



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München

Massenspektrometrische Analyse solider Tumoren zur Identifikation von proteinbasierten prognostischen Biomarkern am Beispiel des Analen Plattenepithelkarzinoms

Birte Anna Katharina Stroucken

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizinischen Wissenschaft genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Angela Krackhardt

Prüfer*innen der Dissertation:

1. TUM Junior Fellow Dr. Peer Hendrik Kuhn, Ph.D.
2. Prof. Dr. Marc Schmidt-Supprian

Die Dissertation wurde am 22.02.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.07.2021 angenommen.

**Massenspektrometrische Analyse solider Tumoren zur
Identifikation von proteinbasierten prognostischen Biomarkern am
Beispiel des Analen Plattenepithelkarzinoms**

Birte Anna Katharina Stroucken

Inhalt

Abstract.....	1
Zusammenfassung.....	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Biomarker.....	3
1.1.1. Definition und Funktion von Biomarkern.....	3
1.1.2. Protein-Biomarker in der Pathologie.....	3
1.1.3. Biomarker solider Tumore.....	4
1.1.4. Biomarker in der personalisierten Medizin.....	7
1.2. Proteomik und Massenspektrometrie.....	8
1.2.1. Begriffsdefinition und Überblick Proteomik.....	8
1.2.2. Proteine messen.....	9
1.2.3. Technische Grundlagen der Massenspektrometrie.....	10
1.2.4. Anwendung.....	12
1.3. Probenaufbereitung für Massenspektrometrie.....	12
1.3.1. Voraussetzungen für massenspektrometrische Messungen.....	12
1.3.2. In-Gel Verdau.....	13
1.3.3. FASP.....	14
1.3.4. In-Stage-Tip Methode.....	15
1.3.5. Single-pot Solid-phase-enhanced Sample preparation (SP3).....	16
1.3.6. Single-tube Verfahren im Vergleich.....	17
1.4. Fixierung von Gewebe.....	19
1.4.1. Fresh-Frozen Gewebe.....	19
1.4.2. FFPE-Gewebe.....	19
1.4.3. Auswirkung von FFPE auf die Proteinstruktur.....	20
1.4.4. Extraktion von Proteinen aus FFPE-Gewebe.....	20
1.4.5. Stabilität von Proteinen in FFPE-Gewebe bei Langzeitlagerung.....	22
1.5. Analkarzinom.....	23
1.5.1. Epidemiologie, Ätiologie, Prävention und Prognose.....	23
1.5.2. Histologie von Analkanal und Analkarzinom.....	23
1.5.3. Klinik, Diagnostik und Therapie.....	24
1.5.4. Prognosefaktoren und Biomarker bei Analkarzinomen.....	26
2. Materialien und Methoden.....	28
2.1. Zellkultur.....	28
2.1.1. Kultur von HEK293T-Zellen.....	28
2.1.2. Proteinextraktion aus Zellen.....	29

2.1.3.	Messung der Protein-Konzentrationen	30
2.2.	SDS-PAGE Gel-Elektrophorese	30
2.2.1.	Vorbereitung des Acrylamid-Gels	30
2.2.2.	Ablauf der Gel-Elektrophorese	32
2.2.3.	Coomassie-Färbung der Gele	32
2.3.	SP3	33
2.3.1.	Vorbereitung der magnetischen Beads.....	33
2.3.2.	Vorbehandlung der SP3-Probe	33
2.3.3.	Bindung und Waschen	34
2.3.4.	Verdau auf den Beads und Elution	35
2.4.	SP3 für SDS-PAGE-Gel Experimente	36
2.4.1.	Definition von PRE, PULL und POST	36
2.4.2.	Elution der PULL-Fraktion und Vorbereitung für SDS-PAGE-Elektrophorese ..	37
2.4.3.	Vorbereitung von PRE und POST für das Laden in das SDS-PAGE	38
2.4.4.	Quantifizierung der Banden mit Fiji Image J	38
2.4.5.	Statistische Auswertung mit Prism Graphpad und graphische Darstellung mit Adobe Photoshop Illustrator.....	39
2.5.	FFPE-Gewebe	39
2.5.1.	Deparaffinierung.....	39
2.5.2.	Isolierung von Tumor-Gewebe von den Deckgläsern	40
2.6.	Proteomische Charakterisierung des Analen Plattenepithelkarzinoms	40
2.6.1.	Anale Plattenepithel Karzinom Kohorte	40
2.6.2.	Massenspektrometrische Messung	41
2.6.3.	Auswertung der Massenspektrometrischen Daten mit Max Quant.....	42
3.	Results	42
3.1.	Etablierung des SP3 Verfahrens	42
3.1.1.	Elutionspuffer im Vergleich: ddH ₂ O, PBS + 1 % (w/v) SDS und Laemmli-Puffer.....	42
3.1.2.	Elutionsbedingungen im Vergleich: ddH ₂ O und PBS + 1 % (w/v) SDS als Elutionspuffer bei Raumtemperatur oder 95 °C	43
3.1.3.	Vergleich von 30 % und 70 % Acetonitril-Konzentration im Bindungsschritt	45
3.1.4.	Bead-Bindungskapazität	46
3.1.5.	Inkubationszeit im Bindungsschritt: 7 Minuten vs. 30 Minuten	48
3.1.6.	TRIS und PBS-basierte Lysepuffer im Vergleich	49
3.2.	Analkarzinom-Kohorte.....	50
3.2.1.	Histologische Evaluation	50
3.2.2.	HPV- und p16-Status	51

3.2.3.	Genetisches Profiling und prognostischer Einfluss	51
3.2.4.	Proteomische Ergebnisse der Kohorte	51
3.2.5.	Prognostische Aussagen auf Basis proteomischer Subtypisierung.....	56
4.	Diskussion.....	58
4.1.	Etablierung des SP3 Verfahrens	58
4.2.	Proteomische Subtypisierung als prognostischer Marker	63
5.	Ausblick.....	67
6.	Literaturverzeichnis	69
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	86
	Danksagungen	88

Abbildungen

Abbildung 1:	Single-tube Verfahren im Vergleich.....	19
Abbildung 2:	Probleme der Proteingewinnung aus FFPE-Gewebe 2003	22
Abbildung 3:	Aufbau der Gellgussvorrichtung.....	31
Abbildung 4:	Magnetisches Gestell mit attachierten Beads	35
Abbildung 5:	SP3 Protokoll als Vorbereitung für Massenspektrometrie	36
Abbildung 6:	SP3 Protokoll für Coomassie-Experimente	37
Abbildung 7:	Drei Elutionspuffer im Vergleich	43
Abbildung 8:	Vergleich von PBS + 1% (w/v) SDS und ddH ₂ O als Elutionspuffer bei 95 °C und Raumtemperatur	45
Abbildung 9:	Vergleich von 30 % ACN (v/v) und 70 % ACN (v/v) im Bindungsschritt.....	46
Abbildung 10:	Beadbindungskapazität.....	48
Abbildung 11:	Vergleich von 7 Minuten und 30 Minuten Inkubationszeit im Bindungsschritt .	49
Abbildung 12:	Vergleich eines TRIS- und PBS-basierten Lysepuffers	50
Abbildung 13:	Volcano-Plot der identifizierten Proteine	54
Abbildung 14:	Clusterung in Epithel-ähnlichen und Mesenchym-ähnlichen Subtyp	56
Abbildung 15:	Kaplan-Meier Überlebenskurven.....	57
Abbildung 16:	Cytokeratin-Expression (CK6/14/16).....	58
Abbildung 17:	SP3-kompatible Lysepuffer in der Literatur	63

Abstract

While DNA and RNA represent the blueprint, proteins are the executive elements of biological processes within eukaryotic cells. In order to understand the complexity of pathophysiological processes in tumors, proteomic data are increasingly consulted, aiming for a panomic approach. Most flexibility is shown by mass spectrometry-based quantitative proteomics, which can measure total proteomes without prejudging the outcome. Proteomes represent the entity of a cell's, tissue's or organism's proteins and can offer a large pool of information searching for new biomarkers. Biomarkers are measurable indicators of biological conditions. In oncology especially prognostic and predictive biomarkers are attractive as they forecast the course of an illness or the response to a certain therapy.

In 2014, Hughes et al. published the "single-pot, solid-phase-enhanced sample-preparation" method, short SP3, for proteomic sample preparation for mass spectrometry. In contrast to other preparation-methods, SP3 offers fast and easy handling, a broad compatibility to different detergents and the possibility of processing very small sample amounts down to the one-digit microgram range. The latter is essential due to limited sample-amounts in tumor-proteomics.

Firstly, I established the SP3-protocol, using HEK293T cells. Secondly, I applied the protocol to a cohort of 31 Anal squamous carcinoma FFPE-specimens, followed by mass spectrometry and data analysis. Thus, two proteomic profiles with prognostic significance could be identified: The Epithelial-like subtype (ES) and the Mesenchymal-like subtype (MS): Patients carrying the MS-subtype showed a significant smaller overall-survival, disease-specific survival and disease-free-survival in correlation with the clinical data. On the protein-level, the epithelial transcription factors p63, IRF and LARP7 were significantly downregulated in the MS-ASCCs. On the other hand, Periostin, Tenascin C and TGFB1, matricellular proteins of the tumor supportive stroma, were significantly upregulated in the MS-Subtype. The biological aggressiveness of the MS-tumours could be explained by mechanisms like chemoresistance especially against 5-FU, deregulated DNA-repair mechanisms including avoidance of apoptosis, dedifferentiation and Epithelial-mesenchymal Transition as well as invasion and metastasis.

Until now, there is neither an established prognostic nor predictive molecular biomarker for anal squamous cell carcinoma implemented in clinical decision making. Proteomic profiling could, like demonstrated in this work, provide pre-therapeutic prognostic information for patients with ASCC. Further evaluation of chemoresistance mechanisms against 5-FU in the MS-subtype could offer important predictive information regarding the frequent use of the 5-FU-containing Nigro-scheme. From my point of view, not only the ASCC but many other solid tumors contain a similar potential: By including FFPE-tissue into proteomic workflows as well as applying an automatized-scalable version of SP3, huge case numbers could be analysed proteomically and provide a large pool of new biomarker-candidates.

Zusammenfassung

Während DNA und RNA den Bauplan darstellen, sind Proteine die ausführende Einheit biologischer Prozesse in der eukaryotischen Zelle. Zum Verständnis komplexer pathophysiologischer Prozesse in Tumoren werden deswegen immer häufiger proteomische Daten im Sinne eines panomischen Ansatzes

hinzugezogen. Besonders vielseitig ist hierbei die quantitative Proteomik, die mittlerweile mithilfe von Massenspektrometern ergebnisoffen komplette Proteome vermessen kann. Proteome, also die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus, sind eine große Informationsquelle auf der Suche nach neuen Biomarkern. Biomarker sind messbare Indikatoren für einen biologischen Zustand. In der Onkologie sind insbesondere prognostische und prädiktive Biomarker gefragt, da sie Krankheitsverläufe oder das Ansprechen auf eine Therapie vorhersagen können.

Zur Aufbereitung von Proben für massenspektrometrische Messungen wurde 2014 von Hughes et al. die „Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation“, kurz SP3, publiziert. Im Gegensatz zu anderen Prozessierungsverfahren zeichnet sich SP3 durch seine schnelle und einfache Handhabung, seine Kompatibilität mit diversen Detergenzien sowie die Möglichkeit der Prozessierung sehr geringer Probenmengen bis in den einstelligen µg-Bereich aus. Gerade letzteres ist für den Bereich der Tumor-Proteomik mit limitiertem Probematerial essentiell.

Zunächst erläutere ich die Etablierung des SP3-Protokolls unter Verwendung von HEK293T Zellen. Anschließend habe ich das Protokoll auf FFPE-Gewebe einer Kohorte von 31 Analen Plattenepithelkarzinomen angewandt. Die Proben wurden massenspektrometrisch vermessen und analysiert. Hierbei konnten zwei proteomische Profile mit prognostischer Signifikanz abgegrenzt werden, nämlich der Epithel-ähnliche (ES) und der Mesenchym-ähnliche Subtyp (MS). Korreliert mit klinischen Daten zeigten Patienten mit MS-ASCC ein signifikant geringeres gesamtes, krankheitsspezifisches und krankheitsfreies Überleben. Auf Proteinebene präsentierten sich die epithelialen Transkriptionsfaktoren p63, IRF und LARP7 beim MS-Subtyp herunterreguliert. Periostin, Tenascin C und TGFB1, matrizelluläre Proteine des tumor-unterstützenden Stromas, waren signifikant hochreguliert. Die biologische Aggressivität des MS-Subtypen lässt sich durch Mechanismen wie Chemoresistenz insbesondere gegen 5-FU, fehlerhafte DNA-Reparaturmechanismen mit Hemmung der Apoptose-, Dedifferenzierung und Epithelial-mesenchymale Transition inklusive Invasion und Metastasierung erklären.

Bislang hat sich kein prognostischer oder prädiktiver molekularer Biomarker des Analen Plattenepithelkarzinoms für die Verwendung im klinischen Alltag etablieren können. Die proteomische Profilbildung könnte, wie in dieser Arbeit dargestellt, schon prätherapeutisch wichtige prognostische Informationen für Patienten mit Analem Plattenepithelkarzinom liefern. Eine weitere Evaluation der Chemoresistenz gegen 5-FU im MS-Typ könnte zudem wichtige prädiktiv-therapeutische Informationen in Hinblick auf das frequent applizierte 5-FU-haltige Nigro-Schema liefern. Ein ähnliches Potenzial sehe ich für diverse andere solide Tumoren: Durch Einbezug von FFPE-Gewebe in die proteomische Forschung sowie Anwendung des SP3-Verfahrens, welches zunehmend automatisier- und skalierbar wird, lassen sich proteomische Analysen großer Fallzahlen durchführen und ein Pool neuer Biomarker-Kandidaten erschließen.

1. Einleitung

1.1. Biomarker

1.1.1. Definition und Funktion von Biomarkern

Das Wort „Biomarker“ ist eine Abkürzung für „Biologischer Marker“ und hat eine weit gefasste Definition: Ein Biomarker ist ein Merkmal, das als Indikator für einen normalen biologischen oder pathologischen Prozess oder als pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention objektiv gemessen und ausgewertet werden kann (Atkinson 2001). Biomarker sind zusammengefasst Vergleichswerte für die Unterscheidung zwischen Gesundheit und Krankheit, müssen jedoch nicht, als Abgrenzung vom Wort „Symptom“, vom Patienten selbst wahrgenommen werden können. Bereits die simple Bestimmung eines erhöhten Blutdrucks kann als Biomarker für ein hypertonisches Krankheitsgeschehen herangezogen werden (Strimbu und Tavel 2010). Im modernen Sprachgebrauch bezieht sich das Wort „Biomarker“ meist auf die Bestimmung der Menge oder Veränderungen von Molekülen auf DNA- (desoxyribonucleic acid), RNA- (ribonucleic acid), Epigenetik- oder Proteinebene. Insgesamt können Biomarker unterschiedliche Funktionen erfüllen, die sich auch überlappen können. Beispielhaft seien Biomarker aufgeführt, die in der Krebsdiagnostik und Therapie von Relevanz sind: Mit prognostischen Biomarkern lassen sich Aussagen über den Verlauf und das Rezidivrisiko einer bereits aufgetretenen Krankheit treffen. Prädiktive Biomarker werden verwendet, um das Ansprechen eines Patienten auf eine bestimmte Therapie vorherzusagen (Dingermann 2012). Zudem sind Biomarker auch im Bereich der sekundären Prävention, nämlich der Früherkennung von Tumorerkrankungen, im Einsatz (Petersen 2019).

1.1.2. Protein-Biomarker in der Pathologie

Zwei Standardmethoden der Biomarkermessung auf Proteinebene im pathologischen Alltagsbetrieb sind die Immunhistochemie (IHC) und der Western Blot. Bei der Immunhistochemie binden Antikörper, die mit einem Enzym gekoppelt sind, an Zielmoleküle im Gewebe. Die Enzyme setzen ein hinzugefügtes farbloses Chromogen in braunes Farbpigment um und erzeugen so eine Färbung im Bereich des Komplexes aus Antikörper, Enzym und gebundenem Zielmolekül. Hierdurch wird ein Bild der Zielmolekül-Verteilung im entsprechenden Gewebe geschaffen (Gambella et al. 2017). Das Verfahren ist aufgrund seiner Einfachheit flächendeckend verfügbar, jedoch aus

folgenden Gründen störanfällig: Erstens können die verwendeten Antikörper degradieren. Zweitens kann das an sie für die Färbereaktion gekoppelte Enzym seine Aktivität verlieren. Drittens müssen Reaktionstemperatur und pH-Wert richtig eingestellt sein. Viertens kann es durch eine schwankende Fixierung des Gewebes mit neutral gepufferter Formaldehydlösung zu einer variierenden Modifikation der durch die Antikörper zu erkennenden Epitope kommen. All diese Gründe können zu Schwankungen in der Farbintensität sowie Problemen mit dem Hintergrundsignal führen. Des Weiteren kann pro Gewebsschnitt maximal ein Proteinmarker mit dieser Methode untersucht werden, was bei vielen anzufertigenden Färbungen einen relativ hohen Verbrauch an Gewebe und hohe Kosten zur Folge hat (Longuespée et al. 2018). Zudem ist keine offene Fragestellung möglich: Es können nur Proteine nachgewiesen werden, gegen die auch Antikörper zur Verfügung stehen (Buczak et al. 2018; Doll et al. 2019). Beim Western Blot wird ein Proteingemisch in einem Gel entsprechend seiner Größe aufgetrennt und danach auf eine Membran, beispielsweise aus Nitrocellulose, transferiert („Blotten“). Anschließend können die auf der Membran immobilisierten Proteine mit Antikörpern detektiert werden. Dazu wird die Membran zunächst mit einem proteinspezifischen primären Antikörper versehen. Danach kann das Bindungsmuster des Primärantikörpers durch Zugabe eines gegen dessen konstante Fc-Domäne gerichteten Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden, indem an den Sekundärantikörper analog zur Immunhistochemie ein Enzym gekoppelt wird. Das typischerweise verwendete Enzym ist Horse reddish peroxidase (HRP), welche durch Umsetzen von Luminol Licht erzeugt und mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann (Burnette 1981). Somit kann ein Western Blot ebenso wie die Immunhistochemie nur jene Proteine nachweisen, für die Antikörper verfügbar sind. Im pathologischen Alltagsbetrieb sind somit noch keine Methoden etabliert, die eine quantitative Proteinanalyse von Proben ohne den Einsatz von Antikörpern zulassen. Gerade eine solche offene Fragestellung würde es aber ermöglichen, im großen Stil unbekannte oder unerwartete Proteine als potenzielle neue Biomarker zu entdecken oder multiple Protein-Biomarker unter wenig Materialeinsatz nachzuweisen (Doll et al. 2019).

1.1.3. Biomarker solider Tumore

Bereits heute gibt es Biomarker, mit deren Hilfe prognostische Informationen gewonnen und Therapien geplant werden können. Beispielhaft werden im Folgenden

die Proteine HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) und EGFR (epidermal growth factor receptor) beleuchtet, welche zu den Rezeptortyrosinkinasen gehören (Yarden und Sliwkowski 2001).

Die Expression von HER2 wird bei jeder Patientin mit invasivem Mammakarzinom geprüft. Hierzu können Gewebeproben sowohl in Form von Operationspräparaten als auch von Stanzbiopsien verwendet werden. Per Immunhistochemie wird die HER2-Rezeptorexpression in den Präparaten sichtbar gemacht. Bei unsicherem Befund kann man eine In-Situ-Hybridisation auf DNA-Ebene anschließen (IQTIG 2018). Alle Patientinnen mit HER2-positivem Befund ohne Metastasierung haben laut S3-Leitlinie eine adjuvante, zielgerichtete Therapie („targeted therapy“) mit dem humanisierten monoklonalen HER2-Antikörper Trastuzumab in Kombination mit einer konventionellen Chemotherapie aus einem Anthrazyklin und einem Taxan zu erhalten (Leitlinienprogramm Onkologie 2020a; Mazzotta et al. 2019). Bereits 1987 wurde anhand signifikant erhöhter Mortalität und Rezidivrate festgestellt, dass eine erhöhte HER2-Expression ein negativ prognostischer Biomarker für das Überleben ist (Slamon et al. 1987). Durch die Einführung der adjuvanten, gezielten Therapie mit Trastuzumab zusätzlich zur Chemotherapie konnten Mortalität, Rezidivrate, Metastasierungsrate und das Auftreten von Zweittumoren im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne adjuvante Trastuzumab-Behandlung signifikant verringert werden (Viani et al. 2007).

Das Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinom gilt als häufigste Unterform des Lungenkarzinoms. In etwa 10% der NSCLC-Fälle (non-small-cell lung carcinoma), allerdings vorwiegend bei Nicht-Rauchern, liegen aktivierende Mutationen der EGFR-Tyrosinkinase-Domäne vor (Govindan et al. 2012; Leitlinienprogramm Onkologie 2018). Dies kann zu einer verstärkt katalysierenden Wirkung des Rezeptorkomplexes führen, was die Krebsentwicklung in Form eines Wachstumsstimulus unterstützen kann (Oda et al. 2005; Stella et al. 2012). Folglich ergibt sich daraus die Option einer medikamentösen Hemmung von aktivierten EGFR-Komplexen mittels Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) wie Gefitinib (Lynch et al. 2004). Die S3 Leitlinie zur Behandlung von Lungenkarzinomen 2018 fordert als Konsequenz eine Prüfung aller Nicht-Plattenepithelkarzinome auf aktivierende EGFR-Mutationen und bei positivem Resultat eine Erstlinientherapie mit einem TKI. Für die Diagnostik wird per Bronchoskopie eine Probe entnommen, FFPE-fixiert (formalin fixed paraffin embedded) und anschließend mit molekularpathologischen Verfahren wie der

Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht. Studien konnten zeigen, dass die Behandlung von EGFR-mutationspositiven, Chemotherapie-naiven Lungenkrebspatienten mit TKI gegenüber einer reinen Chemotherapie zu einem längeren progressionsfreien Überleben, besserem Therapieansprechen, einer höheren Lebensqualität und geringeren Nebenwirkungsraten führen (Pao und Chmielecki 2010).

Ein neuer Pfeiler der Antikrebstherapie ist die Immun-Checkpoint-Inhibition. Hierbei wird mittels monoklonaler Antikörper die tumorale Inhibition der T-Zell-Antwort im Sinne einer „Hemmung der Hemmung“ aufgehoben (Signorelli et al. 2019). Zielmoleküle sind neben CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), exprimiert auf regulatorischen T-Zellen, auch PD-1 (programmed cell death protein 1) auf der Oberfläche von intratumoralen T-Lymphozyten und sein Ligand PD-L1 (programmed death-ligand 1) auf der Oberfläche von Tumorzellen. Wenn PD-1 und PD-L1 einander binden, übt der Tumor ein inhibitorisches Signal auf die T-Zellen aus und eine T-Zell-abhängige endogene Immunantwort gegen den Tumor wird unterbunden. Werden PD-1 oder PD-L1 im Rahmen einer Immun-Checkpoint Inhibition durch therapeutische PD-1/PD-L1 Antikörper geblockt, bleibt dies aus und das Immunsystem des Patienten kann selbst mittels einer T-Zell-abhängigen Immunantwort gegen die Tumorzellen vorgehen (Mellman et al. 2011; Mamalis et al. 2014). Bisher konnten die Inhibitoren bei diversen Krebstypen wie dem Malignen Melanom, dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und dem Nierenkarzinom vielversprechend Einsatz finden (Alsaab et al. 2017). Die Expression der Zielmoleküle PD-1 und PD-L1 sagt allerdings nur bedingt den Therapieerfolg voraus, und auch negativ-getestete Tumoren können für die Therapie empfänglich sein (Aguilar et al. 2016; Daud et al. 2016; Munhoz und Postow 2018). Zudem sind eine hohe Mutationslast sowie die MHC-I (major histocompatibility complex 1) vermittelte Expression der tumorspezifischen Neoantigene auf den Zelloberflächen der Tumorzellen unerlässlich für die Triggerung aktivierter T-Zellen (Daud et al. 2016; Liu und Mardis 2017; Hellmann et al. 2018). Um das Therapieansprechen besser vorhersagen zu können, wird seit Jahren eine intensiviertere Suche nach prädiktiven Biomarkern gefordert. Hierbei wird auch die Evaluation eines optimalen Nutzen-Nebenwirkungsverhältnisses betont (Mamalis et al. 2014; Yi et al. 2018). Beim NSCLC ist die per IHC ermittelte PD-L1-Expression in $\geq 50\%$ der Tumorzellen einer

Gewebeprobe als prädiktiver Biomarker für die Wirksamkeit einer Erstlinientherapie mit Pembrolizumab empfohlen (Herbst et al. 2016; Reck et al. 2016; Leitlinienprogramm Onkologie 2018; Signorelli et al. 2019). Zudem ist seit April 2020 beim triple-negativen Mammakarzinom mit einer PD-L1-Expression ≥ 1 % eine Therapie mit dem PD-1-Inhibitor Atezolizumab zugelassen (Gemeinsamer Bundesausschuss 2020). Trotz dieser Beispiele unterstreicht eine große Metaanalyse, dass die PD-L1 Expression als Werkzeug für die Patientenselektion für Tumoren allgemein nicht ausreicht (Wallis et al. 2020).

1.1.4. Biomarker in der personalisierten Medizin

Die personalisierte Medizin hat zum Ziel, medizinische Maßnahmen zu verbessern, indem Biomarker oder biologische Informationen basierend auf molekularen Signalwegen, genetischen, proteomischen und metabolomischen Daten genutzt werden (Schleidgen et al. 2013). Hiermit ist verallgemeinernd gemeint, dass eine Patientin oder ein Patient der jeweils individuell passenden Therapie zugeführt wird (Salari und Larijani 2017). Im großen Feld der personalisierten Medizin ist die personalisierte Krebstherapie ein Bestandteil, den es sich getrennt zu betrachten lohnt. Die Idee der personalisierten Krebstherapie basierte bislang meistens darauf, anhand von Sequenzanalysen der Tumor-DNA krebsrelevante Mutationen zu erschließen und auf Basis dieser Informationen eine zielgerichtete Therapie zusammenstellen zu können (Prasad 2016; Tannock und Hickman 2016; Salari und Larijani 2017). Randomisierte kontrollierte Studien, die die Wirksamkeit des genbasierten Ansatzes der personalisierten Krebstherapie prüfen sollten, brachten bislang gemischte Ergebnisse: In der für ihr offenes Studiendesign kritisierten SHIVA-Studie konnte kein signifikanter Vorteil im progressionsfreien Überleben im Präzisionsmedizin-Studienarm im Vergleich zum Standard-Therapiearm festgestellt werden. Bei der wohlwollender beurteilten MOSCATO 01-Studie konnten nur 7% aller insgesamt erfolgreich, auf molekulare Target-Mutationen gescreenten Patienten, auch tatsächlich von der Präzisionstherapie profitieren. In beiden Studien wurden schwierig zu behandelnde, fortgeschrittene Tumoren adressiert (Le Tourneau et al. 2015; Massard et al. 2017; Schram und Hyman 2017). Als Alternative wird eine Zuwendung zu proteinbasierten Ansätzen vorgeschlagen, um herauszufinden, inwiefern sich das Mutationsprofil eines Tumors in funktioneller Hinsicht auswirkt. Zudem sind die

meisten zielgerichteten Therapien gegen Proteine gerichtet, was deshalb eine genau Kenntnis des Tumor-Proteoms erfordert (Buczak et al. 2018; Doll et al. 2019).

1.2. Proteomik und Massenspektrometrie

1.2.1. Begriffsdefinition und Überblick Proteomik

Das Wort „Proteom“ beschreibt die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus. Die Proteomik als Wissenschaft beschäftigt sich mit der Analyse einzelner Proteine, ganzer Proteome, Häufigkeitsmustern, Interaktionen, Lokalisationen und Modifikationen. Bei der Aufdeckung von Pathomechanismen, auch im Zuge der Krebsforschung, ist die Proteomik-Perspektive unerlässlich. Proteine agieren als Hauptakteure zellulärer Prozesse, und das Proteom passt sich dynamisch an Umwelt- oder Genveränderungen an. Das Proteom einer Zelle spiegelt somit den funktionellen Status der Zelle wider und definiert ihren Phänotyp (Aebersold und Mann 2016; Doll et al. 2019). An dieser Stelle lohnt es sich, den Weg vom statischen Informationsträger Genom bis zur dynamischen Funktionseinheit Proteom zu betrachten:

Die DNA fungiert als Bauplan und codiert die Aminosäuresequenzen aller Proteine einer Zelle durch Verkettung von Basenpaaren in der Doppelhelix. Bei der eukaryotischen Genexpression werden die genetischen Informationen in mehreren Schritten weitergegeben und Proteine gebildet. Hierzu wird zunächst in der Transkription der Code der DNA durch prä-mRNA (messenger ribonucleic acid) abgeschrieben. Die prä-mRNA wird prozessiert, beim Spleißen werden die Introns aus der Sequenz entfernt, Exons verbunden und beim RNA-Editing einzelne Basen verändert. Hierdurch entsteht die fertige mRNA, die den finalen Code für die Aminosäurekette eines Proteins trägt. Die mRNA wandert zu den Ribosomen, wo anhand ihrer Sequenzabfolge gekoppelt über die tRNA (transfer ribonucleic acid), Schritt für Schritt ein Protein aus den passenden Aminosäuren in der Phase der Translation zusammengesetzt wird. Fertige Proteine können durch posttranslationale Modifikationen weiter prozessiert werden und übernehmen die Aufgaben in der Zelle (Rassow et al. 2012).

Zwischen DNA und Protein liegen also viele Zwischenschritte, in denen die Proteinbildung beeinflusst werden kann und es liegt auf der Hand, dass alleinige Gen-Sequenzierung kaum Aussage über das tatsächliche Proteom einer Zelle treffen kann. Sogar Transkriptom-Analysen via mRNA-Sequenzierung zeigen, dass die RNA-

Expression nicht komplett mit der tatsächlich vorkommenden Proteinexpression übereinstimmt (Nagaraj et al. 2011; Liu et al. 2016). Mutationsereignisse im Genom sind ausschlaggebend für die Entwicklung von Krebserkrankungen, aber auch hier ist das veränderte Proteom verantwortlich für funktionelle Änderungen im Vergleich zu gesunden Zellen. Krebsdefinierende Zellmerkmale wie unkontrollierte Teilung, Verlust der Differenzierung und Apoptose-Stopp werden von Proteinen reguliert (Hanahan und Weinberg 2011; Rasso et al. 2012). Um einen genauen Eindruck in die Pathophysiologie verschiedenster Krebsarten zu bekommen, muss neben genomischen und transkriptomischen Untersuchungen mithilfe von geläufigen Techniken wie dem Next-Generation-Sequencing also auch die Analyse ganzer Proteome im Sinne eines panomischen Ansatzes angestrebt werden (Doll et al. 2019).

1.2.2. Proteine messen

Proteine sind lange Ketten aneinander gereihter Aminosäuren, welche sich dreidimensional anordnen und so komplexe Strukturen bilden können. Kurze Aminosäureketten, auch als Bauteil von Proteinen, werden Peptide genannt. Um Proteine messbar zu machen, bedient man sich des Verfahrens der Massenspektrometrie (MS) (Aebersold und Mann 2003). Hierbei lassen sich zwei Prinzipien basierend auf der Richtung des Informationsflusses während der Messung voneinander abgrenzen, nämlich die Bottom-Up- und die Top-Down-Analyse.

Die Bottom-Up-Analyse entspricht dem am häufigsten angewandten Verfahren in der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen. Hierbei werden Proteine verdaut und die entstehenden Peptide analysiert, wodurch man auf die dazugehörigen Ursprungproteine rückschließen kann. Das Gegenteil hiervon ist die Top-Down-Analyse, bei der direkt ganze Proteine im MS gemessen werden. Vorteil hiervon ist, dass die Proteinstruktur erhalten bleibt und dargestellt werden kann. Das Verfahren ist experimentell kompliziert, da Proteine für das Prinzip der MS als grenzwertig groß gelten (Walther und Mann 2010; Aebersold und Mann 2016).

Für komplette Proteom-Analysen wird die sogenannte DDA-Methode (data-dependent acquisition) bevorzugt. Hierbei wird eine unten beschriebene Tandem-Massenspektrometrie, gefolgt von einer Datenauswertung mit Programmen wie Perseus oder Max-Quant durchgeführt und häufig ein Quadrupol-MS mit einem Orbitrap-MS kombiniert. Als vorteilhaft wird gewertet, dass man vor der Messung die zu erwartenden Proteine nicht kennen muss und dass alle Proteine einer Probe auf

einmal gemessen werden können. Ist von Shotgun- Bottom-Up Proteomik die Rede, ist hiermit die DDA gemeint (Aebersold und Mann 2016).

1.2.3. Technische Grundlagen der Massenspektrometrie

Im Allgemeinen besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionen-Quelle, einem Analysator, der das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z -Wert) der Ionen ermittelt und aus einem Detektor, der die Anzahl der Ionen jedes m/z -Wertes misst (Aebersold und Mann 2003). Jedes Bauteil existiert in Varianten mit differierenden Funktionsweisen. Im Folgenden sollen die Schritte der Proteinmessung mit den entsprechenden Bauteil-Varianten erläutert werden.

Da der Analysator des Massenspektrometers den m/z -Wert in einem elektrischen Feld in einem Vakuum misst, müssen die Peptide vor der Messung ionisiert und in die Gasphase übertragen werden. Die Ionisierung wird am häufigsten mit einer Matrix-associated-laser-ionisation (MALDI) oder einer Elektrosprayionisation (ESI) durchgeführt. Bei der MALDI-Methode werden Ionen mit pulsierenden Laserstrahlen aus einer trockenen, kristallinen Matrix herausgelöst. Die ESI-Methode kann die Proben aus einer Lösung heraus ionisieren und deshalb gut an chromatographische Verfahren wie die Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatographie = LC) angeschlossen werden. Da bei komplexen Proben eine chromatographische Auftrennung vor der MS-Messung vonnöten ist, sind kombinierte LC-ESI-MS Verfahren beliebt.

Der Masseanalysator stellt das Zentrum des Massenspektrometers dar und ist für die Qualität der MS-Messung ausschlaggebend. Sobald die Ionen in der Gasphase in den Analysator eingespeist werden, wird der m/z -Wert ermittelt. Hierfür stehen vier unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, die alleine oder in Kombination bei einem Tandem-Massenspektrometer genutzt werden können. Beim Ion-Trap Analysator werden die Ionen vor der MS-Messung von einer Ionenfalle festgehalten. Beispiel für ein Ion-Trap-Verfahren ist die Orbitrap, bei der die Ionen um eine zentrale Elektrode zirkulieren, und von der axialen Frequenz der Oszillation auf ihrer Flugbahn auf die Quadratwurzel des m/z -Wertes geschlossen werden kann.

