

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun, Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Experimentelle genetische und proteomische Identifikation von
diagnostischen und prognostischen Biomarkern epithelialer
Thymustumoren**

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

vorgelegt von

Nicolas Wortmann

aus

Neumünster

Göttingen 2018

Dekan:

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

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. Philipp Ströbel

II. Berichterstatterin:

PD Dr. Annalen Bleckmann

Datum der mündlichen Prüfung: 12.03.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Experimentelle genetische und proteomische Identifikation von diagnostischen und prognostischen Biomarkern epithelialer Thymustumoren" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 03.03.2019



..... (Nicolas Wortmann)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Thymus	1
1.1.1	Anatomie und Histologie	1
1.1.2	Funktion	1
1.2	Thymusepithel-Tumoren (TET)	2
1.2.1	Typ-A-Thymom	3
1.2.2	Typ-AB-Thymom	3
1.2.3	Typ-B1-Thymom	3
1.2.4	Typ-B2-Thymom	4
1.2.5	Typ-B3-Thymom	4
1.2.6	Thymuskarzinom	5
1.3	Therapie von Thymustumoren	5
1.4	Prognose von Thymustumoren	6
1.5	Experimentelle genetische und proteomische Identifikation von Biomarkern der TET	7
1.5.1	Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarray	7
1.5.2	Massenspektrometrische Proteomanalytik	8
1.5.3	<i>Pathway analysis</i>	9
1.5.4	<i>Tissue Microarray (TMA)</i>	11
1.6	Ziel der Studie	12
2	Material	14
2.1	Elektrische Geräte	14
2.2	Software und Internetadressen	14
2.3	Materialien	15
2.4	Chemikalien/ Reagenzien	15
2.5	Puffer und Medien	16
2.6	Zelllinien	16
2.7	Antikörper	17
3	Methoden	17
3.1	Ethikantrag	17
3.2	Genexpressionsanalyse	18
3.2.1	RNA- Quantifizierung	18
3.2.2	Microarray Datenanalyse	18
3.3	Zellbiologische Methoden	18
3.3.1	Zellkultivierung	18
3.3.2	Zelllyse	19
3.4	Proteinkonzentrationsmessung	19
3.5	Massenspektrometrische Methoden	20
3.5.1	1D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und In-Gel-Verdau	20
3.5.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	20
3.5.3	Massenspektrometrische Analyse	20
3.5.4	Auswertung der massenspektrometrischen Daten	21
3.6	<i>Pathway analysis</i>	21
3.7	<i>Tissue-Microarray (TMA)</i>	21
3.8	Proteinbiochemische Methoden	22
3.8.1	Formalinfixierung und Paraffineinbettung	22
3.8.2	Immunhistochemie	22
3.8.3	Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen	23
3.9	Statistische Überlebenszeitanalyse	24
4	Ergebnisse	25

4.1	Genexpressionsanalyse von Thymusepithel-Tumoren.....	25
4.2	Immunhistochemische Validierung der Genexpressionsdaten.....	29
4.2.1	Tissue-Microarray	29
4.2.2	Überlebenszeitanalyse der eingeschlossenen Patienten nach Diagnose	29
4.3	CD117 (Tyrosinkinase KIT)	31
4.3.1	Immunhistochemische Färbung mit CD117 (Tyrosinkinase KIT)	31
4.3.2	Überlebenszeitanalyse CD117 (KIT).....	33
4.4	Anti-PNMAL1	34
4.4.1	Immunhistochemische Färbung mit Anti-PNMAL1	34
4.4.2	Überlebenszeitanalyse Anti-PNMAL1	36
4.5	Anti-HEPACAM2	38
4.5.1	Immunhistochemische Färbung mit Anti-HEPACAM2	38
4.5.2	Überlebenszeitanalyse mit Anti-HEPACAM2	40
4.6	Massenspektrometrische Proteomanalytik der Zelllinien IU-TAB-1 und T1889	41
4.7	Anti-CRABP2	44
4.7.1	Immunhistochemische Färbung mit Anti-CRABP2	44
4.7.2	Überlebenszeitanalyse mit Anti-CRABP2.....	47
4.8	Anti-ANXA1	48
4.8.1	Immunhistochemische Färbung mit Anti-ANXA1	48
4.8.2	Überlebenszeitanalyse mit Anti-ANXA1	50
4.9	Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) der Zelllinien IU-TAB-1 und T1889.....	51
4.10	MCM7	55
4.10.1	Immunhistochemische Färbung mit MCM7.....	55
4.10.2	Überlebenszeitanalyse MCM7.....	57
5	Diskussion	60
5.1	Genetische Identifikation von Biomarkern epithelialer Thymustumoren	60
5.1.1	Affymetrix GeneChip [®] -Analyse von Thymusepithel-Tumoren	60
5.1.2	Genetische Diagnosemarker PNMAL1 und HEPACAM2	61
5.1.3	Genetische Prognosemarker PNMAL1 und HEPACAM2	64
5.2	Proteomische Identifikation von Biomarkern epithelialer Thymustumoren	65
5.2.1	Proteomische Diagnosemarker CRABP2 und ANXA1	66
5.2.2	Proteomische Prognosemarker CRABP2 und ANXA1	68
5.2.3	Gene Set Enrichment Analysis mit SILAC-Daten der Zelllinien IU-TAB-1 und T1889	69
5.2.3.1	Proteomischer Diagnosemarker MCM7.....	70
5.2.3.2	Proteomischer Prognosemarker MCM7.....	71
5.3	Perspektive	72
6	Zusammenfassung	73
7	Anhang/Ergänzendes Material.....	74
7.1	Proteomanalytik.....	74
8	Literaturverzeichnis	91

Abkürzungsverzeichnis

(-)	negativ
(+)	positiv
°C	Grad Celsius
1D	eindimensional
3D	dreidimensional
A	Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
ANXA1	AnnexinA1
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
Ca	Karzinom, <i>Carcinoma</i>
CA	California
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CRABP2	<i>cellular retinoic acid-binding protein 2</i>
cRNA	<i>complementray ribonucleic acid</i>
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidine
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DFS	<i>disease-free survival</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i>
ES	<i>enrichment score</i>
ESCC	<i>esophageal squamous-cell carcinoma</i>
et al.	<i>et alii, et aliae, et alia</i>
F	Farad
FASP	<i>filter-aided sample preparation</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
g	Erdbeschleunigung
GESA	Gene Set Enrichment Analysis
GIST	Gastrointestinalen Stromatumoren
GO	<i>Gene Ontology</i>
Gy	Gray
HCL	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPACAM2	<i>hepatocytes cell adhesion molecule</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
IAA	<i>indole-3-acetic acid</i>
ITMIG	<i>International Thymic Malignancy Interest Group</i>
k	Kilo
Ki67	Kiel67
l	Liter
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektometrie/Massenspektometrie
LDS	<i>lithium-dodecyl-sulfate</i>

m	milli
m	Meter
M	molar
m/z	Masse/Ladung
MCM7	<i>minichromosome maintenance 7</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIKI	<i>Mitotic Kinetics Regulator</i>
min	Minute
MPI	Max-Planck-Institut
MSigDB	<i>Molecular Signature Database</i>
n	Fallzahl
n	nano
NES	<i>normalized enrichment score</i>
ORC	<i>origin recognition complex</i>
OS	<i>overall survival</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PNMAL1	<i>paraneoplastic ma antigen family like 1</i>
PNS	paraneoplastisches Syndrom
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor
RA	<i>retinoic acid</i>
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s.	siehe
SAMR	<i>significance analysis of microarray in R</i>
sec	Sekunde
SILAC	<i>stable isotop labeling of amino acids in cell culture</i>
T-Lymphozyten	Thymus-Lymphozyten
T-Zellen	Thymus-Zellen
Tab.	Tabelle
TC	<i>thymic carcinoma</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TET	Thymusepithel-Tumor
TMA	<i>tissue microarray</i>
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TZR	Thymus-Zell-Rezeptor
U	<i>Unit/Enzymeinheit</i>
V	Volt
v/v	Volumenprozent
Vers.	Version
vs.	Versus
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ	micro

1 Einleitung

1.1 Der Thymus

1.1.1 Anatomie und Histologie

Der Thymus entwickelt sich aus dem ventralen entodermalen Epithel der linken und rechten dritten Schlundtasche und liegt nach abgeschlossener Embryogenese im vorderen Mediastinum superius dem Pericardium fibrosum von kranial auf. Histologisch wird im Thymus zwischen Rinde und Mark unterschieden. Das Grundgerüst der Rinde besteht aus locker verteilten Thymusepithelzellen, die über Desmosomen untereinander verknüpft sind. Im Zwischenraum befinden sich zahlreiche T-Lymphozyten und Makrophagen sowie dendritische Zellen. Das Mark enthält weniger dicht gepackte ausgereifte T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Charakteristisch für das Mark sind die aus Epithelzellen bestehenden Hassal-Körperchen. Die Rinde ist von einer Bindegewebskapsel umgeben, von der Septen bis zur Mark-Rinden-Grenze ziehen. Hierin befinden sich arterielle und venöse Blutgefäße, über deren Endäste T-Lymphozyten und Antigene in das Thymusgewebe eindringen oder austreten (Bühling et al. 2008; Welsch et al. 2014; Rassow et al. 2016; Schulte et al. 2016).

1.1.2 Funktion

Als primäres lymphatisches Organ ist der Thymus für die Differenzierung von T-Lymphozyten verantwortlich. Über die Blutbahn gelangen Vorläuferzellen der T-Lymphozyten aus dem Knochenmark in die Außenzone der Thymusrinde. Hier findet die Reifung statt, an welcher die Thymusepithelzellen entscheidend beteiligt sind. Diese produzieren zum einen Signalpeptide und Wachstumsfaktoren, was zu einer raschen Vermehrung der Vorläuferzellen führt. Der Kontakt mit Thymusepithelzellen führt zum anderen durch somatische Rekombination zu der Ausprägung von α - und β -Ketten, die gemeinsam einen T-Zell-Rezeptor (TZR) bilden. Simultan kommt es zur Expression der Membranproteine CD4 und CD8. Daraufhin findet in der mittleren Zone der Thymusrinde eine positive Selektion statt. Hierbei wird geprüft, ob der entstandene T-Zell-Rezeptor MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Proteine binden kann. Ansonsten wird die Zelle durch Apoptose eliminiert. Bei der sog. negativen Selektion in der Thymusmedulla werden von medullären Thymusepithelien, Makrophagen und dendritischen Zellen Antigene im MHC-Kontext präsentiert. Bei zu starker Antigenbindung wird die T-Zelle als potentiell autoreaktiv ebenfalls durch Apoptose vernichtet. Nur ca. 2% der unreifen Vorläuferzellen überstehen

diese Selektionsprozesse und werden als reife naive T-Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe (Lymphknoten, MALT, etc.) entlassen. Mit dem Abschluss der Pubertät wird die T-Zell-Produktion größtenteils eingestellt. Das Thymusgewebe atrophiert und wird durch Fettgewebe ersetzt (Altersinvolution). Ein kleiner Thymusrest bleibt bis ins hohe Alter bestehen und sorgt weiterhin für die Differenzierung unreifer T-Zellen (Welsch et al. 2014; Rassow et al. 2016).

1.2 Thymusepithel-Tumoren (TET)

Thymusepithel-Tumoren sind mit einer Inzidenz $1,6/10^6$ /Jahr die häufigsten Tumoren des vorderen Mediastinums des Erwachsenen (Mullen und Richardson 1986; Scorsetti et al. 2016). Sie entwickeln sich aus Thymusepithelzellen und werden histologisch nach Vorgaben der World Health Organization (WHO) klassifiziert. Anhand obligater und fakultativer (engl. *major and minor criteria*) histologischer sowie immunhistochemischer Kriterien unterscheidet man Thymome untereinander (Typ A, AB, B1, B2, B3) und von Thymuskarzinomen (TC) (s. Abb. 1). Ein obligates Kriterium ist in der jeweiligen Subklasse per Definition vorhanden. Ein fakultatives Kriterium ist typisch, aber nicht spezifisch für eine Subklasse. Zuletzt wurde die Klassifikation und Nomenklatur im Jahr 2015 von der WHO überarbeitet und aktualisiert (Marx et al. 2015). Das Staging von Thymustumoren erfolgt durch die Einteilung Stadium I-IV nach Masaoka-Koga (Masaoka et al. 1981; Koga et al. 1994; Marx et al. 2016; Tab. 1) bzw. nach TNM.

Staging nach Masaoka-Koga	
Stadium	Kriterien
I	Makroskopisch und mikroskopisch komplett gekapselter Tumor
IIa	Mikroskopische transkapsuläre Invasion (≤ 3 mm)
IIb	Makroskopische transkapsuläre Invasion (mikroskopisch > 3 mm) ins mediastinale Fettgewebe oder in Thymus; Verwachsung des Tumors mit der Pleura oder dem Perikard
III	Mikroskopisch bestätigte Infiltration in Nachbarorgane (Perikard, große Gefäße, Lunge, mediastinale Pleura, N. phrenicus, N. vagus)
IVa	Pleurale oder perikardiale Metastasierung
IVb	Hämatogene oder lymphogene Metastasierung

Tab. 1
Stadium I-IV
nach Masaoka-
Koga
Modifiziert nach
Marx et al. 2016

1.2.1 Typ-A-Thymom

Makroskopisch sind Typ-A-Thymome meist gut umschrieben und durch eine derbe Kapsel vom anliegenden Gewebe abzugrenzen. Mikroskopisch zeigen sich blande, spindelige Zellen, die häufig wirbelartig oder in Zügen angeordnet sind. Die Zellkerne sind dazu komplementär verändert und weisen kleine Nukleolen auf (s. Abb. 1). Zwischen den Keratin-positiven Thymusepithelzellen dürfen nur vereinzelt unreife T-Zellen auftreten. Mit der immunhistochemischen Färbung TdT können diese detektiert und die Diagnose objektiviert werden. Größere Gruppen (>10%) von T-Zellen sprechen gegen die Diagnose eines Typ-A-Thymoms. Gelegentlich weisen auch die aggressiveren Typ-B3-Thymome und Thymuskarzinome ebenfalls eine zytologisch blande, spindelige Zellmorphologie auf. Thymuskarzinome sind meist CD5(+) oder CD117(+), wohingegen Typ-B3-Thymome Hassal-Körperchen und perivaskuläre Räume aufweisen (Marx et al. 2015; Marx et al. 2016). Bei Abwesenheit dieser histologischen und immunhistochemischen Kriterien ist die Abgrenzung zwischen den klinisch indolenten Typ A und den deutlich aggressiveren Typ B3 Thymomen und Thymuskarzinomen erschwert. Außerdem existieren auch noch sog. atypische Typ-A-Thymome, die möglicherweise ebenfalls einen etwas schlechteren Verlauf als klassische Typ A Thymome nehmen. Diese imponieren meist mit nekrotischen Arealen (Green et al. 2015).

1.2.2 Typ-AB-Thymom

AB-Thymome sind makroskopisch ebenfalls gut vom umliegenden Gewebe abzugrenzen. Auf der Schnittfläche lassen sich lymphozytenarme (Typ A) von lymphozytenreichen (Typ B) Arealen unterscheiden (Marx et al. 2016). Histologisch ist der Typ-A-Anteil mit den Kriterien des Typ-A-Thymoms gleichzusetzen und gilt als lymphozytenarm. Dies gilt nicht für den lymphozytenreichen B-Anteil. Hier sind die Tumorzellen, im Unterschied zu Typ-B-Thymomen, spindelig und weisen kleine Nukleolen auf. Hassal-Körperchen kommen normalerweise nicht vor (Marx et al. 2016) (s. Abb. 1). Immunhistochemisch lassen sich die Epithelzellen außer mit Keratin häufig mit CD20 und die unreifen Lymphozyten mit TdT anfärben. Bei sehr lymphozytenreichen Tumoren kann die Differenzialdiagnose zu B1- und B2-Thymomen erschwert sein (Marx et al. 2015).

1.2.3 Typ-B1-Thymom

Typ-B1-Thymome sind oft große ($\geq 10\text{cm}$) Tumoren, die bindegewebig umkapselt und gut von anliegenden Strukturen abzugrenzen sind. Histologisch sind sie aufgrund der erhaltenen

Mark-Rinden-Struktur und der hohen Dichte an unreifen Lymphozyten dem kindlichen, physiologischen Thymusgewebe am ähnlichsten (s. Abb. 1). Im Unterschied zu diesem grenzen die sogenannten medullären Inseln des Typ-B1-Thymoms häufig an der Kapsel oder an Septen. Zudem überwiegt in Thymomen der kortikale Anteil sehr stark und es fehlen manchmal Hassal-Körperchen. Die Tumorepithelzellen sind polygonal oder dendritisch und bilden keine Cluster (< 3 zusammenhängende Epithelzellen) (Marx et al. 2015). Immunhistochemisch zeigen sich die Epithelzellen CD20(-). Die kortikalen Anteile sind aufgrund der hohen Proliferationsrate TdT(+).

1.2.4 Typ-B2-Thymom

Makroskopisch sind B2-Thymome schlecht von umliegendem Gewebe abzugrenzen. Aufgrund der diskontinuierlichen Kapsel ist der Tumor häufig mit Nachbarstrukturen verwachsen. Wie auch physiologisches Thymusgewebe und B1-Thymome präsentieren sich die Tumoren lymphozytenreich. Charakteristisch ist zudem eine erhöhte Anzahl an polygonalen oder dendritischen Tumorzellen, die in Clustern (> 3 zusammenhängende Epithelzellen) zusammengelagert sind. Die Zellkerne sind rundlich, scharf begrenzt und mit prominenten Nukleoli ausgestattet. Optional treten auch medulläre Inseln, Hassal-Körperchen und perivaskuläre Räume auf. Immunhistochemisch zeigen die Tumorzellen eine Expression von Keratin und die unreifen T-Zellen (Thymozten) TdT und eine hohe Proliferationsrate (ki67). Gelegentlich ist die Abgrenzung zu B3-Thymomen (die auch zusammen mit B2-Thymomen vorkommen können) problematisch. B2-Thymome erscheinen in der HE-Färbung aufgrund der höheren Anzahl T-Zellen eher bläulich, wohingegen B3-Thymome weniger T-Zellen aufweisen und eher „pink“ imponieren (s. Abb. 1) (Marx et al. 2015; Marx et al. 2016).

1.2.5 Typ-B3-Thymom

Auch Typ-B3-Thymome zeigen bei Diagnosestellung schon häufig eine Infiltration von Umgebungsstrukturen und sind selten vollständig umkapselt. Makroskopisch fallen auf der Schnittfläche Einblutungen und nekrotische Areale auf. Histologisch ist die organotypische Mark-Rinden-Struktur verloren. Die Anzahl der polygonalen Tumorepithelzellen überwiegt deutlich zu der Anzahl an unreifen T-Lymphozyten (s. Abb. 1). Die Morphologie der Zellkerne ist mäßig atypisch, gelegentlich finden sich prominente Nukleolen. Typisch sind perivaskuläre Räume, die von palisadenartig angeordneten Epithelzellen umgeben sind. Immunhistochemisch zeigen die Epithelzellen eine Expression von Keratin, die vereinzelt vorkommenden unreifen T-Lymphozyten exprimieren TdT. Differenzialdiagnostisch kann die

prognostisch und therapeutisch relevante Abgrenzung zu Thymuskarzinomen schwierig sein (Marx et al. 2015; Marx et al. 2016).

1.2.6 Thymuskarzinom

Thymuskarzinome zeigen häufig ein invasives, destruktives Wachstum und sind schlecht von Nachbarstrukturen abzugrenzen. Die Schnittfläche ist heterogen und zeigt mitunter zystische Areale, Einblutungen und großflächige nekrotische Areale. Obwohl sie sich von den Thymusepithelzellen ableiten, zeigen sie keine thymusspezifische Morphologie und führen keine Thymopoese durch. Dementsprechend sind T-Zellen nur vereinzelt anzutreffen und zeigen einen reifen Immunphänotyp. Nach der neusten WHO-Klassifikation gibt es 15 verschiedene histologische Subtypen, wovon das Plattenepithelkarzinom mit bis zu 80% die häufigste Entität darstellt (Ströbel et al. 2016). Histologisch zeigen sich polymorphe, polychromatische Zellkerne mit prominenten Nukleolen und atypischen Mitosen (s. Abb. 1). Differenzialdiagnostisch lassen sich die meisten Tumoren mit CD117, CD5 oder GLUT-1 darstellen (Petrini et al. 2010; Song et al. 2012; Hayashi et al. 2013).

Histologie der Thymusepithel-Tumoren

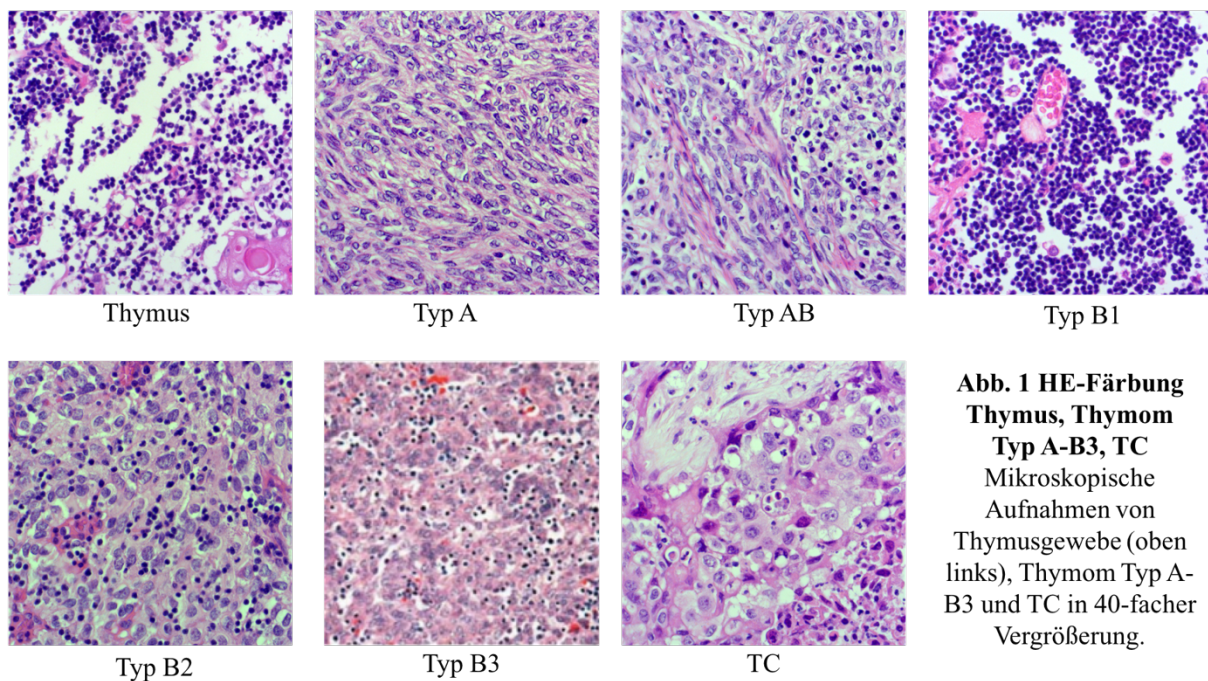


Abb. 1 HE-Färbung Thymus, Thymom Typ A-B3, TC
Mikroskopische Aufnahmen von Thymusgewebe (oben links), Thymom Typ A-B3 und TC in 40-facher Vergrößerung.

1.3 Therapie von Thymustumoren

Die Therapie von Thymustumoren orientiert sich vor allem am Tumorstadium und dem histologischen Subtyp, wobei die wichtigste Unterscheidung hier die zwischen Thymomen

und Thymuskarzinomen darstellt. Allen Thymustumoren und Stadien ist gemeinsam, dass die chirurgische Entfernung des Tumors der einzige kurative Therapieansatz ist und daher oberste Priorität hat. Zusätzlich sollte, wenn möglich, eine Lymphadenektomie im Operationsgebiet erfolgen (Girard et al. 2015), wobei Thymome im Unterschied zu Thymuskarzinomen nur in ca. 5% der Fälle lymphogen metastasieren. Bei postoperativ gesichertem R0-Status ist bei Thymomen im Tumorstadium I und II eine alleinige Nachsorge ohne adjuvante Bestrahlung vertretbar. Bei einem R1-Status wird eine postoperative Radiotherapie empfohlen. Patienten mit einem Thymuskarzinom profitieren hingegen ungeachtet des Stagings und des Resektionsstatus von einer postoperativen Radiatio. Eine postoperative Chemotherapie sollte bei Tumoren im Stadium III in Betracht gezogen werden (Falkson et al. 2009; Girard et al. 2009; Patel et al. 2012; Ruffini et al. 2014; Omasa et al. 2015). Bei einem fortgeschrittenen nicht-resektablen Befund ist der aktuelle Goldstandard die kombinierte Radiochemotherapie. Nach Abschluss sollte der Befund reevaluiert werden (Loehrer et al. 1997; Berruti et al. 1999; Wright et al. 2008; Korst et al. 2014). Überdies hat eine Target-Therapie mit Sunitinib und Sorafenib bei fortgeschrittenen therapierefraktären Thymustumoren positive Ergebnisse erzielt (Ströbel et al. 2010; Marx und Weis 2015; Thomas et al. 2015; Remon et al. 2016).

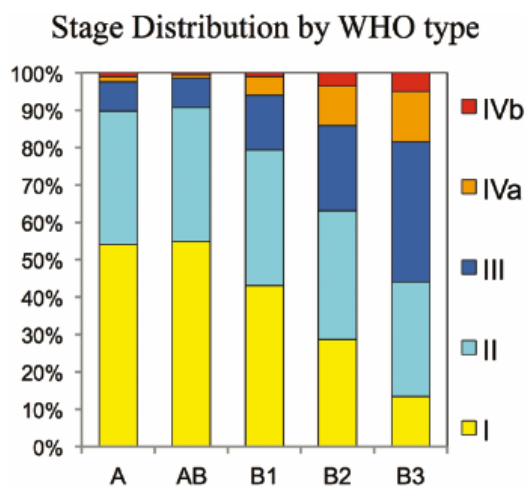


Abb. 2 Korrelation der WHO Klassifikation mit dem Stadium nach Masaoka-Koga

Y-Achse links: Prozentuale Verteilung der Stadien Masaoka-Koga I-IV bei Thymomen, $p = 0,0001$. y-Achse rechts: Stadium nach Masaoka-Koga. x-Achse: Klassifikation nach WHO. Modifiziert

1.4 Prognose von Thymustumoren

Prognostische Faktoren von Thymustumoren werden kontrovers diskutiert. Aufgrund der geringen Prävalenz beinhalten Studien meist eine geringe Patientenzahl, wodurch teils widersprüchliche Ergebnisse präsentiert wurden. Um dem entgegenzuwirken, veröffentlichten Weis et al. im Jahr 2015 eine Multi-Center-Studie mit einer Fallzahl von $n = 4221$ (Weis et al. 2015). Hier konnte der unabhängige prognostische Faktor des Resektionsstatus (Chalabreysse et al. 2002; Sperling et al. 2003; Ströbel et al. 2004b) bestätigt werden. Das *overall survival* (OS)

und *disease-free survival* (DFS) waren signifikant kürzer bei R1-Patienten. Ebenso wurde bestätigt, dass das klinische Stadium nach Masaoka-Koga (Chen et al. 2002; Okumura et al.

2002; Rieker et al. 2002; Ströbel et al. 2004b; Detterbeck 2006) ein unabhängiger prognostischer Faktor ist. Patienten mit Tumoren in Stadium III und IV zeigten eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten in Stadium I und II. Einige Studien bestätigten zusätzlich die Klassifikation nach WHO als unabhängigen, prognostischen Faktor (Chen et al. 2002; Okumura et al. 2002; Kondo und Monden 2003; Nakagawa et al. 2003; Ströbel et al. 2004b). Die Multi-Center-Studie und ein weiteres Review relativierten dies anhand multivariater Verfahren (Detterbeck 2006; Weis et al. 2015). Allerdings weisen bestimmte histologische Subtypen (B2, B3 Thymome) signifikant häufiger ein höheres Stadium nach Masaoka-Koga (s. Abb. 2) und eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit auf, weshalb die histologische Einteilung als univariater Faktor vermutlich relevant ist. Histologisch ist einzig die Unterscheidung von Thymom zu Thymuskarzinom ein unabhängiger prognostischer Faktor (Detterbeck 2006). Das Patientenalter wurde als zusätzlicher prognostischer Faktor identifiziert (Weis et al. 2015). Ein höheres Alter bei Erstdiagnose erwies sich prognostisch als ungünstig.

1.5 Experimentelle genetische und proteomische Identifikation von Biomarkern der TET

1.5.1 Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarray

Mit der DNA-Microarray-Technologie lassen sich tausende Gene eines Gewebes simultan darstellen (Komura et al. 2006). Dies ist die Grundlage für die Durchführung von Expressions- oder Genotypisierungsexperimenten, welche beispielsweise Aufschluss über die molekulare Pathogenese von Tumorerkrankungen geben und dadurch Möglichkeiten für Therapieansätze aufzeigen (Spellman et al. 1998; Park et al. 2001; Yeoh et al. 2002; Huang et al. 2004; Miklos und Maleszka 2004). Das Prinzip der Technologie basiert auf einer Hybridisierungsreaktion, welche durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt wird (Richter et al. 2002). Zunächst wird die RNA des zu untersuchenden Gewebes isoliert, mit einer reversen Transkriptase in Einzelstrang DNA (cDNA) umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte werden enzymatisch fragmentiert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend auf einen Microarray, z. B. Affymetrix *GeneChips*[®], gegeben. Microarrays sind in tausende kleine Felder (24µm x 24µm) unterteilt, welche Sonden (25-60 Oligonukleotide, engl. *probes*) enthalten, die durch Photolithographie synthetisiert werden (Fodor et al. 1991). In jedem Feld sind 1×10^7 Sonden mit selbiger Basenfolge, welche komplementär zu einem Gen sind (Gautier et al. 2004; Stoughton 2005; Bumgarner 2013). Durch Inkubation mit der cDNA findet eine Hybridisierung mit der

komplementären Sonde statt, die durch Fluoreszenz sichtbar gemacht wird. Je häufiger die Sonden eines Feldes gebunden werden, desto stärker ist dessen Fluoreszenz (s. Abb. 3). Die Fluoreszenzintensitäten werden gescannt und in RNA-Expression umgerechnet (Dalma-Weiszhausz et al. 2006). Durch dieses Verfahren lassen sich signifikant veränderte Genexpressionen in Tumoren ausmachen und in Relation setzen.

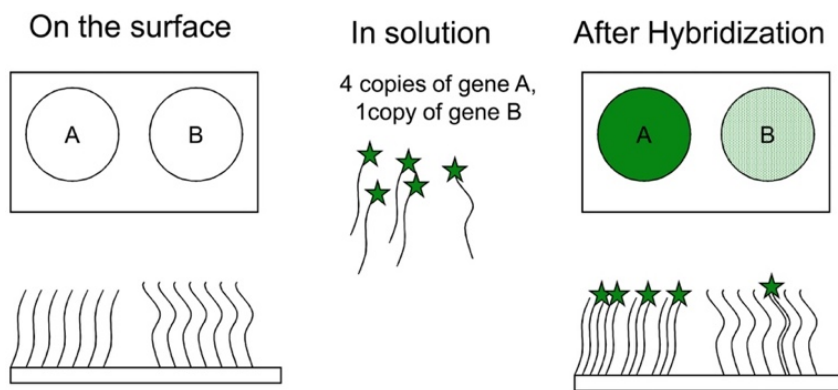


Abb. 3 DNA-Microarray

Die Hybridisierung der cDNA (grüne Sterne) und der Sonden wird durch Fluoreszenz sichtbar gemacht. Je häufiger die Sonden eines Feldes gebunden werden, desto stärker ist dessen Fluoreszenz (dunkelgrün vs. hellgrün). Modifiziert nach Bumgarner, 2013

1.5.2 Massenspektrometrische Proteomanalytik

Als Proteom wird analog zum Genom die Gesamtheit aller exprimierten Proteine einer Zellpopulation bezeichnet. Dieses ist zugleich charakteristisch für eine Zellpopulation, da Proteine in einer bestimmten Menge exprimiert und posttranslational modifiziert werden. Das globale zelluläre Proteom lässt sich mittlerweile quantitativ mittels Massenspektrometrie bestimmen. Hierzu wird beispielsweise das Lysat einer Zelllinie mit eindimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Trypsin verdaut und durch Elektrospray-Ionisation in einen gasförmigen Aggregatzustand gebracht und ionisiert (Fenn et al. 1989). Anschließend wird die Intensität in Abhängigkeit vom Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) bestimmt. Da einige Peptide ein ähnliches Masse-Ladungs-Verhältnis aufweisen, werden sie in einer nachgeschalteten Kollisionskammer fragmentiert. Die Bruchstücke weisen einen spezifischen Gewichtsunterschied auf, aus dem eine Sequenzierung der Aminosäuren erfolgt (Steen und Mann 2004). Durch einen Algorithmus werden die Messdaten ausgewertet und einem Protein zugeordnet (Cox und Mann 2008).

Zum quantitativen Vergleich des Proteoms von zwei Zellpopulationen, ist die Methode der Wahl das *stable isotope labeling of amino acids in cell culture* (SILAC) (Ong et al. 2002; Mann 2006). Das Prinzip beruht auf metabolischer Markierung von Zellen. Die Zellen werden mit essentiellen Aminosäuren (z. B. Arginin und Lysin) kultiviert, die einen isotopbedingten Massenunterschied aufweisen. Als stabile Isotope fungieren Wasserstoff-, Kohlenstoff- oder

Stickstoffatome. Da es sich um essentielle Aminosäuren handelt, werden von den Zellen jeweils nur die markierten Aminosäuren in synthetisierte Proteine eingebaut. Zellkultur A wird beispielsweise mit leichten Aminosäuren kultiviert, wohingegen Zellkultur B mit schweren Aminosäuren kultiviert wird. Zur massenspektrometrischen Auswertung werden die Zellkulturen A und B vermischt. In der Darstellung ergeben sich Peptid-Paare, die sich um die SILAC-Modifizierung unterscheiden. Das Peptid mit der geringeren Masse ist Zellkultur A und das Peptid mit der höheren Masse ist Zellkultur B zuzuordnen. Anhand der massenspektrometrisch dargestellten Peaks (Intensität) lässt sich auf die Menge der Peptide in der Zellkultur schließen. Ein höherer Peak des leichteren Peptids hieße eine größere Menge dessen in Zellkultur A (s. Abb. 4). Da die Peptide bis auf den Massenunterschied chemisch identisch sind, repräsentiert die Ratio der Intensitäten gleichzeitig die Ratio der Proteine von Zellkultur A und B. Der große Vorteil des SILAC-Verfahrens ist, dass die lysierten Zellen vor der Messung vermischt werden und das Proteom im selben massenspektrometrischen Verfahren bestimmt wird. Hierdurch wird die Messung nicht durch unterschiedliche Arbeitsabläufe und Artefakte beeinflusst (Cox und Mann 2011).

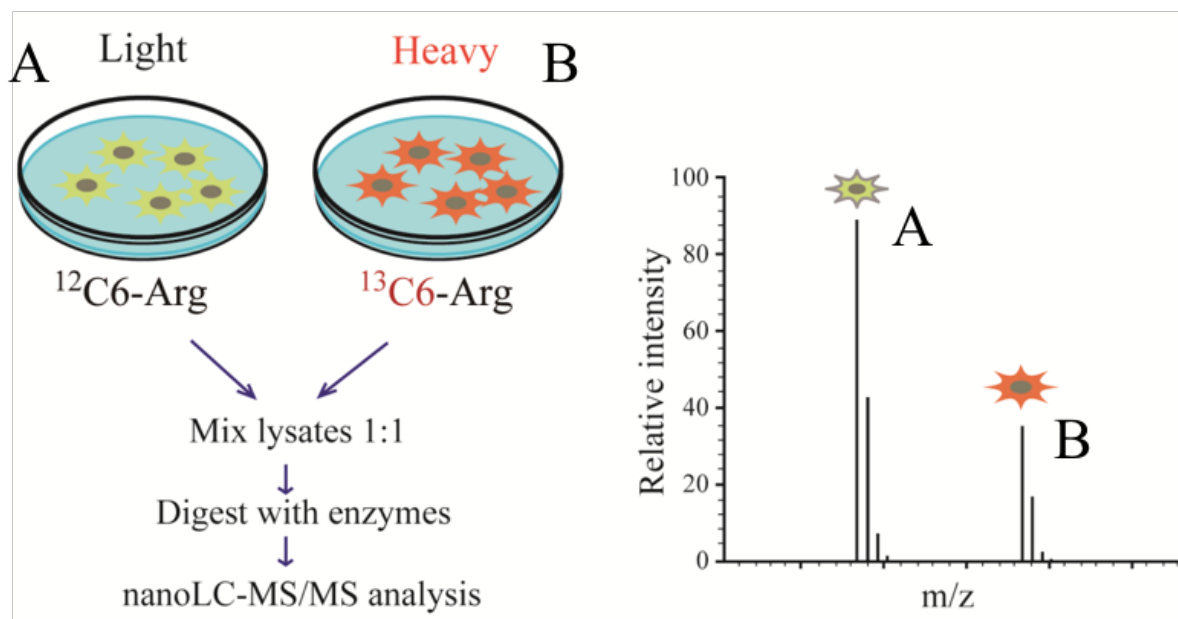


Abb. 4 SILAC-Verfahren

Zellkultivierung mit leichter und schwerer Aminosäure Arginin und anschließender massenspektrometrischer Auswertung. Modifiziert nach Kozuka-Hata et al., 2013

1.5.3 Pathway analysis

Zum Vergleich der Aktivitätsmessung molekularer Profildaten aus verschiedenen Populationen kann mit den Ergebnissen der Massenspektrometrie eine *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) durchgeführt werden (Zhang et al. 2009). Von den massenspektrometrisch

identifizierten und quantifizierten Proteinen wird auf die zugehörigen Gene zurückgeschlossen. Von selbigen wird eine *ranked gene list* erstellt, welche absteigend die Ratio der entsprechenden Proteinpaare aus den Populationen wiedergibt (s. Abb. 5 *phenotype A, B*). Anschließend wird die Liste mit a priori definierten *gene sets* abgeglichen, welche für biochemische *Pathways* kodieren (Mootha et al. 2003). Um die Korrelation der *ranked gene list* und Gengruppen darzustellen, berechnet das Programm einen *enrichment score* (ES) (s.

