

Aus dem Institut für Pathologie  
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Proteomische Analyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Julius Bodemeyer**

aus

Kassel

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Betreuer: Prof. Dr. med. V. Ellenrieder

### **Prüfungskommission**

Referent Prof. Dr. med. P. Ströbel

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. V. Ellenrieder

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 11.01.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Proteomische Analyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

## **Publikationen zum Thema der Doktorarbeit:**

Barbarics B, Eildermann K, Kaderali L, Cyganek L, Plessmann U, Bodemeyer J, Paul T, Ströbel P, Urlaub H, Tirilomis T et al. (2021): Proteomic mapping of atrial and ventricular heart tissue in patients with aortic valve stenosis. *Sci Rep* 11, 24389

Bohnenberger H, Kaderali L, Ströbel P, Yepes D, Plessmann U, Dharia NV, Yao S, Heydt C, Merkelbach-Bruse S, Emmert A et al. (2018): Comparative proteomics reveals a diagnostic signature for pulmonary head-and-neck cancer metastasis. *EMBO Mol Med* 10, e8428

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Neuroendokrine Tumoren des Thymus.....	1
1.1.1 Überblick und Einteilung.....	1
1.1.2 Typisches Karzinoid (TC).....	4
1.1.3 Atypisches Karzinoid (AC).....	5
1.1.4 Großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC).....	5
1.1.5 Kleinzelliges Karzinom (SCC).....	7
1.2 Vergleich mit neuroendokrinen Tumoren der Lunge.....	8
1.3 Massenspektrometrische Proteomik.....	12
1.3.1 Grundlagen der massenspektrometrischen Proteomik.....	12
1.3.2 Quantitative Massenspektrometrie mittels metabolischem Labeling - Das SILAC-Prinzip.....	12
1.3.3 Super-SILAC-basierte quantitative Massenspektrometrie.....	13
1.4 Ziel der Studie.....	16
<b>2 Material .....</b>	<b>17</b>
2.1 Geräte.....	17
2.2 Computersoftware und Internetadressen.....	18
2.3 Materialien.....	19
2.4 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.5 Puffer und Lösungen.....	21
2.6 Kits.....	21
2.7 Zellkultur.....	22
2.7.1 Materialien für Zellkultur.....	22
2.7.2 Chemikalien und Reagenzien für Zellkultur.....	22
2.7.3 Medien und Zusätze für Zellkultur.....	23
2.7.4 Zelllinien.....	23
<b>3 Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.1 Zusammenstellen des Untersuchungskollektivs.....	25
3.2 Zellbiologische Methoden.....	25
3.2.1 Kulturbedingungen.....	25
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	26
3.2.3 Labeln der Zellen und Expansion.....	26
3.3 Proteinbiochemische Methoden.....	27
3.3.1 Proteinisolierung aus FFPE-Gewebe.....	27
3.3.2 Proteinisolierung aus kultivierten neuroendokrinen Tumorzellen.....	27
3.3.3 Herstellung eines Proteinquantifizierungsstandard aus Zellysaten.....	28

3.3.4	Mischen von Gewebelysaten und Proteinquantifizierungsstandard und weitere Probenaufreinigung.....	28
3.3.5	Aufreinigung eines kleinen Probensets zum Testen des Super-SILAC Standards .....	30
3.3.6	Fraktionierung der Peptide .....	31
3.4	Massenspektrometrische Methoden.....	32
3.4.1	Massenspektrometrie – Durchführung.....	32
3.4.2	Massenspektrometrie – Datenverarbeitung .....	33
3.4.3	Bioinformatische statistische Datenanalyse .....	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
4.1	Zusammenstellen des Probenkollektivs.....	35
4.2	Proteinisolation aus FFPE-Gewebe.....	38
4.2.1	Proteinisolation aus einer Testreihe von FFPE-Gewebe .....	38
4.2.2	Proteinisolation aus FFPE-Gewebe von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge.....	39
4.3	Etablierung eines Proteinquantifizierungsstandards für neuroendokrine Tumoren.....	43
4.3.1	Auswahl der Zelllinien für den Proteinquantifizierungsstandard.....	43
4.3.2	Evaluierung der Qualität des Proteinquantifizierungsstandards.....	44
4.4	Peptidaufreinigung durch <i>filter-aided sample preparation</i> .....	47
4.4.1	Peptidaufreinigung einer Testreihe.....	47
4.4.2	Peptidaufreinigung der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge.....	48
4.5	Quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge .....	51
4.6	Explorative Datenanalyse der MS-proteomischen Daten .....	53
4.6.1	Hauptkomponentenanalyse und <i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i> (t-SNE) Analysis.....	53
4.7	Differentielle Proteinexpressionsanalyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge.....	56
4.7.1	Differentielle Proteinexpression – Thymus <i>high grade</i> Tumoren vs. Lungen <i>high grade</i> Tumoren .....	56
4.7.2	Differentielle Proteinexpression – Thymus <i>low grade</i> Tumoren vs. Lungen <i>low grade</i> Tumoren .....	57
4.7.3	Differentielle Proteinexpression – Lungen <i>low grade</i> Tumoren vs. Lungen <i>high grade</i> Tumoren .....	61
4.7.4	Differentielle Proteinexpression – Thymus <i>low grade</i> Tumoren vs. Thymus <i>high grade</i> Tumoren .....	65
4.7.5	Differentielle Proteinexpression – TNET-G3 vs. Thymus <i>low grade</i> Tumoren.....	68
4.7.6	Differentielle Proteinexpression – TNET-G3 vs. Thymus <i>high grade</i> Tumoren .....	69
4.7.7	Differentielle Proteinexpression – Thymus <i>low grade</i> Tumoren und TNET-G3 gepoolt vs. Thymus <i>high grade</i> Tumoren.....	73
4.7.8	Differentielle Proteinexpression – Neuroendokrine <i>low grade</i> Tumoren und TNET-G3 gepoolt vs. neuroendokrine <i>high grade</i> Tumoren.....	77
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>81</b>
5.1	Quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse durch Verwendung eines Proteinquantifizierungsstandards.....	82
5.2	Diagnostische Trennung von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge durch quantitative Massenspektrometrie.....	83

---

5.3	Überexpression von Proteinen des MCM-Komplexes in neuroendokrinen <i>high grade</i> Tumoren von Thymus und Lunge .....	84
5.4	Einteilung von neuroendokrinen Tumoren des Thymus .....	85
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	
ABC	Ammoniumhydrogencarbonat (Ammoniumbicarbonat)
AC	Atypisches Karzinoid
ACN	Acetonitril
AGC	<i>automatic gain control</i> (automatische Verstärkungsregelung)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGH	<i>comparative genomic hybridization</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DCA	<i>dichloroacetic acid</i> (Dichloressigsäure)
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
EZH2	<i>enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
FA	<i>formic acid</i> (Ameisensäure)
FASP	<i>filter aided sample preparation</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FDR	<i>false discovery rate</i> (Falscherkennungsrate)
FFPE-Gewebe	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IAA	<i>iodoacetamide</i> (Iodacetamid)
IDCR	<i>ionic detergent compatibility reagent</i>
LCNEC	<i>large cell neuroendocrine carcinoma</i> (großzelliges neuroendokrines Karzinom)
LHG	Lungen <i>high grade</i> Tumor
LLG	Lungen <i>low grade</i> Tumor
MCM-Komplex	“ <i>minichromosome maintenance-Komplex</i> ”
MEN-1	multiple endokrine Neoplasie
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NET	Neuroendokriner Tumor
PAX8	<i>paired-box-protein 8</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCA	<i>principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PNET	Neuroendokriner Tumor der Lunge (pulmonaler neuroendokriner Tumor)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute



RT	Raumtemperatur
SCC	<i>small cell carcinoma</i> (kleinzelliges Karzinom)
SCLC	<i>small cell lung carcinoma</i> (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
TC	Typisches Karzinoid
TCEP	<i>tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride</i>
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
THG	Thymus <i>high grade</i> Tumor
TLG	Thymus <i>low grade</i> Tumor
TNET	neuroendokriner Tumor des Thymus
TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor-1
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Tumoren des Thymus

### 1.1.1 Überblick und Einteilung

Neuroendokrine Tumoren des Thymus (TNETs) sind sehr seltene Tumoren, die 1972 erstmals beschrieben wurden. Man geht davon aus, dass sie von thymischen neuroendokrinen Zellen abstammen, die eine kleine Zellpopulation im Thymus ausmachen (Rosai und Higa 1972). Sie treten mit einer Inzidenz von etwa 1 zu 5 Millionen auf (Gaur et al. 2010). Die meisten Betroffenen sind im Alter von 50 – 60 Jahren, wobei die Spanne von unter zehn bis über 80 Jahre reicht, mit einem Überwiegen des männlichen Geschlechts im Verhältnis von ca. 3 : 1 (Moran und Suster 2000b; Gaur et al. 2010; Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014; Filosso et al. 2015; Zhao et al. 2016; Dinter et al. 2019; Zaleski et al. 2021). TNETs machen 4 – 7 % der Tumoren des Thymus und Mediastinums aus und treten vor allem im vorderen Mediastinum auf (Soga et al. 1999; Gaur et al. 2010; Zhao et al. 2016).

In der Klassifikation der World Health Organization (WHO) von 2015 (Marx et al. 2015) werden anhand von Morphologie, Mitosezahl und dem Vorhandensein von Nekrosen vier Subtypen unterschieden: typisches Karzinoid (TC), atypisches Karzinoid (AC), großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC) und kleinzelliges Karzinom (SCC) (Tabelle 1, Abbildung 1). Diese Kriterien haben sich in der kürzlich erschienenen neuen fünften Edition der WHO nicht verändert (Ströbel et al. 2021). „Neuroendokrine Differenzierung“ in TC, AC und LCNEC ist definiert als starke und diffuse Expression von üblicherweise mehr als einem neuroendokrinen Marker (z. B. Chromogranin, Synaptophysin) in mehr als 50 % der Tumorzellen. Die Diagnose eines SCC erfolgt rein auf histomorphologischer Basis. Eine Expression neuroendokriner Marker ist oft vorhanden, aber für die Einordnung als SCC nicht nötig (Marx et al. 2015; Bohnenberger et al. 2017). Die Bestimmung der Proliferationsrate der Tumorzellen mittels immunhistochemischer Ki67-Antigenfärbung wird zwar häufig durchgeführt, ist aber noch nicht Bestandteil der Klassifikation (Bohnenberger et al. 2017). Alle neuroendokrinen Tumoren des Thymus werden als maligne eingestuft und lassen sich diesbezüglich in drei Gruppen einteilen: *low grade* (TC), *intermediate grade* (AC) und *high grade* (LCNEC und SCC) (Marx et al. 2015).

Bislang ging man davon aus, dass Karzinoide und *high grade* TNETs (LCNEC und SCC) verschiedene biologische Entitäten sind und verschiedene molekulare Veränderungen zu ihrer Entstehung führen (Ströbel et al. 2014; Marx et al. 2015). Es wurden allerdings auch Fälle beschrieben, bei denen im selben Tumor Areale gut oder mäßig differenzierter Zellen, im Sinne von Karzinoiden, und gleichzeitig schlecht differenzierte Bereiche vorkamen, die

einem *high grade* Tumor entsprechen (Moran und Suster 2000a). In einer neueren Arbeit wurden gemeinsame genetische Alterationen in Karzinoiden und assoziierten synchron oder metachron aufgetretenen *high grade* neuroendokrinen Thymuskarzinomen beschrieben. Dabei wurde ebenso innerhalb desselben Tumors das gleichzeitige Vorkommen von variabel vermischten Arealen mit geringem oder hohem Ki67-Index bzw. niedriger oder hoher Mitoserate beobachtet (Fabbri et al. 2017). In einer weiteren Arbeit wurden Fälle von Karzinoiden des Thymus beschrieben, bei denen metachron aufgetretene Metastasen höhere Mitosezahlen und Ki67-Indices aufwiesen und demnach nicht mehr als Karzinoide klassifiziert werden konnten, sondern in eine andere Kategorie eingeordnet wurden (Dinter et al. 2019). Dies wird in Kapitel 1.1.4 näher ausgeführt. Ob die Transformation von Karzinoiden tatsächlich einen möglichen Weg der Entstehung von *high grade* TNETs darstellt, wird in der Literatur diskutiert (Fabbri et al. 2017; Pelosi et al. 2017a).

**Tabelle 1: WHO-Klassifikation der neuroendokrinen Thymustumoren von 2021.** Dargestellt ist die Einteilung der neuroendokrinen Tumoren des Thymus in die vier Subtypen typisches Karzinoid (TC), atypisches Karzinoid (AC), großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC) und kleinzelliges Karzinom (SCC) nach den Kriterien der World Health Organization von 2021. Die Kriterien beinhalten die Histologie der Zellen, die Anzahl der Mitosen pro 2 mm<sup>2</sup> und das Vorhandensein von Nekrosen im Tumorgewebe. In der linken Spalte sind neben den verschiedenen Subtypen die jeweiligen relativen Häufigkeiten dieser aufgeführt. (Modifiziert nach Ahn et al. 2012; Ströbel et al. 2014; Filosso et al. 2015; Marx et al. 2015; Bohnenberger et al. 2017; Dinter et al. 2019; Ströbel et al. 2021)

Subtyp	Histologische Kriterien
<b>Typisches Karzinoid (TC)</b> ~ 20 %	< 2 Mitosen/2 mm <sup>2</sup> , keine Nekrosen
<b>Atypisches Karzinoid (AC)</b> ~ 40 – 50 %	< 2 Mitosen/2 mm <sup>2</sup> + Nekrosen oder 2 – 10 Mitosen/2 mm <sup>2</sup> +/- Nekrosen
<b>Großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC)</b> ~ 15 – 25 %	> 10 Mitosen/2 mm <sup>2</sup> keine kleinzellige Histologie
<b>Kleinzelliges Karzinom (SCC)</b> ~ 5 – 10 %	Kleinzellige Histologie > 10 Mitosen/2 mm <sup>2</sup>

Makroskopisch werden die TNETs häufig als große und weiche, gelb-bräunliche und oft infiltrativ in Nachbarorgane (Pleura, Perikard, Lunge, große Gefäße) vorwachsende Masse beschrieben (Moran und Suster 2000b; Ahn et al. 2012; Brcic et al. 2016). Die Schnittfläche

ist grauweiß bis bräunlich, es können Einblutungen, nekrotische Areale und Kalzifizierungen auftreten (Brcic et al. 2016). Die Tumoren können sehr klein sein (1 – 2 cm), aber auch bis zu 25 cm groß werden, mit einer durchschnittlichen Größe von 7 – 8 cm (Montpréville et al. 1996; Soga et al. 1999; Moran und Suster 2000b; Gaur et al. 2010; Ahn et al. 2012; Ströbel et al. 2014; Filosso et al. 2015; Dinter et al. 2019; Zaleski et al. 2021).

Etwa die Hälfte der Patienten zeigt Symptome des lokalen Tumorwachstums wie Husten, Dyspnoe, Thoraxschmerz und obere Einflusstauung. Bei den Karzinoiden können überdies paraneoplastische Syndrome auftreten (Cushing-Syndrom, Hyperkalzämie), bei den groß- und kleinzelligen Karzinomen ist dies seltener (Bohnenberger et al. 2017). Karzinoide mit ektopter Hormonproduktion zeigen eine schlechtere Prognose als nicht-hormonproduzierende Karzinoide (Ahn et al. 2012). Viele Patienten (bis zu 80 % nach Zhao et al. 2016) haben bei Diagnosestellung eine lymphogene Ausbreitung und im Verlauf der Tumorerkrankung entwickeln sich sehr oft hämatogene Metastasen, vor allem in Knochen, Lunge und Leber (Crona et al. 2013). Mit etwa 70 % präsentiert sich die Mehrheit der Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien. Dies spricht für die vergleichsweise hohe biologische Aggressivität der neuroendokrinen Tumoren des Thymus (Filosso et al. 2015).

Es gibt eine Assoziation der Thymuskarzinoide mit der multiplen endokrinen Neoplasie Typ1 (MEN-1). Etwa 25 % der Karzinoide treten im Zusammenhang mit MEN-1 auf, wobei vorwiegend Männer betroffen sind (Rosai et al. 1972; Teh et al. 1994; Teh et al. 1998). Umgekehrt tritt bei 1 – 8 % der Patienten mit MEN-1 ein Thymuskarzinoid auf (Gibril et al. 2003; Ferolla et al. 2005; Goudet et al. 2009; Sakurai et al. 2012; Sakurai et al. 2013; Goudet et al. 2015; Christakis et al. 2016).

Die in der Literatur beschriebene 5-Jahresüberlebensrate der TNETs reicht von 30 – 85 % (Montpréville et al. 1996; Moran und Suster 2000b; Gaur et al. 2010; Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014; Filosso et al. 2015; Zhao et al. 2016). Für typische Karzinoide beträgt sie 50 – 100 %, für atypische Karzinoide 20 – 80 % (Soga et al. 1999; Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014), für die LCNEC 30 – 66 % und für die kleinzelligen Karzinome 0 % (Shoji et al. 2011; Ströbel et al. 2014; Bohnenberger et al. 2017). In der Reihe vom TC über das AC und das LCNEC zum SCC nimmt die Überlebensrate wie auch die Differenzierung der Tumoren ab. Gleichzeitig steigt die proliferative Aktivität und die Anzahl genetischer Aberrationen (Ströbel et al. 2014). Als prognostisch relevant gelten Tumorstadium, die histopathologische Klassifikation der WHO, der Resektionsstatus nach Operation und das Auftreten von Rezidiven (Montpréville et al. 1996; Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014). Sowohl die Einteilung nach Masaoka-Koga (Koga et al. 1994), welche für Thymome entwickelt wurde, aber häufig auch für neuroendokrine Tumoren des Thymus verwendet wird (Zhao et al. 2016), als auch die von der International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) und der International Thymic Malignancies Interest Group (ITMIG) vorgeschlagene TNM-Klassifizierung von 2014, sagen den klinischen Verlauf der TNETs nur unzureichend vorher (Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014; Zhao et al. 2016). Bezüglich der

statistischen Signifikanz der genannten Prognosefaktoren gibt es allerdings teilweise widersprüchliche Ergebnisse (Filosso et al. 2015).

In der Literatur finden sich nur wenig Informationen zur Therapie von TNETs, sodass es bislang keine generellen Therapiestandards gibt (Filosso et al. 2015). Bei Operabilität gilt als Therapie der Wahl die komplette chirurgische Resektion des Tumors und der regionalen Lymphknoten, wobei die Lymphadenektomie noch nicht standardisiert durchgeführt wird. Für Chemotherapie und Radiotherapie liegen bisher keine verlässlichen und adäquaten Daten vor (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017). Rezidive treten laut Angaben der Literatur in 17 – 83% der Fälle auf (Cardillo et al. 2012; Ströbel et al. 2014; Filosso et al. 2015). Crona et al. empfehlen die Therapie in spezialisierten Zentren mit radikaler Operation, wenn immer möglich und in nicht resektablen Fällen oder bei Fernmetastasen eine Behandlung mit Temozolomid bei Karzinoiden oder platinbasierter Chemotherapie bei *high grade* Tumoren (Crona et al. 2013). Es wurden zudem Fälle neuroendokriner Tumoren beschrieben, bei denen eine Behandlung mit Somatostatinanaloga allein oder in Kombination mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Sunitinib zu einem Therapieansprechen führte (Dham et al. 2008; Kulke et al. 2008; Okabe et al. 2014).

### 1.1.2 Typisches Karzinoid (TC)

Das typische Karzinoid ( $< 2$  Mitosen/ $2 \text{ mm}^2$ , keine Nekrosen (Ströbel et al. 2021)) macht etwa 20 % aller TNETs aus (Ströbel et al. 2014) und betrifft in über 60 % der Fälle Männer mittleren Alters (Soga et al. 1999). Etwa 25 % der TCs im Thymus sind mit einem MEN-1-Syndrom assoziiert (Teh et al. 1998). Im Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbten histologischen Präparat (Abbildung 1) sind die Tumorzellen einheitlich rund-oval bzw. polygonal mit runden Kernen, feinkörnigem Chromatin und unauffälligen Nucleoli. Das Zytoplasma ist blass eosinophil oder basophil, es finden sich kaum zelluläre Atypien, keine Nekrosen und nur einzelne Mitosen. Das Wachstumsmuster ist typischerweise trabekulär mit Formation von Rosetten und palisadenartig angeordneten Zellkernen. Ebenfalls können bandartige, girlandenförmige Muster, solide Zellnester und glanduläre Strukturen vorkommen. Für neuroendokrine Tumoren typisch sind die zahlreichen feinen Blutgefäße (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017).

Immunhistochemisch sind typische Karzinoide fast immer positiv für Zytokeratin AE1/AE3 und CAM5.2 und mehr als die Hälfte der Zellen sind stark positiv für die üblichen neuroendokrinen Marker (z. B. Chromogranin und Synaptophysin), der Ki67-Index ist gering (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017). Etwa ein Drittel der Fälle war in einer Studie positiv für PAX8 (*paired-box-protein 8*) (Weissferdt et al. 2013). In der Regel sind thymische Karzinoide negativ für TTF-1 (Thyroidaler Transkriptionsfaktor-1) (Oliveira et al. 2001; Weissferdt et al. 2013).

Mögliche Differentialdiagnosen sind Paragangliome (meist histologisch unterscheidbar und zudem Zytokeratin-negativ (Weissferdt et al. 2014)), Thymome, hierbei vor allem die Typ-

A-Thymome, welche aber negativ für die neuroendokrinen Marker sind, medulläre Schilddrüsenkarzinome und Karzinoide der Lunge (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017).

Typische Karzinoide weisen nur wenig genetische Aberrationen auf. In bis zu 40 % sind keine genetischen Veränderungen in der CGH (*comparative genomic hybridization*) zu finden (Pan et al. 2005; Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014). Lymphknoten- oder Fernmetastasen kommen im Verlauf bei etwa 50 % der Betroffenen vor. Häufige Metastasierungsorte sind die Lungen und Knochen, aber auch die Leber und weitere Organe sind möglich (Soga et al. 1999). Je nach Studie haben die TC eine 5-Jahresüberlebensrate von 50 – 100 %, mit einem mittleren Überleben von 126 Monaten und somit von allen TNET-Subtypen die beste Prognose (Soga et al. 1999; Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014).

### 1.1.3 Atypisches Karzinoid (AC)

Das atypische Karzinoid ( $< 2$  Mitosen/ $2 \text{ mm}^2$  mit Nekrosen oder  $2 - 10$  Mitosen/ $2 \text{ mm}^2$  mit oder ohne Nekrosen (Ströbel et al. 2021)) ist mit ca. 40 – 50 % der häufigste Subtyp der TNETs (Ströbel et al. 2014; Filosso et al. 2015). Wie beim TC auch sind vorrangig Männer (bis zu 70 %) im mittleren Alter betroffen. Das AC weist im Vergleich zum TC mehr zelluläre Atypien und eine größere Polymorphie der Zellkerne auf. Die klinische Symptomatik, die immunhistochemischen Befunde und die Differentialdiagnosen sind im Wesentlichen identisch mit denen des typischen Karzinoids, allerdings ist der Ki67-Index etwas höher (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017). Die genetischen Alterationen überlappen sich mit denen des TC, aber ihre durchschnittliche Anzahl ist höher (Ströbel et al. 2014). Ein Viertel bis die Hälfte der Patienten ist bei Diagnosestellung lokal fortgeschritten, weist eine Metastasierung in mediastinale, zervikale oder supraklavikuläre Lymphknoten oder Fernmetastasen in Lunge, Knochen, Gehirn, Leber oder Nebenniere auf (Soga et al. 1999; Gibril et al. 2003). In verschiedenen Studien finden sich für das 5-Jahresüberleben Angaben von 20 – 80% mit einem medianen Überleben von 52 Monaten (Soga et al. 1999; Crona et al. 2013; Ströbel et al. 2014).

### 1.1.4 Großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC)

Mit etwa 15 – 25 % aller TNETs ist das großzellige neuroendokrine Karzinom vergleichbar häufig wie das typische Karzinoid (Ahn et al. 2012; Ströbel et al. 2014). LCNECs weisen per Definition  $> 10$  Mitosen/ $2 \text{ mm}^2$  auf und dürfen keine kleinzellige Histologie haben (Ströbel et al. 2021). Auch hier sind Männer etwas häufiger betroffen (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017). Die typische neuroendokrine Histologie der Tumoren ist meist weniger ausgeprägt als bei den Karzinoiden, auch wenn einzelne LCNECs mit geringerer Mitoserate atypischen Karzinoiden stark ähneln können (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017). Häufig finden sich große Tumorzellen, bis hin zu anaplastischen Riesenzellen mit gut sichtbaren Nucleoli (Chetty et al. 1997). Wenn eine zweite Tumorkomponente eines Thymoms oder nicht-endokrinen Thymuskarzinoms vorliegt, lautet die Nomenklatur

„kombiniertes großzelliges neuroendokrines Karzinom“, unabhängig von der Größe des neuroendokrinen Tumoranteils (Marx et al. 2015).

Die klinische Präsentation der Patienten ist ähnlich wie bei den Karzinoiden. Etwa die Hälfte zeigt Symptome des lokalen Tumorwachstums wie Dyspnoe, obere Einflusstauung oder Thoraxschmerzen (Shoji et al. 2011; Ahn et al. 2012). Paraneoplastische Syndrome wie das Cushing-Syndrom treten nur sehr selten auf (Saito et al. 2011). Die LCNECs des Thymus kommen anders als die Karzinoide nicht im Rahmen eines MEN-1-Syndroms vor (Gibril et al. 2003; Goudet et al. 2009). Die genetischen Veränderungen der LCNECs sind mit denen der TCs und ACs überlappend, jedoch ist die durchschnittliche Anzahl der Alterationen höher und es finden sich Mutationen, die nur bei den LCNECs auftreten (Ströbel et al. 2014).

Neben der Positivität für die neuroendokrinen Marker zeigen sich die LCNECs in der Immunhistochemie ebenfalls positiv für die Zytokeratine AE1/AE3 und CAM5.2 (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017). Differentialdiagnostisch kommen unter anderem pulmonale LCNECs in Frage, oder nicht neuroendokrine Thymuskarzinome, welche auch neuroendokrine Marker exprimieren können, dies aber meist nur fokal und schwach (Lauriola et al. 1998). Bei Diagnosestellung zeigen bis zu 75 % der Patienten eine Invasion in benachbarte Gewebe oder Fernmetastasen (Chetty et al. 1997; Cardillo et al. 2010; Ahn et al. 2012; Ströbel et al. 2014). Die 5-Jahresüberlebensrate der großzelligen neuroendokrinen Karzinome beträgt 30 – 66% (Shoji et al. 2011; Ströbel et al. 2014).

Durch die Definition mit einer Mitosezahl von mehr als 10 pro 2 mm<sup>2</sup> ohne Grenze nach oben ergibt sich eine große Heterogenität der großzelligen neuroendokrinen Karzinome, da sowohl Tumoren mit beispielsweise 11 Mitosen pro 2 mm<sup>2</sup> und wenigen Atypien, als auch Tumoren mit einer weitaus höheren Mitoserate und deutlich ausgeprägteren Atypien und genetischen Abweichungen als LCNEC klassifiziert werden. Möglicherweise wäre eine höhere Anzahl an Mitosen als Grenze zwischen AC und LCNEC eine passendere Definition (Ströbel et al. 2014). In einer Studie von Dinter et al. 2019 wurde eine Subgruppe intermediären Malignitätsgrades innerhalb der großzelligen neuroendokrinen Tumoren des Thymus beschrieben, welche in Anlehnung an die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS)-Klassifikation der gastroenteropankreatischen NETs (Nagtegaal et al. 2020) als NET-G3 Tumoren des Thymus (TNET-G3) bezeichnet wurde. Diese Tumoren zeigten eine Morphologie ähnlich den TC und AC, eine durchschnittlich geringere Mitosezahl und einen geringeren Ki67-Index als die hoch malignen „echten“ LCNECs. Der spezifischste Unterschied zwischen den beiden Gruppen war das immunhistochemische Färbeergebnis für Chromogranin und EZH2 (*enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*). Während die TNET-G3 positiv für Chromogranin und negativ für EZH2 waren, zeigten die LCNECs im Wesentlichen ein gegenteiliges Ergebnis (Dinter et al. 2019).

### 1.1.5 Kleinzelliges Karzinom (SCC)

Das kleinzellige Karzinom des Thymus ist ein hoch maligner neuroendokriner Tumor. Die proliferative Aktivität der SCCs ist in der Regel sehr hoch und es kommen großflächige nekrotische Areale vor. Die Diagnose wird anhand der typischen kleinzelligen Histologie der Tumorzellen gestellt (Ströbel et al. 2021). Das SCC ist mit nur 5 – 10 % der seltenste Subtyp der TNETs mit einer Inzidenz von ca. 1 zu 50 Millionen. Anders als bei den anderen Subtypen sind Männer und Frauen gleich häufig betroffen (Soga et al. 1999; Tiffet et al. 2003; Gaur et al. 2010; Ströbel et al. 2014; Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017). Wie beim LCNEC gilt bei zusätzlicher Komponente eines Thymoms oder Thymuskarzinoms, dass diese Tumoren dann als „kombiniertes kleinzelliges Karzinom“ bezeichnet werden, unabhängig von der relativen Größe der Komponenten (Marx et al. 2015).

Die Tumorzellen sehen im histologischen Präparat (Abbildung 1) aus wie kleinzellige Karzinome anderer Organe: rund-oval bis spindelförmig mit diffusem Wachstum oder in Nestern. Die Zellen sind klein, entsprechend 2 bis 3 ruhenden Lymphozyten. Sie haben einen schmalen Zytoplasmasaum, unscheinbare Nukleoli und sind hoch proliferativ mit teilweise weit mehr als 50 Mitosen/2 mm<sup>2</sup>. Der Zellkern nimmt einen Großteil der Zelle ein. Zusätzlich zu den regelhaft auftretenden Nekrosen finden sich auch Apoptosekörper und Quetschartefakte, da die Tumorzellen sehr vulnerabel sind. Die Mehrzahl, aber nicht alle Fälle, sind positiv bezüglich der Expression von Zytokeratinen und neuroendokrinen Markern (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017).

Von allen neuroendokrinen Tumoren des Thymus weisen die SCCs die höchste Zahl genetischer Abweichungen auf. Zum Teil überlappen sich diese mit denen der Karzinoide und der LCNECs (Ströbel et al. 2014). Hierzu findet man aufgrund der Seltenheit der SCCs nur sehr wenig Informationen in der Literatur. Die SCCs kommen nicht beim MEN-1-Syndrom vor (Teh 1998; Gibril et al. 2003; Ferolla et al. 2005; Goudet et al. 2009). Mögliche Differentialdiagnosen sind vorrangig kleinzellige Karzinome der Lunge, die klinisch, radiologisch und chirurgisch abgegrenzt werden müssen. Weiterhin müssen, vor allem bei Zytokeratin-negativen Tumoren, andere kleinzellige Neoplasien wie T-lymphoblastische Lymphome, primitive neuroektodermale Tumore oder Ewing-Sarkome durch zusätzliche immunhistochemische Färbungen wie CD45, CD3, CD99 und/oder Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ausgeschlossen werden (Brcic et al. 2016; Bohnenberger et al. 2017).

Bei Diagnosestellung sind die meisten Fälle in fortgeschrittenen Stadien, mit Symptomen des lokalen Tumorwachstums und Infiltration in umliegende Strukturen und Organe oder bereits mit Fernmetastasen in Lunge, Knochen, Leber oder Gehirn (Tiffet et al. 2003; Ströbel et al. 2014). Von allen TNET-Subtypen haben die kleinzelligen Karzinome die schlechteste Prognose mit einem Überleben im Bereich von 13 – 26 Monaten (Median 13,5 Monate) und einer 5-Jahresüberlebensrate von 0 % (Tiffet et al. 2003; Ströbel et al. 2014).

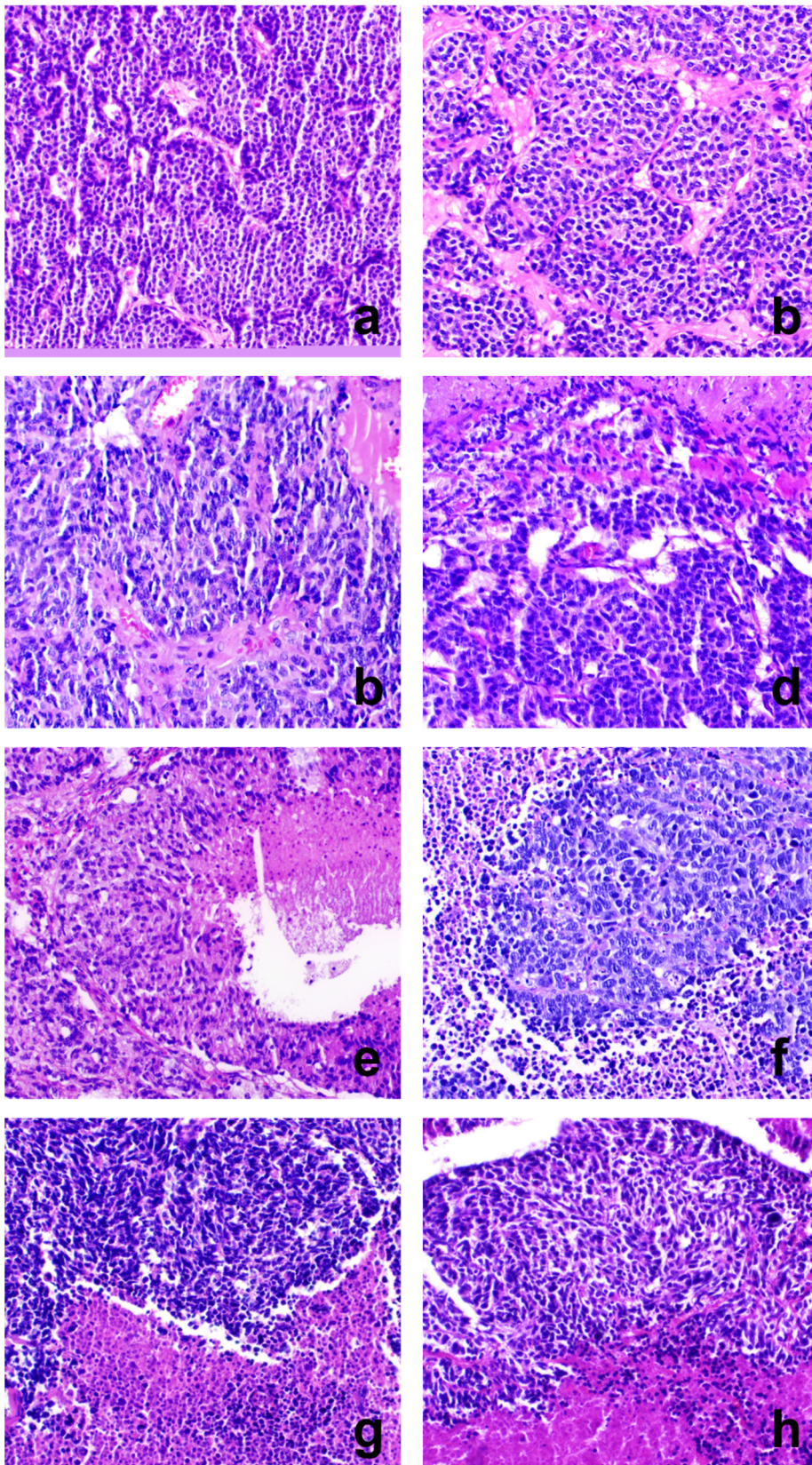


## 1.2 Vergleich mit neuroendokrinen Tumoren der Lunge

Neuroendokrine Neoplasien können in vielen Organsystemen vorkommen. Am häufigsten sind sie im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge, während die TNETs nur 0,4 % aller neuroendokrinen Tumoren ausmachen (Modlin et al. 2003). Die pulmonalen neuroendokrinen Tumoren (PNETs) gelten als nächstverwandte Tumorgruppe zu den neuroendokrinen Tumoren des Thymus (Bohnenberger et al. 2017). Insgesamt sind die PNETs deutlich häufiger als die TNETs, mit einer altersangepassten Inzidenz von 13 – 15 zu 1 Million, während diese bei den TNETs nur ca. 0,2 zu 1 Million beträgt (Gaur et al. 2010; Öberg et al. 2012).

Für die Einteilung in die vier Subtypen der TNETs wurden die WHO-Klassifikationskriterien der PNETs übernommen. Beide werden nach den gleichen Kriterien in TC, AC, LCNEC und SCC bzw. SCLC unterteilt (Ströbel et al. 2021, Tabelle 1, Abbildung 1). Es finden sich allerdings unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen der Subtypen. Während im Thymus die ACs etwa doppelt so häufig vorkommen wie die TCs und vorrangig Männer betroffen sind, zeigen sich bei den PNETs umgekehrte Verhältnisse. Typische Karzinoide sind hier deutlich häufiger als atypische und das weibliche Geschlecht ist häufiger betroffen (Fink et al. 2001; Ahn et al. 2012; Weissferdt et al. 2013; Ströbel et al. 2014). In Zahlen sind bei den PNETs etwa 5 % typische Karzinoide, 0,5 % atypische Karzinoide, 16 % LCNECs und 79 % SCLCs (Travis 2014; Rindi et al. 2018; Siegel et al. 2018). Kleinzellige Karzinome der Lunge sind damit der häufigste PNET-Subtyp und stellen gar einen Anteil von 10 – 20 % aller invasiven Lungentumoren (Gustafsson et al. 2008; Öberg et al. 2012; Ströbel et al. 2014). Die meisten Patienten mit pulmonalen LCNECs und SCLCs sind Raucher, während die TCs und ACs dagegen nicht mit Rauchen assoziiert sind (Travis 2014). Für die TNETs ist Rauchen kein etablierter Risikofaktor (Bohnenberger und Ströbel 2021).

Auch in der WHO-Klassifikation der PNETs ist der Ki67-Index nicht aufgenommen, kann jedoch bei der Unterscheidung der Subtypen eine wertvolle Hilfe darstellen, wenn bei einer Biopsie oder der Untersuchung einer Metastase nur wenig Gewebe für die Diagnostik vorhanden ist (Marx et al. 2015; Pelosi et al. 2017a). Anders als in der Lunge, wo mit der *diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia* (DIPNECH) (Marchevsky et al. 2015; Marchevsky und Walts 2015; Rossi et al. 2016) eine mutmaßliche Vorläuferläsion der neuroendokrinen Tumoren beschrieben wurde, ist dies im Thymus nicht der Fall (Bohnenberger et al. 2017).



**Abbildung 1: Histologische Bilder der TNETs und PNETs.** Dargestellt sind Aufnahmen HE-gefärbter histologischer Präparate neuroendokriner Tumoren des Thymus (linke Spalte) und der Lunge (rechte Spalte) in 200-facher Vergrößerung. Die jeweiligen Subtypen sind nebeneinander angeordnet: TC (a und b), AC (c und d), LCNEC (e und f), SCC bzw. SCLC (g und h). Rein histologisch sind die Tumoren aus Thymus und Lunge nicht zu unterscheiden.

Wie bei den TNETs geht man für die PNETs davon aus, dass die Subtypen biologisch verschiedene Entitäten darstellen und kein Kontinuum mit gemeinsamer Pathogenese (Swartz et al. 2012; Ströbel et al. 2014; Marx et al. 2015; Travis et al. 2015a). Allerdings wurden, wie oben beschrieben, im Thymus Kombinationen von niedrig- und mäßiggradigen und hochgradigen NETs beschrieben, wobei Mutationen von CTNNB1 eine zugrundeliegende Veränderung dieser beschriebenen Progression sein könnten (Moran und Suster 2000a; Fabbri et al. 2017). In der Lunge sind Fälle von neuroendokrinen Karzinomen mit der Morphologie von Karzinoiden beschrieben worden (Quinn et al. 2017). Pelosi zitiert in seiner Arbeit von 2017 mehrere Arbeiten mit der Beobachtung, dass die Karzinoide und LCNECs und SCLCs in der Lunge die meisten Genveränderungen gemeinsam haben, wenn auch mit verschiedenen Häufigkeiten (Voortman et al. 2010; Ströbel et al. 2014; Vollbrecht et al. 2015; Vijayvergia et al. 2016; Scarpa et al. 2017; Simbolo et al. 2017). Dies unterstütze die Hypothese der möglichen Transition von niedriggradigen in hochgradige PNETs in einem Teil der Fälle und würde die Vorstellung der Pathogenese von neuroendokrinen Tumoren teilweise verändern (Pelosi et al. 2017a).

Ebenso wie im Thymus können die Karzinoide der Lunge im Rahmen eines MEN-1-Syndroms vorkommen (Gustafsson et al. 2008; Öberg et al. 2012). In einer Studie zu MEN-1-Patienten wurden etwa 5 % mit pulmonalen Karzinoiden diagnostiziert, wobei retrospektive Analysen von CT-Aufnahmen eine höhere Prävalenz von bis zu 31 % für auffällige Läsionen in der Lunge ergaben, wodurch das Auftreten von PNETs im Rahmen eines MEN-1-Syndroms womöglich häufiger ist als angenommen (Sachithanandan et al. 2005). Ein Cushing-Syndrom kommt bei ca. 1 – 2 % der pulmonalen Karzinoide vor (Limper et al. 1992). In einer großen Studie zu LCNECs der Lunge traten keine paraneoplastischen Syndrome auf (Takei et al. 2002), bei SCLCs hingegen ist dies möglich (Nicholson et al. 2002).

