

AUS DER
KLINIK FÜR CHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. T. KECK
SEKTION FÜR TRANSLATIONALE CHIRURGISCHE ONKOLOGIE & BIOMATERIALBANKEN
LEITER: PROF. DR. DR. MED. J.K. HABERMANN
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**PROTEINEXPRESSIONSMUSTER VON THROMBOZYTEN
GESUNDER PROBAND/INNEN UND PATIENTEN/INNEN MIT
KOLOREKTALEN KARZINOMEN IM FRÜH- UND SPÄTSTADIUM**

INAUGURALDISSERTATION

ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
- AUS DER SEKTION MEDIZIN -

VORGELEGT VON
SINA HUMBORG,
GEB. JOHANNING
AUS HANNOVER

LÜBECK
2022

1. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. DR. MED. JENS K. HABERMANN

2. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. RER. NAT. MARC EHLERS

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 21.06.2022

ZUM DRUCK GENEHMIGT. LÜBECK, DEN 21.06.2022

-PROMOTIONSKOMMISSION DER SEKTION MEDIZIN-

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1 Das kolorektale Karzinom	2
2.1.1 Anatomie und Funktion des gesunden Kolons.....	2
2.1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	4
2.1.3 Ätiologie des kolorektalen Karzinoms.....	5
2.1.4 Klassifikation kolorektaler Karzinome	6
2.1.4.1 Die TNM-Klassifikation kolorektaler Karzinome	7
2.1.4.2 Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome.....	8
2.1.5 Epigenetik des kolorektalen Karzinoms.....	8
2.1.5.1 Der <i>traditionelle</i> Signalweg	9
2.1.5.2 Der <i>alternative</i> Signalweg.....	10
2.1.5.3 Der <i>serratierte</i> Signalweg	11
2.1.6 Prognose und Diagnose des Kolonkarzinoms.....	11
2.1.7 Tumormarker des kolorektalen Karzinoms.....	13
2.1.7.1 Carcinoembryonales Antigen.....	14
2.1.7.2 Carbohydrat-Antigen 19-9	14
2.1.7.3 Methyliertes Septin-9	15
2.1.7.4 Weitere Tumormarker.....	15
2.1.7.5. Liquid Biopsy.....	15
2.2 Verwendung von Thrombozyten zur Früherkennung vom kolorektalen Karzinom.....	16
2.2.1 Eigenschaften und Funktion von Thrombozyten	17
2.2.2 Thrombozyten als Mediatoren der hämatogenen Tumormetastasierung	19
2.3 Zielsetzung der Arbeit.....	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Chemikalien	22
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	23
3.1.2.1 Puffer und Lösungen für die Aufbereitung der Blutprobe / Thrombozytenisolierung	23
3.1.2.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbestimmung	23
3.1.2.3 Puffer und Lösungen für die Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)..	24
3.1.2.4 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE (2. Dimension)	24
3.1.2.5 Puffer und Lösungen für den Western Blot	26
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	26
3.1.4 Geräte	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Patientencharakteristika	28
3.2.2 Gewinnung und Herstellung des Probenmaterials/Thrombozytenisolierung.....	29
3.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	30
3.2.3.1 Aufreinigung des Probenmaterials	32
3.2.3.2 Proteinbestimmung	32

3.2.3.3 Labeling.....	32
3.2.3.4 Erste Dimension-isoelektrische Fokussierung	33
3.2.3.5 Zweite Dimension-isoelektrische Fokussierung	34
3.2.3.6 Digitalisierung und Auswertung der 2-DE Gele	35
3.2.4 Auswertung und Statistik der 2-D DIGE Gele.....	35
3.2.5 MALDI-Massenspektrometrie	36
3.2.6 Ingenuity Pathway Analyse (IPA)	38
3.2.7 Validierung mittels Western Blot.....	39
3.2.8 Statistische Analyse	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1 Unterschiede im Thrombozytenproteom von Kontroll- und Kolorektalkarzinom- Patienten in frühen und späten Stadien	43
4.1.1 Dreigruppenvergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom.....	44
4.1.2 Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom	47
4.1.3 Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Frühkarzinom	47
4.1.4 Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Spätkarzinom.....	50
4.1.5 Zweigruppenvergleich Früh- versus Spätkarzinom	50
4.2 Proteindifferenzierung durch Massenspektrometrie	51
4.3 Ingenuity Pathway Analysis	55
4.4 Validierung der Proteindaten mittels Western Blot-Analyse.....	63
5. DISKUSSION.....	67
5.1 2-D DIGE ermöglicht hohe Detektionsrate	68
5.2 Principal Components Analyse bei KRK-Patienten anhand Thrombozyten-Proteom.....	70
5.3 Massenspektrometrie basierte Proteinprofile im Serum	70
5.4 Ingenuity Pathway Analyse für Proteinnetzwerkanalyse beim KRK	73
5.5 Western Blot	74
5.6 Thrombozyten eignen sich als Marker zur KRK-Früherkennung.....	74
5.7 Proteine	76
5.8 Limitationen und Ausblick	81
6. LITERATURVERZEICHNIS	83
7. ANHANG	96
8. DANKSAGUNG	108
9. LEBENSLAUF	109
10. VERÖFFENTLICHUNGEN	110

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1 Anatomie des Darms.....	3
ABBILDUNG 2 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016.	4
ABBILDUNG 3 Verteilung der UICC (Union internationale contre le cancer)-Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht in Deutschland 2015-2016.....	5
ABBILDUNG 4 Pathogeneseformen des kolorektalen Karzinoms.....	6
ABBILDUNG 5 Fortschreitende somatische Mutationen bei der Entwicklung von Kolonkarzinomen.	10
ABBILDUNG 6 Schematische Darstellung der Ultrastruktur eines ruhenden Thrombozyten und eines aktivierten Thrombozyten.....	18
ABBILDUNG 7 Thrombozyten sorgen für den Erhalt des Endothels und beeinflussen die Angiogenese.....	20
ABBILDUNG 8 Prinzip der 2-Dimensionalen Gelelektrophorese.....	31
ABBILDUNG 9 Exemplarisches Bild des 2-DE-Gel-Scans mit blaumarkierten signifikanten Proteinspots für den Vergleich Kontrollgruppe gegen Kolonkarzinom.	35
ABBILDUNG 10 Schematische Darstellung der MALDI-TOF.	37
ABBILDUNG 11 Schematischer Aufbau des Western Blots im Trans-Turbo Blotting System.....	40
ABBILDUNG 12 Schematisierter Ablauf der 2-DE basierten Proteinexpressionsstudie....	41
ABBILDUNG 13 Zweidimensionale, fluoreszenzgefärbte Darstellung eines Thrombozytenproteoms.	43
ABBILDUNG 14 Anzahl signifikanter Proteine in den unterschiedlichen Gruppenvergleichen.....	44
ABBILDUNG 15 Ergebnisse der PCA unterschiedlich exprimierter Proteine der 24 Patientenproben.	45
ABBILDUNG 16 Repräsentatives Proteinexpressionsprofil von Proteinspot #1148.	46
ABBILDUNG 17 PCA basierend auf den 35 signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen der 24 Patientenproben der Gruppe Kontrolle versus Kolonkarzinom.	47
ABBILDUNG 18 PCA basierend auf 23 signifikanten Spots in dem Zwei-Gruppen-Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom.....	48
ABBILDUNG 19 Repräsentatives Proteinexpressionsprofil von Proteinspot #910.....	49
ABBILDUNG 20 PCA basierend auf den 44 signifikanten Spots des Zwei-Gruppen-Vergleichs Kontrolle versus Spätkarzinom.....	50
ABBILDUNG 21 PCA basierend auf allen 36 signifikanten Spots des Zwei-Gruppen-Vergleichs Früh- versus Spätkarzinom.	51
ABBILDUNG 22 Darstellung der Überschneidung signifikant unterschiedlich exprimierter Proteine in den einzelnen Gruppenvergleichen.	54

ABBILDUNG 23 A: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom. B: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom.	58
ABBILDUNG 24 A: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom mit dem Score von 36. B: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom mit dem Score von 25.	59
ABBILDUNG 25 A: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 28. B: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 26.	60
ABBILDUNG 26 A: IPA Netzwerk im Vergleich Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 36. B: IPA Netzwerk im Vergleich Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 13.	61
ABBILDUNG 27 Punktdiagramm des Bandenvolumens von CLU in den unterschiedlichen Vergleichsgruppen.	64
ABBILDUNG 28 Punktdiagramm des Bandenvolumens von VCL in den unterschiedlichen Vergleichsgruppen.	65
ABBILDUNG 29 Punktdiagramm des Bandenvolumens von CASP3 in den unterschiedlichen Vergleichsgruppen.	66
ABBILDUNG 30 Caspase 3 (CASP3): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CASP 3.	96
ABBILDUNG 31 Caspase 3 (CASP3): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CASP 3.	96
ABBILDUNG 32 Cofilin (CFL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CFL.	96
ABBILDUNG 33 Cofilin (CFL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CFL.	97
ABBILDUNG 34 Clusterin (CLU): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CLU.	97
ABBILDUNG 35 Clusterin (CLU): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CLU.	97
ABBILDUNG 36 Gluthation Synthase (GSS): Expressionsprofil der 2-D DIGE für GSS.	98
ABBILDUNG 37 Gluthation Synthase (GSS): Expressionsprofil der 2-D DIGE für GSS.	98
ABBILDUNG 38 Vinculin (VCL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für VCL.	98
ABBILDUNG 39 Vinculin (VCL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für VCL.	99

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1 TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms	7
TABELLE 2 TNM-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC.	8
TABELLE 3 Biografische Daten des Patientenkollektivs für die Proteinbestimmung der 2-DE Gelelektrophorese	28
TABELLE 4 Biografische Daten des Patientenkollektivs zur Validierung mittels Western Blot	29
TABELLE 5 Identifizierungsrate in den unterschiedlichen Gruppenvergleichen	53
TABELLE 6 IPA Vergleiche	56
TABELLE 7 Die identifizierten Proteine aus der MALDI-TOF Massenspektrometrie	62
TABELLE 8 Identifizierte Proteine der signifikanten Proteinspots der 2-D DIGE aller 5 Vergleiche .	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
ACF	Aberranter Kryptenfokus
ACTB	Actin beta
AJCC	American Joint Committee of Cancer
ANOVA	Integrierte Varianzanalyse
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
CASP3	Caspase 3
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CFL	Cofilin
CIMP	CpG-Insel-Methylations-Phänotyp
CIN	Chromosomale Instabilität
CLU	Clusterin
C-MYC	Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
CRC	Kolorektales Karzinom
CS	Cowden-Syndrom
CT	Computertomographie
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DCO	<i>Death certificate only</i>
DIGE	Differential Gel Elektrophoresis
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FDPS	Farnesyl Diphosphat Synthase
FJP	Familiäre juvenile Polyposis
FOBT	Fäkal okkultes Bluttest
GAPDH	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase
GSS	Glutathion Synthetase
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEN	Intraepitheliale Neoplasie
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IPG	Immobilized pH gradient
IPKD	Ingenuity Pathways Knowledge Database
IS	Interner Standard
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopädie of Genes and Genomes
k-ras	v-Ki-ras2 Kirsten rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
L	Liter
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
mA	Milliampere
MALDI	<i>Matrix-assisted laser-desorption ionization</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MLH1	Humanes mutL Homolog 1
MMR	Mismatch-Reparatursystem
M	Molekulare Masse

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mSEPT-9	Methyliertes Septin-9
MSI	Mikrosatelliten-Instabilitäten
N	Gesamtanzahl
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ns	Nanosekunde
N	Nodi lymphatici
PCA	Principal Components Analyse
pI	isoelektrischer Punkt
PJS	Preutz-Jeghers-Syndrom
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SNCA	Synuclein alpha
T	Tumor
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth-Faktor</i>

1. ZUSAMMENFASSUNG

Zu den am häufigsten auftretenden Malignomen der westlichen Welt zählt das kolorektale Karzinom (KRK). Trotz verfügbarer Früherkennungsmethoden aber eingeschränkter Patientenakzeptanz werden die meisten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits mit einem fortgeschrittenem Krankheitsstadium diagnostiziert. Daher besitzt die Suche nach neuen Screeningmethoden mit vornehmlich minimal-invasiver Diagnostik höchste Relevanz.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Grundlagen für die Entwicklung eines neuen, klinisch relevanten Testverfahrens zur Darmkrebsfrüherkennung zu eruieren. Dafür wurden Proteinexpressionsmuster von Thrombozyten gesunder Kontrollpatienten mit denen von Kolonkarzinompatienten im frühen und späten Tumorstadium – entsprechend der *Union internationale contre le cancer* (UICC)-Einteilung - mittels fluoreszenz-basierter 2-dimensionaler Gelelektrophorese (2-D DIGE) verglichen. Unterschiedlich exprimierte und massenspektrometrisch identifizierte Proteine wurden nachfolgend systembiologisch mittels *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) analysiert. Ausgewählte Zielmoleküle wurden anschließend mit der Methode des Western Blots validiert.

Mit der Untersuchung des Thrombozytenproteoms konnte gezeigt werden, dass bestimmte Patienten mit kolorektalem Karzinom im Gegensatz zu gesunden Patienten unterschiedliche Proteinexpressionsmuster aufwiesen. Anhand einer massenspektrometrischen Auswertung konnten von 177 differenziell exprimierten Proteinen 133 identifiziert werden. Mittels anschließender IPA wurden die Proteine untereinander anhand ihrer Signalwegfunktionen verglichen und in den Kontext ihrer physiologischen Funktionen gestellt. Bei 14 Proteinen, welche vor allem in Stoffwechselwegen der Zell-Zell-Interaktion und an Funktionen wie Zelltod, genetischen Funktionsstörungen und Zellentwicklung involviert sind, präsentierte sich ein deutlicher Expressionunterschied zwischen der Patientengruppe mit KRK und der Kontrollgruppe. Aufgrund ihres hohen Expressionunterschieds wurden Caspase 3, Clusterin und Vinculin abschließend mittels Western Blot validiert. Hier konnte die Identität der potentiellen Markerproteine bestätigt werden.

Die durchgeführte Analyse bildet eine aussichtsreiche Grundlage zur Etablierung einer neuen Screeningmethode zur Früherkennung von Darmkrebs. Um eine genaue und sichere Früherkennung zu ermöglichen, bedarf es einer weitergehenden Optimierung der Methodik und Validierung an größeren Patientenkohorten.

2. EINLEITUNG

2.1 Das kolorektale Karzinom

2.1.1 Anatomie und Funktion des gesunden Kolons

Das Kolon bildet den distalen Abschnitt des Verdauungssystems. Es formiert sich mit Verlauf an der hinteren Wand der Peritonealhöhle und lässt sich anhand seines Verlaufs in vier Abschnitte unterteilen: *Colon ascendens*, *Colon transversum*, *Colon descendens* und *Colon sigmoideum* (Abb. 1).

Das *Colon ascendens* liegt sekundär retroperitoneal an der rechten Bauchwand, steigt kopfwärts hinauf bis zum unteren Rand der Leber und geht hier über in die rechte Colonflexur (*Flexura coli dextra*). Von dort verläuft das *Colon transversum* intraperitoneal quer zur linken Colonflexur (*Flexura coli sinistra*), die sich am unteren Pol der Milz befindet. Das *Colon transversum* ist lediglich über das Mesocolon mit der hinteren Bauchwand verbunden und dadurch sehr beweglich. Ab der linken Colonflexur steigt das *Colon descendens* sekundär retroperitoneal an der linken Bauchwand herab und geht in das S-förmige *Colon sigmoideum* über, welches ebenfalls intraperitoneal liegt. Hieran schließt sich das Rektum an, das im After endet (Bruch und Trentz, 2008).

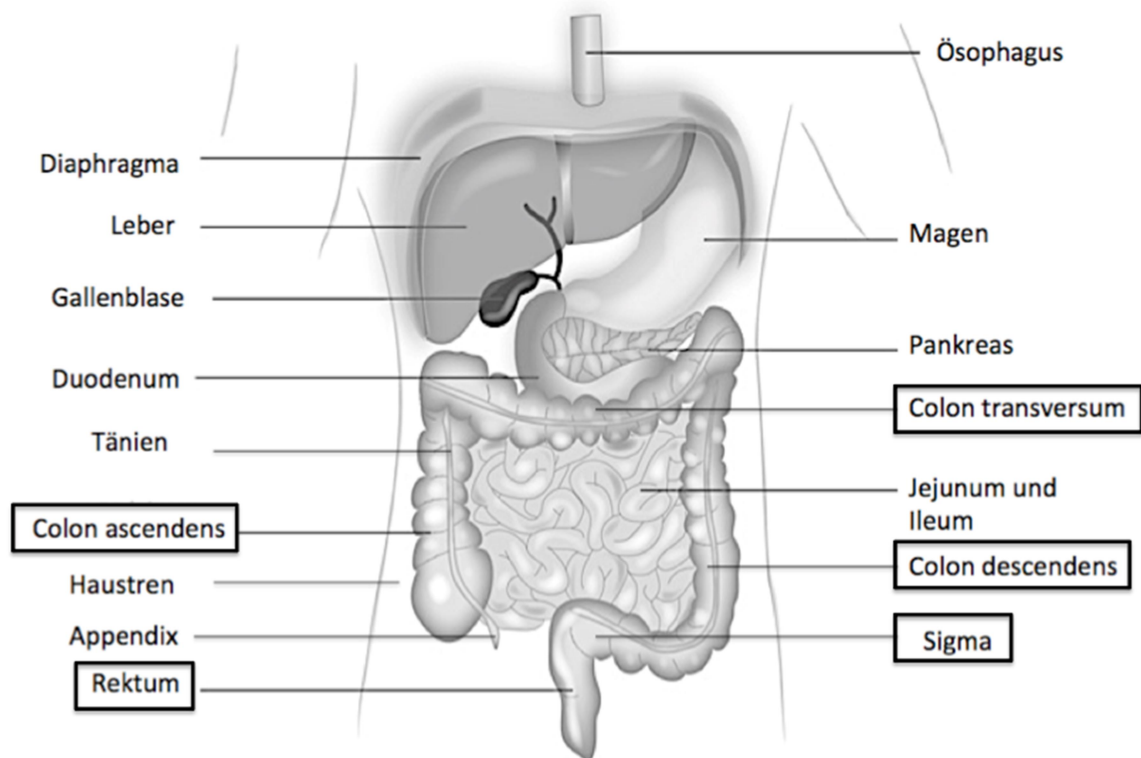


Abbildung 1 Anatomie des Darms. Das Kolon bildet den distalen Abschnitt des Verdauungssystems. Es formiert sich mit Verlauf an der hinteren Wand der Peritonealhöhle und wird anhand seines Verlaufes in vier Abschnitte unterteilt: *Colon ascendens*, *Colon transversum*, *Colon descendens* und *Colon sigmoideum* (Sigma). Das Rektum bildet ein Stuhlreservoir und macht den Enddarm aus (Abbildung modifiziert nach Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum).

Alle Abschnitte des Kolons weisen einen einheitlichen Wandaufbau auf. Das gesamte Darmrohr ist in eine fettreiche Bindegewebsschicht (*Tunica serosa* oder *Tunica adventitia*) eingebettet. Die Muskelschicht (*Tunica muscularis mucosae*), bestehend aus Längs- und Ringmuskulatur, umschließt das Darmrohr. Die Längsmuskulatur, nur diskontinuierlich mit drei Muskelstreifen, den Tänen, ausgeprägt, schnürt wie auch die Ringmuskulatur tiefe Falten in das Darmrohr. Durch Kontraktion dieser beiden Muskelschichten bilden sich Ausbuchtungen der Darmwand, die Haustren. Diese sind inkonstant und wandern im Rahmen der Peristaltik von oral nach aboral (Schünke et al. 2005). An die Muskelschichten schließt sich die bindegewebsartige Verschiebeschicht (*Tela submucosa*) an. Darauf folgend grenzt wiederum eine Lage aus geschichteter Muskulatur (*Tunica muskularis*). Diese liegt einer submukösen Bindegewebsschicht mit Lymph- und Blutgefäßen (*Tunica submucosa*) an und wird von der innersten Schicht der Darmschleimhaut (*Tunica mukosa*) gesäumt.

Die Hauptfunktionen des Kolons sind die bakterielle Durchsetzung des Speisebreis, dem Chymus, die Wasser- und Elektrolytresorption in den proximalen sowie die

Speicherung des eingedickten Darminhaltes in den distalen Abschnitten (Silbernagel und Despopoulos 2007). Die Längsmuskulatur bildet im Rektum einen homogenen Muskelschlauch (Schumpelick et al. 2010) und Ring- und Längsmuskulatur bewirken gemeinsam eine Durchmischung sowie den Transport des Stuhls.

2.1.2 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist in Deutschland die am dritthäufigsten vorkommende Krebsneuerkrankung bei Frauen und Männern (Abb. 2). Weltweit ist es die am dritthäufigsten vorkommende Krebserkrankung bei beiden Geschlechtern (Majek et al. 2012). Laut den Zahlen des Bundeskrebsregisters des Robert-Koch-Institutes erkrankten im Jahr 2016 allein in Deutschland etwa 32.300 Männer und 25.990 Frauen am KRK. Davon starben jährlich knapp 13.411 Männer (19,8%) und 11.391 Frauen (11,8%) (Robert Koch-Institut 2019).

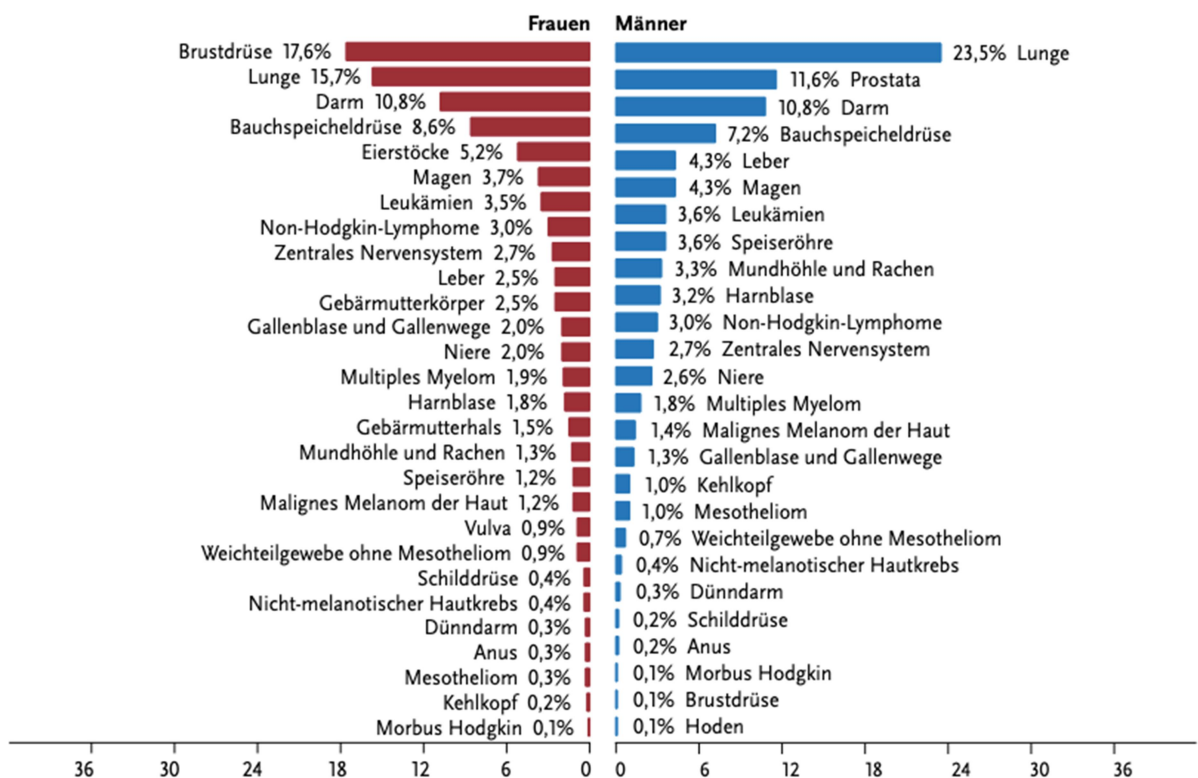


Abbildung 2 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2016. Das Auftreten von Darmkrebs stellt bei Männern nach einem Lungen- und Prostatakarzinom die dritthäufigste Todesursache nach manifester Krebserkrankung mit 10,8% und bei Frauen die dritthäufigste mit ebenfalls 10,8% nach Brust- und Lungenkarzinom dar (Robert Koch-Institut, 2019).

Etwa 90% aller KRK treten nach Vollendung des 50. Lebensjahres auf. Bereits nach dem 40. Lebensjahr steigt das Erkrankungsrisiko an, die Inzidenz verdoppelt sich alle fünf Jahre bis zum 60. Lebensjahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 75 Jahren bei

Frauen bzw. 71 Jahren bei Männern. Vor dem 40. Lebensjahr tritt das KKR selten auf. Die frühzeitige Erkennung von Krebs spielt eine entscheidende Rolle für die Heilungschancen, denn die Lebenserwartung hängt entscheidend vom Stadium der Erkrankung ab, in der das KKR erstmals diagnostiziert wird. In diesem Zusammenhang wird bei über 50% der Frauen und Männern ein KKR erst im fortgeschrittenen UICC-Stadium diagnostiziert (Abb. 3) (Keane und Johnson, 2012; Brenner et al., 2013).

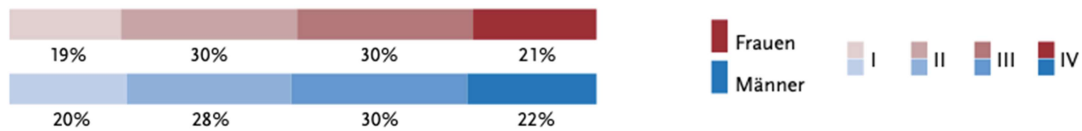


Abbildung 3 Verteilung der UICC (Union internationale contre le cancer) -Stadien bei Erstdiagnose nach Geschlecht in Deutschland 2015-2016 (Robert Koch-Institut, 2019).

2.1.3 Ätiologie des kolorektalen Karzinoms

Es existieren unterschiedliche Ursachen für die Entstehung des KRKs. Diese werden in exogene und endogene Faktoren unterteilt. Zu den exogenen Faktoren zählt die Ernährung, die sich vornehmlich in westlichen Industrieländern durch vermehrte Aufnahme gesättigter Fettsäuren und rotem Fleisch auszeichnet. Dies in Kombination mit einer verminderten Aufnahme von Ballaststoffen und Vitaminen führt zu einem erhöhten Risiko für Krebserkrankungen (Arafa et al. 2011; Riboli 1992). Weitere exogene Faktoren sind Nikotinabusus, erhöhter Alkoholkonsum, Adipositas, Asbestexposition, niedriger sozioökonomischer Status, körperliche Inaktivität und die Einnahme bestimmter Laxanzien (Bergström et al. 2001; Franceschi und La Vecchia 1994; Giovannucci 2001; Kushi und Giovannucci 2002; Midgley und Kerr 1999; Torre et al. 2015; Willett et al. 1990; Yamaji et al. 2020).

Zu den endogenen Faktoren zählen unter anderem das Vorhandensein von Polypen und kolorektalen Adenomen in Abhängigkeit von Anzahl, Größe und Histopathologie. Das Vorliegen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED), wie z.B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, ist ebenfalls als endogener Risikofaktor zu nennen (Müller 2012). Des Weiteren haben Verwandte ersten Grades eines Patienten mit Darmkrebs ein erhöhtes Risiko, selbst zu erkranken. Etwa 5-10% aller KRK entstehen im Rahmen monogener erblicher Tumorsyndrome, wie z.B. das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC- bzw. Lynch-Syndrom), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die familiäre juvenile Polyposis (FJP), das Preutz-Jeghers-Syndrom (PJS) und

das Cowden-Syndrom (CS) (Abb. 4). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass Patienten schon in jungem Alter an einem KRK erkranken (Engel et al. 2020; Jasperson et al. 2010; Lynch et al. 2009). 75% der Darmkrebserkrankungen haben keine erbliche Ursache, d.h. sie entstehen ohne genetische Prädisposition. Man spricht daher von einem sporadisch auftretenden Darmkrebs.

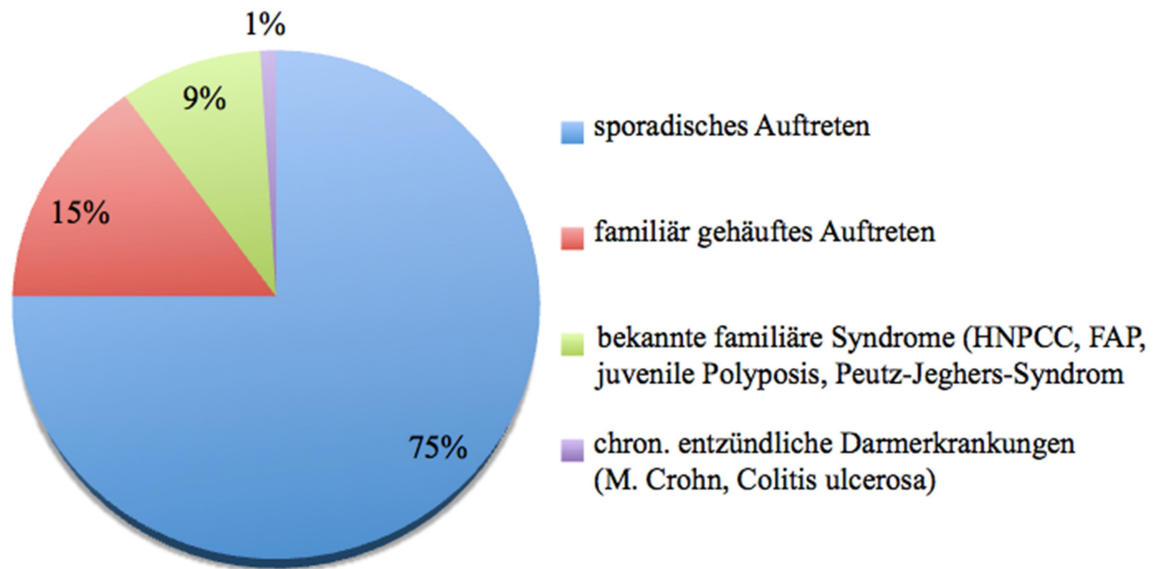


Abbildung 4 Pathogeneseformen des kolorektalen Karzinoms. Den geringsten Anteil hierbei machen die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn, mit ca. 1% aus und den größten Anteil das sporadische Auftreten mit 75%. (Abbildung modifiziert nach Hisamuddin, 2004).

2.1.4 Klassifikation kolorektaler Karzinome

Bereits 1932 wurde durch den Pathologen Cuthbert Dukes das erste Einteilungssystem des KRKs beschrieben (Wu 2007). Aufgrund der über die Zeit hinweg entwickelten, vielfältigen Einteilungsmöglichkeiten wurde durch das *American Joint Committee of cancer* (AJCC) und die *Union internationale contre le cancer* (UICC) sowie im Einklang anderer Gremien eine klinisch-diagnostische und histopathologische Tumoreinstufung nach dem TNM-System geschaffen (Rahman und Mungadi, 2009).

2.1.4.1 Die TNM-Klassifikation kolorektaler Karzinome

Die Stadieneinteilung ist wichtig für die makroskopische Beurteilung maligner Tumoren. Sie setzt sich aus folgenden Parametern zusammen (Tab. 1):

- **T** steht für **Tumor** und bezieht sich auf die Ausdehnung des Primärtumors
- **N** steht für **Nodi lymphatici**, lat. Bedeutung für Lymphknoten, und beschreibt den lokalen Lymphknotenbefall
- **M** steht für **Metastase** und spezifiziert das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von Fernmetastase(n)

Tabelle 1 TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms. Nach (Akkoca et al. 2014).

TNM	Definition
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die M. propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolonisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
Nx	Benachbarte (regionäre) Lymphknoten sind nicht beurteilbar
N0	Kein Anhalt für benachbarte Lymphknotenmetastasen (mindestens 12 Lymphknoten wurden untersucht)
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen treten am häufigsten in Leber, Lunge und Lymphknoten, seltener im Gehirn und im Skelett auf.

2.1.4.2 Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome

Die Kombination der TNM-Klassifikation erlaubt nach Empfehlungen der UICC eine klinisch relevante Stadieneinteilung, auch *Staging* genannt (Tab. 2) (Singh-Ranger 2006). Statistische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich zum Beispiel ab einer bestimmten Tumordinfiltration die Prognose der Erkrankung deutlich verschlechtert (Tab. 2). Daher erlaubt das TNM-*Staging* eine Aussage über die Prognose des KRK und bestimmt somit die weiterführende Therapie (siehe Abschnitt 2.1.6) (Connell 2004; Iacobuzio-Donahue und Montgomery 2005).

Tabelle 2 TNM-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC.

UICC Stadium	5-JÜR in %*	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium	Einteilung
0	-	Tis	N0	M0	Früh-Karzinom
I	93,2	T1, T2	N0	M0	
IIA	84,7	T3	N0	M0	
IIB	72,2	T4	N0	M0	
IIIA	83,4	T1, T2	N1	M0	Spät-Karzinom
IIIB	64,1	T3, T4	N1	M0	
IIIC	44,3	Jedes T	N2	M0	
IV	8,1	Jedes T	Jedes N	M1	

UICC - *Union internationale contre le cancer*; 5-JÜR – 5-Jahresüberlebensrate, * nach (O’Connell et al. 2004); T – Tumorausbreitung; N – Lymphknotenstatus; M – Metastasierung.

2.1.5 Epigenetik des kolorektalen Karzinoms

Kolonkarzinome entwickeln sich meist aus Polypen der Dickdarmschleimhaut. Etwa 76% der Karzinome finden sich im Sigma und im Rektum, etwa 9% im absteigenden Kolon und im querverlaufenden Kolon, etwa 4% im aufsteigenden Kolon und 11% sind im gesamten Kolon verteilt (Zois et al. 2011). 70-80% der KRK entwickeln sich aus Adenomen nach dem Prinzip der Adenom-Karzinom-Sequenz, welches Vogelstein et al. 1988 beschrieben (Arvelo et al. 2015; Nagawa und Muto 1999). Dieses Prinzip basiert auf der konsekutiven Anhäufung genetischer Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen mit dem morphologischen Wandel der Kolonschleimhaut. Es werden dabei drei Grundmechanismen voneinander unterschieden: Der *traditionelle*, der *alternative* und der *serratierte* Signalweg. Der *traditionelle* Signalweg wird durch

chromosomale Instabilität (CIN) hervorgerufen, welche im Rahmen von Chromosomenaberrationen auch zu einer Akkumulation von Mutationen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen führt. Der *alternative* Signalweg zeichnet sich größtenteils durch Mikrosatelliteninstabilität (MSI) aus, die wiederum auf Mutationen des Mismatch-Reparatur-Systems (MMR) basiert. Bei dem *serratierten* Signalweg wird die Genrepressionen durch epigenetische Ereignisse verändert, wie z. B. die Hypermethylierung von Promotorregionen und Histon-Deacetylierung, welche als CpG-Insel-Methylations-Phänotyp (CIMP) bezeichnet werden (Mompalao 2003).

Etwa 50-70% der sporadischen KKR entstehen über den *traditionellen* Signalweg, 10-30% über den *alternativen* Signalweg und etwa 10-20% über den *serratierten* Signalweg (Pancione et al. 2012).

2.1.5.1 Der *traditionelle* Signalweg

Die Gene des *traditionellen* Signalwegs gehören zu den Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen, welche die Zellteilung kontrollieren. Wenn zwei Kopien dieser Gene beschädigt sind, kann das entsprechende Genprodukt nicht mehr hergestellt werden und die Zellen verlieren die Kontrolle über ihr Wachstum (Deininger 1999). Frühe Ereignisse des *traditionellen* Signalwegs stellen die Mutation und den Verlust des Tumorsuppressorgens *APC* (*Adenomatosis Polyposis Coli*) dar.

Das *APC*-Gen spielt eine entscheidende Rolle in den zellulären Prozessen. Indem es hilft zu kontrollieren, wie häufig sich eine Zelle teilt, stellt es den Initiationschritt in der Adenom-Karzinom-Sequenz dar. Es reguliert die Aktivität des β -Catenins durch Phosphorylierung (Deininger 1999; Fodde et al. 2001). Bei diesem ersten Schritt entsteht aus gesundem Epithel ein mikroskopisch erkennbarer aberranter Kryptenfokus (ACF). Im weiteren Verlauf kann es zu einer Mutation von *k-ras* (*v-Ki-ras2 = Kirsten rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) kommen, gefolgt von weiteren genetischen Veränderungen wie einer Inaktivierung der Tumorsuppressorgene *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*) und *C-MYC* (*Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*). Dies begünstigt in der weiteren Abfolge die Entwicklung des ACF zu tubulären Adenomen. Der Übergang vom späten Adenom in das manifeste Karzinom wird wahrscheinlich erst durch eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *p53* ausgelöst (Abb. 5) (Jo und Chung 2005; Pino und Chung 2010).

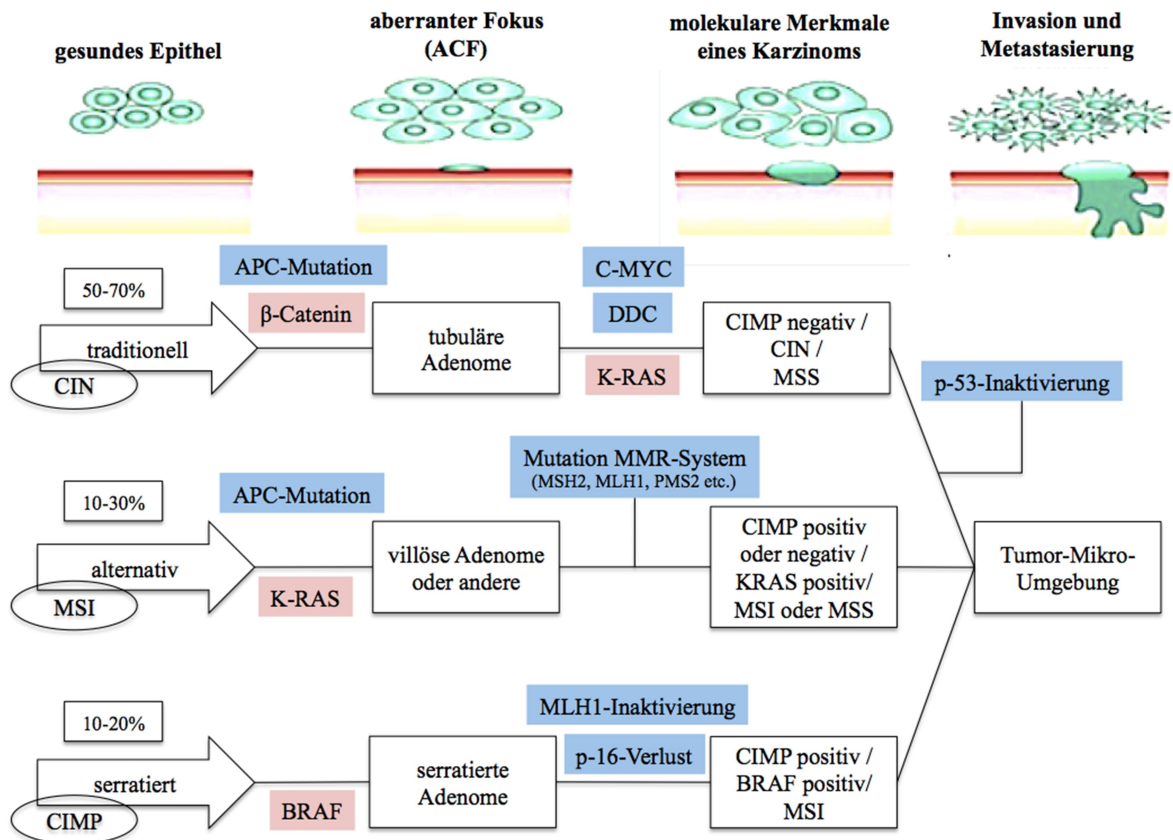


Abbildung 5 Fortschreitende somatische Mutationen bei der Entwicklung von Kolonkarzinomen. Kumulative Veränderungen verschiedener Gene liegen der progressiven Veränderung normaler Epithelzellen zu Adenomen und voll entwickelten Karzinomen zugrunde. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (hellblau) sowie die Aktivierung von Onkogenen (rosa) sind involviert. Tumor-Mikro-Umgebung bezeichnet man als das unmittelbare Umfeld eines Tumors.. ACF = Aberranter Kryptenfokus, BRAF = Rapidly growing fibrosarcoma type B, CIMP = CpG-Insel-Methylations-Phänotyp, CIN = chromosomale Instabilität, C-MYC = Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog, DDC = Deleted in Colorectal Cancer, K-RAS = Kirsten rat sarcoma, MLH1= MutL protein homolog 1, Mismatch Reparaturprotein, MSH2 = MutS protein homolog 2, Mismatch Reparaturprotein, MSI = Mikrosatelliteninstabilität, MSS = Mikrosatellitenstabil, PMS2 = PMS1 homolog 2, Mismatch Reparaturprotein (Abbildung modifiziert nach Aoki et al. 2007; Pancione et al. 2012; Carethers und Jung 2015).