Abb. 5), nach welchem die *gene sets* sortiert werden. Die kumulative Summe des ES nimmt zu, sobald sich ein Gen aus dem Set in der *ranked gene list* befindet, und ab, wenn sich keines der Gene in selbiger Liste befindet. Angegeben wird der *enrichment score* (ES) bei maximaler Abweichung vom Nullpunkt. Bevor die Listung nach ES stattfinden kann, wird der Wert normalisiert (NES = *normalized enrichment score*), da die *gene sets* unterschiedliche Größen aufweisen. Die Signifikanz des ES wird durch ein Permutationsverfahren geschätzt (Subramanian et al. 2007). GSEA wird angewendet, weil es im Krankheitsprozess häufig von größerer Bedeutung ist, Gengruppen zu identifizieren, die einen Krankheitsprozess begünstigen, als einzelne Gene darzustellen, die aufgrund ihrer Expression auffallen. Daher enthalten die *gene sets* biochemische Signalwege, Koexpressionen oder Komplexe, die evidenzbasiert in Stoffwechsel- oder Tumorerkrankungen verändert exprimiert werden (Subramanian et al. 2005). Für den Abgleich *ranked gene list* vs. *gene set* werden bevorzugt Gengruppen verwendet, die sich am Anfang oder Ende der *ranked gene list* befinden, da die Proteinexpression hier am stärksten zur Vergleichspopulationen divergiert (Subramanian et al. 2005). Mittlerweile stehen tausende *gene sets* zur Verfügung, welche in acht Gruppen (H, C1-C7) unterteilt sind (Subramanian et al. 2005).

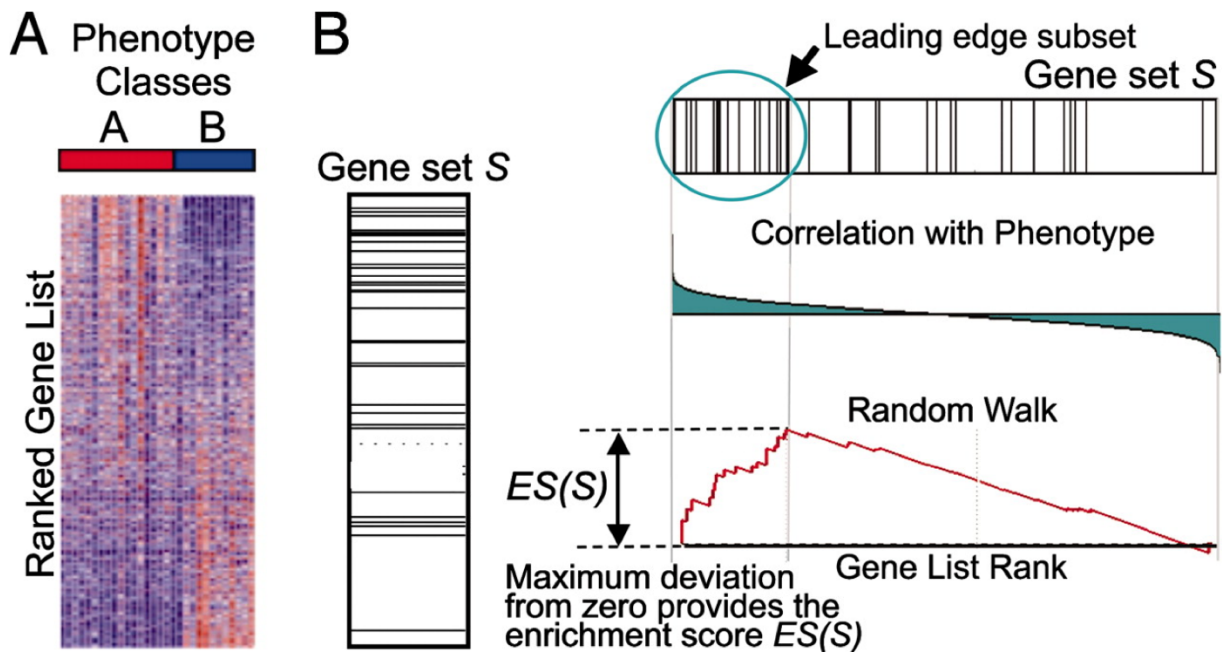


Abb. 5 Gene Set Enrichment Analysis

Vergleich von Phänotyp A und B. Massenspektrometrisch erhobene *ranked gene list* von A und B wird mit a priori definiertem *gene set S* durch GSEA-Software abgeglichen. Ermittelt wird ein *enrichment score* (ES, Maximum der roten Kurve). Modifiziert nach Subramanian et al., 2005

1.5.4 Tissue microarray (TMA)

Zur Darstellung der Proteinexpression in Paraffingewebe ist Immunhistochemie die Methode der Wahl. Bei der indirekten Methode wird im ersten Schritt das zu untersuchende Antigen mit einem spezifischen Antikörper zusammengebracht. Alle Antikörper, die keinen Antigen-Antikörper-Komplex gebildet haben, werden abgespült. Im nächsten Schritt wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet spezifisch den ersten Antikörper. Durch eine Enzym-Substrat-Reaktion wird ein Farbstoff freigesetzt (z. B. 3.3 Diaminobenzidine, kurz DAB), der eine positive Immunhistochemie signalisiert. Um diese Methodik simultan an mehreren Geweben durchzuführen, wurden 1998 erstmals *Tissue microarrays (TMA)* hergestellt (Kononen et al. 1998). Von sogenannten Spenderblöcken wird tumorzellreiches Paraffingewebe durch eine Stanze entnommen und einem Empfängerblock hinzugefügt (s.

Abb. 6). Mittlerweile werden einem Empfängerblock bis zu 1000 Stanzen von jeweils verschiedenen Spenderblöcken zugefügt (Schraml et al. 1999; Kallioniemi et al. 2000). Hierdurch kann die Proteinexpression verschiedener Gewebearten (z. B. Tumoren) immunhistochemisch verglichen werden, ohne dass Artefakte durch individuell veränderte

Arbeitsprozesse entstehen (Diaz et al. 2004; Simon et al. 2010; van Zwieten 2013; Fujita et al. 2015). Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgt mikroskopisch.

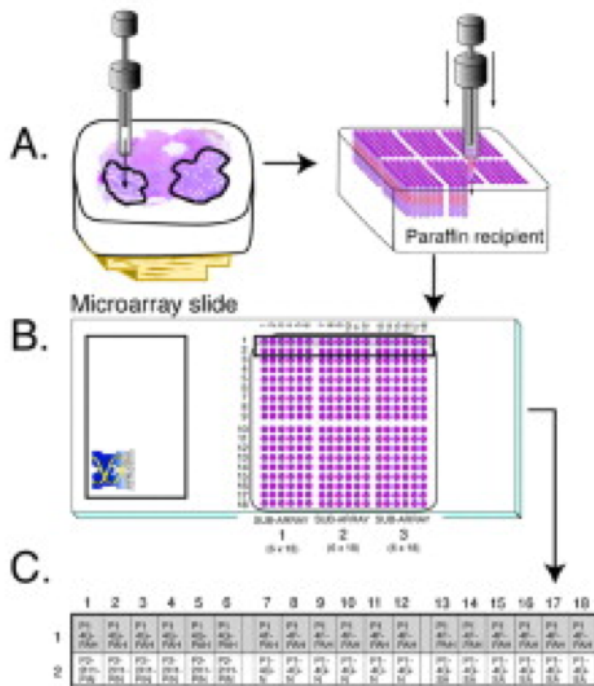


Abb. 6 Arbeitsschritte TMA

A: Entnahme von Gewebszylindern aus tumorzellreichem Areal des Spenderblocks und Anordnung auf dem Empfängerblock. B: Anfertigung eines HE-Schnitts oder einer Immunhistochemie zur mikroskopischen Begutachtung der Gewebszylinder. C: Zuordnung bzw. Rückschluss von Gewebszylinder auf Spenderblock durch anordnungsspezifische Auswertungstabelle. Modifiziert nach Manley et al., 2001

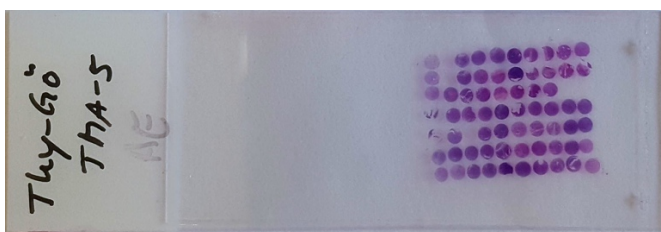


Abb. 7 TMA-Schnitt

Darstellung eines eigenen angefertigten TMA-Schnitts in Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Hergestellt und fotografiert im Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen

1.6 Ziel der Studie

Die Therapie von Thymustumoren basiert entscheidend auf der histologischen Klassifikation nach WHO (s. Kapitel 1.3). Reviews zu dieser histologischen Einteilung belegten allerdings Probleme mit ihrer Reproduzierbarkeit (Detterbeck 2006; Suster und Moran 2008; Marx et al. 2014; Weis et al. 2015). Eingeschlossene Studien zu epithelialen Thymustumoren zeigten untereinander erhebliche Unterschiede in der prozentualen Verteilung der histologischen Subtypen. Typ A variierte von 4-20%, Typ B1 von 6-27%, Typ B2 von 8-38%, Typ B3 von 5-29% und Karzinome von 2-28%. Grund hierfür ist eine ähnliche histologische und immunhistochemische Erscheinung von unterschiedlichen Subtypen, sowie das Vorkommen von mehreren Subtypen in einem Tumor, den *combined thymomas* (Moran und Suster 2000; Ströbel et al. 2004b). Geographische bzw. ethnische Unterschiede werden insbesondere für

Typ-A- und Typ-B2-Thymome diskutiert, sind zum jetzigen Zeitpunkt jedoch als spekulativ zu werten (Weis et al. 2015). Für eine verbesserte Reproduzierbarkeit braucht es weitere obligate und fakultative Kriterien, welche eine sichere histologische Klassifikation erlauben (Marx et al. 2014). Schwierig kann die Unterscheidung von Typ-A- und Typ-AB-Thymomen sein, da beide Tumoren spindelzellartige Tumorzellen und unreife T-Zellen aufweisen können. Weiterhin kann die Unterscheidung von B-Thymomen schwierig sein, da es hierfür keine immunhistochemischen Färbungen gibt (Marx et al. 2015). Eine zentrale diagnostische Problematik ist die korrekte Abgrenzung von Typ A Thymomen und Typ B3 Thymomen und andererseits die Abgrenzung von B3-Thymomen und Thymuskarzinomen (Roden et al. 2015; Marx et al. 2016; Ströbel et al. 2016).

Insbesondere die Abgrenzung zum Karzinom macht einen signifikanten prognostischen Faktor aus (Detterbeck et al. 2011; Weis et al. 2015). Da alle Entitäten mitunter maligne, rasch progrediente Verläufe aufweisen können, ist die Unterscheidung in benigne und maligne Tumoren nach der derzeit gültigen Klassifikation obsolet (Marx et al. 2016). Hingegen zeigten viele Studien, dass die Dignität und Prognose eines Tumors mit dem Expressionsverhalten einzelner Proteine oder *pathways* zusammenhängen können (Nishihara et al. 1992; Fujioka et al. 2009; Giaginis et al. 2010; Campos et al. 2011; Ota et al. 2011; Toyokawa et al. 2011; Sobral-Leite et al. 2015). Für Thymustumoren sind entsprechende Proteine bisher nicht bekannt.

Das Ziel der vorgelegten Studie war zum einen die Etablierung von immunhistochemischen Färbungen, welche diagnosestützend zu werten sind und somit die diagnostische Sicherheit erhöhen. Hierzu wird eine experimentelle Genom- und Proteomanalytik von Thymusepithel-Tumoren durchgeführt. Zum anderen wurde der prognostische Einfluss regulierter Gene und Proteine mittels Kaplan-Meier-Verfahren und eventueller Cox-Regression untersucht.

2 Material

2.1 Elektrische Geräte

Autoklaven	Systemec, Linden
Elektrophoresekammer für 1D-Page	Biorad, München
Feinwaage R160P	Sartorius, Göttingen
GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien
GeneChip® Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Massenspektrometer Q Exactive	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Göttingen
Mikroskop BX46	Olympus, Tokio, Japan
Mikrotom Microm HM430	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts
MTS infinite M200PRO	Tecan, Männedorf
pH-Meter	Schott Instruments, Mainz
Proxeon nano LC	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts
Sicherheitswerkbank HeraSafe Typ H	Heraeus, Hanau
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
TMA Master	3D HISTECH, Budapest
Wasserbad	Heraeus, Hanau
Zellkultur-Inkubator	WTCBinder, Tuttlingen
Zentrifuge Cytospin 4	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts

2.2 Software und Internetadressen

Beschreibung

Excel 2010 und 2015, Microsoft, Redmond, Washington
 GSEA-Software, Broad Institute of MIT, Harvard
<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>
 Gene Set C5 (GO gene sets), molecular signature database (MSigDB)
<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>
<http://www.expasy.org/>

MaxQuant 1.0.12.31, MPI, Martinsried
 Perseus 1.5.2.6., MPI, Martinsried
 Magellan™ - Data Analysis Software, Tecan Group Ltd., Schweiz
www.ncbi.nlm.nih.gov
 Picasa 3.9.141.306, Google inc., Mountain View

Verwendung

Erstellung des Kollektivs, Statistische Auswertung von TMA-Daten
Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

definiertes *gene set* für GSEA

Protein-Datenbank, Information zu Zelllinien
 Auswertung massenspektrometrischer Daten
 Proteinkonzentrationsmessung

PubMed-Literaturrecherche
 Bildbearbeitung

Powerpoint 2015, Microsoft, Redmond, Washington	Erstellung von Abbildungen, Bildbearbeitung
R Version 2.4.0	Statistische Auswertung Genexpressionsanalyse
R affy version 1.6	Statistische Auswertung Genexpressionsanalyse
Significance Analysis of Microarray in R (SAMR)	Signifikanzanalyse der Genexpression
STATISTICA 13, StatSoft, Tulsa, Oklahoma	Erstellung von Abbildungen, Signifikanzberechnungen, Durchführung von Überlebenszeitanalysen
UniProt human Version 28.07.2012 http://www.uniprot.org/	Sequenz-Datenbank Protein-Datenbank
Word 2015, Microsoft, Redmond, Washington	Schriftliche Ausarbeitung der Dissertation

2.3 Materialien

96-Well-Platte	Eppendorf, Hamburg
Akkupipettierhilfe Akujet	Brand, Wertheim
GeneChip® Human Genome U133A Array	Affymetrix, Santa Clara, CA
Objektträger Süssefrost weiß	Süsse Labortechnik, Gudensberg
Pipetten (2.5/20/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten (5/10/25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Verschlussröhrchen (2ml)	Eppendorf, Hamburg
Zellkratzer	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Plastikware	Greiner, Nunc, Falcon
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

2.4 Chemikalien/ Reagenzien

Coomassie Blue R250	Roth, Karlsruhe
DAB (diaminobenzidine)	Dako, Hamburg, Deutschland
Dialysiertes Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, Missouri
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, St. Louis, Missouri
EDTA	Roth, Karlsruhe
EnVision Flex Target Retrieval Solution, pH low	Dako, Hamburg
EnVision Flex+ Visualization System	Dako, Hamburg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
<i>GeneChip® IVT Labelling Kit</i>	Affymetrix, Santa Clara, Kalifornien
Hämatoxylin	Dako, Hamburg
Kaliumchlorid (KCL)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
L-Arginin +10Da, (L-Arg 13C ₆ 15N ₄)	Eurisotop, Saint-Aubin, Frankreich
LDS	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien

L-Lysin +8Da (L-Lys 13C ₆ ,15N ₂)	Eurisotop, Saint-Aubin, Frankreich
Natriumchlorid (NaCl)	Ridel-de Haën, Seelze
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, St. Louis, Missouri
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
NuPAGE Bis-Tris Gel	Invitrogen, Carlsbad, CA
One-Cycle Target Labelling Assay	Affymetrix, Santa Clara, CA
Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma, St. Louis, Missouri
Penicillin	Sigma, St. Louis, Missouri
Protease-Inhibitor-Cocktail (P 2714)	Sigma, St. Louis, Missouri
Protein Assay Reagent A, B und S	BIO-RAD, Hercules, CA
Redox-Substanz	Invitrogen, Carlsbad, CA
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt
Sample Cleanup Module	Affymetrix, Santa Clara, CA
Streptomycin	Sigma, St. Louis, Missouri
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin
SILAC RPMI-1640-Medium	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Gibco, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

2.5 Puffer und Medien

Alle Puffer und Medien wurden in doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) und bei Raumtemperatur gelagert. FCS wurde für 20min bei 56°C hitzeinaktiviert und bei -20°C gelagert.

Einfriermedium	hitzeinaktiviertes FCS, 10% (v/v) DMSO, 4°C
PBS	137,5mM NaCl; 2,7mM KCl; 1,5mM KH ₂ PO ₄ ; 8,6mM Na ₂ HPO ₄
SILAC-RPMI-Medium	RPMI SILAC Medium; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FCS; 50 U/ml Penicillin; 50µg/ml Streptomycin; 2mg/ml Arginin (+10Da oder +0Da); 4mg/ml Lysin (+8Da oder +0Da)
Zell-Lyse-Puffer	50mM Tris/HCl pH8,0; 150mM NaCl; 5mM NaF; 1mM Na ₃ VO ₄ ; 2% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail; 0,5% NP40

2.6 Zelllinien

T1889 (CVCL_D024)

T1889 ist eine humane Zelllinie, die 2008 aus einem gering differenzierten Thymuskarzinom, Masaoka Stadium III eines 56-jährigen Mannes kultiviert und etabliert wurde (Ehemann et al. 2008).

IU-TAB-1 (CVCL_D551)

IU-TAB-1 ist eine humane Zelllinie, die 2012 charakterisiert und etabliert wurde. Das Tumorgewebe zur Kultivierung stammte aus einem Typ AB Thymom (Stadium II, T2N0M0, Myasthenia gravis negativ) eines 53-jährigen Mannes (Gökmen-Polar et al. 2012).

2.7 Antikörper

Mit den Antikörpern wurden die spezifischen Antigene auf den Schnitten der TMA-Blöcke (Kapitel 3.5.3) immunhistochemisch dargestellt.

Antikörper	Spender	Hersteller	Verdünnung	pH-Wert Puffer
CD117 (A4502)	Kaninchen	Dako, Hamburg	1:500	high
Anti-PNMAL1 (HPA012956)	Kaninchen	Atlas Antibodies, Stockholm	1:250	low
Anti-HEPACAM2 (HPA012381)	Kaninchen	Atlas Antibodies, Stockholm	1:100	low
Anti-CRABP2 (HPA004135)	Kaninchen	Atlas Antibodies, Stockholm	1:100	low
ANXA1 (HPA011272)	Kaninchen	Atlas Antibodies, Stockholm	1:50	low
MCM7 (D10A11) XP [®] Rabbit mAb	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:400	low

3 Methoden

3.1 Ethikantrag

Für die Studie wurden Tumorgewebe sowie erkrankungsassoziierte Informationen verwendet. Hierunter sind Informationen wie WHO-Diagnose, Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Diagnose, Anfang und Ende der Nachsorge sowie ein eventuelles Todesereignis zu verstehen. Dies wurde durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt (Antragsnummer: DOK_154_2015) und unter Einhaltung der gesetzlichen Richtlinien durchgeführt.

3.2 Genexpressionsanalyse

Die Durchführung (3.2.1) und Auswertung (3.2.2) der Genexpressionsanalyse fand durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Carsten Sticht der Medizinischen Fakultät Mannheim statt.

3.2.1 RNA- Quantifizierung

Die RNA-Amplifizierung wurde mit Kryogewebe durchgeführt. Die Proben wurden mittels *One-Cycle Target Labelling Assay* (Affymetrix, Santa Clara, CA) biochemisch markiert. Für die Herstellung von Doppelstrang-cDNA wurde 2,5µg RNA verwendet und vorab via *Sample Cleanup Module* (Affymetrix) aufgereinigt. Die Biotinylierung der cRNA wurde mittels *GeneChip® IVT Labelling Kit* (Affymetrix) durchgeführt. Anschließend wurden die Proben für 5min bei 99°C denaturiert und 5µg der fragmentierten cDNA für 16h zur Hybridisierungsreaktion auf den *GeneChip® Human Genome U133A Array* (Affymetrix) gegeben. Zum Waschen und Färben wurden die Proben in die *GeneChip® Fluidics Station 450* (Affymetrix) gegeben. Alle Vorgänge wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt (http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_analysis_technical_manual.pdf). Die Daten wurden durch den *GeneChip® Scanner 3000* (Affymetrix) akquiriert.

3.2.2 Microarray Datenanalyse

Die erhobenen Microarray CEL Daten wurden mit Hilfe der Software *R Version 2.4.0* und dem Add-on *R affy version 1.6* statistisch ausgewertet. Die Signifikanzanalyse wurde mit dem *bioconductor package SAMR (Significance Analysis of Microarray in R)* durchgeführt. Um signifikant regulierte Gene zu identifizieren, wurde ein *cut off* von 5% *false discovery rate* angewendet.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkultivierung

Die in 2.6 beschriebenen Zelllinien wurden jeweils zweimal in RPMI-Medium mit Arginin- und Lysin-Isotopen kultiviert. Einmal wurden die beiden Aminosäuren als leichtes (Arginin +0Da, Lysin +0Da) und einmal als schweres Isotop (Arginin +10Da, Lysin +8Da) hinzugefügt. Hinzugegeben wurden dialysiertes FCS 10% (v/v), 10ml Pyruvat, 50µg/ml Streptomycin und 50U/ml Penicillin. Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden biologische Replikate erzeugt, um Einflüsse des Labeling-Prozesses auf das Protein-

Expressionsprofil auszuschließen. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das regelrechte Wachstum der Zellpopulation wurde mikroskopisch kontrolliert. Abhängig von der zellspezifischen Teilungsrate wurde bei Erreichen einer Zelldichte von 60-80% eine Verdünnung oder Erweiterung auf neue Zellkulturflaschen durchgeführt. Für die Verdünnung wurde das verbrauchte Medium der adhären Zellen verworfen. Anschließend wurde die Zellkulturflasche mit 10ml PBS gespült und die Zellen unter Hinzugabe von 2ml Trypsin nach einer Inkubationszeit von 5min bei 37°C vom Boden abgelöst. Die Zelllösung wurde auf neue Zellkulturflaschen verteilt und frisches Medium wurde hinzugegeben.

3.3.2 Zellyse

Zur Lyse der in 3.3.1 kultivierten Zelllinien wurde diese mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend wurde erneut 10ml PBS hinzugegeben und die Zellen mittels Schaber vom Boden abgetragen. Die Zelllösung wurde für 4min bei 4°C mit 400g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu den Zellen wurde danach erneut 1ml PBS gegeben, die Lösung erneut für 4min bei 4°C mit 400g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Zellen in 50µl Zell-Lyse-Puffer aufgelöst, für 20min auf Eis inkubiert und für 15min bei 4°C bei 20.000g zentrifugiert. Vom Überstand wurde die Proteinkonzentration, wie in 3.2 beschrieben, bestimmt. Anschließend wurde die Proteinmenge der Zell-Lysate im Verhältnis 1:1 vermischt. Dabei wurde jeweils das Lysat der Zelllinie T1889 mit schweren Isotopen und das Lysat der Zelllinie IU-TAB-1 mit leichten Isotopen bzw. als biologisches Replikat das Lysat der Zelllinie T1889 mit leichten Isotopen und das Lysat der Zelllinie IU-TAB-1 mit schweren Isotopen vermischt. Zu dem Proteingemisch wurde anschließend LDS-Lösung 1:4 und Redox-Lösung 1:10 hinzugefügt, daraufhin für 10min bei 72°C inkubiert und anschließend bei -20°C bis zur massenspektrometrischen Auswertung gelagert.

3.4 Proteinkonzentrationsmessung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung wurde von den Zelllysaten je dreimal 2µl Lysat auf eine 96-Well-Platte aufgetragen und mit je 20µl des DC™ Protein Assay Reagent A und S (Verdünnung im Verhältnis 50:1) und anschließend mit je 200µl des DC™ Protein Assay Reagent B versetzt *BIO-RAD* (Hercules, California). Nach einer Inkubationszeit von 10min erfolgte die Proteinkonzentrationsmessung mittels *Magellan™* (Tecan) bei 560nm. Von den drei gemessenen Proteinkonzentrationswerten eines Lysats wurde der Mittelwert bestimmt.

3.5 Massenspektrometrische Methoden

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (3.5.2) und massenspektrometrische Analyse (3.5.3) wurden in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen (Prof. Dr. Henning Urlaub) und dem Universitätsklinikum Frankfurt, Medizinische Klinik II – Hämatologie und Onkologie (Dr. Thomas Oellerich und Prof. Dr. Hubert Serve) durchgeführt.

3.5.1 1D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und In-Gel-Verdau

Zur massenspektrometrischen Analyse wurde das Lysat aus 3.3.2 durch eine eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 4-12%-haltigen Polyacrylamid-Gradienten-Gel (*NuPAGE* Bis-Tris Gel, Invitrogen, Carlsbad, CA) aufgetrennt. Zur Detektion wurde das Gel über Nacht mit dem Farbstoff Coomassie-blau angefärbt. Die gesamte Proteinbande wurde in 23 Teile zerschnitten. Die entstandenen Teile wurden zuerst mit 10mM DTT für 55min bei 56°C und anschließend mit 55mM IAA für 20min bei 26°C behandelt. Zum Proteinverdau wurde das Gemisch über Nacht bei 37°C mit der Protease Trypsin (Promega, Madison, Wisconsin) inkubiert.

3.5.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur weiteren Analytik wurden die trypsinieren Peptide aus 3.5.1 via Flüssigkeitschromatographie aufgetrennt. Diese wurden über eine C18-Vorsäule (1,5cm, 360µm äußerer, 100µm innerer Durchmesser, Reprosil-Pur 120 Å 5µm, C18-AG) mit einer Flussrate von 10µl/min geleitet. Die gebundenen Peptide wurden eluiert und über eine C18-Kapillar-Säule (20cm, 360µm äußerer und 75µm innerer Durchmesser, Reprosil-Pur 120 Å, 5µm C18-AG) mit einer Flussrate von 300nl/min mit einem Gradienten von 5 – 35% Acetonitril in 0,1% Methansäure über 60min mittels des *Proxeon nano LC* (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts) geleitet.

3.5.3 Massenspektrometrische Analyse

Analysiert wurden die Peptide aus 3.5.2 in einem *Q Exactive* Massenspektrometer (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts). Über die Kapillare wurde zur Elektrospray-Ionisierung eine Spannung von 1,8kV gelegt, bei einer Temperatur von 270°C. Die Daten wurden im datenabhängigen Modus akquiriert, d.h. es wurde automatisch zwischen MS- und MS/MS-Modus gewechselt. Zuerst wurde das Masse-Ladungs-Verhältnis der unfraktionierten Peptide bestimmt (MS-Modus) und anschließend die fünfzehn Ionen mit der

höchsten Intensität ausgewählt, welche einer kollisionsinduzierten Dissoziations-Fragmentierung (Energie von 37,5%) zugeführt wurden. Anschließend wurde das Masse-Ladungs-Verhältnis der Fragmente bestimmt (MS/MS-Modus).

3.5.4 Auswertung der massenspektrometrischen Daten

Die massenspektrometrisch erhobenen Daten der Fragmente aus 3.5.3 wurden mit der MaxQuant Software (Version 1.3.0.5) ausgewertet. Als Sequenz-Datenbank wurde UniProt human (Version 27.08.2012) verwendet. Zur Peptididentifikation wurde eine Peptidlänge von maximal zwei ausgelassenen Trypsinspaltungen toleriert und die minimale Länge auf sechs Aminosäuren gesetzt. Variationen durch oxidiertes Methionin wurde als variable Modifikation gesucht. Variationen durch Cystein-Carbamidomethylierung wurde als feste Modifikationen gesucht. Zur Erkennung von SILAC Paaren wurden Modifikationen durch schweres Arginin und Lysin angegeben. Bei Arginin handelte es sich um einen Massenunterschied von 10Da, bei Lysin 8Da. Auf Peptidebene wurde die Falsch-Positiv-Rate auf 1% gesetzt. Auf Proteinebene wurde die Falsch-Erkennungsrate auf 1% gesetzt. Die aus der MaxQuant Software resultierenden Daten wurden weiter mit Perseus (Version 1.5.2.6) ausgewertet. Von den massenspektrometrisch bestimmten Intensitäten der leicht und schwer gelabelten Proteinen wurde die Ratio berechnet und zur Basis zwei logarithmiert. Die Werte der Intensität wurden zur Basis zehn logarithmiert.

3.6 Pathway analysis

Mit den in 3.5.3 und 3.5.4 erhobenen molekularen Profildaten wurde eine *pathway analysis* von Dr. rer. nat. Li Beißbarth des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Hierzu wurde die *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) Software, entwickelt durch das *Broad Institute of MIT and Harvard*, verwendet. Die molekularen Profildaten wurden mit dem *Gene Set C5 (Gene Ontology (GO) gene sets)* der *molecular signature database* (MSigDB) ausgewertet. Der *normalized enrichment score* (NES) wurde auf $\geq 1,6$ oder $\leq -1,6$ und das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ gesetzt.

3.7 Tissue-Microarray (TMA)

Zur Herstellung eines TMA wurden von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebsblöcken Schnitte mit einer Dicke von $2\mu\text{m}$ hergestellt. Anschließend wurde das Gewebe auf einen Objektträger aufgebracht und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Unter

mikroskopischer Aufsicht wurden auf dem Objektträger jeweils zwei Markierungen in Gebieten mit einer hoher Dichte an Tumorzellen gesetzt. Von den ausgewählten Spenderblöcken wurden entsprechend der Markierung zwei Gewebszylinder entnommen und dem Empfängerblock nebeneinander zugeführt. Die Gewebsentnahme und -zuführung wurde von der Firma *TARGOS Molecular Pathology GmbH (Germaniastrasse 7, 34119 Kassel, Deutschland)* mit dem *TMA Master* der Marke *3D HISTECH* durchgeführt. Ein fertiger Empfängerblock enthielt bis zu 66 x 1,5mm große Gewebefelder und mindestens vier Felder ohne Gewebe. Letztere wurden blockspezifisch angeordnet und dienten somit der sicheren Wiedererkennung.

3.8 Proteinbiochemische Methoden

3.8.1 Formalinfixierung und Paraffineinbettung

Entnommenes Tumorgewebe wurde je nach Größe für mindestens 16 Stunden bei Raumtemperatur in Formalin (4%, neutral gepuffert) fixiert. Anschließend wurde das Gewebe zugeschnitten und zur Entwässerung für 30min in Ethanol 75%, für 45min Ethanol 96% und für 1h Ethanol 100% gegeben. Nachfolgend fand über insgesamt 1h50min eine Behandlung mit dem Intermedium Xylol statt. Nach jeweils 20min, 30min und 1h wurde die Flüssigkeit durch neues Reagenz ersetzt. Die Gewebstücke wurden in Kassetten mit flüssigem Paraffin ausgegossen und bei 56°C ausgehärtet, wodurch ein fester Gewebblock entstand.

3.8.2 Immunhistochemie

Von den, in 3.7 hergestellten, TMAs wurden Schnitte mit einer Dicke von 2µm entnommen. Diese wurden für 40min bei Raumtemperatur in *EnVision Flex Target Retrieval Solution, pH low* (pH = 6,1, Dako, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Allein der Antikörper CD117 wurde für 20min bei Raumtemperatur in *EnVision Flex Target Retrieval Solution, pH high* (pH = 9, Dako, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 30min bei Raumtemperatur mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert. Die Verdünnung der jeweiligen Antikörper ist in Kapitel 2.7 beschrieben. Danach wurden die Schnitte mit einem sekundären, polyklonalen, HRP-gekoppelten (horseradish peroxidase) Antikörper (*EnVision Flex+*, Dako) inkubiert. Sichtbar gemacht wurde die Bindung mit DAB (Dako).

3.8.3 Auswertung der Immunhistochemischen Färbungen

Alle in 3.8.2 angefertigten immunhistochemischen Färbungen wurden nach selbigem Prinzip ausgewertet. Beurteilt wurden die Farbintensität und Anzahl der angefärbten Tumorzellen in 10-facher und 40-facher mikroskopischer Vergrößerung. Bei fehlender Färbung von zellulären Bestandteilen wurde der Fall als negativ und mit null Punkten bewertet. Eine schwache Farbintensität von zellulären Bestandteilen gab einen Punkt, eine starke Färbintensität drei Punkte. Waren auf dem jeweiligen Schnitt unter 25% der Tumorzellen immunhistochemisch gefärbt, wurde ein Punkt zur Farbintensität addiert. Waren auf dem jeweiligen Schnitt zwischen 25% und 50% der Tumorzellen immunhistochemisch gefärbt, wurden zwei Punkte zur Farbintensität addiert. Waren auf dem jeweiligen Schnitt über 50% der Tumorzellen immunhistochemisch angefärbt, wurden drei Punkte zur Farbintensität addiert. Die Summe (Farbintensität + Anzahl positiver Tumorzellen) wurde einer von vier Stufen der Proteinexpression zugeordnet. Null Punkte ergab die Proteinexpression negativ. Zwei bis drei Punkte ergaben die Proteinexpression „schwach“. Vier Punkte ergaben die Proteinexpression „intermediär“ und fünf bis sechs Punkte ergaben die Proteinexpression „stark“. Die Vorgehensweise ist in Tab. 2 veranschaulicht.

Proteinexpression via Immunhistochemie	
(a) Farbintensität	(b) Anzahl positiver Tumorzellen
negativ = 0 Pkt.	<25% = 1 Pkt.
schwach = 1 Pkt.	≥25% <50% = 2 Pkt.
stark = 3 Pkt.	≥50% = 3 Pkt.
Summe aus (a) und (b)	= Proteinexpression
0 Punkte	= negativ
2-3 Punkte	= schwach
4 Punkte	= intermediär
5-6 Punkte	= stark

Tab. 2

Proteinexpression via Immunhistochemie

Bestimmung der immunhistochemischen Proteinexpression anhand der Farbintensität und der Menge der angefärbten Tumorzellen. Mögliche Stufen der Proteinexpression sind negativ, schwach, intermediär und stark.

3.9 Statistische Überlebenszeitanalyse

Alle Daten, die zur statistischen Überlebenszeitanalyse verwendet wurden, stammen aus der existierenden Datenbank für Thymustumoren des Pathologischen Instituts der Universitätsklinik Göttingen. Die hier eingetragenen Fälle wurden sämtlich nach WHO klassifiziert. Die Überlebenszeitanalyse wurde graphisch mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Auf der y-Achse ist die kumulierte Überlebenswahrscheinlichkeit aufgetragen. Auf der x-Achse ist die Überlebenszeit (OS) in Monaten seit dem Tag der Operation aufgetragen. Endereignis der Messung war der Tod jedweder Art. War das Endereignis zum Zeitpunkt der Datenanalyse nicht eingetreten, wurden diese Überlebenszeiten zensiert. Verglichen wurden die Überlebenszeiten mit dem auf der Chi²-Verteilung basierenden Logrank-Test. Als Gruppierungsvariable für die Überlebenszeitanalysen wurden die Histologie sowie die Expression der Proteine c-Kit, PNMAL1, HEPACAM2, CRABP2, ANXA1 und MCM7 verwendet. Die Proteinexpression wurde durch die spezifischen Antikörper (s. Kapitel 2.7) bestimmt. Wie in 3.8.3 beschrieben, gab es vier Stufen der Proteinexpression. Verglichen wurde eine positive Proteinexpression (schwach, intermediär, stark) mit einer negativen Proteinexpression. Da Färbungen mit HEPACAM2 und ANXA1 zu wenige negative Fälle aufwiesen, wurde hier eine verminderte Proteinexpression (negativ, schwach = 0-3 Punkte) mit einer vermehrten Proteinexpression (intermediär, stark = 4-6 Punkte) verglichen. Die statistischen Berechnungen und Abbildungen wurden mit dem Programm STATISTICA, Vers. 13 durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, galt ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Genexpressionsanalyse von Thymusepithel-Tumoren

Zur Darstellung signifikanter Unterschiede der Genexpression von TET wurden DNA-Microarrays mit Tumorgewebe an der Medizinischen Fakultät Mannheim (Zentrum für Medizinische Forschung) durchgeführt. Die Daten wurden vom wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Carsten Sticht erhoben. Für die Genexpressionsanalyse wurde Kryogewebe und Affymetrix *GeneChips*[®]-Analyse verwendet. Die notwendigen Tumoren wurden vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Mannheim zur Verfügung gestellt. Diagnostisch wurden die Tumoren von Prof. Dr. med. Alexander Marx und Prof. Dr. med. Philipp Ströbel einer Tumorentität nach WHO zugeordnet. Insgesamt enthält das Kollektiv Tumorproben von zwölf weiblichen und zwölf männlichen Patienten, bestehend aus einem Typ A, zwei Typ AB, einem Typ B1, drei Typ B2, zwölf Typ B3 Thymomen und fünf Thymuskarzinomen. Bei den Thymuskarzinomen handelte es sich ausschließlich um Plattenepithelkarzinome. Der Altersdurchschnitt bei Erstdiagnose lag bei 50,3 Jahren (s. Tab. 3).

Kollektiv Genexpressionsanalyse	
Insgesamt	n=24
Typ A	n= 1 (4%)
Typ AB	n= 2 (8%)
Typ B1	n= 1 (4%)
Typ B2	n= 3 (13%)
Typ B3	n=12 (50%)
TC	n= 5 (21)
Geschlecht	
weiblich	12 (50%)
männlich	12 (50%)
Altersdurchschnitt (Jahre)	50,3

Tab. 3 Kollektiv Genexpressionsanalyse

Kollektiv der Tumorpatienten zur Erstellung einer Genexpressionsanalyse. Klassifiziert nach WHO. Mit angeben ist das Durchschnittsalter bei Diagnose sowie das Geschlecht.

Statistisch verglichen wurden mit der Software SAS die Genexpression TC gegen B3-Thymome („TSCC vs. B3“, s. Abb. 8, Tab. 4) und TC gegen alle Thymome („TSCC vs.

Rest“, s. Abb. 9, Tab. 4). Die Affymetrix *GeneChips*[®] enthielten 19674 Gene, wovon insgesamt im Vergleich TC vs. T3 und TC vs. alle Thymome 3367 signifikant reguliert waren. Die statistische Analyse wurde ebenfalls von Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Carsten Sticht der Medizinischen Fakultät Mannheim durchgeführt.