Genau wie für die TNETs ist die chirurgische Resektion die Therapie der Wahl bei den PNETs und zeigt ein signifikant besseres Überleben im Vergleich zu nicht operierten Patienten (Gustafsson et al. 2008; Detterbeck 2010; Huang et al. 2018). Der Effekt von Chemo- und/oder Radiotherapie bei der Behandlung der PNETs in fortgeschrittenen Stadien ist noch nicht eindeutig geklärt und bleibt ein kontroverses Thema (Chong et al. 2014; Caplin et al. 2015; Colaco und Decker 2015; Nussbaum et al. 2015; Chi et al. 2016; Huang et al. 2018). Für die vier Subtypen stellt sich die Therapie wie folgt dar: TCs werden allein chirurgisch behandelt, ACs benötigen oft zusätzlich eine systemische Therapie und die LCNECs und SCLCs werden entweder kombiniert chirurgisch und systemisch oder mit alleiniger Systemtherapie behandelt, wobei der Chirurgie insgesamt die Hauptrolle zufällt (Gridelli et al. 2013; Corsini et al. 2019).

Die Karzinoide von Thymus und Lunge zeigen möglicherweise ein biologisch unterschiedliches Verhalten. Die Thymuskarzinoide sind aggressiver, metastasieren früher, sind häufiger mit endokriner Symptomatik assoziiert und weisen ein entsprechend signifikant

schlechteres Überleben auf (Moran und Suster 2000b; Yao et al. 2008; Ahn et al. 2012; Weissferdt et al. 2013; de Laat et al. 2014). Auch die genetischen Veränderungen der TNET- und PNET-Karzinome unterscheiden sich signifikant voneinander, während dies bei den *high grade* Tumoren nicht der Fall ist (Ströbel et al. 2014).

Das 5-Jahresüberleben der pulmonalen NETs ist für TCs 87 – 90 %, für ACs 44 – 78 %, für LCNECs 15 – 57 % und für die SCLCs nur etwa 5 % (Travis et al. 1998; Fink et al. 2001; Skuladottir et al. 2002; Takei et al. 2002; Phan et al. 2010). Somit weisen die PNETs insgesamt eine bessere Prognose auf als die biologisch aggressiveren TNETs (Ahn et al. 2012; Weissferdt et al. 2013). Daher ist es wichtig, diese Entitäten voneinander zu unterscheiden, damit den betroffenen Patienten neben der korrekten Diagnose des Tumors und seines Stadiums die bestmögliche Therapie und Lebensqualität ermöglicht wird (Ströbel et al. 2014).

Die diagnostische Trennung von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge kann allerdings schwierig sein, da beide rein histologisch nicht zu unterscheiden sind (Abbildung 1) und in beiden Organen sowohl primäre NETs als auch Metastasen vorkommen können (Weissferdt et al. 2013). Besonders kompliziert wird die Unterscheidung zwischen TNETs und PNETs bei *low* und *intermediate grade* Tumoren, die als große, schwer bis nicht zu resezierende Masse im Mediastinum oder mit metastatischen Läsionen vorliegen (Weissferdt et al. 2014). Aktuell gibt es keine etablierten immunhistochemischen Marker, die eindeutig zwischen primären NETs von Thymus und Lunge unterscheiden können. Daher basiert die diagnostische Trennung aktuell neben (immun-) histologischen Befunden, die aber nicht organspezifisch sind, vor allem auf der Korrelation von klinischen und radiologischen Befunden (Weissferdt et al. 2013; Ströbel et al. 2014; Marx et al. 2015; Bohnenberger et al. 2017). In Studien zur Expression der immunhistochemischen Marker PAX8 und TTF-1 in NETs aus Thymus und Lunge zeigten sich die Thymustumoren häufig positiv für PAX8, zum Teil jedoch auch für TTF-1. Umgekehrt waren in der Lunge die Mehrheit der Fälle positiv für TTF-1 und häufig negativ für PAX8 (Weissferdt et al. 2013; Bi et al. 2016). Es zeigte sich demnach eine unterschiedliche Expression dieser Marker, jedoch nicht spezifisch genug, um in der Differentialdiagnostik von TNETs und PNETs zuverlässig nutzbar zu sein, da auch die TNETs positiv für TTF-1 sein können (Ferolla 2015; Pelosi et al. 2017a). Allgemein können Marker, die häufig zur Differenzierung von gut differenzierten NETs in diversen Organen genutzt werden, wie etwa Islet-1, PAX8 oder CDX2 (Koo et al. 2012; Graham et al. 2013; Weissferdt et al. 2013; Yang et al. 2017), in *high grade* neuroendokrinen Tumoren unabhängig von der anatomischen Lokalisation positiv sein (Agaimy et al. 2013; Pelosi et al. 2015) und helfen somit im Zweifelsfall in der Differentialdiagnostik von TNETs und PNETs nicht entscheidend weiter (Pelosi et al. 2017a). Auch CD117 kann vor allem bei den *high grade* NETs in beiden Organen positiv sein, während CD5 in der Regel negativ ist (Chetty et al. 1997; Pelosi et al. 2004; Dutta et al. 2010; Fabbri et al. 2017).

## 1.3 Massenspektrometrische Proteomik

### 1.3.1 Grundlagen der massenspektrometrischen Proteomik

Proteomik bezeichnet die globale Analyse aller Proteine einer Zelle oder eines Organismus. Die Massenspektrometrie (MS) hat sich als eine gut geeignete Methode hierfür erwiesen. Es gibt dabei verschiedene Ansätze. Einer wird bezeichnet als *shotgun proteomics*, eine spezielle Variante der *bottom-up proteomics*. Hier wird ein komplexes Gemisch von Proteinen zu Peptiden verdaut, üblicherweise durch die Protease Trypsin. Anschließend erfolgt eine Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) gekoppelt an das Massenspektrometer (Matthiesen und Bunkenborg 2013). Auf diese Weise ist es möglich, zehntausende Peptide in einem einzigen Chromatographie-Durchlauf zu bestimmen und aus diesen Informationen tausende Proteine zu identifizieren (Geiger et al. 2011).

Bevor die Peptide in das Massenspektrometer gelangen, müssen sie zunächst ionisiert werden. Dafür wird die Elektrospray-Ionisierung eingesetzt (Fenn et al. 1989). Im Massenspektrometer wird die Masse eines Moleküls bestimmt und auf Basis dieser Information kann das Molekül identifiziert werden. Es gibt verschiedene Arten von Massenspektrometern. Die für diese Arbeit eingesetzten Geräte sind Orbitrap-Massenspektrometer. Hier oszillieren die ionisierten Peptide um eine Ionenfalle. Die Oszillationsfrequenz ist dabei von Masse und Ladung des Peptides abhängig. Dies ermöglicht die Bestimmung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) und der Intensität der Peptide. Diese beiden Werte erscheinen dann im Massenspektrum mit  $m/z$  auf der Abszisse und der Intensität auf der Ordinate (Scigelova und Makarov 2006). Man bezeichnet dieses Vorgehen als MS-Analyse. In komplexen Peptid-Gemischen, wie sie etwa aus der Lyse von Tumorzellen hervorgehen, reicht allerdings die Bestimmung der Masse eines Peptides allein nicht aus, um es sicher zu identifizieren. Deshalb wird in einer zweiten Messung die Aminosäuresequenz des Peptides bestimmt, indem die Peptide in einer Kollisionskammer aufgespalten werden. Dann kann die Masse der resultierenden Bruchstücke gemessen und so die entsprechenden Aminosäuren bestimmt werden (MS/MS Analyse bzw. Tandem-Massenspektrometrie) (Steen und Mann 2004). Um aus den erhaltenen MS- und MS/MS-Datensätzen die entsprechenden Proteine zu identifizieren, werden diese mit einer Datenbank verglichen (Perkins et al. 1999; Sadygov et al. 2004). Speziell für diese Zwecke entwickelte Programme zur Verarbeitung von MS-Daten wie zum Beispiel MaxQuant, ermöglichen erweiterte Auswertungen (Cox und Mann 2008; Cox et al. 2009).

### 1.3.2 Quantitative Massenspektrometrie mittels metabolischem Labeling - Das SILAC-Prinzip

Um bessere Aussagen über die Funktion und Bedeutung von Proteinen machen zu können, ist es wichtig nicht nur zu bestimmen, ob ein Protein vorhanden ist (qualitativ), sondern auch in welcher Menge (quantitativ) (Walther und Mann 2010; Geiger et al. 2011).

Eine massenspektrometrische Analyse ist nicht von sich aus quantitativ, unter anderem aufgrund von variierenden Detektorsignalen und unterschiedlichen Ionisationsergebnissen für verschiedene Substanzen. Die beobachteten Signalverhältnisse („*peak ratios*“) von stabilen Isotopen Analoga sind jedoch sehr präzise, da es zwischen diesen keine chemischen Unterschiede gibt und sie in derselben Messung analysiert werden. Im Massenspektrometer können die Analoga dann aufgrund ihres Massenunterschieds voneinander differenziert werden und das Verhältnis der Signalintensitäten gibt Informationen über das Mengenverhältnis der beiden Analoga (Ong et al. 2002; Aebersold und Mann 2003). Eine Methode für die Proteinquantifizierung mittels der Massenspektrometrie ist das „*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*“; kurz SILAC (Ong et al. 2002).

Beim „klassischen“ SILAC arbeitet man mit lebenden Zellen in mehreren Kulturansätzen, wobei ein Ansatz in Standardmedium wächst und die anderen Zellen in einem speziellen Medium kultiviert werden, das ausschließlich schwere Isotope essenzieller Aminosäuren enthält, zum Beispiel Lysin und Arginin. Bei einer Variante des SILAC sind bei diesen jeweils alle Kohlenstoff- ( $^{13}\text{C}$ ) und Stickstoffatome ( $^{15}\text{N}$ ) durch schwere Isotope ersetzt, was im Falle von Lysin zu einem Massenunterschied von 8 Da (Dalton; atomare Masseneinheit) (Lys + 8) und bei Arginin 10 Da (Arg + 10) führt. Nach mehreren Zellteilungen sind nahezu alle Proteine der Zellen mit schweren Aminosäuren markiert. Dies führt in der Massenspektrometrie zu einem charakteristischen Massenunterschied der Peptide im Vergleich zu denselben, nicht markierten Peptiden (Ong et al. 2002). Vor der MS-Analyse werden die Proteine beider Ansätze vermischt und die weitere Prozessierung, insbesondere die Spaltung in Peptide mittels Trypsin erfolgt gemeinsam. Durch Trypsin werden Proteine C-terminal von Arginin und Lysin gespalten. Da diese beiden Aminosäuren in den SILAC-markierten Proteinen als schwere Isoform vorliegen, enthält jedes resultierende Peptid nach dem Verdau mit Trypsin eine schwere Aminosäure, was die Quantifizierung erleichtert (Neubert und Tempst 2010). Es liegen in den jeweiligen Proben dann Peptid-Paare mit einem definierten Massenunterschied vor, die sich ansonsten während des gesamten Experiments chemisch genau gleich verhalten. Eine Quantifizierung wird nun über den Vergleich der Signalintensitäten dieser Peptid-Paare möglich (Ong et al. 2002).

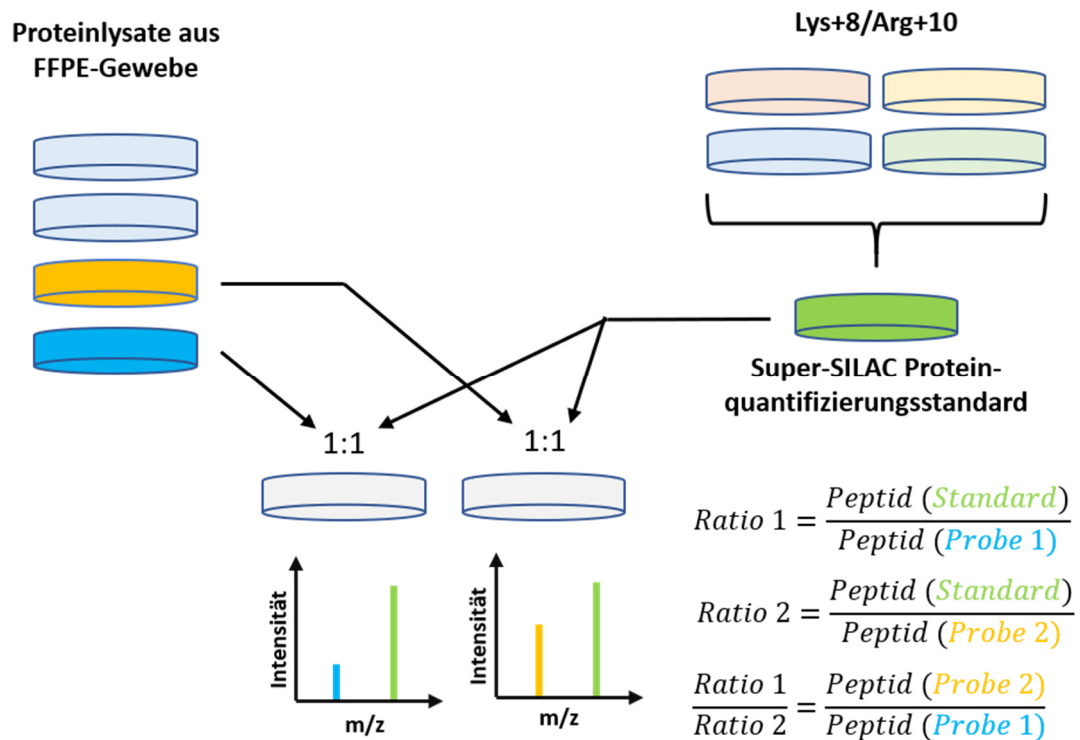
### 1.3.3 Super-SILAC-basierte quantitative Massenspektrometrie

Hierbei werden nicht die eigentlichen Proben gelabelt, sondern ein Proteinquantifizierungsstandard bestehend aus SILAC-markierten Proteinen mehrerer Zelllinien eingesetzt (Geiger et al. 2010). Der Quantifizierungsstandard stellt ein „Referenz-Proteom“ für die zu untersuchende Gewebeart dar. Die grundlegende Annahme ist hierbei, dass darin zu jedem Protein der zu untersuchenden Proben ein mit schweren Aminosäuren markiertes „Gegenstück-Protein“ enthalten ist. Dafür muss die Auswahl der eingesetzten Zelllinien nach besonderen Kriterien erfolgen. Zunächst sollen die Zelllinien hinsichtlich der Proteinexpression die Gewebeart adäquat repräsentieren, also eine ausreichende Ähnlichkeit oder Verwandtschaft zum Untersuchungsgewebe haben (Geiger et al. 2011). Um gleichzeitig eine

möglichst große Diversität im Standard zu erreichen, werden vier bis sechs Zelllinien verwendet. Zu wenige Zelllinien könnten zu einer zu geringen Diversität führen, während zu viele den Nachteil hätten, dass die zellspezifischen Proteine der einzelnen Linien zu stark verdünnt würden (Geiger et al. 2011). Dabei sollen die ausgewählten Zelllinien bezüglich ihrer Proteine untereinander möglichst verschieden sein, um ein breites Spektrum an exprimierten Proteinen darzustellen. Für die Auswahl von Zelllinien mit möglichst verschiedener Proteinausstattung bietet sich eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*; PCA) der MS-Daten von Proteinlysaten der Zelllinien für den Quantifizierungsstandard an. Es werden die Zelllinien ausgewählt, die in der PCA die größten Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsprofil aufweisen (Geiger et al. 2011; Deeb et al. 2012; Bohnenberger et al. 2015). Zur Herstellung des Quantifizierungsstandards werden die ausgewählten Zelllinien zunächst für mehrere Zellteilungen in SILAC-Medium kultiviert, bis alle Proteine mit schweren Aminosäuren (Lys + 8/Arg + 10) markiert sind. Dann wird der Standard nach Lyse der Zellen durch Mischen gleicher Proteinmengen der Zelllinien hergestellt.

Der Vergleichsstandard wird vor der Messung im Massenspektrometer im Massenverhältnis 1 : 1 mit den Proteinen jeder Probe gemischt. Die weitere Prozessierung mit dem proteolytischen Verdau durch Trypsin zu Peptiden und die Messung im Massenspektrometer erfolgen gemeinsam. Es liegen auch hier am Ende Peptid-Paare vor: ein markiertes „schweres“ Peptid aus dem Standard und ein „leichtes“ Peptid aus dem Untersuchungs gewebe. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Signalintensitäten der Proben-Peptide im Vergleich zu den Standard-Peptiden (*peptide ratio*). Ein quantitativer Vergleich der Peptide bzw. Proteine einer Probe mit denen einer anderen erfolgt durch das Verhältnis der jeweiligen *peptide ratios*, der sogenannten *ratio of ratios* (Abbildung 2). Da der verwendete Standard für alle Proben gleich ist, wird er bei der Bildung der *ratio of ratios* rausgekürzt. Dies ermöglicht den relativen quantitativen Vergleich der Peptide bzw. Proteine zwischen allen verschiedenen Proben (Geiger et al. 2011).

Der Einsatz des Super-SILAC-Quantifizierungsstandards hat viele Vorteile in der MS-proteomischen Analyse von Tumoren oder anderen Geweben. Er ermöglicht die quantitative MS-Proteomik von Geweben, die nicht selbst mit SILAC gelabelt werden können, wie beispielsweise Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE) oder auch „frisches“ (Tumor-)Gewebe. Der Labelprozess ist vom eigentlichen Experiment entkoppelt. Die Proben, die man untersuchen möchte, werden chemisch nicht verändert, sondern lediglich mit dem Quantifizierungsstandard gemischt. Der Standard kann theoretisch in beliebig großer Menge hergestellt und für lange Zeit gelagert werden, wodurch die Analyse einer sehr großen Anzahl von Proben möglich ist (Geiger et al. 2011). Dabei können alle Proben, die mit dem gleichen Standard vermischt und in der Massenspektrometrie gemessen werden, quantitativ miteinander verglichen werden. Weitere Vorteile sind die hohe Sensitivität und Genauigkeit der Quantifizierung und vor allem ein minimierter experimenteller Fehler, da die Proben in sehr frühen Versuchsschritten miteinander kombiniert und dann gemeinsam weiter prozessiert werden (Neubert und Tempst 2010).



**Abbildung 2: Super-SILAC Prinzip.** Der aus vier Proteinlysaten SILAC-markierter Zelllinien (Lys + 8/Arg + 10) hergestellte Proteinquantifizierungsstandard wird mit den Proteinlysaten der FFPE-Gewebeprouen in gleicher Menge gemischt. Die weitere Aufreinigung und Messung im Massenspektrometer erfolgen gemeinsam. Zur Quantifizierung wird die Signalintensität eines Proben-Peptids ins Verhältnis (*ratio*) zum Standard-Peptid gesetzt. Um die verschiedenen Proben gegeneinander relativ zu quantifizieren, wird aus diesen *ratios* die *ratio of ratios* gebildet. So können alle Proben eines beliebig großen Untersuchungskollektivs miteinander verglichen werden.

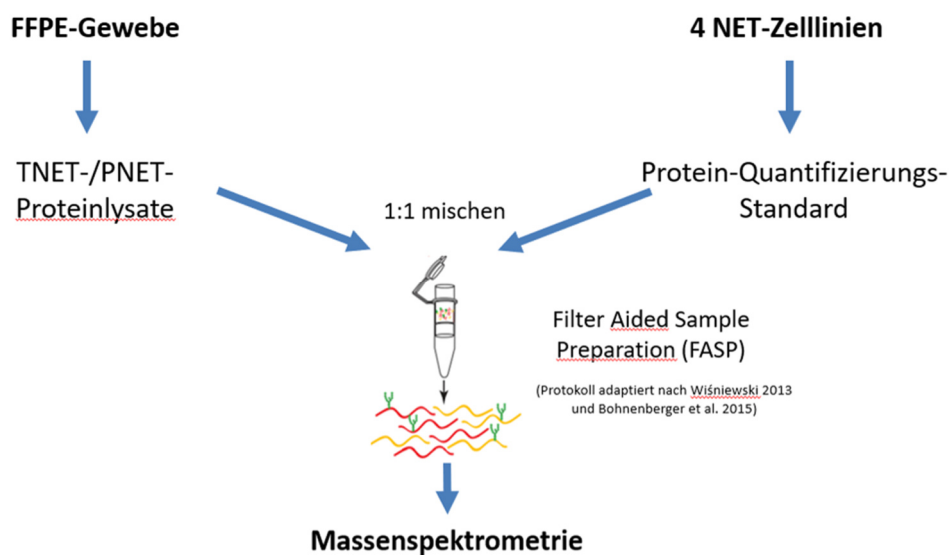


## 1.4 Ziel der Studie

Die Differentialdiagnostik neuroendokriner Tumoren von Thymus und Lunge kann eine Herausforderung darstellen, weil es aktuell keine etablierten immunhistochemischen Marker hierfür gibt. Deshalb basiert die diagnostische Trennung vor allem auf der Korrelation mit klinischen und radiologischen Befunden (Weissferdt et al. 2013; Ströbel et al. 2014; Marx et al. 2015; Bohnenberger et al. 2017).

Das Ziel der Studie ist es, TNETs anhand ihrer exprimierten Proteine diagnostisch von PNETs zu trennen und zusätzliche Kenntnisse über diese seltenen Tumorentitäten zu gewinnen. Dafür wird eine globale proteomische Analyse von FFPE-Gewebe dieser Tumoren mittels Super-SILAC-basierter quantitativer Massenspektrometrie durchgeführt, um mögliche diagnostische Biomarker bzw. Biomarkerkandidaten und biologisch-funktionelle Unterschiede zwischen beiden Tumorgruppen auf der Proteinebene zu finden. Weiterhin soll eine Datenbank an von TNETs und PNETs exprimierten Proteinen geschaffen werden, die für zukünftige Untersuchungen und Vergleiche nutzbar sein wird.

Zunächst werden aus den FFPE-Gewebeproben Proteine isoliert und aus gleichen Mengen von Proteinen aus vier NET-Zelllinien der Proteinquantifizierungsstandard hergestellt. Dann werden die Proteine der Tumoren im Massenverhältnis von 1 : 1 mit dem Quantifizierungsstandard gemischt und die Proben bis zur massenspektrometrischen Analyse gemeinsam aufgereinigt. Eine Übersicht des Arbeitsablaufes ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Arbeitsablauf in der Übersicht.** Nach Isolation der Proteine aus den FFPE-Gewebeproben der TNETs und PNETs werden diese im Verhältnis 1 : 1 mit dem Proteinquantifizierungsstandard vermischt. Die weitere Probenaufreinigung erfolgt nach dem FASP-Protokoll. Die resultierenden Peptide werden massenspektrometrisch analysiert und die gewonnenen Daten mit spezieller Computersoftware ausgewertet.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

**Tabelle 2: Verwendete Geräte für Laborarbeiten.**

Gerät	Firma, Hersteller
CO <sub>2</sub> -Zellkultur-Inkubator	Binder, Tuttlingen
Infinite M200 PRO plate reader	Tecan Trading AG, Schweiz
Invers-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Kühlschrank - 20 °C Liebherr Comfort	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Kühlschrank 4 °C Liebherr Comfort	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Kühlschrank 4 °C Sikafrost Comfort	Siemens, München
Kühltruhe - 80 °C Sanyo Ultra Low	Sanyo, Osaka, Japan
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage R160P	Sartorius, Göttingen
Lichtmikroskop Leica DM 2500	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom pfm Slide 4004 M	pfm medical, Köln
Mini-Zentrifuge (für 0,2 ml Reagiergefäße)	Kisker-Biotech, Steinfurt
Orbitrap Fusion Massenspektrometer	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Perfect Spin Mini (Mini-Zentrifuge für 1,5 ml Reagiergefäße)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND, Wertheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg
UltiMate 3000 RSLCnano HPLC-System	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls HD70	Bandelin electronic, Berlin
Vakuumpzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Firma, Hersteller
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, New York
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Computersoftware und Internetadressen

Tabelle 3: Verwendete Computersoftware und Internetadressen.

Bezeichnung, Hersteller	Verwendung
Excel 2010/2016, Microsoft, Redmond, Washington	Tabellen, Berechnungen, Diagramme
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	Pubmed, Literaturrecherche
i-control, (c) 2012, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz	Steuerungssoftware für Mikroplatten-Reader
MaxQuant 1.0.12.31, MPI, München	Auswertung massenspektrometrischer Daten
Perseus Software, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried	Auswertung massenspektrometrischer Daten
PowerPoint 2016, Microsoft, Redmond, Washington	Erstellen und Bearbeiten von Abbildungen
RStudio (RStudio PBC, Boston, Massachusetts)	Bioinformatische Datenverarbeitung, Erstellen von Grafiken
UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank	Bioinformatische Datenbank für Proteine
Word 2016, Microsoft, Redmond, Washington	Textverarbeitung
Zotero, Roy Rosenzweig Center for History and New Media, George Mason University, Washington DC	Literaturverwaltung

## 2.3 Materialien

Tabelle 4: Verwendete Materialien für Laborarbeiten.

Materialien	Firma, Hersteller
CELLSTAR® Polypropylene Tube (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
HPLC Analysensäule (ReproSil-Pur C18 AQ 1.9 $\mu\text{m}$ <i>reversed-phase resin</i> )	Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen
Low Protein Binding Microcentrifuge Tubes 2,0 ml	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Microcon®-30 Centrifugal Filters, Ultracel® PL-30	Merck Millipore, Darmstadt
Microplate, 384 Well, PS, F-Bottom, Fluotrac, Med. Binding, Black	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikropistill	Eppendorf, Hamburg
Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt, Nürnberg
Parafilm "M"	Bemis, Neenah, Wisconsin
PCR-Tube 0,2 ml 8-Strip	STARLAB, Hamburg
Pipette 0,1 – 2,5 $\mu\text{l}$	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10; 100; 1000 $\mu\text{l}$ )	Sartorius, Göttingen
Pipettenspitzen (0,1 – 20; 2 – 200; 100 – 1000 $\mu\text{l}$ )	Sarstedt, Nürnberg
Protein LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäße (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Reagiergefäße <i>microtubes</i> 1,5 ml, braun	Sarstedt, Nürnberg
<i>reverse-phase</i> C18 Vorsäule	Dionex, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Wägebapier	Macherey-Nagel, Düren
Wägeschalen	neoLAB, Heidelberg
ZipTip® C18 Pipettenspitzen (P10)	Merck Millipore, Darmstadt

## 2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien für Laborarbeiten.

Chemikalien, Reagenzien	Firma, Hersteller
Acetonitril (ACN)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ameisensäure ( <i>formic acid</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Dichloressigsäure (DCA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Essigsäureethylester (Ethylacetat)	Th. Geyer, Renningen
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
Harnstoff (Urea)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
<i>ionic detergent compatibility reagent</i> (for Pierce 660 nm Protein Assay Reagent)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Methanol	Th. Geyer, Renningen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Pierce 660 nm Protein Assay Reagent	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Pierce Water, LC-MS Grade	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
<i>tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride</i> (TCEP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Xylol, Xylen	Th. Geyer, Renningen

## 2.5 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Bis auf die Tryptophan-Lösung wurden alle Puffer am Verwendungstag frisch angesetzt und verbraucht.

**Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen für Laborarbeiten.**

Puffer, Lösung	Bestandteile, Zusammensetzung
660 nm IDCR	5 % IDCR (w/v) in Pierce 660 nm Protein Assay Reagent; lichtgeschützt lagern
<i>alkylation buffer</i>	8 M Urea; 50 mM IAA; 100 mM ABC pH 8
<i>digestion buffer</i>	0,2 % DCA; 50 mM ABC pH 8
<i>exchange buffer</i>	8 M Urea; 0,2 % DCA; 100 mM ABC pH 8
Lysepuffer	4 % SDS; 0,2 % DCA; 50 mM TCEP; 100 mM ABC pH 8
<i>peptide recovery buffer</i>	50 mM ABC pH 8
Tryptophan-Lösung	50 mg Tryptophan in 10 ml ddH <sub>2</sub> O; lichtgeschützt und bei 4° C lagern
Tryptophan-Verdünnungsreihe	20 µl Tryptophan-Lösung (50 mg in 10 ml ddH <sub>2</sub> O) mit Methanol (50 %) seriell verdünnt auf 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 µg Tryptophan/50 µl

## 2.6 Kits

**Tabelle 7: Verwendete Kits für Laborarbeiten.**

Kit	Firma, Hersteller
Pierce Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set (bei 4 °C lagern)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit (bei 4 °C lagern)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Trypsin (Sequencing Grade Modified) (bei - 20 °C lagern)	Promega, Madison, Wisconsin

## 2.7 Zellkultur

### 2.7.1 Materialien für Zellkultur

Tabelle 8: Materialien für Zellkultur.

Materialien	Firma, Hersteller
Gefrierbehälter (Mr. Frosty™)	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt, Nürnberg
CryoPure Röhren	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Pipetten (1; 2; 5; 10; 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg

### 2.7.2 Chemikalien und Reagenzien für Zellkultur

Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien für Zellkultur.

Chemikalien, Reagenzien	Firma, Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Honeywell, Morristown, New Jersey
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
Fetales Kälberserum (FKS) dialysiert	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Human EGF ( <i>epidermal growth factor</i> )	Peptotech, Hamburg
Human FGF-basic (154 a.a.) ( <i>fibroblast growth factor</i> )	Peptotech, Hamburg
ITS ( <i>insulin-transferrin-sodium selenite</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
L-Arginin <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N	Euriso-Top GmbH, Saarbrücken
L-Glutamin 200 mM	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
L-Lysin <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N	Euriso-Top GmbH, Saarbrücken
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin; 10.000 µg/ml Streptomycin)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien
RPMI-1640-Medium	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien

Chemikalien, Reagenzien	Firma, Hersteller
RPMI-1640-Medium für SILAC	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
Natriumpyruvat-Lösung 100 mM	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien

### 2.7.3 Medien und Zusätze für Zellkultur

Tabelle 10: Medien und Zusätze für Zellkultur.

Medium, Lösung	Bestandteile, Zusammensetzung
Einfriermedium	10 % DMSO in FKS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS = <i>phosphate buffered saline</i> )	9,55 g/l, Bio&SELL GmbH, Feucht/Nürnberg
RPMI-Medium	RPMI; 10 % (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin; (für Net18P-Zelllinie zusätzlich: humanes EGF 20 ng/ml; humanes FGF 10 ng/ml; ITS 1 µg/ml)
SILAC RPMI-Medium	RPMI für SILAC; 10 % (v/v) dialysiertes FKS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin; 1 % Natriumpyruvat-Lösung; 1 % L-Arginin <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N; 1 % L-Lysin <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N; (für Net18P-Zelllinie zusätzlich: humanes EGF 20 ng/ml; humanes FGF 10 ng/ml; ITS 1 µg/ml)

### 2.7.4 Zelllinien

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien.

Art der Zelllinien	Name der Zelllinien
Pulmonale NET-Zelllinien	UMC11, H727
Pankreas-NET-Zelllinien	Bon1, Net18P, Net18LM, Net3, QGP1

Die beiden pulmonalen Zelllinien UMC11 und H727 wurden bei ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) gekauft.



Die Zelllinien Bon1 und QGP1 wurden freundlicherweise von der Klinik für Gastroenterologie, gastrointestinale Onkologie und Endokrinologie (AG PD Dr. med. Alexander König) der Universitätsmedizin Göttingen bereitgestellt.

Die Zelllinien Net18P, Net18LM und Net3 wurden freundlicherweise vom ENETS Center of Excellence Hamburg (Leiter: PD Dr. med. Jörg Schrader; I. Medizinische Klinik und Poliklinik; Klinik für Allgemein- Viszeral- und Thoraxchirurgie) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt.

## 3 Methoden

### 3.1 Zusammenstellen des Untersuchungskollektivs

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an menschlichem Tumorgewebe wurden von der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen geprüft und genehmigt (Bearbeitungsnummer 11/7/15).

Zur massenspektrometrisch-proteomischen Analyse wurde ein Untersuchungskollektiv aus FFPE-Gewebe neuroendokriner Tumoren des Thymus und der Lunge erstellt. Alle untersuchten Fälle stammen aus einem Kollektiv von FFPE-Blöcken neuroendokriner Tumoren. Dieses Tumorkollektiv wurde von der Arbeitsgruppe von Professor Dr. med. Philipp Ströbel am Institut für Pathologie an der Universitätsmedizin Göttingen zusammengestellt und beinhaltet Fälle aus Zentren in Deutschland (Göttingen und Mannheim), Österreich (Graz), Italien (Rom) und den Vereinigten Staaten (Silver Springs, Maryland und Rochester, Minnesota).

Zunächst wurden alle verfügbaren Blöcke der neuroendokrinen Tumoren durchgesehen und danach bewertet, wie viel Gewebe noch vorhanden war. Fälle mit unzureichender Gewebemenge wurden ausgeschlossen. Von allen anderen Blöcken wurden neue HE-gefärbte Schnitte angefertigt und lichtmikroskopisch inspiziert. Es wurden nun alle Fälle, die ein ausreichend großes Gewebearéal mit mindestens 80 % Tumorzelldichte aufwiesen, ausgewählt. Diese Anreicherung von Tumorgewebe ist entscheidend, damit die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse für die untersuchte Tumorgewebeart als repräsentativ gelten können.

### 3.2 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1 Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten neuroendokrinen Tumorzelllinien sind alles adhärent wachsende Zellen. Die Zelllinien UMC11 und H727 stammen von neuroendokrinen Tumoren der Lunge, die Zelllinien Bon1, Net18P, QGP1, Net18LM und Net3 von neuroendokrinen Tumoren des Pankreas. Eine Zelllinie von neuroendokrinen Tumoren des Thymus existiert aufgrund der Seltenheit dieser Tumoren nicht und war somit nicht verfügbar.

Die Zellen wurden in RPMI-1640-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für Net18P wurden zum Medium weiterhin folgende Zusätze hinzugefügt: humanes EGF 20 ng/ml, humanes FGF 10 ng/ml und ITS 1 µg/ml.

Nachdem sich die Zellen unter diesen Bedingungen stabilisiert hatten und konstant vermehrten, wurde das Medium auf SILAC-RPMI mit 10 % hitzeinaktiviertem dialysiertem FKS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 2 mM L-Glutamin; 1 % Natriumpyruvat; 1 % L-Arginin <sup>13</sup>C <sup>15</sup>N; 1 % L-Lysin <sup>13</sup>C <sup>15</sup>N umgestellt. Für Net18P wurden wieder die oben genannten Zusätze (EGF, FGF, ITS) hinzugefügt.

### 3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und durch Zugabe einer Trypsin-EDTA-Lösung und 5-minütiger Inkubation bei 37 °C vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Um die Wirkung des Trypsins zu stoppen, wurden nun 6-8 ml frisches Medium hinzugegeben und die in Medium gelösten Zellen in ein 15 ml Reagiergefäß überführt. Dann wurde für 5 Minuten bei 250 g und 20 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nun, je nach Größe, in 1-3 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FKS) gelöst und in 1-3 Kryo-Röhrchen überführt. Diese wurden dann bei - 80 °C eingefroren und gelagert. Der Einfrierprozess erfolgte durch den Einsatz Isopropanol-gefüllter Gefrierbehälter mit einer Abkühlung von 1 °C pro Minute.

Zur erneuten Verwendung wurden die eingefrorenen Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad für 5 Minuten aufgetaut, in 6-8 ml frischem Medium gelöst und für 5 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem Medium aufgenommen und auf Zellkulturflaschen überführt.

### 3.2.3 Labeln der Zellen und Expansion

Zunächst wurden mindestens zehn Zellverdopplungen unter Inkubation in SILAC-Medium (Lys + 8/Arg + 10) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit abgewartet. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden dazu alle 3-7 Tage die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und danach mit einer Trypsin-EDTA-Lösung für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die adhärenen Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen. Die Zellen wurden dann zügig in PBS gelöst und ein Teil der Zellen verworfen. Zu den verbliebenen Zellen wurde nun frisches SILAC-RPMI gegeben, um das Trypsin zu inaktivieren.

Auf diese Weise wurden die Zellen so lange kultiviert, bis mindestens zehn Zellverdopplungen absolviert und von jeder Zelllinie zwei T75-Zellkulturflaschen vollgewachsen waren. Die Zellen je einer dieser Zellkulturflaschen wurden für die spätere Verwendung eingefroren, die der anderen wurden lysiert (siehe unter 3.3.2) und daraus dann wie unter 3.3.3 beschrieben eine kleine Menge eines Super-SILAC Test-Standards hergestellt.

Zur Herstellung einer großen Menge des Proteinquantifizierungsstandards wurden die Zelllinien UMC11, H727, Bon1 und Net18P wieder in SILAC-RPMI bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden vermehrt, bis von jeder Zelllinie zehn große Zellkulturflaschen (T175) vollgewachsen waren. Dann wurden die Zellen lysiert und

die daraus gewonnenen Proteinlysate in gleicher Menge zusammengemischt, um den Proteinquantifizierungsstandard herzustellen. (siehe unter 3.3.2 und 3.3.3).

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Proteinisolierung aus FFPE-Gewebe**

Zunächst wurde für jede Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeprobe der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge ein aktueller HE-gefärbter Schnitt angefertigt und lichtmikroskopisch inspiziert. Ein hinreichend großes Areal mit mindestens 80 % Tumorzellen wurde auf dem Objektträger markiert. Von den korrespondierenden FFPE-Blöcken wurden dann mittels manueller Dissektion mehrere Gewebescheiben des markierten Areals gewonnen. Die Gesamtdicke des jeweils dissezierten Gewebes variierte hierbei in Abhängigkeit von der Größe der markierten Tumorphäche. Die erhaltenen Gewebestücke wurden in 1,5 ml Reagiergefäßen gesammelt.

Zur Entparaffinierung wurden die Proben mit 1 ml Xylol für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 600 rpm im Thermomixer inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 20.817 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das Xylol abpipettiert. Dieser Vorgang wurde einmal mit Xylol und zweimal mit 100 % Ethanol wiederholt. Als nächstes wurden die Proben für 10 Minuten in der Vakuumzentrifuge bei 45 °C getrocknet, um restliches Ethanol zu entfernen.

Die getrockneten Gewebestücke wurden nun in 250 µl Lysepuffer (4 % SDS; 0,2 % DCA; 50 mM TCEP; 100 mM ABC pH 8) gelöst, mithilfe eines Mikropistills homogenisiert und für 60 Minuten bei 90 °C und 600 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 3 Minuten im Ultraschall-Homogenisator behandelt (Cycle 20 %, Power 40 %). Danach wurden die Proteinlysate für 15 Minuten bei 20.817 g und Raumtemperatur zentrifugiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Nutzung aufbewahrt.

#### **3.3.2 Proteinisolierung aus kultivierten neuroendokrinen Tumorzellen**

Das Medium wurde entfernt und die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde etwas PBS in den Kulturflaschen zurückgelassen, mit einem Zellschaber alle Zellen vom Boden abgekratzt und in PBS gelöst in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 250 g für 5 Minuten wurde das überstehende PBS entfernt und die erhaltenen Zellpellets im gleichen Lysepuffer wie für die Proteinisolierung aus FFPE-Gewebe (siehe 3.3.1) gelöst. Abhängig von der Größe der Pellets wurden 200 – 300 µl Lysepuffer verwendet. Die im Lysepuffer gelösten Zellen wurden nun in 1,5 ml Reagiergefäße überführt, für 15 Minuten bei 90 °C und 600 rpm inkubiert, 60 Sekunden im Ultraschall-Homogenisator behandelt (Cycle 20 %, Power 40 %) und für 15 Minuten bei 20.817 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden nun

in neue Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Nutzung aufbewahrt.

### 3.3.3 Herstellung eines Proteinquantifizierungsstandard aus Zelllysaten

Die eingefrorenen Lysate der neuroendokrinen Tumorzelllinien UMC11, H727, Bon1 und Net18P wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde unter Verwendung eines Mikroplattenlesers und des Pierce Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set (BSA-Verdünnungsreihe) und einer Lösung aus 5 % IDCR (w/v) in Pierce 660 nm Protein Assay Reagent nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei wurden jeweils  $5\text{ }\mu\text{l}$  jeder BSA-Lösung und jedes Zelllysats mit je  $75\text{ }\mu\text{l}$  der 660 nm-IDCR-Lösung in einer 96-well-Platte gemischt. Bei einer Proteinkonzentration  $> 4\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  wurden die Zelllysate unter Zugabe von Lysepuffer auf eine Konzentration  $< 4\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt.

Nun wurden gleiche Mengen Protein aus jedem der vier Zelllysate zusammengemischt. Im Detail wurde aus der gemessenen Proteinkonzentration und dem Volumen der Lysate jeweils die Gesamtproteinmenge (in  $\mu\text{g}$ ) berechnet und dann das gesamte Lysat der Zelllinie mit der geringsten Proteinmenge mit einem jeweils genau berechneten Volumen der anderen drei Zelllysate gemischt, damit von jeder Zelllinie die gleiche Menge Protein (in  $\mu\text{g}$ ) im Proteinquantifizierungsstandard vorhanden war. Nun wurde die Proteinkonzentration dieses Gemisches bestimmt und mithilfe von Lysepuffer auf  $2 - 3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt. Der fertige Proteinquantifizierungsstandard wurde aliquotiert, schockgefroren und bis zur Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.3.4 Mischen von Gewebelysaten und Proteinquantifizierungsstandard und weitere Probenaufreinigung

Das hier angewandte Versuchsprotokoll (*filter-aided sample preparation* = FASP) basiert auf vorherigen Arbeiten zur Proteinaufreinigung aus FFPE-Gewebe für die Massenspektrometrie (Wiśniewski 2013; Erde et al. 2014; Bohnenberger et al. 2015). In identischer Weise wie in dieser Arbeit wurde es für eine weitere Studie eingesetzt (Bohnenberger et al. 2018).