Eine autosomal-dominant vererbte Keimbahnmutation des *APC*-Gens kennzeichnet das familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)-Syndrom (Grodin et al. 1991; Soravia et al. 1998). Klinisch-charakteristisch beim FAP-Syndrom ist eine Polypose mit mehr als 100 Polypen im Darm. Dabei zeigen sich die ersten Polypen bei Patienten durchschnittlich im Alter von 16 Jahren. Die Patienten erkranken meist bis zum 55. Lebensjahr an einem KRK (Ahmed 2020; Bruch und Trentz 2008).

2.1.5.2 Der *alternative* Signalweg

Bei dem *alternativen* Signalweg werden entstandene DNA-Fehler in der Replikation nicht mehr erkannt. Hier basiert die Entstehung des Krebsleidens auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Als Mikrosatelliten werden repetitiv konservierte

Mono- bis Tetranukleotidsequenzen bezeichnet, die über das ganze Genom verteilt vorkommen. An diesen Stellen häufen sich natürliche Replikationsfehler, die durch das intakte Mismatch-Reparatursystem (MMR) erkannt und korrigiert werden. Wird dessen Expression unterbunden, kommt es zu vermehrter MSI, die die kolorektale Karzinogenese beschleunigt, indem sie die Wahrscheinlichkeit zusätzlicher Mutationen erhöht (Cappell 2007) (Abb. 5). Auf der molekularen Basis von Keimbahnmutationen in den Genen des MMR entwickelt sich das *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC) Syndrom (Akiyama et al. 1997; Nicolaides et al. 1994). Bei Patienten mit HNPCC lässt sich in den Tumoren MSI nachweisen. Mit ca. 3% der Kolon- und Rektumkarzinome stellt das HNPCC die häufigste Entität der autosomal-dominant vererbten Dickdarmkrebskrankungen dar (Nallamilli und Hegde 2017). Mittlerweile sind fünf Gene des MMR identifiziert, deren Keimbahnmutation das HNPCC Syndrom bedingt (*hMLH1* 49%, *hMSH2* 38%, *hPMS2* 2%, *hMLH3* 2% und *hPMS1* 0,3%) (Hisamuddin und Yang 2006; Müller und Fishel 2002; Piscitello und Edwards 2020).

2.1.5.3 Der serratierte Signalweg

Beim serratierten Karzinogeneseweg entwickelt sich ein KRK über serratierte Polypen. Auf dem molekularen Level beginnt dieser Karzinogeneseweg im *BRAF* (*Rapidly growing fibrosarcoma type B*)-Gen mit Störung der Apoptose der Kryptenepithelien, gefolgt von einer Zellalterung mit epigenetischen Promotor(CpG)-Methylierungen und konsekutiven Genausfällen (z.B. *MLH1* und *p16*) sowie der Entwicklung einer meist hohen MSI (Patai 2013, Baretton 2010). Schritte des serratierten Signalwegs (CIMP) können an den anderen beiden Signalwegen mitwirken, z. B. an der MSI durch Hypermethylierung des *MHL1* (Abb. 5) (Ahmed 2020; Carethers und Jung 2015).

2.1.6 Prognose und Diagnose des Kolonkarzinoms

Zu den Symptomen des KRKs gehören neben Änderungen der Stuhlgewohnheiten sowie ein häufiger Wechsel zwischen flüssigen und festen Stühlen auch Blutbeimengungen im Stuhl. Die wichtigsten Screeningmethoden bei Verdacht auf Darmkrebs sind die digital-rektale Untersuchung, der fäkale okkulte Bluttest (FOBT) und die Darmspiegelung (Koloskopie). Der FOBT beruht auf der Feststellung, dass KRK häufiger bluten als die normale Darmmukosa oder andere Darmerkrankungen. Der gebräuchlichste Test ist der Hämoccult-Test, der auf der Pseudoperoxidaseaktivität von

Hämoglobin beruht, die in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid eine Blaufärbung von Guaiac-Harz hervorruft. Mit einer Spezifität von 78-97% und einer Sensitivität von 65-80% konnte sich dieser Test in der Vorsorge für Karzinome etablieren (van Ballegooijen et al. 2003; Elsafi et al. 2015; Kaur und Adamski 2020; Khakimov et al. 2015). Weitere positive Merkmale des FOBT sind die leichte, nicht invasive Durchführbarkeit und die geringen Kosten. Der Test zeigt allerdings eine hohe Störanfälligkeit verursacht durch die Durchführung, Einnahme von Medikamenten und die Aufnahme bestimmter Nahrungsmittel, die zu falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen führen können. Auch wird durch diesen Test die Ursache des gastrointestinalen Blutverlustes nicht aufgedeckt, weshalb er für eine alleinige Vorsorgeuntersuchung nicht ausreichend ist (Pignone et al. 2001; Young et al. 1996). Die Koloskopie ist daher die präferierte Folgeuntersuchung nach einer positivem FOBT. Dabei können die Schleimhäute des unteren Verdauungstrakts vom Rektum bis in das terminale Ileum beurteilt werden. Aus verdächtigen Bereichen können hierbei Gewebeproben entnommen und nachfolgend histopathologisch beurteilt werden.

KRKs werden aufgrund von unspezifischen Symptomen meist erst in späten Stadien entdeckt. Trotz der zur Verfügung stehenden Screening-Methoden zur Früherkennung haben rund 70% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium erreicht (Jemal et al. 2010). Die Erkennung von Darmkrebs im Frühstadium ist wichtig, um die Heilungs- und Überlebenschancen zu verbessern (Midgley und Kerr 1999; Zois et al. 2011). Durch regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen kann das Risiko signifikant gesenkt werden, an Darmkrebs zu versterben (Quintero et al. 2012; Săftoiu et al. 2020; Zauber et al. 2012; Zois et al. 2011). Derzeit ermöglichen die gesetzlichen Krankenkassen im Rahmen des Krebsfrüherkennungsprogramms ab dem 45. Lebensjahr eine jährliche Untersuchung des Stuhls auf okkultes Blut mittels Hämoccult-Test sowie eine digitale rektale Untersuchung. Da ab einem Alter von 50 Jahren die Inzidenz für das Auftreten eines KRK deutlich ansteigt, wird in Deutschland bei allen Menschen über 50 Jahren eine Darmspiegelung empfohlen (Allescher und Weingart 2019; Birkner 2003).

Bestätigt sich das Vorliegen von Darmkrebs, sind weitere Analysen notwendig, um die Ausbreitung des Tumors zu bestimmen. Dazu gehören die Ultraschalluntersuchung, eine Computertomographie (CT) des Bauchraumes sowie Röntgenaufnahmen der Lunge.

Die Therapie des Darmkrebses erfolgt abhängig von der Lokalisation, der Eindringtiefe in andere Strukturen und der Metastasierung durch Operationen, Bestrahlungen, Chemotherapie oder palliative Maßnahmen. Die 5-Jahres-Überlebensrate für KRK im UICC-Stadium I beträgt 80-95%, im Stadium II 65-75%, im Stadium III 25-60% und im Stadium IV lediglich weniger als 7% (Tab. 2) (O'Connell et al. 2004; Sobin et al. 2009).

2.1.7 Tumormarker des kolorektalen Karzinoms

Tumormarker sind Substanzen unterschiedlicher Stoffklassen (DNA, RNA, Proteine, insbesondere Enzyme und Hormone), welche bei malignen Erkrankungen in erhöhten oder erniedrigten Konzentrationen in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blut, nachgewiesen werden können. Es gibt verschiedene Klassen von Tumormarkern. Tumor-assoziierte Antigene (TAA) sind Tumormarker, die auf dem Nachweis mittels monoklonaler Antikörper beruhen, die sowohl von Tumor- als auch vom Normalgewebe exprimiert werden (Ahn et al. 1982). Diese potentiell als Tumormarker verwendeten Antigene entstehen entweder in der Tumorzelle selbst (*Tumor-Derived-Product*) oder in anderen Geweben (*Tumor-Associated-Product*).

Tumormarker sollten idealerweise folgende Merkmale besitzen:

- Erfassung maligner Tumoren im Frühstadium
- Unterscheidung zwischen Gesunden und Tumor-Patienten sowie Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen
- Tumor- und Organspezifität
- Korrelation von Konzentration und Tumormasse
- Fähigkeit zur prognostischen Aussage
- Hilfe bei Therapieentscheidung
- Hinweise auf Metastasen und Rezidive

Da Blutproben zur Analyse von Tumormarkern jederzeit als nicht-invasive Untersuchungsmethode von Patienten abgenommen werden können, bieten sie ein großes Potential für eine verbesserte Patientenakzeptanz in der Durchführung einer Darmkrebsvorsorge. Ebenso wäre die Untersuchung des Blutes auf Tumormarker im Gegensatz zum FOBT unanfällig gegenüber Störungsfaktoren, wie z.B. der Ernährung,

der Einnahme von Medikamenten oder gastrointestinalen Infektionen (vergleiche Abschnitt 2.1.6).

2.1.7.1 Carcinoembryonales Antigen

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ein bereits etablierter Tumormarker beim KRK und besteht aus einem Protein-Polysaccharid-Komplex, dessen Bildung postnatal unterdrückt wird. Deshalb kann es beim gesunden Erwachsenen kaum nachgewiesen werden.

Die Wahrscheinlichkeit, Darmkrebs im Frühstadium richtig anzuzeigen (Sensitivität), ist gering, steigt aber mit voranschreitendem Stadium der Erkrankung. Ausgehend von einem gemessenen CEA-Spiegel $>2,5$ ng/mL wird eine Sensitivität von 36% bei einer Spezifität von 87% für Patienten mit KRK im Stadium I und II beschrieben. Bei Patienten mit Stadium III und IV der Erkrankung wird eine Sensitivität von 74% und 83% erreicht (Fletcher 1986). Die geringe Verlässlichkeit für diesen Marker bei KRK im Frühstadium macht ihn leider ungeeignet für die Darmkrebsfrüherkennung. Da eine Korrelation zwischen fortgeschrittenen TNM-Stadien des KRK und einem positiven CEA-Wert bestätigt ist, bleibt das CEA der am häufigsten verwendete Prognosemarker für das KRK (Odeny et al. 2019; Sisik et al. 2013). In der Nachsorge kann der CEA-Spiegel im Blut zudem wichtige Hinweise auf ein Lokalrezidiv oder Metastasen liefern (Lamerz und Stieber 2004; Amri et al. 2013).

2.1.7.2 Carbohydrat-Antigen 19-9

Das Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9) ist ein mit monoklonalen Antikörpern versehenes Kohlehydratepitop gegen humane Kolonkarzinomzellen (Koprowski et al. 1981). Es stellt den Zweitmarker nach CEA für die Diagnostik, Verlaufskontrolle und die Nachsorge bei KRK dar. CA 19-9 besitzt eine hohe intraindividuelle Variabilität und lässt aus diesem Grund auch falsch-positive Aussagen zu (Galli et al. 2013; Scarà et al. 2015). Es reagiert positiv mit den meisten Tumorzellen des gastrointestinalen Traktes, einschließlich den Adenokarzinomen des Magens, des Darms und des Pankreas. Die Sensitivität für Darmkrebs liegt jedoch nur bei 47,8%, die Spezifität bei 90,1% (Filella et al. 1994; Zhang et al. 2015). Prognostisch ist das CA 19-9 als eigenständiger Marker zu betrachten. Mehrere Studien belegten, dass die CA 19-9-Freisetzung zum Zeitpunkt der Primärdiagnostik des KRK einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt, der mit einer signifikant höheren Rezidivrate und einer

signifikant reduzierten 5-Jahres-Überlebensrate einhergeht (Kotzev 2019; Reiter et al. 2000).

2.1.7.3 Methyliertes Septin-9

Es ist bekannt, dass Tumore die DNA-Methylierung verändern und damit die Expression von Genen beeinflussen können. *Septin-9* (*SEPT-9*) ist ein solches Gen, das beim Darmkrebs verstärkt methyliert vorliegt (mSEPT-9). Die Studie von Church et al. zeigt für den durchschnittlichen Risikopatienten für Darmkrebs nur eine Detektionsrate von 48% mittels *SEPT-9* an (Church et al. 2014). Auch andere Analysen mit unterschiedlichen Prüfungsverfahren wurden in dieser Studie untersucht und suggerieren eine Sensitivität von 67% und eine Spezifität von 88%. Patienten mit KRK zeigen eine Sensitivität von nur 35% im Stadium I, 63% im Stadium II, 46% im Stadium III und 77% im Stadium IV (Church et al. 2014).

2.1.7.4 Weitere Tumormarker

Tumormarker wie TPA, CA 50, CA 242, hCG und S100 gehören in die Kategorie der Tumormarker der dritten Wahl. Ihre Aussagefähigkeit ist nicht sehr spezifisch und sie weisen eine geringere Sensitivität auf. In Einzelfällen können sie zur weiteren Kontrolle eines Tumorleidens eingesetzt werden (Levy et al. 2008).

2.1.7.5. Liquid Biopsy

Aufgrund der Tatsache, dass Tumorzellen ihre Erbinformation ins Blut oder andere Körperflüssigkeiten abgeben, entstanden blutbasierte Nukleinsäureanalysen, welche zum Nachweis von Tumorzellen bzw. Tumor-DNA im Blut dienen (Bettegowda et al. 2014; Mandel und Metais 1948). Hierfür wurde der Begriff der Flüssigbiopsie, englisch *liquid biopsy* etabliert. Anwendung von Flüssigbiopsien finden sich im Screening zur Früherkennung von Tumorerkrankungen, Einschätzung der molekularen Tumorheterogenität, Überwachung von Tumordynamik, Abschätzung des Metastasierungsrisikos sowie Erkennung einer Resistenzbildung bei laufender Tumorthherapie (Diaz und Bardelli 2014). Allerdings ist die zellfreie Tumor-DNA nicht bei allen Tumorerkrankungen im Blut nachzuweisen. Es bestehen Unterschiede zwischen Tumortypen und deren jeweiligen Krebsstadien (Dahl et al. 2015). Die *liquid biopsy* wird zukünftig zusehends die Routinediagnostik dominieren und umfasst nicht

nur verschiedene Kompartimente (zirkulierende Tumorzellen, Immunzellen, Thrombozyten, Serum, Plasma, Liquor, Urin u.a.) sondern auch auch Analyte hieraus wie z.B. frei zirkulierende Tumor-DNA, RNA/microRNA, Proteine und Antikörper. Der große Vorteil der *liquid biopsy* findet sich in der leichten Zugänglichkeit. Sie ist risikoarm und wiederholbar durchführbar. Thrombozyten stellen einen Großteil der festen Bestandteile des Blutes und sind so in ausreichender Menge bei jeder Blutentnahme zur Diagnostik vorhanden (Anderson und Anderson 2002; Jacobs et al. 2005). Darüber hinaus sprechen die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und zirkulierenden Tumorzellen für eine besondere Bedeutung von Thrombozyten im Rahmen des Krebses mit Potential für die Früherkennung.

2.2 Verwendung von Thrombozyten zur Früherkennung vom kolorektalen Karzinom

Thrombozyten besitzen die Fähigkeit, Proteine, Nukleinsäuren oder andere extrazelluläre Abschnürungen, die sich im Blut ansammeln können, aufzunehmen oder abzugeben. Somit spiegeln sie Veränderungen des Stoffwechsels wider. Es ist davon auszugehen, dass bestimmte Proteinkonzentrationen bei Vorhandensein von Krebs entweder verstärkt oder vermindert im Thrombozytenproteom vorkommen. Diese veränderten Proteinlevel können z.B. untersucht werden, um sie als Biomarker zur Darmkrebsfrüherkennung zu nutzen (Jacobs et al. 2005).

Einen weiteren Vorteil der Analyse von Thrombozyten besteht darin, dass sie die Intratumorheterogenität adressieren und reflektieren können (Best et al. 2015). Intratumorheterogenität beschreibt die Unterschiede zwischen Krebszellen innerhalb eines Tumors. Sie entsteht durch genetische und epigenetische Verschiedenheiten zwischen Krebszellen. Dies führt zur Entstehung von diversen Gruppen von Krebszellen innerhalb eines Tumors, den sogenannten Subpopulationen oder Zellklonen (Bacelli et al. 2013). Die Komplexität eines Tumors kann die Therapiewahl und Therapieeffektivität erschweren. Thrombozyten und deren Proteinprofil bzw. Proteinspiegel als Tumormarker zu verwenden, könnte somit nicht für die Früherkennung sondern auch für die Therapielenkung von großer Bedeutung sein.

2.2.1 Eigenschaften und Funktion von Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind kleine Zellbestandteile im Blut, die eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung nach Verletzung des Gefäßsystems einnehmen. Thrombozyten werden im Knochenmark im Rahmen der Hämatopoese produziert und gehen dabei als kleine Abschnürungen aus Megakaryozyten hervor. Ein gesunder Mensch besitzt ca. 150.000 bis 300.000 Thrombozyten pro Mikroliter Blut (Ross et al. 1988).

Blutplättchen sind mit 2-4 μm Durchmesser und einer Dicke von 0,5-0,75 μm die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile. Sie besitzen keinen Zellkern und somit keine Proteinexpression (Gremmel et al. 2016). Die durchschnittliche Zirkulationszeit im Blut beträgt 5-7 Tage (Sierko und Wojtukiewicz 2007). Durch verschiedene Rezeptoren und Glykoproteinkomplexe, die in der Plättchenmembran eingebaut sind, nimmt der Thrombozyt an Adhäsions- und Aggregationsvorgängen teil (Peerschke 1992; Rosenblum 1997; White 1994, 1979). Thrombozyten enthalten verschiedene Organellen, unter anderem unterschiedliche Granula, welche als Speicherorte für Proteine fungieren (Abb. 6).

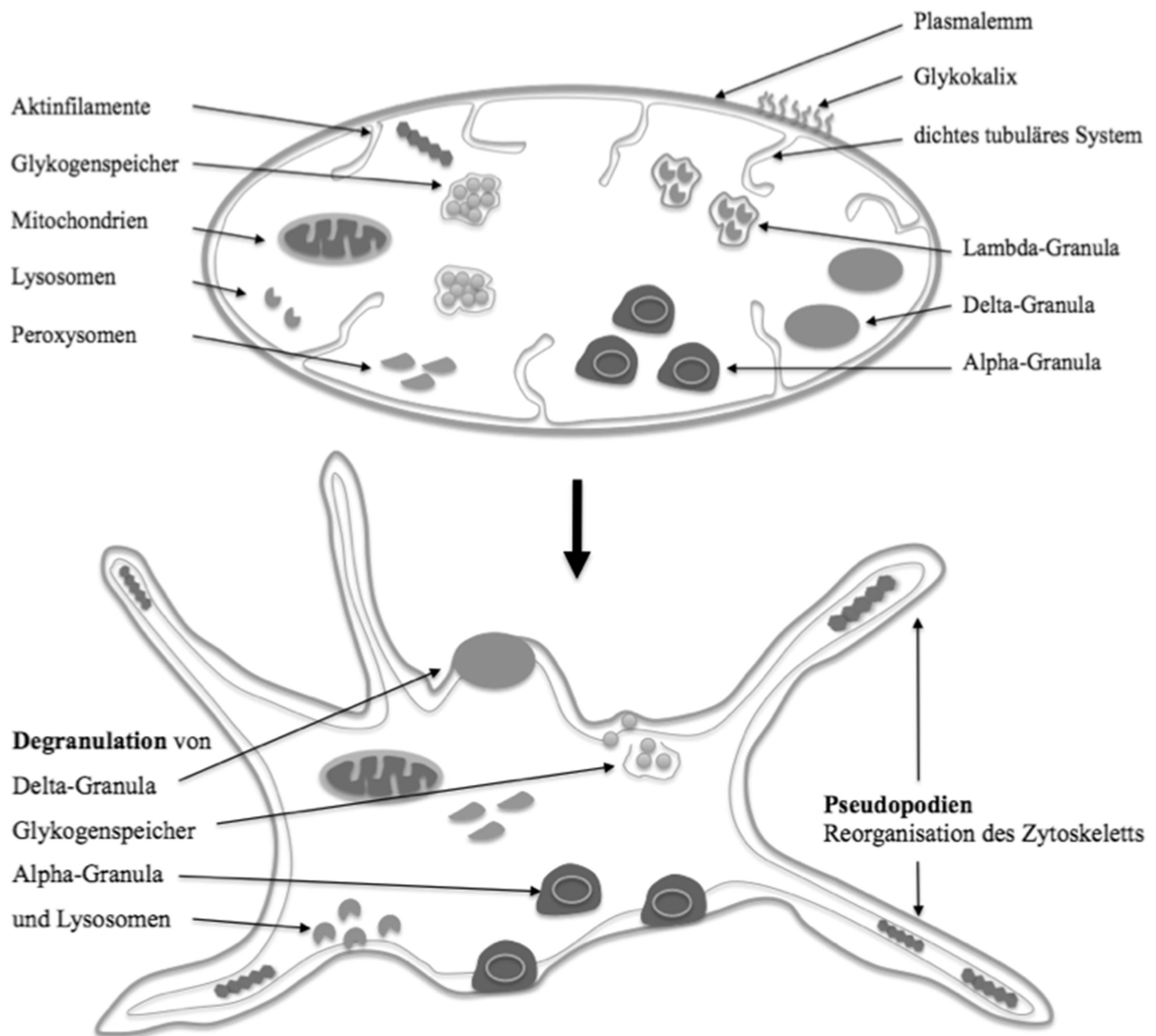


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Ultrastruktur eines ruhenden Thrombozyten (oben) und eines aktivierten Thrombozyten (unten) (Abbildung modifiziert nach Gawaz 1999). Adhärente und aktivierte Thrombozyten schütten mittels Exozytose eine Vielzahl verschiedener Granula aus (Abbildung modifiziert nach Jurk und Kehrel, 2010).

Mit 80% bilden die α -Granula den Hauptteil der zytoplasmatischen Granula. Diese enthalten hauptsächlich Gerinnungsfaktoren, Fibrinogen, Wachstumsfaktoren, Plasminogen und Plasminogenaktivatorinhibitoren. Elektronendichte Granula (*dense bodies* oder Delta-Granula), die ATP, ADP, Histamin und Serotonin enthalten, und lysosomenhaltige Granula (Lambda-Granula), die Lysosomen und verschiedene Hydrolasen speichern, machen jeweils etwa 10% aus. Die Inhaltsstoffe der α - und σ -Granula sind vor allem in der initialen Blutgerinnungsphase für die Plättchenaggregation, Blutkoagulation und Vasokonstriktion verantwortlich. Die Inhalte der Lambda-Granula dienen hauptsächlich der Resorption des Blutgerinnsels in der späteren Phase der Wundheilung (Gremmel et al. 2016; Reed et al. 2000; Rendu und Brohard-Bohn 2001).

Im Blut zirkulierende Thrombozyten müssen Scherkräften widerstehen. Für den Erhalt der diskoiden Form sind das Mikrotubulussystem und vernetzte Aktinfilamente, die

unter anderem mit Spektrin interagieren, von wichtiger Bedeutung. Durch unterschiedliche Substanzen und Reize können die Plättchen aktiviert werden. Das äußert sich durch die Veränderung in der Struktur mit der Bildung von verzweigten Fortsätzen (Abb. 6). Die Thrombozyten verkleben nun mit den freigelegten subendothelialen Strukturen, wie z.B. nach einem Gewebedefekt. Haften weitere Thrombozyten aneinander, bildet sich ein Thrombozytenaggregat, das die Gefäßläsion verschließt (Gawaz 1999; Savage et al. 1998).

2.2.2 Thrombozyten als Mediatoren der hämatogenen Tumormetastasierung

Die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten stellt einen Schlüsselprozess bei hämatogenen Metastasierungsprozessen dar. Thrombozyten vermitteln die endotheliale und leukozytäre Adhäsion zirkulierender Tumorzellen in der Mikrozirkulation von Wirtsgeweben und nachfolgende Migration in deren Parenchym. Zudem sezernieren aktivierte Thrombozyten tumorzell-mitogene Substanzen, die die Neoangiogenese induzieren und somit zum Tumorwachstum beitragen (Bambace und Holmes 2011; Goubran et al. 2014; Schlesinger 2018; Sierko und Wojtukiewicz 2004). In der Blutbahn von Patienten mit hämatogenen Tumoren sind vermehrt Assoziate zwischen Tumorzellen und Thrombozyten auffindbar (Jurk und Kehrel, 2010). Daher wird vermutet, dass Thrombozyten während der Ausbreitung der Krebszellen über die Blutbahn eine wichtige Rolle spielen, indem sie Tumorzellen vor dem Angriff von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) schützen und somit zum Überleben zirkulierender Tumorzellen und zur Metastasierung beitragen. Die Thrombozyten formen protektive Aggregate mit Tumorzellen, die ausgeschüttete Zytokine der NK-Zellen behindern (Cluxton et al. 2019; Gay und Felding-Habermann 2011; Labelle et al. 2011). Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen, wie aktivierte Thrombozyten mit Tumorzellen interagieren und somit deren Funktion beeinflussen, sind bisher nur unzureichend bekannt. Den Thrombozyten konnten bereits Rollen und Mechanismen in der Tumorangio-genese und des Tumorwachstums zugeschrieben werden, wie z.B. die Aufnahme und Abgabe von Regulatoren der Angiogenese sowie die Interaktion mit der Tumorzelle und deren Eskorte (Goubran et al. 2014; Italiano et al. 2008; Sabrkhany et al. 2011) (Abb. 7).

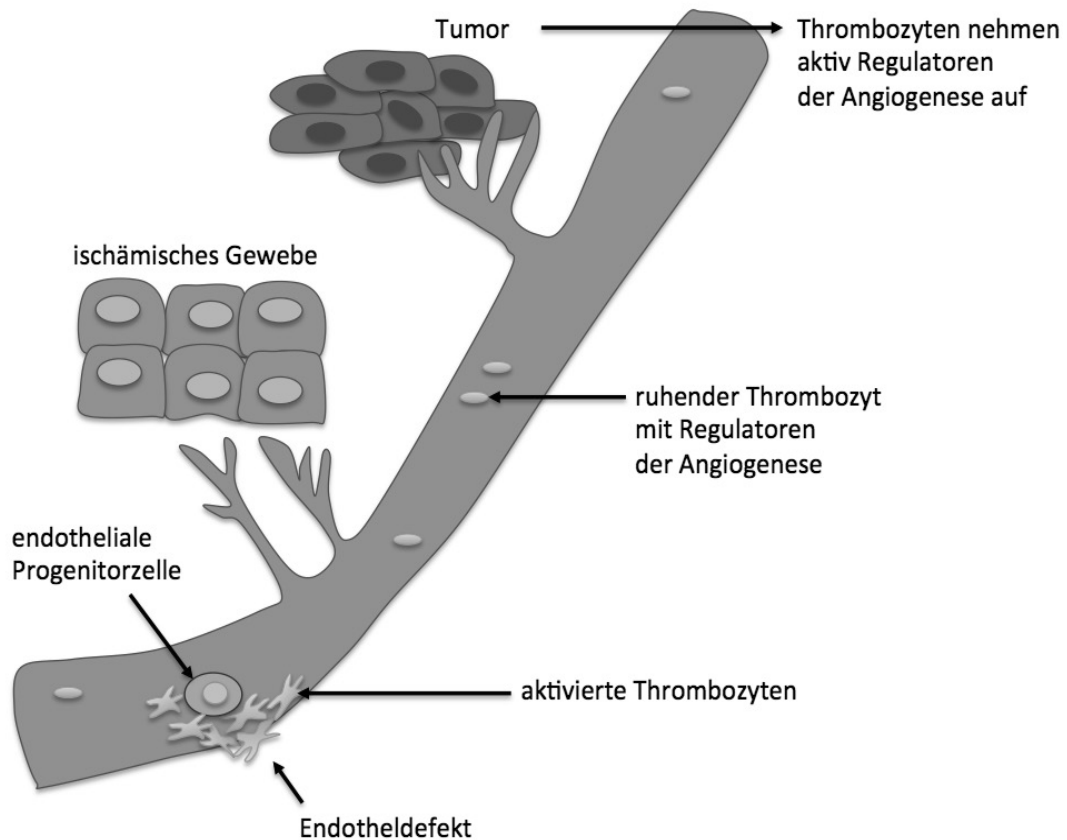


Abbildung 7 Thrombozyten sorgen für den Erhalt des Endothels und beeinflussen die Angiogenese. Die Thrombozyten rekrutieren Progenitorzellen für die Reendothelialisierung in ischämische Gewebe, für die Gefäßneubildung zur Kollateralenbildung und bei Tumorwachstum (Abbildung modifiziert nach Jurk und Kehrel, 2010).

Eine Überlebensstrategie der Tumorzellen besteht darin, Zell-Zell-Interaktionen einzugehen, z.B. von Tumorzellen untereinander oder mit Thrombozyten. Palumbo et al. beschäftigten sich mit der Hypothese, dass Thrombozyten die Tumorzellen vor dem Angriff von NK-Zellen schützen, und zeigten dieses anhand von Fibrinogen-knock-out-Mäusen, die bei Verlust der Plättchenaktivität eine Abnahme der Metastasierung zeigten (Palumbo et al. 2005). Ob und wie die Thrombozyten diesen Schutz vor NK-Zellen bieten, wurde jedoch noch nicht im Detail aufgeklärt.

Nachdem Tumorzellen die Blutbahn verlassen haben, sorgen Mediatoren aus aktivierten Thrombozyten dafür, dass diese Tumorzellen erneut einen Kontakt zur Blutversorgung sicherstellen können, indem sie die Tumorangiogenese und damit das Wachstum der unproliferierten Tochterzellen fördern (Asghar et al. 2019; Jurk und Kehrel 2010; Sierko und Wojtukiewicz 2004).

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der geringen Akzeptanz zur Durchführung einer Koloskopie und fehlender sicherer Screeningmarker zur Früherkennung von Darmkrebs ist es von großem Interesse, neue Methoden zur Darmkrebsfrüherkennung zu entwickeln, die ohne großen Aufwand durchführbar sind und eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Durchführung einer Blutanalyse zur Untersuchung auf veränderte Parameter bei Patienten mit Darmkrebs weist eine einfache Handhabung auf und ist gering invasiv durchführbar. Voruntersuchungen zeigten, dass sich die Proteinzusammensetzung und -expression von Thrombozyten durch den Kontakt zu Tumorzellen eines Karzinoms ändert. Ob und in wieweit sich die Proteinzusammensetzung durch Vorhandensein eines KRK modifiziert, ist Inhalt dieser Arbeit. Daher wurde es in dieser Arbeit zum übergeordneten Ziel, Proteine zwischen der gesunden Kontrollgruppe und Patienten mit KRK im Frühstadium zu detektieren. Insbesondere standen dabei folgende Fragestellungen im Vordergrund:

1. Existieren unterschiedliche Proteinlevel bzw. verändert sich die Proteinzusammensetzung in Thrombozyten zwischen den einzelnen Gruppen (gesunde Kontrollgruppe, Patienten mit KRK im Frühstadium und Patienten mit KRK im Spätstadium), sodass man von einer veränderten Stoffwechsellage des Thrombozyten auf das Vorhandensein von Darmkrebs schließen kann, um daraus potentielle Tumormarker abzuleiten? Besonders interessant ist hierbei die Proteinzusammensetzung in Thrombozyten in frühen Stadien von Darmkrebs.
2. Lässt sich das Thrombozytenproteom mittels 2-DE DIGE analysieren, um es auf neue Tumormarker zu untersuchen?
3. Lassen sich die unterschiedlich exprimierte Proteine des Thrombozytenproteoms mittels MALDI-Massenspektrometrie identifizieren?
4. Lassen sich mittels Ingenuity Pathway-Analyse die Ergebnisse der Massenspektrometrie in Zusammenhang mit bekannten Stoffwechselwegen und biologischen Wechselbeziehungen bringen? Lassen sich so Rückschlüsse auf neue Tumormarker ziehen?
5. Lassen sich mittels Western Blot die Ergebnisse der vorausgegangenen Methoden validieren?
6. Besteht die Möglichkeit, Darmkrebsfrüherkennung auf eine Blutanalyse zu reduzieren?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Bromphenolblau	Merck, Schwalbach, Deutschland
Benzamidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA
Butyliertes Hydroxytoluol (BHT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA
3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propansulfat (CHAPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA
Dithiothreitol (DTT)	BioRad, München, Deutschland
ECL vorausgehendes Blockiermittel	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
EZQ Protein-Quantifizierungsreagenz	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	BioRad, München, Deutschland
Harnstoff	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iodacetamid (IAA)	BioRad, München, Deutschland
IPG-Strip-Puffer	BioRad, München, Deutschland
Laemmli-Puffer	BioRad, München, Deutschland
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	BioRad, München, Deutschland
Pharmalyte	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH), 45 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS-Puffer)	BioRad, München, Deutschland
TRIS-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (TBST)	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland
TRIS/Glycine/SDS-Puffer	BioRad, München, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, Montana, USA
Wasser, dest.	Millipore, Schwalbach, Deutschland

3.1.2 Puffer und Lösungen

3.1.2.1 Puffer und Lösungen für die Aufbereitung der Blutprobe / Thrombozytenisolierung

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland Katalog-Nr.: H31-002

3.1.2.2 Puffer und Lösungen für die Proteinbestimmung

<u>Chemikalie</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Waschpuffer	166 ml dest. Wasser 20 ml Methanol 14 ml Essigsäure
Stammlösung (10 mg/ml)	200 µl TBS-Puffer 2 mg Ovalbumin

3.1.2.3 Puffer und Lösungen für die Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

<u>Chemikalie</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Rehydrations-Puffer (25 ml)	10,5 g Harnstoff 3,8 g Thioharnstoff 0,5 g CHAPS Triton X-100 (10%) 250 µl IPG-Strip-Puffer 1 Spatelspitze Bromphenolblau 13,5 ml dest. Wasser 7 mg DTT/ 2,5 ml Aliquot unmittelbar vor Gebrauch angesetzt
Proben-Vorbereitungs-Puffer (25 ml)	12 g Harnstoff 1 g CHAPS 500 µl IPG-Puffer 154 mg DTT 16 ml dest. Wasser

3.1.2.4 Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE (2. Dimension)

<u>Chemikalie</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Lyse-Puffer (SOL-Puffer) (80 ml)	43,2 g Harnstoff 0,8 g DTT 30 mg EDTA 24 ml dest. Wasser 4 ml NP-40 (10%) 12,3 ml CHAPS (10%) 2,8 ml NaOH (1M) 80 µl PMSF (0,1%) 800 µl Benzamidine (1%) 160 µL BHT

Probenpuffer (DIGE-Puffer)	0,18 g Tris 21,00 g Harnstoff 7,60 g Thioharnstoff 2,00 g CHAPS
Äquilibrierpuffer I (DTT-Puffer) (400 ml)	13,4 ml 1.5 M TRIS (pH 8,8) 144,14g Harnstoff 138 ml 87% (w/v) Glycerin 8 g SDS Die Lösung wurde auf 400 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Zugabe von 0,1 g DTT pro 20 ml Equilibrierlösung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch.
Äquilibrierpuffer II (IAA-Puffer) (400 ml)	13,4 ml 1.5 M TRIS (pH 8,8) 144,14 g Harnstoff 138 ml 87% (w/v) Glycerin 8 g SDS Bromphenolblau Die Lösung wurde auf 400 ml mit dest. Wasser aufgefüllt. Zugabe von 0,25 g Iodacetamid pro 10 ml Equilibrierlösung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch.
TRIS-Lösung (1L)	181,7 g TRIS base Wurde durch HCl auf pH-Wert von 8,8 eingestellt und auf 1 l mit dest. Wasser aufgefüllt.
Anodenpuffer	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Kathodenpuffer	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland

3.1.2.5 Puffer und Lösungen für den Western Blot

<u>Chemikalie</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Blotpuffer (pH 8,3)	1,5 g Tris 7,2 g Glycin 300 ml Methanol bis 500 ml mit dest. Wasser aufgefüllt, 100 ml davon verworfen und auf 500 ml mit 100 % Methanol aufgefüllt.
Waschpuffer (TBST)	900 ml dest. Wasser 100 ml TBST
Blocking-Reagenz (2 %-ig)	2 g ECL Advance blocking agent 100 ml Waschpuffer
Laemmli-Puffer	95 µl Laemmli-Puffer 5 µl Mercaptoethanol
Laufpuffer	Tris/Glycin/SDS-Puffer in 1:10 Verdünnung mit dest. Wasser

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Hersteller</u>
Fluoreszenzfarbstoff Markierung	NH DyeAGNOSTIC, Halle (Saale), Deutschland
EDTA-Monovette 9ml, K3E	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Gefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterpapierstreifen	BioRad, München, Deutschland
Deaktivierungslösung der G-Farbstoff Markierung (G-Dye-Labeling-Stop- Solution)	NH DyeAGNOSTIC, Halle (Saale), Deutschland
Hybond-LFP Membran	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Klebefolie für 96-Well-Platte	O. Kindler, Freiburg im Breisgau, Deutschland
Mikro-Schraubröhre 1,5ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Plastikwanne mit Millipore-Wasser	Einzelhandel
ReadyPrep 2-D Cleanup Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
Sicherheitsverschluss Mikroröhrchen 2ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platte	Nunce Serving Lifescience, Basel, Schweiz
96-Well-Reaktionsplatte	Intavis Bioanalytical Instruments, Köln, Deutschland

3.1.4 Geräte

Gerät

Criterion vertikale Elektrophoresezelle
Ettan Spot Picker
Gefrierschrank

HPE FlatTop Tower
Milli-Q System
Pipetten
PROTEAN IEF Cell
Typhoon FLA 9000-Scanner
Waagen

Hersteller

Bio-Rad, München, Deutschland
GE Healthcare, Solingen, Deutschland
SERVA Electrophoresis, Heidelberg,
Deutschland
Gelcompany, Tübingen, Deutschland
Millipore, Schwalbach, Deutschland
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
BioRad, München, Deutschland
GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Scaltec, Göttingen, Deutschland

Software

ImageQuant TL software
Ingenuity Pathway Analysis (IPA)
software
LabScan

Graph Pad PRISM

Progenesis SameSpots

SPSS Statistics
Trans-Blot Turbo Transfer System

Hersteller, Version

GE Healthcare, Solingen, Deutschland
QIAGEN Silicon Valley, Redwood
City, Kalifornien, USA
GE Healthcare, Solingen, Deutschland,
v6.0
GraphPad software, La Jolla,
Kalifornien, USA, v5.04
Nonlinear Dynamics, Newcastle-
Gateshead, UK, v4.1
IBM, Ehningen, Deutschland, v22
Bio-Rad, München, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Patientencharakteristika

Im Rahmen der experimentellen Arbeit wurden Blutproben von sieben Patienten mit KRK im Frühstadium (UICC I & II), fünf Patienten mit KRK im Spätstadium (UICC III & IV) und von 12 gesunden Kontrollpersonen untersucht. Zur Proteinvalidierung mittels Western Blot wurde eine unabhängige Kohorte mit Blutproben von jeweils fünf Patienten im Früh- und Spätstadium bei KRK und 12 gesunden Kontrollpersonen verwendet. Angaben über Alter, Geschlecht und Krankheitsmerkmale der Patienten der einzelnen Patientenkollektive für 2-D DIGE und Western Blot sind aus den Tabellen 3 und 4 zu entnehmen. Für dieses Projekt liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck mit dem Aktenzeichen 07-124 vor.

Tabelle 3 Biografische Daten des Patientenkollektivs für die Proteinanalyse mittels 2-DE Gelelektrophorese.

	Gesunde Kontrollen	Früh-Karzinome	Spät-Karzinome
Anzahl der Proben	12	7	5
Altersbereich in Jahren	40 – 87	53 – 82	69 - 81
Altersdurchschnitt in Jahren	62,5	66,3	72,9
Geschlecht männlich/weiblich	3 / 9	3 / 4	3 / 2
UICC			
I	-	2	-
II	-	5	-
III	-	-	4
IV	-	-	1
Tumor Grading			
G1	-	-	-
G2	-	7	2
G3	-	-	3

UICC - *Union internationale contre le cancer* (deutsch Internationale Vereinigung gegen Krebs) beschäftigt sich mit der Prävention, Therapie und Erforschung von Krebserkrankungen. Die UICC publiziert die TNM-Klassifikation zum Staging von Tumorerkrankungen (**Sobin et al. 2009**).

Tabelle 4 Biografische Daten des Patientenkollektivs zur Validierung mittels Western Blot.

	Gesunde Kontrollen	Früh-Karzinome	Spät-Karzinome
Anzahl der Proben	12	5	5
Altersbereich in Jahren	31 – 79	55 – 78	48 – 84
Altersdurchschnitt	52,8	68,1	63,7
Geschlecht männlich/weiblich	6 / 6	3 / 2	2 / 3
UICC			
I	-	-	-
II	-	5	-
III	-	-	3
IV	-	-	2
Tumor Grading			
G1	-	-	-
G2	-	3	4
G3	-	2	1

UICC - *Union internationale contre le cancer* (deutsch Internationale Vereinigung gegen Krebs) beschäftigt sich mit der Prävention, Therapie und Erforschung von Krebserkrankungen. Die UICC publiziert die TNM-Klassifikation zum Staging von Tumorerkrankungen (Sobin et al. 2009).

3.2.2 Gewinnung und Herstellung des Probenmaterials/Thrombozytenisolierung

Zur Thrombozytenisolierung wurde venöses in EDTA-Monovetten abgenommenes Blut bei 200 x g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Ca. 700 µl des Plasmas wurden abgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Das Plasma wurde in 2- bis 3-facher Menge, bis das Eppendorfgefäß vollständig gefüllt war, mit PBS verdünnt und bei 800 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Daraus resultierte ein Pellet, welches anschließend in 1 ml PBS gelöst wurde. Der Rückstand wurde dann in ein abgewogenes Probenröhrchen überführt und bei 800 x g für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut abgenommen, das Pellet gewogen und in SOL-Puffer gelöst. Die Menge an SOL in Mikroliter entsprach dabei dem 6-fachen Pelletgewicht in Milligramm. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Das Proteom der Thrombozyten wurde mittels 2-D DIGE aufgetrennt. Die 2-D DIGE ist eine Methode, um intakte Proteine und komplexe Proteingemische aus Zellen, Geweben oder anderen biologischen Materialien zu analysieren. Hierbei werden in zwei orthogonal aufeinanderfolgenden Schritten Proteine nach dem isoelektrischen Punkt (1. Dimension) und der Größe (2. Dimension) aufgetrennt. Bereits 1975 wurde dieses Verfahren von O'Farrell zur Trennung komplexer Proteingemische entwickelt, wodurch es möglich ist, bis zu 5.000 Proteine aufzutrennen (Görg et al. 2004; O'Farrell 1975). Weiteren Fortschritt erlangte diese Technik durch die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten von Görg 1988 (Görg et al. 1988). Die 2-D DIGE ermöglicht es, Aussagen zur Probenqualität zu treffen und posttranslationale Modifikationen zu detektieren. Als initialer Schritt der 2-D DIGE wurde eine Markierung der Proteine mit den Fluoreszenzfarbstoffen G-Dye100, G-Dye200 und G-Dye300 durchgeführt. G-Farbstoffe verfügen über einen aktivierten N-hydroxysuccinimidyl-Ester, der für eine kovalente Bindung an Lysinreste in Proteinen sorgt. Ein besonderer Aspekt an der 2-D DIGE ist die Möglichkeit, die Farbstoffe unabhängig voneinander zu detektieren, sodass der Vergleich dreier probenspezifischer Muster möglich ist (Difference Gel Elektrophoresis, DIGE). Der Marker G-Dye100 wird hierbei als interner Standard (IS) eingesetzt. Der IS repräsentiert ein Mischungsverhältnis gleicher Menge jeder Probe. Um eine gelübergreifende Auswertung und Vergleichbarkeit der einzelnen Proben zu ermöglichen, wurden die Proben zusammen mit dem IS auf ein Gel aufgetragen. Dieser dient als interne Referenz, welche auf die jeweilige Proteinexpression in einem Gel bezogen werden kann (Diez et al. 2010).

Die Separation in der 1. Dimension erfolgte durch isoelektrische Fokussierung (IEF) entsprechend dem isoelektrischen Punkt (pI). Am pI eines Proteins, der von der Zusammensetzung der Aminosäuren abhängig ist, heben sich die positiven und negativen Ladungen auf. Das Protein besitzt an diesem Punkt keine Nettoladung mehr und bewegt sich nicht in einem elektrischen Feld und würde bei Anfärbung als scharfe Bande detektiert werden (Abb. 8, Abschnitt a). Zur Fokussierung wurde das Proteingemisch auf 24 cm lange Gelstreifen mit eingelassenen, immobilisierten Molekülen pipettiert, die den pH-Gradienten von 4-7 erzeugten (Immobilized pH gradient: IPG). An die 1. Dimension schloss sich die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) als 2. Dimension an. In diesem Schritt wurden die Proteine nach der molekularen Masse (Mr) aufgetrennt. Dazu wurden die

Proteine auf den Gelstreifen vertikal zur ersten Dimension auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die auf Gelstreifen aufgetrennten Proteine wurden vorbereitend in SDS-haltigem Puffer äquilibriert, um allen Proteinen eine negative Ladung proportional zu ihrer Größe zu übertragen (Abb. 8, Abschnitt b). Beim Anlegen elektrischer Spannung wanderten negativ geladene Proteine gemäß ihrer Größe zur Anode. Die Wanderungs-geschwindigkeit und Wanderungsstrecke sind dabei von der molekularen Masse abhängig. Kleinere Proteine wanderten aufgrund geringerer Wechselwirkungen mit der Matrix schneller in dem Gel als größere Proteine (Abb. 8, Abschnitt c). Im nachfolgenden Schritt wurden die Proteine über ihre gebundenen Fluoreszenzstoffe detektiert.

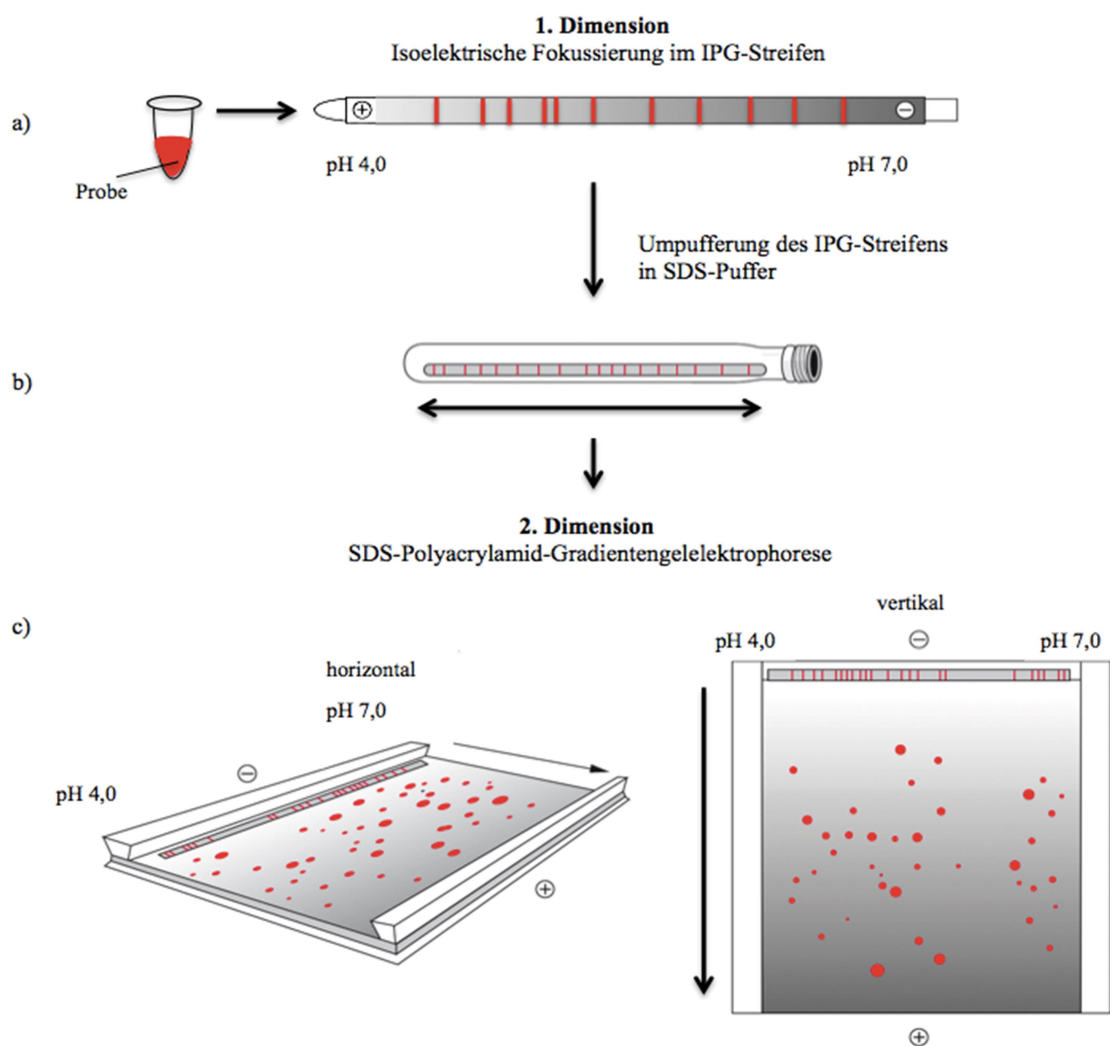


Abbildung 8 Prinzip der 2-Dimensionalen Gelelektrophorese. a: Proteine werden zunächst in der 1. Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt und fokussiert (Isoelektrische Fokussierung). Dazu werden IPG-Gelstreifen verwendet, bei denen die Ampholytmoleküle kovalent an die Polyacrylamidmatrix gebunden sind, um einen stabilen pH-Gradienten zu erzeugen. b: Die Proteine werden durch SDS einheitlich negativ geladen (Äquilibration). c: In der 2. Dimension werden die fokussierten Proteine der 1. Dimension nach ihrer molekularen Masse getrennt. Je nach ihrem Molekulargewicht wandern die Proteine bei angelegter Spannung unterschiedlich schnell in Richtung Anode (Abbildung modifiziert nach Lottspeich/Engels, Bioanalytik, 2. Auflage, 2006 Elsevier GmbH).

3.2.3.1 Aufreinigung des Probenmaterials

Die Aufreinigung diente der Entsalzung, Aufkonzentrierung und Umpufferung der isolierten Thrombozyten, sowie zur anschließenden Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen für die nachfolgende 2-D DIGE. Störende Komponenten wie Salze, Nukleinsäuren, Lipide und ionische Detergenzien wurden durch diese Prozedur entfernt. Die Aufbereitung erfolgte nach dem Protokoll des ReadyPrep 2-D Cleanup Kits von Bio-Rad (München, Deutschland). Nach Abschluss der Aufbereitung wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3.2 Proteinbestimmung

Um vergleichbare Proteinmengen für die einzelnen Läufe der 2-D DIGE zu applizieren, wurde eine Proteinbestimmung mithilfe des EZQ *protein quantitation kit* (Life Technologies, Darmstadt) durchgeführt.

Die Proteinbestimmung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden die Proben für die Standardreihe hergestellt, anhand dessen die zu untersuchenden Proteinkonzentrationen bestimmt wurden. Dazu wurden aus einer Stammlösung von 20 mg/ml einzelne Standards mit DIGE-Puffer mit einem Konzentrationsbereich von 5 mg/ml bis 0,03125 mg/ml generiert. Für die 4-fach-Bestimmung der einzelnen Proben wurde eine 96-well-Mikroplatte mit einem Filterpapier verwendet und die einzelnen Proben in Form der Mikrotiterplatte auf das Filterpapier pipettiert. Das getrocknete Papier wurde in einer Plastikschiene mit 40 ml Methanol bedeckt und ausgefällt. Dafür wurde die Membran für 5 min inkubiert, das Methanol abgegossen und das Filterpapier zum erneuten Trocknen gelegt. Anschließend wurde das Papier mit 40 ml EZQ *protein quantitation reagent* für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Dieser Vorgang diente zur Detektion der Proben. Danach wurde das EZQ Protein-Quantifizierungsreagenz vollständig durch Abkippen entfernt und drei Mal in Folge für jeweils zwei Minuten mit Wasch-Buffer gespült. Alle Proben wurden nach der Detektion mithilfe des Typhoon FLA 9000 gescannt und bezüglich ihrer Konzentration mit Hilfe des Software-Analyseprogramms ImageQuant TL ausgewertet.

3.2.3.3 Labeling

Um einzelne Proteine in der 2-D DIGE sichtbar zu machen, wurden die Proben mittels Fluoreszenzfarbstoffen (G-Dye 100, G-Dye 200 und G-Dye 300; NH DyeAGNOSTIC

Refraktion-2D labling kit, Halle) markiert. Die Vorteile einer Fluoreszenzmarkierung liegen in der Normalisierung gegen einen internen Standard pro Gel, der simultanen Analyse mehrerer Proben pro Gel und in der sehr sensitiven Detektionsgrenze von einer Proteinmenge von bis zu 0,03 ng. Zudem werden bei einer Bindung (*Labeling*) an die Lysinreste nur etwa 3% des Gesamtproteins markiert. Alle Punkte resultieren wiederum in einer Zeitersparnis und einer besseren Vergleichbarkeit bzw. Quantifizierung der Proben untereinander.

Für die 2-D DIGE wurden jeweils zwei Proben mit je einem unterschiedlichen Farbstoff (G-Dye 200 und G-Dye 300) markiert und der IS (mit G-Dye 100 markiert) in eine auf dem Strip vorgestanzte Lücke aufgetragen. Die Herstellung der Arbeitslösung (G-Dye Working Solution) sowie der Vorgang der Markierung von Proteinproben wurden nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 50 µg Protein in ein Reaktionsgefäß transferiert, mit Probenpuffer auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und kurz zentrifugiert. 1 µl der Arbeitslösung wurde hinzugegeben und für exakt 30 min auf Eis inkubiert und durch die Zugabe von 1 µl aktiviertem Fluoreszenzlabel (G-Dye-Labeling-Stop-Solution) gestoppt. Erneut wurde das Reaktionsgemisch für 10 min auf Eis inkubiert.

3.2.3.4 Erste Dimension-isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung der Thrombozyten wurde mit der PROTEAN IEF Cell durchgeführt. Hierfür wurden 24 cm lange IPG-Gelstreifen mit einem pH-Bereich von vier bis sieben verwendet, um eine optimale Auflösung und die größtmögliche Ladekapazität zu erreichen. Für jede IEF wurden 50 µg Protein pro Probe (pro Lauf jeweils zwei Thrombozytenproben) und 50 µg des IS mit Rehydrations-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 450µl verdünnt.

Die gesamte Suspension aus Proben und Puffergemisch wurde gleichmäßig in den Rufen der PROTEAN IEF Cell verteilt, mit IPG-Gelstreifen bedeckt und mit Öl beschichtet, um diese vor Austrocknung bzw. Auskristallisation zu schützen.

Über Nacht wurden alle IPG-Streifen zur Rehydrierung in der IEF Kammer bei 50 V vor der eigentlichen Fokussierung inkubiert. Unter die Enden der Gelstreifen wurde jeweils ein mit 10 µl destilliertem Wasser getränktes Elektrodenfilterpapier gelegt und stündlich gewechselt.

Während der unterschiedlichen Läufe wurden max. 57.747 Voltstunden erreicht. Die Temperatur innerhalb des Gerätes betrug während des gesamten Vorganges stets 20°C. Nach Beendigung der isoelektrischen Fokussierung sind die Proteine nach ihrem pH-Wert aufgetrennt. Die Strips wurden in eine Plastikfolie eingeschweißt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.2.3.5 Zweite Dimension-isoelektrische Fokussierung

Bevor die Gelstrips aus der IEF weiterverwendet werden konnten, mussten sie für die SDS-Page umgepuffert werden. Die Proteine wurden dafür mit SDS beladen, um die Eigenladung der Proteine zu überdecken, sodass anionische Mizellen mit einer konstanten Nettoladung pro Masseneinheit entstanden.

Die Strips wurden im ersten Schritt für 15 min mit dem Äquilibrierpuffer I inkubiert. DTT reduzierte dabei die Disulfidbrücken der Cystine innerhalb des äquilibrierten Proteins und führte zur Proteinfaltung. Nachdem das DTT entfernt wurde, folgte der zweite Schritt. In diesem wurden 6 ml des Äquilibrierpuffers II für 15 min beigelegt, der mittels IAA die SH-Gruppen alkylierte und diese vor erneuter Oxidation schützte. Beide Puffer enthielten SDS, das sich an Proteine anlagerte, um die Proteine proportional zu ihrer Größe negativ zu laden.

Für die Auftrennung in der 2. Dimension wurde die Keramikfläche des FlatTop-Towers mit 4 ml Kühlflüssigkeit benetzt und auf diese die Gelplatten mit der Gelseite nach oben gelegt. Zuvor wurden die Strips in die vorgesehene Vertiefung der Gelplatten eingelassen. An den Enden der Anode und Kathode der Gele wurden mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Dabei lag der Anodenstreifen auf der gegenüberliegenden Seite des IPG-Streifens, damit die negativ geladenen Proteine ihrer Ladung folgend über die Polyacrylamid-Platte Richtung Kathode wandern konnten.

Nach Anschließen des Stromes betrug die Gesamtlaufzeit 6 Stunden bei 40 mA und 30 W pro Gel. Nach Beendigung des Laufes befanden sich alle Proteine in der nach ihrer Molekülgröße und ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennten Position auf dem Gel.

3.2.3.6 Digitalisierung und Auswertung der 2-DE Gele

Nachdem die fluoreszenzstoffmarkierte 2-D DIGE durchgeführt wurde, konnten die Gele mit Hilfe des Typhoon FLA 9000 Laser Scanners digitalisiert werden (Abb. 9). Unter Digitalisierung versteht man das Messen der Absorptionswerte und die Transformation dieser Analogwerte in eine digitale Form, die der Computer mittels spezieller Software (LabScan) interpretieren kann. In drei Scanvorgängen mit unterschiedlichen Filtern wurden die drei Farbstoffe der Fluoreszenzfärbung detektiert. Um die optimale Graustufe für das jeweilige Gel zu finden, wurde die bestmögliche Spannung für jeden Scan gewählt.

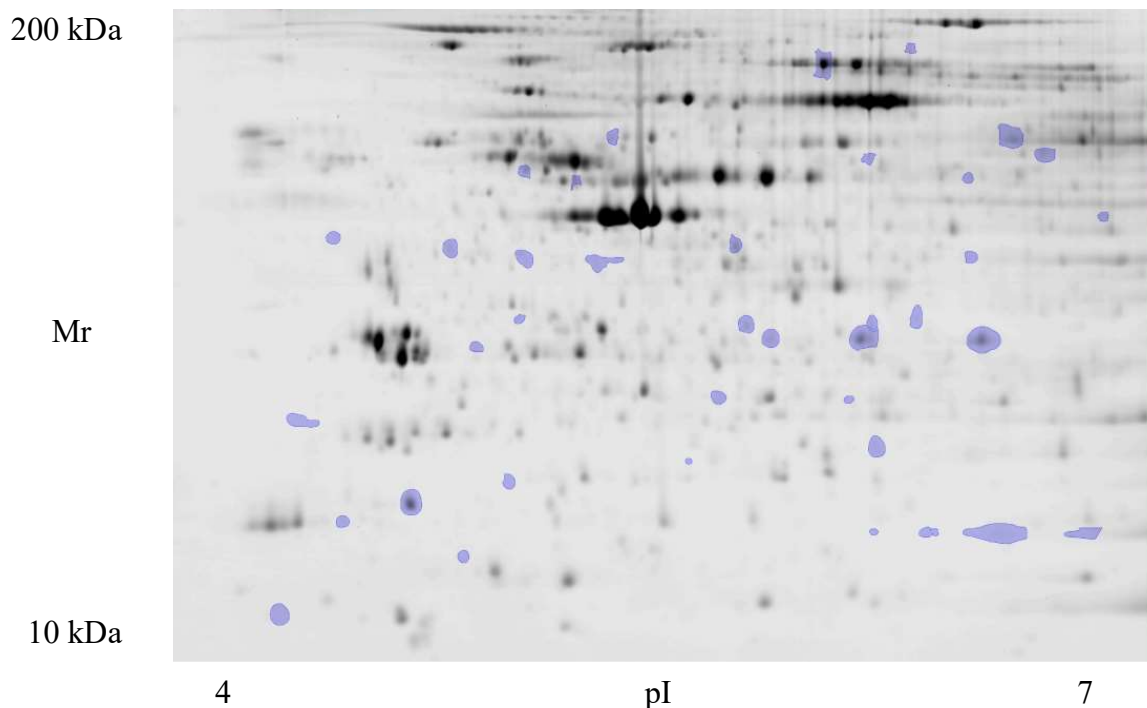


Abbildung 9 Exemplarisches Bild des 2-DE-Gel-Scans mit blaumarkierten signifikanten Proteinspots für den Vergleich Kontrollgruppe gegen Kolonkarzinom. Die Proteine wurden nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und ihrer molekularen Masse (M_r) in Kilodalton (kDa) aufgetrennt. Blau markierte Spots wurden mittels eines Spot-Picking-Roboters ausgestanzt.

3.2.4 Auswertung und Statistik der 2-D DIGE Gele

Insgesamt wurden 12 Gele mit 24 Proben eingescannt und mit dem Bildanalyseprogramm Progenesis SameSpots v. 4.1. ausgewertet. Inhalt der Analyse war die Proteinspot-Detektion, Background-Subtraktion und relative Quantifizierung. Progenesis SameSpots ermöglichte es, einen computerbasierten Gelvergleich durchzuführen. Die statistische Auswertung mittels integrierter Varianzanalyse konnte

nach der Spotdetektion aller Gele derselben Gruppe (hier Kontrolle, Früh- und Spätkarzinom) erfolgen.

Aufgrund der einfachen Umsetzung stellt die Principal Components Analyse (PCA) eine weit verbreitete Methode zur Dimensionsreduktion und Visualisierung von Daten dar. Sie bietet eine Möglichkeit, die Datenmenge auf ein gewünschtes Maß zu reduzieren. Dies bildet die Grundlage für das Anwenden von Klassifikationsverfahren und erleichtert die anschließende Erkennung von Mustern (Jolliffe 2002).

Anhand des statistischen Analysetools der PCA konnten die Beziehungen der unterschiedlichen Proben grafisch dargestellt werden. Die in den Graphen abgebildeten Daten ließen sich in direktem und indirektem Vergleich sowie *supervised* und *unsupervised* darstellen. Dabei entsprach jeder Punkt dem gesamten Expressionsprofil aller differenziell exprimierten Proteine einer Probe. Je nach Expressionswert nahm dieser Punkt eine bestimmte Position in dem Graphen ein. Des Weiteren zeigten die PCA-Graphen an, ob sich Ausreißer in den Daten befanden und ob die zu den jeweiligen Versuchsbedingungen passenden Daten Cluster bildeten. In dem Abschnitt ‚Ergebnisse‘ wurden der Dreigruppenvergleich (Kontrolle versus Frühkarzinom versus Spätkarzinom) und der Zweigruppenvergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Frühkarzinomgruppe als PCA dargestellt. Alle signifikanten Spots wurden nachfolgend mittels eines Spot-Picking-Roboters (Ettan Spot Picker) ausgestanzt.

3.2.5 MALDI-Massenspektrometrie

MALDI (*matrix-assisted laser-desorption ionization*) dient der Strukturaufklärung bzw. Proteinidentifikation. Mit der Entwicklung schonender Ionisationsverfahren (Karas und Hillenkamp 1988; Karas et al. 2000) wurde es erstmals möglich, vollständige Proteine aus der kondensierten oder flüssigen Phase ins Vakuum eines Massenspektrometers zu überführen. Die Technik eröffnete die Analyse von Substanzen in einen Massenbereich von über 100 kDa bei einem minimalen Probenbedarf. Das MALDI-Time-of-Flight (TOF)-Massenspektrometer besteht aus drei Hauptkomponenten (Abb. 10): 1. Der Ionenquelle, die mit Hilfe eines Lasers die Moleküle mobilisiert und ionisiert, 2. einer Massenanalytoreinheit zur Massenbestimmung, Selektierung und Fragmentierung der Ionen sowie 3. der Detektoreinheit, die Ionen registriert und diese in einem elektrischen Signal in Form eines Massenspektrums graphisch darstellt.

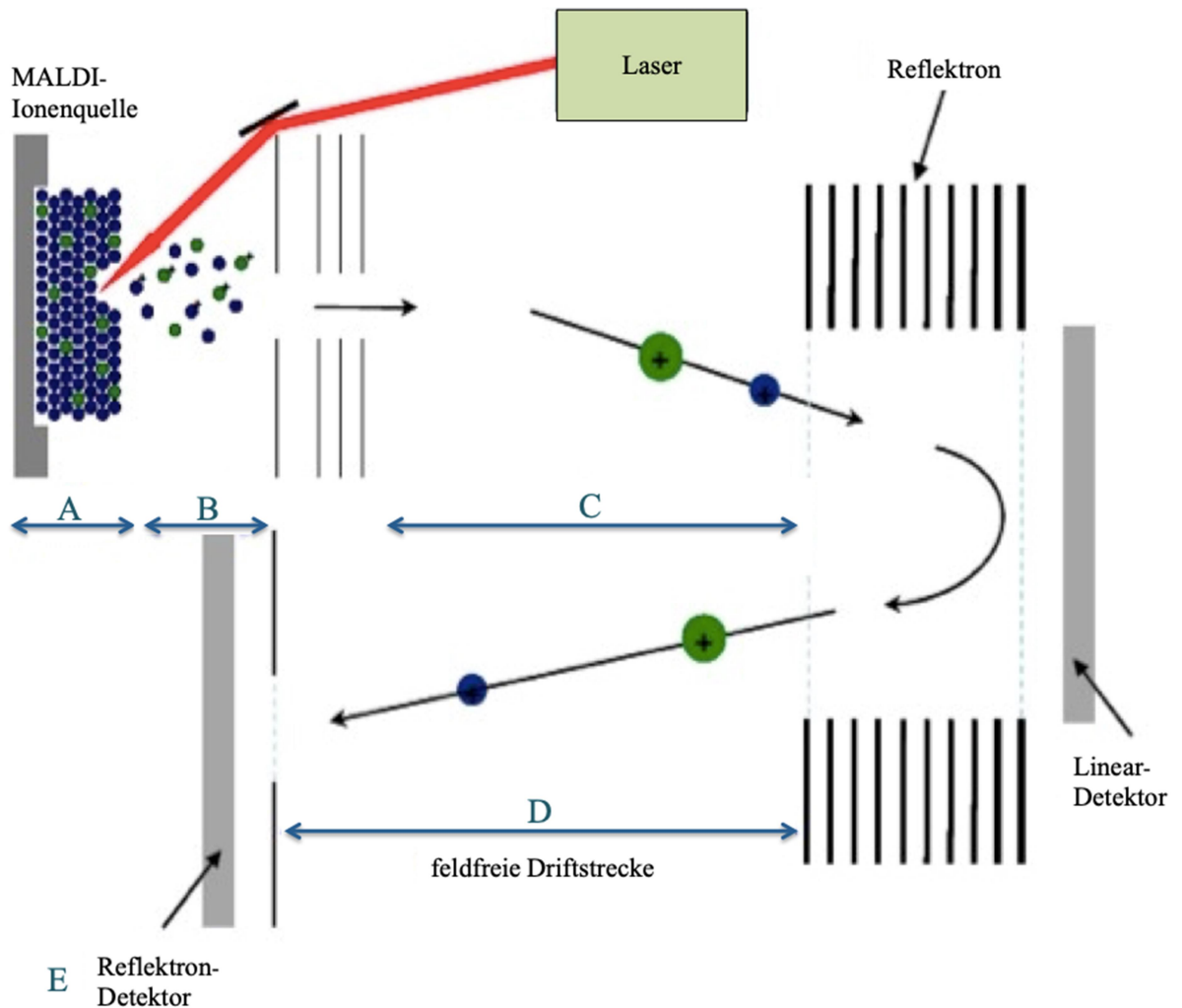


Abbildung 10 Schematische Darstellung der MALDI-TOF. Analyten mit einer größeren molekularen Masse benötigen eine längere Zeit zum Durchqueren der feldfreien Flugstrecke. A: Proben­träger setzt sich zusammen aus Matrix und Untersuchungsgut. B: Im Schritt der Ionisierung lösen sich die ionisierten Analytmoleküle aus dem Träger. C: In der Beschleunigungselektrode werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt. D: In einer feldfreien Driftstrecke hängt die Geschwindigkeit der Ionen vom Masse-Ladungs-Verhältnis ab. E: In dem Time-of-Flight-Detektor wird die Flugzeit der Ionen aufgezeichnet (Modifiziert nach A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications, F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic, 2007).

Bei der MALDI-Präparation wurde der Analyt mit einem Überschuss einer niedermolekularen organischen Verbindung, der sogenannten Matrix, auf einem MALDI-Proben­teller kristallisiert. Dieser wurde nach Einbringen in die Ionenquelle des Massenspektrometers im Hochvakuum mit kurzen Pulsen (3 ns) eines Lasers bestrahlt. Das Prinzip der MALD-Ionisation basierte auf der Absorption von Laserenergie durch eine HCCA- (α -Cyano-4-hydroxycimtsäure) Matrix und einer dadurch ausgelösten explosiven Ablation einer dünnen Oberflächenschicht. In deren Verlauf wurden neben Matrixmolekülen auch ionisierte Analytmoleküle freigesetzt und in die Gasphase überführt (Abb. 10 Abschnitt A und B).

Die Ionen wurden nach ihrer Freisetzung in einem elektrischen Feld beschleunigt (Abb.

10 Abschnitt C) und im angeschlossenen TOF-Analysator nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt. Das Prinzip der Flugzeitmessung basiert auf der Bestimmung der Flugzeit von Ionen auf einer feldfreien Flugstrecke. Nach der Beschleunigung wurden die Ionenpakete während des Fluges in einem evakuierten Flugrohr in Abhängigkeit ihres Masse-Ladungsverhältnisses aufgetrennt (Abb. 10 Abschnitt D). Protein-Ionen mit einem geringeren Gewicht erreichten als erste die Detektionsplatte und schwere folgten später. So konnte bei dem Auftreffen der Ionen auf die Detektionsplatte ein elektrisches Signal in Form eines Massenspektrums erzeugt werden.

Zur Extraktion der Peptide aus den Gelstückchen der 2-D DIGE wurde auf die jeweilige Probe 1% TFA pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt nach der Gewinnung wurden 4 µl der extrahierten Peptide auf das Prespotted AnchorChip MALDI Target (BRUKER Daltonics, USA) pipettiert. Nach Antrocknen bei Raumtemperatur kam das MALDI Target zur Vermessung in das UltraflexFlex TOF/TOF Massenspektrometer (BRUKER Daltonics, USA). Die Proben wurden im Automatik-Modus mit 25 kV Beschleunigungsspannung im positiven Ionenmodus vermessen. Zur Analyse der generierten Proteinspektren wurde die Datenbank SwissProt mit der humanen sub-Datenbank herangezogen.

3.2.6 Ingenuity Pathway Analyse (IPA)

Die Ingenuity Pathway Analyse (IPA) ist eine häufig genutzte vergleichende Datenbank und Software basierend auf der *Ingenuity Pathways Knowledge Datenbank* (IPKD). Die IPA bietet die Möglichkeit, die Beteiligung von signifikant unterschiedlich exprimierten Genen und/oder Proteinen an bereits bekannten Stoffwechselwegen und Proteinnetzwerken darzustellen. Mit der Eingabe der Daten der zuvor mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteinen in das IPA-Programm ließen sich wertvolle Ansätze zur Funktionsanalyse finden, um die biologischen Zusammenhänge der experimentellen Daten zu verstehen. Die Proteindaten wurden in das Programm geladen und mit der IPKD sowie der *Kyoto Encyclopädie of Genes and Genomes* (KEGG) auf deren biologische Funktionen und Interaktionen mit anderen Proteinen und Stoffwechselwegen verglichen.

Die IPA ermittelt somit Gruppen von Proteinen, die zusammen durch direkte oder indirekte Interaktionen untereinander Netzwerke formen. Diese Netzwerke können

anhand eines Scores eingeordnet und verglichen werden. Dieser Score beschreibt als numerischer Wert die Zufallswahrscheinlichkeit, mit der Proteine in einem gemeinsamen Netzwerk auftauchen. Die Bewertung berücksichtigt die Anzahl der netzwerkfähigen Proteine sowie die Gesamtzahl der analysierten netzwerkfähigen Proteine in der IPA-Datenbank. Die Bewertung ist kein Hinweis auf die Qualität oder biologische Relevanz des Netzwerks. Es berechnet lediglich die Zufallswahrscheinlichkeit zwischen dem Netzwerk und seinen netzwerkfähigen Molekülen.

3.2.7 Validierung mittels Western Blot

Zum Nachweis der Enzym-Antigene wurde ein Immunotest angewandt, der auf dem Einsatz zweier verschiedener Antikörper beruht. Ein an den zweiten Antikörper gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff sorgte für die Sichtbarmachung des Antigens, welches an das entsprechende Protein gebunden hat.

Zunächst wurde die Proteinkonzentration bestimmt, um die gewünschte Proteinmenge anschließend mit dem Probenverdünnungspuffer (TBS-Puffer) zu verdünnen. Alle Proben wurden 1:1 mit Laemmli-Puffer und Mercaptoethanol verdünnt. Danach wurden die Proben bei 95 °C 5 min, darauffolgend 5 min lang bei 4°C inkubiert und anschließend 2 min bei 10000 x g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Kammern vorbereitet und mit den Gelen bestückt. Der Kammereinsatz wurde mit Laufpuffer befüllt. Die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und für 40 min bei 200 V aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min mit Blotpuffer äquilibriert. Die Hybond-LFP-Membran wurde 20 sec. in 100%igem Methanol aktiviert. In das Trans-Blot Turbo Blotting System wurde zunächst in der ersten Lage ein Filterpapier eingefügt, auf welches die zuvor äquilibrierte Membran gelegt wurde. Auf diese Lage wurde das Gel appliziert; abschließend wurde darauf erneut eine Lage Filterpapier gegeben (Abb. 11). Dieser Blot lief mit 25 V für 30 min. Währenddessen wurden pro Gel je 2 Falcons mit 10 bzw. 35 ml Blockierungsreagenz befüllt. Nach dem Lauf wurde die Membran direkt in Blocking-Reagenz gegeben. Die Inkubation fand für 60 min bei Raumtemperatur und abgedunkelt auf einem Schüttler statt.

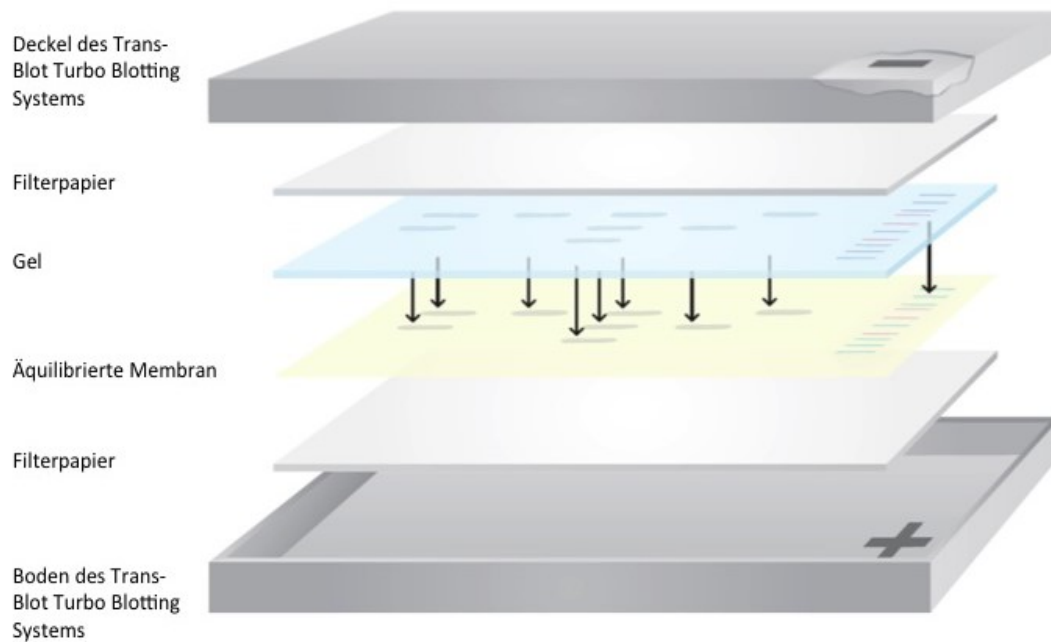


Abbildung 11 Schematischer Aufbau des Western Blots im Trans-Turbo Blotting System (Modifiziert nach Handbuch Trans-Blot Turbo Blotting System von Bio-Rad, Katalognummer 170-4155).

Der Primärantikörper wurde in 10 ml Blocking-Reagenz verdünnt. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörpergemisch für 1,5 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Diese wurde drei Mal mit Waschpuffer gereinigt und im Anschluss vier Mal für 5 min auf dem Schüttler mit Waschpuffer gewaschen.

Der Sekundärantikörper wurde 1:2.500 in 35 ml Blocking-Reagenz verdünnt, zu der Membran gegeben und für 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Gele wurden drei Mal mit Waschpuffer, anschließend vier Mal für 5 min mit Waschpuffer auf dem Schüttler belassen und danach noch drei Mal mit TBS-Puffer gewaschen. Die Membran wurde auf ein Filterpapier gelegt und lichtgeschützt bei 37°C mindestens 1 h getrocknet.

Die Detektion fand im Fluoreszenz-Scanner Typhoon FLA 9000 statt. Mit dem Software-Analyseprogramm ImageQuant TL wurden die durch die unterschiedlichen Proteine erzeugten Banden auf den Membranen ausgewertet. Das Programm erstellte Histogramme, die es erlaubten, das gesamte Volumen der aufgetragenen Probe über die Bandenbreite und die Fläche zu berechnen. Anschließend wurde das Volumen der Bande des jeweiligen Proteins gemessen und gegen das Volumen von GAPDH normalisiert. Zur Bestätigung der Ergebnisse des ausgewählten Kollektivs der 2-D DIGE wurde ein neues Patientenkollektiv für die Validierung mittels Western Blot angelegt (Tab. 4). Der Western Blot wurde mit Hintergrundsubtraktion (Rolling Ball)

durchgeführt. Ein schematisierter Ablauf der 2-D DIGE basierten Proteinexpressionsstudie findet sich in Abbildung 12.

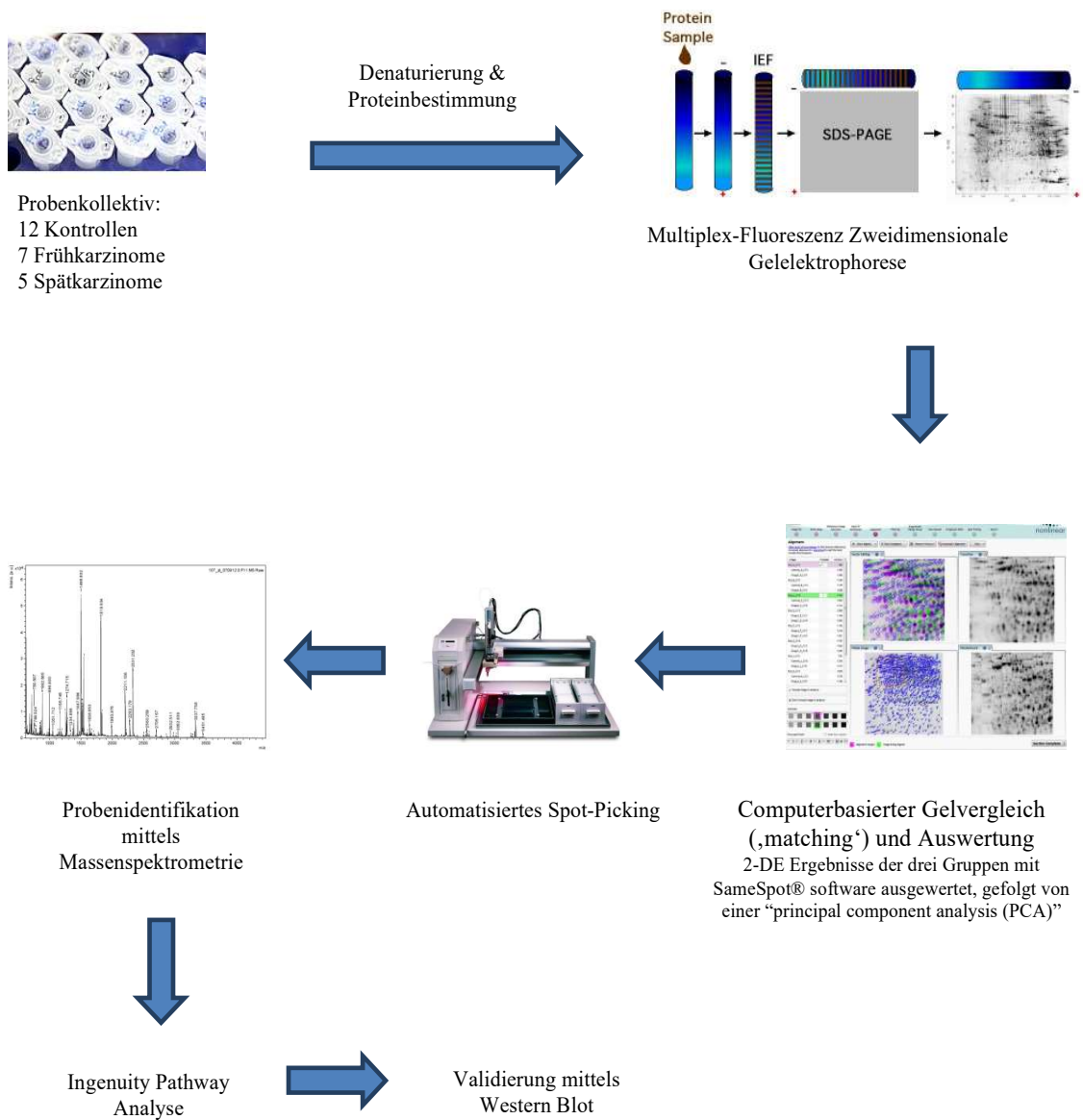


Abbildung 12 Schematisierter Ablauf der 2-DE basierten Proteinexpressionsstudie. Von den Schritten der Probenauswahl, über die Aufbereitung der Proben, bis zur Multiplex-Fluoreszenz Gelelektrophorese mit anschließendem computerbasierten Gelvergleich. Für die Probenidentifikation mittels MALDI-Massenspektrometrie wurden die einzelnen Spots von einem Spot-Picking-Roboter aus den Gelen ausgestanzt. Die Validierung der Proteinspots wurde mittels Western Blot durchgeführt.

3.2.8 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden durch Prof. Dr. Timo Gemoll supervidiert. Die Daten aus der 2-D DIGE Protein-Expression-Analyse wurden mittels der Progenesis SameSpot Software auf Unterschiede in dem Proteingehalt geprüft, aufgeteilt und ließen folgende Gruppenvergleiche zu:

- 1- gesunde Kontrollgruppe vs. Gruppe Früh-Karzinom vs. Gruppe Spät-Karzinom
- 2- gesunde Kontrollgruppe vs. Gruppe Karzinome (Früh- und Spät-Karzinome)
- 3- gesunde Kontrollgruppe vs. Gruppe Früh-Karzinom
- 4- gesunde Kontrollgruppe vs. Gruppe Spät-Karzinom
- 5- Gruppe Früh-Karzinom vs. Gruppe Spät-Karzinom

Nach der Spotdetektion wurden alle Gele aus derselben Gruppe zusammengefasst. Aus sämtlichen Gruppenvergleichen wurden unterschiedlich exprimierte Spots ermittelt. Zur Bestimmung der signifikanten Unterschiede unter den Gruppen wurde diese in Zwei-Gruppenvergleichen mittels Student's *t*-Test und in Drei-Gruppenvergleichen über eine 1-seitig integrierte Varianzanalyse (one-way ANOVA) analysiert und verglichen. Proteine ab einem p-Wert von $< 0,05$ wurden als signifikant berücksichtigt. Um Clusterbildung zu kontrollieren, wurden die Daten durch eine *principal component* Analyse (PCA) überprüft.

Die statistischen Daten der Western Blot Analyse wurden mittels IBM SPSS Statistics v22 und GraphPad PRISM v5.04 Software ausgewertet. Die Daten des Zwei-Gruppenvergleiches wurden durch einen Mann-Whitney U-Test berechnet. Auch hier wurden p-Werte $< 0,05$ als signifikant erachtet. Die Aufteilung in gesunde Kontrollen oder Patienten mit KRK im Frühstadium basierte auf der maximalen Sensitivität oder Spezifität, welche durch die Nutzung einer ROC Kurve errechnet wurde.

4. ERGEBNISSE

4.1 Unterschiede im Thrombozytenproteom von Kontroll- und Kolorektalkarzinom-Patienten in frühen und späten Stadien

Zur Bestimmung der Proteinunterschiede in Thrombozyten zwischen Patienten mit KRK im frühen und späten Stadium und einer gesunden Kontrollgruppe wurde das gesamte Proteom der Thrombozyten mit Hilfe der 2-D DIGE analysiert. Nach der digitalen Auswertung der 2-D DIGE Gele wurden insgesamt 177 Spots detektiert, die im Vergleich mit dem Mittelwert der Kontrollproben entweder eine höhere oder niedrigere Expression reflektierten (Abb. 13).

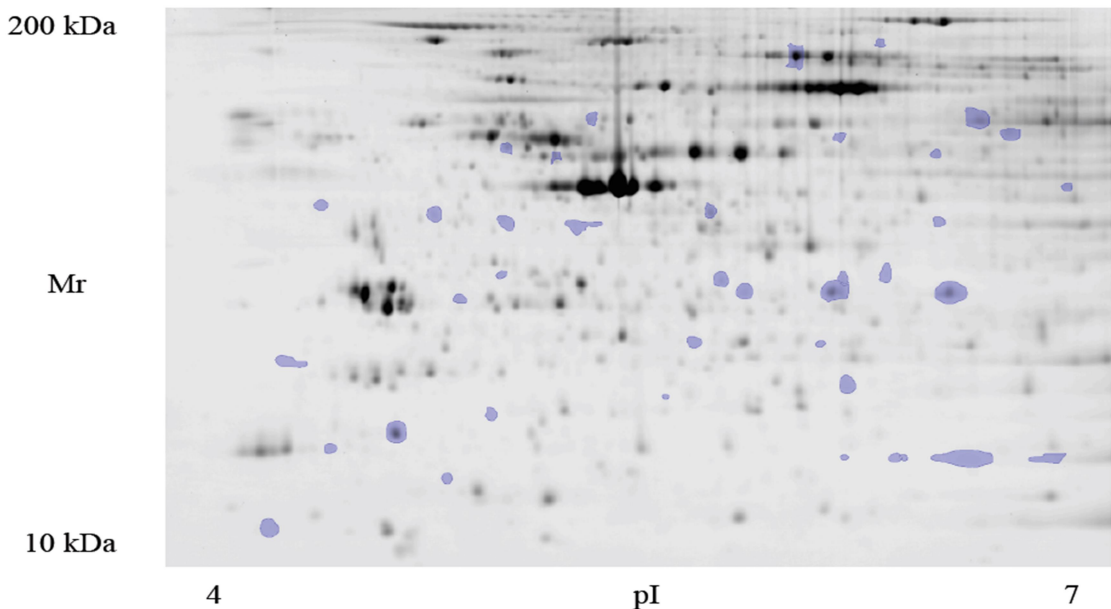


Abbildung 13 Zweidimensionale, fluoreszenzgefärbte Darstellung eines Thrombozytenproteoms. Aus dem Vergleich gesunde Kontrollgruppe vs. Gruppe Früh-Karzinom vs. Gruppe Spät-Karzinom zeigt die Abbildung in den blauen Markierungen die Darstellung von 39 differentiellen Spots auf einem repräsentativen Gel. Ziel des Vergleichs war es festzustellen, inwiefern sich das Proteinexpressionsmuster bei unterschiedlichem Krankheitsstatus verändert. Dazu wurden die 24 Proben in jeweils unterschiedlicher Aufstellung der Gruppen miteinander verglichen. Die schwarz visualisierten Spots stellten die einzelnen Proteine bzw. deren Modifikationen oder Proteinfragmente dar. Die nach der Auswertung von Progenesis SameSpot unterschiedlich exprimierten Spots wurden von einem Spot-Picking-Roboter ausgestanzt.

Die Spots einer Probe wurden der entsprechenden klinischen Gruppe zugeordnet und anschließend verglichen. Der Vergleich geschah mittels einer computergestützten Analyse, der *principal components analysis* (PCA). Diese gab Aufschluss über die Vergleichbarkeit der analysierten Proben. Es wurden die in Abschnitt 3.2.8. aufgeführten fünf Gruppenvergleiche durchgeführt. Die Anzahl signifikant unterschiedlich exprimierter Proteine je Gruppenvergleich ist in Abbildung 14

visualisiert: 39 Proteine waren zwischen den Kontrollen und KRK-Patienten im frühen Stadium und KRK-Patienten im späten Stadium, 35 Proteine zwischen den Kontrollen und KRK-Patienten im frühen Stadium, 23 Proteine zwischen den Kontrollen und KRK-Patienten im frühen Stadium, 44 Proteine zwischen Kontrollen und KRK-Patienten im späten Stadium und 36 Proteine zwischen den KRK-Patienten im frühen Stadium und KRK-Patienten im späten Stadium signifikant unterschiedlich exprimiert.

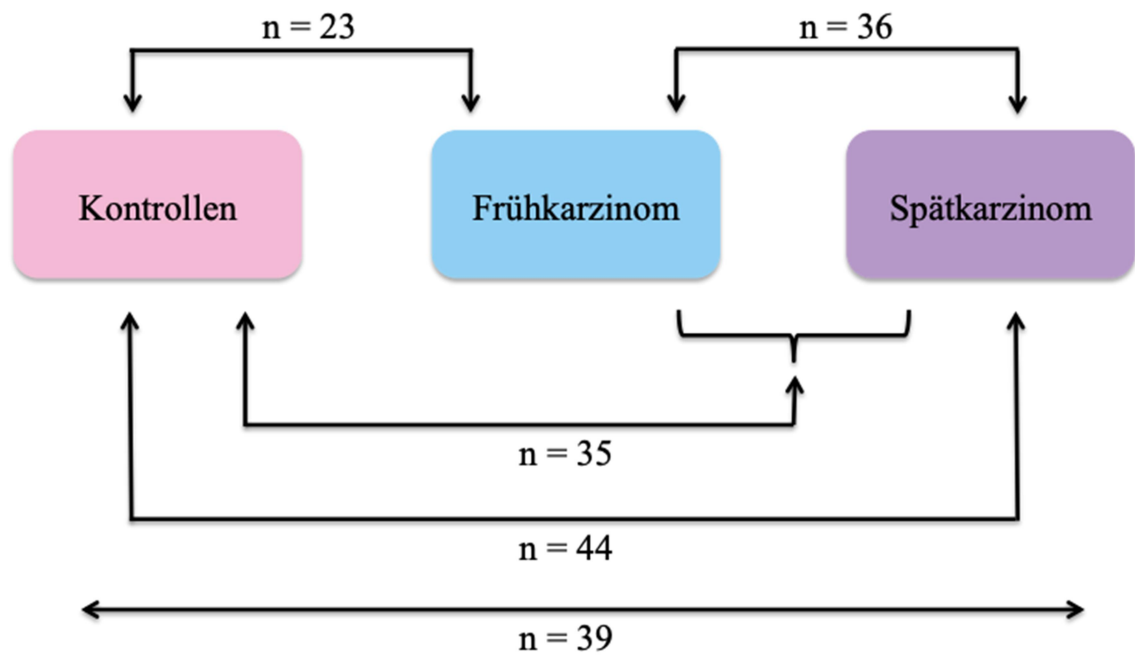


Abbildung 14 Anzahl signifikanter Proteine in den unterschiedlichen Gruppenvergleichen.

4.1.1 Dreigruppenvergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom

Insgesamt wurden im Dreigruppenvergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom aus jeder der 24 Patientenproben 39 Proteinspots mit unterschiedlichem Expressionsmuster detektiert (Abb. 14). In Abbildung 15 ist die PCA für den Dreigruppenvergleich dargestellt. Diese zeigt 24 Punkte in den Farben rosa, blau und lila, die jeweils eine Patientenprobe darstellen. Jeder Punkt vereint die Expressionsdaten aller 39 signifikanten Proteine einer Probe. Die Punkte mit der gleichen Farbe bilden jeweils eine der Gruppen. Anhand der Daten lässt sich eine deutliche Separation der drei Gruppen grafisch darstellen.

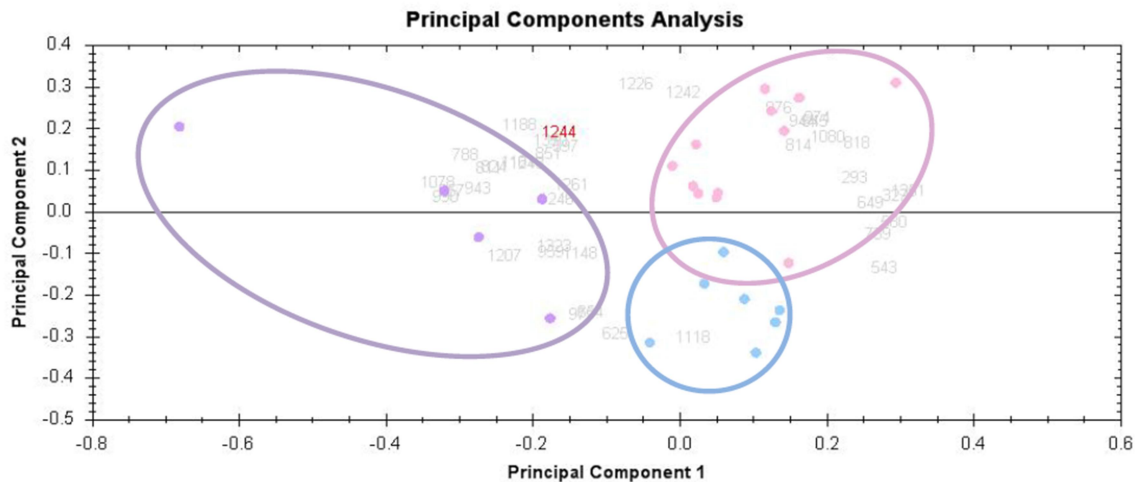


Abbildung 15 Ergebnisse der PCA unterschiedlich exprimierter Proteine (grau) der 24 Patientenproben. Jeder Punkt vereint die Expressionsdaten aller 39 signifikanten Proteine einer Probe. (rosa: Kontrollgruppe; lila: Spätkarzinom-Patienten; blau: Frühkarzinom-Patienten). Die Prozentzahl der einzelnen Komponenten beträgt für Principal Component 1 27,0 % und für Principal Component 2 15,5 %. In den zwei Komponenten können somit 42,4 % der Informationen, die die 39 Proteine des Vergleiches beinhalten, dargestellt werden.

Bedingt durch die drei Gruppen des Vergleiches und die unterschiedlichen Expressionslevel der Proteine ergaben sich insgesamt sechs Expressionsmuster (siehe Tabelle 8 im Anhang):

- (1) Das höchste Expressionsniveau zeigte die Gruppe der Spätkarzinome, ein geringeres Expressionsniveau zeigten Proteine der Gruppe Frühkarzinome und das geringste Expressionsniveau zeigten Proteine der Kontrollgruppe. Dieses Expressionsmuster zeigten insgesamt acht der 39 Proteine.
- (2) Das höchste Expressionsniveau zeigten Proteine der Gruppe Frühkarzinom, gefolgt von Proteinen der Gruppe Spätkarzinom und abschließend denen der Kontrollgruppe. Zwei der 39 Proteine folgten diesem Expressionsmuster.
- (3) Das höchste Expressionsniveau zeigte ein Protein der Kontrollgruppe, ein geringeres Expressionsniveau zeigte dieses Protein in der Gruppe Spätkarzinom und die geringste Expression zeigte es in der Gruppe Frühkarzinom. Nur ein Protein zeigte dieses Expressionsmuster.
- (4) Das höchste Expressionsniveau zeigten Proteine der Gruppe der Spätkarzinome, gefolgt von Proteinen der Kontrollgruppe und abschließend denen der Frühkarzinomgruppe. Insgesamt 14 Proteine wiesen dieses Expressionsmuster auf.
- (5) Das höchste Expressionsniveau zeigten Proteine der Kontrollgruppe, gefolgt von Proteinen der Frühkarzinomgruppe bis zu denen der Spätkarzinomgruppe. Elf Proteine zeigten dieses Muster.

(6) Das höchste Expressionsniveau zeigte die Gruppe der Frühkarzinome, ein geringeres Expressionsniveau zeigten Proteine der Kontrollgruppe und das geringste Expressionsniveau zeigten Proteine der Gruppe der Spätkarzinome. Diesem Expressionsmuster folgten drei Proteine.

Die Verbildlichung eines höheren Expressionsniveaus in KRK-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ist Abbildung 16 zu entnehmen. Diese zeigt eine niedrigere Proteinexpression eines beispielgebend gewählten Spots #1148 im Dreigruppenvergleich. Die Expression dieses Proteins stieg von der gesunden Kontrollgruppe über die Gruppe Frühkarzinom hin zur Gruppe Spätkarzinom deutlich an.

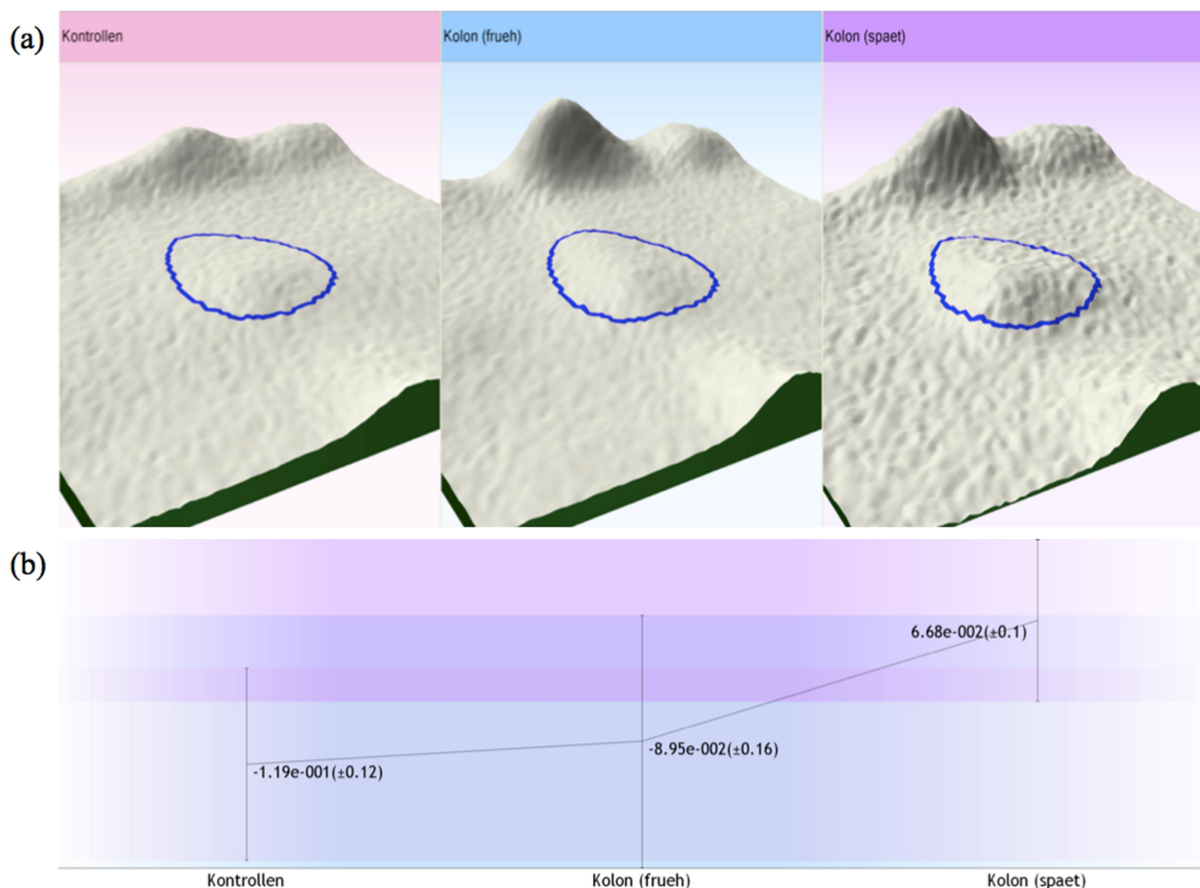


Abbildung 16 Repräsentatives Proteinexpressionsprofil von Proteinspot #1148 (a) und (b). Hier ist ein höheres Expressionsniveau in den Proben der Gruppe Frühkarzinom und Spätkarzinom festzustellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten). In (b) zeigt sich die Zunahme des normalisierten Volumens von der Kontrollgruppe bis zur Spätkarzinomgruppe.

4.1.2 Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom

Im Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom (Vergleich 2.) wurden mittels 2-D DIGE 35 Proteine erkannt, die in einer signifikant unterschiedlichen Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe vorlagen (Abb. 14). Die anhand des Expressionsmusters dieser Proteine errechnete PCA zeigte zwei trennbare Gruppen (Abb. 17). Von den 35 Proteinen zeigten 27 in der Gruppe Kolonkarzinom im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere und 8 eine höherr Expression.

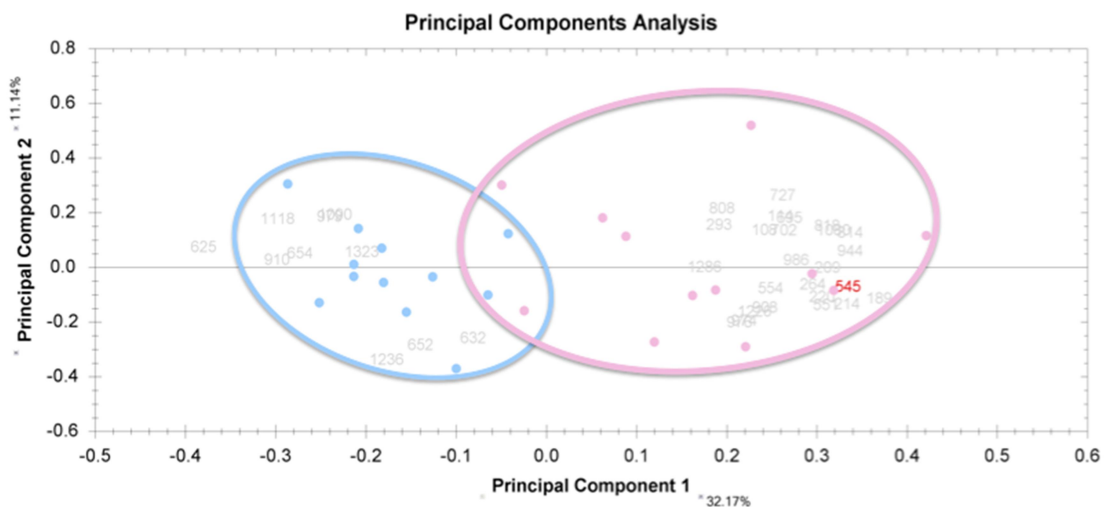


Abbildung 17 PCA basierend auf den 35 signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen (jeweils grau dargestellt) der 24 Patientenproben der Gruppe Kontrolle versus Kolonkarzinom (blau: Kolonkarzinom; rosa: Kontrollgruppe). Die Prozentzahl der einzelnen Komponenten beträgt für Principal Component 1 32,2 % und für Principal Component 2 11,1 %. In den zwei Komponenten können somit 43,3 % der Informationen, die die 35 Proteine des Vergleiches beinhalten, dargestellt werden.

4.1.3 Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Frühkarzinom

Anhand der 2-D DIGE wurden für den Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom 23 unterschiedlich exprimierte Proteine detektiert (Abb. 14). In der PCA (Abb. 18) des Vergleichs Kontrolle versus Frühkarzinom ist ebenfalls eine eindeutig grafische Abgrenzung der beiden Gruppen zu erkennen. Basierend auf den signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen gibt dies einen eindeutigen Hinweis auf deutliche Unterschiede im Proteinexpressionsmuster von gesunden Personen und denen mit einem frühen KRK. Von den 23 Proteinen zeigten 13 in der Gruppe Frühkarzinom im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere und 10 Proteine eine höhere Expression.

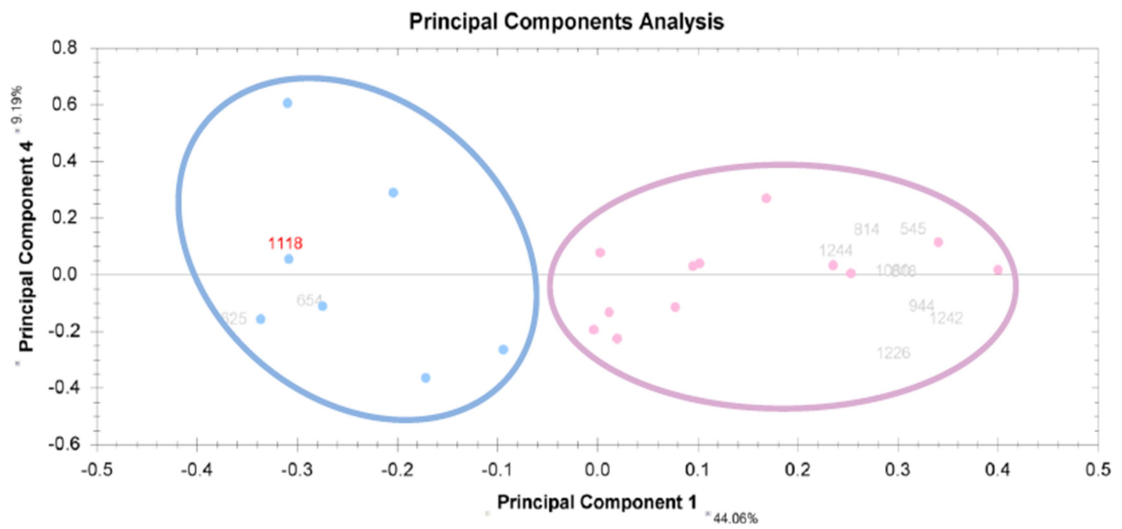


Abbildung 18 PCA basierend auf 23 signifikanten Spots in dem Zwei-Gruppen-Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom (blau: Frühkarzinom Patienten; rosa: Kontrollgruppe). Die Prozentzahl der einzelnen Komponenten beträgt für Principal Component 1 44,1 % und für Principal Component 2 9,2 %. In den zwei Komponenten können somit 53,3 % der Informationen, die die 23 Proteine des Vergleiches beinhalten, dargestellt werden.

In Abbildung 19 ist das Expressionsvolumen exemplarisch für den Spot #818 aus den 12 Proben der Kontrollgruppe im Vergleich zu den sieben Proben der Gruppe Frühkarzinom dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Expression dieses Proteins in der Kontrollgruppe niedriger exprimiert ist als in der Gruppe der Frühkarzinome.

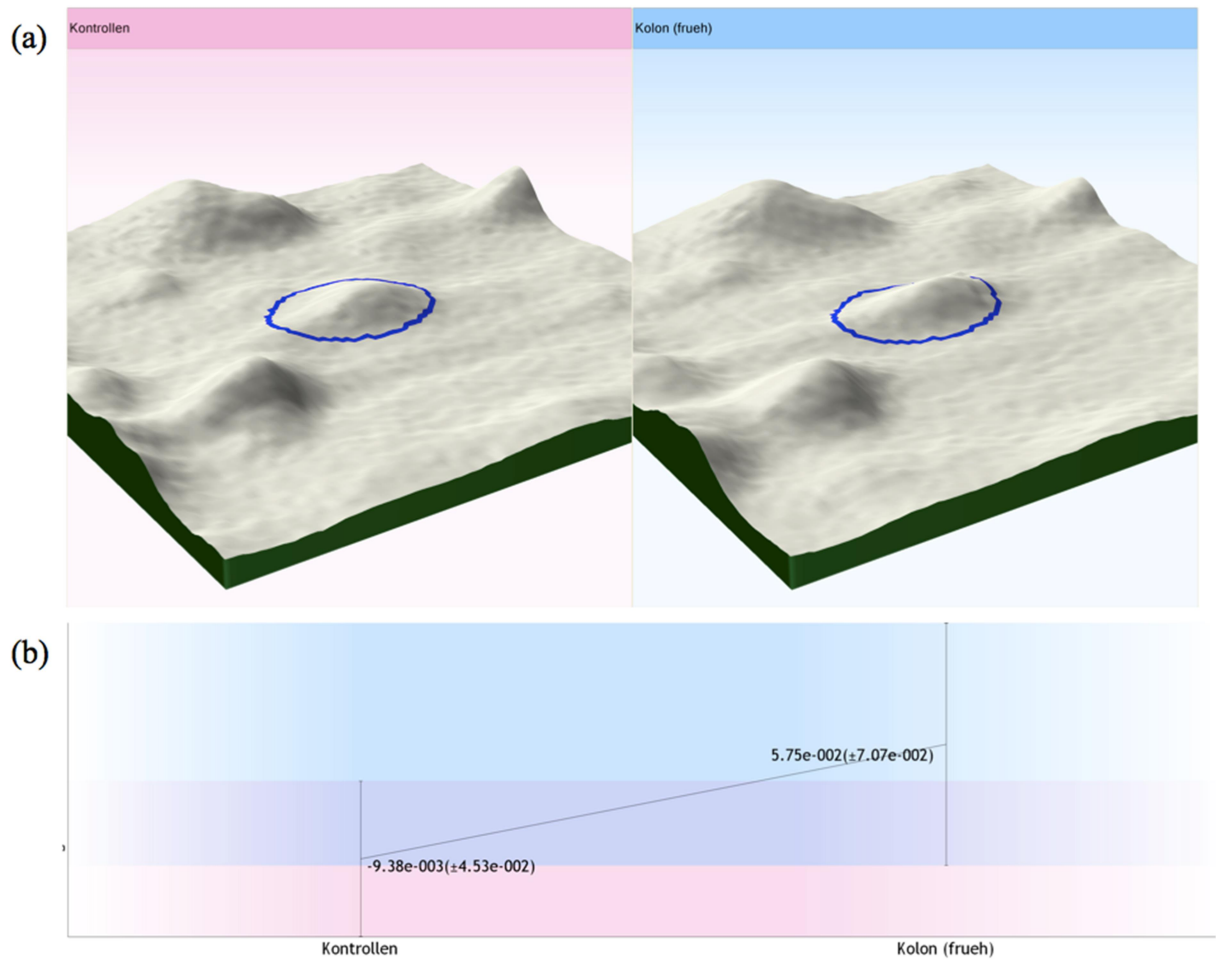


Abbildung 19 Repräsentatives Proteinexpressionsprofil von Proteinspot #910. Die unterschiedlichen Darstellungen verdeutlichen einen höheren Expressionsstatus des Proteins für die Gruppe Frühkarzinom im Vergleich zu der Kontrollgruppe. (a) zeigt die exemplarische Zunahme der Proteinkonzentration als 3-D grafische Darstellung. (b) stellt den Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dar (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten).

4.1.4 Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Spätkarzinom

Mittels 2-D DIGE konnte festgestellt werden, dass 44 Proteine des Thrombozytenproteoms bei KRK-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe unterschiedlich exprimiert waren. Eine deutliche Differenz zwischen den beiden Gruppen ließ sich mittels PCA grafisch darstellen (Abb. 20). Von den 44 Proteinen zeigten sich 25 in der Gruppe Spätkarzinom im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger in ihrer Expression. Die restlichen 19 lagen in ihrer Expression erhöht vor.

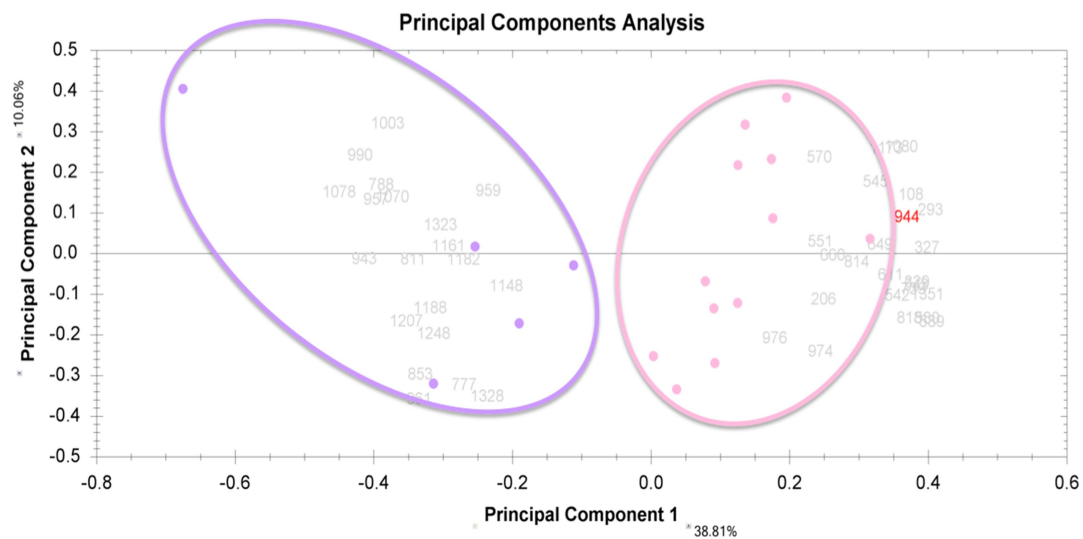


Abbildung 20 PCA basierend auf den 44 signifikanten Spots des Zwei-Gruppen-Vergleichs Kontrolle versus Spätkarzinom (rosa: Kontrollgruppe; lila: Spätkarzinom-Patienten). Die Prozentzahl der einzelnen Komponenten beträgt für Principal Component 1 38,8 % und für Principal Component 2 10,1 %. In den zwei Komponenten können somit 48,9 % der Informationen, die die 44 Proteine des Vergleiches beinhalten, dargestellt werden.

4.1.5 Zweigruppenvergleich Früh- versus Spätkarzinom

In dem Vergleich Früh- versus Spätkarzinom konnten 36 Proteine durch die Auftrennung der 2-D DIGE bestimmt werden, die eine signifikant unterschiedliche Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen (Abb. 14). PCA-basierend konnte auch hier eine grafische Trennung der beiden Gruppen ausgemacht werden (Abb. 21). 13 der 36 Proteine stellten sich in der Gruppe Spätkarzinom im Vergleich mit der Gruppe Frühkarzinom niedriger in ihrer Expression dar. Die übrigen 23 zeigten das gegenläufige Expressionsmuster mit höherer Expression in der Gruppe der Spätkarzinome.

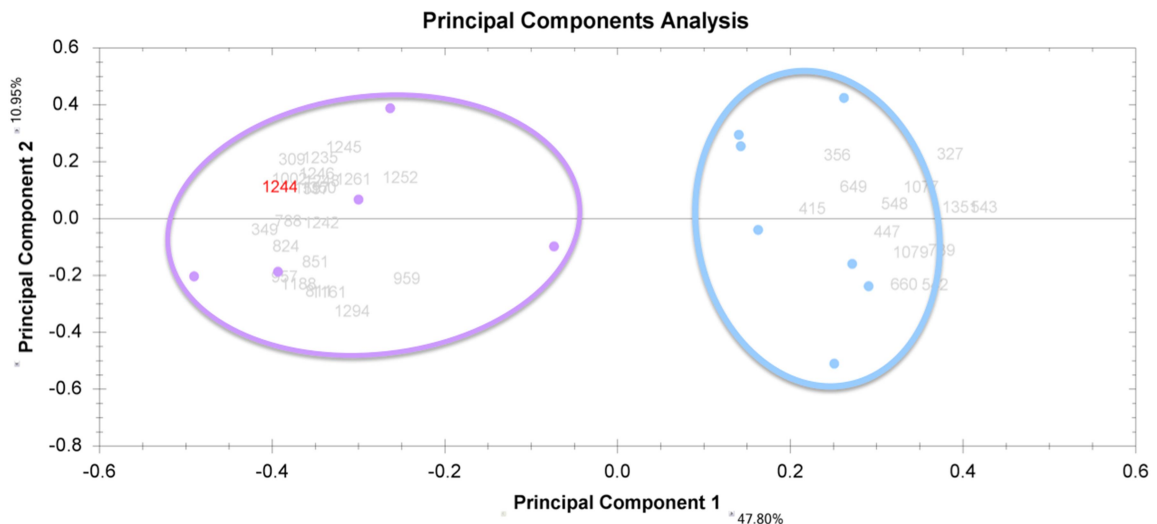


Abbildung 21 PCA basierend auf allen 36 signifikanten Spots des Zwei-Gruppen-Vergleichs Früh- versus Spätkarzinom (lila: Spätkarzinom-Patienten; blau: Frühkarzinom-Patienten). Die Prozentzahl der einzelnen Komponenten beträgt für Principal Component 1 47,8 % und für Principal Component 2 11,0 %. In den zwei Komponenten können somit 59,8 % der Informationen, die die 36 Proteinen des Vergleiches beinhalten, dargestellt werden.

4.2 Proteindifferenzierung durch Massenspektrometrie

Auf die semi-quantitative Analyse der 2D-Gele folgte die massenspektrometrische Identifizierung der zuvor als differentiell eingestuften Proteinspots. Hierzu wurde eine MALDI-TOF Messung durchgeführt, die für jedes Protein ein spezifisches Peptidspektrum erstellte. Hierfür wurden die Proteinspots an das Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie des Deutschen Diabetes-Zentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geschickt. Zum Abgleich der generierten Proteinspektren wurde die Datenbank SwissProt mit der humanen *sub*-Datenbank herangezogen.

Von 177 ausgestanzten Spots aus den 2D-Gelen konnten 133 durch MALDI-TOF identifiziert werden. Dies entsprach einer Identifizierungsrate von 75,1 % (Tabelle 5). Im Einzelnen wurden für den Gruppenvergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom 39 signifikante Proteine detektiert, wovon 31 identifiziert werden konnten. Von den 31 identifizierten Proteinen folgten sechs Proteine dem Expressionsschema **(1)**, welches in der Auswertung der 2-D DIGE festgelegt wurde (siehe Abschnitt 4.1.1.). Ein Protein zeigte Expressionsschema **(2)**, ein Protein wies das Schema **(3)** auf, elf Proteine folgten Schema **(4)**, zehn stellten das Expressionsschema **(5)** dar und zwei Proteine folgten dem Schema **(6)**.

Unter den 31 Proteinen befanden sich 28 Proteine, die nur einmalig auf einem Gel vorkamen. Diese werden im weiteren Verlauf als einmalig detektierte Proteine bezeichnet. Es war möglich, dass Proteine auf den Gelen wiederholt vorkamen. Das geschah z.B. durch Fragmentierung oder durch Modifikationen eines Proteins.

Der Gruppenvergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom zeigte 35 signifikante Proteine, wovon sich 22 identifizieren ließen. Von den identifizierten Proteinen zeigten 17 ein niedrigeres und fünf ein höheres Expressionsniveau in der Gruppe der Kolonkarzinome. Von den 22 identifizierten Proteinen wurden 15 einmalig detektiert.

Der Gruppenvergleich Kontrolle versus Frühkarzinom wies 23 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteinspots auf. 14 ließen sich nachfolgend identifizieren und stellten sich zudem als einmalig detektiert heraus. Davon zeigte jeweils die Hälfte entweder eine niedrigere oder eine höhere Expression in der Gruppe der Frühkarzinome.

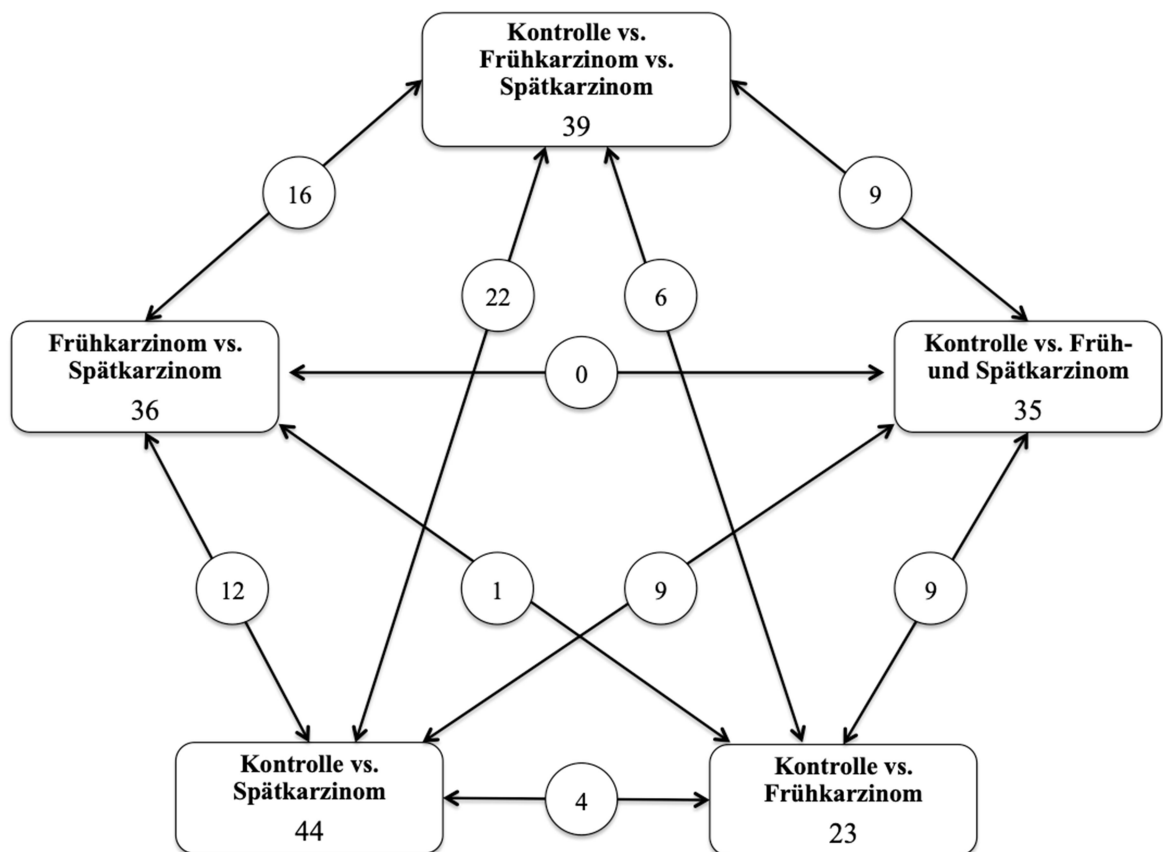
Im Gruppenvergleich Kontrolle versus Spätkarzinom wurden 44 Proteine als signifikant unterschiedlich exprimiert ermittelt, wovon nachfolgend 38 identifiziert wurden. Hiervon zeigten sich 22 niedriger und 16 höher exprimiert in der Gruppe der Spätkarzinome. Aus den 38 identifizierten Proteinen wurden 32 einmalig detektiert.

Für den Gruppenvergleich Früh- versus Spätkarzinom konnten 36 signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine detektiert werden, wovon 28 identifiziert wurden. Für elf Proteine zeigte sich ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau in der Gruppe der Spätkarzinome, während die restlichen 17 Proteine in dieser Gruppe eine erhöhte Expression aufwiesen. Unter den 28 identifizierten Proteinen fanden sich 24 einmalig detektierte Proteine (Tabelle 5).

Tabelle 5 Identifizierungsrate in den unterschiedlichen Gruppenvergleichen. Angegeben sind Proteine, die zwischen den unterschiedlichen Gruppen signifikant unterschiedlich exprimiert waren.

Vergleich	Signifikante Proteine	Identifizierte Proteine	%	Einmalig detektierte Proteine	Nicht identifizierte Proteine
Kontrolle vs. Früh- vs. Spätkarzinom	39	31	79,49	28	8
Kontrolle vs. Früh- und Spätkarzinom	35	22	62,86	15	13
Kontrolle vs. Frühkarzinom	23	14	60,87	14	9
Kontrolle vs. Spätkarzinom	44	38	86,36	32	6
Frühkarzinom vs. Spätkarzinom	36	28	77,78	24	8
Insgesamt	177	133	75,14	133	44

Unter den identifizierten Proteinen befanden sich unter anderem Caspase 3 (CASP3), Cofilin (CFL), Clusterin (CLU), Gluthation Synthase (GSS), Vinculin (VCL), Talin-1 (TLN1), Farnesyl Diphosphat Synthase (FDPS), Alpha Tubulin (α -Tubulin), Beta Tubulin (β -Tubulin), Synuclein alpha (SNCA), Tumor susceptibility gene 101 protein (TSG101), Cytokeratin (CK), Actin und Actin beta (ACTB) (Tabelle 8). Viele dieser Proteine agieren in Stoffwechselwegen zu Zell-Zell-Kontakten oder bei der Zellentwicklung bis hin zum Zelltod (Fiandalo und Kyprianou 2012; Lamkanfi et al. 2007; Olsson und Zhivotovsky 2011; Subauste et al. 2004). Um einen Zusammenhang zwischen den identifizierten Proteinen zueinander und bezüglich ihrer Funktion innerhalb der Thrombozyten herstellen zu können, wurde die Liste der differentiell exprimierten Proteine nachfolgend mit Hilfe der Ingenuity Pathway Analysis analysiert. Ausgehend von den 31 identifizierten Proteinspots des Vergleichs Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom wurden davon neun ebenfalls in dem Vergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom, sechs im Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom, 22 im Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom und 16 im Vergleich Früh- versus Spätkarzinom beschrieben. Die deutlichste Überlappung war mit dem Zweigruppenvergleich Kontrolle versus Spätkarzinom zu beobachten (Abb 22).



Legende

↔ Gruppen beinhalten überlappende Proteine

Abbildung 22 Darstellung der Überschneidung signifikant unterschiedlich exprimierter Proteine in den einzelnen Gruppenvergleichen. Einige Proteine kommen in mehreren Gruppenvergleichen vor, daher kommt es zu Überschneidungen unter den Gruppenvergleichen.

Von den 22 Proteinen des Vergleichs Kontrolle versus Kolonkarzinom zeigten sich jeweils neun in den Vergleichen Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom, Kontrolle versus Frühkarzinom und Kontrolle versus Spätkarzinom mit unterschiedlichem Expressionsniveau. Für den Vergleich Früh- versus Spätkarzinom gab es keine überlappenden Proteine. Von den 14 Proteinen des Vergleiches Kontrolle versus Frühkarzinom ergaben sich bei dem Gruppenvergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom sechs, bei Kontrolle versus Kolonkarzinom neun, bei Kontrolle versus Spätkarzinom vier Überschneidungen und bei Früh- versus Spätkarzinom ergab sich eine Überschneidung. Aus den 38 Proteinen des Vergleichs Kontrolle versus Spätkarzinom wurden 22 in dem Gruppenvergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom, neun im Vergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom, vier im Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom und 12 im Vergleich Früh- versus Spätkarzinom beschrieben. Von den 28 identifizierten Proteinen des Vergleichs Früh- versus Spätkarzinom kamen überlappend 16 Proteine im Vergleich Kontrolle versus Früh-

versus Spätkarzinom, 12 Proteine im Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom und ein Protein im Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom vor. Für den Vergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom ergaben sich keine Überschneidungen (Abb. 22).

4.3 Ingenuity Pathway Analysis

Die IPA berechnete aus den Daten der eingespeisten Ergebnisliste der Massenspektrometrie Netzwerke anhand einer Datenbank, der *ingenuity pathways knowledge database* (IPKD). Diese Datenbank enthält bereits publizierte Interaktionen von anderen Proteinen oder Stoffwechselwegen. Die generierten Netzwerke zeigten die identifizierten Proteine in einer Vielzahl direkter und indirekter Verbindungen im Kontext aller der Datenbank bekannten Proteine und Stoffwechselwege. In Tabelle 6 wurden die unterschiedlichen Vergleiche aufgelistet, welche die wichtigsten Interaktionen der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine mit assoziierten Stoffwechselwegen oder Erkrankungen aufzeigen.

Tabelle 6 IPA Vergleiche

Vergleich	Netzwerke	Score	Erkrankung und Stoffwechselstörung	p-Wert	# der Moleküle	Molekulare und zelluläre Funktion	p-Wert	# der Moleküle	Zentrale Netzwerk - Proteine
Kontrolle vs. Früh- und Spätkarzinom	Zellschädigung und organische Fehlbildungen, Atemwegserkrankung, Kohlenhydratstoffwechsel	36	Immunerkrankungen	1,13E-05 - 2,11E-02	8	Zell-zu-Zell Signalisierung und Interaktion	6,11E-04 - 4,97E-02	5	TLN1↓ VCL↓ CLU↓ GSS↑
			Entzündungsreaktionen	1,09E-04 - 4,31E-02	3	zellulärer Aufbau und Organisation	6,11E-04 - 4,44E-02	5	
			Nieren und urologische Erkrankungen	3,35E-04 - 1,43E-02	4	zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung	6,11E-04 - 1,91E-02	4	
Kontrolle vs. Frühkarzinom	genetische Dysfunktion, neurologische Erkrankungen, Fehlfunktionen des Skeletts und der Muskeln	34	Krebs	4,03E-05 - 4,24E-02	8	Zelltod	2,27E-04 - 4,71E-02	5	FDPS↓ CASP 3↓ CLU↓ GSS↑
			Genetische Dysfunktion	6,63E-05 - 3,65E-02	9	zelluläre Verständigung	2,27E-04 - 2,24E-02	4	
			Neurologische Erkrankung	6,63E-05 - 3,43E-02	5	Zellentwicklung	3,18E-04 - 4,38E-02	5	
Kontrolle vs. Spätkarzinom	zellulärer Aufbau und Organisation, zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung, Krebs	36	Genetische Dysfunktion	2,11E-06 - 3,78E-02	19	zellulärer Aufbau und Organisation	1,34E-05 - 4,21E-02	13	Alpha Tubulin↓ Beta Tubulin↓ CLU↓ SNCA↑
	Entwicklungsstörungen, genetische Dysfunktion, hämatologische Erkrankungen	25	Neurologische Erkrankung	2,11E-06 - 4,49E-02	12	Zell Morphologie	3,16E-05 - 2,34E-02	11	
Kontrolle vs. Frühkarzinom vs. Spätkarzinom	Entwicklung und Funktion des Verdauungssystems, Gewebeentwicklung, Embryonalentwicklung	28	Genetische Dysfunktion	1,68E-06 - 3,38E-02	18	Zellbewegung	6,00E-05 - 4,02E-02	8	TSG 101↑ Cytokeratin↑ Actin↑ ACTB↑ F Actin↑ CFL1↑ CLU↓
	zellulärer Aufbau und Organisation, zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung, Entwicklungsstörung	26	Neurologische Erkrankung	1,68E-06 - 4,02E-02	10	zellulärer Aufbau und Organisation	1,03E-04 - 4,90E-02	12	
Frühkarzinom vs. Spätkarzinom	Arzneimittelstoffwechsel, molekularer Transport, molekulare Biochemie	36	Hämatologische Erkrankung	2,39E-06 - 4,96E-02	4	Arzneimittelstoffwechsel	9,34E-04 - 2,40E-02	3	Cytokeratin↑ TSG 101↓
	zelluläres Wachstum und Proliferation, zellulärer Aufbau und Organisation, zelluläre Funktion und Aufrechterhaltung	13	Dermatologische Erkrankung	4,42E-06 - 4,96E-02	9	Proteinsynthese	9,34E-04 - 2,40E-02	3	

↓ Protein niedriger exprimiert im Vergleich zur Expression im Thrombozytenprofil bei den gesunden Kontrollproben.

↑Protein höher exprimiert im Vergleich zur Expression im Thrombozytenprofil bei den gesunden Kontrollproben.

Die drei Netzwerke mit dem höchsten Score von 36 umfassten die Proteine aus den Vergleichen Kontrolle versus Kolonkarzinom, Kontrolle versus Spätkarzinom und Früh- versus Spätkarzinom. In dem Netzwerk des Vergleichs Kontrolle versus Kolonkarzinom waren besonders die Proteine Clusterin (CLU), Vinculin (VCL) und Gluthation Synthase (GSS) durch ihre Verknüpfung untereinander und das unterschiedliche Expressionsniveua auffällig. GAPDH nimmt in diesem Netzwerk eine zentrale Rolle ein und – wenngleich nicht als signifikant unterschiedlich detektiert – ist in einen Teil der Interaktionen eingebunden (Abb. 23 A). Diese Proteine sind vor allem mit den Stoffwechselwegen der Zell-Zell-Interaktion und der intrazellulären Organisation assoziiert.

Die Proteine aus dem Zweigruppen-Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom bildeten ein IPA-Netzwerk mit einem Score von 34 (Abb. 23 B). Die drei Proteine Caspase 3 (CASP3), CLU und GSS interagieren in diesem Netzwerk in Stoffwechselwegen für krebsassoziierte Funktionen wie Zelltod, genetische Funktionsstörungen und Zellentwicklung.

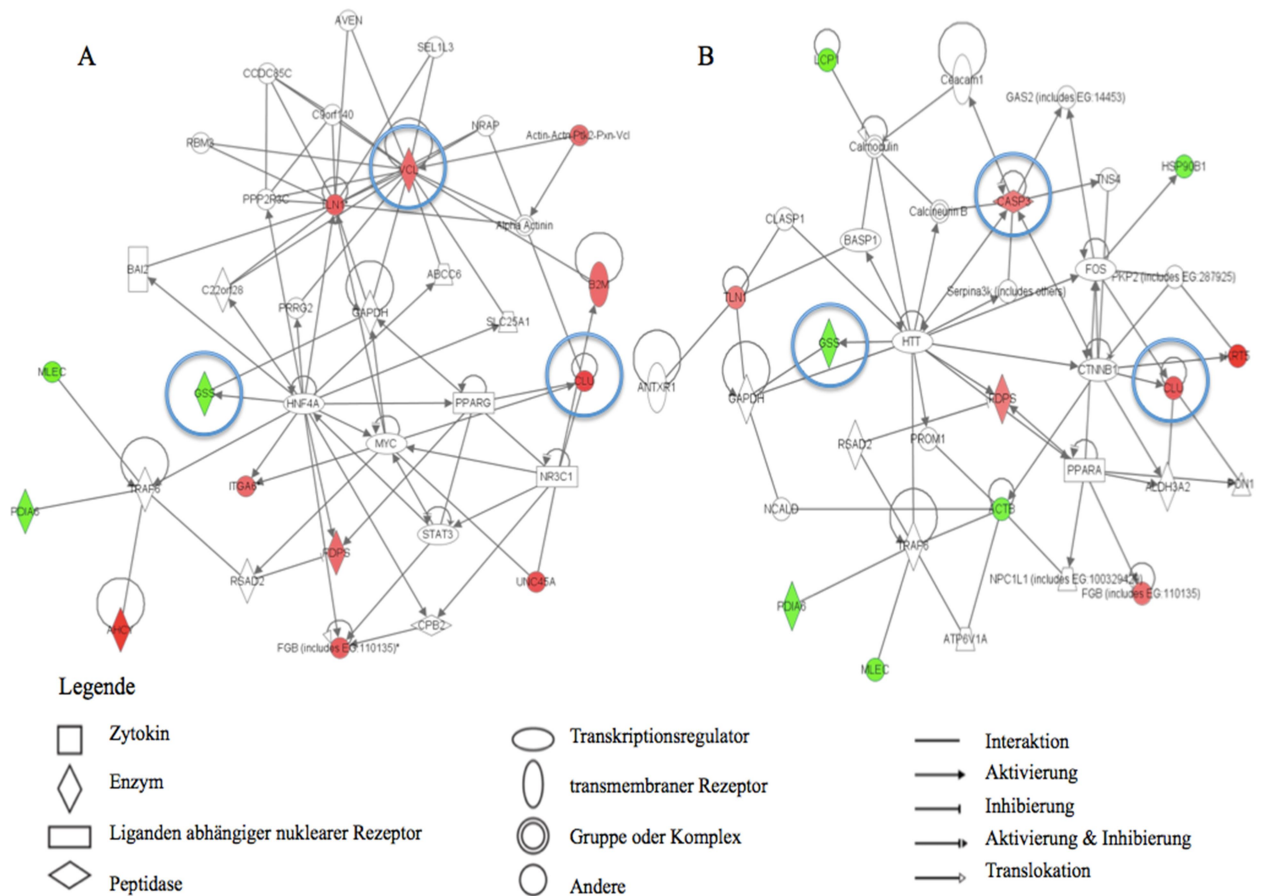


Abbildung 23 A: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom. Drei hervorgehobene unterschiedlich exprimierte Proteine sind in diesen Interaktionen enthalten (CLU, VCL und GSS). GAPDH wird hier zentral dargestellt. **B:** IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom. Drei hervorgehobene Proteine mit unterschiedlichem Expressionsniveau sind in diesen Interaktionen enthalten (CLU, CASP3 und GSS). Rot markierte Proteine haben ein niedrigeres Expressionsniveau in Thrombozyten bei KRK im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei grün markierte Proteine ein höheres Expressionsniveau in den KRK-Proben aufweisen. Weiß dargestellte Gene/Proteine wurden nicht als differentiell exprimiert detektiert aber von IPA mit einbezogen, um bekannte Konnektivität zu zeigen.

Die IPA des Zweigruppen-Vergleichs Kontrolle versus Spätkarzinom ergab zwei getrennt von einander stehende Netzwerke mit einem Score von 36 und 25 (Abb. 24 A und B). Die Proteine alpha Tubulin, beta Tubulin und SNCA sind zu Stoffwechselwegen des zellulären Aufbaus, zur Organisation zellulärer Funktionen sowie zu Krebs assoziiert. CLU ist gemäß IPA an Stoffwechselwegen von Entwicklungsstörungen und genetischen Dysfunktionen beteiligt.

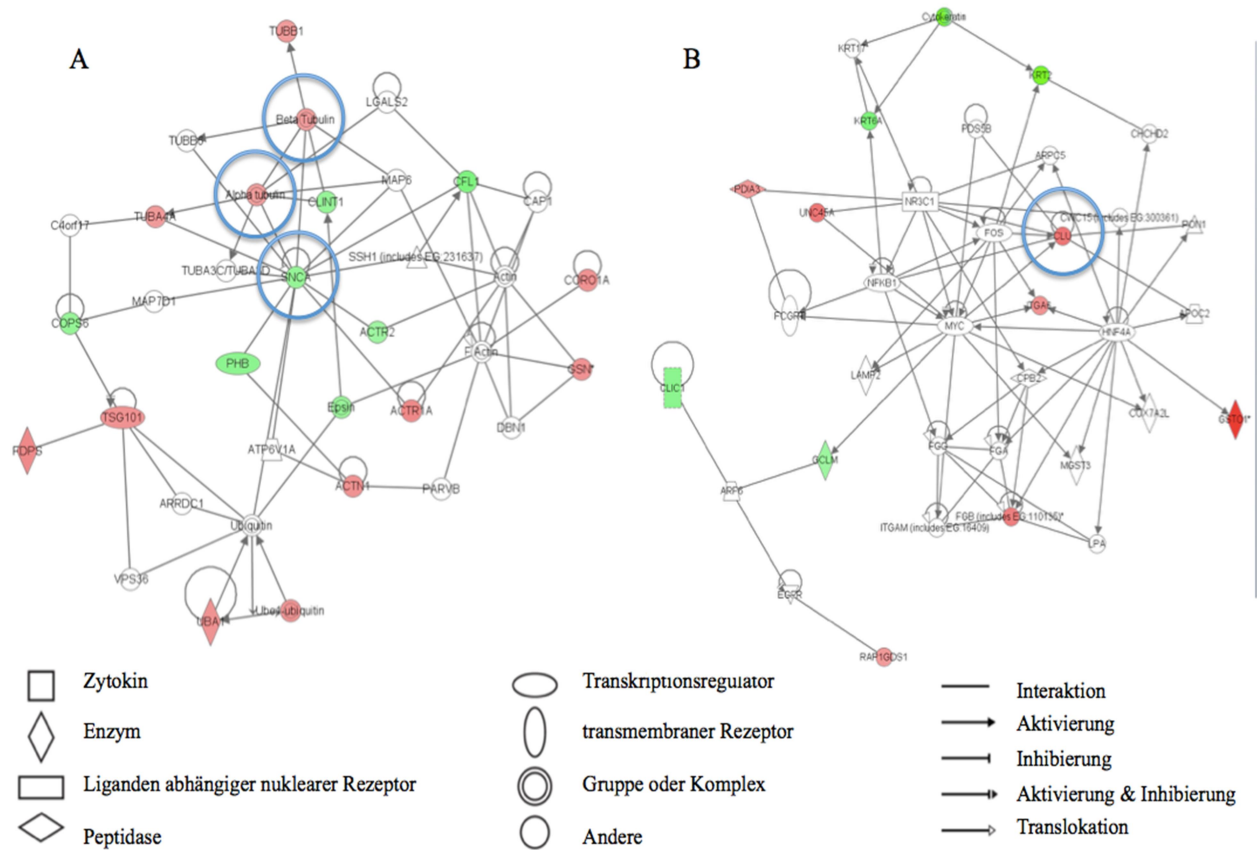


Abbildung 24 **A:** IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom mit dem Score von 36. Drei hervorzuhebende unterschiedlich exprimierte Proteine sind in diesen Interaktionen enthalten (Alpha Tubulin, Beta Tubulin und SNCA). **B:** IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom mit dem Score von 25. Hier ist CLU mit unterschiedlichem Expressionsstatus in den Interaktionen enthalten. Rot markierte Proteine haben ein niedrigeres Expressionsniveau in Thrombozyten bei KRK im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei grün markierte Proteine ein höheres Expressionsniveau in den KRK-Proben haben. Weiß dargestellte Gene/Proteine wurden nicht als differentiell exprimiert detektiert aber von IPA mit einbezogen, um die Konnektivität zu optimieren.

Der Dreigruppenvergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom bildete zwei Netzwerke mit einem Score von 28 und 26. Bei dem Netzwerk mit dem Score von 28 lag das Protein CLU in niedriger Expression vor (Abb. 25 A) und bildete einen zentralen Punkt in dem Netzwerk. Ebenfalls waren Cytokeratin und *Tumor susceptibility gene 101* (TSG 101) abgebildet. Diese Proteine sind in Stoffwechselwege der Entwicklung und Funktion des Verdauungstraktes sowie der Gewebeentwicklung involviert. Bei dem Netzwerk mit dem Score von 26 zeigten sich die Proteine Actin, Beta-actin (ACTB), CFL1 und F Actin in unterschiedlich starker Expression (Abb. 25 B). Sie sind an Stoffwechselwegen des zellulären Aufbaus und Organisation sowie der zellulären Funktion im Sinne der Aufrechterhaltung beteiligt.

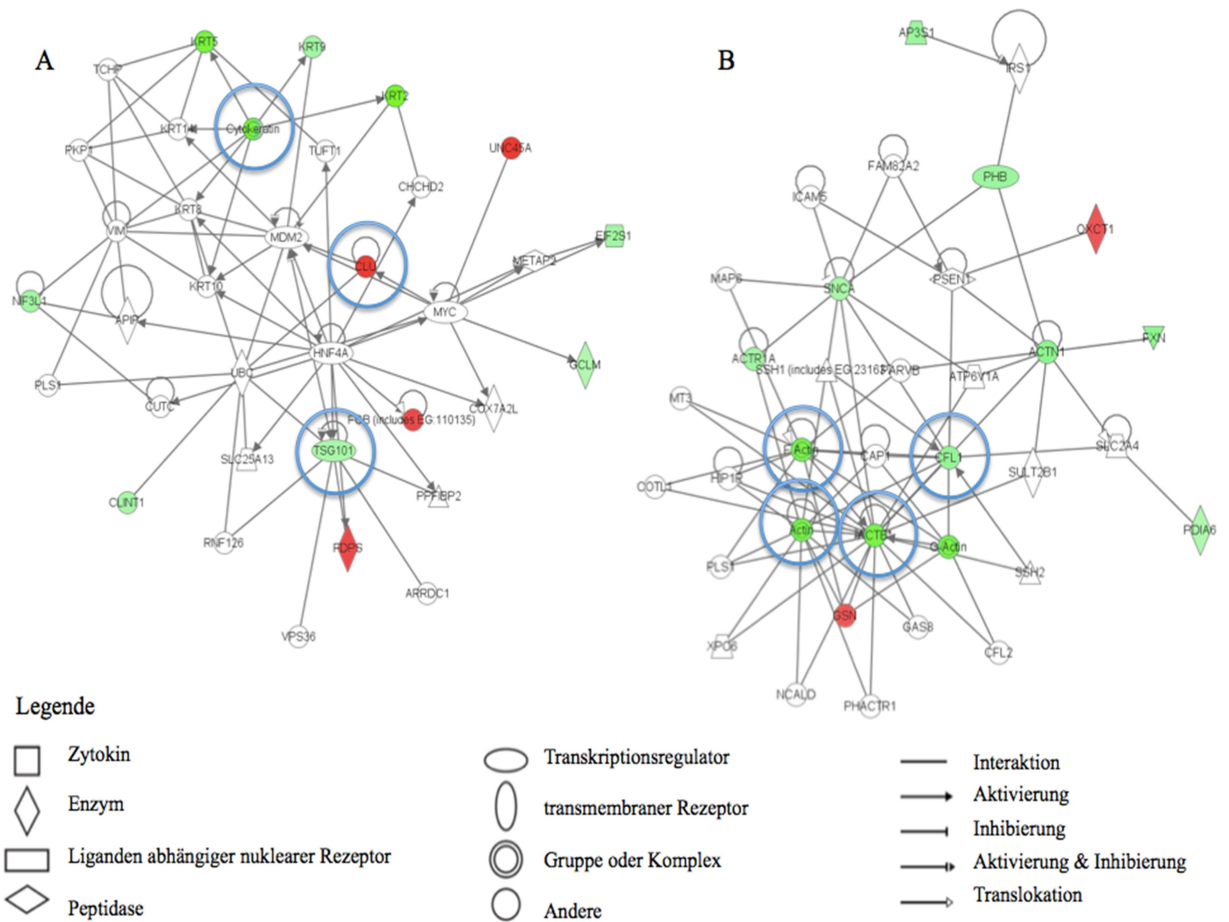


Abbildung 25 A: IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 28. Drei deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine nehmen an den Interaktionen teil (CLU, Cytokeratin und TSG 101). **B:** IPA Netzwerk im Vergleich Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 26. Hier sind vier Proteine mit unterschiedlichem Expressionstatus in den Interaktionen enthalten (Actin, ACTB, CFL1 und F-Actin). Rot markierte Proteine haben ein niedrigeres Expressionsniveau in Thrombozyten bei KRK im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei grün markierte Proteine ein höheres Expressionsniveau in den KRK-Proben haben. Weiß dargestellte Gene/Proteine wurden nicht als differentiell exprimiert detektiert aber von IPA mit einbezogen, um die Konnektivität zu optimieren.

Im Zweigruppen-Vergleich Früh- versus Spätkarzinom ergaben sich zwei Netzwerke mit einem Score von 36 und 13. Das Netzwerk mit dem Score von 36 zeigte die Proteine Cytokeratin und TSG 101 mit deutlich unterschiedlichem Expressionsstatus. Sie interagieren im Arzneimittelstoffwechsel sowie im molekularen Transport (Abb. 26 A). Im Netzwerk mit dem Score von 13 zeigte das Protein Cytokeratin eine niedrigere Expression verglichen mit der Gruppe Frühkarzinom. Cytokeratin ist in Stoffwechselwege von zellulärem Wachstum und Proliferation sowie zellulärer Funktion und Aufrechterhaltung involviert (Abb. 26 B).

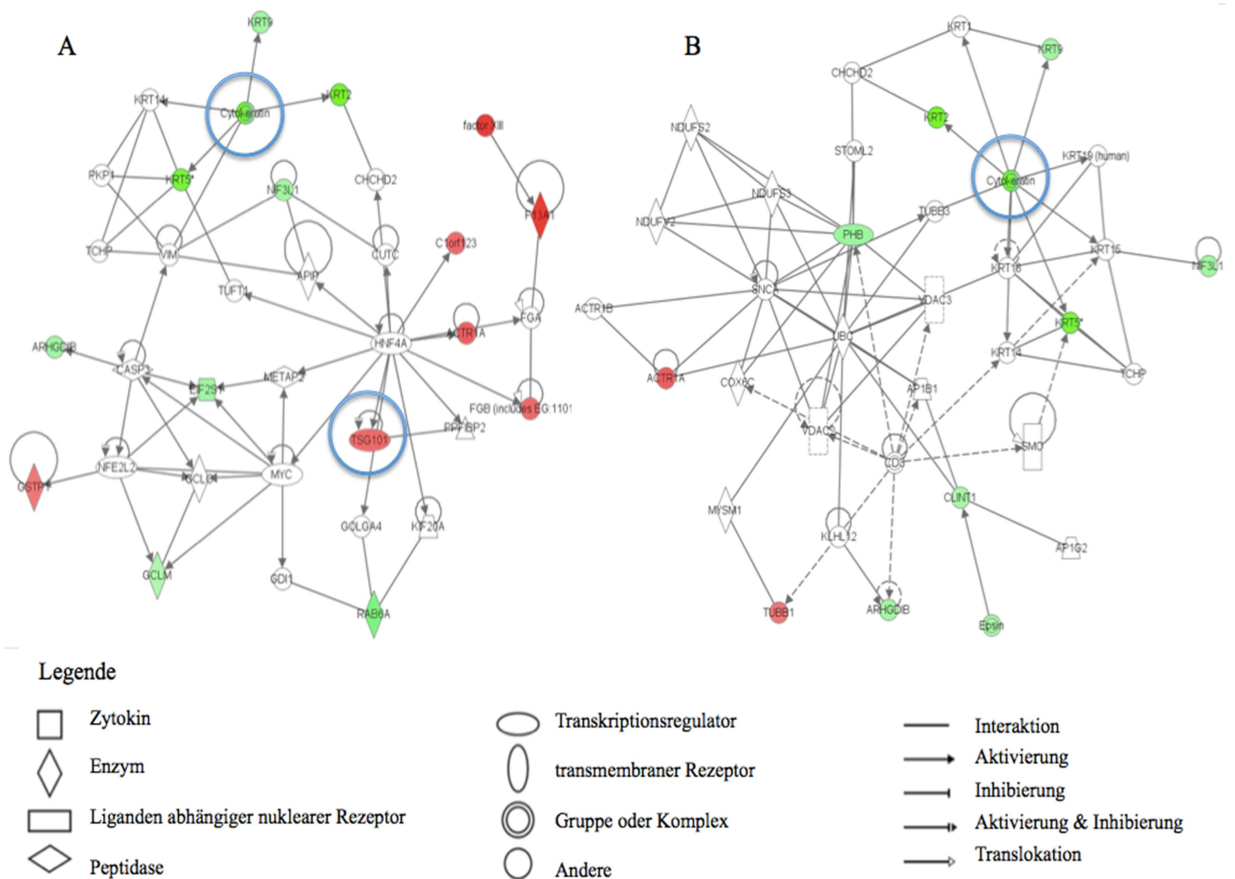


Abbildung 26 A: IPA Netzwerk im Vergleich Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 36. Zwei deutlich unterschiedlich exprimierte Proteine nehmen an den Interaktionen teil (Cytokeratin und TSG 101). **B:** IPA Netzwerk im Vergleich Früh- versus Spätkarzinom mit dem Score von 13. Hier ist ein Protein mit unterschiedlichem Expressionstatus in den Interaktionen enthalten (Cytokeratin). Rot markierte Proteine haben ein niedrigeres Expressionsniveau in Thrombozyten bei KRK im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei grün markierte Proteine ein höheres Expressionsniveau in den KRK-Proben haben. Weiß dargestellte Gene/Proteine wurden nicht als differentiell exprimiert detektiert aber von IPA mit einbezogen, um die Konnektivität zu optimieren.

Die Auswertung der IPA zeigte die oben dargestellten zentralen Proteine aus den Netzwerken mit den höchsten Scores (Tab. 6 und Abb. 23 – 26). Diese Proteine wurde mit den Ergebnissen der 2-D DIGE verglichen. Die Proteine, die in den einzelnen Gruppenvergleichen vorkamen und bei denen die Expression in den Auswertungen der 2-D DIGE und den Netzwerkanalysen übereinstimmten, wurden für weitergehende Analysen ausgewählt (Tab. 7).

Tabelle 7 Proteine identifiziert mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie.

Protein		CLU	VCL	CASP3	CFL	GSS
Spot - #		814	189	918	1148	632
Anova (p)		0,0035	0,0724	0,1640	0,3890	0,1955
Expressionsunterschied		1,50	1,24	1,14	1,24	1,11
Höchster Mittelwert		Kontrollen	Kontrollen	Kontrollen	Karzinom	Karzinom
Niedrigster Mittelwert		Karzinom	Karzinom	Karzinom	Kontrollen	Kontrollen
Protein pI		5,90	5,40	6,10	9,10	5,60
Protein MW		53	124	32	18	52
Chromosomenlokalisierung		8p21-p12	10q22.2	4q34	11q13	20q11.2
Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe		↓	↓	↓	↑	↑
Expression im Vergleich Früh- versus Spätkarzinom		↓	↑	↑	↑	↓
MS/MS-Mode	Score	74	241	102	86	225
	Differenz	24	199	39	43	168
	Abdeckung	16	22	18	8	28
Kontrolle versus Kolonkarzinom		x	x			x
Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom		x			x	
Kontrolle versus Frühkarzinom		x		x		x
Kontrolle versus Spätkarzinom		x			x	
Früh- versus Spätkarzinom						

(pI = isoelektrischer Punkt, MW = Molekulargewicht, Chr = Chromosom, ↓ = niedrigere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. zur Gruppe Frühkarzinom, ↑ = höhere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. zur Gruppe Frühkarzinom)

CLU, VCL und CASP3 wurden als Zielproteine für die anschließende Western Blot Validierung ausgewählt. Die Auswahl von CLU basierte auf dessen Proteinexpression in der 2-D DIGE und dessen Auftreten in den meisten Gruppenvergleichen: Kontrolle versus Kolonkarzinom, Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom, Kontrolle versus Frühkarzinom und Kontrolle versus Spätkarzinom. Zudem wies CLU mit dem 1,5-fachen den höchsten Expressionsunterschied von der gesamten Proteinauswahl auf. Die

Proteinexpression von CLU zeigte sich niedriger im Thrombozytenproteom von KRK-Patienten. VCL wurde aufgrund seiner signifikant niedrigeren Expression in der 2-D DIGE im Thrombozytenproteom der KRK-Patienten selektiert. Es trat in dem Gruppenvergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom auf. Zusätzlich hatte VCL mit dem 1,24-fachen einen der höchsten Expressionunterschiede aufzuweisen.

CASP3 wurde ausgewählt, da es aus der 2-D DIGE als eines der Proteine mit signifikanter Expression in dem Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom hervorging. CASP3 besaß einen Expressionunterschied von 1,14 und lag im Thrombozytenproteom der Patienten mit KRK in niedrigerer Expression vor. Der Gruppenvergleich Kontrolle versus Frühkarzinom zeigte in der PCA (Abb. 18) eine klare Separation der beiden Gruppen. Basierend auf diesen Erkenntnissen lag das Augenmerk dieser Arbeit auf diesen Polypeptiden, die im späteren Verlauf mittels Western Blot validiert wurden.

4.4 Validierung der Proteindaten mittels Western Blot-Analyse

Basierend auf den IPA-Analysen und ihren Funktionen wurden CLU, CASP3 und VCL aus den 2-D DIGE/MALDI-TOF-Experimenten für die ersten Validierungsversuche mittels Western Blot ausgewählt. Unabhängig vom ausgewählten Kollektiv der 2-D DIGE wurde zur Bestätigung der Ergebnisse ein neues Kollektiv für die Validierung mittels Western Blot erstellt, welches 12 Patienten in der Kontrollgruppe, 5 Patienten in der Gruppe Früh-Karzinom und 5 Patienten in der Gruppe Spät-Karzinom beinhaltete (Tab. 4).

Die Western Blot Daten von CLU und VCL spiegelten die Expressionslevel der aus der 2-D DIGE gewonnenen Daten in den Vergleichen Kontrolle versus Früh- versus Spätkarzinom, Kontrolle versus Kolonkarzinom, Kontrolle versus Frühkarzinom und Kontrolle versus Spätkarzinom wider. Für den Gruppenvergleich Früh- versus Spätkarzinom war der Expressionsstatus von CLU im Western Blot zu den Ergebnissen der 2-D DIGE gegenläufig. Für VCL stimmten die Expressionslevel in den beiden Verfahren überein. Für CASP3 hingegen konnten die 2-D DIGE Ergebnisse im Western Blot nicht bestätigt werden.

Die Auswertung des Bandenvolumens von CLU beim Western Blot ergab in den Kontrollproben einen Median von 7,101 kDa. Bei der Patientengruppe mit

Kolonkarzinom lag der Median für das normalisierte Volumen der Bande von CLU bei 5,257 kDa. Die Auswertung der Proben der Patientengruppe mit Frühkarzinom erfasste einen Median von 5,540 kDa und bei der Patientengruppe mit Spätkarzinom lag der Median bei 4,974 kDa.

In dem Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom lag der p-Wert bei 0,055 und repräsentierte damit ein Expressionslevel nur knapp oberhalb der Signifikanzgrenze. Für die weiteren Zweigruppenvergleiche ergab sich ebenfalls kein signifikanter Wert. Auf alle Untersuchungsgruppen bezogen nahm die Konzentration von CLU von der gesunden Kontrollgruppe über die Patientengruppe mit Frühkarzinom hin zum Spätkarzinom tendenziell ab (Abb. 27). Für den Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom lag das Expressionsniveau von CLU bei Patienten mit KRK im Frühstadium leicht niedriger vor. Der Median der Frühkarzinomgruppe befand sich hier unterhalb der Kontrollgruppe, jedoch weisen die Daten eine hohe Standardabweichung auf. Daher fand sich für diesen Gruppenvergleich kein signifikanter p-Wert.

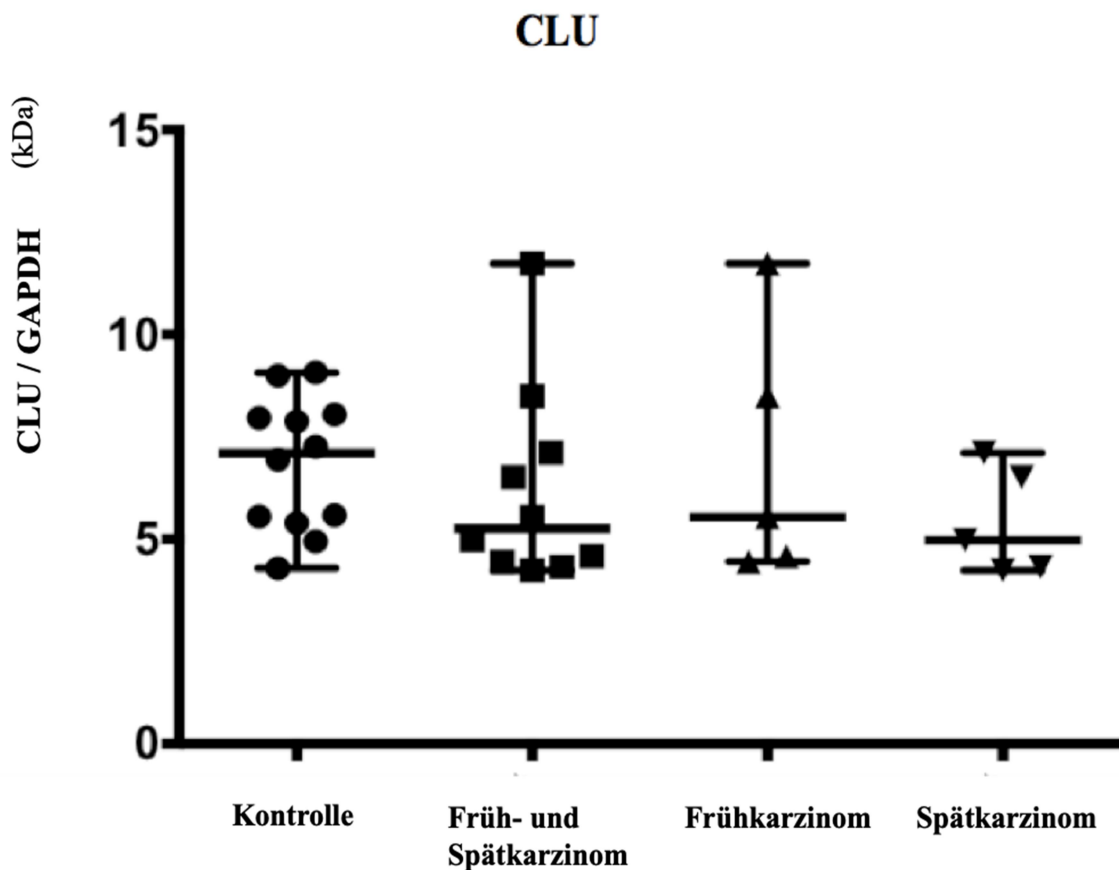


Abbildung 27 Punktdiagramm des Bandenvolumens von CLU in den unterschiedlichen Vergleichsgruppen. Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. Die horizontale Linie zeigt den Median \pm Standardabweichung (SD) der jeweiligen Gruppe an. Jeder Kreis, jedes Dreieck oder Quadrat stellt das Proteinlevel im Thrombozytenproteom für das jeweilige Protein in einer Patientenprobe dar. Bereich Kontrolle: 4,288 - 9,064, Median 7,101; Bereich Früh- und Spätkarzinom: 4,237 - 11,732, Median 5,257;

Bereich Frühkarzinom: 4,451 - 11,732, Median 5,540; Bereich Spätkarzinom: 4,237 - 7,108, Median 4,974.

Bei der Analyse der Kontrollproben für VCL lag der Median für das normalisierte Bandenvolumen bei 41,590 kDa. Für die Proben der Gruppe Kolonkarzinom ergab sich ein Median von 35,370 kDa. Die Auswertung der Proben der Gruppe Frühkarzinom zeigte den Median bei 36,830 kDa und bei der Gruppe Spätkarzinom lag der Median bei 33,900 kDa.

Für die unterschiedlichen Zweigruppenvergleiche fand sich kein signifikanter Wert. In dem Vergleich Kontrolle versus Kolonkarzinom lag der p-Wert bei 0,116, in dem Vergleich Kontrolle versus Frühkarzinom bei 0,112 und im Vergleich Kontrolle versus Spätkarzinom bei 0,294. Auf die Untersuchungsgruppen bezogen zeigte sich die Konzentration von VCL ausgehend von der gesunden Kontrollgruppe in abnehmender Tendenz (Abb. 28). Der Median der drei Karzinomgruppen lag jeweils unterhalb der Kontrollgruppe, jedoch ist auch hier eine große Streuung der Datenpunkte vorhanden.

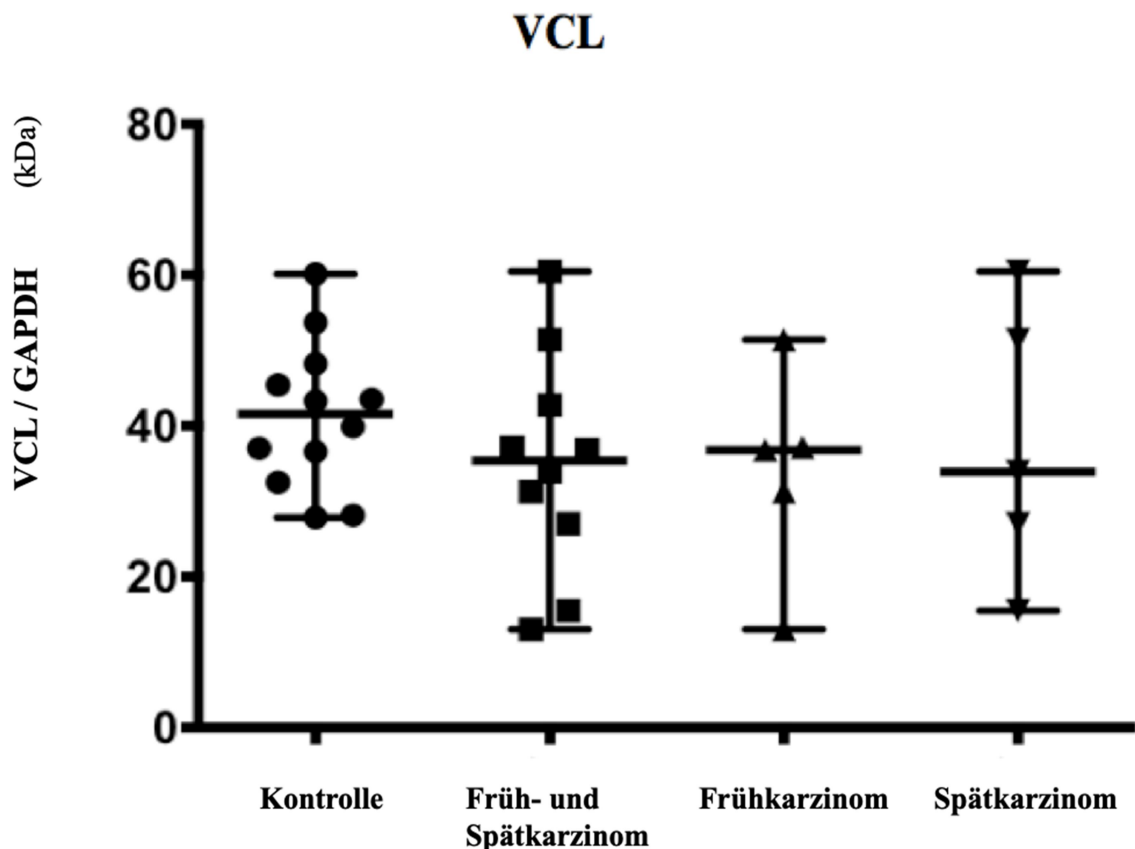


Abbildung 28 Punktdiagramm des Bandenvolumens von VCL in den unterschiedlichen Vergleichsgruppen. Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. Die horizontale Linie zeigt den Median \pm Standardabweichung (SD) der jeweiligen Gruppe an. Jeder Kreis, jedes Dreieck oder Quadrat stellt das Proteinlevel im Thrombozytenproteom für das jeweilige Protein in einer Patientenprobe dar. Bereich Kontrolle: 27,845 - 60,136, Median 41,590; Bereich Früh- und Spätkarzinom: 13,019 - 60,464, Median 35,370; Bereich Frühkarzinom: 13,019 - 51,433, Median 36,830; Bereich Spätkarzinom: 15,484 - 60,464, Median 33,900.

Das normalisierte Bandenvolumen der Auswertung der Kontrollgruppe für CASP3 hatte einen Median von 8,926 kDa. Die Proben der Gruppe Kolonkarzinom für CASP3 zeigten einen Median, der bei 8,043 kDa lag. Bei den Proben der Gruppe Frühkarzinom lag der Median bei 7,578 kDa und bei der Gruppe Spätkarzinom bei 8,508 kDa. In den Zweigruppenvergleichen fand sich kein signifikanter p-Wert. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kontroll- und den KRK-Gruppen in allen Vergleichen (Abb. 29).

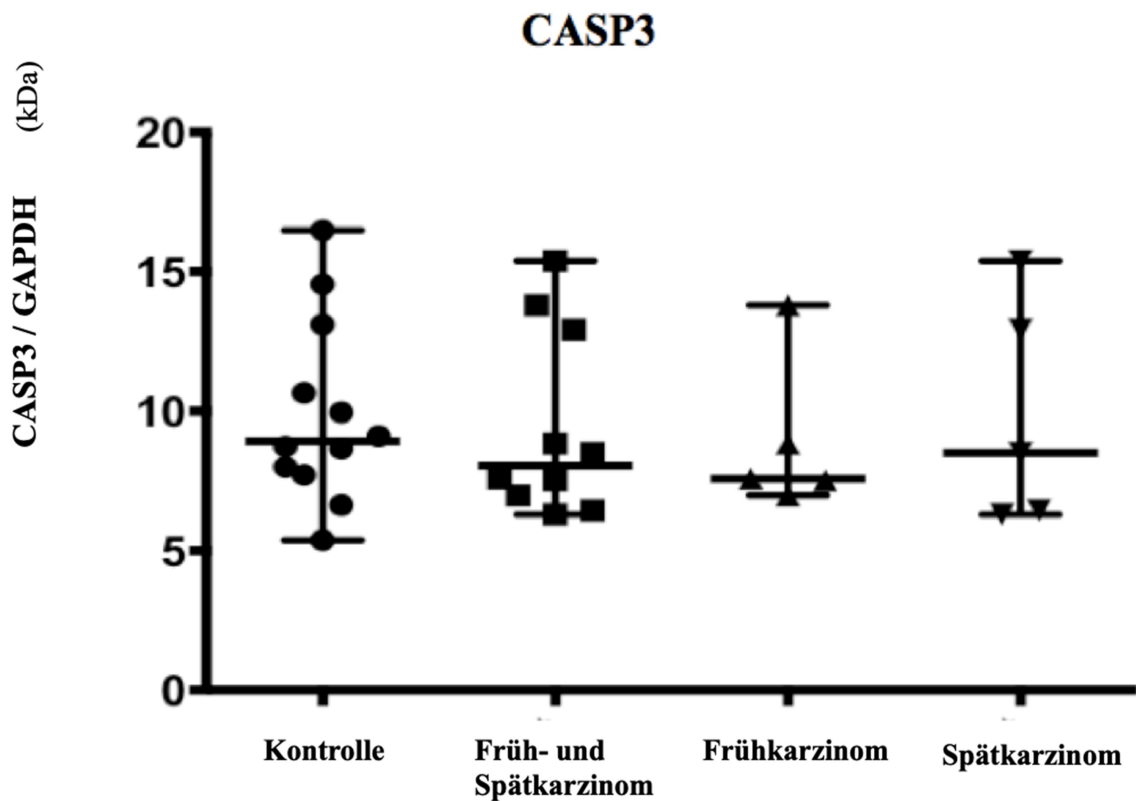


Abbildung 29 Punktdiagramm des Bandenvolumens von CASP3 in den unterschiedlichen Vergleichsgruppen. Normalisierung erfolgte gegen GAPDH. Die horizontale Linie zeigt den Median \pm Standardabweichung (SD) der jeweiligen Gruppe an. Jeder Kreis, jedes Dreieck oder Quadrat stellt das Proteinlevel im Thrombozytenproteom für das jeweilige Protein in einer Patientenprobe dar. Bereich Kontrolle: 5,384 - 16,482, Median 8,926; Bereich Früh- und Spätkarzinom: 6,304 - 15,383, Median 8,043; Bereich Frühkarzinom: 6,975 - 13,790, Median 7,578; Bereich Spätkarzinom: 6,304 - 15,383, Median 8,508.

5. DISKUSSION

Die Bereitschaft zur Darmkrebsvorsorge mittels Koloskopie fällt aufgrund des hohen Aufwandes zur Vorbereitung und die Unannehmlichkeiten der invasiven Diagnostik gering aus. Die Suche nach Markern zur Früherkennung mittels minimal-invasiver Tests wird daher immer notwendiger (Allescher und Weingart 2019; Pox et al. 2012). Bislang haben sich eine geringe Anzahl von anerkannten Biomarkern, wie z.B. Prostataspezifisches Antigen (PSA), Carcinoembryonales Antigen (CEA), Cancer-Antigen 125 (CA125) und Thyroglobulin als klinisch bedingt hilfreich erwiesen. Die Vorteile, Blutbestandteile als Biomarker zu verwenden, sind deren leichte Gewinnung und schnelle Verfügbarkeit (Anderson und Anderson 2002; Bidart et al. 1999; Jacobs et al. 2005; Sidransky 2002; Tirumalai et al. 2003). Zudem würde eine minimal-invasive Diagnostik die Akzeptanz zur Vorsorge und damit die Früherkennung von Malignomen erhöhen.

Die unterschiedlichen Blutkompartimente beinhalten Proteine und Proteinfragmente, die durch verstärktes oder vermindertes Vorkommen zur frühen Detektion einer malignen Veränderung beitragen können. Als eine Quelle für Proteinbiomarker sind Thrombozyten leicht aus dem Serum des Blutes zu gewinnen. Sie besitzen großes Potential, neue Biomarker zu enthalten, da sie körpereigene Prozesse widerspiegeln (Asghar et al. 2019; Burkhart et al. 2014a; Saluk et al. 2014). Es wird angenommen, dass sie Informationen bei Stoffwechselveränderung im Sinne einer modifizierten Proteinkonstellation aufnehmen und transportieren (Burkhart et al. 2014b; Cini et al. 2015).

Ziel dieser Arbeit war es, entsprechende Proteine im Thrombozytenproteom zu detektieren, die auf ein frühes Stadium von Darmkrebs hinweisen. Im Rahmen der fluoreszenzbasierten 2-D DIGE wurden 133 Proteinveränderungen in KRK-Patienten im frühen und späten Stadium verglichen mit Kontrollpersonen detektiert. Mittels der im Anschluss eingesetzten Massenspektrometrie wurden unterschiedlich exprimierte Proteine nachfolgend identifiziert. Zur Auswahl geeigneter Proteine für eine weitergehende Validierung wurde eine IPA mit Netzwerkanalyse angeschlossen. Die

Validierung der ausgewählten Proteine fand durch eine Western Blot Analyse anhand einer neuen Kohorte statt.

5.1 2-D DIGE ermöglicht hohe Detektionsrate

Einen elementaren Abschnitt dieser Arbeit stellt die fluoreszenzbasierte 2-D DIGE dar, die es ermöglicht, komplexe Proteingemische von bis zu 5.000 Proteinen aufzutrennen (Görg et al. 2004). Die Separation eines Proteingemisches auf einem zweidimensionalen Gel ist eine weit verbreitete und gut etablierte Methode. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen lässt einen sehr sensitiven, semi-quantitativen Vergleich zweier unterschiedlicher Proben zu. Die zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese gilt als Goldstandard zur Charakterisierung von Unterschieden in Proteinexpressionsniveaus (Unlü et al. 1997).

Die 2-D DIGE bietet bei der Untersuchung von Expressionsunterschieden und -veränderungen in biologischen Proben viele Vorteile. Sie ermöglicht die gleichzeitige Separation von zwei Untersuchungsproben im Vergleich zum internen Standard (IS) auf einem Gel, was zu erhöhter Sensitivität und besserer Vergleichbarkeit führt, da ein Vergleich der einzelnen Proben über die einzelnen Gele hinweg möglich ist und die Proben nicht paarweise pro Gel verglichen werden müssen (Alban et al. 2003). Weiterhin erleichtert sie die Identifikation der Spots und das Matching, wodurch die Anzahl der analysierbaren Spots erhöht wird. Biologische Veränderungen in zu untersuchenden Proben können so sicher identifiziert werden (Diez et al. 2010; Karp et al. 2004). Die 2-D DIGE besitzt weitergehend die Fähigkeit, Proteine auch mit post-translationalen Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung oder Methylierung, zu erkennen. Hierbei entsteht eine Differenz zwischen identifizierten und einmalig detektierten Proteinen, was in unserer Arbeit gut darzustellen war (siehe Tab. 5). Das Erkennen dieser Modifikationen ist von Vorteil, denn diese spielen häufig eine Rolle in der Proteinmodulation bei veränderten Stoffwechselwegen (vergleiche dazu Abb. 23 – 26) wie z.B. im Rahmen von Karzinogenese zu beobachten ist.

Arbeiten, die das Thrombozytenproteom mittels 2-D DIGE auf Tumormarker zur Früherkennung von KRK untersuchten, sind bisher nicht bekannt. Daher wurden Proteinanalysen in anderen Blutkompartimenten als Vergleich zu unseren Ergebnissen herangezogen.

In der Studie von Lim et al. ließen sich mittels 2-D DIGE mit anschließender Massenspektrometrie Proteine aus Serumproben von Patienten mit KRK im Früh- und im Spätstadium mit gesunden Kontrollproben vergleichen. Hier konnten 23 Proteine ermittelt werden, die im Vergleich zu gesunden Kontrollproben einen signifikant unterschiedlichen Expressionsstatus aufwiesen (Lim et al. 2016). Es bestand jedoch keine Übereinstimmung der von Lim et al. detektierten Proteine mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Anhand der 2D-DIGE konnten in unserer Arbeit allerdings ebenfalls Expressionsschwankungen von Proteinen gefunden werden, wie in den Gruppenvergleichen in Abbildung 13 dargestellt. Hier wurden insgesamt 177 Proteine mit unterschiedlichem Expressionsstatus detektiert (siehe Tab. 9). Da in der Literatur die 2-D DIGE als ein vorteilhaftes Verfahren zur Proteinauftrennung und mit hoher Reproduzierbarkeit unter Erhaltung der quantitativen Verhältnisse beschrieben wird, ist davon auszugehen, dass die detektierten Proteine in beiden Untersuchungen eine klinische Relevanz besitzen. Folgende Ursachen könnten erklären, warum keine überlappenden Proteine zwischen beiden Arbeiten detektiert wurden:

- Der größte Unterschied liegt in der Verwendung von unterschiedlichem Untersuchungsmaterial. Lim et al. verwendeten Serumproben, wobei wir hingegen das Thrombozytenproteom untersuchten. Das zu untersuchende Proteinspektrum beinhaltet daher nur bedingt übereinstimmende Proteine bzw. Kongruenz in den Proteinschwankungen (Lim et al. 2016).
- Weiterhin kann die Untersuchungsmethode angeführt werden: Da die 2D-DIGE eine hohe Anzahl an Proteinen detektieren kann, ist es möglich, dass ähnliche Proteinexpressionsschwankungen bestimmt wurden. Je nach Bedeutung und Signifianz der Proteinexpressionen wurde diesen unterschiedliche Beachtung geschenkt und möglicherweise in den folgenden Schritten (PCA, MALDI, IPA) nicht weiter untersucht.
- In beiden Studien lässt sich die geringe Probenanzahl anführen, die auf eine größere Probandenzahlen erhöht werden muss, um genauere Aussagen zu treffen.

- Des Weiteren ist zu benennen, dass bereits kleine Unterschiede in der Präparation oder Aufbewahrung von Blutproben zu Veränderungen der Ergebnisse führen können (Villanueva et al. 2005).

Mit dem Ziel, neue Biomarker zur Früherkennung des KRK zu etablieren, wurden weitere Studien mit der Verwendung der 2-D DIGE durchgeführt (Álvarez-Chaver et al. 2014). Durch Chen et al. wurde anhand dieses Verfahrens eine Überexpression von Alpha-Enolase in Tumorgewebe von Patienten mit KRK festgestellt (Chen et al. 2011). Weitere Studien mit selbigem Verfahren zeigten S100A8, S100A9 und Desmin als mögliche neue Serummarker (Kim et al. 2009; Ma et al. 2009).

Auch in diesen Studien wurde nicht das Thrombozytenproteom untersucht. Chen et al. analysierten das Tumorgewebe, Kim et al. und Ma et al. arbeiteten Serumproteine auf. Trotzdem, dass unterschiedliche Untersuchungsmaterialien vorlagen, ließen sich Proteinexpressionsschwankungen beim Vorhandensein eines KRK mit der gleichen Methode gut nachweisen.

5.2 Principal Components Analyse bei KRK-Patienten anhand Thrombozyten-Proteom

Um große Datenmengen vergleichen zu können, wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA) herangezogen und verschiedene Gruppenvergleiche durchgeführt. Auf der PCA basierende Clusteranalysen zeigten eine eindeutige Separation zwischen den einzelnen Gruppen (siehe Abbildungen 16, 17, 18, 20, 21). Diese Separation und die hohe Anzahl an signifikanten Proteinen lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich das Thrombozyten-Proteom durch unterschiedliche Stoffwechselprozesse bei Vorhandensein von Krebs deutlich verändert. Unsere Fragestellung nach dem Vorhandensein von Veränderungen in der Proteinzusammensetzung in Thrombozyten im frühen Stadium von Darmkrebs konnte anhand der hier erhobenen Daten mittels PCA bestätigt werden.

5.3 Massenspektrometrie basierte Proteinprofile im Serum

Die mittels 2-D DIGE ermittelten Proteinspots wurden zur Identifikation mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht (siehe Tab. 5). Von 177 zur MALDI-TOF Analyse eingesandten Spots konnten 133 identifiziert werden. Somit ergab sich eine Identifizierungsrate an Proteinen durch die MALDI-TOF von 75%. In der Literatur

sind bislang Identifizierungsraten mittels MALDI-TOF von Proben aus einer zweidimensionalen Gelelektrophorese mit Silberfärbung von 54 % bis 80 % bekannt (Li et al. 2016; Roblick et al. 2008). Somit war die hier generierte Identifizierungsrate im Literaturvergleich als hoch anzusehen.

Die 133 identifizierten Proteine konnten durch Vergleich mit der SwissProt-Datenbank sicher benannt werden. Alle in diesem Experiment identifizierten Proteine waren in dieser Datenbank vorhanden. Proteine, die eine zentrale Rolle in der Zellproliferation spielen, waren für diese Arbeit interessant und wurden weitergehend untersucht (vergleiche Tab. 7). Die SwissProt-Datenbank liefert gemäß Bairoch und Apweiler bestimmte Vorteile, die sie von anderen Datenbanken unterscheidet (Bairoch und Apweiler 2000). Dazu zählt die Möglichkeit der Anfertigung von Anmerkungen für Proteine, entsprechend den Beschreibungen des Proteins durch Funktion, posttranslationale Modifikationen, ähnlichen Proteinen und Vorkommen bei Krankheiten. Darüberhinaus zeigen die aufgelisteten Proteine in der SwissProt-Datenbank eine minimale Redundanz und eine Integration mit anderen Datenbanken ist möglich.

In der Arbeit von Zhang et al. wurde die Proteinidentifikation mittels MALDI-TOF mit anschließender Datenanalyse mittels SwissProt zur Identifikation von Tumorzellen eines KRK verwendet (Zhang et al. 2005a). Es wurde demonstriert, dass Tumorzellen anhand der Verwendung von zweidimensionaler Gelelektrophorese mit Silberfärbung per anschließender Proteinbestimmung mittels MALDI-TOF sicher identifiziert werden konnten. Der Datenabgleich mit der SwissProt Datenbank zeigte, dass die bestimmten Proteine in wichtigen Stoffwechselwegen und Interaktionen der Karzinogene stehen.

Villanueva et. al. setzten sich in ihrer Arbeit das Ziel, neue Biomarker zur Erkennung von Malignomen aus Blutserum mittels PCA und MALDI-TOF zu erschließen. Sie untersuchten Serumproteine von Patienten mit fortgeschrittenem Prostata-, Blasen- und Brustkrebs und verglichen diese mittels MALDI-TOF mit Serumproteinen von gesunden Kontrollpatienten. Sie konnten beschreiben, dass eine Form der Proteinprofile bei Patienten mit o.g. Tumoren vorlag. Überraschenderweise stellten sich die Proteine, die als tumorspezifische Marker identifiziert schienen, als Produkte des enzymatischen Abbaus heraus, der nach der Entnahme von Patientenserum entstand. Ob die Proteinprofile durch das Tumorleiden hervorgerufen wurde oder durch präanalytische

Modifikation nach Blutentnahme entstand, konnte nicht eindeutig festgestellt werden (Villanueva et al. 2006). Die Autoren machten darauf aufmerksam, dass Fehler durch Veränderungen des Blutes nach Probenentnahme entstehen können, da Proteinmodifikationen auch noch nach Blutentnahme ablaufen können. Sie wiesen darauf hin, dass der Gebrauch von Proteaseinhibitoren und die geringste Abweichung vom Studienprotokoll, eingeschlossen der Sammlung von Plasmaproben vermieden werden sollte, würde man die von Ihnen beschriebenen Proteine als klinische Biomarker einsetzen wollen (Villanueva et al. 2005).

Weitere Studien haben gezeigt, dass sich massenspektrometrische Analysen des Proteoms aus Blutproben für die Identifizierung von unterschiedlichen Proteomprofilen eignen. Adam et al. haben Proteommuster aus Serumproben mittels oberflächenverstärkter Laserdesorptions Ionisation (Surface-enhanced laser-desorption ionization = SELDI-TOF) erstellt. Hier wurden anvisierte Proteine in den Proben an eine Oberfläche anstatt an eine Matrix wie bei MALDI-TOF gebunden, bevor sie durch den Laser betrachtet wurden. Sie erstellten Proteommuster von 167 Patienten mit Prostatakarzinom, 77 von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und 82 von einer gesunden Kontrollgruppe. Diese Daten wurde in eine Lernsoftware gespeist. Diese sollte anhand der erlernten Muster bei einem neuen Kollektiv von 30 Patienten mit Prostatakarzinom, 15 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und 15 gesunden Kontrollpatienten zwischen dem Vorhandensein von Prostatakarzinom und gesundem Patientenserum unterscheiden. Mit einer Sensitivität von 83%, einer Spezifität von 97% und einem positivem prädiktivem Wert von 96% konnte anhand dieses Verfahrens von Patientenseren bei Vorhandensein eines Prostatakarzinom und Testseren von gesunden Kontrollpatienten unterschieden werden (Adam et al. 2002). Auch Villanueva et al. nutzen die Erstellung von Proteommustern aus Patientenseren mittels MALDI-TOF zur Suche nach Biomarkern für unterschiedliche Tumorentitäten. Sie untersuchten 106 Serumproben von Patienten mit Prostata-, Blasen- oder Brustkrebs und verglichen diese mit gesunden Kontrollproben. Hieraus resultierten Proteinmuster, die es zuließen, zwischen Kontrollseren und Patientenseren der unterschiedlichen Tumorentitäten zu unterscheiden (Villanueva et al. 2006).

Auch Padoan et al. untersuchten, ob Proteomanalysen mittels MALDI-TOF zur Suche nach speziellen Biomarkern zur Früherkennung eines Prostatakarzinoms eine geeignete

Methode darstellen (Padoan et al. 2018). Sie wählten diese Methode aufgrund geringer Anforderungen an die Probenaufbereitung und dessen geringen Zeitaufwandes. In 148 Serum- und Urinproben von Patienten mit Harnwegssymptomen konnten 482 Besonderheiten im Proteom der Urinproben und 186 in Serumproben festgestellt werden. Anhand des Vergleichs dieser Proteomunterschiede bewerteten sie die Reliabilität von MALDI-TOF und kamen zu dem Schluss, dass Proteomanalysen erfolgreich ausgewertet werden können und reproduzierbar sind, wenn das gesamte Spektrum der Proteomunterschiede bewertet wird.

In ihrem Review beschrieben Indovina et al. Studien, die Proteomanalysen basierend auf Massenspektrometrie nutzten, um Proteine zu bestimmen, die als diagnostische oder prädiktive Marker für ein Lungenkarzinom dienen. Indovina et al. propagierten die massenspektrometrische Analyse als aussagekräftiges Mittel in der Proteomforschung (Padoan et al. 2018).

5.4 Ingenuity Pathway Analyse für Proteinnetzwerkanalyse beim KRK

Mittels IPA wurde die Auswahl der detektierten Proteine spezifiziert, indem die Interaktion der Proteine mit unterschiedlichen Expressionsleveln mittels überlappender Netzwerke dargestellt wurde (siehe Abbildungen 23-26). Die 133 indentifizierten Proteine konnten anhand ihrer Funktionalität zu verschiedenen Netzwerken zugeordnet werden. Nicht jedes Protein, das zu einem bedeutenden Netzwerk gehört, ist an Stoffwechselwegen bzw. Erkrankungsmechanismen von Malignomen beteiligt (Tabelle 6). Daher konnte die Suche nach geeigneten Proteinen als Tumormarker weiter eingegrenzt werden. Wir konzentrierten uns daraufhin auf die fünf Proteine Clusterin (CLU), Caspase 3 (CASP3), Vinculin (VCL), Cofilin (CFL) und Gluthation Synthase (GSS). In der Literatur wird IPA häufig herangezogen, um Biomarker für unterschiedlichste Tumorentitäten zu ermitteln. Entsprechende regulatorische Stoffwechselwege konnten auch hier ausgemacht und in Verbindung mit potentiellen Biomarker gebracht werden (Hershkovitz-Rokah et al. 2018; Liu et al. 2018a, 2018b; Zhang et al. 2005b).

5.5 Western Blot

Um die Aussagekraft der Ergebnisse von 2-D DIGE und MALDI-TOF durch eine weitere Methode zu bestätigen, führten wir eine Western Blot-Analyse durch (siehe Abbildungen 27-29).

Die durch 2-D DIGE und MALDI-TOF bestimmten Expressionslevel für CLU (Abb. 27), VCL (Abb. 28) und CASP3 (Abb. 29) konnten mittels Western Blot nicht signifikant bestätigt werden, was an einer hohen Streuung der Meßdaten liegen könnte. Lediglich eine Tendenz der Expression für alle drei Proteine ließ sich übereinstimmend mit den Daten der 2-D DIGE verzeichnen.

Die in unserem Versuchsansatz verwendete niedrige Probenzahl könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass die Western Blot-Analysen keine Signifikanz erreichte. Strohkamp et al. konnten nachfolgend mit einer modifizierten Western Blot Methodik die in dieser Arbeit identifizierten Proteine erfolgreich validieren (Strohkamp et al. 2017). Dort wurde anstatt des Western Blots mit Trans-Turbo Blotting System eine multiplexe fluoreszenzbasierte Western Blot Analyse verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass CLU und CFL im Thrombozyten-Proteom in unterschiedlicher Konzentration bei Gesunden und KRK Patienten vorkommen.

5.6 Thrombozyten eignen sich als Marker zur KRK-Früherkennung

Thrombozyten verändern sich ständig und spiegeln körpereigene Prozesse wider, was sie als Marker einzigartig und vielversprechend für Darmkrebsfrüherkennung macht (Burkhart et al. 2014b; Normanno et al. 2018; Saluk et al. 2014). 1965 wurde durch den französischen Arzt Armand Trousseau beschrieben, dass Thrombozyten mit Tumorzellen interagieren und entscheidend für den Weg der Metastasen-Bildung sein können (Carrier et al. 2008; Ikushima et al. 2016). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten an verschiedenen Wegen der Krebsentstehung mitwirken, u.a. bei der Angiogenese, der Invasion oder beim Überleben der krebstragenden Zellen im Blutstrom (Gupta und Massagué 2004; Jurasz et al. 2004; Sierko und Wojtukiewicz 2004; Bambace und Holmes 2011; Goubran et al. 2014; Mammadova-Bach et al. 2016). Da Thrombozyten bei der Metastasierung bestimmte Proteomveränderungen zeigen, ist es wahrscheinlich, dass sie schon in frühen Stadien

der Krebserkrankungen wichtige Hinweise auf den Erkrankungsverlauf geben können (Beger 2013; Fiehn 2002). Daher wurde das Thrombozytenproteom in dieser Arbeit als Suchansatz für potentielle Biomarker verwendet.

Das Thrombozytenproteom besitzt die Möglichkeit, potenzielle Zielproteine zu liefern, welche mit Entstehung und Progress von malignen gastrointestinalen Erkrankungen assoziiert sind. In diesem Zusammenhang bieten Biomarker aus Thrombozytenproteinen die Möglichkeit, die Darmkrebsfrüherkennung zu verbessern (Feldman et al. 2004; Petricoin et al. 2004). Da Thrombozyten einfach zu gewinnen sind, würden potenzielle Biomarker einen hohen Einfluss auf die Darmkrebsfrüherkennung, Therapierichtlinien, Kontrolle und das Monitoring besitzen. Derzeitige Screeningmethoden im klinischen Alltag (z. B. FOBT) besitzen eine Spezifität von 78-97% und eine Sensitivität von 65-80% (van Ballegooijen et al. 2003; Elsafi et al. 2015; Khakimov et al. 2015). Allerdings sind diese Tests ungenügend zur Darmkrebsfrüherkennung, da sie erst Hinweise auf einen malignen Prozess liefern können, wenn der Darmkrebs bereits vorhanden ist. Daher gilt weiterhin die hohe Ileokoloskopie als Goldstandard in der Darmkrebsfrüherkennung, obwohl diese auch nicht vollständig alle Krebsvorstufen erkennt und nicht regelmäßig von allen vorsorgeberechtigten Patienten genutzt wird (Brenner et al. 2015b, 2015a; Samadder et al. 2014).

Bislang gibt es nur sehr wenige Präventionsmöglichkeiten gegen KRK. Die These, dass Thrombozyten eine Rolle in der Metastasierung spielen, wird auch als Ansatzpunkt für die Prävention der Tumorentstehung und der Metastasierung genutzt. Zum Beispiel bewirkt Acetylsalicylsäure (Aspirin) über die Hemmung des Enzymes Cyclooxygenase-2 die Vermittlung der Inhibierung der Thrombozytenaggregation. Damit dämpft Aspirin auch die Freisetzung von Thrombozytenproteinen, welche sich in der Zusammensetzung bei Anwesenheit von Tumorzellen verändern (Coppinger et al. 2007). Hier knüpfen therapeutische Ansätze zur Chemoprevention unter anderem beim KRK an. Bei Patienten mit kolorektalen Adenomen stellt Aspirin eine Präventionsmethode vor maligner Entartung der Adenome dar und die regelmäßige Einnahme von ASS bei gesunden Patienten reduziert das Risiko, an einem KRK zu erkranken (Baron 2003; Cole et al. 2009).

Eine Assoziation zwischen dem KRK im Frühstadium, den Thrombozyten und verschiedenen Zielproteinen in den Thrombozyten kann durch die hier generierten

Daten angenommen werden. Die Unterschiede in den Proteinleveln der unten diskutierten Proteine bei der gesunden Kontrollpersonen und den Patienten mit KRK im Frühstadium zeigen eine hohe Dynamik in den pathophysiologischen Prozessen. Damit könnten diese als potentielle Biomarker zur Frühdiagnostik von KRK dienen und sollten weitergehend untersucht werden.

5.7 Proteine

Clusterin (CLU) ist ein Glykoprotein, kommt vor allem in Epithelzellen vor und findet sich universell. Da es in Stresssituationen auch Zell-protektiv agieren kann, ist es auch an Stoffwechselprozessen wie der Apoptose, dem Progress von Tumorzellen und neurodegenerativen Funktionsstörungen beteiligt (Jones und Jomary 2002; Rodríguez-Piñeiro et al. 2012; Koltai 2014). Jones und Jomary stellten fest, dass eine hohe Proteinexpression von Clusterin mit Tumorprogress einhergeht und eine direkte Korrelation zwischen der Höhe des Expressionslevels und dem Fortschritt bzw. der Aktivität der Tumorerkrankung besteht. Tumorzellen selbst, aber auch Thrombozyten, können Clusterin freisetzen. In den Thrombozyten wird CLU in alpha-Granula gespeichert und durch Aktivierung anhand von direktem oder indirektem Kontakt mit der Tumorzelle und dem Blutplättchen entlassen (Jones und Jomary 2002; Pucci et al. 2004, 2009).

In der vorliegenden Arbeit stellte sich CLU als ein Protein heraus, welches in Thrombozyten bei Patienten mit KRK in geringerer Konzentration als in der gesunden Kontrollgruppe vorlag. Dieses steht im Gegensatz zu den Berichten von Jones und Jomary (Jones und Jomary 2002). Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine Modulation der Thrombozytenproteine zum Beispiel durch vermehrte Sekretion von Clusterin aus Thrombozyten durch Aktivierung von Fibrinogenrezeptoren gewesen sein. Diese Freisetzung könnte bereits schon in Frühstadien der Tumorentwicklung erkannt werden.

In den Auswertungen der 2-D DIGE und der MALDI-TOF mit anschließender IPA konnte CLU in der Gruppe Kolonkarzinom im Vergleich zur Kontrollgruppe mit signifikant niedriger Expression nachgewiesen werden (siehe Tab. 7). In der Auswertung der IPA nahm CLU vor allem an Stoffwechselwegen der Zell-Zell-Interaktion, der intrazellulären Organisation und Entzündungsreaktionen teil (vergleiche

Tab. 6). Es stellte häufig ein zentrales Netzwerkprotein mit niedriger Expression in den Thrombozyten von KRK-Patienten dar (siehe Abb. 23 A und B, 24 B, 25 A). Im Vergleichskollektiv bei der Validierung anhand des Western-Blots zeigte das Protein eine Tendenz niedrigerer Expression in der Gruppe der KRK-Patienten im Gegensatz zu der Kontrollgruppe (siehe Abb. 27); erreichte aber nicht das Signifikanzniveau.

In den Gruppenvergleichen Kontrolle gegen Kolonkarzinom und Kontrolle gegen Spätkarzinom lag CLU in der Gruppe der KRK-Patienten in signifikant niedriger Expression vor (siehe Tab. 7). In der Validierung der Ergebnisse vom Gruppenvergleich Kontrolle gegen Kolonkarzinom anhand des Western Blots zeigte sich CLU in den Vergleichen in leicht niedrigerer Expression ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Für den Vergleich Kontrolle gegen Spätkarzinom zeigte sich im Western Blot für CLU der Trend zu niedrigerer Expression knapp nicht signifikant ($p=0.055$).

Es wurde in dieser Arbeit besonders der Expressionsstatus von CLU im Vergleich Kontrolle gegen Frühkarzinom untersucht, um dessen Potential als potentiellen Biomarker zur Früherkennung zu untersuchen. CLU lag im Vergleich Frühkarzinom zur Kontrollgruppe in den Ergebnissen der 2-D DIGE und MALDI-TOF in signifikant niedriger Expression vor (siehe Tab. 7). Das IPA-Netzwerk für diesen Gruppenvergleich erreichte einen Score von 24 (siehe Abb. 23B) mit CLU als zentralem Netzwerkprotein. Diese Daten ließen den Schluss zu, dass CLU ein potentielles Markerprotein sein könnte, das zur Darmkrebsfrüherkennung dienen kann. Diese Interpretation ließ sich anhand der Validierung mittels Western Blot als eine Tendenz, allerdings ohne die gewünschte Signifikanz, darstellen.

Auch Alcaide et al. beschrieben, dass CLU einen hohen Wert für die Darmkrebsfrüherkennung aufweist (Alcaide et al. 2016). Es wurden Tumorzellen auf die CLU-Proteinexpression hin untersucht, die sich entweder positiv oder negativ für CLU anfärben ließen. In gesunden epithelialen Zellen konnte keine CLU Proteinexpression detektiert werden, während sich 16% der aller Adenome positiv für CLU anfärben ließen. Bei den Karzinomzellen waren 30% der Proben positiv für CLU. Hierbei wurde jeweils nur zwischen dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von CLU-Proteinexpression in den Zellen der Mukosa unterscheiden. Die Höhe des

Expressionslevels schien nach Alcaide et al. keinen Zusammenhang mit dem Tumorstadium oder dem TMN-Stadium zu haben.

Auch hier wurde konträr zu unseren Daten festgestellt, dass eine erhöhte CLU-Expression mit steigender Wahrscheinlichkeit eines tumorösen Geschehens assoziiert ist. Allerdings lassen sich die Gewebeanalysen aufgrund des unterschiedlichen Untersuchungsmaterials nur bedingt mit den Thrombozytenergebnissen vergleichen.

Zusammenfassend suggerieren diese Daten jedoch eine wichtige Rolle von CLU als einen im Blut zirkulierenden Biomarker des KRK, der für weitere Studien von großer Bedeutung sein kann. Radziwon-Balicka et al. demonstrierten in ihrem Experiment, dass CLU von Thrombozyten und Zellen des KRK freigesetzt werden kann. Sie beschrieben, dass Thrombozyten die Penetranz des KRK durch Erhöhung bestimmter Proteasenaktivität stimulieren können. Dieser Effekt wurde unter anderem auch durch CLU vermittelt. Radziwon-Balicka et al. identifizierten CLU als ein wichtiges Protein, das von Thrombozyten während der Interaktion mit Tumorzellen sezerniert wird. Allerdings bezieht sich die Studie auf das Vorliegen eines bereits metastasierten KRK und die Relevanz der Thrombozyten in dem Metastasierungsprozess (Radziwon-Balicka et al. 2014). Übereinstimmende Berichte mit unserer Arbeit im Sinne eines Expressionunterschiedes im Thrombozytenproteom finden sich nicht, da bislang keine derartigen Analysen beschrieben wurden. Allerdings bestätigen die bisherigen Publikationen übereinstimmend, dass CLU einen wichtigen Stellenwert in der Tumorgenese einnimmt und geben weiterführende Hinweise darauf, dass CLU als ein Biomarker für KRK-Erkrankungen und für weitergehende Studien geeignet scheint.

Andersen et al., Pucci et al. und Redondo et al. beschrieben, dass eine übermäßige Expression an CLU in Biopsien aus Mukosazellen, Adenomen und Karzinomen einen ungünstigen Prognosefaktor für Patienten mit KRK darstellt, da es mit einem verringerten krankheitsfreien Überleben assoziiert ist (Andersen et al. 2007; Pucci et al. 2004; Redondo et al. 2010). Dies konnte unter anderem durch ein immunhistochemisches Scoring ermittelt werden (Kevans et al. 2009). Unsere Daten zeigten jedoch einen niedrigen Expressionsstatus von CLU in den unterschiedlichen Gruppenvergleichen. Unser Schwerpunkt lag jedoch in der frühen Erkennung möglicher Veränderungen im Thrombozytenproteom. Daher wäre es möglich, dass zunächst eine niedrigere Expression von CLU im Thrombozytenproteom vorliegt, die dann im

Krankheitsverlauf ansteigt. Weitergehende Untersuchungen in einem größeren Studienrahmen mit einem größeren Probenkollektiv wären hierfür wünschenswert. Zusammenfassend weisen die publizierten Daten darauf hin, dass CLU eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt und einen prognostischen Wert besitzt.

Vinculin (VCL) zeigte sich in der 2-D DIGE sowie der MALDI-TOF und IPA in niedriger Expression in den Proben von KRK-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich Frühkarzinom gegen Spätkarzinom war VCL in der Gruppe der Spätkarzinome höher exprimiert. Die Tendenz für die Vergleiche Kontrolle gegen Kolonkarzinom, Kontrolle gegen Frühkarzinom und Kontrolle gegen Spätkarzinom ließ sich in den Western Blot Analysen abbilden, jedoch nicht signifikant validieren (siehe Tab. 6 und 7, Abb. 23A und 26). In dem Vergleich Frühkarzinom gegen Spätkarzinom zeigte der Western Blot einen verminderten Trend im Vergleich zu den Ergebnissen der 2-D DIGE und MALDI-TOF. Die Ergebnisse der IPA zeigten, dass VCL ein Protein ist, welches ebenfalls wie CLU an Zell-Zell-Interaktionen und Entzündungsreaktionen teilnimmt und darüber hinaus eine Funktion für die Zellbeweglichkeit besitzt (siehe Tab. 6). Zudem spielt es auch eine Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation (Carisey und Ballestrem 2011).

VCL wurde bislang noch nicht eindeutig als Biomarker beim KRK beschrieben. Allerdings wurde in der Studie von Sun und Liu festgestellt, dass VCL ein Potential als Biomarker für das Kolonkarzinom besitzt. Hier stellte sich der mRNA-Level von VCL in Metastasezellen des Kolonkarzinoms deutlich höher dar als in ursprünglichen Kolonkarzinomzellen (Sun und Liu 2013). Subauste et al beschrieben im Jahre 2004, dass VCL an Schritten der Karzinogene mitwirkt; Krebszellen, die wenig VCL aufwiesen, haben ein deutlich erhöhtes Metastasierungspotential (Subauste et al. 2004). Ob eine signifikant niedrigere Expression von VCL in Thrombozyten bei Patienten in Frühstadien von Darmkrebs zu detektieren ist, muss ebenfalls wie CLU in größeren Studienprotokollen weiter evaluiert werden.

Caspase 3 (CASP3) ist ein Protein der Familie der Cystein-Asparaginsäure Proteasen (Caspasen). Die Aktivität von Caspasen spielt eine zentrale Rolle in der Phase des programmierten Zelltods. Für die fehlerfreie Zellentwicklung in Lebewesen sind

Caspasen unabdingbar und geben Auskunft über die Schwere einer Zellschädigung (Lamkanfi et al. 2007). Defekte in Caspasen werden der Tumorentstehung zugeschrieben. Während der Tumorgenese kann ein erhöhter Verlust der Caspase-Funktion zu einer beeinträchtigenden Apoptose-Induktion führen, welches eine Dysbalance im Zellwachstum zur Folge hat und zu vermehrtem Wachstum von Tumorzellen führen kann. Untersuchungen von Apoptose-Wegen mittels Caspase-Induktion oder Reaktivierung haben neue Entwicklungsansätze der Therapie gegen solide Tumoren bereitgestellt. Hier wird versucht, bestehende therapeutische Resistenzen durch Wiederherstellen vorhandener Apoptosewege zu umgehen. Bei apoptoseinduzierenden Agenzien sieht man die Möglichkeit, unabhängig vom Tumormilieu den Zelltod von Tumorzellen herbeizuführen (Olsson und Zhivotovsky 2011; Fiandalo und Kyprianou 2012). Ableitend dazu wirkt sich eine erhöhte Expression von CASP3 negativ auf die Tumorzellentwicklung aus.

In dieser Arbeit konnte mittels 2-D DIGE und MALDI-TOF ein niedriger Expressionsstatus von CASP3 in den Vergleichen aller Tumorgruppen gegen die Kontrollgruppe beschrieben werden. In dem Vergleich Frühkarzinom gegen Spätkarzinom wurde ein hoher Expressionsstatus in der Gruppe der Patienten mit Spätkarzinom festgestellt (siehe Tab. 7).

CASP3 stellte in dem IPA-Netzwerk für den Vergleich Kontrolle gegen Frühkarzinom ein zentrales Netzwerkprotein dar (vergleiche Abb. 23B). Die IPA zeigte für diesen Vergleich ein Netzwerk mit einem Score von 34. Proteine, die in diesem Netzwerk beinhaltet sind, nehmen an Stoffwechselwegen der genetischen Dysfunktion und Krebserkrankungen teil. Der Expressionslevel konnte in der nachfolgenden Validierung anhand des Western Blots allerdings nicht validiert werden.

Da CASP3 in signifikant niedrigerer Expression in den 2-D DIGE Auswertungen detektiert wurde und es für den Vergleich Kontrolle gegen Frühkarzinom ein zentrales Netzwerkprotein darstellt, besteht die Möglichkeit, dass CASP3 tumorbedingt supprimiert vorliegt. Obwohl es in dem Vergleichskollektiv des Western-Blots keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gab, ist es nicht sicher auszuschließen, dass CASP3 eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung spielt.

5.8 Limitationen und Ausblick

Die hier verwendeten Analysemethoden bilden einen vielversprechenden Ansatz, um eine Früherkennung des KRK mittels Analysen von Thrombozytenproteinen möglich zu machen. In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass CASP3, CLU und VCL beim KRK in unterschiedlichen Expressionsleveln vorliegen. Auf diese Proteine sollte ein starker Fokus in weiteren Untersuchungen gesetzt werden, um diese als mögliche Marker zur KRK-Früherkennung in der Diagnostik weiter zu evaluieren und ggfls. zu etablieren.

Die Methodik zur Darstellung bzw. zur Verwendung der Serumproben ist anhand der vorgestellten Daten als vielversprechend zu werten. Dennoch konnten die Ergebnisse von 2 D-DIGE und MALDI-TOF nicht mittels Western Blot validiert werden, was unter anderem an der geringen Fallzahl und der Nutzung von GAPDH als Kontrolle (Housekeeper) liegen kann, welches selbst teilweise zentral reguliert und unterschiedlich exprimiert werden kann (siehe Abb. 23A und 23 B).

Daher sollte für eine differenzierte Aussage an einer Weiterentwicklung der Validierungsmethode bzw. an einem verbesserten Versuchssetting durch beispielsweise Verwendung eines größeren Patientenkollektivs gearbeitet werden.

In weiteren Validierungsstudien mittels Western Blot sollte der Vergleich gegen das Gesamtprotein anstatt nur gegen GAPDH stattfinden. Zu dieser Problematik wurde in der Studie von Thacker et al. nach einer Alternative gesucht, da die Ladekontrolle GAPDH von Probe zu Probe variieren kann. Hier wurde als optimale Färbung ‚Ponceau‘ beschrieben und als gute Alternative zu besonders stark vertretenen Proteinen, wie GAPDH, ausgewählt (Thacker et al. 2016). Da GAPDH eine hohe biologische Variabilität besitzt und auch an mehreren Stoffwechselprozess selbst aktiv teilnimmt sowie bei Darmkrebs erhöht exprimiert werden kann, ist es als Ladekontrolle eher als nachteilig anzusehen (Baumgartner et al. 2013; Tang et al. 2012). Entsprechend konnten Strohkamp et al. den Versuchsaufbau weiterentwickeln, indem zu der hier behandelten Problematik der Validierung mittels Western Blot auf die Normalisierung des Gesamtproteins gewechselt wurde (Strohkamp et al. 2017).

Um mögliche probeninherente Einflußfaktoren zu minimieren, wurde ein unabhängiges Patientenkollektiv für die Western Blot-Validierung erstellt. Die Ergebnisse stellten deutlich heraus, dass bei dem Vorhandensein von Darmkrebs Stoffwechselveränderungen in Thrombozyten zu verzeichnen sind. Wenngleich sich die

Ergebnisse mittels Western Blot in dieser Studie nicht signifikant validieren ließen, so konnte dieses jedoch in nachgeordneten Analysen mittels eines sensitiveren Western Blot-Verfahrens mit Normalisierung gegen das Gesamtprotein bestätigt werden (Strohkamp et al 2017).

Ob die Möglichkeit besteht, Darmkrebsfrüherkennung auf eine Blutanalyse zu reduzieren, ist für die nahe Zukunft noch nicht absehbar. Jedoch ist durch den Fortschritt der Forschung deutlich zu sehen, dass eine KRK-Früherkennung mittels Blutanalyse durchaus möglich sein könnte. Diesbezüglich ist zu erwähnen, dass die gesuchten Markerproteine dieser Arbeit ein Potential zur Krebsfrüherkennung aufweisen. Einerseits ist es möglich, durch verbesserte Methodik ein einzelnes Protein als Biomarker zu definieren, welches exakt die Stoffwechselveränderungen bei Darmkrebs widerspiegelt. Andererseits scheint es durchaus sinnvoll, die Gesamtheit der Proteinveränderungen in Thrombozyten bei KRK-Patienten zu bewerten, anhand dessen sich eine klare Aussage zum Darmkrebsrisiko machen lässt.

6. QUELLEN

1. Adam B-L, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, Semmes OJ, Schellhammer PF, Yasui Y, Feng Z, Wright GL. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 62: 3609–3614, 2002.
2. Ahmed M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterol Res* 13: 1–10, 2020.
3. Ahnen DJ, Nakane PK, Brown WR. Ultrastructural localization of carcinoembryonic antigen in normal intestine and colon cancer: abnormal distribution of CEA on the surfaces of colon cancer cells. *Cancer* 49: 2077–2090, 1982.
4. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 57: 3920–3923, 1997.
5. Akkoca AN, Yanık S, Ozdemir ZT, Cihan FG, Sayar S, Cincin TG, Cam A, Ozer C. TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* 7: 2828–2835, 2014.
6. Alban A, David SO, Bjorkesten L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* 3: 36–44, 2003.
7. Alcaide J, Rueda A, Rodrigo I, Tellez T, Funez R, Padilla M del C, Zarcos I, Pérez-Ruiz E, Villatoro R, Perez D, Redondo M. Clusterin expression (CLU) as a prognostic marker in colorectal carcinoma (CCR). *J Clin Oncol* 34: 563–563, 2016.
8. Allescher H-D, Weingart V. Optimizing Screening Colonoscopy: Strategies and Alternatives. *Visc Med* 35: 215–225, 2019.
9. Álvarez-Chaver P, Otero-Estévez O, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal FJ, Martínez-Zorzano VS. Proteomics for discovery of candidate colorectal cancer biomarkers. *World J Gastroenterol WJG* 20: 3804–3824, 2014.
10. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Preoperative carcinoembryonic antigen as an outcome predictor in colon cancer. *J Surg Oncol* 108: 14–18, 2013.
11. Andersen CL, Schepeler T, Thorsen K, Birkenkamp-Demtröder K, Mansilla F, Aaltonen LA, Laurberg S, Ørntoft TF. Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics MCP* 6: 1039–1048, 2007.
12. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics MCP* 1: 845–867, 2002.
13. Aoki K, Aoki M, Sugai M, Harada N, Miyoshi H, Tsukamoto T, Mizoshita T, Tatematsu M, Seno H, Chiba T, Oshima M, Hsieh C-L, Taketo MM. Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* 26: 3511–3520, 2007.

14. **Arafa MA, Waly MI, Jriesat S, Al Khafajei A, Sallam S.** Dietary and lifestyle characteristics of colorectal cancer in Jordan: a case-control study. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 12: 1931–1936, 2011.
15. **Arvelo F, Sojo F, Cotte C.** Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience* 9: 520, 2015.
16. **Asghar S, Parvaiz F, Manzoor S.** Multifaceted role of cancer educated platelets in survival of cancer cells. *Thromb Res* 177: 42–50, 2019.
17. **Bacelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, Klein C, Saini M, Bäuerle T, Wallwiener M, Holland-Letz T, Höfner T, Sprick M, Scharpff M, Marmé F, Sinn HP, Pantel K, Weichert W, Trumpp A.** Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 31: 539–544, 2013.
18. **Bairoch A, Apweiler R.** The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* 28: 45–48, 2000.
19. **van Ballegooijen M, Habbema JDF, Boer R, Zauber AG, Brown ML.** A Comparison of the Cost-Effectiveness of Fecal Occult Blood Tests with Different Test Characteristics in the Context of Annual Screening in the Medicare Population [Online]. Agency for Healthcare Research and Quality (US).<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285640/> [13 Mar. 2016].
20. **Bambace NM, Holmes CE.** The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost JTH* 9: 237–249, 2011.
21. **Baron JA.** Epidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer. *Prog Exp Tumor Res* 37: 1–24, 2003.
22. **Baumgartner R, Umlauf E, Veitinger M, Guterres S, Rappold E, Babeluk R, Mitulović G, Oehler R, Zellner M.** Identification and validation of platelet low biological variation proteins, superior to GAPDH, actin and tubulin, as tools in clinical proteomics. *J Proteomics* 94: 540–551, 2013.
23. **Beger RD.** A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. *Metabolites* 3: 552–574, 2013.
24. **Bergström A, Pisani P, Tenet V, Wolk A, Adami HO.** Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer J Int Cancer* 91: 421–430, 2001.
25. **Best MG, Sol N, Zijl S, Reijneveld JC, Wesseling P, Wurdinger T.** Liquid biopsies in patients with diffuse glioma. *Acta Neuropathol (Berl)* 129: 849–865, 2015.
26. **Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong S-M, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SKN, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih le-M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang T-L, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA.** Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6: 224ra24, 2014.

27. **Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N, Labrousse F, Voitot H.** Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 45: 1695–1707, 1999.
28. **Birkner BR.** [Evidence-based prevention of colorectal carcinoma]. *Dtsch Med Wochenschr* 128: 2598–2603, 2003.
29. **Brenner H, Altenhofen L, Kretschmann J, Rösch T, Pox C, Stock C, Hoffmeister M.** Trends in Adenoma Detection Rates During the First 10 Years of the German Screening Colonoscopy Program. *Gastroenterology* 149: 356-366.e1, 2015a.
30. **Brenner H, Altenhofen L, Stock C, Hoffmeister M.** Prevention, early detection, and overdiagnosis of colorectal cancer within 10 years of screening colonoscopy in Germany. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc* 13: 717–723, 2015b.
31. **Brenner H, Stock C, Hoffmeister M.** In the era of widespread endoscopy use, randomized trials may strongly underestimate the effects of colorectal cancer screening. *J Clin Epidemiol* 66: 1144–1150, 2013.
32. **Bruch H-P, Trentz O.** Berchtold: Chirurgie. Urban & Fischer in Elsevier, 2008, p. 863.
33. **Burkhart JM, Gambaryan S, Watson SP, Jurk K, Walter U, Sickmann A, Heemskerk JWM, Zahedi RP.** What can proteomics tell us about platelets? *Circ Res* 114: 1204–1219, 2014a.
34. **Burkhart JM, Gambaryan S, Watson SP, Jurk K, Walter U, Sickmann A, Heemskerk JWM, Zahedi RP.** What can proteomics tell us about platelets? *Circ Res* 114: 1204–1219, 2014b.
35. **Cappell MS.** From colonic polyps to colon cancer: pathophysiology, clinical presentation, screening and colonoscopic therapy. *Minerva Gastroenterol Dietol* 53: 351–373, 2007.
36. **Carethers JM, Jung BH.** Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 149: 1177-1190.e3, 2015.
37. **Carisey A, Ballestrem C.** Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol* 90: 157–163, 2011.
38. **Carrier M, Le Gal G, Wells PS, Fergusson D, Ramsay T, Rodger MA.** Systematic review: the Trousseau syndrome revisited: should we screen extensively for cancer in patients with venous thromboembolism? *Ann Intern Med* 149: 323–333, 2008.
39. **Chen WT-L, Chang S-C, Ke T-W, Chiang H-C, Tsai F-J, Lo W-Y.** Identification of biomarkers to improve diagnostic sensitivity of sporadic colorectal cancer in patients with low preoperative serum carcinoembryonic antigen by clinical proteomic analysis. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 412: 636–641, 2011.
40. **Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, Castaños-Vélez E, Blumenstein BA, Rösch T, Osborn N, Snover D, Day RW, Ransohoff DF, PRESEPT Clinical Study Steering Committee, Investigators and Study Team.** Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* 63: 317–325, 2014.
41. **Cini C, Yip C, Attard C, Karlaftis V, Monagle P, Linden M, Ignjatovic V.** Differences in the resting platelet proteome and platelet releasate between healthy children and adults. *J Proteomics* 123: 78–88, 2015.

42. **Cluxton CD, Spillane C, O'Toole SA, Sheils O, Gardiner CM, O'Leary JJ.** Suppression of Natural Killer cell NKG2D and CD226 anti-tumour cascades by platelet cloaked cancer cells: Implications for the metastatic cascade. *PloS One* 14: e0211538, 2019.
43. **Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, Chaussade S, Baron JA.** Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 101: 256–266, 2009.
44. **Connell W.** PRO: Endoscopic surveillance minimizes the risk of cancer. *Am J Gastroenterol* 99: 1631–1633, 2004.
45. **Coppinger JA, O'Connor R, Wynne K, Flanagan M, Sullivan M, Maguire PB, Fitzgerald DJ, Cagney G.** Moderation of the platelet releasate response by aspirin. *Blood* 109: 4786–4792, 2007.
46. **Dahl E, Jung A, Fassunke J, Hummel M, Penzel R, Dietmaier W, Laßmann S.** Chancen und Risiken der blutbasierten molekularpathologischen Analytik zirkulierender Tumorzellen (CTC) und zellfreier DNA (cfDNA) in der personalisierten Krebstherapie: Eine Stellungnahme des Arbeitskreises „Liquid Biopsy“ der AG Molekularpathologie in der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP). *Pathol* 36: 92–97, 2015.
47. **Deininger P.** Genetic Instability in Cancer: Caretaker and Gatekeeper Genes. *Ochsner J* 1: 206–209, 1999.
48. **Diaz LA, Bardelli A.** Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 32: 579–586, 2014.
49. **Diez R, Herbstreith M, Osorio C, Alzate O.** 2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis (DIGE) in Neuroproteomics [Online]. In: *Neuroproteomics*, edited by Alzate O. CRC Press/Taylor & Francis <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56019/> [6 Oct. 2018].
50. **Elsafi SH, Alqahtani NI, Zakary NY, Al Zahrani EM.** The sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios of fecal occult blood test for the detection of colorectal cancer in hospital settings. *Clin Exp Gastroenterol* 8: 279–284, 2015.
51. **Engel C, Ahadova A, Seppälä T, Aretz S, Bigirwamungu-Bargeman M, Bläker H, Bucksch K, Büttner R, de Vos Tot Nederveen Cappel W, Endris V, Holinski-Feder E, Holzapfel S, Hüneburg R, Jacobs MAJM, Koornstra JJ, Langers AM, Lepistö A, Morak M, Möslein G, Peltomäki P, Pylvänäinen K, Rahner N, Renkonen-Sinisalo L, Schulmann K, Steinke-Lange V, Stenzinger A, Strassburg CP, van de Meeberg PC, van Kouwen M, van Leerdam M, Vangala DB, Vecht J, Verhulst M-L, von Knebel Doeberitz M, Weitz J, Zachariae S, Loeffler M, Mecklin J-P, Kloor M, Vasen HF, German HNPCC Consortium, the Dutch Lynch Syndrome Collaborative Group, and the Finnish Lynch Syndrome Registry.** Associations of Pathogenic Variants in MLH1, MSH2, and MSH6 With Risk of Colorectal Adenomas and Tumors and With Somatic Mutations in Patients With Lynch Syndrome. *Gastroenterology*, 2020. doi:10.1053/j.gastro.2019.12.032.
52. **Feldman AL, Espina V, Petricoin EF, Liotta LA, Rosenblatt KP.** Use of proteomic patterns to screen for gastrointestinal malignancies. *Surgery* 135: 243–247, 2004.

- 53. Fiandalo MV, Kyprianou N.** CASPASE CONTROL: PROTAGONISTS OF CANCER CELL APOPTOSIS. *Exp Oncol* 34: 165–175, 2012.
- 54. Fiehn O.** Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 48: 155–171, 2002.
- 55. Filella X, Molina R, Piqué JM, Garcia-Valdecasas JC, Grau JJ, Novell F, Astudillo E, de Lacy A, Daniels M, Ballesta AM.** Use of CA 19-9 in the early detection of recurrences in colorectal cancer: comparison with CEA. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 15: 1–6, 1994.
- 56. Fletcher RH.** Carcinoembryonic antigen. *Ann Intern Med* 104: 66–73, 1986.
- 57. Fodde R, Smits R, Clevers H.** APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 55–67, 2001.
- 58. Franceschi S, La Vecchia C.** Alcohol and the risk of cancers of the stomach and colon-rectum. *Dig Dis Basel Switz* 12: 276–289, 1994.
- 59. Galli C, Basso D, Plebani M.** CA 19-9: handle with care. *Clin Chem Lab Med* 51: 1369–1383, 2013.
- 60. García Á.** Platelet Clinical Proteomics: Facts, challenges and future perspectives. *Proteomics Clin Appl*, 2016. doi:10.1002/prca.201500125.
- 61. Gawaz M.** *Das Blutplättchen*. 1. Auflage. Stuttgart; New York: Thieme Verlag, 1999.
- 62. Gay LJ, Felding-Habermann B.** Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 11: 123–134, 2011.
- 63. Giovannucci E.** An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 10: 725–731, 2001.
- 64. Görg A, Postel W, Günther S.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9: 531–546, 1988.
- 65. Görg A, Weiss W, Dunn MJ.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665–3685, 2004.
- 66. Goubran HA, Stakiw J, Radosevic M, Burnouf T.** Platelets effects on tumor growth. *Semin Oncol* 41: 359–369, 2014.
- 67. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD.** Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*, 2016. doi:10.1055/s-0035-1564835.
- 68. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M.** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66: 589–600, 1991.
- 69. Gupta GP, Massagué J.** Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link. *J Clin Invest* 114: 1691–1693, 2004.
- 70. Hershkovitz-Rokah O, Geva P, Salmon-Divon M, Shpilberg O, Liberman-Aronov S.** Network analysis of microRNAs, genes and their regulation in diffuse and follicular B-cell lymphomas. *Oncotarget* 9: 7928–7941, 2018.
- 71. Hisamuddin IM, Yang VW.** Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2: 53–59, 2006.

- 72. Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA.** Epithelial neoplasms of the colorectum. In: *Gastrointestinal and Liver Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier, 2005, p. 367–394.
- 73. Ikushima S, Ono R, Fukuda K, Sakayori M, Awano N, Kondo K.** Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. *Jpn J Clin Oncol* 46: 204–208, 2016.
- 74. Indovina P, Marcelli E, Pentimalli F, Tanganelli P, Tarro G, Giordano A.** Mass spectrometry-based proteomics: the road to lung cancer biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev* 32: 129–142, 2013.
- 75. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J, Klement GL.** Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood* 111: 1227–1233, 2008.
- 76. Jacobs JM, Adkins JN, Qian W-J, Liu T, Shen Y, Camp DG, Smith RD.** Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res* 4: 1073–1085, 2005.
- 77. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW.** Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138: 2044–2058, 2010.
- 78. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E.** Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 60: 277–300, 2010.
- 79. Jo W-S, Chung DC.** Genetics of hereditary colorectal cancer. *Semin Oncol* 32: 11–23, 2005.
- 80. Jolliffe IT.** *Principal Component Analysis*. New York: Springer-Verlag New York, 2002.
- 81. Jones SE, Jomary C.** Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 427–431, 2002.
- 82. Jurasz P, Alonso-Escolano D, Radomski MW.** Platelet--cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 143: 819–826, 2004.
- 83. Jurk K, Kehrel BE.** [Pathophysiology and biochemistry of platelets]. *Internist* 51: 1086, 1088–1092, 1094, 2010.
- 84. Karas M, Glückmann M, Schäfer J.** Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom JMS* 35: 1–12, 2000.
- 85. Karas M, Hillenkamp F.** Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299–2301, 1988.
- 86. Karp NA, Kreil DP, Lilley KS.** Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* 4: 1421–1432, 2004.
- 87. Kaur K, Adamski JJ.** Fecal Occult Blood Test (Hemoccult) [Online]. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537138/> [2 Mar. 2020].
- 88. Keane MG, Johnson GJ.** Early diagnosis improves survival in colorectal cancer. *The Practitioner* 256: 15–18, 2, 2012.

- 89. Kevans D, Foley J, Tenniswood M, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, Mulcahy H, O'Sullivan J.** High Clusterin Expression Correlates with a Poor Outcome in Stage II Colorectal Cancers. *Cancer Epidemiol Prev Biomark* 18: 393–399, 2009.
- 90. Khakimov N, Khasanova G, Ershova K, Gibadullina L, Vetkina T, Lobisheva G, Chumakova A.** Screening for colon cancer: A test for occult blood. *Int J Risk Saf Med* 27 Suppl 1: S110-111, 2015.
- 91. Kim H-J, Kang HJ, Lee H, Lee S-T, Yu M-H, Kim H, Lee C.** Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *J Proteome Res* 8: 1368–1379, 2009.
- 92. Koltai T.** Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *Oncotargets Ther* 7: 447–456, 2014.
- 93. Koprowski H, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF.** Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science* 212: 53–55, 1981.
- 94. Kotzev A.** CA 19-9 in follow-up of patients with colorectal cancer: Should it stay or should it go ? *J BUON Off J Balk Union Oncol* 24: 1310–1311, 2019.
- 95. Kushi L, Giovannucci E.** Dietary fat and cancer. *Am J Med* 113 Suppl 9B: 63S-70S, 2002.
- 96. Labelle M, Begum S, Hynes RO.** Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* 20: 576–590, 2011.
- 97. Lamerz R, Stieber P.** [Tumour markers]. *Dtsch Med Wochenschr* 129: 2722–2730, 2004.
- 98. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenaebelle P.** Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 14: 44–55, 2007.
- 99. Levy M, Visokai V, Lipska L, Topolcan O.** Tumor markers in staging and prognosis of colorectal carcinoma. *Neoplasma* 55: 138–142, 2008.
- 100. Li F, Yu Z, Chen P, Lin G, Li T, Hou L, Du Y, Tan W.** The increased excretion of urinary orosomucoid 1 as a useful biomarker for bladder cancer. *Am J Cancer Res* 6: 331–340, 2016.
- 101. Lim LC, Looi ML, Zakaria SZS, Sagap I, Rose IM, Chin S-F, Jamal R.** Identification of Differentially Expressed Proteins in the Serum of Colorectal Cancer Patients Using 2D-DIGE Proteomics Analysis. *Pathol Oncol Res POR* 22: 169–177, 2016.
- 102. Lin D, Feng S, Pan J, Chen Y, Lin J, Chen G, Xie S, Zeng H, Chen R.** Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis. *Opt Express* 19: 13565–13577, 2011.
- 103. Liu G, Claret FX, Zhou F, Pan Y.** Jab1/COPS5 as a Novel Biomarker for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Human Cancer. *Front Pharmacol* 9: 135, 2018a.
- 104. Liu W-T, Wang Y, Zhang J, Ye F, Huang X-H, Li B, He Q-Y.** A novel strategy of integrated microarray analysis identifies CENPA, CDK1 and CDC20 as a cluster of diagnostic biomarkers in lung adenocarcinoma. *Cancer Lett* 425: 43–53, 2018b.

- 105. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR.** Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 76: 1–18, 2009.
- 106. Ma Y, Peng J, Liu W, Zhang P, Huang L, Gao B, Shen T, Zhou Y, Chen H, Chu Z, Zhang M, Qin H.** Proteomics identification of desmin as a potential oncofetal diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Mol Cell Proteomics MCP* 8: 1878–1890, 2009.
- 107. Majek O, Gondos A, Jansen L, Emrich K, Holleczeck B, Katalinic A, Nennecke A, Eberle A, Brenner H, GEKID Cancer Survival Working Group.** Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century. *Br J Cancer* 106: 1875–1880, 2012.
- 108. Mammadova-Bach E, Zigrino P, Brucker C, Bourdon C, Freund M, Arcangelis AD, Abrams SI, Orend G, Gachet C, Mangin PH.** Platelet integrin $\alpha 6\beta 1$ controls lung metastasis through direct binding to cancer cell-derived ADAM9. *JCI Insight* 1, 2016.
- 109. Mandel P, Metais P.** [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil* 142: 241–243, 1948.
- 110. Midgley R, Kerr D.** Colorectal cancer. *Lancet Lond Engl* 353: 391–399, 1999.
- 111. Momparler RL.** Cancer epigenetics. *Oncogene* 22: 6479–6483, 2003.
- 112. Müller A, Fishel R.** Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest* 20: 102–109, 2002.
- 113. Müller M.** Kolon und Rektum. In: *Chirurgie für Studium und Praxis*. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2012, p. 197–203.
- 114. Nagawa H, Muto T.** [Molecular biology in the development of colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 26: 2147–2153, 1999.
- 115. Nallamilli BRR, Hegde M.** Genetic Testing for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). *Curr Protoc Hum Genet* 94: 10.12.1-10.12.23, 2017.
- 116. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK.** Platelets and cancer. *Lancet Oncol* 3: 425–430, 2002.
- 117. Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM.** Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371: 75–80, 1994.
- 118. Normanno N, Cervantes A, Ciardiello F, De Luca A, Pinto C.** The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treat Rev* 70: 1–8, 2018.
- 119. O’Connell JB, Maggard MA, Ko CY.** Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 96: 1420–1425, 2004.
- 120. Odeny T, Farha N, Hildebrand H, Allen J, Vazquez W, Martinez M, Saeed A, Paluri R, Kasi A.** Association between primary perioperative CEA ratio, tumor site, and overall survival in patients with colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 30 Suppl 4: iv73, 2019.

- 121. Odunsi K, Wollman RM, Ambrosone CB, Hutson A, McCann SE, Tammela J, Geisler JP, Miller G, Sellers T, Cliby W, Qian F, Keitz B, Intengan M, Lele S, Alderfer JL.** Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabolomics. *Int J Cancer* 113: 782–788, 2005.
- 122. O’Farrell PH.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250: 4007–4021, 1975.
- 123. Olsson M, Zhivotovsky B.** Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 18: 1441–1449, 2011.
- 124. Padoan A, Basso D, Zambon C-F, Prayer-Galetti T, Arrighi G, Bozzato D, Moz S, Zattoni F, Bellocco R, Plebani M.** MALDI-TOF peptidomic analysis of serum and post-prostatic massage urine specimens to identify prostate cancer biomarkers. *Clin Proteomics* 15, 2018.
- 125. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirousková M, Degen JL.** Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood* 105: 178–185, 2005.
- 126. Pancione M, Remo A, Colantuoni V.** Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathol Res Int* 2012, 2012.
- 127. Peerschke EI.** Platelet membrane glycoproteins. Functional characterization and clinical applications. *Am J Clin Pathol* 98: 455–463, 1992.
- 128. Petricoin E, Wulfkuhle J, Espina V, Liotta LA.** Clinical proteomics: revolutionizing disease detection and patient tailoring therapy. *J Proteome Res* 3: 209–217, 2004.
- 129. Pichardo-Molina JL, Frausto-Reyes C, Barbosa-García O, Huerta-Franco R, González-Trujillo JL, Ramírez-Alvarado CA, Gutiérrez-Juárez G, Medina-Gutiérrez C.** Raman spectroscopy and multivariate analysis of serum samples from breast cancer patients. *Lasers Med Sci* 22: 229–236, 2007.
- 130. Pignone M, Campbell MK, Carr C, Phillips C.** Meta-analysis of dietary restriction during fecal occult blood testing. *Eff Clin Pract ECP* 4: 150–156, 2001.
- 131. Pino MS, Chung DC.** THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON CANCER. *Gastroenterology* 138: 2059–2072, 2010.
- 132. Piscitello A, Edwards DK.** Estimating the Screening-Eligible Population Size, aged 45 to 74, at Average Risk to Develop Colorectal Cancer in the United States. *Cancer Prev Res Phila Pa* , 2020. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-19-0527.
- 133. Pox CP, Altenhofen L, Brenner H, Theilmeier A, Von Stillfried D, Schmiegel W.** Efficacy of a nationwide screening colonoscopy program for colorectal cancer. *Gastroenterology* 142: 1460-1467.e2, 2012.
- 134. Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli LG.** Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* 23: 2298–2304, 2004.
- 135. Pucci S, Bonanno E, Sesti F, Mazzarelli P, Mauriello A, Ricci F, Zoccai GB, Rulli F, Galatà G, Spagnoli LG.** Clusterin in stool: a new biomarker for colon cancer screening? *Am J Gastroenterol* 104: 2807–2815, 2009.

136. Quintero E, Castells A, Bujanda L, Cubiella J, Salas D, Lanas Á, Andreu M, Carballo F, Morillas JD, Hernández C, Jover R, Montalvo I, Arenas J, Laredo E, Hernández V, Iglesias F, Cid E, Zubizarreta R, Sala T, Ponce M, Andrés M, Teruel G, Peris A, Roncales M-P, Polo-Tomás M, Bessa X, Ferrer-Armengou O, Grau J, Serradesanferm A, Ono A, Cruzado J, Pérez-Riquelme F, Alonso-Abreu I, de la Vega-Prieto M, Reyes-Melian JM, Cacho G, Díaz-Tasende J, Herreros-de-Tejada A, Poves C, Santander C, González-Navarro A, COLONPREV Study Investigators. Colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 366: 697–706, 2012.
137. Radziwon-Balicka A, Santos-Martinez MJ, Corbalan JJ, O’Sullivan S, Treumann A, Gilmer JF, Radomski MW, Medina C. Mechanisms of platelet-stimulated colon cancer invasion: role of clusterin and thrombospondin 1 in regulation of the P38MAPK-MMP-9 pathway. *Carcinogenesis* 35: 324–332, 2014.
138. Rahman GA, Mungadi IA. Surgical trainees’ understanding of Dukes’ staging in rectal cancer. *Niger J Med J Natl Assoc Resid Dr Niger* 18: 75–78, 2009.
139. Redondo M, Rodrigo I, Alcaide J, Tellez T, Roldan MJ, Funez R, Diaz-Martin A, Rueda A, Jiménez E. Clusterin expression is associated with decreased disease-free survival of patients with colorectal carcinomas. *Histopathology* 56: 932–936, 2010.
140. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood* 96: 3334–3342, 2000.
141. Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Werner U, Lamerz R. Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. *Anticancer Res* 20: 5195–5198, 2000.
142. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules’ constituents, secretion and functions. *Platelets* 12: 261–273, 2001.
143. Riboli E. Nutrition and cancer: background and rationale of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 3: 783–791, 1992.
144. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2009/2010. [Online]. 2013. http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2013.pdf%3F__blob%3DpublicationFile [2 Feb. 2016].
145. Roblick UJ, Bader FG, Hammarstedt L, Habermann JK, Hellman U, Becker S, Sundmacker A, Gemoll T, Zimmermann K, Auer G, Munck-Wikland E. Proteomic analysis of protein expression in human tonsillar cancer: differentially expressed proteins characterize human tonsillar cancer. *Acta Oncol Stockh Swed* 47: 1493–1501, 2008.
146. Rodríguez-Piñero AM, García-Lorenzo A, Blanco-Prieto S, Alvarez-Chaver P, Rodríguez-Berrocal FJ, Cadena MP de la, Martínez-Zorzano VS. Secreted clusterin in colon tumor cell models and its potential as diagnostic marker for colorectal cancer. *Cancer Invest* 30: 72–78, 2012.
147. Rosenblum WI. Platelet adhesion and aggregation without endothelial denudation or exposure of basal lamina and/or collagen. *J Vasc Res* 34: 409–417, 1997.
148. Ross DW, Ayscue LH, Watson J, Bentley SA. Stability of hematologic parameters in healthy subjects. Intraindividual versus interindividual variation. *Am J Clin Pathol* 90: 262–267, 1988.

- 149. Sabrkhany S, Griffioen AW, Oude Egbrink MGA.** The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1815: 189–196, 2011.
- 150. Săftoiu A, Hassan C, Areia M, Bhutani MS, Bisschops R, Bories E, Cazacu IM, Dekker E, Deprez PH, Pereira SP, Senore C, Capocaccia R, Antonelli G, van Hooft J, Messmann H, Siersema PD, Dinis-Ribeiro M, Ponchon T.** Role of gastrointestinal endoscopy in the screening of digestive tract cancers in Europe: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement. *Endoscopy*, 2020. doi:10.1055/a-1104-5245.
- 151. Saluk J, Bijak M, Ponczek MB, Wachowicz B.** [The formation, metabolism and the evolution of blood platelets]. *Postępy Hig Med Dośw Online* 68: 384–391, 2014.
- 152. Samadder NJ, Curtin K, Tuohy TMF, Pappas L, Boucher K, Provenzale D, Rowe KG, Mineau GP, Smith K, Pimentel R, Kirchhoff AC, Burt RW.** Characteristics of missed or interval colorectal cancer and patient survival: a population-based study. *Gastroenterology* 146: 950–960, 2014.
- 153. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM.** Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94: 657–666, 1998.
- 154. Scarà S, Bottoni P, Scatena R.** CA 19-9: Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol* 867: 247–260, 2015.
- 155. Schlesinger M.** Role of platelets and platelet receptors in cancer metastasis. *J Hematol Oncol/J Hematol Oncol* 11: 125, 2018.
- 156. Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U.** Allgemein- und Visceralchirurgie. In: *Kurzlehrbuch Chirurgie*. Stuttgart: Thieme, 2010, p. 324.
- 157. Schünke M, Schulte E, Schumacher U.** Prometheus Lernatlas der Anatomie, Hals und Innere Organe. Stuttgart: Thieme, 2005, p. 195.
- 158. Sidransky D.** Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 210–219, 2002.
- 159. Sierko E, Wojtukiewicz MZ.** Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin Thromb Hemost* 30: 95–108, 2004.
- 160. Sierko E, Wojtukiewicz MZ.** Inhibition of platelet function: does it offer a chance of better cancer progression control? *Semin Thromb Hemost* 33: 712–721, 2007.
- 161. Silbernagel S, Despopoulos A.** In: *Taschenatlas Physiologie*. Stuttgart: Thieme, 2007, p. 234.
- 162. Singh-Ranger G.** The American Joint Committee on Cancer staging (AJCC) Atlas, by Greene FL, Compton CC, Fritz AG, Shah JP, Winchester DP. *Int Semin Surg Oncol* 3: 34, 2006.
- 163. Sisik A, Kaya M, Bas G, Basak F, Alimoglu O.** CEA and CA 19-9 are still valuable markers for the prognosis of colorectal and gastric cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 14: 4289–4294, 2013.
- 164. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch, International Union against Cancer.** *TNM classification of malignant tumours*. 7. West Sussex, UK: Chichester, 2009.

- 165. Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B.** Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 62: 1290–1301, 1998.
- 166. Strohkamp S, Gemoll T, Humborg S, Hartwig S, Lehr S, Freitag-Wolf S, Becker S, Franzén B, Pries R, Wollenberg B, Roblick UJ, Bruch H-P, Keck T, Auer G, Habermann JK.** Protein levels of clusterin and glutathione synthetase in platelets allow for early detection of colorectal cancer. *Cell Mol Life Sci CMLS* , 2017. doi:10.1007/s00018-017-2631-9.
- 167. Subauste MC, Pertz O, Adamson ED, Turner CE, Junger S, Hahn KM.** Vinculin modulation of paxillin–FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol* 165: 371–381, 2004.
- 168. Sun Z, Liu F.** Association of Nox1 and vinculin with colon cancer progression. *Cancer Invest* 31: 273–278, 2013.
- 169. Tang Z, Yuan S, Hu Y, Zhang H, Wu W, Zeng Z, Yang J, Yun J, Xu R, Huang P.** Over-expression of GAPDH in human colorectal carcinoma as a preferred target of 3-bromopyruvate propyl ester. *J Bioenerg Biomembr* 44: 117–125, 2012.
- 170. Thacker JS, Yeung DH, Staines WR, Mielke JG.** Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem* 496: 76–78, 2016.
- 171. Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD.** Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics MCP* 2: 1096–1103, 2003.
- 172. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A.** Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65: 87–108, 2015.
- 173. Unlü M, Morgan ME, Minden JS.** Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18: 2071–2077, 1997.
- 174. Villanueva J, Philip J, Chaparro CA, Li Y, Toledo-Crow R, DeNoyer L, Fleisher M, Robbins RJ, Tempst P.** Correcting common errors in identifying cancer-specific serum peptide signatures. *J Proteome Res* 4: 1060–1072, 2005.
- 175. Villanueva J, Shaffer DR, Philip J, Chaparro CA, Erdjument-Bromage H, Olshen AB, Fleisher M, Lilja H, Brogi E, Boyd J, Sanchez-Carbayo M, Holland EC, Cordon-Cardo C, Scher HI, Tempst P.** Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *J Clin Invest* 116: 271–284, 2006.
- 176. White J.** Anatomy and structural organization of the platelet. In: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia: 1994, p. 397–413.
- 177. White JG.** Current concepts of platelet structure. *Am J Clin Pathol* 71: 363–378, 1979.
- 178. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE.** Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 323: 1664–1672, 1990.
- 179. Wu JS.** Rectal Cancer Staging. *Clin Colon Rectal Surg* 20: 148–157, 2007.

- 180. Yamaji T, Iwasaki M, Sawada N, Shimazu T, Inoue M, Tsugane S.** Fat mass and obesity-associated gene polymorphisms, pre-diagnostic plasma adipokine levels and the risk of colorectal cancer: The Japan Public Health Center-based Prospective Study. *PloS One* 15: e0229005, 2020.
- 181. Young GP, Sinatra MA, St John DJ.** Influence of delay in stool sampling on fecal occult blood test sensitivity. *Clin Chem* 42: 1107–1108, 1996.
- 182. Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF, Stewart ET, Waye JD.** Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med* 366: 687–696, 2012.
- 183. Zhang S-Y, Lin M, Zhang H-B.** Diagnostic value of carcinoembryonic antigen and carcinoma antigen 19-9 for colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 9404–9409, 2015.
- 184. Zhang Y-T, Geng Y-P, Zhou L, Lai B-C, Si L-S, Wang Y-L.** Identification of proteins of human colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *World J Gastroenterol WJG* 11: 4679–4684, 2005a.
- 185. Zhang Y-T, Geng Y-P, Zhou L, Lai B-C, Si L-S, Wang Y-L.** Identification of proteins of human colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *World J Gastroenterol WJG* 11: 4679–4684, 2005b.
- 186. Zois CD, Christodoulou DK, Katsanos KH, Sigounas D, Batistatou A, Hatzi V, Marcon N, Tsianos EV.** Endoscopic resection and histological evaluation of colorectal polyps: Is it a definitive treatment? *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol* 24: 115–120, 2011.

7. ANHANG

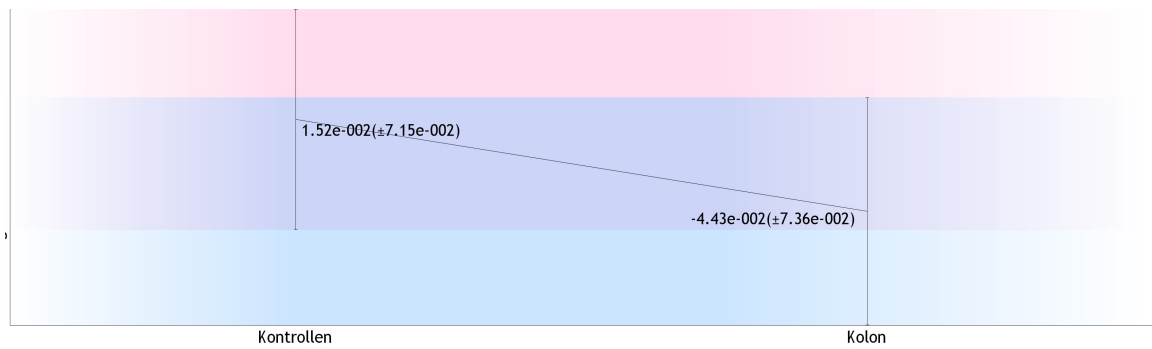


Abbildung 30 Caspase 3 (CASP3): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CASP 3. Vergleich Kontrolle vs. Karziom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

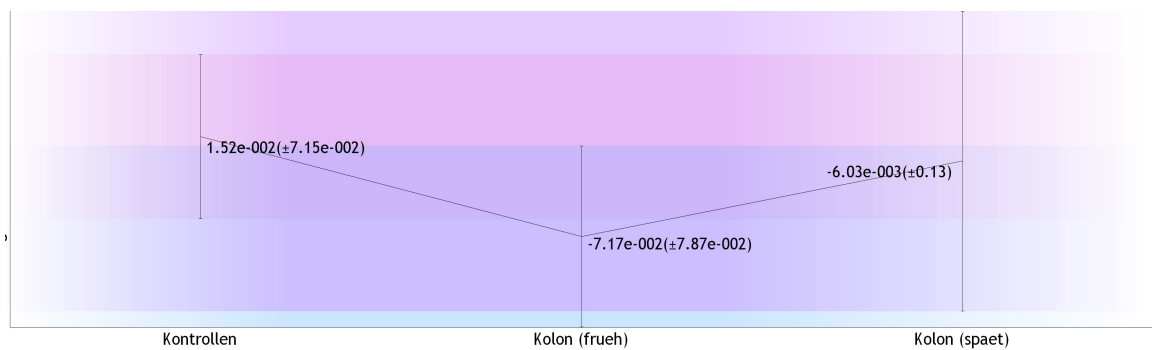


Abbildung 31 Caspase 3 (CASP3): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CASP 3. Vergleich Kontrolle vs. Frühkarzinom vs. Spätkarzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

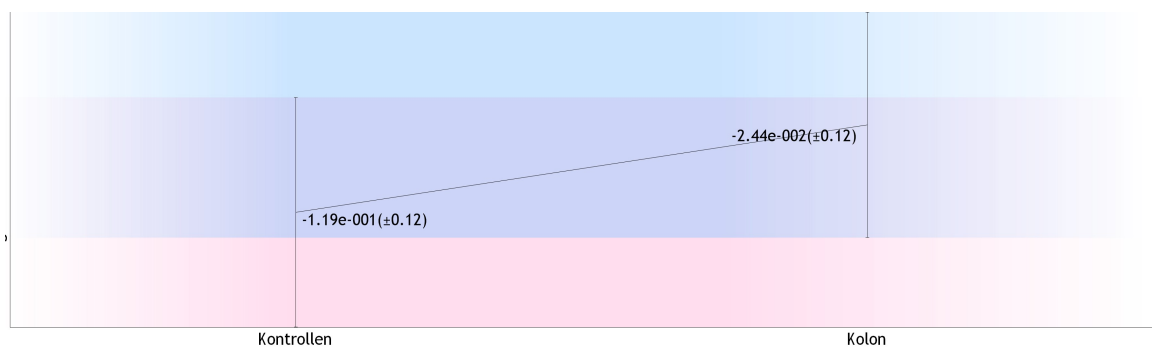


Abbildung 32 Cofilin (CFL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CFL. Vergleich Kontrolle vs. Karzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

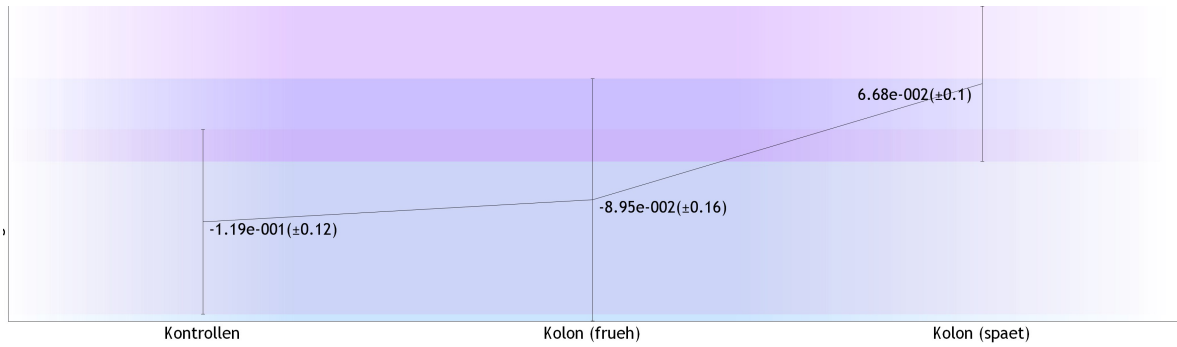


Abbildung 33 Cofilin (CFL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CFL. Vergleich Kontrolle vs. Frühkarzinom vs. Spätkarzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

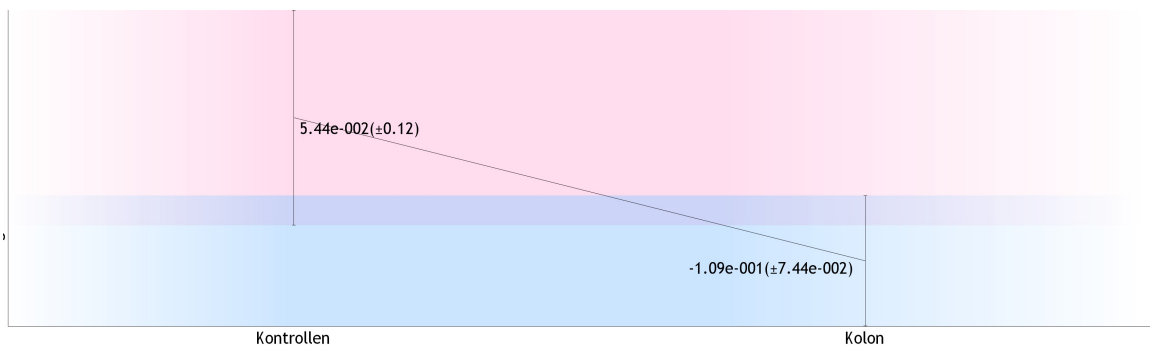


Abbildung 34 Clusterin (CLU): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CLU. Vergleich Kontrolle vs. Karzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

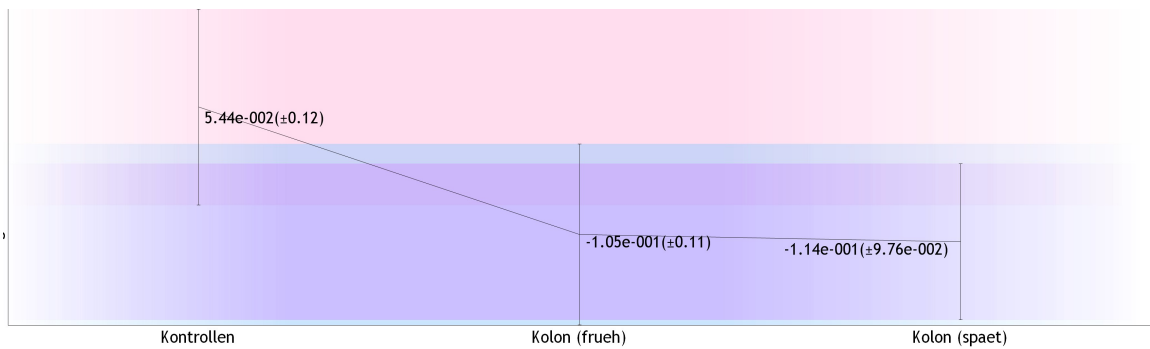


Abbildung 35 Clusterin (CLU): Expressionsprofil der 2-D DIGE für CLU. Vergleich Kontrolle vs. Frühkarzinom vs. Spätkarzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

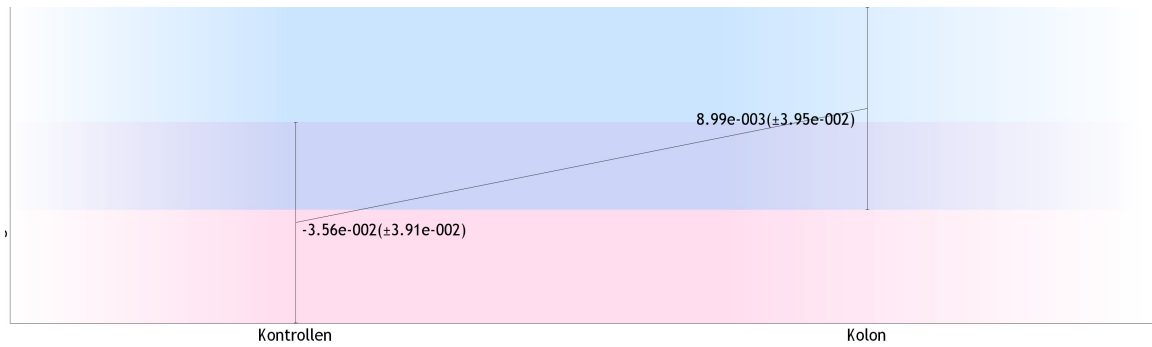


Abbildung 36 Gluthation Synthase (GSS): Expressionsprofil der 2-D DIGE für GSS. Vergleich Kontrolle vs. Karzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

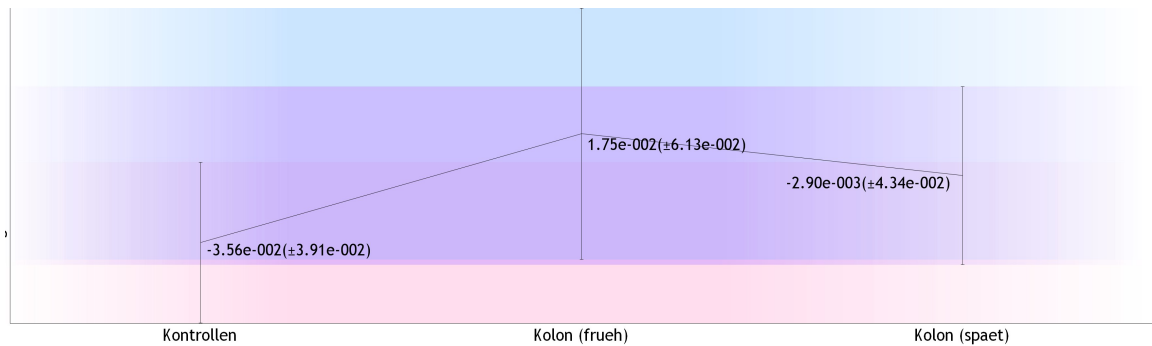


Abbildung 37 Gluthation Synthase (GSS): Expressionsprofil der 2-D DIGE für GSS. Vergleich Kontrolle vs. Frühkarzinom vs. Spätkarzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

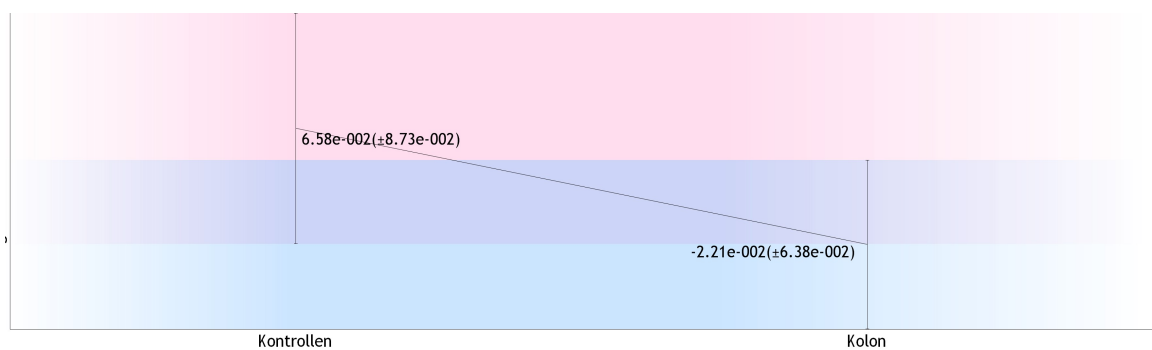


Abbildung 38 Vinculin (VCL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für VCL. Vergleich Kontrolle vs. Karzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

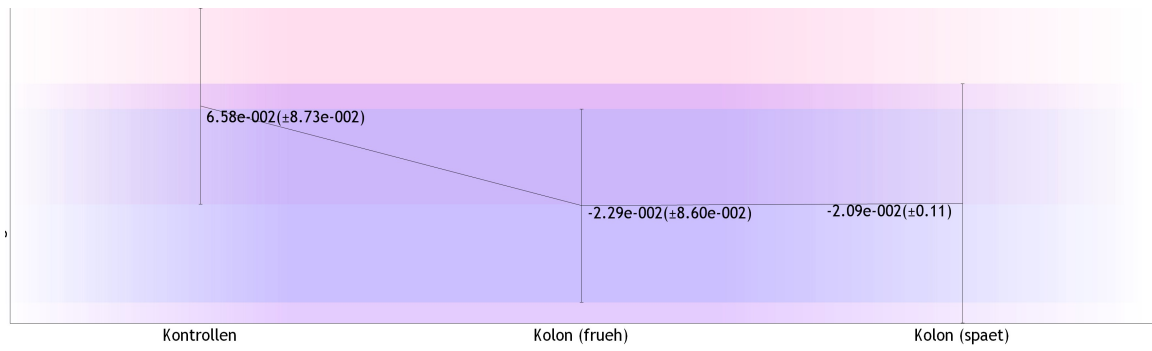


Abbildung 39 Vinculin (VCL): Expressionsprofil der 2-D DIGE für VCL. Vergleich Kontrolle vs. Frühkarzinom vs. Spätkarzinom. Es wird der Expressionsunterschied in logarithmischem Zusammenhang dargestellt (rosa: Kontrollgruppe; blau: Frühkarzinom Patienten; lila: Spätkarzinom Patienten).

Tabelle 8 Identifizierte Proteine der signifikanten Proteinspots aus allen fünf der 2-D DIGE Gruppenvergleiche.

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			MS/MS-Mode			K - C(f+s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
108	ITGA6	0,0552	1,17	Kontrollen	Kolon	5,30	128	6,40	127	2q31.1	150	112	19	253	208	21	x			x	
114	ITGA6	0,0941	1,16	Kontrollen	Kolon	5,36	128	6,40	127	2q31.1	146	108	17	256	195	19	x				
117	TLN1	0,0841	1,21	Kolon	Pankreas	5,61	128	5,70	271	9p13	112	76	12	223	175	12					
119	TLN1	0,0597	1,27	Kolon	Pankreas	5,67	127														
189	VCL	0,0724	1,24	Kontrollen	Kolon	5,87	123	5,40	124	10q22.2	130	89	22	241	199	22	x				
195	HSPA4	0,3777	1,07	Kolon	Pankreas	5,31	122	5,00	95	5q31.1	135	80	29	186	123	31					
206	UBA1	0,4360	1,08	Kontrollen	Kolon	5,65	121	5,40	118	Xp11.23	80	15	25	178	107	29				x	
209	TLN1	0,1436	1,21	Kontrollen	Kolon	6,30	121	5,70	271	9p13	53	8	8	164	114	11	x		x		
214	TLN1	0,0715	1,32	Kontrollen	Kolon	6,03	121			9p13	20	3	8	29	5	16	x				
217	ITGB3	0,2577	1,20	Kolon	Pankreas	4,31	121	5,00	90	17q21.32	104	67	20	143	101	20					
220	TLN1	0,1077	1,28	Kontrollen	Kolon	6,21	121			9p13	56	24	13	21	3	26	x				
236	TLN1	0,2441	1,31	Kontrollen	Kolon	5,87	118	5,70	271	9p13	66	32	6	208	170	6					
269	HSP90B1	0,2422	1,06	Kolon	Kontrollen	4,89	116	4,60	92	12q24.2-q24.3	191	157	30	199	163	32			x		
274	HECTD3	0,5735	1,12	Kontrollen	Kolon	5,85	116	5,30	98	1p34.1	51	16	13	93	6	16					

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			MS/MS-Mode			K - C(f+s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
309	GSN	0,2216	1,11	Kontrollen	Pankreas	5,66	110			9q33											x
327	GSN	0,1602	1,09	Kontrollen	Kolon	6,03	109	5,90	86	9q33	138	93	27	289	243	27		x		x	x
329	GSN	0,1659	1,09	Kontrollen	Kolon	6,13	109	5,90	86	9q33	91	47	21	157	110	25				x	
331	ACTB	0,6204	1,05	Kontrollen	Pankreas	5,47	108	5,20	42	7p22				265	0	18					
343	HSP90AB1	0,0451	1,18	Pankreas	Kontrollen	5,26	107	4,80	83	6p12				65	7	8					
347	VPS35	0,1155	1,25	Kolon	Pankreas	5,66	107	5,20	92	16q12	67	5	16	155	90	18					
349	ACTB	0,1246	1,28	Kolon	Pankreas	5,78	106	5,20	42	7p22	85	0	26	149	0	26					x
353	F13A1	0,0949	1,22	Kontrollen	Pankreas	6,30	106	5,70	83	6p25.3-p24.3	58	23	21	182	110	26					
356	F13A1	0,2150	1,32	Pankreas	Kontrollen	4,87	105	5,70	83	6p25.3-p24.3	76	27	15	205	152	15					x
428	HSPA8 (Tas 605)	0,0568	1,12	Kolon	Pankreas	5,70	95	5,20	71	11q24.1	98	60	19	334	281	21					
455	ACTB	0,0632	1,10	Kolon	Kontrollen	5,47	93	5,20	42	7p22	104	0	31	173	0	31				x	
466	LCPI	0,1950	1,27	Kolon	Kontrollen	5,43	92	5,20	70	13q14.3	47	11	18	64	15	11				x	
522	CCT3	0,0224	1,12	Pankreas	Kolon	6,51	82	6,10	61	1q23	112	68	29	188	131	29					
534	FGB	0,0839	1,25	Kontrollen	Kolon	6,42	79	9,30	56	4q28	154	103	35	197	150	35					
542	ACTB	0,3138	1,07	Kontrollen	Kolon	5,47	78	5,20	42	7p22	82	0	35	219	0	35				x	x

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			MS/MS-Mode			K - C(ft-s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
543	GDS1	0,4149	1,07	Pankreas	Kolon	5,37	78	5,10	67	4q23-q25	29	2	19	80	57	9		x		x	x
544	FGB	0,2019	1,13	Pankreas	Kolon	6,38	78	9,30	56	4q28	51	17	15	136	82	24					
545	FGB	0,0006	1,29	Kontrollen	Kolon	6,62	78	9,30	56	4q28	100	70	16	147	108	16	x	x	x	x	
548	FGB	0,4181	1,10	Pankreas	Kolon	6,67	78	9,30	56	4q28	49	16	13	103	61	17					x
551	FGB	0,0265	1,26	Kontrollen	Kolon	6,71	77	9,30	56	4q28	95	55	21	123	69	21	x			x	
554	FGB	0,0590	1,15	Kontrollen	Kolon	6,83	77	9,30	56	4q28	229	197	47	326	281	50	x				
556	PDIA3	0,1813	1,10	Pankreas	Kolon	6,17	77	5,90	57	15q15	82	38	18	161	115	20					
558	TRI58	0,0558	1,16	Pankreas	Kolon	6,25	77	5,80	55		75	31	16	88	45	16					
570	PDIA3	0,1867	1,07	Kontrollen	Kolon	5,85	76	5,90	57	15q15				70	32	18				x	
579	TUBA4A	0,1169	1,61	Kolon	Pankreas	5,59	74	4,80	50	2q35				110	54	24					
580	SCOT1	0,2884	1,07	Kontrollen	Kolon	6,71	73	7,80	56					87	15	22		x		x	
589	CORO1A	0,4885	1,06	Kontrollen	Kolon	6,88	71	6,30	51	16p11.2	159	119	24	183	138	24				x	
597	KRT9	0,9836	1,02	Kolon	Pankreas	6,17	71	5,00	62	17q21.1-q21.2				58	9	4		x			x
607	ATPB	0,0430	1,24	Kolon	Pankreas	4,77	69	5,10	56					168	133	24					
608	TUBB1	0,1256	1,18	Kontrollen	Pankreas	4,87	69	4,90	50	20q13.32	228	179	50	272	199	50					
611	TUBA4A	0,4917	1,03	Pankreas	Kolon	5,27	69	4,80	50	2q35	180	18	60	302	80	64				x	

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			MS/MS-Mode			K - C(f+s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
620	FGB	0,1789	1,26	Pankreas	Kontrollen	6,44	67	9,30	56	4q28	116	69	26	136	83	26					
626	FGB	0,1348	1,34	Pankreas	Kontrollen	6,69	66	9,30	56	4q28	53	21	15	104	49	19					
632	GSS	0,1955	1,11	Kolon	Kontrollen	5,92	65	5,60	52	20q11.2	63	21	28	225	168	28	x		x		
644	BLMH	0,0424	1,17	Pankreas	Kolon	6,52	63	5,80	53	17q11.2	100	50	26	205	127	26					
649	TSG	0,7931	1,04	Kontrollen	Pankreas	6,48	62	6,00	44					80	5	18		x		x	x
652	FAM49A	0,0946	1,10	Kolon	Pankreas	6,07	62										x		x		
654	PDIA6	0,1946	1,08	Kolon	Kontrollen	5,27	62	4,80	48	2p25.1				119	77	15	x	x	x		
660	TBB1	0,3258	1,05	Kontrollen	Pankreas	5,47	61	4,90	50					74	42	11				x	x
664	TBB1	0,0711	1,20	Kontrollen	Pankreas	5,55	60	4,90	50		97	68	27	295	244	38					
668	RNH1	0,3402	1,15	Pankreas	Kontrollen	4,70	59	4,60	51	11p15.5				166	130	11					
678	ERP44	0,0801	1,17	Kontrollen	Pankreas	5,08	56	5,00	47	9q31.1	127	87	30	157	107	30					
687	ERP44	0,6138	1,09	Kontrollen	Pankreas	5,15	55	5,00	47	9q31.1	127	76	25	287	230	26					
702	AHCY	0,0540	1,76	Pankreas	Kolon	6,36	53	5,90	48	20cen-q13.1	62	25	17				x				
731	ACTB	0,0571	1,44	Kontrollen	Pankreas	5,72	49	5,20	42	7p22	93	0	35	402	0	50					
733	ACTB	0,0894	1,24	Kontrollen	Pankreas	5,64	49	5,20	42	7p22	159	0	36	282	0	44					
739	ACTR1A	0,4794	1,08	Kontrollen	Kolon	6,90	49	6,20	42	10q24.32	104	63	34	170	126	34		x		x	x

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			MS/MS-Mode			K - C(f+s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
742	ACTB	0,0471	1,26	Kontrollen	Pankreas	5,59	49	5,20	42	7p22	209	0	55	257	0	63					
777	ACTR2	0,1879	1,13	Kolon	Pankreas	6,82	48	6,30	45	2p14	63	22	14	65	23	14				x	
788	K22E	0,4964	1,58	Pankreas	Kontrollen	4,53	47	8,90	65		50	6	15	485	401	27		x		x	x
804	MARE2	0,2819	1,14	Pankreas	Kontrollen	5,61	47	5,30	37		63	20	14	86	40	14					
811	CLINT	0,8311	1,04	Kolon	Kontrollen	5,76	47	6,30	41	5q33.3				96	76	20		x		x	x
812	CLU	0,5156	1,13	Kontrollen	Pankreas	4,74	47	5,90	53	8p21-p12	53	1	39	94	44	11					
814	CLU	0,0035	1,50	Kontrollen	Kolon	4,88	46	5,90	53	8p21-p12	81	40	16	74	24	16	x	x	x	x	
818	FPPS	0,0240	1,23	Kontrollen	Kolon	5,10	46	5,80	48		46	2	12	131	73	12	x	x	x	x	
821	PP1A	0,0452	1,38	Kontrollen	Pankreas	6,17	46	5,90	38		92	4	31	138	45	31					
824	NIF3L1	0,9584	1,04	Pankreas	Kolon	6,48	46	6,20	42	2q33	61	15	22	78	24	22		x			x
851	IFA2	0,9759	1,02	Pankreas	Kontrollen	5,33	45	4,90	36		68	22	21	62	15	21		x			x
853	COPS6	0,6730	1,08	Kolon	Kontrollen	5,65	45	5,40	36	7q22.1	41	4	12	70	24	12					x
854	LDH8	0,0094	1,42	Kolon	Pankreas	5,89	45	5,70	36		50	7	16								
888	LDHB	0,1283	1,12	Kontrollen	Pankreas	6,26	43	5,70	36	12p12.2-p12.1	87	39	17	77	29	17					
897	EHD3	0,1330	1,28	Pankreas	Kolon	6,47	43	6,10	60	2p21	76	31	10	72	30	10					
904	LASP1	0,6900	1,07	Pankreas	Kontrollen	6,59	42	6,70	30	17q11-q21.3				56	16	14					

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			MS/MS-Mode			K - C(f+s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
918	CASP3	0,1640	1,14	Kontrollen	Kolon	6,55	42	6,10	32	4q34	63	15	14	102	39	18			x		
927	CLTA	0,7771	1,05	Kolon	Kontrollen	4,31	41	4,30	27	9p13				96	46	9					
939	MARE1	0,5225	1,05	Kolon	Kontrollen	5,20	41	4,90	30		65	30	24	218	170	24					
943	TBCB	0,3840	1,13	Kolon	Kontrollen	5,09	40	4,90	27	19q13.11-q13.12	106	68	39	176	123	39		x		x	
944	HDHD2	0,0082	1,25	Kontrollen	Kolon	6,32	40	5,80	28	18q21.1	119	80	32	155	107	32	x	x	x	x	
957	PHB	0,4888	1,10	Kolon	Kontrollen	5,79	40	5,50	29	17q21	235	198	53	300	246	53		x		x	x
959	GSH0	0,5199	1,05	Kolon	Kontrollen	6,18	40	5,60	31		123	60	35	253	195	35		x		x	x
974	GSTO1	0,0176	1,76	Kontrollen	Kolon	6,15	39	6,30	27	10q25.1	102	55	30	242	168	38	x	x		x	
976	GSTO1	0,0309	1,89	Kontrollen	Kolon	5,87	39	6,30	27	10q25.1	77	23	30	143	81	30	x	x		x	
979	GSTO1	0,0275	1,61	Kolon	Kontrollen	6,52	39	6,30	27	10q25.1	226	189	45	324	286	45	x	x			
993	YWHAG	0,0686	1,19	Kontrollen	Pankreas	4,88	38	4,70	28	7q11.23				174	114	42					
1002	ARHGDI B	0,3066	1,13	Kolon	Pankreas	5,22	37	4,90	23	12p12.3	50	13	20	57	11	23					x
1003	ACTB	0,2935	1,36	Pankreas	Kontrollen	5,49	37	5,20	42	7p22	72	0	30	169	0	33				x	
1004	1433Z_Human	0,0773	1,15	Kolon	Pankreas	4,87	37	5,50	39					61	17	13					
1025	PRDX4	0,0889	1,11	Pankreas	Kontrollen	5,99	37	5,80	30	Xp22.11	98	65	29	259	221	36					
1038	translation initiation factor 6	0,6514	1,04	Kolon	Pankreas	4,53	36	4,40	27					92	58	17					

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			M S/M S-M ode			K - C(f+s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
1073	YWHAB	0,0489	1,28	Kontrollen	Pankreas	6,31	34	4,60	28	20q13.1	63	9	31	77	2	25					
1077	C1orf123	0,9655	1,06	Kontrollen	Pankreas	5,21	34	4,80	18	1p32.3				62	21	27					x
1078	ACTB	0,5752	1,38	Kolon	Kontrollen	5,71	34	5,20	42	7p22				88	0	11		x		x	
1079	GSTP1	0,2268	1,09	Kontrollen	Pankreas	5,87	34	5,30	23	11q13	84	36	31	274	230	31					x
1091	GGCT	0,5294	1,10	Kontrollen	Pankreas	5,14	33	4,90	21	7p15-p14	40	8	15	66	28	15					
1098	RAP1B	0,0729	1,26	Kontrollen	Pankreas	5,77	32	5,50	21	12q14	57	0	22	107	0	22					
1110	DCTN3	0,5366	1,12	Kontrollen	Pankreas	5,52	32	5,20	21	9p13	51	14	19								
1148	CFL1	0,3890	1,24	Kolon	Kontrollen	6,19	29	9,10	18	11q13				86	43	8		x		x	
1157	KRT5	0,6953	1,29	Kolon	Pankreas	5,80	29	8,60	62	12q13.13	70	13	20								x
1161	AP3S1	0,6186	1,13	Kolon	Pankreas	5,62	28	5,10	21	5q22	82	43	32	79	30	32		x		x	x
1189	RHEB	0,1850	1,15	Kontrollen	Pankreas	6,77	27	5,60	20	7q36	94	53	27	126	84	27					
1207	SNCA	0,0648	1,14	Pankreas	Kontrollen	4,76	25	4,50	14	4q21	134	102	54	203	162	54		x		x	
1244	KRT5	0,7894	1,09	Kontrollen	Pankreas	6,37	22	8,60	62	12q13.13				61	24	8		x	x		x
1245	RAB6A_Human	0,7593	1,14	Kolon	Pankreas	6,44	22	5,30	23	11q13.3	52	10	23	49	6	23					x
1246	KRT78	0,7176	1,12	Kolon	Kontrollen	6,35	22	5,70	57	12q13.13				86	32	11		x			x
1259	ACTN1	0,1912	2,36	Pankreas	Kontrollen	6,04	21	5,10	10	14q24.1-q24.2; 14q24; 14q22-q24	65	29	7	60	24	7					

Spot - #	Protein	Anova (p)	Faltung	höchster Mittelwert	niedrigster Mittelwert	pI	MW	Protein pI	Protein MW	Chromosom	MS-Mode			MS/MS-Mode			K - C(f+s)	K - C(f) - C(s)	K - C(f)	K - C(s)	C(f) - C(s)
											Score	Differenz	Abdeckung	Score	Differenz	Abdeckung					
1261	FXN	0,2737	1,25	Kolon	Pankreas	4,92	20	9,40	23	9q21.11	46	10	18	49	8	18		x			x
1286	B2M	0,1147	1,22	Kontrollen	Kolon	6,84	18	6,10	13	15q21-q22.2				159	108	37	x				
1327	SPB9	0,1862	1,26	Pankreas	Kontrollen	4,42	15	5,50	43		54	14	14	51	5	14					
1328	DIS3L	0,1331	2,04	Kolon	Pankreas	4,80	14	6,10	122	15q22.31				59	19	5				x	
1347	TUBA1C	0,0607	1,18	Kontrollen	Pankreas	5,38	67	4,80	50	12q13.12	100	0	31	333	0	34					
1348	TBB1_Human	0,0191	1,35	Kontrollen	Pankreas	5,40	66	4,90	50		109	68	18	201	120	18					
1349	HINT2	0,4176	2,02	Pankreas	Kontrollen	6,85	23	9,80	17	9p13.3				56	26	9					
1350	ACTN1 (Fragment)	0,9276	1,07	Pankreas	Kolon	6,87	22	5,10	103	14q24.1-q24.2; 14q24; 14q22-q24				110	29	22		x			x
1351	ACTN1	0,1854	1,11	Kontrollen	Kolon	5,49	115	5,10	103	14q24.1-q24.2; 14q24; 14q22-q24	34	9	12	207	38	22				x	x
1353	HSPA5	0,0615	1,19	Kolon	Pankreas	5,04	98	4,90	72	9q33.3	111	73	18	106	55	18					
1362	TWF2	0,4380	1,07	Kolon	Pankreas	6,93	48	6,40	39	3p21.1	122	47	42	270	190	42					
1364	HSP90AA1	0,9381	1,01	Pankreas	Kontrollen	5,10	110	4,80	85	14q32.33	81	45	20	279	60	35					
1369	CO3	0,0776	1,38	Pankreas	Kolon	5,98	125	6,00	188		118	80	10	273	224	11					

(pI = isoelektrischer Punkt, MW = Molekulargewicht, Chr = Chromosom, ↓ = vermindert exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe, ↑ = verstärkt exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe, K = Kontrollgruppe, C = Patientengruppe mit Kolonkarzinom, C(f) = Patientengruppe mit Kolonfrühkarzinom, C(s) = Patientengruppe mit Kolonspätkarzinom

8. DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank dem Klinikdirektor der Chirurgie, Herrn Prof. Dr. Tobias Keck.

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. med. Jens K. Habermann bedanken, dass er in mir das Interesse für das spannende Feld der Forschung in der Chirurgie geweckt hat. Mein Dank gilt ebenso dafür, dass er mir das Thema für die Erstellung dieser Dissertation vertrauensvoll überlassen hat. Ich bedanke mich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seinem Labor zu erstellen.

Ein weiterer, ganz herzlicher Dank gilt meinem Betreuer, Prof. Dr. M.Sc. Timo Gemoll. Durch seine jederzeit freundliche und äußerst hilfsbereite Unterstützung ist bei wissenschaftlichen Aspekten, wie auch bei praktischen Fragen nie eine Angelegenheit ungeklärt geblieben. Er hat meine Arbeit oftmals kritisch hinterfragt und mir in vielen Situationen neue Ansichten vermittelt. Dem gesamten Team des Chirurgischen Forschungslabors danke ich für die wundervolle Zeit während der Experimente und der Datenaufnahme.

Der Ad Infinitum Foundation möchte ich für die großzügige Unterstützung sehr herzlich danken. Dadurch wurde es mir ermöglicht, mich konzentriert und störungsfrei um die Anfertigung der Dissertation zu kümmern.

Zum Schluss danke ich ganz besonders und von ganzem Herzen meinen Eltern und meinem Ehemann, die mir in jeder Minute zur Seite gestanden und mich liebevoll unterstützt haben.

9. LEBENSLAUF

10. VERÖFFENTLICHUNGEN

Strohkamp S, Gemoll T, Humborg S, Hartwig S, Lehr S, Freitag-Wolf S, Becker S, Franzén B, Pries R, Wollenberg B, Roblick UJ, Bruch HP, Keck T, Auer G, Habermann JK. Protein levels of clusterin and glutathione synthetase in platelets allow for early detection of colorectal cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Jan;75(2):323-334. doi: 10.1007/s00018-017-2631-9. Epub 2017 Aug 28.

Gemoll T, Johanning S, Bruch HP, Auer G, Roblick U, Habermann JK. Platelet-Protein-Profiling of healthy controls and patients with early- and late-stage colorectal cancers. *Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. 130. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. München, 30.04.-03.05.2013. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2013. Doc13dgch667. doi: 10.3205/13dgch667.*

Gemoll T, Johanning S, Bruch HP, Auer G, Roblick U, Habermann J. Platelet-protein-profiling of healthy controls and patients with early- and late-stage colorectal cancers. *Vortrag bei der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Endoskopie, 21. September 2012, Hamburg.*