Um signifikant unterschiedlich exprimierte Gene auf Proteinebene zu validieren, wurden PNMAL1 und HEPACAM2 (in Abb. 8 und Abb. 9 jeweils mit Pfeil gekennzeichnet) ausgewählt. Das exakte Signifikanzniveau der beiden Gene ist in Tab. 4 aufgelistet. PNMAL1 zeigte im Vergleich „TSCC vs. B3“ eine zur Basis 2 logarithmierte Ratio (TSCC/B3) von -5,06 ($p < 0,0001$) und im Vergleich „TSCC vs. Rest“ eine zur Basis 2 logarithmierte Ratio (TSCC/Rest) von -5,45 ($p < 0,0001$). Somit ist PNMAL1 in der Gruppe der Thymome im Vergleich zu den Thymuskarzinomen verstärkt exprimiert. HEPACAM2 zeigte im Vergleich „TSCC vs. B3“ eine zur Basis 2 logarithmierte Ratio (TSCC/B3) von 5,39 ($p < 0,0001$) und im Vergleich „TSCC vs. Rest“ eine zur Basis 2 logarithmierte Ratio (TSCC/Rest) von 5,31 ($p < 0,0001$). Somit ist HEPACAM2 in der Gruppe der Thymuskarzinome im Vergleich zu der Gruppe der Thymome verstärkt exprimiert. Ebenfalls signifikant reguliert erschien Kit (in Abb. 8 und Abb. 9 mit Pfeil gekennzeichnet), welches für eine Rezeptor-Tyrosinkinase kodiert und dessen verstärkte Expression in Thymuskarzinomen bereits bekannt ist (Henley et al. 2004; Pan et al. 2004; Ströbel et al. 2004a; Petrini et al. 2010). KIT zeigte den größten Genexpressionsunterschied (TSCC vs. B3 und TSCC vs. Rest) zugunsten der Thymuskarzinome (Ratio $\log_2(\text{TSCC}/\text{B3}) = 6,07$, $p < 0,0001$ und Ratio $\log_2(\text{TSCC}/\text{Rest}) = 6,25$, $p < 0,0001$).

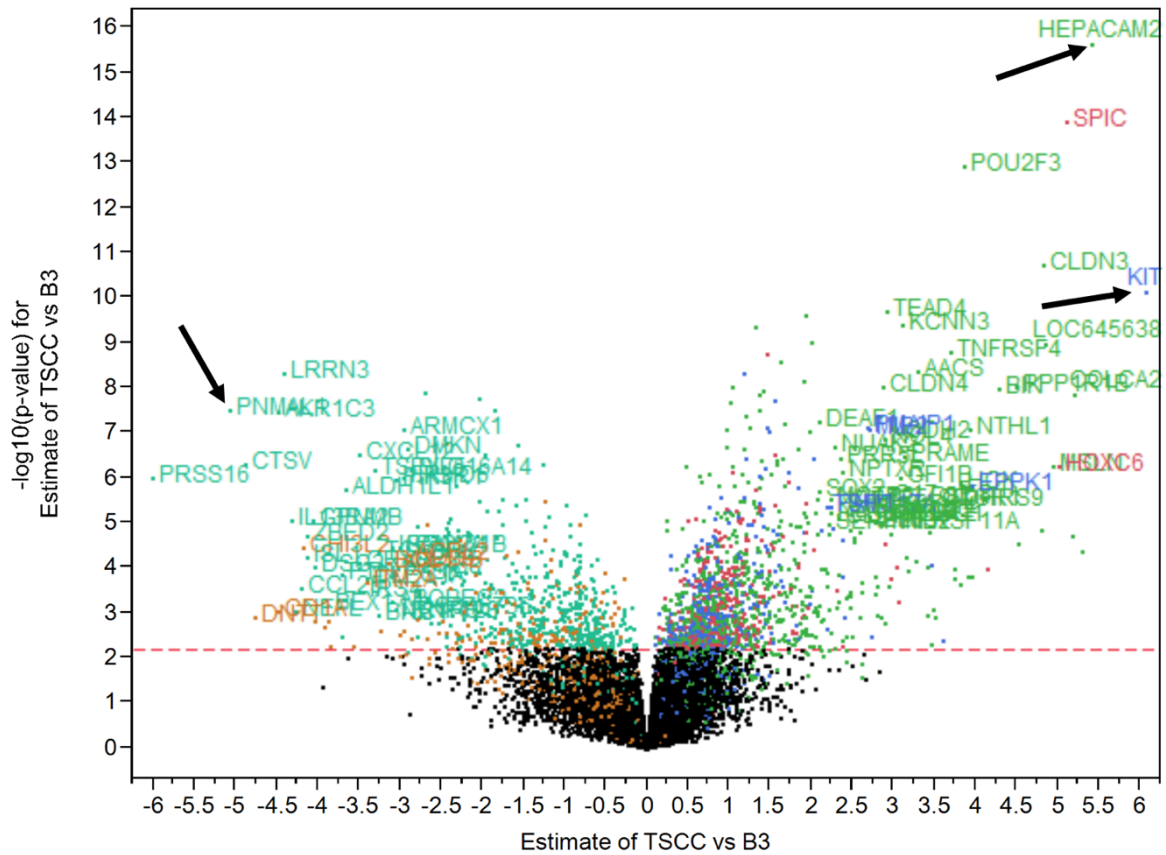


Abb. 8 Volcano Plot TSCC vs. B3

Daten von Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Carsten Sticht, Universität Mannheim. y-Achse: $-\log_{10}(\text{p-Wert})$. x-Achse: Estimate of TSCC vs. B3 entspricht $\log_2(\text{Ratio TSCC/B3})$. Ausgewählte Gene PNMA1, HEPACAM2 und KIT sind einem mit Pfeil gekennzeichnet.

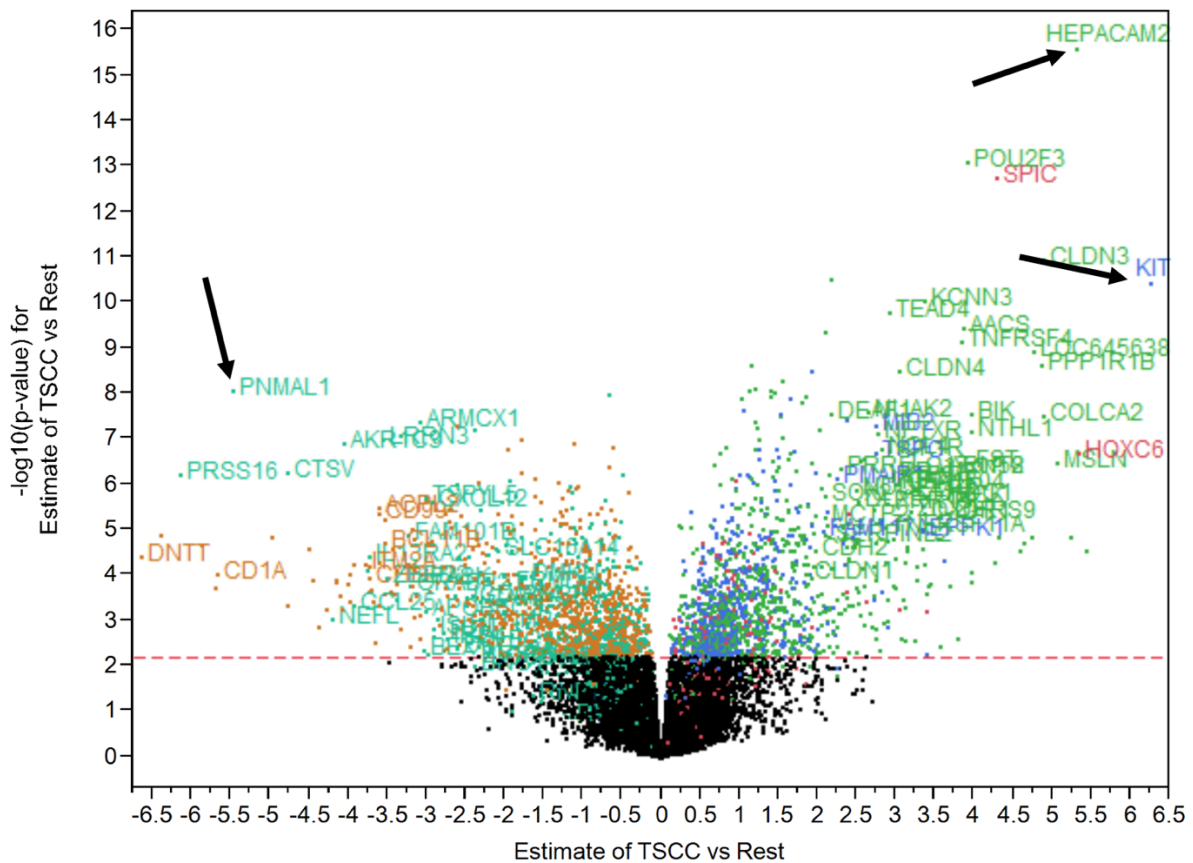


Abb. 9 Volcano Plot TSCC vs. Rest

Daten von Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Carsten Sticht, Universität Mannheim. y-Achse: $-\log_{10}(\text{p-Wert})$. x-Achse: Estimate of TSCC vs. Rest entspricht $\log_2(\text{Ratio TSCC/Rest})$. Ausgewählte Gene PNMAL1, HEPACAM2 und KIT sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Genexpressionsanalyse von TET mit Affymetrix <i>GeneChips</i>			
Gene Name	PNMAL1	HEPACAM2	KIT
$\log_2(\text{TSCC/B3})$	-5,06; p = 10E-7,49	5,39; p = 10E-15,57	6,07; p = 10E-10,12
$\log_2(\text{TSCC/Rest})$	-5,45; p = 10E-8,02	5,31; p = 10E-15,53	6,26; p = 10E-10,4

Tab. 4 Genexpressionsanalyse von TET

Daten der Genexpressionsanalyse von TET mit Affymetrix *GeneChips*[®]. Ausgewertet wurden die Daten mit der Software SAS von Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Carsten Sticht, Fakultät Biotechnologie Universität Mannheim. Auswertung der Genexpressionsanalyse von Thymusepithel-Tumoren. Mit angegeben ist der p-Wert für die Ratio TSCC/B3 und Ratio TSCC/Rest.

4.2 Immunhistochemische Validierung der Genexpressionsdaten

4.2.1 Tissue-Microarray

Zur immunhistochemischen Validierung der Proteinexpression der in 4.1 gefundenen differentiell exprimierten Gene wurden, wie in 3.7 beschrieben, *Tissue microarray* (TMA)-Blöcke von Thymom- und Thymuskarzinom-Gewebeproben angefertigt, welche, mit den in

Kollektiv Tissue-Microarray	
Insgesamt	n=157
Typ A	n=16 (10%)
Typ AB	n=47 (30%)
Typ B1	n=17 (11%)
Typ B2	n=24 (15%)
Typ B3	n=18 (12%)
TC	n=35 (22%)
Geschlecht	
weiblich	73 (46%)
männlich	73 (46%)
unbekannt	11 (8%)
Altersdurchschnitt (Jahre)	59,2

Tab. 5 Kollektiv der Tumorpatienten zur Erstellung der TMA-Blöcke

157 Fälle von 1985-2013. Klassifiziert nach WHO (Typ A-B3, TC). Mit angegeben ist das Durchschnittsalter bei Diagnose und das Geschlecht

Thymuskarzinomen handelte es sich um 26 Plattenepithelzellkarzinome, ein sarkomatoides, drei epidermoide, zwei basaloide und drei adenosquamöse Karzinome. Die Tumoren befanden sich in einem klinischen Stadium nach Masaoka I-IV. Unter den Patienten waren 73 weibliche und 73 männliche Personen. Von elf Personen war das Geschlecht unbekannt. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag bei 59,2 Jahren (s. Tab. 5).

Kapitel 2.7 genannten Antikörpern, gefärbt wurden. Zur Anfertigung der TMA-Blöcke wurde ein Kollektiv, bestehend aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe, zusammengestellt. Das Gewebematerial, mit in Kapitel 3.1 genannter Patienteninformation, stammt aus dem Archiv des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikums Mannheim. Die Tumoren wurden von Prof. Dr. med. Alexander Marx und Prof. Dr. med. Philipp Ströbel histologisch nach WHO klassifiziert. Die Falldaten erstrecken sich über einen Zeitraum von 1985 bis 2013. Das Kollektiv enthält Tumoren von 157 Patienten, bestehend aus 16 Typ A, 47 Typ AB, 17 Typ B1, 24 Typ B2, 18 Typ B3 Thymome und 35 Thymuskarzinomen. Vom Kollektiv ausgeschlossen wurden combined thymomas. Bei den

4.2.2 Überlebenszeitanalyse der eingeschlossenen Patienten nach Diagnose

Zum deskriptiven Vergleich der Überlebenszeit wurden, wie in 3.9 beschrieben, Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Mit dem Logrank-Test wurde errechnet, ob sich die Überlebenskurven untereinander signifikant unterscheiden. Für die Analysen wurden alle Patienten des TMA-Kollektivs (Kapitel 4.2.1), zu denen vollständige Follow-Up-Daten vorlagen (s. Tab. 6), verwendet. Insgesamt erfüllten 61 Fälle die Kriterien. Davon lagen sechs Typ A, 19 Typ AB,

zwei B1, 16 Typ B2, acht Typ B3 Thymome und neun 9 TC vor. Unter den neun Thymuskarzinomen waren acht Plattenepithelkarzinome und ein epidermoides Karzinom. Die o.g. Tumoren zeigten klinische Stadien von Masaoka I-IV. Unter den Patienten befanden sich 28 Frauen und 25 Männer. Bei 8 Fällen war das Geschlecht unbekannt. Der Altersdurchschnitt lag bei 58,4 Jahren. Das *overall survival* unter Mitberücksichtigung der zensierten Daten lag bei 47,7 Monaten. Während des Behandlungszeitraums verstarben 16 Patienten. Initial wurde am Kollektiv das *overall survival* in Abhängigkeit der histologischen Klassifikation nach WHO untersucht (s. Abb. 10). Hier zeigten A-Thymome eine 5-Jahres-Überlebenszeit von 100%, AB-Thymome von 88%, B1-Thymome 50%, B2-Thymome 75%, B3-Thymome 46% und Thymuskarzinome 45%. In der Auswertung konnten in der Gruppe der B1-Thymome lediglich zwei Fälle miteingeschlossen werden. Die weitere statistische Auswertung der Überlebenszeiten ergab einzig bei der Gegenüberstellung AB vs. B3 (Logrank-Test $p = 0,02$) und AB vs. TC (Logrank-Test $p = 0,05$) einen signifikanten Unterschied. Alle anderen Vergleiche zwischen den Subgruppen erwiesen sich als nicht signifikant ($p > 0,05$). Auch mitunter deutliche Tendenzen erwiesen sich als nicht signifikant (Logrank-Test A vs. B3 $p = 0,16$; A vs. TC $p = 0,2$; B2 vs. B3 $p = 0,16$; B2 vs. TC $p = 0,1$).

Kollektiv Überlebenszeitanalyse	
Insgesamt	n=61
Typ A	n= 6 (10%)
Typ AB	n=19 (31%)
Typ B1	n= 2 (3%)
Typ B2	n=17 (28%)
Typ B3	n= 8 (13%)
TC	n= 9 (15%)
Geschlecht	
weiblich	28 (46%)
männlich	25 (41%)
unbekannt	8 (13%)
Altersdurchschnitt (Jahre)	58,4
Median OS (Monate)	47,7
verstorben	16 (26%)

Tab. 6 Kollektiv der Überlebenszeitanalysen

61 Fälle nach WHO klassifiziert Typ A-TC. Unter den Patienten waren 28 Frauen und 25 Männer. Bei 8 Patienten war das Geschlecht nicht bekannt. Mit angegeben ist das Durchschnittsalter bei Diagnose. Das mittlere *overall survival* (OS) lag bei 47,7 Monaten. Hier ist zu beachten, dass auch zensierte Fälle in der Berechnung berücksichtigt wurden. Während des Behandlungszeitraums verstarben 16 Patienten.

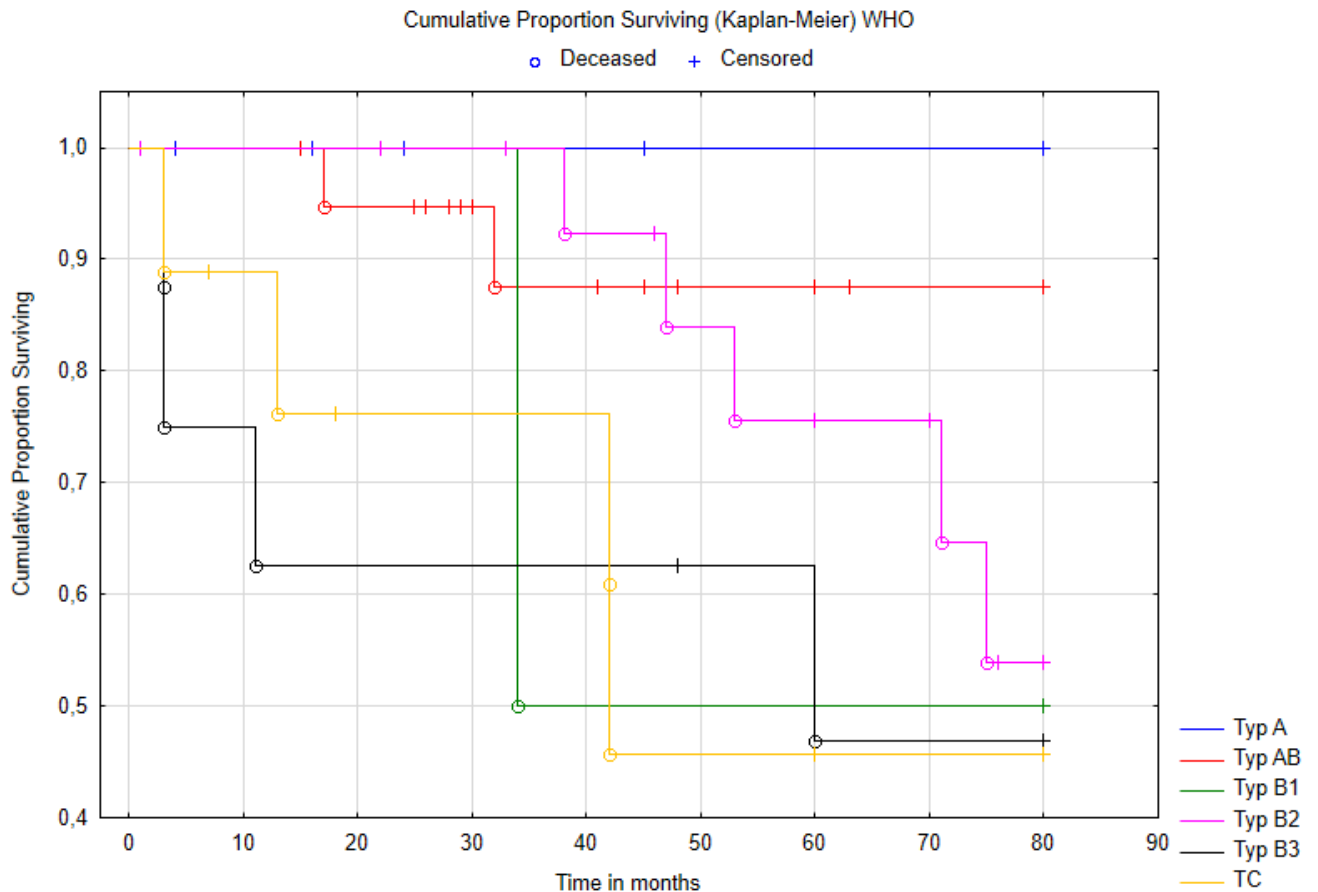


Abb. 10 Überlebenszeitanalyse für Thymome WHO

Kaplan-Meier-Verfahren zur Analyse von TET, A-B3 und TC. Der gruppenbildende Faktor ist die Klassifikation nach WHO. y-Achse: Kumulierte Überlebensanteile. x-Achse: Zeit in Monaten.

4.3 CD117 (Tyrosinkinase KIT)

4.3.1 Immunhistochemische Färbung mit CD117 (Tyrosinkinase KIT)

Zur Validierung der in 4.1 dargestellten differentiellen Proteinexpression in TET, wurden Schnitte der in 3.7 hergestellten TMA-Blöcke hergestellt und immunhistochemisch gefärbt. Hierzu wurde mit einem Mikrotom ein Schnitt des TMA-Blocks angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem primären Antikörper zusammengebracht, welcher proteinspezifische Antigene bindet. Anschließend wurde ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher den primären Antikörper bindet. Durch eine Enzym-Substrat-Reaktion wird ein Farbstoff freigesetzt, welcher eine positive Immunhistochemie und somit die Expression des gesuchten Proteins signalisiert. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 3.8.2 beschrieben.

Wie von Ströbel et al. bereits beschrieben, bestätigte auch diese Genexpressionsanalyse die verstärkte Expression der Tyrosinkinase KIT (CD117) in Thymuskarzinomen (s. Tab. 4, Abb.

8, Abb. 9). Um dies auf Proteinebene darzustellen wurden Schnitte der in 3.7 hergestellten TMA-Blöcke angefertigt und mit dem Antikörper CD117 gefärbt. Insgesamt konnten 156 Tumore (16 A-, 47 AB-, 17 B1-, 24 B2-, 18 B3-Thymome und 34 Thymuskarzinome) des TMA-Kollektivs ausgewertet und die Proteinexpression bestimmt werden. Abb. 11 zeigt das Spektrum der Färbintensität des Antikörpers.

CD117

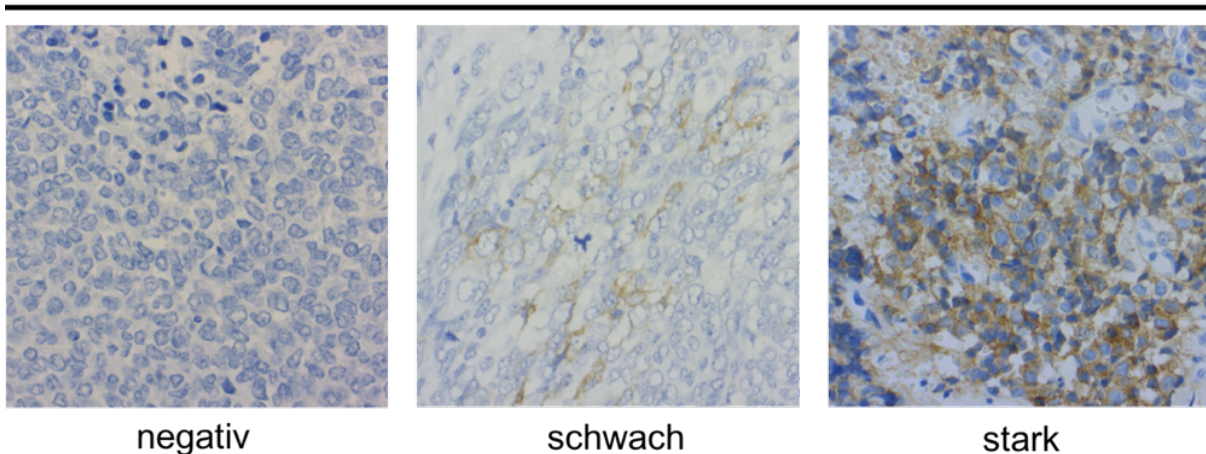


Abb. 11 Farbintensität der Immunhistochemie mit CD117 (KIT)

Links CD117 negative Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Mitte CD117 schwach positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Rechts CD117 stark positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40

Die Gewebstanzen eines Falls konnten aufgrund von mechanischer oder methodischer Beschädigung in der Herstellung nicht ausgewertet werden. Die große Mehrheit der Thymome zeigte eine negative Proteinexpression für CD117 (117 von 122 Fällen). Lediglich drei Fälle zeigten eine schwache, ein Fall eine intermediäre und ein weiterer Fall eine starke Proteinexpression. Insbesondere Typ-B3-Thymome zeigten in 18 von 18 Fällen eine negative Proteinexpression. In der Gruppe der Thymuskarzinome zeigten sich 21 der 34 Fälle CD117 positiv, indem sie eine Färbung der Zellmembran oder des Zytoplasmas aufwiesen. Achtmal zeigte sich eine starke Proteinexpression, siebenmal intermediär und sechsmal stark (s. Abb. 12, Tab. 7). Der Unterschied zwischen Thymom und Thymuskarzinom war statistisch signifikant (Fisher-Yates-Test $p < 0,0001$). Zwischen den Thymomgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied, sodass die bekannte Verteilung von CD117 unter TET reproduziert werden konnte.

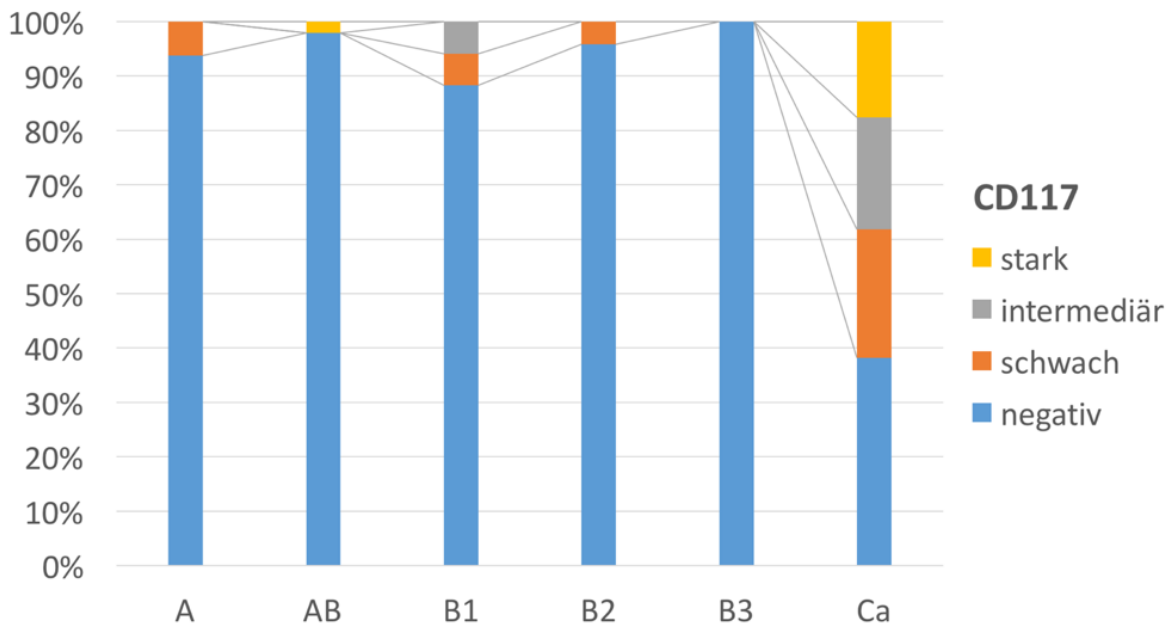


Abb. 12 Statistische Auswertung TMA CD117 (KIT)

Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) der Färbung mit CD117. y-Achse: prozentuale Verteilung. x-Achse: Thymustumoren Typ A-TC.

CD117 (c-Kit)

Insgesamt	Negativ(%)	Schwach(%)	Intermediär(%)	Stark(%)	Total
Typ A	15 (93,75)	1 (6,25)	0 (0)	0 (0)	16
Typ AB	46 (97,87)	0 (0)	0 (0)	1 (2,13)	47
Typ B1	15 (88,24)	1 (5,88)	1 (5,88)	0 (0)	17
Typ B2	23 (95,83)	1 (4,17)	0 (0)	0 (0)	24
Typ B3	18 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18
TC	13 (38,24)	8 (23,53)	7 (20,59)	6 (17,65)	34
Gesamt	130	11	8	7	156

Tab. 7 Absolute Auswertung TMA CD117 (KIT)

Absolute und prozentuale Verteilung der Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von CD117.

4.3.2 Überlebenszeitanalyse CD117 (KIT)

Kapitel 4.3.1 zeigte, dass Thymuskarzinome eine signifikant höhere Expression von KIT aufweisen als Thymome. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde untersucht, ob die alleinige Expression von KIT bereits als prognostischer Faktor angesehen werden kann und die

Überlebenszeit beeinflusst. Hierzu wurde, wie in Kapitel 3.9 beschrieben, eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Verglichen wurde die Gruppe der negativen KIT-Expression (55 Fälle) mit der Gruppe der schwachen, intermediären und starken KIT-Expression (6 Fälle). Ab dem dritten Monat verläuft die Kurve der positiven Proteinexpression oberhalb der Negativ-Kurve, kreuzt diese im 42. Monat und verläuft dann dauerhaft unter ihr (s. Abb. 13). Der Unterschied zwischen Überlebenszeiten von Tumoren einer positiven oder negativen KIT-Expression erwies sich als nicht signifikant (Logrank-Test, $p = 0,97617$). In dieser Studie war KIT kein prognostischer Faktor.

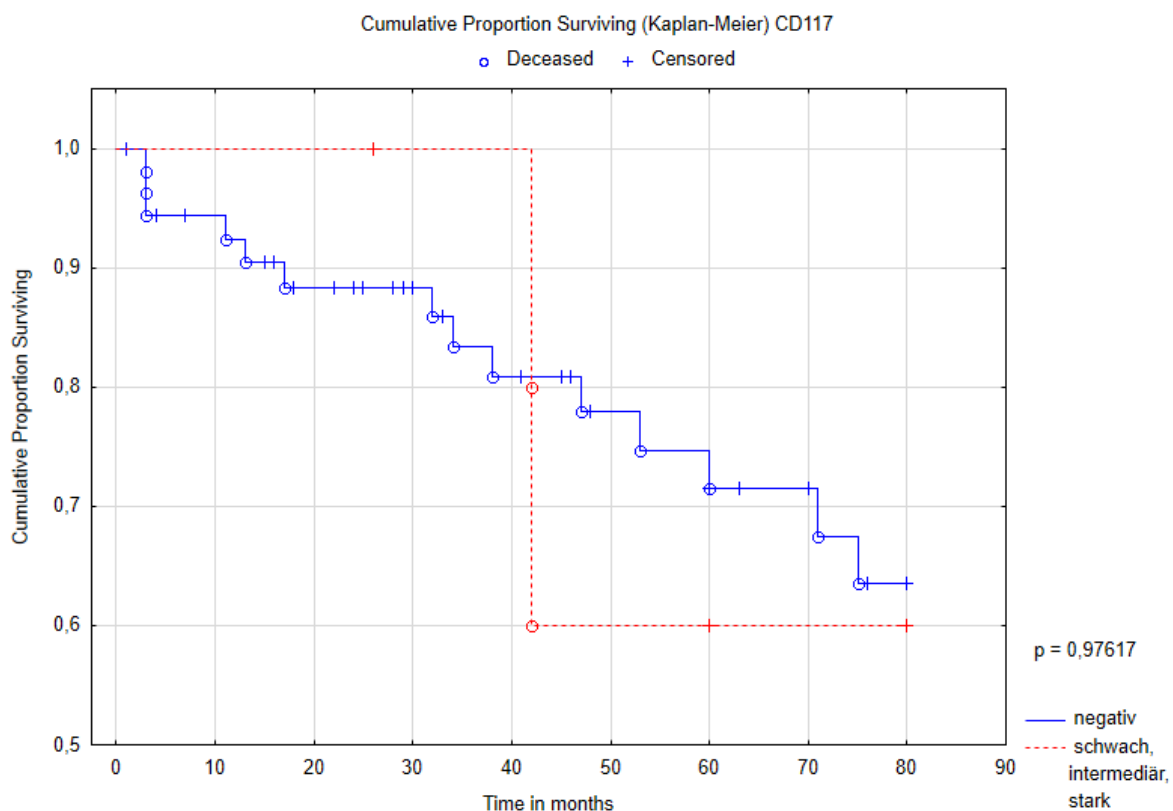


Abb. 13 Überlebenszeitanalyse CD117 (KIT)

Kaplan-Meier-Verfahren zur Analyse von Thymustumoren. Prognostischer Faktor ist die Expression von CD117. y-Achse: Kumulierte Überlebensanteile. x-Achse: Zeit in Monaten.

4.4 Anti-PNMAL1

4.4.1 Immunhistochemische Färbung mit Anti-PNMAL1

Die Genexpressionsanalyse in 4.1 zeigte eine signifikant unterschiedliche Genexpression von PNMAL1. Thymome wiesen im Verhältnis zu Thymuskarzinomen eine erhöhte Expression auf. Zur Darstellung der Expression auf Proteinebene wurden Schnitte der beschriebenen TMA-Blöcke (s. Kapitel 3.7) mit einem PNMAL1 spezifischen Antikörper gefärbt.

Insgesamt konnten von 148 Tumoren die Proteinexpression bestimmt werden. Darunter waren 14 A-, 47 AB-, 17 B1-, 24 B2-, 17 B3-Thymome und 29 Thymuskarzinome. Abb. 14 zeigt beispielhaft das Spektrum der Farbintensität des Antikörpers.

Anti-PNMAL1

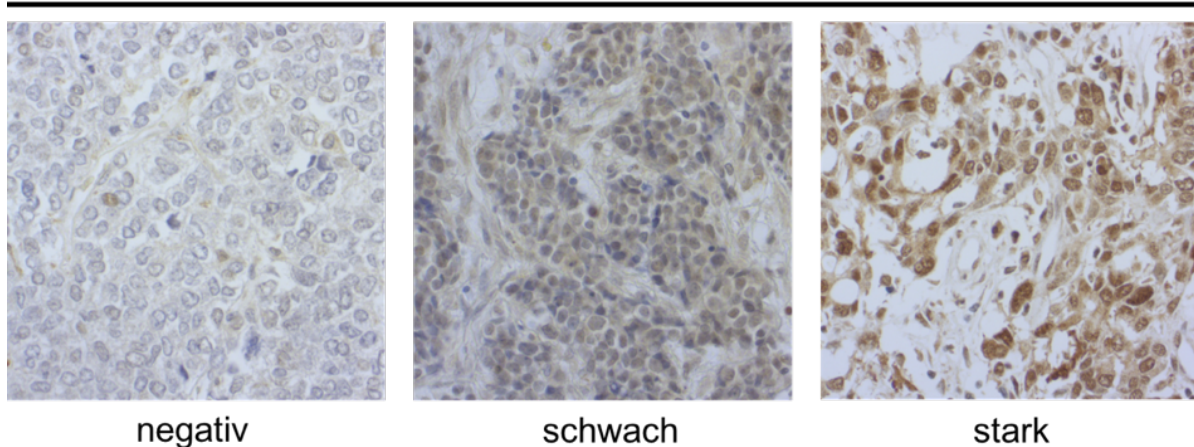


Abb. 14 Farbintensität der Immunhistochemie mit Anti-PNMAL1

Links Anti-PNMAL1 negative Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Mitte Anti-PNMAL1 schwach positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Rechts Anti-PNMAL1 stark positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40

Die Gewebstanzen von neun Fällen konnten aufgrund mechanischer oder methodischer Beschädigung in der Herstellung nicht ausgewertet werden. In der Gruppe der Thymome wurde in 81 der 119 Fälle eine Immunfärbung des Zellkerns oder Zytoplasmas festgestellt. 35-mal zeigte sich eine schwache Proteinexpression, 34-mal intermediär und zwölfmal stark. Im Unterschied dazu wiesen 27 der 29 Thymuskarzinome eine positive Immunfärbung auf. Dreimal zeigte sich eine schwache Proteinexpression, neunmal intermediär und 15-mal stark. Eine positive Immunhistochemie mit Anti-PNMAL1 ist nicht spezifisch für ein Thymom oder Thymuskarzinom (Fisher-Yates-Test $p = 0,36$). Somit kann mit einer positiven bzw. negativen Immunhistochemie nicht zwischen Thymom und Thymuskarzinom unterschieden werden. Die weitere Auswertung ergab signifikant häufiger eine starke Proteinexpression in der Gruppe der Thymuskarzinome (vgl. TC 15/29 Fällen „stark“ vs. Thymom 12/119 Fällen „stark“, Fisher-Yates-Test $p < 0,001$). Dies galt nicht für den Vergleich Thymuskarzinom vs. B3-Thymom (vgl. TC 15/29 Fällen „stark“ vs. B3 3/17 Fällen „stark“, Fisher-Yates-Test $p = 0,14$). Folglich verhält sich die Proteinexpression von PNMAL1 in Thymomen und Thymuskarzinomen nicht kongruent zur Genexpression (s. Abb. 15, Tab. 8).

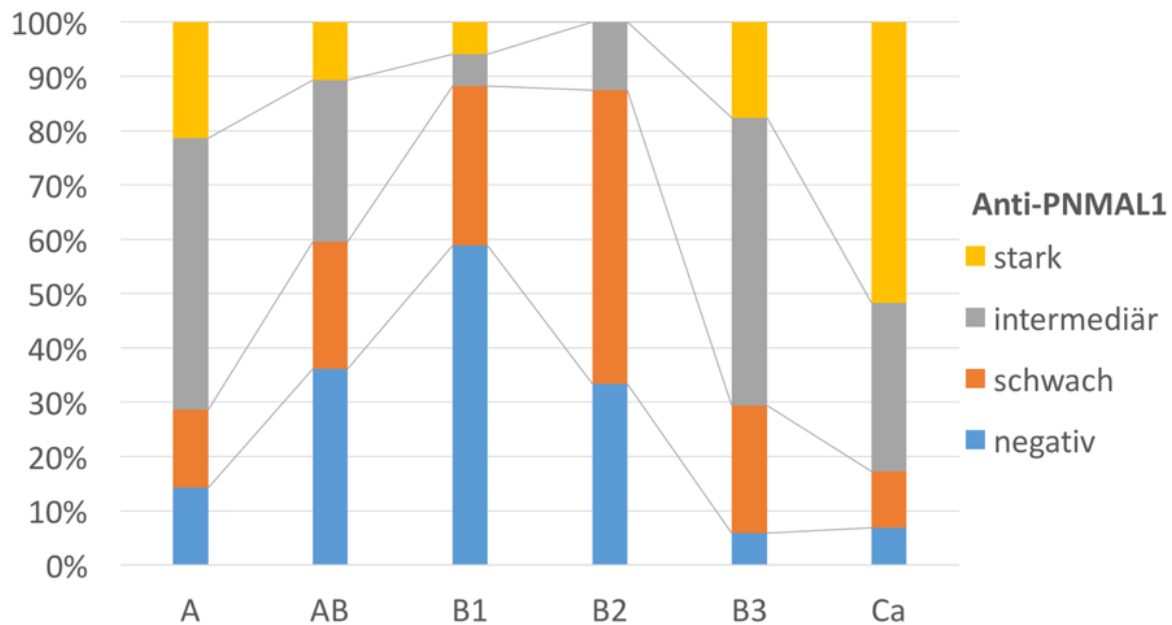


Abb. 15 Statistische Auswertung TMA Anti-PNMAL1

Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) PNMAL1. y-Achse: prozentuale Verteilung. x-Achse: Thymustumoren Typ A-TC.