Die eingefrorenen Gewebelysate aus den FFPE-Blöcken der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge und der Super-SILAC Proteinquantifizierungsstandard wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Proteinkonzentration jedes Lysates und des Proteinquantifizierungsstandards wurde wie unter 3.3.3 beschrieben bestimmt und für jedes Lysat und den Standard das Volumen berechnet, welches eine Proteinmasse von  $50\text{ }\mu\text{g}$  enthält. Entsprechende Volumina der Gewebelysate und des Standards mit jeweils  $50\text{ }\mu\text{g}$  Protein wurden nun gemischt. Das Gemisch wurde zusammen mit  $200\text{ }\mu\text{l}$  eines Puffers aus 8 M Urea; 0,2 % DCA; 100 mM ABC pH 8 (*exchange buffer*) auf 30 kDa Microcon-Filtereinheiten (Merck Millipore, Darmstadt) gegeben und bei  $14.000\text{ g}$  bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten zentrifugiert. Die Filtereinheiten wurden hierfür in die dazugehörigen Reagiergefäße eingesetzt, sodass sich beim Zentrifugieren durch den Filter durchgelaufene Flüssigkeit am Boden

dieser Gefäße sammelte. Die Flüssigkeit wurde in den folgenden Versuchsschritten ab einer Menge von 400 – 500 µl verworfen, damit die Filtereinheiten nicht von unten mit der durchgelaufenen Flüssigkeit in Kontakt kamen.

Nun wurden erneut drei Mal 200 µl *exchange buffer* auf die Filtereinheiten gegeben und bei den gleichen Einstellungen jeweils für 10 Minuten zentrifugiert, bis der gesamte *exchange buffer* die Filtereinheit passiert hatte.

Als nächstes wurden 100 µl eines Puffers aus 8 M Urea; 50 mM IAA; 100 mM ABC pH 8 (*alkylation buffer*) auf die Filter gegeben und lichtgeschützt bei 300 rpm und 37 °C für 60 Minuten im Thermomixer inkubiert. Danach wurde erneut für 10 Minuten bei 14.000 g und 20 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgten eine weitere Zugabe von 200 µl *exchange buffer* und eine 15-minütige Zentrifugation mit den gleichen Einstellungen wie zuvor. Hier-nach erfolgten drei weitere Waschschrte mit jeweils 200 µl *digestion buffer* (0,2 % DCA; 50 mM ABC pH 8). Nach Zugabe des Puffers wurde wieder jeweils 10 Minuten bei 14.000 g und 20 °C zentrifugiert. Der dritte Zentrifugationsschritt wurde hierbei so lange verlängert, bis der gesamte *digestion buffer* die Filtereinheit passiert hatte.

Nun erfolgte der proteolytische Verdau der Proben mit Sequencing Grade Modified-Trypsin (Promega, Madison, Wisconsin). Das Trypsin wurde mit der im Kit enthaltenen Resuspensionslösung (40 µl pro Flasche Trypsinpulver) gelöst. Das gelöste Trypsin wurde danach in 20 µl Aliquots bei - 20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Zu den 20 µl eines Trypsin-Aliquots wurden 90 µl *digestion buffer* gegeben, wodurch 10 µl dieser neuen Lösung nun 1 µg Trypsin enthielten. Auf jede Filtereinheit wurden nun 20 µl dieser Lösung gegeben ( $\cong$  2 µg Trypsin pro Probe). Das Massenverhältnis von Trypsin zu den Proteinen der Proben betrug demnach 1 : 50. Zusätzlich wurden je 90 µl *digestion buffer* auf die Filtereinheiten gegeben. Die Deckel der Filtereinheiten wurden gut verschlossen und zusätzlich mit Parafilm umwickelt, um einen evaporationsbedingten Flüssigkeitsverlust zu vermeiden. Dann wurden die Proben über Nacht (12 – 15 Stunden) bei 300 rpm und 37 °C im Thermomixer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Parafilm entfernt und die Filtereinheiten wurden für 10 Minuten bei 14.000 g und 20 °C zentrifugiert. Die Spaltung der Proteine in Peptide durch das Trypsin führte dazu, dass die Peptide beim Zentrifugieren nun mit der Flüssigkeit den Filter passierten. Das Filtrat wurde deshalb nun, anders als zuvor, nicht mehr verworfen. Im Folgenden wurden zweimal 50 µl eines Puffers aus 50 mM ABC pH 8 (*peptide recovery buffer*) auf die Filtereinheiten gegeben und danach jeweils mit den gleichen Einstellungen für 10 Minuten zentrifugiert.

Im nächsten Schritt wurden die Filtereinsätze aus den Reagiergefäßen entfernt und verworfen. Zu dem Peptid-enthaltenden Filtrat in den Reagiergefäßen wurden nun 200 µl Ethylacetat gegeben und dann alles in ein 1,5 ml Protein LoBind Tube (Eppendorf, Hamburg) überführt. Zum Entfernen der DCA aus den Proben wurden 2,5 µl Trifluoressigsäure (TFA) hinzugegeben und sofort für ein paar Sekunden gevortext. Anschließend wurden

noch einmal 200 µl Ethylacetat hinzugefügt und danach die Proben für je 10 Sekunden im Ultraschall-Homogenisator behandelt (Cycle 20 %, Power 40 %) und für 10 Minuten bei 18.000 g und 20 °C zentrifugiert. Jetzt wurde vorsichtig so viel von der oberen organischen Flüssigkeitsphase abpipettiert wie möglich, ohne die untere Phase zu tangieren. Dann erfolgten noch zwei Durchläufe mit Zugabe von jeweils 200 µl Ethylacetat, 10 Sekunden Ultraschall und 10 Minuten Zentrifugation bei 18.000 g und 20 °C, mit nachfolgendem Entfernen der oberen Flüssigkeitsphase. Um restliches Ethylacetat von den Proben zu entfernen, wurden diese mit geöffnetem Deckel für 10 Minuten bei 60 °C in einem Thermomixer unter einem Abzug positioniert.

Danach wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge bei 45 °C getrocknet. Dieser erste Trocknungsschritt dauerte mindestens 90 Minuten. Das entstandene Pellet wurde nun in 50 µl 50 % Methanol resuspendiert und dann erneut für mindestens 75 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Dieser Schritt wurde noch ein weiteres Mal mit 50 µl 50 % Methanol wiederholt. Dann wurden die Proben mit 60 µl 50 % Methanol resuspendiert, für 10 Sekunden gevortext, 10 Minuten bei 37 °C und 600 rpm im Thermomixer inkubiert und noch einmal 10 Sekunden gevortext, damit die Peptide vollständig im Methanol gelöst waren.

Zur Erfolgskontrolle wurde mit je zweimal 5 µl jeder Probe mithilfe der Tryptophanfluoreszenz der Peptidgehalt aller Proben bestimmt. Davon ausgehend, dass durchschnittlich 1,1 % der Aminosäuren von Proteinen aus einem Lysat menschlicher Zellen Tryptophan sind, entsprechen 0,1 µg Tryptophan einer Masse von rund 9 µg Protein bzw. Peptid. Als Mindestmenge für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse galt hier eine Menge von 10 µg Peptid pro Probe.

Die verbliebenen in nun noch 50 µl 50 % Methanol gelösten Peptide wurden ein letztes Mal in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann bei - 80 °C aufbewahrt.

### **3.3.5 Aufreinigung eines kleinen Probensets zum Testen des Super-SILAC Standards**

Zunächst wurden sechs Proben der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge (je ein TC, AC und LCNEC) mit dem Proteinquantifizierungsstandard nach dem unter 3.3.4 beschriebenen Versuchsprotokoll aufgereinigt. Hierbei wurden jeweils 25 µg Protein aus den Tumoren und dem Standard gemischt.

Die daraus hervorgegangenen vakuumgetrockneten und eingefrorenen Peptide wurden nun bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 50 µl 0,1 % Ameisensäure resuspendiert. Die gelösten Peptide wurden nun mit ZipTip® C18 10 µl-Pipettenspitzen (Merck Millipore, Darmstadt), unter Verwendung dieser gemäß Herstelleranweisung, entsalzen, konzentriert und weiter aufgereinigt. Im Einzelnen wurden die ZipTip-Pipettenspitzen zunächst auf eine 10 µl Pipette aufgesteckt. Dann wurden dreimal 10 µl 100 % Acetonitril aspiriert und jeweils wieder verworfen, um die Matrix in den Pipettenspitzen anzufeuchten. Als nächstes wur-

den in gleicher Weise dreimal 10 µl 0,1 % Ameisensäure aspiriert und wieder verworfen. Nun wurden die Pipettenspitzen in die in 0,1 % Ameisensäure gelösten Peptide getaucht und zehnmal auf- und abpipettiert. Dadurch waren jetzt 5 µg Peptid in der Matrix der Zip-Tip Pipettenspitzen enthalten. Danach wurden erneut dreimal 10 µl 0,1 % Ameisensäure aspiriert und wieder verworfen. Im letzten Schritt wurden 10 µl einer Lösung mit 0,1 % Ameisensäure und 50 % Acetonitril aspiriert, wodurch die Peptide aus der Matrix wieder gelöst wurden. Diese 10 µl wurden dann in ein neues 1,5 ml Protein LoBind Tube (Eppendorf, Hamburg) überführt.

Diese Abfolge von Pipettierschritten wurde für jede Probe zweimal durchgeführt. In jedem der beiden Durchläufe wurden dabei 5 µg Peptid mithilfe der ZipTip Pipettenspitze aufgereinigt, sodass am Ende von jeder Probe 10 µg entsalzene, konzentrierte und aufgereinigte Peptide gelöst in 20 µl 0,1 % Ameisensäure und 50 % Acetonitril vorlagen. Dann wurden die Peptide in einer Vakuumzentrifuge bei 45 °C getrocknet und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei - 80 °C gelagert.

### 3.3.6 Fraktionierung der Peptide

Alle Proben des Untersuchungskollektivs dieser Studie wurden nach dem unter 3.3.4 beschriebenen Protokoll aufgereinigt. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die resultierenden Peptide fraktioniert. Hierfür wurde das Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) unter Befolgung der Herstellerangaben verwendet.

Zur Fraktionierung wurden die vakuumgetrockneten eingefrorenen Peptide bei Raumtemperatur aufgetaut und in 0,1 % TFA gelöst. Die Fraktionierungs-Spinsäulen wurden vorbereitet indem zweimal Acetonitril und zweimal 0,1 % TFA auf die Säulen gegeben wurde mit anschließender Zentrifugation bei 5.000 g für jeweils 2 Minuten. Für die Zentrifugation wurden die Spinsäulen in 2,0 ml Reagiergefäße eingesetzt. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde nach der Zentrifugation verworfen. Im nächsten Schritt wurden die in 0,1 % TFA gelösten Peptide auf die Säulen gegeben und bei 3.000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Peptide wurden dabei an das hydrophobe Kunstharz in den Säulen gebunden. Zur Entsalzung wurde dann Wasser (Pierce Water, LC-MS Grade) auf die Säulen gegeben und erneut zentrifugiert.

Zum Lösen der Peptide aus dem Harz wurden nun nacheinander acht Elutionslösungen mit hohem pH-Wert bestehend aus Triethylamin und Acetonitril auf die Säulen gegeben und bei 3.000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Dabei stieg der Gehalt an Acetonitril von Lösung zu Lösung immer weiter an. So wurde mit jeder Elutionslösung und der anschließenden Zentrifugation eine Peptidfraktion aus den Säulen gelöst und jeweils in einzelnen 2,0 ml Low Protein Binding Tubes (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) gesammelt.

Die beiden jeweils nacheinander gewonnenen Peptidfraktionen wurden in 1,5 ml Protein LoBind Tubes (Eppendorf, Hamburg) zusammengemischt, also jeweils Fraktion 1 und 2,



Fraktion 3 und 4, Fraktion 5 und 6 und Fraktion 7 und 8. Dann wurden die so entstandenen vier Peptidfraktionen in einer Vakuumzentrifuge bei 45 °C getrocknet und anschließend bei - 80 °C bis zur massenspektrometrischen Analyse aufbewahrt.

### 3.4 Massenspektrometrische Methoden

Die folgenden Arbeitsschritte wurden von der Medizinischen Klinik II Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Frankfurt (Prof. Dr. Thomas Oellerich) und der „Bioanalytical Mass Spectrometry“ Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Henning Urlaub am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt. Für alle Proben erfolgte die Messung von zwei technischen Replikaten. Die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse und der nachfolgenden Datenauswertung entspricht dem Vorgehen in der Studie von Bohnenberger et al. (2018).

#### 3.4.1 Massenspektrometrie – Durchführung

Direkt vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Proben durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt. Die nach dem FASP-Protokoll aufgereinigten und fraktionierten Peptide wurden hierzu in einem *loading buffer* (2 % Acetonitril und 0,05 % Trifluoressigsäure) resuspendiert und dann durch ein UltiMate 3000 RSLCnano HPLC-System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), welches an ein Orbitrap Fusion Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) gekoppelt ist, aufgetrennt. Zuerst wurden die Peptide auf einer *reverse-phase* C18 Vorsäule (Dionex, Länge 5 mm, innerer Durchmesser 0,3 mm) für drei Minuten entsalzen. Danach wurde die Vorsäule gegen eine Analysensäule (Länge 30 cm, innerer Durchmesser 75 µm, ReproSil-Pur C18 AQ 1.9 µm *reversed-phase resin* (Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen)) ausgewechselt. Lösungsmittel A bestand aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser und Lösungsmittel B aus 80 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure in Wasser. Die Peptide wurden aus Puffer B mit einem Gradienten von 5 – 42 % und einer Flussrate von 300 nl/min über 166 Minuten gelöst. Während der Chromatographie wurde die Temperatur der Vorsäule und der Analysensäule auf 50 °C eingestellt.

Im Orbitrap Fusion Massenspektrometer wurden die MS-Daten im datenabhängigen *top speed*-Arbeitsmodus erhoben. Dabei wurde automatisch zwischen dem MS-Modus (Messung der Masse der Peptide) und dem MS/MS-Modus (Bestimmung der Masse der Peptidbruchstücke nach Aufspaltung in der Kollisionskammer zur Bestimmung der einzelnen Aminosäuren) gewechselt. Die MS-Modus-Scans wurden mit einer Auflösung von 120.000 und einem *automatic gain control* (AGC; automatische Verstärkungsregelung) *target* von 4E5 durchgeführt. Dabei wurden die ionisierten Peptide, die im MS-Modus ein Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) von 350 – 1500 und einen Ladungsstatus von 2 – 6 aufwiesen, ausgewählt und der Messung im MS/MS-Modus mit kollisionsinduzierter Dissoziations-Fragmentierung (HCD; *higher-energy collisional dissociation*) mit einer normalisierten Dissozia-

tionsenergie von 35 zugeführt. Das Isolationsfenster hierfür betrug 1,6 m/z mit einer maximalen Zyklusdauer von 3 Sekunden. Die MS/MS-Scans wurden in der Ionenfalle im *rapid-scan mode* mit maximaler Ionen-Injektionszeit von 250 ms und einem AGC *target* von 3E3 durchgeführt. Alle Scan-Ereignisse wurden automatisch parallelisiert. Die *dynamic exclusion* (DE) wurde auf 60 Sekunden eingestellt.

### 3.4.2 Massenspektrometrie – Datenverarbeitung

Die gewonnenen Daten aus der Super-SILAC basierten quantitativen massenspektrometrisch-proteomischen Analyse wurden verglichen mit einer UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank mit 134.921 Einträgen humaner Proteine (Stand Juli 2014), ergänzt durch 245 häufig beobachtete Kontaminanten, welche mit der Andromeda-Suchmaschine (Cox et al. 2011) zusammengestellt wurden. Die Massentoleranz der Vorläufer-Ionen wurde nach initialer Rekalibrierung auf 6 ppm und der Fragment-Ionen auf 20 ppm festgelegt. Als variable Proteinmodifikationen wurden N-terminale Acetylierung und Methionin-Oxidierung erlaubt. Als fixe Modifikation wurde die Cystein-Carbamidomethylierung definiert. Als minimale Länge der Peptide wurden sieben Aminosäuren festgelegt, mit maximal zwei verpassten Trypsinspaltungen. Die Falscherkennungsrate (FDR; *false discovery rate*) wurde sowohl für die Peptide als auch für die Proteine auf 1 % festgelegt, indem ein „*forward-and-reverse concatenated decoy*“ Datenbankansatz verfolgt wurde.

Für die SILAC-basierte relative Quantifizierung der Proteine der Tumorproben wurde die Multiplizität für SILAC-Markierungen auf zwei festgelegt, für die nicht markierten „leichten“ Peptide und Proteine aus den FFPE-Gewebeproben der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge (Lys + 0/Arg + 0) und für die markierten „schweren“ Peptide und Proteine aus dem Super-SILAC-Quantifizierungsstandard (Lys + 8/Arg + 10). Für die Quantifizierung der Peptide waren wenigstens zwei *ratio counts* nötig. Die „*match between runs*“ Option in MaxQuant wurde deaktiviert und die „*re-quantify*“ Option aktiviert.

### 3.4.3 Bioinformatische statistische Datenanalyse

Die bioinformatische Auswertung der massenspektrometrisch erhobenen Daten wurde von Dr. Federico Comoglio (enGene Statistics, Schweiz) durchgeführt. Es erfolgte eine R Markdown Analyse (RStudio), welche mit workflowr (version 1.6.2) erstellt wurde.

Zur explorativen Datenanalyse erfolgten eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*; PCA) und eine *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE) *analysis*. Beide basierten auf den SILAC *ratios* der Proteine, die überschneidend in allen Proben quantifiziert wurden. Dabei wurden jeweils die Karzinoide (TC und AC) des TNET-Kollektivs und des PNET-Vergleichskollektiv als zusammengefasste Gruppe der *low grade* Tumoren angesehen (je 27 Fälle) und die großzelligen neuroendokrinen Karzinome und die kleinzelligen Karzinome als *high grade* Tumoren (je 11 Fälle), wobei bei den TNETs zusätzlich die in der Ein-

leitung beschriebene Subgruppe der NET-G3 des Thymus (TNET-G3) berücksichtigt wurde. Vier der LCNECs des Thymus wurden als TNET-G3 bewertet.

Für die Analyse der differentiellen Proteinexpression wurden alle quantifizierten Proteine verwendet. Es wurde jeweils die unterschiedliche Proteinexpression der *high grade* und *low grade* Tumoren des Thymus und der Lunge betrachtet. Weiterhin wurden innerhalb der NETs der einzelnen Organe die Proteinexpressionsprofile der *low grade* und *high grade* Tumoren miteinander verglichen. Für die TNETs erfolgte zusätzlich jeweils der Vergleich der TNET-G3 mit den *low grade* und *high grade* Thymustumoren. Dann wurden die *low grade* Thymustumoren zusammen mit den TNET-G3 mit den *high grade* Thymustumoren verglichen. Schließlich erfolgte ein Vergleich der differentiellen Proteinexpression von *low grade* NETs zusammen mit TNET-G3 und *high grade* NETs unabhängig vom Ursprungsorgan. Für die Analysen wurde eine empirische Bayes-Methode verwendet, welche auf der durchschnittlichen logarithmischen SILAC *ratio* zwischen den Replikaten einer Probe basiert. Um einer Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Hypothesen-Testen entgegenzuwirken, wurden die p-Werte mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur korrigiert. Dabei wurden die Signifikanzniveaus so gewählt, dass die Falscherkennungsrate (*false discovery rate*; FDR) nicht zu hoch wird.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zusammenstellen des Probenkollektivs

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse einen Beitrag zu der häufig schwierigen Differentialdiagnostik der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und Lunge leisten kann. Hierfür wurde ein Probenkollektiv der beiden Tumorgruppen erstellt.

Nach Sichtung der verfügbaren Gewebeproben waren 38 Fälle von neuroendokrinen Tumoren des Thymus für die geplante Analyse geeignet. Diese 38 Fälle teilten sich wie folgt auf die vier Subtypen nach der WHO-Klassifikation (Ströbel et al. 2021) auf:  $n = 7$  typische Karzinoide (TC),  $n = 20$  atypische Karzinoide (AC),  $n = 9$  großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC) und  $n = 2$  kleinzellige Karzinome (SCC). Für jeden Thymusfall wurde ein Lungentumor des gleichen WHO-Subtyps als Vergleich ausgewählt.

Weiterhin wurden jeweils die Karzinoide (TCs und ACs) als *low grade* Tumoren des Thymus (TLG) und der Lunge (LLG) sowie die LCNECs und SCCs bzw. SCLCs als *high grade* Tumoren des Thymus (THG) und der Lunge (LHG) zusammengefasst.

Die Tumorproben aus dieser Studie wurden aus dem gleichen Gesamtkollektiv ausgewählt, welches in der Studie von Dinter et al. (2019) genutzt wurde (siehe auch unter 1.1.4 und 3.1), sodass die dort beschriebenen NET-G3 Tumoren des Thymus (TNET-G3) hier auch als solche berücksichtigt wurden. Vier der neun LCNECs nach WHO wurden für die MS-Proteomische Analyse als TNET-G3 betrachtet. Damit ergibt sich folgende Verteilung der Tumoren des Untersuchungskollektivs bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten: 27 TLG, 27 LLG, vier TNET-G3 (auch als TG3 bezeichnet in Abbildungen und Tabellen), sieben THG und elf LHG.

Das Untersuchungskollektiv für diese Studie umfasst somit insgesamt 76 neuroendokrine Tumoren aus Thymus und Lunge. In Tabelle 12 sind die verfügbaren klinischen Informationen des Kollektivs der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge aufgeführt. Bei den TNETs waren 29 Patienten männlich und acht Patienten weiblich und bei einem Fall war das Geschlecht nicht bekannt. Dies entspricht insgesamt der in der Literatur angegebenen üblichen Geschlechtsverteilung dieser Tumoren von ca. 3 : 1. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung im Probenkollektiv der TNETs lag bei 59,4 Jahren, was ebenfalls in Einklang mit den Angaben der Literatur ist. Somit kann das Versuchskollektiv dieser Studie als repräsentativ für diese seltene Entität angesehen werden.

Von den 38 PNET-Vergleichsfällen waren 17 Patienten männlich und 21 weiblich. Es liegt hier somit ein leichtes Überwiegen des weiblichen Geschlechts bei den Betroffenen vor,

was sich mit den Angaben aus der Literatur deckt (siehe auch unter 1.2). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung lag für die PNETs bei 62,2 Jahren.

**Tabelle 12: Untersuchungskollektiv der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge.** Gezeigt ist für die 76 Proben des Untersuchungskollektivs die Probennummer, der WHO-Subtyp, die Bezeichnung der Probe für die MS-proteomische Analyse (MS-Proben-Nr.), das Geschlecht, das Alter bei Diagnosestellung und die Größe der Tumoren in cm.

Proben-Nr.	WHO-Subtyp	MS-Proben-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Größe (cm)
TN01	TC	TLG01	w	40	x
TN02	TC	TLG02	m	44	x
TN03	TC	TLG03	m	65	x
TN04	TC	TLG04	x	66	x
TN05	TC	TLG05	m	70	x
TN06	TC	TLG06	m	68	x
TN07	AC	TLG07	m	52	13,5
TN08	AC	TLG08	m	74	18,5
TN09	AC	TLG09	m	60	16,0
TN10	AC	TLG10	m	63	6,0
TN11	AC	TLG11	m	53	x
TN12	AC	TLG12	m	69	x
TN13	AC	TLG13	m	59	x
TN14	AC	TLG14	w	76	x
TN15	AC	TLG15	w	68	x
TN16	AC	TLG16	m	60	x
TN17	AC	TLG17	m	85	x
TN18	AC	TLG18	m	85	x
TN19	AC	TLG19	m	49	x
TN20	LCNEC	TG3-20	m	39	x
TN21	LCNEC	THG21	w	61	x
TN22	LCNEC	TG3-22	m	65	x
TN23	LCNEC	TG3-23	m	48	x
TN24	LCNEC	TG3-24	w	29	x
TN25	LCNEC	THG25	m	56	x
TN26	SCC	THG26	m	63	12,0
TN27	AC	TLG27	w	36	x
TN28	AC	TLG28	w	50	x
TN29	AC	TLG29	m	43	x
TN30	AC	TLG30	m	68	x
TN31	LCNEC	THG31	w	53	x
TN32	AC	TLG32	m	74	x
TN33	TC	TLG33	m	53	x
TN34	AC	TLG34	m	67	x

Proben-Nr.	WHO-Subtyp	MS-Proben-Nr.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Größe (cm)
TN35	AC	TLG35	m	71	x
TN36	LCNEC	THG36	m	25	x
TN37	LCNEC	THG37	m	100	x
TN38	SCC	THG38	m	50	x
PN01	TC	LLG01	w	69	4,3
PN02	TC	LLG02	m	63	2
PN03	TC	LLG03	w	72	3,8
PN04	TC	LLG04	w	45	2
PN05	TC	LLG05	w	75	2,7
PN06	TC	LLG06	w	30	2,6
PN07	AC	LLG07	w	72	x
PN08	AC	LLG08	m	79	1,8
PN09	AC	LLG09	m	62	x
PN10	AC	LLG10	m	71	3,5
PN11	AC	LLG11	w	61	3,5
PN12	AC	LLG12	w	64	2,2
PN13	AC	LLG13	w	47	1,2
PN14	AC	LLG14	m	71	1,5
PN15	AC	LLG15	w	71	1
PN16	AC	LLG16	m	48	2,8
PN17	AC	LLG17	w	75	1,8
PN18	AC	LLG18	m	49	5,5
PN19	AC	LLG19	m	61	2,5
PN20	AC	LLG20	m	69	3
PN21	LCNEC	LHG21	w	66	3
PN22	LCNEC	LHG22	w	71	3
PN23	LCNEC	LHG23	m	55	8
PN24	LCNEC	LHG24	m	59	x
PN25	LCNEC	LHG25	w	61	x
PN26	SCC	LHG26	w	58	2,5
PN27	AC	LLG27	m	53	4,5
PN28	AC	LLG28	w	37	9
PN29	AC	LLG29	w	70	2,4
PN30	LCNEC	LHG30	m	60	5
PN31	TC	LLG31	m	65	4,2
PN32	AC	LLG32	w	50	x
PN33	AC	LLG33	w	71	x
PN34	AC	LLG34	m	71	x
PN35	LCNEC	LHG35	m	69	3
PN36	LCNEC	LHG36	w	58	3,2
PN37	LCNEC	LHG37	m	63	1,8
PN38	SCC	LHG38	w	74	12

## 4.2 Proteinisolation aus FFPE-Gewebe

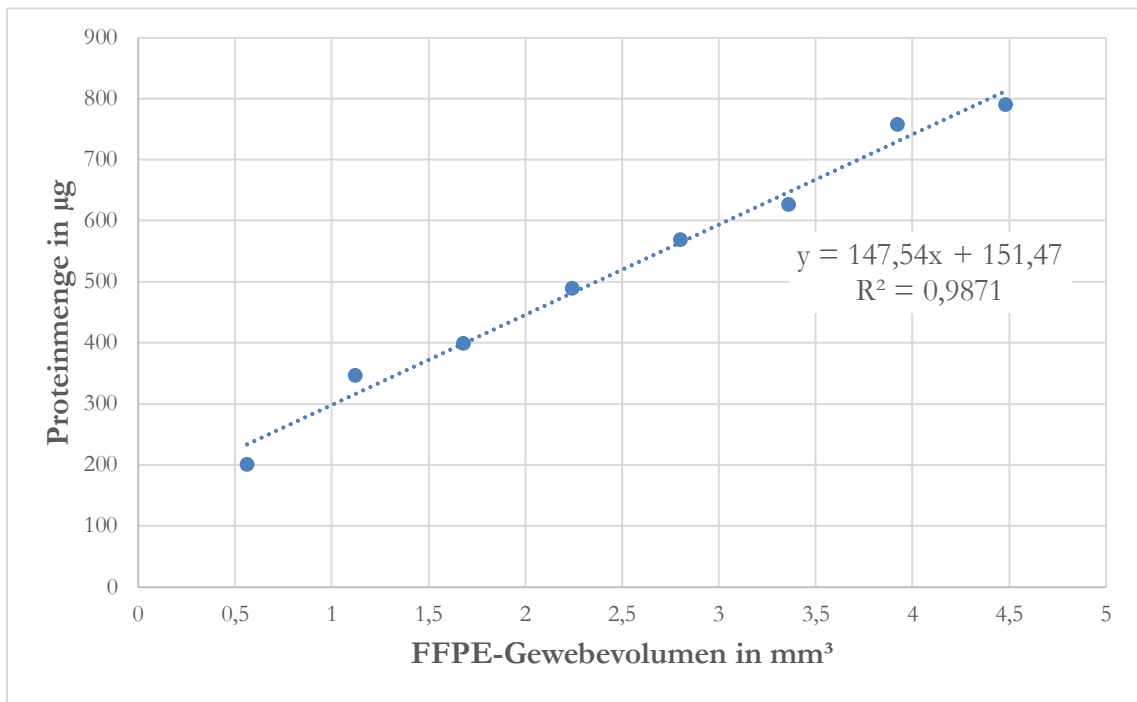
### 4.2.1 Proteinisolation aus einer Testreihe von FFPE-Gewebe

Zur Überprüfung der Proteinisolation nach dem FASP-Protokoll wurde eine Testreihe mit acht Proben aus einem FFPE-Gewebeblock durchgeführt. Dazu wurde an diesem ein rechteckiges Areal von 56 mm<sup>2</sup> Größe markiert und eine Probenreihe mit ansteigenden Schnittdicken und somit ebenfalls ansteigenden Gewebevolumina erstellt (siehe auch Tabelle 13). Aus dem FFPE-Gewebe der acht Proben wurden wie unter 3.3.1 beschrieben Proteine isoliert. Danach wurde die Proteinkonzentration der Lysate mithilfe eines Mikroplattenlesers und unter Verwendung des Pierce 660nm Protein Assay Reagent nach den Herstellerangaben bestimmt (siehe auch unter 3.3.3).

In Tabelle 13 sind die Daten zu dieser Testreihe mit Angabe der Schnittdicken und Gewebevolumina sowie die jeweils daraus isolierte Proteinmenge angegeben. Abbildung 4 stellt die Korrelation von isolierter Proteinmenge zu den jeweiligen Gewebevolumina grafisch in Form eines Punktdiagramms mit Trendlinie dar. Auf der Abszisse ist das Gewebevolumen in mm<sup>3</sup> aufgetragen, auf der Ordinate die isolierte Proteinmenge in µg.

**Tabelle 13: Daten zur Testreihe für die Korrelation von Protein zu Gewebevolumen.** Angegeben sind die jeweilige Schnittdicke des dissezierten Gewebeareals aus dem FFPE-Gewebeblock, das resultierende Gewebevolumen in mm<sup>3</sup> und die daraus isolierte Menge an Protein in µg. Es wurde eine Fläche von 56 mm<sup>2</sup> (7 x 8 mm) verwendet und eine aufsteigende Reihe an Schnittdicken und entsprechenden Gewebevolumina erstellt. Die Informationen der letzten beiden Spalten wurden zur Erstellung des Diagramms in Abbildung 4 verwendet.

Probe	µm Schnittdicke	mm <sup>3</sup> Volumen	µg Protein
7.1	10	0,56	201,90
7.2	20	1,12	347,10
7.3	30	1,68	400,20
7.4	40	2,24	490,20
7.5	50	2,8	569,85
7.6	60	3,36	627,60
7.7	70	3,92	758,70
7.8	80	4,48	790,50



**Abbildung 4: Korrelation Protein zu FFPE-Gewebevolumen für die Testreihe.** Auf der Abszisse ist das Gewebevolumen der acht Testproben in mm<sup>3</sup> angegeben, auf der Ordinate die daraus isolierte Proteinmenge in µg. Aus 1 mm<sup>3</sup> FFPE-Gewebevolumen wurden durchschnittlich etwa 150 µg Protein isoliert.

Aus den dargestellten Daten ist eine starke lineare Korrelation der isolierten Proteinmenge zum Gewebevolumen ablesbar. Die Grafik und die Gleichung, welche die Regressionsgerade der Punktwerte beschreibt, zeigen, dass aus 1 mm<sup>3</sup> FFPE-Gewebevolumen durchschnittlich etwa 150 µg Protein isoliert wurde. Damit lässt sich abschätzen wie viel Gewebevolumen verwendet werden muss, um eine bestimmte Menge Protein zu erhalten. Für das FASP-Protokoll wurden in dieser Arbeit jeweils 50 µg Protein aus den FFPE-Geweben der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge verwendet. Zur Sicherheit und um nötigenfalls mehrere Versuchsdurchläufe mit den Proben durchführen zu können, wurde mithilfe dieser Korrelation für jede Probe ein sicher ausreichendes Gewebevolumen aus den FFPE-Blöcken gewonnen, um eine ausreichende Menge Protein für jede Probe des Untersuchungskollektivs zu erhalten.

#### 4.2.2 Proteinisolation aus FFPE-Gewebe von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge

Analog zum Vorgehen bei der Proteinisolation in der Testreihe (siehe 4.2.1) wurden für die 76 Proben der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge (je 38 Fälle) aus den FFPE-Gewebeblöcken Proteine isoliert. Hierfür wurden zunächst HE-gefärbte Schnitte angefertigt und mikroskopiert. Es wurden Areale mit mindestens 80 % Tumorzellichte markiert und nachfolgend durch Makrodissektion Gewebescheiben von den entsprechenden Bereichen aus den FFPE-Blöcken gewonnen. Da die markierten tumordichten Areale



auf den Schnitten und Blöcken teilweise unregelmäßige und komplexe geometrische Formen aufwiesen, konnte eine Größenbestimmung der Fläche der Areale und somit auch der Volumina der gewonnenen Gewebeproben nur näherungsweise erfolgen. Des Weiteren wurde das Gewebe für acht Proben von Leerschnitten gewonnen, deren genaue Schnittdicke nicht bekannt war, sodass eine nähere Bestimmung der Gewebevolumina der entsprechenden Fälle nicht möglich war. Tabelle 14 zeigt die Daten der Proteinisolation aus allen Proben der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge. Mit diesen Daten wurde das Punktdiagramm in Abbildung 5 erstellt, wobei die Daten für die acht Fälle, bei denen das Gewebe von Leerschnitten gewonnen wurde, nicht berücksichtigt wurden.

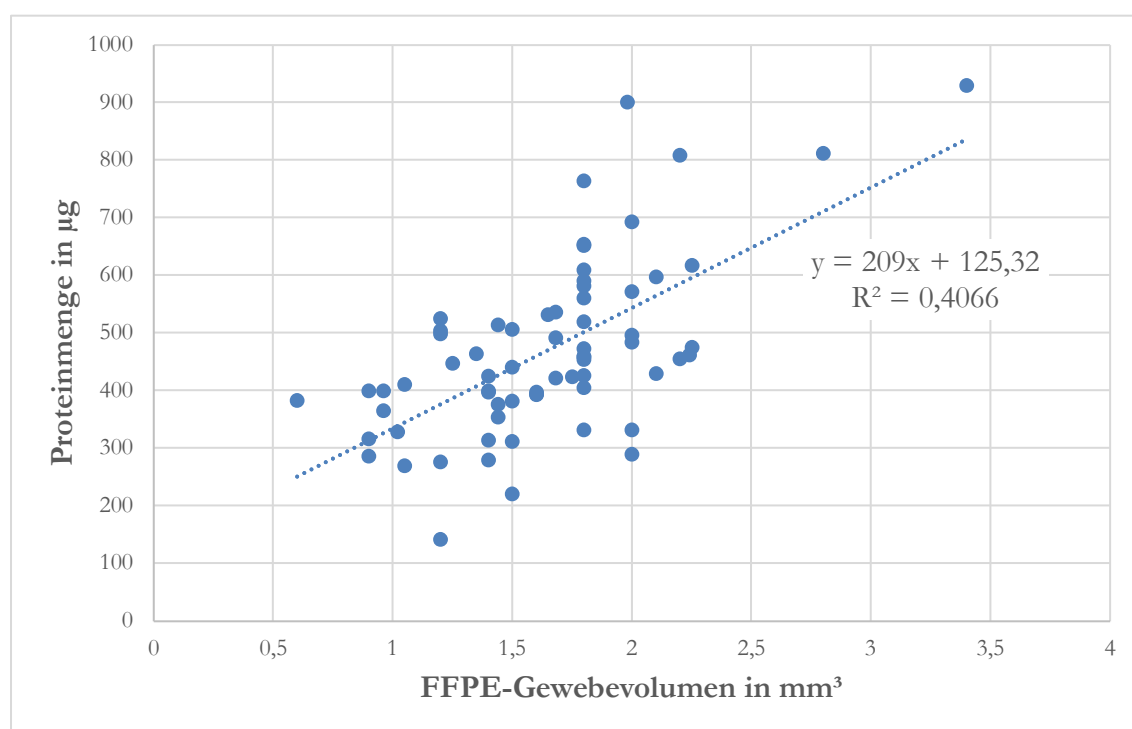
Es zeigte sich wieder eine positive lineare Korrelation von isolierter Proteinmenge und Gewebevolumen, jedoch schwächer ausgeprägt als in der Testreihe. Dies ist am ehesten dadurch bedingt, dass die Bestimmung des Gewebevolumens, anders als bei den Testproben, für die Tumorproben der TNETs und PNETs nur näherungsweise möglich war, wie oben beschrieben. Außerdem wurde für die Testreihe Gewebe aus einer einzelnen Probe in ansteigender Menge verwendet, während hier die Proteine aus verschiedenen Tumoren isoliert wurden. Aus der Grafik und Gleichung der Regressionsgeraden lässt sich jedoch wiederum ablesen, dass aus  $1 \text{ mm}^3$  Gewebevolumen durchschnittlich etwa  $210 \text{ }\mu\text{g}$  Protein isoliert wurde. Dies steht in Einklang mit der durchschnittlich isolierten Proteinmenge aus der Testreihe. Aus allen 76 Proben konnte eine ausreichende Menge an Proteinen isoliert werden, um das FASP-Protokoll durchführen zu können.

**Tabelle 14: Proteinisolation aus neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge.** Angegeben sind die näherungsweise Größe des tumorzellichten Areals auf den FFPE-Gewebeblöcken in  $\text{mm}^2$ , die jeweilige Schnittdicke des dissezierten Areals aus dem Gewebeblock in  $\mu\text{m}$ , das näherungsweise daraus resultierende Gewebevolumen in  $\text{mm}^3$  und die daraus isolierte Menge an Protein in  $\mu\text{g}$ . Die Informationen der letzten beiden Spalten wurden zur Erstellung des Diagramms in Abbildung 5 verwendet. Dabei wurden die acht Fälle, bei denen das Gewebe von Leerschnitten gewonnen wurde, nicht berücksichtigt.

Probe	$\sim\text{mm}^2$ Fläche	$\mu\text{m}$ Schnittdicke	$\sim\text{mm}^3$ Gewebevolumen	$\mu\text{g}$ Gesamtprotein
TN1	24	60	1,44	514,00
TN2	8	120	0,96	400,12
TN3	15	70	1,05	411,00
TN4	3	300	0,9	316,37
TN5	35	30	1,05	269,12
TN6	70	30	2,1	597,25
TN7	110	20	2,2	455,62
TN8	4	240	0,96	365,50
TN9	35	40	1,4	425,50
TN10	12	100	1,2	498,87
TN11	25	50	1,25	447,13
TN12	100	20	2	693,00

Probe	~mm <sup>2</sup> Fläche	µm Schnittdicke	~mm <sup>3</sup> Gewebevolumen	µg Gesamtprotein
TN13	110	20	2,2	808,62
TN14	45	30	1,35	464,37
TN15	6	100	0,6	382,87
TN16	50	30	1,5	440,75
TN17	140	20	2,8	812,00
TN18	45	40	1,8	653,87
TN19	3	300	0,9	286,62
TN20	60	30	1,8	651,62
TN21	12	120	1,44	354,50
TN22	55	30	1,65	532,38
TN23	60	30	1,8	582,12
TN24	6	170	1,02	328,88
TN25	5	180	0,9	400,00
TN26	20	60	1,2	276,50
TN27	8	17 Leerschnitte	unklar	116,87
TN28	60	14 Leerschnitte	unklar	299,38
TN29	45	16 Leerschnitte	unklar	395,75
TN30	28	17 Leerschnitte	unklar	302,37
TN31	20	17 Leerschnitte	unklar	234,75
TN32	20	17 Leerschnitte	unklar	258,50
TN33	8	150	1,2	142,25
TN34	40	40	1,6	397,63
TN35	15	10 Leerschnitte	unklar	75,25
TN36	20	80	1,6	393,13
TN37	6	20 Leerschnitte	unklar	207,19
TN38	14	100	1,4	399,13
PN1	84	20	1,68	536,63
PN2	60	30	1,8	332,25
PN3	112	20	2,24	462,12
PN4	50	30	1,5	506,25
PN5	170	20	3,4	929,12
PN6	70	20	1,4	397,38
PN7	100	20	2	332,38
PN8	60	30	1,8	472,88
PN9	50	40	2	572,12
PN10	100	20	2	484,12
PN11	15	120	1,8	458,50
PN12	20	90	1,8	764,12
PN13	35	50	1,75	423,75
PN14	14	120	1,68	421,38
PN15	20	90	1,8	561,12
PN16	12	150	1,8	405,62
PN17	84	20	1,68	492,37
PN18	45	40	1,8	590,38
PN19	75	30	2,25	617,62
PN20	15	120	1,8	519,37

Probe	~mm <sup>2</sup> Fläche	µm Schnittdicke	~mm <sup>3</sup> Gewebavolumen	µg Gesamtprotein
PN21	45	40	1,8	426,63
PN22	12	150	1,8	610,00
PN23	75	30	2,25	475,13
PN24	4	300	1,2	525,00
PN25	12	100	1,2	504,12
PN26	18	100	1,8	454,37
PN27	50	40	2	496,25
PN28	22	90	1,98	900,50
PN29	6	240	1,44	376,75
PN30	12	150	1,8	459,12
PN31	70	30	2,1	430,13
PN32	50	40	2	290,13
PN33	30	50	1,5	311,69
PN34	35	40	1,4	313,56
PN35	25	60	1,5	220,38
PN36	35	40	1,4	279,50
PN37	30	50	1,5	382,31
PN38	20	80	1,6	394,06



**Abbildung 5: Korrelation Protein zu FFPE-Gewebavolumen für TNETs und PNETs.** Auf der Abszisse ist das näherungsweise bestimmte Gewebavolumen der Proben in mm<sup>3</sup> angegeben, auf der Ordinate die daraus isolierte Proteinmenge in µg. Nicht berücksichtigt wurden die acht Fälle, bei denen das Gewebe von Leerschnitten gewonnen wurde und somit das genaue Gewebavolumen unklar war (siehe auch Tabelle 14). Aus 1 mm<sup>3</sup> FFPE-Gewebavolumen wurden durchschnittlich etwa 210 µg Protein isoliert.