Bei Time-of-Flight-Instrumenten (TOF) werden die Ionen kinetisch aufgeladen und in einer Flugröhre nach ihrer Geschwindigkeit aufgetrennt. Um einen kompakteren Aufbau zu erreichen, sind manche dieser Geräte mit einem Reflektor ausgestattet,

welcher die Flugbahn der Ionen umkehrt und es somit erlaubt, die Länge des Flugrohres zu halbieren. TOF-Instrumente werden häufig mit der MALDI-Methode (matrix-associated-laser Ionisation) kombiniert (MALDI-TOF). Beim Quadrupol-MS werden statische elektrische Felder appliziert, die jeweils nur für Ionen eines bestimmten m/z -Wertes eine stabile Flugbahn liefern. Bei Fourier-Transformations-MS (FT-MS) werden die Ionen wie beim Ion-trap gefangen gehalten, allerdings nicht mit elektrischen, sondern mit magnetischen Feldern.

Um vom m/z -Wert auf die Masse des Moleküls rückschließen zu können, muss die Ladung des Moleküls bekannt sein. Die Ladung wird mithilfe von Kohlenstoff-Isotopen ermittelt. Um die genaue Aminosäurefrequenz bestimmen zu können, wird an die erste MS-Messung eine zweite Messung angeschlossen (MS/MS-Spektrum), Synonyme sind Tandem-MS oder MS/MS. Hierfür werden die Peptide mittels verschiedener Verfahren an den Peptidbindungen fragmentiert. Zum Beispiel werden die Peptide im Rahmen des Collision induced dissociation-Verfahren (CID) durch Kollision mit einem reaktionsträgen Inertgas wie Helium oder Stickstoff bei geringem Druck an den Aminosäurebindungen fragmentiert. Der m/z -Wert der resultierenden Peptidfragmente wird bestimmt, hierdurch kann über den Abstand der einzelnen Fragmente und unter Berücksichtigung der spezifischen Masse jeder einzelnen Aminosäuren auf die genaue Aminosäure-Sequenz zurückgeschlossen werden. CID-Instrumente können zwischen diverse Formen von Masseanalytoren geschaltet werden, beispielsweise zwischen zwei Quadrupol-Analysatoren oder zwischen einen Quadrupol und einen TOF-Analysator.

Die Proteinbestimmung erfolgt, indem die erhobenen Daten in Form von Peptidmasse und Fragment-Spektrum entweder ergebnisoffen durch de novo Sequenzierung oder mit einer bereits vorhandenen in silico verdauten Proteindatenbank abgeglichen werden. Heutzutage gibt es multiple Programme mit verschiedenen Funktionsschwerpunkten aus unterschiedlichen Proteomik-Denkschmieden, weshalb nur eine beispielhafte Vorstellung erfolgen kann. Einer der ersten Datenbank-Algorithmen ist MOWSE (molecular peptide weight search database), welcher 1993 veröffentlicht wurde und mit einem wahrscheinlichkeits-basierten Ansatz die Identifikation von Proteinen leistet (Pappin et al. 1993). Die Weiterentwicklung von MOWSE, Mascot, ist unter anderem flexibler in Bezug auf posttranslationale Modifikationen und bietet einen großen Umfang von Funktionen an (Perkins et al.

1999). Seit 2008 gibt es Max-Quant, welches sich basierend auf der Protein-Quantifizierung des SILAC-Verfahrens auf eine besonders hohe Proteinidentifikations- und Proteinquantifizierungsrate spezialisiert hat (Ong et al. 2002; Aebersold und Mann 2003; Cox und Mann 2008; Aebersold und Mann 2016).

1.2.4. Anwendung

1988 maßen Tanaka et al. zum ersten Mal die Masse von Proteinen, indem sie die Massen ionisierter Peptide mittels MALDI mit einem Time-of-flight-Massenspektrometer analysierten (Tanaka et al. 1988). Seitdem hat sich die Methode ständig weiterentwickelt und die massenspektrometrische Messung von Proteinen hat sich als Standardverfahren für unverzerrte Proteinmessung im großen Stil bewährt. Im Laufe der Zeit verringerten sich die Messzeiten, komplette Proteome wurden messbar und geringere Probenmengen wurden detektierbar (Aebersold und Mann 2003; Walther und Mann 2010; Aebersold und Mann 2016; Doll et al. 2019). In den vergangenen Jahren konnten so schon bei diversen soliden Tumoren MS-Messungen vorgenommen werden, um ihr Proteom zu entschlüsseln. Ebenso konnten auf diese Weise Biomarker auf Proteinebene erschlossen werden, unter anderem bei Kopf-Hals-Bereich-Tumoren (Matta et al. 2010), bei Brustkrebs (Tyanova et al. 2016), dem Prostatakarzinom (Iglesias-Gato et al. 2016), dem kolorektalen Karzinom (Yin et al. 2015) oder dem hepatozellulären Karzinom (Ying et al. 2019).

1.3. Probenaufbereitung für Massenspektrometrie

1.3.1. Voraussetzungen für massenspektrometrische Messungen

Die Aufbereitung der Proteinproben ist besonders wichtig, da sie Sensitivität, Genauigkeit und Robustheit des Verfahrens maßgeblich mit beeinflusst (Altelaar und Heck 2012). Im allgemeinen Ablauf der Probenpräparation für Bottom-up Analysen werden zunächst die Proteine aus Gewebe, Körperflüssigkeiten oder Zellen extrahiert und mittels Seifen solubilisiert. Danach erfolgt die Denaturierung der Proteine sowie die Reduktion und anschließende Alkylierung von Cysteinen. Anschließend werden die Proteine enzymatisch mittels sequenzspezifischer Proteasen verdaut und die resultierenden Peptide vor der MS-Messung aufgereinigt. Ein wichtiges Hindernis entsteht im Zuge der Extraktion und Solubilisierung der Proteine: Aufgrund ihrer komplexen biochemischen Struktur erfordert dies unterschiedliche chemische Reagenzien, unter anderem Detergenzien wie Natrium-Dodecylsulfat (SDS) oder chaotrope Substanzen wie Urea. Diese sind jedoch inkompatibel mit dem späteren

enzymatischen Verdau und können die massenspektrometrische Messung behindern. Proteinaufbereitungsverfahren müssen also in der Lage sein, die störenden Substanzen vor Verdau und MS-Analyse aus der Probe zu entfernen (Kulak et al. 2014; Hughes et al. 2019). Materialverluste im Laufe des Aufbereitungsprotokolls stellen ein weiteres Problem dar: Im Gegensatz zur Genetik, wo man mit der PCR Material beliebig amplifizieren kann, muss die Proteomik auf bereits vorhandenes und häufig rares Material zurückgreifen: Ein Protokoll, das auch geringe Mengen an Startmaterial analysieren möchte, muss demzufolge die Materialrückgewinnung optimieren (Krieg et al. 2002). Des Weiteren sind Einfachheit der Durchführung, Schnelligkeit, Automatisierungsmöglichkeit und geringe Kosten wichtige Faktoren, um Auswertungen im großen Stil zu erlauben (Hughes et al. 2019). Mit verschiedenen Methoden wurde versucht, die Hindernisse der Proteinaufbereitung auf unterschiedliche Art und Weise zu lösen. Im Folgenden werden vier dieser Methoden der Probenaufbereitung für die Bottom-up Analyse präsentiert und ihr Nutzenprofil ausgewertet.

1.3.2. In-Gel Verdau

Grundlage des In-Gel Verdau-Verfahrens ist ein Gel, in dem Proteine auf Basis ihrer Masse und/oder ihres isoelektrischen Punkts mittels Elektrophorese aufgefächert werden. Je nach Aufbau des Experiments eignen sich verschiedene Gele, beliebt ist beispielsweise das Polyacrylamidgel (Magdeldin et al. 2014). Die Proteine im Gel lassen sich durch sichtbare Farbstoffe wie z.B. Coomassie Brilliant Blue, Silbernitrat oder bei Tageslicht unsichtbare Fluoreszenzfarbstoffe anfärben. Silbernitrat ist sehr sensitiv, kann aber durch Modifikation der Proteine die massenspektrometrische Messung stören. Coomassie Brilliant Blue ist weniger sensitiv, stellt aber keine kovalenten Bindungen zu den Proteinen her und ist daher hervorragend kompatibel mit der Massenspektrometrie (Neuhoff et al. 1988; Mortz et al. 2001; Chevalier 2010). Im Gel zeigen sich nach der Färbung Proteinbanden in Form feiner Streifen. Diese können mit einem Skalpell einzeln herausgetrennt und zum Beispiel in 1mm³ große Würfel zerteilt werden. Es folgen Schritte für die Entfärbung, Reduzierung und Alkylierung, meist in einer Abfolge von Wasch- und Entwässerungsschritten. Nach dem Verdau werden die entstandenen Peptide aus der Gel-Phase extrahiert und in einem Puffer gelöst der Massenspektrometrie zugänglich gemacht (Wolters et al. 2016; Goodman et al. 2018).

Die erste Veröffentlichung, in der via In-Gel-Verdau isolierte Peptide in eine massenspektrometrische Messung eingespeist wurden, stammt von 1996 und spezialisiert sich auf die Silbernitrat-Färbung (Shevchenko et al. 1996). 2006 wurde ein überarbeitetes Protokoll des In-Gel Verdau herausgegeben, das sowohl für Silbernitrat- als auch für Coomassie-Färbungen verwendbar ist und eine schnelle und sensitivere Analyse gewährleisten soll (Shevchenko et al. 2006). Für das Verfahren gibt es heutzutage multiple Protokolle mit Anpassung der genannten Schritte, Modifikationen werden immer wieder veröffentlicht. Als Vorteil des Verfahrens wird insbesondere seine langjährige Etablierung gewertet (Syal und Tadala 2015; Ruelcke et al. 2016; Goodman et al. 2018; Laštovičková et al. 2019). Die Verwendung von Detergenzien wie SDS ist durch die Aufreinigung der Gel-Würfel möglich. Zudem ist die getrennte massenspektrometrische Analyse von durch die Elektrophorese nach Gewicht getrennter Proteine von Vorteil. Hierdurch wird nämlich die Messung wenig abundanter Proteine im Vergleich zu abundanteren Proteinen verbessert, der sogenannte dynamische Umfang wird erhöht. Allerdings kann durch die Bindung der Proteine im Gel bei unzureichender Rückgewinnung ein nicht zu vernachlässigender Materialverlust ausgelöst werden (Shevchenko et al. 2006; Klont et al. 2018). Im Gegensatz zu modernen "single tube" Verfahren, die in nur einem Versuchsgefäß durchgeführt werden, ist der In-Gel-Verdau auf einen komplexeren Versuchsaufbau angewiesen, was eine Automatisierung erschwert (Wiśniewski et al. 2009). Neue Protokolle versuchen dennoch, das Verfahren für die Hochdurchsatz-Proteomik zugänglich zu machen (Ruelcke et al. 2016).

1.3.3. FASP

FASP steht kurz für „filter-aided-sample-preparation“ und ist ein Verfahren, das 2009 basierend auf einer 2005 veröffentlichten Methode von Wiśniewsky publiziert wurde (Manza et al. 2005). Hierbei ist eine Vorbehandlung der Proben mit Detergenzien wie SDS möglich, da die Proteine auf einer Filtermembran mit einer Molekulargewichtsgrenze (MWCO) aufliegen und die Kontaminanten durch den Einsatz wiederholter Diafiltration und Pufferaustausch mit 8M Urea entfernt werden können. Auf der Filtermembran aufgebracht, können die so von Störsubstanzen gereinigten Proteine enzymatisch verdaut werden und als Peptide klein genug durch erneute Zentrifugation den Filter durchqueren und in dem darunter liegenden Tube aufgefangen werden (Wiśniewski et al. 2009). FASP konnte bereits in verschiedenen

Gebieten der Proteomik Anwendung finden, beispielsweise in der Analyse von N-Glykoproteomen, Phosphoproteomen und FFPE-Proben (Wiśniewski et al. 2010; Zielinska et al. 2010; Wiśniewski et al. 2013). Vorteil der FASP-Methode ist also neben der Entfernung von Verunreinigungen auch die flexible Einsetzbarkeit des Verfahrens in verschiedenen Proteomik-Sparten. Als Nachteil kann der hohe Materialverlust aufgeführt werden. So war in einer Studie über Tumormarker im Kolonkarzinom die „High-recovery FASP“ in Bezug auf die Materialrückgewinnung (gewonnene Peptidmenge vs. Eingesetzte Proteinmenge in µg) der In-Gel-Digestion zwar deutlich überlegen, aber auch die FASP konnte abhängig von der Proteinmenge zu Beginn nur etwa 50% des Materials in Form von Peptiden zurückgewinnen. Dies war auch mit Steigerung der initialen Proteinmenge nicht veränderlich (Wiśniewski et al. 2011). Um die Materialrückgewinnung und somit die Peptidausbeute zu erhöhen, publizierten Erde et al. ein weiterentwickeltes FASP-Verfahren, genannt enhanced FASP (eFASP) (Erde et al. 2014). In einer vergleichenden Studie zwischen FASP und eFASP konnte 2015 aber auch hier keine deutliche Verringerung des Proteinverlustes nachgewiesen werden (Nel et al. 2015).

1.3.4. In-Stage-Tip Methode

Die In-Stage-Tip Methode (iST) wurde 2014 von Kulak et al. publiziert, basiert teilweise auf dem FASP-Protokoll und wurde mit dem Ziel entwickelt, die Proteinaufbereitung für MS-Analyse radikal zu vereinfachen. Hierfür werden sogenannte StageTips (stop-and-go-tips) verwendet, also Pipettenspitzen, in die eine C18 Membran appliziert worden ist und die man normalerweise für die Probenreinigung kurz vor der MS-Analyse benutzt. Die Membranen verhindern das Vorbeifließen von Flüssigkeit, wodurch sich eine Säule bildet und das Verfahren den Aspekt einer in-solution-digestion erlangt. Lyse, Reduktion und Alkylierung werden zu einem Schritt gebündelt, indem DTT (Dithiothreitol) durch TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin) und IAA (Iodacetamid) durch Chloroacetamid ersetzt und zum SDS-freien Lysepuffer gegeben werden. Nach anschließendem Verdau fungiert die C18 Membran als Bindungsmaterial für die Peptide und als Barriere für unlösliches Material und Makromoleküle. Als Vorteil lässt sich die Schnelligkeit des Protokolls angeben: Abgesehen vom Verdau über Nacht soll das Verfahren nur 30 Minuten dauern, umfasst nur 5 Pipettierschritte und kann demnach auch gut in ein 96er-well Format hochskaliert werden. Auch wenn die Autoren anhand von Experimenten mit Hefe-

Zellen betonten, dass SDS nicht für eine suffiziente Lyse notwendig ist, kann es doch als Nachteil gewertet werden, dass ein universelles und häufig genutztes Detergens wie SDS nicht mit dem iST Verfahren kompatibel ist (Kulak et al. 2014).

1.3.5. Single-pot Solid-phase-enhanced Sample preparation (SP3)

SP3 steht als Abkürzung für „Single-pot Solid-phase-enhanced Sample-Preparation“ und wurde 2014 von Hughes et al. erstmalig veröffentlicht. Bei dem Verfahren werden Proteine und Peptide auf der hydrophilen Oberfläche von mit Carboxylgruppen modifizierten paramagnetischen Beads nach Vorbild der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) immobilisiert. Hierbei können Proteine mit allen gängigen Reagenzien wie SDS oder Triton-X100 solubilisiert werden. In einem ersten Bindungsschritt müssen die lysierten Proteine an die Beads binden. Hierfür wird ein organisches Lösungsmittel wie z.B. Acetonitril (ACN) oder Ethanol im Überschuss zur wässrigen Lösung mit den Beads und den Proteinen hinzugegeben. Die Proteine werden in einer Solvatationsschicht in der hydrophilen Phase rund um die Beads abgefangen und festgehalten. Nach der Immobilisation an den Beads können die Proteine mithilfe eines magnetischen Gestells gewaschen werden, um Kontaminanten zu entfernen: Sobald ein Probengefäß mit paramagnetischen Beads auf das magnetische Gestell gesetzt wird, lagern sich die Beads zusammen mit den immobilisierten Proteinen an der magnetseitigen Probengefäßwand an. In den Waschsritten kann so wiederholend überschüssige Flüssigkeit entfernt und mit neuem Waschpuffer in Form von Ethanol und Acetonitril nachgespült werden. Die von störenden Kontaminanten gereinigten Proteine können dann durch Zugabe eines Verdauungspuffers auf den Beads verdaut und anschließend in einem Elutionsschritt als Peptide wieder von den Beads gelöst und der MS-Analyse zugeführt werden. In dem Paper konnte die Funktionalität des Verfahrens durch die Entschlüsselung des Proteoms von einzelnen Drosophila Embryos gezeigt werden (Hughes et al. 2014).

Die magnetischen Beads sind der Schlüsselfaktor des Verfahrens, ihre experimentellen Eigenschaften bestimmen die Namensgebung von SP3. Erst sie ermöglichen den Ablauf in nur einem Gefäß („single pot“) sowie die Prozessierung der Proteine in einer semisoliden Phase („solid phase-enhanced“). Magnetische Partikel haben seit den 1990er Jahren in der Genetik Verwendung gefunden, insbesondere in der Sequenzierung von Erbgut (Hultman et al. 1989; Uhlen 1989; DeAngelis et al. 1995; Wilkening et al. 2013). Weitere Anwendungsbereiche sind beispielsweise die

Gewinnung von DNA aus Blut (Deggerdal und Larsen 1997) und Knochen (Dukes et al. 2012) oder auch als Hilfsmittel bei Hybridisierungsexperimenten (Lund et al. 1988; Bennick und Brosstad 1993). In der Proteomik wurden magnetische Beads bereits in einige Spezialanwendungen eingebunden. Hierzu gehören die Anreicherung posttranslational modifizierter Proteine wie Phospho- (Ji et al. 2012; Zeng et al. 2012) und Glykoproteine (Yeh et al. 2012) sowie der Verdau von Proteinen durch Immobilisierung von Trypsinen auf magnetischen Beads (Fan et al. 2014). Auch beim Nachweis von Biomarkern wie PSA (prostate-specific antigen), einem in der Prostata produziertem Protein, wurde bereits ein attraktives Anwendungsgebiet der Beads veröffentlicht: Bindet man eine große Menge Antikörper auf der Oberfläche magnetischer Beads, konnte eine einhundertfach erhöhte Sensitivität der Detektion der Biomarker im Vergleich zu ungebundenen Antikörpern ermittelt werden (Mani et al. 2012).

Mit dem SP3-Verfahren wurde 2014 erstmals ein komplett auf magnetischen Beads basierendes Probe-Aufbereitungsverfahren in der Proteomik veröffentlicht. Das Protokoll konnte unter anderem bei der Analyse von Makrophagen (Sielaff et al. 2017; Nagala et al. 2018), der Substantia nigra (Griesser et al. 2020), von Ovarial-CA (Hughes et al. 2016), Colon-CA (Owen et al. 2018), HCC (Buczak et al. 2018) und bei FFPE-Gewebe sowie bei verschiedenen Zelllinien (Tien et al. 2017; Cagnetta et al. 2018; Mateus et al. 2018) Einsatz finden. Insgesamt scheint das SP3-Verfahren die Nachteile der anderen genannten Verfahren zu umgehen, indem es sich robust gegenüber diversen Vorbehandlungsbedingungen zeigt und durch geringen Materialverlust auch kleine initiale Probenmengen analysierbar macht.

1.3.6. Single-tube Verfahren im Vergleich

Geht man davon aus, dass viele eingesetzte Gefäße und komplizierte Abläufe den Materialverlust und die Kontaminationswahrscheinlichkeit von Proben erhöhen, sind „single-tube“ Verfahren, die in nur einem Versuchsgefäß ablaufen, ein Weg, um auch kleine Mengen von Proteinmaterial sauber und sicher verarbeiten zu können. Von den vier vorgestellten Verfahren sind FASP, iST und SP3 Verfahren mit nur einer Versuchseinheit, während der In gel-Verdau mit dem Polyacrylamidgel und Probengefäßen auf einen Versuchsaufbau mit mehreren Einheiten angewiesen ist. Der In gel-Verdau hat sich auch aus eigener Erfahrung im Labor als sehr arbeitsaufwendig gezeigt, das Handling der kleinen Gel-Würfel erfordert

Fingerspitzengefühl. Ebenso ist es, trotz der Aufreinigung, anfällig für Kontaminationen wie beispielsweise mit Polyethylenglykol (PEG). Wie oben gezeigt, hat es sich zudem in Sachen Materialgewinnung dem FASP-Protokoll gegenüber bereits als unterlegen gezeigt. Auch das FASP-Protokoll scheint jedoch langsam abgelöst zu werden: So konnten Sielaff et. al. 2017 in der ersten unabhängigen Vergleichsarbeit zwischen FASP, SP3 und iST Protokollen zeigen, dass das FASP-Protokoll zwar bei relativ hohen Ausgangsmengen von 20 µg Protein den anderen Verfahren ebenbürtig ist. Bei Probenmengen unter 20 µg Protein konnten mittels FASP allerdings deutlich weniger Proteine und Peptide nachgewiesen werden als mittels der anderen beiden Verfahren. Des Weiteren ließen die quantitative Reproduzierbarkeit sowie die Präzision des Verfahrens mit sinkender Proteinausgangsmenge nach. SP3 und iSt lieferten sich hier bei der Materialrückgewinnung ein Kopf an Kopf-Rennen. Beide zeigten bis in den Bereich von 1µg Protein Startmaterial eine ähnlich große Anzahl an identifizierten Proteinen (Sielaff et al. 2017). Da bei dem iST-Verfahren der Nachteil der Inkompatibilität gegenüber wichtigen Detergenzien verbleibt und eine Verarbeitung von SDS solubilisierten Proteinen aus FFPE-Gewebe geplant war, wurde in dieser Arbeit das SP3-Verfahren als am vielversprechendsten für die Biomarker-Bestimmung auf Proteinebene mittels Bottom-up MS-Analyse angesehen.

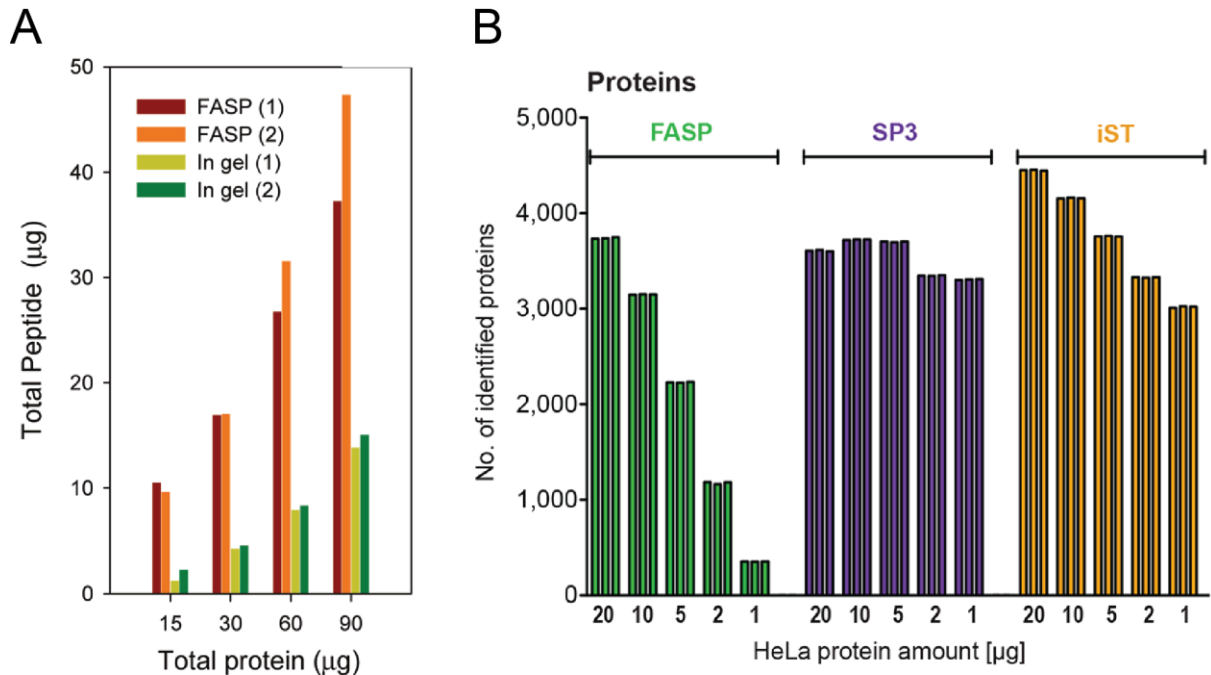


Abbildung 1: Single-tube Verfahren im Vergleich

(A) Während das FASP-Protokoll im Mittel über 50% der geladenen Proteine in Form von Peptiden regenerieren kann, schneidet das In-Gel-Verfahren mit Mittelwerten der Peptid-Ausbeute von unter 20% des Protein-Inputs deutlich schlechter ab (Wiśniewski et al. 2011). (B) Unter einer Input-Menge von 20µg Protein nimmt die Anzahl der identifizierten Proteine beim FASP-Protokoll merklich ab. SP3-Protokoll und In-Stage-Tip-Protokoll generieren bis zu einem Protein-Input von 1µg eine ähnliche hohe Anzahl identifizierter Proteine, wobei das SP3-Protokoll eine konstante Tendenz und das iST-Protokoll eine absteigende Tendenz zeigt (Sielaff et al. 2017).

1.4. Fixierung von Gewebe

1.4.1. Fresh-Frozen Gewebe

Für die konkrete Diagnostik der meisten Krebsentitäten ist die Entnahme von Gewebe nötig (Belczacka et al. 2019). Entnommenes Gewebe muss haltbar gemacht werden, für diese sogenannte „Fixierung“ gibt es zwei Basisverfahren: Bei der Fresh-Frozen-Methode wird das gewonnene Gewebe direkt nach der Entnahme tiefgekühlt. Das Gewebe muss mindestens bei -80°C gelagert werden, teilweise wird flüssiges N₂ benötigt. Hierdurch werden entsprechende Kühlkapazitäten für die Lagerung benötigt und es entstehen nicht zu vernachlässigende Lagerkosten (Donczo und Guttman 2018). Das zweite Verfahren basiert auf einer Fixierung in Formalin und Einbettung in Paraffin und wird im Folgenden beschrieben.

1.4.2. FFPE-Gewebe

Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe wird im englischen Sprachraum „formalin-fixed, paraffin-embedded“ genannt und mit „FFPE“ abgekürzt. Hierbei wird das Gewebe nach der Entnahme heruntergekühlt oder sofort in flüssigem Formalin

platziert. Danach findet die Fixierung statt, indem die Probe für 24 Stunden in einem 19 mM Phosphatpuffer mit bis zu 4 % (w/v) Formaldehyd bei einem pH von 7,4 aufbewahrt wird. Der Einbettungsprozess umfasst zwei Schritte: Zunächst wird die Probe entwässert, indem sie in Ethanol und Xylol inkubiert wird. Dann wird die entwässerte Probe in geschmolzenes Paraffin eingebettet, welches bei Raumtemperatur aushärtet. In der Regel wird das Verfahren in kleinen Plastik-Hülsen durchgeführt. Die fertig präparierten Proben können mit dem Mikrotom in schmale Streifen von 3-5 µm geschnitten, auf gläserne Objektträger aufgebracht und diversen Färbungsmethoden, am geläufigsten ist hier die HE Färbung, zugänglich gemacht werden (Donczo und Guttman 2018).

1.4.3. Auswirkung von FFPE auf die Proteinstruktur

Auf der ganzen Welt gibt es Datenbanken mit FFPE-Gewebeproben, zu denen häufig auch die zugehörigen Patienteninformationen wie Überlebensdaten verfügbar sind. So wird geschätzt, dass es heutzutage, mit steigender Tendenz, ungefähr eine halbe Milliarde archivierter FFPE-Proben gibt (Doll et al. 2019). Hierdurch bieten FFPE-Proben ein enormes Reservoir für pro- und retrospektive Studien. Allerdings muss das enthaltene Material aus den Proben herausgelöst werden. FFPE-Gewebefixierung lässt das Gewebe nicht vollkommen unverändert, sondern beeinflusst seine mikromolekulare Struktur. Formaldehyd ist Hauptbestandteil des Formalins, einer 37% (v/v) wässrigen Formaldehydelösung, und bildet kovalente Quervernetzungen in Form von Methylenbrücken zwischen Proteinen, am häufigsten zwischen Aminogruppen der Aminosäuren Arginin und Lysin, sowie über andere Seitengruppen der Aminosäuren Serin und Cystein (Hood et al. 2006; Ralton und Murray 2011; Donczo und Guttman 2018).

1.4.4. Extraktion von Proteinen aus FFPE-Gewebe

In der proteomischen Forschung galt es lange als Herausforderung, valide Protein-Informationen aus dem quervernetzten Protein Konglomerat von FFPE-Proben zu gewinnen. 1998 konnten Ikeda et al. zum ersten Mal Proteine aus FFPE-Gewebe für eine Western Blot Analyse zurückgewinnen und dabei P53, CDK4, E-Cadherin und β -Catenin nachweisen. Die Signale der Moleküle konnten allerdings vor der Anwendung eines speziellen Protokolls nicht mit Antikörpern in immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen werden. Der Rückschluss war, dass die verwendete Methode, also Inkubation in einem radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) mit 2 % SDS bei

100 °C, die Quervernetzungen gelöst hatte und die Antikörperbindungsstellen hierdurch freigelegt und für die Western Blot Analyse zugänglich gemacht wurden (Ikeda et al. 1998). Vor dem weitverbreiteten Gebrauch der Massenspektrometrie wurden andere Methoden wie auch der Western Blot zur Visualisierung von Proteinen genutzt. Eine von ihnen, die zwei-dimensionale Gel-Elektrophorese (2-DE), kombiniert die Prinzipien der Isoelektrischen Fokussierung und der SDS-PAGE-Analyse (O'Farrell 1975). 2003 konnte eine Studie die Extraktion von Proteinen aus Ethanol-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe und frisch eingefrorenem Gewebe zeigen, nicht aber von FFPE-Gewebe. Das FFPE-Gewebe war mit einem isoelektrischen Fokussierungspuffer behandelt worden, konnte nicht aufgetrennt werden und zeigte eine gegen Null tendierende Protein-Rückgewinnung in der 2-DE (*Abbildung 2*). Obwohl die Autoren auf die höhere Verfügbarkeit von FFPE-Proben hinwiesen, wurde die Ethanol-basierte Fixierungsmethode als Grundlage für die Protein-Analytik empfohlen (Ahram et al. 2003). Nachdem SDS in der Proteomik-Forschung etwas in Vergessenheit geraten war, integrierte Wiśniewski et al. bei der Methode der oben erläuterten FASP-Methode SDS wieder in einen proteomisches Analyseverfahren (Wiśniewski et al. 2009). SDS in hohen Konzentrationen wird bei FASP genutzt, um die Quervernetzungen, die durch die Formalinfixierung entstanden sind, aufzulösen. Nach der Deparaffinierung wird das FFPE Material in einem Puffer (0,1 M Tris/HCL, 4 % SDS, 0,1 M DTT, pH 8.0) bei 99 °C für 1 h gekocht. Während der FASP-Prozedur kann das im Lysepuffer enthaltene SDS quantitativ durch Urea auf dem Filter-Element ersetzt werden und die Proben werden so kompatibel für ein anschließenden proteolytischen Verdau und MS-Messungen. Es konnte gezeigt werden, dass das FFPE-Verfahren nicht maßgeblich die Protein- und PeptidAusbeute im Vergleich zu frisch gefrorenen Proben beeinflusst. FFPE und frisch gefrorene Gewebeproben zeigten 91 % Überlappung bei der Anzahl von Proteinidentifikationen. Trotzdem konnte der FFPE-Ursprung der Proteine noch in Coomassie-gefärbten SDS-Gelen nachgewiesen werden: Im Vergleich zu frisch gefrorenen Geweben zeigte das fixierte Gewebe eine intensivere Färbung zwischen 64 kDa und 250 kDa, die auf Reste der Quervernetzungen zwischen Proteinen hinweisen könnten (Ostasiewicz et al. 2010).

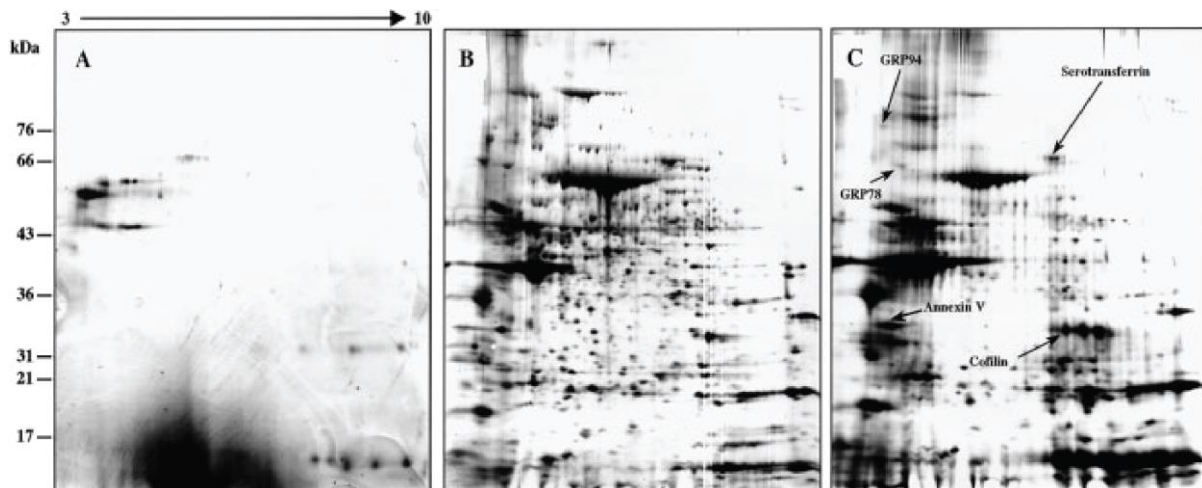


Abbildung 2: Probleme der Proteingewinnung aus FFPE-Gewebe 2003

Proteinsignal von Prostataktomie-Gewebeprobe in einer 2-DE nach drei unterschiedlichen Methoden der Gewebefixierung: Während Ethanol-fixiertes und in Paraffin eingebettetes (B) Gewebe sowie frisch gefrorenes Gewebe (C) ein deutliches Proteinmuster in der 2-DE zeigten, blieb das Protein-Signal der FFPE-Proben (A) im Vergleich schwach (Ahram et al. 2003).

1.4.5. Stabilität von Proteinen in FFPE-Gewebe bei Langzeitlagerung

Gerade die lange Haltbarkeit und flächendeckende Verfügbarkeit von FFPE-Gewebe ist ein starkes Argument für die Verwendung in proteomischen Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass FFPE-Proben auch nach einer Lagerzeit von 30 Jahren noch ohne größere Veränderungen in der makroskopischen Struktur histopathologisch analysierbar sind (Ono et al. 2018). Für eine Proteinanalyse muss allerdings auch die mikroskopische, also molekulare, Struktur weitestgehend stabil sein. Bagley et al. verglichen in einer Arbeit insgesamt 9 Proben von Leiomyomen von 1990 bis 2002, die je nach Alterszugehörigkeit auf drei Gruppen aufgeteilt wurden. Die Effekte einer Lagerung von 10 Jahren zeigten sich generell als gering, allerdings seien weniger abundante Proteine von der Lagerung vermutlich mehr beeinträchtigt worden als abundante Proteine. Die Forscher bemerkten selbst, dass die geringe Probenanzahl und der Mangel an technischen Replikaten die Ergebnisse beeinflusst haben könnten (Balgley et al. 2009). In einer anderen Studie wurden zwei unterschiedlich lang respektive 1 Woche und 6 Monate gelagerte Leberproben miteinander verglichen. Zwischen beiden Proben ließ sich mit der FASP-FFPE-Methode eine Überlappung des Protein-Signals von 85% ermitteln. Dies kann darauf hindeuten, dass zumindest eine Lagerung von 6 Monaten die per FFPE fixierten Proteine nicht maßgeblich beeinflusst (Ostasiewicz et al. 2010). Es ist anzumerken, dass große Übersichtsarbeiten über die

Stabilität von Proteinen und Peptiden in FFPE-Gewebe in Langzeitlagerung bislang fehlen.