Anti-PNMAL1

Insgesamt	Negativ(%)	Schwach(%)	Intermediär(%)	Stark(%)	Total
Typ A	2 (14,29)	2 (14,29)	7 (50)	3 (21,43)	14
Typ AB	17 (36,17)	11 (23,4)	14 (29,79)	5 (10,64)	47
Typ B1	10 (58,82)	5 (29,41)	1 (5,88)	1 (5,88)	17
Typ B2	8 (33,33)	13 (54,17)	3 (12,50)	0 (0)	24
Typ B3	1 (5,88)	4 (23,53)	9 (52,94)	3 (17,65)	17
TC	2 (6,9)	3 (10,34)	9 (31,03)	15 (51,72)	29
Gesamt	40	38	43	27	148

Tab. 8 Absolute Auswertung TMA Anti-PNMAL1

Absolute und prozentuale Verteilung Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von PNMAL1.

4.4.2 Überlebenszeitanalyse Anti-PNMAL1

Die statistische Auswertung der Immunhistochemie in 4.4.1 ergab, dass Thymuskarzinome signifikant häufiger eine starke Proteinexpression von PNMAL1 aufweisen als Thymome. Da Thymuskarzinome ein aggressiveres und invasiveres Wachstumsverhalten zeigen wurde

überprüft ob die verstärkte Expression von PNMAL1 mit einer kürzeren Überlebenszeit nach Diagnose einhergeht. In Abb. 16 ist die Überlebenszeitanalyse dargestellt. Die Analyse wurde wie in 3.9 beschrieben durchgeführt. Insgesamt gingen 61 Fälle in die Analyse ein, davon 6 A-, 20 AB-, 2 B1-, 16 B2-, 8 B3-Thymome und 9 TC. Als prognostischer Faktor wurde die Expression von PNMAL1 verwendet. Verglichen wurde die Gruppe der negativen PNMAL1-Expression (0 Punkte, 19 Fälle) mit der Gruppe der schwachen, intermediären und starken PNMAL1-Expression (2-6 Punkte, 42 Fälle). Die genaue Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (Typ A-TC) innerhalb der Vergleichsgruppen ist in Tab. 9 dargestellt. Die blaue Kurve ist PNMAL1(-), rot zeigt PNMAL1(+). Es ist zu erkennen, dass bis zum 32. Monat Überschneidungen auftreten. Danach zeigen Tumore mit positiver PNMAL1-Expression dauerhaft eine schlechtere Prognose. Der Unterschied zwischen Überlebenszeiten von Tumoren einer positiven oder negativen PNMAL1-Expression erwies sich als nicht signifikant (Logrank-Test, $p = 0,33$).

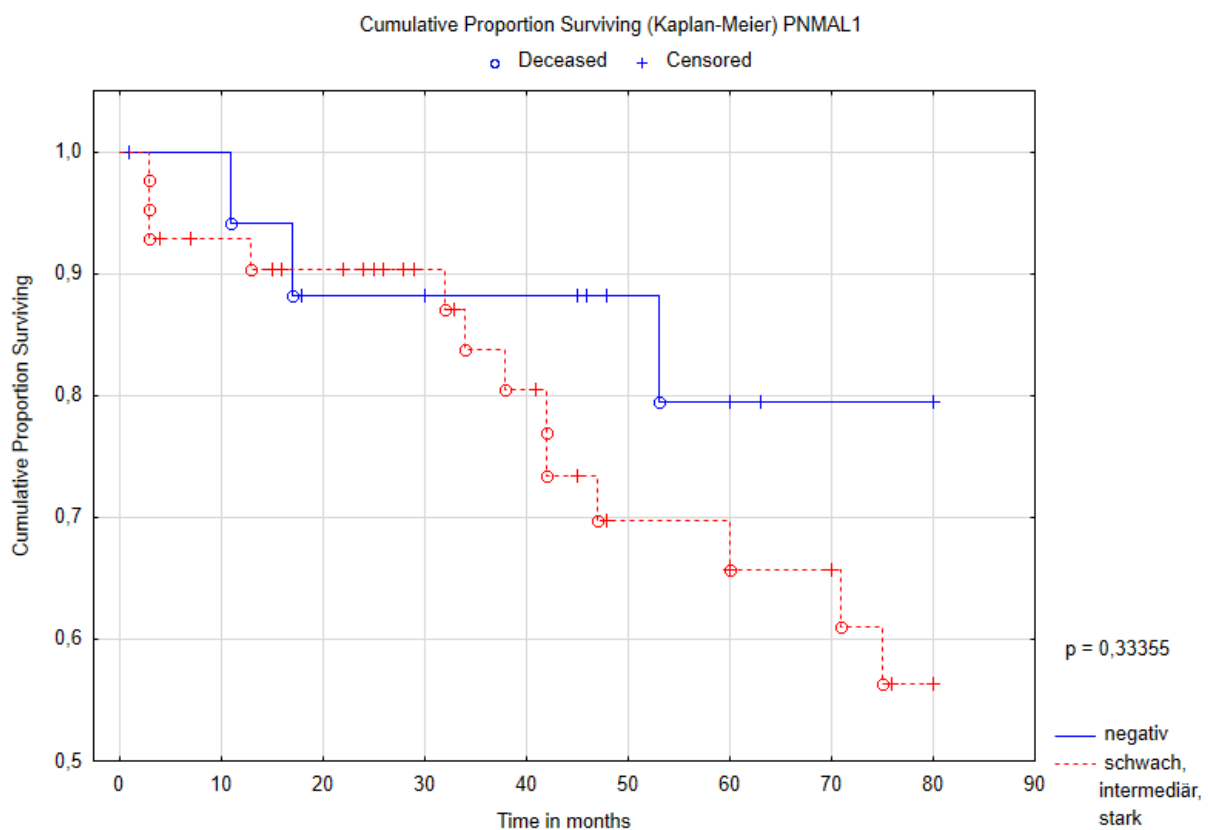


Abb. 16 Überlebenszeitanalyse PNMAL1

Kaplan-Meier-Verfahren zur Analyse von Thymustumoren. Prognostischer Faktor ist die Expression von PNMAL1. y-Achse: Kumulierte Überlebensanteile. x-Achse: Zeit in Monaten.

PNMAL1(-)		PNMAL1(+)	
WHO	n	WHO	n
Typ A	1	Typ A	5
Typ AB	10	Typ AB	10
Typ B1	-	Typ B1	2
Typ B2	6	Typ B2	10
Typ B3	1	Typ B3	7
TC	1	TC	8

Tab. 9 PNMAL1 Fallzahlen (n) Überlebenszeitanalyse
Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (A-TC) in den Vergleichsgruppen. Links: PNMAL1 negativ (0 Punkte, blaue Kurve); Rechts PNMAL1 positiv (2-6 Punkte, rote Kurve). Invasiv wachsende Tumoren wie B3 und TC sind grau unterlegt.

4.5 Anti-HEPACAM2

4.5.1 Immunhistochemische Färbung mit Anti-HEPACAM2

Die Genexpressionsanalyse in 4.1 zeigte eine signifikant unterschiedliche Genexpression von HEPACAM2. Thymuskarzinome wiesen im Verhältnis zu Thymomen eine erhöhte Expression auf. Zur Darstellung der Proteinexpression wurden die Schnitte der beschriebenen TMA-Blöcke (s. Kapitel 3.7) mit einem gegen HEPACAM2 spezifischen Antikörper gefärbt. Insgesamt konnte von 141 Tumoren die Proteinexpression bestimmt werden (s. Kapitel 3.8.3). In Entitäten unterteilt waren dies 13 A-, 47 AB-, 16 B1-, 23 B2-, 16 B3-Thymome und 26 Thymuskarzinome. Abb. 17 zeigt das Spektrum der Farbintensität des Antikörpers.

Anti-HEPACAM2

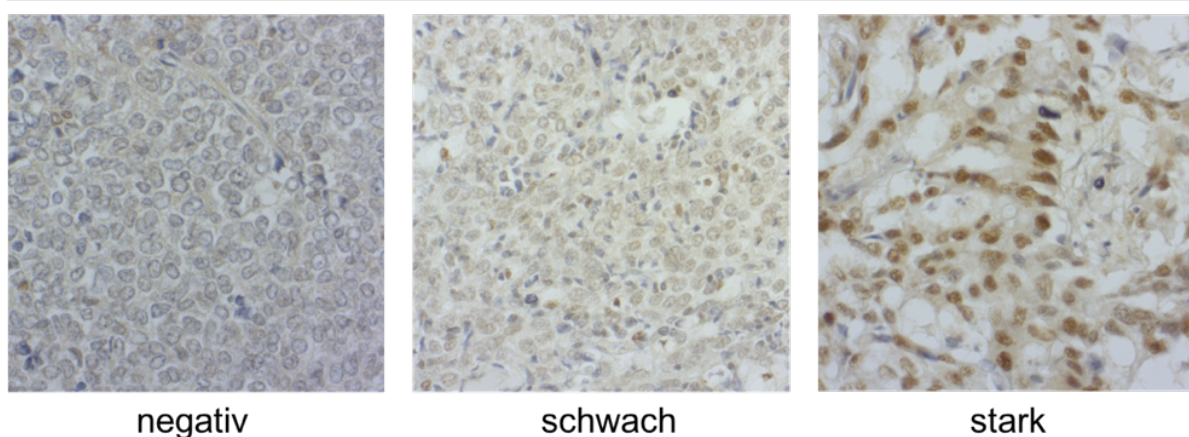


Abb. 17 Farbintensität der Immunhistochemie mit Anti-HEPACAM2

Links Anti-HEPACAM2 negative Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Mitte Anti-HEPACAM2 schwach positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Rechts Anti-HEPACAM2 stark positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40.

Die Gewebstanzen von 16 Fällen konnten aufgrund mechanischer oder methodischer Beschädigung in der Herstellung nicht ausgewertet werden. In der Gruppe der Thymome färbte sich das Zytoplasma oder der Zellkern in 104 der 115 Fälle an. 19-mal zeigte sich eine schwache, 52-mal eine intermediäre und 33-mal eine starke Proteinexpression. Dagegen wurde in der Gruppe der Thymuskarzinome bei 23 der 26 Fälle eine positive Immunfärbung mit Anti-HEPACAM2 festgestellt. Ein Thymuskarzinom zeigte eine schwache, vier weitere eine intermediäre und 18 eine starke Proteinexpression. Eine positive Immunhistochemie mit Anti-HEPACAM2 ist nicht spezifisch für ein Thymom oder Thymuskarzinom (Fisher-Yates-Test $p = 1$). Auffällig ist, dass A-Thymome, B3-Thymome und Thymuskarzinome signifikant häufiger eine starke Proteinexpression zeigten ($p < 0,01$) als AB-, B1- und B2 Thymome (s. Abb. 18, Tab. 10). Thymuskarzinome allein weisen ebenfalls signifikant häufiger eine starke Proteinexpression auf als Thymome ($p = 0,02$).

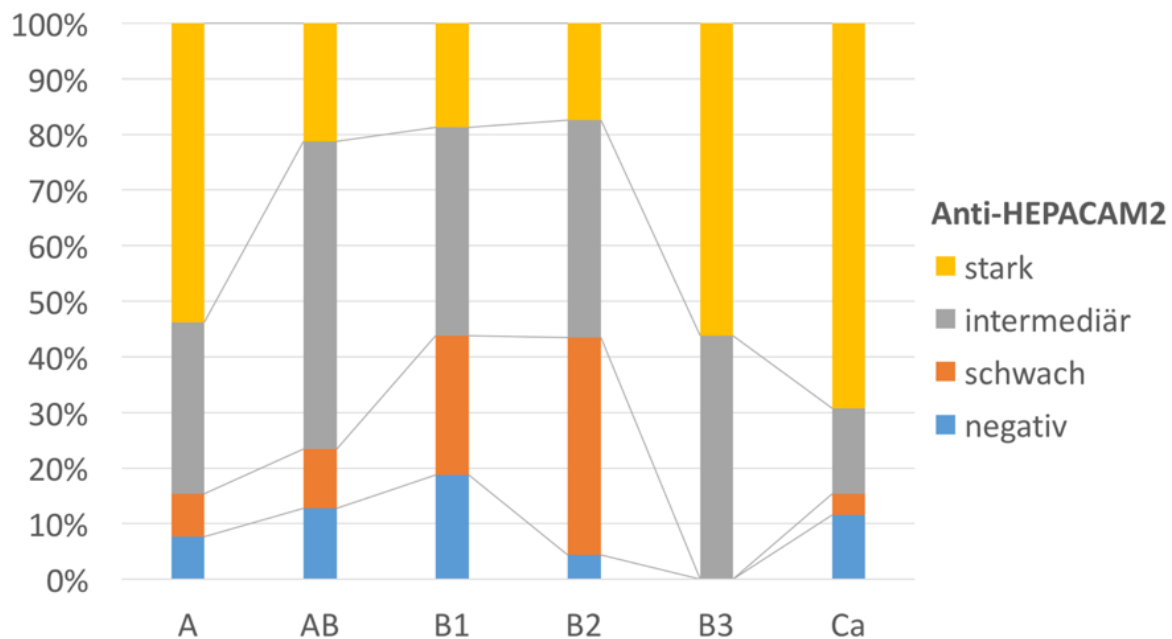


Abb. 18 Statistische Auswertung TMA Anti-HEPACAM2

Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von HEPACAM2. y-Achse: prozentuale Verteilung. x-Achse: Thymustumoren Typ A-TC.

Anti-HEPACAM2

Insgesamt	Negativ(%)	Schwach(%)	Intermediär(%)	Stark(%)	Total
Typ A	1 (7,69)	1 (7,69)	4 (30,77)	7 (53,85)	13
Typ AB	6 (12,77)	5 (10,64)	26 (55,32)	10 (21,28)	47
Typ B1	3 (18,75)	4 (25)	6 (37,5)	3 (18,75)	16
Typ B2	1 (4,35)	9 (39,13)	9 (39,13)	4 (17,39)	23
Typ B3	0 (0)	0 (0)	7 (43,75)	9 (56,25)	16
TC	3 (11,54)	1 (3,85)	4 (15,38)	18 (69,23)	26
Gesamt	14	20	56	51	141

Tab. 10 Absolute Auswertung TMA Anti-HEPACAM2

Absolute und prozentuale Verteilung der Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von HEPACAM2.

4.5.2 Überlebenszeitanalyse mit Anti-HEPACAM2

Die statistische Auswertung der Immunhistochemie in 4.5.1 ergab, dass A-, B3-Thymome und Thymuskarzinome signifikant häufiger eine starke Proteinexpression von HEPACAM2 zeigen als AB-, B1- und B2-Thymome. Zusätzlich wurde überprüft, ob die verstärkte Expression von HEPACAM2 mit einer kürzeren Überlebenszeit nach Diagnose einhergeht. Abschnitt 3.9 beschreibt die Durchführung der Überlebenszeitanalyse mit dem prognostischen Faktor HEPACAM2. Insgesamt gingen 60 Fälle in die Analyse mit ein, davon 6 A-, 20 AB-, 2 B1-, 16 B2-, 8 B3-Thymome und 8 TC. Für eine erhöhte Aussagekraft der Kaplan-Meier-Kurven wurden Fälle mit negativer oder schwacher (0-3 Punkte, 13 Fälle) und Fälle mit intermediärer oder starker (4-6 Punkte, 47 Fälle) Proteinexpression zusammengefasst. Die genaue Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (Typ A-TC) innerhalb der Vergleichsgruppen ist in Tab. 11 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Kurve der vermehrten Proteinexpression (rot) ab dem 13. Monat dauerhaft unter der blauen Kurve (verminderte Proteinexpression) verläuft (s. Abb. 19). Ein Sterbefall im 75. Monat in der Gruppe der verminderten Proteinexpression führt die Kurven erneut zusammen. Der Unterschied zwischen Überlebenszeiten von Tumoren einer verminderten oder vermehrten HEPACAM2-Expression erwies sich als nicht signifikant (Logrank-Test, $p = 0,36$).

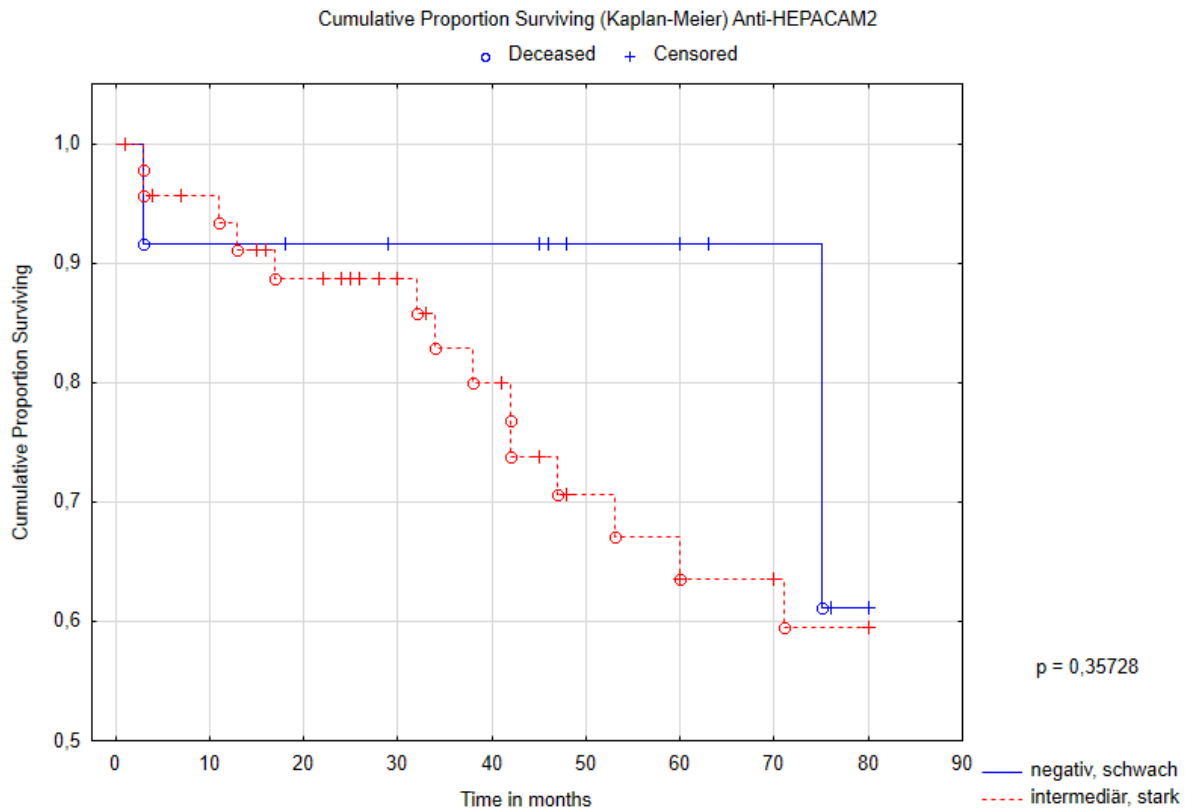


Abb. 19 Überlebenszeitanalyse HEPACAM2

Kaplan-Meier-Verfahren zur Analyse von Thymustumoren. Prognostischer Faktor ist die Expression von HEPACAM2. y-Achse: Kumulierte Überlebensanteile. x-Achse: Zeit in Monaten.

HEPACAM2(↓)		HEPACAM2(↑)	
WHO	n	WHO	n
Typ A	1	Typ A	5
Typ AB	5	Typ AB	15
Typ B1	-	Typ B1	2
Typ B2	5	Typ B2	11
Typ B3	-	Typ B3	8
TC	2	TC	6

Tab. 11 HEPACAM2 Fallzahlen (n) Überlebenszeitanalyse

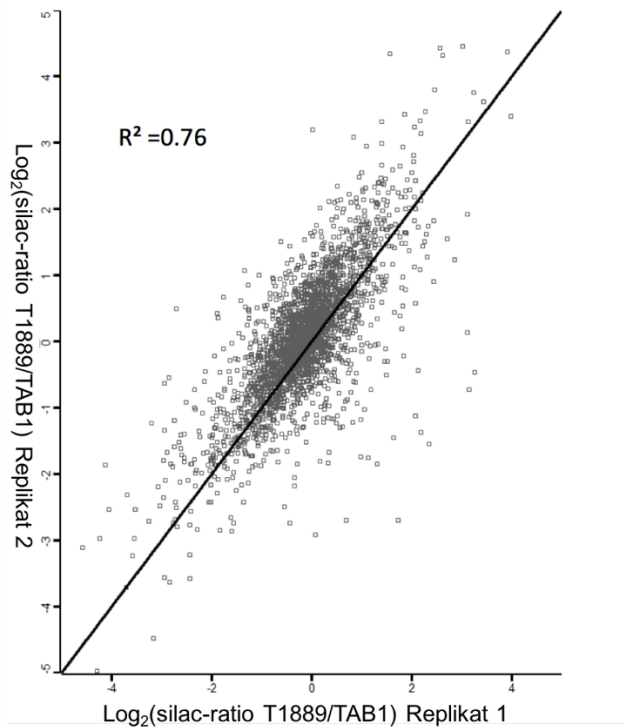
Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (A-TC) in den Vergleichsgruppen. Links: HEPACAM2 negativ, intermediär (0-3 Punkte, blaue Kurve); Rechts HEPACAM2 intermediär, stark (4-6 Punkte, rote Kurve). Invasiv wachsende Tumoren wie B3 und TC sind grau unterlegt.

4.6 Massenspektrometrische Proteomanalytik der Zelllinien IU-TAB-1 und T1889

Zur Beurteilung der unterschiedlichen Proteinexpression von Thymomen und Thymuskarzinomen wurden die Zelllinien IU-TAB-1 (kurz TAB1, Modell für AB-Thymom) und T1889 (Modell für undifferenziertes Thymuskarzinom, s. Kapitel 2.6) in SILAC-Medium kultiviert. Bei den markierten Aminosäuren handelte es sich um Arginin (+0Da, +10Da) und

Lysin (+0Da, +8Da). Jede Zelllinie wurde einmal mit schweren und einmal mit leichten Aminosäuren kultiviert, sodass von beiden Zelllinien ein biologisches Replikat vorhanden war (s. Kapitel 3.3.1). Die Zelllinien wurden darauffolgend lysiert (s. Kapitel 3.3.2), in einem Proteinmengen-Verhältnis von 1:1 vermischt (s. Kapitel 3.4), durch 1D Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Trypsin verdaut (s. Kapitel 3.5.1). Die massenspektrometrische Messung und Auswertung der trypsinisierten Proteine fand in Kooperation mit dem mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen (Prof. Dr. Henning Urlaub) und dem Universitätsklinikum Frankfurt, Medizinische Klinik II – Hämatologie und Onkologie (Dr. Thomas Oellerich und Prof. Dr. Hubert Serve) statt. Hier wurde durch ein Q Exactive Massenspektrometer das Masse-Ladungs-Verhältnis von Peptidfragmenten bestimmt (s. Kapitel 3.5.3), aus denen mit der Software MaxQuant und durch die Sequenz-Datenbank UniProt die entsprechenden Peptide und anschließend Proteine analysiert wurden. Aufgrund der SILAC-Modifikationen wurden Peptid- bzw. Proteinpaare der Zelllinien TAB1 und T1889 erkannt und durch Bildung der Ratio mit der Software Perseus quantitativ dargestellt (s. Kapitel 3.5.4). Selbige Prozedur wurde mit dem biologischen Replikat durchgeführt. Die Ratio (T1889/TAB1) beider biologischen Replikate wurde jeweils zur Basis 2 logarithmiert und in einem zweidimensionalen Graphen gegeneinander aufgetragen (s.

Abb. 20). Die Reproduzierbarkeit der massen-spektrometrischen Analyse (s. Kapitel 3.5.3 und 3.5.4) wurde anhand einer Regressionsanalyse geprüft. Der Wert $R^2 = 0,76$ war ausreichend, um eine Reproduzierbarkeit der massenspektrometrischen Ergebnisse anzunehmen.

**Abb. 20 Regressionsanalyse**

Reproduzierbarkeit der in Kap. 3.3 durchgeführten Massenspektrometrie. y-Achse $\text{Log}_2(\text{silac-ratio T1889/TAB1})$ Replikat 2. x-Achse $\text{Log}_2(\text{silac-ratio T1889/TAB1})$ Replikat 1

Massenspektrometrisch konnten insgesamt 6538 Proteine identifiziert werden. 2824 davon konnten mittels SILAC-Verfahren als Ratio T1889/Tab1 quantifiziert werden. Wiederrum 313 Proteine erwiesen sich in der Quantifizierung als signifikant unterschiedlich exprimiert (s. Anhang Tab. 22).

Abb. 21 zeigt die $\text{log}_2(\text{Silac-Ratio T1889/TAB1})$ in Abhängigkeit der $\text{log}_{10}(\text{Intensität})$ der quantifizierten Proteine. Zur Darstellung der Proteinexpression am TMA-Kollektiv wurde zum einen das signifikant regulierte Protein cellular retinoic acid-binding protein 2

(CRABP2) ausgewählt. Dieses ergab in der Auswertung eine verstärkte Expression in der Zelllinie TAB1. Zum anderen wurde das Protein annexinA1 (ANXA1) ausgewählt. Dieses war vermehrt in der Zelllinie T1889 exprimiert und verhält sich im Vergleich TAB1 vs. T1889 gegensätzlich zu CRABP2. Zusätzlich zeigte die Ratio beider Proteine in der Genexpressionsanalyse (s. Kapitel 4.1) einen zur Proteinexpression konkordanten Wert (s. Tab. 12)

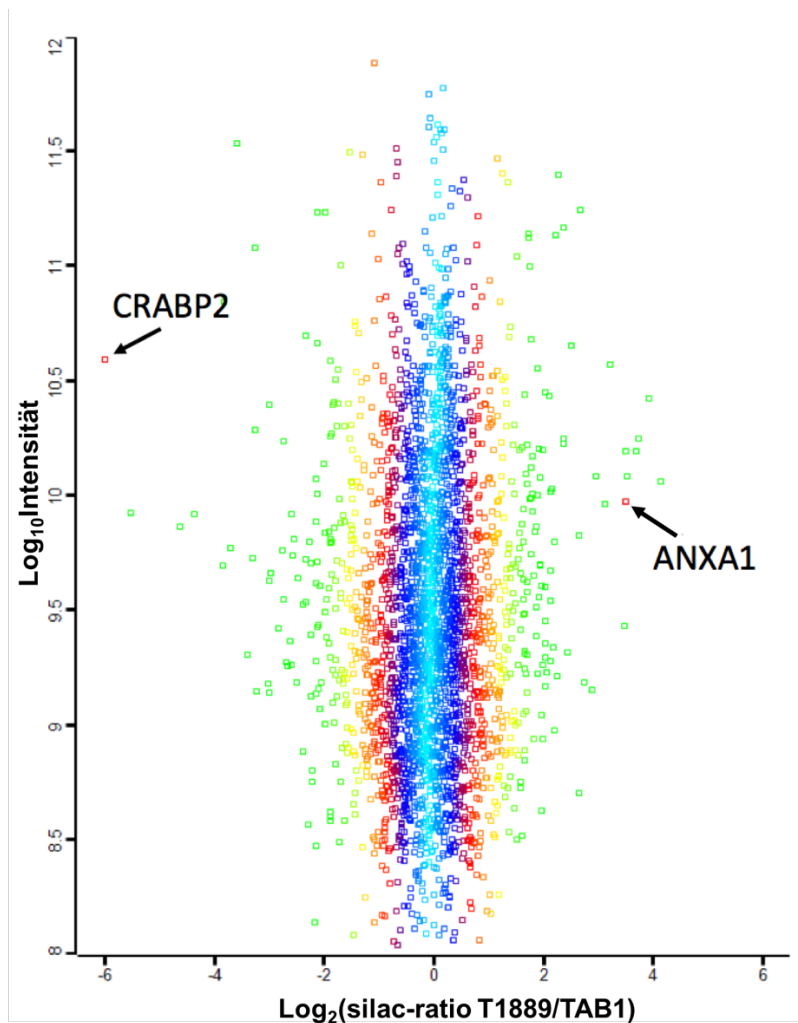


Abb. 21 Verteilung der Protein-SILAC-Ratios

Darstellung der Silac-Ratio T1889/TAB1 in Abhängigkeit der massenspektrometrischen Intensität. y-Achse: Log₁₀(Intensität) der in 3.5.4 ausgewerteten Daten. x-Achse: Log₂(T1889/TAB1).

RNA-Protein-Konkordanz			
Gene Symbol	TSCC/ Non-TSCC	Protein Name	T1889/ TAB1
ANXA1	1,351	AnnexinA1	11,294
CRABP2	0,649	Cellular retinoic acid-binding protein 2	0,016

Tab. 12 Darstellung der Konkordanz Genexpression vs. Proteinexpression von CRABP2 und ANXA1

Ratio der Genexpression vs. Ratio Proteinexpression T1889/TAB1 TSCC/Non-TSCC der massenspektrometrisch gemessenen Proteinexpression T1889/ TAB1 und der Genexpression Ratio TSCC/ Non-TSCC

4.7 Anti-CRABP2

4.7.1 Immunhistochemische Färbung mit Anti-CRABP2

Die massenspektrometrische Auswertung in 4.6 ergab eine signifikant stärkere Expression von CRABP2 in der Zelllinie TAB1 (Modell für AB-Thymom) als in der Vergleichszelllinie T1889 (Modell für undifferenziertes Thymuskarzinom). Um herauszufinden, ob sich dieser Unterschied auf das TMA-Kollektiv übertragen lässt, wurden Schnitte, der in 3.7 beschriebenen TMA-Blöcke, mit einem gegen CRABP2 spezifischen Antikörper gefärbt. Insgesamt konnten 145 Tumore ausgewertet und die Proteinexpression bestimmt werden (s. Kapitel 3.8.3). Darunter waren 13 A-, 46 AB-, 17 B1-, 23 B2-, 18 B3-Thymome und 28 Thymuskarzinome. Abb. 22 zeigt das Spektrum der Farbintensität des Antikörpers.

Anti-CRABP2

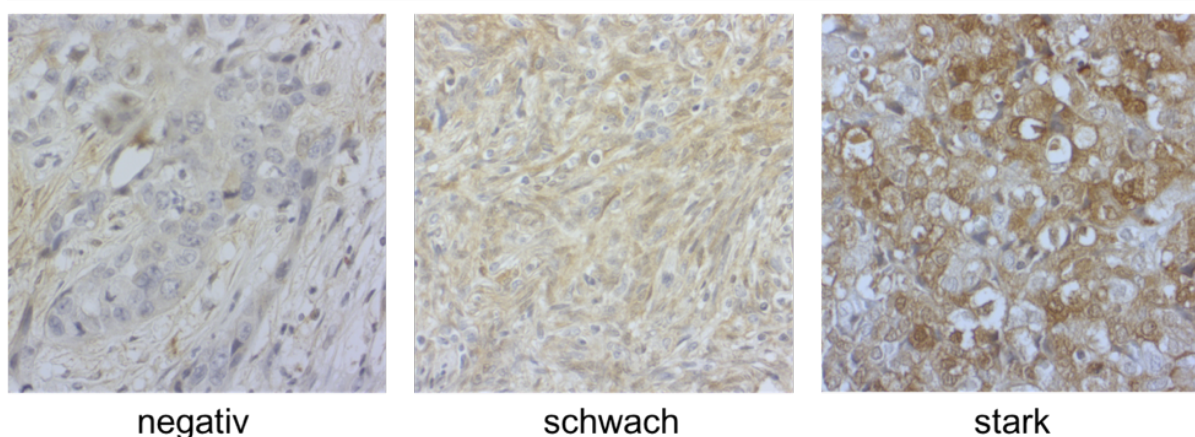


Abb. 22 Farbintensität der Immunhistochemie mit Anti-CRABP2

Links Anti-CRABP2 negative Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Mitte Anti-CRABP2 schwach positive Tumorzellen, Typ A, Vergrößerung x40. Rechts Anti-CRABP2 stark positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40

Die Gewebstanzen von zwölf Fällen konnten aufgrund mechanischer oder methodischer Beschädigung in der Herstellung nicht ausgewertet werden. In der Gruppe der Thymome wurde in 100 der 117 Fälle eine Immunfärbung des Zellkerns oder Zytoplasmas festgestellt. 22-mal zeigte sich eine schwache, 26-mal eine intermediäre und 52-mal eine starke Proteinexpression. Im Vergleich wiesen nur 18 der 28 Thymuskarzinome eine positive Immunfärbung auf. Hier zeigte sich einmal eine schwache, achtmal eine intermediär und neunmal eine starke Proteinexpression (s. Abb. 23, Tab. 13).

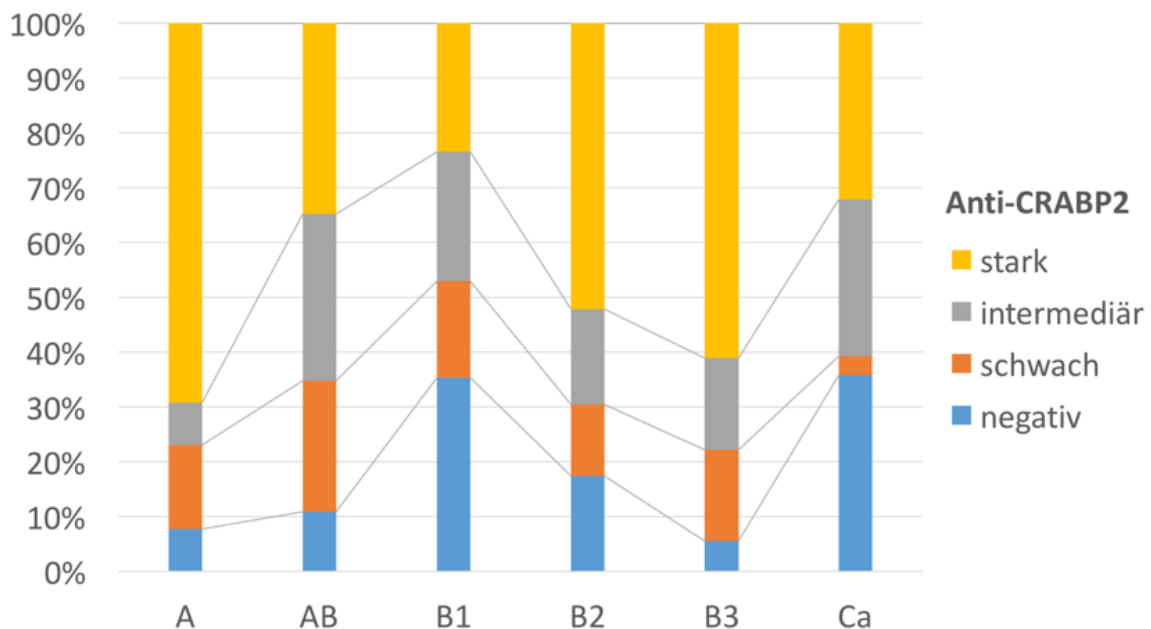


Abb. 23 Statistische Auswertung TMA Anti-CRABP2

Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von CRABP2. y-Achse: prozentuale Verteilung. x-Achse: Thymustumoren Typ A-TC.

Anti-CRABP2

Insgesamt	Negativ(%)	Schwach(%)	Intermediär(%)	Stark(%)	Total
Typ A	1 (7,69)	2 (15,38)	1 (7,69)	9 (69,23)	13
Typ AB	5 (10,87)	11 (23,91)	14 (30,43)	16 (34,78)	46
Typ B1	6 (35,29)	3 (17,65)	4 (23,53)	4 (23,53)	17
Typ B2	4 (17,39)	3 (13,04)	4 (17,39)	12 (52,17)	23
Typ B3	1 (5,56)	3 (16,67)	3 (16,67)	11 (61,11)	18
TC	10 (35,71)	1 (3,57)	8 (28,57)	9 (32,14)	28
Gesamt	27	23	34	61	145

Tab. 13 Absolute Auswertung TMA Anti-CRABP2

Absolute und prozentuale Verteilung der Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von CRABP2.

Trotz des geringeren Prozentsatzes an einer positiven Immunhistochemie bei Thymuskarzinomen besteht kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe der Thymome (Fisher-Yates-Test $p = 0,26$). Ein auffälliger Unterschied ist in der starken Proteinexpression von Typ A vs. Typ B1 und Typ A vs. TC. Diese Unterschiede erwiesen sich jedoch als nicht signifikant (Typ A vs. B1 $p = 0,19$; Typ A vs. TC $p = 0,24$).

4.7.2 Überlebenszeitanalyse mit Anti-CRABP2

Die statistische Auswertung der Immunhistochemie in 4.7.1 ergab variierende Proteinexpression von CRABP2 in Thymustumoren. Es war keine Entität auszumachen, die eine signifikant erhöhte Expression aufwies. Um zu überprüfen, ob die Expression von CRABP2 die Überlebenszeit von Patienten mit TET beeinflusst, wurde wie in 3.9 beschrieben, eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt (s. Abb. 24). Insgesamt gingen 60 Fälle in die Analyse mit ein, davon 6 A-, 20 AB-, 2 B1-, 16 B2-, 8 B3-Thymome und 8 TC. Als prognostischer Faktor wurde die Expression von CRABP2 verwendet. Verglichen wurde die Gruppe der negativen CRABP2-Expression (0 Punkte, 13 Fälle) mit der Gruppe der positiven CRABP2-Expression (2-6 Punkte, 47 Fälle). Die genaue Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (Typ A-TC) ist in Tab. 14 dargestellt. Die blaue Kurve ist CRABP2(-), rot zeigt CRABP2(+) (s. Abb. 24). Ab dem 3. Monat zeigt eine positive Proteinexpression dauerhaft eine bessere Prognose. Mit zunehmender Zeit divergieren die Kurven zusätzlich. Trotz der zu erkennenden Tendenz stellte sich dieser Unterschied im Logrank-Test als nicht signifikant dar ($p = 0,11$).