## 4.3 Etablierung eines Proteinquantifizierungsstandards für neuroendokrine Tumoren

### 4.3.1 Auswahl der Zelllinien für den Proteinquantifizierungsstandard

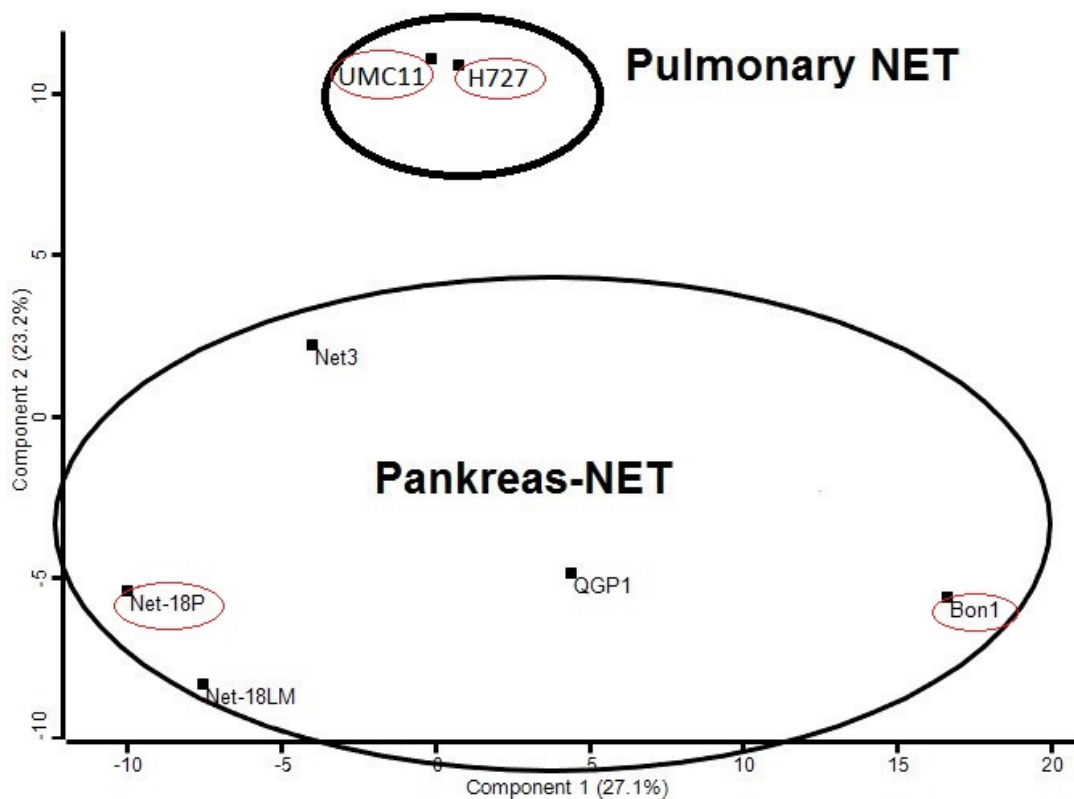
Für die quantitative massenspektrometrische Analyse der Proteine von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge wurde in dieser Arbeit das Super-SILAC-Verfahren angewendet (siehe auch unter 1.3.2 und 1.3.3). Da die FFPE-Gewebeproben der Tumoren nicht selbst mit schweren Isotopen von essenziellen Aminosäuren markiert werden können, weil sie keinen Stoffwechsel mehr aufweisen und nicht mehr teilungsfähig sind, wurde ein Super-SILAC Proteinquantifizierungsstandard eingesetzt. Dieser besteht aus einem Gemisch von Proteinlysaten aus Zelllinien, die in SILAC-Medium kultiviert wurden, in welchem die beiden essenziellen Aminosäuren Lysin und Arginin durch schwere Isotope ersetzt wurden (Lys + 8/Arg + 10). Der Quantifizierungsstandard wurde in gleicher Menge (je 50 µg) mit den Proteinlysaten der FFPE-Gewebeblöcke der TNETs und PNETs vermischt und dann das FASP-Protokoll durchgeführt.

Der Proteinquantifizierungsstandard soll ein „Referenz-Proteom“ für die zu untersuchende Gewebeat darstellen, mit der grundlegenden Annahme, dass im Quantifizierungsstandard für alle Proteine aus dem FFPE-Gewebe der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge, ein mit schweren Aminosäuren markiertes „Gegenstück-Protein“ enthalten ist, damit diese beiden Proteine zueinander quantifiziert werden können. Dafür müssen die Zelllinien die untersuchte Gewebeat adäquat repräsentieren. Aus diesem Grund wurden für die Herstellung des Proteinquantifizierungsstandards in dieser Arbeit neuroendokrine Tumorzelllinien verwendet. Damit die Standardlösung ein breites Spektrum an exprimierten Proteinen enthält, wurden Proteinlysate von vier verschiedenen Tumorzelllinien eingesetzt, die sich in ihrem Proteinexpressionsprofil voneinander unterscheiden mussten, um die nötige Diversität in der Standardlösung zu gewährleisten.

Hierfür wurden Proteinlysate von sieben neuroendokrinen Tumorzelllinien gewonnen und massenspektrometrisch analysiert. Fünf der Zelllinien waren Pankreas-NETs und zwei pulmonale NETs. Aufgrund der Seltenheit dieser Entität, war es nicht möglich, eine Thymus-NET-Zelllinie zu verwenden. Es wurde eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*; PCA) der MS-Daten durchgeführt, um die Proteinexpressionsprofile der Zelllinien grafisch darstellen zu können. Die Analyse der Proteinexpression mit der daraus resultierenden PCA wurde im Vorfeld dieser Doktorarbeit von der Arbeitsgruppe von Dr. Bohnenberger (Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt.

Das Ergebnis der PCA ist in Abbildung 6 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass sich die Proteinexpressionsprofile der NET-Zelllinien von Pankreas und Lunge unterscheiden. Weiterhin zeigt sich, dass die Proteinexpressionsprofile der beiden pulmonalen Zelllinien in der PCA sehr ähnlich sind. Es wurden nachfolgend die vier Zelllinien ausgewählt, die in der PCA die größten Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsprofil aufwiesen, also in der Grafik am

weitesten auseinander liegen. Da in dieser Arbeit neuroendokrine Tumoren aus dem Thymus und der Lunge untersucht werden sollten, wurden beide Lungen-Zelllinien für die Herstellung des Quantifizierungsstandards verwendet. Die ausgewählten Zelllinien UMC11, H727, Bon1 und Net-18P sind in Abbildung 6 rot umrandet. Diese vier Zelllinien wurden im Folgenden mit SILAC-Medium (Lys + 8/Arg + 10) kultiviert und die aus ihnen gewonnenen Proteinlysate wurden zur Herstellung des Proteinquantifizierungsstandard in gleicher Menge miteinander vermischt (siehe auch unter 3.3.3).



**Abbildung 6: Hauptkomponentenanalyse von Proteinlysaten aus NET-Zelllinien.** Die grafische Darstellung der Proteinexpressionsprofile der sieben NET-Zelllinien erfolgte durch eine massenspektrometrische Analyse der Proteinlysate und Durchführung einer Hauptkomponentenanalyse der erhaltenen Daten. Gezeigt ist der Prozentsatz der Varianz, der durch die ersten beiden Hauptkomponenten (*component 1* und *2*) hervorgerufen wird. Je weiter die Zelllinien im Diagramm voneinander entfernt liegen, umso stärker unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer exprimierten Proteine. Für die Herstellung des Proteinquantifizierungsstandards wurden die vier Zelllinien ausgewählt, die am weitesten voneinander entfernt lagen (rot umrandet). Da in dieser Arbeit neuroendokrine Tumoren aus dem Thymus und der Lunge untersucht werden sollten, wurden beide Lungen-Zelllinien (UMC11 und H727) für die Herstellung des Quantifizierungsstandards verwendet.

#### 4.3.2 Evaluierung der Qualität des Proteinquantifizierungsstandards

Die Eignung des Proteinquantifizierungsstandards bestehend aus Proteinlysaten der vier NET-Zelllinien UMC11, H727, Bon1 und Net-18P zur massenspektrometrisch-

proteomischen Analyse der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge wurde überprüft, indem zunächst eine kleine Menge einer solchen Standardlösung hergestellt wurde. Hierfür wurden gleiche Mengen an Proteinen aus Zellysaten von SILAC-markierten Zellen der vier Zelllinien miteinander gemischt.

Diese Test-Standardlösung wurde nun mit Proteinlysaten aus FFPE-Gewebe von sechs neuroendokrinen Tumoren in gleicher Menge gemischt und mit dem FASP-Protokoll aufgereinigt (siehe auch unter 3.3.5). Zur Testung des Proteinquantifizierungsstandards wurden je ein typisches Karzinoid, ein atypisches Karzinoid und ein großzelliges neuroendokrines Karzinom der Thymus- und Lungen-NETs ausgewählt. Die Probe TN20 wurde in den später folgenden Analysen als TNET-G3 und nicht als LCNEC nach der WHO-Klassifikation bewertet. In Tabelle 15 sind die sechs Proben des Standardtests mit Probennummer, Ursprungsorgan und Tumorsubtyp aufgeführt.

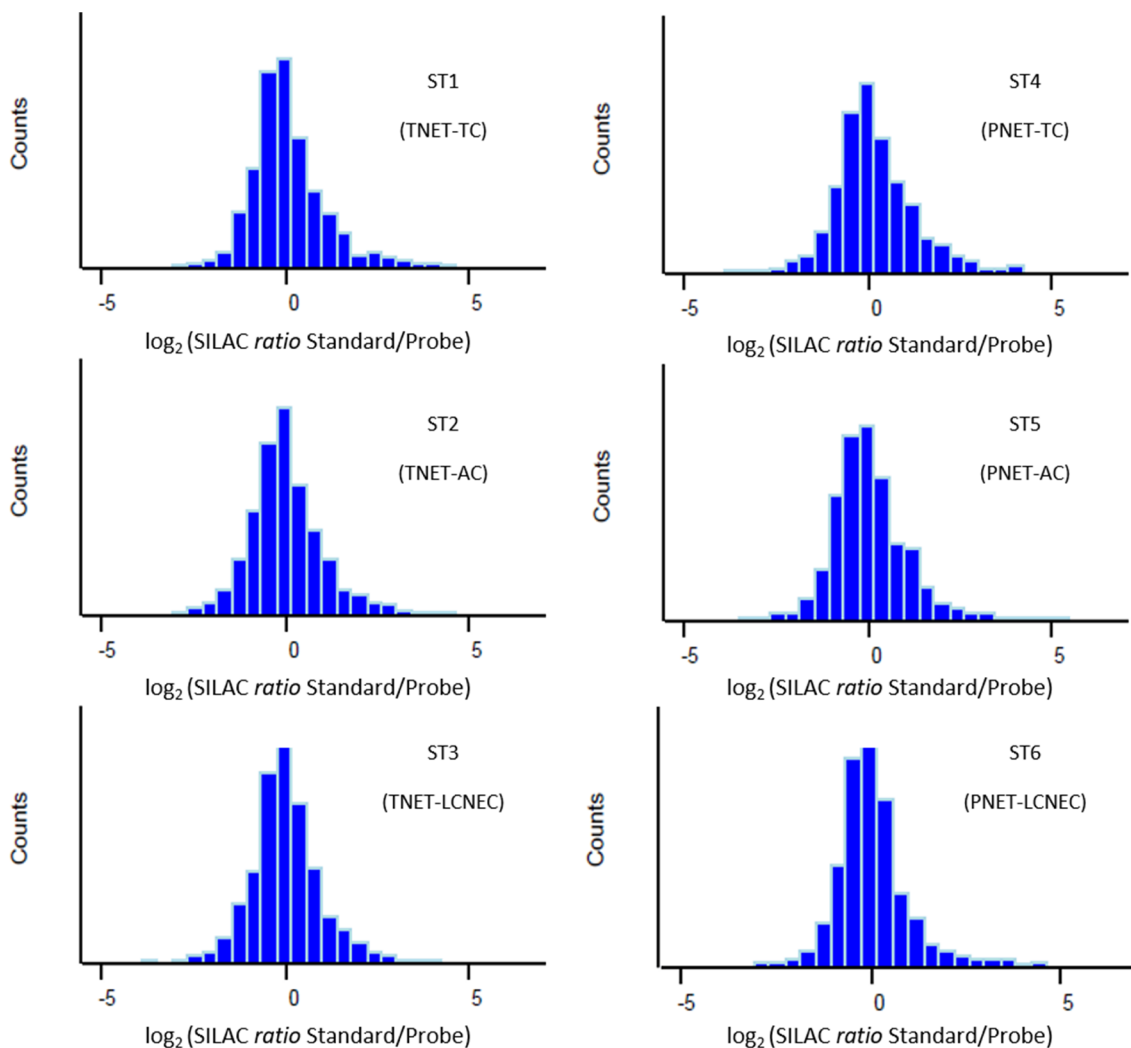
**Tabelle 15: Zuordnung der Probennummer zu Organ und Tumorentität für den Standardtest.** Gezeigt sind die Probennummern der sechs NET-Proben für den Qualitätstest des Proteinquantifizierungsstandards, das jeweilige Ursprungsorgan der Tumoren, der Tumorsubtyp und die verwendete Bezeichnung der Proben in Abbildung 7. Die Proben ST1 bis ST6 stammen aus dem Untersuchungskollektiv dieser Studie. Ihre Probennummer im Gesamt-Untersuchungskollektiv ist in Klammern angegeben.

Probe	Organ	Subtyp	Bezeichnung in Abbildung 7
ST1 (= TN6)	Thymus	TC	TNET-TC
ST2 (= TN17)	Thymus	AC	TNET-AC
ST3 (= TN20)	Thymus	LCNEC (TNET-G3)	TNET-LCNEC
ST4 (= PN5)	Lunge	TC	PNET-TC
ST5 (= PN9)	Lunge	AC	PNET-AC
ST6 (= PN23)	Lunge	LCNEC	PNET-LCNEC

Die Proteinlysate der sechs NET-Proben wurden in gleicher Menge mit der Standardlösung vermischt und nach dem FASP-Protokoll mit Spaltung der Proteine in Peptide durch Trypsin aufgereinigt. Anders als für die spätere Aufreinigung des gesamten Probenkollektivs dieser Arbeit wurde hierbei keine Fraktionierung der Peptide, sondern eine Entsalzung und Konzentrierung durch das ZipTip-Verfahren durchgeführt (siehe auch unter 3.3.5). Diese Prozedur erleichtert die massenspektrometrische Analyse und verbessert die dabei erzielten Ergebnisse. Die resultierenden Peptide wurden dann im Massenspektrometer analysiert und die erhaltenen Daten mittels der Software MaxQuant und Perseus ausgewertet. Wie unter 1.3.3 beschrieben, erhält man durch dieses Vorgehen Peptid-Paare mit dem einen Peptid aus den FFPE-Gewebeproben und dem anderen aus der Standardlösung. Letzteres ist durch die Kultivierung in SILAC-Medium (Lys + 8/Arg + 10) um eine definierte Masse schwerer als das andere Peptid, sodass beide im Massenspektrum um genau diesen Massenunterschied auseinander liegen und zwei Signale erzeugen. Die Intensitäten dieser Signale ermöglichen einen relativen quantitativen Vergleich der Peptide und letztlich der Protei-

ne, aus denen sie nach Trypsinspaltung hervorgegangen sind, wenn man sie ins Verhältnis setzt (SILAC *ratio*).

Zur Überprüfung des Proteinquantifizierungsstandards wurde die Verteilung der aus den massenspektrometrischen Analysen für jedes Protein resultierenden SILAC *ratios* Quantifizierungsstandard zu Gewebeprobe als Histogramm dargestellt. In Abbildung 7 sind die entsprechenden Histogramme für die sechs Proben des Standardtests aufgeführt. Das Verhältnis des Standards zum Probengewebe wurde zur Basis 2 logarithmiert ( $\log_2(\text{SILAC } \textit{ratio} \text{ Standard/Probe})$ ) und auf die X-Achse aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Anzahl der Proteine, die identifiziert wurden (counts).



**Abbildung 7: SILAC-*ratios* Standardtest.** Die Histogramme zeigen die Ratioverteilung von Quantifizierungsstandard zu Gewebeprobe für die sechs Proben des Standardtests (siehe auch Tabelle 15).

Da für alle sechs Proben deutlich mehr als 90 % der SILAC *ratios* in einem +/- fünffachem Bereich lagen, repräsentiert der Proteinquantifizierungsstandard bestehend aus den Zelli-

nien UMC11, H727, Bon1 und Net-18P in adäquater Weise das Proteinexpressionsprofil der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge und ermöglicht eine genaue und vergleichbare quantitative massenspektrometrische Analyse dieser Tumoren.

#### 4.4 Peptidaufreinigung durch *filter-aided sample preparation*

##### 4.4.1 Peptidaufreinigung einer Testreihe

Mit den acht Proben der Testreihe, mit der die Korrelation von isoliertem Protein zu verwendetem Gewebevolumen gezeigt wurde (siehe auch unter 4.2.1), wurde das Protokoll der *filter-aided sample preparation* (FASP) durchgeführt (vergleiche unter 3.3.4), um zu überprüfen, wie viel Protein eingesetzt werden muss, um am Ende eine ausreichende Menge an Peptid für die massenspektrometrische Analyse zu erhalten. Hierfür sollten mindestens 10 µg Peptid pro Probe mit dem FASP-Protokoll gewonnen werden.

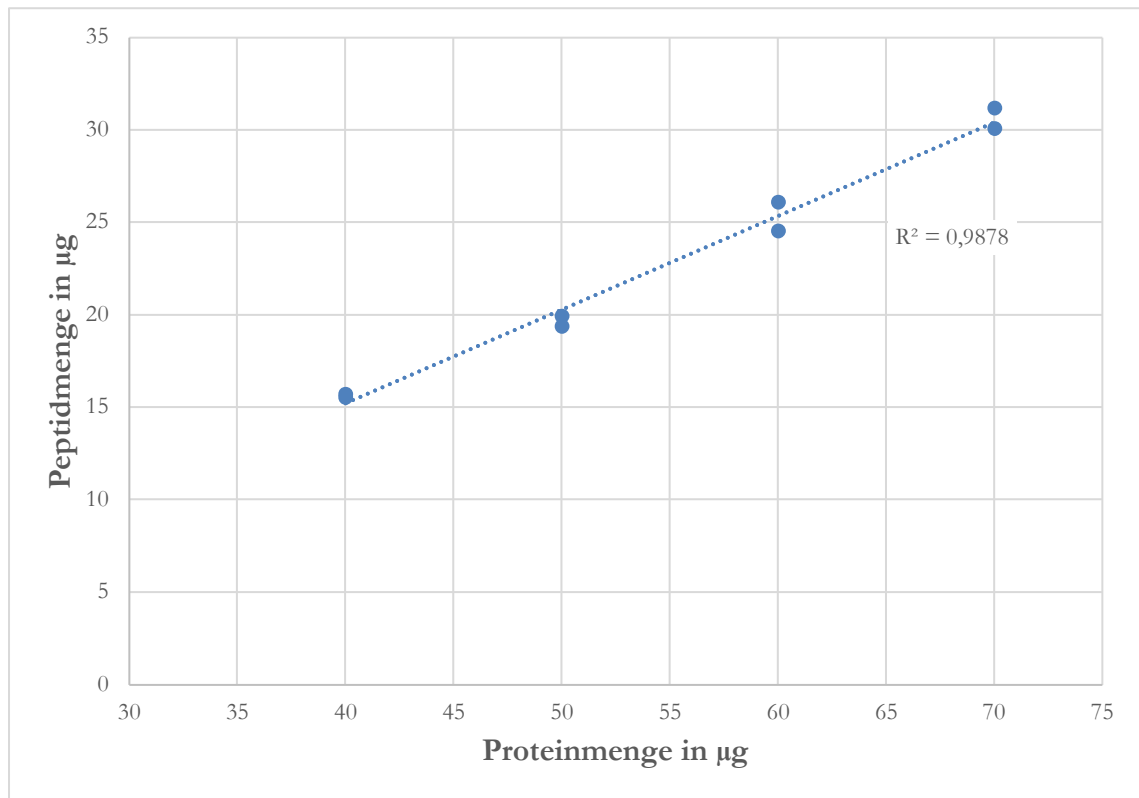
Es wurde die Proteinkonzentration der acht Testproben wie oben beschrieben bestimmt und mithilfe dieser aus jedem Proteinlysate ein berechnetes Volumen genommen, um eine definierte Menge Protein in das FASP-Protokoll hineinzugeben (siehe auch Tabelle 16). Hierfür wurden je zwei Proben mit den Ausgangsmengen von 40, 50, 60 und 70 µg Protein verwendet. Am Ende des Protokolls erfolgte die Messung des Peptidgehalts mithilfe der Tryptophanfluoreszenz.

Die Ergebnisse der Aufreinigung der Testreihe sind in Tabelle 16 und Abbildung 8 aufgeführt. Es zeigte sich eine starke lineare Korrelation von eingesetzter Proteinmenge und daraus erhaltener Peptidmenge. Die Ergebnisse der Proben mit gleicher Ausgangsmenge an Protein lagen sehr dicht beieinander. Daran lässt sich die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit des Versuchsprotokolls erkennen. Die durchschnittliche Peptidausbeute betrug 41,09 % der eingesetzten Menge an Protein.

**Tabelle 16: Peptidaufreinigung aus der Testreihe.** Für jede der acht Testproben wurde nach Messung der Proteinkonzentration eine definierte Menge an Protein für das FASP-Protokoll verwendet und die daraus erhaltene Menge an aufgereinigten Peptiden mithilfe der Tryptophanfluoreszenz bestimmt. Die durchschnittliche Peptidausbeute betrug 41,09 %.

Probe	µg Protein	µg Peptid	Ausbeute in %
7.1	40	15,72	39,31
7.2	40	15,54	38,86
7.3	50	19,40	38,79
7.4	50	19,92	39,84
7.5	60	24,54	40,91
7.6	60	26,09	43,48
7.7	70	30,09	42,99
7.8	70	31,18	44,54
			(durchschnittliche Peptidausbeute 41,09 %)





**Abbildung 8: Korrelation Peptidmenge zu Protein.** Dargestellt ist ein Punktdiagramm mit der jeweils erhaltenen Menge an Peptiden in µg für je zwei Proben mit einer eingesetzten Menge an Protein von 40, 50, 60 und 70 µg. Die genauen Werte sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die Proben wurden mit dem FASP-Protokoll aufgereinigt und der Peptidgehalt mithilfe der gemessenen Tryptophanfluoreszenz bestimmt.

#### 4.4.2 Peptidaufreinigung der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge

Für die Aufreinigung der Proben der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge wurden je 50 µg Protein für das FASP-Protokoll eingesetzt. Nach Messung der Proteinkonzentration der Proteinlysate der Proben wurde das jeweils dafür benötigte Volumen bestimmt und gemeinsam mit 50 µg Protein aus dem Proteinquantifizierungsstandard auf die Filtereinheiten gegeben. Die weitere Aufreinigung nach dem FASP-Protokoll erfolgte in gleicher Weise wie für die Testreihe (siehe unter 4.4.1).

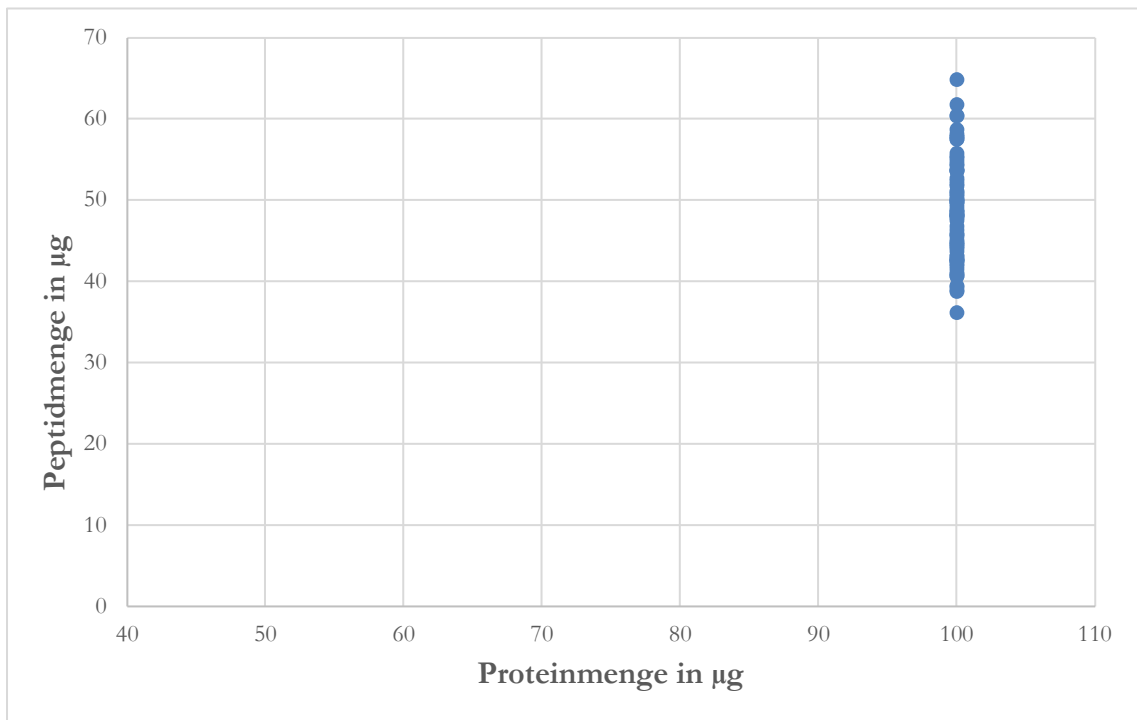
Nach Durchführung der Probenaufreinigung und Fraktionierung der Peptide (siehe auch unter 3.3.6) wurde dann die massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Als Zielwert für diese galt eine Mindestmenge von 10 µg Peptid. An dieser Stelle sollen zunächst die Ergebnisse der Peptidaufreinigung aller Proben nach dem FASP-Protokoll dargestellt werden. In Tabelle 17 sind die Daten für alle 76 Proben aufgeführt. In Abbildung 9 sind die Ergebnisse in Form eines Punktdiagramms dargestellt. Die Werte für die erhaltenen Peptidmengen der einzelnen Proben liegen insgesamt dicht beieinander. Der niedrigste Wert für die erhaltene Peptidmenge betrug 36,18 µg, der höchste Wert lag bei 64,87 µg. Somit

konnte für alle Proben eine hinreichende Menge an Peptiden für die Massenspektrometrie gewonnen werden. Über alle Proben konnten im Durchschnitt 48,77 µg Peptid für die massenspektrometrische Analyse aufgereinigt werden.

**Tabelle 17: Peptidaufreinigung des Probenkollektivs.** Für jede der insgesamt 76 Proben der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge wurde nach Messung der Proteinkonzentration 50 µg Protein aus dem FFPE-Gewebe zusammen mit 50 µg Protein aus dem Proteinquantifizierungsstandard, also insgesamt 100 µg pro Probe, für das FASP-Protokoll verwendet und die daraus erhaltene Menge an Peptid mithilfe der Tryptophanfluoreszenz bestimmt. Die durchschnittliche Peptidausbeute betrug 48,77 µg.

Probe	µg Protein	µg Peptid	Ausbeute in %
TN1	100	41,58	41,58
TN2	100	47,51	47,51
TN3	100	42,77	42,77
TN4	100	40,89	40,89
TN5	100	39,51	39,51
TN6	100	43,72	43,72
TN7	100	42,14	42,14
TN8	100	38,81	38,81
TN9	100	43,18	43,18
TN10	100	49,94	49,94
TN11	100	42,58	42,58
TN12	100	54,49	54,49
TN13	100	54,30	54,30
TN14	100	49,81	49,81
TN15	100	44,13	44,13
TN16	100	48,61	48,61
TN17	100	48,03	48,03
TN18	100	49,57	49,57
TN19	100	44,61	44,61
TN20	100	50,79	50,79
TN21	100	48,77	48,77
TN22	100	46,34	46,34
TN23	100	53,68	53,68
TN24	100	45,82	45,82
TN25	100	42,50	42,50
TN26	100	43,10	43,10
TN27	100	36,18	36,18
TN28	100	53,85	53,85
TN29	100	53,67	53,67
TN30	100	45,13	45,13
TN31	100	41,97	41,97
TN32	100	42,62	42,62
TN33	100	49,83	49,83
TN34	100	58,71	58,71
TN35	100	41,06	41,06

Probe	µg Protein	µg Peptid	Ausbeute in %
TN36	100	57,55	57,55
TN37	100	57,86	57,86
TN38	100	57,56	57,56
PN1	100	49,21	49,21
PN2	100	44,33	44,33
PN3	100	40,71	40,71
PN4	100	55,25	55,25
PN5	100	60,46	60,46
PN6	100	48,18	48,18
PN7	100	45,86	45,86
PN8	100	44,87	44,87
PN9	100	55,83	55,83
PN10	100	51,75	51,75
PN11	100	48,63	48,63
PN12	100	53,59	53,59
PN13	100	47,82	47,82
PN14	100	50,49	50,49
PN15	100	51,13	51,13
PN16	100	48,32	48,32
PN17	100	40,67	40,67
PN18	100	48,17	48,17
PN19	100	54,86	54,86
PN20	100	48,23	48,23
PN21	100	39,35	39,35
PN22	100	51,02	51,02
PN23	100	38,92	38,92
PN24	100	46,84	46,84
PN25	100	42,71	42,71
PN26	100	44,62	44,62
PN27	100	45,53	45,53
PN28	100	60,36	60,36
PN29	100	52,75	52,75
PN30	100	50,10	50,10
PN31	100	64,87	64,87
PN32	100	51,99	51,99
PN33	100	61,76	61,76
PN34	100	58,17	58,17
PN35	100	50,15	50,15
PN36	100	57,89	57,89
PN37	100	55,41	55,41
PN38	100	52,45	52,45
			(durchschnittliche Peptidausbeute 48,77 %)



**Abbildung 9: Peptidaufreinigung für alle Proben des Untersuchungskollektivs.** Dargestellt ist ein Punktdiagramm mit der jeweils erhaltenen Menge an Peptid in µg für alle 76 Proben des Untersuchungskollektivs der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge. Es wurden jeweils 50 µg Protein aus den Proben mit 50 µg Protein aus dem Proteinquantifizierungsstandard gemischt und für das FASP-Protokoll verwendet. Die genauen Werte sind in Tabelle 17 aufgeführt. Nach Aufreinigung der Peptide wurde der Peptidgehalt mithilfe der gemessenen Tryptophanfluoreszenz bestimmt. Der niedrigste Wert für die erhaltene Peptidmenge betrug 36,18 µg, der höchste Wert lag bei 64,87 µg. Die durchschnittliche Peptidausbeute über alle Proben betrug 48,77 µg.

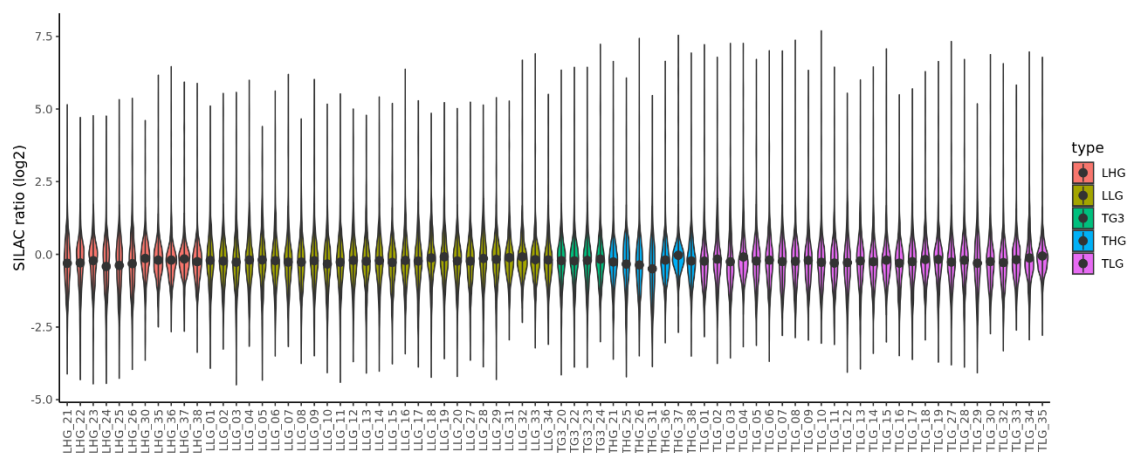
#### 4.5 Quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge

In dieser Studie erfolgte eine quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge. Die Differentialdiagnostik der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge kann eine Herausforderung darstellen, weil es aktuell keine etablierten immunhistochemischen Marker hierfür gibt. Das Ziel dieser Doktorarbeit war herausfinden, ob die MS-proteomischen Daten bei der Differenzierung von neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge helfen können und überdies neue biologische Erkenntnisse über diese Tumoren zu gewinnen, in dem man ihr Proteom anhand eines großen Untersuchungskollektivs analysiert.

Hierfür wurden Proteine aus FFPE-Gewebe dieser Tumoren isoliert und in gleicher Menge mit einem Proteinquantifizierungsstandard gemischt (Super-SILAC Methode). Mit diesem Proteingemisch wurde das oben beschriebene FASP-Protokoll durchgeführt und die resul-

tierenden Peptide wurden vor Durchführung der Massenspektrometrie fraktioniert. Hierfür wurde das Pierce High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) unter Befolgung der beiliegenden Anleitung des Herstellers verwendet (siehe auch unter 3.3.4 und 3.3.6). Mit den fertig aufgereinigten Peptiden erfolgte unter Verwendung eines Orbitrap Fusion Massenspektrometers die quantitative global proteomische Analyse (siehe auch unter 3.4). Der Ablauf der Probenvorbereitung, Messung im Massenspektrometer und nachfolgender Datenauswertung entspricht dem Vorgehen in der Studie von Bohnenberger et al. (2018).

Insgesamt wurden 6600 Proteine in wenigstens einer Probe quantifiziert, davon wurden 1087 Proteine übergreifend in allen Proben des Kollektivs quantifiziert. Abbildung 10 zeigt die SILAC *ratio* Verteilung aller Proben des Untersuchungskollektivs im Vergleich zum Proteinquantifizierungsstandard. Alle SILAC *ratios* lagen mit über 90 % im Bereich von  $\log_2$  SILAC *ratio*  $\pm$  2,5. Dies zeigt, dass der hier hergestellte und verwendete Super-SILAC-Proteinquantifizierungsstandard für alle verwendeten Proben zur quantitativen MS-proteomischen Analyse geeignet ist.



**Abbildung 10: SILAC *ratio* Verteilung der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge.** Gezeigt ist die SILAC *ratio* Verteilung aller Proben des Untersuchungskollektivs zum Proteinquantifizierungsstandard. Für alle 76 Proben liegen die SILAC *ratios* zu über 90 % im Bereich von  $\log_2$  SILAC *ratio*  $\pm$  2,5. Somit konnten alle Proben erfolgreich mit dem eingesetzten Vergleichsstandard quantifiziert werden. (Abbildung erstellt von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

## 4.6 Explorative Datenanalyse der MS-proteomischen Daten

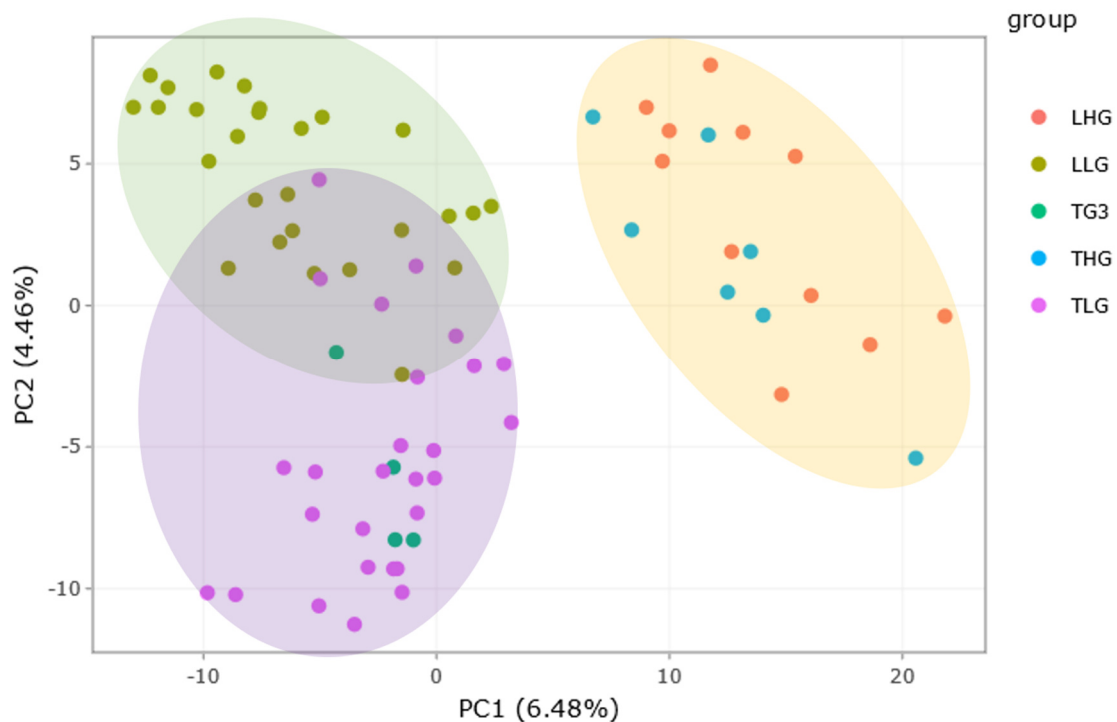
Die bioinformatische Auswertung der massenspektrometrisch erhobenen Daten wurde von Dr. Federico Comoglio (enGene Statistics, Schweiz) durchgeführt. Es erfolgte eine R Markdown Analyse (RStudio), welche mit workflowr (version 1.6.2) erstellt wurde (siehe auch unter 3.4.3). Die gezeigten Abbildungen wurden von Dr. Federico Comoglio erstellt und teilweise modifiziert. Die aufgeführten Tabellen wurden aus den von Dr. Comoglio erstellten Datensätzen extrahiert und modifiziert.

### 4.6.1 Hauptkomponentenanalyse und *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE) Analysis

Zur explorativen Analyse der erhaltenen Daten aus der massenspektrometrisch-proteomischen Messung der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge wurde zunächst eine Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*; PCA) durchgeführt. Dies ermöglicht die Reduzierung der Komplexität des Datensatzes und erlaubt eine zweidimensionale geometrische Darstellung der Ergebnisse (siehe Abbildung 11). Die PCA basiert auf den SILAC *ratios* der Proteine, die überschneidend in allen Proben quantifiziert wurden.

Für den Vergleich der massenspektrometrischen Daten der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge wurden jeweils die Karzinoide (TCs und ACs) des TNET-Kollektivs und des PNET-Vergleichskollektivs als zusammengefasste Gruppe der *low grade* Tumoren angesehen und die großzelligen neuroendokrinen Karzinome und die kleinzelligen Karzinome als *high grade* Tumoren. Des Weiteren wurden die in der Studie von Dinter et al. (2019) beschriebenen TNET-G3 hier im Vergleich zu den restlichen LCNECs separat berücksichtigt. Somit ergaben sich fünf Gruppen: Thymus *low grade* = TLG (27 Fälle); TNET-G3 = TG3 (vier Fälle); Thymus *high grade* = THG (sieben Fälle); Lunge *low grade* = LLG (27 Fälle) und Lunge *high grade* = LHG (elf Fälle).

In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass die TNETs und PNETs hinsichtlich ihrer Protein-expressionsprofile in drei Cluster fallen. Ein Cluster (grün hinterlegt in Abbildung 11) besteht aus den *low grade* Tumoren der Lunge (hellgrüne Punkte). Ein weiterer Cluster (violett hinterlegt) besteht aus den *low grade* Tumoren des Thymus (violette Punkte) und aus den TNET-G3 (dunkelgrüne Punkte). Die Cluster der *low grade* Thymus- und Lungentumoren zeigen sich teilweise überlappend. Im dritten Cluster (gelb hinterlegt) befinden sich die *high grade* Tumoren des Thymus (hellblaue Punkte) und der Lunge (orangefarbene Punkte).