1.5. Analkarzinom

1.5.1. Epidemiologie, Ätiologie, Prävention und Prognose

Analkarzinome stellen etwa 0,3% aller maligner Tumoren dar, was unter 5% aller gastrointestinalen Tumoren entspricht. Der Altersmedian zum Zeitpunkt der Diagnose liegt bei 60 Jahren (Herold 2016). Die Inzidenz ist bei Frauen etwas höher als bei Männern, wobei die Gesamtinzidenz weltweit ansteigt (Nielsen et al. 2012; Wilkinson et al. 2014; van Dyne et al. 2018). Der wichtigste Risikofaktor für das Analkarzinom ist die Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV). Über 80% der Fälle sind mit Hochrisiko-Varianten des Virus assoziiert, hiervon ein Großteil mit HPV-Typ 16, gefolgt von Typ 18 (Grulich et al. 2012; Raptis et al. 2015). Ein weiterer Risikofaktor ist die Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV), wobei Analkarzinome als Nicht-AIDS-definierende Erkrankungen (NAD) gelten. Seit der flächendeckenden Etablierung der kombinierten antiretroviralen Therapie (cART) treten die NADs häufiger auf. Als Grund für die höhere Analkarzinom-Inzidenz bei HIV-positiven Patienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung wird eine hohe Koinfektionsrate von HIV und HPV vermutet (Hensel et al. 2011). Weitere Risikofaktoren sind jede Form von Immunsuppression, rezeptiver analer Geschlechtsverkehr insbesondere unter Männern (MSM= Men having sex with men), Promiskuität, vorangegangene Geschlechtserkrankungen und Nikotinabusus (Daling et al. 2004).

Mit dem Aufkommen der Impfung gegen HPV-Risikotypen seit 2006 steht für das HPV-assoziierte Analkarzinom die Möglichkeit der primären Prävention im Raum. Die Verhinderung von Analen intraepithelialen Neoplasien durch prophylaktische quadrivalente Impfung junger, gesunder und HPV-seronegativer MSM konnte bereits in einer Studie von Palefsky et al. nachgewiesen werden. (Vuyst et al. 2009; Palefsky et al. 2011).

1.5.2. Histologie von Analkanal und Analkarzinom

Der Analkanal hat als Zone zwischen Rektum und Anus eine Übergangsfunktion und eine Länge von in etwa 4 cm. Als Teil des Kontinenzorgans ist er von einem komplexen Sphinktersystem umgeben. Da insbesondere zur Abgrenzung des Analkarzinoms vom Analrandkarzinom die histologischen Verhältnisse von Relevanz sind, werden diese im Folgenden genauer beleuchtet. Vorweg gibt es differierende Nomenklaturen, die

hier genutzte entspricht der Terminologica histologica von 2008: Der Analkanal beginnt vom Rektum ausgehend mit der Junctio colorectalis und der anschließenden Zona colorectalis, die aus kolorektaler Mukosa mit Krypten besteht. Darauf folgt eine Zona transitionalis bis hin zur Linea dentata, die ein Mosaik aus mehrschichtigem Epithel, einschichtigem Zylinderepithel und kolorektaler Schleimhaut charakterisiert. Die Linea dentata ist eine wichtige Landmarke, die zackenartige Form ergibt sich durch alternierend angeordnete Valvulae und Columnae anales, in den Vertiefungen der Valvulae enden die Analdrüsen. Unterhalb der Linea dentata befindet sich die hell anmutende Zona alba, auch histologisch Zona squamosa genannt, die mit mehrschichtigem unverhornten Plattenepithel bedeckt ist. Als nächste Zone folgt auf die Linea anocutanea die Perianalhaut, die sich durch pigmentierte Epidermis und das Vorkommen von Schweißdrüsen und Haarfollikeln kennzeichnet (Lüllmann-Rauch und Paulsen 2012; Osborne et al. 2014).

Das Analkarzinom geht aus einer Vorläuferläsion, der Analen intraepithelialen Neoplasie (AIN), hervor. Klassifiziert man Analkarzinome histologisch, so handelt es sich in 85% der Fälle um Plattenepithelkarzinome. Während es vormals eine differenzierende Nomenklatur für Analkarzinome gab, beruft sich die WHO nun auf einen allgemeinen Begriff, nämlich das Anale Plattenepithelkarzinom (anal squamous cell carcinoma=ASCC) (WHO 2019). Weitere maligne Raumforderungen des Analkanals sind unter anderem Adenokarzinome und Melanome oder auch der Buschke-Löwenstein Tumor. Abzugrenzen sind zudem Analrandtumoren, welche distal der Linea anocutanea in der Zone der Perianalhaut liegen, hierdurch häufig bereits im Frühstadium entdeckt und chirurgisch gut therapiert werden können (Shridhar et al. 2015). Die Ausdehnung des Primärtumors wird wie folgt gegliedert: T1-Läsionen sind kleiner als 2cm, T2-Läsionen 2-5cm, T3-Läsionen größer als 5cm. Bei T4-Läsionen werden benachbarte Organe wie Vagina, Urethra oder Harnblase infiltriert (Amin et al. 2017).

1.5.3. Klinik, Diagnostik und Therapie

Mit steigender Inzidenz des ASCC rückt die Optimierung des Krankheitsmanagements in den Fokus. Die medizinische Versorgung des Analkarzinoms wurde in Deutschland bislang heterogen gestaltet. Mehrere Fachdisziplinen wie die Dermatologie, Gastroenterologie, Chirurgie und Proktologie sind beteiligt und das Vorgehen erfolgt nicht flächendeckend standardisiert. Um diesem Umstand Abhilfe zu verschaffen

wurde die erste deutsche Leitlinie zur optimierten interdisziplinären Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Analkarzinoms entwickelt und im Dezember 2020 veröffentlicht (Leitlinienprogramm Onkologie 2020b). Für die Versorgung von HIV-Patienten mit einem Analkarzinom existiert bereits seit 2013 eine Leitlinie, die aktuell (02/2021) überarbeitet wird (Deutsche AIDS-Gesellschaft e.V. und Österreichische AIDS Gesellschaft 2013).

Das ASCC ist mit einem relativ unspezifischen Symptombild behaftet, so können Blutungen, Juckreiz oder Schmerzen auftreten und eine Verwechslung mit anderen Krankheitsbildern wie Hämorrhoiden ist möglich (Shridhar et al. 2015). Die neue Leitlinie empfiehlt ein jährlich stattfindendes Screening für HIV-positive Personen („soll“) sowie ein Screening alle 36 Monate für HIV-negative Personen mit anderweitigen Risikofaktoren („sollte“). Neben Inspektion, digitaler rektaler Untersuchung und Anozytologie können für das Screening der Nachweis von Hochrisiko-HPV-DNA, die hochauflösende Anoskopie (HRA) und Biopsieentnahmen genutzt werden. Die HRA, bei der mit Essig-Säure oder Lugol'scher Lösung auffällige Areale sichtbar gemacht und biopsiert werden, stellt den Goldstandard dar, ist aber nicht überall in Deutschland verfügbar (Gosens et al. 2017; Leitlinienprogramm Onkologie 2020b).

Bei Verdacht auf ein ASCC umfasst die initiale Diagnostik eine Risikofaktorenorientierte Anamnese und eine körperliche sowie proktologische Untersuchung. Ziel ist die genaue Lokalisation des Tumors sowie eine erste Einschätzung dessen Größe und Infiltrationstiefe. Eine histopathologische Sicherung soll stets erfolgen, bei kleinen Tumoren ohne Infiltration kann hierbei gleichzeitig die Komplettexzision vorgenommen werden. Zur Bestimmung der regionalen Ausdehnung des Tumors (T) ist ein auf den Analkanal anguliertes MRT die Methode der Wahl. Der Nachweis lokoregionärer Lymphknotenmetastasen (N) soll ebenfalls mit einer MR-Bildgebung des Beckens erfolgen. Für die Ermittlung von Fernmetastasen (M) wird die Computertomographie empfohlen. Das PET-CT stellt eine erweiterte Staging-Option in verschiedenen Konstellationen dar (Bhuva et al. 2012; Caldarella et al. 2014).

Als wichtigste Therapiesäule gilt nach wie vor die kontinenzorganerhaltende kombinierte Radiochemotherapie, welche nach ihrem Erstbeschreiber als „Nigro-Protokoll“ bezeichnet wird (Nigro et al. 1974). Die Chemotherapie besteht klassischerweise aus Mitomycin und 5-Fluoruracil (5-FU) (Sclafani und Rao 2018). Die

Strahlendosis der zugehörigen Radiotherapie soll 59,4 Gy nicht überschreiten. Bei Progression oder Rezidiv nach kombinierter Radiochemotherapie kann nach Konsultation eines Tumorboards eine sogenannte Salvage-Operation vorgenommen werden. Hierbei wird das Rektum abdominoperineal exstirpiert und ein Kolostoma angelegt (Osborne et al. 2014; Raptis et al. 2015; Shridhar et al. 2015). Die Resektion inguinaler Lymphknoten kann bei metastatischem Befall dieser vonnöten sein. Bei Fernmetastasen wird aufgrund von bislang fehlender eindeutiger Evidenz im Bereich der Systemtherapien ein durch ein Tumorboard erarbeitetes individuelles Therapieregime empfohlen. Momentaner Standard ist eine platinhaltige Therapie („kann“).

Eine mögliche Systemtherapie ist die EGFR-Inhibition, die bislang in wenigen Studien und Fallberichten untersucht wurde (Lukan et al. 2009; Saif et al. 2011; Rogers et al. 2016; Kim et al. 2017). Als neue therapeutische Verfahren werden Immuntherapien wie die monoklonalen Antikörper gegen PD-1, Nivolumab und Pembrolizumab, gehandelt. Diese sollen die von den HPV-Proteinen E6 und E7 hochregulierten Checkpoint-Moleküle limitieren und wurden ebenfalls bislang nur in geringem Umfang in Studien untersucht (Lyford-Pike et al. 2013; van Morris et al. 2017; Ott et al. 2017; Sciafani und Rao 2018). Zudem wird die Möglichkeit therapeutischen Impfens gegen das HPV-Induzierte Analkarzinom diskutiert. Die aktuelle Leitlinie rät von diesem Vorgehen aufgrund vom ausbleibenden Therapieerfolg in Studien ab (Yang et al. 2016; Symer und Yeo 2018; Wilkin et al. 2018). Der Impfung wird jedoch ein hoher Stellenwert in der primären Prävention beigemessen (Leitlinienprogramm Onkologie 2020b).

1.5.4. Prognosefaktoren und Biomarker bei Analkarzinomen

Das 5-Jahres-Überleben bei den mit Radiochemotherapie behandelbaren ASCC liegt bei 80 % (Herold 2016). Während die meisten Patienten gut auf die Radiochemotherapie ansprechen, zeigen 30% aus unbekanntem Gründen ein schlechtes Therapieansprechen (Das et al. 2008). Obwohl die abdominoperineale Salvage-Operation bislang Gold-Standard bei Therapieversagen ist, liegt das 5-Jahres-Überleben nach OP bei unter 50 % (Hagemans et al. 2018).

Wie bei den meisten Tumoren geben Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Metastasierung beim Analkarzinom prognostische Informationen. Die Faktoren werden anhand der Stadieneinteilung des AJCC (American Joint Committee on Cancer)

klassifiziert (Gunderson et al. 2013). Das männliche Geschlecht wird rezidivierend als negativ prognostischer Faktor gehandelt, eine einheitliche Datenlage gibt es hierzu jedoch nicht. Mehrere Studien und Metaanalysen konnten in den letzten Jahren zeigen, dass ein positiver HPV-Status mit einer besseren Prognose vergesellschaftet ist und zwar insbesondere in Kombination mit einem Nachweis des Proteins p16^{INK4A} (Duncan C Gilbert et al. 2013; Serup-Hansen et al. 2014; Meulendijks et al. 2015; Rödel et al. 2015; Yao et al. 2017a; Sun et al. 2018; Parwaiz et al. 2019; Urbute et al. 2020). p16^{INK4A} wird normalerweise vom pRB-E2F-Komplex supprimiert, das HPV-Virus-Protein E7 kann diese Suppression aber unterdrücken, was durch eine doppelte Hemmung zur Hochregulation von p16^{INK4A} führt. Eine positive IHC für p16^{INK4A} gilt bei Kopf-Hals Tumoren als indirekter Nachweis von Hochrisiko-HPV-DNA und indiziert ein signifikant besseres Therapie-Outcome (Lassen et al. 2009). Dennoch subsumiert auch die neuste Metaanalyse, dass die klinische Anwendung einer kombinierten HPV/p16^{INK4A} Testung noch weiter zu evaluieren ist (Urbute et al. 2020).

Mehrere große Studien haben das Genom des ASCC analysiert und übereinstimmend den Phosphoinositol-3-kinase Signalweg (PIK3CA/AKT/mTOR) sowie die Tumorsuppressoren TP53 und CDKN2A als häufige Alterationen auf Gen-Ebene bestimmen können (Chung et al. 2016; Mouw et al. 2016; Cacheux et al. 2018). Für Chemotherapieresistenzen konnten MRP-1 (multi-drug-resistant protein 1), ERCC1 (excision repair cross-complementing gene 1) und die TS (Thymidylat-Synthase) als verantwortliche Faktoren ermittelt werden. EGFR ist beim ASCC häufig überexprimiert, aber wenig mutiert. Der chimäre Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab wurde in kleinen Studien an einem Patientenkollektiv mit metastasiertem Tumorstatus getestet und das Ansprechen mit dem Vorliegen eines KRAS-Wildtyp-Status in Verbindung gebracht (Lukan et al. 2009; Saif et al. 2011; Paliga et al. 2012; Smaglo et al. 2015). Zudem wurden p53 und p21 als Prädiktoren für das Überleben vorgeschlagen, keiner konnte sich aber bislang komplett etablieren (Lampejo et al. 2010). Die bisher einzige Studie mit quantitativem proteomischen Ansatz ist in Ihrer Aussagekraft limitiert, da nur HPV-positive Tumoren unterschiedlicher Lokalisationen analysiert worden sind. Die Proben wurden aus FFPE-Gewebe entnommen und sowohl massenspektrometrisch als auch per IHC ausgewertet. Die Autoren benennen hier zwei proteombasierte Subtypen mit Ursprung in der Zona transitionalis und Zona squamosa. Tumoren aus der Zona transitionalis zeigten häufiger einen dedifferenzierten beziehungsweise basaloiden

Charakter und schnitten in Bezug auf krankheitsfreies und gesamtes Überleben schlechter ab als der Subtyp der Zona squamosa. Zudem zeichneten sich die beiden Subtypen durch unterschiedliche, ursprungsspezifische Keratinexpressionsprofile aus. Die Publikation schlägt vor, die beiden Subtypen abhängig von ihrem zellulären Ursprung zu behandeln und proteomische Vertiefungsstudien durchzuführen (Herfs et al. 2017).

Trotz großer Fortschritte herrscht so für eine Verbesserung von Therapie und Prognostik des ASCC weiterhin ein Mangel an belastbaren molekularen Biomarkern (Jones et al. 2017).

2. Materialien und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Kultur von HEK293T-Zellen

Sterile Werkbank	(Hera Safe, Heraeus)
Inkubator	(Cytoperm 2, Heraeus)
Wasserbad	(Aqualine, Lauda)
Zentrifuge	(4K15 Sigma)
Vakuum Saugpumpe	(Hirschmann™ Pipetus™ Pipettierhilfe)
Lichtmikroskop	(TS100, Nikon Eclipse)
Zellkulturflasche 250ml mit Filter	(658175, Greiner bio- one)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	(61965-026, GIBCO)
Fetales Bovines Serum (FBS)	(10270-106, GIBCO)
Penicillin-Streptomycin (PenStrep)	(15140-122, GIBCO)
HEK-Zell-Linie 293T	(Embryonal kidney cells, DSMZ No: ACC635)
HEK293T-Medium	(Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1% PenStrep, 10% FBS)
Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7.4	(10010023, GIBCO)
DMSO	(B0515A, new England BioLabs)

HEK293T Zellen werden in 250 ml Zellkulturflaschen (T75 Flaschen, 75 steht für die cm²- Zahl) mit 20 ml HEK293T-Medium bei 37 °C und 5 % CO² Gehalt kultiviert. Das HEK293T-Medium kann bei 4 °C über 2 Wochen gelagert werden und muss vor jedem Gebrauch in der Zellkultur im Wasserbad für etwa eine halbe Stunde auf Raumtemperatur vorgewärmt werden. Alle folgenden Pipettier-Schritte können mit einer serologischen Pipette oder einer Vakuum-Pumpe mit aufgesetzter Glas-Pipette durchgeführt werden. Alle Zell-Eingriffe, ausgenommen die finale Lyse, werden unter einer sterilen Werkbank vorgenommen.

Für die langfristige Zelllagerung werden die Zellen mit einer Mischung aus 10 % (v/v) DMSO und 90 % (v/v) HEK293T-Medium gemischt und bei -80 °C gefroren und gelagert.

Für die erneute Kultivierung gefrorener Zellvorräte werden die Zellen aufgetaut, in ein 15 ml Falcon-Tube mit 5 ml vorgelegtem, erwärmtem HEK293T-Medium transferiert und die Zellen bei 4000 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wird das Medium vollständig entfernt, das verbleibende Zellenpellet in 20 ml HEK293T-Medium resuspendiert und nach Transfer in einer frische T75-Zellkulturflasche kultiviert.

Im Allgemeinen werden die Zellen alle drei Tage mit neuem Medium versorgt und gesplittet. Hierfür wird das HEK293T-Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml steriler Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gewaschen. Nach Entfernung des PBS-Waschpuffers erfolgt die Dissoziation der adhärennten wachsenden HEK293T-Zellen vom Flaschenboden durch Zugabe von 2 ml vorgewärmten Trypsin und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Im Anschluss werden die HEK293T-Zellen durch leichtes seitliches Klopfen gegen die Flaschenseite vom Boden dissoziiert. Danach erfolgt die Zugabe von 5 ml frischen HEK293T-Medium und die weitere Dissoziation der Zellen durch wiederholtes Auf- und Abziehen durch eine serologische 10 ml Pipette. Anschließend werden die resuspendierten HEK293T-Zellen in ein neues Falcon-Tube überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 14.000 g zentrifugiert. Das Medium wird anschließend verworfen, das verbleibende Zellpellet in 5 ml HEK293T-Medium resuspendiert und anschließend in eine neue T75 Zellkulturflasche mit 15 ml HEK293T-Medium überführt.

2.1.2. Proteinextraktion aus Zellen

6 Well Platten	(657160, Cellstar)
Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7.4	(136mM NaCl, 12mM Na ₂ HPO ₄ , 1mM KH ₂ PO ₄ , 2mM KCl)
TRIS-Lysepuffer	(50mM TRIS, 150mM NaCl, 1% Triton x100, pH 7.4)
PBS-Lysepuffer	(50mM PBS, 500mM NaCl, 2mM EDTA Milipore, 1% Triton x100, pH 7.4)

Für die Proteinextraktion aus Zellen werden 1×10^6 HEK293T-Zellen pro Well in runde 6-Well-Platten ausgesät und in 2 ml HEK293T-Medium kultiviert. Ist die gewünschte Zelldichte (etwa 90 %) erreicht, wird das Medium abgesaugt und jede Platte mit 2 ml eiskaltem PBS pro Well gewaschen. Die Zellen werden mit dem gewünschten

Lysepuffer je Well durch wiederholtes Ein- und Aussaugen resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und bei 4 °C für 5 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der klare Überstand als fertiges Lysat wird in ein neues 1.5 ml Eppendorf Tube gegeben, die Proteinkonzentration kann mit dem BCA Bradford Assay gemessen werden.

2.1.3. Messung der Protein-Konzentrationen

96 Well Platte	(144895, Thermo Scientific)
BSA-Standard	(141305, G Bioscience)
Red 660 Protein Assay	(015R, G Bioscience, 660nm)
Elisa Reader	(Infinite F200 Pro, Tecan)
Magellan™	(Tecan)

Der BSA-Standard (Bovines Serumalbumin) wird schrittweise mit Wasser verdünnt, um eine Verdünnungsreihe mit Proteinkonzentrationen von 0 µg/µl, 0,125 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,5 µg/µl, 1 µg/µl und 2 µg/µl als Referenz für die folgende Proteinmessung herzustellen. Um eine Standardkurve zu erhalten, werden 10 µl jeder Verdünnungsstufe als Doubletten in das 96 Well appliziert, anschließend 10 µl jeder Probe ebenfalls in Doubletten. 200 µl des Red 660 Protein Assays werden in jedes befüllte Well gegeben, außerdem werden 2 leere Wells befüllt, um eine Blank-Reduktion zu erhalten. Als Standard-Messparameter werden in der Magellan-Software folgende Parameter definiert: Dauer von 5 Sekunden, Modus „orbital“, Wellenlänge von 660 nm, zu messende Proben und Replikate sowie Standard, Konzentrationsmessung in µg/µl, Blank-Reduktion und Standard Kurve mit linearer Regression. Die gemessenen Daten werden in Excel geöffnet und die genauen Konzentrationen mithilfe der Steigung der Standard-Kurve berechnet.

2.2. SDS-PAGE Gel-Elektrophorese

2.2.1. Vorbereitung des Acrylamid-Gels

Acrylamid 40 %	(T802.1, 40 %, ROTH)
Lower TRIS Puffer	(1,5 M Tris pH 8,8, 0,4 % SDS)
Upper TRIS Puffer	(0,5 M Tris pH 6,8, 0,4 % SDS)
TEMED	(2367.3, ROTH)
Ammoniumpersulfat (APS)	(A3678, Sigma Aldrich)
Gestelle, Gummi-Dichtungen, Halterung, Glasplatten, Kämmen	(Biorad)
Separations-Gel 10 % für 4 Gele	(16 ml ddH ₂ O, 8 ml Acrylamid 40 %, 8 ml 4x Lower TRIS, 60 µl TEMED, 60 µl APS)
Stacking-Gel 10 % für 4 Gele	(13 ml ddH ₂ O, 2,6 ml 40 % Acrylamid, 5 ml 4x Upper Tris, 60 µl TEMED, 60 µl APS)
Vortexer	(VF2, Ika Labortechnik)

Für die Herstellung eines SDS-Polyacrylamid-Gels werden die transparenten Gestelle mit Gummi-Dichtungen versehen, die ein Auslaufen des flüssigen Gels verhindern. Eine große Glasplatte mit Ausbuchtung wird mit einer kleineren Glasplatte verschlossen, in eine Halterung aus grünem Kunststoff gespannt und zusammen in dem transparenten Gestell zwischen großer Klammer und Gummi-Dichtung festgeklemmt. Die Lösungen für das 10 % Trenngel und das Sammelgel werden beide ohne Zugabe von APS frisch zubereitet. Erst knapp vor Einfüllen des Trenngels wird APS hinzugegeben und die Gelmischung kurz mittels Vortexer durchmischt, um die Polymerisation zu starten. Zuerst werden 7,5 ml der Trenngellösung in den Hohlraum zwischen großer und kleiner Glasplatte gegeben. Danach wird die Trenngellösung mit 200 µl Isopropanol vorsichtig überschichtet, um einen ebenen Übergang zwischen Sammel- und Trenngel zu gewährleisten. Nach Polymerisation des Trenngels nach etwa 15 min wird das Isopropanol entfernt. Danach erfolgt die Überschichtung des Trenngels mit ca. 2,5 ml Sammelgel, bis der Hohlraum zwischen großer und kleiner Glasplatte komplett gefüllt ist. Anschließend erfolgt das Einsetzen eines Plastikkamms in den Hohlraum, welcher später die Probestaschen im Sammelgel formt. Sobald das Sammelgel nach etwa 30 Minuten polymerisiert ist, kann der Kamm entfernt werden und das Gel ist fertig.

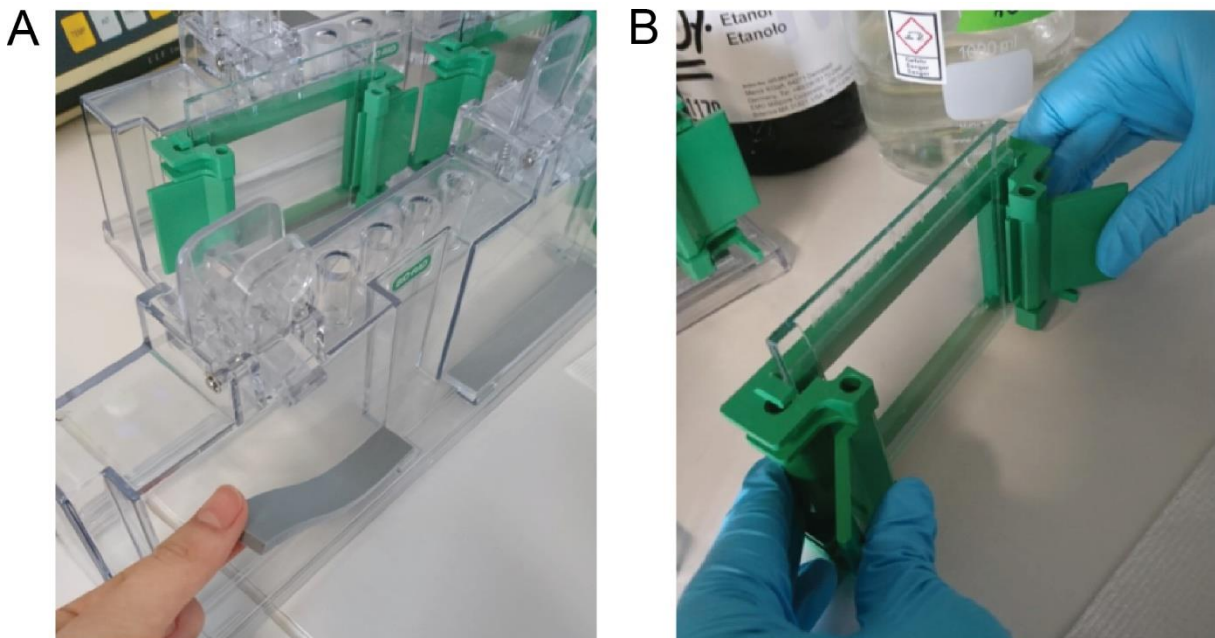


Abbildung 3: Aufbau der Gelgussvorrichtung

(A) Das Kunststoffgestell wird mit einer Gummidichtung versehen. Im Hintergrund sieht man einen bereits fertigen Aufbau. (B) Die Glasplatten werden in eine Halterung aus grünem Kunststoff gespannt und im Anschluss zwischen die große Klammer und die Gummidichtung in das transparente Gestell geklemmt.

2.2.2. Ablauf der Gel-Elektrophorese

Elektrophorese-Zubehör	(Biorad)
Stromquelle	(Mini-Protean System, Biorad)
Vortexer	(VF2, Ika Labortechnik)
Heater	(Thermomixer C, Eppendorf)
Protein Probenpuffer Laemmli, Reduzierend 4x	(8 % SDS, 40 % Glycerol, 10 % DTT, 125 mM Tris pH 6.8, 0.025 % Bromo-phenol Blue)
Protein Probenpuffer, nicht reduzierend 4x	(8 % SDS, 40 % Glycerol, 125 mM Tris pH 6.8, 0.025 % Bromophenol Blue)
SDS Running Puffer 1x	(25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS)
Marker für molekulares Gewicht	(See blue plus 2, LC5925 Invitrogen)

Eine definierte Proteinmenge jeder Probe wird in ein 1,5 ml Eppendorf Tube gegeben und reduzierender oder nicht-reduzierender Proben-Puffer wird in einem Verhältnis von 1:3 hinzugegeben. Jede Probe wird kurz mithilfe des Vortexers vermischt und anschließend bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Die vorbereiteten Gele werden in das Elektrophorese-Gestell eingebaut und die Konstruktion bis zur markierten Linie mit SDS Running Puffer aufgefüllt. Der Marker für das Molekulare Gewicht sowie die Proben werden nacheinander in die Probenaschen des Sammelgels gefüllt. Bei einem 15er Kamm hat jede Probenasche ein Maximalvolumen von 25 µl. Daher sollte das Probenvolumen von 20 µl pro Probenasche nicht überschritten werden. Die Apparatur wird an den Stromversorger angeschlossen und 80 Volt werden als Spannung eingestellt. Wenn die Proben und der Marker das Sammelgel verlassen haben, kann die Spannung auf 120 Volt erhöht werden, um die Elektrophorese zu beschleunigen.

2.2.3. Coomassie-Färbung der Gele

Coomassie Brilliant Blue R	(6104-59-2, Sigma Aldrich)
Essigsäure	(100063, Merck)
Rührgerät	(RCT basic IKA Labortechnik)
Horizontaler Shaker	(Edmund Bühler)

Zur Erstellung einer Coomassie-Färbelösung werden 50 ml Essigsäure und 125 mg Coomassie Brilliant Blue R Pulver in eine 500 ml Glasflasche gegeben und für 30 min mit einem magnetischen Rührfisch verrührt. Die Mischung wird mit ddH₂O auf 500 ml aufgefüllt und für eine weitere Stunde gerührt. Die Flasche muss zu jeder Zeit in Alufolie eingewickelt sein, damit kein Licht an die Färbelösung geraten kann.

Für die Färbung wird das Gel nach der Gelelektrophorese vorsichtig aus den beiden Glasplatten herausgelöst, in eine Glasschale gegeben, komplett mit der Coomassie-Färbelösung bedeckt und für 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler bei leichter Bewegung (100 Bewegungen/Minute) gefärbt. Die Hintergrundfärbung wird entfernt,

indem die Gele wiederholend in einer wässrigen Verdünnung von Essigsäure 10 % (v/v) auf dem Horizontalschüttler bei leichter Bewegung inkubiert werden. Die Gele sind fertig entfärbt, wenn die Hintergrundfärbung verblasst und die Proteinbanden gut sichtbar sind.

2.3. SP3

2.3.1. Vorbereitung der magnetischen Beads

SeraMag A Beads	(GE Healthcare Sera-Mag SpeedBeads™ Carboxyl Magnetic Beads, hydrophilic, CAT NO. 45152105050250)
SeraMag B Beads	(GE Healthcare Sera-Mag SpeedBeads™ Carboxyl Magnetic Beads, hydrophobic, CAT NO. 65152105050250)
Magnetisches Gestell	(Dynamag 2 invitrogen, Thermo Fischer)

20 µl SeraMag A Beads und 20 µl SeraMag B Beads werden in einem 1,5 ml Eppendorf Tube gemischt und 160 µl ddH₂O hinzugegeben. Das Tube wird im magnetischen Gestell platziert und man lässt die Beads 2 min an die Wand des Tubes in Richtung des Magneten adhären. Wenn die Beads an der Wand haften, kann der Überstand mit einer Pipette abgezogen und verworfen werden. Die an der Wand anhaftenden Beads werden dreimal hintereinander gewaschen, indem mit einer Pipette jeweils 200 µl ddH₂O sanft über die Beads pipettiert und danach wieder abgezogen und verworfen wird. Die trockenen, an der Wand haftenden Beads werden mit 100 µl ddH₂O vermischt, bilden so einen Vorrat mit einer Konzentration von 10 µg/µl und können im Kühlschrank bei 4 °C ohne zeitliche Begrenzung aufbewahrt werden. Die Beads dürfen nicht gefroren werden.

2.3.2. Vorbehandlung der SP3-Probe

Benzonase Nuklease	(E1014-25KU, Sigma-Aldrich)
MgCl ₂	(208337-100G, Sigma-Aldrich)
DTT	(R0862, Thermo Fisher)
IAA	(SLBJ8175V, Sigma Aldrich)
Ammoniumbicarbonat	(09830, Sigma Aldrich)
Chromasolv Water	(Gradient grade, VWR chemicals)

Die Proteinkonzentration der Proben wird wie beschrieben (2.1.3.) mit dem InfinitePro Reader gemessen und die Probe beispielsweise mit dem Lysepuffer auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt. Das folgende Protokoll bezieht sich auf eine Probe mit einem Volumen von 50 µl und einem Proteingehalt von 20 µg (c=0,4 µg/µl) in einem 1,5 ml Tube. 0,5 µl Benzonase (1 % des Ausgangsvolumens) und 3 µl

MgCl₂ (6 µl pro 100 µl Ausgangsvolumen) werden zur Probe hinzugegeben und die Probe für 30 Minuten auf 37 °C auf dem Heizer erwärmt. Dieser Schritt zur DNA- und RNA-Entfernung ist nur bei Nukleinsäure-enthaltenden Proben nötig. In der anschließenden Reduktion wird 0,5 µl 1 M DTT (1 % des Ausgangsvolumens) hinzugegeben und für 10 Minuten bei 50 °C auf dem Heizer inkubiert. Es folgt ein Alkylierungsschritt, in dem 5 µl 400 mM IAA (1 % des Ausgangsvolumens) Lösung hinzugegeben werden und die Probe bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunklen inkubiert wird. Die 400 mM IAA-Lösung wird mit frisch gemischtem 50 mM Ammoniumbicarbonat mit Chromasolv Wasser hergestellt. Überschüssiges IAA wird durch die erneute Zugabe von 1 µl 1 M DTT (2 % des Ausgangsvolumens) gequenched. Nach Durchführung der genannten Schritte ergibt sich ein Zwischenvolumen von 60 µl.

2.3.3. Bindung und Waschen

Acetonitril	(34967, LC-MS Chromasolv, Sigma Aldrich)
Ethanol	(1.11727.0500, Gradient grade LiChromasolv, Vwr Chemicals)

Die Proben werden auf eine Acetonitril-Konzentration von 70 % (3.1.3.) gebracht. Bei 60µl Zwischenvolumen werden demnach 140 µl 100 % Acetonitril zu einer Probe hinzugefügt. Danach werden 4 µl Beads zu jeder Probe gegeben und die Tubes für ein paar Sekunden gevortext, damit sich die Beads in der gesamten Probe verteilen. Als Faustregel gilt hierbei, dass pro 10 µg enthaltenem Protein 2 µl der fertigen Beads (c=10 µg/µl) verwendet werden (3.1.4.). Anschließend wird die Probe in einem Bindungsschritt für 30 Minuten bei 100 Bewegungen/Minute auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Danach werden die Proben für 2 Minuten auf dem magnetischen Gestell platziert. Haben die Beads an die Tubewand gebunden, kann der Überstand abgezogen und verworfen werden. Es folgt das Waschen der Proteine. Hierfür wird der Waschpuffer sanft über die an der Wand haftenden Beads pipettiert. Danach wird etwa eine Minute gewartet, bis die Beads wieder komplett an der Tubewand haften. Im Anschluss kann der Überstand aus dem Probengefäß abgezogen und verworfen werden. Für das SP3 Protokoll verwende ich insgesamt vier aufeinander folgende Waschschrirte: Der erste Waschschrirte wird mit 400 µl 70 % Ethanol (100 % Ethanol, verdünnt mit Chromasolv-Wasser) durchgeführt, darauf folgen drei Waschschrirte mit jeweils 400 µl 100 % Acetonitril. Nach dem letzten

Waschschritt wird der Waschpuffer entfernt und die Beads kleben an der Wand des Tubes.