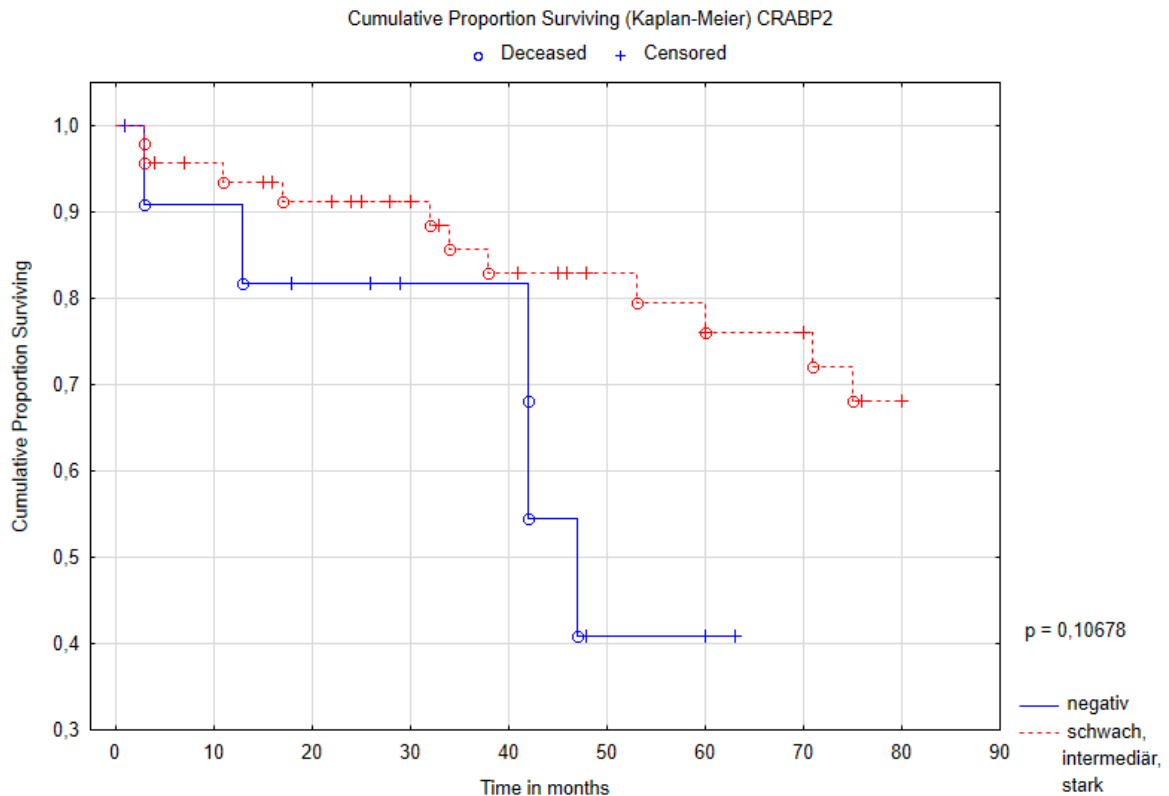


Abb. 24 Überlebenszeitanalyse CRABP2

Kaplan-Meier-Verfahren zur Analyse von Thymustumoren. Prognostischer Faktor ist die Expression von CRABP2. y-Achse: Kumulierte Überlebensanteile. x-Achse: Zeit in Monaten.

CRABP2(-)		CRABP2(+)	
WHO	n	WHO	n
Typ A	1	Typ A	5
Typ AB	3	Typ AB	17
Typ B1	-	Typ B1	2
Typ B2	3	Typ B2	13
Typ B3	1	Typ B3	7
TC	5	TC	3

Tab. 14 CRABP2 Fallzahlen (n) Überlebenszeitanalyse
Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (A-TC) in den Vergleichsgruppen. Links: CRABP2 negativ (0 Punkte, blaue Kurve); Rechts CRABP2 positiv (2-6 Punkte, rote Kurve). Invasiv wachsende Tumoren wie B3 und TC sind grau unterlegt.

4.8 Anti-ANXA1

4.8.1 Immunhistochemische Färbung mit Anti-ANXA1

Die massenspektrometrische Auswertung in 4.6 ergab eine vermehrte Expression von AnnexinA1 (ANXA1) in der Zelllinie T1889 (Modell für undifferenziertes Thymuskarzinom) als in der Vergleichszelllinie TAB1 (Modell für AB-Thymom). Zur immunhistochemischen Darstellung der Proteinexpression wurden Schnitte der TMA's (s. Kapitel3.7) hergestellt und

mit einem gegen ANXA1 spezifischen Antikörper gefärbt. Insgesamt konnten 146 Tumore ausgewertet werden (s. Kapitel 3.8.3). Darunter waren 15 A-, 47 AB-, 16 B1-, 24 B2-, 17 B3-Thymome und 27 Thymuskarzinome. Abb. 25 zeigt beispielhaft die möglichen Farbintensitäten des Antikörpers.

Anti-ANXA1

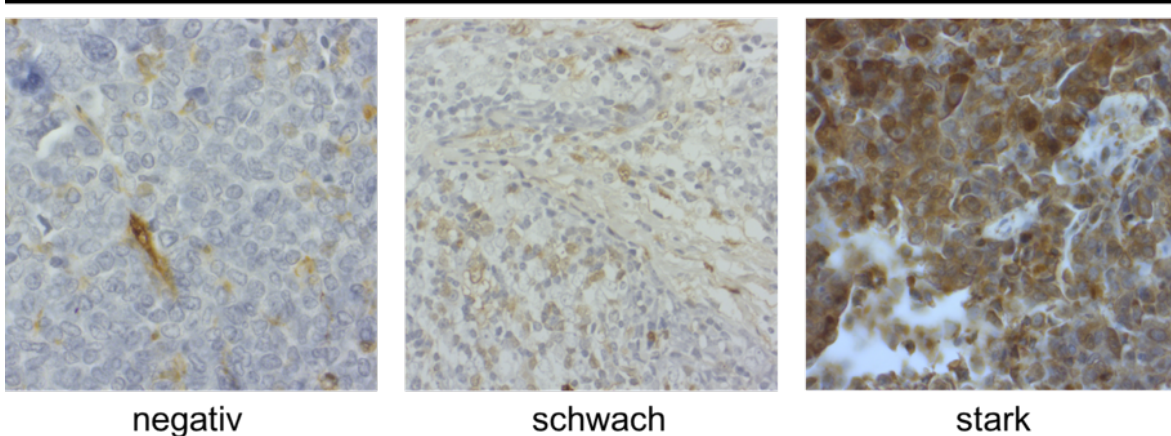


Abb. 25 Farbintensität der Immunhistochemie mit Anti-ANXA1

Links Anti-ANXA1 negative Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Mitte Anti-ANXA1 schwach positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Rechts Anti-ANXA1 stark positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40.

Die Gewebstanzen von elf Fällen konnten aufgrund mechanischer oder methodischer Beschädigung in der Herstellung nicht ausgewertet werden. In der Gruppe der Thymome färbte sich die Zellmembran oder das Zytoplasma in 115 der 119 Fälle an. 30-mal zeigte sich eine schwache Proteinexpression, 52-mal intermediär und 33-mal stark. Vergleichbar ist der angefärbte Prozentsatz bei den Thymuskarzinomen. Hier wiesen 24 der 27 Fälle eine positive Immunhistochemie auf. Ein Thymuskarzinom zeigte eine schwache Proteinexpression, dreimal wurde eine intermediäre und 20 mal eine stark Expression beschrieben (s. Abb. 26, Tab. 15). Eine positive Immunhistochemie mit Anti-ANXA1 ist nicht spezifisch für ein Thymom oder Thymuskarzinom (Fisher-Yates-Test $p = 0,88$). Allerdings zeigten 20 von 27 (74,1%) Thymuskarzinomen eine starke Proteinexpression, wohingegen nur 33 von 119 (27,3%) der Thymome eine starke Expression von ANXA1 aufwiesen. Dieser Unterschied erwies sich als signifikant (Fisher-Yates-Test $p = 0,04$).

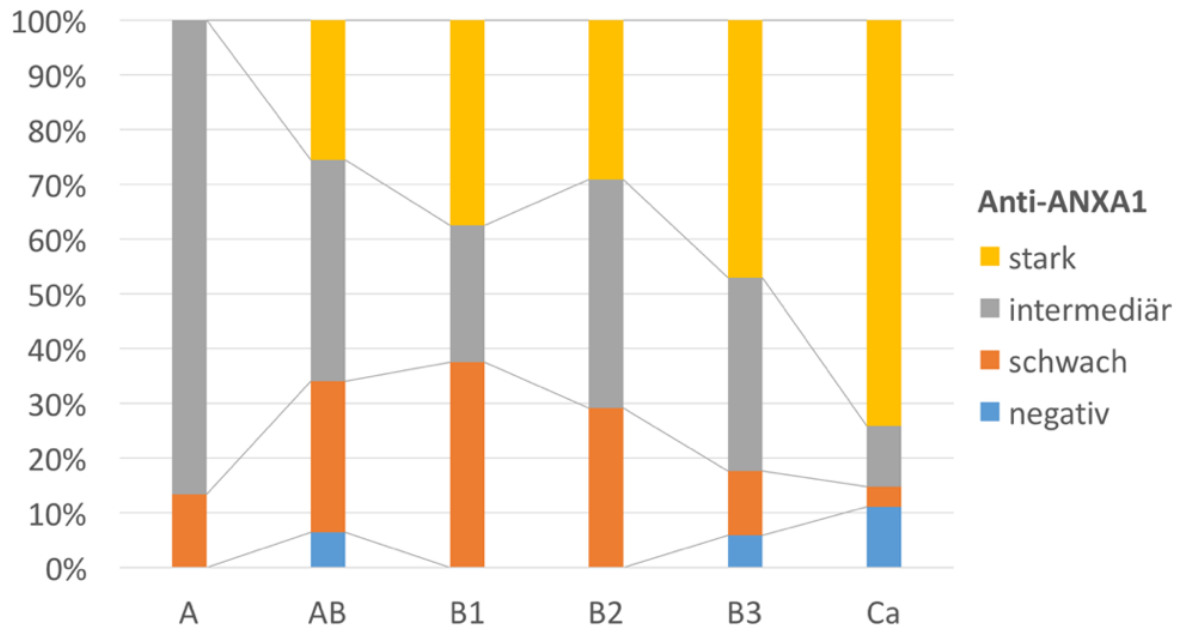


Abb. 26 Statistische Auswertung TMA Anti-ANXA1

Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von ANXA1). y-Achse: prozentuale Verteilung. x-Achse: Thymustumoren Typ A-TC.

Anti-ANXA1

Insgesamt	Negativ(%)	Schwach(%)	Intermediär(%)	Stark(%)	Total
Typ A	0 (0)	2 (13,33)	13 (86,67)	0 (0)	15
Typ AB	3 (6,38)	13 (27,66)	19 (40,43)	12 (25,53)	47
Typ B1	0 (0)	6 (37,5)	4 (25)	6 (37,5)	16
Typ B2	0 (0)	7 (29,17)	10 (41,67)	7 (29,17)	24
Typ B3	1 (5,88)	2 (11,76)	6 (35,29)	8 (47,06)	17
TC	3 (11,11)	1 (3,7)	3 (11,11)	20 (74,07)	27
Gesamt	7	31	55	53	146

Tab. 15 Absolute Auswertung TMA Anti-ANXA1

Absolute und prozentuale Verteilung der Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von ANXA1.

4.8.2 Überlebenszeitanalyse mit Anti-ANXA1

Die statistische Auswertung der Immunhistochemie in 4.8.1 zeigte, dass Thymuskarzinome signifikant häufiger eine starke Proteinexpression von ANXA1 aufwiesen als die Gruppe der Thymome. Aufgrund des invasiveren Wachstums von Thymuskarzinomen wurde untersucht, ob die Expression von ANXA1 die Überlebenszeit nach dem Zeitpunkt der Diagnose

signifikant beeinflusst. Hierzu wurde eine Überlebenszeitanalyse mit der Expression von ANXA1 als variabler Faktor wie in 3.9 beschrieben durchgeführt (s. Abb. 27). Insgesamt gingen 60 Fälle in die Analyse ein, davon 6 A-, 20 AB-, 2 B1-, 16 B2-, 8 B3-Thymome und 8 TC. Für eine erhöhte Aussagekraft der Kaplan-Meier-Kurven wurden Fälle mit negativer oder schwacher (0-3 Punkte 20 Fälle, blaue Kurve) und Fälle mit intermediärer oder starker (4-6 Punkte 40 Fälle, rote Kurve) Proteinexpression zusammengefasst. Die genaue Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (Typ A-TC) ist in Tab. 16 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Kurven ähnlich verlaufen und sich am 13. und 71. Monat kreuzen. Die kumulierten Überlebensanteile werden durch die Expression von ANXA1 nicht signifikant verändert (Logrank-Test, $p = 0,72$)

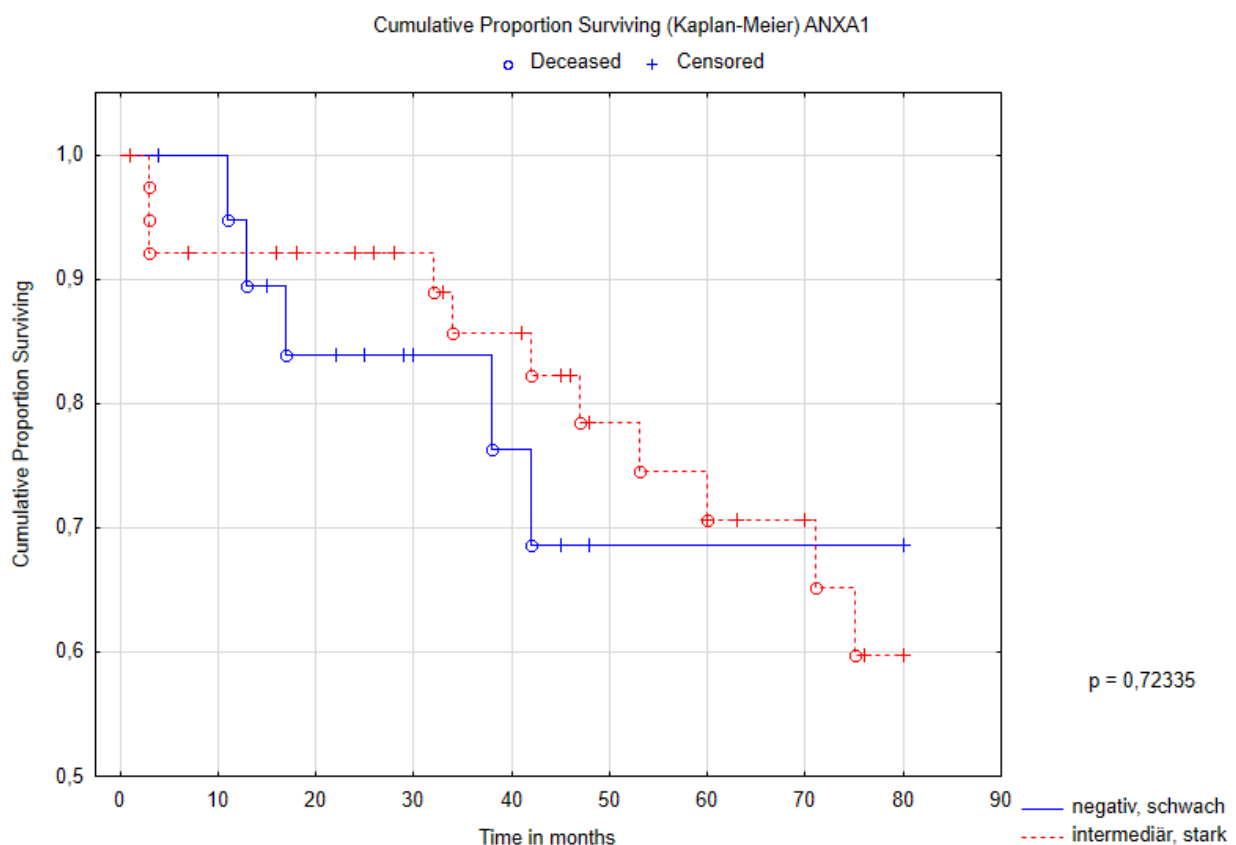


Abb. 27 Überlebenszeitanalyse ANXA1

Kaplan-Meier-Verfahren zur Analyse von Thymustumoren. Prognostischer Faktor ist die Expression von ANXA1. y-Achse: Kumulierte Überlebensanteile. x-Achse: Zeit in Monaten.

ANXA1(↓)		ANXA1(↑)	
WHO	n	WHO	n
Typ A	1	Typ A	5
Typ AB	10	Typ AB	10
Typ B1	1	Typ B1	1
Typ B2	4	Typ B2	12
Typ B3	2	Typ B3	6
TC	2	TC	6

Tab. 16 ANXA1 Fallzahlen (n) Überlebenszeitanalyse

Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (A-TC) in den Vergleichsgruppen. Links: ANXA1 negativ, schwach (0-3 Punkte, blaue Kurve); Rechts ANXA1 intermediär, stark (4-6 Punkte, rote Kurve). Invasiv wachsende Tumoren wie B3 und TC sind grau unterlegt.

4.9 Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) der Zelllinien IU-TAB-1 und T1889

Mit den erhobenen SILAC-Daten der Zelllinien IU-TAB-1 (AB-Thymom) und T1889 (Thymuskarzinom) wurde eine Gene Set Enrichment Analysis durchgeführt. Dies fand in Kooperation mit Dr. rer. nat. Li Beißbarth des Pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Göttingen statt. Für die GSEA wurde aus den SILAC-Daten eine *ranked gene list* erstellt, welche anschließend mit dem definierten *Gene Set C5 (GO gene sets)* der *molecular signature database* abgeglichen wurde. Im Vergleich der Karzinom- (T1889) und Thymomzelllinie (TAB1) konnten Anreicherungsprofile von insgesamt 9681 *gene sets* verzeichnet werden. In Tab. 17 und Tab. 18 sind die *gene sets* mit den niedrigsten (Anreicherung in Zelllinie TAB1) bzw. höchsten (Anreicherung in Zelllinie T1889) *normalized enrichment scores* (NES) gezeigt. An Position 9611 befindet sich der MCM-Pathway mit einem NES von 1,9709. Der zugehörige *enrichment plot* ist in Abb. 28 dargestellt. Hier ist zu sehen, dass keinerlei Anreicherung in der Zelllinie TAB1 stattfindet. Dieser Unterschied war hochsignifikant. Als Teil des *pathway* wies MCM7 in der massenspektrometrischen Auswertung die höchste Ratio auf (T1889/TAB1 = 2,46, p = 0,04, Intensität = 10,51 s. Tab. 19).

position	gene set	NES	p-value
1	CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_MESENCHYMAL_UP	-2,3577	0
2	MODULE_139	-2,2019	0
3	GOLGI_APPARATUS_PART	-2,0838	0
4	MODULE_180	-2,0358	0
5	GSE20715_WT_VS_TLR4_KO_LUNG_DN	-2,0062	0
6	COLDREN_GEFITINIB_RESISTANCE_DN	-1,9756	0
7	SMID_BREAST_CANCER_BASAL_DN	-1,9716	0
8	GOLGI_APPARATUS	-1,9667	0
9	CHR20Q13	-1,9426	0,0016
10	NIKOLSKY_BREAST_CANCER_20Q12_Q13_AMPLICON	-1,9228	0
11	COATED_VESICLE	-1,9224	0
12	CHR17Q23	-1,8865	0,0017
13	GSE26669_CD4_VS_CD8_TCELL_IN_MLR_UP	-1,8792	0
14	CHR19P13	-1,873	0
15	TURASHVILI_BREAST_NORMAL_DUCTAL_VS_LOBULAR_UP	-1,8478	0
16	YANG_BREAST_CANCER_ESR1_BULK_UP	-1,8393	0
17	CHR21Q22	-1,8388	0,0016
18	LIM_MAMMARY_STEM_CELL_DN	-1,8227	0
19	CHR12Q24	-1,8194	0
20	MODULE_40	-1,8148	0,003
21	CHR16Q22	-1,8136	0
22	PROTEIN_TARGETING_TO_MITOCHONDRION	-1,8114	0,0017
23	GSE17721_CTRL_VS_POLYIC_2H_BMDM_UP	-1,8088	0
24	REACTOME_LYSOSOME_VESICLE_BIOGENESIS	-1,8024	0,0017
25	WAMUNYOKOLI_OVARIAN_CANCER_LMP_UP	-1,7931	0
26	CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_BASAL_UP	-1,7625	0
27	GOLGI_MEMBRANE	-1,7602	0,0015
28	MURAKAMI_UV_RESPONSE_6HR_UP	-1,7575	0
29	KEGG_RIG_I LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1,7527	0,0097
30	FINETTI_BREAST_CANCERS_KINOME_GRAY	-1,7524	0
31	PID_FCER1PATHWAY	-1,742	0,0018
32	GSE27786_NKCELL_VS_NEUTROPHIL_UP	-1,7404	0
33	KEGG_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	-1,7335	0,0034
34	CAHOY_NEURONAL	-1,7321	0,0035
35	PHOSPHOTRANSFERASE_ACTIVITY_PHOSPHATE_GROUP_AS_ACCEPTOR	-1,7265	0,0113
36	FERREIRA_EWINGS_SARCOMA_UNSTABLE_VS_STABLE_DN	-1,7238	0,005
37	NUCLEOBASENUCLEOSIDENUCLEOTIDE_KINASE_ACTIVITY	-1,7228	0,0035
38	LIEN_BREAST_CARCINOMA_METAPLASTIC_VS_DUCTAL_DN	-1,7184	0,0083
39	VANTVEER_BREAST_CANCER_ESR1_UP	-1,7149	0,0031
40	V\$AR_02	-1,7149	0,0035
41	GLUCOSE_METABOLIC_PROCESS	-1,7146	0,0067
42	REACTOME_MEMBRANE_TRAFFICKING	-1,7141	0
43	CHR3P25	-1,7101	0,0069
44	MTOR_UP.V1_DN	-1,708	0,0051
45	CLATHRIN_COATED_VESICLE	-1,7065	0,0117
46	GALLUZZI_PREVENT_MITOCHONDIAL_PERMEABILIZATION	-1,7026	0,0034
47	V\$LMO2COM_01	-1,6952	0,0048
48	CHR16P13	-1,6945	0,003
49	REACTOME_GOLGI_ASSOCIATED_VESICLE_BIOGENESIS	-1,6943	0,0061
50	KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	-1,6937	0,0049
51	ALCOHOL_METABOLIC_PROCESS	-1,6932	0,0016
52	CYTOPLASMIC_MEMBRANE_BOUND_VESICLE	-1,6905	0,0075
53	GSE15733_BM_VS_SPLEEN_MEMORY_CD4_TCELL_DN	-1,688	0,0027
54	GOLGI_ASSOCIATED_VESICLE	-1,6856	0,0048
55	KEGG_VEGF_SIGNALING_PATHWAY	-1,6847	0,015
56	KIM_RESPONSE_TO_TSA_AND_DECITABINE_UP	-1,6828	0,0017
57	MODULE_327	-1,6752	0,0101
58	MAYBURD_RESPONSE_TO_L663536_UP	-1,6738	0,0034
59	GSE15324_NAIVE_VS_ACTIVATED_CD8_TCELL_UP	-1,669	0,0156
60	MODULE_227	-1,6686	0,0018
61	XU_GH1_AUTOCRINE_TARGETS_DN	-1,6683	0,0047
62	VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT	-1,6662	0,0041
63	LIANG_SILENCED_BY_METHYLATION_UP	-1,6659	0,0017
64	JACKSON_DNMT1_TARGETS_UP	-1,6649	0,0079
65	CREIGHTON_AKT1_SIGNALING_VIA_MTOR_DN	-1,6645	0,0146
66	ESC_J1_UP_EARLY.V1_UP	-1,6611	0,0119
67	VANTVEER_BREAST_CANCER_BRCA1_DN	-1,6569	0,012
68	VESICLE	-1,656	0,0106
69	MEMBRANE_BOUND_VESICLE	-1,6549	0,0029
70	VECCHI_GASTRIC_CANCER_ADVANCED_VS_EARLY_DN	-1,6534	0,0079
71	MODULE_418	-1,6514	0
72	CYTOPLASMIC_VESICLE	-1,6493	0,0044
73	KEGG_ENDOMETRIAL_CANCER	-1,6481	0,0182
74	TERAMOTO_OPN_TARGETS_CLUSTER_7	-1,6479	0,0103
75	VESICLE_COAT	-1,6472	0,0209
76	PID_ADISS_2PATHWAY	-1,6409	0,0082
77	GSE34205_RSV_VS_FLU_INF_INFANT_PBMIC_UP	-1,6385	0,0078
78	CARBOHYDRATE_BIOSYNTHETIC_PROCESS	-1,6374	0,0087
79	LI_DCP2_BOUND_MRNA	-1,6358	0,0074
80	DCA_UP.V1_UP	-1,6357	0,0157

Tab. 17 Auswertung Gene Set Enrichment Analysis

Aufgelistet sind die 80 *gene sets* mit dem niedrigsten *normalized enrichment score* (NES), sprich der stärksten Expression in TAB1. Mit angegeben ist der p-Wert

position	gene set	NES	p-value
9602	GNF2_CCNB2	1,9563	0
9603	GNF2_GLTSCR2	1,9593	0
9604	INTRINSIC_TO_PLASMA_MEMBRANE	1,9601	0
9605	MODULE_47	1,9625	0
9606	GNF2_RFC4	1,9649	0
9607	CORDENONSI_YAP_CONSERVED_SIGNATURE	1,965	0,0049
9608	REACTOME_INFLUENZA_LIFE_CYCLE	1,9653	0
9609	COFACTOR_CATABOLIC_PROCESS	1,9669	0
9610	ZHOU_CELL_CYCLE_GENES_IN_IR_RESPONSE_6HR	1,9687	0
9611	BIOCARTA_MCM_PATHWAY	1,9709	0
9612	GSE360_CTRL_VS_L_DONOVANI_DC_DN	1,9726	0,003
9613	GOLDRATH_NAIVE_VS_EFF_CD8_TCELL_DN	1,9746	0
9614	JOHANSSON_GLIOMAGENESIS_BY_PDGF_UP	1,9765	0
9615	DAUER_STAT3_TARGETS_UP	1,9795	0
9616	GOZGIT_ESR1_TARGETS_UP	1,9807	0
9617	INTEGRAL_TO_PLASMA_MEMBRANE	1,9828	0
9618	GNF2_CENPF	1,986	0,0027
9619	CELLULAR_RESPIRATION	1,9863	0,0027
9620	AEROBIC_RESPIRATION	1,9876	0
9621	GNF2_FEN1	1,99	0
9622	REACTOME_ASSOCIATION_OF_TRIC_CCT_WITH_TARGET_PROTEINS_DURING_BIOSYNTHESIS	1,992	0
9623	GSE29618_MONOCYTE_VS_PDC_UP	1,996	0
9624	MORI_IMMATURE_B_LYMPHOCYTE_DN	1,9974	0
9625	KEGG_HYPERTROPHIC_CARDIOMYOPATHY_HCM	2	0
9626	REN_BOUND_BY_E2F	2,0013	0
9627	CATION_TRANSPORT	2,0033	0
9628	RB_P107_DN.V1_UP	2,0053	0
9629	WANG_RESPONSE_TO_GSK3_INHIBITOR_SB216763_DN	2,0264	0
9630	CHR1Q23	2,0294	0
9631	PASINI_SUZ12_TARGETS_DN	2,0313	0
9632	MATZUK_SPERMATOCYTE	2,0319	0
9633	BRUNO_HEMATOPOIESIS	2,0431	0
9634	PUJANA_BREAST_CANCER_WITH_BRCA1_MUTATED_UP	2,0441	0
9635	RAF_UP.V1_UP	2,0473	0
9636	GSE24142_DN2_VS_DN3_THYMOCYTE_UP	2,0503	0
9637	KEEN_RESPONSE_TO_ROSIGLITAZONE_DN	2,07	0
9638	MODULE_122	2,0716	0
9639	BROWNE_HCMV_INFECTION_20HR_DN	2,0766	0
9640	EGFR_UP.V1_UP	2,0779	0
9641	GNF2_CCNA2	2,0866	0
9642	GNF2_RRM1	2,0891	0
9643	REACTOME_FORMATION_OF_THE_TERNARY_COMPLEX_AND_SUBSEQUENTLY_THE_43S_COMPLEX	2,0934	0
9644	CHANG_CYCLING_GENES	2,1013	0
9645	RHODES_UNDIFFERENTIATED_CANCER	2,1109	0
9646	MODULE_29	2,1158	0
9647	MODULE_57	2,1193	0
9648	MODULE_321	2,1195	0
9649	CROONQUIST_NRAS_VS_STROMAL_STIMULATION_DN	2,1276	0
9650	LE_EGR2_TARGETS_UP	2,1516	0
9651	REACTOME_G2_M_CHECKPOINTS	2,1734	0
9652	AFFAR_Y1_TARGETS_DN	2,175	0
9653	GOLDRATH_EFF_VS_MEMORY_CD8_TCELL_UP	2,1753	0
9654	REACTOME_3_UTR_MEDIATED_TRANSLATIONAL_REGULATION	2,1952	0
9655	GNF2_PCNA	2,1992	0
9656	SMID_BREAST_CANCER_BASAL_UP	2,2062	0
9657	GTGACTT_MIR-224	2,2089	0
9658	GSE29618_BCELL_VS_PDC_UP	2,2151	0
9659	LEE_LIVER_CANCER_DENA_UP	2,2151	0
9660	CROONQUIST_NRAS_SIGNALING_DN	2,2248	0
9661	WU_APOPTOSIS_BY_CDKN1A_VIA_TP53	2,2303	0
9662	REACTOME_PEPTIDE_CHAIN_ELONGATION	2,2322	0
9663	LIEN_BREAST_CARCINOMA_METAPLASTIC_VS_DUCTAL_UP	2,2322	0
9664	EGUCHI_CELL_CYCLE_RB1_TARGETS	2,2349	0
9665	GSE12366_GC_VS_MEMORY_BCELL_UP	2,2471	0
9666	GRAHAM_NORMAL QUIESCENT_VS_NORMAL_DIVIDING_DN	2,2498	0
9667	REACTOME_ACTIVATION_OF_THE_PRE_REPLICATIVE_COMPLEX	2,281	0
9668	GSE26495_NAIVE_VS_PD1HIGH_CD8_TCELL_DN	2,282	0
9669	REACTOME_ACTIVATION_OF_ATR_IN_RESPONSE_TO_REPLICATION_STRESS	2,2875	0
9670	KEGG_RIBOSOME	2,291	0
9671	POTTI_TOPOTECAN_SENSITIVITY	2,3089	0
9672	REACTOME_INFLUENZA_VIRAL_RNA_TRANSCRIPTION_AND_REPLICATION	2,3134	0
9673	CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_BASAL_DN	2,3518	0
9674	CROONQUIST_IL6_DEPRIVATION_DN	2,3633	0
9675	SMID_BREAST_CANCER_LUMINAL_B_DN	2,4091	0
9676	SCHUETZ_BREAST_CANCER_DUCTAL_INVASIVE_UP	2,4285	0
9677	HUANG_DASATINIB_RESISTANCE_UP	2,4369	0
9678	REACTOME_SRP_DEPENDENT_COTRANSLATIONAL_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	2,4411	0
9679	STRUCTURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME	2,4773	0
9680	GSE29618_PDC_VS_MDC_DAY7_FLU_VACCINE_DN	2,4807	0
9681	CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_MESENCHYMAL_DN	2,624	0

Tab. 18 Auswertung Gene Set Enrichment Analysis

Aufgelistet sind die 80 *gene sets* mit dem höchsten NES, sprich der stärksten Anreicherung in T1889. Mit angegeben ist der p-Wert. An Position 9611 befindet sich der MCM-Pathway.

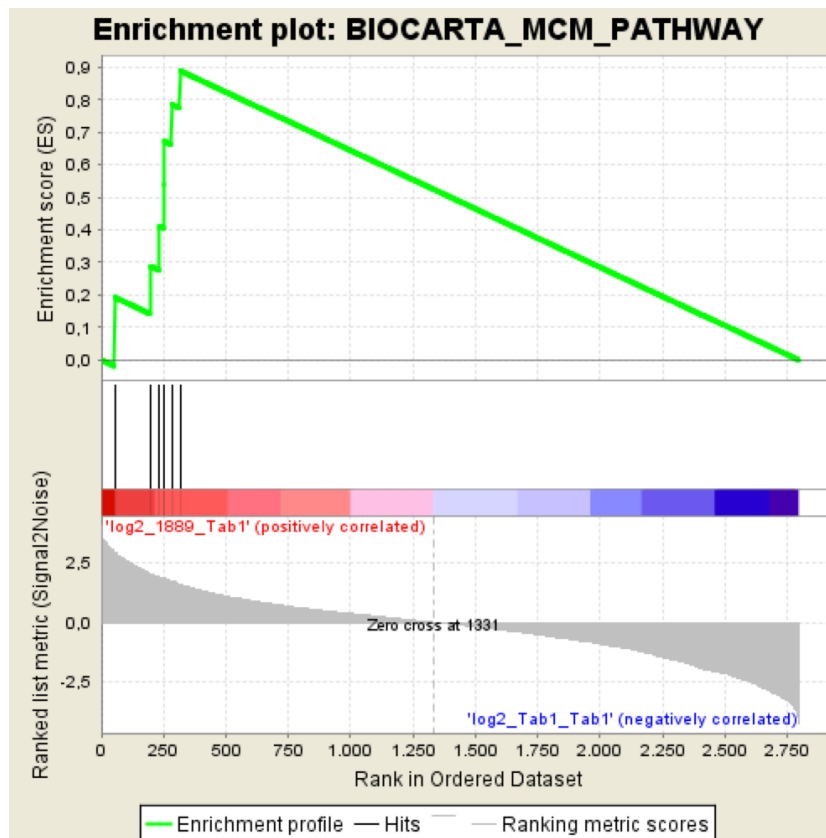


Abb. 28 GSEA Enrichment Plot des MCM Pathway.

Gegenüberstellung der Zelllinien T1889 und TAB1 (Kapitel 3.1.2) bezogen auf die Expression von Genen des MCM Pathway.

Massenspektrometrische Auswertung des MCM Pathway

<i>Gene names</i>	<i>Protein names</i>	<i>Ratio 1889 / Tab1</i>	<i>p-Value</i>	<i>Intensity</i>
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	2.46483317	0.0423054	10.5147
MCM4	DNA replication licensing factor MCM4	2.35953079	0.0540504	10.2305
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	2.36429491	0.0579689	10.1627
MCM6	DNA replication licensing factor MCM6	2.23389287	0.0724956	10.5449
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	2.21800098	0.075243	10.3465
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	2.02956423	0.117038	10.4521

Tab. 19 Massenspektrometrische Auswertung des MCM Pathway

Darstellung mit Namen des Gens und Proteins, der Ratio T1889/TAB1, p-Wert und Intensität.

4.10 MCM7

4.10.1 Immunhistochemische Färbung mit MCM7

Wie in Abschnitt 4.9 beschrieben zeigte die GSEA im Vergleich T1889 (Karzinomzelllinie) vs. TAB1 (Thymom-Zelllinie) eine vermehrte Anreicherung von MCM7 zugunsten T1889. Zur immunhistochemischen Darstellung der Proteinexpression wurden Schnitte der in 3.7

beschriebenen TMA-Blöcke mit einem gegen MCM7 spezifischen Antikörper gefärbt. Insgesamt konnte von 143 Tumoren die Proteinexpression bestimmt werden (s. Kapitel 3.8.3). Darunter waren 15 A-, 45 AB-, 17 B1-, 23 B2-, 17 B3-Thymome und 26 Thymuskarzinome. Abb. 29 zeigt das Spektrum der Farbintensität des Antikörpers.

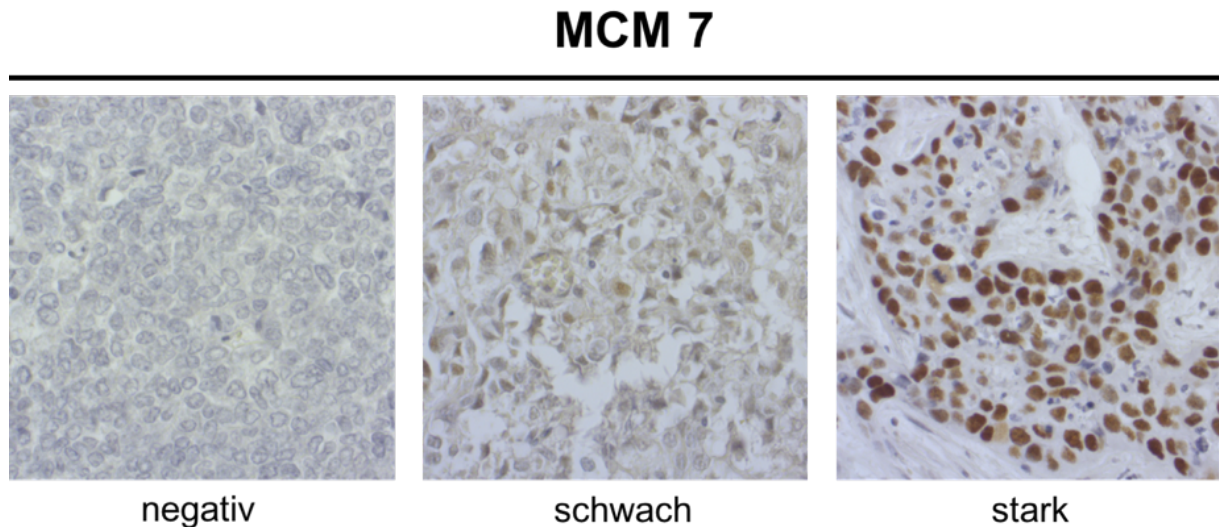


Abb. 29

Farbintensität der Immunhistochemie mit MCM7

Links MCM7 negative Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Mitte MCM7 schwach positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40. Rechts MCM7 stark positive Tumorzellen, TC, Vergrößerung x40

Die Gewebstanzen von 14 Fällen konnten aufgrund mechanischer oder methodischer Beschädigung in der Herstellung nicht ausgewertet werden. In der Gruppe der Thymome wurde in 81 der 117 Fälle eine Immunfärbung des Zellkerns festgestellt. 21-mal zeigte sich eine schwache Proteinexpression, 36-mal intermediär und 24-mal stark. Im Vergleich dazu zeigten 16 von 26 Thymuskarzinomen eine positive immunhistochemische Färbung. Fünf Karzinome zeigten eine starke, eines eine intermediär und zehn eine starke Proteinexpression (s. Abb. 30, Tab. 20). Anhand einer positiven Immunhistochemie kann mit dem Antikörper MCM7 nicht zwischen Thymom und Thymuskarzinom unterschieden werden, da hier kein signifikanter Unterschied besteht (Fisher-Yates-Test $p = 1$). Vergleicht man die Entitäten untereinander, fällt auf, dass keines der A-Thymome eine starke Proteinexpression aufweist. Der Unterschied Typ A vs. TC erwies sich zudem als signifikant ($p = 0,02$), der Vergleich Thymom vs. TC hingegen nicht ($p = 0,16$). Zwischen den Entitäten waren ansonsten keine signifikanten Unterschiede auf Proteinebene auszumachen.