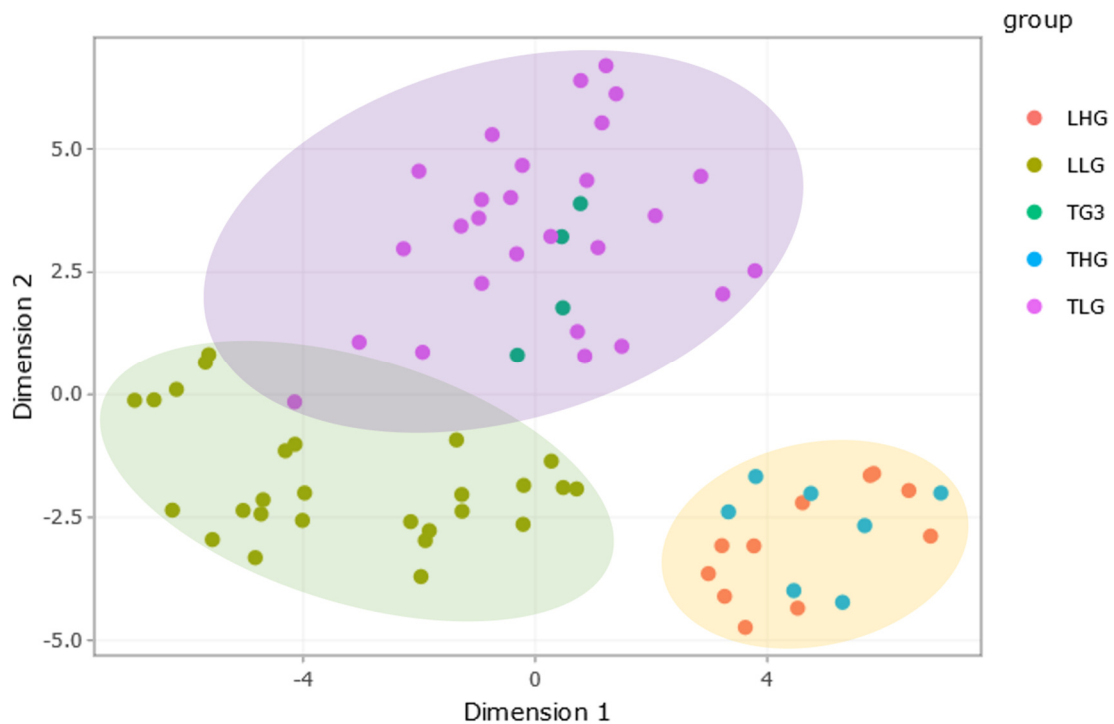


**Abbildung 11: Hauptkomponentenanalyse des Proteinexpressionsprofils von TNETs und PNETs.** Gezeigt ist der Prozentsatz der Varianz der durch die ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) hervorgerufen wird. Die Tumoren wurden in fünf Gruppen eingeteilt: Thymus *low grade* = TLG; TNET-G3 = TG3; Thymus *high grade* = THG; Lunge *low grade* = LLG und Lunge *high grade* = LHG. Die einzelnen Tumoren der Gruppen sind im Diagramm jeweils durch Punkte verschiedener Farben verdeutlicht. (modifizierte Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Die erste Hauptkomponente (PC1) trennt die Tumoren somit in *low grade* Tumoren (links in der Grafik) und *high grade* Tumoren (rechts in der Grafik). Die zweite Hauptkomponente (PC2) trennt die *low grade* Tumoren dann nach ihrem Ursprungsorgan auf mit den Lungen *low grade* Tumoren oben und den Thymus *low grade* Tumoren unten in der Grafik. Für die *high grade* Tumoren zeigt sich hier keine Trennung zwischen Thymus und Lunge.

Auffällig ist, dass die TNET-G3 allesamt in den Cluster der Thymus *low grade* Tumoren fallen und nicht in den gemischten *high grade* Cluster.

Eine weitere Methode zur Dimensionalitätsreduktion eines komplexen Datensatzes ist die *t-distributed stochastic neighbor embedding analysis* (t-SNE Analyse). Auch diese basiert auf den SILAC *ratios* für Proteine, die übergreifend in allen Proben quantifiziert wurden. Die t-SNE Analyse ist ein Dimensionalitätsreduktionsalgorithmus, um hochdimensionale Daten in wenigen Dimensionen darzustellen. Das Ergebnis der t-SNE Analyse des Proteinexpressionsprofils der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge ist in Abbildung 12 gezeigt.



**Abbildung 12: t-SNE Analyse des Proteinexpressionsprofils von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge.** Die Tumoren wurden in fünf Gruppen eingeteilt: Thymus *low grade* = TLG; TNET-G3 = TG3; Thymus *high grade* = THG; Lunge *low grade* = LLG und Lunge *high grade* = LHG. Die einzelnen Tumoren der Gruppen sind im Diagramm jeweils durch Punkte verschiedener Farben verdeutlicht. (modifizierte Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

In Abbildung 12 lassen sich die gleichen drei Cluster wie in der Hauptkomponentenanalyse erkennen. Die Cluster der *low grade* Lungentumoren (grün hinterlegt) und *low grade* Thymustumoren (violett hinterlegt) zeigen sich in der tSNE Analyse sogar nur minimal überlappend. Die *high grade* Tumoren beider Organe fallen wieder in einen gemeinsamen Cluster (gelb hinterlegt), der getrennt ist von den beiden *low grade* Clustern. Auch in der tSNE Analyse fallen die TNET-G3 allesamt in den Thymus *low grade* Cluster.



## 4.7 Differentielle Proteinexpressionsanalyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge

Es erfolgte ein systematischer Vergleich der Proteinexpression der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge. Für diese Analysen wurden alle in der massenspektrometrischen Analyse quantifizierten Proteine herangezogen. Die Tumoren wurden weiterhin in den bereits beschriebenen Gruppen Thymus *low grade*, TNET-G3, Thymus *high grade*, Lungen *low grade* und Lungen *high grade* Tumoren zusammengefasst.

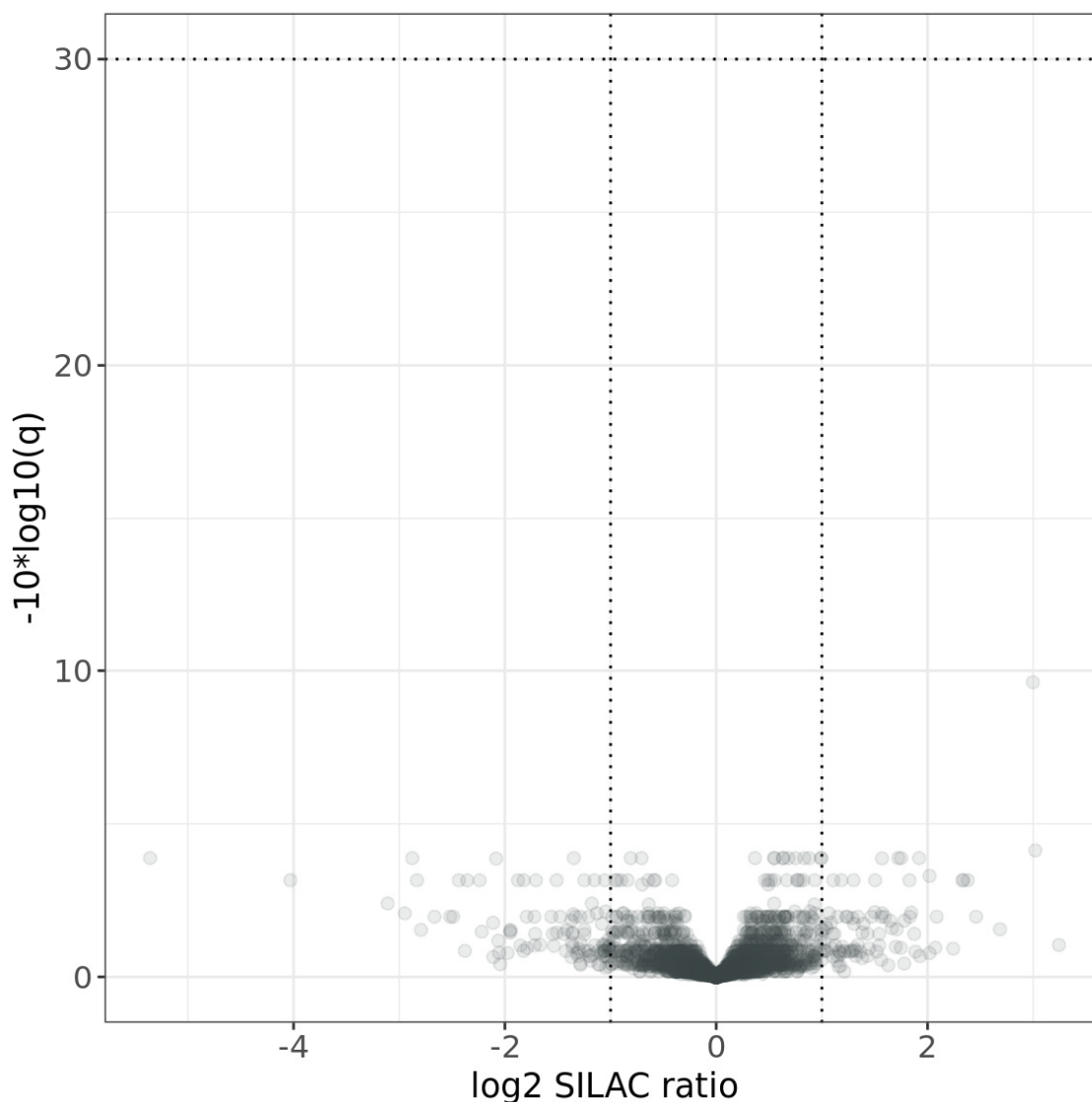
Zunächst wurde die unterschiedliche Proteinexpression der *high grade* Tumoren des Thymus und der Lunge betrachtet. Dann erfolgte der gleiche Prozess für die *low grade* Tumoren der beiden Organe. Als nächstes wurden die *high grade* und *low grade* Lungentumoren miteinander verglichen und anschließend die *high grade* und *low grade* Thymustumoren. Für die TNETs erfolgte zusätzlich jeweils Vergleich der TNET-G3 mit den *low grade* und *high grade* Tumoren. Dann wurden die *low grade* Thymustumoren zusammen mit den TNET-G3 mit den *high grade* Thymustumoren verglichen.

Schließlich erfolgte ein organunabhängiger Vergleich der differentiellen Proteinexpression der *low grade* Tumoren zusammen mit TNET-G3 mit den *high grade* Tumoren.

Für die Analysen wurde eine empirische Bayes-Methode verwendet, welche auf der durchschnittlichen logarithmischen SILAC *ratio* zwischen den Replikaten einer Probe basierte. Um einer Alphafehler-Kumulierung bei multiplem Hypothesen-Testen entgegenzuwirken, wurden die p-Werte mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur korrigiert.

### 4.7.1 Differentielle Proteinexpression – Thymus *high grade* Tumoren vs. Lungen *high grade* Tumoren

Es wurden differentiell exprimierte Proteine von *high grade* NETs aus Thymus und Lunge miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 als *volcano plot* dargestellt. Dies erlaubt eine Identifizierung von quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierten Proteinen zwischen den Tumorgruppen (ablesbar an der Abszisse als  $\log_2$  SILAC *ratio* der Proteine von TNETs und PNETs), bei denen der Unterschied statistisch signifikant ist (ablesbar an der Ordinate mit  $-10 \cdot \log_{10}(q)$ ). Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen *high grade* TNETs und PNETs anhand von entsprechend hohen positiven oder negativen  $\log_2$  SILAC *ratios*. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Für die *high grade* Tumoren der beiden Organen wurden bei einer *false discovery rate* (FDR) von 0,1 % keine statistisch signifikant quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierten Proteine identifiziert.

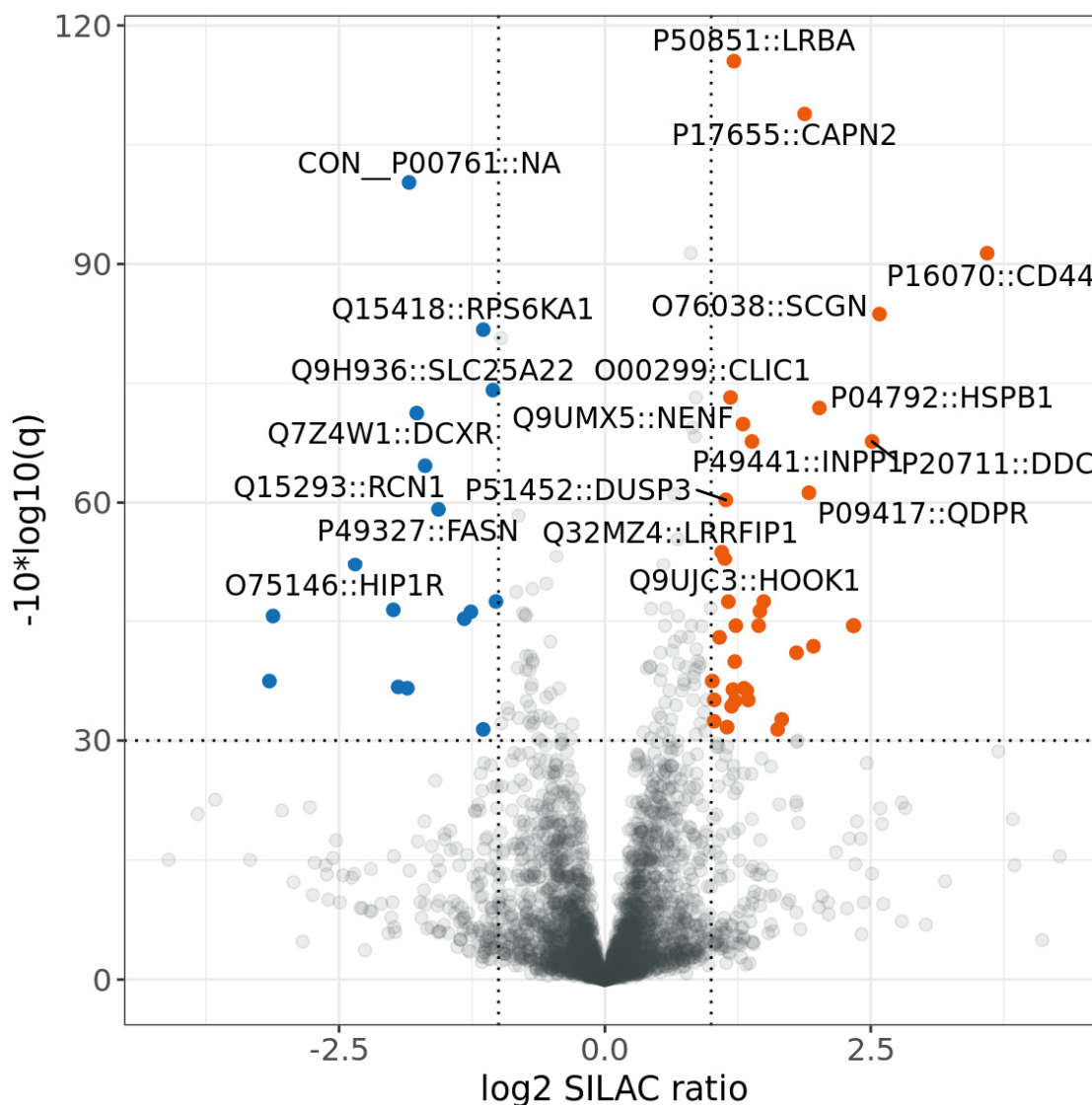


**Abbildung 13: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von *high grade* NETs aus Thymus und Lunge.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen *high grade* TNETs und PNETs anhand einer entsprechenden  $\log_2$  SILAC *ratio* auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Da keine Werte über dieser Linie liegen, wurden in diesem Vergleich keine statistisch signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine identifiziert. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

#### 4.7.2 Differentielle Proteinexpression – Thymus *low grade* Tumoren vs. Lungen *low grade* Tumoren

Als nächstes wurde die differentielle Proteinexpression von *low grade* NETs aus Thymus und Lunge betrachtet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wieder in Form eines *volcano plots* in Abbildung 14. Es fanden sich zahlreiche statistisch signifikant quantitativ unterschiedlich exprimierte Proteine in diesen Tumoren. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den PNETs signifikant höher exprimiert wurden, die blau mar-

kierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den TNETs signifikant höher exprimiert wurden.



**Abbildung 14: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von *low grade* NETs aus Thymus und Lunge.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen *low grade* TNETs und PNETs anhand einer entsprechenden  $\log_2$  SILAC ratio auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den PNETs signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den TNETs signifikant höher exprimiert wurden. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

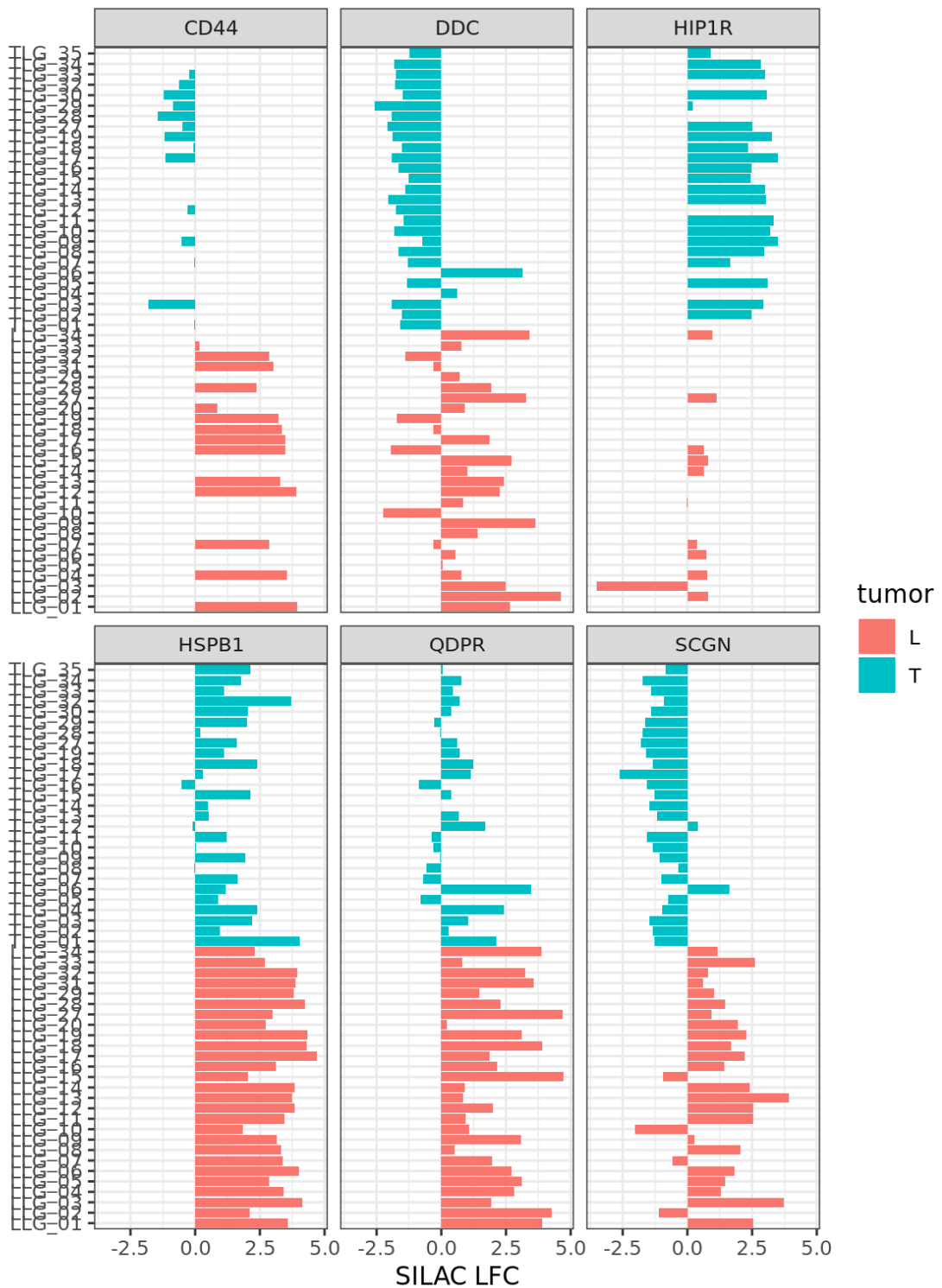
In Tabelle 18 sind die zehn Proteine aufgeführt, die quantitativ am stärksten unterschiedlich exprimiert wurden und bei denen der Unterschied statistisch signifikant war.

**Tabelle 18: Auswahl der statistisch signifikant am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von *low grade* NETs aus Thymus und Lunge.** Dargestellt sind die zehn Proteine mit den höchsten positiven SILAC *ratios* (stärkere Expression in *low grade* PNETs, orangefarbene Zeilen) und den höchsten negativen SILAC *ratios* (stärkere Expression in *low grade* TNETs, blaue Zeilen). Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen quantitativen Proteinexpression ist durch die p-Werte angegeben. Diese wurden mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur (BH) korrigiert.

Gen-Name	Protein-Name	log <sub>2</sub> SILAC ratio	p-Wert (korrigiert nach BH)
CD44	CD44 antigen	3,595	7,313E-10
SCGN	Secretagogin	2,582	4,259E-09
DDC	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	2,512	1,703E-07
HSPB1	Heat shock protein beta-1	2,017	6,448E-08
QDPR	Dihydropteridine reductase	1,918	7,511E-07
CAPN2	Calpain-2 catalytic subunit	1,878	1,298E-11
RCN1	Reticulocalbin-1	-1,691	3,435E-07
DCXR	L-xylulose reductase	-1,769	7,483E-08
Con	Con (Trypsin)	-1,841	9,427E-11
HIP1R	Huntingtin-interacting protein 1-related protein	-2,349	6,099E-06

Zu den Proteinen, die am stärksten ( $\log_2$  SILAC *ratio* > 1,9) in den pulmonalen *low grade* Tumoren exprimiert wurden, gehörten CD44, SCGN, DDC, HSPB1 und QDPR. Das am stärksten ( $\log_2$  SILAC *ratio* < -1,9) exprimierte Protein in den *low grade* Thymustumoren war HIP1R. Diese sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine wurden bezüglich ihrer Expression in den einzelnen Tumoren der *low grade* Thymus- und Lungentumoren untersucht. Damit sollte unter anderem überprüft werden, inwiefern diese Proteine als mögliche Biomarker zur diagnostischen Trennung zwischen *low grade* TNETs und PNETs geeignet sein könnten. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den Lungentumoren ist mit rot, in den Thymustumoren mit türkis dargestellt. Je weiter die Balken nach rechts bzw. links reichen, desto stärker oder schwächer im Vergleich zum Quantifizierungsstandard wurde das entsprechende Protein im jeweiligen Tumor exprimiert. Wenn keine Balken vorhanden sind, wurde das entsprechende Protein in den jeweiligen Tumoren nicht gemessen.

Für CD44 zeigte sich in einigen Lungentumoren eine stärkere Expression und für einen Teil der Thymustumoren eine schwächere Expression. In vielen Tumoren wurde das Protein jedoch nicht gemessen. Das Protein HIP1R war in der Mehrzahl der *low grade* TNETs stark exprimiert und in ein paar *low grade* PNETs ebenfalls gering erhöht. In einem *low grade* PNET war es sehr schwach exprimiert. In den übrigen Proben konnte es nicht gemessen werden.



**Abbildung 15:** *Barplots* der Expression der am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von *low grade* NETs aus Thymus und Lunge. Die Stärke der Proteinexpression für die sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine zur diagnostischen Trennung von *low grade* NETs aus Thymus (türkis) und Lunge (rot) ist mithilfe von *barplots* gezeigt. Je weiter die Balken nach rechts bzw. links reichen, desto stärker oder schwächer im Vergleich zum Quantifizierungsstandard wurde das entsprechende Protein im jeweiligen Tumor exprimiert. (TLG = Thymus *low grade* Tumor; LLG = Lungen *low grade* Tumor; SILAC LFC = SILAC log *foldchange* =  $\log_2$  SILAC *ratio*). (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

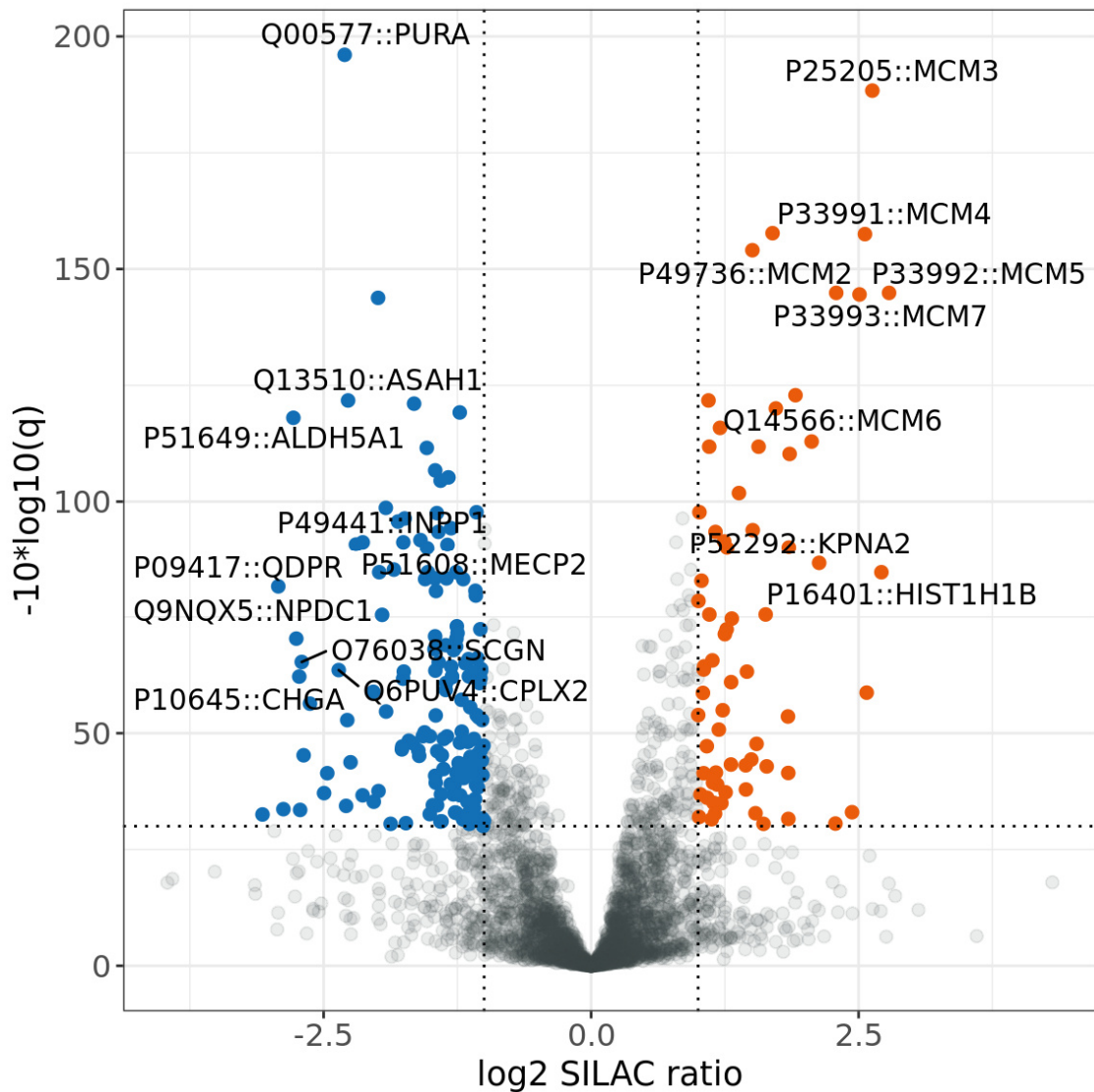
Die Proteine HSPB1 und QDPR konnten in allen bzw. fast allen Proben quantifiziert werden. Beide zeigten sich insgesamt in den pulmonalen *low grade* NETs stärker exprimiert. In einigen Thymus *low grade* NETs waren sie jedoch auch stark exprimiert.

Für die Proteine DDC und SCGN fand sich insgesamt ein ähnliches Bild. Beide konnten in allen Proben gemessen werden. In den meisten *low grade* PNETs waren sie stärker exprimiert und jeweils in ein paar Fällen schwächer exprimiert. In den *low grade* TNETs waren sie schwach exprimiert, mit jeweils zwei Ausnahmen einer stärkeren Expression. Für DDC und SCGN fand sich insgesamt die stärkste unterschiedliche Proteinexpression mit guter Aussagekraft, da beide Proteine in allen Proben gemessen wurden. Allerdings gab es jeweils in den TNETs und PNETs auch Ausnahmefälle bezüglich der Expression, sodass diese Proteine für sich allein genommen jeweils nicht ausreichend spezifisch sind, um die Tumorgruppen zuverlässig trennen zu können.

### 4.7.3 Differentielle Proteinexpression – Lungen *low grade* Tumoren vs. Lungen *high grade* Tumoren

Es wurde die differentielle Proteinexpression zwischen den Gruppen der *low* und *high grade* Lungentumoren untersucht. Erneut erfolgte die Darstellung der Ergebnisse in Form eines *volcano plots* (siehe Abbildung 16). Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* Lungentumoren signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* Lungentumoren signifikant höher exprimiert wurden. Beschriftet sind im Diagramm diejenigen Proteine, die deutlich unterschiedlich exprimiert wurden und gleichzeitig die höchste Signifikanz (geringste p-Werte) aufwiesen (rechts und links oben im *volcano plot*).

In Tabelle 19 sind einige Einträge von statistisch signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen dargestellt. Es wurden die zehn Einträge mit den höchsten positiven und negativen SILAC *ratios* ausgewählt, das heißt diejenigen Proteine, die quantitativ am stärksten unterschiedlich zwischen den *low* und *high grade* Lungentumoren exprimiert wurden. Diese liegen am weitesten rechts und links im Diagramm, sowie oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie als Grenze der statistischen Signifikanz im *volcano plot* (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von *low grade* und *high grade* NETs der Lunge.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen *low grade* und *high grade* PNETs anhand einer entsprechenden  $\log_2$  SILAC *ratio* auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* PNETs signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* PNETs signifikant höher exprimiert wurden. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Zu den Proteinen, die am stärksten ( $\log_2$  SILAC *ratio* > 2,5) in den pulmonalen *high grade* Tumoren exprimiert wurden, gehörten MCM5, MCM3, MCM4 und MCM7 sowie HIST1H1B. Zu den am stärksten ( $\log_2$  SILAC *ratio* < -2,7) exprimierten Proteinen in den *low grade* Lungentumoren gehörten QDPR, ALDH5A1, NPDC1, CHGA und SCGN.

**Tabelle 19: Auswahl der statistisch signifikant am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von *low grade* und *high grade* NETs der Lunge.** Dargestellt sind die zehn Proteine mit den höchsten positiven SILAC *ratios* (stärkere Expression in *high grade* PNETs, orangefarbene Zeilen) und den höchsten negativen SILAC *ratios* (stärkere Expression in *low grade* PNETs, blaue Zeilen). Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen quantitativen Proteinexpression ist durch die p-Werte angegeben. Diese wurden mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur (BH) korrigiert.

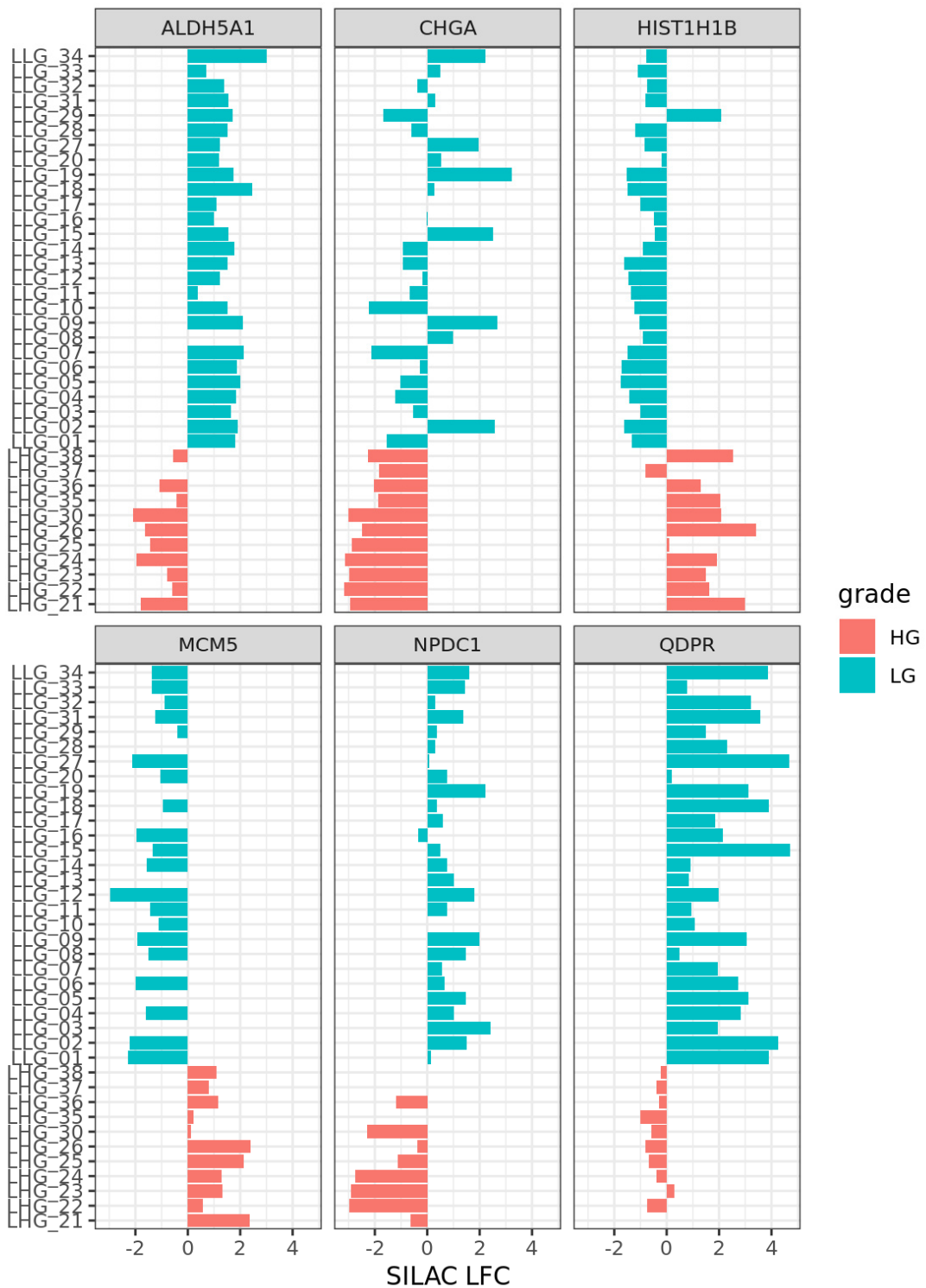
Gen-Name	Protein-Name	log2 SILAC ratio	p-Wert (korrigiert nach BH)
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	2,784	3,258E-15
HIST1H1B	Histone H1.5	2,713	3,463E-09
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	2,628	1,461E-19
MCM4	DNA replication licensing factor MCM4	2,559	1,779E-16
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	2,508	3,525E-15
SCGN	Secretagogin	-2,704	2,944E-07
CHGA	Chromogranin-A	-2,728	6,072E-07
NPDC1	Neural proliferation differentiation and control protein 1	-2,756	9,265E-08
ALDH5A1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	-2,783	1,581E-12
QDPR	Dihydropteridine reductase	-2,924	6,977E-09

Erneut wurden die sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine bezüglich ihrer Expression in den einzelnen Tumoren der *low grade* und *high grade* PNETs untersucht. Damit sollte unter anderem überprüft werden, inwiefern diese Proteine als mögliche Biomarker zur diagnostischen Trennung zwischen *high grade* und *low grade* PNETs geeignet sein könnten. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den *high grade* PNETs ist mit rot, in den *low grade* PNETs mit türkis dargestellt.

Das Protein ALDH5A1 konnte bis auf in je einem *low grade* und *high grade* Tumor in allen Proben quantifiziert werden. In den *low grade* Tumoren zeigte sich eine stärkere Expression, in den *high grade* Tumoren eine schwächere Expression. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für NPDC1 und QDPR, wobei sich hier jeweils eine Ausnahme mit einer schwächeren Expression von NPDC1 in einem *low grade* Tumor und einer stärkeren Expression von QDPR in einem *high grade* Tumor zeigte.

Bis auf in einem *low grade* PNET konnte CHGA in allen Proben gemessen werden. In den *high grade* Tumoren war es durchweg schwächer exprimiert. In den *low grade* Tumoren fand sich ein gemischtes Bild mit einer stärkeren oder schwächeren Expression in jeweils etwa der Hälfte der Fälle.





**Abbildung 17: Barplots der Expression der am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von low grade und high grade NETs der Lunge.** Die Stärke der Proteinexpression für die sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine zur diagnostischen Trennung von low grade PNETs (türkis) und high grade PNETs (rot) ist mithilfe von barplots gezeigt. Je weiter die Balken nach rechts bzw. links reichen, desto stärker bzw. schwächer im Vergleich zum Quantifizierungsstandard wurde das entsprechende Protein im jeweiligen Tumor exprimiert. (LG = low grade Tumor; HG = high grade Tumor; SILAC LFC = SILAC log foldchange = log<sub>2</sub> SILAC ratio). (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Das Protein HIST1HB wurde in allen Proben quantifiziert und war bis auf je eine Ausnahme in den *low grade* Tumoren schwächer exprimiert und in den *high grade* Tumoren stärker exprimiert. Außer in sechs *low grade* PNETs konnte das Protein MCM5 in allen Proben quantifiziert werden und zeigte sich ebenfalls in den *low grade* Tumoren schwächer exprimiert und in den *high grade* Tumoren stärker exprimiert.

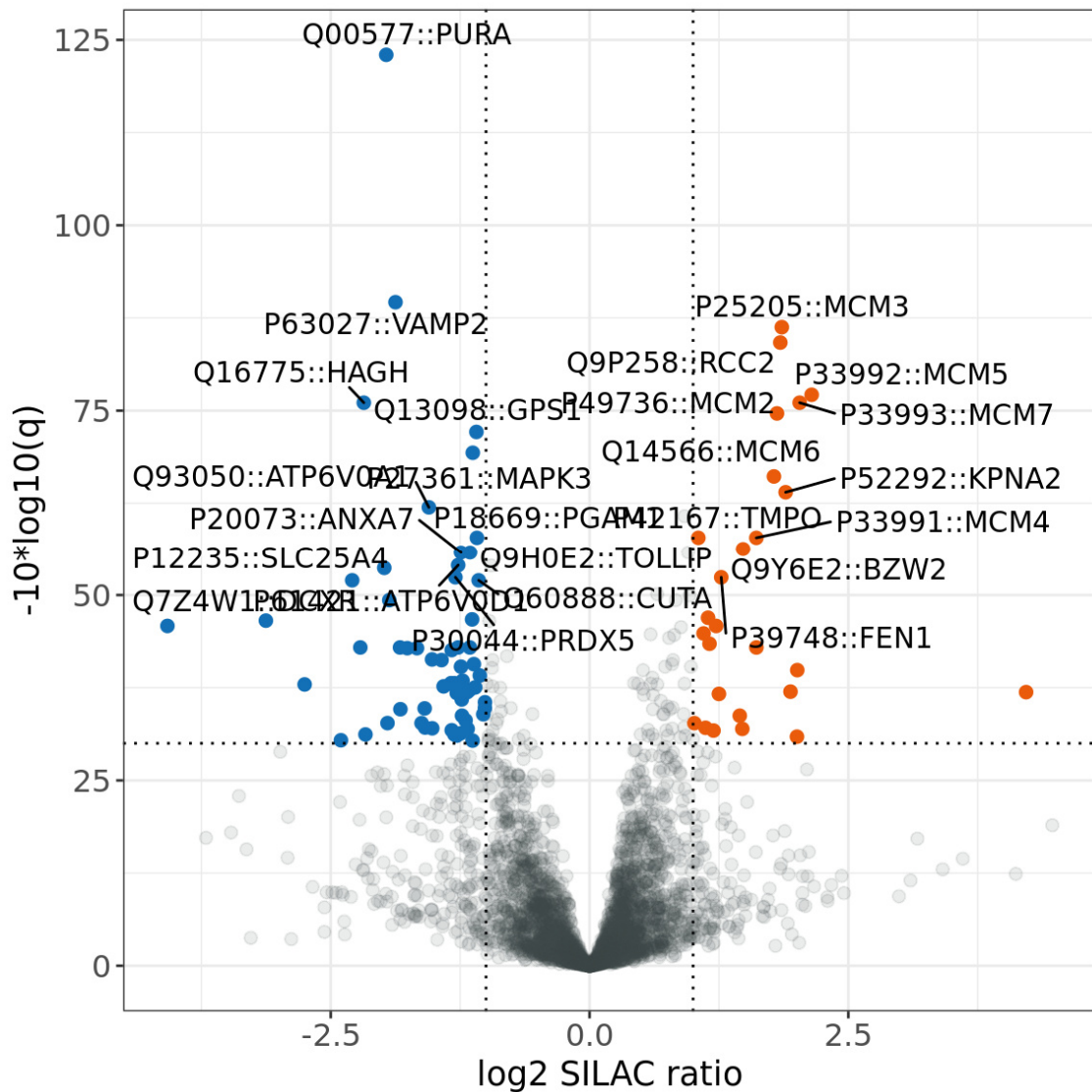
#### 4.7.4 Differentielle Proteinexpression – Thymus *low grade* Tumoren vs. Thymus *high grade* Tumoren

Als nächstes wurde die differentielle Proteinexpression zwischen den Gruppen der *low* und *high grade* NETs des Thymus untersucht. Erneut erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als *volcano plot* (siehe Abbildung 18). Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* TNETs signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* TNETs signifikant höher exprimiert wurden. Beschriftet sind im Diagramm diejenigen Proteine, die deutlich unterschiedlich exprimiert wurden und gleichzeitig die höchste Signifikanz (geringste p-Werte) aufwiesen (rechts und links oben im *volcano plot*).

