FU-Therapie
Her2-neu	Bei palliativer Situation und Zweitlinientherapie	Tumorgewebe	Ggf. Therapie mit Pembrolizumab oder Trastuzumab + Lapatinib

### 1.3.1 Tumorheterogenität und bildgebende Proteinanalytik

Bei dem Begriff Tumorheterogenität wird in intertumorale Heterogenität und intratumorale Heterogenität unterschieden. Erstere bezeichnet, dass es zwischen den Tumoren unterschiedlicher Patienten trotz gleicher Lokalisation große Unterschiede geben kann. Intratumorale Heterogenität bedeutet, dass ein Tumor nicht aus einer homogenen Masse gleichen Gewebes besteht, sondern viele unterschiedliche Areale mit jeweils eigenen Veränderungen, sog. Subklonen, aufweist. Zusätzlich spielt dabei auch der Aspekt eine Bedeutung, dass zwischen Tumor und Stroma große Unterschiede in den jeweiligen Eigenschaften bestehen (Marusyk und Polyak 2010; Baldus und Röcken 2016).

Intratumorale Heterogenität ist umso größer, wenn chromosomale Instabilität vorliegt, da hierdurch die Entstehung vieler unterschiedlicher Subklone befördert wird (Bakhoum und Landau 2017). Diese sind histologisch meist nicht unterscheidbar (Wu et al. 2010). Im Rahmen der nationalen Dekade gegen Krebs wurde die Richtlinie zur Förderung von Verbundforschung zu Tumorerheterogenität, klonaler Tumor-Evolution und Therapieresistenz im November 2020 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung verabschiedet, was den Forschungsbedarf und die Bedeutung der Tumorerheterogenität verdeutlicht (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2020).

In den letzten Jahren hat die Bedeutung und Entwicklung von globalen Proteinexpressionsstudien (Proteomik) deutlich zugenommen. Im Gegensatz zu Genomanalysen ist es hier möglich, klinisch relevante Aussagen über den aktuellen Krankheitsstatus (Phänotyp) und über die Expression der therapeutischen Zielproteine zu treffen.

Ein Ansatz Proteinbiomarker unter Berücksichtigung der Tumorerheterogenität zu finden, ist die bildgebende Massenspektrometrie. Die bildgebende Massenspektrometrie verbindet antikörper-unabhängige, globale Proteinanalysen mit einer räumlichen Auflösung, wodurch u.a. die intratumorale Heterogenität abgebildet werden kann. Auch besteht die Möglichkeit nicht nur eine qualitative, sondern auch eine semi-quantitative Bewertung durchzuführen, um die Aussagekraft unterschiedlicher Proteinkonzentrationen innerhalb der untersuchten Gewebeareale zu erhöhen. Vor diesem Hintergrund hilft die bildgebende Massenspektrometrie in Korrelation mit der Histomorphologie, molekulare Zusammenhänge von Krankheiten und deren Behandlung besser zu verstehen.



## 1.4. Ziele der Arbeit

Kolorektale Karzinome unterscheiden sich auf molekularer Ebene mitunter sehr deutlich voneinander, haben verschiedene Prognosen und ein unterschiedliches Überleben. Ziel dieser Arbeit war es daher, Proteine mittels bildgebender Massenspektrometrie zu detektieren, die kolorektale Karzinome hinsichtlich ihrer prognostischen Parameter voneinander unterscheiden. Hierfür stand ein Tissue-Microarray (TMA) zur Verfügung, der aus repräsentativen Proben von Normalgewebe und KRK aufgebaut war. Ein weiterer Tissue-Microarray bildete ein Validierungsset. Die Expressionsunterschiede sollten nachfolgend immunhistochemisch validiert werden.

Zusammenfassend ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

- Lassen sich prognostische Subgruppen innerhalb eines Kollektivs mittels bildgebender Massenspektrometrie unterscheiden?
- Können massenspektrometrisch Peptide orts aufgelöst detektiert werden, anhand derer auf die Ausprägung von klinischen Parametern geschlossen werden kann?
- Lassen sich detektierte Peptide nachfolgend entsprechenden Proteinen zuordnen?
- Kann ein Proteinexpressionsunterschied zwischen klinischen Parametern in abhängigen und unabhängigen klinischen Kohorten mittels Immunhistochemie validiert werden?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

**Tabelle 4. Auflistung verwendeter Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	DAKO GmbH, Jena, Deutschland
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Acetonitril, 50 % (v/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumbicarbonat	Fluka Honeywell, Morris Plains, USA
Antibody Diluent	DAKO GmbH, Jena, Deutschland
Diaminobenzidin	DAKO GmbH, Jena, Deutschland
Ethanol (abs., vergällt)	Ethanol UKSH, Lübeck, Deutschland
Formaldehyd, 4,5 % (v/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumpyrosulfit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Methanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyrosulfit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natronlauge, 5 mol/L	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pararosanilin/Parafuchsin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Peptidkalibrierungsstandard MALDI-IMS	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Phosphate Buffered Saline	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Salzsäure, 1 M und 5 M	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trifluoressigsäure, 1 %ig (v/v)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Triton-X 100, 0,1 %ig (v/v)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Wasser, dest.	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol (abs.)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Zitronensäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 5. Auflistung verwendeter Lösungen

Lösung	Bestandteile und Verhältnis
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol Matrixlösung  Trypsinlösung  Xylol/Ethanol Zitronensäurepuffer, 10 mM, pH 6	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol, 1:9 7 g/L $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in Acetonitril mit Trifluoressigsäure, 1:1 100 mg/L Trypsin in Ammoniumbicarbonat mit Acetonitril-Lösung, 9:1 Xylol und Ethanol, 1:1 2 g/L Zitronensäure in destilliertem Wasser, pH eingestellt mit Natronlauge

Tabelle 6. Auflistung verwendete Kits

Kit	Hersteller
Schnellfärbekit Hämatoxylin & Eosin, Best.-Nr. 9194.1 Vectastain Elite ABC kit (universal) Best.-Nr. PK-6200	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Vector Laboratories, Burlingame, USA

Tabelle 7. Auflistung verwendeter Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-human SPTBN1 Antikörper, monoklonal, Hase, Best.-Nr. TA311076 Anti-human UBE2N Antikörper, monoklonal, Hase, Best.-Nr. #6999	OriGene Technologies, Rockville, USA  Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA

Tabelle 8. Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aktivkohle  Deckgläser 24 x 60 mm  Eindeckmedium Aquatex mounting agent Eindeckmedium Entellan Falcon Tube, 15 mL Filter 595 1/2, Durchmesser 240 mm	Werner Hassa GmbH, Lübeck, Deutschland Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich Whatman, GE healthcare, Buckinghamshire, Grossbritannien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Harz ReproSil-Pur C18-AQ, 3 $\mu$ M	Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen, Deutschland
Indium-Zinnoxid Objektträger	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Mikrosäulen, 100 $\mu$ m Durchmesser	Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland
Objektträger Superfrost® PLUS	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen (100-1000 $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L, 0,5-10 $\mu$ L)	SARSTEDT AG Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (500-2500 $\mu$ L)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Pierce C18 Tips	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
UPLC PST C18 nanoACQUITY column	Waters, Inc., Milford, USA

**Tabelle 9. Auflistung verwendeter Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Flachbettscanner ScanMaker 9800X2	Microtek, Hsinchu, China
Kühlschrank, 4 °C	Robert Bosch GmbH, Stuttgart, Deutschland
Magnetrührer IKA-COMBIMAG RCT	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Massenspektrometer Autoflex III	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Massenspektrometer Orbitrap XL	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Matrixdepositionsgerät ImagePrep	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikrowelle M8201-1	Miele & Cie. KG, Gütersloh, Deutschland
Nano Flüssigkeitschromatograph Dionex Ultimate 3000 nanoLC	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter Toledo 320	Mettler Toledo, Inc., Columbus, USA
Pipetten, Eppendorf Reference 0,1-10 $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L, 500-2500 $\mu$ L	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage Kern KB 1200-2	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Scanner Panoramic DESK	3D Hitech Kft., Budapest, Ungarn
Scanner ScanMaker 9800X2	Microtek, Hsinchu, Taiwan
Schüttler KS 250 basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland
Videokameraaufsatz	Sony Corporation, Tokio, Japan

**Tabelle 10. Auflistung verwendeter Software.**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
ACAS imaging system	Ahrens Cytometry Analysis System, Hamburg, Deutschland
flexAnalysis (v3.0)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
flexControl (v3.0)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
flexImaging (v3.0)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland
GIMP	Open source software
GraphPad Prism® (v5.0)	GraphPad software, Inc., LaJolla, USA
IBM SPSS 22	IBM Corporation, Armonk, USA
ImageScope (v12.1)	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
MaxQuant software Paket (v1.3.0.5)	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Pannoramic Scanner SP1 RTM	3D Histech Kft., Budapest, Ungarn
Pannoramic Viewer 1.15.4 RTM	3D Histech Kft., Budapest, Ungarn
SCiLS Lab 2015b	Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland

### **2.1.1. Patientengewebe**

Das verwendete Gewebe stammte ausschließlich von Patienten, die am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, operiert wurden. Das herangezogene Normalgewebe wurde im Rahmen der Tumoroperationen aus gesunden Kolonabschnitten entnommen. Die Verwendung des Gewebes (Tabelle 11 und Tabelle 12) erfolgte zu Forschungszwecken mit Einverständnis der Patienten und ist von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt worden (# 07-124).

Für die Analysen wurden Gewebeproben von Patienten in palliativer Situation sowie mit einem Überleben von weniger als 30 Tagen nach dem Eingriff zur Tumorentnahme ausgeschlossen. Außerdem wurden Gewebeproben von Patienten nicht einbezogen, die eine neoadjuvante Bestrahlung ihres Rektumkarzinoms erhalten haben oder die die Amsterdam II-Kriterien (siehe Anhang 8.1.) für das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC)-Syndrom erfüllten.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit zwei unabhängige Kohorten (Trainings- und Validierungsset) untersucht: Für die Proteinbestimmung mittels bildgebender

Massenspektrometrie und die erste immunhistologische Validierung wurde ein Gewebe-Mikroarray (TMA) mit 40 KRK und 20 normalen humanen kolorektalen Schleimhautproben zusammengestellt (Trainings-TMA, Tabelle 11), die insgesamt 20 Patienten repräsentierten. Eine zweite TMA bestehend aus 60 KRK und 30 normalen kolorektalen Mukosa-Proben wurde als unabhängiges Validierungsset verwendet (Validierungs-TMA, Tabelle 12). Alle Kollektive wurden unter Berücksichtigung der Kriterien Geschlecht, Alter, Ploidie, pN-Status, UICC-Status, Überlebensstatus und Überlebenszeit aufeinander abgestimmt und zusammengestellt. Die Parameter Grading, pT-Status und pM-Status wurden nicht gematcht erhoben.

**Tabelle 11. Übersicht der klinischen Daten im Trainingsset.** Die Patientendaten des Trainingssets sind nach klinischen Parametern aufgeschlüsselt dargestellt. Für jeden klinischen Parameter ist die Anzahl der enthaltenen Gewebeproben je Eigenschaft aufgeführt. Für Alter und Überleben ist die Standardabweichung angegeben. m: männlich; w: weiblich; d: diploid; a: aneuploid; pT: pathologisch gesichertes Tumorstadium in der TNM-Klassifikation; pN: pathologisch gesichertes Lymphknotenstadium in der TNM-Klassifikation; pM: pathologisch gesichertes Metastasenstadium in der TNM-Klassifikation; UICC: Stadium in der UICC-Klassifikation. \* nicht gematcht.

Klinische Parameter	Gesunde Kontrollen	KRK
Geschlecht [m/w]	14/6	20/20
Alter [Jahre]	64,5 ± 10,9	66,2 ± 9,2
Ploidie [d/a]		20/20
pT-Status* [1/2/3/4]		0/4/28/8
pN-Status [0/1/2]		20/10/10
pM-Status* [0/1]		36/4
Grading* [1/2/3]		0/28/12
UICC-Status [1/2/3/4]		20/0/16/4
Überlebensstatus [lebend/verstorben]		18/22
Überleben [Monate]		77,4 ± 48,4

**Tabelle 12. Übersicht der klinischen Daten zu der im Validierungsset enthaltenen Gewebeproben.** Es sind die klinischen Daten der im Validierungsset enthaltenen Gewebeproben aufgeführt. Die aufgeschlüsselten Parameter stehen in Spalte 1. In Spalte 2 und 3 steht die Anzahl der Gewebeproben mit der jeweiligen Eigenschaft. w: weiblich; d: diploid; a: aneuploid; pT: pathologisch gesichertes Tumorstadium in der TNM-Klassifikation; pN: pathologisch gesichertes Lymphknotenstadium in der TNM-Klassifikation; pM: pathologisch gesichertes Metastasenstadium in der TNM-Klassifikation; UICC: Stadium in der UICC-Klassifikation. \* nicht gematcht.

Klinische Parameter	Gesunde Kontrollen	KRK
Geschlecht [m/w]	16/14	30/30
Alter [Jahre]	56,7 ± 10,3	68,7 ± 9,7
Ploidie [d/a]		30/30
pT-Status* [1/2/3/4]		2/11/39/8
pN-Status [0/1/2]		30/23/7
pM-Status* [0/1]		60/0
Grading* [1/2/3]		3/41/16
UICC-Status [1/2/3/4]		7/23/30/0
Überlebensstatus [lebend/verstorben]		33/27
Überleben [Monate]		68,1 ± 49,2

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Herstellung der Tissue Microarrays

Die Patientengewebeproben wurden in zwei Tissue Microarrays (TMA) zusammengefasst. Ein TMA kann bis zu 1.000 Gewebeproben enthalten, wodurch die Vergleichbarkeit zwischen den enthaltenen Gewebeproben gegenüber Einzelfärbungen erhöht wird (Kononen et al. 1998; Fedor und De Marzo 2005).

Als Gewebe für den TMA kann sowohl frisch gefrorenes Gewebe als auch mit Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (FFPE-Gewebe) verwendet werden. Da Tumorgewebe von Patienten für pathologische Untersuchungen als FFPE-Gewebe aufbereitet wird und daher besser verfügbar ist als frisch gefrorenes Gewebe, wurde sich in dieser Arbeit auf eine Kohorte von FFPE-Geweben für die TMA-Probenauswahl beschränkt. Aus dem FFPE-Gewebe wurden ausgewählte, histologisch relevante Gewebebereiche gestanzt, zusammengestellt und in einen neuen Paraffin-Block eingebettet. Der so entstandene TMA-Gewebeblock wurde anschließend in 4µm dicken Schnitten auf Objektträger aufgebracht und getrocknet (Fedor und De Marzo 2005; Oberländer et al. 2014). Um eine elektrostatische Aufladung im Rahmen der bildgebenden matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (Matrix Assisted Laser

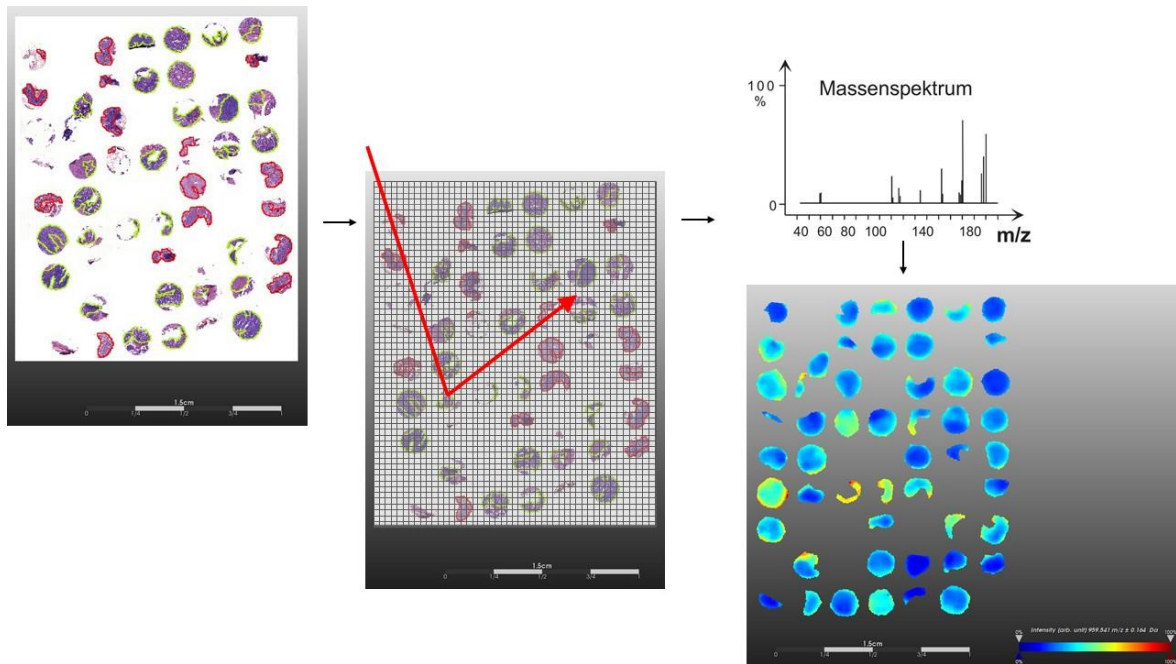
Desorption/Ionization-Imaging Mass Spectrometry, MALDI-IMS) zu vermeiden, wurden für die dafür vorgesehenen Schnitte Indium Tin Oxide (ITO, Indium-Zinnoxid) beschichtete Objektträger verwendet. Für die immunhistologischen Untersuchungen (IHC) des Trainings- und Validierungssets wurde Gewebe auf unbeschichteten Objektträgern analysiert. Alle Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

### **2.2.2. Matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisation-bildgebende Massenspektrometrie**

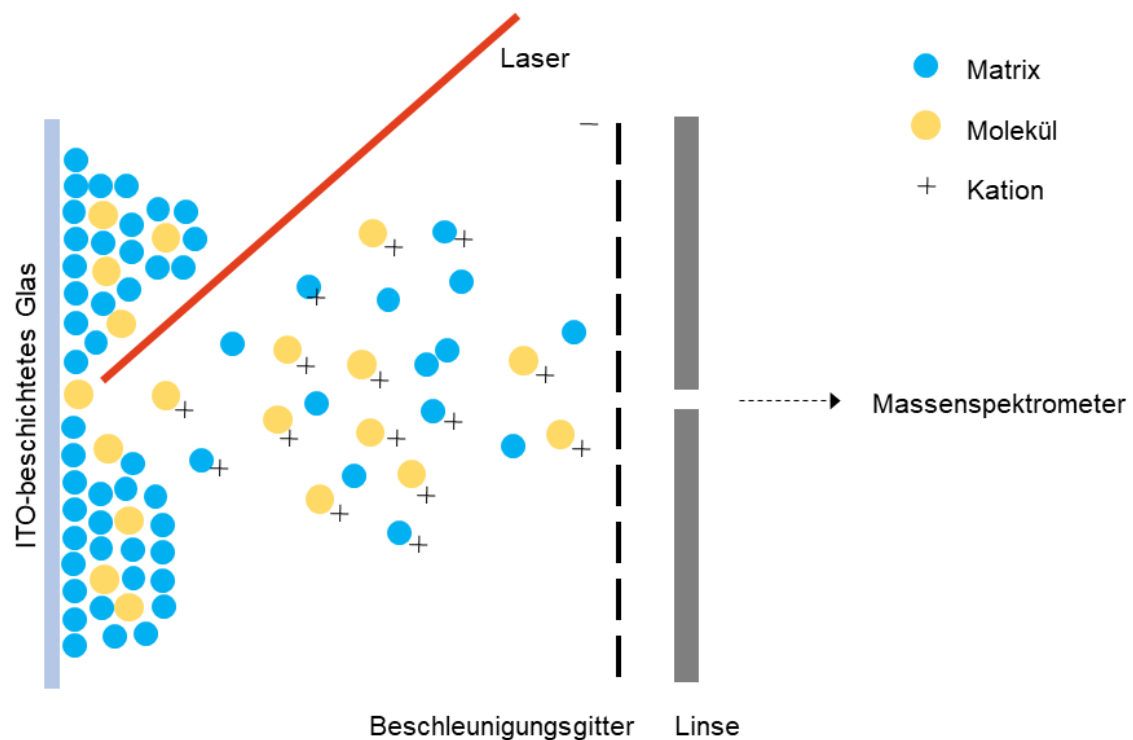
Die MALDI-IMS erlaubt das gleichzeitige Erfassen qualitativer und quantitativer Daten zu Analyten wie Peptiden, Proteinen, Medikamenten und Fetten eines Gewebeschnittes (Caprioli et al. 1997; Quanico et al. 2017b). Es handelt sich um eine Form der Analyse, bei der ungezielt („untargeted“) alle detektierbaren Analyte einer Probe mit Korrelation zur Gewebehistologie evaluiert werden können (Kriegsmann et al. 2013; Quanico et al. 2017b). Hervorzuheben ist hierbei vor allem die Verknüpfung von massenspektrometrischen Daten mit der Morphologie des Gewebes, um u.a. Tumorzellrepräsentativitäten und tumorale Heterogenitäten zu betrachten. MALDI-IMS erlaubt es weiter Peptide und Proteine direkt zu identifizieren, sodass auch keine spezifischen Antikörper für einen Proteinnachweis nötig sind. Darüber hinaus können mehrere Analyten gleichzeitig untersucht werden. Für die Suche nach Biomarkern ist in diesem Zusammenhang besonders die Detektion bisher für die Fragestellung unbekannter Proteine wichtig, da so neue Expressionsunterschiede zwischen analysierten Gruppen entdeckt werden können (Gemoll et al. 2011; Gessel et al. 2014; Aichler und Walch 2015).

In der bildgebenden Massenspektrometrie werden Moleküle der zu analysierenden Probe zunächst ionisiert. Die entstandenen Ionen werden anschließend beschleunigt, mit Hilfe eines Massenanalysators nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis getrennt und schließlich im Detektor detektiert (Abbildung 8). Um Kollisionen der Ionen zu vermeiden, wird im Massenspektrometer ein Vakuum erzeugt. Durch das Vakuum wird zudem verhindert, dass Sauerstoff- und Stickstoffionen die Signale der Probe überlagern oder Streueffekte hervorrufen.





**Abbildung 8. Ablauf der Massenspektrometrie.** Auf die Probe wird die Matrix aufgetragen. Durch gepulstes Laserlicht dampft sie ab und wird ionisiert. Im Massenspektrometer werden die Ionen analysiert und als Massenspektrum dargestellt. Anschließend kann die Intensität von Spektren im Gewebe grafisch dargestellt werden.



**Abbildung 9. Matrix-Ionisation.** Bei der Matrixionisation kristallisieren die zu analysierenden Moleküle in der Matrix. Durch die Applikation des Lasers werden die Moleküle herausgelöst und positiv geladen. Angezogen vom negativ geladenen Beschleunigungsgitter gelangen sie zum Massenspektrometer.

Bei der MALDI-IMS wird die Matrix-unterstützte Ionisation verwendet. In der aufgetragenen Matrix kristallisieren die Peptide und Proteine und können anschließend durch gepulstes Laserlicht gleichzeitig abgedampft und ionisiert werden (Abbildung 9).

Für die Massentrennung wird anschließend häufig die Auftrennung nach Flugzeit (time-of-flight, TOF) genutzt, bei der leichte Teilchen schneller als schwere fliegen und so den Detektor früher erreichen. Als Ergebnis der Messung erhält man schließlich ein Massenspektrum, in dem die relative Intensität der gemessenen Ionen gegen das Massen-Ladungsverhältnis aufgetragen ist. Um eine räumliche Auflösung zu erhalten, wird bei der MALDI-IMS das Gewebe rasterförmig abgetastet und analysiert (Gey 2016; Rehm und Letzel 2016). Jeder analysierte Gewebeabschnitt inkl. der detektierten Massenspektren wird anschließend mit der Gewebehistologie koregistriert.

Die bildgebende Massenspektrometrie wurde in Kooperation mit Dr. Oliver Klein vom Berlin Brandenburger Zentrum für Regenerative Therapien (BCRT) durchgeführt.

Um die bildgebende Massenspektrometrie durchzuführen, wurde der Schnitt des TMA1 mit Orientierungsmarkern eingescannt (ScanMaker 9800X2, Microtek), wodurch die Messareale definiert und die histologischen Informationen für die räumliche Auflösung mit den massenspektrometrischen Daten korreliert werden konnten.

Zum Proteinverdau wurde zunächst mit dem Matrixdepositionsgerät 200 µL Trypsin-Lösung mit den Einstellungen 39 % Leistung  $\pm$  0 % Modulation auf den Schnitt aufgetragen und bei 37 °C in einer Feuchtkammer für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurde im Sprühautomaten die Matrix-Lösung unter Verwendung der Einstellungen 15% Leistung  $\pm$  40% Modulation aufgebracht.

Die Analyse des TMA-Schnittes wurde mit dem Autoflex III Massenspektrometer (MALDI-TOF/TOF) im positiven Ionen-Reflektions-Modus durchgeführt. Dafür wurde die flexControl 3.0 und flexImaging 3.0 Software verwendet. Folgende Einstellungen für den Massenbereich wurden dabei gewählt: m/z-Werte von 800-3500; 200 Laserapplikationen pro Pixel; Abtastrate: 0,5 GS/s; Rasterweite von 80 µm. Die externe Kalibrierung wurde mit einem Peptid-Kalibrierungsstandard durchgeführt, der neben den Gewebeproben aufgebracht wurde. Bei den entstandenen Spektren wurde mittels flexAnalysis 3.0 software eine Glättung und eine rechnerische Entfernung des Hintergrundrauschens durchgeführt.

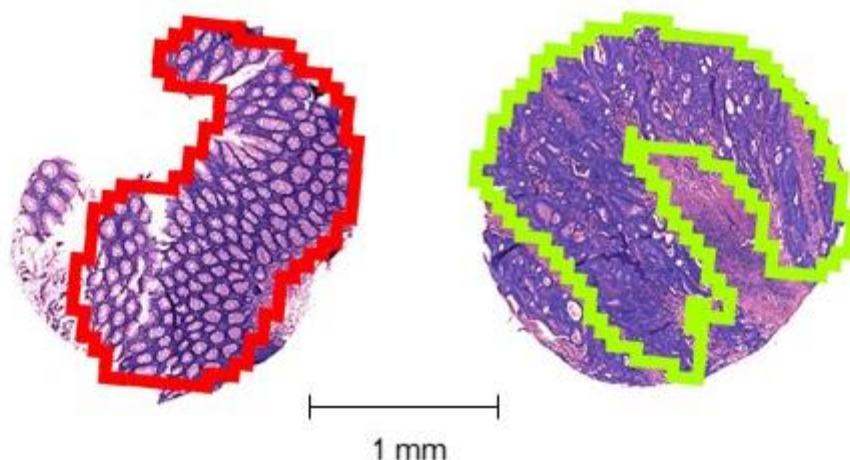
Nach den MALDI-IMS-Experimenten wurde die aufgetragene Matrix mit 70 %igem Ethanol entfernt und der Schnitt mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dafür wurde der Schnitt zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 70 %, Aqua dest.) hydriert und

anschließend für zwei Minuten in Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit destilliertem Wasser und eine Dehydrierung der Schnitte in der Alkoholreihe (70 %, 96 %). Die Färbung mit Eosin erfolgte für eine Minute bevor die Dehydratation mit 96 %igem und 100 %igem Ethanol für je 30 Sekunden fortgesetzt wurde. Abschließend wurde der Schnitt für ca. zweieinhalb Minuten in Xylol gestellt und eingedeckelt (Casadonte und Caprioli 2011). Der gefärbte Schnitt diente als histologisches Korrelat zu der massenspektrometrischen Analyse.

### 2.2.3. Statistische Auswertung der bildgebenden Massenspektrometrie

Zur Auswertung der MALDI-IMS-Daten wurde die Software SCiLS-Lab verwendet. Für den Import der massenspektrometrischen Daten in die Software wurden die Einstellungen „Entfernung Hintergrundrauschen“ und „gesamte Ionenzahl erhalten“ gewählt. Anschließend wurde die standardisierte Aufgliederung mit den Schritten „Detektion“ und „Harmonisierung“ der maximalen Peptidmassenintensitäten durchgeführt. Bei der Detektion wurden relevante Informationen innerhalb eines Spektrums herausgefiltert, bei der Harmonisierung wurde jedes Intensitätsmaximum bei der Generierung der  $m/z$ -Wert-Intervalle separat markiert.

Um das Tumorgewebe separat zum Milieu zu untersuchen, wurde beides anhand der Gewebemorphologie identifiziert und je Gewebeprobe als eigener Bereich (sog. Region) in der Software markiert. (Abbildung 10).



**Abbildung 10. Markierung der Histologie zweier Gewebepfeben des Trainingssets in SCiLS.** Abgebildet sind zwei beispielhafte Gewebepfeben des Trainingssets. Es wurden nur die Spektren der umrandeten Bereiche ausgewertet, wobei mit rot das Mukosagewebe und mit grün das KRK-Gewebe gekennzeichnet ist.