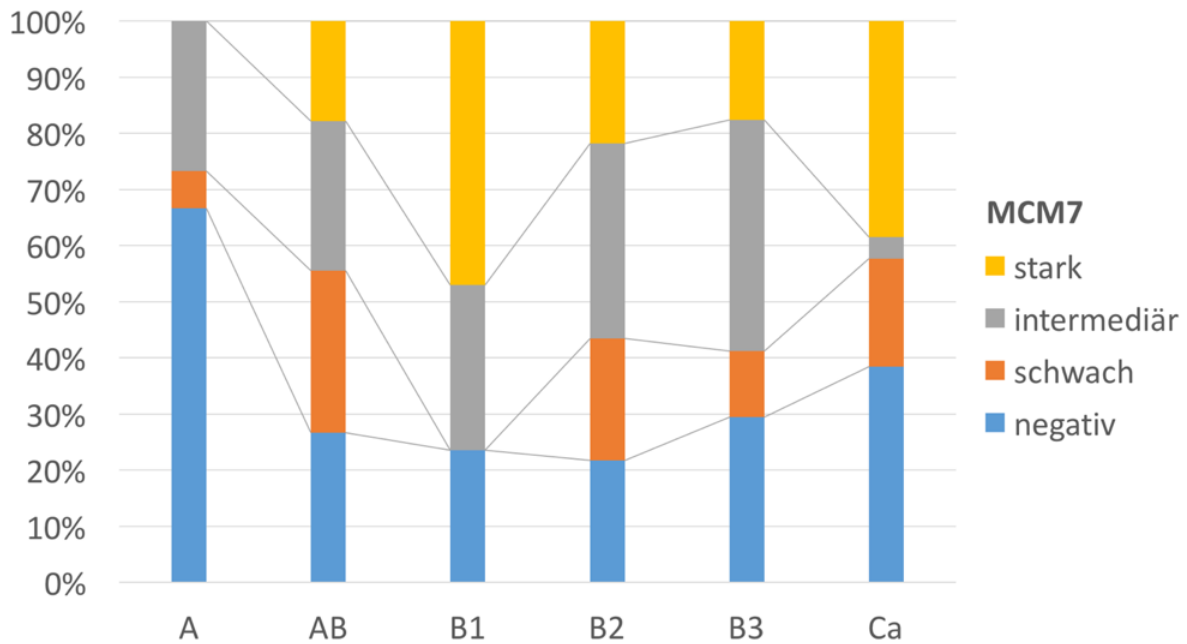


Abb. 30 Statistische Auswertung TMA Anti-MCM7

Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von MCM7. y-Achse: prozentuale Verteilung. x-Achse: Thymustumoren Typ A-TC.

MCM7

Insgesamt	Negativ(%)	Schwach(%)	Intermediär(%)	Stark(%)	Total
Typ A	10 (66,67)	1 (6,67)	4 (26,67)	0 (0)	15
Typ AB	12 (26,67)	13 (28,89)	12 (26,67)	8 (17,78)	45
Typ B1	4 (23,53)	0 (0)	5 (29,41)	8 (47,06)	17
Typ B2	5 (21,74)	5 (21,74)	8 (34,78)	5 (21,74)	23
Typ B3	5 (29,41)	2 (11,76)	7 (41,18)	3 (17,65)	17
TC	10 (38,46)	5 (19,23)	1 (3,85)	10 (38,46)	26
Gesamt	46	26	37	34	143

Tab. 20 Absolute Auswertung TMA MCM7 (D10A11) XP[®] Rabbit mAb

Absolute und prozentuale Verteilung der Proteinexpression (negativ, schwach, intermediär, stark) von MCM7.

4.10.2 Überlebenszeitanalyse MCM7

Um zu überprüfen, ob die Expression von MCM7 die Überlebenszeit von Patienten mit TET beeinflusst, wurde, wie in 3.9 beschrieben, eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Insgesamt gingen 57 Fälle in die Analyse mit ein, davon 6 A-, 18 AB-, 2 B1-, 15 B2-, 8 B3-

Thymome und 8 TC. Als prognostischer Faktor wurde die Expression von MCM7 verwendet. Verglichen wurde die Gruppe der negativen MCM7-Expression (0 Punkte, 18 Fälle) mit der Gruppe der schwachen, intermediären und starken CRABP2-Expression (2-6 Punkte, 39 Fälle). Die genaue Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (Typ A-TC) ist in Tab. 21 dargestellt. Die blaue Kurve ist MCM7(-), rot zeigt MCM7(+) (s. Abb. 31). Ab dem 3. Monat ist keine Expression von MCM7 dauerhaft mit einer schlechteren Prognose assoziiert als eine positive Proteinexpression. Trotz der zu erkennenden Tendenz stellte sich dieser Unterschied im Logrank-Test als nicht signifikant dar ($p = 0,13$).

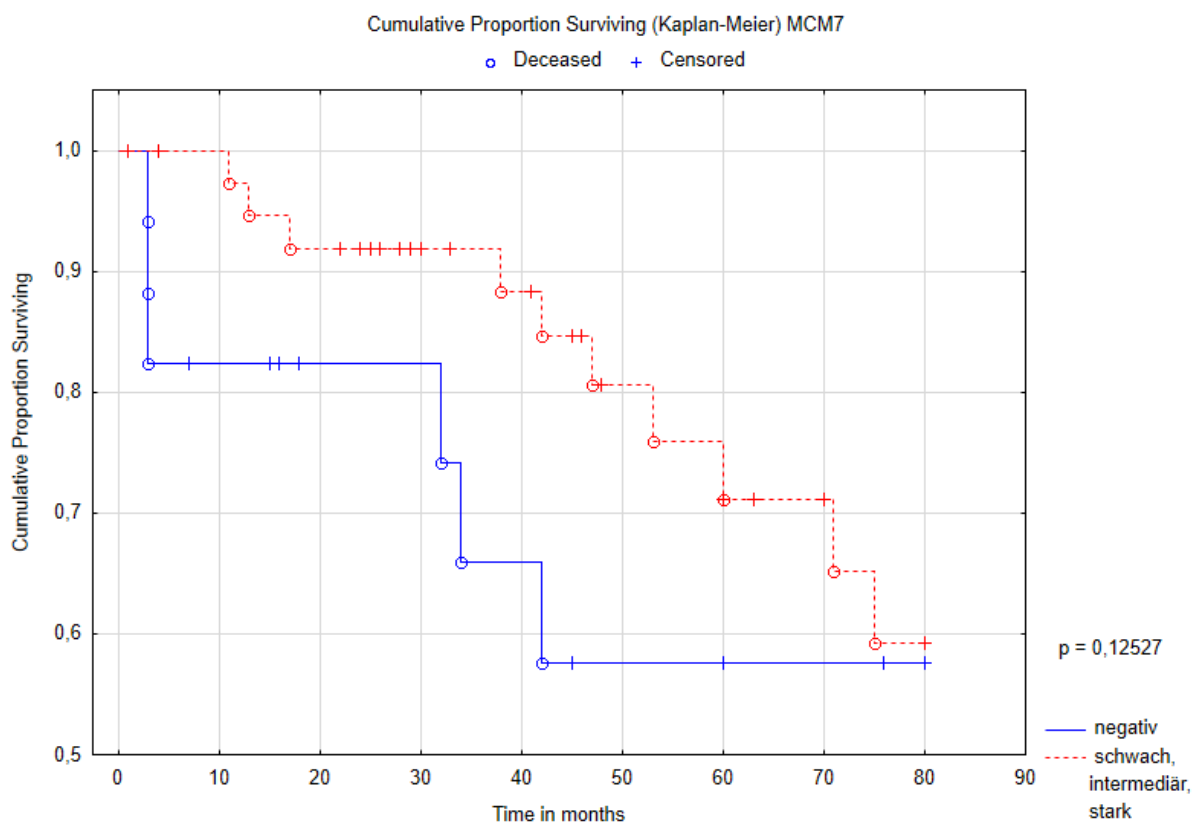


Abb. 31 Überlebenszeitanalyse MCM7

Kaplan-Meier-Verfahren zur Analyse von Thymustumoren. Prognostischer Faktor ist die Expression von MCM7. y-Achse: Kumulierte Überlebensanteile. x-Achse: Zeit in Monaten.

MCM7(-)		MCM7(+)	
WHO	n	WHO	n
Typ A	4	Typ A	2
Typ AB	2	Typ AB	16
Typ B1	1	Typ B1	1
Typ B2	3	Typ B2	12
Typ B3	3	Typ B3	5
TC	5	TC	3

Tab. 21 MCM7 Fallzahlen (n) Überlebenszeitanalyse
 Verteilung der Tumorentitäten nach WHO (A-TC) in den Vergleichsgruppen. Links: MCM7 negativ (0 Punkte, blaue Kurve); Rechts MCM7 positiv (2-6 Punkte, rote Kurve). Invasiv wachsende Tumoren wie B3 und TC sind grau unterlegt.

5 Diskussion

Diagnostik und prognostische Faktoren sind seit Etablierung der WHO-Klassifikation von Thymustumoren kontrovers diskutierte Themen (Rosai und Sobin 1999). Reviews belegten die unzureichende Reproduzierbarkeit der diagnostischen Unterteilung von Thymustumoren in die Subgruppen Typ A-B3 und TC (Detterbeck 2006; Suster und Moran 2008; Weis et al. 2015). Diese ist essenziell wichtig, da Therapiestrategien auf der histologischen Klassifikation nach WHO basieren (Girard et al. 2009; Girard et al. 2015). Tumoren des Typs B2, B3 und TC sind aggressiver und sind folglich mit einem höheren klinischen Stadium nach Masaoka-Koga assoziiert (Detterbeck 2006; Weis et al. 2015). Hierdurch ergibt sich insbesondere beim Vorliegen dieser Entitäten häufig die Notwendigkeit eines multimodalen therapeutischen Vorgehens. Alle Subgruppen weisen allerdings mitunter aggressive und somit ungünstige Verlaufsformen auf, wodurch unabhängige prädiktive Faktoren zur Prognose weiterhin Gegenstand der Forschung sind.

Ziel dieser Studie war es, durch verschiedene analytische Methoden Proteine zu identifizieren, die einerseits dabei helfen, den diagnostischen Prozess zu objektivieren und andererseits die Prognose von Patienten mit Erkrankung an einem Thymustumor beeinflussen.

5.1 Genetische Identifikation von Biomarkern epithelialer Thymustumoren

5.1.1 Affymetrix GeneChip®-Analyse von Thymusepithel-Tumoren

Von jeweils 24 TET wurde eine Affymetrix GeneChip®-Analyse durchgeführt. Die Durchführung und Auswertung fand durch den wissenschaftlichen Mitarbeiter Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Carsten Sticht der Medizinischen Fakultät Mannheim statt. Anschließend wurde die Genexpression von B3-Thymomen und TC sowie von allen Thymomen und TC miteinander verglichen. Primär sollten Gene dargestellt werden, deren Expression sich in Thymomen und Thymuskarzinomen signifikant unterscheidet. Insbesondere B3-Thymome ähneln histologisch und immunhistochemisch den Karzinomen (Roden et al. 2015; Marx et al. 2016), weshalb diese Gruppe gesondert betrachtet wurde. Diesen Fokus spiegeln die Fallzahlen der Subgruppen wider. Die Gruppen A-, AB- und B1-Thymom enthalten nicht genug Fallzahlen, um in der Affymetrix GeneChip®-Analyse als repräsentativ für die jeweilige Entität zu gelten (Typ A n=1; Typ AB n=2; Typ B1 n=1; Typ B2 n=3; Typ B3

n=12; TC n=5; s. Tab. 3). Für einen Vergleich x vs. A/AB/B1 müssten die Fallzahlen in den jeweiligen Gruppen bei einer erneuten Analyse aufgestockt werden.

Durch Anwendung der DNA-Microarray-Technologie lassen sich tausende Gene eines Gewebes simultan (Komura et al. 2006) und vergleichsweise kostengünstig darstellen. Allerdings zeigt die Methodik der Affymetrix GeneChip[®]-Analyse bei hohen Messwerten keine exakte Darstellung der Genexpression. Die Kinetik der Hybridisierungsreaktion beim Microarray ist entsprechend der Michaelis-Menten-Beziehung der Enzymkinetik eine Sättigungskurve, sodass hohe Konzentrationen von cDNA ab einem bestimmten Wert erschwert hybridisieren. Daher ist das gemessene fluoreszierende Signal zwar proportional zu der Menge an stattgefundenen Hybridisierungen, allerdings ist nur ein geringer Abschnitt von Hybridisierungsreaktion linear proportional zu der Menge an cDNA (Bumgarner 2013). Zudem ist es nicht möglich, ein *array* zu synthetisieren, in welchem ähnliche cDNA-Abschnitte nicht dieselbe Sequenz von Oligonukleotiden binden. Insbesondere im komplexen menschlichen Genom weisen Gene eines Pathways identische Basenabschnitte oder multiple Splicing-Verfahren auf (Bumgarner 2013). Aufgrund dieser Begrenzungen bewegt sich der Trend in Richtung *Next Generation Sequencing*. Hierdurch lässt sich eine lineare Genexpressionsanalyse ohne vorherige Kenntnis des Genoms durchführen (Wold et al. 2008).

Zur Validierung der Biomarker wurden Gewebeproben von Thymusepithel-Tumoren (TET) immunhistochemisch gefärbt. Um möglichst viele Gewebeproben simultan auszuwerten, wurden, wie in 3.7 beschrieben, Tissue Microarrays (TMA) aus 157 TET angefertigt. Durch die erhöhte Prävalenz von AB-Thymomen gilt es zu beachten, dass diese Entität im TMA-Kollektiv mit 47 Tumoren (30%) überrepräsentiert ist. Um eine Verzerrung (Bias) in der statistischen Analyse zu vermeiden, sollte bei einer erneuten Analyse darauf geachtet werden, dass die Entitäten in vergleichbar großen Gruppen repräsentiert werden.

5.1.2 Genetische Diagnosemarker PNMAL1 und HEPACAM2

Die Auswertung ergab im Vergleich TSCC vs. B3 und TSCC vs. Rest 3367 signifikant regulierte Gene, wobei PNMAL1 hohe und hochsignifikante Unterschiede aufwies ($\log_2(\text{Ratio TSCC/B3}) = -5,06$; $p < 0,0001$ sowie $\log_2(\text{Ratio TSCC/Rest}) = -5,45$, $p < 0,0001$). Das Gen PNMAL1 (*paraneoplastic ma antigen family like 1*) codiert für PNMA-like protein 1 (auch PNMA1 oder PNMAL1), welches mit fünf weiteren Proteinen zur PNMA-Familie

gehört. PNMAL1-3 wurden erstmalig 1999 im Serum von Patienten mit paraneoplastischem Syndrom (PNS) in Zusammenhang mit einem erweiterten Krankheitsprozess beschrieben (Dalmau et al. 1999; Voltz et al. 1999). Patienten mit PNS zeigten bei Expression von PNMAL-Proteinen eine Kombination aus Autoimmunerkrankung, Neurodegeneration und Krebsleiden (Rosenfeld et al. 2001; Wills et al. 2006; Braik et al. 2010; Cui et al. 2010; Yamamoto und Tsuji 2010; Law et al. 2012; Nahleh 2013; Ney et al. 2014). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die Genexpressionsanalyse eine signifikant stärkere Expression von PNMAL1 in der Gruppe der Thymome zeigte. Thymome sind in 50-70% der Fälle ebenfalls mit paraneoplastischen Syndromen, insbesondere mit Autoimmunerkrankungen, assoziiert. Hier ist als häufigste Erkrankung (30-50%) die Myasthenia gravis zu nennen (Marx et al. 2010; Kumar 2015).

Das Ergebnis der Genexpressionsanalyse konnte immunhistochemisch auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Thymuskarzinome wiesen signifikant häufiger eine starke immunhistochemische Färbung mit Anti-PNMAL1 auf ($p < 0,001$), sodass eine starke Proteinexpression für die Diagnose eines Thymuskarzinoms spricht, allerdings nicht spezifisch ist. Allein mit dem Vorliegen einer positiven oder negativen Immunhistochemie können Karzinome nicht von Thymomen abgegrenzt werden (Fisher-Yates-Test $p = 0,36$). Auffällig ist die Diskonkordanz von Genexpression und Proteinexpression. Die fehlende Korrelation von RNA- und Proteindaten wurde bereits 2014 von Zhang et al. beschrieben. Hier wurde das durch The Cancer Genome Atlas (TCGA) bestimmte Genom mit dem massenspektrometrisch bestimmten Proteom von Kolon- und Rektumkarzinomen verglichen. Die Korrelation von signifikant regulierten Produkten lag bei nur 32% (Zhang et al. 2014). Diese Diskonkordanz kommt vorwiegend durch posttranskriptionelle sowie -translationelle Regulationsmechanismen zustande (Abreu et al. 2009).

Weiterhin ergab die Genexpressionsanalyse hohe Unterschiede für HEPACAM2, diesmal zugunsten der Thymuskarzinome ($\log_2(\text{Ratio TSCC/B3}) = 5,39$; $p < 0,0001$ sowie $\log_2(\text{Ratio TSCC/Rest}) = 5,31$, $p < 0,0001$). *HEPACAM family member 2* oder auch *mitotic kinetics regulator* genannt (HEPACAM2 bzw. MIKI) kodiert mit HEPACAM1 die gleichnamigen Proteine, die zu der *immunoglobulin superfamily* gehören. Diese ist Teil der *cell adhesion molecules* und wirkt sich auf die Zellmotilität aus (Edelman 1986; Edelman und Crossin 1991; Hunter et al. 1996; Moh et al. 2005; Ozaki et al. 2012). HEPACAM1 wurde erstmalig 2005 in Zusammenhang mit dem Hepatozellulären Karzinom beschrieben, allerdings als Tumorsuppressorgen. Dort wirkte es über die p53-, p27- und p21-Signalkaskade pro-

apoptotisch (Klopffleisch et al. 2010). HEPACAM2 wird während der Mitose in der Prometaphase für die Reifung des Zentrosoms benötigt. Nach einer multiplen ADP-Ribolysierung wird das Protein durch den Golgi-Apparat zu den mitotischen Zentromeren transloziert. Dort ist es essentiell zur Herstellung robuster Mikrotubuli, die der Chromosomenbewegung dienen (Ozaki et al. 2012). Im Kontext der Tumorentstehung ist über HEPACAM2 bislang nichts bekannt.

Der signifikante Unterschied auf Genebene konnte auf Proteinebene nicht gleichwertig reproduziert werden. Allein mit dem Vorliegen einer positiven Immunhistochemie lässt sich nicht zwischen Thymom und Thymuskarzinom unterscheiden ($p = 1$). Indes zeigte die Gruppe A-, B3-Thymome und Thymuskarzinome verglichen mit der Gruppe AB-, B1- und B2-Thymome signifikant häufiger den Ausprägungsgrad stark (Fisher-Yates-Test $p = 0,001$). Im Kontext der Literatur ist dies in zweierlei Hinsicht interessant. Einerseits gibt es bis dato keine immunhistochemische Färbung zur Unterscheidung von B-Thymomen. Bei Vorliegen eines B-Thymoms mit starker Expression von HEPACAM2 würde dies aufgrund des signifikanten Unterschiedes in der TMA-Auswertung für ein Typ-B3-Thymom sprechen. Andererseits sind B3-Thymome und Thymuskarzinome invasiv wachsende Tumoren und im klinischen Staging mit einem höheren Stadium nach Masaoka-Koga assoziiert (Ströbel et al. 2004b; Detterbeck et al. 2011; Weis et al. 2015), weshalb die Tumorexpression von HEPACAM2 mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (s. Kapitel 5.1.3). Vergleicht man die Gruppen Thymom vs. Thymuskarzinom miteinander, zeigte letztere signifikant häufiger eine starke Proteinexpression ($p = 0,02$), sodass eine starke Expression von HEPACAM2 für das Vorliegen eines Karzinoms spricht.

Ein Beispiel für eine positive Korrelation zwischen RNA- und Protein-Daten stellte in dieser Studie die Expression von KIT dar. In der Genexpressionsanalyse mit Affymetrix *GeneChips*[®] wies KIT eine Ratio zugunsten der Thymuskarzinome auf ($\log_2(\text{TSCC}/\text{B3}) = 6,07$; $p < 0,0001$ und $\log_2(\text{TSCC}/\text{Rest}) = 6,26$; $p < 0,0001$, s. Abb. 8, Abb. 9, Tab. 4). Dieser Expressionsunterschied konnte auf Proteinebene durch die Immunhistochemie mit dem antigenspezifischen Antikörper CD117 bestätigt werden. 21 von 34 Thymuskarzinomen zeigten eine positive Immunhistochemie, wohingegen nur 5 der 122 Thymome als positiv gewertet wurden (s. Abb. 12, Tab. 7). Mit der Auswertung konnten folglich bereits publizierte Daten reproduziert werden (Henley et al. 2004; Pan et al. 2004; Ströbel et al. 2004a). Hier wird die Überexpression von KIT in einem Teil der Thymuskarzinome und dessen Funktion als immunhistochemischer Marker beschrieben.

Es lässt sich festhalten, dass eine starke Expression von PNMAL1 und HEPACAM2 im Tumorgewebe nicht spezifisch für Thymuskarzinome ist, da mitunter alle Entitäten eine starke Expression der Marker zeigten. Allerdings werden im Vergleich Thymom vs. TC PNMAL1 und HEPACAM2 signifikant häufiger „stark“ in Thymuskarzinomen exprimiert, sodass die beiden Marker in der histopathologischen Diagnostik helfen können, die Tumoren korrekt nach WHO-Klassifikation zu unterscheiden und die Reproduzierbarkeit zu verbessern.

5.1.3 Genetische Prognosemarker PNMAL1 und HEPACAM2

Bereits viele Studien stellten den Einfluss von Proteinexpression auf die Tumorerkrankung dar. Einzelne Proteine oder Proteingruppen wurden als unabhängiger Faktor für die Dignität und Prognose beschrieben (Shomori 1992; Fujjoka et al. 2009; Giaginis et al. 2010; Campos et al. 2011; Ota et al. 2011; Toyokawa et al. 2011; Sobral-Leite et al. 2015). Für Thymustumoren sind entsprechende Proteine nicht bekannt. In dieser Studie stellte sich HEPACAM2 auf Proteinebene, insbesondere bei aggressiv wachsenden Tumoren wie dem B3-Thymom und Thymuskarzinom, als stark exprimiert dar. Hierdurch ergab sich der Verdacht, dass auch Thymustumoren Proteine exprimieren, die den Verlauf günstig oder ungünstig beeinflussen. Um dem Verdacht nachzugehen, wurden Überlebenszeitanalysen von TET durchgeführt. Als prognostischer Faktor wurden die Proteine HEPACAM2 und PNMAL1 verwendet, da diese in der Genexpressionsanalyse eine signifikant differentielle Expression in Thymom und Thymuskarzinom aufwiesen. Um den Ausprägungsgrad der Proteinexpression zu bestimmen, wurden TMA-Schnitte bestehend aus TET immunhistochemisch mit den spezifischen Antikörpern gefärbt (s. Kapitel 3.7 und 3.8). Aus der immunhistochemischen Färbung wurde für jeden Tumor eine Summe (0-6 Punkte) aus Farbintensität und Anzahl der gefärbten Tumorzellen errechnet (s. Tab. 2). Die Prognose von Gruppen unterschiedlicher Punktzahlen wurde durch das Verfahren nach Kaplan-Meier dargestellt (s. Kapitel 3.9).

Für die Überlebenszeitanalyse von TET mit dem prognostischen Faktor der PNMAL1-Expression wurden Tumoren mit dem immunhistochemischen Score 0 Punkte (negativ) gegen Tumoren mit dem Score 2-6 Punkte (schwach, intermediär, stark) aufgetragen. Nach anfänglichen Überschneidungen ist die Kurve der positiven Proteinexpression (2-6 Punkte) nach dem 32. Monat dauerhaft mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Der Logrank-Test ergab einen Wert außerhalb des Signifikanzniveaus ($p = 0,33$, s. Abb. 16).

Die Überlebenszeitanalyse mit dem prognostischen Faktor HEPACAM2 zeichnete eine ähnliche Tendenz ab. Hier wurde die Prognose von Tumoren mit 0-3 Punkten (negativ,

schwach) gegen Tumoren mit 4-6 (intermediär, stark) Punkten gegenübergestellt, damit die jeweiligen Größen Vergleichsgruppen ausgeglichener sind. Auch hier ist die Kurve der vermehrten Proteinexpression (4-6 Punkte) ab dem 13. Monat kontinuierlich mit einer schlechteren Prognose assoziiert, allerdings ist auch der Unterschied zu der verminderten Expression (0-3 Punkte) nicht signifikant ($p = 0,36$, s. Abb. 19). Ein anzunehmender Grund für die Werte außerhalb des Signifikanzniveaus sind niedrige Fallzahlen in den zu vergleichenden Gruppen. Beispielsweise befinden sich in der Gruppe „HEPACAM2, 4-6 Punkte“ lediglich elf Patienten, wodurch die Zufallsvariable in der Signifikanzberechnung an Wertigkeit zunimmt. Dies lässt sich am eindrucksvollsten an der Überlebenszeitanalyse nach WHO-Klassifikation erkennen (s. Abb. 10). Die Abbildung zeigt kongruent zur Literatur (Detterbeck 2006) eindeutig kürzere Überlebenszeiten für Thymuskarzinome verglichen mit den Subgruppen Typ A, AB, B1 und B2. Trotzdem liegen p-Werte außerhalb des Signifikanzniveaus (z. B. A vs. TC $p = 0,2$), da die Fallzahlen in den Subgruppen innerhalb des Kollektivs der Überlebenszeitanalyse nicht groß genug sind. Es ist zu empfehlen, erneute Überlebenszeitanalysen mit dem prognostischen Faktor „Proteinexpression von PNMAL1 und HEPACAM2“ durchzuführen und dabei die Fallzahlen der Kohorten zu erhöhen. Sollten sich bei dieser Analyse signifikante Unterschiede in der Prognose ergeben, müsste die Unabhängigkeit des Faktors mit multivariaten Verfahren, z. B. Cox Regression, überprüft werden. Invasiv wachsende Tumoren wie B3 und TC zeigten bei der TMA-Auswertung häufiger eine vermehrte Proteinexpression. Folglich waren diese Tumoren bei der Überlebenszeitanalyse in derselben Vergleichsgruppe, sodass die Tendenz der Prognose ebenso von der histologischen Differenzierung B3 oder TC abhängig sein kann (s. Tab. 9, Tab. 11).

5.2 Proteomische Identifikation von Biomarkern epithelialer Thymustumoren

Wie in 5.1.2 beschrieben, ergab die Auswertung der diagnostischen Marker PNMAL1 und HEPACAM2 kein eindeutiges Ergebnis, um anhand einer positiven bzw. verstärkten immunhistochemischen Färbung sicher auf das Vorliegen einer Tumorentität schließen zu können. Eine immunhistochemische Färbung beruht auf der Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zwischen Protein und Antikörper. Dabei sind die Antigene proteinspezifisch, sodass eine Proteomanalyse bei der Identifikation von Biomarkern aussagekräftigere Ergebnisse erzielen könnte als die Genexpressionsanalyse. Hierzu wurden die Zelllinien IU-

TAB-1 (Abkürzung TAB1, Modell für Typ-AB-Thymom) und T1889 (Modell für Thymusepithelzellkarzinom) mit SILAC-Medium für mehr als sechs Zellteilungen kultiviert, um eine vollständige metabolische Markierung des Proteoms der Zellen mit Isotopenmarkierten Varianten der Aminosäuren Arginin und Lysin zu ermöglichen. Die lysierten Zelllinien wurden im Proteinmengenverhältnis 1:1 zusammengebracht und mit Trypsin proteolytisch zu Peptiden gespaltet (s. Kapitel 3.3 und 3.4). Anschließend wurde das Proteom massenspektrometrisch, in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen (Prof. Dr. Henning Urlaub) und dem Universitätsklinikum Frankfurt, Medizinische Klinik II – Hämatologie und Onkologie (Dr. Thomas Oellerich und Prof. Dr. Hubert Serve), mittels LC-MS/MS bestimmt. Durch die metabolische Markierung wurden die gemessenen Intensitäten einer Zelllinie zugeordnet und identifizierte Proteine als Ratio T1889/TAB1 quantifiziert.

Bei dieser Methodik der proteomischen Identifikation von Biomarkern für TET ist ein Kritikpunkt die Verwendung von nur zwei Zelllinien. Zum Zeitpunkt dieser Studie sind die einzig etablierten Zelllinien für Thymustumore IU-TAB-1 (Abkürzung TAB1 für AB-Thymom) und T1889 (Thymuskarzinom). Hierdurch sind die ausgewählten Marker CRABP2, ANXA1 und MCM7 in erster Linie repräsentativ für den Vergleich Typ AB vs. TC. Für eine detailliertere Analyse von Biomarkern ist es notwendig, das Proteom bei Etablierung weiterer Zelllinien (Typ A, B1, B2, B3) zu analysieren und Marker mit den auffälligsten signifikanten Unterschieden im Gruppen- und Direktvergleich immunhistochemisch zu validieren.

5.2.1 Proteomische Diagnosemarker CRABP2 und ANXA1

Durch die Proteomanalytik der Zelllinien T1889 (Thymuskarzinom) und TAB1 (AB-Thymom) konnten über 6500 Proteine identifiziert und über 2800 quantifiziert werden. Die Expression von 313 Proteinen war im Vergleich T1889/TAB1 signifikant verändert. Eines dieser Proteine war das *cellular retinoic acid-binding protein 2* (CRABP2). Die SILAC-Auswertung ergab, dass CRABP2 vermehrt in der Zelllinie TAB1 exprimiert wurde (Ratio T1889/TAB1 = 0,016, $p = 1,3E-14$). Zugleich zeigte es in der Genexpressionsanalyse einen zur Silac-Auswertung konkordanten Wert mit 0,649 (TSCC/Non-TSCC). CRABP2 gehört zur Familie der *small cytosolic lipid binding proteins* und ist Transportprotein für Retinsäure (engl. *retinoic acid, RA*) (Yuan et al. 2013). RA wird durch das Zytoplasma in den Nukleus befördert, wo sie mit dem *retinoic acid receptor* (RAR) einen Komplex bilden (Delva et al. 1999; Sessler und Noy 2005). Der RAR ist ein Kernrezeptor, welcher die Transkriptionsaktivität von antiproliferativen Genen moduliert. Der genaue

molekularbiologische Prozess ist bislang unbekannt (Ruberte et al. 1992; Schug et al. 2008; Vreeland et al. 2014; Xiao et al. 2014; Yang et al. 2016). Zur Validierung von CRABP2 als Diagnosemarker für TET wurden Schnitte der TMA's mit dem spezifischen Antikörper gefärbt. Im Vergleich TC vs. Thymom konnte prozentual seltener eine starke Proteinexpression in der TC-Gruppe festgestellt werden (TC = 32,14%, Thymom = 44,44%; $p = 0,55$). Kongruent dazu zeigten Thymuskarzinome häufiger eine negative Immunhistochemie (TC = 35,71%, Thymom = 14,53%; $p = 0,07$). Somit entspricht die Immunhistochemie den Ergebnissen der SILAC-Auswertung (s. Abb. 23, Tab. 13).

AnnexinA1 (ANXA1, Synonym: Lipocortin I) stellte sich massenspektrometrisch in der Karzinomzelllinie als verstärkt exprimiert dar. Die SILAC-Auswertung ergab eine hochsignifikante Ratio T1889/TAB1 von 11,294 ($p = 1,38E-7$). Zugleich zeigte es in der Genexpressionsanalyse einen zur Silac-Auswertung konkordanten Wert mit 1,351 (TSCC/Non-TSCC). ANXA1 ist Mitglied der sogenannten *annexins superfamily* und bindet abhängig von Ca^{2+} Phospholipide der Zellmembran (Geisow et al. 1987). Das Protein ist an multiplen Funktionen beteiligt. Beispielsweise wirkt es über die Inhibition der Phospholipase antiinflammatorisch (Solito et al. 1998), inhibiert, gesteuert durch Glucocorticoide, die Exozytose im neuroendokrinen System (McArthur et al. 2009) oder beteiligt sich am vesikulären Transport des EGFR (*epithelial growth factor receptor*) (Futter et al. 2007). Weiterhin ist es an Membrantransporten beteiligt (Rescher et al. 2004) und reguliert mitunter die Apoptose (Mu et al. 2013). Ermöglicht werden diese heterogenen Funktionen durch diverse Phosphorylierungsstellen am N- und C-Terminus des Proteins. Die Phosphatgruppen werden durch verschiedene Proteine wie den EGFR, Insulinrezeptor, Proteinkinase A und C angebracht (Pepinsky et al. Sinclair 1986; Varticovski et al. 1988; Skouteris et al. 1996). Wie die verschiedenen Funktionen auf molekularer Ebene zu erklären sind, wurde bis heute unzureichend geklärt (D'Acunto et al. 2014). In der Diagnostik besitzt ANXA bereits einen Stellenwert. Durch eine Microarray-Genexpressionsanalyse konnte die vermehrte Expression von ANXA1 bei einer Haarzelleukämie festgestellt werden. Dieser Unterschied bestätigte sich ebenfalls auf Proteinebene, sodass ANXA1 genutzt wird, um die Haarzelleukämie von anderen B-Zell-Lymphomen diagnostisch abzugrenzen (Falini et al. 2004). Bei der immunhistochemischen Validierung von ANXA1 zeigten Thymuskarzinome signifikant häufiger einen starken Expressionsgrad als Thymome. Die Signifikanz bezieht sich nur auf die Gesamtheit der Thymome, da der Prozentsatz einer starken Proteinexpression bei A- und AB-Thymomen sehr gering war. A-Thymome zeigten keinmal den Ausprägungsgrad stark, sodass dieser gegen ein Typ-A-Thymom spricht und eher mit der Diagnose eines

Thymuskarzinoms zu vereinbaren wäre (s. Abb. 26, Tab. 15). Dies kann aufgrund der Histologie von Typ-B3-Thymomen und Thymuskarzinomen hilfreich sein, da diese in seltenen Fällen ebenfalls spindelzellartig erscheinen können (Marx et al. 2015; Marx et al. 2016). Das Vorliegen einer positiven Immunhistochemie ist nicht spezifisch für eine Entität, da 95,21% der Tumoren eine immunhistochemische Färbung zeigten.

Zusammenfassend betrachtet hat die proteomische Analytik mehr als 300 signifikant veränderte exprimierte Proteine in Thymomen und Thymuskarzinomen identifiziert. Mit den ausgewählten Proteinen CRABP2 und ANXA1 konnte wie zuvor in der Genexpressionsanalyse kein spezifischer diagnostischer Marker identifiziert werden, da mitunter alle Entitäten eine positive Immunhistochemie aufzeigten. Die Expression von CRABP2 zeigte in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Entitäten. ANXA1 besitzt das Potenzial, die Reproduzierbarkeit der WHO-Klassifikation zu verbessern, da eine starke Färbung für das Vorliegen eines Thymuskarzinoms und gegen das Vorliegen eines Typ A-Thymoms spricht.

5.2.2 Proteomische Prognosemarker CRABP2 und ANXA1

CRABP2 als prognostischer Faktor von Tumorerkrankungen wurde bereits mehrfach beschrieben. Die Expression kann den Erkrankungsverlauf sowohl günstig als auch ungünstig beeinflussen. Bei Wilmstumoren (Takahashi et al. 2002), Retinoblastomen (Mallikarjuna et al. 2010), fortgeschrittenen Mammakarzinomen (Geiger et al. 2012) und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Favorskaya et al. 2014) war die verstärkte Expression von CRABP2 mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Hingegen wurde bei Prostatakarzinomen (Okuducu et al. 2005), Kopf-Hals-Tumoren (Calmon et al. 2009) und Astrozytomen (Campos et al. 2011; Campos et al. 2012) die Präsenz von CRABP2 mit einer besseren Prognose assoziiert. Insbesondere bei Karzinomen des Ösophagus (ESCC) wurde CRABP2 als günstiger prognostischer Faktor beschrieben. Eine vermehrte Expression in ESCC korrelierte mit einem niedrigen TNM-Stadium, einer geringeren Infiltrationstiefe, besserer histologischer Differenzierung und geringerer Tumorgröße. In der Karzinogenese fungierte es als Tumorsuppressor, indem es das Zellwachstum und die Zellmigration inhibierte sowie die Apoptose einleitete. Somit stellte sich CRABP2 als möglicher molekularbiologischer Marker für die Diagnose und Prognose eines ESCC dar (Yang et al. 2016). Zur Untersuchung der prognostischen Wertigkeit von CRABP2 wurde bei Patienten mit TET anhand der Proteinexpression Überlebenszeitanalysen durchgeführt (s. Kapitel 3.9). Die statistische

Auswertung der Kaplan-Meier-Kurve zeigte, dass keine Expression (0 Punkte) tendenziell mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Die Kurve verläuft ab dem dritten Monat dauerhaft unter der Kurve mit positiver Proteinexpression (2-6 Punkte). Grund für die fehlende Signifikanz ist erneut eine geringe Fallzahl. Eine negative CRABP2-Expression wurde lediglich in 13 Fällen beschrieben. Hier wäre eine erneute Analyse mit aufgestocktem Kollektiv erstrebenswert, da anders als bei der Überlebenszeitanalyse mit PNMAL1 und HEPACAM2 die invasiv wachsenden Tumoren wie B3 und TC gleichmäßig auf die prognostischen Gruppen verteilt sind (s. Tab. 14, grau unterlegt). Sollte sich bei erneuter Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen positiver und negativer Expression von CRABP2 auftreten, ist dementsprechend die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Faktor von der Klassifikation nach WHO unabhängig ist, erhöht. Dies gilt es mit einer Cox-Regression-Analyse zu überprüfen.