In Tabelle 20 sind einige Einträge von statistisch signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen dargestellt. Es wurden die zehn Einträge mit den höchsten positiven und negativen SILAC *ratios* ausgewählt, das heißt diejenigen Proteine, die quantitativ am stärksten unterschiedlich zwischen den *low* und *high grade* Thymus-NETs exprimiert wurden.

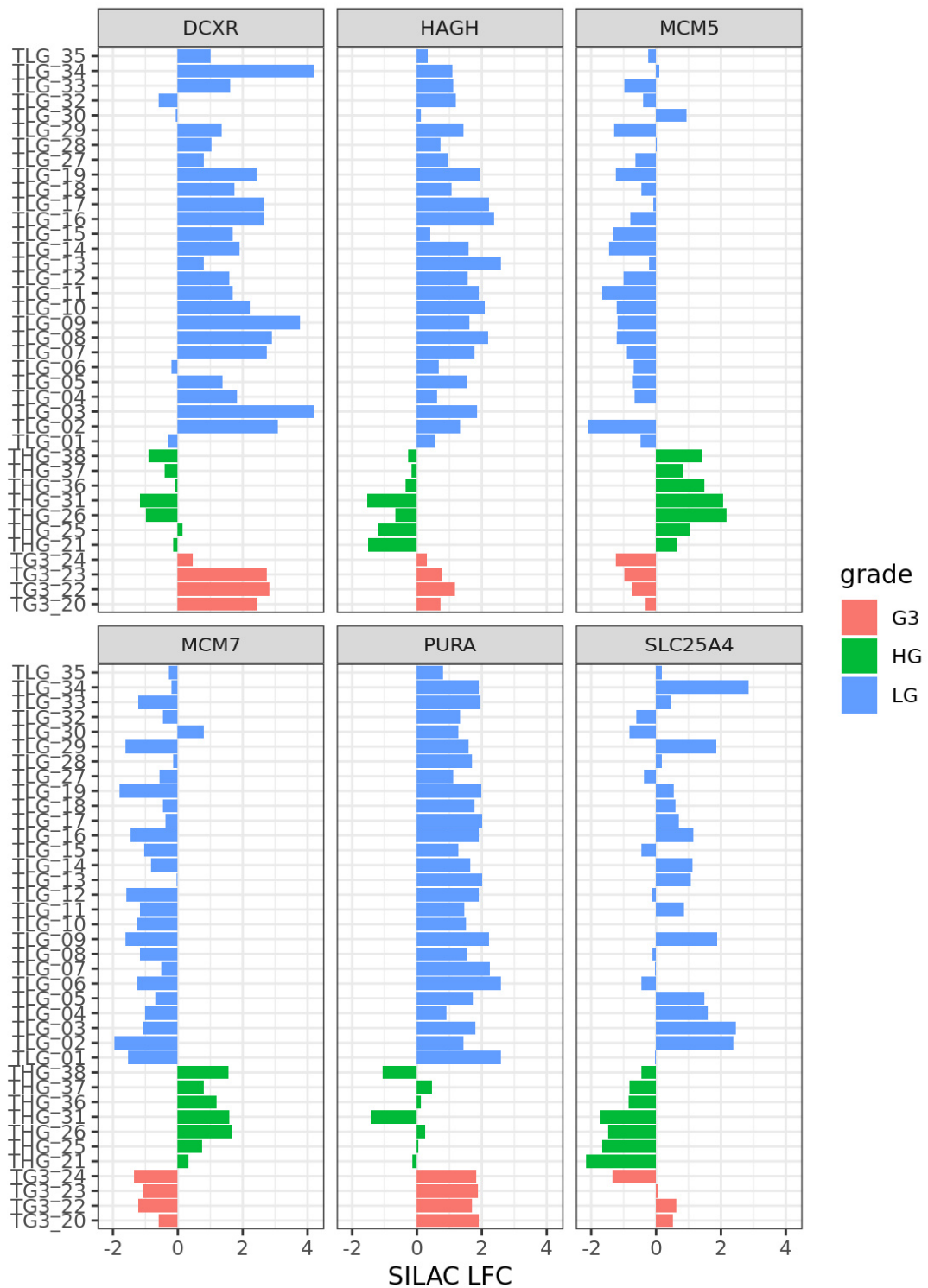
**Tabelle 20: Auswahl der statistisch signifikant am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von *low grade* und *high grade* NETs des Thymus.** Dargestellt sind die zehn Proteine mit den höchsten positiven SILAC *ratios* (stärkere Expression in *high grade* TNETs, orangefarbene Zeilen) und den höchsten negativen SILAC *ratios* (stärkere Expression in *low grade* TNETs, blaue Zeilen). Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen quantitativen Proteinexpression ist durch die p-Werte angegeben. Diese wurden mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur (BH) korrigiert.

Gen-Name	Protein-Name	log2 SILAC ratio	p-Wert (korrigiert nach BH)
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	2,146	1,932E-08
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	2,030	2,473E-08
KPNA2	Importin subunit alpha-1	1,894	3,986E-07
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	1,857	2,367E-09
RCC2	Protein RCC2	1,843	3,817E-09
VAMP2	Vesicle-associated membrane protein 2	-1,875	1,090E-09
PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha	-1,964	5,022E-13
SLC25A4	ADP/ATP translocase 1	-1,983	4,296E-06
HAGH	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	-2,180	2,473E-08
DCXR	L-xylulose reductase	-2,293	6,327E-06



**Abbildung 18: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von *low grade* und *high grade* NETs des Thymus.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen *low grade* und *high grade* TNETs anhand einer entsprechenden  $\log_2$  SILAC *ratio* auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* TNETs signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* TNETs signifikant höher exprimiert wurden. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Wie zuvor wurden die sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine in den einzelnen Proben der TNETs untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 mithilfe von *barplots* gezeigt. Hierbei wurde auch die Subgruppe der TNET-G3 berücksichtigt. Die Expression in den *low grade* TNETs ist mit blau, in den *high grade* TNETs mit grün und in den TNET-G3 mit rot dargestellt.



**Abbildung 19: Barplots der Expression der am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von *low grade* und *high grade* NETs des Thymus.** Die Stärke der Proteinexpression für die sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von *low grade* (blau) und *high grade* TNETs (grün) ist mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den TNET-G3 ist mit rot dargestellt. Je weiter die Balken nach rechts bzw. links reichen, desto stärker bzw. schwächer im Vergleich zum Quantifizierungsstandard wurde das entsprechende Protein im jeweiligen Tumor exprimiert. (LG = *low grade* Tumor; G3 = TNET-G3; HG = *high grade* Tumor; SILAC LFC = SILAC log foldchange =  $\log_2$  SILAC ratio). (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Das Protein DCXR konnte in allen Proben gemessen werden. In den *low grade* Tumoren war es mit Ausnahme von vier Fällen stärker exprimiert. In den *high grade* Tumoren war es in sechs Fällen schwächer exprimiert und in einem Fall stärker exprimiert. In allen vier TNET-G3 war es stärker exprimiert.

Auch das Protein HAGH wurde in allen Proben gemessen. In den *low grade* TNETs und TNET-G3 war es stärker exprimiert und in den *high grade* TNETs schwächer exprimiert. Für das Protein PURA zeigte sich ein ähnliches Bild mit einer durchgängig stärkeren Expression in den *low grade* TNETs und TNET-G3. In den *high grade* Tumoren war es in drei Fällen schwächer exprimiert und in vier Fällen leicht erhöht exprimiert.

Außer in einem *low grade* Tumor konnte SLC25A4 in allen Proben quantifiziert werden. In den *low grade* TNETs und TNET-G3 war es überwiegend stark exprimiert und in der Minderheit der Fälle schwächer exprimiert. In den *high grade* TNETs war es in allen Fällen schwächer exprimiert.

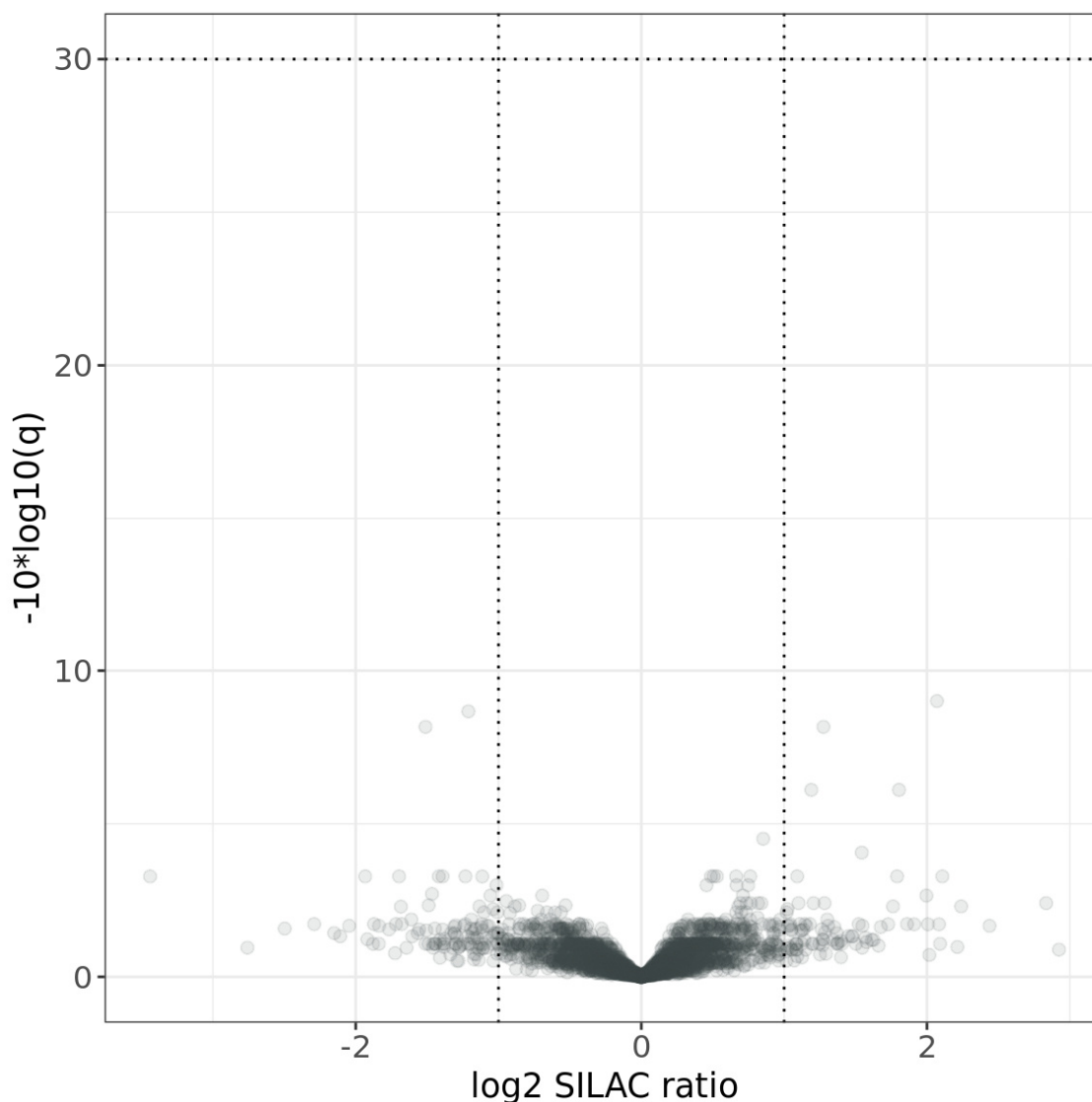
Die Proteine MCM5 und MCM7 konnten mit einer Ausnahme bei MCM5 in allen Proben quantifiziert werden. MCM5 war in zwei *low grade* Tumoren gering erhöht exprimiert und MCM7 in einem Fall. Ansonsten waren beide Proteine in allen übrigen *low grade* TNETs und TNET-G3 schwächer exprimiert. In den *high grade* TNETs waren MCM5 und MCM7 jeweils in allen Proben stärker exprimiert.

Im Rahmen dieser differentiellen Proteinexpressionsanalyse zeigte sich zum einen ein klarer Unterschied zwischen *low grade* und *high grade* TNETs und zum anderen, dass sich die TNET-G3 nahezu identisch zu den *low grade* TNETs und anders als die *high grade* TNETs verhalten.

#### **4.7.5 Differentielle Proteinexpression – TNET-G3 vs. Thymus *low grade* Tumoren**

Es wurde die differentielle Proteinexpression zwischen den Gruppen der TNET-G3 und *low grade* TNETs untersucht. Erneut erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als *volcano plot* in Abbildung 20.

Angesichts der bisherigen Ergebnisse der explorativen Datenanalyse und differentiellen Proteinexpression, wo sich die beiden Tumorgruppen im Wesentlichen gleich verhalten haben, wurden für die TNET-G3 und *low grade* TNETs bei einer FDR von 0,1 % erwartungsgemäß keine statistisch signifikant quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierten Proteine identifiziert.

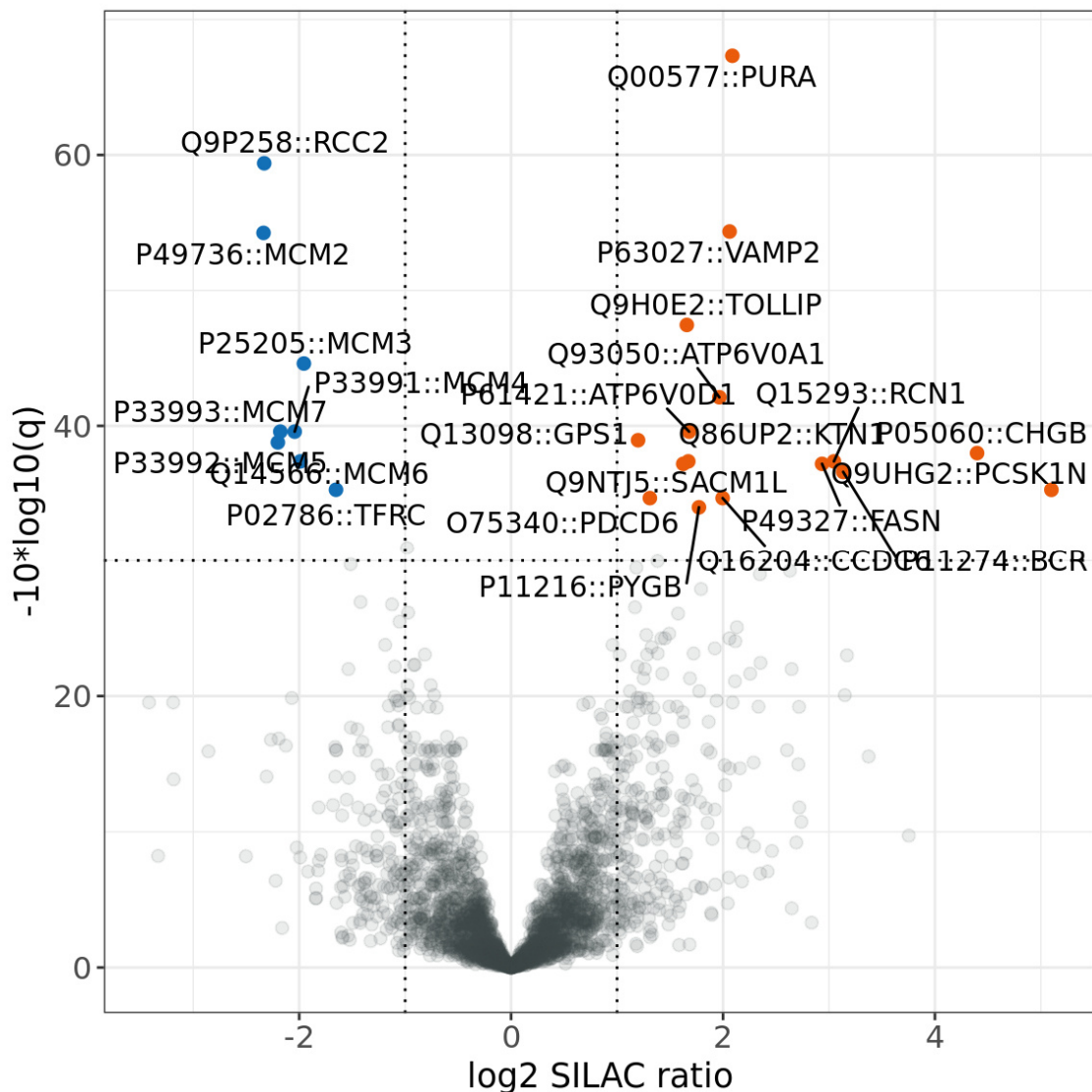


**Abbildung 20: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von TNET-G3 und *low grade* TNETs.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen TNET-G3 und *low grade* TNETs anhand einer entsprechenden  $\log_2$  SILAC *ratio* auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Da keine Werte über dieser Linie liegen, wurden für diesen Vergleich keine statistisch signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine identifiziert. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

#### 4.7.6 Differentielle Proteinexpression – TNET-G3 vs. Thymus *high grade* Tumoren

Nachfolgend wurde die differentielle Proteinexpression zwischen den TNET-G3 und *high grade* NETs des Thymus untersucht. Erneut erfolgte die Darstellung der Ergebnisse als *volcano plot* (siehe Abbildung 21). Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den TNET-G3 signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* TNETs signifikant höher exprimiert wurden. Be-

schriftet sind im Diagramm diejenigen Proteine, die deutlich unterschiedlich exprimiert wurden und gleichzeitig die höchste Signifikanz (geringste p-Werte) aufwiesen (rechts und links oben im *volcano plot*).



**Abbildung 21: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von TNET-G3 und *high grade* TNETs.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen *high grade* TNETs und TNET-G3 anhand einer entsprechenden log<sub>2</sub> SILAC *ratio* auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den TNET-G3 signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* TNETs signifikant höher exprimiert wurden. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

In Tabelle 21 sind die zehn Einträge mit den höchsten positiven und negativen SILAC *ratios* dargestellt, das heißt diejenigen Proteine, die quantitativ am stärksten unterschiedlich zwischen den TNET-G3 und *high grade* Thymus-NETs exprimiert wurden.

**Tabelle 21: Auswahl der statistisch signifikant am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von TNET-G3 und *high grade* TNETs.** Dargestellt sind die zehn Proteine mit den höchsten positiven SILAC *ratios* (stärkere Expression in TNET-G3, orangefarbene Zeilen) und den höchsten negativen SILAC *ratios* (stärkere Expression in *high grade* TNETs, blaue Zeilen). Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen quantitativen Proteinexpression ist durch die p-Werte angegeben. Diese wurden mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur (BH) korrigiert.

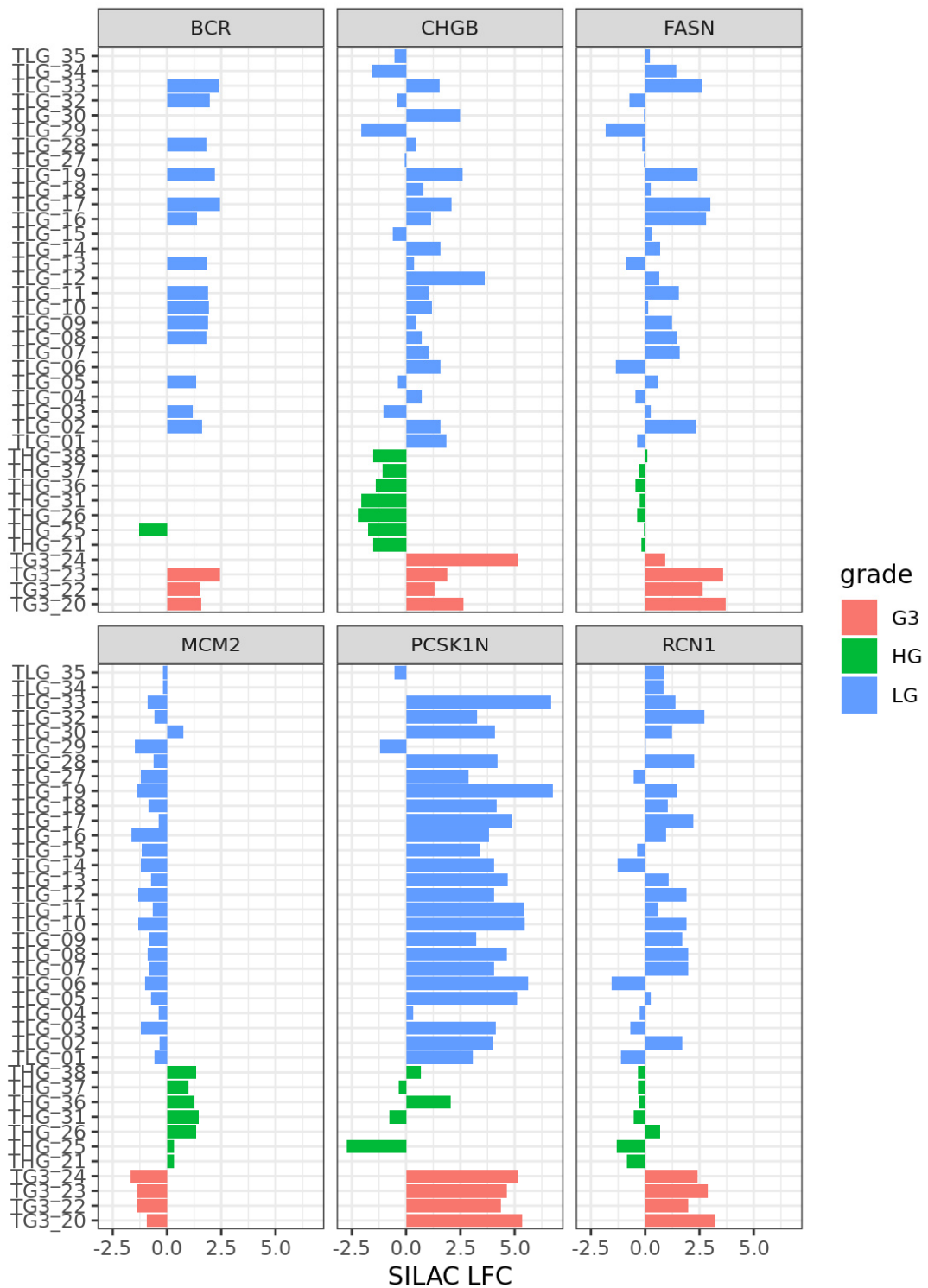
Gen-Name	Protein-Name	log2 SILAC ratio	p-Wert (korrigiert nach BH)
PCSK1N	ProSAAS; Proprotein convertase 1 inhibitor	5,099	2,965E-04
CHGB	Secretogranin-1; Chromogranin-B	4,398	1,588E-04
BCR	Breakpoint cluster region protein	3,134	2,186E-04
RCN1	Reticulocalbin-1	3,047	1,828E-04
FASN	Fatty acid synthase	2,935	1,907E-04
PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha	2,088	1,853E-07
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	-2,178	1,103E-04
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	-2,201	1,325E-04
RCC2	Protein RCC2	-2,330	1,152E-06
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	-2,337	3,761E-06

Erneut wurde die Expression der sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine in den einzelnen Proben aller TNETs analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den *low grade* TNETs ist mit blau, in den *high grade* TNETs mit grün und in den TNET-G3 mit rot dargestellt.

Sofern das Protein BCR in den Proben gemessen werden konnte, zeigte es sich in den *low grade* TNETs und TNET-G3 stärker exprimiert und in den *high grade* TNETs schwächer exprimiert. Allerdings konnte es in etwa der Hälfte der Fälle nicht gemessen werden.

Die Proteine CHGB, FASN und RCN1 konnten in allen Fällen quantifiziert werden. In den *low grade* TNETs waren sie mehrheitlich stärker exprimiert und in wenigen Fällen schwächer exprimiert. In den TNET-G3 waren sie durchweg hoch exprimiert. In den *high grade* TNETs waren sie schwächer exprimiert, wobei sich für FASN und RCN1 jeweils eine Ausnahme mit einer gering erhöhten Expression in einem *high grade* Tumor zeigte.





**Abbildung 22: Barplots** der Expression der am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von TNET-G3 und *high grade* TNETs. Die Stärke der Proteinexpression für die sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine zwischen TNET-G3 (rot) und *high grade* TNETs (grün) ist mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den *low grade* TNETs ist mit blau dargestellt. Je weiter die Balken nach rechts bzw. links reichen, desto stärker bzw. schwächer im Vergleich zum Quantifizierungsstandard wurde das entsprechende Protein im jeweiligen Tumor exprimiert. (LG = *low grade* Tumor; G3 = TNET-G3; HG = *high grade* Tumor; SILAC LFC = SILAC log foldchange =  $\log_2$  SILAC ratio). (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Auch das Protein PCSKN1 war in den TNET-G3 sowie in den meisten *low grade* Tumoren stärker exprimiert. In zwei *low grade* TNETs war es schwächer exprimiert und in einem konnte es nicht gemessen werden. Bei den *high grade* TNETs war es in zwei Fällen stärker exprimiert, in drei Fällen schwächer exprimiert und konnte in zwei Proben nicht gemessen werden.

Das Protein MCM2 konnte in allen Proben quantifiziert werden. Außer in einem Fall war es in allen *low grade* TNETs sowie den TNET-G3 schwächer exprimiert und in allen *high grade* TNETs stärker exprimiert.

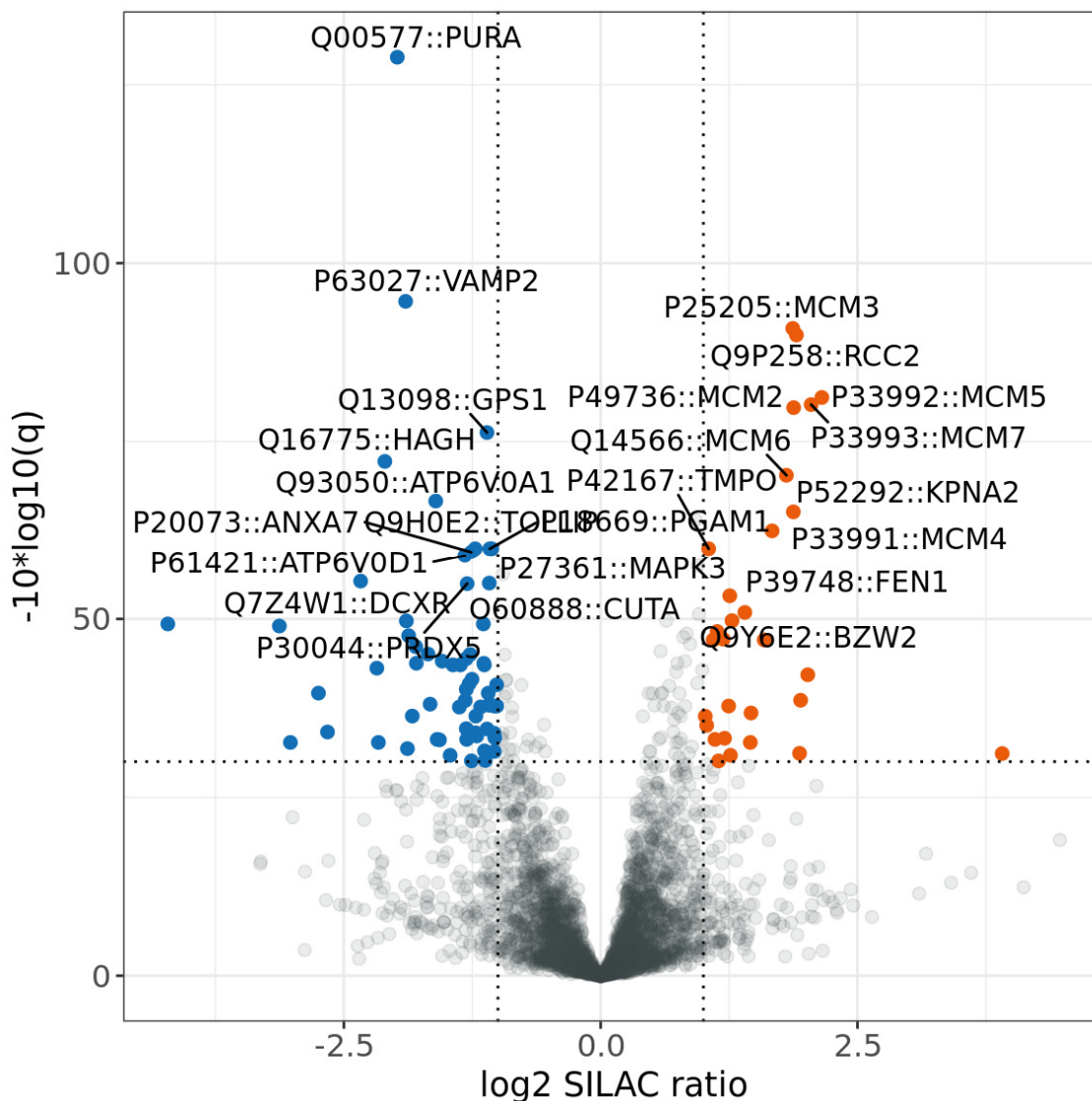
Auch beim Vergleich der differentiellen Proteinexpression zwischen TNET-G3 und *high grade* TNETs zeigte sich, dass sich die TNET-G3 insgesamt entgegengesetzt zu den *high grade* Tumoren und vielmehr wie die *low grade* TNETs verhalten.

#### 4.7.7 Differentielle Proteinexpression – Thymus *low grade* Tumoren und TNET-G3 gepoolt vs. Thymus *high grade* Tumoren

Die bisherigen Ergebnisse der explorativen Datenanalyse und differentiellen Proteinexpression der quantitativen Massenspektrometrie haben gezeigt, dass die TNET-G3 sehr ähnlich zu den *low grade* TNETs sind und sich von den übrigen „wahren“ *high grade* Tumoren unterscheiden. Daher wurde ein weiterer Vergleich der differentiellen Proteinexpression zwischen den *low grade* TNETs zusammengepoolt mit den TNET-G3 und den *high grade* TNETs vorgenommen.

In Abbildung 23 ist das Ergebnis als *volcano plot* dargestellt. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* Tumoren signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* TNETs und TNET-G3 signifikant höher exprimiert wurden. In Tabelle 22 sind die zehn Einträge mit den höchsten positiven und negativen SILAC *ratios* dargestellt.

Die Expression der sechs am stärksten signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine dieses Vergleiches wird in Abbildung 24 wieder mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den *low grade* TNETs ist mit blau, in den *high grade* TNETs mit grün und in den TNET-G3 mit rot dargestellt.



**Abbildung 23: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von gepoolten *low grade* TNETs mit TNET-G3 und *high grade* TNETs.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen gepoolten *low grade* TNETs und TNET-G3 und *high grade* TNETs anhand einer entsprechenden  $\log_2$  SILAC *ratio* auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* Tumoren signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* TNETs und TNET-G3 signifikant höher exprimiert wurden. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Das Protein DCXR konnte in allen Proben quantifiziert werden. In den *low grade* Tumoren war es in den meisten Fällen stärker exprimiert und in vier Fällen etwas schwächer exprimiert. In allen TNET-G3 war es stärker exprimiert. In den *high grade* Tumoren war es in einer Probe gering erhöht exprimiert und ansonsten schwächer exprimiert.

**Tabelle 22: Auswahl der statistisch signifikant am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von gepoolten *low grade* TNETs mit TNET-G3 und *high grade* TNETs.** Dargestellt sind die zehn Proteine mit den höchsten positiven SILAC *ratios* (stärkere Expression in *high grade* TNETs, orangefarbene Zeilen) und den höchsten negativen SILAC *ratios* (stärkere Expression in *low grade* TNETs und TNET-G3, blaue Zeilen). Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen quantitativen Proteinexpression ist durch die p-Werte angegeben. Diese wurden mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur (BH) korrigiert.

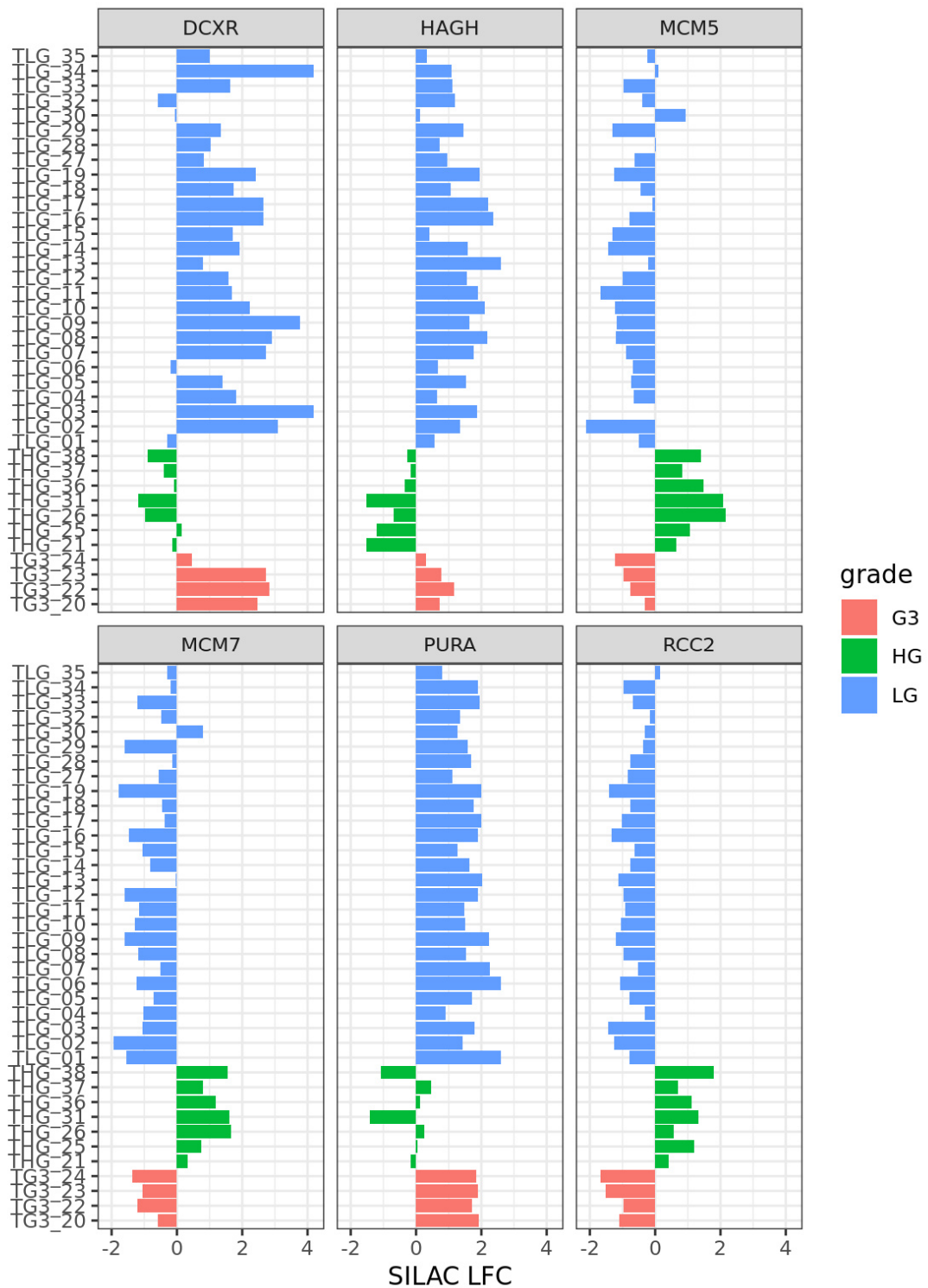
Gen-Name	Protein-Name	log2 SILAC ratio	p-Wert (korrigiert nach BH)
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	2,153	7,630E-09
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	2,049	9,609E-09
RCC2	Protein RCC2	1,906	1,017E-09
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	1,878	1,060E-08
KPNA2	Importin subunit alpha-1	1,876	3,062E-07
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	1,870	8,226E-10
VAMP2	Vesicle-associated membrane protein 2	-1,899	3,435E-10
PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha	-1,980	1,302E-13
HAGH	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	-2,101	6,009E-08
DCXR	L-xylulose reductase	-2,337	2,948E-06

Die Proteine HAGH und PURA wurden in allen Proben gemessen und waren jeweils in allen *low grade* TNETs und TNET-G3 stärker exprimiert. Das Protein HAGH war in allen *high grade* TNETs schwächer exprimiert, während PURA in drei Fällen schwächer exprimiert und in vier Fällen gering erhöht exprimiert war.

Mit einer Ausnahme für MCM5 konnten die Proteine MCM7 und MCM5 in allen Proben quantifiziert werden. Dabei waren sie in den *low grade* Tumoren und TNET-G3 schwächer exprimiert, mit einer Ausnahme einer stärkeren Expression von MCM7 in einem *low grade* Tumor und einer stärkeren Expression von MCM5 in zwei *low grade* Tumoren. In den *high grade* Tumoren waren sie durchgehend stärker exprimiert.

Das Protein RCC2 wurde in allen Proben quantifiziert und war in den *high grade* TNETs in allen Fällen stärker exprimiert. In den *low grade* TNETs war es, bis auf eine Ausnahme mit einer leicht erhöhten Expression, in allen Proben, ebenso wie in den TNET-G3, schwächer exprimiert.

Es zeigte sich erneut, dass sich die TNET-G3 hinsichtlich ihrer Proteinexpression sehr ähnlich zu den *low grade* TNETs und anders als die *high grade* TNETs verhalten.



**Abbildung 24:** *Barplots* der Expression der am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von gepoolten *low grade* TNETs mit TNET-G3 und *high grade* TNETs. Die Stärke der Proteinexpression für die sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine ist mithilfe von *barplots* gezeigt (*low grade* TNETs blau; *high grade* TNETs grün; TNET-G3 rot). Je weiter die Balken nach rechts bzw. links reichen, desto stärker bzw. schwächer im Vergleich zum Quantifizierungsstandard wurde das entsprechende Protein im jeweiligen Tumor exprimiert. (LG = *low grade* Tumor; G3 = TNET-G3; HG = *high grade* Tumor; SILAC LFC = SILAC log *foldchange* = log<sub>2</sub> SILAC *ratio*). (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

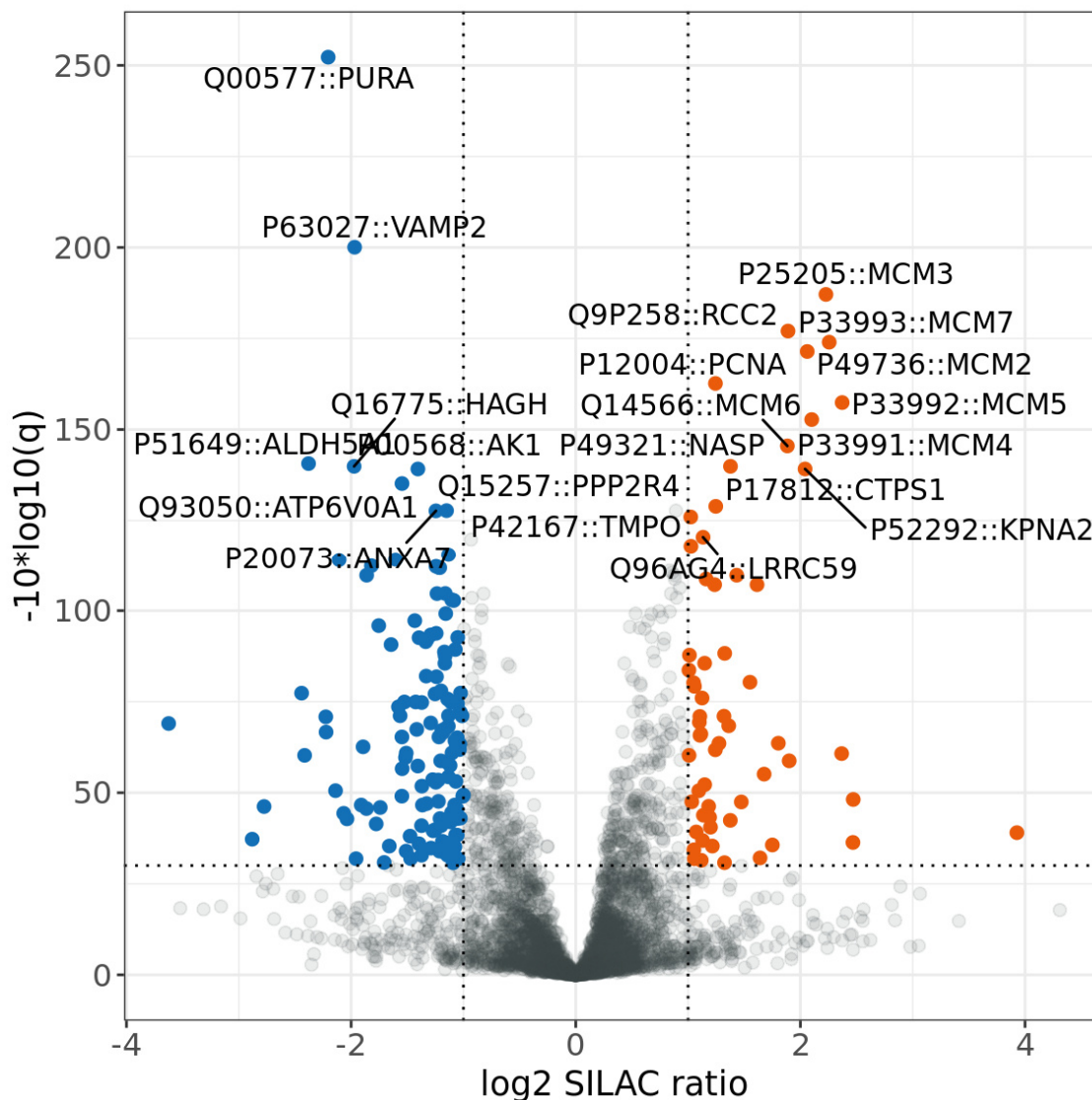
#### 4.7.8 Differentielle Proteinexpression – Neuroendokrine *low grade* Tumoren und TNET-G3 gepoolt vs. neuroendokrine *high grade* Tumoren

Zum Schluss erfolgte noch ein Vergleich der unterschiedlichen Proteinexpression der *low grade* Tumoren zusammen mit den TNET-G3 und den *high grade* Tumoren unabhängig vom Ursprungsorgan der Tumoren. Dafür wurden alle Lungen und Thymus *low grade* Tumoren und die TNET-G3 zusammengenommen und mit den *high grade* Lungen- und Thymustumoren verglichen. Trotz der zu erwartenden und bereits in den vorherigen Vergleichen gezeigten gewebebedingten Unterschiede in der Proteinexpression zwischen *low grade* Thymus- und Lungen-NETs wurde angenommen, dass für einige Proteine der Unterschied zwischen *low* und *high grade* Tumoren den Unterschied zwischen den verschiedenen Ursprungsgeweben überwiegt.