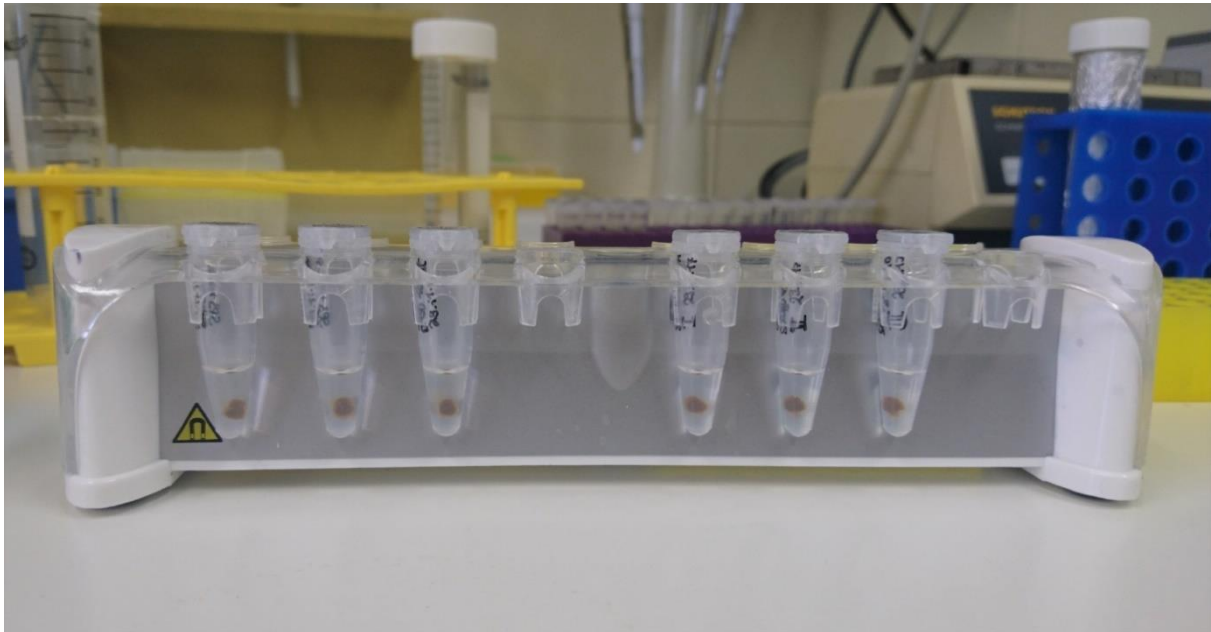


Abbildung 4: Magnetisches Gestell mit attachierten Beads

Beads haften in Pelletform an der zum magnetischen Gestell zeigenden Tubewand. Der klare Überstand in den Tubes kann in diesem Zustand ohne Störung der magnetischen Beads oder der an sie gebundenen Proteine abgezogen werden.

2.3.4. Verdau auf den Beads und Elution

Trypsin	(V511A, Promega; verdünnt im beiliegenden Puffer)
LysC	(V1671, Promega; verdünnt im beiliegenden Puffer)
Ameisensäure	(≥99%, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS, VWR chemicals; hier verdünnt mit Chromasolv Wasser)

Die Beads sind nun gereinigt und haften in trockener Form an der Wand des Tubes. Trypsin und LysC werden laut Herstellerangaben dosiert. Hier werden für 20 µg Protein 4 µL Trypsin (0,1 µg/µl) und 4 µl LysC (0,1 µg/µl) zusammen mit 5 µl 400 mM Ammoniumbicarbonat und 37 µl Chromasolv Wasser vermischt und zu der Probe gegeben, wodurch der Verdauopuffer auf 40 mM Ammoniumbicarbonat kommt. Die Beads müssen gut im Verdauopuffer gelöst sein. Idealerweise werden die Proben mit einem Clip oder einer Folie verschlossen, damit die Verdampfung minimiert wird. Die Proben werden bei 37 °C über Nacht, mindestens aber 12 Stunden, auf dem Heizer inkubiert. Am nächsten Tag werden die Tubes kurz gevortext, um auch die am Deckel gesammelte Flüssigkeit einzufangen. Anschließend werden die Tubes auf dem

magnetischen Gestell platziert, für 2 Minuten dort belassen bis die Beads an der Tube-Wand binden und dann der Überstand abgezogen und in ein frisches Tube transferiert. Die fertige Probe wird mit 5 µl 10 % Ameisensäure versetzt, um einen Säuregehalt von 1 % zu erlangen.

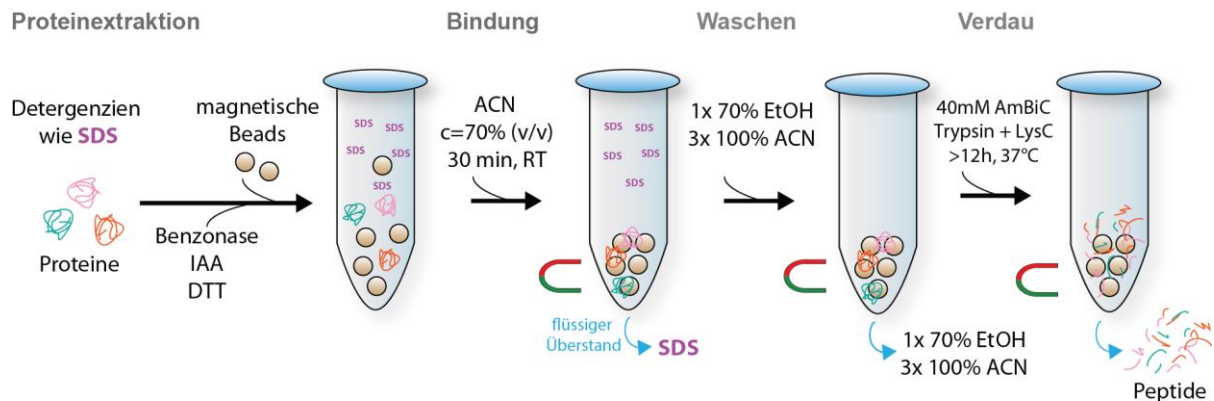


Abbildung 5: SP3 Protokoll als Vorbereitung für Massenspektrometrie

Schematische Darstellung des SP3 Protokolls inklusive peptidgenerierendem Verdauungsschritt. Dem SP3 Protokoll gehen eine DNA-Entfernung mit Benzonase, eine Reduktion mit DTT und eine Alkylierung mit IAA voraus.

2.4. SP3 für SDS-PAGE-Gel Experimente

2.4.1. Definition von PRE, PULL und POST

Um insbesondere den Bindungsschritt des SP3-Protokolls überprüfen zu können, werden drei Fraktionen definiert: Die Probe ohne Zugabe der paramagnetischen Beads inklusive ACN wird als PRE-Fraktion (kurz „PRE“) definiert (2.3.3.). Als POST-Fraktion (kurz „POST“) wird der Überstand, der nach dem Bindungsschritt (2.3.3.) vorliegt, bezeichnet. Die PULL-Fraktion (kurz „PULL“) soll jene Proteine repräsentieren, welche im Bindungsschritt an die paramagnetischen Beads binden. Magnetische Beads sind nicht mit SDS-Page kompatibel. Deswegen muss zur Gewinnung der PULL-Fraktion ein Elutionsschritt stattfinden, in dem die Proteine möglichst komplett von den Beads gelöst werden. Die PULL-Fraktion zeigt also Proteine, die an die Beads binden, aber auch wieder von diesen abgelöst werden können. Eine Vorbehandlung der Proteine wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben ist für SDS-PAGE-Experimente nicht notwendig.

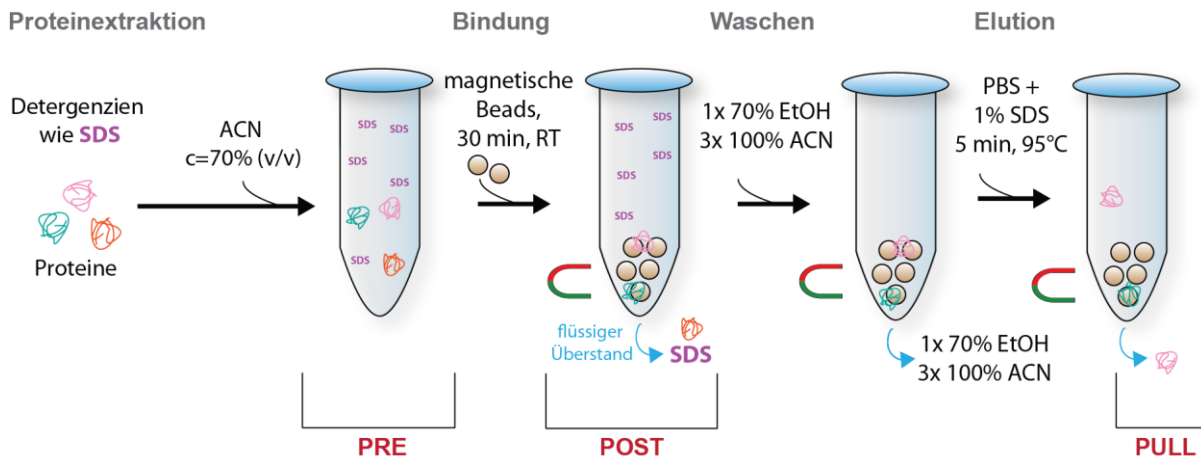


Abbildung 6: SP3 Protokoll für Coomassie-Experimente

Schematische Darstellung des SP3 Protokolls mit Elution der Proteine von den Beads. Die **PRE**-Fraktion entspricht der kompletten Probe vor Beginn des Bindungsschrittes ohne Beads, da Beads nicht in ein Coomassie-Gel geladen werden können. Die **POST**-Fraktion enthält die Proteine, die nicht an die Beads binden konnten, hier dargestellt als das orangefarbene Protein. Die **PULL**-Fraktion repräsentiert jene Proteine, welche sowohl im Bindungsschritt an die Beads binden, als auch im Elutionsschritt von den Beads wiederabgelöst werden konnten. In der Abbildung entspricht dies dem rosafarbenen Protein, das türkisfarbene Protein konnte im Elutionsschritt nicht von den Beads abgelöst werden.

2.4.2. Elution der PULL-Fraktion und Vorbereitung für SDS-PAGE-Elektrophorese

PBS	(P3813-1PAK, Sigma-Aldrich)
SDS	(L3771-500G, Sigma-Aldrich)

Die PRE-Fraktion muss für die Experimente als Richtwert präpariert werden. Die POST-Fraktion entsteht natürlich im Rahmen des SP3-Protokolls.

Die PULL-Fraktion ist durch einen Elutionsschritt nach den Waschschritten zu gewinnen. Hierfür werden die an der Tube-Wand haftenden Beads mit 15 µl Elutionspuffer, in der Regel PBS + 1 % (w/v) SDS, mittels vortexen und repetitivem pipettieren vermischt und danach bei 95 °C 5 Minuten lang auf dem ThermoMixer erhitzt. Im Anschluss wird das Tube erneut kurz gevortext, um am Deckel haftende Flüssigkeitsreste wieder zurück in das Tube zu befördern. Dann wird das Tube auf dem magnetischen Gestell gesetzt, 2 Minuten gewartet und der Überstand abgezogen. Der Überstand entspricht der PULL-Fraktion.

Die PULL-Fraktion (etwa 15 µl) kann nun entsprechend dem SDS-PAGE-Protokoll (2.2.2.) mit Laemmli-Puffer vermischt und für 5 Minuten auf 95 °C auf dem ThermoMixer C erhitzt werden. Es folgt das Laden in die entsprechende Kammer im SDS-PAGE.

2.4.3. Vorbereitung von PRE und POST für das Laden in das SDS-PAGE

Die PRE-Fraktion entspricht der Probe vor Zugabe der paramagnetischen Beads. Eine Vorbehandlung der Proteine wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben ist für SDS-PAGE-Experimente nicht notwendig. Demnach sind PRE- sowie POST-Fraktion vorwiegend aus Proteinen, Lysepuffer und Acetonitril zusammengesetzt. Das Volumen beider Proben ist zu groß für ein zur PULL quantitativ vergleichbares Laden in ein SDS-PAGE.

Um das Laden beider Fraktionen in ein SDS-PAGE in toto zu ermöglichen, muss das Volumen der PRE- und POST-Proben verringert werden. Hierfür werden diese mit geöffnetem Tubendeckel auf den ThermoMixer C gestellt und bei einer Temperatur von 30 °C für mindestens 30 Minuten erwärmt. Je nach Verdunstung der flüssigen Komponente der Proben kann eine längere Zeit auf dem ThermoMixer C von Nöten sein. Der Verdunstungsschritt ist beendet, wenn jede Probe noch ein Volumen von 15-20 µl umfasst.

Das Aufkochen mit Laemmli-Puffer und das Laden in das Gel erfolgt analog zur PULL (2.4.2.) entsprechend dem SDS-PAGE-Protokoll (2.2.2.).

2.4.4. Quantifizierung der Banden mit Fiji Image J

Fiji	(open source project, http://fiji.sc/)
Scanner	(Perfection V550 Photo, Epson)
Glatte Klarsichthüllen	(z.B. Leitz)

Das Gel wird entsprechend dem Coomassie-Protokoll (2.2.3.) gefärbt und entfärbt. Sind alle Banden gut sichtbar, ist das Gel für die Auswertung fertig. Es wird vorsichtig in eine Klarsichtfolie mit glatter Oberfläche gesteckt und in den Scanner gelegt. Das Scannen erfolgt bei maximaler Auflösung (6400 x 6400 dpi). Die Bilddatei des Gels wird farbig mit Fiji/Image J geöffnet. Zunächst wird die Datei in ein 32-bit Schwarz-Weiß-Bild komprimiert (Image→Type→32bit). Danach wird die Bilddatei invertiert (Edit→Invert). Mit dem Rectangular-Tool kann nun ein repräsentativer Ausschnitt einer Bande des Gels umfasst werden. Die erste Bande im Gel wird mit dem shortcut „1“ selektiert. Die folgenden Banden werden monomorph jeweils durch Verschieben des Rechtecks der vorherigen Bande und Drücken des Shortcuts „2“ selektiert. Nach jeder Selektion wird diese mit dem shortcut „t“ zum ROI-Manager hinzugefügt. Nachdem alle Banden inklusive einer Blank-Bande in einem nicht beladenen Anteil des Gels markiert sind, werden die Intensitäten der selektierten Abschnitte mithilfe des Measure-tools

vermessen (ROI-Manager→measure). Die gemessenen Werte umfassen nun Area, Mittelwert, Minimum und Maximum und können in Microsoft Excel übertragen werden. Hier erfolgt der Abzug des Blanks von den Mittelwerten der Intensitäten sowie die Berechnung der PULL/PRE sowie POST/PRE-Werte. Die PULL und POST werden auch bei Vorliegen mehrerer Gele nur mit PRE-Fractionen ihres eigenen Gels in Relation gesetzt.

2.4.5. Statistische Auswertung mit Prism Graphpad und graphische Darstellung mit Adobe Photoshop Illustrator

Prism-Graphpad	(Version 8.4.3.)
Adobe Photoshop Illustrator	(Illustrator 2020, Version 24.1.2)

Im Anschluss werden die PULL/PRE und POST/PRE-Werte in das Programm Prism Graphpad übertragen und in Form eines Scatter-Dot-Plots dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U Tests (bei einem Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben) und Kruskal-Wallis Tests gefolgt von Dunn's Post-Hoc Tests (bei einem Vergleich von mehr als zwei Stichproben), weil bei der Stichprobengröße nicht von einer Normalverteilung auszugehen war.

Die gescannten Fotos der Coomassie-Gele wurden mit Adobe Photoshop in Schwarz-Weiß-Bilder transformiert (32-Bit), zugeschnitten und in Adobe Photoshop Illustrator geöffnet. Hier wurden die Bilder mit einem Rahmen, auf der x-Achse mit einer Beschriftung entsprechend des Molekulargewichts und auf der y-Achse mit einer Beschriftung der Banden, versehen.

2.5. FFPE-Gewebe

2.5.1. Deparaffinierung

Heißluft Ofen	(Memmert)
Xylol, Isopropanol, Ethanol	(Staub & Co, Chemiehandelsgesellschaft mbH)

Die Deckgläser werden in Glasschaukeln einsortiert und zunächst für 30 Minuten bei 70-80 °C in einem Heißluft- Ofen aufgeheizt. Danach werden die Glasschaukeln in einer Serie aus Chemikalien deparaffiniert: Zunächst ist eine Glasschaukel für 20 Minuten in einem Bad aus 100 % Xylol, danach für 10 Minuten in 100 % Isopropanol, dann für 10 Minuten in Ethanol 96 % und im letzten Schritt für 10 Minuten in ddH₂O. Anschließend können die Schnitte in ddH₂O bis zum Kratzen feucht gehalten werden.

2.5.2. Isolierung von Tumor-Gewebe von den Deckgläsern

Skalpells	(Größe 11, Heinz Herenz Medizinbedarf)
Skalpells-Halter	(Größe 3, Heinz Herenz Medizinbedarf)
FFPE-Extraktionspuffer	(4 % SDS (w/v), 100 mM Tris-HCL, 10 mM DTT, pH 8.0)
Parafilm	(Parafilm laboratory film M, Sigma Aldrich)
Zentrifuge	(Centrifuge 5430 R, Eppendorf)
SDS Entfernung Kit	(20308, Thermo Scientific™ SDS-Out™ SDS Precipitation Kit)

Um Austrocknen zu verhindern, werden die Schnitte bis kurz vor dem Kratzen im Wasserbad gehalten. Für alle Schnitte liegt eine HE-Färbung vor, deren Schnitt auf ähnlicher Ebene wie die nativen Schnitte angefertigt wurde. Die Tumor-Regionen in den HE-Schnitten wurden von erfahrenen Pathologen mit einem Marker umrandet. Durch den visuellen Vergleich von Tumor-Arealen in der HE-Färbung und in den nativen Schnitten kann das Tumorgewebe identifiziert werden. Das Tumorgewebe in den nativen Schnitten wird vorsichtig mit einem Skalpell von den Deckgläsern mikrodissiziert. In einem vorbereitetem Probengefäß mit FFPE-Extraktionspuffer wird das zu einer Probe gehörende deparaffinierte Tumorgewebe gesammelt. Die Proben werden mit Clips und Parafilm verschlossen und für 1 Stunde bei 99 °C auf dem ThermoMixer C gekocht. Anschließend werden sie bei 16.000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der klare Überstand, also die lysierte Tumor-Probe, aus den Tubes abgezogen und in ein neues Tube überführt. Die Proteinkonzentration der Proben wird mit dem 660 nm Bradford-Assay (2.1.3.) in Kombination mit einem SDS-Entfernungszusatz gemessen.

2.6. Proteomische Charakterisierung des Analen Plattenepithelkarzinoms

2.6.1. Anale Plattenepithel Karzinom Kohorte

Die untersuchte Kohorte besteht aus 31 FFPE-Proben aus primärem Tumorgewebe von Patientinnen und Patienten mit Analem Plattenepithelkarzinom. Diese wurden zwischen 1994 und 2017 am Klinikum rechts der Isar der TU München (n=24) und am Universitätsklinikum Heidelberg (n=7) behandelt. Das mittlere Alter bei Probegewinnung betrug 62,6 Jahre (Spannbreite 35-88 Jahre). Die Geschlechter waren in der Kohorte fast ebenbürtig vertreten (Frauen: n=17; 55 %/ Männer: n=14; 45 %). In der mittleren Follow-Up-Zeit von 54,8 Monaten (Spannbreite: 8-132 Monate) starben 14 der Patienten, wovon 11 der Todesfälle auf den Tumor zurückzuführen waren. 20 Patienten erlitten ein Tumorrezidiv. 29 erhielten als Erstlinientherapie eine

neoadjuvante kombinierte Radiochemotherapie entsprechend dem Nigro-Protokoll (1.5.3). Für zwei Patienten der Prä-Bioptischen Gruppe lagen keine Therapieinformationen vor. Mithilfe von Patientenakten, lokalen Krebsregistern und Endosonographie-, CT- und MRT-Daten konnten klinische Staging-Kriterien erfasst werden. Klinische Staging-Parameter, welcher vor der Therapie erhoben wurden, waren von 29 Patienten vorhanden. Hiervon waren 59 % cT1/cT2 (n=17) gestaged, 41% waren cT3/cT4 (n=12) gestaged. In 15 Fällen (52 %) wurden auf Basis klinischer Kriterien Lymphknotenmetastasen vermutet. 53 % (n=16) der Gewebeproben entstammte prä-therapeutischen Biopsien. 48 % (n=15) der Proben wurden bei Salvage-Operationen (1.5.3.) von Patienten gewonnen, welche wegen geringem oder keinem Ansprechen auf eine Radiochemotherapie als „Non-Responders“ eingeordnet wurden. In der Gruppe der Proben, welche mittels Salvage-Operationen gewonnen wurden, konnten in der Histologie 11 der Proben als ypT1/2 und 4 als ypT3/4 gegradet werden, 8 der Fälle zeigten Lymphknotenmetastasen.

2.6.2. Massenspektrometrische Messung

Q Exactive™ Hybrid-Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer	(Thermo Fisher Scientific)
Nanospray Flex™ Ionenquellen	(Thermo Fisher Scientific)
Easy nLC-1000 Flüssigchromatograph	(Thermo Fisher Scientific)
PRSO-V1 Säulenofen	(Sonation)
C 18 Kieselgel	(ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 1.9 µm, Dr. Maisch)

Von jeder Probe wurden 1 µg Peptide mit einem Q Exactive Hybrid-Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer analysiert, welches an eine Nanospray Flex Ionen Quelle samt temperaturregulierendem Säulenofen und an einen Easy nLC-1000 Flüssigchromatographen gekoppelt wurde. Die Auftrennung der Peptide erfolgte mithilfe selbst-bestückter C 18 Säulen (30 mm x 75 µm) unter einem binären 180-minütigen Gradienten aus Wasser (A) und Acetonitril (B) mit 0,1 % Methansäure. Mit einer Auflösung von 70.000 und einer m/z-Bandbreite von 300 bis 1400 konnten komplette massenspektrometrische Spektren ermittelt werden. Anschließend wurden die zehn intensivsten Peptid-Ionen eines Spektrums mittels hochenergetischer kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) innerhalb der Ionen-Falle fragmentiert. Die Spektren der fragmentierten Ionen wurden bei einer Auflösung von 17.500 gewonnen. Die Fragmentierung der Peptide erfolgte unter dynamischer Exklusion von 120 s.

2.6.3. Auswertung der Massenspektrometrischen Daten mit Max Quant

MaxQuant	(Version 1.6.0.16, maxquant.org).
UniProt Datenbank Homo sapiens	(Heruntergeladen am 08.06.2017; 16.798 Einträge)
RStudio	(Version 1.1.442)

Für Datenbankrecherche und markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung wurde die Software MaxQuant genutzt. Eine Homo Sapiens UniProt Datenbank wurde für die Proteinidentifikation genutzt. Die im Verdauungsschritt des SP3-Protokolls verwendeten Enzyme Trypsin und LysC wurden in der Auswertung als Proteasen definiert. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit RStudio. Lediglich Protein-Gruppen mit ≥ 5 charakteristischen Peptiden wurden der weiteren Analyse zugeführt. Unter anderem wurden die p-Werte zwischen den Lang-überlebenden (Krankheitsspezifisches Überleben > 60 Monate) und Kurz-Überlebenden (Krankheitsspezifisches Überleben < 60 Monate) mit einem heteroskedastischen t-Test ermittelt, um prognostische Protein-Gruppen zu ermitteln. Die p-Werte wurden gemäß multiplem Testen korrigiert.

3. Results

3.1. Etablierung des SP3 Verfahrens

3.1.1. Elutionspuffer im Vergleich: ddH₂O, PBS + 1 % (w/v) SDS und Laemmli-Puffer

Um das SP3-Protokoll (Hughes et al. 2014) zu etablieren, habe ich Coomassiegefärbte SDS-Polyacrylamidgele als Basis für Visualisierung und Quantifizierung verwendet. Grundsätzlich wurden die drei Fraktionen PRE, PULL und POST verwendet. Da Proteine und nicht Peptide in das Gel geladen werden, muss das Protokoll vor dem Verdauungsschritt gestoppt werden (2.4.2.). Hierfür wurden die Proteine nach Bindungsschritt und Waschen mit Hilfe eines Elutionspuffers von den Beads gelöst. Um eine Elution von so vielen Peptiden wie möglich zu erzielen, wurden in diesem Experiment ddH₂O, PBS + 1 % (w/v) SDS und Laemmli-Puffer auf ihre Eignung untersucht. Hierfür wurden drei Gele mit jeweils einer Bande PRE, PULL und POST der einzelnen Elutionspuffer erstellt (n=3). Als Mittelwerte ergaben sich für die PULL/PRE Fraktionen 46,9 % bei ddH₂O, 79,4 % bei PBS + 1 % (w/v) SDS und 59,61 % für Laemmli-Puffer. Die statistischen Analysen mit dem Kruskal-Wallis Test sowie mit einem Dunn's Post-hoc Test im Prism Graphpad ergaben weder bei den

PULL/PRE noch bei den POST/PRE Fraktionen eine Signifikanz. Visuell wirken die Banden der PBS + 1 % (w/v) SDS- Probe von allen drei Bedingungen am kräftigsten sowie am feinsten gefächert. Insbesondere die mit Laemmli-Puffer eluierten Proben zeigten in beiden Gelen (nur eines dargestellt) eine Bandenverbreiterung, welche die Auswertung erschweren kann.

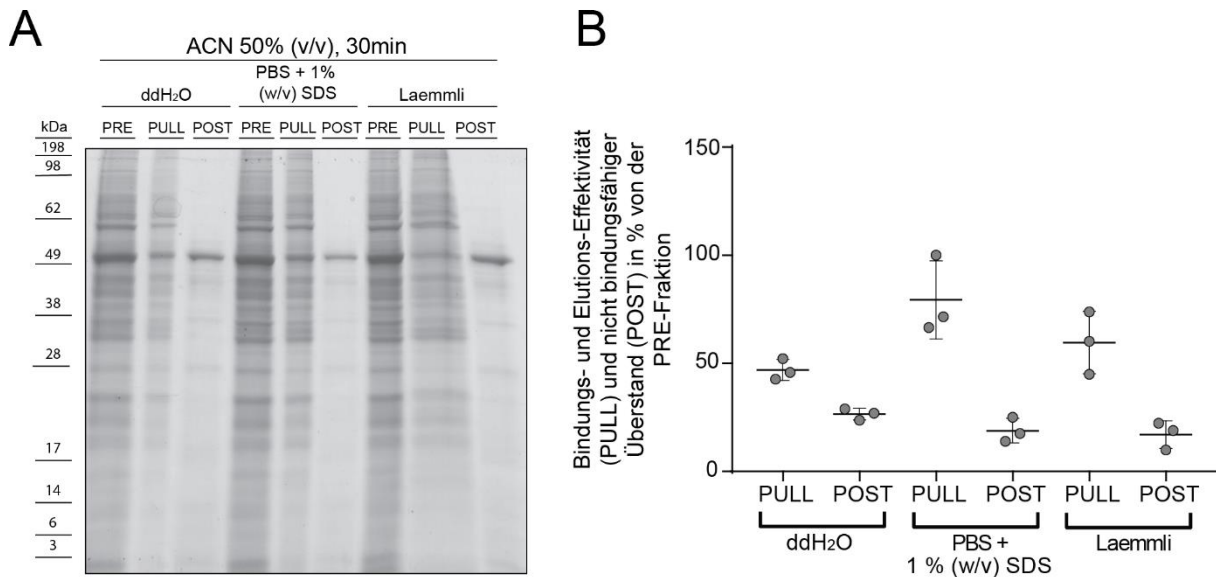


Abbildung 7: Drei Elutionspuffer im Vergleich

(A) Die Elution im SP3 Protokoll wurde mit ddH₂O, PBS + 1% (w/v) SDS und Laemmli-Puffer durchgeführt. PRE, PULL und POST-Fraktionen (n=3) wurden in einem Coomassie-gefärbten SDS-Page-Gel dargestellt. (B) Scatter-Dot-Plot der PULL/PRE- und POST/PRE- Fraktionen. Die Proben enthalten 10µg Protein und wurden mit 2µl Beads (10 µg/µl) unter einer ACN-Konzentration von 50 % für 30 Minuten inkubiert. Es wurden jeweils die kompletten Fraktionen geladen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Kruskal-Wallis-Test in Prism Graphpad (ns=p-Wert >0,05).

3.1.2. Elutionsbedingungen im Vergleich: ddH₂O und PBS + 1 % (w/v) SDS als Elutionspuffer bei Raumtemperatur oder 95 °C

Der vorherige Versuch mit dem Vergleich der drei Elutionspuffer ddH₂O, PBS + 1 % (w/v) SDS sowie Laemmli-Puffer konnte kein signifikantes Ergebnis hervorbringen. Die Elution mit PBS + 1 % (w/v) SDS ergab allerdings ein vielversprechendes feines Bandenmuster im SDS-PAGE. Zudem verliefen die Banden akkurater als bei den Laemmli-Proben. In diesem Versuch wurde erneut eine Elution von PBS + 1 % (w/v) SDS in Vergleich zu ddH₂O getestet. Als zusätzliche experimentelle Bedingung wurden die Proben jeweils entweder 5 Minuten bei Raumtemperatur (etwa 22 °C) oder 5 Minuten bei 95 °C auf dem ThermoMixer C inkubiert. Eine statistische Analyse der PULL/PRE-Fraktionen mit einem Kruskal-Wallis-Test und einem Dunn's Post-hoc Test ergab eine Signifikanz der PBS + 1 % (w/v) SDS- Proben bei Raumtemperatur

gegenüber der ddH₂O- Proben bei Raumtemperatur (p= 0,018). Die PULL/PRE-Fractionen der anderen Bedingungen zeigten keine Signifikanz zueinander. Insbesondere führt das Kochen der PBS + 1 % (w/v) SDS Proben bei 95 °C nicht zu einer signifikant vergrößerten PULL/PRE-Fraktion im Vergleich zu einer Behandlung bei Raumtemperatur. Bei den POST/PRE-Fractionen zeigten sich wie zu erwarten signifikant höhere Werte bei den PBS + 1 % (w/v) SDS- Proben bei Raumtemperatur gegenüber den ddH₂O Proben bei Raumtemperatur (p= 0,0113). Die Mittelwerte des PULL-Downs in Bezug zur PRE-Fraktion betragen 80,73 % (PBS + 1 % (w/v) SDS; RT), 85,03 % (PBS + 1 % (w/v) SDS; 95 °C), 6,86 % (ddH₂O; RT) und 21,08 % (ddH₂O; 95 °C). Basierend auf den Ergebnissen dieses Versuchs habe ich für die SDS-PAGE-Experimente als Elutionspuffer PBS + 1 % (w/v) SDS sowie einen kurzen Erwärmungsschritt von 5 Minuten bei 95 °C gewählt.

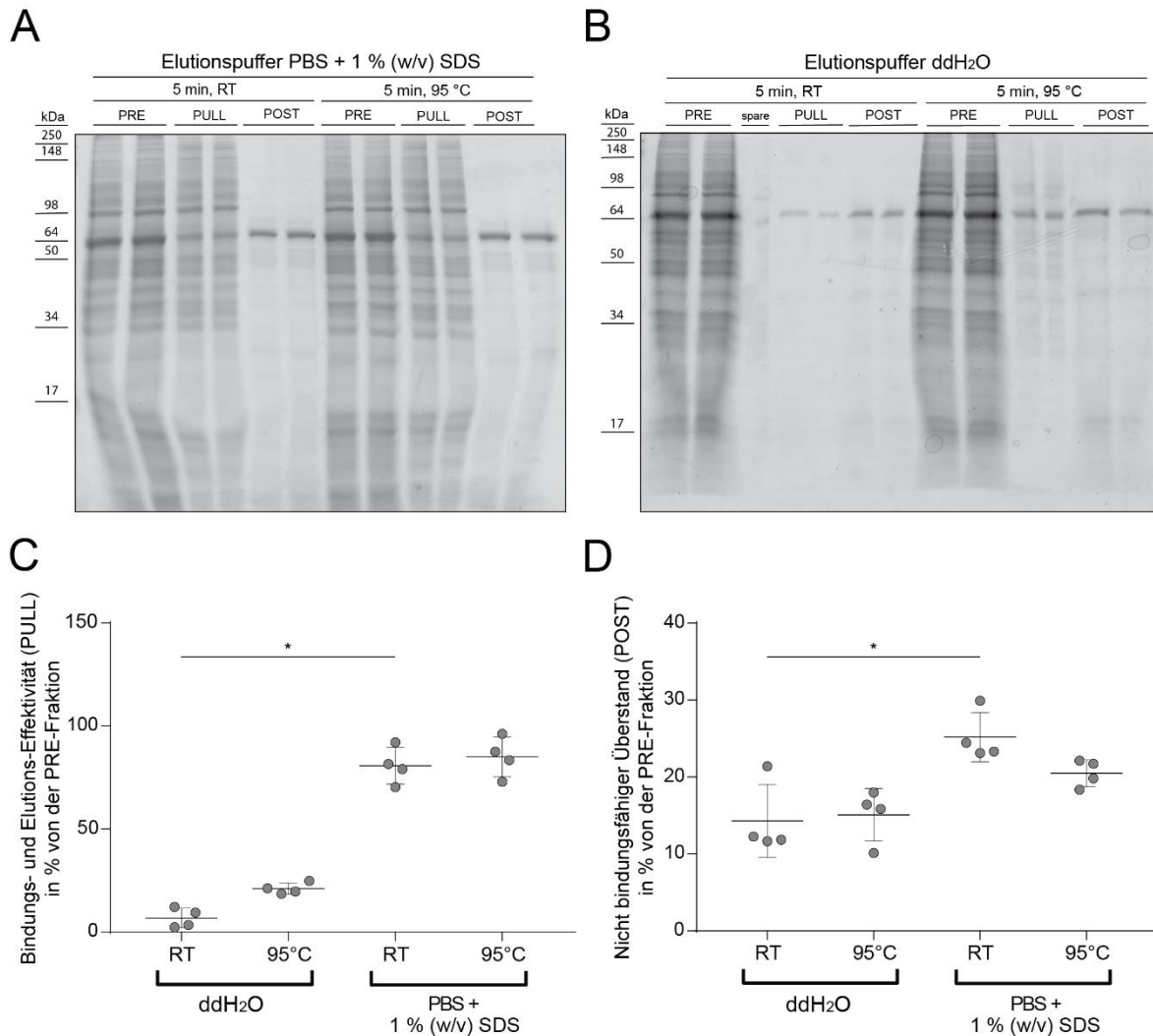


Abbildung 8: Vergleich von PBS + 1 % (w/v) SDS und ddH₂O als Elutionspuffer bei 95 °C und Raumtemperatur
 (A, C) Die Elution im SP3 Protokoll wurde mit ddH₂O und PBS + 1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur oder 95 °C über 5 Minuten durchgeführt. PRE, PULL und POST-Fraktionen (n= 4) wurden in einem Coomassie-gefärbten SDS-Page-Gel dargestellt. (B, D) Scatter-Dot-Plot der PULL/PRE- und POST/PRE- Fraktionen. Die Proben enthalten 10 µg Protein und wurden mit 2 µl Beads (10 µg/µl) unter einer ACN-Konzentration von 50 % (v/v) für 30 Minuten inkubiert. Es wurden jeweils die kompletten Fraktionen geladen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Kruskal-Wallis-Test und einem Dunn's Post-Hoc-Test in Prism Graphpad.

3.1.3. Vergleich von 30 % und 70 % Acetonitril-Konzentration im Bindungsschritt

Um den Bindungsschritt des SP3-Protokolls zu optimieren, wurden Konzentrationen von 30 % und 70 % ACN (jeweils v/v) im Bindungspuffer verglichen. Die Zeit des Bindungsschritts betrug in beiden Fällen 30 Minuten. Während die PULL-Fraktionen als Elution mit PBS + 1 % (w/v) SDS gewonnen wurden, wurde das Volumen der PRE- und POST-Fraktionen auf eine ins Gel ladefähige Menge mittels Verdampfens auf dem ThermoMixer C erzielt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte unter Verwendung eines Mann-Whitney-U Tests im Programm Prism Graphpad. Der Test ergab, dass die

Intensität der PULL/PRE Fraktionen mit der Versuchsbedingung 70 % ACN (v/v) den Intensitäten der PULL/PRE-Fractionen bei 30 % ACN (v/v) im Bindungsschritt signifikant überlegen ist (p-Wert= 0.0286). Die POST/PRE-Fraktion bei 30 % ACN (v/v) war in einem Mann-Whitney-U Test größer als jene bei 70 % ACN (v/v), es konnten also mehr Proteine nicht an die Beads binden. Die Mittelwerte der PULL/PRE lagen bei 30 % ACN (v/v) bei 53,19 % und bei 70 % ACN (v/v) bei 121,11 %. Für die optimierte Version des SP3-Protokoll wurde eine ACN-Konzentration von 70 % (v/v) im Bindungsschritt der Proteine an die Beads übernommen.

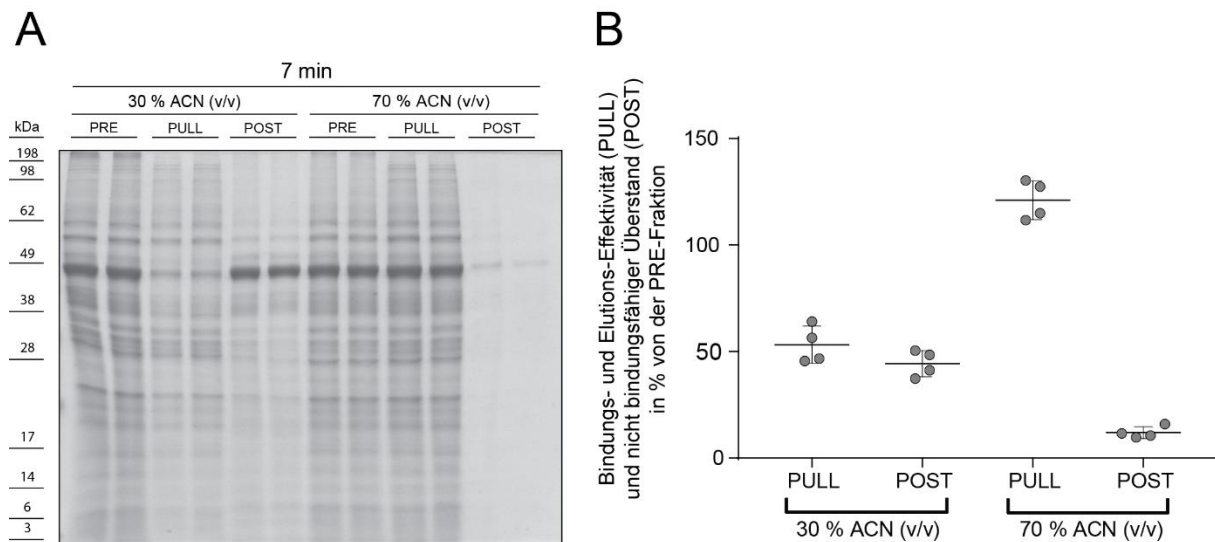


Abbildung 9: Vergleich von 30 % ACN (v/v) und 70 % ACN (v/v) im Bindungsschritt

(A) Der Bindungsschritt im SP3 Protokoll wurde mit 30 % und 70 % ACN durchgeführt. PRE, PULL und POST-Fractionen (n=4) wurden in einem Coomassie-gefärbten SDS-Page-Gel dargestellt. (B) Scatter-Dot-Plot der PULL/PRE- und POST/PRE- Fractionen. Die Proben enthalten 10 µg Protein und wurden mit 2 µl Beads (10 µg/µl) unter einer ACN-Konzentration von 30 % oder 70 % inkubiert. Die Elution von den Beads erfolgte mit 15 µl PBS 1 % (w/v) SDS. Es wurden jeweils die kompletten Fraktionen geladen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test.

3.1.4. Bead-Bindungskapazität

Um die Bindungskapazität der nach dem Ursprungs-SP3-Protokoll (Hughes et al. 2014) fertig präparierten Bead-Mischung (c=10 µg/µl) aus SeraMag A und SeraMag B Beads zu bestimmen, wurden in 10 µg Schritten ansteigende Proteinmengen von 10-50 µg mit einer konstanten Menge Beads (2 µl) unter identischen Bedingungen inkubiert (70 % ACN, 7 min Inkubation). Als PRE Fraktion wurde die kleinste Menge, nämlich 10 µg Protein, geladen. Die PRE wurde rechnerisch an die getestete Menge Protein in der PULL-Fraktion angepasst. So wurde beispielsweise die 50 µg Probe mit der PRE x 5 in Relation gesetzt. Die statistische Auswertung mit einem Kruskal-

Wallis-Test samt Dunn's Post-hoc-Test in Prism Graphpad ergab eine Signifikanz der PULL/PRE 10 µg-Probe gegenüber der PULL/PRE 50 µg-Probe ($p=0,034$). Die anderen PULL/PRE Fraktionen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Bei den POST/PRE-Fraktionen ist ebenfalls nur die 10 µg-Probe der 50 µg-Probe signifikant überlegen ($p= 0.0082$). Mit 10 µg Protein, einem Probevolumen von 200 µl, einem Beadvolumen von 2 µl sowie einer Inkubationszeit von 7 Minuten konnten in diesem Experiment im Schnitt eine PULL/PRE von 61,29 % erzielt werden. Da nach 10 µl Proteinmenge bei 2 µl Beadvolumen die Beadbindungskapazität abfällt, ab 50 µg Proteinmenge sogar signifikant, haben ich für das optimierte Protokoll 10 µg als passende Proteinmenge für 2 µl Beads eruiert und diese Werte als Basis für Aufskalierung verwendet (2.3.3.).

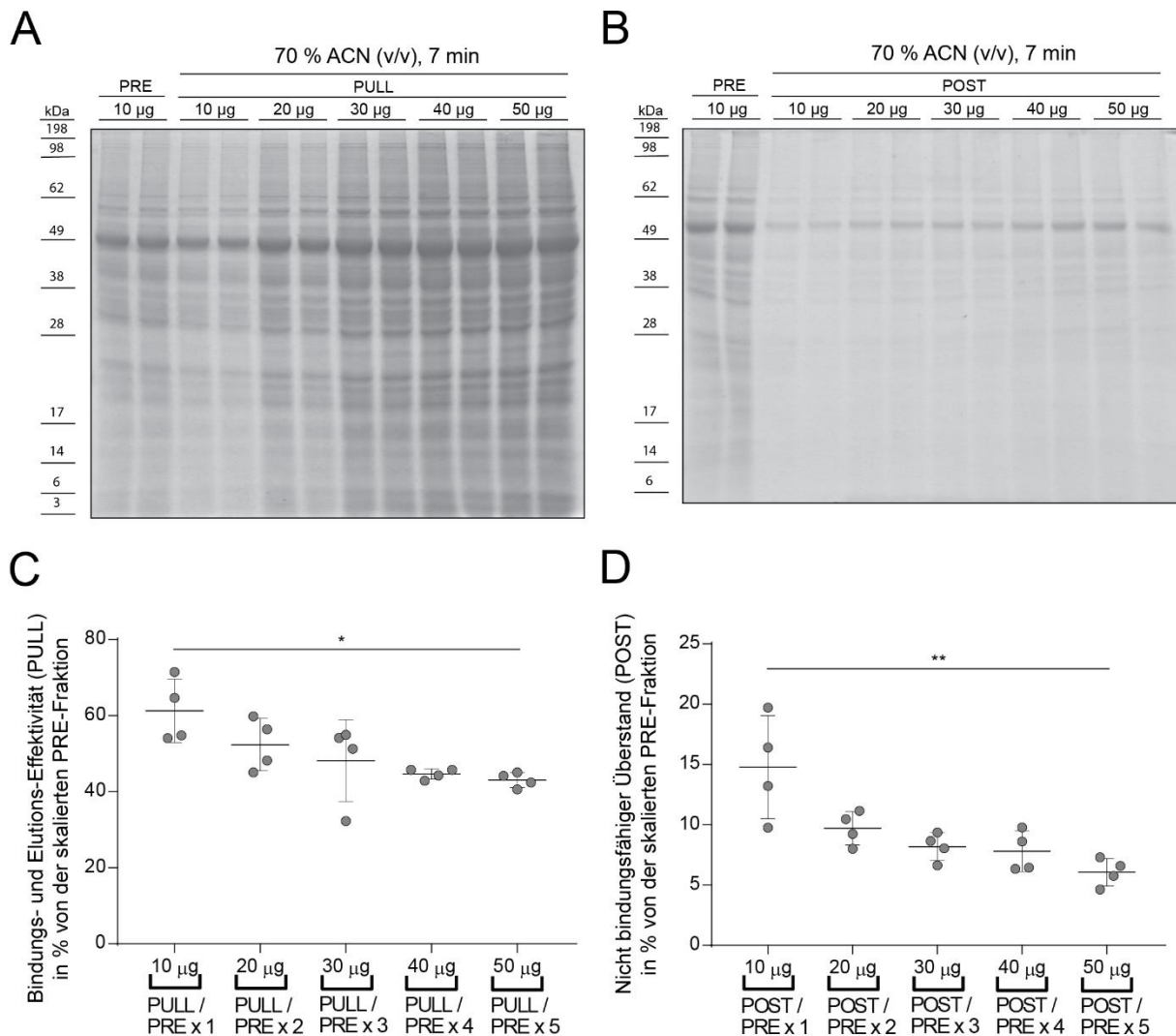


Abbildung 10: Beadbindungskapazität

(A, C) 10-50µg Protein wurden in konstanten Volumen von 200µl, einer ACN-Konzentration von 70% und mit 2µl Beads (10µg/µl) für 7 Minuten im Bindungsschritt inkubiert. PRE, PULL und POST-Fractionen (n=4) wurden in einem Coomassie-gefärbten SDS-Page-Gel dargestellt. (B, D) Scatter-Dot-Plot der PULL/PRE- und POST/PRE-Fractionen. Es wurden jeweils die kompletten Proben geladen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Kruskal-Wallis-Test in Prism Graphpad (ns=p>0,05).

3.1.5. Inkubationszeit im Bindungsschritt: 7 Minuten vs. 30 Minuten

In diesem Experiment wird eine mit dem Ursursungsprotokoll vergleichbare Inkubationszeit von 7 Minuten mit einer längeren Inkubationszeit von 30 Minuten verglichen. Es wurden jeweils 4 technische Replikate der einzelnen Versuchsbedingungen erstellt. Die PRE-Fractionen sind alle gleich präpariert, da sie die Zusammensetzung der Probe vor dem hier untersuchten Bindungsschritt repräsentieren. Sie wurden zwecks besserer optischer Vergleichbarkeit neben den PULL-Fractionen in die Gele geladen. Die Banden des mit Coomassie gefärbten Gels

wurden mit Image-J-quantifiziert (2.4.5.) und mit Prism in Form von Scatter-Dot-Plots dargestellt. Ein auf Basis dieser Daten durchgeführter unverbundener Mann-Whitney-U-test zeigt, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit von 7 auf 30 Minuten nicht zu einer signifikanten Vergrößerung der PULL/PRE Fraktion führt. Es kann also durch eine verlängerte Inkubationszeit nicht mehr Protein an die paramagnetischen Beads binden und wieder abgelöst werden. Die POST/PRE-Fractionen, also die Menge an Proteinen, die nach 7- oder 30-minütiger Inkubationszeit nicht an die Beads binden kann, unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant.

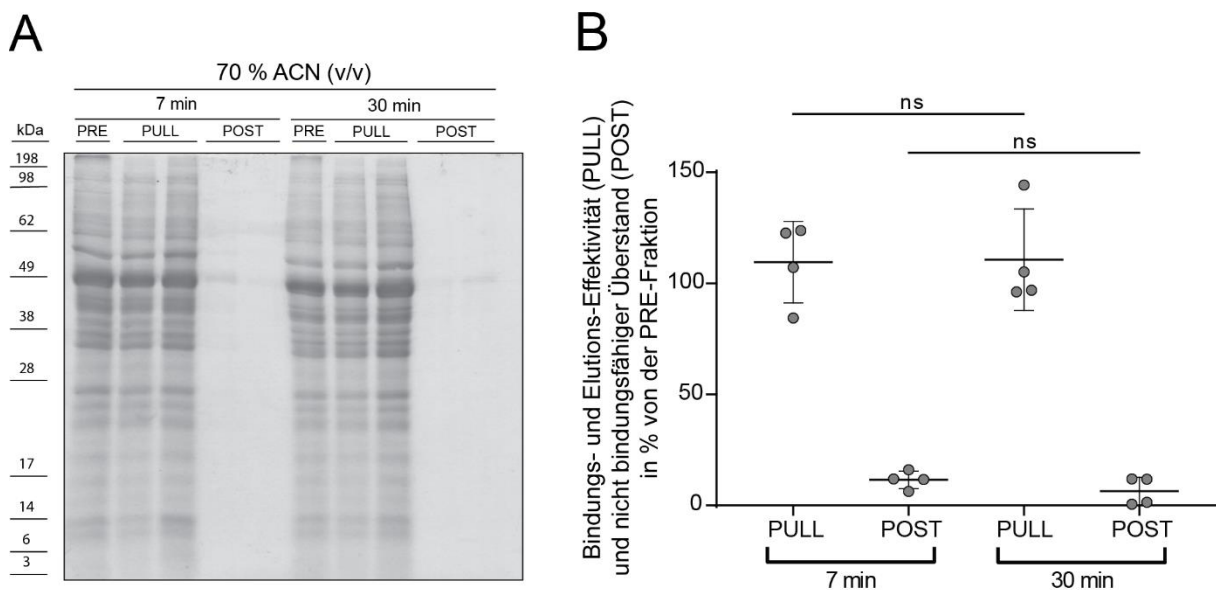


Abbildung 11: Vergleich von 7 Minuten und 30 Minuten Inkubationszeit im Bindungsschritt

(A) PRE, PULL und POST-Fractionen (n=4) im Coomassie-gefärbten SDS-Page-Gel bei 7 und 30 Minuten Inkubationszeit der Beads mit den Proteinen. (B) Scatter-Dot-Plot der PULL/PRE- und POST/PRE- Fractionen. 10 µg Protein aus TRIS-Puffer-HEK-Lysat wurde mit 2 µl Beads (10 µg/µl) einer ACN-Konzentration von 70 % (v/v) inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Elution von den Beads mengenadaptiert an das spätere Laden im Gel mit 15 µl PBS + 1 % (w/v) SDS durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit einem unverbundenen Mann-Whitney-U-test (ns= p > 0,05).

3.1.6. TRIS- und PBS-basierte Lysepuffer im Vergleich

In diesem Schritt wurden zwei in unserem Labor gängige Lyse-Puffer auf ihre Kompatibilität mit dem SP3- Verfahren untersucht. Hierfür wurden HEK-Zellen kultiviert und mit einem 50 mM TRIS-Puffer oder 50 mM PBS-Puffer lysiert und anschließend mit dem SP3 Verfahren aufgereinigt. Es wurden je vier technische Replikate in insgesamt zwei Gele (nur eines gezeigt) geladen. Die Quantifizierung der Intensität der Banden erfolgte mit Image J. Die statistische Auswertung mit einem unverbundenen Mann-Whitney-U-Test in Prism zeigt, dass der TRIS-Lysepuffer

signifikant bessere PULL/PRE Fraktionen ergibt (adjustierter p-Wert= 0,0572). Der gleiche Test zum Vergleich der POST/PRE-Fraktionen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Lysepuffern. Wenn man das Handling der Lyse als Zusatzfaktor hinzuzieht, zeigt sich der TRIS-Lysepuffer einfacher in der Handhabung. Mit ihm gelingt bei den HEK-Zellen ein homogenes, gut pipettierbares Lysat, während beim PBS-Puffer stets eine leicht schleimige Konsistenz auftritt, welche das exakte Pipettieren erschwert. Zudem lässt sich bei genauer Betrachtung der Gele (zweites Gel nicht abgebildet) eine feinere Bandenzeichnung beim TRIS-Lysepuffer im Vergleich zum PBS-Lysepuffer feststellen. Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse haben ich den TRIS-Lysepuffer als Lysepuffer für Zellmaterial in das optimierte SP3-Protokoll übernommen.

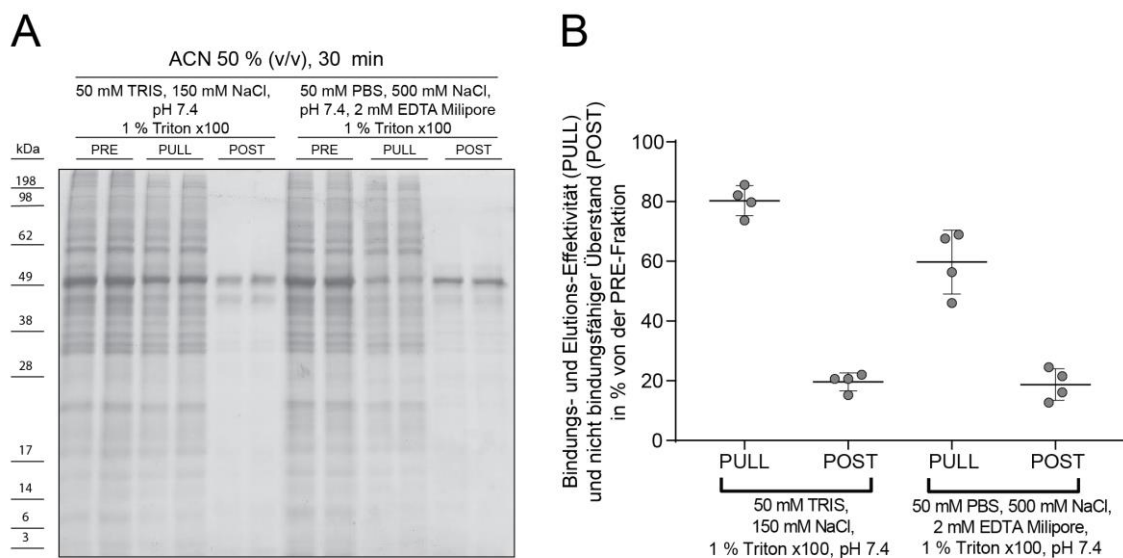


Abbildung 12: Vergleich eines TRIS- und PBS-basierten Lysepuffers

(A) PRE, PULL und POST-Fraktionen (n=4) im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE mit Lysis der HEK-Zellen in TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 % Triton x100, pH 7.4) und in PBS-Puffer (50 mM PBS, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA Milipore, 1 % Triton x100, pH 7.4) und Durchführung des SP3 Protokolls. (B) Scatter-Dot-Plot der PULL/PRE- und POST/PRE- Fraktionen. Die Proben enthalten 10 µg Protein und wurden mit 2 µl Beads (10 µg/µl) unter einer ACN-Konzentration von 50 % inkubiert. Die Elution von den Beads erfolgte mit je 15 µl PBS + 1% (w/v) SDS. Es wurden jeweils die kompletten Fraktionen geladen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test.

3.2. Analkarzinom-Kohorte

3.2.1. Histologische Evaluation

Eine histologische Einschätzung wurde von mindestens einem von drei Pathologen vorgenommen. Nach WHO-Klassifikation ergaben sich 12 keratinisierende, 11 nicht-keratinisierende und 8 basaloide Tumoren. Von den 31 Tumoren insgesamt waren 11 mittel (G2) und 20 schlecht differenzierte Karzinome (G3). Von den Tumoren zeigten

6 geringe, 15 mittlere und 10 hohe Stroma Aktivität. 12 ASCCs zeigten keinerlei, 6 zeigten geringes (<5 per HPF) und 13 hohes (>5 per HPF) Tumor Budding. 6 der Tumoren mit Tumor Budding Aktivität zeigten eine kleine Zellnestgröße, 13 zeigten ein stark invasives Muster inklusive Invasion einzelner Zellen.

3.2.2. HPV- und p16-Status

19 der 31 Patienten zeigten HPV-Hochrisikotypen (16, 31, 35, 59), wobei Typ 16 am häufigsten vorkam (17/31). Alle Tumoren mit HPV-Hochrisikotypen zeigten in der IHC mit >80% eine starke p16-Färbung in den Tumorzellen ($p < 0,001$).

3.2.3. Genetisches Profiling und prognostischer Einfluss

Im ASCC-Panel konnten 23 Mutationen in 8 Genen festgestellt werden, welche auf 15 der 31 Fälle der Kohorte aufgeteilt waren. 7 der 31 Fälle zeigten eine *TP53* Mutation und kamen gehäuft unter den Tumoren ohne HPV-Assoziation vor ($p=0,022$). *PIK3CA* Mutationen (4/31) waren zusammen mit *PIK3CA* Amplifikationen (2/31) in der Gruppe der HPV-positiven Tumoren gebündelt. Jeweils eine Probe zeigte Mutationen in *Rb1*, *STK11*, *FAT1*, *FBXW7* and *CASP8*, eine *NOTCH1* Mutation konnte in 2 der 31 Proben ermittelt werden. Keine der DNA-Veränderungen war frequenter in der Non-Responder Gruppe des MS-Subtyps anzutreffen. ASCCS mit *TP53* Mutationen zeigten ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben ($p < 0,001$), krankheitsspezifisches Überleben ($p < 0,001$) und krankheitsfreies Überleben ($p=0,005$) im Vergleich zu *TP53* Wildtyp Tumoren. Das Vorkommen von Highrisk-HPV-Subtypen war mit einem signifikant erhöhten Gesamtüberleben ($p=0,033$), krankheitsspezifischen Überleben ($p=0,009$) und krankheitsfreien Überleben ($p=0,003$) vergesellschaftet. Alle anderen genetischen Alterationen zeigten keinen prognostischen Einfluss.

3.2.4. Proteomische Ergebnisse der Kohorte

Nach der Prozessierung mit dem SP3-Verfahren konnten die 31 FFPE-Proben des Analen Plattenepithelkarzinoms mit dem oben genannten Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer vermessen werden. Bei der Auswertung mit MaxQuant und der UniProt Datenbank konnten insgesamt 4882 Proteingruppen mit mindestens 2 charakteristischen Peptiden ermittelt werden. Hiervon wurden 2370 mit ≥ 5 charakteristischen Peptiden der weiteren Analyse zugeführt.

Zwischen Patienten mit langem krankheitsspezifischem (>60 Monate) und kurzem krankheitsspezifischen Überleben (<60 Monate) konnten nach multiplen

Hypothesentesten 23 signifikante ($p < 0,005$), gegensätzlich regulierte Proteingruppen ausgemacht werden. Mittels einer hierarchischen Clusterung der 60 signifikantesten gegensätzlich regulierten Protein-Gruppen (p -Wert $\geq 2,3$) konnten dem aggressiveren und dem lang-überlebenden ASCC-Subtypen jeweils eine charakteristische proteomische Signatur zugeordnet werden. Die beiden Signaturen sind in einer Heatmap bildlich dargestellt (*Abbildung 14*).

Konkret zeigt der aggressivere Subtyp eine starke Hochregulierung von tumorsupportiven Stromaproteinen. Hierzu gehören die matrizellulären Proteine Periostin ($p < 0,001$) und Tenascin C ($p < 0,001$), deren Induktor TGFB1 ($p < 0,001$) und bestimmte Kollagene wie COL12A1 ($p < 0,001$), COL6A3 ($p < 0,001$) und COL1A1 ($p < 0,001$). Eine deutliche Herunterregulierung konnte für das Protein LARP7 ($p < 0,001$) nachgewiesen werden. Im Vergleich zum weniger aggressiven Subtyp waren p63 und IRF6 stark herunterreguliert. Diese beiden Proteine fungieren als Transkriptionsfaktoren und haben eine tragende tumor-suppressive Rolle in Plattenepithelien (Botti et al. 2011; Melino 2011; Stransky et al. 2011; Bergholz und Xiao 2012; Mollo et al. 2015; Smirnov et al. 2019). Zudem ist das Bindeprotein des Tumorsuppressors p53 (TP53BP) im aggressiven Subtyp herunterreguliert. TP53BP und sein Ligand p53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, überwachen die Intaktheit der DNA und können bei DNA-Schäden den Zellzyklus stoppen (Rassow et al. 2012). In der Literatur wird eine mit der Herunterregulierung vergesellschaftete Resistenz gegen Chemotherapeutika wie 5-FU und eine Verringerung des Krankheits-spezifischen Überlebens beschrieben (Li et al. 2013; Bi et al. 2015; Cuella-Martin et al. 2016; Soussi und Kroemer 2017; Yao et al. 2017b; Hong et al. 2018b). Ebenso war unter den bei Salvage-Operation gewonnen Tumorproben, welche nicht auf die First-Line Radiochemotherapie angesprochen hatten, der Anteil des aggressiven ASCC Subtyps merklich erhöht (12/15; $p = 0,006$).

Zusammenfassend zeichnet sich der aggressive Subtyp durch eine Häufung tumorsupportiver Stromaproteine, eine verringerte Expression des EMT-Suppressors LARP7 und eine verringerte Expression der Epithelialen Transkriptionsfaktoren p63 und IRF6 aus, weshalb ich die proteomische Signatur des aggressiven ASCC Subtyp als „Mesenchym-ähnlichen Subtyp“ (MS) betitelt habe.

In der Lang-überlebenden Subgruppe zeigt sich ein gegensätzliches Expressionsprofil: Die matrizellulären Proteine wie Periostin und Tenascin C waren

nicht oder kaum exprimiert (jeweils $p < 0,001$). Die Proteine p63, IRF6 und LARP7 waren signifikant erhöht (jeweils $p < 0,001$). Auch die mit DNA-Reparatur assoziierten Proteine, unter anderem TP53BP1, zeigten sich signifikant höher exprimiert ($p < 0,001$). In Abgrenzung zum MS-Subtypen, wegen der hohen Expression von p63, IRF6 und LARP7 und der geringen Expression matrizellulärer Proteine, habe ich die proteomische Signatur „Epithel-ähnlicher Subtyp“ (ES) genannt.

Von insgesamt 31 ASCC-Proben konnten so 14 Proben dem ES-Subtyp und 17 Proben dem MS-Subtyp zugeordnet werden. Die proteomischen Subtypen konnten unter Hinzuziehung von Histologie und Genetik bestätigt werden: Der Mesenchym-ähnliche Subtyp zeigte unter histomorphologischer Betrachtung Malignitätsmerkmale wie einen hohen Stromaanteil ($p = 0,007$), eine hohe Tumor-Budding-Aktivität ($p = 0,005$), Einzelzellinvasion ($p = 0,005$) und eine keratinisierende Morphologie ($p = 0,014$) (Jesinghaus et al. 2019). Immunhistochemische Färbungen bestätigten eine signifikant erhöhte Expression von Periostin ($p < 0,001$) und eine erniedrigte Expression von MSH6 ($p < 0,001$), POLD1 ($p < 0,001$) und p63 ($p = 0,015$) im MS-Subtyp, jeweils im Vergleich zum ES-Subtyp. Eine HPV-Koinfektion wurde in beiden Subtypen gleichermaßen beobachtet, lag aber häufiger im Epithel-ähnlichen Subtyp vor ($p = 0,014$). Auf Gen-Ebene konnten *PIK3CA*-Mutationen und Amplifikationen beim ES-Subtypen häufiger beobachtet werden ($p = 0,05$), *TP53* Mutationen zeigten eine nicht signifikante Häufungs-Tendenz für den MS-Subtyp.

Die in der ersten proteomischen Studie zum Analkarzinom ermittelten spezifischen Signaturen, die Zona transitionalis- und Zona squamosa-Signatur, konnten in den Daten ebenfalls geclustert werden, teilten sich aber nach zufälligem Muster dem ES- und dem MS-Subtypen zu (Herfs et al. 2017).

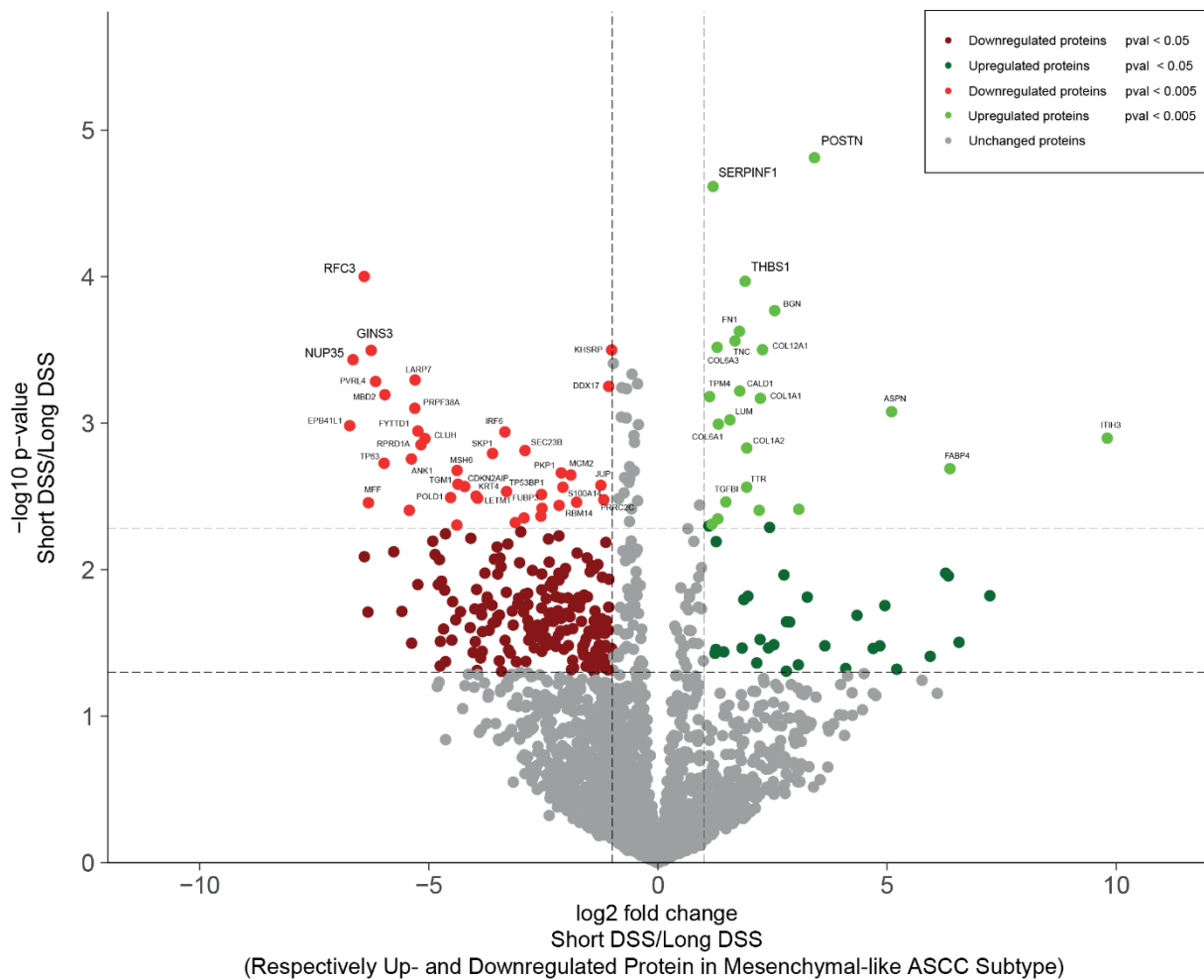


Abbildung 13: Volcano-Plot der identifizierten Proteine

Inklusive aller signifikant gegensätzlich regulierten Proteine zwischen ASCC-Patientinnen und Patienten mit kurzem (<60 Monate) und langem (>60 Monate) krankheitsspezifischen Überleben. Das Diagramm zeigt die relativen Expressionsänderungen des Mesenchym-ähnlichen-Subtyps im Vergleich zum Epithel-ähnlichen Subtyp. Log₂ transformierte x-fache Veränderungen auf der x-Achse sind gegen negative log₁₀ transformierte p-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Die gestrichelten, horizontalen Linien markieren den p-Wert= 0,05 [-log₁₀=1.3] und den p-Wert= 0,005 [-log₁₀ = 2.3]. Die vertikalen gestrichelten Linien in schwarz markieren eine x-fache Veränderung von 0,5 [log₂=-1] und 2 [log₂=1].

Signifikant hochregulierte Proteine mit einem p-Wert <0,05 sind dunkelgrün gefärbt, signifikant hochregulierte mit einem p-Wert <0,005 sind hellgrün gefärbt. Signifikant herunterregulierte Proteine mit einem p-Wert <0,05 sind dunkelrot gefärbt, Signifikant herunterregulierte Proteine mit einem p-Wert von <0,005 sind leuchtend rot gefärbt.

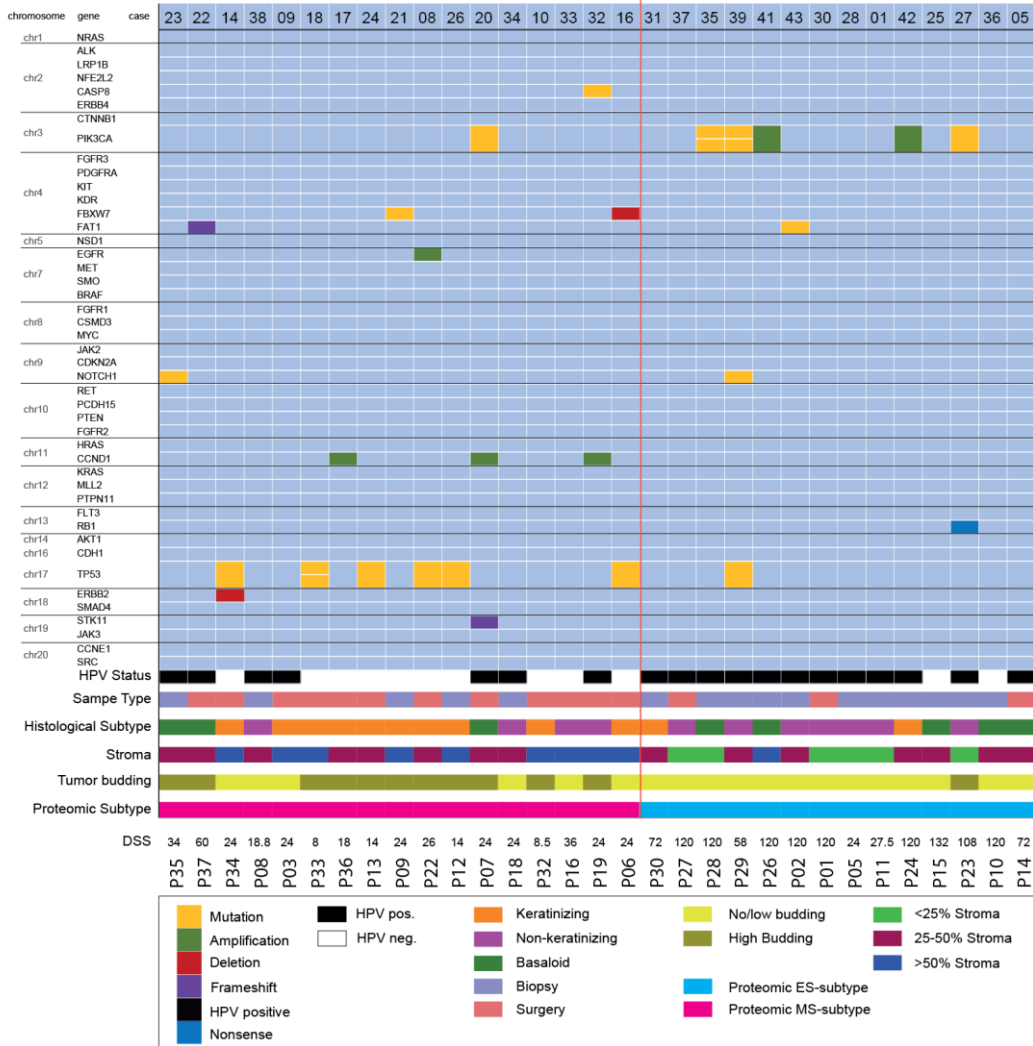
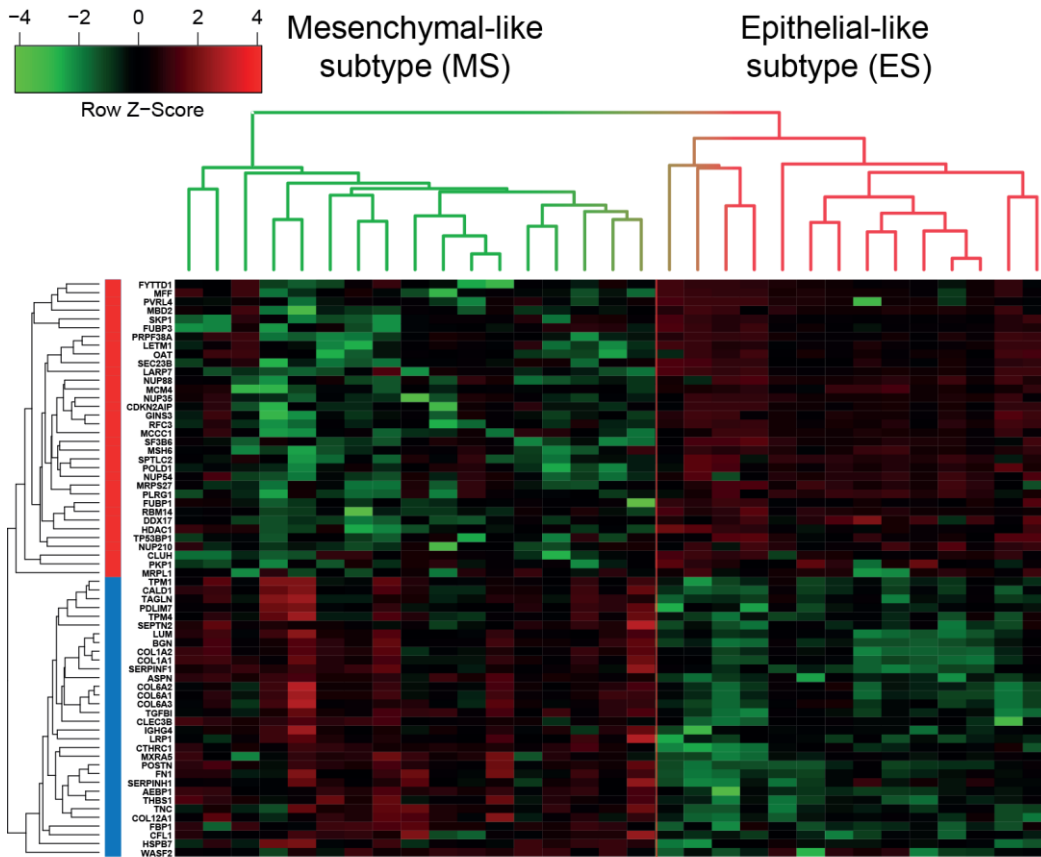


Abbildung 14: Clusterung in Epithel-ähnlichen und Mesenchym-ähnlichen Subtyp

Heatmap einer hierarchischen Clusterung von z-Scores der 60 Proteingruppen, welche sich zwischen dem ES-Subtyp und dem MS-Subtyp am signifikantesten unterscheiden. Die relative Änderung der Proteinexpression zwischen dem MS- und dem ES-Subtypen sind farbkodiert: Eine Hochregulation wird durch leuchtend rote Färbung angezeigt, schwarz steht für keine Änderung der Expression und grün steht für eine Herunterregulierung der entsprechenden Proteine. Die einzelnen ASCC-Tumoren sind in entsprechend ihrer Proteinsignatur dem Mesenchym-ähnlichen oder dem Epithel-ähnlichen Subtyp zugeordnet. Im unteren Bereich der Graphik ist die Korrelation zwischen genetischen Alterationen, HPV-Status, histomorphologischen Charakteristika inklusive histologischem Typ, Tumor- Budding und Stroma-Anteil sowie krankheitsspezifischem Überleben in Monaten für jede ASCC-Probe dargestellt. Die Farbcodierung ist in der Legende unter dem Diagramm erläutert.

3.2.5. Prognostische Aussagen auf Basis proteomischer Subtypisierung

Die eindimensionale Analyse der Überlebensdaten unter Berücksichtigung der identifizierten Subtypen ergab ein extrem verkürztes Gesamtüberleben sowie krankheitsspezifisches Überleben bei Individuen mit dem MS-ASCC (jeweils $p < 0.001$). Das mittlere krankheitsspezifische Überleben für Patienten mit dem ES-Subtyp betrug 125,83 Monate im Vergleich zu 30,15 Monaten bei Patienten mit dem MS-Subtyp. Ebenso war das krankheitsfreie-Überleben bei Patienten mit MS-Subtyp signifikant verringert ($p < 0,001$): Während die mittlere krankheitsfreie Zeitspanne bei Patienten mit MS-Subtyp mit 20.04 Monaten unter zwei Jahren lag, betrug diese bei Patienten mit ES-Subtyp mit 87,62 Monaten über 7 Jahre (jeweils $p < 0,001$). Auch in der prognostisch besonders interessanten prätherapeutischen Subgruppe (16 ASCC) behielt die proteomische Subtypisierung ihre prognostische Aussagekraft (OS/DSS: $p = 0,004$; DFS: $p = 0,001$). In den 15 Tumoren der Non-Responder-Gruppe, in denen der MS-Subtyp vorherrschte, konnte mithilfe der proteomischen Subtypisierung ebenfalls das Überleben der Patienten vorhergesehen werden (OS: $p = 0,009$; DSS: $p = 0,049$), nicht aber die Rezidivrate. Wegen der Prädominanz des MS-Subtypen in der Non-Responder-Gruppe war die statistische Analyse jedoch behindert. Obwohl HPV-assoziierte ASCCs normalerweise mit einem benignen klinischen Verlauf vergesellschaftet sind, konnte auch hier die proteomische Subtypisierung prognostisch relevante Informationen in Bezug auf das krankheitsspezifische Überleben liefern ($p = 0,01$). Die proteomische Subtypisierung von Herfs et al. in Zona-transitionalis- und Zona-squamosa-Untergruppe konnte in der Kohorte keine prognostischen Informationen liefern.

Eine mehrdimensionale statistische Analyse inklusive aller statistisch signifikanter Faktoren der eindimensionalen Analysen (cT, cN, HPV-Status, p53-Status, Proteomische Subtypisierung) sowie Geschlecht und Patientenalter (Über Median/

Median und unter Median) wurde durchgeführt. Während alle anderen Faktoren inklusive präklinisches Stadium und p53-Status ihre statistische Signifikanz verloren, behielt die proteomische Subtypisierung ihre prognostische Aussagekraft für das Gesamtüberleben ($p=0,019$), das krankheitsspezifische Überleben ($p=0,017$) und das krankheitsfreie Überleben ($p=0,01$). Die Hazard-Ratio des krankheitsspezifischen Überlebens von Patienten mit MS-Subtyp lag im Vergleich zu Patienten mit ES-Subtyp bei 84,49 (OS: 133,42, DFS: 19,32).

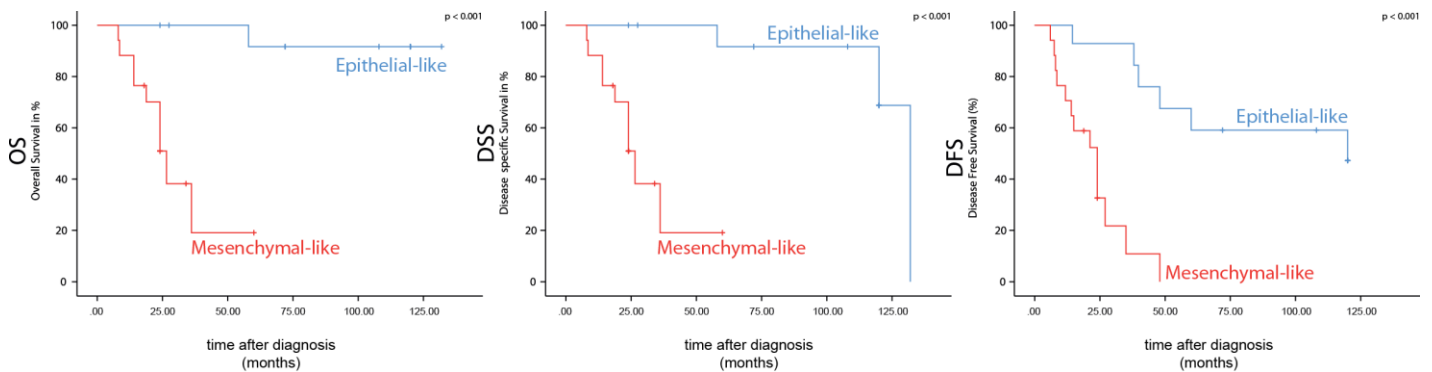


Abbildung 15: Kaplan-Meier Überlebenskurven

(A) des Gesamtüberlebens, (B) des krankheitsspezifischen Überlebens und (C) des krankheitsfreien Überlebens des Epithel-ähnlichen (blau) und Mesenchym-ähnlichen (rot) Subtyps. Insgesamt zeigt sich beim MS-Subtyp eine im Vergleich zum ES-Subtyp deutlich verringerte Überlebenszeit in allen Graphen (jeweils $p < 0,001$). Auf der x-Achse ist die Zeit in Monaten nach der Diagnose, auf der y-Achse die Ereignisse in Prozent dargestellt.

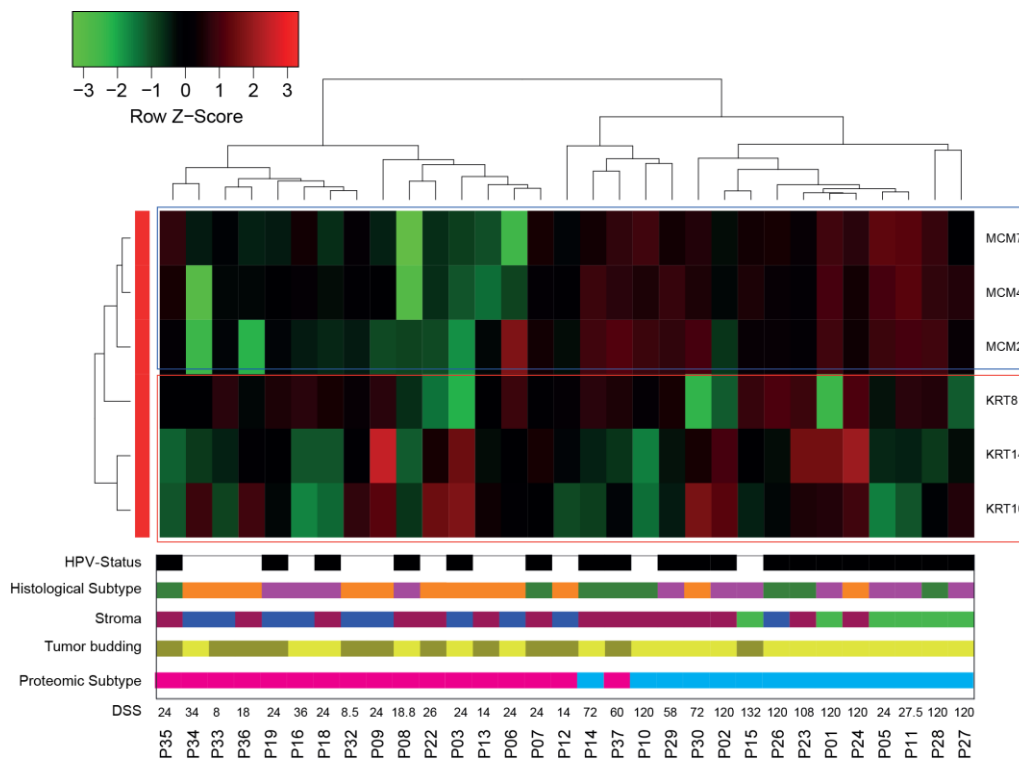


Abbildung 16: Cytokeratin-Expression (CK6/14/16)

Und MCM Protein Veränderungen unter Berücksichtigung der von Herfs et al. vorgeschlagenen Sutypisierung des ASCC. Die Keratinexpressionsprofile sind in unserer Kohorte zufällig zwischen dem ES- und dem MS-Subtyp verteilt ($p > 0,05$).

4. Diskussion

4.1. Etablierung des SP3 Verfahrens

Das Proteom einer Zelle spiegelt ihren funktionellen Status wider und definiert ihren Phänotyp (Doll et al. 2019). Für die quantitative Proteomik und die Präparation von Proben für massenspektrometrische Messungen existieren verschiedene Verfahren, welche jeweils charakteristische Vor- und Nachteilsprofile besitzen. Das 2014 von Hughes et al. erstmalig publizierte SP3-Verfahren ist ein vielversprechendes Single-Pot-Verfahren, welches ich für das Labor der Arbeitsgruppe Kuhn am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München etabliert habe. Die Etablierung basiert auf der Auswertung Coomassiegefärbter Gele, in die ich mit dem SP3-Verfahren behandelte Proteinproben von HEK 293T Zellen geladen haben. Wie erläutert, wurden PRE, PULL und POST-Fractionen definiert, welche Zwischenschritte des Verfahrens repräsentieren (*Abbildung 6*).

Um die Bindungsbedingungen testen zu können, ist ein effizienter Elutionspuffer von entscheidender Bedeutung, da nur so die PULL- und POST-Fractionen quantitativ

dargestellt werden können. Die Wahl des richtigen Elutionspuffers ist essentiell für eine quantitativ korrekte Darstellung der PULL-Fraktion: Ein guter Elutionspuffer muss einen Großteil der an die SP3-Beads gebundenen Proteine lösen können. Die Verwendung eines denaturierenden Elutionspuffers, hier Laemmli Puffer oder PBS + 1 % (w/v) SDS, geht in meinen Ergebnissen im Vergleich zu ddH₂O mit einer signifikant besseren Ablösung von den SP3-Beads einher. In einer großen Übersichtsarbeit zu SP3-Bedingungen wurde die Elution mit denaturierendem Laemmli-Puffer mit einem nicht denaturierenden Ammonium-Bicarbonat-Puffer im Kontext eines Versuches über nicht denaturierte Proteine getestet. Hierbei erzeugte der denaturierende Elutionspuffer im Vergleich zum nicht-denaturierenden Elutionspuffer eine signifikant erhöhte PULL-Fraktion. Im Coomassie-Gel zeigte sich aber, dass die Banden nach Laemmli-Elution ab einem Molekulargewicht von 75 kDa verschwimmen und in die Breite ausscheren (Moggridge et al. 2018). Dieser Effekt war auch in der Laemmli-Probe unserer Blaugelexperimente bei einem Molekulargewicht ab 98 kDa zu beobachten. Für die Auswertung und Quantifizierung von Coomassie-Gelen mit Fiji ist eine solche Verbreiterung der Banden hinderlich. Ein Verschwimmen der Streifen innerhalb der Banden spricht für eine Behinderung der Auftrennung während der Elektrophorese, wodurch die Zuordnung zu einzelnen Molekulargewichten erschwert wird. In der mit PBS + 1% (w/v) SDS eluierten Probe bleiben genannte Effekt weitestgehend aus, eine feine Bandenzeichnung ist über alle Molekulargewichte verteilt sichtbar. Es ist davon auszugehen, dass eine Denaturierung im Elutionsschritt mit einer besseren Rückgewinnung der Proteine von den SP3-Beads einhergeht. PBS + 1 % (w/v) SDS präsentiert sich mit einer mittleren PULL-Fraktion von 80,73 % in den gezeigten Experimenten, unabhängig von der Elutionstemperatur, als zuverlässiger und akkurater Elutionspuffer.

Als essentiell für die Bindung der Proteine an die SP3-Beads hat sich die Konzentration von organischen Lösungsmitteln im Bindungsschritt gezeigt. In den ersten Versuchen zur Etablierung des SP3-Protokolls wurde eine Konzentration von 50 % (v/v) (Daten nicht gezeigt) verwendet, wobei die PULL-Fractionen im Vergleich zu den PRE-Fractionen im Coomassie-Gel deutlich blasser erschienen. Ebenso waren die POST-Fractionen stark ausgeprägt, was für eine geringe Bindung im Bindungsschritt und viel verbleibendes Protein im Überstand spricht. Im Ursprungsprotokoll (Hughes et al. 2014) wird eine ACN-Konzentration von 95 % (v/v) im Bindungsschritt verwendet. Bei

dieser Konzentration zeigte sich in meinen Versuchen eine deutliche Verschlechterung im Handling der Beads: Die Beads, deren Volumen im Vergleich zum Gesamtvolumen sehr klein war, wurden durch Zugabe des Bindungspuffers ACN sehr stark verdünnt. Bei Einsetzen der Tubes auf das magnetische Gestell zeigte sich so eher ein Bead-Schleier, als ein kompaktes Bead-Pellet (*Abbildung 4*). Ein Bead-Schleier lässt sich weniger gut als ein Pellet mit dem Waschpuffer erreichen und weniger gut mit einem Elutions- oder Verdauungspuffer resuspendieren. Die Beads bleiben eher an der Tubewand haften und können höchstens mechanisch mit der Pipettenspitze abgekratzt werden. Ich gehe davon aus, dass hohe Volumina des Bindungspuffers in Relation zu den Beads (v/v) mit einem Materialverlust einhergehen können. Einige Gruppen nutzen als Mittelweg zwischen 95 % und 50 % ACN (v/v) ein modifiziertes SP3 Protokoll mit 70 % ACN (v/v) im Bindungsschritt, häufig als einzige Abwandlung im Vergleich zum Originalprotokoll (Sielaff et al. 2017; Dagley et al. 2019; Doellinger et al. 2020; Griesser et al. 2020). Ich habe mich im Versuch in Kapitel 3.1.3. an diesen 70 % orientiert und eine deutlich geringere ACN-Konzentration von 30 % als Vergleich getestet. Hierbei zeigt sich eine starke Überlegenheit der Konzentration von 70 % (v/v). Zudem ist das Handling bei 70 % sehr gut: Die Beads bilden ein kompaktes Pellet, wodurch das SP3-Protokoll problemfrei durchgeführt werden kann.

Ähnlich wie bei anderen durchgeführten Experimenten (3.1.1., 3.1.5.) ergibt sich in Versuch 3.1.3. teilweise eine PULL/PRE Fraktion über 1. Dies ist eigentlich nicht möglich, da die PULL Fraktion nur einen Anteil der PRE-Fraktion darstellt und demnach kleiner als diese sein müsste. Um die PRE-Fraktion vor Zugabe der Beads so realitätsgetreu wie möglich darstellen zu können, habe ich zu dem verdünnten Lysat (0,5 µg/µl) das theoretisch für den PULL-Schritt zu verwendende ACN hinzugefügt. Hierdurch ergibt sich ein für das Laden ins Gel zu großes Volumen. Um eine komplette Ladung der PRE und auch der POST-Fractionen, welche naturgemäß ebenfalls zu einem großen Anteil mit ACN verdünnt sind, zu gewährleisten, habe ich die überschüssige Flüssigkeit bei 30 °C bis zur Verringerung des Volumens auf etwa 20 µl auf dem ThermoMixer C verdampfen lassen. Es ist nicht auszuschließen, dass bei diesem Verfahren durch Erhitzung der Tubewand einzelne Proteinmoleküle an dieser adhären werden und nach Beendigung des Verdampfens nicht mehr im Restvolumen löslich sind. Die korrekte Darstellung der Proteinmengen in PRE und POST-Fraktion ist eine durch das große Volumen erschwerte, diffizile Aufgabe. Da dieser Schritt nur

für die Visualisierung mittels Coomassie und Protokolletablierung, nicht aber für ein auf die massenspektrometrische Messung hinarbeitendes Protokoll wichtig ist, habe ich keine weiteren Optimierungsmaßnahmen an dieser Stelle unternommen.

Arbeitsgruppen, die das SP3-Protokoll in ihren Publikationen verwenden, haben häufig die Inkubationszeit im Bindungsschritt verändert. Als Modifikation des Ausgangsverfahrens, das auf eine 8-minütige Inkubation im Bindungsschritt setzt, zeigt sich insgesamt eine Tendenz zur Verlängerung der Inkubationszeit von 10 Minuten (Cagnetta et al. 2018), über 15 Minuten (Mateus et al. 2018) bis zu 18 Minuten (Sielaff et al. 2017). Die konkreten Zeiten wirken willkürlich gewählt und werden nicht näher begründet. Eine Verlängerung der Inkubationszeit im Bindungsschritt ist vermutlich mit der Hoffnung auf eine Verbesserung der Proteinbindung an die Beads und eine dadurch erhöhte Protein-Rückgewinnung verbunden. Das Experiment zur Bindungszeit wurde unter den mir bislang bekannten effizientesten Bedingungen, insbesondere einer Konzentration von 70 % ACN (v/v) im Bindungsschritt, durchgeführt. Da sich die Ergebnisse von 7 auf 30 Minuten nicht signifikant unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass durch eine Verlängerung der Inkubationszeit im Bindungsschritt von 7 auf 30 Minuten nicht mehr Proteine an die paramagnetischen Beads gebunden und wieder abgelöst werden können. Für die Nicht-Signifikanz kann selbstredend auch die geringe Fallzahl verantwortlich sein. Zudem ist es möglich, dass je nach Ausgangsmaterial unterschiedliche Inkubationszeiten als optimal zu bewerten sind. So könnten Gewebeproben, wenn auch lysiert, durch ihre Komplexität mehr von einer längeren Inkubationszeit profitieren als die hier verwendeten HEK293T-Zelllysate. Unter Berücksichtigung der anderen Experimente scheinen für den Erfolg des SP3- Protokolls die Bindungsbedingungen mehr Wichtigkeit als die Bindungszeit selbst zu haben. Im Rahmen einer Effizienzsteigerung des SP3 Protokolls wäre es weiterhin interessant zu untersuchen, ob noch kürzere Inkubationszeiten im Bindungsschritt die Menge der PULL-Down-Fraktion maßgeblich im Vergleich zu längeren Inkubationszeiten verringern. Beispielsweise setzt das auf Hochskalierung und Automatisierung bauende SPEED-Verfahren auf eine Inkubationszeit von 5 min, erhöht hierbei aber auch die Temperatur auf 95 °C (Doellinger et al. 2020). Die neuste Version des SP3-Protokolls von Hughes et al. empfiehlt eine Inkubationszeit von 5 min bei 24 °C und 1000 rpm (Hughes et al.

2019). Allgemein scheint eine Verlängerung der Inkubationszeit den Bindungsschritt nicht zu beeinträchtigen (Moggridge et al. 2018).

Die Proteinextraktion aus Zellen und Gewebe ist essentiell, um so viele Proteine wie möglich für das SP3 Verfahren zugänglich zu machen. Das SP3-Protokoll ist laut bisheriger Arbeiten mit einer großen Bandbreite an Reagenzien, nämlich Detergenzien, chaotropen Verbindungen, Salzen und Lösungsmittel kompatibel (Moggridge et al. 2018; Hughes et al. 2019). Dies zeigt sich auch in mannigfaltigen Anwendungen des SP3 Protokolls (1.3.5.), wobei diverse Lysepuffer verwendet wurden.

Im Experiment habe ich zwei gängige Puffersubstanzen, nämlich TRIS und PBS, verglichen. Beide Puffer enthielten das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 mit einer Konzentration von 1 % (v/v). Dieses ist insbesondere zur Solubilisierung von Membranproteinen und somit zum Aufbrechen der Lipid-Doppelmembran, welche die Zellen umgibt, vonnöten (Lichtenberg et al. 2013). In der Literatur wurde eine Kompatibilität von SP3- zu Detergenzien-Konzentration von bis zu 10 % beschrieben (Hughes et al. 2019). Trotz gleicher Zusammensetzung in Bezug auf das Detergenz ist der TRIS-Puffer dem PBS-Puffer unter gegebenen Versuchsbedingungen mit einer signifikant höhere PULL/PRE-Ratio überlegen. Das Experiment wurde jedoch nicht unter den später im Etablierungsprozess festgelegten SP3-Idealbedingungen durchgeführt. So liegt die Inkubation im Bindungsschritt mit 50 % niedriger als die optimierten 70 % Acetonitril (v/v). Die feinere Aufteilung der Banden beim TRIS-Lysepuffer könnte auf eine gründlichere Lyse hinweisen. Die Lyse beim PBS-Puffer könnte dadurch beeinträchtigt sein, dass das Zellmaterial beim PBS-Puffer eher schleimig und schwierig pipettierbar wird. Die POST/PULL-Fraktionen bleiben sehr ähnlich und unterscheiden sich nicht signifikant. Die Anzahl der Proben könnte zu klein sein, um den Abfall der POST bei mehr Bindung nach Behandlung mit dem überlegenen Lysepuffer zu zeigen. Falls unter beiden Versuchsbedingungen die gleiche Menge an Proteinen initial an die Beads bindet, könnten die Proteine im TRIS-Ansatz besser von den Beads wieder ablösbar sein.

Zellen	Lysepuffer	Quelle
Axone	1 % SDC, 0.1 % SDS und 10 mM DTT in 100 mM TRIS HCl pH 8.5	(Cagnetta et al. 2018)
Escherichia coli	0.8 % NP-40, 50 Ig/ml Lysozym, 250 U/ml Benzonase und 1 mM MgCl ₂ in PBS	(Mateus et al. 2018)
Makrophagen	4 % SDS, 50 mM TEAB pH 8.5 und 10 mM TCEP in 50 mM TEAB pH 8.5	(Nagala et al. 2018)

Oozyten	2 % SDS, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM NaOH und 10 mM DTT in 10 mM HEPES Puffer pH 8.5	(Virant-Klun et al. 2016)
Mamma-CA-Zellen - SK-BR-3 - MDA-MB-231	1 % SDS in 200 mM HEPES pH 8.5	(Tien et al. 2017)
Gefrorene Hefezellen	1 % SDS und 5 mM DTT in 50 mM HEPES pH 8.5	(Hughes et al. 2014)
Drosophila Embryonen	1 % SDS, 10 mM DTT, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA und 10 mM NaOH in 10 mM HEPES pH 8.5	(Hughes et al. 2014)

Abbildung 17: SP3-kompatible Lysepuffer in der Literatur

Beispielhafte Übersicht über SP3-kompatible Lysepuffer und den jeweiligen Anwendungsbereich. Einigen Puffern wurden Protease-Hemmer hinzugefügt, dies wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Insgesamt bleibt die Konzentration des verwendeten Detergens stets im empfohlenen Rahmen von 0-10 % (Hughes et al. 2019). FFPE-Experimente werden an dieser Stelle nicht gezeigt.

4.2. Proteomische Subtypisierung als prognostischer Marker

In dieser Studie wurden 31 FFPE-Gewebeproben Analer Plattenepithelkarzinome proteomisch untersucht. Nach Deparaffinierung der Proben und Proteinextraktion mit einem SDS-haltigen Puffer erfolgte die Aufreinigung und Vorbereitung für die massenspektrometrische Messung mit dem SP3-Verfahren, dessen Etablierung en detail in dieser Arbeit beschrieben ist (3.1.). In Hinblick darauf, dass FFPE-Gewebe lange Zeit als unzugänglich für proteomische Analysen galt (1.4.4.) und SDS-haltigen Puffer ohne vorherige Entfernung inkompatibel mit massenspektrometrischen Analysen sind (1.3.1.), ist es ein großer Erfolg, dass 4882 Proteingruppen und hiervon 2370 mit ≥ 5 charakteristischen Peptiden detektiert werden konnten. Die proteomischen Daten konnten mit Daten aus genetischen Sequenzanalysen, Histopathologie und Patientenüberleben sowie klinisch-pathologischen Faktoren korreliert werden. Die proteomische Klassifikation umfasste sowohl die epithelialen Tumorzellen als auch die Tumormikroumgebung, welche das Wachstum, die Invasion und Immun-Umgehungsmechanismen eines Tumors beeinflusst und aus extrazellulärer Matrix mit Blutgefäßen, Fibroblasten und Immunzellen besteht (Nazemi und Rainero 2020).

Durch Vergleich der Proteome von ASCC-Patienten mit langem (>60 Monate) und kurzem (<60 Monate) krankheitsspezifischen Überleben konnten, basierend auf den signifikantesten gegensätzlich regulierten Proteinen, zwei proteomische ASCC Subtypen definiert werden: Der Epithel-ähnliche und der Mesenchym-ähnliche Subtyp. In der Kohorte zeigt sich nach multidimensionaler Analyse unter Einbeziehung aller prognostischen Faktoren unidimensionaler Analysen nur das proteomische Profil der

Tumoren als valider prognostischer Biomarker (3.2.4.). Die in der Literatur vorgeschlagenen prognostischen Biomarker wie der p53 Mutationsstatus (Lampejo et al. 2010), der HPV-Status (Urbute et al. 2020) und die proteomische Einteilung in einen Zona-squamosa und einen Zona-transitionalis Typ (Herfs et al. 2017) zeigen in der Kohorte keine Aussagekraft für das Überleben der Tumorpatienten.

Wie erläutert und in Kaplan-Meier-Kurven (*Abbildung 15*) eindrücklich sichtbar, geht der Mesenchym-ähnliche Subtyp mit einem deutlich aggressiveren klinischen Verlauf einher als der Epithel-ähnliche Subtyp. Dies wird auch durch die hohe Prävalenz des MS-Subtyps unter den bei Salvage-Operationen gewonnenen Proben in der Kohorte deutlich: 80 % dieser Tumoren ließen sich dem Mesenchym-ähnlichen Subtyp zuordnen. Salvage-Operationen gelten als Goldstandard bei Versagen der Erstlinientherapie und Remission, das 5-Jahres Überleben Operation liegt aber trotz hoher Invasivität bei unter <50 % (Hagemans et al. 2018). Auch das proteomische Profil des Mesenchym-ähnlichen Subtyps hat pro-tumorale Eigenschaften:

Der MS-Subtyp zeigt ein erhöhtes Maß an desmoplastischem Stroma, bestehend aus diversen Stromazellen wie tumorassoziierten Fibroblasten. Die tumorumgebende extrazelluläre Matrix zeigt ein hohes Expressionsniveau matrizellulärer Proteine wie Periostin und Tenascin C, einigen Kollagenen und TGFB-1 (3.2.4.). Die Interaktion von Krebs- und Stromazellen gilt als essentiell für das lokale Überleben und Wachstum von Tumorzellen und deren Fähigkeit zur Metastasierung (Malanchi et al. 2011; Oskarsson und Massagué 2012; Wang und Ouyang 2012; González-González und Alonso 2018). Die vom TGF β -Signalweg regulierten Proteine Periostin (POSTN) und Tenascin C (TNC) sind im MS-Subtyp signifikant hochreguliert (Caja et al. 2018) (*Abbildung 13*). Für beide Proteine wird eine negativ prognostische Rolle bei verschiedenen Tumortypen beschrieben (Soltermann et al. 2008; Ryner et al. 2015; Ni et al. 2017; Sundquist et al. 2017). Konkret bindet Periostin Integrine, nämlich transmembranöse Proteine, die für Zelladhäsion und Kommunikation zwischen Tumorzellen und extrazellulärer Matrix zuständig sind (Evans und Calderwood 2007). Integrin-vermittelt kann Periostin mittels Membran-Tyrosinkinasenaktivierung auch intrazelluläre Signalwege wie AKT aktivieren, wodurch beispielsweise das Überleben der Tumorzellen mittels einer Unterdrückung der Apoptose unterstützt wird (Bao et al. 2004). Zudem schafft Periostin mit Vermittlung von Angiogenese, Invasion, Metastasierung und epithelial-mesenchymaler Transition eine supportive

Mikroumgebung für den Tumor (Erkan et al. 2007; Hu et al. 2017). Tenascin C interagiert mit Periostin (Kii et al. 2010; Ni et al. 2017; Kudo und Kii 2018) und hat ähnliche Effekte. In der Literatur zeigen Tumoren mit Periostin- und Tenascin C-reichem Stroma unter hypoxischen und nährstoffarmen Bedingungen sowie unter Chemotherapie ein fortlaufendes Wachstum (Erkan et al. 2007; Ryner et al. 2015).

Die beobachtete Herunterregulation von TP53BP im MS-Subtyp scheint synergistische Effekte mit der Hochregulierung von Periostin und Tenascin C zu haben: Durch einen Mangel an TP53BP kann einerseits das p53 vermittelte Management von DNA-Schäden gestört sein, was sich tumorsupportiv beispielsweise im Ausbleiben der Apoptose äußern kann (Cuella-Martin et al. 2016). Andererseits konnte eine durch TP53BP-Verlust vermittelte Chemoresistenz, insbesondere gegen 5-FU, sowie Verringerung des krankheitsspezifischen Überlebens beobachtet werden (Li et al. 2013; Yao et al. 2017b).

Daneben sind die epithelialen Transkriptionsfaktoren p63 und IRF6 im MS-Subtyp herunterreguliert. Beide sind essentiell für die Entwicklung von Keratinozyten und demnach Plattenepithelien (Restivo et al. 2011; Bergholz und Xiao 2012). P63 wirkt proliferationsunterstützend auf die Basalmembran von Plattenepithelien und ist signifikant für eine intakte Zell-Adhäsion (Mills et al. 1999; Yang et al. 1999). Das Protein ist zwar kein klassischer Tumorsuppressor wie das verwandte p53, ein Expressionsverlust steht aber im Verdacht, in fortgeschrittenen Tumoren zur Metastasierung und Tumorprogression beizutragen (Urist et al. 2002; Melino 2011). Dies konnte *in vitro* anhand von p63-loss-of-function plattenepithelialen Zelllinien untermauert werden. Hierbei zeigte sich interessanterweise auch eine mit dem p63-Verlust vergesellschaftete Hochregulierung von Periostin (Barbieri et al. 2006). IRF6 reguliert den Wechsel vom Proliferationsstadium zum differenzierten Stadium. Ein Mangel könnte somit mit einer Dedifferenzierung einhergehen (Richardson et al. 2006; Rotondo et al. 2016). P63 wird von Transkriptionsfaktoren wie Slug und Twist supprimiert (Kang und Massagué 2004), welche den Prozess der Epithelial-mesenchymalen Transition, kurz EMT, steuern. Die EMT ist die Grundlage von einer Metastasierung, weil sie die Invasion der Zellen durch Verlust von Zell-Zell-Interaktionen einleitet (Hanahan und Weinberg 2011). Während weder Slug noch Twist in unserem proteomischen Datenset nachweisbar waren, konnte eine starke Herunterregulierung von LARP7 beobachtet werden, welches Slug und Twist

supprimieren kann (Ji et al. 2014) . Somit könnten sowohl die Herunterregulierung von p63 als auch von LARP7 zur EMT beim Mesenchym-ähnlichen Subtyp beitragen.

Als histopathologische Korrelate der EMT konnten stark erhöhtes Tumor-Budding und Einzelzellinvasion im MS-Subtyp festgestellt werden (Hong et al. 2018a). Der ES-Subtyp zeigte sich histopathologisch gegensätzlich mit einem nicht-dissoziierten Wachstumsmuster und geringer Tumor Budding-Aktivität sowie beinahe keiner Einzelzellinvasion. Zusammenfassend enthüllt das proteomische Profil des MS-Subtypen plausible malignitäts-steigernde Mechanismen wie die Verringerung von DNA-Reparaturmechanismen, erhöhte Chemoresistenz, Dedifferenzierung sowie eine vermehrte epithelial-mesenchymale Transition inklusive Zellinvasion und Metastasierung. Diese Faktoren können für das schlechte Ansprechen auf Chemotherapien sowie das insgesamt im Vergleich zum ES-Subtypen deutlich verringerte Überleben verantwortlich sein.

Durch ihre retrospektive Natur und die ausbaufähige Fallzahl sind der Aussagekraft der vorgestellten Studie Grenzen gesetzt und eine weitere Untersuchung der prognostischen Qualität der vorgestellten Subtypen des analen Plattenepithelkarzinoms unerlässlich. FFPE-Gewebe stellt durch seine hohe Verfügbarkeit in Gewebebanken insbesondere für seltene Tumoren wie das ASCC eine gute Quelle für Probematerial dar. Dennoch ist durch die Formalin-induzierte Quervernetzung und die partiell lange Lagerung der Gewebeblöcke mit von Frischgewebe abweichendem Outcome sowie Materialverlust zu rechnen (1.4.3., 1.4.5.). Zudem besteht die Kohorte aus einem nicht unerheblichen Anteil an bei Salvage-Operationen gewonnenen Proben von Non-Respondern (48 %), was bei gewöhnlich gutem Ansprechen auf die Radiochemotherapie einem weitaus höheren Anteil als in der Allgemeinpopulation entspricht (James et al. 2013). Ebenso ist der Anteil HPV-positiver Tumoren ($19/31 = 61,3\%$) nicht so hoch, wie die in Realität geschätzten $>80\%$ (Grulich et al. 2012; Raptis et al. 2015).

Insgesamt wäre eine prospektive, verblindete Studie mit erhöhter Fallzahl, unter Einbezug von FFPE- und Fresh-Frozen-Gewebe und einer repräsentativen Zusammensetzung der Tumoren zur weiteren Bestätigung und Verfeinerung der prognostisch relevanten proteomischen Subtypen des ASCC erstrebenswert.

Damit einher geht die Frage nach der klinischen Implementierung der Ergebnisse. In der Literatur konnte beim kolorektalen Adenokarzinom und beim Mamma Karzinom eine durch TP53BP-Verlust vermittelte Chemoresistenz gegenüber 5-Fluorouracil beobachtet werden. Beim Mesenchym-ähnlichen Subtyp ist TP53BP wie erläutert herunterreguliert. Demnach ist eine Resistenz gegen die klassische 5-FU haltige Chemotherapie nach dem Nigro-Schema denkbar (Li et al. 2013; Yao et al. 2017b). Eine prätherapeutische proteomische Klassifizierung könnte schon vor Therapiebeginn die Einleitung einer solchen unwirksamen Chemotherapie verhindern. Hierfür müsste zunächst die 5-FU-Resistenz des Mesenchym-ähnlichen Subtyps in weiteren Studien bestätigt werden. Zudem müssten klare Kriterien zur Zuordnung zu einem der beiden proteomischen Subtypen definiert und im klinischen Alltag implementierbare Techniken zur proteomischen Messung etabliert werden.

5. Ausblick

Durch verbesserte Zugänglichkeit genetischer Sequenzanalysen hat sich die personalisierte Medizin sehr auf die Idee konzentriert, individuelle Therapieentscheidungen auf Basis von Mutationsanalysen treffen zu können. Der Erfolg hierbei war bislang nicht überwältigend, was vor dem Hintergrund, dass selbst Transkriptomanalysen nicht den tatsächlichen Proteinstatus einer Zelle widerspiegeln, nicht überrascht (Nagaraj et al. 2011; Le Tourneau et al. 2015; Liu et al. 2016; Massard et al. 2017; Schram und Hyman 2017). Und obwohl die Onkologie große Fortschritte macht, werden einige Tumorerkrankungen nach wie vor nicht unter Beachtung der Tumorbiologie des Einzelpatienten behandelt:

Das Anale Plattenepithelkarzinom ist ein gutes Beispiel dafür, dass sich seit längerer Zeit keine maßgeblichen Änderungen in Therapie und Zuweisung der Patienten zu einem Therapieschema ergeben haben. So ist das 1974 erstmals publizierte Nigro-Schema mit einer Chemotherapie aus Mitomycin und 5-FU nach wie vor Gold-Standard in der Erstlinientherapie, und zwar für beinahe alle Patienten (Nigro et al. 1974; Leitlinienprogramm Onkologie 2020b). Die bisher vorgeschlagenen molekularen Biomarker wie der HPV/p16-Status oder der *TP53*-Mutationsstatus haben es noch nicht in den klinischen Alltag oder Leitlinien geschafft. In den hier vorgestellten Studien konnten zwei proteomische Subtypen, der ES- und den MS-Subtyp, herausgearbeitet

werden, deren Proteinprofil schon prätherapeutisch als prognostischer Biomarker eingesetzt werden könnte. Auf Basis der gezeigten Daten ist zudem eine Reevaluation des bewährten 5-FU-haltigen Nigro-Schema für Tumoren des Mesenchym-ähnlichen-Subtypen denkbar.

Die Erfassung von Proteinen als ubiquitäre, polymorphe und zeitlich instabile Moleküle ist ein komplexes Unterfangen. Glücklicherweise haben sich in der Massenspektrometrie in den letzten Jahrzehnten bahnbrechende Entwicklungen vollzogen (Aebersold und Mann 2016). Gleichzeitig werden die Präparationsverfahren für MS-Messungen immer schneller, genauer und günstiger. Das SP3-Verfahren ist ein ökonomisches Präparationsverfahren, das zeitgemäß automatisiert und skaliert werden kann (Hughes et al. 2019; Doellinger et al. 2020). Ein weiterer Ausbau massenspektrometrischer Infrastruktur im klinischen Umfeld sowie eine zunehmende Implementierung proteomischer Daten in klinische Entscheidungsprozesse sind wünschenswert und zeichnen sich bereits ab.

Zusätzlich zu genetischen und transkriptomischen Untersuchungen ist die quantitative Proteomik ein essenzieller Baustein zum Verständnis von tumoraler Pathophysiologie, interindividuellen Tumorprofilen sowie der Wirksamkeit gezielter oder ungezielter Therapien (Doll et al. 2019). Gerade im Bereich der personalisierten Medizin stellt die quantitative Proteomik mit ihrer offenen Fragestellung eine große Ressource für neue Biomarker dar. Eine weitere Zuwendung zu proteomischen Verfahren ist in der kliniknahen Forschung unerlässlich.

6. Literaturverzeichnis

- Aebersold, Ruedi; Mann, Matthias (2003): Mass spectrometry-based proteomics. In: *Nature* 422, 198 EP -. DOI: 10.1038/nature01511.
- Aebersold, Ruedi; Mann, Matthias (2016): Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. In: *Nature* 537 (7620), S. 347–355. DOI: 10.1038/nature19949.
- Aguiar, Pedro N.; Santoro, Ilka Lopes; Tadokoro, Hakaru; Lima Lopes, Gilberto de; Filardi, Bruno Andraus; Oliveira, Pedro et al. (2016): The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. In: *Immunotherapy* 8 (4), S. 479–488. DOI: 10.2217/imt-2015-0002.
- Ahram, Mamoun; Flaig, Michael J.; Gillespie, John W.; Duray, Paul H.; Linehan, W. Marston; Ornstein, David K. et al. (2003): Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications. In: *Proteomics* 3 (4), S. 413–421. DOI: 10.1002/pmic.200390056.
- Alsaab, Hashem O.; Sau, Samaresh; Alzhrani, Rami; Tatiparti, Katyayani; Bhise, Ketki; Kashaw, Sushil K.; Iyer, Arun K. (2017): PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. In: *Frontiers in pharmacology* 8, S. 561. DOI: 10.3389/fphar.2017.00561.
- Altelaar, A. F. Maarten; Heck, Albert J. R. (2012): Trends in ultrasensitive proteomics. In: *Current opinion in chemical biology* 16 (1-2), S. 206–213. DOI: 10.1016/j.cbpa.2011.12.011.
- Amin, Mahul B.; Greene, Frederick L.; Edge, Stephen B.; Compton, Carolyn C.; Gershenwald, Jeffrey E.; Brookland, Robert K. et al. (2017): The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 67 (2), S. 93–99. DOI: 10.3322/caac.21388.
- Atkinson (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 69 (3), S. 89–95. DOI: 10.1067/mcp.2001.113989.
- Balgley, Brian M.; Guo, Tong; Zhao, Kejia; Fang, Xueping; Tavassoli, Fattaneh A.; Lee, Cheng S. (2009): Evaluation of archival time on shotgun proteomics of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. In: *Journal of proteome research* 8 (2), S. 917–925. DOI: 10.1021/pr800503u.
- Bao, Shideng; Ouyang, Gaoliang; Bai, Xuefang; Huang, Zhi; Ma, Chaoyu; Liu, Ming et al. (2004): Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. In: *Cancer Cell* 5 (4), S. 329–339. DOI: 10.1016/S1535-6108(04)00081-9.
- Barbieri, Christopher E.; Tang, Luo Jia; Brown, Kimberly A.; Pietenpol, Jennifer A. (2006): Loss of p63 leads to increased cell migration and up-regulation of genes involved in invasion and metastasis. In: *Cancer research* 66 (15), S. 7589–7597. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2020.
- Belczacka, Iwona; Latosinska, Agnieszka; Metzger, Jochen; Marx, David; Vlahou, Antonia; Mischak, Harald; Frantzi, Maria (2019): Proteomics biomarkers for solid tumors: Current status and future prospects. In: *Mass spectrometry reviews* 38 (1), S. 49–78. DOI: 10.1002/mas.21572.

- Bennick, A.; Brosstad, F. (1993): A rapid method for selecting specific hybridoma clones using paramagnetic Dynabeads. In: *Scandinavian journal of immunology* 38 (3), S. 212–214. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1993.tb01716.x.
- Bergholz, Johann; Xiao, Zhi-Xiong (2012): Role of p63 in Development, Tumorigenesis and Cancer Progression. In: *Cancer Microenvironment* 5 (3), S. 311–322. DOI: 10.1007/s12307-012-0116-9.
- Bhuva, N. J.; Glynne-Jones, R.; Sonoda, L.; Wong, W. L.; Harrison, M. K. (2012): To PET or not to PET? That is the question. Staging in anal cancer. In: *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 23 (8). DOI: 10.1093/annonc/mdr599.
- Bi, Jianping; Huang, Ai; Liu, Tao; Zhang, Tao; Ma, Hong (2015): Expression of DNA damage checkpoint 53BP1 is correlated with prognosis, cell proliferation and apoptosis in colorectal cancer. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (6), S. 6070–6082.
- Botti, Elisabetta; Spallone, Giulia; Moretti, Francesca; Marinari, Barbara; Pinetti, Valentina; Galanti, Sergio et al. (2011): Developmental factor IRF6 exhibits tumor suppressor activity in squamous cell carcinomas. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33), S. 13710–13715. DOI: 10.1073/pnas.1110931108.
- Buczak, Katarzyna; Ori, Alessandro; Kirkpatrick, Joanna M.; Holzer, Kerstin; Dauch, Daniel; Roessler, Stephanie et al. (2018): Spatial Tissue Proteomics Quantifies Inter- and Intratumor Heterogeneity in Hepatocellular Carcinoma (HCC). In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 17 (4), S. 810–825. DOI: 10.1074/mcp.RA117.000189.
- Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. In: *Analytical biochemistry* 112 (2). DOI: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
- Cacheux, Wulfran; Tsantoulis, Petros; Briaux, Adrien; Vacher, Sophie; Mariani, Pascale; Richard-Molard, Marion et al. (2018): Array comparative genomic hybridization identifies high level of PI3K/Akt/mTOR pathway alterations in anal cancer recurrences. In: *Cancer Medicine* 7 (7), S. 3213–3225. DOI: 10.1002/cam4.1533.
- Cagnetta, Roberta; Frese, Christian K.; Shigeoka, Toshiaki; Krijgsveld, Jeroen; Holt, Christine E. (2018): Rapid Cue-Specific Remodeling of the Nascent Axonal Proteome. In: *Neuron* 99 (1), 29-46.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.06.004.
- Caja, Laia; Dituri, Francesco; Mancarella, Serena; Caballero-Diaz, Daniel; Moustakas, Aristidis; Giannelli, Gianluigi; Fabregat, Isabel (2018): TGF- β and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. In: *International journal of molecular sciences* 19 (5). DOI: 10.3390/ijms19051294.
- Caldarella, Carmelo; Annunziata, Salvatore; Treglia, Giorgio; Sadeghi, Ramin; Ayati, Narjes; Giovanella, Luca (2014): Diagnostic performance of positron emission tomography/computed tomography using fluorine-18 fluorodeoxyglucose in detecting locoregional nodal involvement in patients with anal canal cancer: a systematic review and meta-analysis. In: *TheScientificWorldJournal* 2014, S. 196068. DOI: 10.1155/2014/196068.
- Chevalier, François (2010): Standard Dyes for Total Protein Staining in Gel-Based Proteomic Analysis. In: *Materials (Basel, Switzerland)* 3 (10), S. 4784–4792. DOI: 10.3390/ma3104784.
- Chung, J. H.; Sanford, E.; Johnson, A.; Klempner, S. J.; Schrock, A. B.; Palma, N. A. et al. (2016): Comprehensive genomic profiling of anal squamous cell carcinoma reveals distinct

genomically defined classes. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 27 (7), S. 1336–1341. DOI: 10.1093/annonc/mdw152.

Cox, Jürgen; Mann, Matthias (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. In: *Nature biotechnology* 26 (12), S. 1367–1372. DOI: 10.1038/nbt.1511.

Cuella-Martin, Raquel; Oliveira, Catarina; Lockstone, Helen E.; Snellenberg, Suzanne; Grolmusova, Natalia; Chapman, J. Ross (2016): 53BP1 Integrates DNA Repair and p53-Dependent Cell Fate Decisions via Distinct Mechanisms. In: *Molecular Cell* 64 (1), S. 51–64. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.08.002.

Dagley, Laura F.; Infusini, Giuseppe; Larsen, Rune H.; Sandow, Jarrod J.; Webb, Andrew I. (2019): Universal Solid-Phase Protein Preparation (USP3) for Bottom-up and Top-down Proteomics. In: *Journal of proteome research* 18 (7), S. 2915–2924. DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00217.

Daling, J. R.; Madeleine, M. M.; Johnson, L. G.; Schwartz, S. M.; Shera, K. A.; Wurscher, M. A. et al. (2004): Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer. In: *Cancer* 101 (2). DOI: 10.1002/cncr.20365.

Das, Prajnan; Crane, Christopher H.; Eng, Cathy; Ajani, Jaffer A. (2008): Prognostic Factors for Squamous Cell Cancer of the Anal Canal. In: *Gastrointestinal Cancer Research : GCR* 2 (1), S. 10–14.

Daud, Adil I.; Wolchok, Jedd D.; Robert, Caroline; Hwu, Wen-Jen; Weber, Jeffrey S.; Ribas, Antoni et al. (2016): Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (34), S. 4102–4109. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.2477.

DeAngelis, M. M.; Wang, D. G.; Hawkins, T. L. (1995): Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. In: *Nucleic acids research* 23 (22), S. 4742–4743. DOI: 10.1093/nar/23.22.4742.

Deggerdal, A.; Larsen, F. (1997): Rapid isolation of PCR-ready DNA from blood, bone marrow and cultured cells, based on paramagnetic beads. In: *BioTechniques* 22 (3), S. 554–557. DOI: 10.2144/97223pf02.

Deutsche AIDS-Gesellschaft e.V.; Österreichische AIDS Gesellschaft (2013): Anale Dysplasien und Analkarzinome bei HIV-Infizierten: Prävention, Diagnostik, Therapie. Seit > 5 Jahren nicht aktualisiert, Leitlinie wird überarbeitet. Online verfügbar unter <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/055-007.html>, zuletzt geprüft am 21.12.2020.

Dingermann, Theo (2012): Individualisierte Medizin: Der Wert von Biomarkern. Online verfügbar unter <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-202012/der-wert-von-biomarkern/>, zuletzt aktualisiert am 14.05.2012, zuletzt geprüft am 21.12.2020.

Doellinger, Joerg; Schneider, Andy; Hoeller, Marcell; Lasch, Peter (2020): Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion (SPEED) - A Universal, Rapid, and Detergent-free Protocol for Proteomics Based on Acid Extraction. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 19 (1), S. 209–222. DOI: 10.1074/mcp.TIR119.001616.

Doll, Sophia; Gnad, Florian; Mann, Matthias (2019): The Case for Proteomics and Phospho-Proteomics in Personalized Cancer Medicine. In: *Proteomics. Clinical applications*, e1800113. DOI: 10.1002/prca.201800113.

- Donczo, B.; Guttman, A. (2018): Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 155, S. 125–134. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.03.065.
- Dukes, Mary J.; Williams, Audra L.; Massey, Corina M.; Wojtkiewicz, Patrick W. (2012): Technical note: Bone DNA extraction and purification using silica-coated paramagnetic beads. In: *American journal of physical anthropology* 148 (3), S. 473–482. DOI: 10.1002/ajpa.22057.
- Duncan C Gilbert; Anthony Williams; Kimberley Allan; Joanna Stokoe; Tim Jackson; Suzanne Linsdall et al. (2013): p16INK4A, p53, EGFR expression and KRAS mutation status in squamous cell cancers of the anus: Correlation with outcomes following chemo-radiotherapy. In: *Radiotherapy and Oncology* 109 (1), S. 146–151. DOI: 10.1016/j.radonc.2013.08.002.
- Erde, Jonathan; Loo, Rachel R. Ogorzalek; Loo, Joseph A. (2014): Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. In: *Journal of proteome research* 13 (4), S. 1885–1895. DOI: 10.1021/pr4010019.
- Erkan, Mert; Kleeff, Jörg; Gorbachevski, Andre; Reiser, Carolin; Mitkus, Tomas; Esposito, Irene et al. (2007): Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. In: *Gastroenterology* 132 (4), S. 1447–1464. DOI: 10.1053/j.gastro.2007.01.031.
- Evans, Evan A.; Calderwood, David A. (2007): Forces and bond dynamics in cell adhesion. In: *Science (New York, N.Y.)* 316 (5828), S. 1148–1153. DOI: 10.1126/science.1137592.
- Fan, Chao; Shi, Zhaomei; Pan, Yiting; Song, Zifeng; Zhang, Wanjun; Zhao, Xinyuan et al. (2014): Dual matrix-based immobilized trypsin for complementary proteolytic digestion and fast proteomics analysis with higher protein sequence coverage. In: *Analytical chemistry* 86 (3), S. 1452–1458. DOI: 10.1021/ac402696b.
- Gambella, Alessandro; Porro, Lucia; Pigozzi, Simona; Fiocca, Roberto; Grillo, Federica; Mastracci, Luca (2017): Section detachment in immunohistochemistry: causes, troubleshooting, and problem-solving. In: *Histochemistry and cell biology* 148 (1), S. 95–101. DOI: 10.1007/s00418-017-1558-4.
- Gemeinsamer Bundesausschuss (2020): Atezolizumab (neues Anwendungsgebiet: Mammakarzinom, triple-negativ, PD-L1-Expression $\geq 1\%$). Beschluss vom 04.02.2020, unbefristet gültig. Online verfügbar unter https://www.g-ba.de/downloads/91-1385-493/2020-04-02_Geltende-Fassung_Atezolizumab_D-470.pdf, zuletzt geprüft am 20.12.2020.
- González-González, Laura; Alonso, Javier (2018): Periostin: A Matricellular Protein With Multiple Functions in Cancer Development and Progression. In: *Frontiers in oncology* 8, S. 225. DOI: 10.3389/fonc.2018.00225.
- Goodman, Jennifer K.; Zampronio, Cleidiane G.; Jones, Alexandra M. E.; Hernandez-Fernaud, Juan R. (2018): Updates of the In-Gel Digestion Method for Protein Analysis by Mass Spectrometry. In: *Proteomics* 18 (23), e1800236. DOI: 10.1002/pmic.201800236.
- Gosens, K. C.; Richel, O.; Prins, J. M. (2017): Human papillomavirus as a cause of anal cancer and the role of screening. In: *Current opinion in infectious diseases* 30 (1). DOI: 10.1097/QCO.0000000000000337.
- Govindan, Ramaswamy; Ding, Li; Griffith, Malachi; Subramanian, Janakiraman; Dees, Nathan D.; Kanchi, Krishna L. et al. (2012): Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. In: *Cell* 150 (6), S. 1121–1134. DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.024.

- Griesser, Eva; Wyatt, Hannah; Have, Sara ten; Stierstorfer, Birgit; Lenter, Martin; Lamond, Angus I. (2020): Quantitative profiling of the human substantia nigra proteome from laser-capture microdissected FFPE tissue. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP*. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001889.
- Grulich, Andrew E.; Poynten, I. Mary; Machalek, Dorothy A.; Jin, Fengyi; Templeton, David J.; Hillman, Richard J. (2012): The epidemiology of anal cancer. In: *Sexual health* 9 (6), S. 504–508. DOI: 10.1071/SH12070.
- Gunderson, Leonard L.; Moughan, Jennifer; Ajani, Jaffer A.; Pedersen, John E.; Winter, Kathryn A.; Benson, Al B. et al. (2013): Anal Carcinoma: Impact of TN Category of Disease on Survival, Disease Relapse, and Colostomy Failure in US Gastrointestinal Intergroup RTOG 98-11 Phase 3 Trial. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 87 (4), S. 638–645. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.07.035.
- Hagemans, J. A. W.; Blinde, S. E.; Nuyttens, J. J.; Morshuis, W. G.; Mureau, M. A. M.; Rothbarth, J. et al. (2018): Salvage Abdominoperineal Resection for Squamous Cell Anal Cancer: A 30-Year Single-Institution Experience. In: *Annals of Surgical Oncology* 25 (7), S. 1970–1979. DOI: 10.1245/s10434-018-6483-9.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hellmann, Matthew D.; Ciuleanu, Tudor-Eliade; Pluzanski, Adam; Lee, Jong Seok; Otterson, Gregory A.; Audigier-Valette, Clarisse et al. (2018): Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. In: *The New England journal of medicine* 378 (22), S. 2093–2104. DOI: 10.1056/NEJMoa1801946.
- Hensel, Manfred; Goetzenich, Armin; Lutz, Thomas; Stoehr, Albrecht; Moll, Arend; Rockstroh, Jürgen et al. (2011): HIV and cancer in Germany. In: *Deutsches Arzteblatt international* 108 (8), S. 117–122. DOI: 10.3238/arztebl.2010.0117.
- Herbst, Roy S.; Baas, Paul; Kim, Dong-Wan; Felip, Enriqueta; Pérez-Gracia, José L.; Han, Ji-Youn et al. (2016): Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. In: *Lancet (London, England)* 387 (10027), S. 1540–1550. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
- Herfs, Michael; Longuespée, Rémi; Quick, Charles M.; Roncarati, Patrick; Suarez-Carmona, Meggy; Hubert, Pascale et al. (2017): Proteomic signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. In: *The Journal of pathology* 241 (4), S. 522–533. DOI: 10.1002/path.4858.
- Herold, Gerd (Hg.) (2016): Innere Medizin 2016. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. S. 501-502. Köln: Selbstverlag.
- Hong, Kyoung-Ok; Oh, Kyu-Young; Shin, Wui-Jung; Yoon, Hye-Jung; Lee, Jae-Il; Hong, Seong-Doo (2018a): Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial-mesenchymal transition process. In: *Human pathology* 80, S. 123–129. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.06.012.
- Hong, Shuhui; Li, Xiaoyan; Zhao, Ying; Yang, Qifeng; Kong, Beihua (2018b): 53BP1 inhibits the migration and regulates the chemotherapy resistance of ovarian cancer cells. In: *Oncology Letters* 15 (6), S. 9917–9922. DOI: 10.3892/ol.2018.8596.

Hood, Brian L.; Conrads, Thomas P.; Veenstra, Timothy D. (2006): Unravelling the proteome of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. In: *Briefings in functional genomics & proteomics* 5 (2), S. 169–175. DOI: 10.1093/bfgp/ell017.

Hu, Wei-Wei; Chen, Po-Chun; Chen, Jun-Ming; Wu, Yue-Ming; Liu, Po-Yi; Lu, Chih-Hao et al. (2017): Periostin promotes epithelial-mesenchymal transition via the MAPK/miR-381 axis in lung cancer. In: *Oncotarget* 8 (37), S. 62248–62260. DOI: 10.18632/oncotarget.19273.

Hughes, Christopher S.; Foehr, Sophia; Garfield, David A.; Furlong, Eileen E.; Steinmetz, Lars M.; Krijgsveld, Jeroen (2014): Ultrasensitive proteome analysis using paramagnetic bead technology. In: *Molecular systems biology* 10, S. 757. DOI: 10.15252/msb.20145625.

Hughes, Christopher S.; McConechy, Melissa K.; Cochrane, Dawn R.; Nazeran, Tayyeb; Karnezis, Anthony N.; Huntsman, David G.; Morin, Gregg B. (2016): Quantitative Profiling of Single Formalin Fixed Tumour Sections: proteomics for translational research. In: *Scientific reports* 6, S. 34949. DOI: 10.1038/srep34949.

Hughes, Christopher S.; Moggridge, Sophie; Müller, Torsten; Sorensen, Poul H.; Morin, Gregg B.; Krijgsveld, Jeroen (2019): Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. In: *Nature protocols* 14 (1), S. 68–85. DOI: 10.1038/s41596-018-0082-x.

Hultman, T.; Ståhl, S.; Hornes, E.; Uhlén, M. (1989): Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. In: *Nucleic acids research* 17 (13), S. 4937–4946. DOI: 10.1093/nar/17.13.4937.

Iglesias-Gato, Diego; Wikström, Pernilla; Tyanova, Stefka; Lavalley, Charlotte; Thysell, Elin; Carlsson, Jessica et al. (2016): The Proteome of Primary Prostate Cancer. In: *European urology* 69 (5), S. 942–952. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.10.053.

Ikeda, K.; Monden, T.; Kanoh, T.; Tsujie, M.; Izawa, H.; Haba, A. et al. (1998): Extraction and analysis of diagnostically useful proteins from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46 (3), S. 397–403. DOI: 10.1177/002215549804600314.

IQTIG (2018): QS-Verfahren Mammachirurgie Qualitätsaspekte der HER2-Bestimmung im Rahmen der externen Qualitätssicherung Infosheet zum Strukturierten Dialog für die Indikatoren 52267 und 52278 (QIDB 2017), S. 12–14. Online verfügbar unter https://iqtig.org/dateien/qs-verfahren/mamma/IQTIG_Mammachirurgie_HER2-Bestimmung_Informationsschreiben-SD_2018-06-20.pdf, zuletzt geprüft am 21.12.2020.

James, Roger D.; Glynne-Jones, Robert; Meadows, Helen M.; Cunningham, David; Myint, Arthur Sun; Saunders, Mark P. et al. (2013): Mitomycin or cisplatin chemoradiation with or without maintenance chemotherapy for treatment of squamous-cell carcinoma of the anus (ACT II): a randomised, phase 3, open-label, 2 × 2 factorial trial. In: *The Lancet. Oncology* 14 (6), S. 516–524. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70086-X.

Jesinghaus, Moritz; Brühl, Frido; Steiger, Katja; Klare, Peter; Reiser, Marianne; Scheiter, Alexander et al. (2019): Cellular Dissociation Grading Based on the Parameters Tumor Budding and Cell Nest Size in Pretherapeutic Biopsy Specimens Allows for Prognostic Patient Stratification in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Independent From Clinical Staging. In: *The American journal of surgical pathology* 43 (5), S. 618–627. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001230.

Ji, Lin; Jayachandran, Gitanjali; Roth, Jack A. (2012): High throughput profiling of serum phosphoproteins/peptides using the SELDI-TOF-MS platform. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 818, S. 199–216. DOI: 10.1007/978-1-61779-418-6_14.

Ji, Xiaodan; Lu, Huasong; Zhou, Qiang; Luo, Kunxin (2014): LARP7 suppresses P-TEFb activity to inhibit breast cancer progression and metastasis. In: *eLife* 3, e02907. DOI: 10.7554/eLife.02907.

Jones, Christopher M.; Goh, Vicky; Sebag-Montefiore, David; Gilbert, Duncan C. (2017): Biomarkers in anal cancer: from biological understanding to stratified treatment. In: *British Journal of Cancer* 116 (2), S. 156–162. DOI: 10.1038/bjc.2016.398.

Kang, Yibin; Massagué, Joan (2004): Epithelial-Mesenchymal Transitions: Twist in Development and Metastasis. In: *Cell* 118 (3), S. 277–279. DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.011.

Kii, Isao; Nishiyama, Takashi; Li, Minqi; Matsumoto, Ken-Ichi; Saito, Mitsuru; Amizuka, Norio; Kudo, Akira (2010): Incorporation of tenascin-C into the extracellular matrix by periostin underlies an extracellular meshwork architecture. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (3), S. 2028–2039. DOI: 10.1074/jbc.M109.051961.

Kim, D. W.; Byer, J.; Kothari, N.; Mahipal, A.; Chang, Y. D.; Kim, R. D. (2017): EGFR Inhibitors in Patients with Advanced Squamous Cell Anal Carcinomas: A Single-Institution Experience. In: *Oncology* 92 (4). DOI: 10.1159/000452766.

Klont, Frank; Bras, Linda; Wolters, Justina C.; Ongay, Sara; Bischoff, Rainer; Halmos, Gyorgy B.; Horvatovich, Péter (2018): Assessment of Sample Preparation Bias in Mass Spectrometry-Based Proteomics. In: *Analytical chemistry* 90 (8), S. 5405–5413. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00600.

Krieg, Rene C.; Paweletz, Cloud P.; Liotta, Lance A.; Petricoin, Emanuel F. (2002): Clinical proteomics for cancer biomarker discovery and therapeutic targeting. In: *Technology in cancer research & treatment* 1 (4), S. 263–272. DOI: 10.1177/153303460200100407.

Kudo, Akira; Kii, Isao (2018): Periostin function in communication with extracellular matrices. In: *Journal of cell communication and signaling* 12 (1), S. 301–308. DOI: 10.1007/s12079-017-0422-6.

Kulak, Nils A.; Pichler, Garwin; Paron, Igor; Nagaraj, Nagarjuna; Mann, Matthias (2014): Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. In: *Nature methods* 11 (3), S. 319–324. DOI: 10.1038/nmeth.2834.

Lampejo, T.; Kavanagh, D.; Clark, J.; Goldin, R.; Osborn, M.; Ziprin, P.; Cleator, S. (2010): Prognostic biomarkers in squamous cell carcinoma of the anus: a systematic review. In: *British Journal of Cancer* 103 (12), S. 1858–1869. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605984.

Lassen, Pernille; Eriksen, Jesper G.; Hamilton-Dutoit, Stephen; Tramm, Trine; Alsner, Jan; Overgaard, Jens (2009): Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (12), S. 1992–1998. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.2853.

Laštovičková, M.; Bobál, P.; Strouhalová, D.; Bobálová, J. (2019): Acetonitrile-assisted enzymatic digestion can facilitate the bottom-up identification of proteins of cancer origin. In: *Analytical biochemistry* 570, S. 1–4. DOI: 10.1016/j.ab.2019.01.004.

Le Tourneau, Christophe; Delord, Jean-Pierre; Gonçalves, Anthony; Gavaille, Céline; Dubot, Coraline; Isambert, Nicolas et al. (2015): Molecularly targeted therapy based on tumour

molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. In: *The Lancet Oncology* 16 (13), S. 1324–1334. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00188-6.

Leitlinienprogramm Onkologie (2018): S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, 203; 229. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_I_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf, zuletzt geprüft am 21.12.2020.

Leitlinienprogramm Onkologie (2020a): Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Februar 2020, 183-186; 231. Online verfügbar unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.4/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.04.pdf, zuletzt geprüft am 21.12.2020.

Leitlinienprogramm Onkologie (2020b): S3-Leitlinie Analkarzinom. Diagnostik, Therapie und Nachsorge von Analkanal und Analrandkarzinomen. Langversion 1.2, Dezember 2020. Unter Mitarbeit von Deutsche Gesellschaft für Koloproktologie e.V. (DGK). Hg. v. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH). Online verfügbar unter https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Analkarzinom/Version_1/LL_Analkarzinom_Langversion_1.2.pdf, zuletzt geprüft am 19.12.2020.

Li, Xiaoyan; Kong, Xiaoli; Kong, Xiangnan; Wang, Yang; Yan, Shi; Yang, Qifeng (2013): 53BP1 sensitizes breast cancer cells to 5-fluorouracil. In: *PloS one* 8 (9), e74928. DOI: 10.1371/journal.pone.0074928.

Lichtenberg, Dov; Ahyayauch, Hasna; Alonso, Alicia; Goñi, Félix M. (2013): Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces. In: *Trends in biochemical sciences* 38 (2), S. 85–93. DOI: 10.1016/j.tibs.2012.11.005.

Liu, X. Shirley; Mardis, Elaine R. (2017): Applications of Immunogenomics to Cancer. In: *Cell* 168 (4), S. 600–612. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.014.

Liu, Yansheng; Beyer, Andreas; Aebersold, Ruedi (2016): On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. In: *Cell* 165 (3), S. 535–550. DOI: 10.1016/j.cell.2016.03.014.

Longuespée, Rémi; Casadonte, Rita; Schwamborn, Kristina; Reuss, David; Kazdal, Daniel; Kriegsmann, Katharina et al. (2018): Proteomics in Pathology. In: *Proteomics* 18 (2). DOI: 10.1002/pmic.201700361.

Lukan, Nadine; Ströbel, Philipp; Willer, Andreas; Kripp, Melanie; Dinter, Dietmar; Mai, Sabine et al. (2009): Cetuximab-based treatment of metastatic anal cancer: correlation of response with KRAS mutational status. In: *Oncology* 77 (5), S. 293–299. DOI: 10.1159/000259615.

Lüllmann-Rauch, Renate; Paulsen, Friedrich (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Lund, V.; Schmid, R.; Rickwood, D.; Hornes, E. (1988): Assessment of methods for covalent binding of nucleic acids to magnetic beads, Dynabeads, and the characteristics of the bound nucleic acids in hybridization reactions. In: *Nucleic acids research* 16 (22), S. 10861–10880. DOI: 10.1093/nar/16.22.10861.

- Lyford-Pike, Sofia; Peng, Shiwen; Young, Geoffrey D.; Taube, Janis M.; Westra, William H.; Akpeng, Belinda et al. (2013): Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. In: *Cancer research* 73 (6), S. 1733–1741. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2384.
- Lynch, Thomas J.; Bell, Daphne W.; Sordella, Raffaella; Gurubhagavatula, Sarada; Okimoto, Ross A.; Brannigan, Brian W. et al. (2004): Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. In: *The New England journal of medicine* 350 (21), S. 2129–2139. DOI: 10.1056/NEJMoa040938.
- Magdeldin, Sameh; Enany, Shymaa; Yoshida, Yutaka; Xu, Bo; Zhang, Ying; Zureena, Zam et al. (2014): Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. In: *Clinical proteomics* 11 (1), S. 16. DOI: 10.1186/1559-0275-11-16.
- Malanchi, Ilaria; Santamaria-Martínez, Albert; Susanto, Evelyn; Peng, Hong; Lehr, Hans-Anton; Delaloye, Jean-Francois; Huelsken, Joerg (2011): Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. In: *Nature* 481 (7379), S. 85–89. DOI: 10.1038/nature10694.
- Mamalis, Andrew; Garcha, Manveer; Jagdeo, Jared (2014): Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. In: *Archives of dermatological research* 306 (6), S. 511–519. DOI: 10.1007/s00403-014-1457-7.
- Mani, Vigneshwaran; Wasalathanthri, Dhanuka P.; Joshi, Amit A.; Kumar, Challa V.; Rusling, James F. (2012): Highly efficient binding of paramagnetic beads bioconjugated with 100,000 or more antibodies to protein-coated surfaces. In: *Analytical chemistry* 84 (23), S. 10485–10491. DOI: 10.1021/ac3028257.
- Manza, Linda L.; Stamer, Sheryl L.; Ham, Amy-Joan L.; Codreanu, Simona G.; Liebler, Daniel C. (2005): Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. In: *Proteomics* 5 (7), S. 1742–1745. DOI: 10.1002/pmic.200401063.
- Massard, Christophe; Michiels, Stefan; Féré, Charles; Le Deley, Marie-Cécile; Lacroix, Ludovic; Hollebecque, Antoine et al. (2017): High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. In: *Cancer discovery* 7 (6), S. 586–595. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-1396.
- Mateus, André; Bobonis, Jacob; Kurzawa, Nils; Stein, Frank; Helm, Dominic; Hevler, Johannes et al. (2018): Thermal proteome profiling in bacteria: probing protein state in vivo. In: *Molecular systems biology* 14 (7), e8242. DOI: 10.15252/msb.20188242.
- Matta, Ajay; Ralhan, Ranju; DeSouza, Leroi V.; Siu, K. W. Michael (2010): Mass spectrometry-based clinical proteomics: head-and-neck cancer biomarkers and drug-targets discovery. In: *Mass spectrometry reviews* 29 (6), S. 945–961. DOI: 10.1002/mas.20296.
- Mazzotta, Marco; Krasniqi, Eriseld; Barchiesi, Giacomo; Pizzuti, Laura; Tomao, Federica; Barba, Maddalena; Vici, Patrizia (2019): Long-Term Safety and Real-World Effectiveness of Trastuzumab in Breast Cancer. In: *Journal of clinical medicine* 8 (2). DOI: 10.3390/jcm8020254.
- Melino, G. (2011): p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. In: *Cell Death Differ* 18 (9), S. 1487–1499. DOI: 10.1038/cdd.2011.81.
- Mellman, Ira; Coukos, George; Dranoff, Glenn (2011): Cancer immunotherapy comes of age. In: *Nature* 480 (7378), S. 480–489. DOI: 10.1038/nature10673.

Meulendijks, D.; Tomaso, N. B.; Dewit, L.; Smits, P. H. M.; Bakker, R.; van Velthuysen, M-L F. et al. (2015): HPV-negative squamous cell carcinoma of the anal canal is unresponsive to standard treatment and frequently carries disruptive mutations in TP53. In: *British Journal of Cancer* 112 (8), S. 1358–1366. DOI: 10.1038/bjc.2015.20.

Mills, A. A.; Zheng, B.; Wang, X. J.; Vogel, H.; Roop, D. R.; Bradley, A. (1999): p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. In: *Nature* 398 (6729), S. 708–713. DOI: 10.1038/19531.

Moggridge, Sophie; Sorensen, Poul H.; Morin, Gregg B.; Hughes, Christopher S. (2018): Extending the Compatibility of the SP3 Paramagnetic Bead Processing Approach for Proteomics. In: *Journal of proteome research* 17 (4), S. 1730–1740. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00913.

Mollo, Maria Rosaria; Antonini, Dario; Mitchell, Karen; Fortugno, Paola; Costanzo, Antonio; Dixon, Jill et al. (2015): p63-dependent and independent mechanisms of nectin-1 and nectin-4 regulation in the epidermis. In: *Experimental Dermatology* 24 (2), S. 114–119. DOI: 10.1111/exd.12593.

Mortz, Ejvind; Krogh, Thomas N.; Vorum, Henrik; Görg, Angelika (2001): Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. In: *Proteomics* 1 (11), S. 1359–1363. DOI: 10.1002/1615-9861(200111)1:11<1359::AID-PROT1359>3.0.CO;2-Q.

Mouw, Kent W.; Cleary, James M.; Reardon, Brendan; Pike, Jonathan; Braunstein, Lior Z.; Kim, Jaegil et al. (2016): Genomic Evolution After Chemoradiotherapy in Anal Squamous Cell Carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (12), S. 3214–3222. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2017.

Munhoz, Rodrigo Ramella; Postow, Michael Andrew (2018): Clinical development of PD-1/PD-L1 in Advanced Melanoma. In: *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* 24 (1), S. 7–14. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000299.

Nagala, Manjula; McKenzie, Emma; Richards, Hannah; Sharma, Ritu; Thomson, Sarah; Mastroeni, Pietro; Crocker, Paul R. (2018): Expression of Siglec-E Alters the Proteome of Lipopolysaccharide (LPS)-Activated Macrophages but Does Not Affect LPS-Driven Cytokine Production or Toll-Like Receptor 4 Endocytosis. In: *Frontiers in Immunology* 8. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01926.

Nagaraj, Nagarjuna; Wisniewski, Jacek R.; Geiger, Tamar; Cox, Juergen; Kircher, Martin; Kelso, Janet et al. (2011): Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. In: *Molecular systems biology* 7, S. 548. DOI: 10.1038/msb.2011.81.

Nazemi, Mona; Rainero, Elena (2020): Cross-Talk Between the Tumor Microenvironment, Extracellular Matrix, and Cell Metabolism in Cancer. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 239. DOI: 10.3389/fonc.2020.00239.

Nel, Andrew J. M.; Garnett, Shaun; Blackburn, Jonathan M.; Soares, Nelson C. (2015): Comparative reevaluation of FASP and enhanced FASP methods by LC-MS/MS. In: *Journal of proteome research* 14 (3), S. 1637–1642. DOI: 10.1021/pr501266c.

Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. In: *Electrophoresis* 9 (6), S. 255–262. DOI: 10.1002/elps.1150090603.

- Ni, Wei-Dong; Yang, Zhao-Ting; Cui, Chun-Ai; Cui, Yan; Fang, Long-Yun; Xuan, Yan-Hua (2017): Tenascin-C is a potential cancer-associated fibroblasts marker and predicts poor prognosis in prostate cancer. In: *Biochemical and biophysical research communications* 486 (3), S. 607–612. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.021.
- Nielsen, A.; Munk, C.; Kjaer, S. K. (2012): Trends in incidence of anal cancer and high-grade anal intraepithelial neoplasia in Denmark, 1978-2008. In: *International journal of cancer* 130 (5). DOI: 10.1002/ijc.26115.
- Nigro, N. D.; Vaitkevicius, V. K.; Considine, B. (1974): Combined therapy for cancer of the anal canal: a preliminary report. In: *Diseases of the colon and rectum* 17 (3), S. 354–356. DOI: 10.1007/bf02586980.
- Oda, Kanae; Matsuoka, Yukiko; Funahashi, Akira; Kitano, Hiroaki (2005): A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. In: *Molecular systems biology* 1, 2005.0010. DOI: 10.1038/msb4100014.
- O'Farrell, P. H. (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 250 (10), S. 4007–4021.
- Ong, Shao-En; Blagoev, Blagoy; Kratchmarova, Irina; Kristensen, Dan Bach; Steen, Hanno; Pandey, Akhilesh; Mann, Matthias (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 1 (5), S. 376–386. DOI: 10.1074/mcp.m200025-mcp200.
- Ono, Yuko; Sato, Hiroko; Miyazaki, Toshiko; Fujiki, Katsuya; Kume, Eisuke; Tanaka, Masaharu (2018): Quality assessment of long-term stored formalin-fixed paraffin embedded tissues for histopathological evaluation. In: *Journal of toxicologic pathology* 31 (1), S. 61–64. DOI: 10.1293/tox.2017-0046.
- Osborne, Marc C.; Maykel, Justin; Johnson, Eric K.; Steele, Scott R. (2014): Anal squamous cell carcinoma: an evolution in disease and management. In: *World journal of gastroenterology* 20 (36), S. 13052–13059. DOI: 10.3748/wjg.v20.i36.13052.
- Oskarsson, Thordur; Massagué, Joan (2012): Extracellular matrix players in metastatic niches. In: *The EMBO journal* 31 (2), S. 254–256. DOI: 10.1038/emboj.2011.469.
- Ostasiewicz, Pawel; Zielinska, Dorota F.; Mann, Matthias; Wiśniewski, Jacek R. (2010): Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. In: *Journal of proteome research* 9 (7), S. 3688–3700. DOI: 10.1021/pr100234w.
- Ott, P. A.; Piha-Paul, S. A.; Munster, P.; Pishvaian, M. J.; van Brummelen, E. M. J.; Cohen, R. B. et al. (2017): Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with recurrent carcinoma of the anal canal. In: *Annals of Oncology* 28 (5), S. 1036–1041. DOI: 10.1093/annonc/mdx029.
- Owen, Daniel R.; Wong, Hui-Li; Bonakdar, Melika; Jones, Martin; Hughes, Christopher S.; Morin, Gregg B. et al. (2018): Molecular characterization of ERBB2-amplified colorectal cancer identifies potential mechanisms of resistance to targeted therapies: a report of two instructive cases. In: *Cold Spring Harbor molecular case studies* 4 (2). DOI: 10.1101/mcs.a002535.
- Palefsky, Joel M.; Giuliano, Anna R.; Goldstone, Stephen; Moreira, Edson D.; Aranda, Carlos; Jessen, Heiko et al. (2011): HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia. In: *The New England journal of medicine* 365 (17), S. 1576–1585. DOI: 10.1056/NEJMoa1010971.

Paliga, A.; Onerheim, R.; Gologan, A.; Chong, G.; Spatz, A.; Niazi, T. et al. (2012): EGFR and K-ras gene mutation status in squamous cell anal carcinoma: a role for concurrent radiation and EGFR inhibitors? In: *British Journal of Cancer* 107 (11), S. 1864–1868. DOI: 10.1038/bjc.2012.479.

Pao, William; Chmielecki, Juliann (2010): Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 10 (11), S. 760–774. DOI: 10.1038/nrc2947.

Pappin, D.J.C.; Hojrup, P.; Bleasby, A. J. (1993): Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. In: *Current Biology* 3 (6), S. 327–332. DOI: 10.1016/0960-9822(93)90195-t.

Parwaiz, I.; MacCabe, T. A.; Thomas, M. G.; Messenger, D. E. (2019): A Systematic Review and Meta-Analysis of Prognostic Biomarkers in Anal Squamous Cell Carcinoma Treated With Primary Chemoradiotherapy. In: *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 31 (12), e1-e13. DOI: 10.1016/j.clon.2019.06.013.

Perkins, David N.; Pappin, Darryl J. C.; Creasy, David M.; Cottrell, John S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. In: *Electrophoresis* 20 (18), S. 3551–3567. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.

Petersen, Wiebke (2019): Biomarker: Basis für die personalisierte Krebsmedizin. Unter Mitarbeit von Dr. med. Albrecht Stenzinger. Online verfügbar unter <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/basis-informationen-krebs-allgemeine-informationen/biomarker-basis-fuer-die-person.html>, zuletzt geprüft am 21.12.2020.

Prasad, V. (2016): Perspective: The precision-oncology illusion. In: *Nature* 537 (7619). DOI: 10.1038/537S63a.

Ralton, Lynda D.; Murray, Graeme I. (2011): The use of formalin fixed wax embedded tissue for proteomic analysis. In: *Journal of clinical pathology* 64 (4), S. 297–302. DOI: 10.1136/jcp.2010.086835.

Raptis, Dimitrios; Schneider, Ignaz; Matzel, Klaus E.; Ott, Oliver; Fietkau, Rainer; Hohenberger, Werner (2015): The differential diagnosis and interdisciplinary treatment of anal carcinoma. In: *Deutsches Arzteblatt international* 112 (14), S. 243–249. DOI: 10.3238/arztebl.2015.0243.

Rassow, Joachim; Hauser, Karin; Netzker, Roland; Deutzmann, Rainer (2012): Biochemie. Mit 67 Tabellen; mit Stoffwechselweg-Animationen. S.: 62-67, 432-470, 511- 523. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://ebooks.thieme.de/9783131253538>.

Reck, Martin; Rodríguez-Abreu, Delvys; Robinson, Andrew G.; Hui, Rina; Csőszi, Tibor; Fülöp, Andrea et al. (2016): Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *The New England journal of medicine* 375 (19), S. 1823–1833. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774.

Restivo, Gaetana; Nguyen, Bach-Cuc; Dziunycz, Piotr; Ristorcelli, Elodie; Ryan, Russell J. H.; Özuysal, Özden Yalçın et al. (2011): IRF6 is a mediator of Notch pro-differentiation and tumour suppressive function in keratinocytes. In: *The EMBO journal* 30 (22), S. 4571–4585. DOI: 10.1038/emboj.2011.325.

- Richardson, Rebecca J.; Dixon, Jill; Malhotra, Saimon; Hardman, Matthew J.; Knowles, Lynnette; Boot-Handford, Ray P. et al. (2006): *Irf6* is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. In: *Nature genetics* 38 (11), S. 1329–1334. DOI: 10.1038/ng1894.
- Rödel, Franz; Wieland, Ulrike; Fraunholz, Ingeborg; Kitz, Julia; Rave-Fränk, Margret; Wolff, Hendrik A. et al. (2015): Human papillomavirus DNA load and p16INK4a expression predict for local control in patients with anal squamous cell carcinoma treated with chemoradiotherapy. In: *International journal of cancer* 136 (2), S. 278–288. DOI: 10.1002/ijc.28979.
- Rogers, Jane E.; Ohinata, Aki; Silva, Ninoska N.; Mehdizadeh, Amir; Eng, Cathy (2016): Epidermal growth factor receptor inhibition in metastatic anal cancer. In: *Anti-cancer drugs* 27 (8), S. 804–808. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000383.
- Rotondo, John Charles; Borghi, Alessandro; Selvatici, Rita; Magri, Eros; Bianchini, Enzo; Montinari, Elena et al. (2016): Hypermethylation-Induced Inactivation of the *IRF6* Gene as a Possible Early Event in Progression of Vulvar Squamous Cell Carcinoma Associated With Lichen Sclerosus. In: *JAMA dermatology* 152 (8), S. 928–933. DOI: 10.1001/jamadermatol.2016.1336.
- Ruelcke, Jayde E.; Loo, Dorothy; Hill, Michelle M. (2016): Reducing the cost of semi-automated in-gel tryptic digestion and GeLC sample preparation for high-throughput proteomics. In: *Journal of proteomics* 149, S. 3–6. DOI: 10.1016/j.jprot.2016.03.025.
- Ryner, Lisa; Guan, Yinghui; Firestein, Ron; Xiao, Yuanyuan; Choi, Younjeong; Rabe, Christina et al. (2015): Upregulation of Periostin and Reactive Stroma Is Associated with Primary Chemoresistance and Predicts Clinical Outcomes in Epithelial Ovarian Cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (13), S. 2941–2951. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3111.
- Saif, Muhammad W.; Kontny, Ewa; Syrigos, Kostas N.; Shahrokni, Armin (2011): The Role of EGFR Inhibitors in the Treatment of Metastatic Anal Canal Carcinoma: A Case Series. In: *Journal of oncology* 2011, S. 125467. DOI: 10.1155/2011/125467.
- Salari, Pooneh; Larijani, Bagher (2017): Ethical Issues Surrounding Personalized Medicine: A Literature Review. In: *Acta Medica Iranica* 55 (3), S. 209–217.
- Schleiden, Sebastian; Klingler, Corinna; Bertram, Teresa; Rogowski, Wolf H.; Marckmann, Georg (2013): What is personalized medicine: sharpening a vague term based on a systematic literature review. In: *BMC Medical Ethics* 14, S. 55. DOI: 10.1186/1472-6939-14-55.
- Schram, Alison M.; Hyman, David M. (2017): Quantifying the Benefits of Genome-Driven Oncology. In: *Cancer discovery* 7 (6), S. 552–554. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0380.
- Sclafani, Francesco; Rao, Sheela (2018): Systemic Therapies for Advanced Squamous Cell Anal Cancer. In: *Current oncology reports* 20 (7), S. 53. DOI: 10.1007/s11912-018-0698-6.
- Serup-Hansen, Eva; Linnemann, Dorte; Skovrider-Ruminski, Wojciech; Høgdall, Estrid; Geertsen, Poul Flemming; Havsteen, Hanne (2014): Human papillomavirus genotyping and p16 expression as prognostic factors for patients with American Joint Committee on Cancer stages I to III carcinoma of the anal canal. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32 (17), S. 1812–1817. DOI: 10.1200/JCO.2013.52.3464.

Shevchenko, Andrej; Tomas, Henrik; Havlis, Jan; Olsen, Jesper V.; Mann, Matthias (2006): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. In: *Nature protocols* 1 (6), S. 2856–2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468.

Shevchenko, Andrej; Wilm, Matthias; Vorm, Ole; Mann, Matthias (1996): Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. In: *Anal. Chem.* 68 (5), S. 850–858. DOI: 10.1021/ac950914h.

Shridhar, Ravi; Shibata, David; Chan, Emily; Thomas, Charles R. (2015): Anal cancer: current standards in care and recent changes in practice. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 65 (2), S. 139–162. DOI: 10.3322/caac.21259.

Sielaff, Malte; Kuharev, Jörg; Bohn, Toszka; Hahlbrock, Jennifer; Bopp, Tobias; Tenzer, Stefan; Distler, Ute (2017): Evaluation of FASP, SP3, and iST Protocols for Proteomic Sample Preparation in the Low Microgram Range. In: *Journal of proteome research* 16 (11), S. 4060–4072. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00433.

Signorelli, Diego; Giannatempo, Patrizia; Grazia, Giulia; Aiello, Marco Maria; Bertolini, Federica; Mirabile, Aurora et al. (2019): Patients Selection for Immunotherapy in Solid Tumors: Overcome the Naïve Vision of a Single Biomarker. In: *BioMed research international* 2019, S. 9056417. DOI: 10.1155/2019/9056417.

Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. In: *Science (New York, N.Y.)* 235 (4785). DOI: 10.1126/science.3798106.

Smaglo, Brandon G.; Tesfaye, Anteneh; Halfdanarson, Thorvardur R.; Meyer, Joshua E.; Wang, Jue; Gatalica, Zoran et al. (2015): Comprehensive multiplatform biomarker analysis of 199 anal squamous cell carcinomas. In: *Oncotarget* 6 (41), S. 43594–43604. DOI: 10.18632/oncotarget.6202.

Smirnov, Artem; Lena, Anna Maria; Cappello, Angela; Panatta, Emanuele; Anemona, Lucia; Bischetti, Simone et al. (2019): ZNF185 is a p63 target gene critical for epidermal differentiation and squamous cell carcinoma development. In: *Oncogene* 38 (10), S. 1625–1638. DOI: 10.1038/s41388-018-0509-4.

Soltermann, Alex; Tischler, Verena; Arbogast, Stefanie; Braun, Julia; Probst-Hensch, Nicole; Weder, Walter et al. (2008): Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (22), S. 7430–7437. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0935.

Soussi, Thierry; Kroemer, Guido (2017): TP53 and 53BP1 Reunited. In: *Trends in cell biology* 27 (5), S. 311–313. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.10.004.

Stella, Giulia M.; Luisetti, Maurizio; Inghilleri, Simona; Cemmi, Francesca; Scabini, Roberta; Zorzetto, Michele; Pozzi, Ernesto (2012): Targeting EGFR in non-small-cell lung cancer: lessons, experiences, strategies. In: *Respiratory medicine* 106 (2), S. 173–183. DOI: 10.1016/j.rmed.2011.10.015.

Stransky, Nicolas; Egloff, Ann Marie; Tward, Aaron D.; Kostic, Aleksandar D.; Cibulskis, Kristian; Sivachenko, Andrey et al. (2011): The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6046), S. 1157–1160. DOI: 10.1126/science.1208130.

- Strimbu, Kyle; Tavel, Jorge A. (2010): What are Biomarkers? In: *Current opinion in HIV and AIDS* 5 (6), S. 463–466. DOI: 10.1097/COH.0b013e32833ed177.
- Sun, Guorui; Dong, Xiaoyuan; Tang, Xiaolong; Qu, Hui; Zhang, Hao; Zhao, Ensheng (2018): The prognostic value of HPV combined p16 status in patients with anal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. In: *Oncotarget* 9 (8), S. 8081–8088. DOI: 10.18632/oncotarget.23545.
- Sundquist, Elias; Kauppila, Joonas H.; Veijola, Johanna; Mroueh, Rayan; Lehenkari, Petri; Laitinen, Saara et al. (2017): Tenascin-C and fibronectin expression divide early stage tongue cancer into low- and high-risk groups. In: *British Journal of Cancer* 116 (5), S. 640–648. DOI: 10.1038/bjc.2016.455.
- Syal, Kirtimaan; Tadala, Raghu (2015): Modifications in trypsin digestion protocol for increasing the efficiency and coverage. In: *Protein and peptide letters* 22 (4), S. 372–378. DOI: 10.2174/0929866522666150327132415.
- Symer, Matthew M.; Yeo, Heather L. (2018): Recent advances in the management of anal cancer. In: *F1000Research* 7. DOI: 10.12688/f1000research.14518.1.
- Tanaka, Koichi; Waki, Hiroaki; Ido, Yutaka; Akita, Satoshi; Yoshida, Yoshikazu; Yoshida, Tamio; Matsuo, T. (1988): Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. In: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2 (8), S. 151–153. DOI: 10.1002/rcm.1290020802.
- Tannock, Ian F.; Hickman, John A. (2016): Limits to Personalized Cancer Medicine. In: *The New England journal of medicine* 375 (13), S. 1289–1294. DOI: 10.1056/NEJMs1607705.
- Tien, Jerry F.; Mazloomian, Alborz; Cheng, S.-W. Grace; Hughes, Christopher S.; Chow, Christalle C.T.; Canapi, Leanna T. et al. (2017): CDK12 regulates alternative last exon mRNA splicing and promotes breast cancer cell invasion. In: *Nucleic acids research* 45 (11), S. 6698–6716. DOI: 10.1093/nar/gkx187.
- Tyanova, Stefka; Albrechtsen, Reidar; Kronqvist, Pauliina; Cox, Juergen; Mann, Matthias; Geiger, Tamar (2016): Proteomic maps of breast cancer subtypes. In: *Nature communications* 7, S. 10259. DOI: 10.1038/ncomms10259.
- Uhlen, M. (1989): Magnetic separation of DNA. In: *Nature* 340 (6236), S. 733–734. DOI: 10.1038/340733a0.
- Urbute, Aivara; Rasmussen, Christina Louise; Belmonte, Federica; Obermueller, Theresa; Prigge, Elena-Sophie; Arbyn, Marc et al. (2020): Prognostic Significance of HPV DNA and p16INK4a in Anal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 29 (4), S. 703–710. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-19-1259.
- Urist, Marshall J.; Di Como, Charles J.; Lu, Ming-Lan; Charytonowicz, Elizabeth; Verbel, David; Crum, Christopher P. et al. (2002): Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. In: *The American journal of pathology* 161 (4), S. 1199–1206. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64396-9.
- van Dyne, Elisabeth A.; Henley, Jane S.; Saraiya, Mona; Thomas, Cheryl C.; Markowitz, Laury E., Benard, Vicky B. (2018): Trends in Human Papillomavirus–Associated Cancers — United States, 1999–2015. In: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 67. DOI: 10.15585/mmwr.mm6733a2.

van Morris, K.; Salem, Mohamed E.; Nimeiri, Halla; Iqbal, Syma; Singh, Preet; Ciombor, Kristen et al. (2017): Nivolumab for previously treated unresectable metastatic anal cancer (NCI9673): a multicentre, single-arm, phase 2 study. In: *The Lancet Oncology* 18 (4), S. 446–453. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30104-3.

Viani, Gustavo A.; Afonso, Sergio L.; Stefano, Eduardo J.; Fendi, Ligia I. de; Soares, Francisco V. (2007): Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. In: *BMC cancer* 7, S. 153. DOI: 10.1186/1471-2407-7-153.

Virant-Klun, Irma; Leicht, Stefan; Hughes, Christopher; Krijgsveld, Jeroen (2016): Identification of Maturation-Specific Proteins by Single-Cell Proteomics of Human Oocytes. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15 (8), S. 2616–2627. DOI: 10.1074/mcp.M115.056887.

Vuyst, Hugo de; Clifford, Gary M.; Nascimento, Maria Claudia; Madeleine, Margaret M.; Franceschi, Silvia (2009): Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. In: *International journal of cancer* 124 (7), S. 1626–1636. DOI: 10.1002/ijc.24116.

Wallis, Christopher J. D.; Lawson, Keith; Butaney, Mohit; Satkunasivam, Raj; Parikh, Jigarkumar; Freedland, Stephen J. et al. (2020): Association between PD-L1 status and immune checkpoint inhibitor response in advanced malignancies: a systematic review and meta-analysis of overall survival data. In: *Japanese journal of clinical oncology*. DOI: 10.1093/jjco/hyaa021.

Walther, Tobias C.; Mann, Matthias (2010): Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. In: *The Journal of cell biology* 190 (4), S. 491–500. DOI: 10.1083/jcb.201004052.

Wang, Zhe; Ouyang, Gaoliang (2012): Periostin: a bridge between cancer stem cells and their metastatic niche. In: *Cell stem cell* 10 (2), S. 111–112. DOI: 10.1016/j.stem.2012.01.002.

WHO (2019): Classification of tumours of the digestive system. 5th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer (World Health Organization Classification of Tumours).

Wilkening, Stefan; Tekkedil, Manu M.; Lin, Gen; Fritsch, Emilie S.; Wei, Wu; Gagneur, Julien et al. (2013): Genotyping 1000 yeast strains by next-generation sequencing. In: *BMC genomics* 14, S. 90. DOI: 10.1186/1471-2164-14-90.

Wilkin, T. J.; Chen, H.; Cespedes, M. S.; Leon-Cruz, J. T.; Godfrey, C.; Chiao, E. Y. et al. (2018): A Randomized, Placebo-Controlled Trial of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine in Human Immunodeficiency Virus-Infected Adults Aged 27 Years or Older: AIDS Clinical Trials Group Protocol A5298. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 67 (9). DOI: 10.1093/cid/ciy274.

Wilkinson, J. R.; Morris, E. J.; Downing, A.; Finan, P. J.; Aravani, A.; Thomas, J. D.; Sebag-Montefiore, D. (2014): The rising incidence of anal cancer in England 1990-2010: a population-based study. In: *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 16 (7). DOI: 10.1111/codi.12553.

Wiśniewski, Jacek R.; Duś, Kamila; Mann, Matthias (2013): Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10 000 proteins. In: *Proteomics. Clinical applications* 7 (3-4), S. 225–233. DOI: 10.1002/prca.201200046.

Wiśniewski, Jacek R.; Nagaraj, Nagarjuna; Zougman, Alexandre; Gnad, Florian; Mann, Matthias (2010): Brain phosphoproteome obtained by a FASP-based method reveals plasma

membrane protein topology. In: *Journal of proteome research* 9 (6), S. 3280–3289. DOI: 10.1021/pr1002214.

Wiśniewski, Jacek R.; Ostasiewicz, Pawel; Mann, Matthias (2011): High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. In: *Journal of proteome research* 10 (7), S. 3040–3049. DOI: 10.1021/pr200019m.

Wiśniewski, Jacek R.; Zougman, Alexandre; Nagaraj, Nagarjuna; Mann, Matthias (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. In: *Nature methods* 6 (5), S. 359–362. DOI: 10.1038/nmeth.1322.

Wolters, Justina C.; Ciapaite, Jolita; van Eunen, Karen; Niezen-Koning, Klary E.; Matton, Alix; Porte, Robert J. et al. (2016): Translational Targeted Proteomics Profiling of Mitochondrial Energy Metabolic Pathways in Mouse and Human Samples. In: *Journal of proteome research* 15 (9), S. 3204–3213. DOI: 10.1021/acs.jproteome.6b00419.

Yang, A.; Schweitzer, R.; Sun, D.; Kaghad, M.; Walker, N.; Bronson, R. T. et al. (1999): p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. In: *Nature* 398 (6729), S. 714–718. DOI: 10.1038/19539.

Yang, Andrew; Jeang, Jessica; Cheng, Kevin; Cheng, Ting; Yang, Benjamin; Wu, T-C; Hung, Chien-Fu (2016): Current state in the development of candidate therapeutic HPV vaccines. In: *Expert review of vaccines* 15 (8), S. 989–1007. DOI: 10.1586/14760584.2016.1157477.

Yao, Jian-Ning; Zhang, Xue-Xiu; Zhou, Hai-Ning; Li, Yan-Le; Xu, Hong-Rui; Wang, Chun-Feng et al. (2017a): Human papillomavirus related anal squamous cell carcinoma survival: a systematic review and meta-analysis. In: *Translational Cancer Research* 6 (3), S. 463–473. DOI: 10.21037/14049.

Yao, Jing; Huang, Ai; Zheng, Xiumei; Liu, Tao; Lin, Zhenyu; Zhang, Sheng et al. (2017b): 53BP1 loss induces chemoresistance of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by inhibiting the ATM-CHK2-P53 pathway. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 143 (3), S. 419–431. DOI: 10.1007/s00432-016-2302-5.

Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (2), S. 127–137. DOI: 10.1038/35052073.

Yeh, Chia-Hao; Chen, Shu-Hui; Li, Ding-Tzai; Lin, Hong-Ping; Huang, Hung-Jen; Chang, Chi-I et al. (2012): Magnetic bead-based hydrophilic interaction liquid chromatography for glycopeptide enrichments. In: *Journal of chromatography. A* 1224, S. 70–78. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.12.057.

Yi, Ming; Jiao, Dechao; Xu, Hanxiao; Liu, Qian; Zhao, Weiheng; Han, Xinwei; Wu, Kongming (2018): Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. In: *Mol Cancer* 17 (1), S. 32. DOI: 10.1186/s12943-018-0864-3.

Yin, Xuefei; Yang Zhang; Shaowen Guo; Hong Jin; Wenhai Wang; Pengyuan Yang (2015): Large scale systematic proteomic quantification from non-metastatic to metastatic colorectal cancer. In: *Sci Rep* 5 (1), S. 1–9. DOI: 10.1038/srep12120.

Ying, Jiang; Aihua Sun; Yang Zhao; Wantao Ying; Huichuan Sun; Xinrong Yang et al. (2019): Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. In: *Nature* 567 (7747), S. 257–261. DOI: 10.1038/s41586-019-0987-8.

Zeng, Yi Y.; Chen, Huang-Juo; Shiau, Kai J.; Hung, Shain-Un; Wang, Yi-Sheng; Wu, Chih-Che (2012): Efficient enrichment of phosphopeptides by magnetic TiO₂-coated carbon-

encapsulated iron nanoparticles. In: *Proteomics* 12 (3), S. 380–390. DOI: 10.1002/pmic.201000726.

Zielinska, Dorota F.; Gnad, Florian; Wiśniewski, Jacek R.; Mann, Matthias (2010): Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. In: *Cell* 141 (5), S. 897–907. DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.012.

7. Abkürzungsverzeichnis

2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
ACN	Acetonitril
AJCC	American Joint Comitee on Cancer
ASCC	anal squamous cell carcinoma
CA	Karzinom
CT	Computertomographie
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EFPE	ethanol fixed paraffin embedded
EGFR	epidermal growth factor receptor
FASP	filter aided sample preparation
FFPE	formalin fixed paraffin embedded
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	human embryonic kidney cells
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
HPF	high power field
HRP	horse reddish peroxidase
IAA	Iodacetamid
IHC	Immunhistochemie
IRF6	interferon regulatory factor 6
LARP7	la-related protein 7
MHC	major histocompatibility complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MS	Mesenchym-ähnlich

m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
NSCLC	non-small-cell lung carcinoma
PAGE	Polyacrylamid Gel
PBS	phosphate bufferede saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	m= messenger
tRNA	t= transfer
Rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate; Deutsch: Natriumdodecylsulfat
SP3	single tube solid phase-enhanced sample preparation
TGFB1	transforming growth factor beta 1
TKI	Tyrosin Kinase Inhibitor
TRIS	Trisaminomethan

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Dr. med. Peer-Hendrik Kuhn, für die stetige Unterstützung und die fachlich und menschlich erstklassige Betreuung bedanken. Für die massenspektrometrischen Messungen gebührt mein Dank Herrn Professor Stefan Lichtenthaler sowie Herrn Dr. Stephan Müller vom Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen. Zudem gilt meine Dankbarkeit meinem Zweitbetreuer Herrn Professor Wilko Weichert sowie meinem Mentor Herrn Professor Marc Schmidt-Supprian, welche mich beide in meinem Forschungsjahr mit wichtigem Feedback zu meinem Projekt unterstützt haben. Für die inspirierende und immer humorvolle Zusammenarbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. Alperen Serdaroglu, Frau Nora Hanane und Frau Dr. Yuxiang Zhou bedanken. Für die großzügige finanzielle Unterstützung der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung und die fachliche Einbettung in die TUM-Graduate-School bin ich sehr dankbar.

Ohne die stetige Unterstützung meines Freundes Jonas und meiner Familie sowie meiner Kolleginnen und Kollegen aus dem Translationalen Medizinprogramm wäre ich nicht so weit gekommen: Herzlichen Dank!

Nettetal, den 11.02.2021

Birte Stroucken