Um verschiedene KRK-Gewebe mit gleichen klinischen Parametern (z.B. diploide KRKs, Tabelle 13) vergleichen zu können, sind jedem einzelnen Bereich die Eigenschaften des Gewebes als Attribut (z.B. diploid, N0, UICC 1, ...) manuell zugewiesen worden. Anschließend wurden die Spektren der klinischen Parameter Dignität, Lymphknotenstatus, Ploidie, 5-Jahres-Überleben und UICC-Status mittels einer Grenzwertoptimierungsanalyse (ROC-Analyse) verglichen, um unterscheidende m/z-Werte zu detektieren. Mit einer ROC-Analyse ließ sich die Unterscheidungskraft von m/z-Werten und deren Intensität zwischen zwei Gruppen untersuchen. Sie basierte dabei auf der statistischen Sensitivität und Spezifität unter der Annahme des Diskriminierungsgebots, welches in diesem Fall die unterschiedlich hohe Intensität eines m/z-Werts war. Mit Hilfe der Analyse wurde eine sog. ROC-Kurve erstellt, die die Diskriminierungsqualität darstellte. Eine Fläche unter der Kurve (area under curve, AUC) nahe 1 oder nahe 0 bedeutete dabei eine gute Unterscheidung. Im Gegensatz dazu entsprach eine AUC von 0,5 einer zufälligen Unterscheidung (Florkowski 2008; Drobatz 2009). Um nachfolgend eine stringente Differenzierung aller detektierten m/z-Werte zu erreichen, wurden der Wilcoxon Rangsummentest mit einer ROC-Analyse kombiniert. Hierbei sollte gleichzeitig das Signifikanzniveau beim Wilcoxon Rangsummentest unter  $< 0,001$  liegen und eine AUC von  $< 0,385$  bzw.  $> 0,635$  detektiert werden.

**Tabelle 13. Untersuchte klinische Parameter und deren Dichotomisierung.** In Spalte 1 sind die klinischen Parameter aufgeführt, nach denen Gewebegruppen gebildet und später verglichen wurden. In Spalte 2 und 3 ist die Aufteilung der Gruppen aufgeführt. Es wurden jeweils alle KRK Gewebeproben nach jedem klinischen Parameter in Gruppen differenziert. Außerdem wurden die gesamten KRK-Gewebe mit Mukosagewebe verglichen.

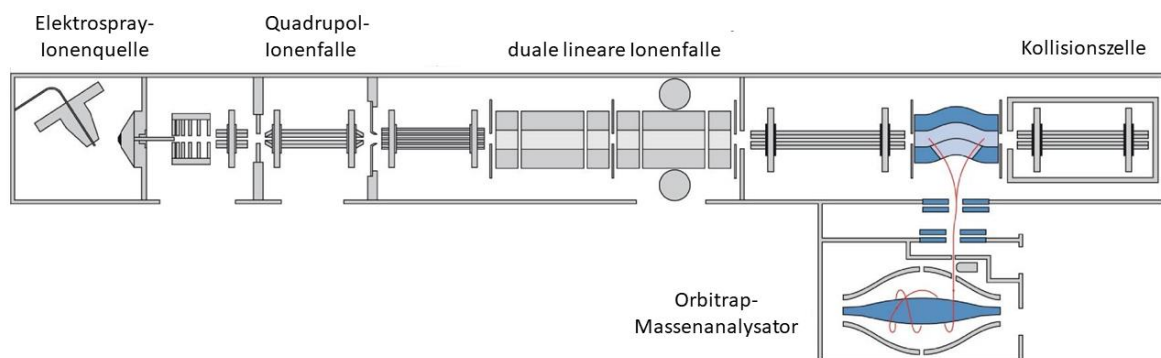
Klinische Parameter	Dichotomisierung	
Lymphknotenstatus Ploidie 5-Jahres-Überleben UICC-Status	negativ (N0) diploid positiv I und II	positiv (N1, N2) aneuploid negativ III und IV

#### 2.2.4. Proteinidentifikation

Um den signifikant unterschiedlichen m/z-Werten Proteinen zuordnen zu können, wurde eine nano-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (nLC-MS/MS) durchgeführt. Dies erfolgte in Kooperation mit Dr. Murat Eravci vom Institut für

Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin. Bei der nLC-MS/MS-Methode handelte es sich um die Kopplung einer nano-Flüssigchromatographie (nLC, Dionex Ultimate 3000 nanoLC) mit einem Massenspektrometer (LTQ Orbitrap XL). In der nLC können besonders kleine Probenvolumina mit einem niedrigen Fluss direkt aus einer Lösung analysiert werden. Dies verbesserte die Sensitivität und Spezifität der Identifikation durch das Massenspektrometer.

In dieser Arbeit wurde die Elektrospray-Ionisations (ESI) und eine Ionenfalle zur Ionenanreicherung (LTQ Orbitrap) verwendet, welche im positiven Modus betrieben wurde (Abbildung 11). In Kombination mit vorgeschalteten Quadrupolen zur ersten Trennung der Peptide/Proteine konnten so die vollen Spektren ( $m/z$  300- 1.700) bei einer Auflösung von 60.000 gemessen werden. Bei der Analysemethode wurden jeweils die 20 Ionen mit der höchsten Intensität für die anschließende Fragmentierung selektiert, bevor sie als Fragmentionen weiter betrachtet wurden.

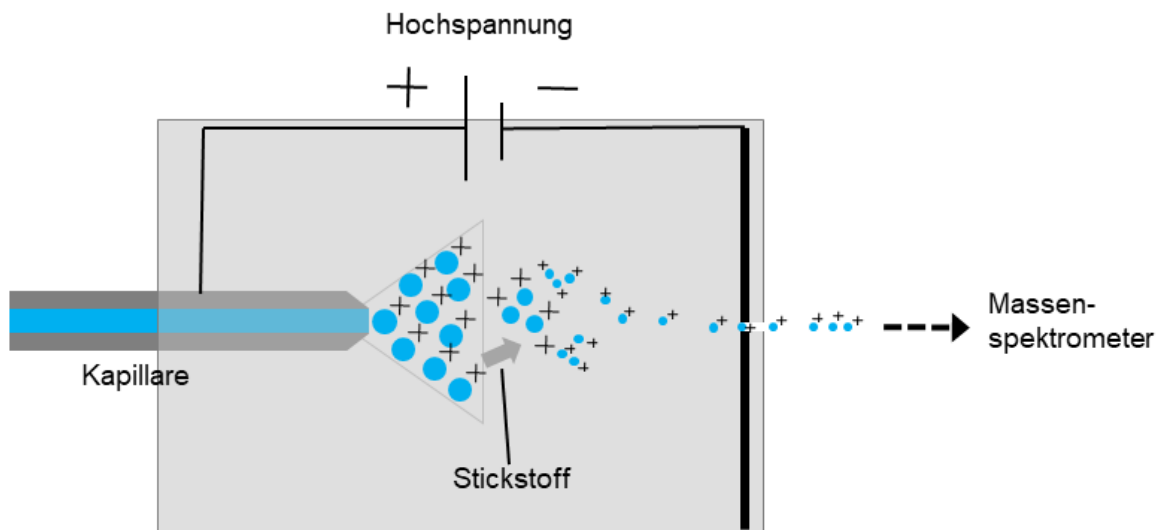


**Abbildung 11. Aufbau LTQ Orbitrap Massenspektrometer.** Die von einer Elektrosprayionenquelle gebildeten Ionen gelangen in einen Quadrupol. Dieser lässt die Ionen des gewünschten Mass/Ladungsverhältnisses weiter bis zur Orbitrap-Ionenfalle. Bestimmte Ionen können hieraus in die Kollisionszelle geleitet werden, um dort fragmentiert und erneut analysiert zu werden. (Abb nach Wolters et al. 2001; <https://www.brown.edu/research/facilities/proteomics/about/people>).

Für die nLC-MS/MS wurde zunächst ein Folgeschnitt des bereits mit MALDI-IMS analysierten Trainingssets geschnitten und in der Matrixlösung gelöst. Anschließend wurde Trypsin hinzugegeben, wonach die Peptidprobe mittels Festphasenextraktion (Solid phase extraction, SPE) und C18 stage tips entsalzt wurde (Rappsilber et al. 2003). Für die Umkehrphasenchromatographie wurden Silica-Mikrosäulen mit einem Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  und 25 cm Länge verwendet und mit ReproSil-Pur C18-AQ Harz von 3  $\mu\text{m}$  Körnung gefüllt. Zur Auftrennung wurde ein 90-Minuten Gradient über 5 %-60 %igem

Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure und einer Flussrate von 320 nL/min verwendet. Die so getrennten Peptide wurden anschließend zur Ionisierung in die Elektrospray-Einheit überführt.

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) zählt ebenfalls zu den weichen Ionisationsmethoden. Um Proteine und Peptide mittels dieser Methode zu analysieren, wurde die Lösung durch eine Kapillare geleitet, an deren Ende ein elektrisches Feld angelegt war. Die Lösung trat aus der Kapillare in einem Taylor-Kegel als Spray aus, wobei Ionen entstanden und durch eingeleiteten Stickstoff verdampften. War das Volumen der Tröpfchen genügend klein (Rayleigh-Limit), stießen sich diese gegenseitig ab und gelangten so über Gegenspannung in den Analysator des Massenspektrometers (Gey 2016).



**Abbildung 12. Elektrospray-Ionisation.** Die Lösung mit den zu analysierenden Molekülen wird durch eine Kapillare geleitet, an deren Ende eine Spannung anliegt. Dadurch tritt die Flüssigkeit in Form eines Taylor-Kegels als Spray aus. Die Tröpfchen verkleinern sich weiter, da der eingeleitete Stickstoff das Elutionsmittel verdampfen lässt. Schließlich zerfallen die Tropfen weiter durch die Abstoßung gleicher Ladung (Rayleigh-Limit). Die entstandenen „Quasimolekülonen“ werden von der negativen Ladung der Gegenelektrode angezogen und zum Massenspektrometer geleitet.

Die nLC-MS/MS-Daten wurden mit Hilfe der MaxQuant Software für die Peptid- und Proteinidentifizierung ausgewertet. Die Massenabweichung der Proteinfragmente wurde auf maximal 7 ppm bzw. 0,5 Da eingestellt. Die Methioninoxidierung bzw. Acetylierung der N-Termini der Peptide sowie Carbaminomethylierung entsprechender Cysteine wurden als variable bzw. feste Modifikation definiert. Die Falscherkennungsrate (FDR), basierend auf Ziel und fälschlich entdecktem Ziel, wurde für die Peptid- und Proteinidentifikation auf 1 %

festgelegt. Die minimale Peptidlänge betrug sieben Aminosäuren und es wurden maximal zwei für Trypsin unspezifische Spaltungen toleriert. Mit diesen Einstellungen wurde eine Proteindatenbank erstellt, die spezifisch für die Proteine des verwendeten TMA ist.

Im nächsten Schritt konnten die m/z-Werten der MALDI-IMS mit denen der nLC-MS/MS abgeglichen werden. Ziel dieser Analyse war, signifikante m/z-Werte der MALDI-IMS-Methode über die detektierten ESI-MS Peptide und Proteine zu identifizieren.

Um zufällige Übereinstimmungen und fehlerhafte Zuordnungen zwischen MALDI-IMS und ESI-MS/MS zu vermeiden, wurden verschiedene Vorkehrungen getroffen. Zum einen wurde für eine Proteinidentifikation eines m/z-Wertes in der MALDI-IMS eine Zuordnung durch zwei Peptide aus der ESI-MS/MS vorausgesetzt. Außerdem wurde die maximal tolerable Massendifferenz zwischen dem m/z-Wert der MALDI-IMS und dem zugeordneten m/z Wert der ESI-MS/MS-Datenbank auf 0,5 Da festgelegt.

Identifizierte Proteine, die in gleichen Gruppenvergleichen sowohl über- als auch unterexprimiert wurden, wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen. Ebenso wurden Werte, die in zwei Vergleichen enthalten waren, nicht verwendet.

### **2.2.5. Validierung durch immunhistochemische Färbung**

Ein Teilziel der Arbeit war es nachfolgend, die Ergebnisse der bildgebenden Massenspektrometrie immunhistochemisch zu validieren. Für die Immunhistochemie wurde die für MALDI-IMS verwendete Kohorte (TMA1) und eine weitere unabhängige Kohorte (TMA2) verwendet (vgl. 8.2. und 8.3.). Neben einer Bestätigung der bisherigen Ergebnisse, bietet eine erfolgreiche immunhistologische Validierung den Vorteil, die Detektion bestimmter Proteine in die aktuell dominanten klinisch-pathologischen Untersuchungsmethoden und Strukturen zu überführen.

Bei der immunhistochemischen Färbung werden ausgewählte Antigene mit Antikörpern markiert und diese gezielt angefärbt. Es handelt sich hierbei um eine sehr sensitive Methode, da durch die Amplifizierung im Rahmen der Färbung auch kleine Antigenmengen sichtbar werden. Außerdem kann die IHC Aufschluss über die Lokalisation der Antigenmengen bieten. In dieser Arbeit sollte die Antigenmenge mithilfe Software-gestützter Auswertung und eines Scoring-Systems quantifiziert werden.

Für die Immunhistochemische Färbung musste das Gewebe zunächst entparaffiniert werden. Hierzu wurde das FFPE-Gewebe mit Xylol und mit Xylol/Ethanol für jeweils drei Minuten gewaschen. Die anschließende Rehydrierung wurde mit einer absteigenden Alkoholreihe (96 % / 70 % / 50 % Ethanol) durchgeführt und die Alkoholreste mit destilliertem Wasser entfernt. Um die Antigene zu demaskieren, wurden alle Schnitte in Zitronensäurepuffer zunächst bei 900 W für fünf Minuten und anschließend bei 600 W für zweimal zehn Minuten in der Mikrowelle inkubiert. Gegebenenfalls verdunstete Flüssigkeit wurde mit destilliertem Wasser aufgefüllt, bevor die Proben mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlten (Shi et al. 1991).

Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen und anschließend zur Verbesserung der Zugänglichkeit intrazellulärer Proteine mit Triton X-100 in PBS (1:1000) für 10 Minuten inkubiert (<http://www.abcam.com/kits/permeabilization-for-ihc>).

Nach dem Waschen mit PBS wurde zur Hemmung endogener Peroxidasen Wasserstoffperoxid (1:9 in Methanol verdünnt) aufgetragen. Nach einer Inkubation von zehn Minuten wurde das restliche Peroxid mit PBS entfernt.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Erstantikörpers wurde für 30 Minuten mit Pferde-Serum (1:50 mit PBS verdünnt) inkubiert. Als Erstantikörper wurden sowohl Anti-human-Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (SPTBN1) (1:500) als auch Anti-human Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (UBE2N) (1:250) Antikörper genutzt. Zur Verdünnung wurde Antibody Diluent verwendet. Anschließend wurde der Erstantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Der Anteil an nicht gebundenen Erstantikörpern wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde das sogenannte AB-Reagenz, bestehend aus Reagenz A, Reagenz B und PBS (im Verhältnis 1:1:50) aus dem Vectastain Kit (Vector Laboratories) aufgetragen. Reagenz A ist Avidin DH, ein zur Minderung unspezifischer Bindungen modifiziertes Avidin mit vier Bindungsstellen für Biotin. Reagenz B enthält biotinylierte Meerrettichperoxidase H. Durch diese Komplexierung findet eine deutliche Amplifizierung der Enzymreaktion bezogen auf die ursprüngliche Menge an Antigen statt, um auch sehr kleine Mengen an Antigen detektieren zu können (Hsu et al. 1981).

Nach erneutem Waschen in PBS folgte die Zugabe des Substrates. Bei Nutzung des Erstantikörpers gegen SPTBN1 wurde DAB verwendet und 29 Sek. inkubiert, bevor die Färbereaktion mit Wasser gestoppt wurde. Bei Anti-UBE2N als Erstantikörper wurde AEC verwendet, für 310 Sek. inkubiert und die Färbereaktion ebenso mit Wasser gestoppt. Durch wiederholtes Spülen mit Wasser wurden übriggebliebene Färberückstände entfernt.



Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalun für drei Minuten, anschließend wurde der Objektträger unter fließendem Wasser gespült. Dieses veränderte den pH-Wert, stoppte die Färbung und ließ Hämalun ins Blaue umschlagen. Der Prozess war beendet, wenn sich kein Farbstoff mehr löste.

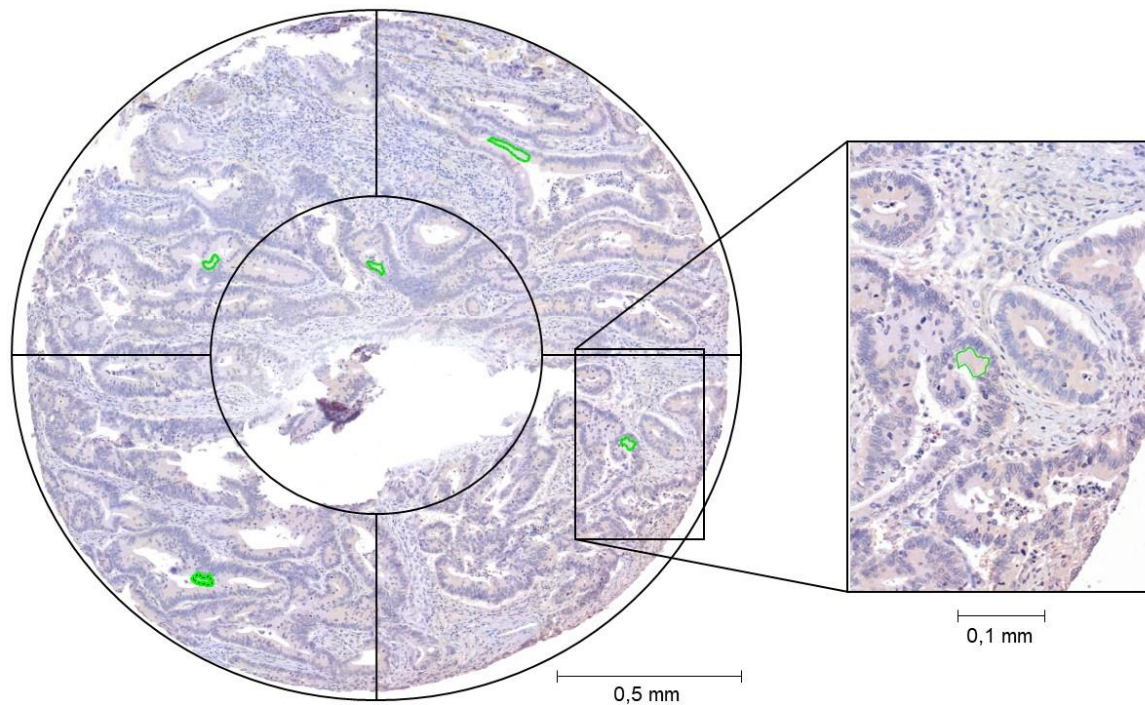
Alle Schnitte wurden mit Deckgläsern und Eindeckmedium eingedeckelt und bei Raumtemperatur lichtgeschützt mindestens eine Nacht bis zur weiteren Verwendung getrocknet.

### **2.2.6. Auswertung der immunhistochemischen Färbung**

Zur Auswertung der Intensität der Anfärbung des Gewebes wurden die Schnitte zunächst mit einem Scanner eingescannt, sodass sie anschließend mit einer maximalen Auflösung von 1:1000 betrachtet werden konnten.

#### **2.2.6.1. Software-gestützte Bestimmung der Immunpositivität**

Zuerst wurde anhand der Gegenfärbung mit HE beurteilt, ob genügend repräsentatives Gewebe von jedem Tumor- bzw. jedem Mukosagewebe vorhanden war. Anschließend wurde die Intensität der immunhistochemischen Färbung mit der Image Scope Software bestimmt. Mit Hilfe der Software kann die Intensität der Färbung als sog. Immunpositivität quantifiziert werden. Dazu wurden bei jeder Gewebeprobe jeweils fünf verschiedene Areale zur Auswertung ausgewählt. Die gemessenen Bereiche wurden so ausgewählt, dass möglichst viel Zytoplasma enthalten war, da die untersuchten Proteine vornehmlich in diesem Bereich beschrieben wurden (Abbildung 13). Es wurde die Immunpositivität in Prozent gemessen und anschließend der Mittelwert der Immunpositivität der fünf verschiedenen Sektoren gebildet.



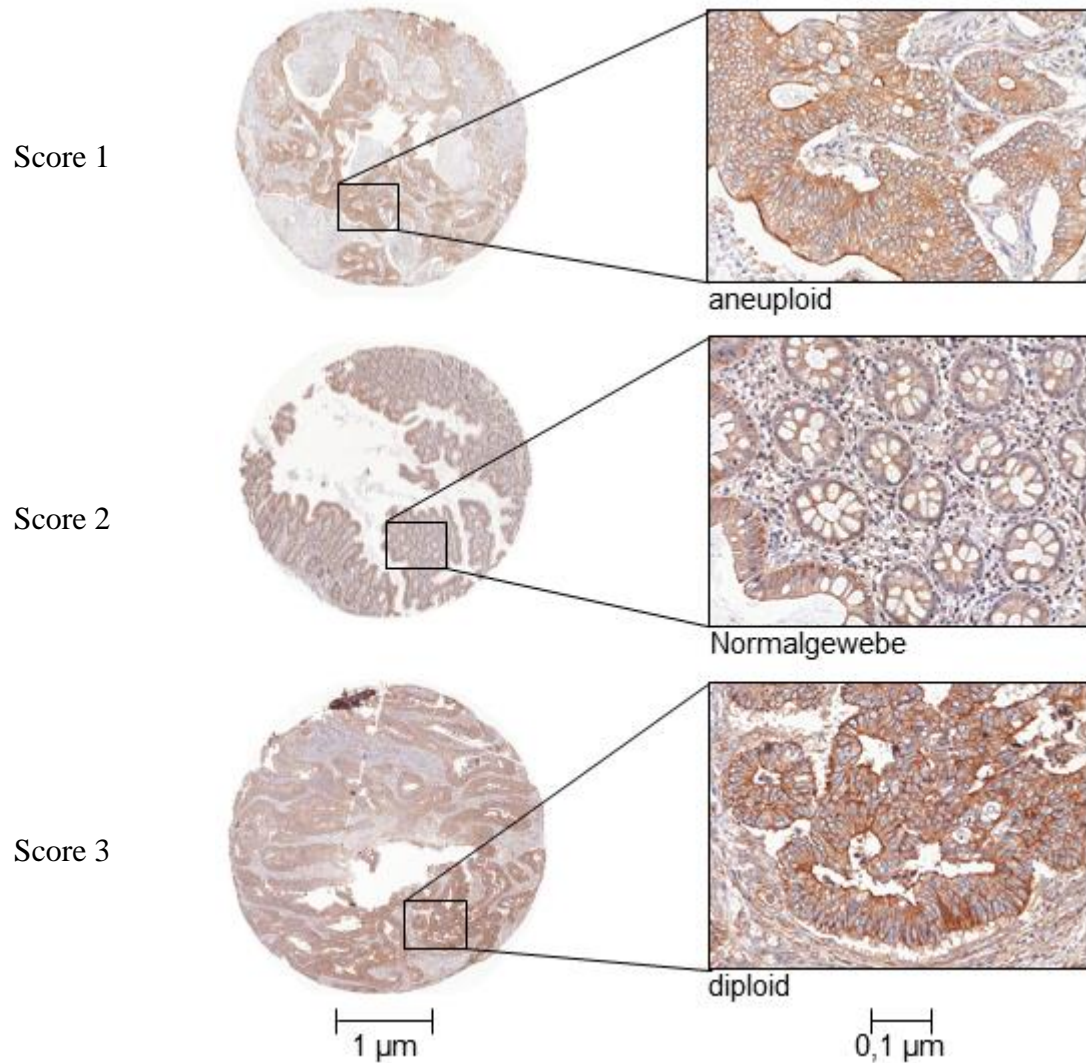
**Abbildung 13. Gemessene Gewebeausschnitte.** Beispielhaft ist die Färbung von UBE2N mit AEC dargestellt, wobei auf der linken Seite die Einteilung jeder Gewebeprobe in 5 Ausschnitte abgebildet ist. In jedem Ausschnitt findet sich eine (hier grün) markierte Stelle, deren Immunpositivität gemessen wurde. Auf der rechten Seite findet sich zu Veranschaulichung die vergrößerte Darstellung einer solchen Stelle. Bei geringeren Gewebemengen wurden fünf repräsentative Gewebestellen ausgewählt. Zur Auswertung wurde der Mittelwert aller fünf Ausschnitte verwendet.

#### 2.2.6.2. Manuelle Bewertung der Immunintensität

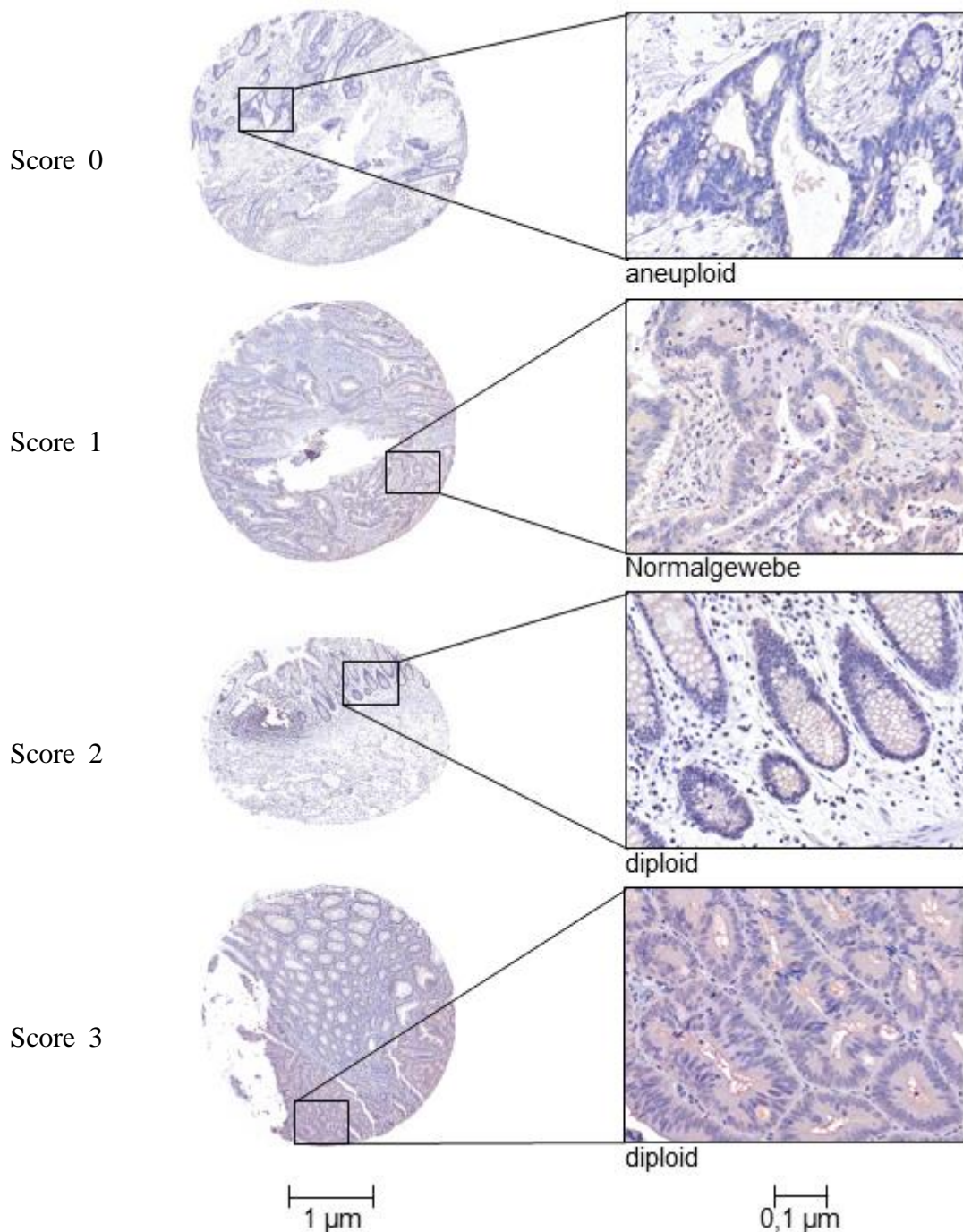
Die Färbeintensität jeder Probe wurde zusätzlich zur Software-basierten Auswertung manuell mit einem Scoringssystem bewertet (Tabelle 14, Abbildung 14 und Abbildung 15). Dabei wurde die minimale Immunintensität zwischen 0 und 100 % eingeteilt. Basierend darauf wurde die Intensität der Färbung skaliert und bewertet.

**Tabelle 14. Scoringssystem zur Bewertung der Färbeintensität jeder Gewebeprobe.** Jeder Gewebeprobe wurde entsprechend der Färbeintensität ihr Score zugeordnet.

Intensität der Färbung	Score	Bezeichnung
0	0	Keine
> 0 - 20 %	1	Schwach
> 20 - 50 %	2	Mittel
> 50 %	3	Stark



**Abbildung 14. Färbintensitäten der Färbung von SPTBN1.** Links sind im Trainingsset enthaltene Gewebeproben abgebildet, rechts ist ein Ausschnitt jeder Probe in Vergrößerung gezeigt. Die Proben wurden beispielhaft ausgewählt. Es wurde DAB als Chromogen verwendet. Oben: gemessene Färbintensität des Cytoplasmas von 59,1 % und manueller Score 1; Mitte: gemessene Färbintensität von 70,5 % und manueller Score 2; Unten: gemessene Färbintensität von 92,5 % und manueller Score 3. Der Score 0 wurde nicht vergeben.



**Abbildung 15. Färbintensitäten der Färbung mit UBE2N.** Die Gewebeproben aus dem Trainingsset wurden beispielhaft ausgewählt. Auf der linken Seite ist jeweils die komplette enthaltene Probe, auf der rechten Seite ein Ausschnitt abgebildet. Es wurde AEC als Chromogen verwendet. Oben: eine gemessene Färbintensität von 4,6 % und manueller Score 0; Mitte oben: eine gemessene Färbintensität von 16,9 % und manueller Score 1; Mitte unten: eine gemessene Färbintensität von 29,5 % und manueller Score 2; Unten: eine gemessene Färbintensität von 54,2 % und manueller Score 3.



### 2.2.6.3. Statistische Auswertung der Immunpositivität

Im Trainingsset waren von jedem Tumor zwei Gewebeproben vorhanden. Um alle Tumoren in gleichem Maße zu berücksichtigen, wurde der Mittelwert aus den Immunpositivitätswerten beider Proben gebildet. Mit den Werten aus dem Scoringssystem wurde ebenso verfahren, und der entstandene Score gerundet.

Zunächst wurde überprüft, ob sich die Immunpositivität zwischen Gruppen eines klinischen Parameters grundsätzlich unterscheidet. Die mit der ImageScope Software ermittelten Immunpositivitäten wurden dazu mit dem Mann-Whitney-U Test verglichen ( $\alpha = 0,05$ ). Außerdem wurden die Immunpositivitäten beider Gruppen mit einer ROC-Analyse verglichen.

Weiterhin sollte ein Grenzwert für die Immunpositivität bestimmt werden, mit dessen Hilfe die beiden Gruppen (z.B. Mukosa und KRK; diploid und aneuploid) möglichst genau differenziert werden können. Hierfür wurde die in der ROC-Kurve ablesbare Sensitivität und Spezifität verwendet. Die größte Summe aus Sensitivität und Spezifität definierte nachfolgend den besten Schwellenwert zur Auftrennung der untersuchten Gruppen.

Nach Bestimmung des Grenzwertes wurden die Immunpositivitäten der beiden Gruppen eines klinischen Parameters in einer Kreuztabelle eingetragen, mit deren Hilfe Sensitivität, Spezifität, positiv prädiktiver Wert und negativ prädiktiver Wert eines Tests bestimmt werden konnten. Darüber hinaus wurde mit Hilfe des exakten Fisher-Tests die Unabhängigkeit der durch den Grenzwert unterteilten Gruppen überprüft. Die Scores der manuellen Auswertung beider Gruppen wurden mit einem  $\chi^2$ -Test mit dem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  verglichen.

### 2.2.7. Korrelationsanalyse

Um eine mögliche Assoziation zwischen den klinischen Charakteristika der Gewebeproben und der Expression der getesteten Proteine festzustellen wurde ein Pearson-Korrelationstest mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  durchgeführt. Es wurden Geschlecht, Ploidiestatus, Alter, Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Metastasierung, Grading, UICC-Status und Überlebensstatus hinsichtlich ihrer Korrelation mit der computerbasiert ausgemessenen Immunpositivität der Färbung der getesteten Proteine überprüft.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bildgebende Massenspektrometrie zeigt Unterschiede im Proteom

Das Ziel der Arbeit war es, das Proteom von kolorektalen Karzinomen (KRK) auf Unterschiede zwischen den prognostisch-relevanten Gruppen Gewebeentität (Mukosa/KRK), Lymphknotenstatus (pN0/pN1, pN2), Ploidie (diploid/aneuploid), 5-Jahresüberleben (positiv/negativ) und UICC-Status (UICC 1+2/UICC 3+4) zu untersuchen. Zur Detektion von unterschiedlich exprimierten Proteinen zwischen diesen Gruppen wurde zunächst das Trainingsset mit bildgebender Massenspektrometrie untersucht und die Auswertung auf Tumorgewebe bzw. Mukosa begrenzt. Nach Einteilung der Gewebeproben in die entsprechenden Gruppen, wurden deren Spektren mittels einer ROC-Analyse verglichen, um differenzierende m/z-Werte zu detektieren. Anschließend wurde mittels LC-MS/MS eine individuelle Proteindatenbank für die Gewebeproben des Trainingssets generiert. Mit den hierin verzeichneten Proteinen und deren m/z-Werten wurden die Ergebnisse aus der bildgebenden Massenspektrometrie abgeglichen und zugeordnet. Eindeutig identifizierte Proteine wurden schließlich an zwei unterschiedlichen Kohorten immunhistochemisch validiert.

##### 3.1.1. Auswertbare Gewebeproben für das MALDI-IMS

Für die Auswertung sollten zunächst die Spektren des Tumor- bzw. Mukosagewebes ohne das Zellmilieu verwendet werden. Nach Auswahl entsprechender Regionen (Abbildung 16) war bei 45 der 60 Gewebeproben eine ausreichend repräsentative Menge Gewebe vorhanden. Insgesamt konnten so 17 Mukosa- und 28 KRK-Gewebeproben ausgewertet werden (Tabelle 15).



**Abbildung 16. Gewebezuzuordnung nach HE-Färbung des Trainingssets.** Auf Basis der HE-Färbung des Trainingssets wurden die für die bildgebende Massenspektrometrie verwendeten Gewebebereiche markiert. Sie sind mit farbiger Umrandung gekennzeichnet und enthalten ausschließlich Mukosa (rot umrandet) oder Karzinomgewebe ohne Milieu (grün umrandet). 15 Gewebeproben des Trainingssets (graue Kreise) konnten nicht mit ausgewertet werden, da keine repräsentative Gewebemenge vorlag.

**Tabelle 15. Übersicht der ausgewerteten Gewebeproben sowie der prognostischen Untergruppen.** Es sind alle ausgewerteten Gruppen aufgeführt. Das KRK-Gewebe wurde weiter nach den klinischen Parametern (Ploidie, Lymphknotenstatus, 5-Jahresüberleben und UICC-Status) und deren Ausprägung differenziert.

Klinischer Parameter	Gruppen	Anzahl der Gewebeproben
Dignität	Normalmukosa	17
	KRK	28
Ploidie	diploid	17
	aneuploid	11
Lymphknotenstatus	N0	14
	N1, N2	14
5-Jahres-Überleben	positiv	15
	negativ	13
UICC-Status	I+II	20
	III+IV	8

### 3.1.2. Intensitäten verschiedener m/z-Werte unterscheiden Ploidie und Gewebeart

Zunächst wurden die IMS-Spektren aller markierten Gewebebereiche erhoben, wobei insgesamt 14.191 m/z-Werte detektiert wurden. Um die IMS-Spektren der Gruppen vergleichen zu können, wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Hierbei wurden die m/z-Werte ermittelt, deren Intensität sich zwischen den zwei Gruppen eines klinischen Parameters am stärksten unterschied. Sie haben die höchste bzw. geringste AUC unter der Grenzwertoptimierungskurve. Die m/z-Werte mit der stärksten Diskriminierungskraft in der ROC-Analyse, wurden weiter überprüft und im nächsten Schritt Proteinen zugeordnet.

#### 3.1.2.1. Vergleich zwischen Mukosa- und KRK-Gewebe

Zunächst wurde Mukosa- mit KRK-Gewebe verglichen. Anhand des Wilcoxon-Rangsummentest ( $p < 0.001$ ) und einer ROC-Analysen ( $AUC < 0,385$  bzw.  $> 0,635$ ) wurden differentiell m/z-Werte ausgewählt. Es wurden insgesamt 30 m/z-Werte detektiert, die sich in der Intensität zwischen diesen beiden Gruppen unterschieden (Tabelle 16).



**Tabelle 16. Diskriminierende m/z-Werte zwischen Mukosa und KRK.** Aus dem Vergleich der massenspektrometrisch detektierten Spektren von Mukosa- und KRK-Gewebe wurden unterscheidende m/z-Werte ausgewählt (je die m/z-Werte mit der höchsten bzw. geringsten AUC, welche mindestens < 0,385 bzw. > 0,635 betrug). Die AUC der m/z-Werte wurde anhand der Grenzwertoptimierungskurven, der p-Wert mit dem Wilcoxon-Rangsummentest bestimmt. m/z-Wert: Massen-Ladungs-Verhältnis.

Intensität Mukosa > KRK			Intensität KRK > Mukosa		
m/z-Wert	ROC AUC	p-Wert	m/z-Wert	ROC AUC	p-Wert
850,4	0,797	< 0,001	1628,7	0,338	< 0,001
851,4	0,802	< 0,001	1629,6	0,348	< 0,001
990,5	0,773	< 0,001	1630,6	0,354	< 0,001
1127,5	0,908	< 0,001	2561,1	0,343	< 0,001
1128,5	0,830	< 0,001	2586,1	0,339	< 0,001
1213,7	0,766	< 0,001	2587,1	0,337	< 0,001
1292,6	0,793	< 0,001	2737,2	0,350	< 0,001
1303,6	0,789	< 0,001	2738,1	0,354	< 0,001
1304,7	0,782	< 0,001	2887,7	0,310	< 0,001
1318,7	0,788	< 0,001	2890,8	0,358	< 0,001
1319,7	0,791	< 0,001	2905,3	0,355	< 0,001
1320,7	0,799	< 0,001	3059,1	0,357	< 0,001
1494,8	0,764	< 0,001	3070,8	0,321	< 0,001
1554,8	0,798	< 0,001	3085,4	0,355	< 0,001
1555,8	0,862	< 0,001	3086,4	0,351	< 0,001

### 3.1.2.2. Vergleich der Ploidie in kolorektalen Karzinomen

Der Vergleich der Spektren von diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe zeigte eine signifikante Unterscheidung und entsprechende AUC in der Intensität von 27 m/z-Werten (Tabelle 17). Es wurden hierfür 17 Regionen mit diploidem KRK-Gewebe und 11 Regionen mit aneuploidem KRK-Gewebe verglichen (Tabelle 15).

**Tabelle 17. Diskriminierende m/z-Werte zwischen diploiden und aneuploiden KRK.** Beim Vergleich der massenspektrometrisch detektierten Spektren von diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe mit der ROC-Analyse fiel die Intensität von 27 m/z-Werte mit einer AUC von  $< 0,385$  bzw.  $> 0,635$  als unterscheidend auf. Die AUC der m/z-Werte wurde anhand der Grenzwertoptimierungskurve jedes Wertes bestimmt. Der p-Wert wurde mit dem Wilcoxon-Rangsummentest bestimmt. m/z-Wert: Massen-Ladungs-Verhältnis.

Intensität diploid > aneuploid			Intensität aneuploid > diploid		
m/z-Wert	ROC AUC	p-Wert	m/z-Wert	ROC AUC	p-Wert
806,5	0,650	$< 0,001$	3203,6	0,354	$< 0,001$
959,5	0,660	$< 0,001$	3244,2	0,354	$< 0,001$
960,5	0,665	$< 0,001$	3252,4	0,354	$< 0,001$
1043,5	0,667	$< 0,001$	3286,3	0,354	$< 0,001$
1118,7	0,665	$< 0,001$	3366,6	0,353	$< 0,001$
1120,8	0,661	$< 0,001$	3380,4	0,355	$< 0,001$
1203,9	0,684	$< 0,001$	3383,1	0,351	$< 0,001$
1204,8	0,683	$< 0,001$	3394,6	0,354	$< 0,001$
1301,9	0,678	$< 0,001$	3403,8	0,354	$< 0,001$
1359,0	0,647	$< 0,001$	3415,4	0,353	$< 0,001$
1378,0	0,653	$< 0,001$	3416,3	0,345	$< 0,001$
1384,0	0,648	$< 0,001$	3417,2	0,343	$< 0,001$
1387,0	0,651	$< 0,001$	3418,1	0,354	$< 0,001$
			3444,8	0,354	$< 0,001$

### 3.1.2.3. Vergleich der klinischen Parameter Lymphknotenstatus, 5-Jahresüberleben und UICC-Status

Auch die Spektren innerhalb der klinischen Parametergruppen Lymphknotenstatus, 5-Jahresüberleben, und UICC-Status wurden verglichen. Interessanter Weise zeigte kein m/z-Wert eine AUC von  $< 0,385$  bzw.  $> 0,635$  und einen p-Wert  $< 0,001$  zwischen den Gruppen der klinischen Parameter.

## 3.2. Identifizierung von m/z-Werten

Im nächsten Schritt der Arbeit sollten den unterschiedlichen m/z-Werten Peptide und Proteine zugeordnet werden. Hierfür wurden eine LC-MS/MS-Analyse eines konsekutiven TMA-Schnittes durchgeführt und softwarebasiert mit der UniProt-Datenbank abgeglichen. Insgesamt konnten 1.204 Proteingruppen aus der TMA-Probe identifiziert werden (siehe Anhang 8.4.). Anschließend wurden alle diskriminierenden m/z-Werte der MALDI-IMS mit der Proteinliste und deren zugehörigen Peptiden abgeglichen. Für eine Identifikation wurde

eine maximale Abweichung der Proteinmassen (MALDI-IMS und LC-MS/MS) von 0,5 Da toleriert, sowie eine Zuordnung durch mindestens zwei Peptidmassen je Protein vorausgesetzt.

### **3.2.1. Keine Proteinzuordnung bei Mukosa- und KRK-Gewebe möglich**

Insgesamt wurden die 30 identifizierten m/z-Werte, deren Intensität zwischen Mukosa und KRK unterschiedlich detektiert wurden mit der für das Trainingsset erstellten Identifizierungsliste abgeglichen. In diesem Vergleich konnten jedoch keinem Protein zwei oder mehr m/z-Werte zugeordnet werden, sodass auch keine eindeutige Identifizierung vollzogen werden konnte.

### **3.2.2. Vier Proteine unterscheiden diploides von aneuploidem KRK-Gewebe**

Der Vergleich der Spektren von diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe zeigte 27 m/z-Werte, deren Intensität zwischen beiden Gruppen signifikante Signalunterschiede aufwiesen. Nach Abgleich mit der erstellten Proteindatenbank konnten insgesamt fünf Spektren vier Proteinen zugeordnet werden. Alle wiesen in diploidem KRK-Gewebe eine signifikant höhere Intensität auf als in aneuploidem KRK-Gewebe (Tabelle 18). Bei den erfolgreich identifizierten Proteinen handelte es sich um Alpha-Enolase (ENO1), Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (SPTBN1), Transgelin-2 (TAGLN2) und Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (UBE2N).

**Tabelle 18. Identifizierte Proteine, deren MALDI-IMS m/z-Werte im Gruppenvergleich der Ploidie unterschiedliche Signalintensitäten zeigten.** Die mit MALDI-IMS bestimmten m/z-Werte wurden mit den m/z-Werten aus der individuellen Proteindatenbank der LC-MS/MS des Trainingssets abgeglichen. Für eine Zuordnung wurde eine maximale Abweichung von  $\pm 0,5$  Da toleriert und für eine Proteinidentifizierung eine Zuordnung durch mindestens zwei m/z-Werte vorausgesetzt. Insgesamt konnten so vier Proteine identifiziert werden, die massenspektrometrisch zwischen diploidem und aneuploidem Karzinomgewebe unterschieden. m/z: Massen-Ladungsverhältnis; Da: Dalton; H<sup>+</sup>: positiv geladenes Wasserstoffion; d: diploid; a: aneuploid.

MALDI-IMS [m/z, H <sup>+</sup> ]	LC-MS/MS [m/z, H <sup>+</sup> ]	Delta [Da]	Protein	Gen	Expression [diploid zu aneuploid]
959,544 1118,661	959,545 1118,665	-0,001 -0,004	Alpha-Enolase	ENO1	d > a
959,544 1203,898	959,513 1203,593	0,031 0,305	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	SPTBN1	d > a
1203,898 1384,045	1203,633 1383,613	0,265 0,432	Transgelin-2	TAGLN2	d > a
1043,533 1203,898	1043,635 1203,593	-0,102 0,305	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	UBE2N	d > a

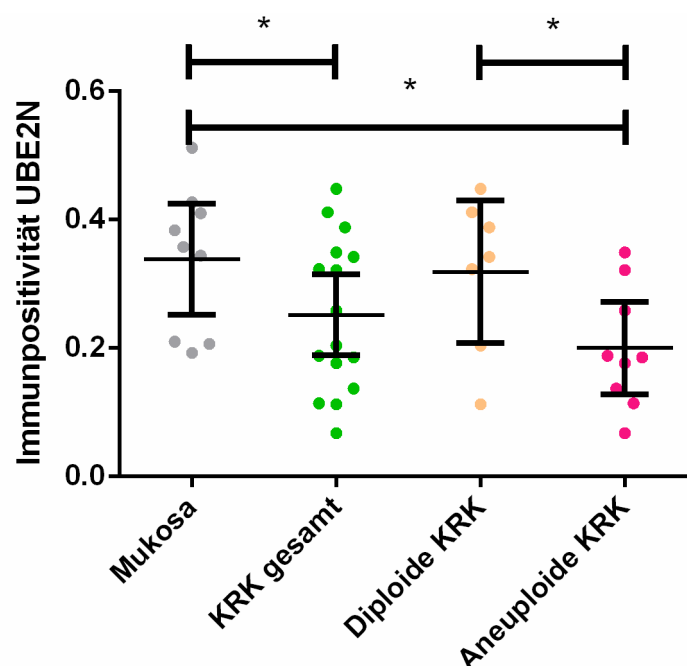
### 3.3. Validierung der bildgebenden Massenspektrometrie mittels immunhistochemischer Färbungen

Die mit der Kombination aus MALDI-IMS und LC-MS/MS identifizierten Proteine wurden anschließend mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung überprüft. Dafür wurde untersucht, ob anhand der Färbung der Proteine eine Unterscheidung zwischen diploidem und aneuploidem Gewebe möglich ist (Tabelle 13). Nach Literaturrecherche hinsichtlich ihrer biologischen Funktion zur genomischen Instabilität wurden die Proteine SPTBN1 und UBE2N für die Validierung ausgewählt. Die immunhistochemische Färbung dieser Proteine wurde zunächst mit der ImageScope Software und anschließend mit einem manuellen Scoring-System ausgewertet.

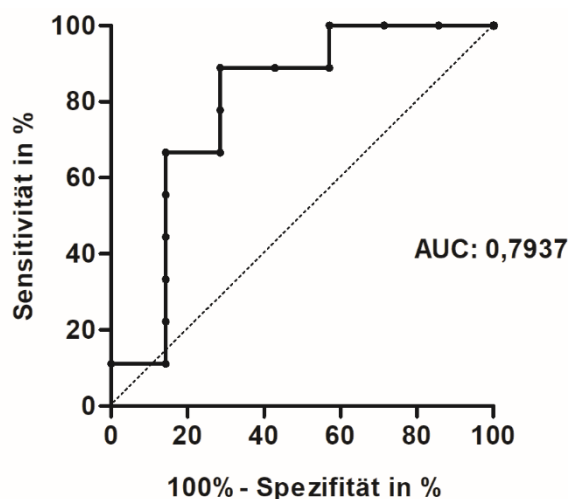
#### 3.3.1. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (UBE2N) zeigt signifikante Unterschiede in Trainings- und Validierungsset nach histologischer Färbung

Um die Diskriminierung zwischen diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe durch UBE2N zu überprüfen, wurde zunächst das Trainingsset immunhistochemisch mit Anti-UBE2N angefärbt. Nach der HE-Gegenfärbung konnten 42 von 60 Gewebeproben ausgewertet werden. Die 42 Gewebeproben teilten sich in 10 diploide und 17 aneuploide KRK-Gewebe sowie 15 Mukosagewebe auf.

Bei der Software-gestützten Auswertung unterschieden sich diploide KRK-Gewebe (Mittelwert = 0,32) signifikant von aneuploiden (Mittelwert = 0,20), wobei aneuploide im Mittel schwächer immunpositiv waren ( $p \leq 0,0274$ ). Somit konnte die detektierte Proteinexpression in der bildgebenden Massenspektrometrie erfolgreich validiert werden. Der Vergleich von Mukosagewebe (Mittelwert = 0,34) mit dem gesamten KRK-Gewebe (Mittelwert = 0,25) zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied wobei Mukosagewebe signifikant stärker immunpositiv war als das KRK-Gewebe ( $p \leq 0,0289$ ). Auch im Vergleich mit dem aneuploiden KRK-Gewebe unterschied sich Mukosagewebe und zeigte eine stärkere Immunpositivität ( $p \leq 0,0028$ , Abbildung 17). Eine anschließende ROC-Kurvenberechnung ergab eine AUC von 0,7937 für die Unterscheidung zwischen diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe mittels immunhistochemischer Färbung gegen UBE2N (Abbildung 18).



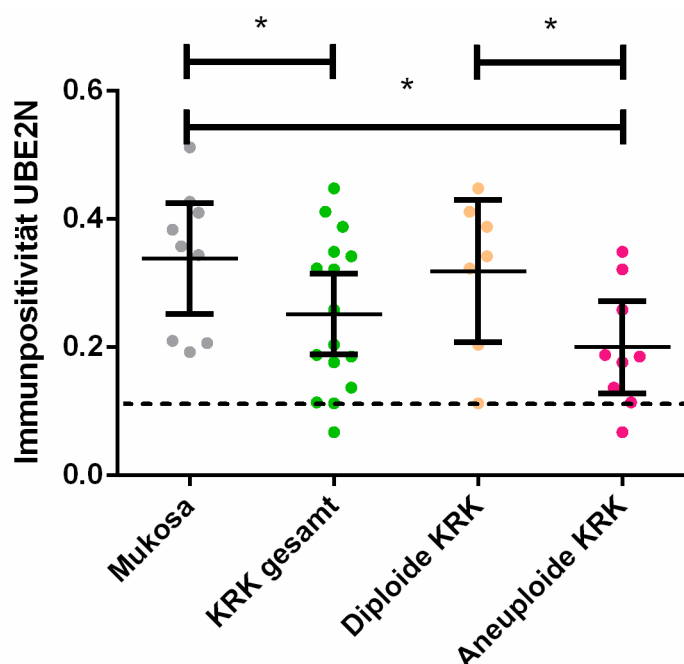
**Abbildung 17. Immunpositivität des mit Anti-UBE2N gefärbten Trainingssets.** In der Abbildung ist die Immunpositivität der Gruppen diploide KRK-, aneuploide KRK-, Mukosa- und gesamte KRK-Gewebe dargestellt. Die Immunpositivität diploider KRK-Gewebe unterschied sich signifikant von der Immunpositivität aneuploider KRK-Gewebe, deren Immunpositivität geringer ausfiel ( $p \leq 0,0274$ ). Das gesamte KRK-Gewebe ist verglichen mit Mukosagewebe signifikant schwächer gefärbt ( $p \leq 0,0289$ ). \*: signifikant ( $p < 0,05$ ). Die stärkere Immunpositivität von Mukosagewebe unterschied sich weiter von aneuploidem KRK-Gewebe ( $p \leq 0,0028$ ). Neben den einzelnen Messwerten ist der Mittelwert mit seinem 95 % Konfidenzintervall dargestellt.



**Abbildung 18. ROC-Kurve zwischen diploidem und aneuploidem KHK-Gewebe nach Färbung gegen UBE2N und Intensitätsbestimmung im Trainingskollektiv.** Dargestellt ist die ROC-Kurve aus der Analyse der Immunpositivitäten diploider und aneuploider KHK-Gewebe nach Färbung gegen UBE2N. Die AUC beträgt 0,7937 und bezeichnet die Fläche unter der ROC-Kurve. Mit der gestrichelten Linie ist eine AUC von 0,5 dargestellt, die eine zufällige Unterscheidung darstellt.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich ein Grenzwert der Immunpositivität bei optimaler Sensitivität und Spezifität bestimmen lässt, mit dem zwischen diploidem und aneuploidem KHK-Gewebe differenziert werden kann. Hierfür wurde die Immunpositivität mit der maximalen Summe aus Sensitivität (66,7 %) und Spezifität (85,7 %) ausgewählt, die einen Grenzwert von 0,1957 für die Differenzierung des KHK-Gewebes nach seinem Ploidiestatus anhand der Färbung gegen UBE2N ergab (Abbildung 19 und Tabelle 19).

Bei Anwendung des Grenzwerts auf das Trainingsset wurden 6 von 7 diploiden KHK-Gewebe (positiv prädiktiver Wert von 66,7 %) und 6 von 9 aneuploiden KHK-Gewebe (negativ prädiktiver Wert von 85,7 %) korrekt zugeordnet ( $p = 0,0601$ ).



**Abbildung 19. Grenzwert zur Diskriminierung von diploiden und aneuploiden KRK anhand der UBE2N-Färbung des Trainingssets.** In der Abbildung ist die Immunpositivität der Gruppen diploide KRK-, aneuploide KRK-, Mukosa- und gesamte KRK-Gewebe dargestellt. Mit gestrichelter Linie ist der Grenzwert von 0,1957 eingezeichnet, der die bestmögliche Differenzierung zwischen diploiden und aneuploiden KRK anhand dieser Färbung zeigt. \*: signifikant ( $p < 0,05$ ). Neben den einzelnen Messwerten ist der Mittelwert mit seinem 95 % Konfidenzintervall dargestellt.

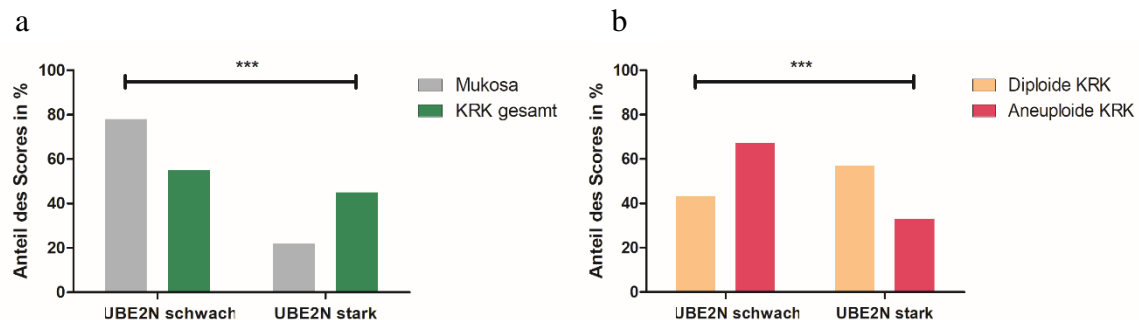
**Tabelle 19. Kreuztabelle zur Bewertung des Grenzwertes.** In der Kreuztabelle ist die zytometrische Bestimmung des Ploidiestatus und der Grenzwert von 0,1957 als diagnostischer Test zur Differenzierung zwischen diploiden und aneuploiden Karzinomen bei Färbung gegen UBE2N gewählt worden. Eine Immunpositivität von  $\geq 0,1957$  wurde als positiv gewertet. Insgesamt wurde für den Grenzwert 0,1957 als diagnostischen Test eine Sensitivität von 66,7 %, eine Spezifität von 85,7 %, ein positiv prädiktiver Wert von 66,7 % und ein negativ prädiktiver Wert von 85,7 % erreicht ( $p \leq 0,0601$ ). RP: richtig positiv; FN: falsch negativ; FP falsch positiv; RN richtig negativ.

Färbung gegen UBE2N	Zytometrische Bestimmung		
	diploid	aneuploid	gesamt
positiv	6 (RP) bzw. 37,5 %	3 (FP) bzw. 18,8 %	9 (56,3 %)
negativ	1 (FN) bzw. 6,3 %	6 (RN) bzw. 37,5 %	7 (43,8 %)
gesamt	7 (43,8 %)	9 (56,3 %)	

Um die computerbasierte Validierung zu untermauern, wurde für dieselbe Färbung eine manuelle Auswertung der Färbeintensität vorgenommen. Beim Normalgewebe wurden 2 Stenzen mit einem Score von 0, 5 Stenzen mit einem Score von 1 und 2 Stenzen mit einem Score von 2 bewertet. Beim KRK-Gewebe wurden 2 Proben mit einem Score von 0, 7 mit einem Score von 1, 3 mit einem Score von 2 und 4 mit einem Score von 3 bewertet. Nach

der Dichotomisierung von starker (Score 2 und 3) und schwacher (Score 0 und 1) Färbung zeigten im Vergleich 44 % der KRK und lediglich 22 % der Normalgewebeprobe eine starke Färbung. Für die statistische Auswertung wurde der  $\chi^2$ -Test angewendet. Die Analyse zeigte eine signifikant stärkere Färbung im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe ( $p \leq 0,0001$ ). Der Vergleich der Scores zeigte weiter einen signifikanten Unterschied zwischen der Immunpositivität von diploiden und aneuploiden KRK-Geweben ( $p \leq 0,0006$ ). Diploide KRK-Gewebe wurden häufiger mit höheren Scores bewertet als aneuploide KRK-Gewebe und bestätigten so die computer-basierte Auswertung, sowie die MALDI-IMS-Daten.

Anschließend wurden die Scores der Gewebeprobe dichotomisiert in die Gruppen „schwächere Anfärbung“ (Score 0;1) und „stärkere Anfärbung“ (Score 2;3). Der Vergleich der Scores zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Scores diploider KRK-Gewebe und denen aneuploider KRK-Gewebe ( $p \leq 0,0006$ ), sowie zwischen Mukosagewebe und dem gesamten KRK-Gewebe ( $p \leq 0,0001$ ). Diploide KRK-Gewebe wurden häufiger mit höheren Scores bewertet als aneuploide KRK-Gewebe und Mukosagewebe häufiger mit schwächeren Scores als die gesamten KRK-Gewebe (Abbildung 20).



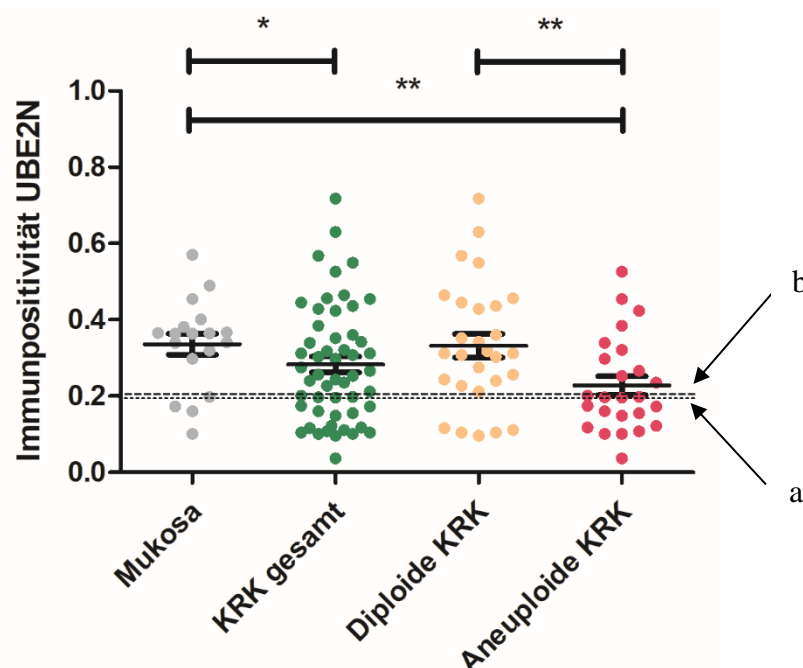
**Abbildung 20. Dichotomisierte Scores von diploiden und aneuploiden KRK-Geweben, sowie von Mukosa- und dem gesamten KRK-Gewebe des mit UBE2N gefärbten Trainingssets.** (a) zeigt die dichotomisierten Scores von Mukosa- und dem gesamten KRK-Gewebe und (b) die von diploiden und aneuploiden KRK-Geweben. Die Intensität der Färbung wurde für jede Gewebeprobe manuell bestimmt und mit Scores bewertet. Dabei stand ein Score von 0 für keine Färbung, 1 für schwache Färbung, 2 für mittlere Färbung und 3 für starke Färbung. 0 und 1 wurden als schwache Färbung, 2 und 3 als starke Färbung dichotomisiert. Es sind die Anteile der jeweiligen Scores an der Gesamtzahl aller Scores in % angegeben. Die Scores des Gewebes diploider KRK unterschieden sich signifikant von denen aneuploider KRK, wobei aneuploides KRK-Gewebe häufiger schwächer war ( $p \leq 0,0006$ ). Die Scores von Mukosagewebe unterschieden sich signifikant von denen der gesamten KRK-Gewebe. Mukosagewebe wurde signifikant häufiger als schwächer angefärbt bewertet als aneuploide KRK-Gewebe ( $p \leq 0,0001$ ). \*\*\*:  $p < 0,001$ .



Zur Validierung und Überprüfung der Ergebnisse des Trainingssets sollte ein unabhängiges Kollektiv mit höherer Probenzahl (Validierungsset) untersucht werden.

Die HE-Gegenfärbung zeigte, dass bei 71 der 90 (78,9 %) im Validierungsset enthaltenen Gewebeproben repräsentativ auswertbares Gewebe vorhanden war. Davon entfielen 28 Gewebeproben auf diploide KRK, 25 auf aneuploide KRK und 18 auf Normalmukosa (Tabelle 23).

Die Auswertung des Validierungssets erfolgte analog zu der Auswertung des Trainingssets. Die Software-gestützte Auswertung ergab eine signifikant unterschiedliche Immunpositivität für diploide KRK-Gewebe im Vergleich zu aneuploiden KRK-Geweben und bestätigte damit die Ergebnisse aus der MALDI-IMS und dem Trainingsset ( $p \leq 0,0075$ ). Aneuploide KRK-Gewebe (Mittelwert = 0,23) wiesen dabei geringere Immunpositivitäten auf als diploide KRK-Gewebe (Mittelwert = 0,33). Der Vergleich der gesamten KRK- mit Mukosagewebe zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied. Mukosagewebe präsentierte sich dabei als stärker immunpositiv (Mittelwert = 0,34) als die gesamten KRK-Gewebe (Mittelwert = 0,28;  $p \leq 0,0356$ ; Abbildung 21).



**Abbildung 21. Die UBE2N-Immunpositivität diploider KRK-Gewebe ist höher als die von aneuploiden KRK-Geweben.** Dargestellt ist die Immunpositivität diploider KRK-, aneuploider KRK-, von Mukosa- und den gesamten KRK-Geweben bei einer Färbung gegen UBE2N. Diploide KRK-Gewebe unterschieden sich signifikant von aneuploiden KRK-Geweben, wobei aneuploide KRK-Gewebe schwächer angefärbt waren ( $p \leq 0,0075$ ). Im Vergleich der Immunpositivität von Mukosa- und dem gesamten KRK-Gewebe unterschieden sich die Immunpositivitäten signifikant. Mukosagewebe war dabei stärker immunpositiv als das gesamte KRK-

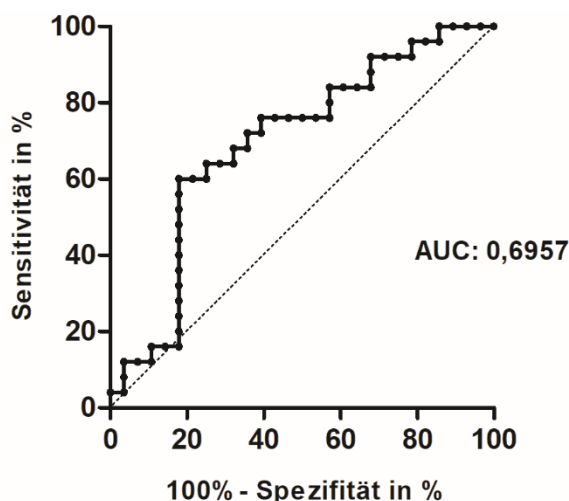
Gewebe ( $p \leq 0,0356$ ). Die gestrichelte Linie (a) stellt den Grenzwert dar, der im Trainingsset diploide und aneuploide KRK am besten differenzierte. Er liegt bei einer Immunpositivität von 0,1957 und wies im Validierungsset eine Sensitivität von 56% und eine Spezifität von 82,14 % auf. Der weitere Grenzwert (b) wurde anhand des Validierungssets kalkuliert und liegt bei 0,2066. Er wies eine Sensitivität von 60 % und eine Spezifität von 82,14 % auf. Neben den einzelnen Messwerten ist der Mittelwert mit seinem 95 % Konfidenzintervall dargestellt. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ .

Bei Anwendung des anhand des Trainingssets kalkulierten Grenzwertes von 0,1957 auf das Validierungsset ergab sich eine Sensitivität von 82,14 % bei einer Spezifität von 56 %. Der positiv prädiktive Wert betrug 67,6 % und der negativ prädiktive Wert 73,7 % ( $p < 0,0049$ ; Tabelle 20).

**Tabelle 20. Kreuztabelle zur Bewertung des Grenzwertes 0,1957 bei Färbung des Validierungssets von UBE2N.** In der Kreuztabelle ist als Goldstandard die zytometrische Bestimmung des Ploidiestatus angegeben und als diagnostischer Test der Grenzwert von 0,1957 zur Differenzierung zwischen diploiden und aneuploiden Karzinomen. Insgesamt wurden 53 verschiedene KRK-Gewebeproben ausgewertet, die alle Bestandteil des Trainingskollektivs waren. Eine Immunpositivität von  $\geq 0,1957$  wurde als positiv gewertet,  $< 0,1957$  als negativ. Es wurde ein positiv prädiktiver Wert von 67,6 %, ein negativ prädiktiver Wert von 73,68 %, eine Sensitivität von 82,14 % und eine Spezifität von 56 % erreicht ( $p < 0,0049$ ). RP: richtig positiv; FN: falsch negativ; FP falsch positiv; RN richtig negativ.

Färbung gegen UBE2N	Bildzytometrische Bestimmung		
	diploid	aneuploid	gesamt
positiv	23 (RP) bzw. 43,4 %	11 (FP) bzw. 20,8 %	34 (64,2 %)
negativ	5 (FN) bzw. 9,4 %	14 (RN) bzw. 26,4 %	19 (35,8 %)
gesamt	28 (52,8 %)	25 (47,2 %)	

Aufgrund der geringen Probenzahl des Trainingssets wurde auch für das Validierungsset eine Grenzwertbestimmung durchgeführt. Der Vergleich zwischen der Immunpositivität diploider und aneuploider KRK-Gewebe mit der ROC-Analyse ergab eine AUC von 0,6957 (Abbildung 22).



**Abbildung 22. ROC-Kurve des Validierungskollektivs.** Dargestellt ist die ROC-Kurve der Differenzierung der Färbung gegen UBE2N zwischen diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe. Mit AUC ist die Fläche unter der Kurve bezeichnet, die 0,6957 beträgt. Die gestrichelte Linie stellt den Verlauf einer ROC-Kurve mit einer AUC von 0,5 dar, was einer zufälligen Differenzierungsqualität entspricht.

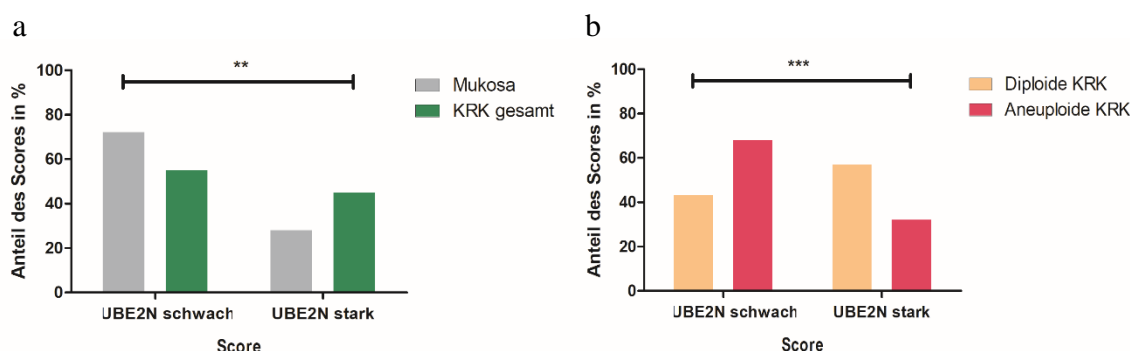
Für das Validierungsset wurde der Grenzwert bei der höchsten Likelihood-ratio von 3,36 gesetzt, was einer Immunpositivität von 0,2066 entspricht. Diploide KRK-Gewebe wurden hierdurch mit einer Wahrscheinlichkeit von 69,7 % korrekt als diploid eingeordnet (PPW), während aneuploide KRK-Gewebe mit einer Wahrscheinlichkeit von 75 % korrekt als aneuploid (NPW) eingeordnet wurden. Die Sensitivität betrug unter der Berücksichtigung des Schwellenwertes 82,14 % bei einer Spezifität von 60 % ( $p < 0,0021$ ; Tabelle 21).

Insgesamt unterschieden sich die anhand des Trainings- und Validierungssets kalkulierten Grenzwerte nur in geringem Umfang, sowohl in ihrem absoluten Wert als auch in ihrer Aussagekraft.

**Tabelle 21. Kreuztabelle zur Bewertung des Grenzwertes 0,2066 bei Färbung des Validierungssets von UBE2N.** In der Kreuztabelle ist als Goldstandard die zytometrische Bestimmung des Ploidiestatus angegeben und als diagnostischer Test der Grenzwert von 0,2066 zur Differenzierung zwischen diploiden und aneuploiden Karzinomen. Insgesamt wurden 53 verschiedene KRK-Gewebeproben ausgewertet, die alle Bestandteil des Validierungssets waren. Es wurde, ein positiv prädiktiver Wert von 69,7 %, ein negativ prädiktiver Wert von 75 %, eine Sensitivität von 82,14 % und eine Spezifität von 60 % erreicht ( $p < 0,0021$ ). RP: richtig positiv; FN: falsch negativ; FP falsch positiv; RN richtig negativ.

Färbung gegen UBE2N	Bildzytometrische Bestimmung		
	diploid	aneuploid	gesamt
positiv	23 (RP) bzw. 43,4 %	10 (FP) bzw. (18,9 %)	33 (62,3 %)
negativ	5 (FN) bzw. 9,4 %	15 (RN) bzw. (28,3 %)	20 (37,7 %)
gesamt	28 (52,8 %)	25 (47,2 %)	

Wie auch beim Trainingsset wurde die Färbeintensität der Färbung ebenso manuell ausgewertet. Beim Normalgewebe wurde 1 Stanze mit einem Score von 0, 12 Stanzen mit einem Score von 1, 4 Stanzen mit einem Score von 2, sowie 1 Stanze mit einem Score von 3 bewertet. Beim KRK-Gewebe wurden 5 Proben mit einem Score von 0, 24 mit einem Score von 1, 21 mit einem Score von 2 und 3 mit einem Score von 3 bewertet. Nach der Dichotomisierung in starke (Score 2 und 3) und schwache (Score 0 und 1) Färbung zeigten im Vergleich 45 % der KRK und lediglich 28 % der Normalgewebeproben eine starke Färbung. Für die statistische Auswertung wurde der  $\chi^2$ -Test angewendet. Die Analyse zeigte eine signifikant stärkere Färbung im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe ( $p \leq 0,0063$ ; Abbildung 23b). Auch der Vergleich der dichotomisierten Scores zwischen diploiden und aneuploiden KRK-Geweben ergab einen signifikanten Unterschied mit einer stärkeren Färbung in diploiden Geweben ( $p \leq 0,0002$ ; Abbildung 23a).



**Abbildung 23. Dichotomisierte Scores des Validierungssets von diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe sowie von Mukosa- und den gesamten KRK-Geweben.** (a) zeigt die dichotomisierten Scores von diploiden und aneuploiden KRK-Geweben und (b) die von Mukosa- und den gesamten KRK-Geweben des Validierungssets. Dabei stand ein Score von 0 für keine Färbung, 1 für schwache Färbung, 2 für mittlere Färbung und 3 für starke Färbung. Es wurden 0 und 1 als „schwach“ und 2 und 3 als „stark“ gefärbt dichotomisiert. Es sind die Anteile der jeweiligen Scores an der Gesamtzahl aller Scores in % angegeben. Normalmukosagewebe war verglichen mit den gesamten KRK-Geweben signifikant unterschiedlich, wobei Mukosa häufiger schwächere Scores aufwies ( $p \leq 0,0063$ ). Die Färbung diploider KRK-Gewebe unterschied sich signifikant von der aneuploider KRK-Gewebe. Diese wurden häufiger als schwächer bewertet ( $p \leq 0,0002$ ). \*\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

### 3.3.2. UBE2N Färbung korreliert mit Ploidie und Grading

Zur weiteren Einordnung der Ergebnisse wurden die UBE2N-Färbung auf mögliche Zusammenhänge mit allen anderen erhobenen klinischen Parametern untersucht. Zwischen der Immunpositivität bei UBE2N-Färbung und Ploidiestatus (Pearson

Korrelationskoeffizient -0,342), sowie dem Grading (Pearson Korrelationskoeffizient -0,282) bestätigte sich eine direkte Korrelation.

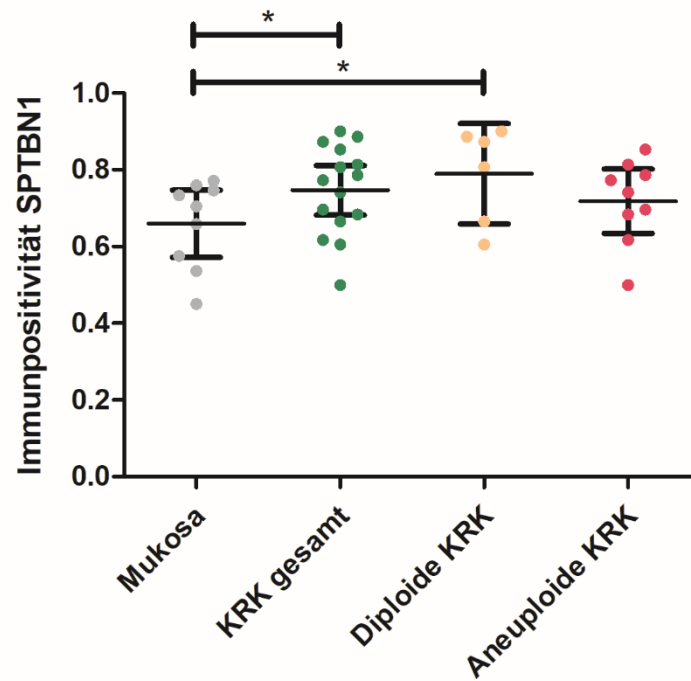
Eine stärkere UBE2N-Proteinexpression geht somit mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit mit Aneuploidie und einem hohen Grading einher. Die Proteinexpression von UBE2N wurde dabei als signifikant geringer in G1 und G2 im Vergleich zu G3 detektiert ( $p = 0,0261$ ).

Bei den weiteren klinischen Parametern Geschlecht (Pearson Korrelationskoeffizient 0,202), Alter (0,089), Tumorstadium (-0,031), Lymphknotenstatus (-0,017), Metastasierung (konstante Variable), UICC-Status (-0,031) oder Überlebensstatus (-0,103) zeigte sich keine Korrelation zur Immunpositivität.

### **3.3.3. Färbung gegen Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (SPTBN1) kann**

#### **Ergebnisse der bildgebende Massenspektrometrie im Trend bestätigen**

Die Gegenfärbung des Trainingssets mit HE ergab für 39 von 60 Gewebeproben eine ausreichend repräsentative Materialmenge. Unter diesen 39 Gewebeproben befanden sich neun diploide und 16 aneuploide KRK-Gewebe sowie 14 Mukosa-Gewebeproben. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der immunhistochemischen Färbung von SPTBN1 zwischen diploiden und aneuploiden KRK-Geweben, wobei diploide allerdings stärker angefärbt waren ( $p \leq 0,1361$ ) und damit im Trend den MALDI-IMS-Ergebnissen folgten. Die AUC für die Unterscheidung diploid - aneuploid anhand der Färbung war 0,7185. Die Immunpositivität der gesamten KRK-Gewebe war verglichen mit Mukosagewebe signifikant unterschiedlich, wobei die gesamten KRK-Gewebe sich stärker angefärbt präsentierten als umliegendes Mukosagewebe ( $p \leq 0,042$ ). In diesem Zusammenhang zeigte sich auch diploides KRK-Gewebe signifikant stärker als Mukosagewebe gefärbt ( $p \leq 0,0332$ ; Abbildung 24).



**Abbildung 24. Immunpositivität des mit Anti-SPTBN1 gefärbten Trainingskollektivs.** Die Abbildung zeigt die Auswertung der Immunpositivität der Anti-SPTBN1-Färbung. Die Färbung diploider und aneuploider KRK-Gewebe war nicht signifikant unterschiedlich. Der Vergleich der Färbung der gesamten KRK-Gewebe mit der von Mukosagewebe zeigte einen signifikanten Unterschied, wobei die gesamten KRK-Gewebe stärker angefärbt waren als Mukosagewebe ( $p \leq 0,042$ ). Ebenso zeigte der Vergleich diploider KRK-Gewebe mit Mukosa einen signifikanten Unterschied, wobei diploide KRK-Gewebe stärker angefärbt waren als Mukosagewebe ( $p \leq 0,0332$ ). \*:  $p < 0,05$ . Neben den einzelnen Messwerten ist der Mittelwert mit seinem 95% Konfidenzintervall dargestellt.

## 4. Diskussion

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist weltweit eines der häufigsten Malignome und tritt vorwiegend beim älteren Menschen auf. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung ist die Erkrankung daher von hoher Relevanz (vgl. 1.2.1.). Die mangelnde Akzeptanz der Vorsorgeuntersuchungen (Koloskopie und iFOBT) und unspezifische und geringe Symptomatik im Anfangsstadium führt dazu, dass viele KRK erst in einem fortgeschrittenen Stadium detektiert werden, sodass eine lokale Resektion nicht mehr ausreichend ist. Die Tumorthherapie wird hierbei immer weiter individualisiert, weswegen zunehmend neue Biomarker, wie z.B. Proteine, ob zur Einschätzung der Prognose oder als mögliches Therapieziel gesucht werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mittels bildgebender Massenspektrometrie (MALDI-IMS) Proteine zu identifizieren, die KRK mit unterschiedlichen prognostischen Parametern differenzieren. Anschließend sollten die identifizierten Proteine immunhistochemisch an einer abhängigen und unabhängigen Kohorte validiert werden.

Die Ergebnisse der bildgebenden Massenspektrometrie zeigten Peptide, die zwischen normaler Kolonmukosa und KRK-Gewebe, sowie zwischen diploiden und aneuploiden KRK signifikant unterschiedlich exprimiert waren. Für den Vergleich zwischen diploiden und aneuploiden KRK-Geweben konnten anschließend die Proteine Alpha-Enolase (ENO1), Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (SPTBN1), Transgelin-2 (TAGLN2) und Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (UBE2N) mittels Elektrospray-Massenspektrometrie identifiziert werden. Das Protein UBE2N wurde danach sowohl in der abhängigen als auch in einer unabhängigen Patientenkohorte erfolgreich immunhistochemisch validiert. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass FFPE-basierte Protein-Analysen unter der Berücksichtigung der intratumoralen Heterogenität mittels MALDI-IMS Proteinmuster identifizieren können, die den Ploidie-Status einer bestimmten Probe anzeigen. Es wurde mit UBE2N ein Protein erfolgreich identifiziert und validiert, welches mit der genomischen Instabilität einer Zellpopulation assoziiert zu sein scheint.

### 4.1. Bildgebende Massenspektrometrie (MALDI-IMS)

Das Verfahren der bildgebenden Massenspektrometrie ermöglicht die Untersuchung von Gewebeschnitten inklusive der exakten Lokalisation von tausenden von Proteinen innerhalb eines Experiments. Mit Hilfe dieser Methode kann die Heterogenität von Tumoren aufgrund

der unterschiedlichen Verteilung von Proteinen erfasst werden, da eine räumliche Auflösung und Abgrenzung möglich ist (Quanico et al. 2017b). Insbesondere durch die räumliche Auflösung der Proteinexpression bietet sich ein einzigartiger Vorteil, die komplexe molekulare Morphologie des Gewebes abzubilden und u.a. Tumorgewebe getrennt vom Tumormilieu zu betrachten. Da molekulare Subklone eines Tumors ein jeweils unterschiedliches Therapieansprechen zeigen, ist es zur Entwicklung personalisierter Therapiekonzepte essentiell, diese zu kennen (Wu et al. 2010). Unterschiede im Proteom innerhalb eines Tumors kennzeichnen diese Subklone und könnten zukünftig über bildgebende Massenspektrometrie erkannt werden (Overman et al. 2017; Neagu 2019; Mas et al. 2020). Zusätzliche Vorteile gegenüber alternativen Proteinuntersuchungsmethoden mit räumlicher Auflösung, wie z.B. der Immunhistochemie, bestehen darin, dass die Proteine für die Analysen weder markiert noch vorher bekannt sein müssen. Für diese Arbeit und ihre Fragestellung war vor allem der Aspekt der Identifizierung von unbekannten Proteinen unter Berücksichtigung der Tumorerheterogenität bzw. der räumlichen Histologie von Bedeutung.

#### **4.1.1. Technische Limitierung und Entwicklung**

Aktuell wird die MALDI-IMS vor allem in der präklinischen Forschung angewandt. Es wird aufgrund der zahlreichen Vorteile der Methode jedoch erwartet, dass diese zeitnah auch im klinischen Kontext eingesetzt werden kann (Longuespée et al. 2016; Kriegsmann et al. 2018; Neagu 2019).

Eine technische Limitierung der Methode stellt aktuell noch die abnehmende Sensitivität bei geringerer Rastergröße bzw. Auflösung dar. Die Detektion eines Proteins mit Hilfe der MALDI-IMS ist abhängig von der Proteinmenge pro Rastereinheit. Je enger das Raster bzw. die Auflösung gewählt wird, um so eine hohe räumliche Auflösung zu gewinnen, desto geringer ist die Konzentration der zu detektierenden Proteine pro Rastereinheit (Lanni et al. 2012; Gessel et al. 2014; Quanico et al. 2017a). Dieser Umstand steigert die Wahrscheinlichkeit, besonders gering konzentrierte Proteine unter Umständen nicht zu erfassen. In Abwägung zwischen Sensitivität und räumlicher Auflösung wurde für diese Arbeit eine Rasterweite von 80  $\mu\text{m}$  gewählt. Mit fortschreitender Entwicklung der Massenspektrometer könnten in Zukunft technische Lösungen entstehen, um weitere, insbesondere gering konzentrierte, Proteine zu detektieren.



#### 4.1.2. Unterscheidung weiterer klinischer Parameter

Durch die bildgebende Massenspektrometrie ließen sich kolorektale Karzinome in diploide und aneuploide Karzinome unterscheiden. Ebenso gelang die Unterscheidung zwischen Mukosa und dem gesamten kolorektalen Karzinomgewebe. Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den weiteren prognostischen Parametern UICC-Status (I+II vs. III+IV), Lymphknotenstatus (negativ (N0) vs. positiv (N1 und N2)) und Überleben. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte sein, dass die Ploidie einen größeren Einfluss auf das Proteinmuster hat als z.B. das Überleben und somit auch größere Unterschiede bestehen und detektierbar sind. Dieses Phänomen konnten auch Gemoll und Kollegen in ihrer Arbeit zum Endometriumkarzinom zeigen, bei der histologische im Vergleich zu genomischen Subgruppen einen kleineren Unterschied im Proteinexpressionsmuster zeigten (Gemoll et al. 2012). Es wurde daher postuliert, dass die Ploidie einen größeren Einfluss auf das Proteinexpressionsmuster zu haben scheint als die histologische Einteilung des Tumors.

Weiter könnte es sein, dass Unterschiede in weniger konzentrierten Proteinen zu finden wären, welche aktuell aufgrund der technischen Limitierung nicht erfasst werden konnten. Im Rahmen der technischen Weiterentwicklung der Massenspektrometer wäre daher eine erneute Untersuchung des verwendeten Tissue Microarrays denkbar.

Möglicherweise trägt auch der Gewebeverlust dazu bei, dass bestimmte Eigenschaften unter- bzw. überrepräsentiert sein konnten. Dies geht einher mit der hierdurch teilweise reduzierten Probenzahl, welche es erschwert, ein statistisch signifikantes Niveau zu erreichen.

#### 4.2. Immunhistochemie

Zur Validierung der massenspektrometrischen Ergebnisse bot sich besonders die immunhistochemische (IHC) Färbung mit ihrer örtlichen Auflösung an. Hierbei werden bereits bekannte Antigene spezifisch angefärbt und können mit einer hohen räumlichen Auflösung dargestellt werden. Zudem ist die IHC eine im klinischen Alltag und insbesondere der Pathologie breit etablierte Methode.

Die Durchführung einer immunhistochemischen Färbung ist aktuell (noch) besser im klinischen Alltag anwendbar als eine reine Analyse mit der MALDI-IMS. Gründe hierfür sind, dass die Methode hohe technische Hürden aufweist, noch wenig verbreitet ist und daher auch bisher nur geringe Kapazitäten vorhanden sind (<https://www.bmbf.de/foerderungen/bekanntmachung-2148.html>). Für die weitere Entwicklung der Pathologie und Histologie und den damit verbundenen Möglichkeiten der

Automatisierung ist die Etablierung der Massenspektrometrie als Methode zu erwarten (Longuespée et al. 2016). Insbesondere ist durch die Nutzbarkeit von FFPE-Gewebe während der MALDI-IMS und IHC-Methode die Möglichkeit gegeben, auf die klinisch gängige Gewebearchivierungsmethode zurückzugreifen (Gemoll et al. 2011).

In dieser Arbeit wurden für die beiden zu validierenden Proteine unterschiedliche Chromogene verwendet. Die Färbung gegen SPTBN1 wurde mit DAB durchgeführt, die Färbung gegen UBE2N mit AEC. Mit AEC kann eine Färbung des Zellkerns genauer dargestellt werden als mit DAB. Da UBE2N je nach Interaktionspartner im Zellkern oder im Zellplasma vorkommen kann, wurde hierfür AEC als Chromogen gewählt (Andersen et al. 2005; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000177889-UBE2N/cell>). Für SPTBN1 ist als Lokalisation bisher nur das Zytoplasma bzw. der Golgi-Apparat bekannt, weswegen hierfür DAB verwendet wurde (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115306-SPTBN1/cell>). Trotz der Anwendung von AEC zeigte sich keine UBE2N-Färbung der Zellkerne, sodass der Fokus bei der Auswertung auf das Zytoplasma gelegt wurde. Es ist zu vermuten, dass sich die Proteine in kolorektalen Zellen vornehmlich im Zytoplasma finden. Bei fortführenden Versuchen wäre eine Verwendung von DAB für das UBE2N-Protein denkbar.

#### **4.2.1. Differenzierung durch Immunhistochemie**

Zur Einschätzung der Differenzierungsqualität von UBE2N nach der immunhistochemischen Färbung und software-basierten Auswertung wurde für das Trainings- und das Validierungsset ein Grenzwert kalkuliert, der diploide von aneuploiden Proben mit der höchsten Sensitivität und Spezifität unterscheiden kann. Dieser Grenzwert lag im Trainingsset bei 0,1957 (Sensitivität 66,7 % und Spezifität 85,7 %) und im Validierungsset bei 0,2066 (Sensitivität 82,1 %, Spezifität 60,0 %). Zwar lassen beide Sensitivität- und Spezifitätskombinationen noch keine Translation in die Klinik für z.B. eine optimierte Prognosestellung zu, jedoch bestätigt der sehr ähnliche Grenzwert die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Eine Anwendung in klinischen Studien erscheint daher mit dem erarbeiteten Protokoll gut umsetzbar. Zusätzlich konnte die manuelle Auswertung die Ergebnisse der automatischen Analyse bestätigen.

Durch Modifikationen der immunhistochemischen Färbung, wie z.B. eine Immunfluoreszenzfärbung oder alternative Antikörperhersteller könnte die IHC und hiermit die Testqualität möglicherweise weiter verbessert werden.

#### 4.2.2. UBE2N korreliert mit dem Ploidiestatus und dem Grading

Kolorektale Karzinome lassen sich durch den kalkulierten Grenzwert der Immunpositivität von UBE2N in zwei unabhängige Gruppen (diploid und aneuploid) unterteilen ( $p \leq 0,0049$ ). Es ergab sich hierbei eine Korrelation von hoher UBE2N-Expression mit dem Ploidiestatus (vgl. 3.3.2.). KRK, die als UBE2N-positiv getestet wurden, sind demnach durchschnittlich häufiger diploid als UBE2N-negative KRK. Diploide KRK haben gegenüber aneuploiden KRK zudem eine bessere Prognose, was sich in der Korrelationsanalyse nach Aufteilung in UBE2N positiv und -negativ jedoch nicht widerspiegelt (Sinicrope et al. 2006; Araujo et al. 2007). Insgesamt bestätigt die Korrelationsanalyse dennoch die Aussagekraft der immunhistochemischen Färbung und zeigte eine positive Validierung des Grenzwertes der IHC. Zudem bestand ein Zusammenhang von UBE2N-Status und Grading. UBE2N-negative Karzinome hatten demnach deutlich häufiger ein höheres Grading als UBE2N-positive Karzinome. Auf die molekularbiologischen Zusammenhänge zwischen der UBE2N-Expression und dem Ploidiestatus bzw. dem Grading wird in Abschnitt 4.4. eingegangen.

#### 4.3. Gewebekollektiv und Gewebeverluste

Sowohl mit dem für die MALDI-IMS verwendeten Gewebeschnitt als auch mit den in der IHC verwendeten Gewebeschnitten wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass bei beiden Methoden ein Teil des Gewebes verloren ging und nicht ausgewertet werden konnte. Der Verlust war bei der IHC verglichen mit der MALDI-IMS jedoch größer (MALDI-IMS: 45 auswertbare Proben; IHC SPTBN1: 39 bzw. UBE2N: 42 auswertbare Proben). Ursache könnten die zahlreichen Waschvorgänge und das Kochen zum Denaturieren der Proteine in der Mikrowelle während der immunhistochemischen Färbung des TMA sein, da Gewebestanden nicht sehr fest mit dem Objektträger verbunden sind (Oberländer et al. 2014).

Obwohl die analysierten Probenzahlen für statistische Analysen ausreichend waren, wurde eine zweite immunhistologische Validierung an einem größeren, unabhängigen Kollektiv (90 Proben, davon 71 auswertbare Proben) durchgeführt, um die gefundenen Ergebnisse weiter bestätigen zu können. Auch hier zeigte sich eine statistische Signifikanz zwischen den untersuchten Gruppen.

Alle immunhistologischen Validierungsexperimente wurden mittels eines Tissue Micro-Arrays (TMA) durchgeführt. Durch das Zusammenfassen der Proben in einem Array

ergeben sich mehrere Vorteile: So war es nicht nur möglich, eine deutliche Ersparnis an Zeit und Reagenzien zu erlangen, sondern auch gleiche Untersuchungsbedingungen zwischen den unterschiedlichen klinischen Proben zu gewährleisten. Besonders bei einer großen Anzahl auszuwertender Proben ist dies daher eine sehr vorteilhafte Methode (Bonini et al. 2002; Troyer 2008; Gemoll et al. 2011).

Sowohl das Trainingskollektiv als auch das Validierungskollektiv bestand aus „gematchten“ Proben (vgl. 2.1.1.). Durch das „matchen“ der Gewebeproben konnten zumeist gut vergleichbare Gruppengrößen (möglichst normalverteilt und mit ähnlicher Varianz) je klinischem Parameter erreicht werden. Somit können statistische Tests genauer durchgeführt und die Fehlerrate minimiert werden. Weiter war es über diesen Ansatz möglich, alle untersuchten prognostischen Faktoren gleichgewichtet zu analysieren.

Die Häufigkeiten der verwendeten Proben entsprachen jedoch nicht dem realen Vorkommen. So waren im Kollektiv Frauen und Männer in gleicher Häufigkeit repräsentiert. In Deutschland erkranken jährlich jedoch ca. 24 % mehr Männer als Frauen am kolorektalen Karzinom. Auch sind die UICC-Stadien 1 und 3 unterdurchschnittlich repräsentiert. Werden beispielsweise alle KRK des Kollektivs zusammen als Gruppe im Vergleich zu gesunden Mukosagewebe ausgewertet, entsteht so eine Verschiebung im Vergleich zur Realität (ZfKD und GEKID 2019).

#### **4.4. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N**

Die in der bildgebenden Massenspektrometrie zwischen diploiden und aneuploiden KRK-Geweben unterscheidenden  $m/z$ -Werte 1043.533 und 1203.898 konnten mit Hilfe der Ergebnisse der LC-MS/MS dem Protein Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (UBE2N) zugeordnet werden.

UBE2N war dabei in Mukosa höher exprimiert als in KRK und wurde nachfolgend immunhistochemisch sowohl im Trainings- als auch im Validierungsset bestätigt.

UBE2N ist ein ubiquitylierendes Enzym, welches Ubiquitinketten über die Lysinreste 48 und 63 bilden kann. Während die Ubiquitylierung am Lysin 48 von Proteinen zur Degradation und deren Abbau führt, beeinflusst die Ubiquitylierung über die Lysinreste 63 die DNA-Reparatur. (Hofmann und Pickart 1999).

UBE2N ist unter den Namen Bendless-like ubiquitin-conjugating enzyme, E2 ubiquitin-conjugating enzyme N, Ubc13, UbcH13, Ubiquitin carrier protein N und Ubiquitin-protein

ligase N bekannt und liegt auf Chromosom 12. Es wurde innerhalb der Zelle bisher im Cytoplasma und dem Nucleus beschrieben, weswegen wir uns für das Chromogen AEC aufgrund dessen guter Darstellung einer Kernfärbung entschieden haben (Marteijn et al. 2009; [https://www.uniprot.org/uniprot/P61088#subcellular\\_location](https://www.uniprot.org/uniprot/P61088#subcellular_location)). UBE2N bildet im Zytoplasma zusammen mit seinen beiden Bindungspartnern Ubiquitin conjugating enzyme variant MMS2 (Mms2) und Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A (Uev1a) Heterodimere aus. In Kombination mit Mms2 kann UBE2N im Nukleus die postreplikative DNA-Reparatur, z. B. über den RAD6-Signalweg beeinflussen und so genomische Instabilität verhindern (Ulrich und Jentsch 2000). Zusammen mit Uev1a ist zytoplasmatisches UBE2N hingegen ein Teil der Zellantwort gegen bakterielle, virale und parasitäre Infektionen (Hodge et al. 2016). Über eine direkte Interaktion kann UBE2N zudem den NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren, welcher sich außerdem durch hohe Konzentrationen an Uev1a in seiner Grundaktivität induzieren lässt (Yamamoto et al. 2006b). Ein aktivierter NF- $\kappa$ B-Signalweg kann nachfolgend zu einer verstärkten chronischen Entzündung sowie zu malignen Entartungen führen (Syed et al. 2006). Massenspektrometrisch konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch weder Mms2 noch Uev1a identifiziert werden.

Eine mögliche Erklärung für die UBE2N-Reduktion in KRK im Vergleich zur gesunden Mukosa könnte der Verlust von zytoplasmatischem UB2N bei gleichzeitiger Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sein (Yamamoto et al. 2006a; Yamamoto et al. 2006b). Dies kann zur Anreicherung von  $\beta$ -Catenin, einem Ziel des Wnt-Signalweges führen, welches an der Regulation von adenomatous polyposis coli (APC) beteiligt ist (Wu et al. 2009). Durch die Beteiligung von APC an der Zellmigration, Chromosomenteilung und somit genomischer (In)Stabilität kann hiermit eine maligne Entartung gefördert werden (Gavert und Ben-Ze'ev 2007; Kroboth et al. 2007). Reichert sich  $\beta$ -Catenin in den Vorläufern von Enterozyten an, können sich diese zu einem Stammzellphänotyp rückentwickeln und hierdurch Polypen als Basis von KRK bilden (vgl. Abbildung 6; Armaghany et al. 2012).

Ein weiterer Erklärungsansatz könnte in der UBE2N Mms2-Interaktion liegen. Das Heterodimer UBE2N/Mms2 ermöglicht zusammen mit dem DNA-Reparaturprotein RAD5 (RAD5) und der E3 Protein Ligase RNF8 oder RNF168 (RNF8/RNF168) bei Doppelstrangbrüchen oder Nukleotiddefekten über die Polyubiquitylierung von Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) die Reparatur mittels homologer Rekombination (Brun et al. 2008). Eine alternative Reparatur wird von der E3 ubiquitin-protein Ligase

(RAD18) und der Ubiquitin-conjugating enzyme E2 B (RAD6) vermittelt und führt zur fehleranfälligen Translasi-DNA-Synthese, welche für defekte Nukleotide mitunter zufällige Nukleotide einsetzt und so Mutationen begünstigt (Hedglin und Benkovic 2015). Die Reduktion von UBE2N im Tumor würde dementsprechend zu einer Anhäufung von Doppelstrangbrüchen führen und so dem Karzinom Wachstumsvorteile schaffen. (Andersen et al. 2005). Unterstützt wird diese These von den in dieser Arbeit gefundenen erhöhten UBE2N-Spiegel in Karzinomen mit diploidem Ploidiestatus im Vergleich zu aneuploiden Zellpopulationen.

Auch von anderen Forschungsgruppen wurde UBE2N bereits als differentiell exprimiertes Protein bei unterschiedlichen Fragestellungen evaluiert. So wurde UBE2N u.a. in Prostatakarzinomen beschrieben, bei denen eine hohe UBE2N-Konzentration mit einem kürzeren Überleben assoziiert war und somit kontrovers zu den hier vorgestellten Ergebnissen steht. (Singh und Sharma 2020). Auch für maligne Melanome wurde eine hohe UBE2N-Suppression gemessen: Dikshit und Kollegen detektierten eine Suppression von UBE2N, die nachfolgend zu einem geringeren Tumorstadium führte (Dikshit et al. 2018). In Neuroblastomen führte die Inhibition von UBE2N/Uev1a zu einem tumorsuppressivem Effekt (Cheng et al. 2014). Interessanterweise konnte bei Blasenkarzinomen und Hepatozellulären Karzinomen – ähnlich zu dieser Arbeit - ein gegenteiliger Effekt gefunden werden. Hier bewirkte eine Wiederherstellung des UBE2N-Spiegels eine Tumorsuppression (Zhang et al. 2017; Yan et al. 2019).

Die in der Literatur gegensätzliche Expression von UBE2N sind vor allem mit den gewählten Methoden und eingesetzten Modellen zu erklären. So wurden die Daten zum Prostatakarzinom und zum Melanom auf Basis von Zellkulturen erhoben. Zellkulturen sind hervorragende Modelle, um wissenschaftliche Theorien zu unterlegen sind jedoch nur eingeschränkt auf translationale Ansätze übertragbar. Eine Übertragung von Ergebnissen aus Zellkulturexperimenten auf klinisches Probenmaterial ist nicht trivial (Pastor et al. 2010). Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in der Verwendung unterschiedlicher Methoden und Expressionsebenen. Die oben beschriebenen UBE2N-Ergebnisse basierend zum Großteil auf Genomanalysen, die sich aufgrund von unterschiedlichen Regulationsmechanismen nicht auf die Proteinexpression spiegeln lassen können (Rehm und Letzel 2016). Zusätzlich wurde noch keine Studie veröffentlicht, die UBE2N im kolorektalen Karzinomen untersucht hat.

Zusammenfassend kann somit eine niedrige zytoplasmatische UBE2N-Konzentration die Folge einer genomischen Instabilität als Reparaturmechanismus sein und/oder durch die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-assoziierten Tumorprogression bedingt sein.

#### **4.4.1. UBE2N induziert genomische Instabilität**

Mit bildgebender Massenspektrometrie konnten diploide und aneuploide KRK differenziert werden, wobei UBE2N als Marker für diese Fragestellung immunhistologisch validiert wurde.

Diploide und aneuploide KRK unterscheidet unter anderem, dass mit Aneuploidie eine genomische Instabilität und eine erhöhte Tumorerheterogenität einhergeht (Duesberg et al. 2004; Bakhoun und Landau 2017). Vor diesem Hintergrund legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass auch die UBE2N-Expression eng mit dem Erhalt der genomischen Stabilität und zellulären Integrität assoziiert sind. Passend hierzu wurde eine im Vergleich hohe UBE2N-Expression in gesundem und genomisch stabilem Mukosagewebe gefunden. Zusätzlich korrelierte eine geringe UBE2N-Expression mit stark entdifferenzierten Karzinomen (G3). Im Einklang mit den gefundenen Resultaten, zeigen G3-differenzierte KRK-Tumore ein schlechteres Überleben als G1- oder G2-Geschwüre und weisen ebenfalls eine größeres Maß einer Zellheterogenität auf (Fleming et al. 2012; Sagaert et al. 2018). Daher könnte UBE2N als potentielles Therapieziel betrachtet werden.

#### **4.4.2. UBE2N als Therapieziel**

Mit den o.a. Ergebnissen zum KRK und den Zusammenhängen zur genomischen Instabilität könnten erhöhte UBE2N-Konzentrationen im Kern aufgrund der Zellantwort auf DNA-Schäden insbesondere in aneuploiden Proben ein Therapieziel darstellen (Araujo et al. 2007; Walther et al. 2008).. Interessant könnte in diesen Zusammenhang allerdings dann die Inhibition von UBE2N mittels NSC697923 sein. NSC697923 ist ein selektiver Inhibitor von zytoplasmatischen UBE2N und verhindert die Aktivität des UBE2N-Uev1a Komplex und somit die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges. Es wurde bereits gezeigt, dass der Inhibitor das Zellwachstum in Neuroblastom-Zelllinien hemmt und die Proliferation von Tumoren in Neuroblastom-Xenografts *in vivo* unterdrückt. Eine Hypothese könnte sein, den Komplex UBE2N-Uev1a in aneuploiden Tumoren zu hemmen, um mehr UBE2N-Proteine für die

Interaktion mit Mms2 zur Verfügung zu stellen und die DNA-Reparatur zu erhalten bzw. zu steigern.

Zusätzlich könnte die Inhibition von UBE2N durch die Ubiquitin thioesterase OTUB1 (OTUB1) ein interessanter Ansatz in der Klinik sein, da eine hohe Konzentration an OTUB1 beim kolorektalen Karzinomen mit Metastasierung und einer verschlechterten Prognose einhergeht und hierbei UBE2N-mediierte DNA-Reparaturmechanismen negativ beeinträchtigt werden (Sato et al. 2012; Zhou et al. 2014; Zhou et al. 2019). Eine Hemmung von OTUB1 könnte entsprechend mehr UBE2N freisetzen und die normale Zellfunktionen wieder herstellen.

Auch der direkte Bindungspartner von UBE2N, Uev1a, wurde bereits als Therapietarget für Karzinome in Zellkultur und Mausmodell untersucht (vgl. 4.4.). Wu et al. konnten für Kolon- und Brustkarzinome in Zellkulturmodellen zeigen, dass eine Reduktion von Uev1a mit einer geringeren Metastasierungsrate einhergeht (Wu et al. 2014; Wu et al. 2018).

Für alle potenziellen Therapieeinsätze muss jedoch die Rolle von UBE2N in kolorektalen Karzinomen zwingend weiter erforscht werden. Ausblickend könnte eine Einteilung in genomisch stabile und instabile KRKs für die Fragestellungen hilfreich sein.

#### **4.5.Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1**

Mit Hilfe der bildgebenden Massenspektrometrie und der anschließenden LC-MS/MS-Identifizierung konnte zwischen diploiden und aneuploiden KRK neben UBE2N das Protein Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (SPTBN1) detektiert werden.

Das Protein SPTBN1 ist ein Membranskelettprotein aus der Familie der Spectrine und auch unter den Namen Beta-II spectrin, Fodrin beta chain und Spectrin, non-erythroid beta chain 1 bekannt. Das Gen liegt auf Chromosom 2, wobei Synonym auch die Bezeichnung SPTB2 verwendet wird. SPTBN1 ist im Zytoskelett und der Plasmamembran lokalisiert und interagiert hier vornehmlich mit Actin und Calmodulin (Mohler et al. 2004; King et al. 2014). SPTBN1 beeinflusst u.a. die Differenzierung, Polarisierung und Adhäsion von Zellen (Bennett und Baines 2001; Tang et al. 2005).



#### **4.5.1. Immunhistochemie kann bildgebende Massenspektrometrie im Trend bestätigen**

Die SPTBN1-zugeordneten m/z-Werte 959.544 und 1203.898 zeigten in der MALDI-IMS höhere Intensitäten bei diploiden KRK verglichen mit aneuploiden KRK. Dies lässt auf eine höhere Konzentration von SPTBN1 in diploiden KRK im Vergleich zu aneuploiden KRK schließen. Immunhistochemisch konnte keine signifikant unterschiedlich starke Färbung zwischen diploidem und aneuploidem KRK-Gewebe festgestellt werden ( $p \leq 0,1361$ ). Im Trend waren jedoch diploide KRK-Gewebe stärker angefärbt als aneuploide Gewebe. Die fehlende Signifikanz könnte möglicherweise am methodisch bedingten Gewebeverlust bzw. am eingesetzten Antikörper liegen (Oberländer et al. 2014). Außerdem könnte durch die Nutzung eines größeren Kollektivs oder eines anderen Chromogens (z.B. Fluoreszenzfarbstoffe) ein signifikantes Niveau erreicht werden.

#### **4.5.2. SPTBN1-Expression ist kongruent zur Literatur**

Je nach Interaktionspartner beeinflusst SPTBN1 unterschiedliche Signalwege im Kontext der Karzinogenese und genomischer Instabilität. SPTBN1 wird z.B. von TGF- $\beta$  aktiviert und beeinflusst die Transkription u.a. von Fanconi anaemia group D2 (FANCD2) (Tang et al. 2003). So beeinflusst der Fanconi-Anämie (FA)-Signalweg die genomische Stabilität u.a. über DNA-Reparaturmechanismen wie homologe Rekombination und die Reparatur von Querverbindungen zwischen DNA-Strängen. Defekte im Signalweg führen nachfolgend zu maligner Entartung. Mit dem Signalweg sind bekannte mit Karzinom-assoziierte Proteine wie BRCA1/2 verbunden (Moldovan und D'Andrea 2009; Chen et al. 2017; Nepal et al. 2017).

Auch über den Wnt-Signalweg kann SPTBN1 Einfluss auf die Transkriptionsregulation und somit die Karzinogenese nehmen. Der Wnt-Signalweg wird dabei aktiviert und die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin unterbrochen. Dadurch kann  $\beta$ -Catenin akkumulieren und im Zellkern die Transkription, u.a. von zellteilungsfördernden Genen verstärken, was onkogene Effekte hervorruft (Heinrich et al. 2014; Zhi et al. 2015). Modifikationen des Wnt-Signalwegs wurden bereits für KRK und Pankreaskarzinome gezeigt (Tang et al. 2005; Jiang et al. 2010). Weiterhin beeinflusst SPTBN1 die Lokalisation von E-Cadherin. Durch den Verlust von SPTBN1 löst sich E-Cadherin aus den Zell-Zell-Kontakten. Dies vereinfacht das migrieren einer Zelle aus dem Zellverband, was die Voraussetzung für Metastasierung darstellt (Katuri et al. 2006; Böcker et al. 2012b).

Der Verlust von SPTBN1 wirkt sich über mindestens diese drei geschilderten Wege kanzerogen auf Zellen aus. Da aneuploide KRK in der Regel mit einer schlechteren Prognose als diploide KRK vergesellschaftet sind, erscheint die Expression von SPTBN1 essentiell für das Zellgleichgewicht zu sein.

#### **4.6.Ausblick UBE2N und bildgebende Massenspektrometrie**

Durch MALDI-IMS kann sowohl Mukosa von kolorektalem Karzinomgewebe als auch diploide von aneuploiden KRK-Geweben unterschieden werden. Die massenspektrometrischen Ergebnisse konnten für UBE2N immunhistochemisch validiert werden (Bakhoun und Landau 2017).

Durch den Vergleich von Gewebe gesunder Probanden mit dem Erkrankten konnte die bildgebende Massenspektrometrie in dieser Arbeit zeigen, dass sie sowohl histologisch erkennbare (Mukosa versus KRK-Gewebe) als auch histologisch nicht-erkennbare (diploide vs. aneuploide KRK) Unterschiede in Gewebe mit hoher Sensitivität differenzieren kann. Hierfür wurde UBE2N als differentielles Protein etabliert.

Viele Proteine wurden bereits als Biomarker für die Tumorerkennung und als Ansatz für kurative Behandlungsmaßnahmen bei KRK identifiziert und vorgeschlagen. Nur wenige sind jedoch zuverlässig und daher für die klinische Anwendung geeignet. Ursache hierfür sind oft technologische Einschränkungen/Verfügbarkeit oder fehlende Folgestudien zur Validierung und/oder Verifizierung (de Wit et al. 2013). Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine sind daher wertvolle Targets, da sie bereits histologisch an zwei unabhängigen Kohorten validiert wurde. Sie können als potenzielle, innovative Biomarker für die klinische Anwendung gesehen werden, die die personalisierte Medizin verbessern könnten, und sollten daher in prospektiven Multicenterstudien validiert werden.

Neben den in dieser Arbeit gewählten proteomischen Ansätzen eröffnen aber auch andere Technologien Möglichkeiten für die personalisierte Medizin, wie z. B. die gezielte- oder komplett-genomische Sequenzierung (Next Generation Sequencing, NGS). Die Kombination aus Gewebe-basierten genomischen, transkriptomischen und proteomischen Daten zusammen kann dazu beitragen, die personalisierte Therapie von KRK entscheidend zu verbessern. Hierdurch könnte die auf "Omics"-Daten basierende Forschung Präzisionsmedizin auf individueller Patientenebene ermöglichen.

## 5. Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome (KRK) verursachen weltweit jährlich über 800.000 Todesfälle. Es stehen Früherkennungsmaßnahmen zur Verfügung, welche von der Bevölkerung jedoch schlecht angenommen werden, was die bestmögliche Therapie in den Vordergrund rückt. Um in der Zukunft eine optimierte Prognose und Therapie für einzelne Patienten anbieten zu können, ist eine möglichst genaue Charakterisierung der Tumoreigenschaften notwendig. In dieser Arbeit konnten anhand von FFPE-Geweben und bildgebender Massenspektrometrie Proteinprofile erstellt werden, die sowohl gesunde Darmmukosa von kolorektalen Karzinomen, als auch genomisch stabile (diploide) von genomisch instabilen (aneuploiden) Tumoren unterschieden. Im Verlauf wurde das Protein UBE2N identifiziert und an zwei unabhängigen Kohorten immunhistochemisch validiert. Statistische Korrelationen zeigten eine enge Assoziation zwischen der UBE2N Expression und schlechter Differenzierung (G3).

Die Ergebnisse zeigen, dass Protein-Expressionsprofile der bildgebenden Massenspektrometrie einen potenziellen Wert für eine verbesserte molekulare Klassifizierung haben. Mit der Detektion und Validierung von UBE2N inklusive der engen Verbindung zu  $\beta$ -Catenin, APC und dem Wnt konnten neue prognostische Erkenntnisse beim kolorektalen Karzinom gewonnen werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aichler M, Walch A (2015): MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice. *Lab Invest* 95, 422–431
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P: Krebs. In: *Molekularbiologie der Zelle*. 6.; Wiley-VCH, Weinheim 2017, 1235–1297
- Altenhofen L (2016): Projekt Wissenschaftliche Begleitung von Früherkennungs-Koloskopien in Deutschland, Berichtszeitraum 2014. 12. Jahresbericht, Version 2.
- Andersen PL, Zhou H, Pastushok L, Moraes T, McKenna S, Ziola B, Ellison MJ, Dixit VM, Xiao W (2005): Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A. *J Cell Biol* 170, 745–755
- Araujo SEA, Bernardo WM, Habr-Gama A, Kiss DR, Ceconello I (2007): DNA ploidy status and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of published data. *Dis Colon Rectum* 50, 1800–1810
- Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G (2012): Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res GCR* 5, 19–27
- Bagci B, Sari M, Karadayi K, Turan M, Ozdemir O, Bagci G (2016): KRAS, BRAF oncogene mutations and tissue specific promoter hypermethylation of tumor suppressor SFRP2, DAPK1, MGMT, HIC1 and p16 genes in colorectal cancer patients. *Cancer Biomark Sect Dis Markers* 17, 133–143
- Bakhom SF, Landau DA (2017): Chromosomal Instability as a Driver of Tumor Heterogeneity and Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7
- Baldus C, Röcken C (2016): Tumorheterogenität. *Forum (Genova)* 31, 212–215
- Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut 2016
- Bennett V, Baines AJ (2001): Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 81, 1353–1392
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89–95
- Bocker T, Schlegel J, Kullmann F, Stumm G, Zirngibl H, Epplen JT, Rüschoff J (1996): Genomic instability in colorectal carcinomas: comparison of different evaluation methods and their biological significance. *J Pathol* 179, 15–19
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H: Kolon, Rektum und Analkanal. In: *Pathologie*. 5.; Elsevier GmbH, München 2012a, 592–622
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Höfler G, Kreipe H, Moch H: Tumorerkrankungen. In: *Pathologie*. 5.; Elsevier GmbH, München 2012b, 123–169

- Bokemeyer C, Köhne C-H, Ciardiello F, Lenz H-J, Heinemann V, Klinkhardt U, Beier F, Duecker K, van Krieken JH, Tejpar S (2015): FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 51, 1243–1252
- Boland CR, Goel A (2010): Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138, 2073-2087.e3
- Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F (2002): Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 48, 691–698
- Brun J, Chiu R, Lockhart K, Xiao W, Wouters BG, Gray DA (2008): hMMS2 serves a redundant role in human PCNA polyubiquitination. *BMC Mol Biol* 9, 24
- Caprioli RM, Farmer TB, Gile J (1997): Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 69, 4751–4760
- Casadonte R, Caprioli RM (2011): Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue by MALDI imaging mass spectrometry. *Nat Protoc* 6, 1695–1709
- Chen C-C, Yang S-H, Lin J-K, Lin T-C, Chen W-S, Jiang J-K, Wang H-S, Chang S-C (2005): Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer? *J Surg Res* 124, 169–174
- Chen Jian, Shukla V, Farci P, Andricovich J, Jogunoori W, Kwong LN, Katz LH, Shetty K, Rashid A, Su X, et al. (2017): Loss of the transforming growth factor- $\beta$  effector  $\beta$ 2-Spectrin promotes genomic instability. *Hepatology* 65, 678–693
- Cheng J, Fan Y-H, Xu X, Zhang H, Dou J, Tang Y, Zhong X, Rojas Y, Yu Y, Zhao Y, et al. (2014): A small-molecule inhibitor of UBE2N induces neuroblastoma cell death via activation of p53 and JNK pathways. *Cell Death Dis* 5, e1079
- de Wit M, Fijneman RJA, Verheul HMW, Meijer GA, Jimenez CR (2013): Proteomics in colorectal cancer translational research: biomarker discovery for clinical applications. *Clin Biochem* 46, 466–479
- Deliu IC, Georgescu EF, Bezna MC (2014): Analysis of prognostic factors in colorectal carcinoma. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 118, 808–816
- Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, Allen B, Bozic I, Reiter JG, Nowak MA, et al. (2012): The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 486, 537–540
- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J (1997): Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57, 4749–4756
- Dikshit A, Jin YJ, Degan S, Hwang J, Foster MW, Li C-Y, Zhang JY (2018): UBE2N promotes melanoma growth via MEK/FRA1/SOX10 signaling. *Cancer Res* 78, 6462–6472
- Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, et al. (2005): BRAF-V600E is not involved

- in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 24, 3995–3998
- Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, et al. (2013): Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 369, 1023–1034
- Drobatz KJ (2009): Measures of accuracy and performance of diagnostic tests. *J Vet Cardiol Off J Eur Soc Vet Cardiol* 11 Suppl 1, S33-40
- Duesberg P, Fabarius A, Hehlmann R (2004): Aneuploidy, the primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* 56, 65–81
- Fearon ER, Vogelstein B (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767
- Fedor HL, De Marzo AM (2005): Practical methods for tissue microarray construction. *Methods Mol Med* 103, 89–101
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386
- Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL (2012): Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 3, 153–173
- Florkowski CM (2008): Sensitivity, Specificity, Receiver-Operating Characteristic (ROC) Curves and Likelihood Ratios: Communicating the Performance of Diagnostic Tests. *Clin Biochem Rev* 29, S83–S87
- Gavert N, Ben-Ze'ev A (2007): beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 102, 820–828
- Gemoll T, Roblick UJ, Habermann JK (2011): MALDI mass spectrometry imaging in oncology (Review). *Mol Med Rep* 4, 1045–1051
- Gemoll T, Habermann JK, Lahmann J, Szymczak S, Lundgren C, Bündgen NK, Jungbluth T, Nordström B, Becker S, Lomnytska MI, et al. (2012): Protein profiling of genomic instability in endometrial cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS* 69, 325–333
- Gessel MM, Norris JL, Caprioli RM (2014): MALDI Imaging Mass Spectrometry: Spatial Molecular Analysis to Enable a New Age of Discovery. *J Proteomics* 0, 71–82
- Gey MH: Massenspektrometrie. In: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 3.; Springer, Berlin 2016, 315–341
- Hedglin M, Benkovic SJ (2015): Regulation of Rad6/Rad18 Activity During DNA Damage Tolerance. *Annu Rev Biophys* 44, 207–228
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L: Molekularbiologie. In: *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9.; Springer, Berlin 2014, 535–684

- Herold G: Gastroenterologie. In: Innere Medizin. Gerd Herold, Köln 2018, 432–571
- Hodge CD, Spyrapoulos L, Glover JNM (2016): Ubc13: the Lys63 ubiquitin chain building machine. *Oncotarget* 7, 64471–64504
- Hofmann RM, Pickart CM (1999): Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645–653
- Hsu SM, 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
- Jass JR (2007): Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130
- Jia M, Gao X, Zhang Y, Hoffmeister M, Brenner H (2016a): Different definitions of CpG island methylator phenotype and outcomes of colorectal cancer: a systematic review. *Clin Epigenetics* 8
- Jia M, Jansen L, Walter V, Tagscherer K, Roth W, Herpel E, Kloor M, Bläker H, Chang-Claude J, Brenner H, Hoffmeister M (2016b): No association of CpG island methylator phenotype and colorectal cancer survival: population-based study. *Br J Cancer* 115, 1359–1366
- Jiang X, Gillen S, Esposito I, Giese NA, Michalski CW, Friess H, Kleeff J (2010): Reduced expression of the membrane skeleton protein beta1-spectrin (SPTBN1) is associated with worsened prognosis in pancreatic cancer. *Histol Histopathol* 25, 1497–1506
- Katuri V, Tang Y, Li C, Jogunoori W, Deng C-X, Rashid A, Sidawy AN, Evans S, Reddy EP, Mishra B, Mishra L (2006): Critical interactions between TGF-beta signaling/ELF, and E-cadherin/beta-catenin mediated tumor suppression. *Oncogene* 25, 1871–1886
- King MDA, Phillips GW, Bignone PA, Hayes NVL, Pinder JC, Baines AJ (2014): A conserved sequence in calmodulin regulated spectrin-associated protein 1 links its interaction with spectrin and calmodulin to neurite outgrowth. *J Neurochem* 128, 391–402
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844–847
- Kriegsmann J, Casadonte R, Zweynert F, Kriegsmann M, Otto M, Deininger S (2013): [MALDI-TOF imaging]. *Z Rheumatol* 72, 724–728
- Kriegsmann J, Casadonte R, Kriegsmann K, Longuespée R, Kriegsmann M (2018): Mass spectrometry in pathology - Vision for a future workflow. *Pathol Res Pract* 214, 1057–1063
- Kroboth K, Newton IP, Kita K, Dikovskaya D, Zumbrunn J, Waterman-Storer CM, Nähnke IS (2007): Lack of adenomatous polyposis coli protein correlates with a decrease in

- cell migration and overall changes in microtubule stability. *Mol Biol Cell* 18, 910–918
- Lanni EJ, Rubakhin SS, Sweedler JV (2012): Mass spectrometry imaging and profiling of single cells. *J Proteomics* 75, 5036–5051
- Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, Lu S, Kemberling H, Wilt C, Luber BS, et al. (2017): Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 357, 409–413
- Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O (2008): Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma* 55, 138–142
- Liu X, Cheng D, Kuang Q, Liu G, Xu W (2014): Association of UGT1A1\*28 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians. *Pharmacogenomics J* 14, 120–129
- Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM (1990): Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 14, 524–537
- Longuespée R, Casadonte R, Kriegsmann M, Pottier C, Picard de Muller G, Delvenne P, Kriegsmann J, De Pauw E (2016): MALDI mass spectrometry imaging: A cutting-edge tool for fundamental and clinical histopathology. *Proteomics Clin Appl* 10, 701–719
- Marteijn JA, van der Meer LT, Smit JJ, Noordermeer SM, Wissink W, Jansen P, Swarts HG, Hibbert RG, de Witte T, Sixma TK, et al. (2009): The ubiquitin ligase Triad1 inhibits myelopoiesis through UbcH7 and Ubc13 interacting domains. *Leukemia* 23, 1480–1489
- Marusyk A, Polyak K (2010): Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* 1805, 105
- Mas S, Torro A, Fernández L, Bec N, Gongora C, Larroque C, Martineau P, de Juan A, Marco S (2020): MALDI imaging mass spectrometry and chemometric tools to discriminate highly similar colorectal cancer tissues. *Talanta* 208, 120455
- Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, Deenen MJ, Froehlich TK, Amstutz U, Largiadèr CR, Jennings BA, Marinaki AM, Sanderson JD, et al. (2015): Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 16, 1639–1650
- Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, et al. (2012): Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486, 532–536
- Mohler PJ, Yoon W, Bennett V (2004): Ankyrin-B targets beta2-spectrin to an intracellular compartment in neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 279, 40185–40193



- Moldovan G-L, D'Andrea AD (2009): How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet* 43, 223–249
- Morkel M, Riemer P, Bläker H, Sers C (2015): Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget* 6, 20785–20800
- Nagasaka T, Koi M, Kloor M, Gebert J, Vilkin A, Nishida N, Shin SK, Sasamoto H, Tanaka N, Matsubara N, et al. (2008): Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 134, 1950–1960, 1960.e1
- Nazemalhosseini Mojarad E, Kuppen PJ, Aghdaei HA, Zali MR (2013): The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 6, 120–128
- Neagu A-N (2019): Proteome Imaging: From Classic to Modern Mass Spectrometry-Based Molecular Histology. *Adv Exp Med Biol* 1140, 55–98
- Nepal M, Che R, Ma C, Zhang J, Fei P (2017): FANCD2 and DNA Damage. *Int J Mol Sci* 18
- Oberländer M, Alkemade H, Bünger S, Ernst F, Thorns C, Braunschweig T, Habermann JK (2014): A „waterfall“ transfer-based workflow for improved quality of tissue microarray construction and processing in breast cancer research. *Pathol Oncol Res* 20, 719–726
- Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, et al. (2017): Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 18, 1182–1191
- Pancione M, Remo A, Colantuoni V (2012): Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathol Res Int* 2012
- Pastor DM, Poritz LS, Olson TL, Kline CL, Harris LR, Koltun WA, Chinchilli VM, Irby RB (2010): Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. *Int J Clin Exp Med* 3, 69–83
- Pino MS, Chung DC (2010): The chromosomal instability pathway in cancer. *Gastroenterology* 138, 2059–2072
- Quanico J, Franck J, Wisztorski M, Salzert M, Fournier I (2017a): Combined MALDI Mass Spectrometry Imaging and Parafilm-Assisted Microdissection-Based LC-MS/MS Workflows in the Study of the Brain. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1598, 269–283
- Quanico J, Franck J, Wisztorski M, Salzert M, Fournier I (2017b): Progress and Potential of Imaging Mass Spectrometry Applied to Biomarker Discovery. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1598, 21–43

- Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M (2003): Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 75, 663–670
- Rehm H, Letzel T: Proteomics. In: *Proteinbiochemie Proteomics*. 7.; Springer, Berlin 2016, 233–346
- Riede U-N, Werner M: Dickdarm. In: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2.; Springer, Berlin 2017a, 497–510
- Riede U-N, Werner M: Neubildung/Neoplasie. In: *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 2.; Springer, Berlin 2017b, 227–278
- Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S (2018): Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiol J Immunopathol Mol Cell Biol* 85, 72–84
- Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML (2005): Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 129, 837–845
- Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, Zagonel V, Leone F, Depetris I, Martinelli E, et al. (2016): Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17, 738–746
- Sato Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Miyamoto R, Nakada S, Fukai S (2012): Molecular basis of Lys-63-linked polyubiquitination inhibition by the interaction between human deubiquitinating enzyme OTUB1 and ubiquitin-conjugating enzyme UBC13. *J Biol Chem* 287, 25860–25868
- Schlegel J, Bocker T, Zirngibl H, Hofstädter F, Rüschoff J (1995): Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening technique. *Virchows Arch Int J Pathol* 426, 223–227
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M: Kapitel IX, Funktionen des Magen-Darm-Trakts, Abschnitt 38.8 Kolon und Rektum. In: *Physiologie des Menschen*. 31.; Springer, Heidelberg 2017, 820–822
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U: Abdomen und Becken. In: *LernAtlas der Anatomie - Innere Organe*. Band 2; 3.; Georg Thieme, Stuttgart 2012, 196–398
- Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 39, 741–748
- Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A (2017): Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67, 177–193

- Singh AN, Sharma N (2020): Quantitative SWATH-Based Proteomic Profiling for Identification of Mechanism-Driven Diagnostic Biomarkers Conferring in the Progression of Metastatic Prostate Cancer. *Front Oncol* 10, 493
- Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, French AJ, Laurie JA, Goldberg RM, Thibodeau SN, Witzig TE (2006): Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* 131, 729–737
- Strimbu K, Tavel JA (2010): What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5, 463–466
- Syed NA, Andersen PL, Warrington RC, Xiao W (2006): Uev1A, a ubiquitin conjugating enzyme variant, inhibits stress-induced apoptosis through NF-kappaB activation. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 11, 2147–2157
- Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng C-X, Mishra L (2003): Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 299, 574–577
- Tang Y, Katuri V, Srinivasan R, Fogt F, Redman R, Anand G, Said A, Fishbein T, Zasloff M, Reddy EP, et al. (2005): Transforming growth factor-beta suppresses nonmetastatic colon cancer through Smad4 and adaptor protein ELF at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res* 65, 4228–4237
- Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G (2010): The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arzteblatt Int* 107, 760–766
- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015): Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65, 87–108
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP (1999): CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8681–8686
- Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O, Desai J (2011): Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 117, 4623–4632
- Troyer D (2008): Biorepository standards and protocols for collecting, processing, and storing human tissues. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 441, 193–220
- Ulfig N: Verdauungsapparat. In: *Kurzlehrbuch Histologie*. 2.; Georg Thieme, Stuttgart 2005, 117–148
- Ulrich HD, Jentsch S (2000): Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *EMBO J* 19, 3388–3397
- Umar A (2004): Lynch syndrome (HNPCC) and microsatellite instability. *Dis Markers* 20, 179–180
- Wagener C, Müller O: Mechanismen der Tumorentstehung. In: *Molekulare Onkologie*. 3.; Georg Thieme, Stuttgart 2010a, 77–133

- Wagener C, Müller O: Transkription. In: Molekulare Onkologie. 3.; Georg Thieme, Stuttgart 2010b, 134–176
- Walther A, Houlston R, Tomlinson I (2008): Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut* 57, 941–950
- Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N (2001): Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48, 821–829
- Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Yamada H, Hayama T, Inoue E, Tamura J, et al. (2012): Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 30, 2256–2264
- Wolters DA, Washburn MP, Yates JR (2001): An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 73, 5683–5690
- Wu JM, Halushka MK, Argani P (2010): Intratumoral heterogeneity of HER-2 gene amplification and protein overexpression in breast cancer. *Hum Pathol* 41, 914–917
- Wu X, Yamamoto M, Akira S, Sun S-C (2009): Regulation of hematopoiesis by the K63-specific ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20836–20841
- Wu Z, Shen S, Zhang Z, Zhang W, Xiao W (2014): Ubiquitin-conjugating enzyme complex Uev1A-Ubc13 promotes breast cancer metastasis through nuclear factor- $\kappa$ B mediated matrix metalloproteinase-1 gene regulation. *Breast Cancer Res BCR* 16, R75
- Wu Z, Neufeld H, Torlakovic E, Xiao W (2018): Uev1A-Ubc13 promotes colorectal cancer metastasis through regulating CXCL1 expression via NF- $\kappa$ B activation. *Oncotarget* 9, 15952–15967
- Yamamoto M, Sato S, Saitoh T, Sakurai H, Uematsu S, Kawai T, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S (2006a): Cutting Edge: Pivotal Function of Ubc13 in Thymocyte TCR Signaling. *J Immunol* 177, 7520–7524
- Yamamoto M, Okamoto T, Takeda K, Sato S, Sanjo H, Uematsu S, Saitoh T, Yamamoto N, Sakurai H, Ishii KJ, et al. (2006b): Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 7, 962–970
- Yan H, Ren S, Lin Q, Yu Y, Chen C, Hua X, Jin H, Lu Y, Zhang H, Xie Q, et al. (2019): Inhibition of UBE2N-dependent CDK6 protein degradation by miR-934 promotes human bladder cancer cell growth. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 33, 12112–12123
- ZfKD, GEKID Krebs in Deutschland. Robert Koch-Institut, Berlin 2019
- Zhang E, Liu Q, Wang Y, Wang H, He L, Jin X, Li N (2017): MicroRNA miR-147b promotes tumor growth via targeting UBE2N in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 8, 114072–114080

- Zhi X, Lin L, Yang S, Bhuvaneshwar K, Wang H, Gusev Y, Lee M-H, Kallakury B, Shivapurkar N, Cahn K, et al. (2015):  $\beta$ II-Spectrin (SPTBN1) suppresses progression of hepatocellular carcinoma and Wnt signaling by regulation of Wnt inhibitor kallistatin. *Hepatology* 61, 598–612
- Zhou Y, Wu J, Fu X, Du W, Zhou L, Meng X, Yu H, Lin J, Ye W, Liu J, et al. (2014): OTUB1 promotes metastasis and serves as a marker of poor prognosis in colorectal cancer. *Mol Cancer* 13, 258
- Zhou Y, Jia Q, Meng X, Chen D, Zhu B (2019): ERR $\alpha$  Regulates OTUB1 Expression to Promote Colorectal Cancer Cell Migration. *J Cancer* 10, 5812–5819
- Bundesministerium für Bildung und Forschung.  
<https://www.bundesanzeiger.de/pub/de/amtliche-veroeffentlichung?3>; Zugriff am 26.11.2020
- <https://amboss.miamed.de/library#xid=qK0ChS&term=Verdauung>.  
<https://amboss.miamed.de/library#xid=qK0ChS&term=Verdauung>; Zugriff am 14.11.2017
- <https://www.amboss.com/de/library#xid=rK0f3S&anker=Z2fca41c82a5e0c7584e006cb695f9395>.  
<https://www.amboss.com/de/library#xid=rK0f3S&anker=Z2fca41c82a5e0c7584e006cb695f9395>; Zugriff am 03.07.2020
- <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html>.  
<https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html>; Zugriff am 12.04.2018
- <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html>.  
<https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/021-007OL.html>; Zugriff am 07.01.2020
- <https://www.bmbf.de/foerderungen/bekanntmachung-2148.html>.  
<https://www.bmbf.de/foerderungen/bekanntmachung-2148.html>; Zugriff am 23.05.2021
- <https://www.brown.edu/research/facilities/proteomics/about/people>.  
<https://www.brown.edu/research/facilities/proteomics/about/people>; Zugriff am 08.08.2020
- <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115306-SPTBN1/cell>.  
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000115306-SPTBN1/cell>; Zugriff am 29.01.2019
- <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000177889-UBE2N/cell>.  
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000177889-UBE2N/cell>; Zugriff am 29.01.2019
- [https://www.uniprot.org/uniprot/P61088#subcellular\\_location](https://www.uniprot.org/uniprot/P61088#subcellular_location).  
[https://www.uniprot.org/uniprot/P61088#subcellular\\_location](https://www.uniprot.org/uniprot/P61088#subcellular_location); Zugriff am 29.01.2019

<http://www.abcam.com/kits/permeabilization-for-ihc>.

<http://www.abcam.com/kits/permeabilization-for-ihc>; Zugriff am 11.05.2018

## 7. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
a	aneuploid
AEC	2,3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	adenomatous polyposis coli Protein
AUC	Area under the curve (Bereich unter der Kurve)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BRCA1/2	Breast Cancer 1 und 2, early onset
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CEA	Karzinoembryonales Antigen
CG	Cytosin Guanin
CIN	Chromosomale Instabilität
CIMP	CpG-Insel-Methylierungs Phänotyp
CIMP-h	hochgradige CpG-Insel-Methylierung
CIMP-l	geringgradige CpG-Insel-Methylierung
CpG	Cytosin-phosphytidyl-Guanin
d	diploid
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DCO	death certificate only
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ENO1	alpha-Enolase
et al.	et alii (und andere)
FANCD2	Fanconi anemia group D2 Protein
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FFPE	Formalin-fixed, paraffine-embedded (Formalin-fixiert, Paraffin-gebettet)
GS	Gigasamples
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
Her2-neu	human epidermal growth factor receptor 2-neu
hMLH1	human MutL homolog 1
hMSH2	human MutS protein homolog 2
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
IMS	Bildgebende Massenspektrometrie
ITO	Indium-Zinnoxid
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog

KRK	Kolorektales Karzinom
L	Liter
LC	Liquid Chromotography (Flüssigchromatographie)
LOH	Loss of heterozygosity (Verlust von Heterozygotität)
LTQ	Linear Trap Quadrupole (Lineare Quadrupol-Ionenfalle)
m	männlich
m/z	Massen-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix assistierte Laser Desorption/Ionisation
min	Minuten
mL	Milliliter
MMR	Mismatch repair (Fehlpaarungsreparatur)
Mms2	Ubiquitin konjugierendes Enzym MMS2
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MS	Massenspektrometrie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatellitenstabilität
MYC	Myc Protein
n	Anzahl
N	Stickstoff
NF-κB	nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
nL	Nanoliter
nLC	nanoLC
nm	Nanometer
NPW	negativ prädiktiver Wert
OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1
p16	Protein p16
p53	Protein p53
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
pH	potentia hydrogenii
pM	pathologisch bestimmter Metastasierungsstatus
pN	pathologisch bestimmter Lymphknotenstatus
ppm	parts per million
PPW	positiv prädiktiver Wert
pT	pathologisch bestimmter Tumorstatus
pMS2	pMS1 homolog 2
R	Auflösung
RAD5	DNA-Reparaturprotein RAD5
RAD6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 B
RAD18	E3 ubiquitin-protein Ligase RAD 18
RAS	Rat sarcoma protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNF8	E3 Protein Ligase RNF8
RNF168	E3 Protein Ligase RNF168



RKI	Robert-Koch-Institut
ROC	Receiver Operating Characteristics
s	Sekunden
sog.	sogenannt(e)
SPE	Festphasenextraktion
SPTBN1	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1
TGF- $\beta$	transforming growth factor-beta
TAGLN2	Transgelin-2
TMA	Tissue Microarray
TNM	Tumor-, Nodus (Lymphknoten)- und Metastasenausdehnung
TOF	Time of flight (Flugzeit)
u.a.	unter anderem
UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
Uev1a	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1A
UICC	Union International Contre le Cancer (Internationale Union gegen den Krebs)
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
w	weiblich
W	Watt
Wnt	Wingless Int-1
z. B.	zum Beispiel
$\mu$ L	Microliter
$\mu$ m	Micrometer
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

## 8. Anhang

### 8.1. Amsterdam II-Klassifikation des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinoms

Alle Kriterien müssen zur Diagnosestellung erfüllt sein.

1. Mindestens 3 Familienangehörige mit HNPCC-assoziiertem Karzinom (Endometrium, Dünndarm, Urothel, Kolon, Rektum)
2. Einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen
3. Erkrankungen in mindestens zwei aufeinander folgenden Generationen
4. Mindestens ein Patient mit der Diagnose eines Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr

(Herold 2018)

### 8.2. Klinische Daten des Trainingssets aufgeschlüsselt nach Patienten

**Tabelle 22. Klinische Daten des Trainingssets.** Alle im Trainingsset enthaltenen Gewebeproben und deren klinische Daten sind aufgeführt. Jede Zeile entspricht einem Patienten, wobei von jedem Patienten im Trainingsset zwei Tumorgewebeproben vorhanden sind. <sup>m</sup>: Patienten, von denen auch Mukosagewebe vorlag. m: männlich; w: weiblich; d: diploid; a: aneuploid; pT: pathologisch gesichertes Tumorstadium in der TNM-Klassifikation; pN: pathologisch gesichertes Lymphknotenstadium in der TNM-Klassifikation; pM: pathologisch gesichertes Metastasenstadium in der TNM-Klassifikation; UICC: Stadium in der UICC-Klassifikation.

Ge- schlecht	Alter [Jahre]	Ploidie- status	pT	pN	pM	grading	UICC	Überleben [Monate]	
m	59	d	3	0	0	2	2	90,0	m
w	71	d	3	0	0	2	2	63,6	
w	75	d	3	0	0	2	2	57,6	
m	58	d	3	0	0	2	2	40,8	m
w	78	d	4	0	0	2	2	50,4	m
m	77	d	2	1	0	3	3	114,0	m
m	57	d	3	1	0	2	3	64,8	
w	52	d	2	1	0	2	3	142,0	m
w	73	d	4	2	0	3	3	18,0	
m	60	d	4	1	1	2	4	57,6	
m	74	a	3	0	0	2	2	142	m
m	47	a	3	0	0	3	2	133	m
w	74	a	3	0	0	2	2	176	
w	78	a	3	0	0	2	2	39,6	
m	64	a	3	0	0	3	2	55,2	
m	60	a	3	2	0	2	3	82,5	m
m	66	a	4	2	0	3	3	145	m
w	74	a	3	2	0	3	3	10,8	m
w	63	a	3	1	0	2	3	27,6	
w	63	a	3	2	1	2	4	37,2	

### 8.3. Klinische Daten des Validierungssets aufgeschlüsselt nach Patienten

**Tabelle 23. Klinische Daten des Validierungssets.** Jeder Patient wird in der Tabelle durch eine Zeile dargestellt. Mit <sup>m</sup> sind alle Gewebe markiert, von denen auch Mukosagewebe vorlag. Zusätzlich wurde Mukosagewebe von 3 Patienten verwendet, deren KRK-Gewebe hier nicht aufgeführt ist. m: männlich; w: weiblich; d: diploid; a: aneuploid; pT: pathologisch gesichertes Tumorstadium in der TNM-Klassifikation; pN: pathologisch gesichertes Lymphknotenstadium in der TNM-Klassifikation; pM: pathologisch gesichertes Metastasenstadium in der TNM-Klassifikation; UICC: Stadium in der UICC-Klassifikation.

Ge- schlecht	Alter [Jahre]	Ploidie- status	pT	pN	pM	grading	UICC	Überleben [Monate]	
m	57	d	3	0	0	2	2a	52,1	m
m	86	d	3	0	0	2	2a	2,5	
m	82	d	2	0	0	2	1	2,4	
w	58	d	2	0	0	2	1	54,9	
w	72	d	2	0	0	2	1	106,6	
w	70	d	2	0	0	3	1	95,9	m
m	80	d	3	0	0	2	2a	132,7	
w	71	d	3	0	0	3	2a	65,4	
m	76	d	3	0	0	2	2a	80,1	
m	65	d	3	0	0	2	2a	134,0	
m	64	d	3	0	0	2	2a	61,1	m
w	71	d	3	0	0	2	2a	63,6	
m	70	d	1	0	0	2	1	81,0	
w	57	d	2	0	0	2	1	166,9	
w	50	d	2	0	0	2	1	150,4	
w	61	d	2	1a	0	2	3a	24,9	m
w	70	d	2	1a	0	1	3a	36,7	m
m	85	d	3	1a	0	2	3b	30,8	m
w	84	d	4a	2a	0	2	3c	36,2	
m	72	d	4b	2b	0	2	3c	21,8	
m	72	d	2	1b	0	3	3a	37,3	
w	78	d	4b	1b	0	3	3c	5,0	
m	90	d	3	1a	0	2	3b	17,6	m
m	62	d	2	1a	0	3	3a	70,8	
w	74	d	4a	1a	0	2	3b	131,5	
m	66	d	3	1b	0	3	3b	64,8	
m	57	d	3	1b	0	1	3b	66,4	
w	57	d	3	1a	0	2	3b	183,1	m
w	67	d	3	1a	0	1	3b	122,5	
w	54	d	3	1a	0	3	3b	118,2	
m	78	a	3	0	0	2	2a	28,6	
m	62	a	3	0	0	2	2a	59,3	
m	81	a	3	0	0	2	2a	43,2	m
w	81	a	3	0	0	3	2a	1,8	m
w	75	a	3	0	0	2	2a	1,8	
m	73	a	4b	0	0	3	2c	2,2	
w	71	a	3	0	0	2	2a	27,6	
w	81	a	3	0	0	2	2a	0,5	
m	58	a	3	0	0	2	2a	97,2	m
m	64	a	3	0	0	3	2a	63,8	
m	56	a	3	0	0	3	2a	66,0	
w	68	a	3	0	0	2	2a	157,5	
w	77	a	3	0	0	2	2a	141,1	
w	72	a	3	0	0	3	2a	89,7	

Ge- schlecht	Alter [Jahre]	Ploidie- status	pT	pN	pM	grading	UICC	Überleben [Monate]	
w	69	a	4b	0	0	2	2c	88,5	
m	66	a	3	2a	0	2	3b	3,1	
m	58	a	3	2a	0	2	3b	43,5	
m	72	a	3	2a	0	3	3b	5,7	
m	64	a	3	1b	0	2	3b	44,2	
w	54	a	4b	1a	0	2	3c	40,5	
w	52	a	3	2b	0	3	3c	30,7	
w	82	a	3	2b	0	3	3c	10,0	m
m	73	a	3	1a	0	2	3b	96,9	m
m	57	a	4b	1a	0	2	3c	112,3	m
m	72	a	3	1a	0	2	3b	61,0	
m	69	a	3	1b	0	2	3b	61,0	
w	77	a	2	1a	0	2	3a	117,4	
w	62	a	3	1b	0	3	3b	92,2	
w	68	a	1	1a	0	2	3a	144,0	
w	50	a	3	1b	0	2	3b	140,9	m

## 8.4. Proteindatenbank des Trainingssets

Im Folgenden sind die im Trainingsset enthaltenen und anhand der LC-MS/MS identifizierten Proteine aufgeführt.

10 kDa heat shock protein, mitochondrial  
 14-3-3 protein beta/alpha;14-3-3 protein beta/alpha, N-terminally processed  
 14-3-3 protein epsilon  
 14-3-3 protein eta  
 14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed  
 14-3-3 protein gamma;14-3-3 protein gamma, N-terminally processed;14-3-3 protein beta/alpha;14-3-3 protein beta/alpha, N-terminally processed;14-3-3 protein zeta/delta;14-3-3 protein eta;14-3-3 protein theta;14-3-3 protein epsilon;14-3-3 protein sigma  
 14-3-3 protein theta  
 14-3-3 protein zeta/delta  
 26S protease regulatory subunit 6B  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2  
 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3  
 28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein  
 28S ribosomal protein S23, mitochondrial  
 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial  
 3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial  
 40S ribosomal protein S10  
 40S ribosomal protein S10;Putative 40S ribosomal protein S10-like  
 40S ribosomal protein S11  
 40S ribosomal protein S12  
 40S ribosomal protein S13  
 40S ribosomal protein S14  
 40S ribosomal protein S16  
 40S ribosomal protein S17-like;40S ribosomal protein S17  
 40S ribosomal protein S18  
 40S ribosomal protein S19

40S ribosomal protein S20  
 40S ribosomal protein S21  
 40S ribosomal protein S23  
 40S ribosomal protein S24  
 40S ribosomal protein S25  
 40S ribosomal protein S27;40S ribosomal protein S27-like  
 40S ribosomal protein S28  
 40S ribosomal protein S29  
 40S ribosomal protein S3  
 40S ribosomal protein S30  
 40S ribosomal protein S3a  
 40S ribosomal protein S4, X isoform  
 40S ribosomal protein S4, X isoform;40S ribosomal protein S4, Y isoform 1  
 40S ribosomal protein S4, X isoform;40S ribosomal protein S4, Y isoform 1;40S ribosomal protein S4, Y isoform 2  
 40S ribosomal protein S6  
 40S ribosomal protein S7  
 40S ribosomal protein S8  
 40S ribosomal protein S9  
 40S ribosomal protein SA  
 4F2 cell-surface antigen heavy chain  
 4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase  
 60 kDa heat shock protein, mitochondrial  
 60S acidic ribosomal protein P0  
 60S acidic ribosomal protein P1  
 60S acidic ribosomal protein P2  
 60S acidic ribosomal protein P2;60S acidic ribosomal protein P1  
 60S ribosomal protein L10  
 60S ribosomal protein L10;60S ribosomal protein L10-like  
 60S ribosomal protein L10a  
 60S ribosomal protein L11

60S ribosomal protein L12	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15
60S ribosomal protein L13	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 1
60S ribosomal protein L13a;Putative 60S ribosomal protein L13a protein RPL13AP3	Acylamino-acid-releasing enzyme
60S ribosomal protein L15	Acyl-CoA-binding protein
60S ribosomal protein L15;Ribosomal protein L15	Adenine phosphoribosyltransferase
60S ribosomal protein L18	Adenosylhomocysteinase
60S ribosomal protein L18a	Adenylyl cyclase-associated protein;Adenylyl cyclase-associated protein 1
60S ribosomal protein L19;Ribosomal protein L19	Adenylyl cyclase-associated protein;Adenylyl cyclase-associated protein 2
60S ribosomal protein L21	ADP/ATP translocase 2;ADP/ATP translocase 2, N-terminally processed
60S ribosomal protein L22	ADP/ATP translocase 3;ADP/ATP translocase 3, N-terminally processed
60S ribosomal protein L23a	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 3
60S ribosomal protein L24	ADP-ribosylation factor-like protein 8B;ADP-ribosylation factor-like protein 8A
60S ribosomal protein L26;60S ribosomal protein L26-like 1	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 2
60S ribosomal protein L27a	AH receptor-interacting protein
60S ribosomal protein L28	A-kinase anchor protein 12
60S ribosomal protein L29	A-kinase anchor protein 8-like
60S ribosomal protein L3	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic
60S ribosomal protein L31	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]
60S ribosomal protein L32	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial
60S ribosomal protein L34	Aldose reductase
60S ribosomal protein L35	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B
60S ribosomal protein L35a	Alpha-1-acid glycoprotein 1
60S ribosomal protein L36	Alpha-1-antitrypsin;Short peptide from AAT
60S ribosomal protein L4	Alpha-2-HS-glycoprotein;Alpha-2-HS-glycoprotein chain A;Alpha-2-HS-glycoprotein chain B
60S ribosomal protein L5	Alpha-2-macroglobulin
60S ribosomal protein L6	Alpha-actinin-1
60S ribosomal protein L7	Alpha-actinin-4
60S ribosomal protein L7a	Alpha-adducin
60S ribosomal protein L8	Alpha-centractin
60S ribosomal protein L9	Alpha-crystallin B chain
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Alpha-enolase
78 kDa glucose-regulated protein	Alpha-enolase;Enolase
Abl interactor 1	Alpha-enolase;Enolase;Gamma-enolase;Beta-enolase
Abl interactor 2	Alpha-internexin
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Alpha-synuclein
Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A;Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	Amine oxidase [flavin-containing] A
Aconitate hydratase, mitochondrial	AMP deaminase 2
Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle	Amyloid beta A4 protein;N-APP;Soluble APP-alpha;Soluble APP-beta;C99;Beta-amyloid protein 42;Beta-amyloid protein 40;C83;P3(42);P3(40);C80;Gamma-secretase C-terminal fragment 59;Gamma-secretase C-terminal fragment 57;Gamma-secretase C-terminal fragment 50;C31;Amyloid-like protein 2
Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle;Actin, alpha skeletal muscle	Amyloid beta A4 protein;N-APP;Soluble APP-alpha;Soluble APP-beta;C99;Beta-amyloid protein 42;Beta-amyloid protein 40;C83;P3(42);P3(40);C80;Gamma-secretase C-terminal fragment 59;Gamma-secretase C-terminal fragment 57;Gamma-secretase C-terminal fragment 50;C31
Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed	Ankyrin-2
Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed;Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle;Actin, alpha skeletal muscle	Annexin A1
Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed;Beta-actin-like protein 2;Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle;Actin, alpha skeletal muscle	Annexin A1;Annexin
Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed;POTE ankyrin domain family member F;Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, alpha skeletal muscle;POTE ankyrin domain family member E;POTE ankyrin domain family member I;POTE ankyrin domain family member J;Putative beta-actin-like protein 3;Putative beta-actin-like protein 3, N-terminally processed	Annexin;Annexin A2
Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed;Actin, cytoplasmic 1;Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed;POTE ankyrin domain family member F;Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, gamma-enteric smooth muscle;Actin, aortic smooth muscle;Actin, alpha skeletal muscle;POTE ankyrin domain family member E;POTE ankyrin domain family member I	Annexin;Annexin A2;Putative annexin A2-like protein
Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	Annexin;Annexin A4
Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	Annexin;Annexin A5
	Annexin;Annexin A6
	Antigen peptide transporter 1
	AP-2 complex subunit alpha-1
	AP-2 complex subunit alpha-2
	AP2-associated protein kinase 1
	AP-3 complex subunit sigma-1
	Apolipoprotein A-I;Proapolipoprotein A-I;Truncated apolipoprotein A-I
	Apolipoprotein A-II;Proapolipoprotein A-II;Truncated apolipoprotein A-II
	Apolipoprotein A-IV
	Apolipoprotein E
	Apoptosis regulator BAX
	ARF GTPase-activating protein GIT1

Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1  
 Arginase-2, mitochondrial  
 Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome  
 Aspartate aminotransferase, mitochondrial  
 Asporin  
 Astrocytic phosphoprotein PEA-15  
 ATP synthase subunit alpha, mitochondrial  
 ATP synthase subunit beta, mitochondrial  
 ATP synthase subunit beta, mitochondrial;ATP synthase subunit beta  
 ATP synthase subunit e, mitochondrial  
 ATP synthase subunit O, mitochondrial  
 ATPase ASNA1  
 ATP-citrate synthase  
 ATP-dependent (S)-NAD(P)H-hydrate dehydratase  
 ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type  
 ATP-dependent RNA helicase A  
 BAG family molecular chaperone regulator 3  
 Band 4.1-like protein 1  
 Band 4.1-like protein 2  
 Band 4.1-like protein 3;Band 4.1-like protein 3, N-terminally processed  
 Barrier-to-autointegration factor;Barrier-to-autointegration factor, N-terminally processed  
 Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein;Endorepellin;LG3 peptide  
 Basigin  
 Beta-actin-like protein 2  
 Beta-adducin  
 Beta-synuclein  
 Bifunctional purine biosynthesis protein  
 PURH;Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase;IMP cyclohydrolase  
 Biglycan  
 Biliverdin reductase A  
 BolA-like protein 2  
 Brain acid soluble protein 1  
 Branched-chain-amino-acid aminotransferase, cytosolic  
 BTB/POZ domain-containing protein KCTD12  
 BTB/POZ domain-containing protein KCTD2  
 BUB3-interacting and GLEBS motif-containing protein ZNF207  
 Cadherin-6  
 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta  
 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit beta;Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit gamma  
 Calcium-responsive transactivator  
 Calcyclin-binding protein  
 Caldesmon  
 Calmodulin  
 Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3  
 Calnexin  
 Calpain small subunit 1  
 Calponin-1;Calponin;Transgelin  
 Calponin-3  
 Calsyntenin-1;Soluble Alc-alpha;CTF1-alpha  
 cAMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase 4B  
 Cancer-associated gene 1 protein  
 CAP-Gly domain-containing linker protein 2  
 Carbonic anhydrase 1  
 Carboxypeptidase E  
 Casein kinase II subunit alpha 3;Casein kinase II subunit alpha  
 Catalase  
 Catenin alpha-2  
 Catenin alpha-2;Catenin alpha-1  
 Catenin beta-1  
 Catenin delta-1  
 Catenin delta-2  
 Cathepsin B;Cathepsin B light chain;Cathepsin B heavy chain  
 Cathepsin D;Cathepsin D light chain;Cathepsin D heavy chain  
 Caytaxin  
 CB1 cannabinoid receptor-interacting protein 1  
 CD44 antigen  
 Cdc42 effector protein 4  
 Cell adhesion molecule 1  
 Cell adhesion molecule 3  
 Cell cycle and apoptosis regulator protein 2  
 Cell death-inducing p53-target protein 1  
 Cell surface glycoprotein MUC18  
 Centromere protein V  
 Centromere/kinetochore protein zw10 homolog  
 Centrosomal protein of 170 kDa  
 Centrosomal protein of 170 kDa;Cep170-like protein  
 Charged multivesicular body protein 2a  
 Chloride intracellular channel protein 1  
 Chloride intracellular channel protein 4  
 Chondroitin sulfate synthase 3  
 C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4  
 Clathrin coat assembly protein AP180  
 Clathrin heavy chain;Clathrin heavy chain 1  
 Clathrin light chain A  
 Clathrin light chain B  
 Clavesin-2  
 Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5  
 Cleavage stimulation factor subunit 2;Cleavage stimulation factor subunit 2 tau variant  
 Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain  
 Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin alpha chain;Clusterin  
 Coatome subunit gamma-1  
 Cofilin-1  
 Cofilin-2  
 Cofilin-2;Cofilin-1  
 Coiled-coil domain-containing protein 124  
 Coiled-coil domain-containing protein 96  
 Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2;Putative coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein CHCHD2P9, mitochondrial  
 Cold-inducible RNA-binding protein  
 Collagen alpha-1(I) chain  
 Collagen alpha-1(VI) chain  
 Collagen alpha-1(XII) chain  
 Collagen alpha-1(XIV) chain  
 Collagen alpha-1(XVIII) chain;Endostatin  
 Collagen alpha-2(I) chain  
 Collagen alpha-2(IV) chain;Canstatin  
 Collagen alpha-2(VI) chain  
 Collagen alpha-3(VI) chain  
 COMM domain-containing protein 10  
 COMM domain-containing protein 9  
 Complement C1q subcomponent subunit A  
 Complement C1q subcomponent subunit B  
 Complement C1q subcomponent subunit C  
 Complement C1s subcomponent;Complement C1s subcomponent heavy chain;Complement C1s subcomponent light chain  
 Complement C3;Complement C3 beta chain;C3-beta-c;Complement C3 alpha chain;C3a anaphylatoxin;Acylation stimulating protein;Complement C3b alpha chain;Complement C3c alpha chain fragment 1;Complement C3dg fragment;Complement C3g fragment;Complement C3d fragment;Complement C3f fragment;Complement C3c alpha chain fragment 2  
 Complement C4-B;Complement C4 beta chain;Complement C4-B alpha chain;C4a anaphylatoxin;C4b-B;C4d-B;Complement C4 gamma chain;Complement C4-A;Complement C4 beta chain;Complement C4-A alpha chain;C4a anaphylatoxin;C4b-A;C4d-A;Complement C4 gamma chain  
 Complement component C9;Complement component C9a;Complement component C9b  
 Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1  
 Conserved oligomeric Golgi complex subunit 3  
 Constitutive coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma  
 Contactin-1  
 Contactin-associated protein 1  
 COP9 signalosome complex subunit 2  
 COP9 signalosome complex subunit 3

Copine-1	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase 1
Core histone macro-H2A.1	Dual specificity protein phosphatase 3
Core histone macro-H2A.1;Histone H2A	Dynactin subunit 1
Core histone macro-H2A.2	Dynactin subunit 2
Core histone macro-H2A.2;Core histone macro-H2A.1;Histone H2A	Dynamin-1
Core histone macro-H2A.2;Histone H2A	Dynamin-1;Dynamin-2
Core histone macro-H2A.2;Histone H2A;Core histone macro-H2A.1	Dynamin-1;Dynamin-2;Dynamin-3
Coronin;Coronin-1C	Dynein light chain roadblock-type 1;Dynein light chain roadblock-type 2
Coronin-1B	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1
Costars family protein ABRACL	EF-hand domain-containing protein D2
Creatine kinase B-type	EH domain-containing protein 3
Creatine kinase U-type, mitochondrial	EH domain-containing protein 4
Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Elastin
Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1	Elongation factor 1-alpha 2
Cysteine and glycine-rich protein 1	Elongation factor 1-gamma
Cysteine-rich protein 2	Elongation factor 2
Cytochrome b reductase 1	Elongation factor Tu, mitochondrial
Cytochrome b-245 heavy chain	Emerin
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	EMILIN-1
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	Endophilin-A1;Endophilin-A2
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial;Cytochrome b-c1 complex subunit 11;Putative cytochrome b-c1 complex subunit Rieske-like protein 1	Endophilin-B2
Cytochrome c	Endoplasmic reticulum resident protein 29
Cytochrome c oxidase subunit 2	Endoplasmic reticulum resident protein 44
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	Endoplasmin
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	Endoplasmin;Putative endoplasmin-like protein
Cytochrome c oxidase subunit 6C	Endothelial differentiation-related factor 1
Cytoglobin	Enhancer of mRNA-decapping protein 4
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Enhancer of rudimentary homolog
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 1	Ephrin-B3
Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	Epsin-1
Cytoplasmic phosphatidylinositol transfer protein 1	Erythrocyte band 7 integral membrane protein
Cytoskeleton-associated protein 4	ES1 protein homolog, mitochondrial
Cytosol aminopeptidase	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase
Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	Eukaryotic initiation factor 4A-I
Cytosolic non-specific dipeptidase	Eukaryotic initiation factor 4A-I;Eukaryotic initiation factor 4A-II;Eukaryotic initiation factor 4A-II, N-terminally processed
Decorin	Eukaryotic initiation factor 4A-III;Eukaryotic initiation factor 4A-III, N-terminally processed
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	Eukaryotic initiation factor 4A-III;Eukaryotic initiation factor 4A-III, N-terminally processed;Eukaryotic initiation factor 4A-I;Eukaryotic initiation factor 4A-II;Eukaryotic initiation factor 4A-II, N-terminally processed
Dematin	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1
Desmin	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
Dihydrolipoyl dehydrogenase;Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
Dihydropteridine reductase	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
Dihydropyrimidinase-related protein 1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K
Dihydropyrimidinase-related protein 1;Dihydropyrimidinase-related protein 3	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
Dihydropyrimidinase-related protein 2;Dihydropyrimidinase-related protein 1	Eukaryotic translation initiation factor 4B
Dihydropyrimidinase-related protein 2;Dihydropyrimidinase-related protein 1;Dihydropyrimidinase-related protein 3	Eukaryotic translation initiation factor 4H
Dihydropyrimidinase-related protein 2;Dihydropyrimidinase-related protein 3	Eukaryotic translation initiation factor 6
Dihydropyrimidinase-related protein 2	Exosome complex component RRP40
Dihydropyrimidinase-related protein 3	Extended synaptotagmin-1
Dihydropyrimidinase-related protein 4	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]
Dihydropyrimidinase-related protein 5	Ezrin
DNA damage-binding protein 1	Ezrin;Radixin;Moesin
DNA helicase INO80	FACT complex subunit SSRP1
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase;DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase, mitochondrial	F-actin-capping protein subunit alpha-1
DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	F-actin-capping protein subunit alpha-1;F-actin-capping protein subunit alpha-2
DnaJ homolog subfamily B member 2	F-actin-capping protein subunit alpha-2
DnaJ homolog subfamily C member 5	Far upstream element-binding protein 1
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	Far upstream element-binding protein 2
Dopamine beta-hydroxylase;Soluble dopamine beta-hydroxylase	Fascin
Double-strand-break repair protein rad21 homolog	Fatty acid synthase;[Acyl-carrier-protein] S-acetyltransferase;[Acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase;3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase;3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase;3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase;Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase;Oleoyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase
Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	Fatty acid-binding protein, epidermal
Drebrin	Ferritin light chain
Drebrin-like protein	

Fibrinogen alpha chain;Fibrinopeptide A;Fibrinogen alpha chain  
 Fibrinogen beta chain;Fibrinopeptide B;Fibrinogen beta chain  
 Fibronectin;Anastellin;Ugl-Y1;Ugl-Y2;Ugl-Y3  
 Fibulin-2  
 Filamin-A  
 Filamin-A;Filamin-B  
 Filamin-C  
 Flotillin-1  
 Flotillin-2  
 Forkhead-associated domain-containing protein 1  
 Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2  
 Fructosamine-3-kinase  
 Fructose-bisphosphate aldolase;Fructose-bisphosphate aldolase A  
 Fructose-bisphosphate aldolase;Fructose-bisphosphate aldolase C  
 Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2A  
 FYVE and coiled-coil domain-containing protein 1  
 G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1  
 Galactokinase  
 Galectin-1  
 Galectin-3-binding protein  
 Gamma-enolase  
 Gamma-enolase;Enolase  
 Gamma-enolase;Enolase;Beta-enolase  
 Gamma-glutamyltransferase 5;Gamma-glutamyltransferase 5 heavy chain;Gamma-glutamyltransferase 5 light chain  
 Gamma-synuclein  
 GDP-L-fucose synthase  
 Gelsolin  
 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase  
 Glucose-6-phosphate isomerase  
 Glucosidase 2 subunit beta  
 Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial  
 Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial;Glutamate dehydrogenase 2, mitochondrial  
 Glutamate-rich protein 3  
 Glutaredoxin-1  
 Glutathione peroxidase;Glutathione peroxidase 3  
 Glutathione S-transferase P  
 Glutathione synthetase  
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
 Glycine--tRNA ligase  
 Glycogen phosphorylase, brain form  
 Glycogenin-1  
 Golgi to ER traffic protein 4 homolog  
 Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1  
 Growth factor receptor-bound protein 2  
 GTPase HRas;GTPase HRas, N-terminally processed;GTPase NRas  
 GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1  
 GTP-binding nuclear protein Ran  
 Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1  
 Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2  
 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12  
 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1  
 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2  
 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4  
 Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2;Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-4;Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1  
 Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha  
 Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas  
 Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas;Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short  
 Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas;Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short;Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-1;Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-2;Guanine nucleotide-binding protein G(k) subunit alpha;Guanine nucleotide-binding protein G(t) subunit alpha-3;Guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha;Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha;Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2;Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1  
 Guanine nucleotide-binding protein G(z) subunit alpha  
 Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma;Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2  
 Guanine nucleotide-binding protein subunit gamma;Guanine nucleotide-binding protein G(T) subunit gamma-T1  
 Guanine nucleotide-binding protein-like 1  
 Guanylate kinase  
 HCLS1-binding protein 3  
 Heat shock 70 kDa protein 12A  
 Heat shock 70 kDa protein 1B;Heat shock 70 kDa protein 1A  
 Heat shock 70 kDa protein 1B;Heat shock 70 kDa protein 1A;Heat shock 70 kDa protein 6  
 Heat shock 70 kDa protein 1B;Heat shock 70 kDa protein 1A;Heat shock 70 kDa protein 6;Heat shock cognate 71 kDa protein;Heat shock-related 70 kDa protein 2  
 Heat shock 70 kDa protein 1B;Heat shock 70 kDa protein 1A;Heat shock 70 kDa protein 6;Putative heat shock 70 kDa protein 7;Heat shock cognate 71 kDa protein;Heat shock-related 70 kDa protein 2  
 Heat shock 70 kDa protein 1B;Heat shock 70 kDa protein 1A;Heat shock cognate 71 kDa protein;Heat shock-related 70 kDa protein 2  
 Heat shock 70 kDa protein 4  
 Heat shock 70 kDa protein 4L  
 Heat shock 70 kDa protein 6;Putative heat shock 70 kDa protein 7  
 Heat shock cognate 71 kDa protein  
 Heat shock cognate 71 kDa protein;Heat shock-related 70 kDa protein 2  
 Heat shock protein 105 kDa  
 Heat shock protein beta-1  
 Heat shock protein beta-6  
 Heat shock protein HSP 90-alpha  
 Heat shock protein HSP 90-beta  
 Heat shock protein HSP 90-beta;Heat shock protein HSP 90-alpha  
 Heat shock protein HSP 90-beta;Heat shock protein HSP 90-alpha A2;Heat shock protein HSP 90-alpha;Putative heat shock protein HSP 90-beta 2  
 Heat shock protein HSP 90-beta;Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4;Heat shock protein HSP 90-alpha  
 Heat shock protein HSP 90-beta;Putative heat shock protein HSP 90-beta 2  
 Heat shock protein HSP 90-beta;Putative heat shock protein HSP 90-beta-3  
 Heat shock protein HSP 90-beta;Putative heat shock protein HSP 90-beta-3;Heat shock protein HSP 90-alpha  
 Heat shock protein HSP 90-beta;Putative heat shock protein HSP 90-beta-3;Putative heat shock protein HSP 90-beta 2  
 Hematological and neurological expressed 1 protein;Hematological and neurological expressed 1 protein, N-terminally processed  
 Hematological and neurological expressed 1-like protein  
 Hematopoietic lineage cell-specific protein  
 Heme oxygenase 2  
 Hemoglobin subunit alpha  
 Hemoglobin subunit beta;LVV-hemorphin-7;Spinorphin  
 Hemoglobin subunit delta  
 Hemoglobin subunit delta;Hemoglobin subunit beta;LVV-hemorphin-7;Spinorphin  
 Hemoglobin subunit delta;Hemoglobin subunit gamma-2;Hemoglobin subunit gamma-1;Hemoglobin subunit epsilon;Hemoglobin subunit beta;LVV-hemorphin-7;Spinorphin  
 Hepatoma-derived growth factor  
 Hepatoma-derived growth factor-related protein 3  
 Heterochromatin protein 1-binding protein 3



Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, N-terminally processed  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, N-terminally processed;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F, N-terminally processed  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2  
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1  
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2  
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 4;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 3;Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 2  
High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 4  
High mobility group protein B1;High mobility group protein B2  
High mobility group protein B1;Putative high mobility group protein B1-like 1  
High mobility group protein B2  
High mobility group protein HMG-I/HMG-Y  
Histamine H4 receptor  
Histidine triad nucleotide-binding protein 1  
Histone H1.0;Histone H1.0, N-terminally processed  
Histone H1.2  
Histone H1.3  
Histone H1.4  
Histone H1.4;Histone H1.1;Histone H1.2;Histone H1.5;Histone H1.3  
Histone H1.4;Histone H1.1;Histone H1t;Histone H1.2;Histone H1.3  
Histone H1.4;Histone H1.2;Histone H1.3  
Histone H1.4;Histone H1.2;Histone H1.5;Histone H1.3  
Histone H1.4;Histone H1.3  
Histone H1.5  
Histone H1x  
Histone H2A type 1-B/E  
Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3  
Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-C  
Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 2-A  
Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-C;Histone H2A.J  
Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone H2AX;Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 1-A;Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-C;Histone H2A.J  
Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone H2AX;Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 1-A;Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-C;Histone H2A.J;Histone H2A.V;Histone H2A.Z;Histone H2A  
Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone H2AX;Histone H2A type 2-B;Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 1-A;Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-C;Histone H2A.J

Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone  
H2AX;Histone H2A type 2-B;Histone H2A type 1-C;Histone  
H2A type 1-A;Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-  
C;Histone H2A.J;Histone H2A.V;Histone H2A.Z;Histone  
H2A

Histone H2A type 1-B/E;Histone H2A type 3;Histone  
H2AX;Histone H2A type 2-B;Histone H2A type 1-C;Histone  
H2A type 2-A;Histone H2A type 2-C;Histone H2A.J  
Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-C  
Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-C;Histone H2A.J  
Histone H2A type 2-B  
Histone H2A type 2-B;Histone H2A type 1-C;Histone H2A  
type 1-A;Histone H2A type 2-A;Histone H2A type 2-  
C;Histone H2A.J

Histone H2A type 3;Histone H2AX;Histone H2A type 2-  
B;Histone H2A type 1-C;Histone H2A type 1-A;Histone H2A  
type 2-A;Histone H2A type 2-C;Histone H2A.J  
Histone H2A.V;Histone H2A.Z  
Histone H2A.V;Histone H2A.Z;Histone H2A

Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F  
Histone H2B type 1-K;Histone H2B type F-S  
Histone H2B type 2-E;Histone H2B type 3-B;Putative histone  
H2B type 2-D;Putative histone H2B type 2-C  
Histone H2B type 2-E;Putative histone H2B type 2-D;Putative  
histone H2B type 2-C  
Histone H2B type 3-B  
Histone H2B type 3-B;Histone H2B type 1-L  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-A;Histone H2B type 1-K;Histone H2B type F-  
S;Histone H2B type 2-E;Histone H2B type 1-H;Histone H2B  
type 2-F;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-  
D;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-L  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-A;Histone H2B type 1-K;Histone H2B type F-  
S;Histone H2B type 2-E;Histone H2B type 1-H;Histone H2B  
type 2-F;Histone H2B type 1-N;Histone H2B type 1-  
D;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 3-B;Histone H2B  
type 1-L  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-A;Histone H2B type 2-E;Histone H2B type 1-  
H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-N;Histone H2B  
type 1-D;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 3-  
B;Histone H2B type 1-L  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-K;Histone H2B type 2-E;Histone H2B type 1-  
H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-N;Histone H2B  
type 1-D;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 3-  
B;Histone H2B type 1-L;Putative histone H2B type 2-  
D;Putative histone H2B type 2-C  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-K;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 1-  
H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B type 1-N;Histone H2B  
type 1-D;Histone H2B type 1-M;Histone H2B type 1-L  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-K;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 2-E  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-K;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 2-  
E;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B  
type 1-N;Histone H2B type 1-D;Histone H2B type 1-  
M;Histone H2B type 1-L  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-K;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 2-  
E;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B  
type 1-N;Histone H2B type 1-D;Histone H2B type 1-  
M;Histone H2B type 1-L  
Histone H2B;Histone H2B type 1-C/E/F/G/I;Histone H2B  
type 1-K;Histone H2B type F-S;Histone H2B type 2-  
E;Histone H2B type 1-H;Histone H2B type 2-F;Histone H2B  
type 1-N;Histone H2B type 1-D;Histone H2B type 1-  
M;Histone H2B type 1-L  
Histone H3  
Histone H3;Histone H3.2;Histone H3.3;Histone H3.1  
Histone H3;Histone H3.2;Histone H3.3;Histone H3.1;Histone  
H3.1t  
Histone H3;Histone H3.2;Histone H3.3;Histone H3.1;Histone  
H3.1t;Histone H3.3C  
Histone H4

Histone-binding protein RBBP4  
 Histone-lysine N-methyltransferase EHMT2  
 HLA class I histocompatibility antigen, A-74 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, A-36 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, A-11 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, A-32 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, A-3 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-42 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-8 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-40 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-41 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-6 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-18 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-1 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-15 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-14 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-8 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-4 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-2 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-3 alpha chain  
 HLA class I histocompatibility antigen, B-42 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-8 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-81 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-48 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-6 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-18 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-1 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, Cw-7 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-38 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-67 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-82 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-39 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-14 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-37 alpha chain  
 HLA class I histocompatibility antigen, B-42 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-8 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-81 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-48 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-40 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, B-41 alpha chain  
 HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain  
 Host cell factor 1;HCF N-terminal chain 1;HCF N-terminal chain 2;HCF N-terminal chain 3;HCF N-terminal chain 4;HCF N-terminal chain 5;HCF N-terminal chain 6;HCF C-terminal chain 1;HCF C-terminal chain 2;HCF C-terminal chain 3;HCF C-terminal chain 4;HCF C-terminal chain 5;HCF C-terminal chain 6  
 Hsp90 co-chaperone Cdc37;Hsp90 co-chaperone Cdc37, N-terminally processed  
 Huntingtin-interacting protein 1  
 Huntingtin-interacting protein 1-related protein  
 Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial  
 Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase  
 Hypoxia up-regulated protein 1  
 Ig alpha-1 chain C region  
 Ig alpha-1 chain C region;Ig alpha-2 chain C region  
 Ig gamma-1 chain C region  
 Ig gamma-1 chain C region;Ig gamma-3 chain C region;Ig gamma-2 chain C region;Ig gamma-4 chain C region  
 Ig kappa chain C region  
 Ig kappa chain V-I region Lay;Ig kappa chain V-III region POM;Ig kappa chain V-III region VH;Ig kappa chain V-III region CLL  
 Ig kappa chain V-III region WOL;Ig kappa chain V-III region SIE;Ig kappa chain V-III region HIC;Ig kappa chain V-III region HAH  
 Immunity-related GTPase family Q protein  
 Importin subunit alpha-4  
 Importin subunit beta-1  
 Importin-5  
 Inositol-3-phosphate synthase 1  
 Integrin alpha-3;Integrin alpha-3 heavy chain;Integrin alpha-3 light chain  
 Integrin beta;Integrin beta-1  
 Interferon regulatory factor 2-binding protein 2  
 Interferon-induced GTP-binding protein Mx1;Interferon-induced GTP-binding protein Mx1, N-terminally processed  
 Interferon-induced very large GTPase 1  
 Interleukin enhancer-binding factor 2  
 Interleukin enhancer-binding factor 3  
 Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial  
 KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1  
 Kinesin light chain 1  
 Kinesin-1 heavy chain  
 Kinesin-like protein KIF21A  
 Kinesin-like protein KIF21A;Kinesin-like protein  
 Kinesin-like protein;Kinesin heavy chain isoform 5C;Kinesin heavy chain isoform 5A  
 Kinesin-like protein;Kinesin-like protein KIF3A  
 Lamina-associated polypeptide 2, isoforms  
 beta/gamma;Thymopoietin;Thymopentin;Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha;Thymopoietin;Thymopentin  
 Lamin-B1  
 Laminin subunit alpha-4  
 Laminin subunit gamma-1  
 La-related protein 1  
 Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2  
 Latexin  
 LEM domain-containing protein 2  
 Leucine-rich alpha-2-glycoprotein  
 Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 4  
 Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1  
 Leucine-rich repeat-containing protein 16C  
 Leucine-rich repeat-containing protein 47  
 Leucyl-cystinyl aminopeptidase;Leucyl-cystinyl aminopeptidase, pregnancy serum form  
 Leukocyte elastase inhibitor  
 LIM and SH3 domain protein 1  
 LIM domain-containing protein 2  
 Lipopolysaccharide-binding protein  
 LisH domain and HEAT repeat-containing protein KIAA1468  
 L-lactate dehydrogenase A chain  
 L-lactate dehydrogenase B chain  
 L-lactate dehydrogenase B chain;L-lactate dehydrogenase  
 LON peptidase N-terminal domain and RING finger protein 2  
 Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1  
 Lumican  
 L-xylulose reductase  
 Lysine--tRNA ligase  
 Lysosomal alpha-glucosidase;76 kDa lysosomal alpha-glucosidase;70 kDa lysosomal alpha-glucosidase  
 Lysosome membrane protein 2  
 Macrophage migration inhibitory factor  
 Macrophage-capping protein  
 Major vault protein  
 Malate dehydrogenase, cytoplasmic  
 Malate dehydrogenase, mitochondrial  
 Malate dehydrogenase, mitochondrial;Malate dehydrogenase  
 Mammalian ependymin-related protein 1  
 MAP7 domain-containing protein 1  
 MAP7 domain-containing protein 2  
 MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein-like  
 MARCKS-related protein  
 Matrilin-2  
 Matrin-3  
 Matrix-remodeling-associated protein 7  
 Membrane primary amine oxidase  
 Membrane-associated progesterone receptor component 1  
 Metalloproteinase inhibitor 2  
 Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta  
 Methionine aminopeptidase 2  
 Methyl-CpG-binding protein 2  
 Microfibril-associated glycoprotein 4  
 Microtubule-associated protein

Microtubule-associated protein 1A;MAP1A heavy chain;MAP1 light chain LC2  
 Microtubule-associated protein 1A;MAP1A heavy chain;MAP1 light chain LC2;Microtubule-associated protein 1B;MAP1B heavy chain;MAP1 light chain LC1  
 Microtubule-associated protein 1B;MAP1B heavy chain;MAP1 light chain LC1  
 Microtubule-associated protein 2  
 Microtubule-associated protein 6  
 Microtubule-associated protein RP/EB family member 3  
 Microtubule-associated protein tau  
 Microtubule-associated protein tau;Microtubule-associated protein  
 Microtubule-associated protein;Microtubule-associated protein 4  
 Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B;Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3 beta 2  
 Mimecan  
 Mitochondrial import receptor subunit TOM22 homolog  
 Mitogen-activated protein kinase 1  
 Mitogen-activated protein kinase 3  
 Mitogen-activated protein kinase 3;Mitogen-activated protein kinase  
 Moesin  
 Monocyte differentiation antigen CD14;Monocyte differentiation antigen CD14, urinary form;Monocyte differentiation antigen CD14, membrane-bound form  
 Mothers against decapentaplegic homolog;Mothers against decapentaplegic homolog 2  
 Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein  
 Multimerin-2  
 Myelin expression factor 2  
 Myosin light polypeptide 6  
 Myosin light polypeptide 6;Myosin light chain 6B  
 Myosin regulatory light chain 12A;Myosin regulatory light chain 12B  
 Myosin regulatory light polypeptide 9  
 Myosin-10  
 Myosin-9  
 Myosin-9;Myosin-11;Myosin-14  
 Myotrophin  
 Myotubularin-related protein 9  
 Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate  
 N(4)-(beta-N-acetylglucosaminyl)-L-asparaginase;Glycosylasparaginase alpha chain;Glycosylasparaginase beta chain  
 N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1  
 N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2  
 Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1  
 NAC-alpha domain-containing protein 1  
 N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein  
 N-acylneuraminate cytidyltransferase  
 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2  
 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 7  
 NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6  
 NADH-cytochrome b5 reductase 3;NADH-cytochrome b5 reductase 3 membrane-bound form;NADH-cytochrome b5 reductase 3 soluble form  
 Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha;Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form  
 Nestin  
 Neudesin  
 Neural cell adhesion molecule 1  
 Neural cell adhesion molecule L1  
 Neural proliferation differentiation and control protein 1  
 Neuroblast differentiation-associated protein AHNK  
 Neuroendocrine convertase 1  
 Neurofascin  
 Neurofilament heavy polypeptide  
 Neurofilament light polypeptide  
 Neurofilament medium polypeptide  
 Neuromodulin  
 Neuronal cell adhesion molecule  
 Neurosecretory protein VGF;Neuroendocrine regulatory peptide-1;Neuroendocrine regulatory peptide-2;Antimicrobial peptide VGF[554-577]  
 Neutral alpha-glucosidase AB  
 Nidogen-1  
 Nidogen-2  
 Non-histone chromosomal protein HMG-17;High mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 3  
 Non-POU domain-containing octamer-binding protein  
 NSFL1 cofactor p47  
 N-sulphoglucosamine sulphonylhydrolase  
 Nuclear mitotic apparatus protein 1  
 Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1  
 Nuclease-sensitive element-binding protein 1  
 Nuclease-sensitive element-binding protein 1;Y-box-binding protein 2;Y-box-binding protein 3  
 Nucleobindin-1  
 Nucleolin  
 Nucleophosmin  
 Nucleoplasmin-3  
 Nucleoprotein TPR  
 Nucleoside diphosphate kinase  
 Nucleosome assembly protein 1-like 1  
 Nucleosome assembly protein 1-like 4  
 Numb-like protein  
 Osteopontin  
 Palladin  
 Paralemmin-1  
 Parathymosin  
 Partner of Y14 and mago  
 PC4 and SFRS1-interacting protein  
 PCTP-like protein  
 PDZ and LIM domain protein 1  
 PDZ and LIM domain protein 3  
 PDZ and LIM domain protein 7  
 Pentraxin-related protein PTX3  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4;Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4, N-terminally processed  
 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1  
 Perilipin-3  
 Peripherin  
 Peripherin;Vimentin  
 Peroxiredoxin-1  
 Peroxiredoxin-2  
 Peroxiredoxin-2;Peroxiredoxin-1  
 Peroxiredoxin-5, mitochondrial  
 Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit  
 Phosphatidate cytidyltransferase 2  
 Phosphatidylethanolamine-binding protein 1;Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide  
 Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha  
 Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein  
 Phosphoglycerate kinase 1  
 Phosphoglycerate kinase 1;Phosphoglycerate kinase 2  
 Phosphoglycerate mutase 1;Phosphoglycerate mutase 2  
 Phosphoglycerate mutase 1;Phosphoglycerate mutase 2;Probable phosphoglycerate mutase 4  
 Phosphoglycerate mutase 1;Probable phosphoglycerate mutase 4  
 Phospholipase D3  
 Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase  
 Phostensin  
 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide;PACAP-related peptide;Pituitary adenylate cyclase-activating

polypeptide 27;Pituitary adenylate cyclase-activating  
 polypeptide 38  
 Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4  
 Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4;Plasma  
 membrane calcium-transporting ATPase 3;Plasma membrane  
 calcium-transporting ATPase 2  
 Plasma protease C1 inhibitor  
 Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein  
 Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit gamma  
 Plectin  
 Plectin;Epiplakin  
 Poly [ADP-ribose] polymerase 1  
 Poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3  
 Poly(rC)-binding protein 1  
 Poly(rC)-binding protein 1;Poly(rC)-binding protein  
 2;Poly(rC)-binding protein 3  
 Poly(U)-binding-splicing factor PUF60  
 Polyadenylate-binding protein 2  
 Polyadenylate-binding protein;Polyadenylate-binding protein  
 1;Polyadenylate-binding protein 3  
 Polyglutamine-binding protein 1  
 Polymerase I and transcript release factor  
 Polypyrimidine tract-binding protein 2  
 Potassium voltage-gated channel subfamily D member  
 2;Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3  
 Potassium-transporting ATPase alpha chain 2  
 POTE ankyrin domain family member E;POTE ankyrin  
 domain family member I;POTE ankyrin domain family  
 member J;Putative beta-actin-like protein 3;Putative beta-  
 actin-like protein 3, N-terminally processed  
 PRA1 family protein 2  
 Prefoldin subunit 1  
 Prelamin-A/C;Lamin-A/C  
 Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17  
 Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC1  
 Profilin;Profilin-2  
 Profilin-1  
 Programmed cell death protein 2-like  
 Programmed cell death protein 5  
 Prohibitin  
 Pro-interleukin-16;Interleukin-16  
 Prolargin  
 Proliferation-associated protein 2G4  
 Proline synthase co-transcribed bacterial homolog protein  
 Proline-rich protein 36  
 Proline-rich transmembrane protein 2  
 Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1;Low-  
 density lipoprotein receptor-related protein 1 85 kDa  
 subunit;Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 515  
 kDa subunit;Low-density lipoprotein receptor-related protein 1  
 intracellular domain  
 Pro-neuropeptide Y;Neuropeptide Y;C-flanking peptide of  
 NPY  
 ProSAAS;KEP;Big SAAS;Little SAAS;Big PEN-  
 LEN;PEN;Little LEN;Big LEN  
 ProSAAS;KEP;Big SAAS;Little SAAS;Big PEN-  
 LEN;PEN;Little LEN;Big LEN;Complement component C1q  
 receptor  
 Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1  
 Proteasome inhibitor PI31 subunit  
 Proteasome subunit alpha type-1  
 Proteasome subunit beta type-6  
 Protein AHNK2  
 Protein C10  
 Protein canopy homolog 2  
 Protein canopy homolog 3  
 Protein CDV3 homolog  
 Protein deglycase DJ-1  
 Protein DEK  
 Protein disulfide-isomerase  
 Protein disulfide-isomerase A3  
 Protein disulfide-isomerase A4  
 Protein disulfide-isomerase A6  
 Protein Dos  
 Protein enabled homolog  
 Protein FAM134A  
 Protein FAM49A;Protein FAM49B  
 Protein flightless-1 homolog  
 Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein  
 1  
 Protein lin-7 homolog B  
 Protein lin-7 homolog C  
 Protein lunapark  
 Protein NDRG1  
 Protein NDRG2  
 Protein NipSnap homolog 1  
 Protein NipSnap homolog 2  
 Protein phosphatase 1 regulatory subunit 11  
 Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A  
 Protein phosphatase 1 regulatory subunit 21  
 Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7  
 Protein phosphatase 1B  
 Protein phosphatase 1F  
 Protein RUFY3  
 Protein S100;Protein S100-A6  
 Protein S100-A9  
 Protein SEC13 homolog  
 Protein SOGA3  
 Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase;Protein-L-  
 isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase  
 Prothrombin;Activation peptide fragment 1;Activation peptide  
 fragment 2;Thrombin light chain;Thrombin heavy chain  
 Prothymosin alpha;Prothymosin alpha, N-terminally  
 processed;Thymosin alpha-1  
 Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase  
 Putative adenosylhomocysteinase 3  
 Putative beta-actin-like protein 3;Putative beta-actin-like  
 protein 3, N-terminally processed  
 Putative elongation factor 1-alpha-like 3;Elongation factor 1-  
 alpha 1  
 Putative elongation factor 1-alpha-like 3;Elongation factor 1-  
 alpha 1;Elongation factor 1-alpha 2  
 Putative elongation factor 1-alpha-like 3;Elongation factor 1-  
 alpha 1;Elongation factor 1-alpha;Elongation factor 1-alpha 2  
 Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like  
 protein;Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3  
 Putative heat shock protein HSP 90-beta 2  
 Putative histone H2B type 2-D;Putative histone H2B type 2-C  
 Putative protein FAM10A4;Putative protein  
 FAM10A5;Hsc70-interacting protein  
 Pyridoxal kinase  
 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta,  
 mitochondrial  
 Pyruvate kinase  
 Pyruvate kinase PKM;Pyruvate kinase  
 Pyruvate kinase PKM;Pyruvate kinase;Pyruvate kinase PKLR  
 Rab GDP dissociation inhibitor alpha  
 Rab GDP dissociation inhibitor alpha;Rab GDP dissociation  
 inhibitor beta  
 Rab GDP dissociation inhibitor beta  
 Rab-like protein 6  
 Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1  
 Ran GTPase-activating protein 1  
 Ran-binding protein 3  
 Rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1  
 Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1  
 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
 Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3  
 Ras-related protein Rab-10  
 Ras-related protein Rab-11A;Ras-related protein Rab-11B  
 Ras-related protein Rab-14  
 Ras-related protein Rab-1B;Putative Ras-related protein Rab-  
 1C;Ras-related protein Rab-1A  
 Ras-related protein Rab-34  
 Ras-related protein Rab-7a  
 Ras-related protein Ral-A  
 Ras-related protein Ral-A;Ras-related protein Ral-B  
 Ras-related protein Rap-1A;Ras-related protein Rap-1b;Ras-  
 related protein Rap-1b-like protein  
 Receptor expression-enhancing protein;Receptor expression-  
 enhancing protein 2  
 Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N

Recombining binding protein suppressor of hairless	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3
Replication protein A 14 kDa subunit	Signal peptidase complex subunit 2
Reticulocalbin-1	Signal transducer and activator of transcription;Signal
Reticulocalbin-3	transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
Reticulon-1	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial
Reticulon-4	Small nuclear ribonucleoprotein E
Reticulon-4;Reticulon	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2
Retinol-binding protein 5	Small ubiquitin-related modifier 4;Small ubiquitin-related
Rho GDP-dissociation inhibitor 1	modifier 2;Small ubiquitin-related modifier 3
Rho GTPase-activating protein 1	SNW domain-containing protein 1
Rho GTPase-activating protein 23	Sodium/calcium exchanger 1
Ribosome-binding protein 1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
RING finger protein 11	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
RING finger protein 214	1;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
RNA-binding motif protein, X chromosome;RNA-binding	2;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3
motif protein, X chromosome, N-terminally processed	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
RNA-binding motif protein, X chromosome;RNA-binding	1;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
motif protein, X chromosome, N-terminally processed;RNA	2;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
binding motif protein, X-linked-like-1	4;Potassium-transporting ATPase alpha chain
RNA-binding protein 14	1;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
RNA-binding protein 3	3;Potassium-transporting ATPase alpha chain 2
RNA-binding protein Raly	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
Rootletin	1;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	2;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
RuvB-like 1	4;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3
RuvB-like 2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-
S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	1;Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3
SAFB-like transcription modulator	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3
Scaffold attachment factor B1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1
Sec1 family domain-containing protein 1	Sodium-dependent neutral amino acid transporter SLC6A17
Secemin-1	Somatostatin;Somatostatin-28;Somatostatin-14
Secretogranin-1;PE-11;GAWK peptide;CCB peptide	Sorting nexin-12
Secretogranin-2;Secretoneurin;Manserin	Sorting nexin-2
Secretory carrier-associated membrane protein 1	Sorting nexin-3
Secretory carrier-associated membrane protein 3	Sorting nexin-5
Seizure 6-like protein 2	Sorting nexin-6;Sorting nexin-6, N-terminally processed
Seizure 6-like protein 2;Seizure 6-like protein	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1
Septin-11	Spectrin beta chain, erythrocytic
Septin-2	Spectrin beta chain, erythrocytic;Spectrin beta chain, non-
Septin-5	erythrocytic 1
Septin-6	Spectrin beta chain, erythrocytic;Spectrin beta chain, non-
Septin-7	erythrocytic 2;Spectrin beta chain, non-erythrocytic 4;Spectrin
Septin-7;Septin-14	beta chain, non-erythrocytic 1
Septin-8	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1
Septin-9	Spliceosome RNA helicase DDX39B
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	Spliceosome RNA helicase DDX39B;ATP-dependent RNA
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	helicase DDX39A
Serine/arginine-rich splicing factor 2	Splicing factor 3A subunit 1
Serine/arginine-rich splicing factor 2;Serine/arginine-rich	Splicing factor 3A subunit 3
splicing factor 8	Splicing factor 3B subunit 2
Serine/arginine-rich splicing factor 3	Splicing factor, proline- and glutamine-rich
Serine/arginine-rich splicing factor 6	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T-cells 3
Serine/threonine-protein kinase ATR	SRC kinase signaling inhibitor 1
Serine/threonine-protein kinase DCLK1	Src substrate cortactin
Serine/threonine-protein kinase PAK 1	SRSF protein kinase 2;SRSF protein kinase 2 N-
Serine/threonine-protein kinase PAK 1;Non-specific	terminal;SRSF protein kinase 2 C-terminal
serine/threonine protein kinase	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1
Serine/threonine-protein kinase PAK 2;PAK-2p27;PAK-2p34	Stathmin
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 56 kDa regulatory	Stathmin;Stathmin-2
subunit delta isoform	Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1
Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory	Stress-70 protein, mitochondrial
subunit A alpha isoform	Stress-induced-phosphoprotein 1
Serine/threonine-protein phosphatase 2A activator	SUMO-activating enzyme subunit 2
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
alpha isoform;Serine/threonine-protein phosphatase 2A	SWI/SNF complex subunit SMARCC1
catalytic subunit beta isoform	Synapsin-1
Serine/threonine-protein phosphatase CPPED1	Synapsin-3
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog
Serotransferrin	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog-like
Serpin H1	Synaptogyrin-1
Serrate RNA effector molecule homolog	Synaptogyrin-3
Serum albumin	Synaptophysin
Serum amyloid P-component;Serum amyloid P-component(1-	Synaptosomal-associated protein 25
203)	Synaptosomal-associated protein;Synaptosomal-associated
SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	protein 23
SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	Synaptotagmin-11

Syndecan-1	Tuberin
Synembryon-A	Tubulin alpha-1A chain;Tubulin alpha-1C chain;Tubulin
Synemin	alpha-1B chain
Syntaxin-12	Tubulin alpha-1A chain;Tubulin alpha-1C chain;Tubulin
Syntaxin-16	alpha-1B chain;Tubulin alpha-3C/D chain
Syntaxin-1B	Tubulin alpha-1A chain;Tubulin alpha-1C chain;Tubulin
Syntaxin-7	alpha-1B chain;Tubulin alpha-3C/D chain;Tubulin alpha-3E
Syntaxin-binding protein 1	chain
Talin-1	Tubulin alpha-1A chain;Tubulin alpha-3C/D chain;Tubulin
Target of Myb protein 1	alpha-3E chain
TBC1 domain family member 10B	Tubulin alpha-4A chain
T-complex protein 1 subunit alpha	Tubulin alpha-4A chain;Tubulin alpha chain-like 3;Tubulin
T-complex protein 1 subunit beta	alpha-1A chain;Tubulin alpha-1C chain;Tubulin alpha-1B
T-complex protein 1 subunit delta	chain;Tubulin alpha-3C/D chain;Tubulin alpha-8 chain
T-complex protein 1 subunit epsilon	Tubulin alpha-4A chain;Tubulin alpha-1A chain;Tubulin
T-complex protein 1 subunit gamma	alpha-1C chain;Tubulin alpha-1B chain
T-complex protein 1 subunit theta	Tubulin alpha-4A chain;Tubulin alpha-1A chain;Tubulin
T-complex protein 1 subunit zeta	alpha-1C chain;Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-3C/D
Tenascin	chain
Tenascin-X	Tubulin alpha-4A chain;Tubulin alpha-1A chain;Tubulin
Tenascin-X;Putative tenascin-XA	alpha-1C chain;Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-3C/D
Tensin-1	chain;Tubulin alpha-3E chain
Tether containing UBX domain for GLUT4	Tubulin alpha-4A chain;Tubulin alpha-1A chain;Tubulin
Thioredoxin	alpha-1C chain;Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-3C/D
Thioredoxin domain-containing protein 5	chain;Tubulin alpha-3E chain;Tubulin alpha-8 chain
Thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese-like domain-	Tubulin alpha-4A chain;Tubulin alpha-1A chain;Tubulin
containing protein 1	alpha-1C chain;Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-3C/D
THO complex subunit 4	chain;Tubulin alpha-8 chain
Thy-1 membrane glycoprotein	Tubulin beta chain
Thymidine phosphorylase	Tubulin beta-2A chain
Thymosin beta-10	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-2B chain
Thymosin beta-4;Hematopoietic system regulatory peptide	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-2B chain;Tubulin beta-6
Titin	chain
Toll-interacting protein	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-2B
TOM1-like protein 2	chain
Torsin-1A-interacting protein 1	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-2B
Transaldolase	chain;Tubulin beta chain
Transcription intermediary factor 1-beta	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-2B
Transcriptional activator protein Pur-alpha	chain;Tubulin beta chain;Tubulin beta-4A chain
Transcriptional activator protein Pur-alpha;Transcriptional	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-8 chain-like protein
activator protein Pur-beta	LOC260334;Tubulin beta-1 chain;Tubulin beta-4B
Transcriptional repressor CTCF	chain;Tubulin beta-8 chain;Tubulin beta-2B chain;Tubulin
Transferrin receptor protein 1;Transferrin receptor protein 1,	beta chain
serum form	Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-8 chain-like protein
Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1	LOC260334;Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-8
protein	chain;Tubulin beta-2B chain;Tubulin beta chain;Tubulin beta-
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	6 chain;Tubulin beta-4A chain
Transforming protein RhoA	Tubulin beta-2B chain
Transgelin	Tubulin beta-3 chain
Transgelin-2	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-2B
Transgelin-3;Transgelin	chain;Tubulin beta chain
Transgelin-3;Transgelin-2	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-4B
Transient receptor potential cation channel subfamily V	chain;Tubulin beta-2B chain;Tubulin beta chain
member 2	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-4B
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	chain;Tubulin beta-2B chain;Tubulin beta chain;Tubulin beta-
Transketolase	4A chain
Transmembrane protein 109	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-4B
Transmembrane protein 119	chain;Tubulin beta-2B chain;Tubulin beta chain;Tubulin beta-
Transmembrane protein 245	6 chain;Tubulin beta-4A chain
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial;Long-chain	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-2A chain;Tubulin beta-8
enoyl-CoA hydratase;Long chain 3-hydroxyacyl-CoA	chain-like protein LOC260334;Tubulin beta-1 chain;Tubulin
dehydrogenase	beta-4B chain;Tubulin beta-8 chain;Tubulin beta-2B
Triosephosphate isomerase	chain;Tubulin beta chain;Tubulin beta-6 chain;Tubulin beta-
Tripartite motif-containing protein 16	4A chain
Triple functional domain protein	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta
Tropomodulin-2	chain
Tropomodulin-3	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta
Tropomyosin alpha-1 chain	chain;Tubulin beta-4A chain
Tropomyosin alpha-3 chain	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A
Tropomyosin alpha-3 chain;Tropomyosin alpha-4	chain
chain;Tropomyosin beta chain;Tropomyosin alpha-1 chain	Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-6 chain
Tropomyosin alpha-4 chain	Tubulin beta-4A chain
Tropomyosin alpha-4 chain;Tropomyosin beta chain	Tubulin beta-4B chain
Tropomyosin beta chain	Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta chain
Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic;T1-TrpRS;T2-TrpRS	Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta chain;Tubulin beta-4A
	chain

Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain	Versican core protein
Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-8 chain;Tubulin beta-4A chain	Vesicle-associated membrane protein 2
Tubulin beta-6 chain;Tubulin beta-4A chain	Vesicle-associated membrane protein 2;Vesicle-associated membrane protein 3;Vesicle-associated membrane protein 1
Tubulin polymerization-promoting protein	Vesicle-associated membrane protein 8
Tubulin polymerization-promoting protein family member 3	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C
Tubulin-specific chaperone A	Vesicle-fusing ATPase
Tubulin--tyrosine ligase-like protein 12	Vesicle-trafficking protein SEC22b
Tumor protein D54	Vigilin
Tumor suppressor p53-binding protein 1	Vimentin
Tyrosine 3-monooxygenase	Vinculin
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	Vitronectin;Vitronectin V65 subunit;Vitronectin V10 subunit;Somatomedin-B
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 23	von Willebrand factor A domain-containing protein 1
U4/U6,U5 tri-snRNP-associated protein 2	V-type proton ATPase catalytic subunit A
Ubiquilin-1	V-type proton ATPase subunit a;V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1
Ubiquilin-1;Ubiquilin-4	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform
Ubiquilin-2	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform;V-type proton ATPase subunit B, kidney isoform
Ubiquilin-4	V-type proton ATPase subunit D
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	V-type proton ATPase subunit E 1
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	V-type proton ATPase subunit G 2
Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog	V-type proton ATPase subunit G 2;V-type proton ATPase subunit G 1
Ubiquitin-60S ribosomal protein L40;Ubiquitin;60S ribosomal protein L40;Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a;Ubiquitin;40S ribosomal protein S27a;Polyubiquitin-B;Ubiquitin;Polyubiquitin-C;Ubiquitin	V-type proton ATPase subunit H
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	WAS/WASL-interacting protein family member 1
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N;Putative ubiquitin-conjugating enzyme E2 N-like	WASH complex subunit FAM21C;WASH complex subunit FAM21A
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	WASH complex subunit FAM21C;WASH complex subunit FAM21A;Putative WASH complex subunit FAM21
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2
Unconventional myosin-Ic	X-ray repair cross-complementing protein 5
Urotensin-2	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1
Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Zinc finger protein 512
Vacuolar protein sorting-associated protein VTA1 homolog	Zinc finger protein castor homolog 1
Valacyclovir hydrolase	Zyxin
Valine--tRNA ligase	
Vasodilator-stimulated phosphoprotein	

## 9. Danksagung

Ich danke ...

... Prof. Timo Gemoll, dafür, dass ich das Thema zur Verfügung gestellt bekommen habe und so großartig betreut wurde. Deine Tür war immer offen und ich habe immer schnell und unkompliziert Antworten auf meine vielen Fragen bekommen. Danke, dass du mir so viel Freiraum gelassen hast, trotzdem manchmal nachgefragt hast und immer einen Rat für mich hattest. Einfach Danke für die tolle Betreuung!

... Prof. Jens K. Habermann, Leiter der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie und Biomaterialbanken während meiner experimentellen Arbeiten, dafür, dass es dieses Labor, mitsamt Personal und Material gibt. Danke für das freundliche um die Ecke schauen und viele gute persönliche Ratschläge.

...Prof. Tobias Keck, Leiter der Klinik für Chirurgie, dass die Rahmenbedingungen für die chirurgische experimentelle Forschung einfach stimmen.

... Dr. Oliver Klein vom Berlin Brandenburger Zentrum für Regenerative Therapien (BCRT) für die Durchführung der bildgebenden Massenspektrometrie und Erstellung der Datenbank, sowie Murat Eravci vom Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin für die Durchführung der LC-MS/MS.

... der Universität zu Lübeck für ihre Unterstützung in Form des Promotionsstipendiums, das es mir ermöglichte, ohne finanzielle Sorgen ein Semester aussetzen und im Labor arbeiten zu können.

... Gisi, die mich im Labor stets unterstützt hat, mit mir die immunhistochemische Färbung etablierte und auch sonst immer ein offenes Ohr hatte. Dafür gilt mein Dank auch Katja, Steffi, Emma, Sarah, Giulia, Nathalie, Annette und Friederike.

... meinen Geschwistern und meinen Freunden, dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatten und mich dann abgelenkt haben, wenn ich es nötig hatte. Dass ihr euch meine Bedenken angehört und zerstreut habt, dass ihr mich motiviert und unterstützt habt.



... Björn, dafür dass du mir immer wieder freundlich, aber bestimmt, in den Allerwertesten getreten hast. Vielen Dank für deine fachkundigen Kommentare und deine moralische Aufbauarbeit in meinen zahlreichen „das schaff ich nie“-Phasen. Ohne dich hätte ich die Arbeit wohl erst bei Rentenantritt fertig gestellt. Danke auch deiner Familie für ihre Unterstützung und offenes Ohr.

... meinen Eltern, dafür dass ihr mich in jeder Phase auf alle erdenkliche Weise unterstützt habt. Danke, dass ihr einfach immer für mich da seid, egal wie gut oder schlecht ich gelaunt bin und egal wie weit ich gerade von euch weg wohne. Ohne euch hätte ich dieses Studium und damit auch diese Arbeit niemals so durchführen können.