Auch ANXA1 ist für multiple Tumorerkrankungen als prognostischer Faktor beschrieben. Beispielsweise zeigten sich Ösophaguskarzinome mit starker ANXA1-Expression zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in einem höheren T-Stadium, entwickelten im Verlauf signifikant häufiger ein Rezidiv und waren mit einem kürzeren *overall survival* assoziiert (Wang et al. 2006). Seither gilt ANXA1 als unabhängiger prognostischer Faktor für ESCC. ANXA1 zeigte sich ebenso beim familiären Mamma-Ca mit BRCA1/2-Mutation überexprimiert und korrelierte mit prognostisch negativen Faktoren wie schlechter histologischer Differenzierung und triple-negativem Rezeptorstatus (Sobral-Leite et al. 2015). Hingegen ist beim ductalen Adenokarzinom des Pankreas eine negative Proteinexpression von ANXA1 ein prognostisch ungünstiger Faktor (Liu et al. 2015). In der hier durchgeführten Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier wurde die Prognose von Tumoren mit 0-3 Punkten (negativ, schwach) gegen Tumoren mit 4-6 (intermediär, stark) Punkten verglichen. Auf diese Weise wurden die Vergleichsgruppen vergrößert (0-3 Punkte n = 20, 4-6 Punkte n = 40). Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen vermehrter oder verringerter Proteinexpression (p = 0,72). Die Kurven kreuzten sich jeweils im 13. und 71. Monat. In dieser Studie besaß ANXA1 keine prognostische Tendenz oder Wertigkeit.

5.2.3 Gene Set Enrichment Analysis mit SILAC-Daten der Zelllinien IU-TAB-1 und T1889

Zur weiteren proteomischen Identifikation von Biomarkern für TET wurde in Kooperation mit Dr. rer. nat. Li BeiBarth des Pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Göttingen eine GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) mit den SILAC-Daten durchgeführt. Hierzu

wurde mit den Daten eine *ranked gene list* erstellt, welche anschließend mit dem definierten *Gene Set C5 (GO gene sets)* der *molecular signature database* abgeglichen wurde. Wie in 4.9 beschrieben konnten im Vergleich TAB-1 (Modell für AB-Thymom) vs. T1889 (Modell für undifferenziertes Thymuskarzinom) 9681 Anreicherungsprofile für *gene sets* berechnet werden (s. Tab. 17, Tab. 18). Zur weiteren Analytik wurde der an Stelle 9611 gelistete MCM-Pathway verwendet, obgleich andere *gene sets* (z. B. CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_MESENCHYMAL_DN, GSE29618_PDC_VS_MDC_DAY7_FLU_VACCINE_DN, STRUC_TURAL_CONSTITUENT_OF_RIBOSOME) einen höheren *enrichment score* (ES) aufwiesen und folglich eine verstärkte Anreicherung in der Zelllinie T1889 vorliegt. Grund hierfür ist die exklusive Anreicherung des MCM-*pathway* in T1889. Keines der zugehörigen Gene wurde verstärkt in der Zelllinie TAB1 transkribiert. Zudem werden Bestandteile des MCM-Komplexes unlängst als diagnostische und prognostische Biomarker verwendet (s. 5.2.3.1). Massenspektrometrisch wies MCM7 die höchste Intensität innerhalb des Signifikanzniveaus auf (s. Tab. 19).

5.2.3.1 Proteomischer Diagnosemarker MCM7

Der MCM-*pathway* ist ein Heterohexamerkomplex (MCM2-7), welcher wiederum Teil des Präreplikationskomplexes ist. Dieser kontrolliert in der S-Phase des Zellzyklus den Start der Transkription. Sobald der *origin recognition complex* (ORC) durch Zyklin A und CDK2 phosphoryliert wird, entfernen sich die mcm-Proteine vom ORC und entwinden mit ihrer Helikaseaktivität die DNA. Störungen in diesem Kontrollsystem haben oftmals verheerende Wirkung auf den Zellzyklus und begünstigen die Entstehung von Tumoren (Tye 1999; Takisawa et al. 2000; Bell und Dutta 2002; Laskey und Madine 2003; Maiorano et al. 2006; Giaginis et al. 2010). MCM-Proteine werden nur in einem aktiven Zellzyklus benötigt. Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren daher keine Proteine des MCM-Komplexes. Hierdurch kann von der immunhistochemisch dargestellten Proteinexpression auf die Proliferation einer Zellpopulation geschlossen werden, weshalb Antikörper gegen MCM-Proteine neben Ki67 und PCNA als Proliferationsmarker verwendet werden (Freeman et al. 1999; Ha et al. 2004). Als Teil des Pathways wies MCM7 in der massenspektrometrischen Auswertung die höchste Ratio innerhalb des Signifikanzniveaus auf (T1889/TAB1 = 2,46, $p = 0,04$, Intensität = 10,51 s. Tab. 14), weshalb dieser Teil des Heterohexamerkomplexes als immunhistochemischer Diagnosemarker getestet wurde. Hierzu wurden Schnitte der TMA's mit dem Antikörper MCM7 gefärbt. Im Vergleich wiesen 69% der Thymome und 62% der Thymuskarzinome eine positive Immunhistochemie auf, sodass allein durch das Vorliegen

einer positiven Färbung nicht zwischen diesen Entitäten differenziert werden kann. Auffällig war die fehlende starke Expression von MCM7 in A-Thymomen. Kein Fall dieser Entität wurde in der Auswertung mit 5 oder 6 Punkten bewertet, sodass in der histopathologischen Diagnostik eine starke Expression von MCM7 gegen die WHO-Klasse Typ-A-Thymom spricht. Thymuskarzinome zeigten im Vergleich Typ A vs. TC signifikant häufiger eine starke Proteinexpression ($p = 0,02$). Dies kann hilfreich sein, da A-Thymome und Thymuskarzinome mitunter spindelzellartige Anteile aufweisen. Somit kann auch der immunhistochemische Marker MCM7 dazu beitragen, die Reproduzierbarkeit der WHO-Klassifikation von TET zu erhöhen.

5.2.3.2 Proteomischer Prognosemarker MCM7

Eine veränderte Expression von Proteinen des MCM-Komplexes besitzt in vielen Tumorerkrankungen prognostischen Stellenwert. Beispielsweise ergab eine TMA-Auswertung von 277 Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) MCM2 als unabhängigen prognostischen Faktor. Eine vermehrte Expression von MCM2 korrelierte mit zunehmender Tumorgroße, Zellproliferation und *disease free survival* (Huang et al. 2006). Gleiches gilt für Magenkarzinome (Tokuyasu et al. 2008). In einer Studie von Li et al. wurde MCM7 mit einer schlechten Prognose bei Endometriumkarzinomen beschrieben. Hier wurden ebenfalls TMA-Blöcke aus Paraffingewebe hergestellt und mit einem MCM7-Antikörper gefärbt. Kürzeres Überleben, höheres Alter bei Diagnose und schlechtere histologische Differenzierung waren mit einer verstärkten Expression von MCM7 assoziiert, wobei die Wertigkeit als unabhängiger prognostischer Faktor auch hier durch multivariate Verfahren bestätigt werden konnte (Li et al. 2005). Gleichermaßen mit einer schlechteren Prognose assoziiert war MCM2 in Kopf-Hals-Tumoren (Kato et al. 2003), Mammakarzinomen (Gonzalez et al. 2003), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Yang et al. 2006) und Nierenzellkarzinomen (Rodins et al. 2002), MCM2 und MCM5 in kolorektalen Karzinomen (Giaginis et al. 2009) und Ovarialtumoren (Gakiopoulou et al. 2007), MCM7 in Prostatakarzinomen (Laitinen et al. 2008), MCM5 und MCM7 in Schilddrüsentumoren (Kebebew et al. 2006) und MCM2 und MCM7 in Urothelkarzinomen (Korkolopoulou et al. 2005).

Der prognostische Stellenwert einer veränderten Expression von MCM7 bei TET wurde wie in Abschnitt 3.9 beschrieben untersucht. Die Kaplan-Meier-Kurven in Abb. 31 zeigen die klare Tendenz, dass Tumoren ohne Expression von MCM7 (0 Punkte) ab dem dritten Monat dauerhaft mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind als Tumoren mit Expression von MCM7 (2-6 Punkte). Erneut ist die fehlende Signifikanz des prognostischen Unterschieds (p

= 0,12) wahrscheinlich auf die Größe des Kollektivs für die Überlebenszeitanalyse zurückzuführen. Eine erneute Überlebenszeitanalyse mit erhöhten Fallzahlen wäre sehr interessant, da ähnlich wie bei dem Biomarker CRABP2 die invasiv wachsenden Tumoren Typ B3 und TC gleichmäßig auf die Vergleichsgruppen (positive Expression vs. negative Expression) verteilt sind (s. Tab. 21, grau unterlegt).

5.3 Perspektive

Für die Identifikation von Biomarkern für TET gibt es alternative Methoden, welche vielversprechend für einen zusätzlichen Informationsgewinn sind. Die Genexpressionsanalyse ließe sich beispielsweise durch *Next Generation Sequencing* ergänzen, da diese Methodik weniger von einer biochemischen Kinetik abhängig ist (s. Kapitel 5.1). Ebenso ließe sich die Proteomik mit einer Analyse von Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorgewebe erweitern. Mit der Filter Aided Sample Preparation (FASP) lässt sich FFPE-Gewebe lysieren und für die Massenspektrometrie aufreinigen (Wiśniewski et al. 2009; Erde et al. 2014). Durch eine *Spike-in-SILAC*-Quantifizierung lässt sich biologisches Gewebe quantifizieren, ohne es vorher mit leichten oder schweren Aminosäuren markiert zu haben (Geiger et al. 2010; Geiger et al. 2011). Mit dieser Methodik ließe sich abhängig vom Kollektiv massenspektrometrisch das Proteom von Thymusepithel-Tumoren jeder WHO-Klasse (A-TC) mit maximierter Fallzahl pro Entität darstellen. Für eine erhöhte Validität sollten pro WHO-Klasse Tumoren mit vergleichbaren Diagnostikkriterien (Rezidiv, Stadium nach Masaoka-Koga, Alter) analysiert werden. Zusätzlich wäre es möglich, eine weitere Gruppe mit physiologischem Thymusgewebe untersuchen, da sich dieses häufig im Tumorsektat von jungen Patienten befindet. Mit den erhobenen Daten ließen sich das Proteom der WHO-Gruppen untereinander vergleichen und eventuell weitere Biomarker zur Diagnostik, Prognostik und Therapie etablieren.

6 Zusammenfassung

Therapieempfehlungen von epithelialen Thymus-Tumoren basieren auf der Klassifikation nach WHO. Zur Verbesserung der diagnostischen Reproduzierbarkeit dieser seltenen Tumoren werden weitere immunhistochemische Marker benötigt. Weiterhin sind für Thymustumoren bislang keine prognostischen Marker etabliert. Ziel dieser Studie war die experimentelle Identifikation entsprechender Biomarker.

Hierzu wurden genomische Daten von extern durchgeführten DNA-Microarrays ausgewertet. Zusätzlich wurde das Proteom von zwei Zelllinien (AB-Thymom, Thymuskarzinom) massenspektrometrisch quantifiziert. Mit den SILAC-Daten wurden anschließend eine GSEA durchgeführt. Zur Validierung der ausgewählten Biomarker wurde die Proteinexpression immunhistochemisch an Tissue-Microarrays getestet.

Die Auswertung der DNA-Microarrays zeigte im Vergleich TC vs. Thymom und TC vs. B3 3367 Gene signifikant reguliert, wovon PNMAL1, HEPACAM2 und c-Kit zur Validierung verwendet wurden. Durch die Proteomik konnten 6538 Proteine identifiziert werden, wovon 2824 quantifiziert wurden. 313 Proteine zeigten sich im Vergleich AB vs. TC signifikant reguliert. Zur Validierung wurden die Marker CRABP2, ANXA1 und MCM7 ausgewählt.

In der TMA-Auswertung zeigten alle Marker bis auf CRABP2 das Potenzial, die Reproduzierbarkeit der WHO-Klassifikation zu verbessern. Eine starke Expression von PNMAL1, HEPACAM2 und ANXA1 spricht für das Vorliegen eines Thymuskarzinoms und gegen das Vorliegen eines Thymoms. Ferner spricht eine starke Expression von ANXA1 und MCM7 gegen das Vorliegen eines Typ-A-Thymoms. In der Überlebenszeitanalyse zeigten insbesondere die Marker CRABP2 und MCM7 Potenzial als prognostischer Biomarker.

Insgesamt konnte mit der Gen- und Proteinexpressionsanalyse eine molekulare Datenbank erstellt werden, die es erlaubt, Biomarker für epitheliale Thymustumoren zu identifizieren. Für zusätzliche Ergebnisse ist es notwendig, die genetische Methodik um *Next Generation Sequencing* zu ergänzen und in der Proteomik weitere Analysen mit FFPE-Tumorgewebe durchzuführen. Überlebenszeitanalysen sollten an einem vergrößerten Patientenkollektiv durchgeführt werden.

7 Anhang/Ergänzendes Material

7.1 Proteomanalytik

Nr.	Protein names	Gene names	log2 Ratio 1889 / Tab1	Ratio 1889 / Tab1	p-Value
1	Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	-6,01089	0,015507501	1,30E-14
2	Non-specific lipid-transfer protein	SCP2	-5,53863	0,02151326	3,58E-14
3	Heat shock-related 70 kDa protein 2	HSPA2	3,92801	15,22119793	1,89E-10
4	Latexin	LXN	-4,63309	0,040299619	2,44E-10
5	Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	NMES1;C15orf48	4,14221	17,6575099	4,61E-10
6	Protein S100-A10	S100A10	3,73231	13,29037586	1,48E-09
7	Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	3,69155	12,92014181	2,24E-09
8	PCTP-like protein	STARD10	-4,36893	0,048397287	2,41E-09
9	HLA class I histocompatibility antigen, A-11 alpha chain;HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain	HLA-A;HLA-A24AK	3,49102	11,24350547	1,62E-08
10	Proteasome subunit beta type-9;Proteasome subunit beta type	PSMB9	3,46797	11,06529493	2,74E-08
11	Brain acid soluble protein 1	BASP1	3,52246	11,49121945	1,12E-07
12	Annexin;Annexin A1	ANXA1	3,49747	11,29388546	1,38E-07
13	Microtubule-associated protein 1B;MAP1B heavy chain;MAP1 light chain LC1	MAP1B;DKFZp686F1345	3,22551	9,353523922	1,89E-07
14	HEAT repeat-containing protein 6	HEATR6	-3,71034	0,076397011	4,14E-07
15	Epiplakin	EPPK1	-3,82257	0,070679223	8,07E-07
16	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	PYCARD	-3,84438	0,069618763	1,70E-06
17	Mitochondrial	MFF	3,12829	8,743979387	2,40E-

	fission factor				06
18	Heat shock protein beta-1	HSPB1	-3,59741	0,08261743	3,34E-06
19	Keratin, type I cytoskeletal 19	KRT19	-3,5357	0,086227986	4,87E-06
20	Ras-related protein Rab-27B	RAB27B	-3,23652	0,106098782	6,08E-06
21	Band 4.1-like protein 2	EPB41L2	2,95462	7,752276349	8,32E-06
22	Tensin-3	TNS3;DKFZp434I2435	2,7512	6,732769154	9,78E-06
23	Grancalcin	GCA	-3,40377	0,094485057	1,76E-05
24	Transgelin-2	TAGLN2	2,66139	6,326422907	1,89E-05
25	SH3 and PX domain-containing protein 2B	SH3PXD2B	2,63943	6,230854378	2,33E-05
26	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 11	ABHD11	-3,25604	0,104672909	2,49E-05
27			-3,25506	0,104744036	2,50E-05
28	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15	-3,00389	0,124663411	2,87E-05
29	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase, mitochondrial	BDH1	-3,29867	0,101625193	4,13E-05
30	Moesin	MSN	2,50915	5,692845711	5,67E-05
31	Integrin alpha-3;Integrin alpha-3 heavy chain;Integrin alpha-3 light chain	ITGA3	2,64056	6,235736646	6,68E-05
32	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP3	IQGAP3	2,42276	5,361958302	9,56E-05
33	Myosin-14	MYH14	-2,99691	0,125268015	0,000101138
34	Protein S100-A16	S100A16	-3,02645	0,122729162	0,000137761
35	Myoferlin	MYOF	2,37504	5,187502045	0,00014218
36	Utrophin	UTRN	2,37355	5,182147214	0,000143596
37	Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	2,36247	5,142500397	0,000154585
38	Endoplasmic reticulum metalloproteinase 1	ERMP1;KIAA1815	-2,76222	0,147397095	0,000170301
39	Cysteine-rich	CRIP2	-3,00415	0,124640947	0,00019

	protein 2				1607
40	CD151 antigen	CD151	2,8729	7,325361718	0,00019 2281
41	UPF0364 protein C6orf211	C6orf211	-2,98358	0,126430812	0,00021 2256
42	Annexin A2;Annexin;Putativ e annexin A2-like protein	ANXA2;ANX A2P2	2,27561	4,842023227	0,00027 2572
43	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	2,25001	4,756861432	0,00028 5671
44	Hexokinase-1	HK1	-2,74784	0,148873616	0,00035 3758
45	Prelamin- A/C;Lamin-A/C	LMNA	2,23161	4,696578099	0,00036 0605
46	Nicotinate- nucleotide pyrophosphorylase [carboxylating]	QPRT	-2,82617	0,141006151	0,00037 5862
47	Gamma- glutamylcyclotransf erase	GGCT	-2,601	0,164824202	0,00040 3417
48	Oligoribonuclease, mitochondrial	REXO2	2,17745	4,523533012	0,00044 3046
49	Ras-related protein Rab-3D	RAB3D	-2,56379	0,169130646	0,00048 902
50	Stromal interaction molecule 1	STIM1	2,12913	4,374535998	0,00058 9341
51	Ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase 32;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP32	-2,28483	0,205209582	0,00061 3849
52	Glycolipid transfer protein	GLTP	-2,74224	0,14945261	0,00067 2651
53	Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain- containing protein 3	HDHD3	-2,70021	0,153870652	0,00068 4589
54	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	PC	2,10457	4,300695534	0,00078 6671
55	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase- like 3;Peptidyl- prolyl cis-trans isomerase	PPIL3	-2,66105	0,158104463	0,00082 0796
56	Ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase 48	USP48	2,06662	4,189040987	0,00084 5504
57	Secretory carrier- associated membrane protein 3	SCAMP3	2,20305	4,604517543	0,00085 8121

58	60S ribosomal export protein NMD3	NMD3	-2,22173	0,214384127	0,000876719
59	Guanosine-3,5-bis(diphosphate) 3-pyrophosphohydrolase MESH1	HDDC3	-2,21343	0,21562106	0,00091818
60	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4;Dehydrogenase/reductase SDR family member 4-like 2	DHRS4;DHR S4L2	-2,6291	0,161644912	0,00095012
61	Prostaglandin E synthase	PTGES	2,03238	4,090791478	0,00102628
62	Calcium and integrin-binding protein 1	CIB1	-2,38767	0,19109077	0,00102808
63	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	SMCHD1	2,03169	4,088835437	0,00103027
64	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	GABARAPL2	-2,60685	0,164157208	0,00105103
65	Lysosomal acid phosphatase	ACP2	2,02311	4,06459047	0,00108105
66	Interferon-induced transmembrane protein 3;Interferon-induced transmembrane protein 1;Interferon-induced transmembrane protein 2	IFITM3;IFITM 2;IFITM1	2,15811	4,463297586	0,00109019
67	Pleckstrin homology-like domain family A member 3	PHLDA3	-2,18041	0,220613044	0,00110176
68	Superoxide dismutase;Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	SOD2	2,04346	4,12233	0,00112807
69	A-kinase anchor protein 1, mitochondrial	AKAP1	-2,14897	0,225473533	0,00130765
70	Protein NDRG1	NDRG1;TRG 14	2,11585	4,334453182	0,00136013
71	Endothelin-converting enzyme	ECE1	1,97558	3,932863187	0,00140686

	1				
72	Condensin-2 complex subunit D3	NCAPD3	1,96726	3,9102477	0,00144 519
73	dCTP pyrophosphatase 1	DCTPP1	-2,57024	0,168376185	0,00145 157
74	Monocarboxylate transporter 4	SLC16A3	2,13087	4,379815204	0,00148 498
75	Microsomal glutathione S-transferase 3	MGST3	2,12695	4,367930799	0,00151 469
76	Stathmin	STMN1	1,98844	3,968076941	0,00154 779
77	Protein phosphatase Slingshot homolog 3	SSH3	-2,51419	0,175046485	0,00158 744
78	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM33	TRIM33	-2,27985	0,205919163	0,00195 857
79	Guanylate kinase	GUK1	-2,488	0,178253215	0,00206 46
80	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1	CKS1B	1,89885	3,729158197	0,00212 85
81	Protein dopey-2	DOPEY2	-2,24101	0,211538183	0,00215 254
82	NAD(P) transhydrogenase, mitochondrial	NNT	1,92554	3,798790103	0,00220 129
83		NCAM2	-2,33461	0,198249619	0,00229 617
84	EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2	2,03177	4,089062176	0,00242 61
85	Serum paraoxonase/aryles terase 2	PON2	2,03003	4,084133429	0,00244 663
86	Condensin complex subunit 3	NCAPG	1,86834	3,651122313	0,00249 976
87	Annexin A6;Annexin	ANXA6	1,88986	3,705992598	0,00267 612
88	Zinc finger protein 217	ZNF217	-2,16183	0,223472622	0,00315 113
89	Redox-regulatory protein FAM213A	FAM213A	-2,38275	0,191743556	0,00319 384
90	Sorcin	SRI	1,93532	3,824629506	0,00335 55
91	Neurofilament medium polypeptide;Neurofilament light polypeptide	NEFM;DKFZ p761K0922;N EFL	-2,15601	0,224375957	0,00343 097
92	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit,	SDHB	1,95182	3,868622614	0,00355 366

	mitochondrial				
93	Transmembrane protein 205	TMEM205	-2,14698	0,225784758	0,00357044
94	Calpain-2 catalytic subunit	CAPN2	1,94885	3,860666677	0,00360346
95	Epididymal secretory protein E1	NPC2	1,94521	3,850938278	0,00366559
96	Carbonyl reductase [NADPH] 3	CBR3	-2,34238	0,197184766	0,00375951
97	BAG family molecular chaperone regulator 3	BAG3	-2,34154	0,197299609	0,00377208
98	Multidrug resistance-associated protein 4	ABCC4;MOA T-B	2,19105	4,566377084	0,00390667
99	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	SLC9A3R1	-2,12024	0,230008646	0,0040139
100	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	ITPR1	1,92007	3,784414203	0,00412085
101	Mitochondrial translocator assembly and maintenance protein 41 homolog	TAMM41	-2,09818	0,233552695	0,00424238
102	Fascin	FSCN1	1,88458	3,692454132	0,00427263
103		CAST	1,879	3,678200185	0,00438632
104	Dedicator of cytokinesis protein 6	DOCK6	-2,08516	0,235669996	0,00450403
105	Melanoma-associated antigen D1	MAGED1;FLJ 00163	-1,89762	0,268385754	0,00474732
106	Histone-lysine N-methyltransferase SETD7	SETD7	-1,89333	0,269185014	0,00484699
107	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase	NADSYN1	-1,89108	0,269605157	0,00489997
108	UDP-glucose 6-dehydrogenase	UGDH	-2,13897	0,227041826	0,00509156
109	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5	1,84647	3,59619188	0,00510488
110	CD44 antigen	CD44	-2,23367	0,212617168	0,00510877
111	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSPA1A;HSPA1B	-2,13639	0,227448212	0,00514335

112	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	-2,13175	0,228180909	0,00523773
113	Vinculin	VCL	1,76107	3,389494195	0,0052728
114	Ezrin	EZR	1,75881	3,384188666	0,00533387
115	Chromosome-associated kinesin KIF4A	KIF4A	1,85825	3,62567598	0,00546623
116	L-xylulose reductase	DCXR	-2,24704	0,210655867	0,00547312
117	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2; Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 soluble form	GALNT2	1,70964	3,270791962	0,0055718
118	Glutamate--cysteine ligase regulatory subunit	GCLM	1,82987	3,555050368	0,00620762
119	Filamin-B	FLNB	1,72251	3,300100591	0,00640763
120	Adenylate kinase 2, mitochondrial; Adenylate kinase 2, mitochondrial, N-terminally processed	AK2	-2,0082	0,248583079	0,00646799
121	Structural maintenance of chromosomes protein 2; Structural maintenance of chromosomes protein	SMC2	1,79429	3,468447386	0,00648211
122	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit; Nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit	NFKB2	1,67799	3,199818334	0,00649199
123	Talin-1	TLN1	1,71848	3,290895009	0,00653798
124	Major vault protein	MVP	1,79198	3,462898256	0,00655009
125	Mitochondrial pyruvate carrier 2	MPC2	1,66244	3,165514491	0,00670159
126	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1; DKF Zp686M148	1,78582	3,44814394	0,00673479
127	Protein THEM6	THEM6	-1,98758	0,252161513	0,00704454
128	Acetoacetyl-CoA synthetase	AACS	-2,14596	0,225944446	0,00718538
129	Integrin beta-1	ITGB1	1,77081	3,412454949	0,00720

					455
130	CD59 glycoprotein	CD59	1,65501	3,149253735	0,00724 343
131	Dihydropyrimidinas e-related protein 2	DPYSL2	1,76859	3,407207947	0,00727 649
132	Immunoglobulin superfamily member 3	IGSF3	-1,974	0,2545463	0,00740 578
133	Dystroglycan;Alpha -dystroglycan;Beta- dystroglycan	DAG1	1,6501	3,138553932	0,00741 375
134	Actin-binding protein anillin	ANLN	1,64913	3,136444426	0,00744 805
135	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E	ANP32E	1,69051	3,227707846	0,00751 125
136	Pachytene checkpoint protein 2 homolog	TRIP13	1,78364	3,44293752	0,00761 035
137	Sorbitol dehydrogenase	SORD	-2,13084	0,228324883	0,00761 178
138	Mitochondrial antiviral-signaling protein	MAVS	-2,15419	0,224659193	0,00779 021
139	Glycogen phosphorylase, liver form;Phosphorylas e	PYGL	1,75178	3,367738221	0,00784 211
140	Caspase- 6;Caspase-6 subunit p18;Caspase-6 subunit p11	CASP6	-1,78597	0,289980944	0,00804 455
141	Pyridoxal- dependent decarboxylase domain-containing protein 1	PDXDC1	-2,12509	0,22923671	0,00867 913
142	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 3	TCIRG1	1,97908	3,942415956	0,00870 493
143	Acyl-CoA desaturase	SCD	1,60051	3,032504949	0,00892 319
144			1,65482	3,148839012	0,00894 075
145	Protein FAM127A;Protein FAM127C	FAM127A;FA M127C	1,96906	3,915129424	0,00902 665
146	Nucleoside diphosphate kinase B;Nucleoside diphosphate kinase	NME2;NME1- NME2;NME1	-1,98154	0,253219427	0,00927 42

147	Myocyte-specific enhancer factor 2D	MEF2D;MEF2D variant protein	1,59004	3,010576965	0,00935771
148	Niemann-Pick C1 protein	NPC1	1,58759	3,00546871	0,00946223
149	Transcription factor 25	TCF25;NULP1	-2,06574	0,238863778	0,00971771
150	Ribonuclease UK114	HRSP12	-2,09311	0,234374903	0,00975981
151	Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase	GNPNAT1	-2,08976	0,234919764	0,00987965
152	BRI3-binding protein	BRI3BP	-1,90295	0,267396039	0,00992579
153	Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	ADAR	1,58654	3,003282112	0,00996668
154	Chromobox protein homolog 3	CBX3	-1,89687	0,268525313	0,0101685
155	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	PDHB	1,69178	3,230550439	0,0101961
156	TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1	TRAFD1	-1,73273	0,300882061	0,0102449
157	Phosphoglucomutase-1	PGM1	1,70029	3,249662743	0,0108727
158	Acyl-coenzyme A thioesterase 13	ACOT13	-1,8791	0,271853254	0,0109083
159	Prostaglandin reductase 1	PTGR1	1,67581	3,194986865	0,0109203
160	Neutral cholesterol ester hydrolase 1	NCEH1	1,69894	3,246623298	0,0109344
161	Carnitine O-palmitoyltransferase 2, mitochondrial	CPT2	-1,87628	0,272385158	0,0110298
162	Calumenin	CALU	1,60188	3,035386019	0,0115091
163	Tight junction protein ZO-2	TJP2	-1,69671	0,308488796	0,0120229
164	Keratin, type II cytoskeletal 1	KRT1	-1,9009	0,267776266	0,0124321
165	Acylphosphatase-1;Acylphosphatase	ACYP1	1,66379	3,168478004	0,0126564
166	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	IDI1	1,6389	3,114282891	0,0127714
167	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit, mitochondrial	SDHD;UNQ5809	1,52813	2,884117617	0,012975

168	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	PTPRG	1,51566	2,859296043	0,0130281
169	Nucleoside diphosphate kinase A	NME1	-1,88602	0,27055241	0,0131088
170	Solute carrier family 12 member 2	SLC12A2	-1,83742	0,279821748	0,0131985
171	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETFA	-1,88098	0,271499228	0,0133457
172	Carbonic anhydrase 2	CA2	1,62455	3,08345972	0,0135635
173	DnaJ homolog subfamily B member 7	DNAJB7	-1,96866	0,255490225	0,0138251
174	PDZ domain-containing protein GIPC1	GIPC1	-1,82492	0,282256752	0,0138901
175	Purine nucleoside phosphorylase	PNP	-1,81635	0,283938424	0,0139176
176	Transmembrane emp24 domain-containing protein 3	TMED3	-1,99201	0,251388403	0,0140069
177	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	1,55748	2,943392627	0,0141484
178	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	PEA15	1,63551	3,106973637	0,0142121
179	Dual specificity protein phosphatase 23	DUSP23	1,63533	3,106586015	0,0142224
180	Neuropathy target esterase	PNPLA6	1,6312	3,097705515	0,0144632
181	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	-1,85723	0,276005706	0,0145123
182	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	LPCAT1;AYTL2	1,60099	3,033514064	0,0149574
183	Electron transfer flavoprotein subunit beta	ETFB	-1,84544	0,278270523	0,0151239
184	Spermatogenesis-associated protein 20	SPATA20	-1,64196	0,320420865	0,0152498
185	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP8	-1,9652	0,2561037	0,015377
186	Prolyl 3-hydroxylase 1	LEPRE1	1,81234	3,512114793	0,0156404

187	Gelsolin	GSN	-1,78487	0,290202127	0,01568 73
188	Poly [ADP-ribose] polymerase 4	PARP4	1,46045	2,751941878	0,01652 47
189	6- phosphofruktokinase, liver type	PFKL	-1,81557	0,284091978	0,01677 7
190	Glutathione peroxidase;Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, mitochondrial	GPX4	-1,91302	0,265536115	0,01681 37
191	ATP-dependent DNA helicase Q1	RECQL	1,5693	2,9676069	0,01703 1
192		TPM3;DKFZp 686J1372	1,5154	2,858780792	0,01712 78
193	Condensin complex subunit 1	NCAPD2	1,5872	3,004656359	0,01726 21
194	Coiled-coil and C2 domain-containing protein 1A	CC2D1A	-1,77008	0,293192479	0,01731 55
195	Probable 2- oxoglutarate dehydrogenase E1 component DHKTD1, mitochondrial	DHTKD1	-1,92052	0,26415928	0,01792 32
196	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH;Phosphoribosylaminoimidazole carboxamide formyltransferase;IMP cyclohydrolase	ATIC	-1,79152	0,288867539	0,01822 12
197	Heme oxygenase 1	HMOX1	1,5521	2,932436768	0,01825 85
198	Probable cation- transporting ATPase 13A1	ATP13A1	-1,88634	0,270492407	0,01843 87
199	Adipocyte plasma membrane- associated protein	APMAP	-1,72974	0,301506289	0,01926 6
200	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2;KIAA 0324	-1,76496	0,294234842	0,01994 11
201	Peptidyl-prolyl cis- trans isomerase FKBP4;Peptidyl- prolyl cis-trans isomerase FKBP4, N-terminally processed	FKBP4	-1,75522	0,296228017	0,02060 63

202	Kinectin	KTN1	1,47331	2,776581994	0,02064 57
203		SLC35A4	1,54044	2,908832049	0,02074 58
204	N-acetylserotonin O- methyltransferase- like protein	ASMTL	-1,87203	0,273188754	0,02109 83
205	Condensin complex subunit 2	NCAPH	1,41279	2,66251564	0,02134 99
206	Flavin reductase (NADPH)	BLVRB	-1,74298	0,298751943	0,02146 98
207	Phosphoenolpyruv ate carboxykinase [GTP], mitochondrial	PCK2	-1,69875	0,308052895	0,02157 63
208	Transcription activator BRG1	SMARCA4	-1,83616	0,280066241	0,02186 92
209	Mitochondrial assembly of ribosomal large subunit protein 1	MALSU1	1,39151	2,623531296	0,02202 81
210	Protein canopy homolog 4	CNPY4	1,40343	2,645297532	0,02220 08
211	Plexin-A1	PLXNA1	1,69677	3,241743627	0,02295 03
212	FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 1	FARP1	1,37632	2,596053293	0,02343 58
213	Putative transferase CAF17, mitochondrial	IBA57	-1,80549	0,286083858	0,02422 87
214	Charged multivesicular body protein 1b	CHMP1B	1,67783	3,199463482	0,02439 57
215	Glucose-6- phosphate 1- dehydrogenase	G6PD	-1,70121	0,307528069	0,02465 87
216	UPF0556 protein C19orf10	C19orf10	1,47434	2,778565019	0,02482 6
217	Dihydrolipoyllysine- residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	DLAT	1,43029	2,69500883	0,02487 64
218	Uncharacterized protein KIAA1522	KIAA1522	-1,67292	0,313617941	0,02522 75
219	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial	ACOT9	1,48901	2,806962908	0,02527 17
220	Long-chain fatty	SLC27A3	-1,78891	0,289390607	0,02559

	acid transport protein 3				43
221	Lipase maturation factor 2	LMF2	1,66106	3,162487988	0,0257411
222	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	TRIM25	-1,64712	0,319276882	0,0259617
223	Structural maintenance of chromosomes protein 4; Structural maintenance of chromosomes protein	SMC4	1,47979	2,789081322	0,0261676
224	Protein S100-A13	S100A13	-1,80373	0,286433075	0,0263958
225	Ankyrin repeat domain-containing protein 50	ANKRD50	-1,50918	0,35131084	0,026415
226	Canalicular multispecific organic anion transporter 2	ABCC3;MRP3	1,34601	2,542080999	0,0264793
227	Phosphorylase		-1,80266	0,286645592	0,0264878
228	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	NDUFA4	-1,63725	0,32146866	0,0268828
229	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2	TNFAIP2	1,62988	3,094872552	0,0284133
230	Monofunctional C1-tetrahydrofolate synthase, mitochondrial	MTHFD1L	1,3429	2,536606968	0,0284491
231	Glutathione S-transferase P	GSTP1	1,3963	2,632256355	0,0287301
232	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	ATP1B3	1,45178	2,73545344	0,0290593
233	Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	MAT2B	1,33285	2,518998041	0,0296214
234	Histone H1x	H1FX	1,42724	2,689317333	0,0297276
235	Isochorismatase domain-containing protein 1	ISOC1	-1,76619	0,293984093	0,029771
236	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	GPD2	-1,63718	0,321484258	0,0303413
237	Pirin	PIR	1,43572	2,705171388	0,03083

					81
238	Uncharacterized protein DKFZp762l1415		-1,61796	0,32579582	0,03096 24
239	Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	1,43397	2,701891984	0,03103 77
240	Syntaxin-binding protein 2	STXBP2	-1,72479	0,302542557	0,03151 86
241	Thymocyte nuclear protein 1	THYN1	1,30133	2,464559822	0,03158 62
242	Late secretory pathway protein AVL9 homolog	AVL9	-1,46191	0,363012215	0,03182 53
243	Probable RNA-binding protein EIF1AD	EIF1AD	-1,60929	0,327759613	0,03196 22
244	Centrosomal protein of 170 kDa protein B	CEP170B	-1,45829	0,363924227	0,03227 71
245	Galectin-1	LGALS1	1,36559	2,57681685	0,03264 49
246	Calcineurin-like phosphoesterase domain-containing protein 1	CPPED1	-1,60121	0,329600423	0,03291 9
247	Syntaxin-binding protein 1	stxbp1;STXB P1	1,30282	2,467106508	0,03337 45
248	Antigen peptide transporter 1	TAP1	1,41342	2,663678569	0,03346 32
249	Interferon-stimulated gene 20 kDa protein	ISG20	-1,44806	0,366513946	0,03358 09
250	Myosin-9	MYH9	1,35828	2,563793384	0,03364 22
251	Iron-sulfur cluster co-chaperone protein HscB, mitochondrial	HSCB	-1,44247	0,36793683	0,03431 18
252		SMCR7L	1,27806	2,425126494	0,03456 59
253	Solute carrier family 35 member E1	SLC35E1	-1,57879	0,334762539	0,03570 27
254	Probable aminopeptidase NPEPL1	NPEPL1	-1,70754	0,306181708	0,03578 4
255	FLYWCH family member 2	FLYWCH2	-1,57768	0,335020202	0,03584 53
256	Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	1,39389	2,627862882	0,03591 65
257	Bax inhibitor 1	TMBIM6	-1,57584	0,335447757	0,03608 3
258	Epidermal growth factor receptor	EPS8L2	-1,68178	0,311697826	0,03612 25

	kinase substrate 8-like protein 2				
259	Antigen peptide transporter 2	TAP2;TAP2-G	1,28238	2,432399166	0,036156
260	Nicastrin	NCSTN	1,39121	2,622985805	0,0362651
261			-1,70229	0,30729794	0,0363695
262	Calponin-2	CNN2	1,37294	2,589978281	0,036391
263	HEAT repeat-containing protein 5A	HEATR5A	1,54383	2,915675169	0,0370597
264	SUN domain-containing protein 2	SUN2;UNC84B	1,27529	2,420474676	0,0371661
265	Zyxin	ZYX	1,3644	2,574692252	0,0375463
266	Rhotekin	RTKN	-1,41863	0,374067362	0,0375874
267	Ras suppressor protein 1	RSU1	1,38075	2,604037095	0,0376524
268	Protein AHNAK2	AHNAK2	1,33023	2,514427577	0,0377106
269	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	PC4;SUB1	1,32795	2,510456975	0,0380579
270	Mucin-1;Mucin-1 subunit alpha;Mucin-1 subunit beta	MUC1	-1,66506	0,315331238	0,0380601
271	UPF0553 protein C9orf64	C9orf64	-1,66463	0,315425237	0,0381109
272	Dipeptidyl peptidase 3	DPP3;DKFZp686O1117	-1,56334	0,338366817	0,0382571
273	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein	IKBIP	1,52836	2,88457745	0,0388311
274	Endophilin-B2	SH3GLB2	-1,65475	0,317592776	0,0392984
275	Putative phospholipase B-like 2;Putative phospholipase B-like 2 32 kDa form;Putative phospholipase B-like 2 45 kDa form	PLBD2	-1,54911	0,341720807	0,039694
276	Titin	TTN	-1,67302	0,313596204	0,0397858
277	BolA-like protein 2	BOLA2	-1,513	0,350381862	0,0411083
278	Histone H1.0;Histone H1.0,	H1F0	1,35593	2,559620631	0,0411264

	N-terminally processed				
279	Elongation factor 2	EEF2	-1,53514	0,345045853	0,0417136
280	Growth factor receptor-bound protein 2	GRB2	-1,50773	0,351664108	0,0418308
281	Exportin-T	XPOT	-1,50574	0,352149515	0,0421076
282	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	NUP210	-1,53105	0,346025436	0,0422363
283	DNA replication licensing factor MCM7	MCM7	1,30149	2,464833166	0,0423054
284	Histone H1.3	HIST1H1D	1,30008	2,462425369	0,0425424
285	Sulfhydryl oxidase 2	QSOX2	1,2395	2,361166863	0,0426371
286	Pyridoxal kinase	PDXK	-1,50104	0,353298615	0,0427644
287	Serine/threonine-protein kinase N2	PKN2	1,23859	2,359677994	0,0427846
288	Dehydrogenase/reductase SDR family member 7	DHRS7;DKF Zp564H1664	-1,4998	0,353602407	0,0429404
289	Carnitine O-acetyltransferase	CRAT	1,49349	2,815692916	0,043089
290	Microsomal glutathione S-transferase 2	MGST2	-1,62288	0,324686656	0,0433456
291	AP-1 complex subunit beta-1	AP1B1	-1,49593	0,354552211	0,0434893
292	Alpha-actinin-4	ACTN4	-1,5212	0,348396008	0,0435175
293	Peroxisomal membrane protein PEX16	PEX16	-1,37591	0,38530959	0,0441205
294	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial	SDHC	1,48081	2,791053928	0,0447326
295	Transducin beta-like protein 2	TBL2	-1,48652	0,356872342	0,0448514
296	Cytoplasmic aconitate hydratase	ACO1;IRP1	1,32805	2,510630993	0,0453481
297	Syntaxin-7	STX7	1,32793	2,510422173	0,0453679
298	Vesicle-fusing ATPase	NSF	-1,48052	0,358359623	0,0457392
299	Ephrin type-B receptor 4	EPHB4	1,20075	2,298591346	0,0462451
300	BAG family molecular	BAG2	1,32132	2,498946474	0,0464205

	chaperone regulator 2				
301	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	VAPB	-1,49891	0,353820612	0,0465384
302	Activity-dependent neuroprotector homeobox protein	ADNP	-1,50352	0,352691815	0,0465617
303	CGG triplet repeat-binding protein 1	CGGBP1	1,46448	2,759639852	0,0469266
304	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1	UFC1	1,21274	2,317774161	0,0471616
305	Inactive tyrosine-protein kinase 7	PTK7	1,31628	2,490231731	0,0472382
306	Cleft lip and palate transmembrane protein 1-like protein	CLPTM1L	1,46179	2,754499116	0,047297
307	Protein unc-45 homolog A	UNC45A	-1,4681	0,361458018	0,0476215
308	Coronin-1B	CORO1B;DKFZp7621166	-1,46178	0,363044927	0,0486049
309	Mitochondrial GTPase 1	MTG1	1,18344	2,271176773	0,0492729
310	Single-stranded DNA-binding protein; Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP1	1,26235	2,398861724	0,0493187
311	CCA tRNA nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	TRNT1	-1,57771	0,335013236	0,049682
312	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms short; Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	GNAS;GSA	-1,57589	0,335436131	0,0499519
313	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1	BZW1;hCG_2022736	-1,45321	0,365207931	0,0499661

Tab. 22 Auswertung SILAC Proteomanalytik.