Das Ergebnis ist in Abbildung 25 als *volcano plot* dargestellt. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* NETs signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* NETs und TNET-G3 signifikant höher exprimiert wurden. Tatsächlich zeigten sich bei diesem Vergleich zahlreiche unterschiedlich exprimierte Proteine. In Tabelle 23 sind die zehn Einträge mit den höchsten positiven und negativen SILAC *ratios* dargestellt.

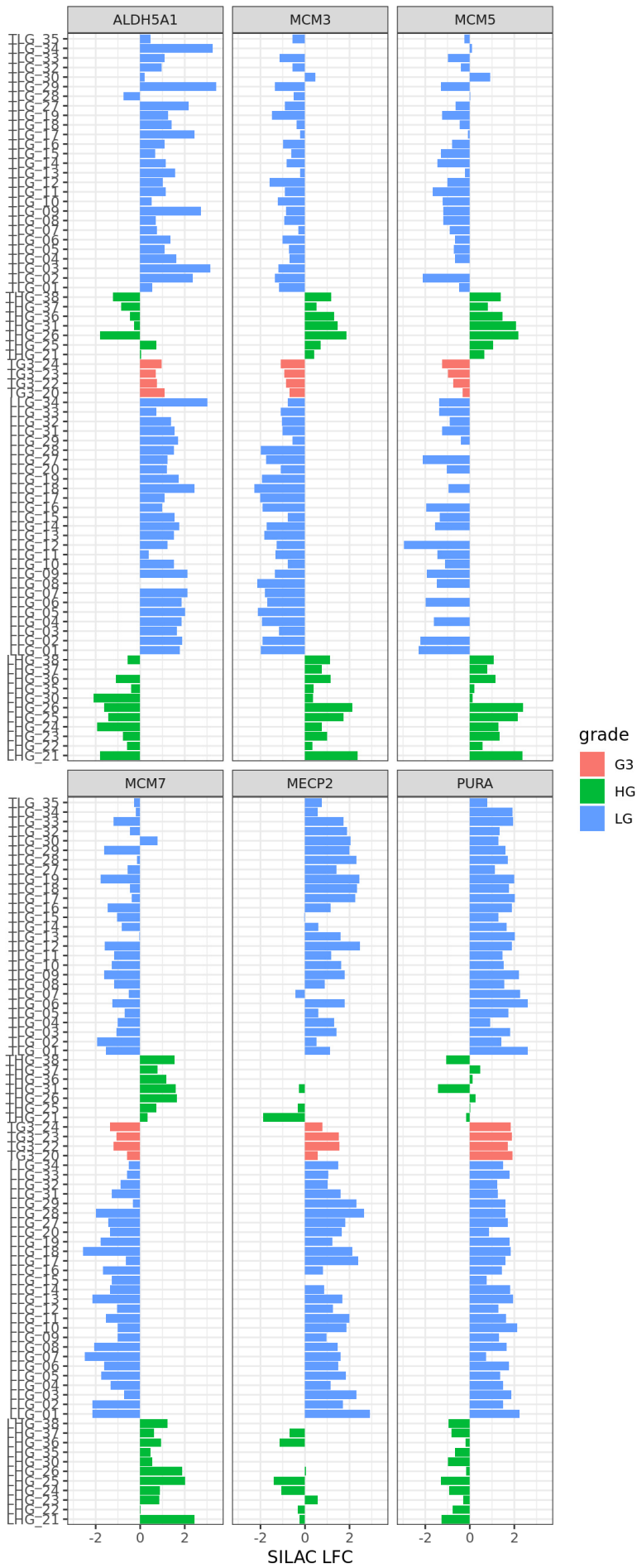
**Tabelle 23: Auswahl der statistisch signifikant am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von gepoolten *low grade* NETs mit TNET-G3 und *high grade* NETs.** Dargestellt sind die zehn Proteine mit den höchsten positiven SILAC *ratios* (stärkere Expression in *high grade* NETs, orangefarbene Zeilen) und den höchsten negativen SILAC *ratios* (stärkere Expression in *low grade* NETs und TNET-G3, blaue Zeilen) unabhängig vom Ursprungsorgan der Tumoren. Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen quantitativen Proteinexpression ist durch die p-Werte angegeben. Diese wurden mit der Benjamini-Hochberg-Prozedur (BH) korrigiert.

Gen-Name	Protein-Name	log2 SILAC ratio	p-Wert (korrigiert nach BH)
MCM5	DNA replication licensing factor MCM5	2,372	1,817E-16
MCM7	DNA replication licensing factor MCM7	2,256	3,996E-18
MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	2,227	1,949E-19
MCM4	DNA replication licensing factor MCM4	2,101	5,327E-16
MCM2	DNA replication licensing factor MCM2	2,061	7,196E-18
KPNA2	Importin subunit alpha-1	2,042	1,211E-14
HAGH	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	-1,973	1,025E-14
MECP2	Methyl-CpG-binding protein 2	-2,107	3,952E-12
PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha	-2,204	5,964E-26
ALDH5A1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase, mitochondrial	-2,379	8,597E-15



**Abbildung 25: Volcano plot: Unterschiedliche Proteinexpression von gepoolten *low grade* NETs mit TNET-G3 und *high grade* NETs unabhängig vom Ursprungsorgan.** Die Punkte rechts und links der vertikalen gestrichelten Linien kennzeichnen quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine zwischen gepoolten *low grade* NETs mit TNET-G3 und *high grade* NETs unabhängig vom Ursprungsorgan der Tumoren anhand einer entsprechenden  $\log_2$  SILAC *ratio* auf der X-Achse. An der Y-Achse ist die statistische Signifikanz der Einträge ablesbar. Werte oberhalb der horizontalen gestrichelten Linie wurden als statistisch signifikant angesehen. Die rot markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *high grade* NETs signifikant höher exprimiert wurden, die blau markierten Einträge kennzeichnen Proteine, die in den *low grade* NETs und TNET-G3 signifikant höher exprimiert wurden. (Abbildung von Dr. Federico Comoglio, enGene Statistics)

Die Expression der sechs am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine dieses Vergleiches wurde in den einzelnen Proben aller neuroendokrinen Tumoren des Studienkollektivs analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den *low grade* NETs ist mit blau, in den *high grade* NETs mit grün und in den TNET-G3 mit rot dargestellt.





**Abbildung 26: Barplots der Expression der am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine von gepoolten *low grade* NETs mit TNET-G3 und gepoolten *high grade* NETs.** Die Stärke der Proteinexpression für die am stärksten unterschiedlich exprimierten Proteine ist mithilfe von *barplots* gezeigt. Die Expression in den *low grade* NETs ist mit blau, in den *high grade* NETs mit grün und in den TNET-G3 mit rot dargestellt. Je weiter die Balken nach rechts bzw. links reichen, desto stärker bzw. schwächer im Vergleich zum Quantifizierungsstandard wurde das entsprechende Protein im jeweiligen Tumor exprimiert. (LG = *low grade* Tumor; G3 = TNET-G3; HG = *high grade* Tumor; SILAC LFC = SILAC log *foldchange* =  $\log_2$  SILAC *ratio*). (Abbildung von Dr. Federico Coglioglio, enGene Statistics)

Die sechs am stärksten signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine konnten in allen bzw. den meisten Proben des Untersuchungskollektivs quantifiziert werden. Dabei zeigten sich die Proteine ALDH5A1, MECP2 und PURA mit einzelnen Ausnahmen in den *low grade* NETs von Thymus und Lunge und den TNET-G3 stärker exprimiert und in den *high grade* Tumoren beider Organe schwächer exprimiert.

Bezüglich der Proteine MCM3, MCM5 und MCM7 zeigten sich hierbei insgesamt umgekehrte Verhältnisse mit einer stärkeren Expression in den *high grade* NETs und einer schwächeren Expression in *low grade* NETs und TNET-G3. Interessant ist, dass der Fall TG30 sowohl in diesem Vergleich als auch in allen vorangegangenen Analysen eine stärkere Expression der Proteine des MCM-Komplexes zeigte. In dieser Hinsicht verhält sich dieser *low grade* Tumor des Thymus wie ein *high grade* Tumor.

Auch bei diesem Vergleich der Proteinexpression zeigten die TNET-G3 ein gleiches Bild wie die *low grade* Tumoren und entsprechend entgegengesetzt zu den *high grade* Tumoren.

Das Protein ALDH5A1 zeigte sich bereits im Vergleich *low grade* vs. *high grade* PNETs in den *low grade* Tumoren stärker exprimiert und in den *high grade* Tumoren schwächer exprimiert. Für PURA konnte dasselbe in den Vergleichen *low grade* PNETs vs. *high grade* PNETs, *low grade* TNETs vs. *high grade* TNETs, TNET-G3 vs. *high grade* TNETs und *low grade* TNETs und TNET-G3 gepoolt vs. *high grade* TNETs beobachtet werden. Für diese beiden Proteine zeigte sich somit entitätsübergreifend eine differentielle Expression in neuroendokrinen *low grade* und *high grade* Tumoren.

Für die Proteine des MCM-Komplexes konnte in den vorhergehenden Vergleichen ebenfalls bereits gezeigt werden, dass sie in den *high grade* NETs stärker exprimiert und in den *low grade* Tumoren und TNET-G3 schwächer exprimiert wurden. Eine starke Expression von Proteinen des MCM-Komplexes scheint somit ein markantes Merkmal von neuroendokrinen *high grade* Tumoren zu sein.

## 5 Diskussion

Mit einer Inzidenz von etwa 1 zu 5 Millionen sind die neuroendokrinen Tumoren des Thymus (TNETs) sehr seltene Tumoren. Sie machen 4 – 7% der Tumoren des Thymus und Mediastinums aus und treten vor allem im vorderen Mediastinum auf (Soga et al. 1999; Gaur et al. 2010; Zhao et al. 2016). Als nächstverwandte Tumorgruppe gelten die neuroendokrinen Tumoren der Lunge (PNETs) (Bohnenberger et al. 2017). Diese sind mit einer altersangepassten Inzidenz von 13 – 15 zu 1 Million deutlich häufiger (Öberg et al. 2012). Beide Tumorgruppen werden nach den gleichen WHO-Klassifikationskriterien in die vier Subtypen typisches Karzinoid (TC), atypisches Karzinoid (AC), großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC) und kleinzelliges (Lungen-)Karzinom (SCC bzw. SCLC) eingeteilt (Ströbel et al. 2021, Tabelle 1, Abbildung 1).

Die pulmonalen NETs weisen vor allem für die Karzinoide insgesamt eine bessere Prognose auf als die biologisch aggressiveren TNETs (Ahn et al. 2012; Weissferdt et al. 2013). Daher ist es wichtig, diese Entitäten voneinander zu unterscheiden, damit den betroffenen Patienten neben der korrekten Diagnose des Tumors und seines Stadiums, die bestmögliche Therapie und Lebensqualität ermöglicht wird (Ströbel et al. 2014).

Die Differentialdiagnostik der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge kann jedoch eine Herausforderung darstellen, weil sie histologisch nicht zu unterscheiden sind und es aktuell auch keine etablierten immunhistochemischen Marker hierfür gibt. Die TNETs sind in der Regel negativ für TTF-1 und positiv für PAX8, während dies bei den PNETs eher umgekehrt ist, ohne dass diese unterschiedliche Expression sensitiv oder spezifisch genug wäre, um sie zuverlässig diagnostisch nutzen zu können (Weissferdt et al. 2013; Bi et al. 2016; Uccella et al. 2018; Bohnenberger und Ströbel 2021). Deshalb basiert die diagnostische Trennung zurzeit vor allem auf der Korrelation von klinischen und radiologischen Befunden (Weissferdt et al. 2013; Ströbel et al. 2014; Marx et al. 2015; Bohnenberger et al. 2017; Uccella et al. 2018).

Um einen Beitrag zur Differentialdiagnostik dieser Tumoren zu leisten und weitere biologisch-funktionelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu finden, sowie allgemein das Wissen über thymische und pulmonale NETs zu erweitern, wurde in dieser Arbeit ein massenspektrometrisch-proteomischer Ansatz mit Einsatz eines Proteinquantifizierungsstandards (Super-SILAC Verfahren) gewählt.

In einer anderen Studie konnten histologisch nicht zu unterscheidende Plattenepithelkarzinome als Primärtumoren der Lunge von Lungenmetastasen vorangegangener Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches durch den Einsatz Super-SILAC-basierter quantitativer MS-Proteomik auf der Ebene ihrer Proteinexpression voneinander unterschieden werden (Bohnenberger et al. 2018).

## 5.1 Quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse durch Verwendung eines Proteinquantifizierungsstandards

Im Rahmen dieser Studie erfolgte eine quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge. Hierfür wurden Proteine aus FFPE-Gewebe dieser Tumoren isoliert und in gleicher Menge mit einem Proteinquantifizierungsstandard gemischt (Super-SILAC Verfahren). Der Proteinquantifizierungsstandard wurde durch Mischen gleicher Mengen von isolierten Proteinen aus SILAC-markierten (Lys + 8/Arg + 10) neuroendokrinen Tumorzelllinien hergestellt. Es wurde das oben beschriebene FASP-Protokoll durchgeführt und die resultierenden Peptide wurden vor der Durchführung der Massenspektrometrie fraktioniert. Durch die Aufteilung der initialen Peptidmenge einer Probe auf mehrere Fraktionen wird die Komplexität der gesamten Probe reduziert und es können in der massenspektrometrischen Analyse mehr Peptide und somit auch mehr Proteine identifiziert werden. Der Ablauf der Probenvorbereitung, Messung im Massenspektrometer und nachfolgender Datenauswertung entspricht dem Vorgehen in der Arbeit von Bohnenberger et al. (2018).

In der hier durchgeführten Studie konnten insgesamt 6600 Proteine in wenigstens einer Probe quantifiziert werden. Weiterhin wurden 1087 Proteine übergreifend in allen Proben des Kollektivs quantifiziert. Damit stellen die Ergebnisse dieser Studie eine umfangreiche proteomische Datendank der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge dar, die für weitere zukünftige Untersuchungen und Vergleiche mit anderen Tumorentitäten nutzbar sein wird.

Der für diese Studie spezifisch hergestellte und verwendete Proteinquantifizierungsstandard repräsentiert in adäquater Weise das Proteinexpressionsprofil der neuroendokrinen Tumoren von Thymus und Lunge, da bei der Testung des Standards mehr als 90 % der SILAC *ratios* in einem +/- fünffachem Bereich lagen (vergleiche unter 4.3.2 und Abbildung 7 und Abbildung 10). Damit ermöglicht der Standard eine genaue und vergleichbare quantitative massenspektrometrische Analyse der TNETs und PNETs. Die Daten suggerieren zudem, dass dieser Proteinquantifizierungsstandard auch für die proteomische Analyse weiterer neuroendokriner Tumoren (z. B. gastrointestinale NETs) geeignet ist, da der Standard neben den Proteinen zweier Lungen-NET-Zelllinien auch aus denen zweier Pankreas-NET-Zelllinien besteht und er gleichwohl sehr gut für die Analyse der Thymus-NETs geeignet ist. Die erzielten Ergebnisse einer proteomischen Analyse anderer Tumoren unter Verwendung desselben Proteinquantifizierungsstandards könnten direkt mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen und bewertet werden. Dies unterstreicht nochmals die Vielseitigkeit und besonderen Vorteile des Super-SILAC-Verfahrens.

Für die Zukunft erscheint es denkbar, dass spezifische Super-SILAC-Proteinquantifizierungsstandards für verschiedenste Anwendungen - ggf. zentral hergestellt und von dort verteilt - verfügbar sein werden, wodurch quantitative MS-proteomische Analysen einfachere und breitere Anwendungsmöglichkeiten haben könnten (Geiger et al.

2010). Da hierdurch die proteomische Analyse von FFPE-Gewebe möglich ist, können sehr große Probenkollektive auch seltener Tumorentitäten untersucht werden, da das entsprechende FFPE-Gewebe in den Archiven pathologischer Institute reichlich vorhanden ist. Genau wie in der hier durchgeführten Studie, könnten die FFPE-Gewebeproben seltener Tumoren in einem gemeinsamen internationalen Ansatz gesammelt werden, um ausreichend große und repräsentative Untersuchungskollektive zusammenzustellen.

Das Ziel dieser Technik muss es sein, ihr immenses Potenzial in der Erforschung des Proteoms von (Tumor-)Gewebe für den Einsatz in der Diagnostik verschiedener Krankheiten mit unmittelbarem Nutzen für die Patienten und ihre Behandlung auszuschöpfen.

## 5.2 Diagnostische Trennung von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge durch quantitative Massenspektrometrie

Besonders kompliziert wird die Unterscheidung zwischen TNETs und PNETs bei niedrig- bis mäßiggradig malignen Tumoren (TCs und ACs), die als große, schwer bis nicht zu resezierende Masse im Mediastinum oder mit metastatischen Läsionen vorliegen (Weissferdt et al. 2014). Die Karzinoide von Thymus und Lunge zeigen ein biologisch unterschiedliches Verhalten. Die Thymuskarzinoide sind aggressiver, metastasieren früher, sind häufiger mit endokriner Symptomatik assoziiert und weisen ein entsprechend signifikant schlechteres Überleben auf (Moran und Suster 2000b; Yao et al. 2008; Ahn et al. 2012; Weissferdt et al. 2013; de Laat et al. 2014).

Die hier durchgeführte quantitative MS-proteomische Analyse der TNETs und PNETs lieferte bezüglich der schwierigen Differentialdiagnostik dieser Tumoren vielversprechende Ergebnisse. Die explorative Datenanalyse (PCA und t-SNE Analyse) des Proteinexpressionsprofils der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge zeigte, dass es in den meisten Fällen möglich ist, die *low grade* Tumoren (TCs und ACs) beider Organe voneinander zu unterscheiden. Sie fielen in zwei sich allenfalls teilweise überlappende Cluster (siehe unter 4.6.1, Abbildung 11 und Abbildung 12). Daneben zeigte sich, dass die TNET-G3 (Dinter et al. 2019) bezüglich ihrer exprimierten Proteine sehr ähnlich zu den *low grade* TNETs sind. Obwohl diese Tumoren nach der WHO-Klassifikation noch als LCNEC und somit *high grade* Tumoren eingestuft werden, verhalten sie sich bezüglich ihrer exprimierten Proteine wie *low grade* TNETs.

Für die *high grade* Tumoren aus Thymus und Lunge konnte in der explorativen Datenanalyse kein klarer Unterschied gefunden werden. Sie fielen in der PCA und t-SNE Analyse in einen gemeinsamen Cluster, der getrennt war von den jeweiligen Clustern der *low grade* Thymustumoren und *low grade* Lungentumoren. Somit ließen sich die *high grade* Tumoren allerdings klar von den *low grade* Tumoren und TNET-G3 trennen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich für beide Organe jeweils die *low* und *high grade* Tumoren in ihrer Proteinexpression signifikant unterscheiden und dass sich die *low*

*grade* TNETs und PNETs ebenfalls unterscheiden, während dies für die *high grade* TNETs und PNETs nicht beobachtet werden konnte. Allerdings sind im Untersuchungskollektiv dieser Studie auch deutlich weniger *high grade* Tumoren als *low grade* Tumoren enthalten, was in erster Linie durch die Seltenheit der TNETs und speziell der *high grade* TNETs bedingt ist. Die TNET-G3 verhielten sich sehr ähnlich zu den *low grade* TNETs und entsprechend anders als die *high grade* TNETs, zu denen sie nach der WHO-Klassifikation hinzugezählt werden. Dies wird in Kapitel 5.4 ausführlich weiter erörtert.

Die hier erzielten Ergebnisse mit einer unterschiedlichen Proteinexpression zwischen *low grade* TNETs und PNETs, aber keinen signifikanten Unterschieden zwischen den *high grade* Tumoren beider Organe, stehen in Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Ströbel et al. (2014). Dort wurde ein großes Untersuchungskollektiv neuroendokriner Tumoren von Thymus und Lunge mittels *comparative genomic hybridization* untersucht. Dabei waren die genetischen Veränderungen für die *low grade* Tumoren signifikant unterschiedlich, für die *high grade* Tumoren jedoch nicht (Ströbel et al. 2014).

### 5.3 Überexpression von Proteinen des MCM-Komplexes in neuroendokrinen *high grade* Tumoren von Thymus und Lunge

In der differentiellen Proteinexpressionsanalyse der neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge (Absätze 4.7.1 bis 4.7.8) zeigten sich zahlreiche statistisch signifikant quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine in den beschriebenen durchgeführten Vergleichen, sodass sich eine Fülle an möglichen Biomarkerkandidaten ergeben hat, die in weiteren Studien genauer untersucht werden können. Die Proteine ALDH5A1 und PURA beispielsweise zeigten sich in mehreren Vergleichen in den *low grade* NETs aus Thymus und Lunge sowie in den TNET-G3 stärker exprimiert und in den *high grade* Tumoren schwächer exprimiert und könnten als mögliche Biomarker weiter analysiert werden.

Besonders auffällig war eine starke Expression von Proteinen des MCM-Komplexes (“*minichromosome maintenance*-Komplex“) in den *high grade* Tumoren von Thymus und Lunge. Die MCM-Proteine gehörten in mehreren Vergleichen der differentiellen Proteinexpression zwischen *low grade* Tumoren bzw. TNET-G3 und *high grade* TNETs und PNETs zu den quantitativ am stärksten signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen.

Die Proteine des MCM-Komplexes wurden 1984 in genetischen Analysen an *saccharomyces cerevisiae* entdeckt (Maine et al. 1984). Mitglieder des MCM-Komplexes wurden durch genetische und biochemische Analysen in allen Eukaryoten gefunden und beinhalten die Proteine MCM2 – 7, die als hexamerer Enzymkomplex den Kern der eukaryotischen replikativen Helikase bilden und somit essenziell für die DNA-Replikation sind (Tye 1999; Forsburg 2004; Li et al. 2015; Zhai et al. 2017; Seo und Kang 2018; Meagher et al. 2019).

Störungen der Funktion des MCM-Komplexes führen zu genomischer Instabilität und tragen zur Entstehung maligner Neoplasien bei (Shima et al. 2007; Bochman und Schwacha

2009; Nowinska et al. 2019). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die MCM-Proteine Marker für Zellproliferation und auch präkanzeröse Zellen sind und eine wichtige Rolle in der Tumordiagnostik und Tumorprognose spielen können (Williams et al. 1998; Freeman et al. 1999; Ramnath et al. 2001; Tan et al. 2001; Alison et al. 2002; Going et al. 2002; Rodins et al. 2002; Ishimi et al. 2003; Forsburg 2004; Giaginis et al. 2010; Hua et al. 2014; Juríková et al. 2016; Fortuna et al. 2017).

Die Proteine des MCM-Komplexes zeigten sich in der quantitativen massenspektrometrischen Analyse in den *high grade* TNETs und PNETs insgesamt sehr stark exprimiert und könnten daher ein zusätzliches Kriterium in der Trennung von *low* und *high grade* NETs darstellen. Es wäre interessant, die quantitative Proteinexpression des MCM-Komplexes in weiteren Tumorentitäten zu untersuchen, um ihre mögliche Rolle als diagnostische und prognostische Marker insbesondere für gering differenzierte, hoch proliferative maligne Tumoren weiter zu evaluieren. Als Ziel für die Zukunft sollte hier insbesondere untersucht werden, ob und inwiefern es auch ein therapeutischer Ansatz sein kann, eine Überexpression von Proteinen des MCM-Komplexes in malignen Neoplasien mit gezielten Wirkstoffen zu behandeln (Seo und Kang 2018; Garbati et al. 2020; Reed und Alexandrow 2020).

#### 5.4 Einteilung von neuroendokrinen Tumoren des Thymus

Eine grundsätzliche Beobachtung bei neuroendokrinen Neoplasien ist, dass sie sich unterschiedlich verhalten bezüglich anatomischer Lokalisation, assoziierten Risikofaktoren und zugrundeliegenden molekularen Mechanismen (Vollbrecht et al. 2015; Karpathakis et al. 2016; Vijayvergia et al. 2016; Fabbri et al. 2017; Nieser et al. 2017; Pelosi et al. 2017a; Scarpa et al. 2017; Simbolo et al. 2017). Es gibt daher keine offizielle einheitliche Einteilung für die neuroendokrinen Tumoren verschiedener Organsysteme, sondern jeweils eigene Klassifikationen, was mitunter zu Verwirrung führen kann. Ein internationales Expertengremium hat daher ein gemeinsames organübergreifendes Klassifikationssystem vorgeschlagen, in welchem ein entscheidender Aspekt die Trennung zwischen gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren (NETs) und gering differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (NECs) ist (Rindi et al. 2018). Diese dichotome morphologische Aufteilung wird von klinischen, epidemiologischen, histologischen, prognostischen und genetischen Faktoren unterstützt (Kımlıođlu Şahan et al. 2015; Vijayvergia et al. 2016; Ali et al. 2017; Simbolo et al. 2017; Woischke et al. 2017; Rindi et al. 2018). Dabei sollen die NETs auf Basis der Mitoseanzahl, Ki67-Index und dem Vorhandensein und Ausmaß von Nekrosen in die Grade G1, G2 und G3 unterschieden werden. Da die NECs immer hoch maligne sind, ist für diese kein Grading nötig (Rindi et al. 2018). Weiterhin wurde angemerkt, dass neuroendokrine Neoplasien verschiedener anatomischer Lokalisationen variabel in dieses Klassifikationssystem passen können (Rindi et al. 2018).

Während die thymischen und pulmonalen NETs aktuell nach den beschriebenen WHO-Kriterien (Ströbel et al. 2021) anhand von Morphologie, Anzahl der Mitosen pro zehn Ge-

sichtsfelder ( $\cong 2 \text{ mm}^2$ ) und dem Vorhandensein von Nekrosen in die vier Subtypen typisches Karzinoid (TC), atypisches Karzinoid (AC), großzelliges neuroendokrines Karzinom (LCNEC) und kleinzelliges Karzinom (SCC) unterteilt werden (Tabelle 1), erfolgt die Einteilung der gastroenteropankreatischen NETs (GEP-NETs) nach der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS)/WHO-Klassifikation. Diese verwendet Zellmorphologie, Mitosezahl und den Ki67-Index zur Unterteilung in die Subtypen NET-G1, NET-G2, NET-G3, sowie die groß- und kleinzelligen neuroendokrinen Karzinome (Nagtegaal et al. 2020). Die NET-G3 Tumoren zeichnen sich durch eine gut differenzierte Morphologie aus (karzinoid-ähnlich), während ihr Ki67-Index einen hohen Tumorgrad (G3) anzeigt (Basturk et al. 2015). Für die Einteilung der PNETs wurde im Vergleich zur WHO-Klassifikation eine alternative, aus den Parametern Morphologie, Mitosezahl, Ki67-Index und Ausmaß von Nekrosen bestehende, integrierte Klassifikation mit den Gruppen „Lu-NET G1 – 3“ vorgeschlagen (Pelosi et al. 2017b). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls eine alternative morphomolekulare Klassifikation der TNETs in „Thy-NET G1 – 3“ (siehe auch Tabelle 24) vorgeschlagen, indem die Zellmorphologie, die Mitosezahl, der Ki67-Index, ein *copy number instability* (CNI) Score und das immunhistochemische Färbeergebnis für Chromogranin und EZH2 bewertet werden (Dinter et al. 2019).

**Tabelle 24: Morphomolekulare Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Thymus.**

Dargestellt ist die morphomolekulare Einteilung der neuroendokrinen Tumoren des Thymus (TNETs) in die Gruppen Thy-NET G1 – 3 nach Zellmorphologie, Mitosezahl, Ki67-Index, CNI (*copy number instability*) Score und immunhistochemischem Färbeergebnis für Chromogranin (CGA) und EZH2. (NET: Neuroendokriner Tumor, TC: typisches Karzinoid, AC: atypisches Karzinoid, LCNEC: großzelliges neuroendokrines Karzinom, SCC: kleinzelliges Karzinom, IHC: Immunhistochemie) (nach Dinter et al. 2019)

Morphomolekulare Gruppe	Morphologie (WHO-Subtyp)	Mitosezahl pro 2 mm <sup>2</sup>	Ki67-Index	CNI Score	IHC
Thy-NET G1	Karzinoid (TC, AC, NET-G3)	< 10	< 9	< 9	CGA pos EZH2 neg
Thy-NET G2	Karzinoid oder Karzinom (TC, AC, NET-G3, LCNEC)	10 – 29	9 – 47	9 – 29	CGA pos EZH2 neg
Thy-NET G3	Karzinoid oder Karzinom (LCNEC, SCC)	≥ 30	≥ 48	≥ 30	CGA pos/neg EZH2 pos

In der Studie von Dinter et al. (2019) wurde des Weiteren eine neue Subgruppe intermediären Malignitätsgrades innerhalb der großzelligen neuroendokrinen Karzinome des Thymus identifiziert, welche in Anlehnung an die ENETS-Klassifikation der gastroenteropankreatischen NETs (Nagtegaal et al. 2020) als NET-G3 Tumoren des Thymus bzw. TNET-G3 bezeichnet wurde. Diese Tumoren zeigten eine Morphologie ähnlich den typischen und atypischen Karzinoide, eine geringere Mitosezahl und einen geringeren Ki67-Index als die hoch malignen „wahren“ LCNECs. Der spezifischste Unterschied zwischen den beiden

Gruppen war das immunhistochemische Färbeergebnis für Chromogranin und EZH2. Während die TNET-G3 positiv für Chromogranin und negativ für EZH2 waren, zeigten die „wahren“ LCNECs weitgehend ein gegenteiliges Ergebnis (Dinter et al. 2019; Bohnenberger und Ströbel 2021). In einer weiteren aktuellen immunhistochemischen Studie zu typischen und atypischen Karzinoiden des Thymus zeigte sich allerdings auch rund ein Drittel der untersuchten Proben positiv für EZH2 (Zaleski et al. 2021). Eine Überexpression von EZH2 ist in vielen Malignomen wie aggressiven pulmonalen und gastrointestinalen NETs mit einem schlechteren Überleben, erhöhter Zellproliferation und einer Überexpression des TP53-Proteins assoziiert (Bondgaard et al. 2012; Faviana et al. 2019; Bohnenberger und Ströbel 2021).

Die Tumorproben aus dieser Studie wurden aus dem gleichen Gesamtkollektiv ausgewählt, welches in der Studie von Dinter et al. (2019) genutzt wurde (siehe auch unter 3.1), sodass die dort beschriebenen TNET-G3 hier auch gesondert betrachtet wurden und nicht als LCNECs, wie sie es nach der WHO-Einteilung sind.

Die TNET-G3 fallen in der morphomolekularen Klassifikation von Dinter et al. (2019) in die Gruppen Thy-NET G1 – 2, während die „wahren“ LCNECs, zusammen mit den kleinzelligen Karzinomen, vorrangig in der Gruppe Thy-NET G3 liegen. Bei der Einteilung der TNETs nach der morphomolekularen Klassifikation sei es am wichtigsten, zwischen Thy-NET G1 – 2 und Thy-NET G3 zu unterscheiden (Dinter et al. 2019). Demnach ist es ebenso entscheidend, innerhalb der LCNECs nach der WHO-Klassifikation (Ströbel et al. 2021) die TNET-G3 und die „wahren“ LCNECs zu differenzieren, da sie in dieser morphomolekularen Klassifikation in verschiedene Gruppen fallen und eine unterschiedliche Prognose aufweisen (Dinter et al. 2019).

In den hier erhobenen MS-proteomischen Daten zeigten sich bezüglich des Proteinexpressionsprofils der TNETs in der explorativen Datenanalyse zwei Hauptgruppen. In der Hauptkomponentenanalyse (Abbildung 11) und der *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE) *analysis* (Abbildung 12) ist zu erkennen, dass die neuroendokrinen Thymustumoren in zwei Cluster fallen. Ein Cluster (jeweils violett hinterlegt in den Abbildungen) besteht aus den *low grade* Tumoren (TCs und ACs) sowie aus den TNET-G3. Der andere Cluster (jeweils gelb hinterlegt in den Abbildungen) besteht aus den *high grade* TNETs („wahre“ LCNECs und SCCs). Der erste Cluster spiegelt damit die Tumoren der gering- und intermediärgradigen Kategorien (Thy-NET G1 und Thy-NET G2) nach der morphomolekularen Klassifikation von Dinter et al. wider, während der Cluster mit den *high grade* Tumoren der Kategorie Thy-NET G3 entspricht. Damit konnte die quantitative massenspektrometrische Proteomik die beschriebene entscheidende Trennung zwischen Thy-NET G1 – 2 (*low* und *intermediate grade*) und Thy-NET G3 (*high grade*) aufweisen und innerhalb der LCNECs nach WHO die TNET G3 von den „wahren“ LCNECs trennen.

In der differentiellen Proteinexpressionsanalyse ergaben sich dazu passend statistisch signifikant quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine in den Vergleichen *low grade*



TNETs vs. *high grade* TNETs, TNET-G3 vs. *high grade* TNETs und gepoolte *low grade* TNETs und TNET-G3 vs. *high grade* TNETs. In allen hier durchgeführten Analysen verhielten sich die TNET-G3 wie *low grade* Tumoren (TCs und ACs), was verdeutlicht, dass sie nach aktueller Klassifikation als LCNECs und somit *high grade* Tumoren, hinsichtlich ihres biologischen Verhaltens nicht korrekt eingruppiert werden.

Neuroendokrine Tumoren des Thymus, die bisher als TC oder AC klassifiziert werden, sowie auch die neu definierte Subgruppe der TNET-G3 sind vermutlich keine wirklichen eigenen Entitäten, sondern eher ein Spektrum von Tumoren, welche in die gering- und intermediärgradigen molekularen Kategorien bzw. in den MS-proteomischen „*low grade* Cluster“ fallen und hier auch eine Progression zeigen können (Dinter et al. 2019; Bohnenberger und Ströbel 2021). Daneben gibt es die Tumoren, welche in die *high grade* Kategorie gehören, also die „wahren“ LCNECs und SCCs nach der WHO-Klassifikation. Diese Aufteilung in zwei wesentliche Hauptgruppen von TNETs bezüglich Malignitätsgrad und Prognose, welche auf Basis molekularer Daten bereits beschrieben wurde (Dinter et al. 2019; Bohnenberger und Ströbel 2021), wurde durch die quantitativen massenspektrometrisch-proteomischen Analysen deutlich bestärkt.

Auch für die PNETs zeigte sich in der proteomischen Analyse eine Aufteilung in einen *low grade* Cluster (TCs und ACs) und einen *high grade* Cluster. Von den *high grade* PNETs lagen keine im *low grade* PNET Cluster. Im Untersuchungskollektiv dieser Studie sind unter den pulmonalen NETs demnach keine Pendanten zu den TNET-G3 enthalten. Unter den *high grade* PNETs sind die LCNECs eine heterogene Gruppe von Tumoren. Etwa 40 % sind SCLC-artige LCNECs, 50 % NSCLC-artige (nicht kleinzelliges Lungenkarzinom) LCNECs und etwa 5 % karzinoid-artige LCNECs auf der Basis verschiedener Gruppen alterierter Gene (Rekhtman et al. 2016). Diese karzinoid-artigen LCNECs sind ein Hinweis darauf, dass auch in den Lungen-NETs eine Subgruppe von „PNET-G3“ existiert. Weitere Studien bestärken die Einschätzung einer solchen korrespondierend zu den TNET-G3 existierenden Subgruppe pulmonaler NETs, jedoch bedarf es hier noch weiterführender Untersuchungen (Quinn et al. 2017; Alcalá et al. 2019).

Die pulmonalen TCs und ACs zusammengenommen werden pragmatisch auch als gut differenzierte und die LCNECs und SCLCs als gering differenzierte NETs vergleichbar zu den gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Karzinomen (NECs) eingeordnet (Klimstra et al. 2010a; Klimstra et al. 2010b; Caplin et al. 2015; Klimstra et al. 2015; Klimstra 2016). Diese Dichotomie der morphologischen Klassifikation ist passend zur derzeitigen Auffassung, dass die TCs und ACs sich molekular von den LCNECs und SCLCs unterscheiden (Fernandez-Cuesta et al. 2014; George et al. 2015; Travis et al. 2015b; Fernandez-Cuesta und McKay 2016; Rekhtman et al. 2016; Miyoshi et al. 2017; Pelosi et al. 2017a). Die Ergebnisse der quantitativen massenspektrometrisch-proteomischen Analyse unterstützen diese Aufteilung in zwei wesentliche Hauptgruppen von neuroendokrinen Lungentumoren bezüglich des biologischen Verhaltens.

Sowohl für die TNETs als auch für die PNETs konnte damit die im gemeinsamen Klassifikationssystem von Rindi et al. beschriebene Dichotomie neuroendokriner Neoplasien (Rindi et al. 2018) in gut differenzierte NETs und gering differenzierte NECs auch auf Ebene der Proteinexpression gezeigt werden.

Während eine Expression von Chromogranin A in *high grade* NETs häufig reduziert ist oder gar fehlt, bleibt die Expression von beispielsweise Synaptophysin meist erhalten (Travis 2010; Caplin et al. 2015; Travis et al. 2015b; Pelosi et al. 2017a; Thunnissen et al. 2017; Uccella et al. 2018). Bei zuvor gestellter Diagnose eines NETs spricht ein negatives immunhistochemisches Färbeargebnis für Chromogranin A damit eher für einen *high grade* NET. Neben Chromogranin A existiert unter anderem auch Chromogranin B. In pankreatischen neuroendokrinen Tumoren wurde der diagnostische Nutzen von Chromogranin B im Vergleich zu Chromogranin A untersucht, mit dem Ergebnis, dass beide Marker im Wesentlichen gleichwertig waren (Miki et al. 2017). Beide Marker weisen demnach grundsätzlich einen Wert für die Diagnostik neuroendokriner Tumoren auf (Lloyd und Wilson 1983; Taupenot et al. 2003; Uccella et al. 2018).

In den MS-proteomischen Analysen zeigte sich bezüglich Chromogranin A und B in verschiedenen Vergleichen eine differentielle Expression zwischen *low* und *high grade* NETs von Thymus und Lunge. Chromogranin B war hier in den Vergleichen *low grade* TNETs vs. *high grade* TNETs, TNET-G3 vs. *high grade* TNETs und gepoolte *low grade* TNETs und TNET-G3 vs. *high grade* Tumoren in den *low grade* Tumoren und TNET-G3 stärker exprimiert, aber nicht als eines der am stärksten quantitativ signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine, weshalb es in den entsprechenden Abbildungen und Tabellen nicht explizit aufgeführt wurde. Für Chromogranin A ergab sich im Vergleich *low grade* PNETs vs. *high grade* PNETs eine stärkere Expression in den *low grade* Tumoren. Im Vergleich gepoolte *low grade* NETs und TNET-G3 vs. gepoolte *high grade* NETs unabhängig vom Ursprungsorgan waren sowohl Chromogranin A als auch Chromogranin B in den *low grade* Tumoren und TNET-G3 stärker exprimiert.

Die quantitative Massenspektrometrie konnte damit die zumeist erhaltene Expression von Chromograninen in *low grade* NETs gegenüber einem häufiger auftretenden Verlust in *high grade* NETs untermauern und unterstützt damit einen Einsatz der Expression von Chromogranin A und B bzw. des immunhistochemischen Färbeargebnisses im Rahmen der diagnostischen Einteilung von neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge.

Als zuverlässigster einzelner immunhistochemischer Marker, um das klinische Verhalten neuroendokriner Tumoren zu beurteilen, wurde das Ki67-Antigen beschrieben, gerade wenn nur wenig diagnostisches Material zur Verfügung steht (Pelosi et al. 2005; Pelosi et al. 2014; Pelosi et al. 2017a). Verschiedene Studien haben die Ki67-Expression in den PNETs untersucht und Vorschläge gemacht, wie diese in eine Klassifikation integriert werden kann, aber es gibt keinen Konsens über einen optimalen Ansatz (Pelosi et al. 2014; Rindi et al. 2014; van Velthuysen et al. 2014; Caplin et al. 2015; Pelosi et al. 2017a; Pelosi et al.

2017b; Rindi et al. 2018). Andere Studien haben für Ki67 einen begrenzten Zusatzwert gegenüber histologischen Kriterien und besonders der Mitoseanzahl beschrieben (Walts et al. 2012; Swarts et al. 2017). Für die gastroenteropankreatischen NETs wird der Ki67-Index bereits für die diagnostische Einteilung verwendet (Nagtegaal et al. 2020). Eine Fortführung der Diskussion über einen zukünftigen Einbezug in die diagnostischen Kriterien für die TNETs und PNETs, wie in den beschriebenen integrierten Klassifikationen Thy-NET G1 – 3 und Lu-NET G1 – 3, erscheint daher sinnvoll (Pelosi et al. 2017a; Pelosi et al. 2017b; Dinter et al. 2019).

Die bisherige WHO-Klassifikation (Marx et al. 2015) wurde der Biologie dieser Tumoren nicht ausreichend gerecht, vor allem hinsichtlich der Tumoren der Kategorie TNET-G3. Auch wenn die Mitoserate ein wichtiger Faktor zur Unterteilung und Prognoseabschätzung der TNETs ist (Ströbel et al. 2014), sind die aktuellen Schwellenwerte der Mitosezahlen zur Einteilung der TNETs unzureichend, um das komplette Spektrum dieser Tumoren abzubilden (Bohnenberger und Ströbel 2021). In der kürzlich erschienenen neuen Version von 2021 wurde die grundsätzliche Einteilung in die vier Subtypen nach den bekannten Kriterien beibehalten. Die Subgruppe der TNET-G3 wurde zwar beschrieben, jedoch werden diese Tumoren vorerst weiter als LCNECs klassifiziert (Ströbel et al. 2021). Eine integrierte Klassifikation der TNETs mit jeweils individueller Bewertung multipler Parameter wie Morphologie, Mitosen, Nekrosen und Immunhistochemie (Ki67, Chromogranin, EZH2 und ggf. MCM-Proteine) ist möglicherweise besser geeignet, um die TNETs ihrem biologischen Verhalten nach korrekt in *low* bis *intermediate grade* Tumoren und *high grade* Tumoren einzuteilen. Dabei wäre es entscheidend, die TNET-G3 in die *low* bis *intermediate grade* Gruppe einzuordnen, da diese Subgruppe einen anderen Verlauf zeigt als die „wahren“ LCNECs. Angesichts der vielen Ähnlichkeiten der TNETs mit neuroendokrinen Tumoren anderer Organe, hätte diese Unterscheidung zwischen TNET-G3 und LCNECs vermutlich auch therapeutische Konsequenzen. Klinisch wurde beobachtet, dass gastrointestinale NET-G3 nur ein begrenztes Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie zeigen, welche zur Behandlung von neuroendokrinen Karzinomen eingesetzt wird (Rinke und Gress 2017; Bohnenberger und Ströbel 2021).

Für die Zukunft sind weitere experimentelle und klinische Studien der neuroendokrinen Tumoren des Thymus erforderlich, um diese seltenen Neoplasien besser verstehen, diagnostizieren und korrekt klassifizieren und letztlich bestmöglich behandeln zu können. Hierzu werden gemeinsame internationale Ansätze nötig sein, um ausreichend große Untersuchungskollektive zusammenstellen bzw. die bestehenden Kollektive erweitern zu können. Die Ergebnisse der quantitativen massenspektrometrisch-proteomischen Analyse dieser Studie bieten gute Ansätze zur Generierung weiterer Hypothesen und genauerer Untersuchung unterschiedlich exprimierter Proteine als diagnostische, prognostische oder prädiktive Biomarker.

## 6 Zusammenfassung

Neuroendokrine Tumoren des Thymus sind sehr seltene Neoplasien. Als nächstverwandte Tumorgruppe gelten die neuroendokrinen Tumoren der Lunge. Beide werden nach den gleichen Kriterien in die vier Subtypen typisches Karzinoid, atypisches Karzinoid, großzelliges neuroendokrines Karzinom und kleinzelliges (Lungen-)Karzinom eingeteilt. Gleichwohl bestehen zwischen den Tumorgruppen auch einige Unterschiede, beispielsweise die relative Häufigkeit der Subgruppen, die Geschlechterverteilung und die biologische Aggressivität. Die neuroendokrinen Thymustumoren haben vor allem bei den Karzinoiden eine schlechtere Prognose. Um das bislang vergleichsweise geringe Wissen über diese seltenen Tumoren zu erweitern, wurde in dieser Arbeit eine quantitative massenspektrometrisch-proteomische Analyse durchgeführt. Der hierzu spezifisch hergestellte Proteinquantifizierungsstandard ermöglicht zum einen eine zukünftige Analyse von weiteren neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge und zum anderen suggerieren die erhobenen Daten, dass er auch für die Analyse anderer neuroendokriner Tumorentitäten geeignet ist.

Mit diesem Ansatz konnten tausende Proteine quantifiziert werden, sodass eine umfangreiche proteomische Datenbank von neuroendokrinen Tumoren allgemein und speziell des Thymus und der Lunge geschaffen wurde. Außerdem zeigten sich zahlreiche signifikant quantitativ deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine in verschiedenen Vergleichen der jeweiligen Tumorsubgruppen, welche als Biomarkerkandidaten zur teilweise schwierigen diagnostischen Trennung zwischen neuroendokrinen Tumoren des Thymus und der Lunge weiter untersucht werden können. Auffällig war hier eine starke Expression der Proteine des MCM-Komplexes in den *high grade* Tumoren von Thymus und Lunge.

In der explorativen Datenanalyse zeigte sich, dass sich die Karzinoide (*low* und *intermediate grade* Tumoren) beider Organe voneinander unterscheiden, während dies für die groß- und kleinzelligen Karzinome nicht der Fall war. Weiterhin zeigte sich, dass sich die zuvor beschriebene Subgruppe der TNET-G3 wie die Karzinoide verhält und sich klar von den anderen großzelligen Karzinomen unterscheidet. Diese Umstände sollten für zukünftige Einteilungen der neuroendokrinen Tumoren des Thymus berücksichtigt werden, damit die betroffenen Patienten dem biologischen Verhalten der Tumoren nach diagnostisch korrekt eingeteilt und entsprechend optimal behandelt werden können.

Die aktuelle WHO-Klassifikation, welche für die neuroendokrinen Lungentumoren erstellt und für die Thymustumoren übernommen wurde, erscheint in dieser Hinsicht verbesserungswürdig. Eine Diskussion um eine Erweiterung der bisherigen Kriterien, welche die Zellmorphologie, Mitosezahl und das Auftreten von Nekrosen bewerten, um weitere Parameter wie immunhistochemische Färbegergebnisse (Chromogranin, EZH2, Ki67-Index, MCM-Proteine), erscheint unter Berücksichtigung der hier erzielten Ergebnisse angebracht und nötig, insbesondere um die Subgruppe der TNET-G3 korrekt zu klassifizieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aebersold R, Mann M. <https://www-1.nature-1.com-1e5jmg56p3e82.han.sub.uni-goettingen.de/articles/nature01511>; Zugriff am 26.01.2018
- Agaimy A, Erlenbach-Wünsch K, Konukiewitz B, Schmitt AM, Rieker RJ, Vieth M, Kiesewetter F, Hartmann A, Zamboni G, Perren A et al. (2013): ISL1 expression is not restricted to pancreatic well-differentiated neuroendocrine neoplasms, but is also commonly found in well and poorly differentiated neuroendocrine neoplasms of extrapancreatic origin. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* **26**, 995–1003
- Ahn S, Lee JJ, Ha SY, Sung CO, Kim J, Han J (2012): Clinicopathological Analysis of 21 Thymic Neuroendocrine Tumors. *Korean J Pathol* **46**, 221–225
- Alcala N, Leblay N, Gabriel A a. G, Mangiante L, Hervas D, Giffon T, Sertier AS, Ferrari A, Derks J, Ghantous A et al. (2019): Integrative and comparative genomic analyses identify clinically relevant pulmonary carcinoid groups and unveil the supra-carcinoids. *Nat Commun* **10**, 3407
- Ali AS, Grönberg M, Federspiel B, Scoazec JY, Hjortland GO, Grønbaek H, Ladekarl M, Langer SW, Welin S, Vestermark LW et al. (2017): Expression of p53 protein in high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinoma. *PLOS ONE* **12**, e0187667
- Alison MR, Hunt T, Forbes SJ (2002): Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. *Gut* **50**, 290–291
- Basturk O, Yang Z, Tang LH, Hruban RH, Adsay NV, McCall CM, Krasinskas AM, Jang K-T, Frankel WL, Balci S et al. (2015): The high grade (WHO G3) pancreatic neuroendocrine tumor category is morphologically and biologically heterogeneous and includes both well differentiated and poorly differentiated neoplasms. *Am J Surg Pathol* **39**, 683–690
- Bi Y, Deng Y, Li S, Zhou X, Chen Y, Ma D, Mao X, Guan Y, Chen J, Meng Y (2016): Immunophenotypic and prognostic analysis of PAX8 and TTF-1 expressions in neuroendocrine carcinomas of thymic origin: A comparative study with their pulmonary counterparts. *J Surg Oncol* **114**, 697–702
- Bochman ML, Schwacha A (2009): The Mcm Complex: Unwinding the Mechanism of a Replicative Helicase. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **73**, 652–683
- Bohnenberger H, Ströbel P (2021): Recent advances and conceptual changes in the classification of neuroendocrine tumors of the thymus. *Virchows Arch Int J Pathol* **478**, 129–135
- Bohnenberger H, Ströbel P, Mohr S, Corso J, Berg T, Urlaub H, Lenz C, Serve H, Oellerich T (2015): Quantitative Mass Spectrometric Profiling of Cancer-cell Proteomes Derived From Liquid and Solid Tumors. *J Vis Exp*, e52435–e52435
- Bohnenberger H, Dinter H, König A, Ströbel P (2017): Neuroendocrine tumors of the thymus and mediastinum. *J Thorac Dis* **2**, 1448-1457
- Bohnenberger H, Kaderali L, Ströbel P, Yepes D, Plessmann U, Dharia NV, Yao S, Heydt C, Merkelbach-Bruse S, Emmert A et al. (2018): Comparative proteomics reveals a diagnostic signature for pulmonary head-and-neck cancer metastasis. *EMBO Mol Med* **10**, e8428

- Bondgaard A-LRØ, Poulsen TT, Poulsen HS, Skov BG (2012): Different expression of EZH2, BMI1 and Ki67 in low and high grade neuroendocrine tumors of the lung. *Cancer Biomark* 11, 123–128
- Brcic L, Heidinger M, Popper H (2016): Neuroendokrine Neoplasien des Mediastinums. *Pathol* 37, 434–440
- Caplin ME, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, Oberg K, Pelosi G, Perren A, Rossi RE et al. (2015): Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 26, 1604–1620
- Cardillo G, Treggiari S, Paul MA, Carleo F, De Massimi AR, Remotti D, Graziano P, Martelli M (2010): Primary neuroendocrine tumours of the thymus: a clinicopathologic and prognostic study in 19 patients. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg* 37, 814–818
- Cardillo G, Rea F, Lucchi M, Paul MA, Margaritora S, Carleo F, Marulli G, Mussi A, Granone P, Graziano P (2012): Primary neuroendocrine tumors of the thymus: a multicenter experience of 35 patients. *Ann Thorac Surg* 94, 241–245
- Chetty R, Batitang S, Govender D (1997): Large cell neuroendocrine carcinoma of the thymus. *Histopathology* 31, 274–276
- Chi Y, Gao S, Du F, Wang JW, Jiang W-C, Sun YK, Song Y, He J (2016): Diagnosis, treatment, and prognosis of bronchopulmonary carcinoid: an analysis of 74 patients. *Anticancer Drugs* 27, 54–59
- Chong CR, Wirth LJ, Nishino M, Chen AB, Sholl LM, Kulke MH, McNamee CJ, Jänne PA, Johnson BE (2014): Chemotherapy for locally advanced and metastatic pulmonary carcinoid tumors. *Lung Cancer Amst Neth* 86, 241–246
- Christakis I, Qiu W, Silva Figueroa AM, Hyde S, Cote GJ, Busaidy NL, Williams M, Grubbs E, Lee JE, Perrier ND (2016): Clinical Features, Treatments, and Outcomes of Patients with Thymic Carcinoids and Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Syndrome at MD Anderson Cancer Center. *Horm Cancer* 7, 279–287
- Colaco RJ, Decker RH (2015): Stereotactic radiotherapy in the treatment of primary bronchial carcinoid tumor. *Clin Lung Cancer* 16, e11-14
- Corsini EM, Mitchell KG, Sceusi EL, Mehran RJ, Rice DC, Sepesi B, Walsh GL, Swisher SG, Roth JA, Vaporciyan AA et al. (2019): Multidisciplinary treatment of thymic neuroendocrine tumors: surgery remains a key component. *J Thorac Dis* 11, 3391–3398
- 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, Matic I, Hilger M, Nagaraj N, Selbach M, Olsen JV, Mann M (2009): A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc* 4, 698–705
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M (2011): Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res* 10, 1794–1805

- Crona J, Björklund P, Welin S, Kozlovacki G, Oberg K, Granberg D (2013): Treatment, prognostic markers and survival in thymic neuroendocrine tumours. a study from a single tertiary referral centre. *Lung Cancer Amst Neth* 79, 289–293
- de Laat JM, Pieterman CR, van den Broek MF, Twisk JW, Hermus AR, Dekkers OM, de Herder WW, van der Horst-Schrivers AN, Drent ML, Bisschop PH et al. (2014): Natural course and survival of neuroendocrine tumors of thymus and lung in MEN1 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 99, 3325–3333
- Deeb SJ, D'Souza RCJ, Cox J, Schmidt-Supprian M, Mann M (2012): Super-SILAC Allows Classification of Diffuse Large B-cell Lymphoma Subtypes by Their Protein Expression Profiles. *Mol Cell Proteomics MCP* 11, 77–89
- Detterbeck FC (2010): Management of carcinoid tumors. *Ann Thorac Surg* 89, 998–1005
- Dham A, Truskinovsky AM, Dudek AZ (2008): Thymic Carcinoid Responds to Neoadjuvant Therapy with Sunitinib and Octreotide: A Case Report. *J Thorac Oncol* 3, 94–97
- Dinter H, Bohnenberger H, Beck J, Bornemann-Kolatzki K, Schütz E, Küffer S, Klein L, Franks TJ, Roden A, Emmert A et al. (2019): Molecular Classification of Neuroendocrine Tumors of the Thymus. *J Thorac Oncol* 14, 1472–1483
- Dutta R, Kumar A, Julka PK, Mathur SR, Kaushal S, Kumar R, Jindal T, Suri V (2010): Thymic neuroendocrine tumour (carcinoid): clinicopathological features of four patients with different presentation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 11, 732–736
- 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
- Fabbri A, Cossa M, Sonzogni A, Bidoli P, Canova S, Cortinovis D, Abbate MI, Calabrese F, Nannini N, Lunardi F et al. (2017): Thymus neuroendocrine tumors with CTNNB1 gene mutations, disarrayed  $\beta$ -catenin expression, and dual intra-tumor Ki-67 labeling index compartmentalization challenge the concept of secondary high-grade neuroendocrine tumor: a paradigm shift. *Virchows Arch Int J Pathol* 471, 31–47
- Faviana P, Marconcini R, Ricci S, Galli L, Lippolis P, Farci F, Castagna M, Boldrini L (2019): EZH2 Expression in Intestinal Neuroendocrine Tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* 27, 689–693
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71
- Fernandez-Cuesta L, McKay JD (2016): Genomic architecture of lung cancers. *Curr Opin Oncol* 28, 52–57
- Fernandez-Cuesta L, Peifer M, Lu X, Sun R, Ozretić L, Seidal D, Zander T, Leenders F, George J, Müller C et al. (2014): Frequent mutations in chromatin-remodeling genes in pulmonary carcinoids. *Nat Commun* 5, 3518
- Ferolla P (2015): Medical Therapy of Pulmonary Neuroendocrine Neoplasms: Targeted, Symptomatic and Chemotherapy. *Front Horm Res* 44, 193–197
- Ferolla P, Falchetti A, Filosso P, Tomassetti P, Tamburrano G, Avenia N, Daddi G, Puma F, Ribacchi R, Santeusano F et al. (2005): Thymic Neuroendocrine Carcinoma (Carcinoid) in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Syndrome: The Italian Series. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2603–2609

- Filosso PL, Yao X, Ahmad U, Zhan Y, Huang J, Ruffini E, Travis W, Lucchi M, Rimner A, Antonicelli A et al. (2015): Outcome of primary neuroendocrine tumors of the thymus: A joint analysis of the International Thymic Malignancy Interest Group and the European Society of Thoracic Surgeons databases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 149, 103-109.e2
- Fink G, Krelbaum T, Yellin A, Bendayan D, Saute M, Glazer M, Kramer MR (2001): Pulmonary carcinoid: presentation, diagnosis, and outcome in 142 cases in Israel and review of 640 cases from the literature. *Chest* 119, 1647–1651
- Forsburg SL (2004): Eukaryotic MCM Proteins: Beyond Replication Initiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 109–131
- Fortuna D, Boman B, O’Neill R, Palazzo J (2017): MCM2 expression in serrated polyps demonstrates aberrant cellular proliferation. *Hum Pathol* 63, 177–183
- 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
- Garbati P, Barbieri R, Cangelosi D, Zanon C, Costa D, Eva A, Thellung S, Calderoni M, Baldini F, Tonini GP et al. (2020): MCM2 and Carbonic Anhydrase 9 Are Novel Potential Targets for Neuroblastoma Pharmacological Treatment. *Biomedicines* 8, 471
- Gaur P, Leary C, Yao JC (2010): Thymic Neuroendocrine Tumors: A SEER Database Analysis of 160 Patients. *Ann Surg* 251, 1117–1121
- 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
- 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
- George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, Leenders F, Lu X, Fernández-Cuesta L, Bosco G et al. (2015): Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 524, 47–53
- 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
- Gibril F, Chen YJ, Schrupp DS, Vortmeyer A, Zhuang Z, Lubensky IA, Reynolds JC, Louie A, Entsuh LK, Huang K et al. (2003): Prospective Study of Thymic Carcinoids in Patients with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1066–1081
- Going JJ, Keith WN, Neilson L, Stoeber K, Stuart RC, Williams GH (2002): Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett’s mucosa. *Gut* 50, 373–377
- Goudet P, Murat A, Cardot-Bauters C, Emy P, Baudin E, Choplin H du B, Chapuis Y, Kraimps J-L, Sadoul JL, Tabarin A et al. (2009): Thymic Neuroendocrine Tumors in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: A Comparative Study on 21 Cases Among a Series of 761 MEN1 from the GTE (Groupe des Tumeurs Endocrines). *World J Surg* 33, 1197–1207
- Goudet P, Dalac A, Le Bras M, Cardot-Bauters C, Niccoli P, Lévy-Bohbot N, du Boullay H, Bertagna X, Ruszniewski P, Borson-Chazot F et al. (2015): MEN1 disease occurring before 21 years old: a 160-patient cohort study from the Groupe d’étude des Tumeurs Endocrines. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 1568–1577



- Graham RP, Shrestha B, Caron BL, Smyrk TC, Grogg KL, Lloyd RV, Zhang L (2013): Islet-1 is a sensitive but not entirely specific marker for pancreatic neuroendocrine neoplasms and their metastases. *Am J Surg Pathol* 37, 399–405
- Gridelli C, Rossi A, Airoma G, Bianco R, Costanzo R, Daniele B, Chiara GD, Grimaldi G, Irtelli L, Maione P et al. (2013): Treatment of pulmonary neuroendocrine tumours: state of the art and future developments. *Cancer Treat Rev* 39, 466–472
- Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM (2008): Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer* 113, 5–21
- Hua C, Zhao G, Li Y, Bie L (2014): Minichromosome Maintenance (MCM) Family as potential diagnostic and prognostic tumor markers for human gliomas. *BMC Cancer* 14, 526
- Huang Y, Yang Xiaodong, Lu T, Li M, Zhao M, Yang Xingyu, Ma K, Wang S, Zhan C, Liu Y, Wang Q (2018): Assessment of the prognostic factors in patients with pulmonary carcinoid tumor: a population-based study. *Cancer Med* 7, 2434–2441
- Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon HJ, Kimura H, Yamada K, Song SY (2003): Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem* 270, 1089–1101
- Juríková M, Danihel I, Polák Š, Varga I (2016): Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochem* 118, 544–552
- Karpathakis A, Dibra H, Pipinikas C, Feber A, Morris T, Francis J, Oukrif D, Mandair D, Pericleous M, Mohmaduvesh M et al. (2016): Prognostic Impact of Novel Molecular Subtypes of Small Intestinal Neuroendocrine Tumor. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 22, 250–258
- Kımlıoğlu Şahan E, Erdoğan N, Ulusoy İ, Samet E, Akyıldız İğdem A, Gönüllü D (2015): P53, Ki-67, CD117 expression in gastrointestinal and pancreatic neuroendocrine tumours and evaluation of their correlation with clinicopathological and prognostic parameters. *Turk J Gastroenterol Off J Turk Soc Gastroenterol* 26, 104–111
- Klimstra DS (2016): Pathologic Classification of Neuroendocrine Neoplasms. *Hematol Oncol Clin North Am* 30, 1–19
- Klimstra DS, Modlin IR, Adsay NV, Chetty R, Deshpande V, Gönen M, Jensen RT, Kidd M, Kulke MH, Lloyd RV et al. (2010a): Pathology reporting of neuroendocrine tumors: application of the Delphic consensus process to the development of a minimum pathology data set. *Am J Surg Pathol* 34, 300–313
- Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S (2010b): The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 39, 707–712
- Klimstra DS, Beltran H, Lilenbaum R, Bergsland E (2015): The spectrum of neuroendocrine tumors: histologic classification, unique features and areas of overlap. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Meet*, 92–103
- 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
- Koo J, Mertens RB, Mirocha JM, Wang HL, Dhall D (2012): Value of Islet 1 and PAX8 in identifying metastatic neuroendocrine tumors of pancreatic origin. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 25, 893–901

- Kulke MH, Lenz HJ, Meropol NJ, Posey J, Ryan DP, Picus J, Bergsland E, Stuart K, Tye L, Huang X et al. (2008): Activity of Sunitinib in Patients With Advanced Neuroendocrine Tumors. *J Clin Oncol* 26, 3403–3410
- Lauriola L, Erlandson RA, Rosai J (1998): Neuroendocrine differentiation is a common feature of thymic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 22, 1059–1066
- Li N, Zhai Y, Zhang Y, Li W, Yang M, Lei J, Tye BK, Gao N (2015): Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature* 524, 186–191
- Limper AH, Carpenter PC, Scheithauer B, Staats BA (1992): The Cushing syndrome induced by bronchial carcinoid tumors. *Ann Intern Med* 117, 209–214
- Lloyd RV, Wilson BS (1983): Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Science* 222, 628–630
- Maine GT, Sinha P, Tye B-K (1984): Mutants of *S. Cerevisiae* Defective in the Maintenance of Minichromosomes. *Genetics* 106, 365–385
- Marchevsky AM, Walts AE (2015): Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia (DIPNECH). *Semin Diagn Pathol* 32, 438–444
- Marchevsky AM, Wirtschafter E, Walts AE (2015): The spectrum of changes in adults with multifocal pulmonary neuroendocrine proliferations: what is the minimum set of pathologic criteria to diagnose DIPNECH? *Hum Pathol* 46, 176–181
- Marx A, Chan JKC, Coindre JM, 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
- Matthiesen R, Bunkenborg J: Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. In: Matthiesen R (Hrsg.): *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, Totowa, NJ 2013, 1–45
- Meagher M, Epling LB, Enemark EJ (2019): DNA translocation mechanism of the MCM complex and implications for replication initiation. *Nat Commun* 10, 3117
- Miki M, Ito T, Hijioka M, Lee L, Yasunaga K, Ueda K, Fujiyama T, Tachibana Y, Kawabe K, Jensen RT et al. (2017): Utility of chromogranin B compared with chromogranin A as a biomarker in Japanese patients with pancreatic neuroendocrine tumors. *Jpn J Clin Oncol* 47, 520–528
- Miyoshi T, Umemura S, Matsumura Y, Mimaki S, Tada S, Makinoshima H, Ishii G, Udagawa H, Matsumoto S, Yoh K et al. (2017): Genomic Profiling of Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 23, 757–765
- Modlin IM, Lye KD, Kidd M (2003): A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 97, 934–959
- Montpréville VT de, Macchiarini P, Dulmet E (1996): Thymic neuroendocrine carcinoma (carcinoid): A clinicopathologic study of fourteen cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111, 134–141
- Moran CA., Suster S (2000a): Thymic Neuroendocrine Carcinomas With Combined Features Ranging From Well-Differentiated (Carcinoid) to Small Cell Carcinoma: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 11 Cases. *Am J Clin Pathol* 113, 345–350

- Moran CA., Suster S (2000b): Neuroendocrine Carcinomas (Carcinoid Tumor) of the Thymus: A Clinicopathologic Analysis of 80 Cases. *Am J Clin Pathol* **114**, 100–110
- Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, Washington KM, Carneiro F, Cree IA (2020): The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* **76**, 182–188
- Neubert TA, Tempst P (2010): Super-SILAC for tumors and tissues. *Nat Methods* **7**, 361
- Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, Falk R, Travis WD (2002): Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol* **26**, 1184–1197
- Nieser M, Henopp T, Brix J, Stoß L, Sitek B, Naboulsi W, Anlauf M, Schlitter AM, Klöppel G, Gress T et al. (2017): Loss of Chromosome 18 in Neuroendocrine Tumors of the Small Intestine: The Enigma Remains. *Neuroendocrinology* **104**, 302–312
- Nowinska K, Ciesielska U, Piotrowska A, Jablonska K, Partynska A, Paprocka M, Zatonski T, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P (2019): MCM5 Expression Is Associated With the Grade of Malignancy and Ki-67 Antigen in LSCC. *Anticancer Res* **39**, 2325–2335
- Nussbaum DP, Speicher PJ, Gulack BC, Hartwig MG, Onaitis MW, D'Amico TA, Berry MF (2015): Defining the role of adjuvant chemotherapy after lobectomy for typical bronchopulmonary carcinoid tumors. *Ann Thorac Surg* **99**, 428–434
- Öberg K, Hellman P, Ferolla P, Papotti M (2012): Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **23**, 120–123
- Okabe N, Inoue T, Watanabe Y, Muto S, Hasegawa T, Ohsugi J, Higuchi M, Shio Y, Suzuki H (2014): Two cases of thymic carcinoid treated with octreotide long-acting repeatable. *Gan To Kagaku Ryoho* **41**, 879–883
- Oliveira AM, Tazelaar HD, Myers JL, Erickson LA, Lloyd RV (2001): Thyroid transcription factor-1 distinguishes metastatic pulmonary from well-differentiated neuroendocrine tumors of other sites. *Am J Surg Pathol* **25**, 815–819
- 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
- Pan CC, Jong YJ, Chen YJ (2005): Comparative genomic hybridization analysis of thymic neuroendocrine tumors. *Mod Pathol* **18**, 358–364
- Pelosi G, Masullo M, Leon ME, Veronesi G, Spaggiari L, Pasini F, Sonzogni A, Iannucci A, Bresola E, Viale G (2004): CD117 immunoreactivity in high-grade neuroendocrine tumors of the lung: a comparative study of 39 large-cell neuroendocrine carcinomas and 27 surgically resected small-cell carcinomas. *Virchows Arch Int J Pathol* **445**, 449–455
- Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J (2005): Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *Am J Surg Pathol* **29**, 179–187
- Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M (2014): Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol* **9**, 273–284

- Pelosi G, Fabbri A, Cossa M, Sonzogni A, Valeri B, Righi L, Papotti M (2015): What clinicians are asking pathologists when dealing with lung neuroendocrine neoplasms? *Semin Diagn Pathol* 32, 469–479
- Pelosi G, Sonzogni A, Harari S, Albini A, Bresaola E, Marchiò C, Massa F, Righi L, Gatti G, Papanikolaou N et al. (2017a): Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Transl Lung Cancer Res* 6, 513–529
- Pelosi G, Pattini L, Morana G, Fabbri A, Faccinnetto A, Fazio N, Valeri B, Sonzogni A (2017b): Grading lung neuroendocrine tumors: Controversies in search of a solution. *Histol Histo-pathol* 32, 223–241
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567
- Phan AT, Oberg K, Choi J, Harrison LH, Hassan MM, Strosberg JR, Krenning EP, Kocha W, Woltering EA, Maples WJ, North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS) (2010): NANETS consensus guideline for the diagnosis and management of neuroendocrine tumors: well-differentiated neuroendocrine tumors of the thorax (includes lung and thymus). *Pancreas* 39, 784–798
- Quinn AM, Chaturvedi A, Nonaka D (2017): High-grade Neuroendocrine Carcinoma of the Lung With Carcinoid Morphology: A Study of 12 Cases. *Am J Surg Pathol* 41, 263–270
- Ramnath N, Hernandez FJ, Tan DF, Huberman JA, Natarajan N, Beck AF, Hyland A, Todorov IT, Brooks JS, Bepler G (2001): MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 19, 4259–4266
- Reed DR, Alexandrow MG (2020): Myc and the Replicative CMG Helicase: The Creation and Destruction of Cancer. *BioEssays* 42, e1900218
- Rekhtman N, Pietanza MC, Hellmann MD, Naidoo J, Arora A, Won H, Halpenny DF, Wang H, Tian SK, Litvak AM et al. (2016): Next-Generation Sequencing of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine Carcinoma Reveals Small Cell Carcinoma-like and Non-Small Cell Carcinoma-like Subsets. *Clin Cancer Res* 22, 3618–3629
- Rindi G, Klersy C, Inzani F, Fellegara G, Ampollini L, Ardizzoni A, Campanini N, Carbognani P, De Pas TM, Galetta D et al. (2014): Grading the neuroendocrine tumors of the lung: an evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer* 21, 1–16
- Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E, Busam KJ, de Krijger RR, Dietel M, El-Naggar AK et al. (2018): A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Mod Pathol* 31, 1770–1786
- Rinke A, Gress TM (2017): Neuroendocrine Cancer, Therapeutic Strategies in G3 Cancers. *Digestion* 95, 109–114
- 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, Higa E (1972): Mediastinal endocrine neoplasm, of probable thymic origin, related to carcinoid tumor. Clinicopathologic study of 8 cases. *Cancer* 29, 1061–1074
- Rosai J, Higa E, Davie J (1972): Mediastinal endocrine neoplasm in patients with multiple endocrine adenomatosis. A previously unrecognized association. *Cancer* 29, 1075–1083

- Rossi G, Cavazza A, Spagnolo P, Sverzellati N, Longo L, Jukna A, Montanari G, Carbonelli C, Vincenzi G, Bogina G et al. (2016): Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia syndrome. *Eur Respir J* 47, 1829–1841
- Sachithanandan N, Harle RA, Burgess JR (2005): Bronchopulmonary carcinoid in multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer* 103, 509–515
- Sadygov RG, Cociorva D, Yates JR (2004): Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book. *Nat Methods* 1, 195–202
- Saito T, Kimoto M, Nakai S, Ikoma A, Toyoshima H, Kawakami M, Nokubi M, Ishikawa S (2011): Ectopic ACTH Syndrome Associated with Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Thymus. *Intern Med* 50, 1471–1475
- Sakurai A, Suzuki S, Kosugi S, Okamoto T, Uchino S, Miya A, Imai T, Kaji H, Komoto I, Miura D et al. (2012): Multiple endocrine neoplasia type 1 in Japan: establishment and analysis of a multicentre database. *Clin Endocrinol (Oxf)* 76, 533–539
- Sakurai A, Imai T, Kikumori T, Horiuchi K, Okamoto T, Uchino S, Kosugi S, Suzuki S, Suyama K, Yamazaki M et al. (2013): Thymic neuroendocrine tumour in multiple endocrine neoplasia type 1: female patients are not rare exceptions. *Clin Endocrinol (Oxf)* 78, 248–254
- Scarpa A, Chang DK, Nones K, Corbo V, Patch AM, Bailey P, Lawlor RT, Johns AL, Miller DK, Mafficini A et al. (2017): Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* 543, 65–71
- Scigelova M, Makarov A (2006): Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2, 16–21
- Seo YS, Kang YH (2018): The Human Replicative Helicase, the CMG Complex, as a Target for Anti-cancer Therapy. *Front Mol Biosci* 5, 26
- Shima N, Alcaraz A, Liachko I, Buske TR, Andrews CA, Munroe RJ, Hartford SA, Tye BK, Schimenti JC (2007): A viable allele of Mcm4 causes chromosome instability and mammary adenocarcinomas in mice. *Nat Genet* 39, 93–98
- Shoji T, Fushimi H, Takeda S, Tanio Y (2011): Thymic large-cell neuroendocrine carcinoma: a disease neglected in the ESMO guideline? *Ann Oncol* 22, 2535–2535
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018): Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 68, 7–30
- Simbolo M, Mafficini A, Sikora KO, Fassan M, Barbi S, Corbo V, Mastracci L, Rusev B, Grillo F, Vicentini C et al. (2017): Lung neuroendocrine tumours: deep sequencing of the four World Health Organization histotypes reveals chromatin-remodelling genes as major players and a prognostic role for TERT, RB1, MEN1 and KMT2D. *J Pathol* 241, 488–500
- Skuladottir H, Hirsch FR, Hansen HH, Olsen JH (2002): Pulmonary neuroendocrine tumors: incidence and prognosis of histological subtypes. A population-based study in Denmark. *Lung Cancer Amst Neth* 37, 127–135
- Soga J, Yakuwa Y, Osaka M (1999): Evaluation of 342 cases of mediastinal/thymic carcinoids collected from literature: a comparative study between typical carcinoids and atypical varieties. *Ann Thorac Cardiovasc Surg Off J Assoc Thorac Cardiovasc Surg Asia* 5, 285–292
- Steen H, Mann M (2004): The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 699–711

- Ströbel P, Zettl A, Shilo K, Chuang WY, Nicholson AG, Matsuno Y, Gal A, Laeng RH, Engel P, Capella C et al. (2014): Tumor genetics and survival of thymic neuroendocrine neoplasms: A multi-institutional clinicopathologic study. *Genes Chromosomes Cancer* 53, 738–749
- Ströbel P, Marchevsky A, Marom E, Pelosi G: Thymic neuroendocrine neoplasms: Introduction. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board (Hrsg.): WHO Classification of Tumours: Thoracic tumours 5th ed.; vol. 5; International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon 2021, 389-390
- Swartz DRA, Ramaekers FCS, Speel EJM (2012): Molecular and cellular biology of neuroendocrine lung tumors: evidence for separate biological entities. *Biochim Biophys Acta* 1826, 255–271
- Swartz DRA, Rudelius M, Claessen SMH, Cleutjens JP, Seidl S, Volante M, Ramaekers FCS, Speel EJM (2017): Limited additive value of the Ki-67 proliferative index on patient survival in World Health Organization-classified pulmonary carcinoids. *Histopathology* 70, 412–422
- Takei H, Asamura H, Maeshima A, Suzuki K, Kondo H, Niki T, Yamada T, Tsuchiya R, Matsuno Y (2002): Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of eighty-seven cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124, 285–292
- Tan DF, Huberman JA, Hyland A, Loewen GM, Brooks JS, Beck AF, Todorov IT, Bepler G (2001): MCM2 - a promising marker for premalignant lesions of the lung: a cohort study. *BMC Cancer* 1, 6
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003): The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348, 1134–1149
- Teh (1998): Thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern Med* 243, 501–504
- Teh BT, Hayward NK, Walters MK, Shepherd JJ, Wilkinson S, Nordenskjöld M, Larsson C (1994): Genetic studies of thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Med Genet* 31, 261–262
- Teh BT, Zedenius J, Kytölä S, Skogseid B, Trotter J, Choplin H, Twigg S, Farnebo F, Giraud S, Cameron D et al. (1998): Thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *Ann Surg* 228, 99–105
- Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, Witte B, Beasley MB, Chung JH, Dacic S, Lantuejoul S, Russell PA, den Bakker M et al. (2017): The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. *J Thorac Oncol* 12, 334–346
- Tiffet O, Nicholson AG, Ladas G, Sheppard MN, Goldstraw P (2003): A Clinicopathologic Study of 12 Neuroendocrine Tumors Arising in the Thymus. *CHEST* 124, 141–146
- Travis WD (2010): Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 21 Suppl 7, vii65-71
- Travis WD (2014): Pathology and diagnosis of neuroendocrine tumors: lung neuroendocrine. *Thorac Surg Clin* 24, 257–266
- Travis WD, Rush W, Flieder DB, Falk R, Fleming MV, Gal AA, Koss MN (1998): Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol* 22, 934–944

- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG (2015a): Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol* 10, 1240–1242
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB et al. (2015b): The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 10, 1243–1260
- Tye BK (1999): MCM Proteins in DNA Replication. *Annu Rev Biochem* 68, 649–686
- Uccella S, La Rosa S, Volante M, Papotti M (2018): Immunohistochemical Biomarkers of Gastrointestinal, Pancreatic, Pulmonary, and Thymic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Pathol* 29, 150–168
- van Velthuysen MLF, Groen EJ, van der Noort V, van de Pol A, Tesselaar MET, Korse CM (2014): Grading of neuroendocrine neoplasms: mitoses and Ki-67 are both essential. *Neuroendocrinology* 100, 221–227
- Vijayvergia N, Boland PM, Handorf E, Gustafson KS, Gong Y, Cooper HS, Sheriff F, Astsaturov I, Cohen SJ, Engstrom PF (2016): Molecular profiling of neuroendocrine malignancies to identify prognostic and therapeutic markers: a Fox Chase Cancer Center Pilot Study. *Br J Cancer* 115, 564–570
- Vollbrecht C, Werner R, Walter RFH, Christoph DC, Heukamp LC, Peifer M, Hirsch B, Burbat L, Mairinger T, Schmid KW et al. (2015): Mutational analysis of pulmonary tumours with neuroendocrine features using targeted massive parallel sequencing: a comparison of a neglected tumour group. *Br J Cancer* 113, 1704–1711
- Voortman J, Lee JH, Killian JK, Suuriniemi M, Wang Yonghong, Lucchi M, Smith WI, Meltzer P, Wang Yisong, Giaccone G (2010): Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 13040–13045
- Walther TC, Mann M (2010): Mass spectrometry–based proteomics in cell biology. *J Cell Biol* 190, 491–500
- Walts AE, Ines D, Marchevsky AM (2012): Limited role of Ki-67 proliferative index in predicting overall short-term survival in patients with typical and atypical pulmonary carcinoid tumors. *Mod Pathol* 25, 1258–1264
- Weissferdt A, Tang X, Wistuba II, Moran CA (2013): Comparative immunohistochemical analysis of pulmonary and thymic neuroendocrine carcinomas using PAX8 and TTF-1. *Mod Pathol* 26, 1554–1560
- Weissferdt A, Kalhor N, Liu H, Rodriguez J, Fujimoto J, Tang X, Wistuba II, Moran CA (2014): Thymic neuroendocrine tumors (paraganglioma and carcinoid tumors): a comparative immunohistochemical study of 46 cases. *Hum Pathol* 45, 2463–2470
- Williams GH, Romanowski P, Morris L, Madine M, Mills AD, Stoeber K, Marr J, Laskey RA, Coleman N (1998): Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14932–14937
- Wiśniewski JR (2013): Proteomic Sample Preparation from Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissue. *J Vis Exp* 79, e50589

- Woischke C, Schaaf CW, Yang HM, Vieth M, Veits L, Geddert H, Märkl B, Stömmer P, Schaeffer DF, Frölich M et al. (2017): In-depth mutational analyses of colorectal neuroendocrine carcinomas with adenoma or adenocarcinoma components. *Mod Pathol* 30, 95–103
- Yang Z, Klimstra DS, Hruban RH, Tang LH (2017): Immunohistochemical Characterization of the Origins of Metastatic Well-differentiated Neuroendocrine Tumors to the Liver. *Am J Surg Pathol* 41, 915–922
- Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A et al. (2008): One hundred years after „carcinoid“: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 26, 3063–3072
- Zaleski M, Kalhor N, Moran CA (2021): Typical and Atypical Carcinoid Tumors of the Mediastinum: A Biomarker Analysis of 27 Cases With Clinical Correlation. *Int J Surg Pathol* 29, 358–367
- Zhai Y, Cheng E, Wu H, Li N, Yung PYK, Gao N, Tye BK (2017): Open-ringed structure of the Cdt1–Mcm2–7 complex as a precursor of the MCM double hexamer. *Nat Struct Mol Biol* 24, 300–308
- Zhao Y, Shi J, Fan L, Yang J, Hu D, Zhao H (2016): Evaluation of the proposed International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)/International Thymic Malignancies Interest Group (ITMIG) staging revisions in thymic well-differentiated neuroendocrine carcinoma patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 49, 569–573



## Danksagung

Für das Vertrauen und die Möglichkeit der experimentellen Doktorarbeit im Institut für Pathologie an der Universitätsmedizin Göttingen, möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Philipp Ströbel bedanken.

Für die technische Unterstützung im Labor und den Rat geht mein Dank an Dr. Stefan Küffer, Monique Küffer, Stefanie Schwager, Pamela Nissen, Olga Dschun und Jennifer Appelhans.

Für die ausführliche und hervorragende Einarbeitung in die allgemeine Labortätigkeit, die Zellkultur und insbesondere in das Protokoll der *filter-aided sample preparation* (FASP-Protokoll), möchte ich mich bei Jonatan Hoffmann bedanken. Außerdem danke ich Helen Dinter für die Übergabe und die Informationen des FFPE-Gewebekollektivs der neuroendokrinen Tumoren, aus welchem das Versuchskollektiv dieser Arbeit entnommen wurde.

Diese Arbeit entstand in Kooperation mit der Abteilung von Professor Dr. Thomas Oellerich (Medizinische Klinik II – Hämatologie/Onkologie am Universitätsklinikum Frankfurt) und der „Bioanalytical Mass Spectrometry“ Arbeitsgruppe von Professor Dr. Henning Urlaub am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen. Für die gelungene Zusammenarbeit und die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen möchte ich mich bedanken.

Weiterer Dank geht an Dr. Federico Comoglio (enGene Statistics, Schweiz) für die Durchführung der bioinformatischen Auswertung der massenspektrometrisch erhobenen Daten.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Hanibal Bohnenberger für die hervorragende Betreuung in allen Bereichen meiner Forschungstätigkeit, die Möglichkeit der Mitarbeit an weiteren Projekten seiner Arbeitsgruppe und dafür, dass ich ihn stets um Rat fragen konnte.