Liste der 313 signifikant verändert exprimierten Proteine im Vergleich IU-TAB1-Zelllinie (AB-Thymom) vs. T1889-Zelllinie (Thymuskarzinom).

8 Literaturverzeichnis

Abreu R de S, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009): Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5, 1512–1526

Bell SP, Dutta A (2002): DNA Replication in Eukaryotic Cells. *Annu Rev Biochem* 71, 333–374

Berruti A, Borasio P, Gerbino A, Gorzegno G, Moschini T, Tampellini M, Ardisson F, Brizzi MP, Dolcetti A, Dogliotti L (1999): Primary chemotherapy with adriamycin, cisplatin, vincristine and cyclophosphamide in locally advanced thymomas: a single institution experience. *Br J Cancer* 81, 841–845

Braik T, Evans AT, Telfer M, McDunn S (2010): Paraneoplastic Neurological Syndromes: Unusual Presentations of Cancer. A Practical Review. *Am J Med Sci* 340, 301–308

Bühling KJ, Lepenies J, Witt K (Hrsg.): Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. (Klinik), 4., aktualisierte Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München Jena 2008 -> Lepenies J: Tumoren. In: Bühling KJ, Lepenies J, Witt K: Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4., aktualisierte Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München Jena 2008, 99-122

Bumgarner R (2013): DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr Protoc Mol Biol* A1 0 22, Unit-22.1.

Calmon MF, Rodrigues RV, Kaneto CM, Moura RP, Silva SD, Mota LDC, Pinheiro DG, Torres C, de Carvalho AF, Cury PM, et al. (2009): Epigenetic Silencing of CRABP2 and MX1 in Head and Neck Tumors. *Neoplasia* 11, 1329–1339

Campos B, Centner F-S, Bermejo JL, Ali R, Dorsch K, Wan F, Felsberg J, Ahmadi R, Grabe N, Reifenberger G, et al. (2011): Aberrant Expression of Retinoic Acid Signaling Molecules Influences Patient Survival in Astrocytic Gliomas. *Am J Pathol* 178, 1953–1964

Campos B, Warta R, Chaisaingmongkol J, Geiselhart L, Popanda O, Hartmann C, von Deimling A, Unterberg A, Plass C, Schmezer P, Herold-Mende C (2012): Epigenetically mediated downregulation of the differentiation-promoting chaperon protein CRABP2 in astrocytic gliomas. *Int J Cancer* 131, 1963–1968

Chalabreysse L, Roy P, Cordier J-F, Loire R, Gamondes J-P, Thivolet-Bejui F (2002): Correlation of the WHO schema for the classification of thymic epithelial neoplasms with prognosis: a retrospective study of 90 tumors. *Am J Surg Pathol* 26, 1605–1611

Chen G, Marx A, Wen-Hu C, Yong J, Puppe B, Stroebel P, Mueller-Hermelink HK (2002): New WHO histologic classification predicts prognosis of thymic epithelial tumors. *Cancer* 95, 420–429

Cox J, Mann M (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367–1372

Cox J, Mann M (2011): Quantitative, High-Resolution Proteomics for Data-Driven Systems Biology. *Annu Rev Biochem* 80, 273–299

Cui T, Hurtig M, Elgue G, Li S-C, Veronesi G, Essaghir A, Demoulin J-B, Pelosi G, Alimohammadi M, Öberg K, Giandomenico V (2010): Paraneoplastic Antigen Ma2 Autoantibodies as Specific Blood Biomarkers for Detection of Early Recurrence of Small Intestine Neuroendocrine Tumors. *PLOS ONE* 5, e16010

D'Acunto CW, Gbelcova H, Festa M, Ruml T (2014): The complex understanding of Annexin A1

phosphorylation. *Cell Signal* 26, 173–178

Dalma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG: [1] The Affymetrix GeneChip® Platform: An Overview; Band 410; hrsg. v. Enzymology B-M in; Academic Press 2006, 3–28

Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R, Hoard R, DesChamps T, Balmaceda C, Batchelor T, Gerstner E, Eichen J, Frennier J, et al. (1999): Ma1, a novel neuron- and testis-specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 122, 27–39

Delva L, Bastie J-N, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C (1999): Physical and Functional Interactions between Cellular Retinoic Acid Binding Protein II and the Retinoic Acid-Dependent Nuclear Complex. *Mol Cell Biol* 19, 7158–7167

Detterbeck F, Youssef S, Ruffini E, Okumura M (2011): A Review of Prognostic Factors in Thymic Malignancies. *J Thorac Oncol* 6, S1698–S1704

Detterbeck FC (2006): Clinical Value of the WHO Classification System of Thymoma. *Ann Thorac Surg* 81, 2328–2334

Diaz LK, Gupta R, Kidwai N, Sneige N, Wiley EL (2004): The use of TMA for interlaboratory validation of FISH testing for detection of HER2 gene amplification in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 52, 501–507

Edelman GM (1986): Cell Adhesion Molecules in the Regulation of Animal Form and Tissue Pattern. *Annu Rev Cell Biol* 2, 81–116

Edelman GM, Crossin KL (1991): Cell Adhesion Molecules: Implications for a Molecular Histology. *Annu Rev Biochem* 60, 155–190

Ehemann V, Kern MA, Breinig M, Schnabel PA, Gunawan B, Schulten H-J, Schlaeger C, Radlwimmer B, Steger CM, Dienemann H, et al. (2008): Establishment, characterization and drug sensitivity testing in primary cultures of human thymoma and thymic carcinoma. *Int J Cancer* 122, 2719–2725

Erde J, Loo RRO, Loo JA (2014): Enhanced FASP (eFASP) to Increase Proteome Coverage and Sample Recovery for Quantitative Proteomic Experiments. *J Proteome Res* 13, 1885–1895

Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabbatini E, Pacini R, Foa R, Pulsoni A, Favera RD, Pileri S (2004): Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet* 363, 1869–1871

Falkson CB, Bezjak A, Darling G, Gregg R, Malthaner R, Maziak DE, Yu E, Smith CA, McNair S, Ung YC, Evans WK (2009): The Management of Thymoma: A Systematic Review and Practice Guideline. *J Thorac Oncol* 4, 911–919

Favorskaya I, Kainov Y, Chemeris G, Komelkov A, Zborovskaya I, Tchevkina E (2014): Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* 35, 10295–10300

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71

Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991): Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251, 767–773

Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N (1999): Minichromosome Maintenance Proteins as Biological Markers of Dysplasia and Malignancy. *Clin*

Cancer Res 5, 2121–2132

Fujioka S, Shomori K, Nishihara K, Yamaga K, Nosaka K, Araki K, Haruki T, Taniguchi Y, Nakamura H, Ito H (2009): Expression of minichromosome maintenance 7 (MCM7) in small lung adenocarcinomas (pT1): Prognostic implication. *Lung Cancer* 65, 223–229

Fujita H, Takayama T, Takaoka N, Tan C, Igarashi H, Sugimura H, Ozono S (2015): Validity of Tissue Microarray by Immunohistochemistry. *Clin Lab* 61, 569–574

Futter CE, White IJ (2007): Annexins and Endocytosis. *Traffic* 8, 951–958

Gakiopoulou H, Korkolopoulou P, Levidou G, Thymara I, Saetta A, Piperi C, Givalos N, Vassilopoulos I, Ventouri K, Tsenga A, et al. (2007): Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer* 97, 1124–1134

Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA (2004): affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20, 307–315

Geiger T, Cox J, Ostasiewicz P, Wisniewski JR, Mann M (2010): Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Methods* 7, 383–385

Geiger T, Wisniewski JR, Cox J, Zanivan S, Kruger M, Ishihama Y, Mann M (2011): Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics. *Nat Protoc* 6, 147–157

Geiger T, Madden SF, Gallagher WM, Cox J, Mann M (2012): Proteomic Portrait of Human Breast Cancer Progression Identifies Novel Prognostic Markers. *Cancer Res* 72, 2428–2439

Geisow MJ, Walker JH, Boustead C, Taylor W (1987): Annexins—New family of Ca²⁺-regulated-phospholipid binding protein. *Biosci Rep* 7, 289–298

Giaginis C, Georgiadou M, Dimakopoulou K, Tsourouflis G, Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S (2009): Clinical significance of MCM-2 and MCM-5 expression in colon cancer: association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity. *Dig Dis Sci* 54, 282–291

Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S (2010): MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol* 25, 351–370

Girard N, Mornex F, Van Houtte P, Cordier J-F, van Schil P (2009): Thymoma: A Focus on Current Therapeutic Management. *J Thorac Oncol* 4, 119–126

Girard N, Ruffini E, Marx A, Faivre-Finn C, Peters S (2015): Thymic epithelial tumours: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 26, v40–v55

Gökmen-Polar Y, Sanders KL, Goswami CP, Cano OD, Zaheer NA, Jain RK, Kesler KA, Nelson RP, Vance GH, Smith D, et al. (2012): Establishment and characterization of a novel cell line derived from human thymoma AB tumor. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 92, 1564–1573

Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Bird K, Bell JA, Laskey RA, Coleman N (2003): Minichromosome Maintenance Protein 2 Is a Strong Independent Prognostic Marker in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 21, 4306–4313

Green AC, Marx A, Ströbel P, Mason M, Lim E, Jordan S, Ladas G, Dusmet M, Rice A, Nicholson AG (2015): Type A and AB thymomas: histological features associated with increased stage. *Histopathology* 66, 884–891

- Ha S-A, Shin SM, Namkoong H, Lee H, Cho GW, Hur SY, Kim TE, Kim JW (2004): Cancer-Associated Expression of Minichromosome Maintenance 3 Gene in Several Human Cancers and Its Involvement in Tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 10, 8386–8395
- Hayashi A, Fumon T, Miki Y, Sato H, Yoshino T, Takahashi K (2013): The evaluation of immunohistochemical markers and thymic cortical microenvironmental cells in distinguishing thymic carcinoma from type b3 thymoma or lung squamous cell carcinoma. *J Clin Exp Hematop JCEH* 53, 9–19
- Henley JD, Cummings OW, Patrick J, Loehrer S (2004): Tyrosine kinase receptor expression in thymomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 130, 222–224
- Huang H-Y, Huang W-W, Lin C-N, Eng H-L, Li S-H, Li C-F, Lu D, Yu S-C, Hsiung C-Y (2006): Immunohistochemical Expression of p16INK4A, Ki-67, and Mcm2 Proteins in Gastrointestinal Stromal Tumors: Prognostic Implications and Correlations with Risk Stratification of NIH Consensus Criteria. *Ann Surg Oncol* 13, 1633–1644
- Huang J, Wei W, Zhang J, Liu G, Bignell GR, Stratton MR, Futreal PA, Wooster R, Jones KW, Shapero MH (2004): Whole genome DNA copy number changes identified by high density oligonucleotide arrays. *Hum Genomics* 1, 287–299
- Hunter I, Sawa H, Edlund M, Obrink B (1996): Evidence for regulated dimerization of cell-cell adhesion molecule (C-CAM) in epithelial cells. *Biochem J* 320, 847–853
- Kallioniemi O-P, Kononen J, Sauter G (2000): Tissue microarrays for high-throughput profiling in molecular oncology. *Breast Cancer Res* 2, S.34
- Kato H, Miyazaki T, Fukai Y, Nakajima M, Sohda M, Takita J, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Ojima H, et al. (2003): A new proliferation marker, minichromosome maintenance protein 2, is associated with tumor aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol* 84, 24–30
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh Q-Y, Clark OH, McMillan A (2006): Diagnostic and prognostic value of cell-cycle regulatory genes in malignant thyroid neoplasms. *World J Surg* 30, 767–774
- Klopfleisch R, Klose P, da Costa A, Brunberg L, Gruber AD (2010): HEPACAM1 and 2 are differentially regulated in canine mammary adenomas and carcinomas and its lymph node metastases. *BMC Vet Res* 6, 15
- Koga K, Matsuno Y, Noguchi M, Mukai K, Asamura H, Goya T, Shimosato Y (1994): A review of 79 thymomas: Modification of staging system and reappraisal of conventional division into invasive and non-invasive thymoma. *Pathol Int* 44, 359–367
- Komura D, Shen F, Ishikawa S, Fitch KR, Chen W, Zhang J, Liu G, Ihara S, Nakamura H, Hurles ME, et al. (2006): Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res* 16, 1575–1584
- Kondo K, Monden Y (2003): Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg* 76, 878–884
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärnlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844–847
- Korkolopoulou P, Givalos N, Saetta A, Goudopoulou A, Gakiopoulou H, Thymara I, Thomas-Tsagli E, Patsouris E (2005): Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 expression in muscle-invasive urothelial cancer: a multivariate survival study including proliferation markers and cell cycle regulators. *Hum Pathol* 36, 899–907

- Korst RJ, Bezjak A, Blackmon S, Choi N, Fidias P, Liu G, Marx A, Wright C, Mock S, Rutledge JR, Keshavjee S (2014): Neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced thymic tumors: A phase II, multi-institutional clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 147, 36–46.e1
- Kozuka-Hata H, Goto Y, Oyama M: Phosphoproteomics-Based Characterization of Cancer Cell Signaling Networks; in: *Oncogenomics and Cancer Proteomics - Novel Approaches in Biomarkers Discovery and Therapeutic Targets in Cancer*; hrsg. v. Lopez-Camarillo C; InTech 2013
- Kumar R (2015): Myasthenia gravis and thymic neoplasms: A brief review. *World J Clin Cases* 3, 980–983
- Laitinen S, Martikainen PM, Tolonen T, Isola J, Tammela TLJ, Visakorpi T (2008): EZH2, Ki-67 and MCM7 are prognostic markers in prostatectomy treated patients. *Int J Cancer* 122, 595–602
- Laskey RA, Madine MA (2003): A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep* 4, 26–30
- Law J, Yu VC, Baksh S (2012): Modulator of Apoptosis 1: A Highly Regulated RASSF1A-Interacting BH3-Like Protein. *Mol Biol Int* 2012, e536802
- Li SS, Xue WC, Khoo US, Ngan HYS, Chan KYK, Tam IYS, Chiu PM, Ip PPC, Tam KF, Cheung ANY (2005): Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathology* 46, 307–313
- Liu Q-H, Shi M-L, Bai J, Zheng J-N (2015): Identification of ANXA1 as a lymphatic metastasis and poor prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 16, 2719–2724
- Loehrer PJ, Chen M, Kim K, Aisner SC, Einhorn LH, Livingston R, Johnson D (1997): Cisplatin, doxorubicin, and cyclophosphamide plus thoracic radiation therapy for limited-stage unresectable thymoma: an intergroup trial. *J Clin Oncol* 15, 3093–3099
- Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M (2006): MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol* 18, 130–136
- Mallikarjuna K, Sundaram CS, Sharma Y, Deepa PR, Khetan V, Gopal L, Biswas J, Sharma T, Krishnakumar S (2010): Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors. *PROTEOMICS – Clin Appl* 4, 449–463
- Manley S, Mucci NR, Marzo AMD, Rubin MA (2001): Relational Database Structure to Manage High-Density Tissue Microarray Data and Images for Pathology Studies Focusing on Clinical Outcome. *Am J Pathol* 159, 837–843
- Mann M (2006): Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 952–958
- Marx A, Weis C-A (2015): Sunitinib in thymic carcinoma: enigmas still unresolved. *Lancet Oncol* 16, 124–125
- Marx A, Willcox N, Leite MI, Chuang W-Y, Schalke B, Nix W, Ströbel P (2010): Thymoma and paraneoplastic myasthenia gravis. *Autoimmunity* 43, 413–427
- Marx A, Ströbel P, Badve SS, Chalabreysse L, Chan JKC, Chen G, de Leval L, Detterbeck F, Girard N, Huang J, et al. (2014): ITMIG Consensus Statement on the Use of the WHO Histological Classification of Thymoma and Thymic Carcinoma: Refined Definitions, Histological Criteria, and Reporting. *J Thorac Oncol* 9, 596–611
- Marx A, Chan JKC, Coindre J-M, Detterbeck F, Girard N, Harris NL, Jaffe ES, Kurrer MO, Marom

- EM, Moreira AL, et al. (2015): The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Thymus: Continuity and Changes. *J Thorac Oncol* 10, 1383–1395
- Marx A, Weis C-A, Ströbel P (2016): Thymomas. *Pathol* 37, 412–424
- Masaoka A, Monden Y, Nakahara K, Tanioka T (1981): Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 48, 2485–2492
- McArthur S, Yazid S, Christian H, Sirha R, Flower R, Buckingham J, Solito E (2009): Annexin A1 regulates hormone exocytosis through a mechanism involving actin reorganization. *FASEB J* 23, 4000–4010
- Miklos GLG, Maleszka R (2004): Microarray reality checks in the context of a complex disease. *Nat Biotechnol* 22, 615–621
- Moh MC, Zhang C, Luo C, Lee LH, Shen S (2005): Structural and Functional Analyses of a Novel Ig-like Cell Adhesion Molecule, hepaCAM, in the Human Breast Carcinoma MCF7 Cells. *J Biol Chem* 280, 27366–27374
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, et al. (2003): PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34, 267–273
- Moran CA, Suster S (2000): On the Histologic Heterogeneity of Thymic Epithelial Neoplasms. *Am J Clin Pathol* 114, 760–766
- Mu D, Gao Z, Guo H, Zhou G, Sun B (2013): Sodium Butyrate Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Human Prostate Cancer DU145 Cells by Up-Regulation of the Expression of Annexin A1. *PLoS ONE* 8, e74922
- Mullen B, Richardson JD (1986): Primary Anterior Mediastinal Tumors in Children and Adults. *Ann Thorac Surg* 42, 338–345
- Nahleh Z (2013): Paraneoplastic limbic encephalitis, an uncommon presentation of a common cancer: Case report and discussion. *Am J Case Rep* 14, 391–394
- Nakagawa K, Asamura H, Matsuno Y, Suzuki K, Kondo H, Maeshima A, Miyaoka E, Tsuchiya R (2003): Thymoma: a clinicopathologic study based on the new World Health Organization classification. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126, 1134–1140
- Ney DE, Messersmith W, Behbakht K (2014): Anti-Ma2 Paraneoplastic Encephalitis in Association with Recurrent Cervical Cancer. *J Clin Neurol* 10, 262–266
- Nichihara K (1992): Minichromosome maintenance protein 7 in colorectal cancer: Implication of prognostic significance. *Int J Oncol*
- Okuducu AF, Janzen V, Ko Y, Hahne JC, Lu H, Ma ZL, Albers P, Sahin A, Wellmann A, Scheinert P, Wernert N (2005): Cellular retinoic acid-binding protein 2 is down-regulated in prostate cancer. *Int J Oncol* 27, 1273–1282
- Okumura M, Ohta M, Tateyama H, Nakagawa K, Matsumura A, Maeda H, Tada H, Eimoto T, Matsuda H, Masaoka A (2002): The World Health Organization histologic classification system reflects the oncologic behavior of thymoma. *Cancer* 94, 624–632
- Omasa M, Date H, Sozu T, Sato T, Nagai K, Yokoi K, Okamoto T, Ikeda N, Tanaka F, Maniwa Y, for the Japanese Association for Research on the Thymus (2015): Postoperative radiotherapy is effective for thymic carcinoma but not for thymoma in stage II and III thymic epithelial tumors: The Japanese

Association for Research on the Thymus Database Study. *Cancer* 121, 1008–1016

Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002): Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376–386

Ota T, Clayton AC, Minot DM, Shridhar V, Hartmann LC, Gilks CB, Chien JR (2011): Minichromosome maintenance protein 7 as a potential prognostic factor for progression-free survival in high-grade serous carcinomas of the ovary. *Mod Pathol* 24, 277–287

Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, et al. (2012): Poly-ADP Ribosylation of Miki by tankyrase-1 Promotes Centrosome Maturation. *Mol Cell* 47, 694–706

Pan C-C, Chen PC-H, Chiang H (2004): KIT (CD117) is frequently overexpressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Pathol* 202, 375–381

Park JC, Kim HS, Kim JJ (2001): Bidirectional incremental parsing for automatic pathway identification with combinatory categorial grammar. *Pac Symp Biocomput* 2001, 396-407

Patel S, Macdonald OK, Nagda S, Bittner N, Suntharalingam M (2012): Evaluation of the Role of Radiation Therapy in the Management of Malignant Thymoma. *Int J Radiat Oncol* 82, 1797–1801

Pepinsky RB, Sinclair LK (1986): Epidermal growth factor-dependent phosphorylation of lipocortin. *Nature* 321, 81–84

Petrini I, Zucali PA, Lee HS, Pineda MA, Meltzer PS, Walter-Rodriguez B, Roncalli M, Santoro A, Wang Y, Giaccone G (2010): Expression and Mutational Status of c-kit in Thymic Epithelial Tumors. *J Thorac Oncol* 5, 1447–1453

Rassow J, Hauer K, Netzker R, Deutzmann R: *Biochemie. (Duale Reihe), 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2016 -> Rassow J Biochemie. (Duale Reihe), 4. Auflage; Thieme, Stuttgart 2016 Teil E Infektionen, Verletzung, Vergiftungen*

Remon J, Girard N, Mazieres J, Dansin E, Pichon E, Grellier L, Dubos C, Lindsay CR, Besse B (2016): Sunitinib in patients with advanced thymic malignancies: Cohort from the French RYTHMIC network. *Lung Cancer* 97, 99–104

Rescher U, Gerke V (2004): Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* 117, 2631–2639

Richter A, Schwager C, Hentze S, Ansorge W, Hentze MW, Muckenthaler M (2002): Comparison of fluorescent tag DNA labeling methods used for expression analysis by DNA microarrays. *BioTechniques* 33, 620–628, 630

Rieker RJ, Hoegel J, Morresi-Hauf A, Hofmann WJ, Blaeker H, Penzel R, Otto HF (2002): Histologic classification of thymic epithelial tumors: Comparison of established classification schemes. *Int J Cancer* 98, 900–906

Roden AC, Yi ES, Jenkins SM, Donovan JL, Cassivi SD, Garces YI, Marks RS, Aubry M-C (2015): Diagnostic significance of cell kinetic parameters in World Health Organization type A and B3 thymomas and thymic carcinomas. *Hum Pathol* 46, 17–25

Rodins K, Cheale M, Coleman N, Fox SB (2002): Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res* 8, 1075–1081

- Rosai J, Sobin LH: *Histological Typing of Tumours of the Thymus*. Springer, Berlin Heidelberg, 1999
- Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J (2001): Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol* 50, 339–348
- Ruberte E, Friederich V, Morriss-Kay G, Chambon P (1992): Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 115, 973–987
- Ruffini E, Detterbeck F, Van Raemdonck D, Rocco G, Thomas P, Weder W, Brunelli A, Guerrera F, Keshavjee S, Altorki N, et al. (2014): Thymic Carcinoma: A Cohort Study of Patients from the European Society of Thoracic Surgeons Database. *J Thorac Oncol* 9, 541–548
- Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G (1999): Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 5, 1966–1975
- Schug TT, Berry DC, Toshkov IA, Cheng L, Nikitin AY, Noy N (2008): Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR β/δ to RAR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7546–7551
- Schulte E, Schumacher U, Schünke M: *PROMETHEUS LernPaket Anatomie: LernAtlas Anatomie*. 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2016
- Scorsetti M, Leo F, Trama A, D'Angelillo R, Serpico D, Macerelli M, Zucali P, Gatta G, Garassino MC (2016): Thymoma and thymic carcinomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 99, 332–350
- Sessler RJ, Noy N (2005): A Ligand-Activated Nuclear Localization Signal in Cellular Retinoic Acid Binding Protein-II. *Mol Cell* 18, 343–353
- Simon R, Mirlacher M, Sauter G (2010): Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. *Methods Mol Biol* 664, 113–126
- Skouteris GG, Schröder CH (1996): The Hepatocyte Growth Factor Receptor Kinase-mediated Phosphorylation of Lipocortin-1 Transduces the Proliferating Signal of the Hepatocyte Growth Factor. *J Biol Chem* 271, 27266–27273
- Sobral-Leite M, Wesseling J, Smit VTHBM, Nevanlinna H, van Miltenburg MH, Sanders J, Hofland I, Blows FM, Coulson P, Patrycja G, et al. (2015): Annexin A1 expression in a pooled breast cancer series: association with tumor subtypes and prognosis. *BMC Med* 13: 156. doi: 10.1186/s12916-015-0392-6
- Solito E, Raguene-Nicol C, De Coupade C, Bisagni-Faure A, Russo-Marie F (1998): U937 cells deprived of endogenous annexin 1 demonstrate an increased PLA2 activity. *Br J Pharmacol* 124, 1675–1683
- Song N, Chen G, Zhang P, Liu M, He W-X, Jiang G-N (2012): Diagnostic and clinical significance of KIT(CD117) expression in thymic epithelial tumors in China. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 2745–2748
- Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B (1998): Comprehensive Identification of Cell Cycle-regulated Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization. *Mol Biol Cell* 9, 3273–3297
- Sperling B, Marschall J, Kennedy R, Pahwa P, Chibbar R (2003): Thymoma: a review of the clinical and pathological findings in 65 cases. *Can J Surg* 46, 37–42
- Steen H, Mann M (2004): The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 699–711

- Stoughton RB (2005): Applications of Dna Microarrays in Biology. *Annu Rev Biochem* 74, 53–82
- Ströbel P, Hartmann M, Jakob A, Mikesch K, Brink I, Dirnhofner S, Marx A (2004a): Thymic Carcinoma with Overexpression of Mutated KIT and the Response to Imatinib. *N Engl J Med* 350, 2625–2626
- Ströbel P, Bauer A, Puppe B, Kraushaar T, Krein A, Toyka K, Gold R, Semik M, Kiefer R, Nix W, et al. (2004b): Tumor Recurrence and Survival in Patients Treated for Thymomas and Thymic Squamous Cell Carcinomas: A Retrospective Analysis. *J Clin Oncol* 22, 1501–1509
- Ströbel P, Hohenberger P, Marx A (2010): Thymoma and Thymic Carcinoma: Molecular Pathology and Targeted Therapy. *J Thorac Oncol* 5, S286–S290
- Ströbel P, Weis C-A, Marx A (2016): Thymuskarzinome. *Pathol* 37, 425–433
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005): Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545–15550
- Subramanian A, Kuehn H, Gould J, Tamayo P, Mesirov JP (2007): GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* 23, 3251–3253
- Suster S, Moran CA (2008): Histologic Classification of Thymoma: The World Health Organization and Beyond. *Hematol Oncol Clin North Am* 22, 381–392
- Takahashi M, Yang XJ, Lavery TT, Furge KA, Williams BO, Tretiakova M, Montag A, Vogelzang NJ, Re GG, Garvin AJ, et al. (2002): Gene Expression Profiling of Favorable Histology Wilms Tumors and Its Correlation with Clinical Features. *Cancer Res* 62, 6598–6605
- Takisawa H, Mimura S, Kubota Y (2000): Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr Opin Cell Biol* 12, 690–696
- Thomas A, Rajan A, Berman A, Tomita Y, Brzezniak C, Lee M-J, Lee S, Ling A, Spittler AJ, Carter CA, et al. (2015): Sunitinib in patients with chemotherapy-refractory thymoma and thymic carcinoma: an open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol* 16, 177–186
- Tokuyasu N, Shomori K, Nishihara K, Kawaguchi H, Fujioka S, Yamaga K, Ikeguchi M, Ito H (2008): Minichromosome maintenance 2 (MCM2) immunoreactivity in stage III human gastric carcinoma: clinicopathological significance. *Gastric Cancer* 11, 37–46
- Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y, Cho H-S, Yoshimatsu M, Takawa M, Hayami S, Maejima K, Chino M, Field HI, et al. (2011): Minichromosome Maintenance Protein 7 is a potential therapeutic target in human cancer and a novel prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 10, 65
- Tye BK (1999): MCM Proteins in DNA Replication. *Annu Rev Biochem* 68, 649–686
- Varticovski L, Chahwala SB, Whitman M, Cantley L, Schindler D, Chow EP, Sinclair LK, Pepinsky RB (1988): Location of sites in human lipocortin I that are phosphorylated by protein tyrosine kinases and protein kinases A and C. *Biochemistry (Mosc)* 27, 3682–3690
- Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, Gerstner E, Eichen J, Posner JB, Dalmau J (1999): A Serologic Marker of Paraneoplastic Limbic and Brain-Stem Encephalitis in Patients with Testicular Cancer. *N Engl J Med* 340, 1788–1795
- Vreeland AC, Levi L, Zhang W, Berry DC, Noy N (2014): Cellular retinoic acid-binding protein 2

inhibits tumor growth by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 289, 34065–34073

Wang KL, Wu T-T, Resetkova E, Wang H, Correa AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Rashid A, Hamilton SR, Albarracin CT (2006): Expression of Annexin A1 in Esophageal and Esophagogastric Junction Adenocarcinomas: Association with Poor Outcome. *Clin Cancer Res* 12, 4598–4604

Weis C-A, Yao X, Deng Y, Detterbeck FC, Marino M, Nicholson AG, Huang J, Ströbel P, Antonicelli A, Marx A (2015): The Impact of Thymoma Histotype on Prognosis in a Worldwide Database. *J Thorac Oncol* 10, 367–372

Welsch U, Deller T, Kummer W (Hrsg.): *Lehrbuch Histologie: 4. Aufl*; Elsevier, Urban & Fischer, München 2014

Wills NM, Moore B, Hammer A, Gesteland RF, Atkins JF (2006): A Functional –1 Ribosomal Frameshift Signal in the Human Paraneoplastic Ma3 Gene. *J Biol Chem* 281, 7082–7088

Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M (2009): Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359–362

Wold B, Myers RM (2008): Sequence census methods for functional genomics. *Nat Methods* 5, 19–21

Wright CD, Choi NC, Wain JC, Mathisen DJ, Lynch TJ, Fidias P (2008): Induction Chemoradiotherapy Followed by Resection for Locally Advanced Masaoka Stage III and IVA Thymic Tumors. *Ann Thorac Surg* 85, 385–389

Xiao W, Hong H, Awadallah A, Yu S, Zhou L, Xin W (2014): CRABP-II is a highly sensitive and specific diagnostic molecular marker for pancreatic ductal adenocarcinoma in distinguishing from benign pancreatic conditions. *Hum Pathol* 45, 1177–1183

Yamamoto T, Tsuji S (2010): [Anti-Ma2-associated encephalitis and paraneoplastic limbic encephalitis]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyū No Shinpo* 62, 838–851

Yang J, Ramnath N, Moysich KB, Asch HL, Swede H, Alrawi SJ, Huberman J, Geradts J, Brooks JS, Tan D (2006): Prognostic significance of MCM2, Ki-67 and gelsolin in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 6, 203

Yang Q, Wang R, Xiao W, Sun F, Yuan H, Pan Q (2016): Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2 Is Strikingly Downregulated in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Functions as a Tumor Suppressor. *PLoS ONE* 11 2016 Feb 3;11(2):e0148381

Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, Behm FG, Raimondi SC, Relling MV, Patel A, et al. (2002): Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1, 133–143

Yuan J, Tang Z, Yang S, Li K (2013): CRABP2 Promotes Myoblast Differentiation and Is Modulated by the Transcription Factors MyoD and Sp1 in C2C12 Cells. *PLoS ONE* 8

Zhang B, Wang J, Wang X, Zhu J, Liu Q, Shi Z, Chambers MC, Zimmerman LJ, Shaddox KF, Kim S, et al. (2014): Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 513, 382–387

Zhang H, Zhang L, Wang J, Ma Y, Zhang J, Mo F, Zhang W, Yan S, Yang G, Lin B (2009): Proteomic analysis of bone tissues of patients with osteonecrosis of the femoral head. *Omics J Integr Biol* 13, 453–466

van Zwieten A (2013): Tissue microarray technology and findings for diagnostic immunohistochemistry. *Pathology (Phila)* 45, 71–79

Danksagung

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Philipp Ströbel (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen), der mir diese Promotion in dem von ihm geleiteten Institut ermöglicht hat. Er stand mir, wie auch vielen anderen Doktoranden im Institut, stets für persönliche und wissenschaftliche Fragen zur Verfügung.

Für die Rohdaten der Genexpressionsanalyse von Thymusepithel-Tumoren möchte ich Dr. rer. nat. Carsten Sticht (Zentrum für Medizinische Forschung, Medizinischen Fakultät Mannheim) danken.

Weiterhin bedanke ich mich für die Kooperationen mit Prof. Dr. Henning Urlaub (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen), Dr. med. Thomas Oellerich (Universitätsklinikum Frankfurt, Medizinische Klinik II – Hämatologie und Onkologie), Prof. Dr. Hubert Serve (Universitätsklinikum Frankfurt, Medizinische Klinik II – Hämatologie und Onkologie) und Dr. rer. nat. Li Beißbarth (Institut der Universitätsmedizin Göttingen), die mir das Durchführen und Auswerten massenspektrometrischer Methoden ermöglicht haben.

Außerordentlicher Dank gebührt Dr. med. Hanibal Bohnenberger (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen). Während meines Forschungssemesters führte er mich als Betreuer an die experimentelle Laborarbeit heran und bestärkte hierdurch meinen Wunsch zur wissenschaftlichen Arbeit. In der Folgezeit erwies er sich ausnahmslos als zuverlässiger Ansprechpartner und war aufgrund seiner Ratschläge und konstruktiven Kritik wegweisend für dieses Projekt.

Schließlich möchte ich meiner Familie danken, welche mich fortdauernd unterstützt und mir ein zusätzliches Semester in der experimentellen Forschung ermöglicht hat.

Lebenslauf

Am 19.04.1989 wurde ich als Sohn von Patrizia Wortmann und Werner Wortmann in Neumünster geboren.

Dort wuchs ich mit einem älteren Bruder und zwei jüngeren Schwestern auf und besuchte ab dem Sommer 1996 für drei Jahre die Grundschule Gadeland. 1999 wechselte ich zur Grundschule Gartenstadt und im darauffolgenden Jahr zum Immanuel-Kant-Gymnasium Neumünster. Hier erlangte ich im Jahr 2008 mein Abitur.

Anschließend studierte ich für zwei Semester Elektro- und Informationstechnik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Im Wintersemester 2009/10 wechselte ich den Studiengang und begann, an der Georg-August-Universität Göttingen Humanmedizin zu studieren. Hier legte ich im März 2012 das Physikum (M1) und im Oktober 2015 das 2. Staatsexamen (M2) ab. Das folgende Praktische Jahr verbrachte ich ausschließlich in Göttingen. Während des ersten Tertials für Innere Medizin arbeitete ich im Evangelischen Krankenhaus Weende. Das zweite Tertial leistete ich in der Psychiatrie der Universitätsmedizin Göttingen ab, gefolgt vom dritten Tertial in der Unfallchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen. Im Dezember 2016 absolvierte ich die mündliche Prüfung (M3) zum Erhalt der Approbation.

Seit dem 01. Februar 2017 arbeite ich als Assistenzarzt in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover.