

**Molekulare Analysen von Kolorektal Karzinomen und  
präklinischen Modellen –  
Identifizierung der Tumor Heterogenität und Mikroumgebung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Nilofar Badra-Azar

Aus Teheran (Iran)

2018

Diese Arbeit wurde vom 01.05.2014 – 31.04.2018 unter der Leitung von Dr. Marie-Laure Yaspo am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik erstellt.

1. Gutachterin: Dr. Marie-Laure Yaspo

2. Gutachterin: Prof. Dr. Silke Rickert-Sperling

Disputation am 10.10.2018

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und einen persönlichen Dank an die Leute aussprechen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben und denen ich es unter anderem zu verdanken habe, dass ich mit dieser Arbeit meine Promotion erfolgreich abschließen konnte.

Mein erster Dank geht an Dr. Marie-Laure Yaspo, welche es mir ermöglicht hat in ihrer Arbeitsgruppe meine Arbeit auszuführen und mir das Bearbeiten dieses interessanten Themas ermöglichte und für ihre wissenschaftliche Supervision während meiner gesamten PhD-Zeit. Zudem hat diese Arbeit von ihren Anmerkungen und Hinweisen profitiert.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Prof. Dr. Silke-Sperling bedanken.

Ich bedanke mich darüber hinaus beim gesamten OncoTrack Konsortium und bei allen Kollaboraturen, für die Bereitstellungen der Daten und der Zusammenarbeit in den letzten vier Jahren.

Ein sehr herzliches Dankeschön gilt meinen Arbeitskollegen, welche mir während der gesamten Arbeitszeit mit Rat zur Seite gestanden haben. Sowohl dem technischen Team, welche bei der Datenerstellung geholfen haben, wie auch dem wissenschaftlichen Team, die mir stets mit ihrem Fachwissen zur Seite gestanden haben. Darüber hinaus möchte ich mich für die schöne Zusammenarbeit in stressigen, wie auch entspannten Tagen, bei dem gesamten Team bedanken.

Meinen Freunden, allen voran Matina Jozi, danke ich besonders für den starken emotionalen Rückhalt über die Dauer meiner Promotion.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken. Sie geben mir Kraft in jeder Lebenslage und sind immer eine große Unterstützung in meinem Leben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann, Marcel Badra, bedanken. Er gibt mir tatkräftige moralische Unterstützung und bringt das Beste aus mir raus. Er spornte mich weiter an, falls mal etwas nicht genau nach Plan lief und ohne ihn, wäre ich nicht da wo ich jetzt bin.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	8
Abstract .....	10
1.Einleitung.....	12
1.1 Generelle Informationen zum Dickdarmaufbau .....	12
1.2 Pathogenese von Kolorektal Karzinomen.....	15
1.2.1 Krankheitsablauf .....	15
1.2.2 Medikation.....	16
1.2.3 Prozesse zur Tumorentstehung und Metastasierung .....	17
1.2.4 Molekulare Eigenschaften.....	18
1.2.5 Signalwege die in CRC betroffen sind.....	21
1.2.6 Transkriptomische Klassifizierung der Tumore .....	23
1.2.5 Multiple primäre Kolorektal Karzinomen .....	25
1.3 Präklinische Modelle.....	26
1.3.1 Zellkulturmodelle .....	26
1.3.2 Xenograft .....	27
1.3.3 Patienten-abgeleitete Modelle.....	29
1.4 Tumor Heterogenität.....	29
1.5 Tumormikroumgebung.....	30
1.6 Das OncoTrack Projekt.....	33
1.6.1 Rekrutierung .....	33
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	36
2. Material.....	38
3. Methoden .....	45
3.1 Kohorte .....	45
3.1.1 Patienteninformationen.....	45

3.1.2 DNA und RNA Extraktion .....	45
3.1.3 DNA und RNA Extraktion von FFPE fixiertem Material .....	45
3.1.4 PCR.....	45
3.1.5 Real time PCR (qPCR) .....	46
3.1.6 Mikrosatelliten-Status.....	46
3.2 PDX/PDO Erstellung und Medikamententest .....	47
3.3 Sequenzierverfahren .....	47
3.3.1 Vollständige Genomsequenzierung (WGS).....	47
3.3.2 Exom Sequenzierung (WES).....	47
3.3.3 Vollständige Transkriptomsequenzierung .....	48
3.3.4 Gezielte Sequenzierung .....	48
3.3.4 Gezielte Sequenzierung Auswertung .....	48
3.3.5 Sanger Sequenzierung .....	48
3.4 Bioinformatische Analysen .....	49
3.4.1 DNA Datenprozessierung .....	49
3.4.2 Kopienzahlvarianten.....	49
3.4.3 Somatische Alterationen .....	50
3.4.4 RNA Datenprozessierung .....	50
3.4.5 Bestimmung der Tumorreinheit .....	50
3.4.6 Genfusionen .....	50
3.4.7 SciClone .....	51
3.4.8 Vergleichende genomische Analysen in Patienten Tumoren, PDX & PDO	51
3.4.9 Vergleichende Analysen der chromosomalen Profile der Patienten Tumoren, PDX & PDO .....	52
3.4.10 Differentielle Genexpressions Analysen (DGEA).....	52
3.4.11 Mean Pattern Matrix .....	53

3.4.12 Funktionelle Annotation .....	53
3.4.13 Immunsignaturen .....	53
3.4.14 Tumormikroumgebung spezifische Gene .....	53
3.4.15 Violin Plot .....	54
3.4.15 Streudiagramm und Spearmans Rangkorrelationskoeffizient .....	54
3.4.16 Auswahl der Kandidatengene der gruppenspezifischen TME .....	54
4. Ergebnisse .....	55
4.1 Die molekulare Charakterisierung der Kohorte.....	55
4.1.1 Genfusions-Detektion .....	55
4.1.2 CNV Profil .....	57
4.2 Vergleichende Analysen der genetischen Profile von Tumor und Modellen .....	58
4.2.1 Fraktion von unterschiedlichen Veränderungen .....	58
4.2.2 CRC spezifische Gene .....	60
4.2.3 Klonalitätsanalysen .....	62
4.2.4 CNV Unterschiede in Tumoren und Modellen .....	63
4.3 Patient 118 als eine Fallstudie für die Inter- und Intra-Tumorheterogenität.....	66
4.3.1 Patienteninformation .....	66
4.3.2 Synchrone Tumore .....	66
4.3.3 Molekulares Profil von Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase .....	68
4.3.4 Transkriptom Analysen von Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase .....	70
4.3.5 Vergleich von Tumor 1 und der Metastase mit den Modellen .....	71
4.4 CRC Subtypen Beschreibung .....	74
4.5 Tumormikroumgebung.....	76
4.5.1 Kontrollgewebevergleich.....	76
4.5.2 Zellen in der Tumormikroumgebung.....	80
5. Diskussion.....	89

6. Fazit.....	102
7. Literaturverzeichnis .....	104
8. Verzeichnis der erfolgten Publikationen .....	118
9. Verzeichnis der Abkürzungen .....	119
10. Abbildungsverzeichnis.....	120
11. Tabellenverzeichnis.....	125
12. Anhang .....	126

## Zusammenfassung

Kolorektal Karzinome (CRC) sind die dritthäufigste Krebsart weltweit und jedes Jahr werden 1.4 Millionen Fälle neu diagnostiziert. Nur ein sehr kleiner Teil der fortgeschrittenen Tumore reagiert auf die vorhandenen Therapien. Daher ist es wichtig, das genetische Profil der CRC-Tumore besser zu verstehen, insbesondere im Hinblick auf die personalisierte Medizin. Hieran anknüpfend hat das IMI OncoTrack Projekt eine Pan-Omics Studie durchgeführt. Darin wurden Genom, Exom, Methylom und Transkriptom von 106 CRC Tumoren, 46 Organoid Modellen (PDO) und 59 Xenografts (PDX) sequenziert und die Arzneimittelsensitivität der Modelle in Bezug auf 16 Medikamente bestimmt. Als Kontrollen und zur Beschreibung der Umgebung der Tumore wurde das Transkriptom von 43 Darm- und Leber-Kontrollen in dieser Pan-Omics Studie sequenziert. In diesem Rahmen fand das vorliegende Dissertationsprojekt statt.

Der Fokus dieser Arbeit liegt a) auf einer Analyse der Inter- und Intra-Tumorheterogenität und dem Rekapitulieren der molekularen Profile in den Modellen, sowie b) auf der Charakterisierung der Tumormikroumgebung (TME). Hierfür wurden vergleichende molekulare Analysen der Tumore mit ihren entsprechenden präklinischen Modellen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten zunächst, dass das genetische Profil der Modelle gut mit dem der entsprechenden Tumore übereinstimmt. Daher scheinen Modelle das Profil der Tumore im Allgemeinen rekapitulieren zu können. Es fanden sich jedoch auch einige Tumor-Modell-Paare mit verschiedenen Mutationen in Genen wie *EGFR*, *APC*, *SMAD4*, *PIK3CA* oder *TP53* gefunden, die direkt mit CRC assoziiert sind. Darüber hinaus konnte die *EGFR* Mutation im PDO, die nicht im PDX desselben Patienten vorhanden war, die unterschiedliche Medikamentensensitivität der EGFR-Inhibitoren in den beiden Modellen erklären. Diese Unterschiede in den Tumor-Modell-Paaren spiegeln die initiale Intra-Tumorheterogenität wider, wobei einige der Tumore eindeutig aus verschiedenen Tumorklonen mit unterschiedlichen Mutationsprofilen bestehen.

Die Ergebnisse aus der TME-Analyse zeigen zwei Arten von Gen-Gruppen: einmal eine TME der molekularen CRC-Subgruppen, und einmal eine allgemeine gruppenspezifische TME, welche in allen Tumoren zu finden ist. Innerhalb der gruppenspezifischen TME Gen-Gruppen konnten wiederum Gene identifiziert werden, die eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Tumorumgebung spielen. Dazu gehören *GREM1*, welches von Krebs-assoziierten Fibroblasten exprimiert wird; oder *LOXL1*, welches bei der Reorganisation der extrazellulären Matrix beteiligt

ist; aber auch *SLC15A3*, welches die Zellaktivität der Makrophagen und dendritischen Zellen reguliert.

Nimmt man die Analysen der Tumorheterogenität und der Tumormikroumgebung zusammen, wird deutlich, dass die Tumormasse von CRC-Tumoren genetisch komplex ist und aus mehreren Tumorklonen mit verschiedenen Mutationen besteht. Zudem, konnten wir verschiedene Gene, welche relevant für die Mikroumgebung der Tumore sind, in den CRC-Subgruppen identifizieren, was wiederum zur molekularen Komplexität beiträgt. Daher müssen für Biomarker-Studien, sowohl die Heterogenität als auch der Einfluss der TME beachtet werden.

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide, with 1.4 million cases newly diagnosed each year. Nevertheless, only a small fraction of advanced tumors respond to existing therapies. Therefore, it is important to advance our knowledge of the genetic profiles of CRC tumors, especially in light of personalized medicine. Based on this, the IMI OncoTrack project was created to conduct a pan-omics study focusing on the sequencing of the genome, exome, methylome and transcriptome of 106 CRC tumors and 46 organoid models (PDO) and 59 xenografts (PDX). In a drug sensitivity analysis the models were treated with 16 clinically relevant drugs. As controls and to describe the environment of the tumor, the transcriptome of 43 colon and liver controls was examined. The present dissertation was conducted within this framework.

The project focused on (a) the analysis of the inter- and intra-tumor heterogeneity and the recapitulation of molecular profiles in the models, as well as (b) the characterization of the tumor microenvironment (TME). For these purposes, comparative analyses of preclinical models and their corresponding tumors were conducted.

The results showed that the genetic profile of the models matches that of the corresponding tumors. Therefore, generally the models seem to be able to recapitulate the molecular make-up of the tumors. However, there were also some tumor-model pairs with relevant discordant mutations, such as *EGFR*, *APC*, *SMAD4*, *PIK3CA* or *TP53*, which are directly associated with CRC. In addition, the *EGFR* mutation in the PDO, which was not present in the PDX of the same patient, may explain the different drug sensitivities of the EGFR inhibitors in the two models. These differences in the tumor-model pairs reflect the initial intra-tumor heterogeneity, showing that the tumor clearly consists of different tumor clones with different mutational profiles.

The results of the TME analysis presented two types of gene sets: a group-dependent TME unique to each of the three molecular groups of CRC and one group independent TME which appears in all tumors. In the group-dependent TME gene-sets relevant genes were identified, which play an important role in the formation of the tumor microenvironment. These include *GREM1*, which is expressed by cancer-associated fibroblasts; or *LOXL1*, which is involved in the extracellular matrix reorganization; but also *SLC15A3*, which regulates the cell activity of macrophages and dendritic cells.

When combining the analyses of tumor heterogeneity and the tumor microenvironment, it becomes clear that CRC tumors are genetically complex and consist of several tumor clones with different mutations. In addition, we could identify different patterns of gene expression, relevant to the microenvironment of the tumors, in the CRC subgroups, which, in turn, contribute to the molecular complexity. Therefore, for further biomarker studies, both the heterogeneity and the influence of the TME must be considered.

# 1. Einleitung

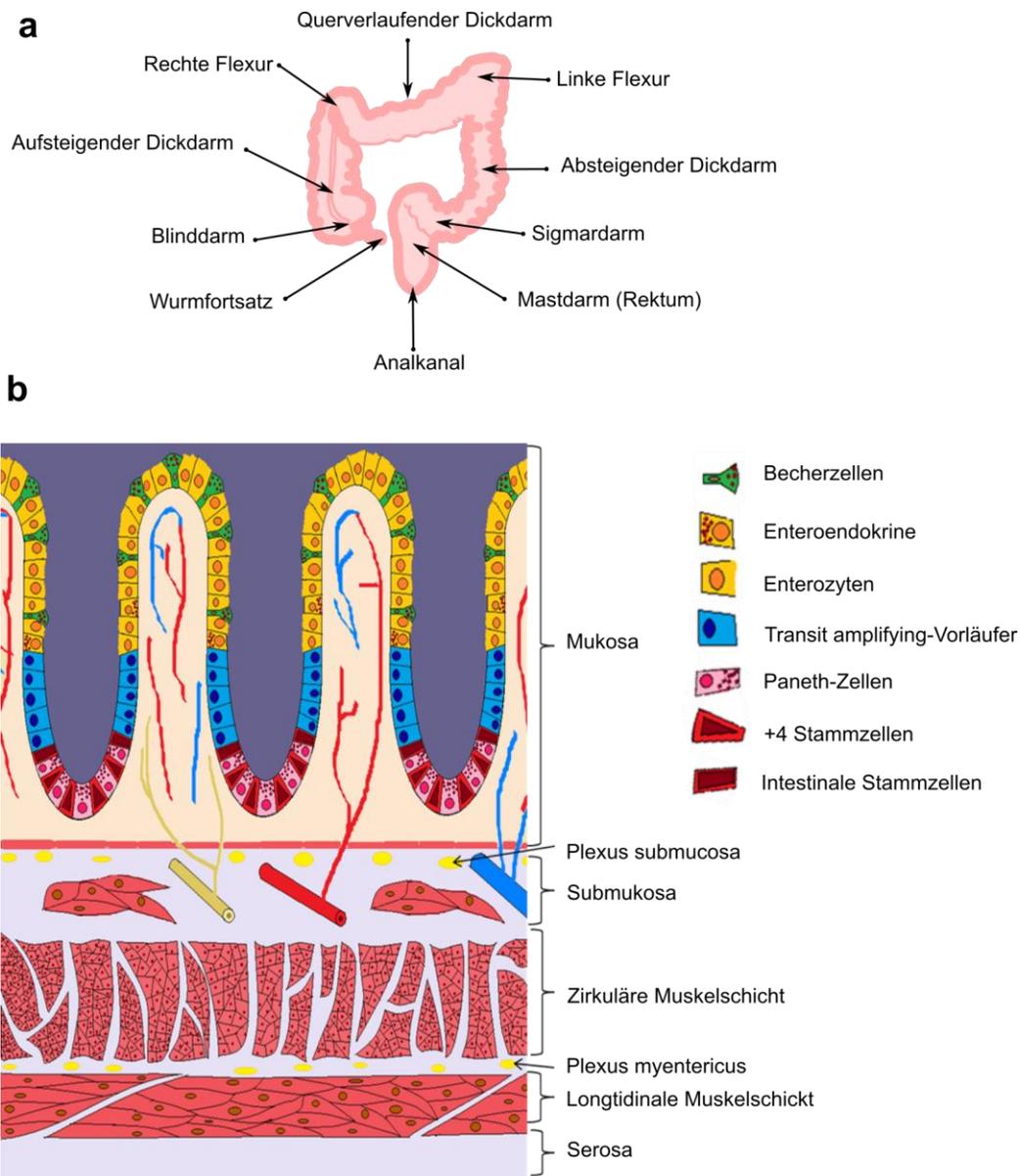
## 1.1 Generelle Informationen zum Dickdarmaufbau

Der Gastrointestinaltrakt besteht aus zwei Organen, dem Magen und dem Darm. Im Magen wird die Nahrung aufgenommen und verdaut, um die Nährstoffe zu extrahieren. Alles, was nicht genutzt werden kann, wird über den Darm, in Form von Fäkalien, aus dem Körper entsorgt. Der Dickdarm ist der letzte Abschnitt des Verdauungstraktes, hier werden die Reste gesammelt und aus dem Körper ausgeschieden <sup>1</sup>.

Man kann den Dickdarm in verschiedene Bereiche unterteilen. Im rechten Unterbauch beginnt der Dickdarm mit dem Blinddarm (und am Ende findet man den Wurmfortsatz), der Grimmdarm teilt sich je nach Lage in drei weitere Teile (aufsteigender, querverlaufender und absteigender Dickdarm). Nach dem absteigenden Darmabschnitt folgt eine leichte S-Kurve, dieser Abschnitt wird aufgrund der Form Sigmardarm genannt und endet im Mastdarm (Rektum). Mit dem Mastdarm endet der Dickdarm und geht weiter in den Analkanal über <sup>1</sup> (Abbildung 1.1a).

Anders als beim Dünndarm, besteht die Oberfläche des Dickdarms aus Krypten und ermöglicht somit eine Oberflächenvergrößerung. Der Aufbau der Darmwand ist in allen Abschnitten gleich und beginnt mit der innersten Schicht, Mukosa, welche die Darmzotten bildet und deren Einbuchtungen Krypten genannt werden <sup>2</sup> (Abbildung 1.1b). Jede Zotte ist aufgeteilt in unterschiedliche Zelltypen, die einer bestimmten Anordnung folgen. Am unteren Teil der Krypten liegen die Stammzellen, die sich asymmetrisch in identische Tochterzellen oder differenzierte Zellen teilen können, und je weiter man die Krypte entlangläuft, findet man differenziertere Zelltypen bis hin zu den Enterozyten, Enteroendokrine und Becherzellen am äußersten Rand. Enterozyten sind hochprismatische Zellen und haben verschiedene Funktionen in der Verdauung. Enzyme auf der Oberfläche von Enterozyten verdauen Polysaccharide und Peptide. Daraufhin werden die einzelnen Nahrungsbestandteile (Zucker, Aminosäuren, Fette und Vitamine) aufgenommen <sup>3,4</sup>. Enteroendokrine Zellen sind für die Sekretion zuständig, bei Vorhandensein von Nährstoffen, geben Enteroendokrine Zellen regulatorische Faktoren (zum Beispiel gastrointestinale Hormone oder Peptide) als Reaktion auf verschiedene Reize ab, diese Faktoren können die Verdauung, Darmmotilität und Nahrungsaufnahme regulieren <sup>5</sup>. Die Becherzellen hingegen sind da um die Mukosa zu schützen (zum Beispiel gegen das Eindringen von Bakterien), dazu geben die Becherzellen einen Schleim ab. Der Schleim besteht aus *MUC2*, einem großen Glykoprotein. Die Struktur des Schleimes ist so aufgebaut, dass zwar kleinere

Moleküle die Schutzschicht passieren können, jedoch keine Bakterien <sup>6</sup>. Zellen, die sich in Stadien zwischen Stammzellen und weiter differenzierten Zellen befinden, werden Transit amplifying-Vorläuferzellen genannt, welche pluripotent sind und nach einigen weiteren Zellteilungsschritten sich endgültig differenzieren <sup>7</sup>. Paneth Zellen hingegen differenzieren sich von den Transit amplifying-Vorläuferzellen abwärts und sind bei den Stammzellen zu finden <sup>8</sup>. Paneth Zellen sekretieren antimikrobielle Peptide und Proteine und basierend auf ihrer Lage zwischen den Stammzellen, schützen sie die Epithelzellerneuerungsprozesse <sup>9</sup>. Die Bindehautschicht, die sich unterhalb der Mukosa befindet, wird Submukosa genannt und beinhaltet Plexus submucosus, welches eine Anhäufung von Ganglien ist und von und von denen die Nervenfasern ausgeht. Unter dieser Schicht liegen weitere Muskelschichten (die zirkuläre und die longitudinale), die durch den Plexus myentericus getrennt sind. Beim Plexus myentericus handelt es sich ebenfalls um eine Anhäufung von Ganglien und Nervenfasern. Die beiden Muskelschichten sind vonnöten, um ein Zusammenziehen in die beiden verschiedenen Richtungen zu ermöglichen und die Nahrung zu transportieren. Die äußerste Schicht des Dickdarms bildet die Serosa, diese ist eine dünne Schicht des Bindegewebes. Die Blutversorgung in allen Bereichen ist durch Blutgefäße gesichert, die sich durch alle Schichten hindurch ziehen <sup>10</sup> (Abbildung 1.1b).



**Abbildung 1.1: Genereller Dickdarmaufbau. a)** Aufbau des Dickdarms in die verschiedenen Regionen (Blinddarm, aufsteigender-, querverlaufender, absteigender Dickdarm, Sigmoid und Mastdarm. **b)** Aufbau der Darmzotten und der Einbuchtungen (Krypten). Die spezifischen Zelltypen sind dargestellt, sowie die verschiedenen Schichten.

## 1.2 Pathogenese von Kolorektal Karzinomen

Kolorektal Karzinomen („colorectal carcinoma“ - CRC) ist die am dritthäufigsten auftretende Krebsart bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen weltweit, mit insgesamt fast 1.4 Millionen neuen Fällen diagnostiziert im Jahr 2012. Darüber hinaus sind im Jahr 2012 etwa 694.000 Menschen an CRC gestorben, was die Krankheit zur vierthäufigsten Todesursache weltweit macht. Ungefähr 95% der diagnostizierten CRC Fälle sind Adenokarzinomen <sup>11</sup>.

### 1.2.1 Krankheitsablauf

Meistens beginnt der Krebs in der Innenseite des Dick- und Mastdarms als Polypen und vergrößert sich über die Zeit und wächst zu einem Tumor heran, was mehrere Jahre dauern kann <sup>12</sup>. Je nach der Stufe des Tumors kann man diesen anhand der UICC-Klassifizierung in vier Hauptstadien (I-IV) einteilen. Tumore im Stadium I-II haben einen Primärtumor, jedoch keine Metastasen oder Lymphknoten Befall. Tumore im Stadium III haben zusätzlich zum Primärtumor noch betroffene Lymphknoten, während Stadium IV Tumore zusätzlich in andere Organe metastasiert haben <sup>13</sup>. In frühen Stadien (I-II) verursacht der Tumor keine Symptome und dies macht die CRC-Erkrankung so gefährlich, da so der Tumor unbemerkt wachsen kann. Die klinischen Symptome treten somit erst auf. Wenn der Tumor fortgeschritten ist und die Lymphknoten befallen bzw. Metastasen sich gebildet haben. Einige solcher Symptome sind beispielsweise die Veränderung des Stuhlgangs (sowohl Durchfall als auch Verstopfungen), was auch mit Schmerzen verbunden sein kann. Mit der Zeit verlieren Patienten auch Blut und dies führt zu Müdigkeit und Erschöpfung. Unerklärlicher Gewichtsverlust ist ein weiteres mögliches Symptom <sup>14</sup>. Tumore im Stadium I haben eine ~90% 5-Jahres-Überlebensrate, dies fällt jedoch stark bis auf eine ~10% 5-Jahres-Überlebensrate in Stadien IV Tumore <sup>15</sup>.

## 1.2.2 Medikation

Die Medikation von CRC erkrankten Patienten hängt von dem Stadium des Tumors zur Zeit der Diagnose ab. In frühen Stadien, wenn noch keine weiteren Organe befallen sind, kann der Tumor in den meisten Fällen operativ entfernt werden. Um einen Rückfall zu vermeiden, schließt sich der Operation eine Bestrahlung/Chemotherapie an. Dabei sollten Krebszellen, die nicht operativ entfernt wurden, abgetötet werden und ein erneutes Ausbreiten des Tumors verhindert werden. Wie schon oben erwähnt, sinkt die Heilung mit dem Metastasieren des Tumors drastisch. Hierbei werden sowohl der Primärtumor als auch die Metastasen operativ entfernt, wohingegen bei einer Chemo- und Strahlentherapie versucht wird die Tumorreste abzutöten<sup>16,17</sup>. Zusätzlich zu diesen beiden Therapie-Möglichkeiten werden häufig gezielte Krebstherapien angewandt. Die Wirkstoffe setzen anders als bei der Chemo/Strahlungstherapie auf Zellebene an und sind zielgerichtet auf molekulare Veränderungen des Tumors. Genetische Biomarker oder Veränderungen der Genexpression sind solche Trigger, da diese Therapien sich von Tumor zu Tumor und von Person zu Person unterscheiden, wird es oft personalisierte Therapie genannt. Im besten Fall wird vor der Behandlung auf einige Biomarker getestet, und basierend auf dem genetischen Profil die gezielte Therapie ausgewählt<sup>18</sup>. Hier werden verschiedene Ansätze verfolgt, eine Möglichkeit sind Angiogenese-Inhibitoren, diese unterdrücken die Neubildung von Blutgefäßen und stoppen somit das Wachstum des Tumors, da Nährstoffe fehlen<sup>19</sup>. Angiogenese wirkt wie folgt, Signalmoleküle (zum Beispiel vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor („vascular endothelial growth factor“ – VEGF) oder andere endotheliale Wachstumsfaktoren binden an Rezeptoren von Endothelial Zellen und dies löst in der Zelle Reaktionen aus, die in weiteren Schritten neue Blutgefäße bilden. Angiogenese Inhibitoren stören diese Schritte, ein Beispiel ist Avastin, welches ein monoklonal Antikörper ist und spezifische an VEGF bindet Dies hat zur Folge, dass VEGF gebunden ist und somit den Rezeptoren nicht mehr zu Verfügung steht<sup>20,21</sup>. Ein anderer Ansatz ist die Inhibition des epidermalen Wachstumsrezeptors („epidermal growth factor receptor“- EGFR) -Signalweges. Ein Beispiel dafür ist Cetuximab, ein Antikörper gegen *EGFR*. Dies verhindert, dass ein Ligand bindet und somit wird die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin Kinase blockiert. Für die Tumorzellen hat das zur Folge, dass keine Zell-Proliferation stattfindet Im Falle von Cetuximab bindet der Antikörper an die externe Domäne von *EGFR* und der Rezeptor wird internalisiert und teilweise degradiert, dies zusammen führt zu einer Runterregulierung des Rezeptors<sup>22</sup>. Diese Methode wird aber nur bei Tumoren angewandt, die keine Mutation in *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* oder *PIK3CA* haben, da diese Gene Downstream vom EGFR-Signalweg wirken und Mutationen die

therapeutische Leistung verringern und somit Tumore mit der Mutation nicht auf die Behandlung ansprechen <sup>23-25</sup>.

### 1.2.3 Prozesse zur Tumorentstehung und Metastasierung

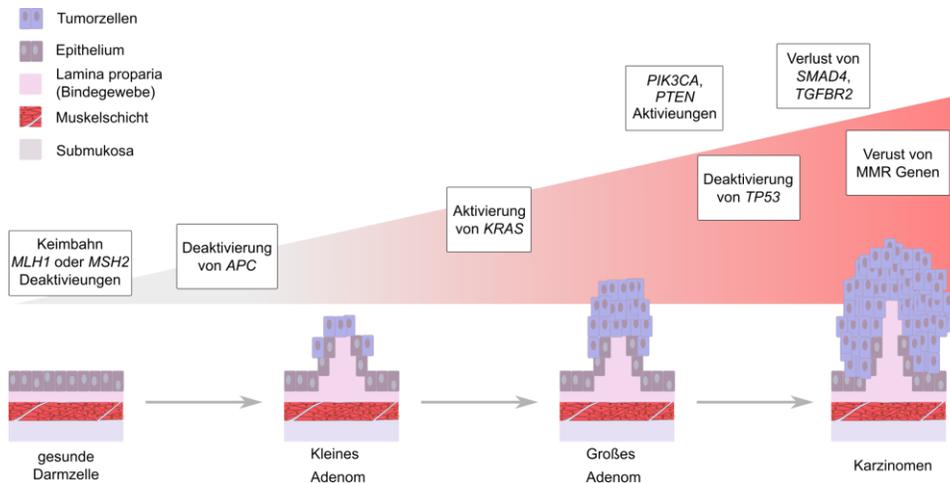
Es gibt eine Krebs-assoziierte Stammzell Hypothese, die besagt, dass das Tumorwachstum von Zellen mit Stammzellähnlichen Eigenschaften ausgeht. Diese Zellen haben die Kontrolle über die Replikation und Differenzierung verloren und teilen sich ohne Pause <sup>8,26</sup>. Dies führt bei vielen Zellen zu Stammzell-Ähnlichkeiten und durch den Kontrollverlust häufen sich Mutationen an <sup>27</sup>. Dabei sind *OCT4*, *SOX2* und *NANOG* wichtige Stammzell-Marker, da sie eine Rolle in der Regulierung der Pluripotenz innehaben und zudem sind alle drei Transkriptionsfaktoren, die sich selbst regulieren können <sup>28</sup>. Andere Stammzell-Gene die CRC relevant sind *LGR5*, *ASCL2* und *BMI1* <sup>29,30</sup>. Dabei sind zusätzlich zu den drei oben genannten Genen *MYC* und *KLF4* Marker für die Pluripotenz <sup>31</sup>. In den Stammzellen ist das Gen *SOX9* von besonderem Interesse, da es in der Zelldifferenzierung in den intestinalen Stammzellen mitwirkt <sup>32</sup>.

Für die Metastasierung von Tumorzellen dahingegen, ist die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von großem Interesse, ein Prozess der sonst in der Embryogenese abläuft <sup>33</sup>. Bei diesem Prozess verlieren Epithelialzellen ihre Zell Polarität und Adhäsion und ändern ihren Phänotypen dahingegen und werden mesenchymale Stammzellen. Mesenchymale Zellen können wandern, invadieren und sind weniger anfällig für Apoptose <sup>26,34</sup>. EMT Gene sind Gene, die Charakteristisch sind für den Epithelial oder Mesenchymalen Phänotypen einer Zelle. Während der Transition werden Zellverbindungs-Proteine runterreguliert, nennenswert sind E-Cadherin, Caudins und Occludins. Zeitgleich werden Gene aktiviert, die die mesenchymalen Adhäsion einleiten, wie Vimentin, Fibronectin und N-Cadherin) <sup>35</sup>. Dabei ist der Verlust von E-Cadherin, das prominente Protein der EMT, durch verschiedene Events möglich, einmal transkriptionelle Unterdrückung, Promotor Methylierung oder Protein Phosphorylierung und Degradation <sup>36-38</sup>. Zudem konnte ein Verlust von E-Cadherin mit einer schlechteren Prognose in CRC-Tumoren des Stadium III korreliert werden <sup>39</sup>. Daneben konnten auch eine zu hohe Expression von Fibronectin und N-Cadherin, beides mesenchymal Marker, auch mit einer schlechteren Prognose korreliert werden <sup>40,41</sup>. Man kann die EMT hauptsächlich durch drei Transkriptionsfaktor-Familien aktivieren: SNAIL-Familie, ZEB-Familie und TWIST-Familie <sup>35</sup>. Darüber hinaus konnte die Stammzellmarker *OCT4* und *SOX2* im Zusammenhang mit EMT und der Metastasierung gefunden werden. Dabei konnte die *OCT4*-Expression in einer Studie in Zellen, die den Switch von EMT vornehmen gefunden werden <sup>42</sup>. *SOX2* Expression hingegen konnte in CRC mit Metastasierung und Infiltration von Lymphknoten korreliert werden <sup>43</sup>.

#### 1.2.4 Molekulare Eigenschaften

Auf der molekularen Ebene ist CRC eine heterogene und komplexe Krankheit und kann, basierend auf verschiedenen molekularen Signalen und pathologischen Befunden, in einzelne Gruppen eingeteilt werden. Das häufigste auftretende Phänomen, genauer gesagt in ca. 85% der Fälle, ist die chromosomale Instabilität (CIN), gefolgt vom CpG-Insel-Methylator-Phänotyp („CpG island methylator phenotype“-CIMP) und der sporadisch auftretenden Mikrosatelliten Instabilität (MSI) <sup>44</sup>. CIN, hat zur Folge, dass die Tumore ganze oder große Regionen von Chromosomen verlieren oder dazugewinnen. Dies resultiert in einer unausgeglichene Anzahl an Chromosomen (Aneuploidie) und kann zudem zum Verlust von Heterozygotität („loss of heterozygosity“ - LOH) führen, wo im einfachsten Fall eine Deletion stattfindet. Es können aber auch mehrere Kopien von dem gleichen Chromosom vorliegen, dies nennt man Kopieranzahl neutrale LOH („copy number neutral LOH“) <sup>38,45</sup>. Der Ursprung dieses Phänotyps sind Defekte in Signalwegen, die die Chromosomen-Segregation betreffen, vor allem hat die Ausbildung des mitotischen Spindelapparats eine Schlüsselfunktion inne. Wenn dieser Signalweg gestört wird, gibt es keine genaue Auftrennung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen und somit entsteht eine Aneuploidie <sup>46</sup>. Ein anderer Phänotyp ist CIMP, die so genannten CpG-Inseln sind Sequenzabschnitte, die viele CpG Dinukleotide vorweisen; diese werden häufig am 5' Ende der Gene gefunden <sup>47</sup>. Charakteristisch für den CIMP Phänotyp ist eine hohe Hypermethylierung der CpG-Inseln. Methylierungen sind in der Tumorbilogie ein alternativer Mechanismus zur Gen-Deaktivierung <sup>48</sup>. Besonders kritisch wird es, wenn Tumorsuppressorgene methyliert sind, ein häufiges Beispiel dafür sind *MGMT* und *MLH1*, welche in den meisten Fällen keine Mutation im Gen haben, aber trotzdem nicht exprimiert sind <sup>44,49</sup>. MSI-Tumore bilden eine weitere Kategorie an CRC-Subtypen, der Phänotyp wird durch Veränderungen in der Sequenz von Desoxyribonukleinsäure (DNA) Reparatur Gene verursacht und dadurch akkumulieren sich Mutationen und es entsteht ein hypermutierter Phänotyp. Ca. 15% der CRC-Tumore sind MSI-positiv <sup>50</sup>. Um den MSI-Status zu identifizieren, empfiehlt das National Cancer Institute fünf Marker Regionen auf Mutationen zu testen, darunter zwei Mononucleotide Loci (BAT25 and BAT26) und drei Dinukleotide Loci (D2S123, D5S346, und D17S250). Falls einer dieser Regionen positiv ist, so wird davon ausgegangen, dass der Tumor MSI-positiv ist <sup>51</sup>. Zudem kann man MSI-Tumore durch die Keimbahnmutationen in den DNA-Mismatch-Reparatur Signalwegen identifizieren, besonders häufig sind es *MLH1* und *MSH2*, aber auch *MLH3*, *MSH3*, *MSH6* und *PMS2* sind nennenswert und treten in 3.6% der Fälle auf <sup>51-53</sup>. Es konnte auch eine zusätzliche Methylierungen von *MLH1* als Indikator für MSI-Tumoren identifiziert werden <sup>52</sup>.

Die genetische Entwicklung einer normalen Darmzelle zu einem Karzinom, läuft in mehreren Stufen ab und ein vereinfachtes Modell ist in Abbildung 1.2 gezeigt. Es kann auf drei Hauptaktivitäten runter gebrochen werden und zwar beginnt die Tumorentwicklung mit einer ersten Mutation in dem Onkogen *APC* und eine darauffolgende Aktivierungen vom Onkogen *KRAS*, und als letztes, einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *TP53* bzw. die Deaktivierung von den sogenannten Reparatur-Gene („Mismatch-repair genes“ – MMR Gene) als die drei treibenden genomischen Veränderungen (Abbildung 1.2) <sup>54</sup>. Mutationen in *APC*, aktivieren den WNT Signalweg, sodass mehr  $\beta$ -Catenin vorhanden ist, was wiederum in den Zellkern wandert und dort weitere Onkogene aktiviert. *APC* Inaktivierungen können sowohl Keimbahn als auch somatische Mutationen sein. Jedoch tritt in 72% der Tumore eine somatische Mutation auf, zudem ist *APC* in 75% der Fälle zusätzlich in einer LOH Region, was zur Folge hat, dass die Mutation homozygot vorliegt. Nichtsdestotrotz ist für die Entwicklung des Tumors kein vollständiger Verlust von *APC* notwendig <sup>55</sup>. Es wurde gezeigt, dass es auch Tumore gibt, die eine Mutation in andere Genen, die den WNT Signalweg unterbrechen (anstatt *APC*), haben können <sup>56</sup>. Zudem sind in 10% der Tumore Genfusionen in der R-spondin Familie (*RSPO2* und *RSPO3*) gefunden worden. Dabei sind *APC* Mutationen und *RSPO*-Fusionen einander ausschließend, dies könnte durch eine ähnliche Rolle in der Aktivierung des WNT Signalweges geschuldet sein <sup>57</sup>. *KRAS*-Aktivierung findet bei 30-40% der Patienten ausschließlich durch Punktmutationen in Kodon 12 und 13 im Exon 1 statt. Der RAS Signalweg wird somit verstärkt aktiviert und aktiviert darüber hinaus den MAPK/ERK-Signalwege. Es können weitere Mutationen hinzukommen, oder auch *KRAS*-Mutationen ersetzen, die diese Signalwege aktivieren. Ein Beispiel sind Mutationen in anderen *RAS/RAF*-Genen, zum Beispiel *BRAF* oder auch *PTEN*, *PIK3CA* <sup>33,44</sup>. Veränderungen in *TP53* sind in vielen verschiedenen Krebs-Erkrankungen von Bedeutung. Sowohl eine Aktivierung, die zur Folge hat, dass NF- $\kappa$ B angeregt wird und Inflammationsmechanismen ansteigen, als auch eine Inaktivierung, die folglich Funktionen wie Zell-Zyklus Pause, DNA Reparatur-Mechanismen und Apoptose missreguliert. Dies geschieht, da das mutierte *TP53* Protein nicht mehr richtig an die DNA binden kann und somit die Ziel-Gene nicht regulieren kann <sup>58</sup>.



**Abbildung 1.2 Vereinfachtes Modell der genetischen Entwicklung von der gesunden Darmzelle zum Kolorektal Karzinomen.** MSI positiven Tumore zeigen Keimbahnmutationen in *MLH1* oder *MSH2* und treten daher sehr früh in der Entwicklung auf. Die eigentliche Tumorentwicklung beginnt mit einer initialen Deaktivierung von *APC*, was zu einem kleinen Adenom führt. Eine Aktivierung von *KRAS*, führt zu einem großen Adenom und letztendlich durch Deaktivierungen in *TP53*, *SMAD4*, *TGFBR2* oder den MMR-Genen, sowie aktivierende Veränderungen in *PIK3CA* und *PTEN* bildet sich das eigentliche Karzinom.

Das Cancer Genome Atlas Projekt hat sich dem Ziel gewidmet das genetische Profil von 34 verschiedenen Krebs-Typen zu bestimmen und diese Analysen wurden auch für CRC durchgeführt. Von den 32 fehlen noch 3 Krebs-Typen, um das Projekt abzuschließen<sup>59</sup>. Für CRC wurden zunächst Die Darm-Proben mit den Rektum-Proben verglichen und es konnte keine Aufteilung nach den beiden Kriterien in den Analysen gefunden werden, sodass Darm und Rektum zusammen betrachtet wurden<sup>52</sup>. Es wurden 32 somatische Mutationen wiederholend in der Kohorte gefunden, 15 in den hypermutierten und 17 in den nicht-hypermutierten Proben. Von besonderem Interesse sind die oben beschriebenen Mutationen in *APC*, *KRAS* und *TP53*, darüber hinaus wurden *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *TCF7L2*, *CTNNB1*, *SMAD2*, *FAM123B*, *SOX9* und *NRAS* identifiziert. Interessanterweise sind *TP53* und *APC* deutlich weniger mutiert in den hypermutierten Tumoren. Chromosomale Änderungen wurden in der Studie auch untersucht und zu den bekannten Zugewinnen von Chromosom 1q, 7, 8, 12q, 13q, 19q und 20<sup>52,60</sup> und Verluste von Chromosom 18 (beinhaltet *SMAD4*) und 17 (somit auch *TP53*)<sup>46,52</sup>, konnten andere signifikante Verluste auf Chromosomen: 1p, 4q, 5q, 8p, 14q, 15q, 20p und 22q identifiziert werden. Zudem wurden neue Therapierelevante Amplifikationen in *ERBB2* und *IGF2* identifiziert<sup>52</sup>.

### 1.2.5 Signalwege die in CRC betroffen sind

Im folgenden Abschnitt sind die wichtigsten CRC-relevanten Signalwege aufgelistet

#### **WNT Signalweg**

In Krebserkrankungen wird eine Fehlfunktion im WNT Signalweg meist durch die *APC* Mutation ausgelöst, durch die Inaktivierung von *APC* wird  $\beta$ -Catenin nicht richtig degradiert.  $\beta$ -Catenin wird vermehrt in den Nukleus transportiert und führt zusammen mit den Transkriptionsfaktoren *LEF1*, *TCF1*, *TCF2* oder *TCF3* zur Expression von unter anderem dem Onkogen *MYC*, *CCND1*, *MMP7*, und *ITF2*. Neben *APC* hat die TCGA CRC Studie (vom Cancer Genome Atlas Projekt) auch Funktionsverlustmutationen in *FAM123B* als eine wiederkehrende Veränderung identifiziert<sup>52</sup>. *FAM123B* ist ein negativer Regulator des WNT Signalweges, indem es die  $\beta$ -Catenin Ubiquitinierung und Degradierung befördert<sup>61</sup>. Die betroffenen Gene sind sowohl für die initiale Tumorentwicklung als auch das Tumorstadium wichtig, dabei spielen die Gene eine Rolle im Zell-Zyklus Progression, Zellproliferation, Angiogenese und Apoptose<sup>9,62</sup>. Darüber hinaus reguliert der Signalweg auch die Stammzell-Pluripotenz und die Entscheidung über das Zellschicksal während der Entwicklung<sup>63</sup>.

#### **RAS/MAPK Signalweg**

Der Schritt von einem Adenom zu einem Karzinom ist bei CRC meist ausgelöst durch eine *KRAS* Mutation. Dementsprechend sind aktivierende *KRAS* Mutationen ein frühes Ereignis in der Tumorentwicklung<sup>64</sup>. *KRAS* ist ein Onkogen und kodiert für eine GTPase Protein, welches wiederum über mehrere Schritte inaktiviert. Genauer wird zunächst RAF aktiviert welches das aktivierte RAS (RAS-GTP) und die RAF Proteine: c-RAF1, BRAF und ARAF bindet. Darauf folgt eine Phosphorylierung von den Kinasen MEK1 und 2, die im nächsten Schritt *ERK1* und *ERK2*, beides Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), phosphorylieren. *ERK1* und 2 können somit in den Zellkern gelangen und weitere Geneexpressionen veranlassen. Im Ganzen werden transkriptionelle Regulatoren aktiviert, die in der Regulation des Zell-Zyklus eine Rolle spielen und daher hat die Tumorzelle einen Wachstumsvorteil. Andere *RAS* Gene, die häufiger mutiert sind, sind *NRAS* oder auch *HRAS*<sup>65,66</sup>. Neben *RAS*-Mutationen ist eine Veränderung von *BRAF* auch verantwortlich für eine erhöhte MAPK Aktivität<sup>67</sup>. Darüber hinaus findet man erhöht *BRAF* Mutationen in sporadischen MSI Tumoren<sup>68</sup>. Unabhängig vom MAPK-Signalweg kann *RAS* auch weitere Signalwege aktivieren, darunter auch den PI3K/AKT Signalweg<sup>66</sup>, welches im nächsten Abschnitt näher beschrieben wird.

## PI3K/Akt Signalweg

Der erste Schritt in diesem Signalweg ist die Umwandlung von *PIP2* zu *PIP3*, entweder durch die Rezeptor-Tyrosin Kinasen (RTKs) oder der Aktivierung durch *RAS* Gene. *PIP3* rekrutiert das Downstream liegende *AKT* und *PDK1*, beides Serin-Threonin Kinasen <sup>69</sup>. Zu einer vollen Aktivierung von *AKT* werden zwei Phosphorylierungen benötigt, die erste wird durch *PDK1* am Threonin 308 ausgelöst und eine zweite zusätzliche am Serin 473 führt zu einer kompletten Aktivierung. Aktives Akt reguliert Proteine, die in krankheitsrelevanten Prozessen beteiligt sind, wie zum Beispiel: Zellproliferation oder Zellwachstum. Im gesunden System ist die Menge an *PIP3* streng reguliert, durch die Phosphatase *PTEN*, welches *PIP3* zu *PIP2* zurück umwandelt und somit den PI3K Signalweg beendet. Aus diesem Grund ist eine Veränderung von *PTEN* im Kontext von Krebs von Bedeutung <sup>69,70</sup>. Die Hyperaktivierung des PI3K-Akt Signalweges ist in vielen verschiedenen Krebsarten gefunden <sup>71</sup>.

## mTOR Signalweg

Ein Downstream Effektor vom PI3K/AKT Signalweg ist *mTOR*, welches ein PI3K assoziiert Proteinkinase ist, da der C-Terminus und die katalytische Domäne von PI3K starke Homologien zeigen <sup>72</sup>. Es gibt zwei mTOR-Komplexe (mTORC1 und 2), welche stark konserviert sind und in der Hefe bis hin zu Säugetieren vorkommen <sup>73</sup>. Beide Komplexe beinhalten ihre eigenen Proteine, die mit *mTOR* interagieren können. Dabei ist Hauptfunktion von mTORC1 Zellwachstum, Proliferation und Überleben zu regulieren <sup>74,75</sup>. Dahingegen reguliert mTORC2 das Aktin-Zytoskelett und moduliert Zellüberleben indem es Akt phosphoryliert <sup>75,76</sup>.

## EGFR Signalweg

Der EGFR Signalweg besteht aus einer Familie von RTK und ist in verschiedenen Krebsarten exprimiert. Im Kontext von Krebs werden Wachstum, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Überleben der Tumorzellen reguliert. Basierend auf dieser vielfältigen Rolle in der Erkrankung sind *EGFR* und Mitglieder des Signalweges interessante Kandidaten von Anti-Krebstherapien <sup>77,78</sup>. Neben *EGFR* sind noch drei weitere Mitglieder der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinase Familie zu benennen: *ERBB2*, *ERBB3* und *ERBB4* <sup>79</sup>. Mitglieder der ErbB Familien können entweder durch eine Überexpression vom Rezeptor oder durch Liganden aktiviert werden. Wenn einer der Liganden bindet entsteht eine Strukturänderung, welche weitere Modifikationen zu lässt <sup>80</sup>. Eine Liganden unabhängige Aktivierung erfolgt durch Deletionen in den Genen in der Extrazellulären Domäne. Die Aktivierung erlaubt eine Strukturänderung, sodass Proteine an die

Phosphotyrosin-Rückstände binden können, dies löst intrazelluläre Signalwege aus und aktiviert somit verschiedene andere Signalwege. Darunter fallen RAS- und der PI3K-Signalweg <sup>78</sup>.

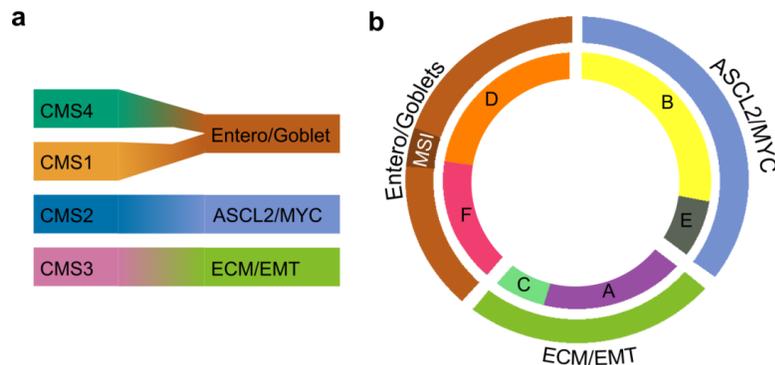
## **TGFβ Signalweg**

Gene der TGFβ-Familie haben viele verschiedene Funktionen, die Krankheitsrelevant sind. Darunter sind die Regulierung von Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Apoptose und Immun Antworten <sup>81</sup>. Dementsprechend sind Fehlfunktionen in Genen dieser Familie besonders kritisch in der Tumorentwicklung sowie die Metastasierung. Das Level an TGFβ und die Auswirkungen für den Patienten sind zweigeteilt, in frühen Stadien ist ein erhöhtes Level von Vorteil, jedoch mit ansteigendem Stadium wird ein hohes Level von TGFβ mit einem aggressiveren Tumor und schlechteren Überlebensraten im Patienten korreliert <sup>82,83</sup>. Dies ist zu erklären mit der Funktion von Genen im TGFβ-Signalweg, in früheren Stadien werden Zell-Zyklus Arrest und Apoptose gefördert <sup>84,85</sup>, wo hingehend aggressivere Tumore den TGFβ-Signalweg für die Entwicklung und Metastasierung nutzen <sup>84,86</sup>. Diese gegensätzlichen Funktionen von TGFβ wird auch als „TGFβ Paradox“ bezeichnet <sup>87</sup>. Einer der ersten genetischen Veränderungen im TGFβ-Signalweg ist das Inaktivieren von *TGFBR1/2* oder *SMAD2/4* <sup>81</sup>. Aber nicht nur die Gene die direkt betroffen sind, sind wichtig im Hinblick auf den Tumor. Auch die Effekte in der Tumormikroumgebung sind von Bedeutung, denn es sind neben den Tumorzellen auch andere Zellen innerhalb der Tumormasse zu finden. Diese exprimieren Gene des TGFβ-Signalwegs und beeinflussen somit die Umgebung <sup>88</sup>.

### **1.2.6 Transkriptomische Klassifizierung der Tumore**

Basierend auf den Transkriptom-Daten, konnten CRC-Tumore in verschiedene molekulare Gruppen aufgeteilt werden. Verschiedene Ansätze zeigten verschiedene, aber teils auch ähnliche, Aufteilungen <sup>89-93</sup>. Im Jahr 2015 hat sich das „CRC Subtyping Consortium“ gebildet und kombinierte sechs Klassifizierungen zusammen in eine gemeinsame. Diese Typisierung teilt CRC Tumore in vier Gruppen ein, CMS1 (MSI und Immungruppe), CMS2 (kanonische Gruppe), CMS3 (metabolische Gruppe) und CMS4 (mesenchymale Gruppe). Mit den verschiedenen Subtypen wurden auch molekulare Eigenschaften assoziiert, wie eine erhöhte *BRAF* Mutationsrate in CMS1 Tumoren, hohe *WNT* und *MYC* Aktivität in CMS2, *KRAS* Mutationen in CMS3 und Stroma-Infiltration in CMS4 <sup>94</sup>. Im Jahr 2017 hat das OncoTrack Konsortium eine weitere Klassifizierung publiziert, diese bildet den Vorteil, dass die Subgruppen mit detaillierten molekularen Eigenschaften und Medikamentensensitivität korreliert wurden. Diese Klassifizierung nutzt die Information von 22 publizierten und 16 eigenen Signaturen für die

Aufteilung der Tumore in die molekularen Gruppen. Zusätzlich zu der Klassifizierung der Tumore, wurden die Gene der 16 eigenen Signaturen funktional annotiert und die molekularen Gruppen dementsprechend benannt, es ergibt sich somit eine Benennung als: I) ASCL2/MYC mit erhöhter Expression von *ASCL2*, dem Hauptregulator der Krypten-Stammzellen; II) Entero/Goblets mit Merkmalen von epithelialen Enterozyten, Enteroendokrinen und Becherzellen; sowie III) ECM/EMT mit hochaktiven TGF $\beta$ - und Sonic Hedgehog-Signalwegen, die auch EMT zeigen. Zudem zeigt diese Gruppe viele Signale der Extrazellulären Matrix („extra cellular matrix“-ECM). In der CMS Einteilung bilden MSI-Tumore eine eigene Gruppe, welche bei der OncoTrack Klassifizierung in die Entero/Goblet Gruppe fallen. Die OncoTrack-Gruppen stimmen im Wesentlichen mit den CMS-Gruppierungen überein hierbei korrespondieren ASCL2/MYC Gruppe zu CMS2, die ECM/EMT zu CMS3 und die Entero/Goblet Gruppe teilt sich in zwei CMS Gruppen auf, einmal in CMS1, welche die MSI positiven Tumore sind, und einmal in CMS4. Um die biologische Funktion der Gruppen und auch Unterschiede der Gruppen zueinander und feinere Unterschiede innerhalb einer Gruppe zu beschreiben, wurden die Hauptgruppen in jeweils zwei Subgruppen (A-F) aufgeteilt <sup>93</sup> (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3 Klassifizierung von Kolorektal Karzinomen in distinkte molekulare Gruppen.** a) CMS1-4 Einteilung der Tumore und die korrespondierenden 3 Hauptgruppen von OncoTrack (ASCL2/MYC, Entero/Goblet und ECM/EMT). b) Die OncoTrack-Einteilung und die spezifische Aufteilung der Subgruppen (A-F). Die MSI-Tumore fallen in die Entero/Goblet-Gruppen und sind separat markiert.

### 1.2.5 Multiple primäre Kolorektal Karzinomen

In wenigen Fällen können mehr als nur ein Primärtumor in einer Person entstehen, falls diese simultan entdeckt werden spricht man von synchronen Tumoren und falls diese nacheinander entstehen von metachronen Tumoren. Die Prävalenz von synchronen Tumoren wurde in einer Studie mit 5346 Patienten auf ~2% und die von metachronen Tumoren auf ~1% eingeschätzt <sup>95</sup>. Die Behandlung solcher Tumore ist ähnlich wie bei solitären Tumoren eine operative Entfernung. Hierbei ist empfohlen eine erweiterte Resektion, wobei nahe Regionen und zum Teil auch die lokalen Lymphknoten entnommen werden. Somit wird sichergestellt, dass der Patient nicht mit einem fortgeschrittenen Tumor in naher Zukunft nochmals operiert werden muss und letztlich eine schlechtere Prognose hat <sup>96</sup>. Die Tumore sind genetisch unabhängig entstanden und teilen somit keine genetischen Veränderungen. Es ist bekannt, dass Patienten, die an Lynch-Syndromen, welches durch einen vererbten Defekt in den Reparaturmechanismen gekennzeichnet ist <sup>53</sup>, oder an familiärer adenomatöser Polyposis, welche durch eine Keimbahnmutation in *APC* charakterisiert sind <sup>97</sup>, leiden, eine höhere Wahrscheinlichkeit haben mehrere Tumore zu bilden <sup>98,99</sup>. Zudem befürworten auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und die Erkrankung hyperplastischer Polypen synchrone Tumore <sup>100</sup>. Jedoch kann man so nur 10% der Fälle erklären <sup>99</sup>. Es gibt aber auch molekulare Prädispositionen, die mit dem Entstehen von synchronen Tumoren korrelieren. Hohe Methylierungen von CpG Inseln zum Beispiel treten wiederholt auf <sup>101,102</sup>. Eine Studie von Cereda et al. (2016) hat das Genom von 20 Tumoren von 10 Patienten analysiert, um Merkmale von synchronen Tumoren zu finden. Damit konnte gezeigt werden, dass synchrone Tumore genetisch unabhängig sind und zudem sehr heterogene Tumore. Sie konnten darüber hinaus Keimbahn-Mutationen in Immunbezogenen Genen als Prädisposition identifizieren, die das Entstehen voneinander unabhängiger Tumore begünstigt. Diese Mutationen führen zu einer erhöhten inflammatorischen Umgebung, welches die Tumorgenese antreibt <sup>103</sup>.

## 1.3 Präklinische Modelle

Präklinische Modelle sind ein essentieller Teil der Krebsforschung im Allgemeinen. Man nutzt diese einerseits um die Krankheiten an sich zu verstehen als auch für die Entwicklung neuer Medikations- und Therapiemöglichkeiten <sup>104,105</sup>.

### 1.3.1 Zellkulturmodelle

Zellkulturmodelle bieten den Vorteil, eine höhere Durchsatz an Experimenten zu ermöglichen als *in vivo* Mausmodelle. Man kann Zellkultur-Screens in Hochdurchsatz-Methoden anwenden und kostengünstiger mehr Ansätze testen. Solche Ansätze gibt es in 2D-Monolayer und 3D Sphäroide <sup>106</sup>.

#### 2D-Modelle

Unsterbliche Krebszelllinien sind eine einfach zu benutzende und häufig genutzte Methode in der Krebsforschung. Jedoch spiegeln diese Zelllinien nicht die Diversität und Heterogenität eines echten Tumors wider. Zudem häufen sich genetische Veränderungen an, die sich durch das viele passagieren ergeben <sup>107</sup>. Zusammen ergibt sich, dass sich solche Zelllinien nicht eignen, um klinische Korrelationen zu machen <sup>106,108,109</sup>.

Die Kulturen werden häufig mit Kollagen, Fibronectin, oder ähnlichen Komponenten vorgelegt, sodass die chemischen Voraussetzungen einer extrazellulären Matrix simuliert werden und die Zellen adhärent wachsen können. Die Zellen werden als Einzelzell-Suspension in die Petrischale, die mit einer der genannten Komponenten versetzt wurde, gegeben und wachsen in einer Monoschicht, ohne Gewebe spezifische Charakteristiken <sup>110</sup>.

#### 3D-Modelle

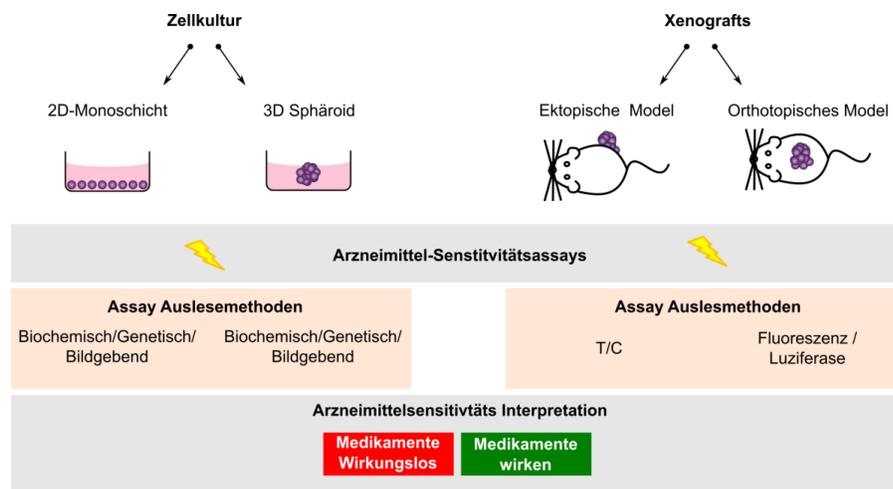
Verschiede Studien konnten zeigen, dass die Ergebnisse aus dem 2D Monoschicht Ansatz sich von den Ergebnissen der klinischen Studien grundlegend unterscheiden <sup>106,109,111</sup>. Dahingegen können 3D Zellkulturen eine Dimension mehr bieten und sind näher an dem eigentlichen Tumor im Menschen dran. Die Zell-Zell Interaktionen können in diesem Modell besser nachgestellt werden. Die räumliche Nähe der Zelle in einem 3D-Modell verändert auch das chemische Milieu und die physikalischen Kräfte, die auf die Zellen wirken. Im Vergleich zu den 2D Modellen sind Ergebnisse aus dem 3D Modell besser zu vergleichen mit dem eines echten Tumors in einem Menschen <sup>112</sup>.

Es gibt verschiedene Methoden 3D-Modelle zu erstellen. Besonders sind zwei Methoden zu nennen, einmal das Wachsen der Zellen in einem vorgegebenen Gerüst aus einer basalmembranartigen Matrix (zum Beispiel „Matrigel“). Dieses Gerüst bietet den Zellen Nährstoffe und hält die 3D-Form <sup>113</sup>. Diese Methode ist weitverbreitet und einfach zu nutzen. Die andere zu nennende Methode ist die sogenannte „hanging drop“-Methode, wo eine Zellsuspension in einen Tropfen gehalten wird und durch die Erdanziehungskraft sich die Zellen alle in einem 3D-Zellaggregat im unteren Teil des Tropfens sammeln und dort multizelluläre Sphäroide bilden. Die Sphäroide werden dann in eine Zellkulturschale runtergespült und können dort weiterwachsen und evtl. auch mit Medikamenten behandelt werden, um so das Zellwachstum zu beobachten. Der Vorteil zu der Matrigel-Methode ist, dass diese Methode ohne Zugabe von Kollagen oder ähnlichen ECM-imitierenden Materialien funktioniert und die Zellen nicht zusätzlichen künstlich hinzugegebenen Faktoren ausgeliefert sind <sup>114</sup>.

### 1.3.2 Xenograft

Mausmodelle sind eine Methode, um Tumor Mechanismen zu verstehen und dahingehend auch zur Medikamenten-Entwicklung. Um ein Abbild des humanen Krebses in einem lebenden Organismus untersuchen zu können. Für die Implantation der humanen Krebszellen oder Tumorgewebe werden athymischen Nacktmäuse („athymic nude mice“) und schwere kombinierte Immunschwäche (“severe combined immune deficiency” - SCID) Mäuse genutzt. Beide Maus-Stränge haben ein inhibiertes Immunsystem, sodass der Tumor bzw. die Krebszellen wachsen können. Die Mausmodelle werden dann Xenograft genannt <sup>115,116</sup>. Unabhängig von den injizierten Zelltypen unterscheidet man zwei verschiedene Xenograft-Modelle. Einmal das ektopische Xenograft Model, hierbei werden die Tumorzellen subkutan in das Hinterbein oder den Rücken des Tieres injiziert. Hierbei ist zu beachten, dass die Zellen aus dem regionalen Kontext heraus an einen anderen Ort gebracht werden. Die ektopische Methode ist die Standardmethode in der Krebsforschung, da es anschaulich die Tumorentwicklung im lebenden Modell zeigt und somit in Medikamenten-Studien die Antikrebs-Effizienz widerspiegeln kann. Dabei wird der T/C-Wert berechnet: Dieser gibt die Ratio von der Größe der Tumore in der behandelten Gruppe (T) in Hinblick auf die Größe der Tumore in der Kontrollgruppe (C) wieder <sup>60</sup>. Eine akkurates und der Realität im Menschen näherkommendes Model wäre ein orthotopisches Tumor Xenograft-Modell. Hier werden die Tumorzellen an den Ort des Tumor-Ursprunges implantiert <sup>116</sup>. Zum Beispiel werden Darmkrebszellen in den Darm der Maus eingesetzt, dies hat zur Folge, dass die Zellen in einer ähnlichen Umgebung wie der Tumor im

Menschen wachsen können und auch den Einflüssen und der molekularen Umgebung des Organes ausgesetzt sind. Diese Methode bietet viele Vorteile, vor allem im Hinblick auf dem Nachstellen der originalen Voraussetzungen, jedoch auch Nachteile in der Handhabung. Zum einem ist dies eine Operation, die Expertise voraussetzt, aber auch das Messen der Effektivität eines Medikamentes auf das Tumorwachstum ist schwierig, da der Tumor nicht sichtbar ist <sup>117,118</sup>. Es gibt Messungsansätze, die Zelllinien verwenden, die markiert sind (Fluoreszenz oder Luziferase). Diese kann man in einer Kernspintomographie oder Magnet Resonanz Tomographie entdecken und Rückschlüsse auf das Tumorwachstum ziehen <sup>119</sup>.



**Abbildung 1.4 Präklinische Modelle.** Es gibt zwei Modellsysteme: Zellkultur (links) und Xenograft-Mausmodelle (rechts). Die Zellkultur kann in einer 2D Monoschicht oder als 3D Sphäroid Modell erstellt werden und die Arzneimittelsensitivität kann mit verschiedenen Auslesemethoden bestimmt werden: biochemisch (Proteinmengen Bestimmung), genetisch (Genexpressions-Bestimmung) oder bildgebend (Fluoreszenzen oder mikroskopisch). Xenograften kann man als ektopisches oder orthotopisches Modell erstellen und entweder mit T/C (ektopisches) oder mittels Fluoreszenz/Luziferase (orthotopisches) auslesen. Die Daten werden analysiert und die Wirksamkeit der Arzneimittel wird bestimmt.

### 1.3.3 Patienten-abgeleitete Modelle

Da sich das molekulare Profil eines jeden Tumors unterscheidet, kann man ein Patient spezifisches Mausmodell, Patienten-abgeleitete Xenografts („patient-derived xenografts“ – PDX) oder Patienten-abgeleitete Organoide („patient-derived organoids“ – PDO) erstellen. Diese Modelle spiegeln die molekularen Eigenschaften des Tumors wieder, mit den spezifischen Tumormutationen und chromosomalen Veränderungen <sup>120</sup>. Aber hier muss man vorsichtig sein, denn es gibt Krebsarten wie akute lymphatische Leukämie, da spiegeln die Modelle das genetische Abbild des Tumors fast perfekt wider <sup>121</sup>, aber es gibt auch Patienten-abgeleiteten Modelle, die sich vom Tumor in einigen Faktoren unterscheiden <sup>122</sup>. Daher ist bei der Übersetzung und Weiterleitung aus Medikamenten-Untersuchungen in PDX und PDO Modellen zu Therapieansätzen bei Patienten Achtung geboten <sup>93,105</sup>.

## 1.4 Tumor Heterogenität

Tumor Heterogenität kann verschieden interpretiert werden, einmal in Inter-Tumorheterogenität, Unterschiede zwischen Tumore einer Art oder synchrone Tumore <sup>123</sup>, und auf der anderen Seite Intra-tumor Heterogenität (ITH), Unterschiede innerhalb eines Tumors. Inter-Tumor Heterogenität zeigt sich in den verschiedenen genetischen Profilen der Tumore, in den verschiedenen chromosomalen Unterschieden <sup>52</sup> oder auch in der Zusammensetzung der ECM <sup>124</sup>, aber auch in unterschiedlichen Entzündungs-Profilen von Tumoren. Zum Beispiel haben MSI Tumore eine hohe Infiltration von cytotoxischen T-Zellen und dies konnte positiv zum Patienten Überleben assoziierten werden, unabhängig vom MSI-Status <sup>125,126</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Unterschiede von Immunzellen im Tumor prognostische Marker für die Erkrankung darstellen können, dabei hat Galon et al. einen Immunscore entwickelt, der auf der Quantifizierung von T-Lymphozyten im Tumor basiert <sup>127</sup>. Und in den darauffolgenden Studien auch die klinische Signifikanz gezeigt <sup>128,129</sup>. Die ITH kann weiter in zwei Arten definiert werden. Einmal die räumlichen Unterschiede innerhalb eines Tumors („partial heterogeneity“) <sup>130</sup>, zum Beispiel durch das vorhanden sein von Subpopulationen an Tumorklone. Die zweite Art von ITH sind temporale Heterogenität, die eine zeitliche Entwicklung von dem genetischen Profil des Tumors, beschreibt. Das heißt der initiale Tumor hat ein anderes genetisches Profil als ein fortgeschrittener Tumor <sup>131</sup>. Genetische Diversität innerhalb eines Tumors in einem Patienten ist kein neues Phänomen und schon häufiger für verschiedene Krebsarten beschrieben worden <sup>132,133</sup>. Heterogenität beschränkt sich nicht nur auf Mutationen, sondern auch auf epigenetischen Veränderungen, DNA Methylierung, Chromatin Remodellierung <sup>134,135</sup>, transkriptomische

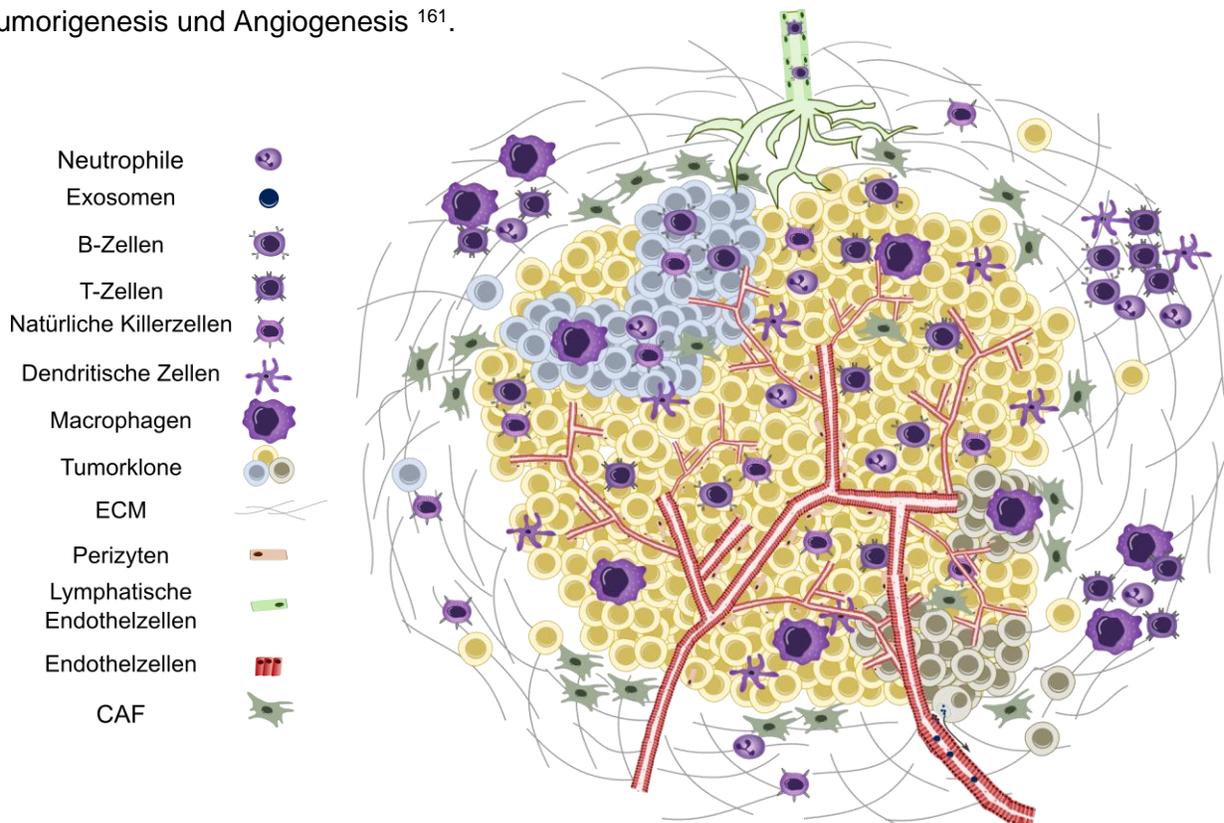
Veränderungen <sup>136</sup> oder auch Veränderung in den chromosomalen Kopierzahlen. Die ITH ermöglicht es, dass man anhand der genetischen Mutationen in den verschiedenen Subklonen des Tumors einen zeitlichen Ablauf der Veränderungen sehen kann, d.h. man startet mit den Treibermutationen und akkumuliert weitere Mutationen im Laufe der Zeit, die jedoch nicht in allen Klonen vertreten sind. Eine Studie die 9 verschiedene Krebsarten verglichen hat, konnte zeigen, dass es gehäuft subklone Mutationen im PI3K-Akt-mTor Signalweg gibt im Vergleich zum RAS-MAPK Signalweg <sup>137</sup>. Speziell im Falle von CRC gibt es ein „Big Bang“ Modell des Tumorwachstums, in welchem der Tumor sich aus der Ausbreitung vieler einzelner Klone zusammensetzt und somit aus einem Mix von vielen Subklonen besteht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die ITH von frühen Veränderungen getrieben wird und nicht von späten „clonal expansions“ <sup>138</sup>. Temporale ITH zeigt sich zum Beispiel zwischen Metastasen und Primärtumoren, dass Mutationen allein in dem Ursprungstumor bzw. in der Metastase gefunden werden können, somit können sich Tumorsubklone über die Zeit auch an verschiedenen Regionen im Körper weiterentwickeln <sup>132,139</sup>. Kim et al. haben im Jahr 2015 die ITH in fünf CRC-Patienten näher beschrieben, dabei wurden mehrere Regionen eines Tumors und der passenden Metastase mit Exom-Sequenzierung und Kopierzahlprofilen analysiert. Sie zeigte, dass ITH in den Tumoren vorhanden ist jedoch die Treibermutationen nicht davon betroffen sind und in allen Regionen zu finden sind <sup>140</sup>. Dagegen steht aber die Studie von Losi et al. im Jahr 2005 mit 45 Patienten die Unterschiede in *KRAS*, *TP53* und Verluste von Chromosom 18q innerhalb eines Tumors gezeigt haben <sup>122</sup>. Solche Multi-klonalen Tumore bzw. Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen, unterstützen Medikamentenresistenzen, wo ein Subklon auf das Medikament anspringt und verdrängt wird, ein anderes jedoch nicht. Solche Fälle führen meist zu einer Ausbreitung des resistenten Klons und somit in vielen Fällen zu einem schweren Rückfall <sup>132</sup>. Um dies vorzubeugen, muss die Tumor Heterogenität in die Entwicklung neuer Therapie-Möglichkeiten eingebunden werden <sup>123,132</sup>. Gezielte Medikamenten-Therapien greifen in bestimmten Prozessen (z. B. Proliferation) ein und blockieren diesen. Auch hier könnten evtl. Mutationen positiv für einige Subklone sein und somit die Therapie nur bedingt erfolgreich sein und auch mit Rückfällen der Krankheit enden <sup>141,142</sup>.

## 1.5 Tumormikroumgebung

Nicht nur die verschiedenen Tumorsubklone und die ITH bilden die Tumormasse aus, sondern auch die ganze Umgebung, in dem die Tumorklone wachsen. Die Wichtigkeit der Umgebung lässt sich auf die Theorie von Paget et al. von 1989 zurückführen, nach welcher ein Tumor nur

wachsen kann, wenn die Umgebung stimmt, die sogenannte „seed & soil“ Theorie <sup>143</sup>. Die Umgebung besteht aus nicht malignen Immunzellen, ECM, Fibroblasten, Blutgefäßen und anderen Zelltypen (Abbildung 1.5) <sup>144</sup>. Zudem ist mittlerweile klar, dass die Tumorzellen ohne die Umgebung nicht wachsen bzw. nicht überleben können. Man kann die Krebserkrankung nur im Ganzen verstehen und behandeln. Wenn man die Umgebung außer Acht lässt, ignoriert man einen wichtigen Teil der Krankheit <sup>133</sup>. Die Menge an nicht malignen Zellen innerhalb eines Tumors variiert von Tumor zu Tumor und zwischen den verschiedenen Arten. Aber der Tumor braucht eine gewisse Umgebung, allein der Nährstoffe wegen. Der Hauptbestandteil der Tumor Mikroumgebung („Tumor microenvironment“ -TME) ist die ECM, welche das Gerüst bildet mit Epithelial-, Endothelial- und Stroma-Zellen, die Matrix besteht aus Kollagen, Laminin, Fibronectin und Linker-Proteinen. Die ECM wird im Kontext von einem Tumor remodelliert und an den Tumorbedingungen angepasst, somit ändert sich die Architektur sowie die physikalischen Gegebenheiten des Tumors-ECM im Vergleich zum ECM des normalen gesunden Gewebes <sup>124</sup>. Des Weiteren benötigt der Tumor Blutgefäße, um wachsen zu können. Dafür gibt es Mechanismen, welche die Formation von neuen Gefäßen antreiben, so wie auch das Sekretieren von Wachstumsfaktoren <sup>145</sup>. Fibroblasten sind wichtig für die Kollagen und Proteoglykanen Bildung, welches die ECM stabilisieren. Im Tumorgewebe gibt es eine besondere Art von Fibroblasten, die Krebs-assoziierten Fibroblasten („cancer associated fibroblasts“ CAFs). Dieser Subtyp charakterisiert sich durch eine Ähnlichkeit zu Myofibroblasten, die bei der Wundheilung aktiv sind und den Heilungsprozess mit antreiben. Sobald die Wundheilung abgeschlossen ist, sinkt die Zahl der Myofibroblasten <sup>146</sup>. Dahingegen sind CAFs die ganze Zeit aktiv und verändern ihren Phänotypen nicht <sup>147</sup>. CAFs tragen zur der Tumor-Entwicklung bei, indem sie Proliferation, Invasion und Metastasierung durch Abgabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen unterstützen <sup>148</sup>. Durch diese Signale rekrutieren CAFs auch andere wichtige Bestandteile der Tumormikroumgebung, dazu gehören auch Immunzellen <sup>149</sup>. Tumor assoziierte Makrophagen (TAMs) sind ein solcher Zelltyp und werden im Zuge, der durch den Tumor ausgelösten Entzündung, rekrutiert. TAMs haben, ungleich von normalen Makrophagen, keine cytotoxischen Aktivitäten <sup>150</sup>. TAMs sind im nekrotischen, hypoxischen Bereich des Tumors vorhanden und produzieren Wachstumsfaktoren, die zur Angiogenese und zum remodellieren des ECM führen. Das Wirt Immunsystem wird unterdrückt und dadurch können Tumorzellen wachsen <sup>151</sup>. Tumor infiltrierte Lymphozyten sind Lymphozyten, die in der Tumormasse vorkommen, darunter fallen unter anderem T- und B-Zellen, natürliche Killerzellen, Neutrophile und dendritische Zellen. Verschiedene T-Zell Subtypen sind im TME vorhanden, zum Beispiel cytotoxische CD8+

Gedächtnis und Effektor T-Zellen, sowie verschiedene T-Helfer Zellen (CD4+ Zellen) <sup>152</sup>. T<sub>reg</sub> Zellen sind eine weitere Population an T-Zellen, das Tumorwachstum unterstützt, indem es die Immunüberwachung unterdrückt <sup>153</sup>. Eine andere Zellart, die die gleiche Wirkweise hat wie T<sub>reg</sub> Zellen, und zwar die Wirt Immunantwort zu stoppen, sind myeloide Suppressor Zellen („myeloid-derived suppressor cells“ MDSCs) <sup>154</sup>. MDSCs entstehen, weil im Tumor keine Myelopoese stattfindet <sup>155</sup> und wirken unter anderem, indem sie die Antigen-Präsentation von dendritischen Zellen stören und die T-Zell Aktivität unterbrechen <sup>156</sup>. B-Zellen sind wichtige Bestandteile der humoralen Immunantwort und helfen bei der Tumorentwicklung durch das Sekretieren von Zytokinen, die die T-Helferzellzahlen regulieren. Die Wichtigkeit der B-Zellen im Tumorwachstum wurde in B-Zell defiziten Mäusen gezeigt, wo das Engraftment von Tumoren nicht mehr funktioniert hat <sup>156,157</sup>. Exosome sind kleine Vesikel, die von vielen verschiedene Zellen des Organismus und auch von Tumorzellen an die Umgebung abgegeben werden können und beinhalten (mtDNA, ssDNA, dsDNA), RNA (mRNA, miRNA, long non coding RNA) und Proteine <sup>158,159</sup>. Exosome die von Tumoren abgegeben werden, nennt man „tumor derived exosomes“. Diese Exosome unterstützen das Tumorwachstum, indem sie autokrine Signale abgeben <sup>160</sup>, sind aber auch wichtig für viele weitere Tumoren relevante Mechanismen, wie Tumorigenesis und Angiogenesis <sup>161</sup>.



**Abbildung 1.5: Die Tumormasse.** Die verschiedenen Zelltypen der Tumormikroumgebung die zusammen mit den verschiedenen Tumorklonen die Tumormasse ausmachen.

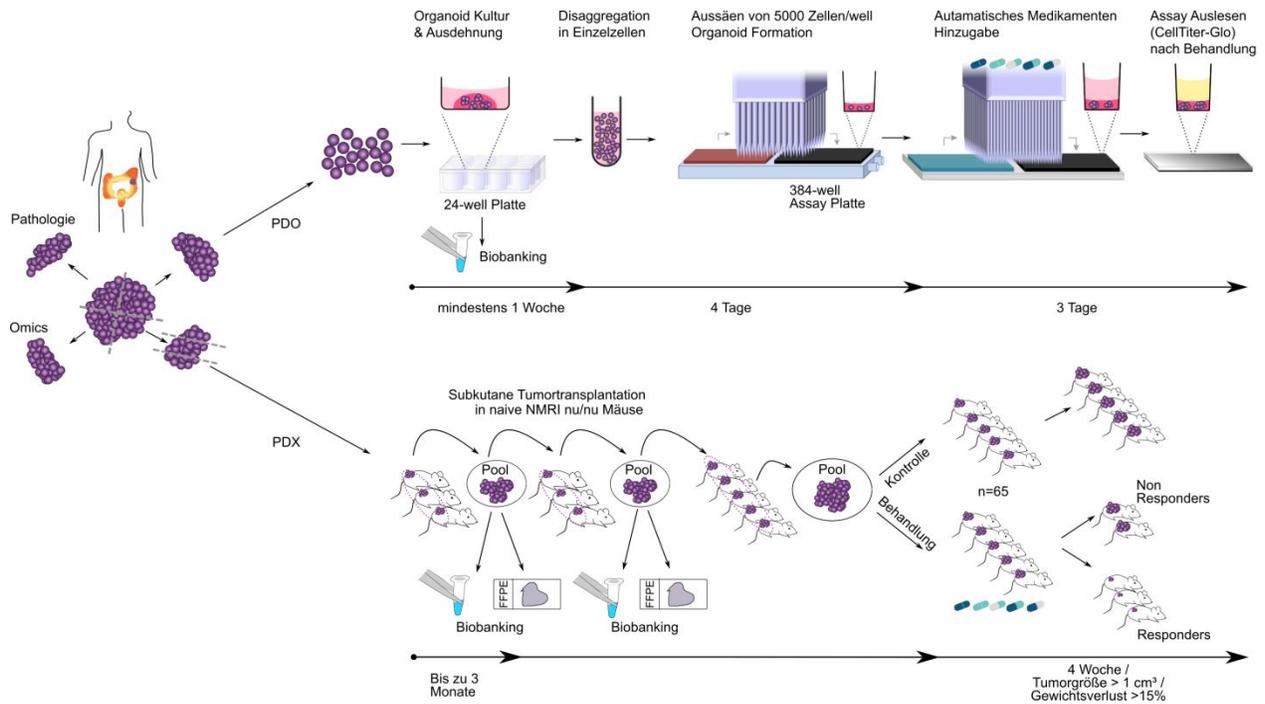
## 1.6 Das OncoTrack Projekt

Das Projekt OncoTrack (<http://www.OncoTrack.eu/>), gefördert durch die „Innovative Medicines Initiative“ (IMI), einer Private-public-partnership zwischen der Europäischen Union und der Europäischen Vereinigung der pharmazeutischen Industrie (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations, EFPIA), hatte das Ziel, biologische Marker für CRC zu identifizieren und zu charakterisieren. Dabei liegt der Fokus auf ein Verständnis von den verschiedenen Tumor-Profilen von CRC Patienten und wie diese unterschiedlichen Profile einen Einfluss auf die Therapie-Sensitivität im Patienten haben.

### 1.6.1 Rekrutierung

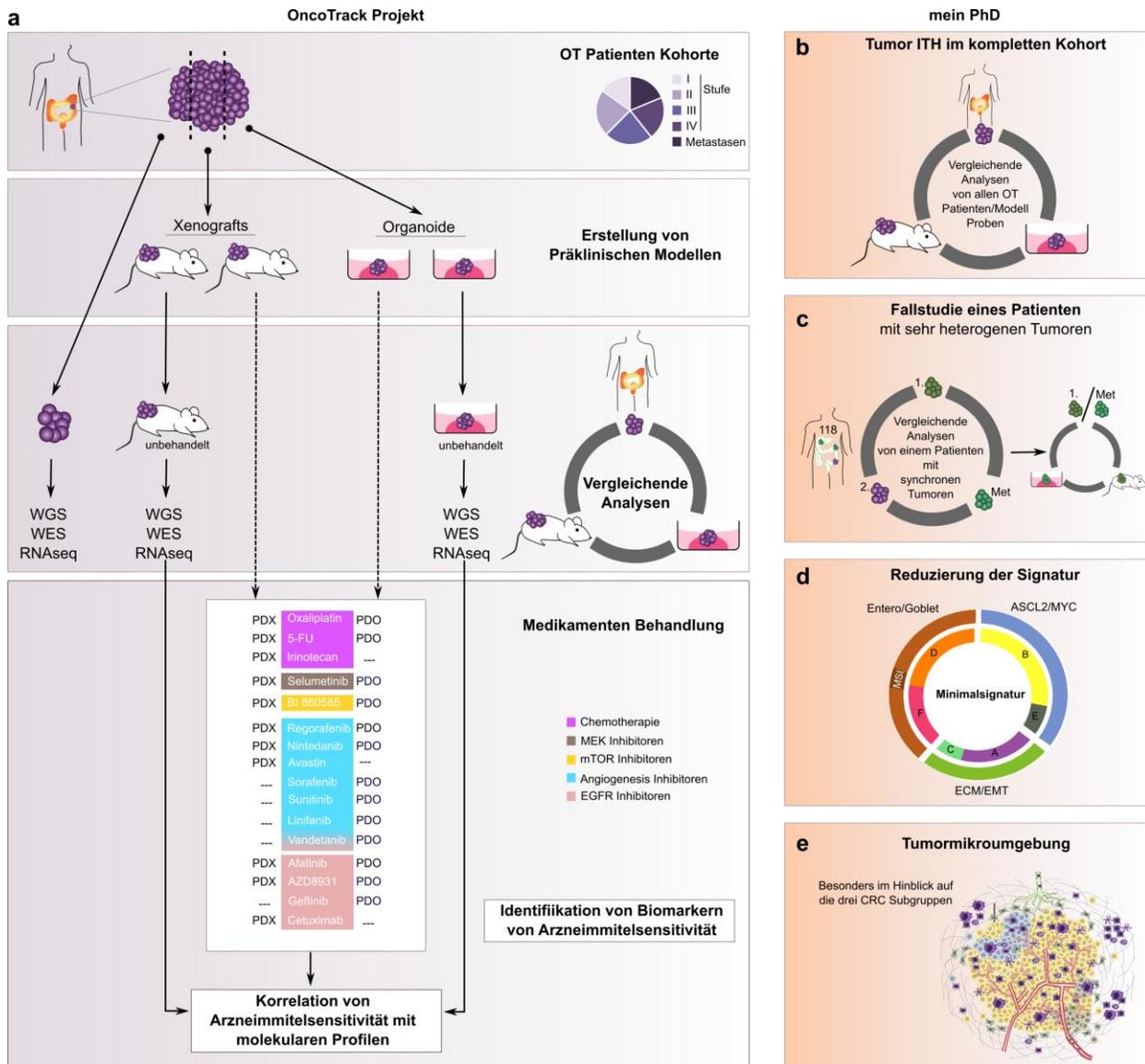
Innerhalb dieses Projektes haben Kollaborationspartner 106 CRC-Patienten in allen vier Krankheitsstadien (I-IV) rekrutiert, dies ergab insgesamt 116 Tumoreinheiten (89 Primärtumore und 27 Metastasen). Zudem haben Sie von den Patienten Blutproben genommen und als Keimbahn-Kontrolle genutzt. Wiederrum andere Partner innerhalb des Konsortiums haben aus den Ursprungstumoren 59 *in vivo* und 46 *in vitro* Modelle (PDX und PDO) erstellt. Von 19 Patienten wurde sowohl ein PDX als auch ein PDO generiert. Jeder Ursprungstumor wurde aufgeteilt, einmal für die Omics-Daten-Generation, einmal für die Pathologie, ein Teil für die PDO Generation und zuletzt ein Teil für die PDX Erstellung. Das Tumorgewebe zur PDO Erstellung wurde von den Kollaborationspartnern zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und in einer 24-Well Platte kultiviert. Nach ca. 1 Woche wurden die Organoide wieder in eine Einzel-Zellsuspension gebracht und es wurde in einer 382-Well Assay-Platte mit 5000 Zelle/Well ausplattiert. Nach 4 Tagen starteten die Arzneimitteltests und die Sensitivität der Assays wurden mit CellTiter-Glow ausgelesen (Abbildung 1.6-oberere Teil). Die PDX-Generation begann mit dem Tumor-Gewebe, welches von Kollaborationspartnern in mehrere Teile geteilt und subkutan in drei Mäuse (naive NMRI nu/nu) injiziert wurde. Nach erfolgreichem Engraftment wurden alle Tumore vereinigt und wieder auf neue Mäuse aufgeteilt. Dieser Schritt wurde wiederholt und aus dem letzten Pool wurde Kontroll- und Arzneimittelgruppe gebildet, wobei das Tumorstadium mittels T/C Methode bestimmt wurde (Abbildung 1.6-unterer Teil). Die Modelle wurden genutzt, um die Arzneimittelwirksamkeit von 16 verschiedenen Wirkstoffen mit verschiedenen Therapieansätzen zu untersuchen (Chemotherapie: Oxaliplatin, 5-FU, Irinotecan; MEK-Inhibitor: Selumetinib; mTOR-Inhibitor: BI860585; Angiogenese-Inhibitoren: Regorafenib, Nintedanib, Avastin, Sorafenib, Sunitinib, Linifanib und Vandetanib; EGFR-Inhibitoren: Afatinib, AZD8931,

Gefitinib, Cetuximab). Für die Analysen wurden die IC<sub>50</sub> Response Werte der PDO und die T/C Werte der PDX zur Verfügung gestellt.



**Abbildung 1.6: OncoTrack PDO, PDX Generation.** Der Tumor wird aus dem Patienten entnommen und geteilt. Ein Teil geht an die Pathologie, ein Teil für die Omics Datengenerierung. *Oberer Teil:* Der Teil für die PDO Generation wird erstmal in eine Einzell-Zellsuspension gebracht und in einer 24-well Platten wachsen die Zellen zu Organoid Kulturen an. Für die Medikamentenzugabe wurden die Organoid wieder disaggregiert und 5000 Zellen/Well in eine 384-well Platte gegeben und 3 Tage lang behandelt. *Unterer Teil:* PDX Engraftment: Das Tumorstück wird aufgeteilt und subkutan in 3 Mäuse injiziert, sobald die Tumore anwachsen sind werden sie geerntet und wieder auf Mäuse verteilt. Dieser Schritt wird wiederholt. Wenn es zur Medikamentenbehandlung kommt, teilt man den Tumor-Pool auf eine Kontroll- und eine Testgruppe auf. Die Medikamentensensitivität wird mittels der T/C Methode bestimmt. Sowohl bei den PDO als auch bei den PDX Modellen werden Proben zur Erstellung einer Biobank gesichert. Die PDX, sowie die PDO Modell-Erstellung, und die Medikamentenscreens wurde von Kollaborationspartnern übernommen.

Der Ablauf und die Übersicht des OncoTrack Projektes ist in Abbildung 1.7a gezeigt. Dabei wurde im Anschluss an die Rekrutierung und dem Erstellen der Modelle molekulare Analysen und Vergleiche der verschiedenen Tumoreinheiten durchgeführt, dafür wurden das Genom, Exom und Transkriptom der Ursprungstumore, PDX- und PDO-Modelle sequenziert, dies wurde von Partnern innerhalb des Konsortiums durchgeführt.



**Abbildung 1.7: Eine Übersicht zu dem OncoTrack Projekt und meine Arbeit innerhalb des Konsortiums.**

**a)** Oncotrack Übersicht: Aufgeteilte CRC Patiententumore werden für die Datenanalyse und Generation verwendet, ein Teil für die PDX und ein Teil für die PDO Erstellung. Unbehandelte Modelle und die Primärtumore werden mittels WGS; WES und RNAseq analysiert. Modelle wurden mit 16 verschiedenen Medikamenten behandelt und die Sensitivität zu den Wirkstoffen wurde gemessen. Die molekularen Informationen werden mit den Arzneimittelsensitivitäten korreliert zur Identifikation von Biomarkern. **b-e)** Meine Arbeiten innerhalb des Projektes. **b)** Umfangreiche Analyse der Genome von CRC Donor-Tumore und den Patientenentstandenen PDX und PDO Modellen. **c)** Fallstudie eines synchronen Tumors in einem Patienten. Vergleichende genomische und transkriptomische Analyse zwischen allen Tumoreinheiten und Modellen. **d)** Reduzierung der Signaturen der molekularen Hauptgruppen (ASCL2/MYC, Entero/Goblet und ECM/EMT). Bestimmung einer zuverlässigen Minisignatur. **e)** Charakterisierung der Tumormikroumgebung mit dem Fokus auf den drei molekularen Hauptgruppen.

## 1.7 Ziel dieser Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit besteht darin, das Wissen rundum um CRC zu erweitern und zu präzisieren, um so langfristig bessere präklinische Modelle entwickeln zu können, die essentiell für die erfolgreiche Behandlung von CRC sind.

Aus diesem übergeordneten Ziel ergeben sich drei Teilziele für diese Arbeit: (1) Prüfen inwieweit das molekulare Profil der präklinischen *in vivo* und *in vitro* Modelle zum molekularen Profil der entsprechenden Patienten Tumore passen; (2) Bestimmung der initialen Inter- und Intra-Tumorheterogenität; und (3) die Bestimmung der TME in den verschiedenen molekularen Gruppen von CRC.

Konkret bedeutet das für Ziel (1), dass zu allererst die molekularen Profile aller Primärtumore und Modelle bestimmt werden müssen und in einem zweiten Schritt, die Profile der passenden Tumor-Modell-Paare miteinander verglichen werden. Daraus ergibt sich das Ziel (2), welches auf den vergleichenden Analysen basiert und die initiale ITH in den Patienten-Modellen Vergleichen aufdeckt. Unabhängig davon wird die Inter-Tumorheterogenität einmal in der gesamten Kohorte, sowie in einer Fallstudie genauer analysiert. Das Ziel (3) teilt sich wiederum in zwei Teile auf: (3.1) Einmal die Gewebe Unterschiede der gesunden Umgebung der Tumore, d.h. sowohl die im Darm, als Ort des Tumorausprunges, als auch die in der Leber, als Region der Metastasen. Und andererseits (3.2) die zelltypenspezifischen Unterschiede in der Tumormasse, mit einem Fokus auf die Unterschiede in den molekularen Gruppen.

Um diese Ziele zu erreichen waren einige Schritte notwendig. Zunächst wurde das molekulare Profil von allen Tumoreinheiten bestimmt. Das besteht aus Varianten der Basensequenz („single nucleotide variants“ – SNVs), Deletion/Insertion Polymorphismen („Insertion and deletions“ – Indels), Genfusionen, Kopierzahlvarianten („copy number variants“ – CNVs) und dem Verlust der LOH. Dabei habe ich im ersten Teil meiner Arbeit zusammen mit Kollegen die CNV/LOH Profile basierend auf den Genomsequenzierdaten erstellt und innerhalb der Kohorte verglichen. Im zweiten Teil habe ich die Genfusionen, die Kollegen basierend auf den RNAseq Daten detektiert haben, in einer manuellen Inspektion validiert und darauf basierend zusammen mit Kollegen eine Liste an Genfusionen für die komplette Kohorte identifiziert. Der dritte Teil stellte einen Schwerpunkt meiner Arbeit dar. Hier wurde die ITH in einer vergleichenden Analyse der 105 Modelle (59 PDX und 46 PDO) mit ihren Donor-Tumoren adressiert – sowohl das genetische, als auch das CNV-Profil (Abbildung 1.7 b). Um diese Analysen zu der Inter- und Intra-Tumorheterogenität zu vertiefen, wurde in einem vierten Teil, ein Patient als Fallstudie

innerhalb der Kohorte tiefer analysiert (Abbildung 1.7 c). Im fünften Teil habe ich, basierend auf Ergebnissen eines Kollegen, eine minimale Signatur entwickelt, welche die Kohorte der Donor-Tumore weiterhin zuverlässig in die drei bereits bestehenden molekularen Gruppen trennen kann (ASCL2/MYC, ECM/EMT und Entero/Goblet; Abbildung 1.7d). Der sechste Teil und zweite Schwerpunkt meiner Arbeit, adressierte die Tumormikroumgebung. Dabei wurde sowohl die Umgebung außerhalb der Tumormasse in gesundem Kontrollgewebe, als auch die Mikroumgebung innerhalb der Tumormasse analysiert. Für die Analysen des Kontrollgewebes wurden die RNAseq Daten der Darm- und Leberkontrollen verwendet und untereinander verglichen, um mögliche Unterschiede in den beiden Gruppen zu identifizieren. Für die Mikroumgebung der Tumormasse dahingegen wurden die Expressionsdaten der Tumore und der präklinischen Modelle genutzt. Die Analysen basieren auf der Annahme, dass den Modellen die humane Mikroumgebung fehlt. Daher erlaubt der Vergleich von den Genen, die zwar im Tumor exprimiert sind, aber in den Modellen nicht, einen tiefgreifenden Einblick in die TME. Dabei liegt in den Analysen der Fokus einerseits auf der Identifizierung der gruppenspezifischen Gene der drei molekularen Gruppen, und andererseits auf der Identifizierung der gruppenunspezifischen, bzw. generell-geteilten Gene, also solche, die in allen Tumoren enthalten sind (siehe Abbildung 1.7e).

## 2. Material

Dieses Kapitel listet die Materialien, Kits, Maschinen, Software, Pakete, Webseiten, Probenliste und Personen auf, die bei der Erstellung der Daten eine Rolle gespielt haben.

Tabelle 2.1: Aufgelistete Methoden, die andere durchgeführt haben.

<b>Methode</b>	<b>Name der Person/en, die die Methode durchgeführt haben</b>
DNA und RNA Extraktion	Labor-Team AG Yaspo (2012-2017)
WGS Bibliothek und Sequenzierung	Labor-Team AG Yaspo (2012-2017)
WES Bibliothek und Sequenzierung	Labor-Team AG Yaspo (2012-2017)
RNaseq Bibliothek und Sequenzierung	Labor-Team AG Yaspo (2012-2017)
Gezielte Sequenzierung	Labor-Team AG Yaspo (2012-2017)
DNA Aufreinigung	Labor-Team AG Yaspo (2012-2017)
DNA Datenprozessierung	Vyacheslav Amstislavskiy
RNA Datenprozessierung	Vyacheslav Amstislavskiy
RPKM Bestimmung	Thomas Risch, Christine Jandrasits
Genfusions-Detektion	Dr. Moritz Schütte
SNV Detektion	Dr. Moritz Schütte
Indel Detektion	Vyacheslav Amstislavskiy

Tabelle 2.2: Aufgelistete Methoden, die ich zusammen mit anderen Personen durchgeführt habe.

<b>Methode</b>	<b>Name der Person/en, die die Methode durchgeführt haben</b>
PCR	Sabine Thamm, Nilofar Badra-Azar
CNV-Detektion	Dr. Moritz Schütte, Nilofar Badra-Azar
Genfusions-Validierung	Dr. Moritz Schütte, Dr. Hans-Jörg Warnatz, Nilofar Badra-Azar
SciClone	Dr. Moritz Schütte, Nilofar Badra-Azar
Bestimmung der Tumoreinheit	Dr. Moritz Schütte, Nilofar Badra-Azar

Tabelle 2.3: Aufgelistete Kits die genutzt wurden

<b>Kit</b>	<b>Methode</b>
DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen 80004)	DNA/RNA Extraktion
das AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen, 80224)	DNA/RNA Extraktion
QIAmp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, 51192)	Blut DNA Extraktion
Qubit® Fluorometer	DNA und RNA Konzentrationen
Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA)	RNA-Integrität
AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, 80234)	DNA und RNA Aufreinigung von FFPE fixiertem Material
TruSeq DNA Sample Prep v2 Kit (Illumina, set A: FC-121-2001; set B: FC-121-2002)	WGS
Nextera Rapid Capture Exome and Expanded Exome Kit (Illumina, FC-140-1006)	WGS niedrigere Abdeckung ("low coverage")
ure Select XT Human All Exon 50 MB (Agilent Technologies, 5190-0407)	WES - SOLiD
SureSelect Human All Exon V4 (Agilent Technologies, 5190-4631)	WES SOLiD
Nextera Rapid Caputre Exome and Expanded Exome Kit (Illumina, FC-140-1006)	WES Illumina
Nextera Rapid Caputre Exome and Expanded Exome Kit (Illumina, FC-140-1006)	RNAseq
dem TrueSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina, set A: RS-122-2101, setB: RS-1222-2102)	RNAseq
das Ribo-Zero™ Magnetic Gold Kit (Epicentre, MRZG12324)	RNAseq
TruSeq Custom Amplicon Kit (Illumina, FC-130-1001)	Gezielte Sequenzierung
Indext Kit (Illumina, FC-130-1003)	Gezielte Sequenzierung
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	DNA Aufreinigung nach PCR
dART 1-Step RT-PCR Kit (EURx #E0803-02)	RNA in cDNA umschreiben

Tabelle 2.4: Aufgelistete Maschinen

Maschine	Seriennumber
Illumina HiSeq 2500	546
Illumina HiSeq 2000	935
Solid Wildfire	5515
Solid 5500 XL	5518
Solid 5500 XL	5501
MaxiCycler PTC 100-96VHB	16498
StepOne Realtime PCR System	271002646
Qubit2.0 Fluorometer	45261-661
Agilent 2100 Bioanalyser	DE72903175

Tabelle 2.5: Auflistung der genutzten Software, Websites und Pakete.

Software/Websites	Referenz
Primer Blast	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Primer 3Plus	<a href="http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi">http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi</a>
IGV	<a href="http://software.broadinstitute.org/software/igv/">http://software.broadinstitute.org/software/igv/</a>
Genomatix GEPS	v3.80116
Genomatix Gene Ranker	v3.80116
Revigo-2D Plot	<a href="http://revigo.irb.hr/">http://revigo.irb.hr/</a>
Revigo-Treemap	<a href="http://revigo.irb.hr/">http://revigo.irb.hr/</a>
USCS-Genome Browser	<a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway</a> 162,163
Inkscape	<a href="https://inkscape.org/de/">https://inkscape.org/de/</a>
Adobe Illustrator	CC 2015
GIMP	<a href="https://www.gimp.org/">https://www.gimp.org/</a>
edgeR	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html</a> <sup>164</sup>
mclust	<a href="https://cran.r-project.org/web/packages/mclust/index.html">https://cran.r-project.org/web/packages/mclust/index.html</a>
Vioplot	<a href="https://cran.r-project.org/web/packages/vioplot/index.html">https://cran.r-project.org/web/packages/vioplot/index.html</a>
GSVA	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GSVA.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/GSVA.html</a> 165
Defuse	166

Tophat	167
BICseq	168
VarScan2	169
SAMtools	<a href="http://samtools.sourceforge.net/">http://samtools.sourceforge.net/</a>
Ensemble	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
SciClone Version 1.1	170
MutationTaster	<a href="http://www.mutationtaster.org/20676075">http://www.mutationtaster.org/20676075</a>
PolyPhen	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/23315928">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/23315928</a>
SIFT	<a href="http://sift.bii.a-star.edu.sg/">http://sift.bii.a-star.edu.sg/</a> 12824425

Tabelle 2.6: Auflistung der genutzten Chemikalien, die nicht in einem Kit zu finden waren

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller und Katalognummer</b>
Q5 Reaction Buffer	BioLabs; Katalognummer: B9027S
Q5 DNA Polymerase	BioLabs; Katalognummer M0491S
Nuclease Free water	Ambion; Katalognummer::1203041
SYBR ® Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific; Katalognummer: 4472908
dNTPs	Amersham Pharmacia Biotech; Katalognummer: 272050/60/70/80
LE-Agarose	Biozym; Katalognummer: 840000
Ethidium bromid solution	Sigma Aldrich; Katalognummer: E1510

Tabelle 2.7: Auflistung der Proben, mit der Proben ID, den präklinischen Modellen, den Tumor Ursprung, das Geschlecht des Patienten, das Tumorstadium und die Tumorreinheit (in Prozent).

Proben ID	PDX	PDO	Tumor Ursprung	Geschlecht	Tumorstadium	Tumorreinheit (%)
100_MET	100_MET_XEN		Dickdarm	f	IVA	50
101_MET			Dickdarm	f	IVA	50
102_MET	102_MET_XEN		Dickdarm	f	IVA	50
103_MET			Dickdarm	m	IVA	60
104_T			Dickdarm	m	IIB	30
105_T			Dickdarm	m	IIIB	80
106_T	106_T_XEN		Dickdarm	f	I	65
108_T	108_T_XEN	108_T_XEN_CELL	Dickdarm	m	IIIB	80
109_T	109_T_XEN		Dickdarm	m	IIIB	40
111_T	111_T_XEN		Dickdarm	m	IVB	65
112_T			Dickdarm	f	I	60
113_T			Rektum	m	IIIB	45
114_T	114_T_XEN	114_T_XEN_CELL	Dickdarm	f	IVA	65
115_T			Dickdarm	f	I	30
116_T	116_T_XEN	116_T_XEN_CELL	Dickdarm	m	IIA	75
118_MET		118_MET_CELL				50
118_T1	118_T1_XEN		Dickdarm	m	IVA	65
118_T2						85
123_T			Dickdarm	m	IIIB	50
128_T	128_T_XEN		Rektum	f	IIIB	--
132_T			Dickdarm + Rektum	m	IIIB	65
133_T			Dickdarm	m	IIIC	65
134_T			Rektum	m	IIIB	75
135_T	135_T_XEN		Dickdarm	m	IIIB	50
139_MET	139_MET_XEN		Dickdarm	m	IVA	--
142_T			Dickdarm	f	IIIA	60
148_T			Rektum	m	I	40
150_MET1	150_MET1_XEN1 150_MET1_XEN2 150_MET1_XEN3 150_MET1_XEN4 150_MET1_XEN5		Dickdarm	f	IVB	35
150_MET2	150_MET2_XEN					
151_METa	151_MET_XEN	151_MET_CELL1	Dickdarm	m	IVA	40
151_METb						40
152_T		152_T_CELL	Rektum	m	IVA	55
153_T			Dickdarm	m	I	45
154_MET	154_MET_XEN		Rektum	m	IVA	50
155_T	155_T_XEN	155_T_XEN_CELL	Dickdarm	m	IIIC	50
157_T	157_T_XEN		Dickdarm	f	IIA	60
159_T	159_T_XEN	159_T_CELL	Dickdarm	f	IIIB	50
160_T			Dickdarm	m	IIA	75
161_T	161_T_XEN	161_T_XEN_CELL	Dickdarm	f	I	70
162_T		162_T_CELL	Dickdarm	f	IIA	60
163_T		163_T_CELL	Dickdarm	f	I	70
164_T			Dickdarm	f	I	60
165_T		165_T_CELL	Dickdarm	m	IVB	65
167_T			Dickdarm	m	IIIB	40
168_T			Rektum	f	IIA	45

170_T1			Dickdarm	m	IVA	50
170_T2		170_T2_CELL				55
171_MET1	171_MET1_XEN		Dickdarm	m	IVA	40
171_MET2	171_MET2_XEN					40
172_T			Rektum	f	IIIB	70
175_T			Dickdarm	f	IIIA	45
176_T			Rektum	f	IIIB	40
181_T	181_T_XEN		Dickdarm	m	IIA	40
183_T	183_T_XEN		Rektum	f	I	40
184_T	184_T_XEN		Rektum	m	IIA	--
185_T		185_T_CELL	Rektum	m	I	45
189_T			Dickdarm	f	IIA	45
190_T	190_T_XEN		Dickdarm	m	IIA	70
		190_T_CELL				
191_T	191_T_XEN		Dickdarm	m	IIA	75
193_T			Dickdarm	f	I	45
194_T			Dickdarm	f	I	45
195_T		195_T_CELL2	Dickdarm	f	IVA	80
196_T			Dickdarm	f	IIA	40
201_T2			Dickdarm	f	IIA	50
202_T			Rektum	m	IIA	80
206_T			Rektum	f	IVB	70
208_MET1	208_MET1_XEN					
208_MET2	208_MET2_XEN		Rektum	f	IVA	20
208_T						
209_MET2	209_MET2_XEN					
		209_MET2_CELL				
209_T2	209_T2_XEN		Rektum	m	IVA	30
		209_T2_CELL				
210_T			Rektum	m	IIA	55
212_T	212_T_XEN		Dickdarm	f	IVB	60
215_T			Dickdarm	m	IIA	60
216_T	216_T_XEN		Dickdarm	f	IVA	30
		216_T_CELL				
227_T	227_T_XEN		Dickdarm	f	IVA	70
		227_T_CELL				
230_T	230_T_XEN		Dickdarm	f	I	20
233_MET			Dickdarm	m	IVB	70
234_T	234_T_XEN		Dickdarm	f	I	45
		234_T_CELL				
235_MET			Dickdarm	m	IVA	45
238_T	238_T_XEN		Dickdarm	f	IIA	40
		238_T_CELL				
239_T		239_T_CELL	Dickdarm	m	IVB	30
250_T		250_T_CELL	Dickdarm	m	IIIA	50
257_T			Dickdarm	m	IIIB	30
259_T	259_T_XEN		Dickdarm	m	IVA	--
261_T	261_T_XEN		Dickdarm	f	I	70
		261_T_CELL				
269_T		269_T_CELL	Dickdarm	f	IIIB	70
273_T	273_T_XEN		Dickdarm	m	IIA	40
276_T		276_T_CELL	Dickdarm	m	IIIC	25
277_MET	277_MET_XEN		Dickdarm	m	IVA	50
278_T	278_T_XEN		Dickdarm	m	IIB	50
	278_T_CELL_XEN	278_T_CELL				
280_T	280_T_XEN		Dickdarm	f	IIIB	--
281_T		281_T_CELL	Dickdarm	m	IIA	--

283_T	283_T_XEN		Dickdarm	m	IIIC	35
286_T		286_T_CELL	Dickdarm	m	I	80
288_MET		288_MET_CELL	Dickdarm	f	IVB	50
289_T	289_T_XEN		Dickdarm	m	IVB	75
292_MET		292_MET_CELL	Dickdarm	m	IVA	80
299_T1	299_T1_XEN		Dickdarm	m	IIA	--
		299_T1_CELL				
300_T		300_T_CELL	Dickdarm	m	IVA	55
302_MET	302_MET_XEN		Dickdarm	f	IVA	--
	302_MET_CELL_XEN	302_MET_CELL				
315_MET		315_MET_CELL	Dickdarm	m	IVA	85
319_T		319_T_CELL	Dickdarm	m	IIA	55
320_T	320_T_XEN		Dickdarm	m	IVA	80
323_T	323_T_XEN		Dickdarm	m	I	60
		323_T_CELL				
326_T		326_T_CELL	Dickdarm	m	IIA	--
327_T	327_T_XEN		Dickdarm	f	IIA	40
		327_T_CELL				
329_T			Dickdarm + Rektum	m	IIIC	70
330_T		330_T_CELL	Dickdarm	m	IIIB	70
347_MET2		347_MET2_CELL	Rektum	m	IVA	70
347_MET3		347_MET3_CELL				--
351_MET			Dickdarm	f		50
351_T		351_MET_CELL			IVA	--
352_MET	352_MET_XEN		Dickdarm	f	IVA	40
		352_MET_CELL				
353_T	353_T_XEN		Dickdarm	m	IIIB	--
364_MET		364_MET_CELL	Dickdarm	m	IVA	80
372_T1	372_T1_XEN		Dickdarm	f	IIA	60

## 3. Methoden

Alle Methoden, die nicht von mir durchgeführt wurden, sind mit einem Sternchen markiert und in den Materialien ist aufgelistet wer diese Methoden durchgeführt hat.

### 3.1 Kohorte

#### 3.1.1 Patienteninformationen

Diese Arbeit beinhaltet Daten von CRC-Patienten in einer Altersspanne von 18 und 100 Jahren. Patienten mit Infektionskrankheiten wurden ausgeschlossen. Patientenproben wurden nach den aktuellen GCP Richtlinien aufbewahrt. Die Patienten-Einverständniserklärung für alle Analysen wurde erhalten. Die Rekrutierung der Patienten wurde von Kollaborationspartnern durchgeführt.

#### 3.1.2 DNA und RNA Extraktion\*

Die Aufreinigung erfolgte entweder durch das AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen 80004) oder das AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen, 80224). DNA Extraktion aus Blut wurde mit dem QIAmp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen, 51192) durchgeführt. DNA und RNA Konzentrationen wurden mit dem Qubit® Fluorometer bestimmt und die RNA-Integrität mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA).

#### 3.1.3 DNA und RNA Extraktion von FFPE fixiertem Material

Als erstes wurde der Tumor von 2-3 Slides abgekratzt und zusammengesammelt. Die Aufreinigung erfolgt anhand des AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, 80234). DNA und RNA Konzentrationen wurden mit dem Qubit® Fluorometer bestimmt.

#### 3.1.4 PCR

Für die PCR wurden 2ng/µl genomische DNA mit 0.5µl dNTP (10 mM), 5 µl Q5 Reaction Buffer (BioLabs #B9027S Lot.: 0011412), 0.25µl Q5 DNA Polymerase (BioLabs #M0491S Lot.: 0051506), 2.5 µl Primer-Mix (5 µM) gemischt und mit Nuklease freies Wasser auf ein totales Volumen von 16.5 µl aufgefüllt. Das PCR-Programm ist in der unteren Tabelle aufgelistet Das

gewonnene PCR Produkt wurde auf ein 1.5% TAE-Agarose Gel aufgeladen und für 70min bei 90V aufgetrennt. Die spezifische Bande wurde ausgeschnitten und die DNA wurde mit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit auf gereinigt.

Schritte	Temperatur [°C]	hh:mm:ss	Cycles
Erste Denaturierung	98	00:03:00	1
Denaturierung	98	00:00:20	35
Annealing	60	00:00:20	
Erweitern	72	00:00:30	
Finale Erweiterung	72	00:05:00	1

### 3.1.5 Real time PCR (qPCR)

Für die qPCR wurden 1ng/ul genomische DNA mit 10µl Master Mix, jeweils 0.8µl Primer (5 µM) gemischt und mit Nuklease freies Wasser auf ein totales Volumen von 20µl aufgefüllt. Die PCR-Programm ist in der uneteren Tabelle. Das gewonnene PCR Produkt wurde auf ein 1.5% TAE-Agarose Gel aufgeladen und für 70min bei 90V aufgetrennt. Die spezifische Bande wurde ausgeschnitten und die DNA wurde mit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit aufgereinigt.

Schritte	Temperatur [°C]	hh:mm:ss	Cycles
Erste Denaturierung	98	00:03:00	1
Denaturierung	98	00:00:20	50
Annealing	55	00:00:20	
Erweitern	72	00:00:30	
Finale Erweiterung	72	00:05:00	1

### 3.1.6 Mikrosatelliten-Status\*

Um den Mikrosatelliten Status der Tumore zu bestimmen, wurden fünf monomorphe Marker: BAT25, BAT26, NR21, NR24 und NR27<sup>51</sup> genutzt. Die Validierung des Mikrosatelliten Status wurde von Kollaborationspartnern durchgeführt.

## 3.2 PDX/PDO Erstellung und Medikamententest

Die PDX/PDO Modell-Erstellung und die Arzneimittelsensitivitätsassays wurden im Rahmen der OncoTrack-Studie von Kollaborationspartner erstellt. Für die Analysen der Medikamentensensitivitäten wurden uns bei den PDX die T/C-Werte und bei den PDOs die IC<sub>50</sub> zur Verfügung gestellt.

Die genaue Erstellung der Modelle und der Durchführung der Medikamententest ist in der Publikation beschrieben <sup>93</sup>.

## 3.3 Sequenzierverfahren

### 3.3.1 Vollständige Genomsequenzierung (WGS) \*

Für hoch abdeckende WGS-Bibliotheken wurden das TruSeq DNA Sample Prep v2 Kit (Illumina, set A: FC-121-2001; set B: FC-121-2002) unter Berücksichtigung des Illumina Low Throughput (LT) Protokoll (Stand August 2011) genutzt. Paired-end Bibliotheken wurden auf dem HiSeq 2000/2500 mit 2 x 101 Basenpaar Sequenzstücke für eine 50x Abdeckung sequenziert. Für gering abdeckende WGS Bibliotheken wurde das Nextera Rapid Capture Exome and Expanded Exome Kit (Illumina, FC-140-1006), unter Auslassung des Exome Schrittes, genutzt. Paired-end Bibliotheken wurden auf dem HiSeq 2000/2500 mit 2 x 51 Basenpaar Sequenzstücke für eine 1x Abdeckung sequenziert.

### 3.3.2 Exom Sequenzierung (WES) \*

Hierbei wurden zwei verschiedene Plattformen genutzt, einmal SOLiD und einmal Illumina. Für die SOLiD Bibliotheken wurde entweder das Sure Select XT Human All Exon 50 MB (Agilent Technologies, 5190-0407) oder das SureSelect Human All Exon V4 (Agilent Technologies, 5190-4631). Sequenziert wurde entweder auf der SOLiD 5500 in Frag75/ECC Einstellung oder auf der SOLiD Wildfire in der Frag50/ECC Einstellung mit single-end Sequenzstücke. Für die Illumina Bibliotheken wurde das Nextera Rapid Capture Exome and Expanded Exome Kit (Illumina, FC-140-1006) genutzt. Paired-end Bibliotheken wurden auf dem HiSeq 2000/2500 mit 2 x 51 Basenpaar Sequenzstücke für eine 1x Abdeckung sequenziert.

### 3.3.3 Vollständige Transkriptomsequenzierung \*

RNA Bibliotheken wurden entweder mit dem TrueSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina, set A: RS-122-2001, setB: RS-1222-2002), mit Änderungen bezüglich der Strang-spezifität <sup>171</sup>, oder dem TrueSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (Illumina, set A: RS-122-2101, setB: RS-1222-2102). Für 10 RNA Proben wurde das Ribo-Zero™ Magnetic Gold Kit (Epicentre, MRZG12324) genutzt. Die Transkriptom-Bibliotheken wurden auf dem HiSeq 2000/2500 mit 2 x 51 Basenpaar Sequenzstücke sequenziert.

### 3.3.4 Gezielte Sequenzierung \*

Die Sequenzierungsbibliotheken wurden mit dem TruSeq Custom Amplicon Kit (Illumina, FC-130-1001) und dem Index Kit (Illumina, FC-130-1003) anhand des „True Seq Custom Amplicon Low Input Library Prep“ Protokoll erstellt (Stand Oktober 2015). Die TrueSeq Amplicon Panel wurde mit Illuminas DesignStudio erstellt. Die Paired-end-Bibliotheken wurde auf dem Miseq PE 151 dual Index sequenziert.

### 3.3.4 Gezielte Sequenzierung Auswertung

Die Sequenzierstücke an der Position der Mutation wurden mittels der Software „IGV-Browser“ <sup>162,163</sup> betrachtet und nach der Mutation gesucht.

### 3.3.5 Sanger Sequenzierung

Die Sanger Sequenzierung des genomischen Materials wurde bei Eurofins MWG Operon durchgeführt.

## 3.4 Bioinformatische Analysen

### 3.4.1 DNA Datenprozessierung \*

DNA Sequenzierstücke wurden mit Hilfe von BWA (bwa0.7.7-r441-mem für 75/101basenpaare, bwa0.5.9-r16-aln für 51basenpaare) <sup>172</sup> zu dem menschlichen Referenzgenom (hg19) aligniert. Für die Xenograft Proben wurden die Sequenzierstücke einmal an das humane hg19 Genome und einmal an das Maus mm9 Genome gemappt, somit könnten die humanen und die Maus Sequenzierstücke getrennt werden. Für weitere Analysen der Xenograft Daten wurden nur die humanen Sequenzierstücke verwertet

### 3.4.2 Kopienzahlvarianten

Die spezifischen Chromosomen Kopienzahlen wurden bestimmt mit dem BICseq Algorithmus <sup>168</sup> und unter der Berücksichtigung der Sequenzierstück-Abdeckung von Tumor im Vergleich zu den normalen Kontroll-Sequenzierstücke (gewonnen aus dem Blut). Die Ploidy wurde bestimmt mit der B Allelfrequenz von heterozygoten Keimbahn Varianten. Für gering abdeckende WGS Proben ohne passende Blutkontrolle wurde eine Annäherung durch das Zusammenlegen von sechs anderen Kontrollproben des gleichen Geschlechts genutzt.

*Einteilung in die drei Gruppen, basierend auf den Kopierzahlen für jedes Chromosom:*

Tumore die auf Chromosom 18 den größten Teil verloren haben (1N, 0N oder LOH), wurden als Hypoploide Tumore und alle anderen Tumore sind als Hyperploide-Tumore annotiert, die MSI-Proben wurden außenvorgelassen, da sie chromosomal neutral sind und kaum Veränderungen aufweisen.

### 3.4.3 Somatische Alterationen \*

Die somatischen SNVs wurden mit Hilfe einer etablierten Pipeline, welche auf VarScan2 <sup>169</sup> kombiniert mit RNAseq Daten und funktionaler Analyse der Variante (basierend auf Ensemble v.70) bestimmt. Somatische Indels wurden mit SAMtools <sup>172,173</sup> und Dindel <sup>174</sup> bestimmt.

### 3.4.4 RNA Datenprozessierung \*

RNA Sequenzierstücke wurden an das hg19 Referenzgenom aligniert mittels BWA <sup>172</sup> und SAMtools <sup>172,173</sup>. Gemappte Sequenzierstücke wurden anhand Ensemble v70 annotiert. Die spezifische Gen Expression wurde quantifiziert in Sequenzierstücke pro Kilobase von Exon per Million gemappter Sequenzierstücke (RPKM).

### 3.4.5 Bestimmung der Tumorreinheit

Die Tumorreinheit der Proben wurden durch die Verteilung der Allelfrequenzen der Einzelnukleotid-Polymorphismus („single nucleotide polymorphism“ – SNP) bestimmt. Dabei wurden die Verteilungen auf den verschiedenen chromosomalen Regionen betrachtet. Die Verteilung von der Allelfrequenz und der Anzahl an SNPs für jeden Chromosomen-Abschnitt wurde bestimmt. Chromosomen-Abschnitte die 1N oder unter LOH sind, zeigen aufgrund der Verunreinigung von anderen Zellen, zwei Peaks (einmal die für den Tumor und die anderen Zelltypen). Der Abstand der beiden Peak Maxima ergeben die Tumorreinheit. Dies wird für alle 1N/LOH Chromosomen-Abschnitte gemacht und alle Werte gemittelt ergibt die endgültige Tumorreinheit für die Probe.

### 3.4.6 Genfusionen

Genfusionen wurden detektiert mit Hilfe der RNAseq Daten der Primärtumore und den PDX und PDO-Modellen, unter Berücksichtigung von deFuse <sup>166</sup> und TopHat1-Fusion <sup>167</sup>. Die Genfusionen wurden mittels einer visuellen Inspektion validiert und besonders interessante oder unklare Genfusionen wurden anhand einer PCR mit anschließender Sanger-Sequenzierung validiert. 50ng der RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und das fusionierte Transkript wurde mit dART 1-Step RT-PCR Kit (EURx #E0803-02) angereichert. Die Primer wurden so designet, dass ein Primer Paar Upstream und das andere Downstream von dem Bruchpunkt liegen.

### 3.4.7 SciClone

Zur Bestimmung der Tumorklonalität von zueinander gehörigen Patienten, PDX und PDO Proben desselben Donors wurde das Programm SciClone Version 1.1 <sup>170</sup>. Die Analysen basieren auf den Listen von spezifischen SNVs, Chromosomen Kopienzahlen und Regionen von LOH. Das Clustern der Daten beruht auf den Allelfrequenzen von allen SNVs in diploiden, heterozygoten Regionen mit einer minimalen Abdeckung von 48 Sequenzstücken für die Patienten und 24 für die Modelle. Alle Daten wurden dem Programm zeitgleich zur Verfügung gestellt. Einige Proben hatten nicht genügend SNVs in diploiden Regionen, sodass von den anfangs 62 gestarteten Analysen nur 40 Fälle ein Ergebnis liefern.

### 3.4.8 Vergleichende genomische Analysen in Patienten Tumoren, PDX & PDO

Für den Vergleich der genomischen Daten von zueinander gehörigen Patienten, PDX und PDO Proben desselben Donors wurden die SNVs/Indels Positionen in einem der drei Tumoreinheiten genommen und mit einem Cutoff von 2% nach der Variante gesucht. Bei Genfusionen wurde die ungefilterte und unbearbeitete Liste von Tophat2 (fusions.out) und deFuse (results.tsv) genommen und nach der Fusion gesucht. Bei den Chromosomen Kopienzahlen wurde die Regionen miteinander verglichen.

#### *Schädliche Mutationen identifizieren:*

Die Mutationen werden mit drei Vorhersagetools, auf ihre Proteinschädlichkeit getestet: MutationTaster, PolyPhen und SIFT. Alle drei Ansätze geben einen Wert zwischen 0-1 wieder. Bei MutationTaster und PolyPhen wurden ein Wert größer 0.7 als schädlich eingestuft und bei SIFT ein Wert kleiner 0.05. In unseren Analysen reicht es, wenn einer der drei Ansätze eine schädliche Proteinstruktur vorhersagen.

### 3.4.9 Vergleichende Analysen der chromosomalen Profile der Patienten Tumoren, PDX & PDO

Alle chromosomalen Abschnitte der Primärtumore wurden mit dem der passenden Modelle verglichen und bei Unstimmigkeiten wurde annotiert ob der Tumor oder das Modelle chromosomale Regionen dazu gewonnen oder verloren hat. Die Unterschiede wurden für jede der drei chromosomalen Gruppen gesammelt und quantifiziert. Die drei Gruppen wurden einmal auf zugewonnene- und verlorene Regionen mittels einem t-Test verglichen.

### 3.4.10 Differentielle Genexpressions Analysen (DGEA)

Die RPKMs wurden pro Gen normalisiert und differentielle Vergleich von den Kohorten wurden durchgeführt mittels dem R Paket edgeR (V.3.6.0) <sup>164</sup>.

*Folgende Filterschritte wurden berücksichtigt bei der Filterung:*

- $|\log_2(\text{FC})| \geq \log_2(1.7)$  (FC - fold change)
- $\text{FDR} \leq 0.01$
- Mittlere Differenz von  $\geq 1$

### 3.4.11 Mean Pattern Matrix

Die mittlere Expression für jede Signatur, bestehend aus eine Anzahl an Genen, wurde pro Patientenprobe bestimmt. Genauer gesagt wurde der getrimmte Mittelwert der  $\log_2$  und Z-score transformierten RPKM Werte genommen und in einer Matrix dargestellt. Um die Patienten in Gruppen zu klassifizieren wurde das mclust Paket in R genommen und auf die 3 erwarteten Cluster eingestellt.

### 3.4.12 Funktionelle Annotation

Funktionelle Genannotationen wurden mit Überrepräsentationen von Gen-Sets bestimmt, dafür wurde die Genomatix Software genutzt (v3.80116). Genauer wurden Analysen mit dem GePS Tool und dem GeneRanker durchgeführt. Zur Visualisierung von GO-Terme wurde in einigen Analysen REVIGO genutzt, ein Web basiertes Tool, welches eine Liste von angereicherten GO-Terme reduziert auf ein Set an Repräsentative und diese visualisiert basierend auf dem P-Wert. Als Visualisierung wurden in dieser Arbeit zwei-dimensionale Plots und Baumkarte („Treemap“) genutzt <sup>175</sup>. Dabei wurden die GO-Terme nicht ins Deutsche übersetzt und entsprechen dem Original.

### 3.4.13 Immunsignaturen

Die Immunprofile wurden anhand von „Single sample Gene Set enrichment Analysis“ (GSEA) mit dem R Packet GSVA <sup>165</sup>. Die  $\log_2$  transformierten RPKM Werte wurde als Ausgangsliste genutzt. Es wurden publizierte Immunsignaturen verwendete <sup>176-178</sup>. Um signifikante Signaturen zu bestimmen wurde ein Welch t-Test durchgeführt und die P-Werte wurden angepasst, durch das mehrmalige testen mittels der Benjamini–Hochberg Methode („false discovery rate“ – FDR  $\leq$  0.05)

### 3.4.14 Tumormikroumgebung spezifische Gene

Die TME spezifischen Genen wurden im Vergleich zu den Modellen bestimmt, dabei wurden alle Modelle-Tumorpaaare in der jeweiligen molekularen Gruppe des Tumors (ASCL2/MYC, ECM/EMT, Entero/Goblet) gesondert betrachtet Für die Identifikation der TME-Gene wurden nur proteinkodierende Gene betrachtet Der Vergleich von PDX und PDO ist separat durchgeführt

worden. Dabei wurden Gene als TME spezifisch annotiert, wenn sie in 75% der PDX und 75% der PDO der jeweiligen Gruppen nicht exprimiert sind ( $RPKM < 0.3$ ) und im Tumor exprimiert sind ( $RPKM > 1$ ). Gene, die in allen drei Gruppen gefunden wurden, sind als gruppenunspezifische TME Gen Liste definiert und Gene, die nur in einem der drei Gruppen gefunden wurde als gruppenspezifische TME Gen Liste.

#### 3.4.15 Violin Plot

Die RPKM-Werte wurden  $\log_2$  transformiert und mittels dem R-Paket „vioplot“ für die Tumore der drei molekularen Gruppen und den PDX und PDO, aufgeteilt in die Gruppen der passenden Primärtumore, dargestellt

#### 3.4.15 Streudiagramm und Spearmans Rangkorrelationskoeffizient

Die Korrelation von der Tumorreinheit und der RPKM wurde einmal anhand eines Streudiagramms („Scatterplots“) mit der Regressionslinie pro Gruppe betrachtet Dazu wurde der Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient bestimmt. Für das Streudiagramm wurden die  $\log_2$  transformierten RPKM Werte genutzt und die Tumorreinheit der Proben in Prozent. Der Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient rho und der P-Wert sind für jedes Gen der Gen Liste für alle drei Gruppen bestimmt worden.

#### 3.4.16 Auswahl der Kandidatengene der gruppenspezifischen TME

Basierend auf den gruppenspezifischem TME Gen Listen wurde eine Auswahl an Kandidatengenen getroffen. Dabei wurde die Expressionsunterschiede zu den Modellen betrachtet, die Spearmans-Rangkorrelationskoeffizient der Tumorreinheit vs. der RPKM-Werte und die Literatursuche der Genfunktionen. Basierend auf den drei Analysen wurde eine Liste an Kandidatengenen identifiziert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die molekulare Charakterisierung der Kohorte

Innerhalb des Projektes *OncoTrack* wurden 106 Patientenproben, 116 Tumoreinheiten und passenden Blutproben gesammelt. Darunter befinden sich 89 Primärtumore (Stadien I-IV) und 27 Metastasen. Aus dem Ursprungstumoren wurden 59 *in vivo* und 46 *in vitro* Modelle (PDX und PDO) erstellt. Sowohl die Tumore als auch die Modelle wurden durch Genom-, Exom- und Transkriptom-Sequenzierung (RNAseq) molekular detailliert charakterisiert.

#### 4.1.1 Genfusions-Detektion

Von den 116 Tumorproben (Primärtumor und Metastase) hatten 106 eine Tumorreinheit von mindestens 20% und wurden für die Analysen in Betracht gezogen. Basierend auf den RNAseq Daten hat ein Kollege mit Hilfe der beiden Programmen, Defuse <sup>166</sup> und Tophat <sup>167</sup>, die Genfusionen detektiert. Daraufaufgehend habe ich basierend auf diesen ersten Listen, zusammen mit anderen, 145 zuverlässige Fusionen in 58 Tumoreinheiten identifiziert. 16% der Genfusionen sind in Genen, die auf verschiedenen Chromosomen liegen und werden daher Translokationen genannt. Dahingegeben sind die restlichen 84% intrachromosomale Fusionen. Dies sind Fusionen zwischen Genen, die auf einem Chromosom liegen. Des Weiteren wird diese Gruppe nochmal in drei Ereignisse eingeteilt: Inversionen, Deletionen und Duplikationen (Abbildung 4.1a). Die Aufteilung der Kohorte in die Gruppen ist in Abbildung 4.1b gezeigt. Der größte Teil der Fusionen konnte als Inversion identifiziert werden (n=49), gefolgt von Deletionen (n=30) und Duplikationen (n=12). 30 weitere Fusionen sind durch andere komplexere intrachromosomale Veränderungen entstanden. Ein Beispiel ist *HSPG2-WNT4*, welches auf eine Duplikation und Inversion zurückzuführen ist. Unter anderem haben wir auch die bekannte und wiederkehrend auftretende *PTPRK-RSPO3* Fusion (sowohl die *PTPRK*- Exon1 und Exon7) <sup>179</sup> gefunden. Einige Fusionen führen zur einer Deaktivierung der Gene und werden deshalb deletierende Fusionen genannt. Andere führen zu einer Aktivierung (aktivierende Fusionen). Besonders interessant werden solche Fusionen im Kontext von Krebs, wenn diese Tumorsuppressorgene oder Onkogene betreffen. Wir konnten deletierende Fusionen in *APC*, *SMAD4*, *CTCF* und *SCL12A2* finden (Abbildung 1, als auch Fusionen die *BRAF* bzw. *FZD3* aktiviert haben (Abbildung 4.1d). Die *TRIM24-BRAF* Fusion in Patient 196\_T ist von besonderem Interesse, da sie die *BRAF* Serin/Threonin Kinase Domäne aktiviert und zuvor in Melanomen <sup>180</sup> und pilozytisches Astrozytom <sup>181</sup>, nachgewiesen wurde. Die *FDFT1-FZD3* Fusion wird wahrscheinlich den WNT

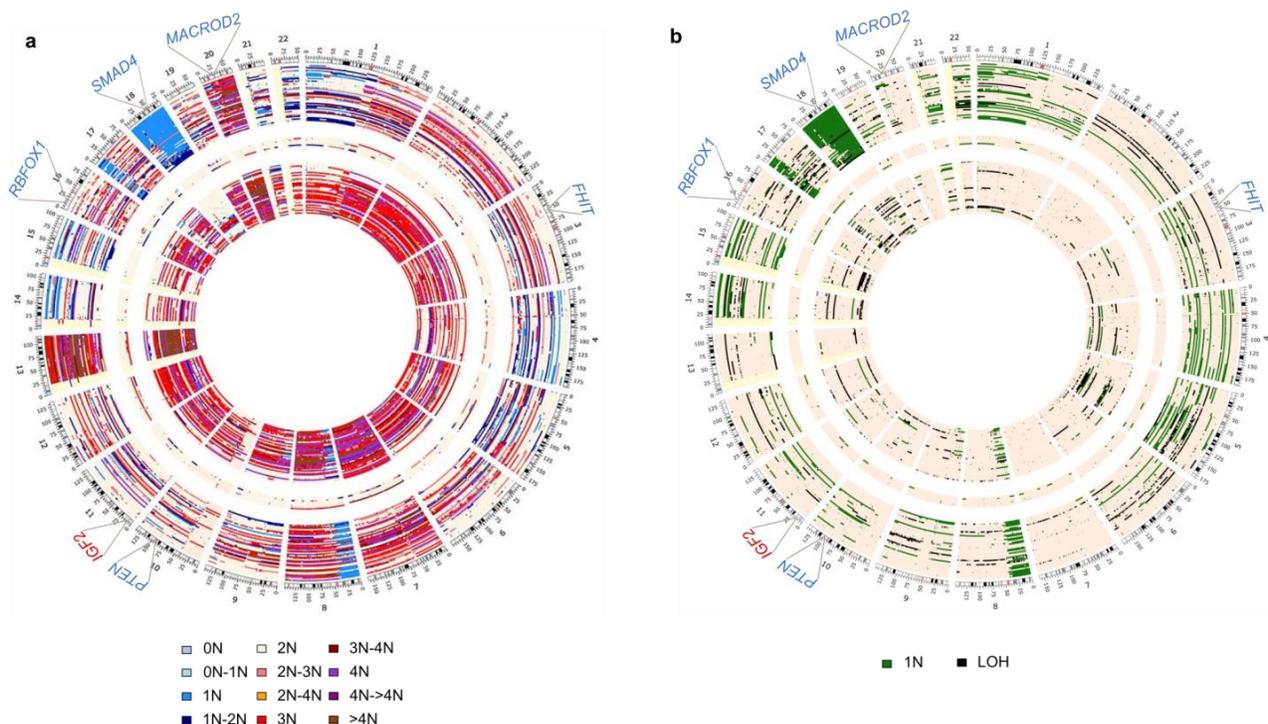
Signalweg aktivieren und somit zum Tumorwachstum beitragen. Zwei Gene traten verhäuft in Verbindung mit anderen Fusionpartnern auf, einmal das haploinsuffiziente *CTCF* (Abbildung 4.1c ein Beispiel ist gezeigt) und *SLC12A2* (*NKCC1*) - beide regulieren den Cl<sup>-</sup> Flux in den Darmkrypten<sup>182</sup>. Bei einem Xenograften (353-T-XEN) konnten wir eine *ALK*-Fusion als Tumor treibende Mutation identifizieren, leider fehlt der passende Patiententumor (Abbildung 4.1e). In den Arzneimitteltests, welche von Kollaborationspartner durchgeführt wurde, war der PDX resistent bzgl. allen drei getesteten EGFR-Inhibitoren (Cetuximab, AZD8931 und Afatinib), sprach jedoch auf Crizotinib an, ein Medikament, das zugelassen ist für Patienten mit einer *ALK*-Fusion in Lungenkrebs angewendet wird<sup>183</sup>.



**Abbildung 4.1: Genfusionsdetektion.** a) Schematische Darstellung der möglichen Fusionseffekte: Intrachromosomale Veränderung (Deletion, Duplikation und Inversion) und die Interchromosomale Veränderung (Translokation). b) Prozentualer Anteil der verschiedenen Fusionseffekte in der Kohorte. c,d,e) Schematische Darstellung von Fusionstranskripten. Gezeigt sind, die chromosomalen Regionen, die beiden Fusionspartner, die Exon Struktur (blau, rot und graue Boxen), die Fusionsbruchpunkte (rote Linie), die Validation mittels Sanger-Sequenzierung und die RNA Sequenz-Abdeckung (im USCS Browser). In c) sind vier Beispiele für deletierender Fusionen (*ZNF322A-SLC12A2*, *ME2-SMAD4*, *NFATC3-CTCF*, *APC-REEP5*), in d) zwei aktivierende Fusionen (*TRIM24-BRAF* und *FDFT1-FZD3*) und in e) eine aktivierende Fusion in einer PDX Probe (*EML4-ALK*) gezeigt.

### 4.1.2 CNV Profil

Basierend auf den Genom-Sequenzierdaten der Tumore und der des passenden Blutes vom gleichen Patienten, welches als Keimbahn-Kontrolle und somit als Referenz dient, konnten wir die chromosomalen Kopierzahlen und die Regionen von LOH bestimmen. Für die Analysen wurden Tumore mit einer Reinheit von mindestens 35% genommen. MSI-Tumore zeigen kaum chromosomale Veränderungen und LOH Ereignisse und sind fast komplett diploid, dahingegen sind Mikrosatellitenstabile (MSS) Tumore sehr stark von Ploidie- und LOH-Veränderungen betroffen (Abbildung 4.2 a+b). Die MSS Tumore konnten basierend auf ihrem chromosomalen Profil in zwei Gruppen eingeteilt werden: einmal eine Hypoploide Gruppe (n=43), wo Chromosom 18 und der kurze Arm von Chromosom 17 deletiert sind auf 1N, und eine Hyperploide Gruppe (n=40), in der deutlich mehr chromosomale Zugewinne zu finden sind (Abbildung 4.2a). Die häufig deletierten Regionen beinhalten wichtige Gene wie *SMAD4*, *RBFOX1*, *PTEN* und *MACROD2*. *IGF2* hingegen liegt in einer Region, die häufig Polyploid ist (Abbildung 4.2a).

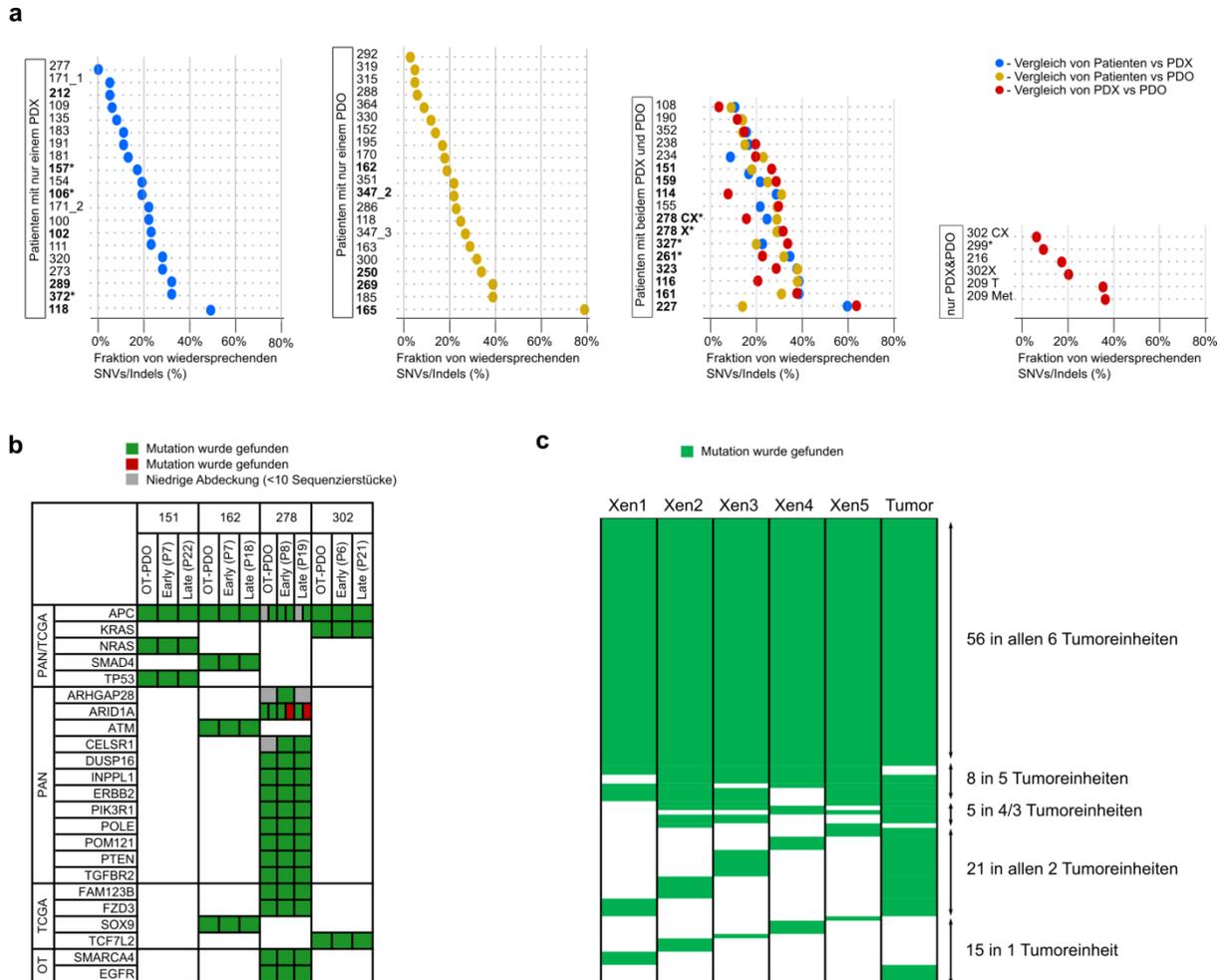


**Abbildung 4.2: Kopierzahlen Variationen und LOH Profile.** Die beiden Circos-Plots zeigen das chromosomale Profil (a) und das LOH-Profil (b) von sowohl Tumoren als auch Metastasen. Die Kohorte wurde in drei Gruppen eingeteilt: Hypoploiden- (äußerster Kreis n=43), chromosomal stabilen MSI- (mittlerer Kreis, n=6) und Hyperploide-Gruppe (innerer Kreis, n=40). Häufig amplifizierte- (*IGF2*- rot) und deletierte- (*SMAD4*, *MACROD2*, *FHIT*, *PTEN* und *RBFOX1*, blau) Gene sind in beiden Plots markiert. Tumore mit einer Reinheit von mindestens 35% sind gezeigt.

## 4.2 Vergleichende Analysen der genetischen Profile von Tumor und Modellen

### 4.2.1 Fraktion von unterschiedlichen Veränderungen

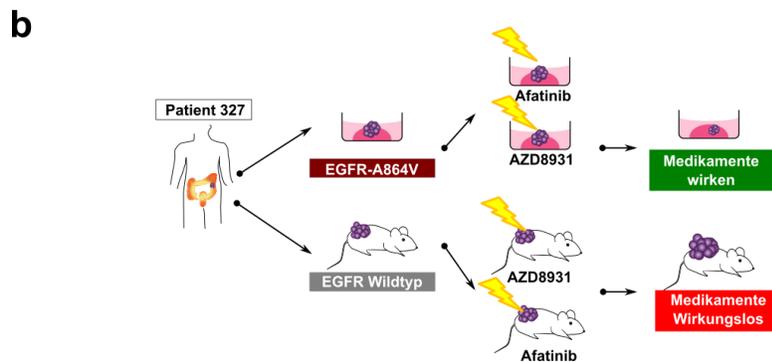
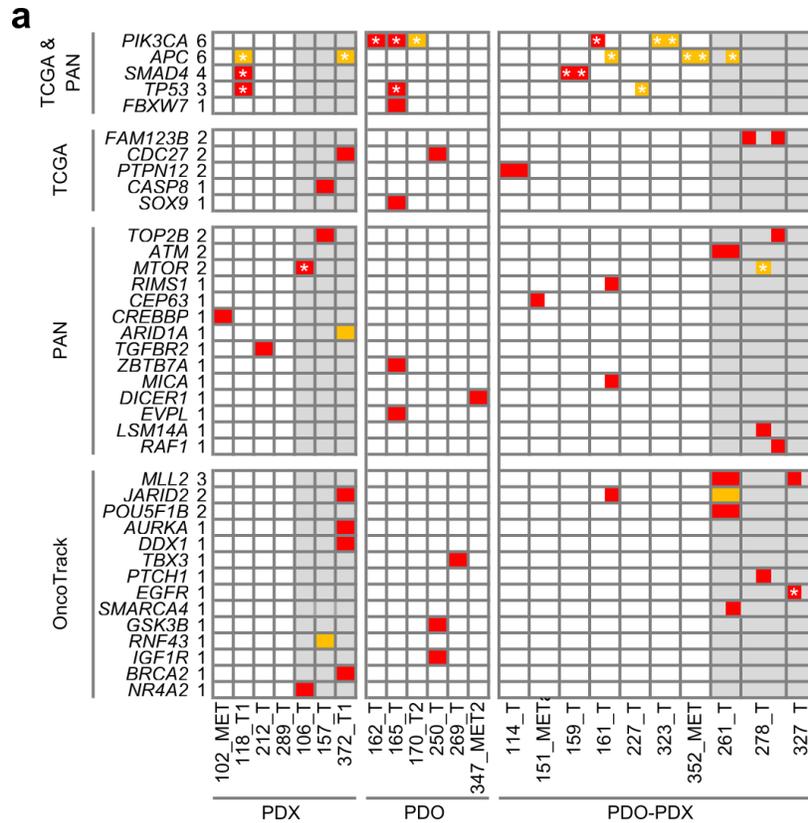
Zur Begutachtung der Ähnlichkeit von Modellen und Ihren Donor-Tumoren wurde ein tiefgehender Vergleich von dem genetischen Profil von PDX und PDO zu den passenden Tumoren durchgeführt. Für diesen Vergleich wurden nur die somatischen Mutationen genommen, die Tumorrelevant sind (Methoden). Zudem wurden die Indels in den Modellen und Patienten berücksichtigt. Um sicherzustellen, dass keine Unstimmigkeiten im genetischen Profil auf eine zu unreine Probe zurückzuführen sind, wurden nur Patienten Tumore genommen die einen Tumoranteil von 40% oder mehr vorweisen konnten. Dies führte zu 56 Patienten Tumoren, die mit jeweils 37 *ex vivo* Modellen (PDX und PDO) verglichen werden konnten und fünf PDX-PDO Paaren ohne passendes Patiententumormaterial. Es wurde das ganze Spektrum von Modellen gefunden: solche, die ihrem Donor treu geblieben sind und dasselbe genetische Profil vorweisen bis hin zu Tumor-Modell-Paaren, die in mehr als 80% der Mutationen Unterschiede zeigen (Abbildung 4.3a). Als Beispiel ist hierbei einmal das Tumor-PDX Paar von Patient 277 zu benennen mit mehr als 95% Übereinstimmung, sowie ein ähnlicher Vergleich im Patient 292 (Tumor-PDO-Paar). Das Triplet von Patient 108 (PDX, PDO und Tumor) zeigt ein übereinkommendes genetisches Profil in 90% der Fälle. Dahingegen zeigen 118\_T1 und 165\_T sehr viele Unterschiede zu ihren Modellen auf (Abbildung 4.3a). Um auszuschließen, dass es sich bei den Unterschieden um einen genetischen Drift handelt, wurden einmal vier PDOs von frühen Passagen mit PDOs von späten Passagen desselben Patienten (Abbildung 4.3b) und fünf PDX, die alle vom Patienten 150\_Met1 erstellt wurden (Abbildung 4.3c), verglichen. Sowohl bei den PDOs, als auch dem PDX Vergleich konnten wir eine starke Übereinstimmung zwischen den Modellen finden und konnten somit einen genetischen Drift ausschließen. Daher basieren die gefundenen Unterschiede auf einer ITH. Das spricht für verschiedene Mutationen in distinkten Orten des Tumors, die durch das Sampling bei der Probenentnahme entstanden sind. Zudem konnte keine Korrelation zu den Tumorstadien festgestellt werden, was wiederum für ein frühes Entstehen von ITH spricht und im Einklang mit dem "Big Bang Modell", postuliert von Sottoriva et al. in 2015 <sup>138</sup>, ist. Die Unterschiede, die wir zwischen Patient und Tumor sehen, sind somit mit der anfänglichen Tumorheterogenität zu erklären.



**Abbildung 4.3: Mutationen im Vergleich. a)** Fraktion an tumorrelevanten somatischen SNV/Indels (Methoden) die Unterschiede aufzeigen im Tumor-Modell Vergleich. Es wurden 56 Patienten Tumore (Tumorreinheit  $\geq 40\%$ ) und ihre passenden Modelle (37 PDX und 37 PDO), sowohl wie fünf PDX-PDO Paare ohne Patiententumor verglichen. Der Vergleich von Patient vs. PDX ist in Blau, Patient vs. PDO in Gelb und PDX vs. PDO in Rot gezeigt. Proben die in Abbildung 4.4 gezeigt sind, sind in fetter Schrift markiert, MSI und die hypermutierten Proben sind mit einem Sternchen versehen. Die Vergleiche sind von links nach rechts und wie folgt angeordnet: Patienten von dem nur ein PDX erstellt wurde, Patienten von dem nur ein PDO erstellt wurde, Patienten von dem PDX und PDO erstellt wurden und zuletzt PDX und PDO ohne passendem Patiententumor. Im Falle von 278 und 302, steht das Suffix „X“ für PDX und „CX“ für ein PDX, welches aus einer PDO Probe entstanden ist. **b+c)** Stabilität von Xenograft und Organoid Modellen. **b)** Vergleich von CRC relevante somatische Veränderungen in frühen und späten Passagen von vier PDO Modellen. In Grün markierte Zellen wurde die Mutation gefunden und in Rot nicht, Grau bedeutet zu geringe Abdeckung an der Stelle **c)** Vergleich von allen somatischen Mutationen in fünf PDX Modellen eines Patienten. Grün bedeutet, dass die Mutation gefunden wurde in dem Patienten.

#### 4.2.2 CRC spezifische Gene

Um spezifische Unterschiede für CRC zu bestimmen wurden für die weiteren Analysen Gene in Betracht gezogen, die krankheitsspezifisch sind. Dazu wurden die Treibermutationen von TCGA<sup>52</sup> und die CRC spezifischen Gene aus dem Pan Cancer Projekt<sup>184</sup> genommen und darüber hinaus wurden 17 zusätzliche Gene hinzugefügt. Dies ergab eine komplette Liste von 123 CRC-spezifischen Genen (siehe Ergänzende Tabelle 1). Nur 3% der ausgewählten Gene unterscheiden sich voneinander in unserem Tumor-Model Vergleich. Zudem finden wir keine fehlenden *KRAS/BRAF* Mutationen zwischen Modellen und Tumoren, jedoch haben 118\_Met und 227\_T eine homozygote *KRAS* Mutation, die Modelle hingegen sind heterozygote für *KRAS*. Unter anderem haben wir seltenen *EGFR* Mutation (A864V) gefunden, die nur im PDO von 327 zu finden ist und nicht im eigentlichen Primärtumor oder im PDX (Abbildung 4.4a).. *EGFR* ist von besonderem Interesse, da es ein Signalweg ist, der in der gezielten Therapie mit EGFR-Inhibitoren angegriffen wird, um den Tumorwachstum zu stoppen<sup>185</sup>. Interessanterweise unterscheiden sich die Medikamentenwirksamkeit-Daten von AZD8931 und Afatinib (beides EGFR Inhibitoren), welche von Kollaborationspartnern für beiden Modelle erstellt wurden. Das PDO Modell reagiert sensitiv auf beide EGFR-Inhibitoren, wobei im PDX keine Wirkung auf das Tumorwachstum zu beobachten ist. Somit wirken in diesem Fall EGFR-Inhibitoren besser im PDO-Modell mit der *EGFR* Mutation (Abbildung 4.4b). Der Tumor 278\_T und seine Modelle haben widersprüchliche Mutationen in *FAM123B*, *MTOR* und *PTCH1*, wodurch nach einer frameshift Mutation der Sonic Hedgehog Signal Signalweg aktiviert wurde<sup>186</sup>. Häufig wurden auch redundante Mutationen gefunden, wie zum Beispiel in der Probe 323, die vier verschiedenen Mutationen in *PIK3CA* vorweist. Darunter ist eine Mutation, die im Tumor und in beiden Modellen gefunden wurde (G1049R); eine Mutation im PDX (E542K) und PDO (A775S); und eine letzte Mutation, die im Tumor und PDO, jedoch nicht im PDX, zu finden war (R88Q) (Abbildung 4.4a). In fünf Patienten wurden unterschiedliche *APC* Mutationen gefunden im Vergleich zu den Modellen, da alle diese Mutationen ein nicht funktionsfähiges APC-Protein zur Folge haben, ist die Auswirkung für das Tumorwachstum funktional gleich (Abbildung 4.4a). Um sicher zu gehen, dass das Fehlen einer Mutation nicht an einer unzureichenden Abdeckung der Position lag, sondern an der ITH, wurden alle unterschiedlichen *PIK3CA*, *APC*, *SMAD4*, *TP53*, *MTOR* und *EGFR* Mutationen mit „deep targeted“ Sequenzierung überprüft und es konnten keine subklonalen Mutationen gefunden werden, die durch unzureichende Sequenzierung in erster Instanz verursacht wurden (Abbildung 4.4a).

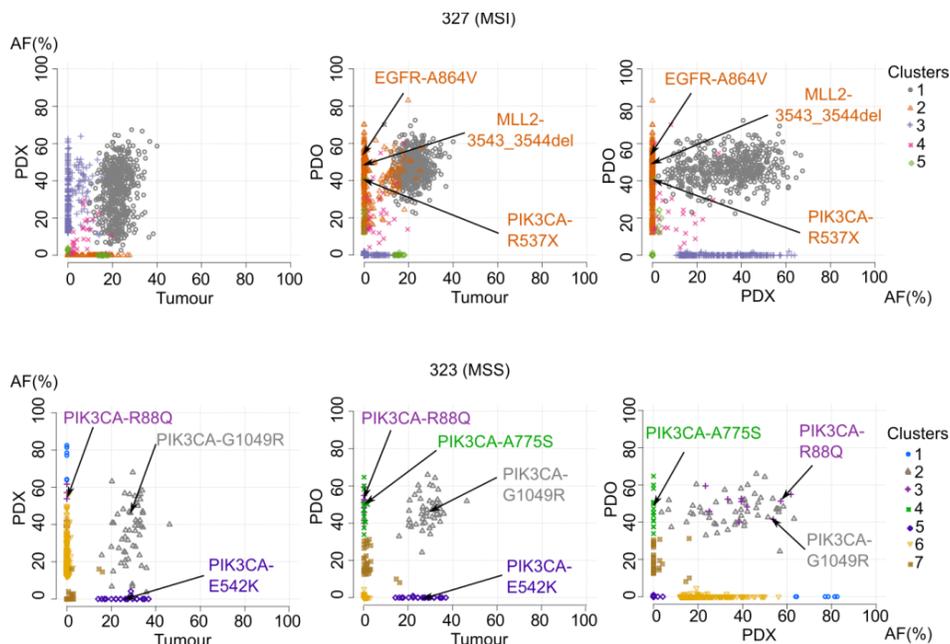


**Abbildung 4.4: Molekulare Unterschiede zwischen Patienten Tumoren und Modellen in CRC-relevante Gene.**

**a)** Somatische klonale Mutationsunterschiede in Patienten/PDX (links), Patienten/PDO (Mitte), und Patienten/PDX/PDO (rechts). Gene, die nur einmal mutiert vorgefunden wurden, entweder im Tumor oder in einem Modell, sind rot markiert. Gene mit verschiedenen Mutationen in Tumor und Modellen sind orange markiert. Mutationen, die mit gezielter Sequenzierung validiert wurden, sind mit einem Sternchen versehen. MSI und die hypermutierten Proben zeigen einen grauen Hintergrund. Nur Krebs-relevante Gene aus TCGA, PAN und OncoTrack („OT“) Studie sind gezeigt (siehe Methoden). Patienten mit einer Tumorreinheit von  $\geq 40\%$  und mindestens einer unterschiedlichen Mutation in Tumor-Modell-Vergleich in den relevanten CRC Genen sind gezeigt. **b)** EGFR Mutationen im PDX und PDO von 327 und die Auswirkung von zwei EGFR-Inhibitoren (AZD8931 & Afatinib) konnte eine Medikamenten-Wirksamkeit im PDO und keine im PDX festgestellt werden (Response-Daten von Kollaborationspartner).

### 4.2.3 Klonalitätsanalysen

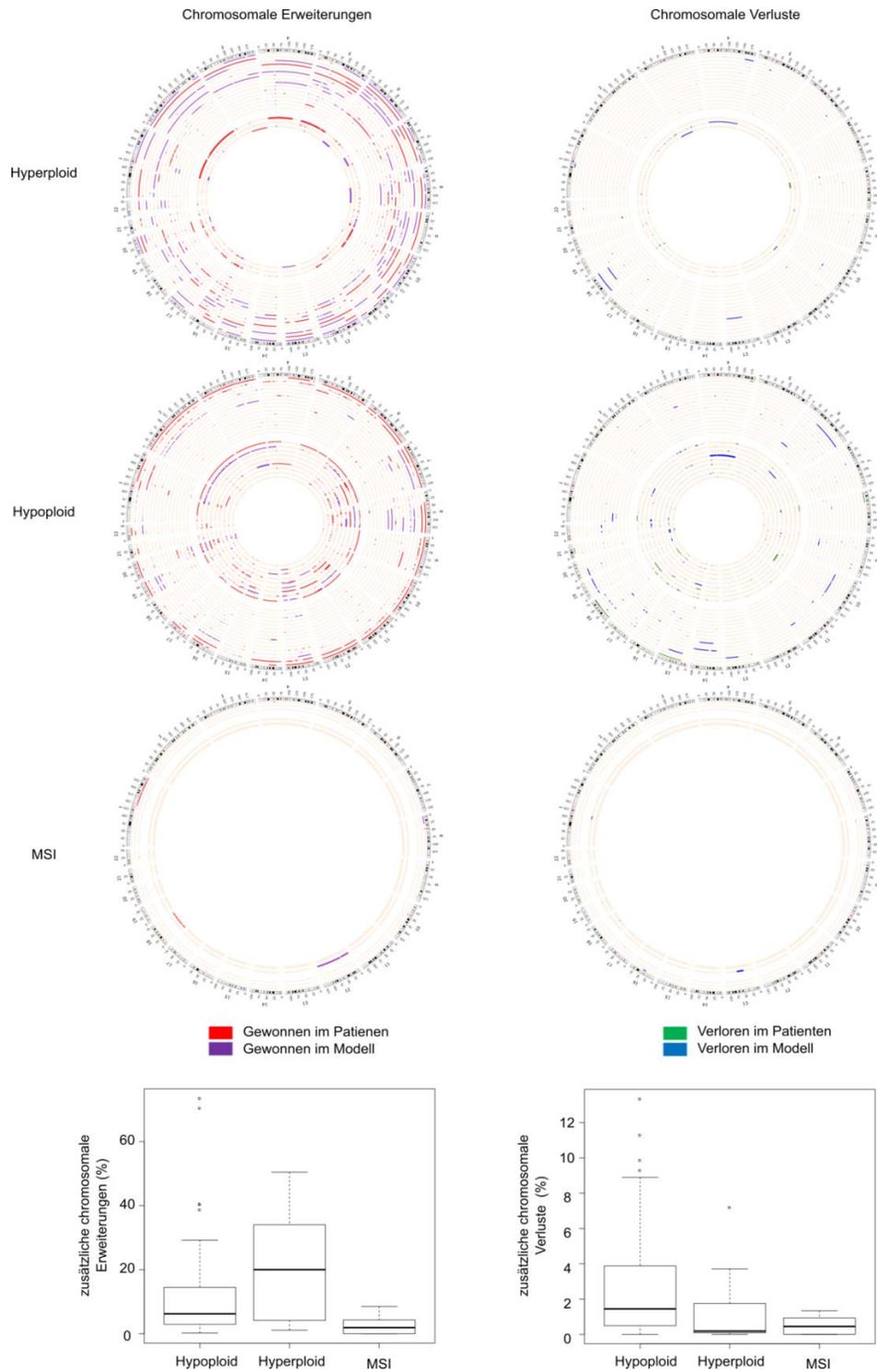
Um die ITH, die sich zwischen einigen Tumoren und dazugehörigen Modellen gezeigt hat, weiter zu analysieren, hat ein Kollege die Cluster von Mutationen mit SciClone <sup>170</sup> bestimmt. Dabei konnten die Beobachtungen aus den Vergleichenden Analysen, welche Unterschiede in den Tumor-Modell-Paaren gezeigt hat, weiter untersucht werden. Die SciClone Cluster bilden sich aus Gruppe von Mutationen, die entweder nur in einer Tumoreinheit gefunden wurden, oder eine Gruppe, die von beiden Tumoren geteilt wird. Zwei Beispiele sind in Abbildung 4.5 gezeigt: einmal 327, als MSI Tumor, und 323 als MSS Tumor. Hierbei erkennt man, dass beide Proben ein Mutations-Cluster haben, was in allen drei Tumoreinheiten vorkommt (grau), aber jeweils auch ein Cluster an Mutationen, welches nur in einer Einheit gefunden wurde. Mutationsunterschiede, die im dem genomischen Vergleich der Tumor-Modell-Paare gefunden wurden, sind in den einzelnen Clustern markiert. Diese Analyse, der Vergleich der CNV- und der genetischen Profile zusammengenommen bestätigt, die Hypothese, dass es Proben gibt die aus mehreren unterschiedlichen Tumorklonen bestehen.



**Abbildung 4.5: SciClone Klonalitätsanalysen an zwei Patienten und der zugehörigen PDX und PDO Probe.** Im oberen Teil ist der Patient 327 (MSI und 40% Tumorreinheit) und darunter 323 (MSS und 60% Tumorreinheit). Die Graphen zeigen die Mutationen in diploiden Regionen, geclustert nach der Allelfrequenz (AF) im Tumor vs. PDX (links), Tumor vs. PDO (Mitte) und PDX vs. PDO (rechts). Individuelle Mutationsgruppen sind in unterschiedlichen Farben gezeigt, und Mutationsgruppen, die geteilt werden in grau. Interessante Mutationen in den Gruppen sind aufgezeigt.

#### 4.2.4 CNV Unterschiede in Tumoren und Modellen

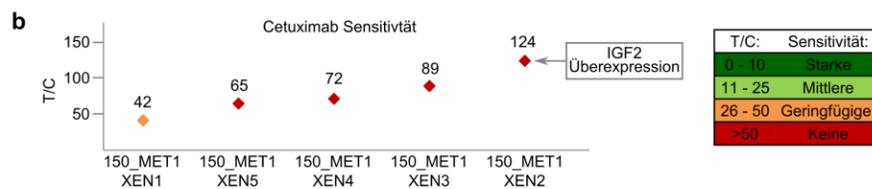
Um die chromosomalen Unterschiede zu bestimmen, wurden alle Regionen im Tumor mit denen in den Modellen verglichen und markiert falls Patient oder Modell chromosomale Regionen dazu gewonnen haben. Genauso falls eine Region im Patient und im Modell verlorengegangen ist. Die Proben wurden in die drei Gruppen geteilt: MSI, Hyperploid und Hypoploid und die gesamte Menge an chromosomalen Erweiterungen und Verlusten wurde quantifiziert (Abbildung 4.6). Die MSI Proben blieben chromosomal neutral mit 2N und wenig Veränderungen - auch in den Modellen. Dahingegen verlieren die Modelle der Hypoploiden Gruppe deutlich mehr chromosomale Regionen im Vergleich zu den Hyperploiden-Tumoren ( $P = .005$ , t-test). Jedoch gewinnen dafür die Hyperploiden-Tumore mehr chromosomale Regionen dazu ( $P = .04$ , t-test) (Abbildung 4.6). Dieser Vergleich von Tumor und Modell zeigt die Heterogenität einiger Proben, ähnlich wie im Mutationsvergleich. Die ITH wurde auch in der Expression von *IGF2* in den fünf PDX von der Probe 150\_Met1 gesehen, in der nur ein PDX extreme *IGF2* Expression zeigt („Reads Per Kilobase per Million“ (RPKM) von 299) und die restlichen vier Modelle niedrig exprimiert sind mit 0-1 RPKM. Der Ursprungstumor hingegen zeigt intermediäre Expression von 30 RPKM (Abbildung 4.7a). In einer Studie von Zanella et al. in 2015 wurde eine *IGF2* Überexpression zu einer schlechteren Cetuximab-Sensitivität korreliert <sup>187</sup>. Dies ist im Einklang mit unseren Daten, wo der PDX (150\_MET1\_XEN2) mit einer Überexpression von *IGF2*, die schlechteste Cetuximab Sensitivität in dem Vergleich der fünf PDX zeigte (124 vs. 42-89 T/C). Jedoch zeigen alle fünf PDX keine oder geringe Wirkung auf Cetuximab (Abbildung 4.7b).



**Abbildung 4.6: Chromosomale Unterschiede von Patiententumoren und ihren passenden Modellen.** *Oberer Teil:* Chromosomale Erweiterungen (links) und Verluste (rechts) in den drei Ploidie Gruppen (Hyperploid – n=21, Hypoploid – n=28 und MSI – n=6). Dazugewonnene Regionen im Patienten sind in Rot und in Modellen in Lila gezeigt. Dahingegen sind verlorengene Regionen im Patienten in Grün und in Modellen in Blau markiert. *Unterer Teil:* Die Quantifizierung der zusätzlichen Erweiterungen (links) und Verluste (rechts) in Prozent.

**a**

Patient	151_METa	191_T	319_T	152_T	347_MET2	292_MET	315_MET	234_T	100_MET	352_MET	109_T	171_MET1	171_MET2	116_T	150_MET1	239_T	288_MET	327_T								
PDO	151_MET_CELL		319_T_CELL	152_T_CELL	347_MET2_CELL	292_MET_CELL	315_MET_CELL	234_T_CELL		352_MET_CELL				116_T_XEN_CELL				239_T_CELL	288_MET_CELL	327_T_CELL						
PDX	151_MET_XEN	191_T_XEN						234_T_XEN	100_MET_XEN	352_MET_XEN	109_T_XEN	171_MET1_XEN	171_MET2_XEN		116_T_XEN	150_MET1_XEN1	150_MET1_XEN2	150_MET1_XEN3	150_MET1_XEN4	150_MET1_XEN5				327_T_XEN		
Patient	1720	1689	779	732	706	471	451	301	85	62	46	45	44	34		30								16	13	12
PDO	875		1354	824	1705	310	624	1915		0	0	0	0	1		0	0	299	1	1	0		0	1	0	
PDX		873	1801					1377	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**Abbildung 4.7: IGF2-Expression in Patient, PDO und PDX Proben und Cetuximab Response in den PDX vom Patienten 150\_MET1. a)** Alle Patienten Tumore, die eine Expression von mehr als 10 RPKM haben, sind aufgelistet und Orange gefärbt. RPKM-Werte über 100 sind Rot hinterlegt. Patienten die PDO und PDX Modellen haben, sind Fett geschrieben. **b)** Die Cetuximab Sensitivität von den fünf PDX von Patient 150\_Met1. Die Response ist in T/C Werte angegeben. Wobei ein PDX geringfügige Sensitivität (T/C: 42- Orange) zu Cetuximab zeigt und alle anderen resistent sind (65-124 - Rot). Die PDX sind nach aufsteigendem T/C Wert sortiert und die Kategorisierung der T/C zu Medikamentensensitivitäten ist gezeigt. Der PDX 150\_MET1\_XEN hat eine Überexpression von *IGF2* (Response-Daten von Kollaborationspartner).

Die molekulare Beschreibung der Kohorte im Abschnitt 4.1 zeigt uns die Inter-Tumorheterogenität, die es zwischen verschiedenen Tumoren von verschiedenen Patienten gibt. Die vergleichenden Analysen der Tumore und ihrer passenden Modelle im Abschnitt 4.2 zeigte, dass es auf der einen Seite Paare gibt deren molekulares Profil sich ähneln und das Modell den Tumor gut widerspiegeln kann. Auf der anderen Seite hingegen, konnten wir auch Paare finden, die sehr unterschiedlich waren und zudem auch genetische Veränderungen in Genen zeigten, die krankheitsrelevant sind und sogar Beispiele finden, die Unterschiede in der Medikamentensensitivität von verschiedenen Modellen, desselben Tumors, erklären würden. Diese Ergebnisse spiegeln keinen genetischen Drift wieder, dafür wurden PDO-Modelle aus verschiedenen Passagen und fünf PDX vom gleichen Patienten verglichen und diese zeigten starke Übereinstimmungen. Daher sind die gefundenen Unterschiede auf eine initiale ITH der Tumore zurückzuführen. Sowohl die Inter-Tumorheterogenität, als auch die Intra-Tumorheterogenität wurde daraufhin in einer Analyse eines sehr heterogenen Patienten in einer Fallstudie vertieft.

## 4.3 Patient 118 als eine Fallstudie für die Inter- und Intra-Tumorheterogenität

### 4.3.1 Patienteninformation

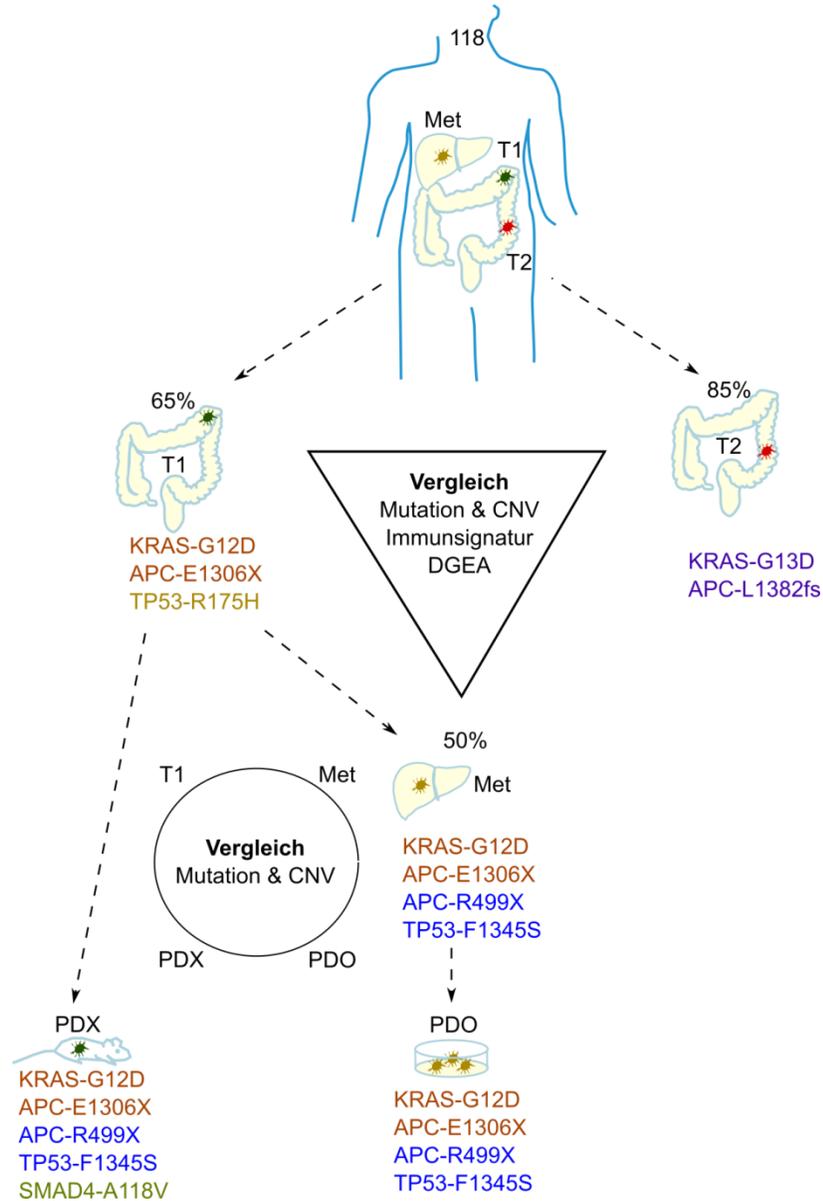
Bei dem Patienten 118 handelt es sich um einen Mann mit zwei synchronen Dickdarm Tumoren, einmal in der linken Dickdarmflexur und ein zweites im absteigenden Dickdarm. Zudem hat dieser Patient unter anderem auch eine Lebermetastase. Der Patient wurde hospitalisiert und einer Operation unterzogen, wobei die Tumore und die Metastase entfernt wurden. Keine neoadjuvante Therapie wurde durchgeführt. Die Tumore wurden beide aufgrund der Metastase als Stufe IVA klassifiziert. Bei der Operation waren die Tumore 1 und 2, jeweils 30mm und 25mm lang.

Es wurde Tumormaterial von den beiden synchronen Tumoren, sowie von der Lebermetastase und Blut als Kontrolle entnommen. Zudem wurde ein *in vitro* Modell von der Metastase und ein *in vivo* Modell vom Tumor 1 erstellt (Abbildung 4.8). Von allen Proben wurde das Genom (WGS/WES) und das Transkriptom (RNAseq) sequenziert.

### 4.3.2 Synchrone Tumore

CRC Tumore können als synchrone Tumore auftreten, dies bedeutet, dass mehrere voneinander unabhängige Tumore im gleichen Patienten bei der Diagnose festgestellt werden. Dieses Phänomen erscheint bei ~2% aller CRC Fälle <sup>95</sup> und dabei ist der Dickdarm das Organ was am meisten von synchronen Tumoren befallen ist <sup>188</sup>. Es ist zu beachten, dass synchrone Tumore genetisch einzigartig sind und ihre eigenen somatischen Veränderungen vorweisen. Daraus ergeben sich Tumore, die genetisch genauso heterogen sind wie zwei Tumore von unterschiedlichen Patienten. Aus diesem Grund finden wir im Fall von Patient 118 für die beiden Tumore 1 und 2 keine einzige gemeinsame Mutation.

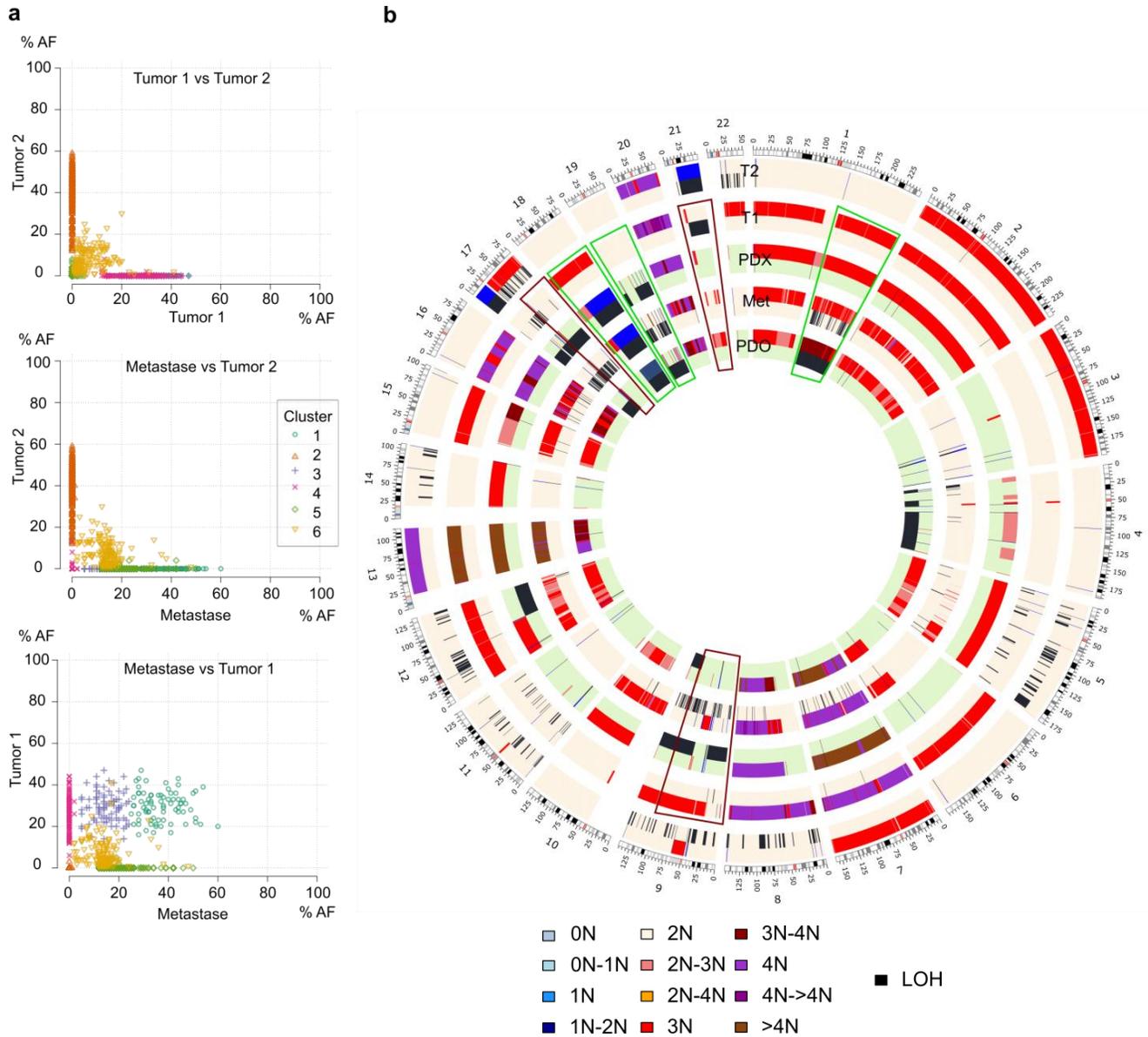
2016 haben Cereda et al. <sup>103</sup> beschrieben, dass bei synchronen CRC Tumoren öfters schädliche Keimbahn-Mutationen in immunabgeleiteten Genen auftreten, verglichen zu solitären CRC Tumoren und zu gesunden Kontrollen aus dem 1000 Genom Projekt. Genauer gesagt, wurden in vier immunbezogenen und in vier krankheitsassoziierten KEGG Gengruppen jeweils eine Akkumulierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen („single nucleotide polymorphism“ - SNP) in synchronen Tumoren gefunden. Wir konnten in unseren Proben von Patient 118, 30 Keimbahnmutationen finden, die auch bei Cereda et al. <sup>103</sup> gefunden wurden, wobei keine der Mutationen in Bezug zu den immun- oder krankheitsassoziierten Gengruppen steht.



**Abbildung 4.8: Eine Übersicht von den Tumoreinheiten und ihre abgeleiteten Modelle des Patienten 118.** Die Tumoreinheit ist über Tumor 1 (T1), Tumor 2 (Tumor 2) und der Metastase (Met) als Prozent angegeben. Die Treibermutationen stehen unter den Tumoreinheiten und gleiche Mutationen sind in einer Farbe dargestellt.

### 4.3.3 Molekulares Profil von Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase

Um die Tumoreinheiten miteinander vergleichen zu können wurden die Informationen von WGS, WES und RNAseq kombiniert. Damit konnten die chromosomalen Kopierzahlen, LOH Regionen, Genfusionen und somatische Mutationen identifiziert werden. Die Blutprobe wurde als Keimbahn-Kontrolle genutzt. Krankheitsrelevante Mutationen wurden ausgewählt, basierend auf der Genexpression und dem Grad der Proteinbeschädigung. Alle drei Tumoreinheiten wurden auf die MSI Marker negativ getestet (siehe Methoden). Die Tumoreinheit von T1, Tumor 2 und Metastase sind jeweils 65%, 85% und 50%. Zudem wurden 59, 34 und 66 schädliche Mutationen für Tumor 1, Tumor 2 und Metastase identifiziert, es gab keinen Überlapp in allen drei Tumoreinheiten. Jedoch teilen Tumor 1 und Metastase 29 gemeinsame Veränderungen, darunter die zwei treibende Mutationen *APC*-E1306X und *KRAS*-G12D (Abbildung 4.8). Durch diese Gemeinsamkeiten, und der Fehlenden zu Tumor 2, konnte die Metastase Tumor 1 zugeordnet werden. Interessanterweise wurden in Tumor 2 auch *APC* und *KRAS* als Treibermutationen identifiziert, obgleich es ein anderer Effekt war (Abbildung 4.8). Neben *APC*-E1306X und *KRAS*-G12D wurden in Tumor 1 und der passenden Metastase eine Mutation in *ARID2*, ein Tumorsuppressorgen in hepatozelluläres Karzinomen <sup>189</sup>, gefunden, allerdings nur subklonal in Tumor 1. Beide Tumoreinheiten teilen eine Fraktion ihrer Mutation, aber ein großer Teil ist nur in der Metastase oder dem Tumor 1 gefunden worden, darunter sind zwei verschiedene *TP53* Mutationen und ein zusätzlicher Hit in *APC* in der Metastase (Abbildung 4.8). Diese Unterschiede können mit einer anfänglichen ITH erklärt werden. Die Klonalitätsanalysen mit SciClone <sup>170</sup> haben unsere vorherigen Ergebnisse bestätigt: von den insgesamt 6 Clustern, die wir für das Trio Tumor 1, Tumor 2 und Metastase gefunden haben, finden wir keines für alle drei. Jede Tumoreinheit hat ein eigenes Cluster und zusätzlich teilen sich Tumor 1/Metastase zwei (Abbildung 4.9a). Ein sehr gering exprimiertes Cluster (Cluster 6) wurde zwar in allen gefunden, jedoch werden solche Cluster auch bei nicht verwandten und zufällig gepaarten Tumoren gefunden. Das CNV Profil verstärkt weiterhin die ITH von Tumor 1, im Vergleich zu der Metastase, zum Beispiel ist Chromosom 21 2n LOH im Tumor 1 aber heterozygot in der Metastase (Abbildung 4.9b).



**Abbildung 4.9: Vergleich von den Tumoreinheiten.** **a)** SciClone Klonalitätsanalysen an Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase. Die Graphen zeigen die Mutationen in diploiden Regionen, geclustert nach der Allelfrequenzen (AF) im Tumor 1 vs. Tumor 2 (oben), Tumor 2 vs. Metastase (Mitte) und Tumor 1 vs. Metastase (unten). Individuelle Mutationsgruppen sind den angedeuteten Farben gezeigt. **b)** Der Circos-Plot zeigt das Chromosomen- und das LOH-Profil von sowohl Tumoren als auch den Modellen. Besonders divergente Regionen sind markiert.

#### 4.3.4 Transkriptom Analysen von Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase

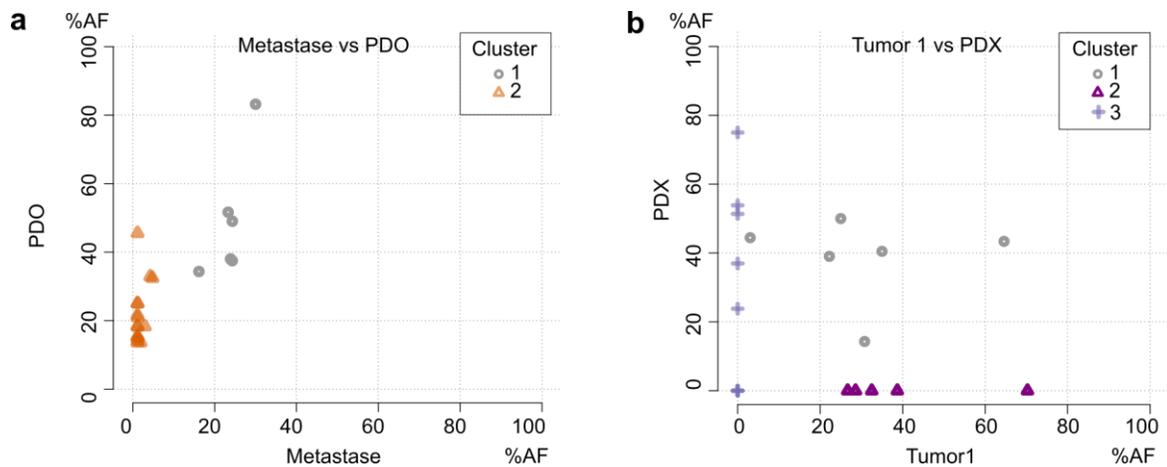
Das Transkriptom Profil von Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase wurden analysiert basierend auf den RNAseq Daten. Es wurden verschiedene Klassifizierungsmethoden publiziert <sup>89-92</sup> unter anderem die CMS-Annotation in vier Gruppen (CMS1-4) <sup>94</sup> und eine OncoTrack <sup>93</sup> CRC Klassifizierung in 3 molekulare spezifischen Gruppen (ASCL2/MYC, ECM/EMT oder Entero/Goblets). Die CMS Annotation bietet zwei Möglichkeiten die Proben zu klassifizieren, jedoch widersprechen sich die zwei Ansätze. Der „Random Forest“ Ansatz im Kontext der gesamten, wird im Kontext einer gesamten Kohorte genutzt und teilt Tumor 1 als CMS3, Tumor 2 als CMS2 ein und die Metastase konnte nicht zugeordnet werden. Die „Single Sample Prediction“, welche Kohorten unabhängig funktioniert, teilt alle drei Proben als CMS2 ein. Die OncoTrack Klassifizierung stimmt mit der „Single Sample Prediction“ überein und teilt alle drei Proben der ASCL2/MYC Gruppe zu, die zu der CMS2 Gruppe korrespondiert, und hauptsächlich durch einen Stammzell Phänotyp charakterisiert wurde. Die OncoTrack Studie geht noch einen Schritt weiter und teilt die Hauptgruppen in jeweils zwei spezifischere Subgruppen ein. Nutzt man diese Einteilung erfolgt eine Auftrennung der Proben in Subgruppe B (Tumor1 und die Metastase) und Subgruppe E (Tumor 2). Die beiden Gruppen unterscheiden sich durch die Expression von an TGFβ/WNT assoziierten Genen, die in der Subgruppe E weniger exprimiert sind im Vergleich zu Tumoren der Subgruppe B.

Die Unterschiede in den transkriptomischen Profilen wurden mittels Differentielle Genexpressionsanalysen (DGEA), zwischen allen drei Tumoreinheiten, analysiert und anschließende funktionale Annotation der Tumor-spezifischen Genen wurden durchgeführt. 74% aller differentiell exprimierten Immunoglobulin Gene waren höher exprimiert in Tumor 1. Deshalb waren auch in den funktionellen Annotation der Gene, spezifisch für Tumor 1, auch Signaturen für „immunoglobulin mediated immune response“ (P:  $1,79 \times 10^{-6}$ ) angereichert. Die Metastase zeigte Anreicherungen in Genen des „Typ I Interferon“ (IFN I) Signalweges (P:  $3,06 \times 10^{-15}$ ) und aktivierte Stress-Signale („response to stress“-P:  $2,41 \times 10^{-12}$ ). Gewebe spezifische Anreicherungen zeigten eine hohe Infiltration von Stoma-Zellen (P:  $2,36 \times 10^{-9}$ ), Blut-Gefäße (P:  $2,64 \times 10^{-9}$ ) und Entzündungs-Zellen (P:  $1,726 \times 10^{-6}$ ). Diese Signale sind im Einklang mit der niedrigsten Tumorreinheit von 50% in der Metastase in dem Patienten. Signifikant angereicherte Darm-Signale konnten für Tumor 1 und Tumor 2 gefunden werden (P:  $2,4 \times 10^{-11}$  und P:  $3,04 \times 10^{-10}$ ). Zudem zeigte Tumor 2 eine besondere Anreicherung von „single-organism metabolic processes“ (P:  $6,5 \times 10^{-14}$ ).

Um den Immun-Status der Tumoreinheiten besser zu charakterisieren wurden publizierte Immunsignaturen<sup>176-178</sup> genommen und die mittlere Expression pro Signatur in Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase analysiert. Alle drei Tumore zeigen wenig Expression in den Immunsignaturen. Jedoch konnte, im Vergleich der drei Tumoreinheiten, nur bei der Metastase eine hohe Expression von IFN I Signaturen festgestellt werden, welche in der DGEA schon beobachtet wurde.

#### 4.3.5 Vergleich von Tumor 1 und der Metastase mit den Modellen

Im nächsten Schritt wurde das Mutationsprofil von den Patienten abgeleiteten Modellen (PDX und PDO) zum Tumor 1 und der Metastase verglichen. Hierbei konnten wir den Grad der ITH weiter beschreiben, dabei war ein großer Teil der somatischen Veränderungen privat für jede Probe, wie zum Beispiel die *SMAD4* Mutation A118V, die nur im PDX detektiert wurde. Aber es gibt auch gemeinsame übereinstimmende Veränderungen, wie die Treibermutationen *APC*-E1306X und *KRAS*-G12D. Die *TP53*-F1345S Mutationen die nur in der Metastase, aber nicht im Tumor 1 gefunden wurden, konnte in beiden Modellen nachgewiesen werden, genauso wie die zusätzliche Mutation in *APC*. Dahingegen wurde die *TP53*-R175H nur in Tumor 1 gefunden (Abbildung 4.8). Überraschenderweise stimmte der Xenograft, der von Tumormaterial von Tumor 1 erstellt wurden, in 66% der gesamten Veränderungen mit der Metastase überein und nur in 40% mit Tumor 1. Das Paar PDO-Metastase zeigte die höchste Übereinstimmigkeit mit 69%. In der Metastase wurde eine *MGAT5-PHF11* Translokation identifiziert und diese konnte im PDO wiedergefunden werden, jedoch nicht im Tumor 1 oder dem PDX. SciClone-Klonalitätsanalysen der Tumor-Model Paare, bestätigt die vorherigen Ergebnisse, mit einem gemeinsamen Cluster an Genen und private für jeder der Tumoreinheiten (Abbildung 4.10), es ist zu erwähnen das bei den SciClone Analysen durch die geringere Abdeckung (WES in den Modellen statt WGS bei den Tumoren) und die Limitierung nur diploide Regionen nehmen zu können, deutlich weniger Gene zur Formung der Cluster genutzt werden können.



**Abbildung 4.10: SciClone Klonalitätsanalysen der Tumor-Modell-Paare.** Der Vergleich von Tumor 1-PDX ist im linken Graphen und der Metastase-PDO Vergleich im rechten gezeigt. Die Graphen zeigen die Mutationen in diploiden Regionen, geclustert nach den Allelfrequenzen (AF). Individuelle Mutationsgruppen sind den ange deuteten Farben gezeigt, und Mutationsgruppen, die geteilt werden in grau.

Um zu testen wie die initiale ITH war wurden verschiedene Regionen des Tumor 1 auf eine Auswahl an aussagekräftigen Mutationen getestet. Es wurden zwei zusätzliche Regionen von Tumor 1 getestet (Region H und F). DNA wurde von FFPE fixierten Slides isoliert und die Mutationen mittels Sanger überprüft. Mutationen, die im Tumor 1 bei der Sequenzierung identifiziert wurden, konnten in beiden Regionen wiedergefunden werden, eine Ausnahme ist *ARID2*, welche Heterozygot in der Metastase, PDX und PDO gefunden wurde aber nur subklonal in Tumor 1. Diese Mutation konnte weder in H noch in F mittels Sanger validiert werden. Alle anderen Mutationen die nur in der Metastase, PDX oder PDO gefunden wurden, konnten nicht nachgewiesen werden (Tabelle 4.1).

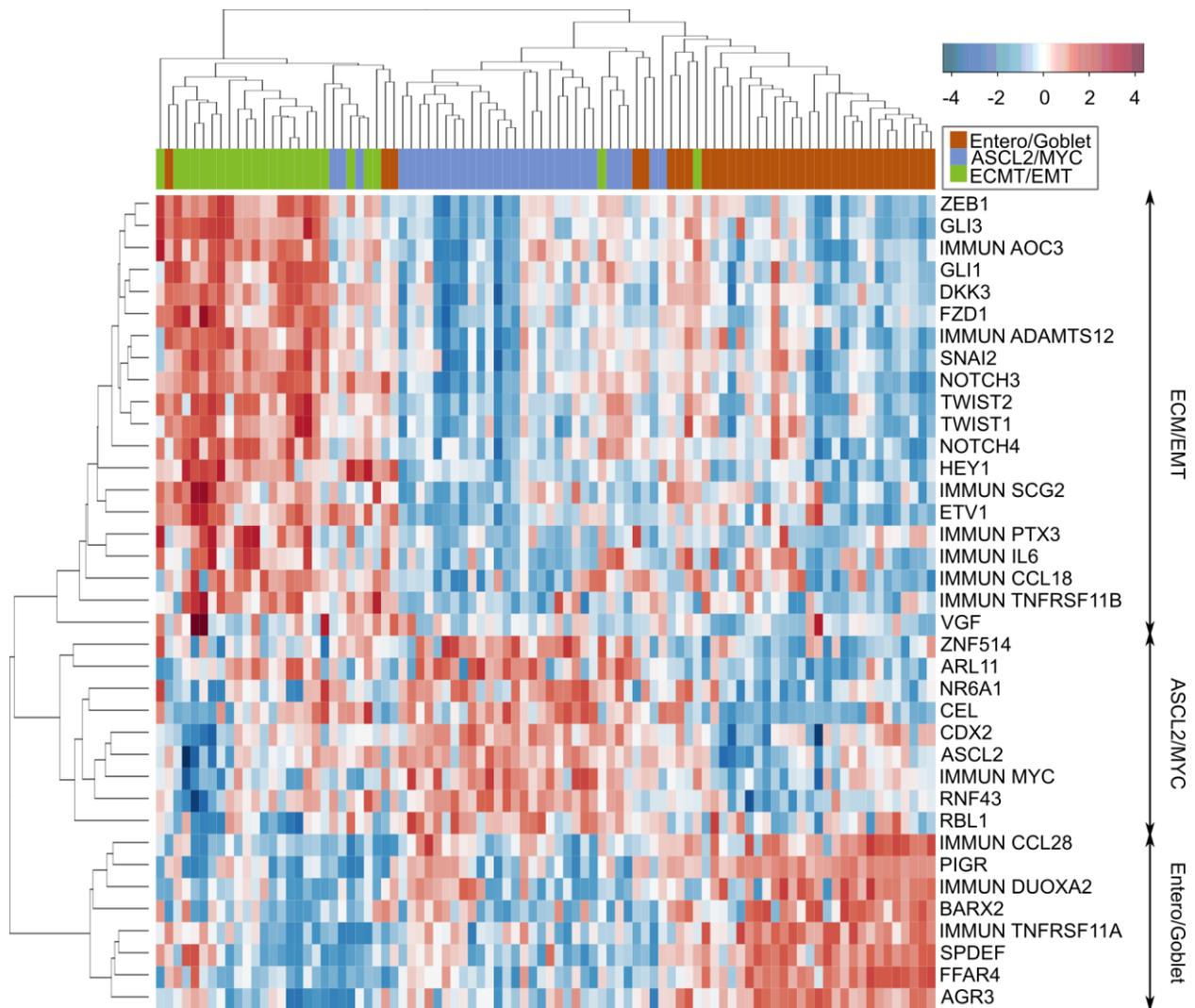
**Tabelle 4.1: Übersicht der CRC-relevanten Mutationen in Tumor 1 (T1), der Metastase, PDX, PDO und den beiden Regionen vom Tumor 1 (H und F).** Subklonale Mutationen wurden mit einem Sternchen markiert. Die Mutationen in T1, Metastase, PDX und PDO wurden mittels NGS detektiert (grün), die Regionen H und F mit Sanger Sequenzierung (orange). Nur Krebs-relevante Gene aus TCGA, PAN und OncoTrack („OT“) Studie sind getestet worden.

Mutation		T1	M	PDO	PDX	H	F
APC_E1306X	PAN/TCGA	■	■	■	■	■	■
APC_R499X		■	■	■	■	■	■
KRAS_G12D		■	■	■	■	■	■
SMAD4_A118V		■	■	■	■	■	■
TP53_F134S		■	■	■	■	■	■
TP53_R175H		■	■	■	■	■	■
ARID2_E194X	OT	■*	■	■	■	■	■
LCP1_V143L		■	■	■	■	■	■
LCP1_V442E		■	■	■	■	■	■
MN1_R728C		■	■	■	■	■	■
SETBP1_S568I		■	■	■	■	■	■

Da der Vergleich des CNV Profils von Tumor 1 und Metastase schon große Unstimmigkeiten ergeben hat, ist der Vergleich zu den Modellen von noch größerem Interesse. Wie oben genannt, wurden im Rahmen der Studie, alle Proben in 3 Gruppen geteilt, basierend auf ihrem chromosomalen Profil. Dementsprechend werden die Metastase und beide Modelle der Hypoploiden-Gruppe zugeordnet, da alle drei Tumoreinheiten eine Deletion von Chromosom 18 vorweisen, wohingegen aber Chromosom 18 von Tumor 1 polyploid (3N) ist und der Tumor somit der Hyperploiden-Gruppe zugehörig ist (Abbildung 4.8b). Aber nicht nur die Kopierzahlen der Tumore unterscheiden sich, auch die LOH Regionen und die Modelle stellen einen Mix von Tumor 1 und der Metastase dar. Als Beispiel ist hier wieder Chromosom 21 zu nennen, der Tumor zeigt eine LOH Region, die Modelle dahingegen aber nicht. Chromosom 9 und 14 der Metastase und des PDX sind zum größten Teil LOH, aber nicht Tumor 1 und PDO. Teile des langen Arms von Chromosom 1 sind in der Metastase und dem PDO LOH, aber nicht im PDX und Tumor 1 (Abbildung 4.8b).

#### 4.4 CRC Subtypen Beschreibung

Man kann CRC-Tumore, basierend auf ihren Expressionen, in molekulare Gruppen einteilen, wie des OncoTrack Konsortium <sup>93</sup> und andere Gruppen <sup>89-92,94</sup> es gezeigt haben. Innerhalb des OncoTrack-Projektes wurden die Gruppen: ECM/EMT, ASCL2/MYC und Entero/Goblet genannt, basierend auf ihren molekularen Funktionen. All diese Gensignaturen beinhalten zwischen 30-300 Gene. Durch funktionelle Annotationen der Signaturen konnten Schlüssel Gene identifiziert werden <sup>93</sup>. Um die Signaturen auf eine Minimalsignatur zu verkleinert, wurden als Startpunkt die Gene genommen, die von Kollegen, zu den drei molekularen Gruppen assoziiert wurden. Um das Clustering zu stabilisieren habe ich zusätzliche differentielle Genexpression zwischen den drei Gruppen durchgeführt und Gene der Minimalsignatur hinzugefügt, nach weiteren Filterschritten konnte daraufhin die Kernsignatur bestimmt werden (Methoden). Zudem wurden differentiell exprimierte Immun-assoziierte Gene der Kernsignatur hinzugefügt. Somit entstand eine Signatur die 20 Gene für die ECM/EMT, 9 Gene für die ASCL2/MYC und 8 Gene für die Entero/Goblet Gruppe beinhaltet Diese Kernsignatur kann die Patienten Tumore (Tumorreinheit von  $\geq 40\%$ ) in die drei molekularen Hauptgruppen einteilen und missklassifizierte nur 10 von 90 Patienten (Abbildung 4.11), wobei 2 von diesen auch in der initialen Klassifizierung zu der jeweils anderen Gruppe geclustert wurden <sup>93</sup>. MSI Proben fallen in die Entero/Goblet Gruppe. Wichtige Gene der ASCL2/MYC Gruppe in den Kernsignaturen sind *ASCL2*, ein Regulator der Stammzellen in den Darm Krypten Zellen, und *CDX2*, welches WNT Signalwege fördert. *TWIST1* und *TWIST2* sind an der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) <sup>190</sup> beteiligt und deshalb ist deren Expression wichtig für die ECM/EMT Gruppe. Ein wichtiges Gen der Entero/Goblet Gruppe ist: *AGR3* ist in den epithelialen Zellen exprimiert und ist ein Paralog des bekannten *AGR2*-Gens, welches in dem Prozess der Metastasierung wichtig ist und ein erhöhtes Protein Level von *AGR2* ist mit einem schlechteren Krankheitsverlauf verbunden <sup>191</sup>. Wir können somit basierend auf der Expression von 36 Genen, Tumore in eine der drei funktional unterschiedlichen Gruppen einteilen (Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11: Expressions-Heatmap der Kernsignatur.** Unbeaufsichtigtes hierarchisches Clustering der Expression von 37 Genen in 90 Patienten. Gene, die zu Immunsignalen assoziiert sind mit dem Wort Immun markiert. Die Einteilung der Patienten in die drei molekularen Gruppen ist oberhalb des Plots gezeigt. Die Gene, die für eine Gruppe spezifisch sind, sind markiert.

## 4.5 Tumormikroumgebung

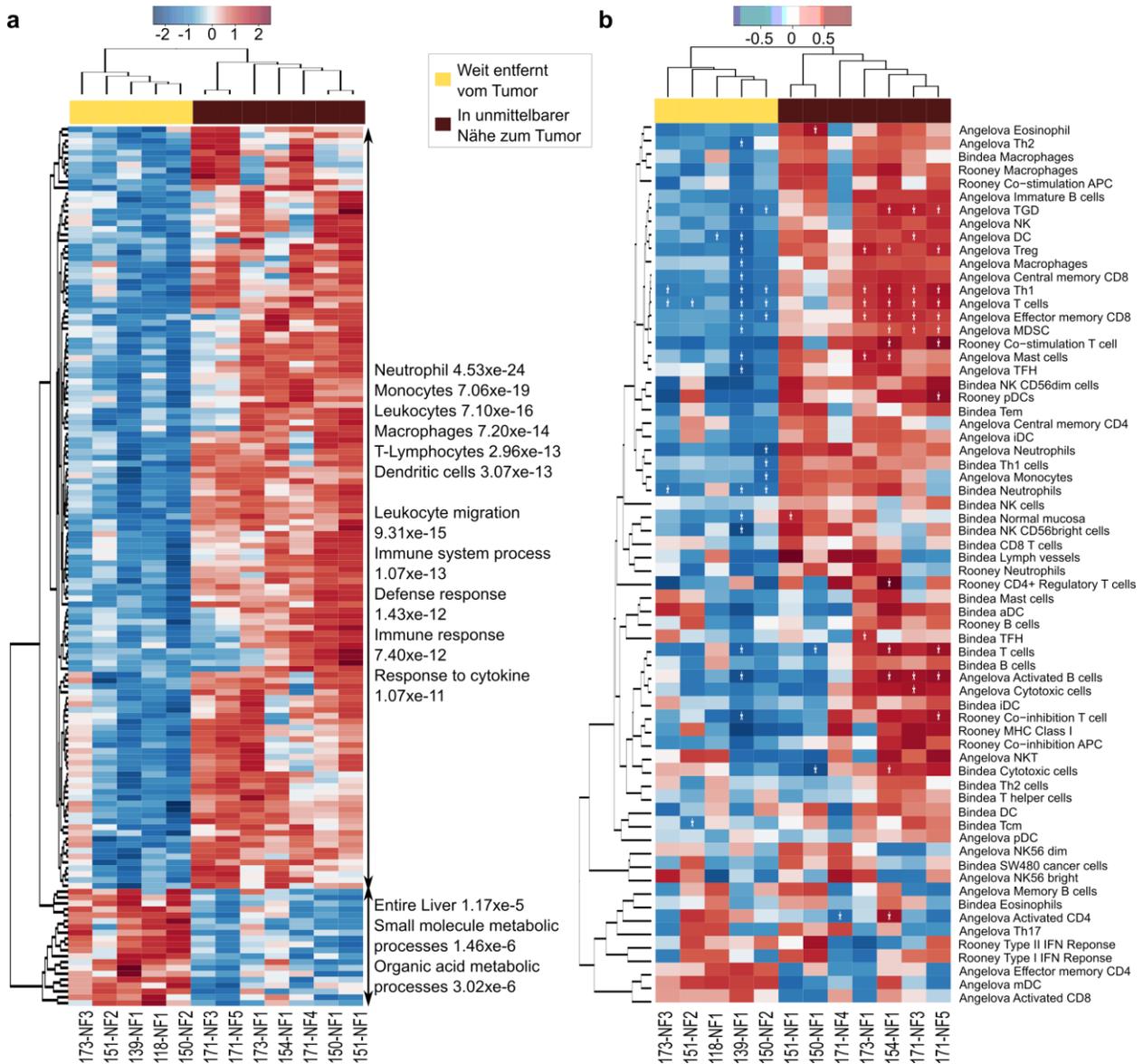
Basierend auf dem Vergleich von Patienten und Modellen hat man die Heterogenität der Tumormasse beobachten können, jedoch sind Tumorklone nicht die einzigen Zellen in dem gesamten Tumor. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Tumormikroumgebung (TME). Zunächst mit der Beschreibung des gesunden Kontrollgewebes und wird dann vertieft in der Identifizierung und Charakterisierung der gesunden Zellen, die in der Tumormasse zu finden sind.

### 4.5.1 Kontrollgewebevergleich

Innerhalb des Konsortiums wurde von einigen Patienten gesundes Kontrollgewebe, entweder Darm (CF, n=31) oder Leber (NF, n=12), entnommen. Aus dem Gewebe wurde RNA extrahiert und sequenziert. Die Leber und Darmkontrollen wurden erstmal unabhängig voneinander untersucht, um näheres zu der Tumorumgebung zu erfahren.

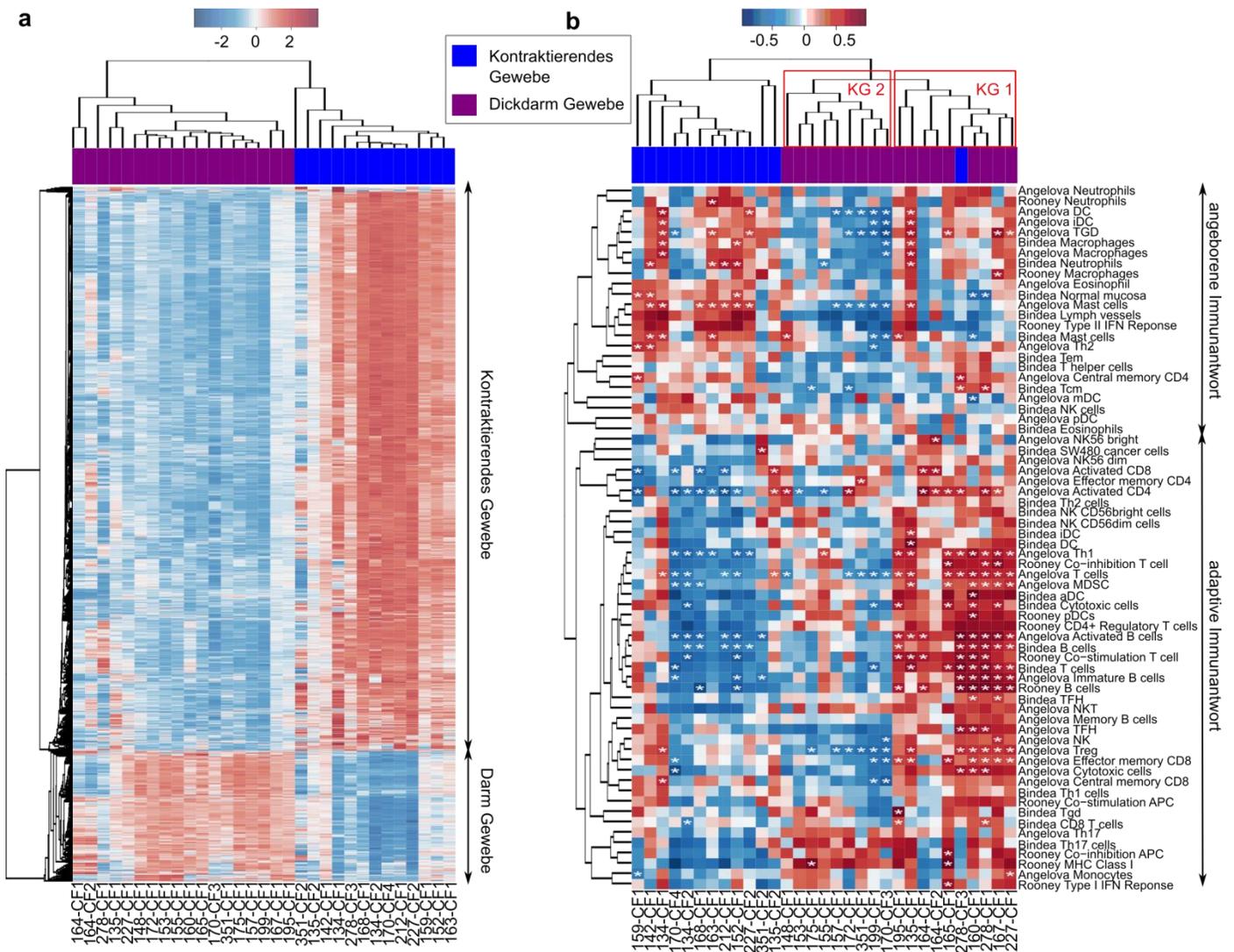
Differentielle Genexpressionsanalyse (DGEA) der 12 Leberkontrollen, ergab eine Aufteilung in zwei Gruppen (Liste der Gene in der Ergänzenden Tabelle 7). Funktionale Annotationen der beiden Gruppen wurden durch Genset-Überrepräsentation mittels GePS Genomatix Software (v3.51106) gemacht. Die eine Gruppe der Kontrollen ergab eine Signatur, die mit der Leber assoziiert werden konnte, im Gegensatz zu den sieben anderen Proben, die sehr starke Immunsignale zeigten. Die Aufteilung der beiden Gruppen, stimmt überein mit der regionalen Annotation am Tag der Operation. Es wurde angegeben, ob die Proben in unmittelbarer Nähe des Tumors lagen bzw. weit entfernt. Somit zeigen gesunde Kontrollen, die in unmittelbarer Umgebung des Tumors liegen sehr starke Immunsignale, wohingegen Kontrollen die weiter entfernt liegen diese nicht haben (Abbildung 4.12a). Um die Immunumgebung weiter zu erörtern, wurde die gemittelte Genexpression von publizierten Immunsignaturen<sup>176-178</sup> pro Kontrollprobe gezeigt (Abbildung 4.12b). Und bei dieser Analyse wiederholt sich die Aufteilung in die zwei Gruppen von Kontrollen, die wir bei DGEA auch gesehen haben. Somit ist auch hier wieder zu erkennen, dass die Gruppe an Kontrollproben, die in der unmittelbaren Tumorumgebung entnommen wurden eine sehr hohe Immun- und Entzündungssignale zeigen im Vergleich zu den Kontrollen weit entfernt vom Tumor, diese zeigen weniger Immun-Anreicherungen. Um sicher zu gehen, dass die Kontrollen, die nahe am Tumor sind, echte gesunde Kontrollen sind und kein Tumorverunreinigungen zeigen, wurden die spezifischen Mutationen der zugehörigen Tumore in den Kontrollen überprüft. Kein einziges Sequenzstück zeigte die Mutation in den Kontrollen. Somit wurde eine Tumorverunreinigung in den Proben

ausgeschlossen. Es scheint, als ob die Kontrollen die weit weg sind die eigentlichen Tumorunabhängige Leber Kontrollen darstellen und das je näher man zum Tumor kommt, mehr Tumor abhängige Immunsignale vorhanden sind.



**Abbildung 4.12: Analysen des Leber-Kontrollgewebes. a)** DGEA Analysen von 12 Leber Kontrollen. Funktionale Annotationen der beiden Gengruppen sind aufgelistet. Dabei sind die GO Termine nicht übersetzt und entsprechen dem Original. **b)** Immunprofil der Leber Kontrollen - die mittlere Genexpression von publizierten Immun-Zelltypen und -Prozessen ist gezeigt. Die Sternchen stehen für statistisch signifikante Unterschiede ( $FDR \leq 0.05$ ). Die Aufteilung in zwei Gruppen bezüglich der Region des Tumors ist in beiden Plots farblich markiert. Dabei sind die Signaturen nicht übersetzt und entsprechen dem Original.

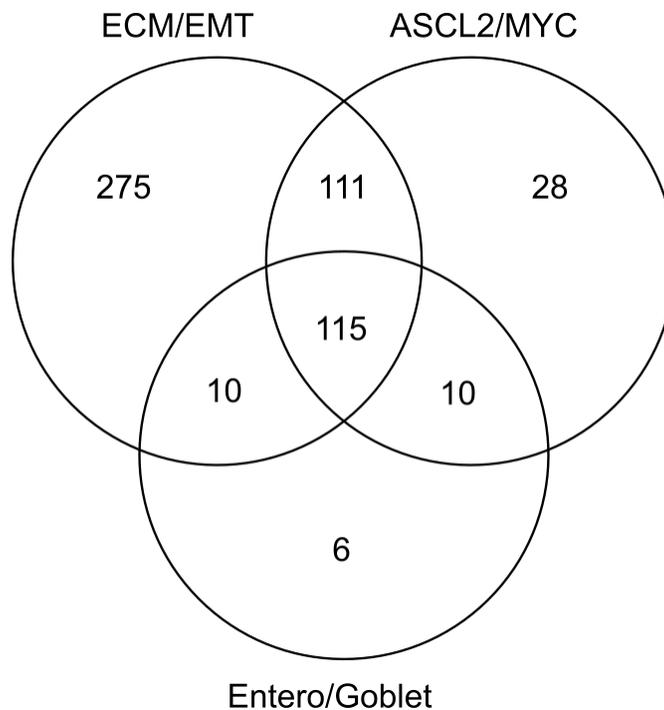
Die DGEA zeigt bei den Darm-Kontrollen, eine klare Auftrennung der Proben in zwei Gruppen (Liste der Gene in der Ergänzenden Tabelle 8) und basierend auf der funktionellen Annotation der Gene, die unterschiedlich exprimiert sind in den beiden Gruppen. Wir konnten diese einteilen in kontrahierendes Gewebe und Darm-Gewebe (Abbildung 4.13a). Diese Klassifizierung kann mit der wahrscheinlichen Region der Entnahme im Darm erklärt werden, somit sind die Kontrollen die als kontrahierendes Gewebe annotiert sind in der submukosalen und darunter liegenden Muskel Region entnommen wurden und zeigen deshalb Expression von Muskel Zellen. Dahingegen hat die Gruppe, die als Darm Gewebe klassifiziert wurde, mehr Mukosa Anteile und auch eine dementsprechende Genexpression. Diese Aufteilung, bis auf eine Ausnahme, sehen wir auch, wenn wir uns die mittlere Expression von Immun-Signaturen anschauen (Abbildung 4.13b). Interessanterweise zeigen die Kontrollen des kontrahierenden Gewebes signifikant weniger Expression und Zellsignaturen des adaptiven Immunsystems, zum Beispiel aktivierende CD4 Zellen, verschiedene T und B-Zellsignaturen. Dahingegen ist in dieser Gruppe die angeborene Immunsignatur stärker ausgeprägt, mit signifikant höheren Signalen für dendritische Zellen, Neutrophile, Mastzellen und Makrophagen (Abbildung 4.13b). Darüber hinaus können wir mittels der Immunsignale die Gruppe der Darmkontrollen in zwei Gruppen aufteilen, einmal eine mit starken Immunsignalen (Kontrollgruppe 1) und eine mit weniger starken Signalen (Kontrollgruppe 2) (Abbildung 4.13b). Und auch hier ist die Aufteilung in adaptiver und angeborener Immunantwort, die Kontrollgruppe 2 zeigt weniger angeborene Zellsignale und die Kontrollgruppe 1 zeigt eine starke adaptive Immunantwort. Was die beiden Kontrollgruppen gemein haben und was zudem in der Gruppe des kontrahierenden Gewebes fehlt, sind hohe Expression von Signalen die mit Th17 Zellen und des Haupthistonkompatibilitätskomplexes („Major Histocompatibility Complex“ - MHC) I korrelieren.



**Abbildung 4.13: Analysen des Dickdarm-Kontrollgewebes. a)** DGEA Analysen von 31 Dickdarm Kontrollen. Funktionale Analysen der beiden Gengruppen sind aufgezeigt. **b)** Immunprofil der Kontrollen - die mittlere Genexpression von publizierten Immun-Zelltypen und -Prozessen ist gezeigt. Die Sternchen stehen für statistisch signifikante Unterschiede ( $FDR \leq 0.05$ ). Die Auftrennung in die adaptive und angeborene Immunantwort ist rechts gezeigt, sowohl die Aufteilung in die Kontrollgruppen 1 und 2 (KG1 und 2 – rote Boxen oberhalb des Plots). Die Aufteilung in zwei Gruppen bezüglich der Region des Tumors ist in beiden Plots farblich markiert. Dabei sind die Signaturen nicht übersetzt und entsprechen dem Original.

## 4.5.2 Zellen in der Tumormikroumgebung

Im nächsten Schritt sollen die Zelltypen der Tumormikroumgebung näher beschrieben werden. Die Tumorreinheit unserer Proben beträgt im Mittel 50%, die anderen 50% gehören zu gesunde Zellen und sind keine Tumorklone, diese werden aber nichtsdestotrotz vom Tumor benötigt um weiter zu wachsen und zu überleben. Um diese Zelltypen näher zu beschreiben nutzten wir die präklinischen Modelle und die dazu passenden Tumore. Denn aus den Transkriptomanalysen der Modelle war deutlich, dass diese keine ECM Signale haben <sup>93</sup>. Da die ECM ein wichtiger Bestandteil der TME ist, konnten wir daraus schließen, dass die Mikroumgebung in den präklinischen Modellen (sowohl PDX als auch PDO) komplett fehlt. Basierend darauf wollten wir Gene identifizieren, die in den Modellen runterreguliert sind (bis hin zu gar nicht exprimiert) jedoch in den Patienten Tumoren exprimiert sind (Die Gene sind in der Ergänzenden Tabelle 2 aufgelistet). In den ganzen Analysen fokussieren wir uns auf die drei Hauptgruppen (ASCL2/MYC, Entero/Goblet und ECM/EMT), da diese molekulare Unterschiede zeigen und somit auch die Umgebung in den drei Gruppen unterschiedlich sein muss. Das heißt zusätzlich sollen die gruppenspezifischen Gene auch nur in den Modellen fehlen, wo der passende Primärtumor zugehört.



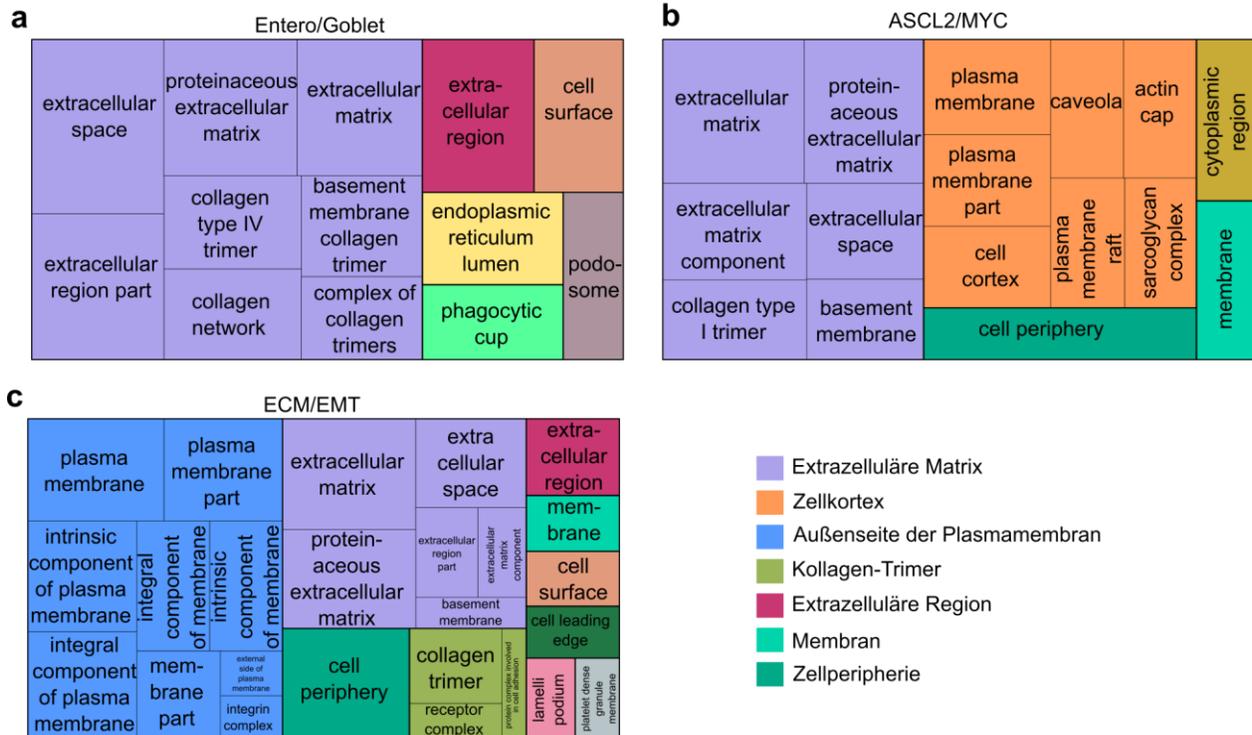
**Abbildung 4.14: TME Gene aufgeteilt nach den molekulare Gruppen.** Venn Diagramm mit der Anzahl an Genen die in den Modellen nicht exprimiert sind, jedoch in den Tumoren.

Unsere Ergebnisse brachten 28 ASCL2/MYC spezifische, 6 Entero/Goblet spezifische, 275 ECM/EMT spezifische Gene und 115 gemeinsame Gene, die die gruppenspezifische und unspezifische TME beschreiben (Abbildung 4.14). Gene, die in allen Modellen verloren sind, aber in allen Tumoren noch exprimiert sind, beschreiben die gruppenunspezifische TME. Durch funktionelle Annotation der 115 Gene, konnte als erstes festgestellt werden, dass Signale der Extrazellulären Matrix, Plasma Membran und Kollagen Komplexe signifikant angereichert sind (Abbildung 4.15 und Ergänzende Tabelle 2). Schaut man sich die molekularen Funktionen an, so bilden sich verschiedene Gruppen von Funktionen, einmal die am signifikantesten: Immunoglobulin- und Wachstumsfaktor-Bindung ( $2.85 \times 10^{-7}$  und  $1.27 \times 10^{-6}$ ). Aber auch Signale für den Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) sind angereichert ( $2.37 \times 10^{-4}$ ), welches in der Angiogenese wirkt, daneben wird die Migration von Monozyten und Makrophagen durch VEGF stimuliert <sup>192</sup>. Dies ist von Bedeutung im Herbeirufen der Immunzellen zur Tumormasse. Die biologischen Prozesse erlauben uns einen weiteren Einblick in die TME. Dabei ist Adhäsion ein sehr angereicherter Prozess ( $5.51 \times 10^{-16}$ ), ähnlich signifikant ist der Prozess der Zellmigration ( $6.50 \times 10^{-16}$ ). Andere wichtige Bereiche sind die humorale Immunantwort und all die dazu gehörigen Prozesse, sowie wie eine Stress Response, Angiogenese und darunter auch Entwicklung von Gewebe und zuletzt auch die Zell-Proliferation (Abbildung 4.15 und Ergänzende Tabelle 2). Zusammen betrachtet scheinen die Gene die wir als TME identifiziert haben alle Bereiche der Umgebung abzudecken. Angefangen mit der Extrazellulären Matrix, Immunzellen, Blutgefäße und Membransignalen. Diese Beobachtungen machen wir auch wenn wir uns, die signifikanten Gewebe spezifischen Signale, beschreibend für unsere Liste an Genen, betrachten. Darunter sind Blutgefäße ( $4.84 \times 10^{-20}$ ), Stroma Zellen ( $7.07 \times 10^{-16}$ ), ECM ( $1.16 \times 10^{-15}$ ), Myofibroblasten ( $1.15 \times 10^{-09}$ ) und Immunzellen (unter anderem Monozyten ( $3.00 \times 10^{-12}$ ), Neutrophile ( $9.32 \times 10^{-11}$ ), Makrophagen ( $1.64 \times 10^{-10}$ ) und dendritische Zellen ( $2.21 \times 10^{-08}$ )) (Ergänzende Tabelle 2). Diese Analysen zusammengenommen bestätigt die vorangegangene Hypothese, dass die TME in den präklinischen Modellen fehlt und durch den Vergleich mit ihren passenden Primärtumoren identifiziert werden kann.



Um die gruppenspezifische Tumormikroumgebung zu beschreiben, haben wir auch hier eine funktionelle Genannotation durchgeführt. Dabei sind die Ergebnisse der zellulären Komponente in Abbildung 4.16 für jede der drei Gruppen gezeigt, die biologischen Prozesse und molekularen Funktionen sind im Anhang per Gruppe aufgelistet. Alle drei Gruppen zeigen Signale der ECM (lila Kacheln in der Abbildung 4.16). Die Entero/Goblet spezifische Gruppe besteht aus 7 Genen, welche nichtsdestotrotz starke ECM Komponente zeigen. Die 28 Gene, die die ASCL2/MYC Gruppe bilden, zeigen zusätzliche starke Signale des Zell-Kortexes (Abbildung 4.16b). Die ECM/EMT Gruppe, die mit Abstand die größte ist mit 275 Genen. Neben den ECM Signalen sind auch Komponente der Plasma-Membran und der Kollagen-Bildung angereichert (Abbildung 4.16c). Schaut man sich die biologischen Prozesse der verschiedenen Gruppen an, so kann man die Unterschiede innerhalb besser beschreiben. Die ASCL2/MYC spezifischen Gene, zeigen angereicherte Signale des *ERK1* und *ERK2* Kaskade ( $2.54 \times 10^{-5}$ ) (Ergänzende Tabelle 3). Die ECM/EMT Gene, zeigen zusätzliche Anreicherungen der Zell-Adhäsion ( $1.61 \times 10^{-14}$ ) und Migrations-Prozesse ( $6.83 \times 10^{-13}$ ). Zudem findet man weitere Immunsignale, wie Verteidigungs-Response ( $6.56 \times 10^{-11}$ ) und allgemeiner Immunsystem Prozesse ( $7.05 \times 10^{-9}$ ). Zudem sind auch Prozesse zur Blutgefäß Bildung angereichert ( $9.75 \times 10^{-8}$ ). Weitere Analysen zeigen gewebespezifische Anreicherungen in Zelltypen wie endothelial Zellen ( $8.34 \times 10^{-11}$ ), Stroma-Zellen ( $9.74 \times 10^{-9}$ ) und Immunzellen (Leukozyten ( $2.10 \times 10^{-18}$ ), Monozyten ( $1.27 \times 10^{-16}$ ), dendritische Zellen ( $3.18 \times 10^{-14}$ ), Neutrophile ( $1.32 \times 10^{-12}$ ) und Makrophagen ( $8.23 \times 10^{-12}$ )) und Stroma ( $9.74 \times 10^{-9}$ ) (Ergänzende Tabelle 4). Die Entero/Goblet Gruppe zeigt Myofibroblasten Signale in den gewebespezifischen Anreicherungen ( $9.56 \times 10^{-5}$ ) (Ergänzende Tabelle 5).

## Gruppenspezifische Tumormikroumgebung



**Abbildung 4.16: Funktionelle Annotationen der gruppenspezifischen Gene der TME.** Die funktionellen Analysen sind mittels "Gene-Ontology" (GO)-Terme beschrieben. Die angereicherten zellulären Komponenten sind in einem sogenannten Kacheldiagramm („TreeMap“) dargestellt. GO-Terme, die zusammen gefasst werden können sind in einer Farbe hinterlegt und der Oberbegriff ist genannt. Die Größe der Kacheln korreliert zu dem  $\log_{10}$  P-Wert, dabei gilt je größer die Kachel desto signifikanter ist der GO-Term. Dabei sind Gene spezifisch für die Entero/Goblet-Gruppe (6 Gene) in **a**) gezeigt, die in ASCL2/MYC (28 Gene) in **b**) und die ECM/EMT-Gene (275 Gene) in **c**). Dabei sind die GO-Terme nicht übersetzt und entsprechen dem Original.

Aus den gruppenspezifischen Gen-Listen wurde, basierend auf einer manuellen Untersuchung (Methoden), eine Kandidaten Liste an Genen erarbeitet, die wichtig für die TME der jeweiligen molekularen Gruppe sind. Diese sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Zwei Gene (*GREM1* und *LCP1*) beschreiben die TME der Entero/Goblet Gruppe, sieben Gene (*CALD1*, *LOXL1*, *GPX8*, *SLC43A3*, *CALHM2*, *IFI16* und *PRKCDBP*) die der ASCL2/MYC Gruppe und fünf Gene die der ECM/EMT Gruppe (*SLC15A3*, *FPR3*, *FNDC4*, *RASSF8* und *LTC4S*)

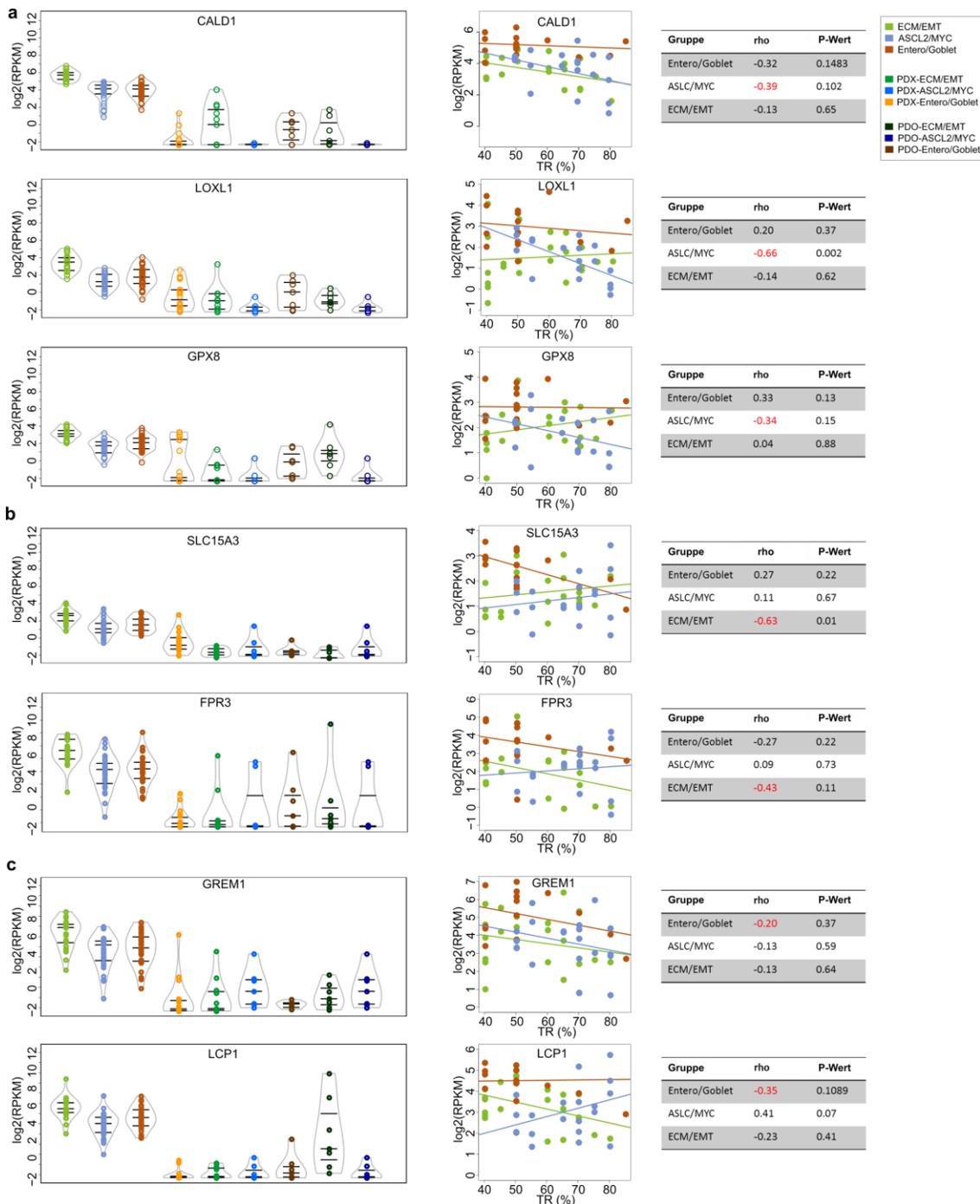
**Tabelle 4.2: Kandidatengene der gruppenspezifischen TME.** Zwei Gene sind für die Entero/Goblet Gruppe ausgewählt worden, sieben für die ASCL2/MYC Gruppe und fünf für die ECM/EMT Gruppe.

Kandidatengene	Molekulare Hauptgruppe
<i>GREM1</i>	Entero/Goblet
<i>LCP1</i>	Entero/Goblet
<i>CALD1</i>	ASCL2/MYC
<i>LOXL1</i>	ASCL2/MYC
<i>SLC43A3</i>	ASCL2/MYC
<i>CALHM2</i>	ASCL2/MYC
<i>IFI16</i>	ASCL2/MYC
<i>GPX8</i>	ASCL2/MYC
<i>PRKCDBP</i>	ASCL2/MYC
<i>SLC15A3</i>	ECM/EMT
<i>FNDC4</i>	ECM/EMT
<i>RASSF8</i>	ECM/EMT
<i>FPR3</i>	ECM/EMT
<i>LTC4S</i>	ECM/EMT

*CALD1* ist ein ASCL2/MYC spezifisches Gen und dementsprechend nur in den Modellen der ASCL2/MYC Tumore nicht vorhanden (Abbildung 4.17a). *CALD1* kodiert für ein Calmodulin und Aktin bindendes Protein, welche eine Rolle in der Regulation von Muskelzellen spielt, in einer Studie in Brustkrebs wurde gezeigt, dass Annexin-A1 und *CALD1* mit Resistenzen zu Tamoxifen assoziiert werden, man hat eine schlechtere Prognose, wenn das *CALD1* Level niedriger ist <sup>193</sup>. Ein anderes Gen in der ASCL2/MYC Gruppe ist *LOXL1* (Abbildung 4.17a). Das Gen codiert für ein Mitglied der Lysyloxidase-Proteinfamilie. Die Proteinfamilie wurde spezifisch im Zusammenhang mit metastasierendem Krebs und in der Extrazelluläre Matrix Umstrukturierung genannt <sup>194</sup>. Zudem wurden Veränderungen der Gene der Familie in verschiedenen Krebsarten beschrieben, wie zum Beispiel eine verringerte LOX Expression in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen („head and neck squamous cell carcinomas“ - HNSCC) <sup>195</sup> und Magenkrebs <sup>196</sup>. *LOXL1* und *LOXL4* sind im Kontext von Blasenkrebs beschrieben <sup>197</sup>. Ein anderer interessanter Kandidat ist *GPX8* (Abbildung 4.17a), welches eine Glutathionen Peroxidase ist und die Lipid Hydroperoxidase, sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziert <sup>198</sup>. Ferroptose ist eine Art von Zelltod und wird durch *GPX4* reguliert, es wurde auch gezeigt, dass ein knockdown von *GPX8* die Zell Viabilität beeinflusst <sup>199</sup>. Für die ECM/EMT Gruppe sind zwei Gene aufgrund ihrer Aktivität sehr interessant, einmal *SLC15A3* und *FPR3* (Abbildung 4.17b). Genauer beschrieben ist *SLC15A3* beteiligt an der phagozytischen Regulierung von Makrophagen. In dendritischen

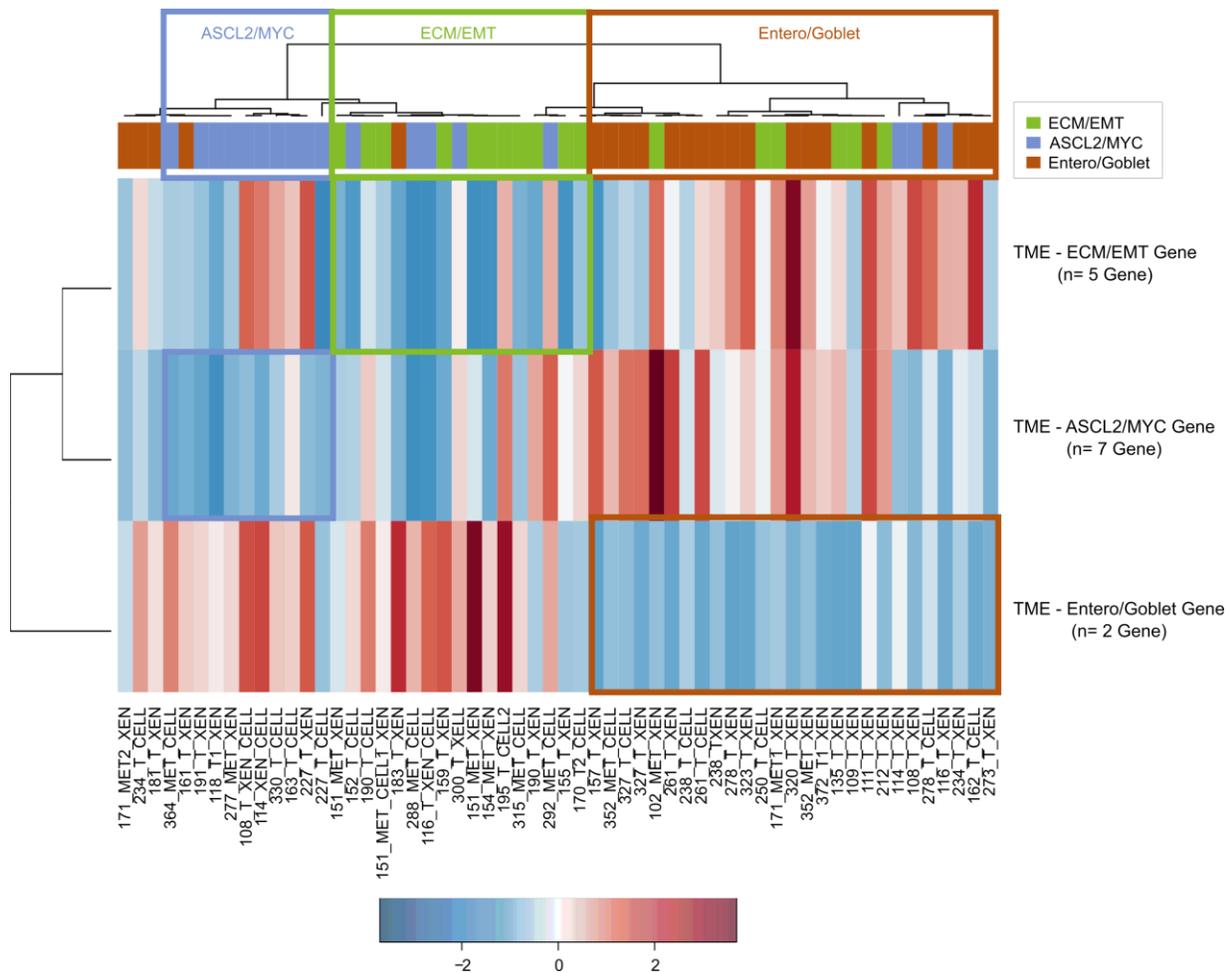
Zellen hingegen werden das intrazelluläre Aufspüren von Pathogenen nach der nach Toll-Like-Rezeptor-Stimulation durch *SLC15A3* reguliert <sup>200</sup>. *FPR3* ist ein Mitglied der Formyl Peptid Rezeptorfamilie und diese werden hauptsächlich von phagozytischen Leukozyten von Säugetieren exprimiert und fungieren als Tumorsuppressor im Magenkrebs, indem die Angiogenese inhibiert wird. Weiter kann *FPR3* die EMT Transition einleiten <sup>201</sup> und ist daher ein sehr interessantes Gen im Hinblick auf die TME. Die Entero/Goblet Gruppe war die mit Abstand kleinste Gruppe mit nur 6 Genen und dabei waren keine eindeutigen Kandidaten, basierend auf ihrer Expression, dabei. Nichtsdestotrotz haben zwei Gene sehr interessante Funktionen und bilden daher die beiden Gen-Kandidaten der Gruppe: *GREM1* und *LCP1* (Abbildung 4.17c). Dabei wird *GREM1* von Krebs assoziierte Fibroblasten (CAFs) exprimiert und kann somit das Tumorwachstum bestärken, dies wurde in Basalzellkarzinomen gezeigt <sup>202</sup>. Und somit ist eine direkte Rolle zum TME und *GREM1* vorhanden. Passend dazu wurde in den funktionellen Genanalysen bei der Entero/Goblet Gruppe als einzige eine spezifische Anreicherung in Myofibroblasten gefunden (Ergänzende Tabelle 5). *LCP1* wurde in verschiedenen Tumoren beschrieben und ein knockdown des Genes führte zu weniger Zell Proliferation, Invasion und Migrationsaktivitäten der Tumorzellen <sup>203</sup>.

Um die Auswahl der Gene und ihre Bedeutung für die TME weiter zu bestätigen wurde eine Kontroll-Analyse gemacht, welche für die oben genannten Gene in Abbildung 4.15 im mittleren Plot und die Korrelations-Ergebnisse auf der linken Seite gezeigt sind. Dabei wurden nur die Tumor-Proben genutzt und die Korrelation von der Expression des Genes zu der Tumorreinheit ausgerechnet. Dabei sollten besonders reine Tumore (mit einem hohen prozentualen Anteil an Tumorklone) eine niedrigere Expression von den Genen haben und im Umkehrschluss die Tumore, die eine hohe Infiltration von anderen Zelltypen haben und somit einen niedrigeren prozentualen Anteil an Tumorklone, eine höhere Expression. Um zu bestimmen, ob ein Zusammenhang zwischen der Tumorreinheit und der Expression-Werte vorliegt, wurde die Spearmans Rangkorrelationskoeffiziente ( $\rho$ ) für jedes Gen berechnet. Für die sieben Genkandidaten, die in Abbildung 4.17 gezeigt sind, sind die Koeffizienten in der jeweiligen Gruppe am besten. Dies spricht wieder für die Gruppenspezifität der Gene zu den drei molekularen Gruppen.



**Abbildung 4.17: Expressionsanalysen einiger Kandidatengene der gruppenspezifischen TME.** Rechte Seite: zeigt die Expression ( $\log_2(\text{RPKM})$ ) der Patienten, PDX & PDO jeweils aufgeteilt in die drei molekularen Gruppen (ASCL2/MYC, ECM/EMT & Entero/Goblet). Mittig: Streudiagramm der Patiententumor Expression ( $\log_2(\text{RPKM})$ ) vs. der Tumorreinheit (TR – in Prozent). Die Zugehörigkeit zu den drei molekularen Gruppen ist farblich markiert. Linke Seite: Spearmans Rangkorrelationskoeffizient im Zusammenhang von Tumorreinheit und der Expression-Werte für jedes Gen innerhalb der molekularen Gruppe. Dabei ist rho und der P-Wert für jede Gruppe gezeigt und der niedrigste Korrelationswert ist rot markiert. In **a**) sind drei Gene der ASCL2/MYC Gruppe gezeigt, in **b**) zwei Gene der ECM/EMT Gruppe und in **c**) zwei Gene der Entero/Goblet Gruppe.

Als letztes wird die Stabilität der Kandidatengene als Signatur zur Beschreibung der TME in den drei molekularen Gruppen getestet. Dafür wurden die Kandidatengene (Tabelle 4.2) einer Gruppe als TME-gruppenspezifische Signatur fusioniert. Und die mittlere Expression der Signatur wurde für die PDX und PDO Modelle berechnet und als Heatmap dargestellt. Da die Modelle hierfür genutzt werden und diese keine TME haben, sollte die TME-Signaturen in ihre jeweiligen Gruppe nicht exprimiert sein. Es wurde ein Unbeaufsichtigtes hierarchisches Clustern der Modelle vorgenommen (Abbildung 4.18). Dabei konnten wir unsere drei molekularen Gruppen der Patienten innerhalb der Modelle annähernd wieder rekonstruieren können und dies zeigt, dass die 14 TME Kandidatengene die verschiedene molekulare Umgebung der Tumore widerspiegeln.



**Abbildung 4.18: Expressions-Heatmap der gruppenspezifischen Kernsignaturen der TME in den präklinischen Modellen.** Unbeaufsichtigtes hierarchisches Clustern von der Expression der drei Kernsignaturen der gruppenspezifischen TME. Die Anzahl der Gene in jeder Signatur ist aufgelistet und in 58 PDX und PDOs gezeigt. Die Einteilung der Modelle in die drei molekularen Gruppen ihrer passenden Primärtumore ist oberhalb des Plots abgebildet

## 5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit der Tumorheterogenität und der Tumormikroumgebung von CRC auseinander. Dafür wurden mehr als 100 Patienten, 59 *in vivo* Modelle, 46 *in vitro* Modelle und 43 Darm/Leber-Kontrollgewebe Proben analysiert. Ein erstes Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Tumore und Modelle, darüber hinaus auch die Vergleichbarkeit aller Tumoreinheiten. Dabei werden die verschiedenen Formen von Heterogenität (Inter und Intra, wie auch eine sowohl räumliche als auch eine temporale ITH) untersucht und analysiert. Ein weiteres Ziel ist es die Tumormikroumgebung zu charakterisieren, einmal das gesunde Gewebe (ohne Tumoranteile) und einmal die Zellen, die in der eigentlichen Tumormasse zu finden sind.

### *Charakterisierungen der molekularen Profile der Tumore und Modelle in der Kohorte*

Im ersten Schritt wurden die kompletten molekularen Profile aller Tumoreinheiten und Modellen bestimmt, um diese in einem zweiten Schritt zu vergleichen. Zu der Profil-Bestimmung gehört auch, die Genfusionsanalyse, welche 145 identifizierte Fusionen ergab, darunter CRC bekannte *PTPRK-RSPO3* Fusionen<sup>179</sup>. Darüber hinaus auch Fusionen, die in der Behandlung mit Medikamenten von Interesse wären, beispielweise eine aktivierende Genfusion in *ALK* in einem PDX (Abbildung 4.1e), welches in den Arzneimittelsensitivitäts-Analysen auf Crizotinib angesprochen hat. Crizotinib ist für nichtkleinzelliger Lungenkarzinome („non small cell lung carcinoma“ – NSCLC) Patienten mit einer Reorganisation von *ALK* seit 2011 als Behandlung zugelassen<sup>183</sup>. In unserer Studie wurde zum ersten Mal eine *ALK*-Reorganisation und eine damit einhergehende Crizotinib-Sensitivität im Kontext von CRC beobachtet. Eine weitere Fusion, die auch das erste Mal für CRC beschrieben wurde ist *TRIM24-BRAF* in Patient 196\_T (Abbildung 4.1d), wobei *BRAF* aktiviert wird. Dabei werden Mutationen in *BRAF* in 10% der CRC Patienten gefunden<sup>204</sup>. In Melanomen wurde eine solche *TRIM24-BRAF* Fusion identifiziert und es wurde nachgewiesen, dass der MAPK-Signalweg aktiviert wird in den Patienten mit der Fusion und welche wiederum sensitiv auf MEK-Inhibitoren reagieren<sup>180</sup>. Leider ist für den Patienten 196\_T kein Modell vorhanden, um eine gegebene Sensitivität zu MEK-Inhibitoren zu überprüfen, da dies ein vielversprechender Kandidat wäre. Ein weiterer Teil des molekularen Profils sind die chromosomalen Veränderungen. Die Kohorte lässt sich, basierend auf den Verlusten von einigen Chromosomen oder Chromosomenabschnitten, in drei Gruppen aufteilen. Die Aufteilung basiert auf dem Verlust von Chromosom 18 und Chromosom 17p. Beides sind Regionen, die schon vorher mit CRC in Verbindung gebracht wurden und mit einer schlechteren Krankheitsprognose korrelieren, auf grund der MMR- und Tumorsuppressorgene, die in diesem

Bereich liegen <sup>205</sup>. Die drei Gruppen sind wie folgt definiert: Hypoploid-, Hyperploid und die chromosomal stabile MSI-Gruppe. Die MSI-Tumore sind dafür bekannt, einen hypermutierten Phänotyp zu haben und chromosomal stabil zu sein <sup>50,206</sup>. Genau dies konnte in unseren Analysen bestätigt werden. MSI-Tumore haben zwischen 577-1917 Mutationen (Median von 1025) mit sehr vielen Indels, dahingegen haben MSS-Tumore zwischen 35-233 (Median von 108) nicht synonyme Mutationen in proteinkodierenden Genen. MSS Tumore zeigen viele chromosomale Veränderungen, wobei MSI-Tumore fast ausschließlich diploid sind (Abbildung 4.3a+b). In der Hypoploiden Gruppe sind unter anderem *SMAD4* und *PTEN* betroffen (Abbildung 4.3a+b). Dabei spielt *SMAD4* eine zentrale Rolle im TGF $\beta$  Signalweg. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass *SMAD4*-Deaktivierungen (entweder durch eine Mutation oder durch den Verlust von Chromosom 18) mit der Metastasierung <sup>207</sup>, Resistenzen zu 5-fluorouracil (5-FU) Chemotherapie <sup>208</sup> und mit allgemein schlechteren Überlebensraten korreliert <sup>209</sup>. *PTEN* ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen, welches in die homöostatische Aufrechterhaltung des PI3K/Akt Signalweges involviert ist <sup>210</sup>. Die klinische Auswirkung von *PTEN* Verlusten in CRC ist zweigeteilt, einerseits gibt es verschiedene Studien, die einen Verlust von *PTEN* mit einem fortgeschrittenen Tumor, Metastasierung und einem allgemein schlechteren Verlauf im Zusammenhang bringen <sup>211,212</sup>. Andererseits gibt es ebenso Studien, nach denen keine Korrelation aufgezeigt werden konnte <sup>213,214</sup>. Unabhängig von spezifischen Genen ist ein Verlust von Chromosom 18q als prognostischer Marker in Stadium II Tumore definiert <sup>215</sup>. Zusammengenommen bedeutet dies für unsere Hypoploiden-Gruppe eine wahrscheinlich schlechtere Prognose. Es fehlen jedoch Daten zu den Krankheitsverläufen der Patienten, um einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Hypoploiden-Gruppe und der CRC-Progression feststellen zu können.

#### *Inter- und Intra- Tumorerogenitätsanalysen*

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit war es das Potential und damit eingehend auch die Limitierungen von präklinischen patienten-abgeleiteten Modellen zu evaluieren. Damit die Modelle zuverlässig die Arzneimittelsensitivität vorhersagen können, müssen diese die komplexen molekularen und biologischen Eigenschaften des Tumors widerspiegeln, sowohl die Inter- als auch die Intra-Tumorerogenität. Das Vorkommen von verschiedenen genetischen Profilen innerhalb einer Erkrankung ist eine Art der Inter-Tumorerogenität. Denn nicht nur das Tumorstadium ist für den Krankheitsverlauf wichtig, sondern auch die molekularen Profile der Tumore <sup>216</sup>. Man kann Tumore anhand der genetischen Veränderungen und den damit einhergehenden Eigenschaften eines Tumors unterschiedlich behandeln. Dabei ist das

prominenteste und am weitesten verbreitete Beispiel für CRC, der Mutationsstatus von *KRAS*, bei dem ein Patient mit einem mutierten Gen keine Behandlung mit EGFR-Inhibitoren ausgesetzt wird <sup>217</sup>. Die Inter-Tumorheterogenität zeigt sich auch anhand bekannten molekularen Phänotypen (MSI, CIMP und CIN). Eine weitere Ebene der Inter-Heterogenität, ist die Einteilung der Tumore in molekulare Gruppen basierend auf ihren Transkriptom Daten. Hierbei werden den verschiedenen Gruppen verschiedene molekulare Eigenschaften zugeschrieben <sup>93,94</sup>. Basierend auf vorhergesagte Medikamentensensitivitäten innerhalb der OncoTrack-Studie, wurden 5-FU sensitive Tumore hauptsächlich in der Entero/Goblet Gruppe gefunden und die höchste Cetuximab Sensitivität in den Tumoren der ASCL2/MYC Gruppe <sup>93</sup>. Diese Inter-Tumorheterogenitäts-Korrelation mit der Medikamentensensitivität wurde innerhalb dieser Arbeit als Anlass genommen, um die NGS-basierten Einteilung der Tumore in die molekularen Gruppen, mit der Expression möglichst weniger Gene zu beschreiben. In Abbildung 4.11 ist die effektive Aufteilung der Tumore in die Gruppen basierend auf der Minisignatur gezeigt, dabei hat diese den Vorteil, dass man die Tumore nun mehr anhand von 37 Gene in die molekularen Gruppen einteilen kann. Somit könnte man, in einem nächsten Schritt, die transkriptom-abhängige Inter-Tumorheterogenität von CRC in der Klinik anhand der 37 Gene bestimmen und diese Information könnte bei der Therapieauswahl helfen, ähnlich wie es heutzutage schon bei dem Mutationsstatus von *KRAS* durchgeführt wird <sup>217</sup>. Hierbei ist anzumerken, dass die Minisignatur, zur Einteilung in die molekularen Gruppen, und die Korrelation von Medikamentensensitivität zu den molekularen Gruppen weiter untersucht und validiert werden muss. Jedoch ist nicht nur die Inter-Tumorheterogenität ein Faktor, der bei der Medikamentenentwicklung und Evaluierung von präklinischen Modellen eine Rolle spielt, sondern auch die Intra-Tumorheterogenität (ITH). Dafür wurden die molekularen Profile von Tumoren und Modellen verglichen und die Übertragbarkeit von präklinischen Modellen und ihre Fähigkeit, die morphologischen und genetischen Eigenschaften des Donor-Tumors, zu rekapitulieren untersucht. Unsere Daten ermöglichen einen Vergleich von *in vivo* und *in vitro* Modellen. Die Studienlage hierzu ist jedoch kontrovers, da es sowohl Studien gibt, die zeigen, dass PDX besser abschneiden als Standard Zellkultur Ansätze im Hinblick auf das Reproduzieren der molekularen Eigenschaften, so wie auch auf die Arzneimittelsensitivität <sup>218,219</sup>, aber wiederum auch Studien bestehen, welche den Fortschritt in der Organoid Entwicklung zeigen und dahingehend bessere Ergebnisse für Organoide <sup>120</sup>. Insgesamt konnten in unserer Studie die meisten Modelle das genetische Profil ihrer Tumore rekapitulieren. Wenn man sich die Unstimmigkeiten in den genetischen Profilen anschaut sind genauso viele PDX wie auch PDOs betroffen und kein Modellsystem zeigt gegenüber den anderen einen Vorteil in der

Reproduktion der molekularen Eigenschaften. Im Kontext von CRC muss bei der Begutachtung von Modell-Systemen die ITH beachtet werden. Dementsprechend fanden wir Modelle die im Mutations-Profil und/oder in den chromosomalen Kopierzahlen deutliche Unterschiede aufweisen (Abbildung 4.3a und Abbildung 4.4a). Um sicherzustellen, dass die gefundenen Unterschiede nicht auf unzureichende Sequenzierung zurückzuführen sind, wurden Mutationen in sechs Genen (*PIK3CA*, *APC*, *SMAD4*, *TP53*, *mTOR* und *EGFR*) mit gezielt tiefer Sequenzierung („deep targeted sequencing“) überprüft und bestätigten unsere initialen NGS-Ergebnisse. Um zusätzlich einen genetischen Drift bei der Modell-Erstellung auszuschließen wurden Mutationen in vier PDOs von frühen vs. ihren späten Passagen miteinander verglichen und anschließend fünf PDX von demselben Stück Tumor untereinander. Alle zeigten ein homogenes Bild mit kaum Änderungen (Abbildung 4.3b+c). Daher müssen die gefundenen Unterschiede die ITH reflektieren und sind bei der Probenverteilung entstanden. Dies bedeutet, dass der Teil der als eigentlicher Tumor analysiert wurde, teilweise andersartigen Tumorklone enthielt, als der Teil, der für die Erstellung der Modelle genutzt wurde. Diese Beobachtung geht einher mit dem „Big Bang“-Modell der CRC-Tumor Entwicklung, bei der verschiedene Mutationen in unabhängigen Regionen in der Tumormasse gefunden wurden. Demnach breiten sich die Zellen nach der ersten Tumor-Transformation als einzelne Klone aus und enden in einem Mix aus verschiedenen Subklonen. Daher findet man die Treibermutationen in allen Zellen (klonal), wobei sich durch Fehler bei der Replikation neue „private“ Mutationen anhäufen und verschiedene Subpopulationen entstehen <sup>138</sup>. Das Vorherrschen von einem Mix aus verschiedenen Klonen in der Tumormasse wurde zusätzlich in den SciClone Analysen bestätigt, indem es Cluster gab, das geteilt ist, und dazu zusätzlich Cluster, die privat für jeweils den Tumor und das Modell sind (Abbildung 4.5). Genauer gesagt wurden unterschiedliche private Mutationen im Tumor und Modell gefunden, Beispiele dafür sind *APC* oder *PIK3CA*. Jedoch führten diese Unterschiede sowohl im Tumor als auch im Modell zum gleichen Ergebnis, und zwar einem beschädigten Protein. Dies zwar jeweils durch einen anderen Effekt, aber in allen Fällen mit einem Verlust des Gens als Folge (Abbildung 4.4a). Daher sind die Unterschiede, welche nur im Tumor oder Modellen gefunden werden, kritisch, da somit bei einer initialen ITH die verschiedenen Tumorklone in der Tumormasse verschiedene Veränderungen zeigen. Ein Beispiel ist die Mutation in *EGFR*, welche nur in dem PDO gefunden wurde und die Mutation mit der Response zu verschiedenen EGFR-Inhibitoren assoziiert werden konnte. Der PDX desselben Patienten hatten keine Mutation in *EGFR*. Mit der Folge, dass der PDX resistent ist für die gleichen Medikamente, auf die der PDO positiv reagiert hat (Abbildung 4.4b). Dies hat für den korrespondierenden Patienten zur Folge, dass die Tumormasse aus verschiedenen Klonen

besteht, welche unterschiedlich auf das gleiche Medikament reagieren würden. Ein anderes Beispiel ist die Überexpression von *IGF2* ohne eine chromosomale Amplifikation in einem PDX von Patient 150 (Abbildung 4.7a), die Überexpression von *IGF2* wurde in 15% von CRC Tumoren in der TCGA Studie gefunden und wird durch eine Aktivierung vom PI3K-Signalweg, durch Veränderungen von *PIK3CA*, *PIK3R1* oder *PTEN*, ausgelöst <sup>52</sup>. Von diesem Patienten wurden vier weitere PDX erstellt, welche alle keine Überexpression zeigen. Und auch hier können wir davon ausgehen, dass der initiale Tumor aus mehreren Tumorklonen besteht. Im Falle von *IGF2* konnte in einer Studie von Zanella et al. im Jahr 2015 gezeigt werden, dass eine Überexpression zu einer abgeschwächten Response von Cetuximab, einem EGFR-Inhibitor, in PDX führt <sup>187</sup>. Diese Beobachtung können wir in unserem in unserem Fall bestätigen, jedoch sind alle fünf PDX resistent zu Cetuximab. Nichtsdestotrotz hat der PDX (150\_MET1\_XEN2) mit der Überexpression von *IGF2* den höchsten T/C Wert von 124 (Resistent), die vier anderen PDX haben T/C Werte zwischen 42 (geringfügige Response) – 89 (Resistent) (Abbildung 4.7b). Für den Patienten 150 hat das zur Folge, dass er ein Mix aus Klonen mit Veränderungen in Medikamentenrelevanten Genen hat und dies muss bei einer Behandlung in Betracht gezogen werden. Die ITH zeigt sich jedoch nicht nur in dem Vergleich von genomischen Mutation, sondern auch wenn man das chromosomale Profil analysiert. Dabei wird deutlich, dass verlorene Chromosomenabschnitte in den Primärtumoren, in den Modellen wieder zu finden sind und dies ist ein eindeutiges Zeichen der initialen räumlichen Heterogenität und ist nicht mit temporale Heterogenität zu erklären ist (Ein Beispiel ist in Abbildung 4.9b zu sehen). Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass Modelle der Hypoploiden-Tumore signifikant mehr chromosomale Regionen verlieren und Modelle der Hyperploiden-Tumore signifikant mehr Regionen dazugewinnen (Abbildung 4.6).

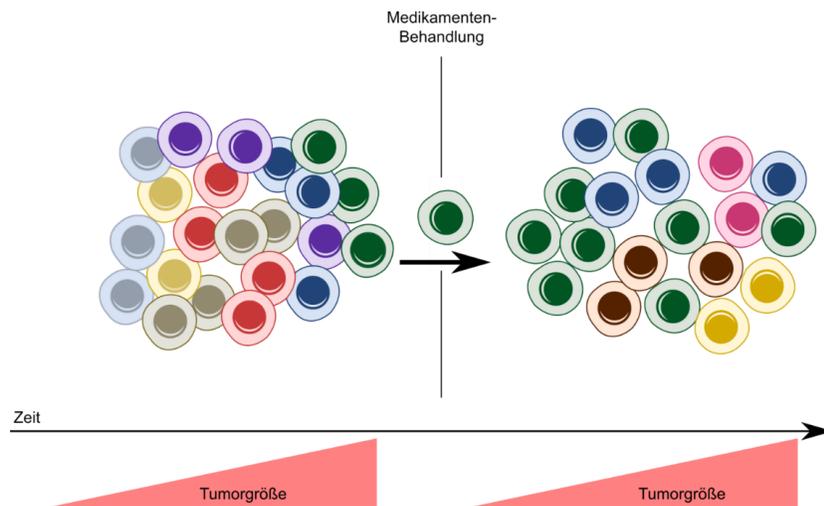
In dem Vergleich von Tumoren-Modellen gab es einige sehr divergente Paare, ein herausstechendes Beispiel ist Patient 118 mit über 60% Unterschiede in Tumor und PDX. Zudem eignet sich dieser Patient hervorragend dafür, die ITH näher zu beschreiben, da wir Daten von einer Metastase haben und ein PDO Modell der Metastase. Dazu hat der Patient noch einen weiteren synchronen Primärtumor, um die Inter-Tumorheterogenität zu analysieren (Abbildung 4.8). Zunächst konnten wir bestätigen, dass die beiden synchronen Tumore genetisch unabhängig sind wie zwei Tumore aus zwei verschiedenen Patienten, dies steht in Einklang mit einer NGS-Studie von synchronen CRC-Tumoren <sup>96</sup>. Zudem stammte die Metastase von Tumor 1 ab, welches sowohl durch das Mutations-Profil als auch durch die SciClone Analysen zu erkennen war (Abbildung 4.8 und Abbildung 4.9a). Nicht nur der

Vergleich zu den Modellen zeigte die ITH, sondern auch die Unterschiede in den molekularen Profilen von Tumor und Metastase. Besonders die im CNV Profil sprechen eindeutig für eine initiale räumliche Heterogenität im Tumor und gegen die temporale Heterogenität, welche sich über die Zeit entwickelte. Chromosom 21 ist in dem Tumor in einer Region von LOH und hat zweimal die gleiche Kopie eines Chromosoms, die Metastase hingegen ist 2N diploid, hat also zwei verschiedene Kopien. Es steht außer Zweifel, dass man mit der Zeit ein Wildtyp Chromosom hinzugewinnen kann. Als Konsequenz muss das Stück was wir als Metastase sequenziert haben, ein anderer Tumorklon sein, als der den wir als Tumor 1 vorliegen haben. Die Modelle sind im Chromosom 21 in keiner LOH Region, genauso wie die Metastase (Abbildung 4.9b). Ähnlich ist es bei Chromosom 9, wo die Metastase viele kleine Regionen von LOH zeigt, jedoch das abgeleitete PDO Model 2N, genauso wie der Tumor 1, heterozygot ist. Und auch dies zeigt zweifelslos, dass es einen Mix an Tumorklonen in der Tumormasse geben muss. Auch die Mutationen sind unterschiedlich, wobei *APC-E1306X* und *KRAS-G12D* in allen Tumoreinheiten die treibenden sind (Abbildung 4.8). Zusätzlich sind ~26% andere Mutationen und die Mehrheit aller Chromosomen in allen Tumoreinheiten konkordant. Interessanterweise zeigt der PDX, welcher aus einem Tumorstück von Tumor 1 erstellt wurde, ein ähnlicheres Mutationsprofil zu der Metastase (66%) als der Tumor 1 (40%). Zudem sind die *TP53-F1345S* Mutation und eine zusätzliche *APC-R499X* Mutation, die schon in der Metastase gefunden wurden, im PDX und PDO bestätigt worden, jedoch nicht im Tumor 1. Darüber hinaus finden wir die *TP53-R175H* Mutation im Tumor nicht im PDX wieder. Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse nur auf unzureichender Sequenziertiefe zurückzuführen sind, wurde „deep targeted“ sequenziert und die ersten Ergebnisse der NGS-Sequenzierung konnten auf diese Weise bestätigt werden (Abbildung 4.4a). Erstaunlicherweise konnten die Mutations-Analysen an zwei unabhängigen Regionen des Tumor 1, nur die Mutationen im Tumor 1 bestätigen und keines, welches nur in den anderen drei Einheiten gefunden wurde (Tabelle 4.1). Da es leider keine regionalen Aufzeichnungen darüber gibt, wo und wie der Tumor geschnitten wurde, kann man nicht rekonstruieren, an welchem Teil des Tumors man diese Analysen durchgeführt hat. Zudem wurden die Mutationen mittels Sanger geprüft und die Sensitivität der Methode erlaubt es nicht, subklonale Ereignisse zu zeigen. Da die Regionen als FFPE fixierte Slides aufbewahrt wurden, war die Menge und Qualität der gewonnen DNA nicht ausreichend für NGS-Methoden, die an dieser Stelle informativer wären, da sie einmal das komplette Genom abdecken und zudem subklonale Veränderungen detektieren können. Die Heterogenität der Tumore innerhalb eines Patienten war auch auf der Transkriptom-Ebene zu beobachten, wo der unabhängige Tumor 2 in Subgruppe E gruppiert wurde und der Tumor 1 und die Metastase in B. Auch zeigten sich

leichte Unterschiede in der Tumorzusammensetzung, wo die Metastase eine starke Infiltration von Stroma-Zellen zeigte, was im Einklang ist mit der Tumorreinheit von 50% (die niedrigste in dem Patienten) und Tumor 1 Expression von Immunoglobulin-Gene vermehrt aufweist. Abschließend sei noch einmal hervorgehoben, dass dieser Patient ein Beispiel für einen sehr heterogenen Tumor darstellt. Mit einer eindeutigen Inter-Tumor Heterogenität zwischen den beiden synchronen Tumoren, aber auch eine starke Intra-Tumorheterogenität innerhalb des Tumor 1 und der Metastase. Dies erschwert immens die Therapie-Möglichkeiten, da einmal zwei genetisch unabhängige Tumore behandelt werden müssen, von denen mindestens einer mehrere genetisch unterschiedliche Tumorklone hat. Daher muss ein tiefgehendes Verständnis von dem molekularen Abbild einer jeden Tumoreinheit verstanden werden, welche nämlich erst die Komplexität der Erkrankung widerspiegeln kann. Basierend auf unseren Ergebnissen zur ITH in der gesamten Kohorte und in der Fallstudie, sollte mit Blick auf eine wahrheitsgetreue personalisierte Medizin mehr als nur ein Modelle, im besten Fall sogar bis zu fünf, von einem Tumor erstellt werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass verschiedene Regionen des Tumors in Betracht gezogen werden. Somit kriegt man im Hinblick auf CRC ein Abbild des eigentlichen multiklonalen Tumors.

Nichtsdestotrotz wird die ITH kontrovers diskutiert und es liegen verschiedene Meinungen und Studien vor, eine davon ist die Studie von Gao et al. mit PDX Modellen, in welcher ein 1x1x1 Schema postuliert wird, wo ein Tiermodell pro Treatment genügt um ein Abbild von einem CRC-Tumor zu erstellen <sup>219</sup> oder eine Studie von Kim et al. welche mehrere Regionen eines Tumors vergleicht und keine Unterschiede in den krankheitsrelevanten Genen findet <sup>140</sup>. Dagegen lässt sich einwenden, dass die Studie von Kim et al. nur fünf Patienten untersucht hat und somit keine repräsentative Kohorte darstellt. Die Studie von Gao et al. hat nicht das Ziel eines direkten Vergleiches von Tumor-Model-Paaren; und somit die ITH für jeden Tumor zu identifizieren, sondern das allgemeine genetische Profil der PDX-Kohorte zu dem vom humanen TCGA-Kohorte zu vergleichen und in diesem Zuge wurde festgestellt, dass die Mausmodelle das allgemeine genetische Profil von einer CRC Kohorte gut widerspiegeln können. Nichtsdestotrotz gibt es auch andere Studien, die mit unseren Ergebnissen im Einklang sind, Losi et al. konnten Unterschiede in *KRAS* und *TP53* Mutationen in verschiedenen Biopsien derselben Proben finden. Es wurden nur Unterschiede in bekannten Punktmutationen und Chromosomen-Umstrukturierungen angeschaut, da keine Genomsequenzierung durchgeführt wurde <sup>122</sup>. Allgemein kann man die ITH und die damit einhergehenden Unterschiede, die innerhalb eines Tumors, in Form von verschiedenen Klonen mit einem unabhängigen

genetischen Profil auftreten, mit der der klassischen Evolutionstheorie vergleichen. Laut dieser, muss eine Variation vorherrschen (in diesem Fall die ITH) und diese Variation führt dann zu unterschiedlichen Überlebenschancen <sup>220</sup>, im Kontext von ITH und Krebstherapien, sind es die verschiedenen Auswirkungen auf ein Medikament basierend auf unterschiedlichen Veränderungen des Genoms. Man spricht von dem sogenannten Flaschenhals Effekt in der Therapie Response, wo der Tumor nach Behandlung weg ist, aber mit der Zeit zurückkommt, da eine kleine Fraktion an Tumorklone die Medikamentenbehandlung überlebt hat <sup>220,221</sup> (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der ITH während der Behandlung mit Medikamenten.** Die heterogene Tumormasse (verschiedene Tumorklone sind durch verschiedene Farben dargestellt) vor der Behandlung (links). Die Medikamentenbehandlung führt zu einer selektiven Auswahl eines Medikamenten resistenten Klons (Dunkelgrün) und der Flaschenhals, der die Heterogenität erstmals reduziert. Der Tumorklon kann nun wieder wachsen und es entsteht wiederum ein neuer heterogener Tumor (rechts). Der zeitliche Ablauf und die entsprechende Tumorgroße (rote Dreiecke) sind unterhalb gezeigt.

### *Analysen zu der Tumormikroumgebung*

Neben der Heterogenität ist auch die Tumormikroumgebung ein wichtiger Teil dieser Arbeit und ist vonnöten, um die komplette Komplexität von CRC zu verstehen. Der erste Schritt war es, die Umgebung des Tumors zu analysieren und zu beschreiben, ganz nach der „seed and soil“-Theorie, die besagt, dass ein Tumor („seed“) eine gewisse Umgebung („soil“) braucht, um zu

wachsen <sup>143</sup>. Dafür wurde in dieser Studie zum ersten Mal das Expressionsprofil von gesunden Kontrollgeweben von der Leber und von dem Darm untersucht. Um auszuschließen, dass Tumorklone die Untersuchungen beeinflussen, wurden alle Kontrollen auf ihre tumorspezifischen Mutationen untersucht und es konnte keine Tumorverunreinigung gefunden werden. Daher können wir davon ausgehen, dass unsere Kontrollproben keine Tumorklone enthalten. Um die offensichtlichen gewebespezifischen Signale zwischen Darm und Leber zu umgehen, wurden die Proben der beiden Organe unabhängig voneinander untersucht. Eine differentielle Genexpressionsanalyse ergab eine Aufteilung in zwei Gruppen von Leberkontrollen (Abbildung 4.12a). Funktionelle Annotationen der Gene in den beiden Gruppen zeigten einmal Signale der Leber und einmal starke Immunsignale. Die beiden Gruppen korrelierten zu verschiedenen Regionen bei der Entnahme der Kontrollproben. Sieben Proben wurden in unmittelbarer Nähe des Tumors entnommen und fünf weitentfernt vom Tumor. Die Proben, die hohe Immunsignale zeigten, sind alle aus der unmittelbaren Umgebung des Tumors. Diese klare Aufteilung in zwei Gruppen spricht für eine Veränderung des Gewebes um den Tumor herum. Somit sind wahre, von Tumorsignalen unabhängige Kontrollen weiter weg von der Tumormasse. Die Metastasen-Nischen Theorie („The Metastatic Niche“) ist, eine abgeänderte Form der „seed and soil“-Theorie und geht einen Schritt weiter. Es wird postuliert, dass die Veränderungen in der Umgebung vor der Initiation und Einnistung der Metastase geschehen ist <sup>222</sup>. Dies würde die Inflammation in der unmittelbaren Nähe des Tumors in den Leberkontrollen erklären, sodass die Umgebung dort sich schon stark dem Tumor angepasst hat und mit der Metastasierung nur noch verstärkt wurde. Diese Theorie steht jedoch im Gegensatz zu der verbreiteten Annahme, dass die Tumorzelle selbst der Auslöser der Metastase ist und die Umgebung sich nach dem Anwachsen anpasst <sup>223</sup>. Legen wir diese Theorie unseren Daten zugrunde, müsste das heißen, dass der Tumor in der Leber beim Wachsen Immunsignale in die Umgebung abgibt und wir somit, um das Tumorgewebe herum, Signale wahrnehmen. Auch diese Erklärung, passt zu unseren Daten, um die beiden Theorien zu untersuchen, könnte an dieser Stelle gesundes Kontrollgewebe ohne den Einfluss von der CRC Erkrankungen, genommen werden und untersucht werden. Im besten Fall in einem zeitlichen Ablauf von gesund, bis hin zur Erkrankung. Dies würde Einblicke in die Umgebung vor dem Tumor und ihre Einflüsse auf die Entwicklung der Krankheit geben. Um die Immunsignale besser zu verstehen, wurde die gemittelte Genexpression von publizierten Immunsignaturen in den Leberkontrollen verglichen. Diese Analyse bestätigt die Ergebnisse der DGEA und eine Aufteilung in die Kontrollen in unmittelbarer Tumornähe und weit vom Tumor entfernt ist wieder zu finden (Abbildung 4.12b). Die Aufteilung ist getrieben, vom Fehlen der Signaturen in den Kontrollen, die weit vom Tumor

entfernt sind und das im Umkehrschluss stark exprimierte Signalen in den Kontrollen in Tumornähe (Abbildung 4.12b). Da wir drei Patienten haben wo gepaarte Kontrollen (nah und fern vom Tumor) vorhanden sind, können wir eine patientenspezifische Aufteilung der Proben in der DGEA und im Immunsignaturen-Vergleich ausschließen. Widmet man sich den Darmkontrollen in einer Analyse der Genexpressionsprofile von 31 Proben, so findet man auch eine Aufteilung in zwei Gruppen, diesmal in eine Gruppe die GO-Term-Anreicherungen von kontrahierendem Gewebe zeigt und eines was darmspezifisch ist (Abbildung 4.13a). Dies könnte im Zusammenhang stehen mit der Region der Entnahme. Der Aufbau der Darmkrypten kann diese Beobachtungen erklären, indem die Kontrollen, die ein Expressionsprofil von kontrahierendem Gewebe haben, mehr Anteile der Submukosa und der darunter liegenden Muskelschicht haben und die Kontrollen, die mehr Darmsignale zeigen mehr Anteile der Mukosa beinhalten. Interessanterweise clusterten die Paare von Kontrollen vom selben Patienten, bis auf eine Ausnahme (164), immer in die beiden unterschiedlichen Gruppen. (Abbildung 4.13b). Diese Beobachtung bedeutet, dass in 6/7 Fällen die Kontrollen zufällig von verschiedenen Regionen des Darmes entnommen wurden und nur in einem Fall von derselben. Die Kontrollen, in den Paaren, die als nah am Tumor annotiert wurden, zeigen, bis auf die Ausnahme von (164\_CF2) eine Anreicherung des kontrahierenden Gewebes (Abbildung 4.13a). Dies kann einhergehen mit dem Tumor, da der Tumor aus den Krypten entsteht und wenn man gesundes Gewebe in Nähe des Tumors entnimmt, man eher Regionen wählt, die in der Submukosa und der Muskelschicht liegen. Das Expressionsprofil vom Kontrollpaar 164 zeigt klare Expression von den Genen, die in Darmsignalen angereichert sind und zusätzlich in der nah am Tumor annotierten Probe, leichte Expression von Genen des kontrahierenden Gewebes. Dies kann daran liegen, dass bei dieser einen Probe ein Mix aus beiden Regionen entnommen wurde. Aufgrund der geringen Anzahl an Paaren, können wir keine weiteren Schlüsse ziehen und benötigten weitere Analysen und Paare, um die Hypothese zu bestätigen, dass die Auftrennung der Kontrollen, basierend auf der Darmregion bei der Entnahme liegt. Somit würden solche Kontrollen einem Mix aus Gewebe aus beiden Regionen beinhalten. Die Analyse der Immunsignaturen führte in eine ähnliche Aufteilung der zwei Gruppen, jedoch wurde die Dickdarm-Kontrollgruppe nochmals geteilt in zwei unterschiedliche Gruppen, die verschiedene Immunprofile aufzeigen (Abbildung 4.13b). Diese beiden Profile lassen sich grob in starke und schwächere Immunsignale teilen. Die Kontrollgruppe 1 zeigt besonders starke Immunsignale, die mehrheitlich der adaptiven Immunantwort zugehörig sind. Die Kontrollen, die nahe dem Tumor entnommen wurden, zeigen in 5 von 7 Fällen mehr angeborene Immunreaktionen. Dies könnte alles durch die verschiedenen Regionen der Probenentnahme geschuldet sein, jedoch

kann dies auch weitesten Sinne mit der „seed and soil“ Theorie <sup>143</sup> korreliert werden, da die Umgebung für den Tumor durch das Vorhandensein der angeborenen Immunantwort vorbereitet war und das Gewebe nicht durch eine Entzündungsreaktion ausgelöste adaptive Immunantwort nach dem Tumorwachstum verändert wurde. Die Daten jedoch sind am Endpunkt entnommen und man kann keine Aussagen über die Umgebung vor der Tumorentwicklung machen. Dies müsste in einer prospektiven Studie weiter untersucht werden, in welcher das Expressionsprofil von Gewebeproben von gesunden Patienten über einen gewissen Zeitraum bis hin zur Tumorentwicklung untersucht werden müsste, um eine evtl. Prädisposition der Umgebung zu beschreiben. Im Großen und Ganzen können diese Untersuchungen der Kontrollgewebe eine heterogene Masse an Gewebetypen und einen Bias der Expressionsprofile basierend auf der Region der Entnahme, sowohl eine regionale am Organ (nah am Tumor oder weit entfernt) oder auch eine zelltypenspezifische (Entnahme der Probe an der Mukosa oder an der Submukosa/Muskelschicht), bestätigen.

Im nächsten Schritt wurden die Tumormasse und die direkte Mikroumgebung des Tumors näher definiert. Dazu wurden auch die präklinischen Modelle genutzt, insbesondere da während der OncoTrack-Studie herausgefunden wurde, dass die Modelle keine humane Mikroumgebung zeigen <sup>93</sup>, darum kann der Vergleich zu den passenden Tumoren uns einen Einblick in die Mikroumgebung geben. Die Tumore haben eine mittlere Tumorreinheit von 50%, dementsprechend sind die anderen 50% andere nicht tumorartige Zellen, die der TME entsprechen, da man weiß, dass innerhalb der Tumormasse noch andere Zellen vorkommen, welche die Umgebung der Tumorklone ausmachen und vom Tumor benötigt werden, um zu wachsen und zu überleben <sup>134,153</sup>. Zudem kann man die Tumore, basierend auf ihrem Transkriptom, in verschiedenen molekularen Gruppen teilen <sup>89-94</sup>. Daher liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Identifikation der molekularen gruppenspezifischen TME, welche hier zum ersten Mal untersucht wird. Hierbei nutzen wir die Einteilung in die drei OncoTrack definierten Gruppen: ASCL2/MYC, ECM/EMT und Entero/Goblet <sup>93</sup>. Bei den Analysen ergaben sich 115 gruppenunspezifische TME Gene, welche funktional annotiert wurden (Abbildung 4.14 und 4.5). Dabei sind Extrazelluläre Matrix, Membran und Kollagen Signale innerhalb der Gen-Liste angereichert, sowie biologische Prozesse wie die Humorale Immunantwort, Angiogenese und Zellkommunikation. Dies bestärkt uns darin, dass in unseren Analysen TME spezifische Gene identifiziert wurden. Dies wurde auch in den gruppenspezifischen Analysen der Gene bestätigt, in allen drei Genlisten wurde Extrazelluläre Matrix Signale signifikant angereichert. Jedoch fanden sich auch Unterschiede: zum Beispiel hat die ASCL2/MYC Gruppe viele Signale für den

Zell-Kortex und zudem ist die *ERK1* und *ERK2* Kaskade angereichert. Dies passt zu der molekularen Charakterisierung von *ASCL2/MYC* Tumoren, welche stammzell spezifischen Eigenschaften zeigen<sup>93</sup>. *ERK1* und *ERK2* regulieren die Stammzell Selbsterneuerung durch die Phosphorylierung von *Klf4*, durch die Bindung von *ERK1* oder *ERK2* an der Aktivierungs-Domäne von *Klf4* und einer direkten Phosphorylierung an der Ser123<sup>224</sup>. Darüber hinaus wurde *KLF4* als ein potentieller Tumorsuppressor-Kandidat für CRC identifiziert, wobei *KLF4* im Tumorgewebe weniger stark exprimiert ist, als in gesundem Gewebe<sup>225</sup>. Zudem werden *ERK1* und *ERK2* Aktivierungen für das Erhalten von hämatopoetischen Stammzellen benötigt<sup>226</sup>. Die ECM/EMT Gruppe an TME Genen ist mit Abstand die größte, was jedoch mit der initialen molekularen Beschreibung dieser Gruppe, die sich über die Extrazelluläre Matrix und EMT definiert<sup>93</sup>, erklärt werden kann. Die ECM/EMT gruppenspezifischen Gene zeigen signifikante Anreicherungen in Immunsignalen und Prozesse zur Blutgefäß-Bildung. Darüber hinaus sind TME-Zelltypen, wie Stroma-Zellen und Immunzellen, in gewebespezifischen Analysen signifikant angereichert. Die Entero/Goblet Gruppe hatte nur sechs gruppenspezifische Gene, welche jedoch nichtsdestotrotz starke TME Signale zeigen, besonders interessant waren Myofibroblasten-Signale in den gewebespezifischen Anreicherungen, welche nur in dieser Gruppe gefunden wurden. Diese Anreicherungen werden durch die Funktion des Gens *GREM1* unterstützt, welches eines der sechs Entero/Goblet spezifischen Gene ist. Da gezeigt wurde, dass *GREM1* in einer Studie zu Basalzellkarzinomen von CAFs exprimiert wird, um das Tumorstromawachstum zu unterstützen<sup>202</sup>. Hierbei ist anzumerken, dass man anhand der RNAseq Daten der kompletten Tumormasse nicht genau identifizieren kann, woher die Expression des Gens herkommt. Hierbei würden sich Daten eines Einzelzell-Experiments gut anbinden, um klar zu identifizieren, dass die *GREM1* Expression von CAFs innerhalb der Tumormasse von Entero/Goblet Tumoren herkommt.

Um die gruppenspezifische TME innerhalb des Tumorgewebes zu untersuchen und weitere Informationen zu Gewebearchitektur und Zellmorphologien innerhalb der Tumormasse zu erhalten und eventuelle Biomarker-Korrelationen und Zellinteraktionen zu beschreiben, wurden die gruppenspezifischen TME Gene auf eine Liste an Kandidatengene reduziert (Tabelle 4.2). Diese könnten durch immunhistochemische Methoden innerhalb der Tumormasse in weiteren Experimenten untersucht werden. Die Entero/Goblet Gruppe wurde auf zwei Kandidaten gekürzt, die *ALSC2/MYC* Gruppe auf sechs und die ECM/EMT auf fünf. Die Stabilität der Kandidatengene wurde zudem überprüft, indem diese als Minisignatur ihrer Gruppe betrachtet wurden und die mittlere Expression dieser Signaturen wurde genutzt, um die Modell-Kohorte zu

clustern. Die drei molekularen Gruppen konnten somit wieder rekonstruiert werden (Abbildung 4.18).

Die Ergebnisse der TME zusammengenommen, konnten wir zeigen, dass es eine gemeinsame gruppenunspezifische Mikroumgebung gibt, die sich alle Tumore teilen, und dass darüber hinaus die drei molekularen Gruppen nochmals ihre eigene spezifische Umgebung haben, die für ihre Gruppe einzigartig ist. Zudem konnten wir die gruppenspezifischen Signale auf eine Liste an Kandidatengen reduziert, welche in weiteren Experimenten validiert und deren Rolle in der Mikroumgebung beschrieben werden muss. Das regionspezifische Auftreten der Proteine, könnte zum Beispiel mittels einer immunhistochemischen Analyse der Proben auf FFPE fixierten Slides von den Tumoren und PDX getestet werden. Dabei wäre die Verteilung aller 13 Kandidatenproteine in den verschiedenen Gruppen von besonderem Interesse. Dabei wäre auch wichtig die PDX mit den initialen Tumoren zu vergleichen, da die PDX keine humanen Umgebung, jedoch aber die Maus Umgebung haben und eventuelle Unterschiede oder auch Gemeinsamkeiten interessant wären, insbesondere im Hinblick auf die Relevanz und die Rekonstruktion der Tumore und ihrer Umgebung in Mäusen. Dies könnte in den Medikamentenstudien an PDX eine wichtigere Rolle spielen, da man versucht, die Tumormasse im Menschen, so nah wie möglich im Modell nachzustellen und mögliche Reaktionen auf Medikamente vorherzusagen. Diese Analysen der TME stellen eine Beschreibung der Mikroumgebung in CRC dar, wo sowohl die Umgebung außerhalb der Tumormasse als auch die Zellen in der Tumormasse beschrieben worden sind. Hierbei ist aufgefallen, dass die TME eine komplexe heterogene Masse ist, die sicherlich an der Tumorinitiation und dem -Wachstum beteiligt ist.

## 6. Fazit

Aufbauend auf vorhergehende Studien, wurde die Tumorheterogenität zusammen mit der Tumormikroumgebung von CRC anhand verschiedener Modelle so tiefgreifend analysiert, dass unter anderem Schlussfolgerungen über a) die Rekapitulation des genetischen Profils des Tumors im Model; b) die initiale ITH in den Tumoren; c) die Inter-Tumorheterogenität anhand einer Minimalsignatur; und schließlich d) die gewebe- und zelltypspezifischen Unterschiede in der TME möglich sind.

Der erste Fokus der Arbeit lag auf der Inter- und Intra-Tumorheterogenität, die beide zur Komplexität der Erkrankungen beitragen. Dabei zeigte sich die Inter-Tumorheterogenität unter anderem durch das molekulare Profil der Tumore, welches sich in verschiedene Gruppen mit klinisch relevanten Charakteristika einteilen ließ. Um diese von meinen Kollegen gefundenen Unterschiede zu adressieren, entwickelte ich eine Minisignatur, welche die Tumore effizient in die drei Gruppen einteilen kann. Dadurch wird der klinische Mehrwert der molekularen Gruppen erhöht, da die Gruppen nun mehr mit der Expression von 37 Genen bestimmt werden können. Jedoch braucht es weitere Studien und Validierungen der Signatur, um diese effektiv in einem klinischen Setting nutzen zu können. Nichtsdestotrotz kann das Runterbrechen auf eine Minimalsignatur – so wie es in der vorliegenden Arbeit gemacht wurde – der erste Schritt sein, um die molekularen Profile im Kontext von Therapien zu betrachten. Der tiefe genetische Vergleich von synchronen Tumoren anhand eines Fallbeispiels zeigt ein weiteres Spektrum der klinischen Relevanz der Inter-Tumorheterogenität. Da die synchronen Tumore genetisch so unterschiedlich sind wie zwei Tumore von zwei verschiedenen Patienten, schlägt gezielte Medikamententherapie eventuell nur bei einem der beiden Tumore an.

Neben der Inter-Tumorheterogenität spielt die Intra-Tumorheterogenität eine ebenso wichtige Rolle. In dieser Studie wurden dafür sowohl *in vivo* (PDX) als auch *in vitro* (PDO) Modelle untersucht und genetisch verglichen. Zum einen konnte bestätigt werden, dass viele Modelle das genetische Profil der eigentlichen Tumore rekapitulieren und dass es in unserer Studie keine Unterschiede in den beiden Modellsystemen gab. Zum anderen gab es jedoch auch Tumor-Modell-Paare, die sich sehr voneinander unterschieden. Diese starken Diskrepanzen konnten eindeutig der ITH zugeschrieben werden. Die ITH ist ein viel diskutiertes und sehr wichtiges Thema im Kontext von CRC und durch das Vorkommen von mehreren verschiedenen Klonen innerhalb einer Tumormasse, welche anders auf Medikamente reagieren, immer mehr an Bedeutung. Wir konnten innerhalb unserer Kohorte eindeutige ITH zeigen und auch die klinische Relevanz dieser Heterogenität darstellen. Dies wurde anhand eines Beispiel anschaulich: ein PDO mit einer Mutation in *EGFR* auf EGFR-Inhibitoren reagierte positiv und der

passende PDX vom gleichen Patienten, jedoch ohne Mutation, zeigte keine Response. Da beide Modelle vom gleichen Tumor abstammten, müssen verschiedene Klone vorhanden sein und dadurch die Therapie erschweren. In diesem Zusammenhang muss der Flaschenhals-Effekt beachtet werden, der aufzeigt, dass ein einzelner Tumorklon, der die Behandlung überlebt, ausreicht, damit nach Abschluss der Therapie der Patient wieder rückfällig wird. Die vorliegende Arbeit legt daher nahe, dass mehrere Regionen eines Tumors untersucht werden müssen, um die Heterogenität adäquat zu beschreiben. Diese Untersuchungen erlauben es, ein komplettes Bild der verschiedenen Tumorklone zu zeichnen. Nur ein komplettes Abbild der eigentlichen Klone in der Tumormasse kann zu einer echten personalisierten Medizin führen.

Der zweite Fokus lag auf den verschiedenen Zelltypen der Mikroumgebung der Tumorklone und auf der Umgebung außerhalb der Tumormasse. Es zeigte sich, dass die gefundene Heterogenität an verschiedenen Gewebe- und Zelltypen des gesunden Gewebes eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung spielt. In diesem Sinne wurden verschiedene Kandidatengene der TME für jede der drei molekularen Gruppen von CRC bestimmt und es konnte gezeigt werden, dass es sogar in der Mikroumgebung der Tumormasse Unterschiede innerhalb der molekularen Gruppen gibt. Zudem haben wir zusätzlich zu der Tumormasse, die Genexpression des tumorfreen Gewebes aus der Umgebung des Tumors und der Metastase analysiert, und spezifische Signale in dieser Umgebung finden können. Diese Signale basieren wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Regionen bei der Entnahme der Proben. Dazu gehören zum einen Proben, die mehr kontrahierende Gewebe-Signale aufzeigen, da mehr submukosale Regionen vorhanden sind und zum anderen Proben, die mehr Darm-Signale aufweisen und dementsprechend mehr Mukosa beinhalten. Zudem scheinen sich die Immunsignale innerhalb der Regionen zu unterscheiden. Dabei waren Regionen, die nahe an Tumor/Metastase sind, stark entzündet und zeigen die Einflüsse des Tumors; Regionen weiter weg, zeigen mehr organspezifische Signale. Dies lässt auf einen graduellen Verlauf der Entzündungssignale schließen, vom Tumorkern (stark entzündet) bis hin zu weit entferntem Gewebe (keine Entzündungssignale).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Komplexität von CRC nur verstanden werden kann, wenn sowohl die Tumorerogenität (Inter- und Intra-) als auch die Tumormikroumgebung beachtet wird. Besonders wichtig ist dies in der personalisierten Medizin. Eine realitätsnahe Darstellung der Tumormasse ist notwendig, um Korrelationen von Medikamenten-Sensitivitäten zu den molekularen Profilen bestimmen zu können, insbesondere im Hinblick auf die therapierelevante Biomarker-Identifikationen.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Zervos-Kopp, J. *Anatomie, Biologie und Physiologie*. 225 (2017).
- 2 Theodor Heinrich Schiebler, W. S., Karl Zilles. *Anatomie*. 569 (Springer Berlin Heidelberg, 1995).
- 3 Washabau, R. J. in *Canine and Feline Gastroenterology* Ch. Chapter 57 Small Intestine (Elsevier, 2013).
- 4 Tahvonon, R. S., S. in *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease* Ch. 13, (Elsevier, 2014).
- 5 Moran, G. W., Leslie, F. C., Levison, S. E., Worthington, J. & McLaughlin, J. T. Enteroendocrine cells: neglected players in gastrointestinal disorders? *Therap Adv Gastroenterol* **1**, 51-60, doi:10.1177/1756283X08093943 (2008).
- 6 Johansson, M. E. & Hansson, G. C. Mucus and the goblet cell. *Dig Dis* **31**, 305-309, doi:10.1159/000354683 (2013).
- 7 Hsu, Y. C., Li, L. & Fuchs, E. Transit-amplifying cells orchestrate stem cell activity and tissue regeneration. *Cell* **157**, 935-949, doi:10.1016/j.cell.2014.02.057 (2014).
- 8 Ricci-Vitiani, L., Fabrizi, E., Palio, E. & De Maria, R. Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)* **87**, 1097-1104, doi:10.1007/s00109-009-0518-4 (2009).
- 9 Clevers, H. C. & Bevins, C. L. Paneth cells: maestros of the small intestinal crypts. *Annu Rev Physiol* **75**, 289-311, doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183744 (2013).
- 10 Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 387 (Georg Thieme Verlag, 2009).
- 11 Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359-386, doi:10.1002/ijc.29210 (2015).
- 12 National Cancer Institute. *Colorectal Cancer—Patient Version*, <https://www.cancer.gov/types/colorectal>
- 13 Akkoca, A. N. *et al.* TNM and Modified Dukes staging along with the demographic characteristics of patients with colorectal carcinoma. *Int J Clin Exp Med* **7**, 2828-2835 (2014).
- 14 Vega, P., Valentin, F. & Cubiella, J. Colorectal cancer diagnosis: Pitfalls and opportunities. *World J Gastrointest Oncol* **7**, 422-433, doi:10.4251/wjgo.v7.i12.422 (2015).
- 15 Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. P. Colorectal cancer. *Lancet* **383**, 1490-1502, doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9 (2014).
- 16 De Rosa, M. *et al.* Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* **34**, 1087-1096, doi:10.3892/or.2015.4108 (2015).
- 17 Agrawal Dilip, R. M., Khinchi Mahaveer P, Gupta MK, Sharma Natasha, Avlani Gunjan DIAGNOSIS AND TREATMENT OF COLORECTAL CANCER: A REVIEW. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 60-66 (2012).
- 18 Sawyers, C. Targeted cancer therapy. *Nature* **432**, 294-297, doi:10.1038/nature03095 (2004).
- 19 Mousa, L., Salem, M. E. & Mikhail, S. Biomarkers of Angiogenesis in Colorectal Cancer. *Biomark Cancer* **7**, 13-19, doi:10.4137/BIC.S25250 (2015).

- 20 Gotink, K. J. & Verheul, H. M. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* **13**, 1-14, doi:10.1007/s10456-009-9160-6 (2010).
- 21 Shih, T. & Lindley, C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* **28**, 1779-1802, doi:10.1016/j.clinthera.2006.11.015 (2006).
- 22 Ciardiello, F. & Tortora, G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* **358**, 1160-1174, doi:10.1056/NEJMra0707704 (2008).
- 23 Van Cutsem, E. *et al.* Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* **29**, 2011-2019, doi:10.1200/JCO.2010.33.5091 (2011).
- 24 Bokemeyer, C. *et al.* Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer* **48**, 1466-1475, doi:10.1016/j.ejca.2012.02.057 (2012).
- 25 Troiani, T. *et al.* Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence. *ESMO Open* **1**, e000088, doi:10.1136/esmoopen-2016-000088 (2016).
- 26 Kreso, A. & Dick, J. E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **14**, 275-291, doi:10.1016/j.stem.2014.02.006 (2014).
- 27 Zheng, S., Xin, L., Liang, A. & Fu, Y. Cancer stem cell hypothesis: a brief summary and two proposals. *Cytotechnology* **65**, 505-512, doi:10.1007/s10616-012-9517-3 (2013).
- 28 Hadjimichael, C. *et al.* Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J Stem Cells* **7**, 1150-1184, doi:10.4252/wjsc.v7.i9.1150 (2015).
- 29 Jang, B. G. *et al.* Distribution of intestinal stem cell markers in colorectal precancerous lesions. *Histopathology* **68**, 567-577, doi:10.1111/his.12787 (2016).
- 30 Maynard, M. A. *et al.* Bmi1 is required for tumorigenesis in a mouse model of intestinal cancer. *Oncogene* **33**, 3742-3747, doi:10.1038/onc.2013.333 (2014).
- 31 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 32 Bastide, P. *et al.* Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* **178**, 635-648, doi:10.1083/jcb.200704152 (2007).
- 33 Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428, doi:10.1172/JCI39104 (2009).
- 34 Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-196, doi:10.1038/nrm3758 (2014).
- 35 Vu, T. & Datta, P. K. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers (Basel)* **9**, doi:10.3390/cancers9120171 (2017).
- 36 Cano, A. *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2**, 76-83, doi:10.1038/35000025 (2000).
- 37 Graff, J. R. *et al.* E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* **55**, 5195-5199 (1995).

- 38 Palacios, F., Tushir, J. S., Fujita, Y. & D'Souza-Schorey, C. Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions. *Mol Cell Biol* **25**, 389-402, doi:10.1128/MCB.25.1.389-402.2005 (2005).
- 39 Yun, J. A. *et al.* Loss of E-Cadherin expression is associated with a poor prognosis in stage III colorectal cancer. *Oncology* **86**, 318-328, doi:10.1159/000360794 (2014).
- 40 Saito, N., Nishimura, H. & Kameoka, S. Clinical significance of fibronectin expression in colorectal cancer. *Mol Med Rep* **1**, 77-81 (2008).
- 41 Yan, X. *et al.* N-cadherin, a novel prognostic biomarker, drives malignant progression of colorectal cancer. *Mol Med Rep* **12**, 2999-3006, doi:10.3892/mmr.2015.3687 (2015).
- 42 Dai, X. *et al.* OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion. *Oncol Rep* **29**, 155-160, doi:10.3892/or.2012.2086 (2013).
- 43 Neumann, J. *et al.* SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer* **11**, 518, doi:10.1186/1471-2407-11-518 (2011).
- 44 Tariq, K. & Ghias, K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* **13**, 120-135, doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103 (2016).
- 45 O'Keefe, C., McDevitt, M. A. & Maciejewski, J. P. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood* **115**, 2731-2739, doi:10.1182/blood-2009-10-201848 (2010).
- 46 Pino, M. S. & Chung, D. C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2059-2072, doi:10.1053/j.gastro.2009.12.065 (2010).
- 47 Bird, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209-213, doi:10.1038/321209a0 (1986).
- 48 Nazemalhosseini Mojarad, E., Kuppen, P. J., Aghdaei, H. A. & Zali, M. R. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* **6**, 120-128 (2013).
- 49 Toyota, M. *et al.* CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8681-8686 (1999).
- 50 Boland, C. R. & Goel, A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **138**, 2073-2087 e2073, doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064 (2010).
- 51 Umar, A. *et al.* Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* **96**, 261-268 (2004).
- 52 Cancer Genome Atlas, N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337, doi:10.1038/nature11252 (2012).
- 53 Hampel, H. *et al.* Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**, 5783-5788, doi:10.1200/JCO.2008.17.5950 (2008).
- 54 Smith, G. *et al.* Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9433-9438, doi:10.1073/pnas.122612899 (2002).

- 55 Christie, M. *et al.* Different APC genotypes in proximal and distal sporadic colorectal cancers suggest distinct WNT/beta-catenin signalling thresholds for tumorigenesis. *Oncogene* **32**, 4675-4682, doi:10.1038/onc.2012.486 (2013).
- 56 Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 1130-1134 (1998).
- 57 Seshagiri, S. *et al.* Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* **488**, 660-664, doi:10.1038/nature11282 (2012).
- 58 Solomon, H., Brosh, R., Buganim, Y. & Rotter, V. Inactivation of the p53 tumor suppressor gene and activation of the Ras oncogene: cooperative events in tumorigenesis. *Discov Med* **9**, 448-454 (2010).
- 59 The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Selected for Study*, (<https://cancergenome.nih.gov/cancersselected>).
- 60 Wood, L. D. *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**, 1108-1113, doi:10.1126/science.1145720 (2007).
- 61 Major, M. B. *et al.* Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* **316**, 1043-1046, doi:10.1126/science/1141515 (2007).
- 62 Behrens, J. The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. *Biochem Soc Trans* **33**, 672-675, doi:10.1042/BST0330672 (2005).
- 63 Van Camp, J. K., Beckers, S., Zegers, D. & Van Hul, W. Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev* **10**, 207-229, doi:10.1007/s12015-013-9486-8 (2014).
- 64 Bos, J. L. *et al.* Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**, 293-297, doi:10.1038/327293a0 (1987).
- 65 Barbacid, M. ras genes. *Annu Rev Biochem* **56**, 779-827, doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.004023 (1987).
- 66 Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 11-22, doi:10.1038/nrc969 (2003).
- 67 Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-954, doi:10.1038/nature00766 (2002).
- 68 Deng, G. *et al.* BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 191-195 (2004).
- 69 Luo, J., Manning, B. D. & Cantley, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* **4**, 257-262 (2003).
- 70 Cantley, L. C. & Neel, B. G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4240-4245 (1999).
- 71 Fruman, D. A. & Rommel, C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 140-156, doi:10.1038/nrd4204 (2014).
- 72 Keith, C. T. & Schreiber, S. L. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* **270**, 50-51 (1995).

- 73 Zhou, H. & Huang, S. The complexes of mammalian target of rapamycin. *Curr Protein Pept Sci* **11**, 409-424 (2010).
- 74 Fingar, D. C. & Blenis, J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**, 3151-3171, doi:10.1038/sj.onc.1207542 (2004).
- 75 Populo, H., Lopes, J. M. & Soares, P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci* **13**, 1886-1918, doi:10.3390/ijms13021886 (2012).
- 76 Sarbassov, D. D. *et al.* Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**, 1296-1302, doi:10.1016/j.cub.2004.06.054 (2004).
- 77 Grandis, J. R. & Sok, J. C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther* **102**, 37-46, doi:10.1016/j.pharmthera.2004.01.002 (2004).
- 78 Seshacharyulu, P. *et al.* Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **16**, 15-31, doi:10.1517/14728222.2011.648617 (2012).
- 79 Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 127-137, doi:10.1038/35052073 (2001).
- 80 Burgess, A. W. *et al.* An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* **12**, 541-552 (2003).
- 81 Wakefield, L. M. & Hill, C. S. Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer* **13**, 328-341, doi:10.1038/nrc3500 (2013).
- 82 Padua, D. & Massague, J. Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Res* **19**, 89-102, doi:10.1038/cr.2008.316 (2009).
- 83 Neuzillet, C. *et al.* Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther* **147**, 22-31, doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.001 (2015).
- 84 Drabsch, Y. & ten Dijke, P. TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **31**, 553-568, doi:10.1007/s10555-012-9375-7 (2012).
- 85 Park, J. *et al.* Combination delivery of TGF-beta inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat Mater* **11**, 895-905, doi:10.1038/nmat3355 (2012).
- 86 Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* **24**, 99-146, doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737 (2006).
- 87 Tian, M. & Schiemann, W. P. The TGF-beta paradox in human cancer: an update. *Future Oncol* **5**, 259-271, doi:10.2217/14796694.5.2.259 (2009).
- 88 Neuzillet, C. *et al.* Perspectives of TGF-beta inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas. *Oncotarget* **5**, 78-94, doi:10.18632/oncotarget1569 (2014).
- 89 De Sousa, E. M. F. *et al.* Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* **19**, 614-618, doi:10.1038/nm.3174 (2013).

- 90 Marisa, L. *et al.* Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med* **10**, e1001453, doi:10.1371/journal.pmed.1001453 (2013).
- 91 Sadanandam, A. *et al.* A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat Med* **19**, 619-625, doi:10.1038/nm.3175 (2013).
- 92 Schlicker, A. *et al.* Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med Genomics* **5**, 66, doi:10.1186/1755-8794-5-66 (2012).
- 93 Schutte, M. *et al.* Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors. *Nat Commun* **8**, 14262, doi:10.1038/ncomms14262 (2017).
- 94 Guinney, J. *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* **21**, 1350-1356, doi:10.1038/nm.3967 (2015).
- 95 Huang, C. S. *et al.* Synchronous and metachronous colorectal cancers: distinct disease entities or different disease courses? *Hepatogastroenterology* **62**, 286-290 (2015).
- 96 Yang, J., Peng, J. Y. & Chen, W. Synchronous colorectal cancers: a review of clinical features, diagnosis, treatment, and prognosis. *Dig Surg* **28**, 379-385, doi:10.1159/000334073 (2011).
- 97 Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W. & Burt, R. W. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* **138**, 2044-2058, doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054 (2010).
- 98 Greenstein, A. J., Slater, G., Heimann, T. M., Sachar, D. B. & Aufses, A. H., Jr. A comparison of multiple synchronous colorectal cancer in ulcerative colitis, familial polyposis coli, and de novo cancer. *Ann Surg* **203**, 123-128 (1986).
- 99 Lam, A. K. *et al.* Clinicopathological significance of synchronous carcinoma in colorectal cancer. *Am J Surg* **202**, 39-44, doi:10.1016/j.amjsurg.2010.05.012 (2011).
- 100 Liu, X. *et al.* Distinct clinicohistologic features of inflammatory bowel disease-associated colorectal adenocarcinoma: in comparison with sporadic microsatellite-stable and Lynch syndrome-related colorectal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* **36**, 1228-1233, doi:10.1097/PAS.0b013e318253645a (2012).
- 101 Nosho, K. *et al.* A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. *Gastroenterology* **137**, 1609-1620 e1601-1603, doi:10.1053/j.gastro.2009.08.002 (2009).
- 102 Ogino, S. *et al.* Epigenetic profiling of synchronous colorectal neoplasias by quantitative DNA methylation analysis. *Mod Pathol* **19**, 1083-1090, doi:10.1038/modpathol.3800618 (2006).
- 103 Cereda, M. *et al.* Patients with genetically heterogeneous synchronous colorectal cancer carry rare damaging germline mutations in immune-related genes. *Nat Commun* **7**, 12072, doi:10.1038/ncomms12072 (2016).
- 104 Day, C. P., Merlino, G. & Van Dyke, T. Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. *Cell* **163**, 39-53, doi:10.1016/j.cell.2015.08.068 (2015).

- 105 Dhandapani, M. & Goldman, A. Preclinical Cancer Models and Biomarkers for Drug Development: New Technologies and Emerging Tools. *J Mol Biomark Diagn* **8**, doi:10.4172/2155-9929.1000356 (2017).
- 106 Lovitt, C. J., Shelper, T. B. & Avery, V. M. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology (Basel)* **3**, 345-367, doi:10.3390/biology3020345 (2014).
- 107 Gillet, J. P. *et al.* Redefining the relevance of established cancer cell lines to the study of mechanisms of clinical anti-cancer drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18708-18713, doi:10.1073/pnas.1111840108 (2011).
- 108 Kirk, R. Genetics: Personalized medicine and tumour heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol* **9**, 250, doi:10.1038/nrclinonc.2012.46 (2012).
- 109 Baek, N., Seo, O. W., Lee, J., Hulme, J. & An, S. S. Real-time monitoring of cisplatin cytotoxicity on three-dimensional spheroid tumor cells. *Drug Des Devel Ther* **10**, 2155-2165, doi:10.2147/DDDT.S108004 (2016).
- 110 Mitra, A., Mishra, L. & Li, S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol* **31**, 347-354, doi:10.1016/j.tibtech.2013.03.006 (2013).
- 111 Roskelley, C. D., Srebrow, A. & Bissell, M. J. A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 736-747 (1995).
- 112 Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* **12**, 207-218, doi:10.1089/adt.2014.573 (2014).
- 113 Hughes, C. S., Postovit, L. M. & Lajoie, G. A. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **10**, 1886-1890, doi:10.1002/pmic.200900758 (2010).
- 114 Foty, R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*, doi:10.3791/2720 (2011).
- 115 Cheon, D. J. & Orsulic, S. Mouse models of cancer. *Annu Rev Pathol* **6**, 95-119, doi:10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244 (2011).
- 116 Jung, J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. *Toxicol Res* **30**, 1-5, doi:10.5487/TR.2014.30.1.001 (2014).
- 117 Bibby, M. C. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer* **40**, 852-857, doi:10.1016/j.ejca.2003.11.021 (2004).
- 118 Richmond, A. & Su, Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech* **1**, 78-82, doi:10.1242/dmm.000976 (2008).
- 119 Hsu, A. R. *et al.* In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin alphavbeta3 in an orthotopic glioblastoma model. *Mol Imaging Biol* **8**, 315-323, doi:10.1007/s11307-006-0059-y (2006).
- 120 van de Wetering, M. *et al.* Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* **161**, 933-945, doi:10.1016/j.cell.2015.03.053 (2015).
- 121 Fischer, U. *et al.* Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet* **47**, 1020-1029, doi:10.1038/ng.3362 (2015).

- 122 Losi, L., Baisse, B., Bouzourene, H. & Benhattar, J. Evolution of intratumoral genetic heterogeneity during colorectal cancer progression. *Carcinogenesis* **26**, 916-922, doi:10.1093/carcin/bgi044 (2005).
- 123 Dagogo-Jack, I. & Shaw, A. T. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 81-94, doi:10.1038/nrclinonc.2017.166 (2018).
- 124 Provenzano, P. P. *et al.* Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* **4**, 38, doi:10.1186/1741-7015-4-38 (2006).
- 125 Deschoolmeester, V. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol* **11**, 19, doi:10.1186/1471-2172-11-19 (2010).
- 126 Dolcetti, R. *et al.* High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* **154**, 1805-1813, doi:10.1016/S0002-9440(10)65436-3 (1999).
- 127 Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960-1964, doi:10.1126/science.1129139 (2006).
- 128 Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **12**, 298-306, doi:10.1038/nrc3245 (2012).
- 129 Galon, J. *et al.* The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med* **10**, 1, doi:10.1186/1479-5876-10-1 (2012).
- 130 Zellmer, V. R. & Zhang, S. Evolving concepts of tumor heterogeneity. *Cell Biosci* **4**, 69, doi:10.1186/2045-3701-4-69 (2014).
- 131 Sagaert, X., Vanstapel, A. & Verbeek, S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology*, doi:10.1159/000486721 (2018).
- 132 Fisher, R., Pusztai, L. & Swanton, C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer* **108**, 479-485, doi:10.1038/bjc.2012.581 (2013).
- 133 McGranahan, N. & Swanton, C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* **168**, 613-628, doi:10.1016/j.cell.2017.01.018 (2017).
- 134 Martinez, P. *et al.* Parallel evolution of tumour subclones mimics diversity between tumours. *J Pathol* **230**, 356-364, doi:10.1002/path.4214 (2013).
- 135 Navin, N. E. & Hicks, J. Tracing the tumor lineage. *Mol Oncol* **4**, 267-283, doi:10.1016/j.molonc.2010.04.010 (2010).
- 136 Becht, E. *et al.* Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin Cancer Res* **22**, 4057-4066, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2879 (2016).
- 137 McGranahan, N. *et al.* Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. *Sci Transl Med* **7**, 283ra254, doi:10.1126/scitranslmed.aaa1408 (2015).
- 138 Sottoriva, A. *et al.* A Big Bang model of human colorectal tumor growth. *Nat Genet* **47**, 209-216, doi:10.1038/ng.3214 (2015).

- 139 Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**, 883-892, doi:10.1056/NEJMoa1113205 (2012).
- 140 Kim, T. M. *et al.* Subclonal Genomic Architectures of Primary and Metastatic Colorectal Cancer Based on Intratumoral Genetic Heterogeneity. *Clin Cancer Res* **21**, 4461-4472, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2413 (2015).
- 141 Diaz, L. A., Jr. *et al.* The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* **486**, 537-540, doi:10.1038/nature11219 (2012).
- 142 Gore, M. E. & Larkin, J. M. Challenges and opportunities for converting renal cell carcinoma into a chronic disease with targeted therapies. *Br J Cancer* **104**, 399-406, doi:10.1038/sj.bjc.6606084 (2011).
- 143 Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 98-101 (1989).
- 144 Wang, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* **8**, 761-773, doi:10.7150/jca.17648 (2017).
- 145 Nagy, J. A., Chang, S. H., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer* **100**, 865-869, doi:10.1038/sj.bjc.6604929 (2009).
- 146 De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M. & Bracke, M. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* **123**, 2229-2238, doi:10.1002/ijc.23925 (2008).
- 147 Li, H., Fan, X. & Houghton, J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* **101**, 805-815, doi:10.1002/jcb.21159 (2007).
- 148 Yamamura, Y. *et al.* Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer Res* **75**, 813-823, doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1317 (2015).
- 149 Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 392-401, doi:10.1038/nrc1877 (2006).
- 150 Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51, doi:10.1016/j.cell.2010.03.014 (2010).
- 151 Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P. & Sica, A. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 315-322, doi:10.1007/s10555-006-9001-7 (2006).
- 152 Balkwill, F. R., Capasso, M. & Hagemann, T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* **125**, 5591-5596, doi:10.1242/jcs.116392 (2012).
- 153 Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998, doi:10.1038/ni1102-991 (2002).
- 154 Almand, B. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678-689 (2001).
- 155 Talmadge, J. E. & Gabrilovich, D. I. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer* **13**, 739-752, doi:10.1038/nrc3581 (2013).
- 156 Gabrilovich, D. I., Ostrand-Rosenberg, S. & Bronte, V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* **12**, 253-268, doi:10.1038/nri3175 (2012).

- 157 de Visser, K. E., Korets, L. V. & Coussens, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* **7**, 411-423, doi:10.1016/j.ccr.2005.04.014 (2005).
- 158 Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F., Stoorvogel, W. & Geuze, H. J. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3365-3374 (2000).
- 159 Soung, Y. H., Ford, S., Zhang, V. & Chung, J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)* **9**, doi:10.3390/cancers9010008 (2017).
- 160 Wang, Z., Chen, J. Q., Liu, J. L. & Tian, L. Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *J Transl Med* **14**, 297, doi:10.1186/s12967-016-1056-9 (2016).
- 161 Guo, W. *et al.* Exosomes: New players in cancer (Review). *Oncol Rep* **38**, 665-675, doi:10.3892/or.2017.5714 (2017).
- 162 Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24-26, doi:10.1038/nbt.1754 (2011).
- 163 Thorvaldsdottir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* **14**, 178-192, doi:10.1093/bib/bbs017 (2013).
- 164 Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139-140, doi:10.1093/bioinformatics/btp616 (2010).
- 165 Hanzelmann, S., Castelo, R. & Guinney, J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* **14**, 7, doi:10.1186/1471-2105-14-7 (2013).
- 166 McPherson, A. *et al.* deFuse: an algorithm for gene fusion discovery in tumor RNA-Seq data. *PLoS Comput Biol* **7**, e1001138, doi:10.1371/journal.pcbi.1001138 (2011).
- 167 Kim, D. & Salzberg, S. L. TopHat-Fusion: an algorithm for discovery of novel fusion transcripts. *Genome Biol* **12**, R72, doi:10.1186/gb-2011-12-8-r72 (2011).
- 168 Xi, R. L., Joe; Hadjipanayis, Angela; Kim, Tae-Min; Park, Peter J. BIC-seq: a fast algorithm for detection of copy number alterations based on high-throughput sequencing data. *Genome Biology* **11**, doi:10.1186/gb-2010-11-s1-o10 (2010).
- 169 Koboldt, D. C. *et al.* VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* **22**, 568-576, doi:10.1101/gr.129684.111 (2012).
- 170 Miller, C. A. *et al.* SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Comput Biol* **10**, e1003665, doi:10.1371/journal.pcbi.1003665 (2014).
- 171 Parkhomchuk, D. *et al.* Transcriptome analysis by strand-specific sequencing of complementary DNA. *Nucleic Acids Res* **37**, e123, doi:10.1093/nar/gkp596 (2009).
- 172 Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078-2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352 (2009).

- 173 Li, H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics* **27**, 2987-2993, doi:10.1093/bioinformatics/btr509 (2011).
- 174 Albers, C. A. *et al.* Dindel: accurate indel calls from short-read data. *Genome Res* **21**, 961-973, doi:10.1101/gr.112326.110 (2011).
- 175 Supek, F., Bosnjak, M., Skunca, N. & Smuc, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* **6**, e21800, doi:10.1371/journal.pone.0021800 (2011).
- 176 Angelova, M. *et al.* Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome Biol* **16**, 64, doi:10.1186/s13059-015-0620-6 (2015).
- 177 Bindea, G., Mlecnik, B., Angell, H. K. & Galon, J. The immune landscape of human tumors: Implications for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **3**, e27456, doi:10.4161/onci.27456 (2014).
- 178 Rooney, M. S., Shukla, S. A., Wu, C. J., Getz, G. & Hacohen, N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* **160**, 48-61, doi:10.1016/j.cell.2014.12.033 (2015).
- 179 Sekine, S. *et al.* Frequent PTPRK-RSPO3 fusions and RNF43 mutations in colorectal traditional serrated adenoma. *J Pathol* **239**, 133-138, doi:10.1002/path.4709 (2016).
- 180 Hutchinson, K. E. *et al.* BRAF fusions define a distinct molecular subset of melanomas with potential sensitivity to MEK inhibition. *Clin Cancer Res* **19**, 6696-6702, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1746 (2013).
- 181 Jones, D. T. *et al.* Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet* **45**, 927-932, doi:10.1038/ng.2682 (2013).
- 182 Matthews, J. B. *et al.* Na-K-2Cl cotransporter gene expression and function during enterocyte differentiation. Modulation of Cl<sup>-</sup> secretory capacity by butyrate. *J Clin Invest* **101**, 2072-2079, doi:10.1172/JCI1042 (1998).
- 183 Ou, S. H. Crizotinib: a novel and first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and beyond. *Drug Des Devel Ther* **5**, 471-485, doi:10.2147/DDDT.S19045 (2011).
- 184 Chang, M. T. *et al.* Identifying recurrent mutations in cancer reveals widespread lineage diversity and mutational specificity. *Nat Biotechnol* **34**, 155-163, doi:10.1038/nbt.3391 (2016).
- 185 Nelson, V. M. & Benson, A. B., 3rd. Status of targeted therapies in the adjuvant treatment of colon cancer. *J Gastrointest Oncol* **4**, 245-252, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2013.035 (2013).
- 186 Taipale, J. *et al.* Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature* **406**, 1005-1009, doi:10.1038/35023008 (2000).
- 187 Zanella, E. R. *et al.* IGF2 is an actionable target that identifies a distinct subpopulation of colorectal cancer patients with marginal response to anti-EGFR therapies. *Sci Transl Med* **7**, 272ra212, doi:10.1126/scitranslmed.3010445 (2015).
- 188 Lee, T. K., Barringer, M., Myers, R. T. & Sterchi, J. M. Multiple primary carcinomas of the colon and associated extracolonic primary malignant tumors. *Ann Surg* **195**, 501-507 (1982).

- 189 Zhao, H. *et al.* ARID2: a new tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2**, 886-891, doi:10.18632/oncotarget355 (2011).
- 190 Khan, M. A. *et al.* Thymoquinone inhibits cancer metastasis by downregulating TWIST1 expression to reduce epithelial to mesenchymal transition. *Oncotarget* **6**, 19580-19591, doi:10.18632/oncotarget3973 (2015).
- 191 Obacz, J. *et al.* The role of AGR2 and AGR3 in cancer: similar but not identical. *Eur J Cell Biol* **94**, 139-147, doi:10.1016/j.ejcb.2015.01.002 (2015).
- 192 Yla-Herttuala, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I. & Hartikainen, J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* **49**, 1015-1026, doi:10.1016/j.jacc.2006.09.053 (2007).
- 193 De Marchi, T. *et al.* Annexin-A1 and caldesmon are associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive recurrent breast cancer. *Oncotarget* **7**, 3098-3110, doi:10.18632/oncotarget6521 (2016).
- 194 Xiao, Q. & Ge, G. Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis. *Cancer Microenviron* **5**, 261-273, doi:10.1007/s12307-012-0105-z (2012).
- 195 Rost, T. *et al.* Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* **23**, 1565-1573 (2003).
- 196 Kaneda, A. *et al.* Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res* **64**, 6410-6415, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1543 (2004).
- 197 Wu, G. *et al.* LOXL1 and LOXL4 are epigenetically silenced and can inhibit ras/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human bladder cancer. *Cancer Res* **67**, 4123-4129, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0012 (2007).
- 198 Cortes, D. F. *et al.* Differential gene expression in normal and transformed human mammary epithelial cells in response to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **50**, 1565-1574, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.002 (2011).
- 199 Yang, W. S. *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* **156**, 317-331, doi:10.1016/j.cell.2013.12.010 (2014).
- 200 Bissa, B., Beedle, A. M. & Govindarajan, R. Lysosomal solute carrier transporters gain momentum in research. *Clin Pharmacol Ther* **100**, 431-436, doi:10.1002/cpt.450 (2016).
- 201 Prevede, N. *et al.* The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Oncogene* **34**, 3826-3838, doi:10.1038/onc.2014.309 (2015).
- 202 Kim, H. S. *et al.* GREM1 is expressed in the cancer-associated myofibroblasts of basal cell carcinomas. *PLoS One* **12**, e0174565, doi:10.1371/journal.pone.0174565 (2017).
- 203 Koide, N. *et al.* Evidence for Critical Role of Lymphocyte Cytosolic Protein 1 in Oral Cancer. *Sci Rep* **7**, 43379, doi:10.1038/srep43379 (2017).
- 204 Barras, D. BRAF Mutation in Colorectal Cancer: An Update. *Biomark Cancer* **7**, 9-12, doi:10.4137/BIC.S25248 (2015).
- 205 Goel, A. *et al.* Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res* **63**, 1608-1614 (2003).

- 206 Sinicrope, F. A. *et al.* Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* **131**, 729-737, doi:10.1053/j.gastro.2006.06.005 (2006).
- 207 Losi, L., Bouzourene, H. & Benhattar, J. Loss of Smad4 expression predicts liver metastasis in human colorectal cancer. *Oncol Rep* **17**, 1095-1099 (2007).
- 208 Alhopuro, P. *et al.* SMAD4 levels and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 6311-6316, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0244 (2005).
- 209 Mehrvarz Sarshekeh, A. *et al.* Association of SMAD4 mutation with patient demographics, tumor characteristics, and clinical outcomes in colorectal cancer. *PLoS One* **12**, e0173345, doi:10.1371/journal.pone.0173345 (2017).
- 210 Maehama, T. & Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378 (1998).
- 211 Atreya, C. E. *et al.* PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival. *Cancer Med* **2**, 496-506, doi:10.1002/cam4.97 (2013).
- 212 Li, X. H. *et al.* PTEN expression and mutation in colorectal carcinomas. *Oncol Rep* **22**, 757-764 (2009).
- 213 Day, F. L. *et al.* PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **19**, 3285-3296, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3614 (2013).
- 214 Eklof, V. *et al.* The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer. *Br J Cancer* **108**, 2153-2163, doi:10.1038/bjc.2013.212 (2013).
- 215 Martinez-Lopez, E. *et al.* Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* **114**, 1180-1187 (1998).
- 216 Cusnir, M. & Cavalcante, L. Inter-tumor heterogeneity. *Hum Vaccin Immunother* **8**, 1143-1145, doi:10.4161/hv.21203 (2012).
- 217 Raponi, M., Winkler, H. & Dracopoli, N. C. KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 413-418, doi:10.1016/j.coph.2008.06.006 (2008).
- 218 Bertotti, A. *et al.* A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* **1**, 508-523, doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0109 (2011).
- 219 Gao, H. *et al.* High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat Med* **21**, 1318-1325, doi:10.1038/nm.3954 (2015).
- 220 Gerlinger, M. & Swanton, C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer* **103**, 1139-1143, doi:10.1038/sj.bjc.6605912 (2010).
- 221 Navin, N. E. Tumor evolution in response to chemotherapy: phenotype versus genotype. *Cell Rep* **6**, 417-419, doi:10.1016/j.celrep.2014.01.035 (2014).
- 222 Psaila, B. & Lyden, D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* **9**, 285-293, doi:10.1038/nrc2621 (2009).

- 223 Zarour, L. R. *et al.* Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **3**, 163-173, doi:10.1016/j.jcmgh.2017.01.006 (2017).
- 224 Kim, M. O. *et al.* ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 283-290, doi:10.1038/nsmb.2217 (2012).
- 225 Zhao, W. *et al.* Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* **23**, 395-402, doi:10.1038/sj.onc.1207067 (2004).
- 226 Chan, G., Gu, S. & Neel, B. G. Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. *Blood* **121**, 3594-3598, doi:10.1182/blood-2012-12-476200 (2013).

## 8. Verzeichnis der erfolgten Publikationen

M. Schütte\*, T. Risch\*, **N. Abdavi-Azar\***, K.Boehnke\*, D. Schumacher\*, et al. **Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors.** Nature Communications (2017)

\* Geteilte Erst-Autorenschaft

## 9. Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Deutsche Bezeichnung	Englische Bezeichnung
<b>CAF</b>	Krebs-assoziierten Fibroblasten	Cancer associated fibroblasts
<b>CF</b>	Darmkontrollen	-
<b>CIMP</b>	CpG-Insel-Methylator-Phänotyp	CpG island methylator phenotype
<b>CIN</b>	chromosomale Instabilität	Chromosomal instability
<b>CNV</b>	Kopierzahlvarianten	Copy number variants
<b>CRC</b>	Kolorektal Karzinomen	Colorectal Cancer
<b>DGEA</b>	Differentielle Genexpressionsanalyse	Differential gene expression analysis
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	Deoxyribonucleic acid
<b>ECM</b>	Extrazellulären Matrix	Extra cellular matrix
<b>EGFR</b>	epidermalen Wachstumsrezeptor	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>EMT</b>	Epithelial-mesenchymale Transition	Epithelial–mesenchymal transition
<b>GO</b>	Gen Ontologie	Gene Onotology
<b>Indels</b>	Deletion/Insertion Polymorphismen	Insertion and deletions
<b>ITH</b>	Intra-tumor Heterogenität	Intra tumor heterogeneity
<b>LOH</b>	Verlust von Heterozygosität	Loss of heterozygosity
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	Mitogen-activated protein kinase
<b>MDSC</b>	myeloide Suppressor Zellen	Myeloid-derived suppressor cells
<b>MHC</b>	Haupthistonkompatibilitätskomplexes	Major Histocompatibility Complex
<b>MSI</b>	Mikrosatelliten Instabilität	Microsatellite instability
<b>MSS</b>	Mikrosatellitenstabile	Microsatellite stable
<b>mTORC</b>	mTOR-Komplexe	mTOR Complex
<b>NF</b>	Leberkontrollen	-
<b>OT</b>	Oncotrack	Oncotrack
<b>PDO</b>	Patienten-abgeleitete Organoide	Patient-derived organoids
<b>PDX</b>	Patienten-abgeleitete Xenografts	Patient-derived xenografts
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure	Ribonucleic acid
<b>RNAseq</b>	Vollständige Transkriptomsequenzierung	RNA sequencing
<b>RPKM</b>	-	Reads Per Kilobase per Million mapped
<b>RTK</b>	Rezeptor-Tyrosin Kinasen	Receptor tyrosine kinase
<b>SCID</b>	schwere kombinierte Immunschwäche	Severe combined immune deficiency
<b>SNV</b>	Varianten der Basensequenz	single nucleotide variants
<b>TAM</b>	Tumor assoziierte Makrophagen	Tumor associated macrophages
<b>TME</b>	Tumor Mikroumgebung	Tumor microenviroment
<b>VEGF</b>	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>WES</b>	Exom Sequenzierung	Whole exome sequencing
<b>WGS</b>	Vollständige Genomsequenzierung	Whole genome sequencing

## 10. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1.1: Genereller Dickdarmaufbau.** a) Aufbau des Dickdarms in die verschiedenen Regionen (Blinddarm, aufsteigender-, querverlaufender, absteigender Dickdarm, Sigmoid und Mastdarm. b) Aufbau der Darmzotten und der Einbuchtungen (Krypten). Die spezifischen Zelltypen sind dargestellt, sowie die verschiedenen Schichten..... 14

**Abbildung 1.2 Vereinfachtes Modell der genetischen Entwicklung von der gesunden Darmzelle zum Kolorektal Karzinomen.** MSI positiven Tumore zeigen Keimbahnmutationen in *MLH1* oder *MSH2* und treten daher sehr früh in der Entwicklung auf. Die eigentliche Tumorentwicklung beginnt mit einer initialen Deaktivierung von *APC*, was zu einem kleinen Adenom führt. Eine Aktivierungen von *KRAS*, führt zu einem großen Adenom und letztendlich durch Deaktivierungen in *TP53*, *SMAD4*, *TGRBR2* oder den MMR-Genen, sowie aktivierende Veränderungen in *PIK3CA* und *PTEN* bildet sich das eigentliche Karzinom. .... 20

**Abbildung 1.3 Klassifizierung von Kolorektal Karzinomen in distinkte molekulare Gruppen.** a) CMS1-4 Einteilung der Tumore und die korrespondierenden 3 Hauptgruppen von OncoTrack (*ASCL2/MYC*, Entero/Goblet und ECM/EMT). b) Die OncoTrack-Einteilung und die spezifische Aufteilung der Subgruppen (A-F). Die MSI-Tumore fallen in die Entero/Goblet-Gruppen und sind separat markiert. .... 24

**Abbildung 1.4 Präklinische Modelle.** Es gibt zwei Modellsysteme: Zellkultur (links) und Xenograft-Mausmodelle (rechts). Die Zellkultur kann in einer 2D Monoschicht oder als 3D Sphäroid Modell erstellt werden und die Arzneimittelsensitivität kann mit verschiedenen Auslesemethoden bestimmt werden: biochemisch (Proteinmengen Bestimmung), genetisch (Genexpressions-Bestimmung) oder bildgebend (Fluoreszenzen oder mikroskopisch). Xenograften kann man als ektopisches oder orthotopisches Modell erstellen und entweder mit T/C (ektopisches) oder mittels Fluoreszenz/Luziferase (orthotopisches) auslesen. Die Daten werden analysiert und die Wirksamkeit der Arzneimittel wird bestimmt..... 28

**Abbildung 1.5: Die Tumormasse.** Die verschiedenen Zelltypen der Tumormikroumgebung die zusammen mit den verschiedenen Tumorklonen die Tumormasse ausmachen. .... 32

**Abbildung 1.6: OncoTrack PDO, PDX Generation.** Der Tumor wird aus dem Patienten entnommen und geteilt. Ein Teil geht an die Pathologie, ein Teil für die Omics Datengenerierung. *Oberer Teil:* Der Teil für die PDO Generation wird erstmal in eine Einzell-Zellsuspension gebracht und in einer 24-well Platten wachsen die Zellen zu Organoid Kulturen an. Für die Medikamentenzugabe wurden die Organoide wieder disaggregiert und 5000 Zellen/Well in eine 384-well Platte gegeben und 3 Tage lang behandelt. *Unterer Teil:* PDX Engraftment: Das Tumorstück wird aufgeteilt und subkutan in 3 Mäuse injiziert, sobald die Tumore anwachsen sind werden sie geerntet und wieder auf Mäuse verteilt. Dieser Schritt wird wiederholt. Wenn es zur Medikamentenbehandlung kommt, teilt man den Tumor-Pool auf eine Kontroll- und eine Testgruppe auf. Die Medikamentensensitivität wird mittels der T/C Methode bestimmt. Sowohl bei den PDO als auch bei den PDX Modellen werden Proben zur Erstellung einer Biobank gesichert. Die PDX, sowie die PDO Modell-Erstellung, und die Medikamentenscreens wurde von Kollaborationspartnern übernommen. .... 34

**Abbildung 1.7: Eine Übersicht zu dem OncoTrack Projekt und meine Arbeit innerhalb des Konsortiums.** a) Oncotrack Übersicht: Aufgeteilte CRC Patiententumore werden für die Datenanalyse und Generation verwendet, ein Teil für die PDX und ein Teil für die PDO Erstellung. Unbehandelte Modelle und die Primärtumore werden mittels WGS; WES und RNAseq analysiert. Modelle wurden mit 16 verschiedenen Medikamenten behandelt und die Sensitivität zu den Wirkstoffen wurde gemessen. Die molekularen Informationen werden mit den Arzneimittelsensitivitäten korreliert zur Identifikation von Biomarkern. **b-e)** Meine Arbeiten innerhalb des Projektes. b)

Umfangreiche Analyse der Genome von CRC Donor-Tumoren und den Patiententumoren PDX und PDO Modellen. **c)** Fallstudie eines synchronen Tumors in einem Patienten. Vergleichende genomische und transkriptomische Analyse zwischen allen Tumoreinheiten und Modellen. **d)** Reduzierung der Signaturen der molekularen Hauptgruppen (ASCL2/MYC, Entero/Goblet und ECM/EMT). Bestimmung einer zuverlässigen Minisignatur. **e)** Charakterisierung der Tumormikroumgebung mit dem Fokus auf den drei molekularen Hauptgruppen. .... 35

**Abbildung 4.1: Genfusionsdetektion.** **a)** Schematische Darstellung der möglichen Fusionseffekte: Intrachromosomale Veränderung (Deletion, Duplikation und Inversion) und die Interchromosomale Veränderung (Translokation). **b)** Prozentualer Anteil der verschiedenen Fusionseffekte in der Kohorte. **c,d,e)** Schematische Darstellung von Fusionstranskripten. Gezeigt sind, die chromosomalen Regionen, die beiden Fusionspartner, die Exon Struktur (blau, rot und graue Boxen), die Fusionsbruchpunkte (rote Linie), die Validation mittels Sanger-Sequenzierung und die RNA Sequenz-Abdeckung (im USCS Browser). In c) sind vier Beispiele für deletierende Fusionen (*ZNF322A-SLC12A2*, *ME2-SMAD4*, *NFATC3-CTCF*, *APC-REEP5*), in d) zwei aktivierende Fusionen (*TRIM24-BRAF* und *FDFT1-FZD3*) und in e) eine aktivierende Fusion in einer PDX Probe (*EML4-ALK*) gezeigt. .... 56

**Abbildung 4.2: Kopierzahlen Variationen und LOH Profile.** Die beiden Circos-Plots zeigen das chromosomale Profil (a) und das LOH-Profil (b) von sowohl Tumoren als auch Metastasen. Die Kohorte wurde in drei Gruppen eingeteilt: Hypoploiden- (äußerster Kreis n=43), chromosomal stabilen MSI- (mittlerer Kreis, n=6) und Hyperploide-Gruppe (innerer Kreis, n=40). Häufig amplifizierte- (*IGF2*- rot) und deletierte- (*SMAD4*, *MACROD2*, *FHIT*, *PTEN* und *RBFOX1*, blau) Gene sind in beiden Plots markiert. Tumore mit einer Reinheit von mindestens 35% sind gezeigt. ... 57

**Abbildung 4.3: Mutationen im Vergleich.** **a)** Fraktion an tumorrelevanten somatischen SNV/Indels (Methoden) die Unterschiede aufzeigen im Tumor-Modell Vergleich. Es wurden 56 Patienten Tumore (Tumorreinheit  $\geq 40\%$ ) und ihre passenden Modelle (37 PDX und 37 PDO), sowohl wie fünf PDX-PDO Paare ohne Patiententumor verglichen. Der Vergleich von Patient vs. PDX ist in Blau, Patient vs. PDO in Gelb und PDX vs. PDO in Rot gezeigt. Proben die in Abbildung 4.4 gezeigt sind, sind in fetter Schrift markiert, MSI und die hypermutierten Proben sind mit einem Sternchen versehen. Die Vergleiche sind von links nach rechts und wie folgt angeordnet: Patienten von dem nur ein PDX erstellt wurde, Patienten von dem nur ein PDO erstellt wurde, Patienten von dem PDX und PDO erstellt wurden und zuletzt PDX und PDO ohne passendem Patiententumor. Im Falle von 278 und 302, steht das Suffix „X“ für PDX und „CX“ für ein PDX, welches aus einer PDO Probe entstanden ist. **b+c)** Stabilität von Xenograft und Organoid Modellen. **b)** Vergleich von CRC relevante somatische Veränderungen in frühen und späten Passagen von vier PDO Modellen. In Grün markierte Zellen wurde die Mutation gefunden und in Rot nicht, Grau bedeutet zu geringe Abdeckung an der Stelle **c)** Vergleich von allen somatischen Mutationen in fünf PDX Modellen eines Patienten. Grün bedeutet, dass die Mutation gefunden wurde in dem Patienten. .... 59

**Abbildung 4.4: Molekulare Unterschiede zwischen Patienten Tumoren und Modellen in CRC-relevante Gene.** **a)** Somatische klonale Mutationsunterschiede in Patienten/PDX (links), Patienten/PDO (Mitte), und Patienten/PDX/PDO (rechts). Gene, die nur einmal mutiert vorgefunden wurden, entweder im Tumor oder in einem Modell, sind rot markiert. Gene mit verschiedenen Mutationen in Tumor und Modellen sind orange markiert. Mutationen, die mit gezielter Sequenzierung validiert wurden, sind mit einem Sternchen versehen. MSI und die hypermutierten Proben zeigen einen grauen Hintergrund. Nur Krebs-relevante Gene aus TCGA, PAN und OncoTrack („OT“) Studie sind gezeigt (siehe Methoden). Patienten mit einer Tumorreinheit von  $\geq 40\%$  und mindestens einer unterschiedlichen Mutation in Tumor-Modell-Vergleich in den relevanten CRC Genen sind gezeigt. **b)** EGFR

Mutationen im PDX und PDO von 327 und die Auswirkung von zwei EGFR-Inhibitoren (AZD8931 & Afatinib) konnte eine Medikamenten-Wirksamkeit im PDO und keine im PDX festgestellt werden (Response-Daten von Kollaborationspartner). ..... 61

**Abbildung 4.5: SciClone Klonalitätsanalysen an zwei Patienten und der zugehörigen PDX und PDO Probe.** Im oberen Teil ist der Patient 327 (MSI und 40% Tumorreinheit) und darunter 323 (MSS und 60% Tumorreinheit). Die Graphen zeigen die Mutationen in diploiden Regionen, geclustert nach der Allelfrequenz (AF) im Tumor vs. PDX (links), Tumor vs. PDO (Mitte) und PDX vs. PDO (rechts). Individuelle Mutationsgruppen sind in unterschiedlichen Farben gezeigt, und Mutationsgruppen, die geteilt werden in grau. Interessante Mutationen in den Gruppen sind aufgezeigt. .... 62

**Abbildung 4.6: Chromosomale Unterschiede von Patiententumoren und ihren passenden Modellen.** *Oberer Teil:* Chromosomale Erweiterungen (links) und Verluste (rechts) in den drei Ploidie Gruppen (Hyperploid – n=21, Hypoploid – n=28 und MSI – n=6). Dazugewonnene Regionen im Patienten sind in Rot und in Modellen in Lila gezeigt. Dahingegen sind verlorengegangene Regionen im Patienten in Grün und in Modellen in Blau markiert. *Unterer Teil:* Die Quantifizierung der zusätzlichen Erweiterungen (links) und Verluste (rechts) in Prozent. .... 64

**Abbildung 4.7: IGF2-Expression in Patient, PDO und PDX Proben und Cetuximab Response in den PDX vom Patienten 150\_MET1.** **a)** Alle Patienten Tumore, die eine Expression von mehr als 10 RPKM haben, sind aufgelistet und Orange gefärbt. RPKM-Werte über 100 sind Rot hinterlegt. Patienten die PDX und PDO Modellen haben, sind Fett geschrieben. **b)** Die Cetuximab Sensitivität von den fünf PDX von Patient 150\_Met1. Die Response ist in T/C Werte angegeben. Wobei ein PDX geringfügige Sensitivität (T/C: 42- Orange) zu Cetuximab zeigt und alle anderen resistent sind (65-124 - Rot). Die PDX sind nach aufsteigendem T/C Wert sortiert und die Kategorisierung der T/C zu Medikamenten-Sensitivitäten ist gezeigt. Der PDX 150\_MET1\_XEN hat eine Überexpression von *IGF2* (Response-Daten von Kollaborationspartner). .... 65

**Abbildung 4.8: Eine Übersicht von den Tumoreinheiten und ihre abgeleiteten Modelle des Patienten 118.** Die Tumorreinheit ist über Tumor 1 (T1), Tumor 2 (Tumor 2) und der Metastase (Met) als Prozent angegeben. Die Treibermutationen stehen unter den Tumoreinheiten und gleiche Mutationen sind in einer Farbe dargestellt. .... 67

**Abbildung 4.9: Vergleich von den Tumoreinheiten.** **a)** SciClone Klonalitätsanalysen an Tumor 1, Tumor 2 und der Metastase. Die Graphen zeigen die Mutationen in diploiden Regionen, geclustert nach der Allelfrequenzen (AF) im Tumor 1 vs. Tumor 2 (oben), Tumor 2 vs. Metastase (Mitte) und Tumor 1 vs. Metastase (unten). Individuelle Mutationsgruppen sind den angedeuteten Farben gezeigt. **b)** Der Circos-Plot zeigt das Chromosomen- und das LOH-Profil von sowohl Tumoren als auch den Modellen. Besonders divergente Regionen sind markiert. .... 69

**Abbildung 4.10: SciClone Klonalitätsanalysen der Tumor-Modell-Paare.** Der Vergleich von Tumor 1-PDX ist im linken Graphen und der Metastase-PDO Vergleich im rechten gezeigt. Die Graphen zeigen die Mutationen in diploiden Regionen, geclustert nach den Allelfrequenzen (AF). Individuelle Mutationsgruppen sind den angedeuteten Farben gezeigt, und Mutationsgruppen, die geteilt werden in grau. .... 72

**Abbildung 4.11: Expressions-Heatmap der Kernsignatur.** Unbeaufsichtigtes hierarchisches Clustering der Expression von 37 Gene in 90 Patienten. Gene, die zu Immunsignalen assoziiert sind mit dem Wort Immun markiert. Die Einteilung der Patienten in die drei molekularen Gruppen ist oberhalb des Plots gezeigt. Die Gene, die für eine Gruppe spezifisch sind, sind markiert. .... 75

**Abbildung 4.12: Analysen des Leber-Kontrollgewebes.** **a)** DGEA Analysen von 12 Leber Kontrollen. Funktionale Annotationen der beiden Gengruppen sind aufgelistet. Dabei sind die GO Termine nicht übersetzt und entsprechen dem Original. **b)** Immunprofil der Leber Kontrollen - die mittlere Genexpression von publizierten Immun-Zelltypen und -Prozessen ist gezeigt. Die Sternchen stehen für statistisch signifikante Unterschiede ( $FDR \leq 0.05$ ). Die Aufteilung in zwei Gruppen bezüglich der Region des Tumors ist in beiden Plots farblich markiert. Dabei sind die Signaturen nicht übersetzt und entsprechen dem Original. .... 77

**Abbildung 4.13: Analysen des Dickdarm-Kontrollgewebes.** **a)** DGEA Analysen von 31 Dickdarm Kontrollen. Funktionale Analysen der beiden Gengruppen sind aufgezeigt. **b)** Immunprofil der Kontrollen - die mittlere Genexpression von publizierten Immun-Zelltypen und -Prozessen ist gezeigt. Die Sternchen stehen für statistisch signifikante Unterschiede ( $FDR \leq 0.05$ ). Die Auftrennung in die adaptive und angeborene Immunantwort ist rechts gezeigt, sowohl die Aufteilung in die Kontrollgruppen 1 und 2 (KG1 und 2 – rote Boxen oberhalb des Plots). Die Aufteilung in zwei Gruppen bezüglich der Region des Tumors ist in beiden Plots farblich markiert. Dabei sind die Signaturen nicht übersetzt und entsprechen dem Original. .... 79

**Abbildung 4.14: TME Gene aufgeteilt nach den molekulare Gruppen.** Venn Diagramm mit der Anzahl an Genen die in den Modellen nicht exprimiert sind, jedoch in den Tumoren. .... 80

**Abbildung 4.15: Funktionelle Annotationen der 115 Gene der gruppenunspezifischen TME.** Die funktionellen Analysen sind mittels " Gene Ontology" (GO)-Terme beschrieben. Im oberen Bereich findet sich ein sogenanntes Kacheldiagramm („TreeMap“) der angereicherten zellulären Komponente. GO-Terms, die zusammen gefasst werden können sind in einer Farbe hinterlegt und der Oberbegriff ist seitlich genannt. Die Größe der Kacheln korreliert zu dem  $\log_{10}$  P-Wert, dabei gilt je größer die Kachel desto signifikanter ist de GO-Term. Im unteren Bereich sind die molekularen Funktionen (links) und die biologischen Prozesse dargestellt. Dabei repräsentiert jeder Punkt einen biologischeren Prozess oder eine molekulare Funktion. Die Größe der Punkte basiert auf dem  $\log_{10}$  P-Wert. Die X- und Y-Achse repräsentieren einen semantischen Raum, der zur Gruppierung verwandter Begriffe dient. Einzelne signifikante Go-Terme sind abgebildet. Dabei sind die GO-Terme nicht übersetzt und entsprechen dem Original. .... 82

**Abbildung 4.16: Funktionelle Annotationen der gruppenpezifischen Gene der TME.** Die funktionellen Analysen sind mittels " Gene-Ontology" (GO)-Terme beschrieben. Die angereicherten zellulären Komponenten sind in einem sogenannten Kacheldiagramm („TreeMap“) dargestellt. GO-Terms, die zusammen gefasst werden können sind in einer Farbe hinterlegt und der Oberbegriff ist genannt. Die Größe der Kacheln korreliert zu dem  $\log_{10}$  P-Wert, dabei gilt je größer die Kachel desto signifikanter ist de GO-Term. Dabei sind Gene spezifisch für die Entero/Goblet- Gruppe (6 Gene) in **a)** gezeigt, die in ASCL2/MYC (28 Gene) in **b)** und die ECM/EMT-Gene (275 Gene) in **c)**. Dabei sind die GO-Terme nicht übersetzt und entsprechen dem Original. .... 84

**Abbildung 4.17: Expressionsanalysen einiger Kandidatengene der gruppenpezifischen TME.** Rechte Seite: zeigt die Expression ( $\log_2(RPKM)$ ) der Patienten, PDX & PDO jeweils aufgeteilt in die drei molekularen Gruppen (ASCL2/MYC, ECM/EMT & Entero/Goblet). Mittig: Streudiagramm der Patiententumor Expression ( $\log_2(RPKM)$ ) vs. der Tumorreinheit (TR – in Prozent). Die Zugehörigkeit zu den drei molekularen Gruppen ist farblich markiert. Linke Seite: Spearmans Rangkorrelationskoeffizient im Zusammenhang von Tumorreinheit und der Expression-Werte für jedes Gen innerhalb der molekularen Gruppe. Dabei ist rho und der P-Wert für jede Gruppe gezeigt und der niedrigste Korrelationswert ist rot markiert. In **a)** sind drei Gene der ASCL2/MYC Gruppe gezeigt, in **b)** zwei Gene der ECM/EMT Gruppe und in **c)** zwei Gene der Entero/Goblet Gruppe. .... 87

**Abbildung 4.18: Expressions-Heatmap der gruppenspezifischen Kernsignaturen der TME in den präklinischen Modellen.** Unbeaufsichtigtes hierarchisches Clustern von der Expression der drei Kernsignaturen der gruppenspezifischen TME. Die Anzahl der Gene in jeder Signatur ist aufgelistet und in 58 PDX und PDOs gezeigt. Die Einteilung der Modelle in die drei molekularen Gruppen ihrer passenden Primärtumore ist oberhalb des Plots abgebildet..... 88

**Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der ITH während der Behandlung mit Medikamenten.** Die heterogene Tumormasse (verschiedene Tumorklone sind durch verschiedene Farben dargestellt) vor der Behandlung (links). Die Medikamentenbehandlung führt zu einer selektiven Auswahl eines Medikamenten resistenten Klons (Dunkelgrün) und der Flaschenhals, der die Heterogenität erstmals reduziert. Der Tumorklon kann nun wieder wachsen und es entsteht wiederum ein neuer heterogener Tumor (rechts). Der zeitliche Ablauf und die entsprechende Tumorgöße (rote Dreiecke) sind unterhalb gezeigt. .... 96

## 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Aufgelistete Methoden, die andere durchgeführt haben. ....	38
Tabelle 2.2: Aufgelistete Methoden, die ich zusammen mit anderen Personen durchgeführt habe. ....	38
Tabelle 2.3: Aufgelistete Kits die genutzt wurden .....	39
Tabelle 2.4: Aufgelistete Maschinen.....	40
Tabelle 2.5: Auflistung der genutzten Software, Websites und Pakete. ....	40
Tabelle 2.6: Auflistung der genutzten Chemikalien, die nicht in einem Kit zu finden waren .....	41
Tabelle 2.7: Auflistung der Proben, mit der Proben ID, den präklinischen Modellen, den Tumor Ursprung, das Geschlecht des Patienten, das Tumorstadium und die Tumorreinheit (in Prozent). ....	42
<b>Tabelle 4.1: Übersicht der CRC-relevanten Mutationen in Tumor 1 (T1), der Metastase, PDX, PDO und den beiden Regionen vom Tumor 1 (H und F).</b> Subklonale Mutationen wurden mit einem Sternchen markiert. Die Mutationen in T1, Metastase, PDX und PDO wurden mittels NGS detektiert (grün), die Regionen H und F mit Sanger Sequenzierung (orange). Nur Krebs-relevante Gene aus TCGA, PAN und OncoTrack („OT“) Studie sind getestet worden.....	72
<b>Tabelle 4.2: Kandidatengene der gruppenspezifischen TME.</b> Zwei Gene sind für die Entero/Goblet Gruppe ausgewählt worden, sieben für die ASCL2/MYC Gruppe und fünf für die ECM/EMT Gruppe. ....	85

## 12. Anhang

Die kompletten NGS Rohdaten für die Patienten Tumore, Blut, PDX und PDO sind nach Anfrage beim European Genome-phenome Archive (EGA) von der EBI-Daten-Verwaltung unter der Zugriffsnummer: EGAS00001001752 zu erhalten.

Die Daten die dieser Arbeit zugrunde liegen sind wie folgt zu finden:

1. **Die Kopierzahlen Variationen („CNV“)** ist in den Ergänzenden Daten 2 der Publikation <sup>93</sup>.
2. **Die kombinierte Liste aller genomische Veränderungen in Patienten Tumoren, PDX und PDO** ist in den Ergänzenden Daten 3 der Publikation <sup>93</sup>.
3. **Die Liste der identifizierten Genfusionen** ist in den Ergänzende Daten 4 der Publikation <sup>93</sup>.
4. **Die Liste an unterschiedlichen SNVs und Indels in den Patienten Tumoren-Modellpaaren** ist in den Ergänzenden Daten 6 der Publikation <sup>93</sup>.
5. **Übersicht der SciClone Analysen der Kohorte** ist in den Ergänzenden Daten 8 der Publikation <sup>93</sup>.

**Ergänzende Tabelle 1:** Liste der TME Gene und ihre Zugehörigkeit zu den drei molekularen Gruppen (Enter/Goblet (E/G), ASCL2/MYC(A/M) und ECM/EMT (E/E)).

g	Symbol	chr	E/G	A/M	E/E
ENSG00000130635	COL5A1	9	X		X
ENSG00000143248	RGS5	1	X	X	X
ENSG00000166923	GREM1	15	X		
ENSG00000182492	BGN	X	X		X
ENSG00000204287	HLA-DRA	6			X
ENSG0000000938	FGR	1		X	X
ENSG0000000971	CFH	1		X	X
ENSG00000005249	PRKAR2B	7			X
ENSG00000005844	ITGAL	16			X
ENSG00000006074	CCL18	17		X	X
ENSG00000006075	CCL3	17		X	X
ENSG00000006638	TBXA2R	19			X
ENSG00000007237	GAS7	17			X
ENSG00000007908	SELE	1			X
ENSG00000010295	IFFO1	12			X
ENSG00000010327	STAB1	3	X	X	X
ENSG00000010610	CD4	12	X	X	X
ENSG00000011028	MRC2	17		X	X
ENSG00000011201	KAL1	X		X	X
ENSG00000011465	DCN	12	X	X	X
ENSG00000011600	TYROBP	19	X	X	X
ENSG00000013016	EHD3	2			X
ENSG00000015285	WAS	X			X
ENSG00000019169	MARCO	2			X
ENSG00000019549	SNAI2	8	X	X	X
ENSG00000020181	GPR124	8		X	X
ENSG00000022267	FHL1	X			X
ENSG00000024422	EHD2	19		X	X
ENSG00000026025	VIM	10		X	X
ENSG00000026751	SLAMF7	1			X
ENSG00000037280	FLT4	5			X
ENSG00000038427	VCAN	5	X	X	
ENSG00000038945	MSR1	8			X
ENSG00000041982	TNC	9	X	X	X

g	Symbol	chr	E/G	A/M	E/E
ENSG00000144810	COL8A1	3		X	X
ENSG00000145147	SLIT2	4			X
ENSG00000145623	OSMR	5	X	X	X
ENSG00000145649	GZMA	5	X		X
ENSG00000145936	KCNMB1	5			X
ENSG00000147100	SLC16A2	X	X		X
ENSG00000147113	CXorf36	X			X
ENSG00000147443	DOK2	8			X
ENSG00000148516	ZEB1	10		X	X
ENSG00000149131	SERPING1	11	X	X	X
ENSG00000149557	FEZ1	11			X
ENSG00000149596	JPH2	20			X
ENSG00000149633	KIAA1755	20			X
ENSG00000149968	MMP3	11	X		
ENSG00000150630	VEGFC	4			X
ENSG00000150995	ITPR1	3			X
ENSG00000151388	ADAMTS12	5			X
ENSG00000151468	CCDC3	10	X	X	X
ENSG00000151617	EDNRA	4		X	X
ENSG00000151702	FLI1	11			X
ENSG00000152049	KCNE4	2			X
ENSG00000152377	SPOCK1	5			X
ENSG00000152583	SPARCL1	4	X	X	X
ENSG00000152661	GJA1	6	X	X	
ENSG00000153814	JAZF1	7			X
ENSG00000154096	THY1	11	X	X	X
ENSG00000154133	ROBO4	11		X	X
ENSG00000154453	GBP5	1			X
ENSG00000154553	PDLIM3	4		X	X
ENSG00000154589	LY96	8	X	X	X
ENSG00000154721	JAM2	21			X
ENSG00000154734	ADAMTS1	21	X	X	X
ENSG00000154736	ADAMTS5	21			X
ENSG00000154783	FGD5	3			X

ENSG0000004362	LCP2	5		X	X
ENSG00000058091	CDK14	7			X
ENSG00000060718	COL11A1	1			X
ENSG00000060982	BCAT1	12			X
ENSG00000061337	LZT51	8		X	X
ENSG00000061918	GUCY1B3	4		X	X
ENSG00000064989	CALCR1	2		X	X
ENSG00000066056	TIE1	1		X	X
ENSG00000066336	SP11	11	X	X	X
ENSG00000069122	GPR116	6	X	X	X
ENSG00000071246	VASH1	14			X
ENSG00000072163	LIMS2	2			X
ENSG00000072840	EVC	4			X
ENSG00000072952	MRV11	11		X	X
ENSG00000073712	FERMT2	14		X	X
ENSG00000074660	SCARF1	17			X
ENSG00000076706	MCAM	11	X	X	X
ENSG00000077420	APBB1IP	10			X
ENSG00000077782	FGFR1	8			X
ENSG00000077942	FBLN1	22			X
ENSG00000078596	ITM2A	X			X
ENSG00000079931	MOXD1	6			X
ENSG00000081237	P1PRC	1	X	X	X
ENSG00000082014	SMARCD3	7			X
ENSG00000082397	EPB41L3	18			X
ENSG00000085265	FCN1	9			X
ENSG00000087116	ADAMTS2	5	X	X	X
ENSG00000087245	MMP2	16	X	X	X
ENSG00000087303	NID2	14			X
ENSG00000088827	SIGLEC1	20			X
ENSG00000088882	CPXM1	20	X	X	X
ENSG00000090104	RG51	1	X	X	X
ENSG00000090539	CHRD	3			X
ENSG00000090659	CD209	19			X
ENSG00000091879	ANGPT2	8		X	X
ENSG00000091986	CDC80	3			X
ENSG00000092096	SLC22A17	14			X
ENSG00000095370	SH2D3C	9		X	X
ENSG00000095970	TREM2	6		X	X
ENSG00000099280	PALMD	1			X
ENSG00000099864	PALM	19			X
ENSG00000099895	OSM	22			X
ENSG00000099998	GGT5	22	X	X	X
ENSG00000100055	CYTH4	22			X
ENSG00000100368	CSF2RB	22			X
ENSG00000100385	IL2RB	22	X		X
ENSG00000100842	EFS	14			X
ENSG00000100985	MMP9	20	X	X	X
ENSG00000101285	RASSF2	20	X	X	X
ENSG00000101336	HCK	20	X	X	X
ENSG00000101445	PPP1R16B	20			X
ENSG00000101825	MXRA5	X		X	X
ENSG00000102524	TNFSF13B	13			X
ENSG00000102755	FLT1	13	X	X	X
ENSG00000102802	MEDAG	13			X
ENSG00000103175	WFDCA1	16			X
ENSG00000103241	FOXF1	16		X	X
ENSG00000103569	AQP9	15			X
ENSG00000103710	RASL12	15		X	
ENSG00000104368	PLAT	8			X
ENSG00000104415	WISP1	8		X	X
ENSG00000104435	STMN2	8			X
ENSG00000104723	TUSC3	8			X
ENSG00000104894	CD37	19			X
ENSG00000104903	LVL1	19			X
ENSG00000105122	RASAL3	19			X
ENSG00000105137	SYDE1	19			X
ENSG00000105374	NGK7	19	X	X	X
ENSG00000105426	PTPRS	19			X
ENSG00000105639	JAK3	19		X	X
ENSG00000105664	COMP	19		X	X
ENSG00000105894	PTN	7			X
ENSG00000105989	WNT2	7			X
ENSG00000106034	CPED1	7			X
ENSG00000106483	SFRP4	7		X	X
ENSG00000106624	AEBP1	7	X	X	X
ENSG00000106819	ASP1	9		X	X
ENSG00000106823	ECM2	9			X
ENSG00000107186	MPDZ	9			X
ENSG00000107562	CXCL12	10			X
ENSG00000108691	CCL2	17	X	X	X
ENSG00000108700	CCL8	17			X
ENSG00000108798	ABI3	17	X	X	X
ENSG00000109113	RAB34	17	X	X	X
ENSG00000109625	CPZ	4			X
ENSG00000109846	CRYAB	11		X	
ENSG00000110077	MSA6A	11	X	X	X
ENSG00000110079	MSA4A4	11		X	X
ENSG00000110324	IL10RA	11			X
ENSG00000110446	SLC15A3	11			X
ENSG00000110799	VWF	12	X	X	X
ENSG00000110848	CD69	12			X
ENSG00000110852	CLEC2B	12			X
ENSG00000110876	SELP1G	12		X	X
ENSG00000111341	MGP	12	X	X	X
ENSG00000111799	COL12A1	6	X	X	X
ENSG00000112531	QKI	6			X
ENSG00000112799	LY86	6		X	X
ENSG00000113083	LOX	5		X	X
ENSG00000113088	GZMK	5			X
ENSG00000113140	SPARC	5		X	X
ENSG00000113555	PCDH12	5		X	X
ENSG00000113580	NR3C1	5		X	

ENSG00000155011	DKK2	4			X
ENSG00000155307	SAMSN1	21			X
ENSG00000155659	VSIG4	X		X	X
ENSG00000155926	SLA	8			X
ENSG00000156113	KCNMA1	10			X
ENSG00000157510	AFAP1L1	5			X
ENSG00000157554	ERG	21			X
ENSG00000158186	MRAS	3			X
ENSG00000158270	COLEC12	18			X
ENSG00000158714	SLAMF8	1		X	X
ENSG00000158859	ADAMTS4	1	X	X	X
ENSG00000158869	FCER1G	1	X	X	X
ENSG00000159167	STC1	8			X
ENSG00000159189	C10C	1	X	X	X
ENSG00000160255	ITGB2	21		X	X
ENSG00000160307	S100B	21			X
ENSG00000160791	CCR5	3			X
ENSG00000160883	HK3	5			X
ENSG00000161281	COX7A1	19		X	X
ENSG00000161381	PLXDC1	17			X
ENSG00000161544	CYGB	17	X	X	X
ENSG00000161835	GRASP	12			X
ENSG00000161940	BCL6B	17		X	X
ENSG00000162493	PDPN	1	X	X	X
ENSG00000162511	LAPTM5	1	X	X	X
ENSG00000162551	ALPL	1			X
ENSG00000162576	MXRA8	1		X	X
ENSG00000162614	NEXN	1		X	X
ENSG00000162618	ELTD1	1	X	X	X
ENSG00000162654	GBP4	1	X	X	X
ENSG00000162692	VCAM1	1	X	X	X
ENSG00000162733	DDR2	1			X
ENSG00000162745	OLFM12B	1	X	X	X
ENSG00000163154	TNFAIP2L2	1	X		X
ENSG00000163219	ARHGAP25	2			X
ENSG00000163359	COL6A3	2	X	X	X
ENSG00000163430	FSTL1	3	X	X	X
ENSG00000163431	LMOD1	1	X	X	X
ENSG00000163453	IGFBP7	4		X	X
ENSG00000163520	FBLN2	3			X
ENSG00000163563	MNDA	1		X	X
ENSG00000163565	IF16	1		X	
ENSG00000163638	ADAMTS9	3			X
ENSG00000163751	CPA3	3			X
ENSG00000163762	TM4SF18	3			X
ENSG00000163909	HEYL	1			X
ENSG00000164035	EMCN	4			X
ENSG00000164107	HAND2	4			X
ENSG00000164116	GUCY1A3	4		X	X
ENSG00000164176	EDIL3	5	X	X	X
ENSG00000164283	ESM1	5	X	X	X
ENSG00000164294	GPX8	5			X
ENSG00000164692	COL1A2	7			X
ENSG00000164694	FNDC1	6		X	X
ENSG00000164736	SOX17	8			X
ENSG00000165457	FOLR2	11		X	X
ENSG00000165633	VSTM4	10			X
ENSG00000165757	KIAA1462	10		X	X
ENSG00000166025	AMOTL1	11			X
ENSG00000166073	GPR176	15			X
ENSG00000166086	JAM3	11		X	X
ENSG00000166147	FBN1	15		X	X
ENSG00000166250	CLMP	11			X
ENSG00000166265	CYR1	21		X	X
ENSG00000166482	MFAP4	17	X	X	X
ENSG00000166503	HDCFRP3	15		X	X
ENSG00000166741	NNMT	11	X	X	X
ENSG00000166780	C16orf45	16			X
ENSG00000166927	MS4A7	11	X		X
ENSG00000166963	MAP1A	15			X
ENSG00000167286	CD3D	11	X	X	X
ENSG00000167601	AXL	19			X
ENSG00000167613	LAIR1	19		X	X
ENSG00000167680	SEMA6B	19		X	X
ENSG00000167851	CD300A	17		X	X
ENSG00000168077	SCARA3	8			X
ENSG00000168140	VASN	16	X		
ENSG00000168461	RAB31	18	X	X	X
ENSG00000168497	SDPR	2		X	
ENSG00000168685	IL7R	5		X	X
ENSG00000169026	MFSD7	4			X
ENSG00000169418	NPR1	1			X
ENSG00000169439	SDC2	8	X	X	X
ENSG00000169442	CD52	1	X	X	X
ENSG00000169508	GPR183	13	X	X	X
ENSG00000169515	CCDC8	19			X
ENSG00000169554	ZEB2	2		X	X
ENSG00000169604	ANTXR1	2	X	X	X
ENSG00000169744	LDB2	4			X
ENSG00000169851	PCDH7	4			X
ENSG00000169896	ITGAM	16			X
ENSG00000170276	HSPB2	11			X
ENSG00000170323	FABP4	8			X
ENSG00000170624	SGCD	5			X
ENSG00000170801	HTRA3	4	X	X	X
ENSG00000170955	PRKCSBP	11		X	
ENSG00000170962	PDGFD	11			X
ENSG00000170989	S1PR1	1	X	X	X
ENSG00000171051	FPR1	19			X
ENSG00000171115	GIMAP8	7			X
ENSG00000171444	MCC	5			X
ENSG00000171659	GPR34	X			X
ENSG00000171791	BCL2	18			X

ENSG00000113721	PDGFRB	5	X	X	X
ENSG00000114013	CD86	3			X
ENSG00000114251	WNT5A	3	X		
ENSG00000114450	GNB4	3			X
ENSG00000115226	FNDC4	2			X
ENSG00000115232	ITGA4	2			X
ENSG00000115380	EFEMP1	2	X	X	X
ENSG00000115414	FN1	2		X	
ENSG00000115461	IGFBP5	2	X	X	X
ENSG00000115523	GNLY	2			X
ENSG00000115956	PLEK	2	X	X	X
ENSG00000116132	PRRX1	1			X
ENSG00000116194	ANGPTL1	1			X
ENSG00000116824	CD2	1	X	X	X
ENSG00000117020	AKT3	1		X	X
ENSG00000117091	CD48	1			X
ENSG00000117114	LPHN2	1		X	X
ENSG00000117594	HSD11B1	1			X
ENSG00000118526	TCF21	6			X
ENSG00000118785	SPP1	4	X	X	
ENSG00000118946	PCDH17	13			X
ENSG00000119508	NR4A3	9			X
ENSG00000119681	LTP2	14		X	X
ENSG00000119714	GPR68	14			X
ENSG00000119865	CNRIP1	2			X
ENSG00000119938	PPP1R3C	10			X
ENSG00000120156	TEK	9			X
ENSG00000120279	MYCT1	6			X
ENSG00000120594	PLXDC2	10		X	
ENSG00000120659	TNFSF11	13		X	
ENSG00000120820	GLT8D2	12			X
ENSG00000121068	TBX2	17		X	X
ENSG00000121297	TSHZ3	19			X
ENSG00000121413	ZSCAN18	19			X
ENSG00000121898	CPXM2	10			X
ENSG00000122122	SASH3	X	X	X	X
ENSG00000122641	INHBA	7	X	X	X
ENSG00000122679	RAMP3	7	X	X	X
ENSG00000122691	TIWIST1	7			X
ENSG00000122786	CALD1	7		X	
ENSG00000122862	SRGN	10	X	X	X
ENSG00000122863	CHST3	10			X
ENSG00000122896	HVCN1	12			X
ENSG00000123094	RASSF8	12			X
ENSG00000123096	SSPN	12			X
ENSG00000123243	ITIH5	10		X	
ENSG00000123329	ARHGAP9	12			X
ENSG00000123338	NCKAP1L	12			X
ENSG00000123342	MMP19	12		X	X
ENSG00000123500	COL10A1	6			X
ENSG00000123610	TNFAIP6	2		X	X
ENSG00000124212	PTGIS	20			X
ENSG00000125730	C3	19		X	
ENSG00000125810	CD93	20	X	X	X
ENSG00000126264	HCST	19		X	
ENSG00000126785	RHOJ	14		X	X
ENSG00000126860	EV12A	17			X
ENSG00000126882	FAM78A	9			X
ENSG00000126947	ARMCX1	X			X
ENSG00000127533	F2RL3	19			X
ENSG00000127920	GN11	7	X	X	X
ENSG00000127951	FGL2	7	X	X	X
ENSG00000127990	SGCE	7		X	X
ENSG00000128052	KDR	4	X	X	X
ENSG00000129009	ISLR	15	X	X	X
ENSG00000129038	LOXL1	15		X	
ENSG00000129277	CCL4	17			X
ENSG00000129675	ARHGEF6	X			X
ENSG00000130052	STARDB8	X			X
ENSG00000130176	CNN1	19		X	X
ENSG00000130201	EXOC3L2	19		X	X
ENSG00000130300	PLVAP	19	X	X	X
ENSG00000130508	PXDN	2		X	X
ENSG00000130592	LSP1	11	X	X	X
ENSG00000130755	GMFG	19	X		X
ENSG00000131016	AKAP12	6		X	
ENSG00000131042	LILRB2	19			X
ENSG00000131196	NFATC1	18			X
ENSG00000131203	IDO1	8			X
ENSG00000131378	RFTN1	3	X	X	X
ENSG00000131459	GFPT2	5			X
ENSG00000131471	AOC3	17		X	X
ENSG00000131634	TMEM204	16	X	X	X
ENSG00000132274	TRIM22	11			X
ENSG00000132465	IGJ	4	X	X	X
ENSG00000132622	HSPA12B	20			X
ENSG00000132718	SYT11	1			X
ENSG00000133048	CHIL3L	1		X	
ENSG00000133104	SPG20	13			X
ENSG00000133110	POSTN	13	X	X	X
ENSG00000133392	MYH11	16		X	X
ENSG00000133561	GIMAP6	7	X	X	X
ENSG00000133574	GIMAP4	7	X	X	X
ENSG00000133800	LYVE1	11			X
ENSG00000134013	LOXL2	8	X	X	X
ENSG00000134028	ADAMDEC1	8	X	X	X
ENSG00000134460	IL2RA	10			X
ENSG00000134533	RERG	12			X
ENSG00000134802	SLC43A3	11		X	
ENSG00000134817	APLN	11	X	X	X
ENSG00000134853	PDGFRA	4	X	X	X
ENSG00000135077	HAVCR2	5		X	X
ENSG00000135094	SDS	12			X

ENSG00000171812	COL8A2	1			X
ENSG00000171860	C3AR1	12	X		X
ENSG00000172156	CCL11	17		X	X
ENSG00000172236	TPSAB1	16			X
ENSG00000172243	CLEC7A	12			X
ENSG00000172403	SYNPO2	4			X
ENSG00000172716	SLFN11	17		X	X
ENSG00000172724	CCL19	9			X
ENSG00000172817	CYP7B1	8			X
ENSG00000172935	MRC6PRF	11		X	X
ENSG00000173210	ABLIM3	5			X
ENSG00000173369	C10B	1	X	X	X
ENSG00000173372	C10A	1	X	X	X
ENSG00000173391	OLR1	12			X
ENSG00000173482	PTPRM	18			X
ENSG00000173546	CSPG4	15		X	X
ENSG00000173641	HSPB7	1			X
ENSG00000173706	HEG1	3		X	X
ENSG00000174059	CD34	1	X	X	X
ENSG00000174099	MSRB3	12		X	X
ENSG00000174175	SELP	1			X
ENSG00000174348	PODN	1		X	X
ENSG00000174600	CMKLR1	12			X
ENSG00000174640	SLCO2A1	3			X
ENSG00000174807	CD248	11	X	X	X
ENSG00000175040	CHST2	3			X
ENSG00000175264	CHST1	11			X
ENSG00000175489	LRRRC25	19		X	X
ENSG00000175899	A2M	12	X	X	
ENSG00000176435	CLEC14A	14	X	X	X
ENSG00000176641	RNF152	18			X
ENSG00000176971	FIBIN	11		X	X
ENSG00000177374	HIC1	17		X	X
ENSG00000177409	SAMD9L	7			X
ENSG00000177464	GPR4	19		X	X
ENSG00000177575	CD163	12		X	X
ENSG00000177706	FAM20C	7		X	X
ENSG00000161570	CCL5	17			X
ENSG00000178726	THBD	20	X	X	X
ENSG00000178860	MSC	8		X	X
ENSG00000179044	EXOC3L1	16			X
ENSG00000179144	GIMAP7	7	X	X	X
ENSG00000179772	FOXSI	20		X	X
ENSG00000179776	CDH5	16	X	X	X
ENSG00000179855	GIPC3	19			X
ENSG00000179954	SSC5D	19			X
ENSG00000180353	HCLS1	3	X	X	X
ENSG00000180447	GAS1	9			X
ENSG00000180543	TSPYL5	8			X
ENSG00000180730	SHISA2	13			X
ENSG00000181374	CCL13	17			X
ENSG00000181804	SLC9A9	3			X
ENSG00000182195	LDOC1	X		X	X
ENSG00000182326	C1S	12	X		X
ENSG00000182578	CSF1R	5	X	X	X
ENSG00000182636	NDN	15		X	X
ENSG00000182667	NTM	11			X
ENSG00000182809	CRIP2	14		X	
ENSG00000182871	COL18A1	21			X
ENSG00000182916	TCEAL7	X			X
ENSG00000183098	GPC6	13			X
ENSG00000183160	TMEM119	12	X	X	X
ENSG00000183580	FBXL7	5			X
ENSG00000183688	FAM101B	17	X	X	X
ENSG00000183722	LHFP	13	X		X
ENSG00000183801	OLFML1	11			X
ENSG00000184060	ADAP2	17			X
ENSG00000184113	CLDN5	22		X	X
ENSG00000184347	SLIT3	5			X
ENSG00000184838	PRR16	5		X	X
ENSG00000184867	ARMCX2	X			X
ENSG00000184922	FMNL1	17		X	X
ENSG00000185052	SLC24A3	20			X
ENSG00000185585	OLFML2A	9			X
ENSG00000185862	EVI2B	17			X
ENSG00000186074	CD300LF	17			X
ENSG00000186340	THBS2	6		X	X
ENSG00000186469	GN2	14		X	X
ENSG00000186517	ARHGAP30	1			X
ENSG00000186818	LILRB4	19			X
ENSG00000186827	TNFRSF4	1		X	X
ENSG00000186891	TNFRSF18	1	X	X	
ENSG00000186994	KANK3	19			X
ENSG00000187116	LILRA5	19			X
ENSG00000187474	FPR3	19			X
ENSG00000187498	COL4A1	13	X		X
ENSG00000187513	GJA4	1		X	X
ENSG00000187688	TRPV2	17	X	X	X
ENSG00000187942	LDLRAD2	1			X
ENSG00000187955	COL14A1	8		X	X
ENSG00000188404	SELL	1			X
ENSG00000188641	DPVD	1			X
ENSG00000188783	PRELP	1		X	X
ENSG00000188820	FAM26F	6			X
ENSG00000188921	PTPLAD2	9			X
ENSG00000189129	PLAC9	10			X
ENSG00000196405	EVL	14			X
ENSG00000196557	CACNA1H	16		X	
ENSG00000196628	TCF4	18		X	X
ENSG00000197380	DACT3	19			X
ENSG00000197629	MPEG1	11	X	X	X
ENSG00000197872	FAM49A	2			X
ENSG00000198523	PLN	6		X	X

ENSG00000135272	MDFC	7		X	X
ENSG00000135604	STX11	6			X
ENSG00000135636	DYSF	2		X	
ENSG00000135842	FAM129A	1			X
ENSG00000136040	PLXNC1	12			X
ENSG00000136160	EDNRB	13			X
ENSG00000136167	LCP1	13	X		
ENSG00000136235	GPNMB	7	X	X	
ENSG00000136244	IL6	7			X
ENSG00000136378	ADAMTS7	15			X
ENSG00000136630	HLX	1		X	X
ENSG00000136732	GYPC	2		X	X
ENSG00000136859	ANGPTL2	9	X	X	X
ENSG00000137077	CCL21	9	X	X	X
ENSG00000137273	FOXF2	6			X
ENSG00000137573	SULF1	8	X	X	X
ENSG00000137809	ITGA11	15		X	X
ENSG00000138080	EMILIN1	2	X	X	X
ENSG00000138135	CH25H	10			X
ENSG00000138172	CALHM2	10		X	
ENSG00000138185	ENTPD1	10		X	
ENSG00000138411	HECW2	2			X
ENSG00000138755	CXCL9	4	X	X	X
ENSG00000139329	LUM	12	X	X	
ENSG00000139926	FRMD6	14			X
ENSG00000140092	FBLN5	14		X	X
ENSG00000140285	FGF7	15		X	X
ENSG00000140379	BCL2A1	15	X	X	X
ENSG00000140511	HAPLN3	15		X	
ENSG00000140678	ITGAX	16		X	X
ENSG00000140749	IGSF6	16			X
ENSG00000140937	CDH11	16		X	X
ENSG00000142173	COL6A2	21	X	X	X
ENSG00000142303	ADAMTS10	19			X
ENSG00000142512	SIGLEC10	19			X
ENSG00000143119	CD53	1	X	X	X
ENSG00000143196	DPT	1			X
ENSG00000143546	S100A8	1		X	X

ENSG00000198542	ITGBL1	13			X
ENSG00000198771	RCSB1	1			X
ENSG00000198844	ARHGFEF15	17			X
ENSG00000198851	CD3E	11	X		X
ENSG00000203747	FCGR3A	1	X	X	X
ENSG00000203883	SOX18	20		X	X
ENSG00000204161	C10orf128	10			X
ENSG00000204252	HLA-DOA	6		X	X
ENSG00000204262	COL5A2	2	X	X	X
ENSG00000204291	COL15A1	9	X	X	X
ENSG00000204301	NOTCH4	6			X
ENSG00000204381	LAYN	11			X
ENSG00000204472	AIF1	6	X	X	X
ENSG00000204482	LST1	6		X	X
ENSG00000206190	ATP10A	15			X
ENSG00000206538	VGLL3	3			X
ENSG00000213088	DARC	1			X
ENSG00000213203	GIMAP1	7			X
ENSG00000213316	LTC4S	5			X
ENSG00000213694	S1PR3	9		X	X
ENSG00000219438	FAM19A5	22			X
ENSG00000223865	HLA-DPB1	6	X	X	X
ENSG00000227051	C14orf132	14			X
ENSG00000231389	HLA-DPA1	6	X	X	X
ENSG00000232629	HLA-DQB2	6			X
ENSG00000240771	ARHGFEF25	12			X
ENSG00000244482	LILRA6	19			X
ENSG00000244486	SCARF2	22		X	X
ENSG00000244734	HBB	11		X	X
ENSG00000249751	ECSCR	5	X	X	X
ENSG00000254709	IGLL5	22	X	X	X
ENSG00000254979	RP11-872D17.8	11		X	
ENSG00000258227	CLECSA	7			X
ENSG00000259159	MFRP	11			X
ENSG00000265118	CTD-2370N5.3	17			X
ENSG00000267987	AL161784.1	9			X
ENSG00000143515	ATP8B2	1			X

**Ergänzende Tabelle 2:** Liste der angereicherten GO-Terme der ASCL2/MYC spezifischen TME.

Gewebe-Signale	P-Wert
ENDOTHELIAL CELLS	5.45E-05
ENTIRE FASCIAL SHEATH OF EYEBALL	7.63E-05
EXTRACELLULAR FIBRIL	8.37E-05
ENTIRE BRUCH'S BASAL MEMBRANE	9.76E-05
LENS SAMPLE	1.07E-04
BASAL LAMINA OF CHOROID	1.22E-04
DENTIN	1.41E-04
INTERDENTAL PAPILLA	1.96E-04
ENTIRE INTERDENTAL PAPILLA OF GINGIVA	1.96E-04
FLUID SPECIMEN FROM WOUND	2.32E-04
BONE TISSUE SAMPLE	2.32E-04
CONNECTIVE TISSUE CELLS	2.61E-04
SKIN TISSUE	2.87E-04
SICKLE CELL	4.00E-04
ENTIRE HEART VALVE	4.29E-04
ROOT FURCATION	5.05E-04
MESANGIAL EXTRACELLULAR MATRIX	5.05E-04
STRUCTURE OF BLOOD VESSEL OF RETINA	5.08E-04
STRUCTURE OF TRACHEAL CARTILAGE	5.60E-04
ENTIRE TRACHEAL CARTILAGE	5.60E-04
LEUKEMIC MAST CELL	6.19E-04
EXTRACELLULAR MATRIX	6.50E-04
COLLAGEN FIBER	8.46E-04
PORTAL TRIAD	8.80E-04
CONNECTIVE TISSUE	9.00E-04
ENTIRE AQUEOUS HUMOR	9.67E-04

GO-Term - Molekulare Funktion	P-Wert
extracellular matrix structural constituent	2.17E-04
protein kinase C binding	2.72E-03
transcription factor activity, ligand-activated RNA polymerase II transcription factor binding	3.10E-03
mercury ion binding	3.10E-03
peptidase regulator activity	4.32E-03
low voltage-gated calcium channel activity	4.65E-03
steroid hormone binding	9.29E-03

GO-Term- Biologische Prozesse	P-Wert
regulation of ERK1 and ERK2 cascade	2.54E-05
ERK1 and ERK2 cascade	3.27E-05
positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	1.21E-04
regulation of peptidase activity	2.45E-04
muscle system process	2.57E-04
negative regulation of endopeptidase activity	3.79E-04
negative regulation of peptidase activity	4.51E-04
intracellular signal transduction	6.80E-04
regulation of protein kinase B signaling	7.54E-04
response to interleukin-6	8.03E-04
positive regulation of acute inflammatory response	8.03E-04

GO-Term- Zelluläre Komponente	P-Wert
extracellular matrix	3.43E-05
proteinaceous extracellular matrix	1.72E-04
cell periphery	7.88E-04
extracellular matrix component	8.65E-04
plasma membrane	2.23E-03
plasma membrane part	2.81E-03

collagen type I trimer	3.02E-03
extracellular space	3.37E-03
cell cortex	5.27E-03
caveola	6.00E-03
actin cap	6.03E-03
plasma membrane raft	7.60E-03
basement membrane	8.65E-03
cytoplasmic region	8.85E-03
sarcoglycan complex	9.03E-03
membrane	9.57E-03

### Ergänzende Tabelle 3: Liste der am meisten angereicherten GO-Terme der ECM/EMT spezifischen TME

Gewebe-Signale	P-Wert
LEUKOCYTES	2.10E-18
MONOCYTES	1.27E-16
DENDRITIC CELLS	3.18E-14
HIGH ENDOTHELIAL VENULE	4.16E-14
NEUTROPHIL	1.32E-12
MACROPHAGE	8.23E-12
EXTRACELLULAR MATRIX	1.67E-11
VASCULAR ENDOTHELIUMS	5.24E-11
LYMPHOID TISSUE	6.64E-11
ENDOTHELIAL CELLS	8.34E-11
ENDOTHELIUM	2.24E-10
STRUCTURE OF VENULE	5.98E-10
ENTIRE VENULE	5.98E-10
PERICYTES	6.31E-10
BLOOD SUPPLY ASPECTS	8.46E-09
STROMA	9.74E-09
SPLEEN	1.94E-08
PHAGOCYTES	2.17E-08
LYMPHATIC ENDOTHELIUMS	2.89E-08
VASCULAR SMOOTH MUSCLES	3.09E-08
VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS	3.11E-08
SMOOTH MUSCLE MYOCYTE	3.27E-08
DECIDUAL	4.70E-08
LYMPHOCYTE COMPONENT OF BLOOD	4.81E-08
LYMPHOCYTE	4.99E-08
CARTILAGE	5.43E-08

GO-Term - Molekulare Funktion	P-Wert
receptor activity	4.59E-09
molecular transducer activity	4.59E-09
glycosaminoglycan binding	2.94E-08
heparin binding	4.07E-08
sulfur compound binding	1.02E-07
signaling receptor activity	1.97E-07
carbohydrate binding	6.28E-07
signal transducer activity	2.24E-06
transmembrane signaling receptor activity	1.81E-05
scavenger receptor activity	3.62E-05
cargo receptor activity	3.69E-05
transmembrane receptor activity	4.41E-05
chemokine activity	5.27E-05
molecular function regulator	6.51E-05
extracellular matrix binding	7.46E-05
pattern recognition receptor activity	7.69E-05
signaling pattern recognition receptor activity	7.69E-05
N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase activity	9.07E-05
CCR chemokine receptor binding	1.02E-04
chemokine receptor binding	1.27E-04
sialic acid binding	1.44E-04
chemoattractant activity	4.37E-04
glycoprotein binding	5.39E-04
N-formyl peptide receptor activity	5.76E-04
fibronectin binding	5.86E-04
receptor binding	6.50E-04

GO-Term- Zelluläre Komponente	P-Wert
extracellular matrix	9.37E-12
cell periphery	3.45E-11
plasma membrane	4.19E-11
proteinaceous extracellular matrix	1.43E-10
plasma membrane part	8.69E-10
intrinsic component of plasma membrane	9.47E-10
integral component of plasma membrane	1.82E-09
extracellular space	4.74E-08
integral component of membrane	8.30E-08
intrinsic component of membrane	8.63E-08
membrane part	3.32E-06

GO-Term- Biologische Prozesse	P-Wert
cell adhesion	1.61E-14
biological adhesion	2.01E-14
cell migration	6.83E-13
locomotion	1.02E-12
localization of cell	1.84E-12
cell motility	1.84E-12
movement of cell or subcellular component	5.76E-12
regulation of response to stimulus	8.24E-12
defense response	6.56E-11
leukocyte migration	1.07E-10
response to stimulus	3.44E-10

extracellular region	4.61E-06
collagen trimer	6.43E-06
extracellular region part	6.84E-05
membrane	1.30E-04
cell surface	1.53E-04
cell leading edge	2.47E-04
extracellular matrix component	5.70E-04

regulation of cell motility	1.39E-09
regulation of cellular component movement	2.94E-09
regulation of locomotion	3.73E-09
signal transduction	5.53E-09
signaling	6.14E-09
immune system process	7.05E-09
cell communication	7.51E-09
cell surface receptor signaling pathway	7.86E-09
single organism signaling	1.14E-08
regulation of cell migration	1.33E-08
single-organism process	1.55E-08
regulation of multicellular organismal development	1.87E-08
regulation of developmental process	1.88E-08
inflammatory response	2.12E-08
chemokine-mediated signaling pathway	2.25E-08
regulation of multicellular organismal process	2.39E-08
positive regulation of cell adhesion	3.63E-08
cellular response to stimulus	4.39E-08
regulation of epithelial cell proliferation	4.62E-08
vasculature development	5.35E-08
positive regulation of response to external stimulus	5.56E-08
positive regulation of leukocyte migration	6.79E-08
regulation of immune system process	7.66E-08
blood vessel development	9.75E-08

**Ergänzende Tabelle 4:** Liste der am meisten angereicherten GO-Terme der Entero/Goblet Gruppe spezifischen TME.

Gewebe-Signale	P-Wert
GIZZARD	7.50E-07
MESANGIAL EXTRACELLULAR MATRIX	1.65E-05
ENTIRE PALATE	5.90E-05
PALATE	8.91E-05
MYOFIBROBLASTS	9.56E-05
DECIDUA	1.22E-04
FIBROUS TISSUE	1.82E-04
STROMAL CELLS	2.08E-04
APICAL ECTODERMAL RIDGE	2.88E-04
GINGIVAL CREVICULAR FLUID	3.92E-04
ENTIRE TEMPOROMANDIBULAR JOINT	4.18E-04
CARTILAGE	4.44E-04
ENTIRE AQUEOUS HUMOR	5.83E-04
AQUEOUS HUMOR	6.04E-04
GRANULATION TISSUE	6.69E-04
CHONDROCYTE	7.46E-04
ENTIRE TRABECULAR MESHWORK	7.86E-04
TRABECULAR MESHWORK STRUCTURE	7.98E-04
EXTRACELLULAR MATRIX	8.05E-04
ENTIRE ANKLE REGION	8.22E-04
ENTIRE URETER	8.47E-04
PERIODONTIUM	9.38E-04
ENTIRE GINGIVA	9.78E-04

GO-Term- Zelluläre Komponente	P-Wert
extracellular space	1.42E-05
extracellular region part	8.84E-05
proteinaceous extracellular matrix	1.50E-04
extracellular matrix	2.55E-04

GO-Term - Molekulare Funktion	P-Wert
receptor agonist activity	1.12E-05
receptor activator activity	4.96E-05
receptor regulator activity	1.01E-04
cytokine binding	4.42E-04
frizzled-2 binding	7.17E-04
growth factor binding	8.14E-04
extracellular matrix constituent conferring elasticity	1.43E-03
vascular endothelial growth factor receptor 2 binding	2.15E-03
transmembrane receptor protein tyrosine kinase activator activity	2.15E-03
structural molecule activity conferring elasticity	2.15E-03
cytokine activity	2.49E-03
morphogen activity	2.51E-03
vascular endothelial growth factor receptor binding	3.22E-03
BMP binding	3.22E-03
platelet-derived growth factor binding	3.94E-03
transforming growth factor beta binding	5.72E-03
protein tyrosine kinase activator activity	6.08E-03
chemoattractant activity	9.29E-03

GO-Term- Biologische Prozesse	P-Wert
extracellular matrix organization	2.07E-06
extracellular structure organization	2.10E-06
negative regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	4.18E-06
epithelial to mesenchymal transition	5.58E-06
negative regulation of cellular response to growth factor stimulus	7.07E-06
morphogenesis of an epithelium	1.25E-05
branching morphogenesis of an epithelial tube	1.33E-05
mesenchymal cell development	2.14E-05
morphogenesis of a branching epithelium	2.41E-05

extracellular region	2.56E-04
cell surface	1.34E-03
endoplasmic reticulum lumen	1.82E-03
collagen type IV trimer	2.01E-03
collagen network	2.35E-03
network-forming collagen trimer	2.35E-03
basement membrane collagen trimer	2.68E-03
phagocytic cup	6.03E-03
podosome	7.70E-03
complex of collagen trimers	7.70E-03

tissue morphogenesis	2.49E-05
mesenchymal cell differentiation	2.61E-05
morphogenesis of a branching structure	3.01E-05
regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	3.61E-05
regulation of cellular response to growth factor stimulus	4.83E-05
mesenchyme development	5.56E-05
regulation of cellular component biogenesis	6.07E-05
tissue development	6.51E-05
renal system development	8.85E-05
negative regulation of BMP signaling pathway	8.87E-05

**Ergänzende Tabelle 5:** Liste der am meisten angereicherten GO-Terme der gruppenunspezifischen TME.

GO-Term- Biologische Prozesse	P-Wert
cell adhesion	5.51E-16
biological adhesion	6.50E-16
cell migration	1.06E-13
positive regulation of immune system process	1.79E-13
localization of cell	2.31E-13
cell motility	2.31E-13
locomotion	3.90E-13
regulation of immune system process	4.11E-13
immune system process	6.07E-13
response to stimulus	6.71E-13
regulation of multicellular organismal process	8.19E-13
positive regulation of response to stimulus	1.68E-12
regulation of cell migration	2.32E-12
single-multicellular organism process	2.37E-12
regulation of cell activation	2.37E-12
cell surface receptor signaling pathway	6.12E-12
regulation of cellular component movement	8.16E-12
regulation of cell motility	1.02E-11
regulation of locomotion	2.29E-11
cell activation	2.70E-11
positive regulation of biological process	8.32E-11
collagen metabolic process	8.69E-11
positive regulation of cellular component movement	9.37E-11
angiogenesis	9.75E-11
single-organism developmental process	9.79E-11
positive regulation of cell activation	9.89E-11
multicellular organismal macromolecule metabolic process	1.42E-10
movement of cell or subcellular component	1.45E-10
positive regulation of cell proliferation	1.53E-10
system development	1.84E-10
extracellular matrix organization	1.99E-10
extracellular structure organization	2.09E-10
regulation of developmental process	2.50E-10
regulation of cell proliferation	2.78E-10
developmental process	3.06E-10
anatomical structure development	3.14E-10
positive regulation of cell migration	3.14E-10
anatomical structure formation involved in morphogenesis	3.46E-10
positive regulation of cell motility	5.02E-10
multicellular organism metabolic process	5.43E-10

Gewebe-Signale	P-Wert
ENTIRE BLOOD VESSEL	4.84E-20
BLOOD VESSEL	6.68E-19
ENDOTHELIAL CELLS	4.62E-17
PERICYTES	7.72E-17
MICROVASCULAR NETWORK	3.43E-16
STROMAL CELLS	7.07E-16
STROMA	1.16E-15
EXTRACELLULAR MATRIX	2.34E-14
BLOOD SUPPLY ASPECTS	2.43E-14
VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS	3.83E-14
LYMPHATIC VESSEL	2.82E-13
LYMPHATIC ENDOTHELIUMS	4.06E-13
ENDOTHELIUM	4.68E-13
ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS	6.21E-13
MONOCYTES	3.00E-12
LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS	4.09E-12
VASCULAR ENDOTHELIUMS	6.34E-12
CONNECTIVE TISSUE	6.53E-12
ADVENTITIA	1.47E-11
SMOOTH MUSCLE MYOCYTE	2.75E-11
ENTIRE LYMPHATIC VESSEL	3.91E-11
NEUTROPHIL	9.32E-11
HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS	1.52E-10
MACROPHAGE	1.64E-10
CAPILLARY	2.56E-10
CAPILLARY VESSEL	2.68E-10
BLOOD CAPILLARIES	2.68E-10
TENDON STRUCTURE	2.78E-10
ENTIRE TENDON	2.97E-10
ENTIRE VEIN	3.48E-10
ENTIRE AORTA	4.89E-10
SYNOVIAL TISSUE OF JOINT OR TENDON SHEATH OR APONEUROSIS	9.17E-10

GO-Term- Zelluläre Komponente	P-Wert
cell surface	3.17E-15
proteinaceous extracellular matrix	1.19E-13
extracellular matrix	3.46E-13
extracellular space	4.87E-13
extracellular region	7.93E-13
side of membrane	3.16E-12

vasculature development	6.63E-10
positive regulation of leukocyte activation	6.81E-10
positive regulation of locomotion	7.34E-10

GO-Term - Molekulare Funktion	P-Wert
immunoglobulin binding	2.85E-07
growth factor binding	1.27E-06
transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	3.12E-06
receptor activity	8.36E-06
molecular transducer activity	8.36E-06
vascular endothelial growth factor-activated receptor activity	8.49E-06
transmembrane receptor protein kinase activity	1.15E-05
protein complex binding	1.92E-05
signaling receptor activity	4.62E-05
signal transducer activity	5.59E-05
collagen binding	5.67E-05
integrin binding	5.72E-05
receptor binding	1.12E-04
platelet-derived growth factor-activated receptor activity	1.19E-04
extracellular matrix structural constituent	1.20E-04
protein tyrosine kinase activity	1.28E-04
transmembrane signaling receptor activity	1.35E-04
cell adhesion molecule binding	1.81E-04
metallopeptidase activity	1.93E-04
macromolecular complex binding	2.12E-04
transmembrane receptor activity	2.34E-04
vascular endothelial growth factor binding	2.37E-04
peptidase activity	2.56E-04
glycosaminoglycan binding	3.18E-04
calcium ion binding	4.32E-04
peptidase activity, acting on L-amino acid peptides	6.91E-04
insulin-like growth factor binding	7.21E-04
metalloendopeptidase activity	7.57E-04
serine-type peptidase activity	7.77E-04
serine hydrolase activity	8.16E-04

extracellular region part	1.18E-11
external side of plasma membrane	2.58E-11
plasma membrane part	4.06E-11
collagen trimer	2.43E-10
extracellular matrix component	7.84E-09
vesicle	6.66E-08
membrane-bounded vesicle	4.98E-07
plasma membrane	6.16E-07
intrinsic component of plasma membrane	1.23E-06
cell periphery	1.28E-06
extracellular exosome	1.51E-05
extracellular vesicle	1.67E-05
extracellular organelle	1.69E-05
complement component C1 complex	4.11E-05
integral component of plasma membrane	5.61E-05
membrane raft	9.47E-05
membrane microdomain	9.73E-05
collagen type VI trimer	1.22E-04
collagen beaded filament	1.22E-04
vacuole	1.81E-04
basement membrane	3.35E-04
complex of collagen trimers	4.19E-04
platelet alpha granule lumen	4.31E-04
membrane region	5.34E-04

## Ergänzende Tabelle 6: Liste der differentiell exprimierten Gene in den Leberkontrollen

g	Symbol	RPKM (gemittelt von Proben weit vom Tumor)	RPKM (gemittelt von Proben in Tumornähe)	logFC	FDR
ENSG00000000938	FGR	3.40	7.38	-1.06	0.01
ENSG00000003249	DBNDD1	1.14	3.42	-1.40	0.00
ENSG000000004776	HSPB6	9.63	23.46	-1.26	0.00
ENSG000000006074	CCL18	0.77	3.71	-1.95	0.00
ENSG000000006075	CCL3	12.56	29.86	-1.23	0.00
ENSG000000008516	MMP25	0.65	1.95	-1.30	0.00
ENSG000000010319	SEMA3G	1.35	3.61	-1.28	0.00
ENSG000000011422	PLAUR	2.77	8.97	-1.61	0.00
ENSG000000018280	SLC11A1	0.56	1.70	-1.27	0.01
ENSG000000023445	BIRC3	4.18	16.29	-1.90	0.00
ENSG000000026025	VIM	44.80	101.29	-1.17	0.00
ENSG000000026508	CD44	2.85	6.01	-1.01	0.00
ENSG000000026751	SLAMF7	1.70	3.76	-1.04	0.00
ENSG000000042493	CAPG	1.77	4.18	-1.13	0.00
ENSG000000050555	LAMC3	2.54	6.05	-1.18	0.01
ENSG000000059804	SLC2A3	3.46	9.07	-1.33	0.00
ENSG000000060558	GNA15	1.18	2.72	-1.05	0.00

g	Symbol	RPKM (gemittelt von Proben weit vom Tumor)	RPKM (gemittelt von Proben in Tumornähe)	logFC	FDR
ENSG00000127954	STEAP4	6.73	14.75	-1.10	0.00
ENSG00000128383	APOBEC3A	0.78	2.57	-1.45	0.01
ENSG00000129038	LOXL1	0.73	1.97	-1.19	0.01
ENSG00000129277	CCL4	6.65	21.93	-1.68	0.00
ENSG00000130635	COL5A1	1.90	4.66	-1.19	0.00
ENSG00000130649	CYP2E1	1670.32	710.29	1.23	0.00
ENSG00000132205	EMILIN2	0.72	2.07	-1.25	0.00
ENSG00000132854	KANK4	1.75	0.67	1.12	0.00
ENSG00000132965	ALOX5AP	2.53	5.96	-1.16	0.00
ENSG00000133985	TTC9	0.75	1.81	-1.04	0.00
ENSG00000134243	SORT1	1.07	5.31	-2.08	0.00
ENSG00000135842	FAM129A	0.94	2.14	-1.01	0.00
ENSG00000136235	GNPMB	5.32	14.70	-1.42	0.00
ENSG00000137077	CCL21	23.17	88.80	-1.93	0.00
ENSG00000137507	LRRC32	6.24	13.86	-1.12	0.00
ENSG00000137673	MMP7	1.29	4.10	-1.49	0.00
ENSG00000138131	LOXL4	0.86	2.37	-1.23	0.00

ENSG00000065154	OAT	68.29	18.27	1.89	0.00
ENSG00000065911	MTHFD2	0.82	2.12	-1.15	0.00
ENSG00000069849	ATP1B3	4.08	9.48	-1.17	0.00
ENSG00000070404	FSTL3	6.33	15.06	-1.22	0.00
ENSG00000073756	PTGS2	2.14	6.05	-1.40	0.01
ENSG00000074181	NOTCH3	1.92	4.55	-1.15	0.00
ENSG00000077150	NFKB2	9.33	20.96	-1.15	0.00
ENSG00000085265	FCN1	6.62	16.23	-1.26	0.00
ENSG00000087245	MMP2	5.30	13.55	-1.31	0.01
ENSG00000090339	ICAM1	30.03	106.94	-1.82	0.00
ENSG00000090382	LYZ	34.54	101.51	-1.55	0.00
ENSG00000090924	PLEKHG2	1.26	2.77	-1.00	0.00
ENSG00000091986	CCDC80	1.25	3.43	-1.29	0.00
ENSG00000095970	TREM2	0.54	2.20	-1.64	0.01
ENSG00000099985	OSM	0.82	2.90	-1.56	0.00
ENSG00000100033	PRODH	3.80	1.07	1.61	0.00
ENSG00000100767	PAPLN	0.62	1.77	-1.22	0.00
ENSG00000100985	MMP9	0.70	5.79	-2.67	0.00
ENSG00000102265	TIMP1	46.74	130.49	-1.48	0.00
ENSG00000104549	SOLE	7.70	27.10	-1.78	0.01
ENSG00000104856	RELB	4.47	11.39	-1.30	0.01
ENSG00000104894	CD37	1.79	3.87	-1.02	0.00
ENSG00000105371	ICAM4	0.40	2.26	-1.95	0.00
ENSG00000105639	JAK3	0.75	1.86	-1.08	0.00
ENSG00000108700	CCL8	0.80	5.68	-2.50	0.00
ENSG00000108830	RND2	3.61	1.09	1.53	0.00
ENSG00000109181	UGT2B10	607.67	284.98	1.09	0.00
ENSG00000109610	SOD3	4.63	11.49	-1.27	0.00
ENSG00000110243	APOA5	586.74	280.64	1.06	0.00
ENSG00000110448	CD5	0.48	1.68	-1.40	0.00
ENSG00000111341	MGP	5.51	17.36	-1.61	0.00
ENSG00000111700	SLCO1B3	95.06	39.05	1.28	0.00
ENSG00000111912	NCOA7	9.78	23.40	-1.24	0.00
ENSG00000112149	CD83	6.96	17.51	-1.30	0.00
ENSG00000112303	VNN2	2.24	5.37	-1.18	0.00
ENSG00000113161	HMGCR	18.41	41.11	-1.15	0.01
ENSG00000115009	CCL20	1.74	9.26	-2.25	0.00
ENSG00000115380	EFEMP1	2.25	7.22	-1.58	0.00
ENSG00000115956	PLEK	7.13	18.04	-1.31	0.00
ENSG00000116741	RGS2	13.53	33.63	-1.30	0.00
ENSG00000116990	MYCL	6.61	2.32	1.42	0.00
ENSG00000117091	CD48	3.01	6.34	-1.01	0.00
ENSG00000118298	CA14	7.90	2.14	1.77	0.00
ENSG00000118503	TNFAIP3	6.98	26.62	-1.89	0.00
ENSG00000118785	SPP1	8.79	19.95	-1.16	0.00
ENSG00000119535	CSF3R	1.93	4.67	-1.17	0.00
ENSG00000121797	CCRL2	0.81	2.12	-1.17	0.00
ENSG00000121966	CXCR4	11.62	23.77	-1.02	0.01
ENSG00000122254	HS3ST2	0.31	1.62	-1.73	0.00
ENSG00000122694	GLIPR2	2.54	5.88	-1.13	0.00
ENSG00000122787	AKR1D1	216.74	106.77	1.02	0.00
ENSG00000122861	PLAU	1.33	3.99	-1.42	0.00
ENSG00000123342	MMP19	3.34	13.65	-1.95	0.00
ENSG00000124568	SLC17A1	26.01	12.82	1.01	0.00
ENSG00000125347	IRF1	9.25	26.61	-1.50	0.00
ENSG00000125735	TNFSF14	8.73	25.45	-1.52	0.01
ENSG00000125775	SDCBP2	5.76	2.43	1.16	0.00
ENSG00000126803	HSPA2	1.88	4.46	-1.14	0.00

ENSG00000138722	MMRN1	1.65	4.44	-1.30	0.00
ENSG00000139329	LUM	17.02	39.23	-1.19	0.00
ENSG00000139514	SLC7A1	0.69	1.76	-1.10	0.00
ENSG00000140379	BCL2A1	2.05	7.91	-1.83	0.00
ENSG00000140511	HAPLN3	0.25	1.25	-1.59	0.00
ENSG00000140678	ITGAX	2.30	6.97	-1.50	0.00
ENSG00000142227	EMP3	5.39	11.63	-1.07	0.00
ENSG00000145692	BHMT	698.67	330.09	1.08	0.01
ENSG00000146112	PPP1R18	10.91	23.02	-1.06	0.00
ENSG00000146232	NFKBIE	5.55	11.91	-1.07	0.00
ENSG00000147168	IL2RG	3.38	7.10	-1.02	0.00
ENSG00000148346	LCN2	1.60	4.56	-1.38	0.00
ENSG00000155307	SAMSN1	2.15	5.02	-1.13	0.00
ENSG00000158050	DUSP2	4.68	12.20	-1.34	0.00
ENSG00000158714	SLAMF8	0.99	3.04	-1.41	0.00
ENSG00000160326	SLC2A6	1.06	2.76	-1.20	0.00
ENSG00000162391	FAM151A	46.75	11.95	1.95	0.00
ENSG00000162747	FCGR3B	1.51	5.22	-1.64	0.00
ENSG00000162783	IER5	8.81	21.62	-1.27	0.00
ENSG00000163421	PROK2	0.28	1.31	-1.56	0.00
ENSG00000163435	ELF3	9.30	29.42	-1.64	0.00
ENSG00000163545	NUAK2	2.59	6.91	-1.34	0.00
ENSG00000163993	S100P	0.47	1.62	-1.38	0.00
ENSG00000164825	DEFB1	159.85	72.27	1.14	0.01
ENSG00000164949	GEM	5.27	17.99	-1.72	0.00
ENSG00000165175	MID1IP1	31.08	75.32	-1.27	0.00
ENSG00000166523	CLEC4E	0.55	1.89	-1.41	0.00
ENSG00000166592	RRAD	1.15	4.48	-1.76	0.00
ENSG00000166819	PLIN1	18.34	5.17	1.78	0.00
ENSG00000167508	MVD	7.29	20.48	-1.46	0.00
ENSG00000168685	IL7R	2.14	5.05	-1.15	0.00
ENSG00000169245	CXCL10	7.99	33.12	-2.02	0.00
ENSG00000169248	CXCL11	0.33	1.49	-1.58	0.00
ENSG00000169442	CD52	5.80	12.12	-1.03	0.00
ENSG00000170909	OSCAR	1.10	2.57	-1.06	0.00
ENSG00000170961	HAS2	1.09	3.80	-1.60	0.01
ENSG00000172602	RND1	24.86	66.70	-1.41	0.01
ENSG00000172724	CCL19	10.71	45.91	-2.07	0.00
ENSG00000173110	HSPA6	0.89	14.46	-3.69	0.00
ENSG00000176170	SPHK1	0.86	3.34	-1.69	0.00
ENSG00000178860	MSC	1.18	3.72	-1.48	0.00
ENSG00000184254	ALDH1A3	1.09	2.95	-1.25	0.00
ENSG00000184922	FMNL1	1.80	3.91	-1.02	0.00
ENSG00000186340	THBS2	2.31	6.51	-1.40	0.00
ENSG00000186407	CD300E	1.08	2.85	-1.22	0.00
ENSG00000196924	FLNA	13.20	27.84	-1.06	0.00
ENSG00000197405	C5AR1	7.61	17.01	-1.13	0.00
ENSG00000197461	PDGFA	1.12	2.70	-1.11	0.00
ENSG00000204099	NEU4	26.74	12.87	1.04	0.00
ENSG00000204388	HSPA1B	14.91	148.58	-3.29	0.00
ENSG00000204389	HSPA1A	42.35	167.18	-1.97	0.01
ENSG00000204681	GABBR1	3.42	8.73	-1.29	0.00
ENSG00000205754	SLCO1B7	10.00	3.98	1.28	0.00
ENSG00000213145	CRIP1	1.94	4.32	-1.06	0.00
ENSG00000213886	UBD	20.33	58.15	-1.50	0.00
ENSG00000227507	LTB	3.38	7.83	-1.16	0.00
ENSG00000255398	HCAR3	0.45	1.62	-1.41	0.01
ENSG00000257046	LST3	57.55	22.18	1.37	0.00

## Ergänzende Tabelle 7: Liste der differentiell exprimierten Gene in den Darmkontrollen

g	Symbol	RPKM (gemittelt von Proben des kontrahierenden Gewebe)	RPKM (gemittelt von Proben mit Darmsignalen)	logFC	FDR
ENSG00000003096	KLHL13	2.09	0.78	1.18	0.00
ENSG00000003400	CASP10	4.94	10.88	-1.10	0.00
ENSG00000004776	HSPB6	223.59	19.19	3.53	0.00
ENSG00000004799	PDK4	114.95	23.95	2.25	0.00
ENSG00000005073	HOXA11	12.03	3.15	1.85	0.00
ENSG00000005243	COP22	7.85	1.52	2.20	0.00
ENSG00000005810	MYCBP2	5.19	2.44	1.02	0.00
ENSG00000006025	OSBPL7	5.98	12.70	-1.06	0.00
ENSG00000006047	YBX2	3.47	9.11	-1.33	0.01
ENSG00000006555	TTC22	8.14	22.48	-1.44	0.00
ENSG00000007171	NOS2	1.47	5.15	-1.65	0.00
ENSG00000007237	GAS7	9.46	3.24	1.48	0.00
ENSG00000007866	TEAD3	39.12	14.63	1.40	0.00
ENSG00000007908	SELE	3.64	0.16	3.25	0.00
ENSG00000008441	NFIX	27.72	8.74	1.64	0.00
ENSG00000008853	RHOBTB2	4.23	1.62	1.26	0.00
ENSG00000009413	REV3L	4.50	1.84	1.18	0.00
ENSG00000010803	SCMH1	15.24	6.51	1.20	0.00
ENSG00000010810	FYN	6.92	3.28	1.02	0.00
ENSG00000011275	RNF216	10.90	4.32	1.29	0.00
ENSG00000011454	RABGAP1	15.44	6.64	1.19	0.00
ENSG00000011523	CEP88	6.70	2.31	1.44	0.00
ENSG00000012232	EXTL3	4.42	1.77	1.21	0.00
ENSG00000012660	ELOVL5	16.12	5.10	1.61	0.00
ENSG00000012822	CALCOO1	26.48	10.76	1.28	0.00
ENSG00000015171	ZMYND11	23.76	10.66	1.14	0.00
ENSG00000016391	CHDH	4.77	11.10	-1.18	0.01
ENSG00000017621	MAGIX	0.73	1.93	-1.16	0.00
ENSG00000018236	CNTN1	2.59	0.61	1.73	0.00
ENSG00000018408	WWTR1	19.93	3.44	2.45	0.00
ENSG00000018625	ATP1A2	26.19	2.26	3.40	0.00
ENSG00000019169	MARCO	3.57	0.62	2.13	0.00
ENSG00000019485	PRDM11	2.03	0.67	1.32	0.00
ENSG00000020129	NCDN	6.23	2.92	1.03	0.00
ENSG00000020181	GPR124	13.33	5.66	1.20	0.00
ENSG00000020577	SAMD4A	7.40	1.29	2.32	0.00
ENSG00000021300	PLEKHB1	6.43	1.90	1.64	0.00
ENSG00000021645	NRXN3	3.72	0.41	2.59	0.00
ENSG00000022267	FHL1	163.92	17.96	3.17	0.00

g	Symbol	RPKM (gemittelt von Proben des kontrahierenden Gewebe)	RPKM (gemittelt von Proben mit Darmsignalen)	log FC	FDR
ENSG00000148411	NACC2	19.03	4.87	1.91	0.00
ENSG00000148516	ZEB1	22.93	2.63	3.01	0.00
ENSG00000148541	FAM13C	2.42	0.70	1.48	0.00
ENSG00000148600	CDHR1	5.93	20.13	-1.72	0.00
ENSG00000148660	CAMK2G	25.26	10.87	1.20	0.00
ENSG00000148798	INA	2.86	0.83	1.53	0.01
ENSG00000148841	ITPRIP	8.37	3.01	1.40	0.00
ENSG00000148842	CNNM2	4.59	9.76	-1.05	0.00
ENSG00000148908	RGS10	36.91	16.00	1.19	0.00
ENSG00000149131	SERPING1	59.31	25.88	1.19	0.00
ENSG00000149294	NCAM1	6.36	1.16	2.23	0.00
ENSG00000149485	FADS1	2.02	0.58	1.45	0.00
ENSG00000149557	FEZ1	4.81	1.12	1.89	0.00
ENSG00000149573	MPZL2	6.41	15.07	-1.20	0.00
ENSG00000149575	SCN2B	1.77	0.32	1.82	0.00
ENSG00000149582	TMEM25	3.45	0.96	1.61	0.00
ENSG00000149591	TAGLN	1288.72	81.42	3.98	0.00
ENSG00000149596	JPH2	23.69	1.93	3.46	0.00
ENSG00000149633	KIAA1755	1.73	0.63	1.17	0.00
ENSG00000149639	SOGA1	5.61	1.59	1.67	0.00
ENSG00000149798	CDC42EP2	8.49	3.53	1.21	0.00
ENSG00000149968	MMP3	1.40	0.37	1.42	0.00
ENSG00000150093	ITGB1	99.99	45.79	1.12	0.00
ENSG00000150281	CTF1	5.02	0.82	2.30	0.00
ENSG00000150347	ARID5B	9.94	3.57	1.42	0.00
ENSG00000150457	LATS2	7.84	3.37	1.16	0.00
ENSG00000150510	FAM124A	3.00	0.46	2.20	0.00
ENSG00000150625	GPM6A	7.87	0.48	3.48	0.00
ENSG00000150687	PRSS23	32.66	15.86	1.03	0.01
ENSG00000150764	DIXDC1	14.25	2.07	2.64	0.00
ENSG00000150782	IL18	8.26	21.54	-1.36	0.01
ENSG00000150995	ITPR1	6.27	1.50	1.90	0.00
ENSG00000151065	DCP1B	7.28	3.37	1.06	0.00
ENSG00000151067	CACNA1C	7.16	0.49	3.32	0.00
ENSG00000151151	IPMK	2.34	6.06	-1.29	0.00
ENSG00000151208	DLG5	11.25	5.21	1.07	0.00
ENSG00000151240	DIP2C	8.82	1.46	2.41	0.00
ENSG00000151320	AKAP6	3.03	0.31	2.54	0.00
ENSG00000151422	FER	2.25	0.85	1.19	0.00

ENSG00000023902	PLEKHO1	28.12	5.44	2.32	0.00
ENSG00000024422	EHD2	51.42	11.82	2.10	0.00
ENSG00000025039	RRAGD	2.32	0.98	1.07	0.00
ENSG00000025156	HSF2	4.57	2.00	1.10	0.00
ENSG00000025423	HSD17B6	6.63	1.79	1.76	0.00
ENSG00000025708	TYMP	8.84	22.61	-1.33	0.00
ENSG00000033867	SLC4A7	3.08	1.20	1.20	0.00
ENSG00000035403	VCL	132.94	32.96	2.00	0.00
ENSG00000035862	TIMP2	96.09	36.88	1.38	0.00
ENSG00000037042	TUBG2	5.69	1.86	1.49	0.00
ENSG00000039523	FAM65A	9.46	3.94	1.21	0.00
ENSG00000041982	TNC	59.85	3.65	3.94	0.00
ENSG00000046653	GPM6B	8.26	1.51	2.28	0.00
ENSG00000047648	ARHGAP6	4.18	0.66	2.29	0.00
ENSG00000047849	MAP4	28.65	10.87	1.38	0.00
ENSG00000048342	CC2D2A	4.21	0.73	2.18	0.00
ENSG00000048471	SNX29	3.34	1.42	1.11	0.00
ENSG00000048540	LMO3	11.34	0.61	3.75	0.00
ENSG00000048740	CELF2	9.92	4.57	1.08	0.00
ENSG00000049246	PER3	9.91	3.79	1.33	0.00
ENSG00000049323	LTPB1	12.85	6.06	1.05	0.00
ENSG00000049540	ELN	9.37	3.34	1.42	0.00
ENSG00000050165	DKK3	18.69	5.97	1.61	0.00
ENSG00000050628	PTGER3	2.87	0.48	2.10	0.00
ENSG00000051523	CYBA	19.28	43.74	-1.17	0.00
ENSG00000053254	FOXN3	16.41	8.01	1.01	0.00
ENSG00000053328	METTL24	5.01	0.33	3.17	0.00
ENSG00000053438	NNAT	19.95	0.88	4.16	0.00
ENSG00000054598	FOXC1	1.77	0.71	1.07	0.01
ENSG00000054938	CHRD2	8.08	0.53	3.42	0.00
ENSG00000054965	FAM168A	10.58	4.81	1.10	0.00
ENSG00000055118	KCNH2	12.54	1.30	3.04	0.00
ENSG00000056736	IL17RB	2.00	5.29	-1.30	0.00
ENSG00000057019	DCBLD2	4.69	1.04	1.94	0.00
ENSG00000058056	USP13	2.20	0.76	1.28	0.00
ENSG00000058091	CDK14	3.48	1.01	1.57	0.00
ENSG00000058272	PPP1R12A	16.37	5.16	1.62	0.00
ENSG00000058668	ATP2B4	87.06	6.73	3.64	0.00
ENSG00000059804	SLC2A3	10.06	2.39	1.97	0.00
ENSG00000059915	PSD	28.87	1.84	3.80	0.00
ENSG00000060656	PTPRU	1.54	0.53	1.20	0.00
ENSG00000061455	PRDM6	2.78	0.42	2.19	0.00
ENSG00000061918	GUCY1B3	11.40	1.93	2.42	0.00
ENSG00000062524	LTK	3.05	9.78	-1.60	0.00
ENSG00000063180	CA11	5.01	1.53	1.56	0.00
ENSG00000063245	EPN1	35.51	71.32	-1.00	0.00

ENSG00000151474	FRMD4A	2.84	1.01	1.30	0.00
ENSG00000151718	WWC2	2.76	0.64	1.76	0.00
ENSG00000151726	ACSL1	9.55	4.53	1.04	0.00
ENSG00000151729	SLC25A4	70.16	22.84	1.61	0.00
ENSG00000151892	GFRA1	8.05	1.58	2.18	0.00
ENSG00000151929	BAG3	35.48	12.12	1.53	0.00
ENSG00000151967	SCHIP1	3.21	0.57	2.07	0.00
ENSG00000152022	LIX1L	13.52	5.06	1.37	0.00
ENSG00000152049	KCNE4	3.03	1.03	1.36	0.00
ENSG00000152078	TMEM56	6.70	16.97	-1.31	0.00
ENSG00000152104	PTPN14	1.41	0.19	1.92	0.00
ENSG00000152137	HSPB8	143.98	7.54	4.21	0.00
ENSG00000152217	SETBP1	5.39	1.13	2.03	0.00
ENSG00000152270	PDE3B	8.33	2.63	1.58	0.00
ENSG00000152284	TCF7L1	6.53	1.66	1.83	0.00
ENSG00000152292	SH2D6	0.38	1.66	-1.59	0.00
ENSG00000152377	SPOCK1	7.24	0.48	3.36	0.00
ENSG00000152409	JMY	7.00	1.97	1.71	0.00
ENSG00000152475	ZNF837	0.73	1.83	-1.09	0.00
ENSG00000152527	PLEKHH2	2.15	0.83	1.15	0.00
ENSG00000152556	PFKM	9.51	3.41	1.41	0.00
ENSG00000152583	SPARCL1	308.33	42.53	2.85	0.00
ENSG00000152767	FARP1	4.21	1.68	1.21	0.00
ENSG00000152784	PRDM8	3.34	0.88	1.66	0.00
ENSG00000153012	LGI2	2.62	0.39	2.16	0.00
ENSG00000153234	NR4A2	16.67	2.85	2.45	0.00
ENSG00000153250	RBMS1	4.44	1.63	1.32	0.00
ENSG00000153814	JAZF1	12.83	2.45	2.28	0.00
ENSG00000153885	KCTD15	8.72	2.49	1.71	0.00
ENSG00000153956	CACNA2D1	4.69	0.65	2.45	0.00
ENSG00000154035	C17orf103	5.42	2.52	1.04	0.00
ENSG00000154096	THY1	18.52	5.83	1.63	0.00
ENSG00000154153	FAM134B	11.44	23.30	-1.01	0.01
ENSG00000154175	ABI3BP	6.01	2.64	1.11	0.00
ENSG00000154188	ANGPT1	2.45	0.61	1.66	0.00
ENSG00000154229	PRKCA	11.15	3.56	1.58	0.00
ENSG00000154240	CEP112	1.46	0.32	1.57	0.00
ENSG00000154252	GAL3ST2	2.49	9.37	-1.81	0.00
ENSG00000154258	ABCA9	1.82	0.52	1.42	0.00
ENSG00000154265	ABCA5	2.34	5.44	-1.14	0.00
ENSG00000154277	UCHL1	15.39	4.98	1.58	0.00
ENSG00000154309	DISP1	3.82	0.88	1.85	0.00
ENSG00000154330	PGM5	60.29	4.80	3.58	0.00
ENSG00000154380	ENAH	10.81	2.83	1.85	0.00
ENSG00000154511	FAM69A	11.83	5.07	1.18	0.00
ENSG00000154553	PDLIM3	32.73	3.61	3.09	0.00

ENSG0000064042	LIMCH1	3.97	1.29	1.45	0.00
ENSG0000064300	NGFR	5.80	2.17	1.32	0.00
ENSG0000064309	CDON	4.46	0.34	3.00	0.00
ENSG0000065320	NTN1	8.23	3.07	1.36	0.00
ENSG0000065534	MYLK	137.22	12.09	3.48	0.00
ENSG0000065882	TBC1D1	28.63	7.95	1.82	0.00
ENSG0000066629	EML1	10.72	1.32	2.80	0.00
ENSG0000066697	MSANTD3	4.68	1.93	1.18	0.00
ENSG0000067369	TP53BP1	6.04	2.87	1.01	0.00
ENSG0000067606	PRKCZ	3.28	6.84	-1.01	0.00
ENSG0000067715	SYT1	3.18	0.95	1.52	0.00
ENSG0000067840	PDZD4	7.71	1.86	1.91	0.00
ENSG0000068024	HDAC4	6.21	1.54	1.85	0.00
ENSG0000068078	FGFR3	6.13	18.43	-1.55	0.00
ENSG0000068615	REEP1	13.71	1.31	3.16	0.00
ENSG0000068781	STON1- GTF2A1L	13.06	0.93	3.50	0.00
ENSG0000068976	PYGM	8.59	0.66	3.29	0.00
ENSG0000069011	PITX1	1.81	5.38	-1.45	0.00
ENSG0000069275	NUCKS1	41.56	20.09	1.04	0.00
ENSG0000069431	ABCC9	1.88	0.17	2.35	0.00
ENSG0000069535	MAOB	26.31	5.55	2.20	0.00
ENSG0000069702	TGFBF3	10.34	2.86	1.77	0.00
ENSG0000069849	ATP1B3	66.64	141.30	-1.08	0.01
ENSG0000069956	MAPK6	11.57	23.89	-1.03	0.01
ENSG0000069966	GNB5	3.74	1.27	1.39	0.00
ENSG0000070193	FGF10	2.09	0.47	1.71	0.00
ENSG0000070404	FSTL3	11.52	3.16	1.79	0.00
ENSG0000070423	RNF126	7.38	15.23	-1.02	0.00
ENSG0000071054	MAP4K4	7.16	3.36	1.04	0.00
ENSG0000071205	ARHGAP1 0	4.47	0.67	2.35	0.00
ENSG0000071242	RPS6KA2	6.22	2.84	1.07	0.00
ENSG0000071794	HLTF	5.94	2.09	1.40	0.00
ENSG0000071991	CDH19	3.84	0.68	2.14	0.00
ENSG0000072110	ACTN1	69.91	9.95	2.78	0.00
ENSG0000072163	LIMS2	24.93	3.37	2.80	0.00
ENSG0000072195	SPEG	11.81	1.33	2.93	0.00
ENSG0000072840	EVC	5.74	1.14	2.10	0.00
ENSG0000072864	NDE1	14.25	2.31	2.50	0.00
ENSG0000072952	MRV1	26.33	3.93	2.67	0.00
ENSG0000073712	FERMT2	28.59	2.89	3.20	0.00
ENSG0000073756	PTGS2	10.28	1.11	2.95	0.00
ENSG0000073910	FRY	4.38	0.96	1.93	0.00
ENSG0000074047	GLI2	1.73	0.52	1.35	0.00
ENSG0000074219	TEAD2	13.03	3.47	1.84	0.00
ENSG0000074657	ZNF532	5.17	1.21	1.89	0.00
ENSG0000075035	WSCD2	1.48	0.14	2.15	0.00

ENSG00000154556	SORBS2	13.48	1.81	2.74	0.00
ENSG00000154639	CXADR	5.20	16.97	-1.66	0.00
ENSG00000154734	ADAMTS1	32.09	8.00	1.97	0.00
ENSG00000154917	RAB6B	5.34	1.60	1.59	0.00
ENSG00000154928	EPHB1	1.35	0.06	2.38	0.00
ENSG00000155016	CYP2U1	3.46	1.34	1.22	0.00
ENSG00000155090	KLF10	55.85	21.07	1.40	0.00
ENSG00000155099	TMEM55A	5.82	1.47	1.82	0.00
ENSG00000155130	MARCKS	46.57	99.58	-1.09	0.00
ENSG00000155545	MIER3	15.04	48.14	-1.66	0.00
ENSG00000155760	FZD7	30.81	5.42	2.45	0.00
ENSG00000155792	DEPTOR	12.62	3.99	1.60	0.00
ENSG00000155980	KIF5A	2.73	0.89	1.39	0.00
ENSG00000156113	KCNMA1	31.29	2.68	3.43	0.00
ENSG00000156218	ADAMTSL 3	5.68	0.52	2.95	0.00
ENSG00000156381	ANKRD9	11.19	35.33	-1.64	0.00
ENSG00000156475	PPP2R2B	1.42	0.22	1.82	0.00
ENSG00000156535	CD109	4.25	0.78	2.12	0.00
ENSG00000156804	FBXO32	71.59	14.64	2.27	0.00
ENSG00000156966	B3GNT7	18.00	70.10	-1.95	0.00
ENSG00000157005	SST	4.14	11.73	-1.45	0.00
ENSG00000157064	NMNAT2	1.48	0.29	1.68	0.00
ENSG00000157110	RBPMS	21.14	3.35	2.57	0.00
ENSG00000157315	TMED6	1.20	3.35	-1.31	0.01
ENSG00000157514	TSC22D3	40.83	19.87	1.03	0.00
ENSG00000157570	TSPAN18	17.50	1.93	3.02	0.00
ENSG00000157654	PALM2- AKAP2	20.24	6.76	1.55	0.00
ENSG00000158186	MRAS	5.99	1.04	2.27	0.00
ENSG00000158201	ABHD3	13.68	44.17	-1.67	0.00
ENSG00000158246	FAM46B	17.74	1.06	3.78	0.00
ENSG00000158270	COLEC12	6.41	2.99	1.04	0.00
ENSG00000158301	GPRASP2	4.27	1.08	1.76	0.00
ENSG00000158373	HIST1H2B D	15.17	34.61	-1.18	0.01
ENSG00000158445	KCNB1	2.14	0.15	2.57	0.00
ENSG00000158560	DYNC111	3.78	0.36	2.73	0.00
ENSG00000158859	ADAMTS4	5.62	0.68	2.67	0.00
ENSG00000158887	MPZ	7.70	2.94	1.32	0.00
ENSG00000158985	CDC42SE 2	17.95	36.95	-1.03	0.00
ENSG00000159164	SV2A	2.33	0.83	1.26	0.00
ENSG00000159167	STC1	2.74	0.69	1.67	0.00
ENSG00000159176	CSR1P1	251.54	29.18	3.10	0.00
ENSG00000159208	C1orf51	2.77	0.47	2.06	0.00
ENSG00000159251	ACTC1	24.19	0.68	4.71	0.00
ENSG00000159335	PTMS	118.17	47.49	1.31	0.00
ENSG00000159388	BTG2	316.46	51.32	2.62	0.00
ENSG00000159403	C1R	66.78	32.48	1.03	0.00

ENSG00000075073	TACR2	46.58	2.37	4.16	0.00
ENSG00000075213	SEMA3A	4.94	0.90	2.17	0.00
ENSG00000075234	TTC38	20.50	41.94	-1.02	0.01
ENSG00000075240	GRAMD4	14.52	33.22	-1.18	0.00
ENSG00000076554	TPD52	16.74	36.49	-1.11	0.00
ENSG00000076555	ACACB	9.20	4.12	1.11	0.00
ENSG00000076706	MCAM	49.53	8.15	2.57	0.00
ENSG00000076716	GPC4	15.30	5.38	1.47	0.00
ENSG00000076770	MBNL3	2.34	5.23	-1.08	0.01
ENSG00000076826	CAMSAP3	6.54	17.74	-1.41	0.01
ENSG00000077092	RARB	2.46	0.77	1.40	0.00
ENSG00000077157	PPP1R12 B	94.95	8.85	3.39	0.00
ENSG00000077463	SIRT6	12.97	35.08	-1.42	0.00
ENSG00000077684	JADE1	3.59	1.48	1.15	0.00
ENSG00000077782	FGFR1	13.25	2.93	2.09	0.00
ENSG00000078246	TULP3	7.00	3.35	1.01	0.00
ENSG00000078549	ADCYAP1 R1	1.74	0.34	1.76	0.00
ENSG00000079102	RUNX1T1	1.71	0.41	1.57	0.00
ENSG00000079150	FKBP7	3.79	1.68	1.07	0.00
ENSG00000079308	TNS1	106.35	7.33	3.81	0.00
ENSG00000079931	MOXD1	5.06	1.01	2.08	0.00
ENSG00000080493	SLC4A4	13.81	49.36	-1.82	0.01
ENSG00000080561	MID2	3.55	0.59	2.17	0.00
ENSG00000080644	CHRNA3	3.56	1.16	1.44	0.00
ENSG00000080854	IGSF9B	1.22	0.12	2.00	0.00
ENSG00000081041	CXCL2	7.70	2.70	1.43	0.00
ENSG00000081853	PCDHGA2	17.49	7.03	1.28	0.00
ENSG00000082014	SMARCD3	4.37	1.39	1.50	0.00
ENSG00000082175	PGR	1.44	0.16	2.05	0.00
ENSG00000082269	FAM135A	2.74	6.14	-1.10	0.00
ENSG00000082497	SERTAD4	4.59	1.23	1.71	0.00
ENSG00000082805	ERC1	5.87	2.80	1.00	0.00
ENSG00000083290	ULK2	2.99	0.94	1.45	0.00
ENSG00000083720	OXCT1	13.22	4.81	1.41	0.00
ENSG00000083814	ZNF671	2.45	0.99	1.12	0.00
ENSG00000084636	COL16A1	6.40	2.51	1.27	0.00
ENSG00000084731	KIF3C	3.29	0.76	1.81	0.00
ENSG00000085265	FCN1	4.16	1.03	1.79	0.00
ENSG00000085491	SLC25A24	9.46	20.54	-1.10	0.00
ENSG00000087116	ADAMTS2	2.36	0.96	1.12	0.00
ENSG00000087258	GNAO1	11.78	1.28	2.98	0.00
ENSG00000087303	NID2	4.21	1.81	1.11	0.00
ENSG00000087448	KLHL42	11.37	4.33	1.34	0.00
ENSG00000087510	TFAP2C	3.39	0.35	2.59	0.00
ENSG00000087903	RFX2	2.24	0.98	1.01	0.01
ENSG00000088386	SLC15A1	0.97	3.50	-1.62	0.01

ENSG00000159433	STARD9	2.49	0.65	1.60	0.00
ENSG00000159713	TPPP3	18.62	6.94	1.39	0.00
ENSG00000159733	ZFYVE28	2.15	5.06	-1.14	0.00
ENSG00000159784	FAM131B	2.39	0.34	2.16	0.00
ENSG00000159840	ZYX	93.71	28.91	1.69	0.00
ENSG00000159899	NPR2	6.17	2.03	1.49	0.00
ENSG00000160094	ZNF362	9.58	4.45	1.07	0.00
ENSG00000160113	NR2F6	28.58	74.55	-1.38	0.00
ENSG00000160233	LRRC3	3.67	0.97	1.69	0.00
ENSG00000160307	S100B	20.59	4.68	2.08	0.00
ENSG00000160325	CACFD1	15.78	33.22	-1.06	0.00
ENSG00000160404	TOR2A	3.87	8.39	-1.07	0.00
ENSG00000160408	ST6GALN AC6	44.70	103.86	-1.21	0.00
ENSG00000160446	ZDHHC12	12.95	28.84	-1.14	0.00
ENSG00000160469	BRSK1	2.13	0.65	1.40	0.00
ENSG00000160539	PPAPDC3	3.26	0.81	1.72	0.00
ENSG00000160844	GATS	2.74	0.92	1.36	0.00
ENSG00000160972	PPP1R16 A	9.72	24.11	-1.29	0.00
ENSG00000160973	FOXH1	0.46	1.57	-1.36	0.00
ENSG00000161013	MGAT4B	36.60	83.97	-1.19	0.00
ENSG00000161179	YDJC	6.01	13.82	-1.17	0.00
ENSG00000161243	FBXO27	1.78	0.38	1.68	0.00
ENSG00000161281	COX7A1	22.26	4.03	2.40	0.00
ENSG00000161326	DUSP14	5.18	1.27	1.84	0.00
ENSG00000161328	LRRC56	1.29	3.65	-1.34	0.00
ENSG00000161638	ITGA5	40.94	4.53	3.11	0.00
ENSG00000161714	PLCD3	26.23	55.65	-1.08	0.01
ENSG00000161896	IP6K3	1.68	0.24	1.99	0.00
ENSG00000162069	CCDC64B	9.72	31.23	-1.66	0.01
ENSG00000162174	ASRGL1	2.05	4.35	-1.00	0.00
ENSG00000162373	BEND5	3.61	0.88	1.77	0.00
ENSG00000162409	PRKAA2	2.90	0.62	1.86	0.00
ENSG00000162413	KLHL21	12.97	3.22	1.93	0.00
ENSG00000162433	AK4	6.38	2.72	1.16	0.00
ENSG00000162437	RAVER2	11.22	22.81	-1.01	0.00
ENSG00000162444	RBP7	5.51	1.91	1.41	0.00
ENSG00000162493	PDPN	3.73	1.54	1.15	0.00
ENSG00000162512	SDC3	33.74	6.31	2.37	0.00
ENSG00000162520	SYNC	10.65	3.62	1.49	0.00
ENSG00000162543	UBXN10	6.84	2.45	1.39	0.00
ENSG00000162576	MXRA8	24.67	10.11	1.27	0.00
ENSG00000162599	NFIA	5.91	2.65	1.09	0.00
ENSG00000162614	NEXN	34.26	2.53	3.63	0.00
ENSG00000162616	DNAJB4	11.34	5.25	1.08	0.00
ENSG00000162623	TYW3	6.16	2.71	1.11	0.00
ENSG00000162694	EXTL2	4.12	1.73	1.14	0.00

ENSG00000088538	DOCK3	1.09	0.08	2.02	0.00
ENSG00000088543	C3orf18	4.75	1.13	1.86	0.00
ENSG00000088854	C20orf194	7.18	2.03	1.70	0.00
ENSG00000088881	EBF4	5.25	1.58	1.59	0.00
ENSG00000088882	CPXM1	4.72	1.83	1.26	0.01
ENSG00000089041	P2RX7	1.53	0.45	1.34	0.00
ENSG00000089250	NOS1	1.54	0.04	2.65	0.00
ENSG00000090104	RGS1	28.25	9.66	1.52	0.00
ENSG00000090661	CERS4	3.76	1.65	1.08	0.01
ENSG00000090924	PLEKHG2	4.53	1.99	1.09	0.00
ENSG00000090971	NAT14	5.40	2.18	1.22	0.00
ENSG00000091136	LAMB1	32.59	15.58	1.05	0.00
ENSG00000091436	MLTK	26.12	2.19	3.43	0.00
ENSG00000091482	SMPX	11.34	0.43	4.09	0.00
ENSG00000091656	ZFHx4	1.39	0.07	2.38	0.00
ENSG00000091986	CCDC80	39.73	12.50	1.65	0.00
ENSG00000092096	SLC22A17	8.19	2.68	1.52	0.00
ENSG00000092621	PHGDH	5.65	1.41	1.83	0.00
ENSG00000092929	UNC13D	3.09	6.62	-1.04	0.00
ENSG00000092964	DPYSL2	12.78	5.87	1.09	0.00
ENSG00000092969	TGFB2	1.81	0.29	1.92	0.00
ENSG00000093183	SEC22C	4.53	2.13	1.00	0.00
ENSG00000094963	FMO2	1.38	0.26	1.68	0.00
ENSG00000095303	PTGS1	44.41	6.75	2.67	0.00
ENSG00000095637	SORBS1	79.36	6.00	3.67	0.00
ENSG00000095713	CRTAC1	1.83	0.20	2.20	0.00
ENSG00000097096	SYDE2	2.63	0.70	1.60	0.00
ENSG00000099250	NRP1	7.29	3.51	1.00	0.00
ENSG00000099260	PALMD	2.50	0.98	1.16	0.00
ENSG00000099785	MARCH2	28.67	13.06	1.12	0.00
ENSG00000099849	RASSF7	18.45	53.30	-1.52	0.00
ENSG00000099860	GADD45B	48.97	14.52	1.74	0.00
ENSG00000099864	PALM	9.62	2.75	1.72	0.00
ENSG00000099985	OSM	1.89	0.30	1.96	0.00
ENSG00000099994	SUSD2	2.79	0.79	1.55	0.00
ENSG00000100065	CARD10	8.16	16.88	-1.03	0.01
ENSG00000100077	ADRBK2	2.89	1.02	1.31	0.00
ENSG00000100097	LGALS1	247.68	62.47	1.98	0.00
ENSG00000100139	MICALL1	16.70	5.92	1.46	0.00
ENSG00000100146	SOX10	5.39	1.79	1.47	0.00
ENSG00000100154	TTC28	3.04	1.13	1.25	0.00
ENSG00000100234	TIMP3	104.14	28.76	1.85	0.00
ENSG00000100299	ARSA	18.27	37.78	-1.04	0.00
ENSG00000100300	TSPO	58.53	135.55	-1.21	0.00
ENSG00000100307	CBX7	22.92	7.27	1.62	0.00
ENSG00000100311	PDGFB	5.88	2.27	1.28	0.00

ENSG00000162733	DDR2	19.30	2.14	3.03	0.00
ENSG00000162734	PEA15	79.94	25.47	1.64	0.00
ENSG00000162745	OLFML2B	11.58	1.23	2.99	0.00
ENSG00000162747	FCGR3B	2.92	0.22	2.74	0.00
ENSG00000162772	ATF3	73.17	25.63	1.50	0.00
ENSG00000162885	B3GALNT2	2.80	0.87	1.44	0.00
ENSG00000162949	CAPN13	1.69	6.02	-1.69	0.00
ENSG00000162981	FAM84A	9.13	22.62	-1.29	0.00
ENSG00000163001	CCDC104	7.95	3.70	1.05	0.00
ENSG00000163017	ACTG2	1388.52	47.91	4.85	0.00
ENSG00000163069	SGCB	24.18	10.25	1.22	0.00
ENSG00000163145	C1QTNF7	4.22	1.12	1.71	0.00
ENSG00000163171	CDC42EP3	12.02	4.19	1.47	0.00
ENSG00000163220	S100A9	48.18	7.41	2.66	0.00
ENSG00000163221	S100A12	2.31	0.20	2.50	0.00
ENSG00000163249	CCNYL1	5.65	13.66	-1.24	0.00
ENSG00000163251	FZD5	14.65	32.56	-1.14	0.00
ENSG00000163297	ANTXR2	25.31	11.78	1.09	0.00
ENSG00000163328	GPR155	4.78	1.11	1.89	0.00
ENSG00000163346	PBXIP1	78.18	29.81	1.38	0.00
ENSG00000163359	COL6A3	38.17	6.74	2.46	0.00
ENSG00000163430	FSTL1	56.91	12.23	2.19	0.00
ENSG00000163431	LMOD1	243.18	16.26	3.88	0.00
ENSG00000163453	IGFBP7	190.31	72.62	1.39	0.00
ENSG00000163464	CXCR1	1.11	0.09	1.98	0.00
ENSG00000163513	TGFBR2	61.00	30.35	1.00	0.00
ENSG00000163531	NFASC	3.34	0.97	1.55	0.00
ENSG00000163545	NUAK2	5.72	14.01	-1.26	0.01
ENSG00000163563	MNDA	4.37	1.72	1.23	0.00
ENSG00000163577	EIF5A2	1.62	0.48	1.36	0.00
ENSG00000163596	ICA1L	1.28	0.23	1.67	0.00
ENSG00000163629	PTPN13	2.43	0.63	1.61	0.00
ENSG00000163637	PRICKLE2	10.39	1.68	2.46	0.00
ENSG00000163638	ADAMTS9	1.66	0.58	1.21	0.00
ENSG00000163681	SLMAP	23.48	5.89	1.95	0.00
ENSG00000163697	APBB2	4.04	1.89	1.00	0.00
ENSG00000163703	CRELD1	14.57	6.42	1.15	0.00
ENSG00000163754	GYG1	29.40	6.49	2.14	0.00
ENSG00000163820	FYCO1	21.43	5.58	1.90	0.00
ENSG00000163873	GRIK3	2.60	0.53	1.86	0.00
ENSG00000163879	DNAL1	2.30	0.83	1.24	0.00
ENSG00000163884	KLF15	2.56	0.55	1.82	0.00
ENSG00000163909	HEYL	3.36	1.41	1.12	0.00
ENSG00000164070	HSPA4L	1.58	0.43	1.44	0.00
ENSG00000164088	PPM1M	7.17	3.37	1.04	0.00
ENSG00000164105	SAP30	6.45	2.31	1.39	0.00

ENSG00000100320	RBFOX2	18.15	5.21	1.75	0.00
ENSG00000100321	SYNGR1	4.61	1.12	1.83	0.00
ENSG00000100399	CHADL	2.64	1.11	1.09	0.01
ENSG00000100604	CHGA	12.76	40.57	-1.65	0.00
ENSG00000100628	ASB2	20.92	3.25	2.60	0.00
ENSG00000100744	GSKIP	12.89	37.03	-1.50	0.00
ENSG00000100842	EFS	6.92	2.16	1.57	0.00
ENSG00000100968	NFATC4	7.05	1.97	1.72	0.00
ENSG00000101004	NINL	2.40	0.65	1.56	0.00
ENSG00000101166	SLMO2	25.35	51.76	-1.02	0.00
ENSG00000101188	NTRS1	7.78	0.26	3.97	0.00
ENSG00000101210	EEF1A2	5.57	1.66	1.61	0.01
ENSG00000101220	C20orf27	16.80	7.41	1.16	0.01
ENSG00000101230	ISM1	1.32	0.19	1.83	0.00
ENSG00000101265	RASSF2	9.98	4.59	1.08	0.01
ENSG00000101290	CDS2	8.11	3.92	1.00	0.00
ENSG00000101298	SNPH	3.52	0.89	1.72	0.00
ENSG00000101335	MYL9	3265.21	187.80	4.12	0.00
ENSG00000101400	SNTA1	11.34	4.43	1.31	0.00
ENSG00000101447	FAM83D	32.25	3.78	3.01	0.00
ENSG00000101605	MYOM1	7.31	1.08	2.51	0.00
ENSG00000101680	LAMA1	0.49	1.71	-1.40	0.00
ENSG00000101782	RIOK3	22.76	51.93	-1.18	0.01
ENSG00000101938	CHRDL1	46.24	7.91	2.51	0.00
ENSG00000101955	SRPX	25.89	8.29	1.61	0.00
ENSG00000101958	GLRA2	0.36	1.56	-1.56	0.00
ENSG00000102024	PLS3	22.13	7.81	1.47	0.00
ENSG00000102038	SMARCA1	11.99	2.23	2.30	0.00
ENSG00000102181	CD99L2	12.92	4.31	1.53	0.00
ENSG00000102265	TIMP1	68.49	27.19	1.33	0.00
ENSG00000102302	FGD1	2.34	0.96	1.10	0.00
ENSG00000102316	MAGED2	53.91	21.58	1.31	0.00
ENSG00000102385	DRP2	1.14	0.11	1.96	0.00
ENSG00000102401	ARMCX3	15.24	7.43	1.01	0.00
ENSG00000102409	BEX4	35.58	13.91	1.34	0.00
ENSG00000102471	NDFIP2	10.26	27.31	-1.39	0.00
ENSG00000102547	CAB39L	13.50	2.66	2.24	0.00
ENSG00000102781	KATNAL1	4.48	0.76	2.23	0.00
ENSG00000102802	MEDAG	6.01	2.02	1.47	0.00
ENSG00000103175	WFDC1	8.86	1.78	2.16	0.00
ENSG00000103196	CRISPLD2	10.57	4.29	1.25	0.00
ENSG00000103202	NME4	27.76	8.92	1.61	0.00
ENSG00000103241	FOXF1	47.76	13.44	1.81	0.00
ENSG00000103254	FAM173A	5.81	13.01	-1.13	0.00
ENSG00000103257	SLC7A5	7.87	3.32	1.18	0.01
ENSG00000103326	CAPN15	8.19	21.71	-1.38	0.00

ENSG00000164106	SCRG1	6.25	0.34	3.45	0.00
ENSG00000164107	HAND2	31.83	2.70	3.44	0.00
ENSG00000164114	MAP9	1.73	0.35	1.73	0.00
ENSG00000164116	GUCY1A3	15.48	2.02	2.79	0.00
ENSG00000164120	HPGD	25.92	62.53	-1.26	0.01
ENSG00000164122	ASB5	2.88	0.13	3.04	0.00
ENSG00000164124	TMEM144	1.61	3.69	-1.09	0.00
ENSG00000164125	FAM198B	9.03	4.24	1.05	0.00
ENSG00000164181	ELOVL7	1.72	3.84	-1.05	0.00
ENSG00000164197	RNF180	1.90	0.33	1.89	0.00
ENSG00000164211	STARD4	2.47	5.62	-1.11	0.00
ENSG00000164294	GPX8	4.62	1.80	1.25	0.00
ENSG00000164308	ERAP2	5.49	13.46	-1.26	0.01
ENSG00000164323	KIAA1430	6.23	2.80	1.09	0.00
ENSG00000164326	CARTPT	5.55	0.07	4.18	0.00
ENSG00000164403	SHROOM1	10.23	25.76	-1.31	0.00
ENSG00000164484	TMEM200A	1.66	6.60	-1.84	0.00
ENSG00000164692	COL1A2	78.03	21.19	1.87	0.00
ENSG00000164694	FNDC1	6.24	0.58	2.96	0.00
ENSG00000164741	DLC1	7.97	1.73	2.06	0.00
ENSG00000164764	SBSPON	3.04	0.45	2.23	0.00
ENSG00000164776	PHKG1	1.87	0.31	1.93	0.00
ENSG00000164877	MICALL2	5.54	12.52	-1.14	0.00
ENSG00000164932	CTHRC1	3.86	1.28	1.42	0.00
ENSG00000164946	FREM1	1.91	0.48	1.56	0.00
ENSG00000164949	GEM	75.58	4.70	3.94	0.00
ENSG00000165030	NFIL3	30.28	11.68	1.36	0.00
ENSG00000165071	TMEM71	2.38	0.67	1.51	0.00
ENSG00000165072	MAMDC2	17.80	3.04	2.46	0.00
ENSG00000165092	ALDH1A1	76.84	28.48	1.42	0.00
ENSG00000165113	GKAP1	1.82	0.65	1.19	0.00
ENSG00000165124	SVEP1	2.95	0.89	1.49	0.00
ENSG00000165171	WBSCR27	1.02	2.44	-1.09	0.01
ENSG00000165186	PTCHD1	2.23	0.19	2.50	0.00
ENSG00000165215	CLDN3	126.40	446.45	-1.82	0.00
ENSG00000165410	CFL2	53.50	4.99	3.36	0.00
ENSG00000165424	ZCCHC24	29.60	4.91	2.53	0.00
ENSG00000165553	NGB	2.27	0.29	2.22	0.00
ENSG00000165617	DACT1	3.90	1.81	1.01	0.00
ENSG00000165633	VSTM4	3.10	0.91	1.53	0.00
ENSG00000165644	COMTD1	7.44	37.55	-2.30	0.00
ENSG00000165698	C9orf9	2.97	1.11	1.24	0.00
ENSG00000165716	FAM69B	3.67	1.45	1.21	0.01
ENSG00000165731	RET	2.17	0.62	1.48	0.00
ENSG00000165757	KIAA1462	21.71	1.43	3.71	0.00
ENSG00000165821	SALL2	4.18	0.75	2.15	0.00

ENSG00000103351	CLUAP1	3.41	1.04	1.50	0.00
ENSG00000103490	PYCARD	15.14	37.36	-1.29	0.00
ENSG00000103569	AQP9	1.53	0.17	2.07	0.00
ENSG00000103647	CORO2B	2.02	0.80	1.11	0.00
ENSG00000103710	RASL12	18.84	3.52	2.34	0.00
ENSG00000104177	MYEF2	2.14	0.73	1.29	0.00
ENSG00000104213	PDGFRL	3.09	0.71	1.80	0.00
ENSG00000104324	CPQ	17.26	7.85	1.11	0.00
ENSG00000104415	WISP1	1.41	0.29	1.63	0.00
ENSG00000104427	ZC2HC1A	2.84	1.03	1.27	0.00
ENSG00000104447	TRPS1	2.32	0.47	1.84	0.00
ENSG00000104490	NCALD	4.88	1.22	1.81	0.00
ENSG00000104518	GSDMD	14.19	29.55	-1.04	0.00
ENSG00000104635	SLC39A14	18.81	38.96	-1.04	0.00
ENSG00000104643	MTMR9	3.96	1.74	1.08	0.00
ENSG00000104728	ARHGEF10	3.37	1.11	1.41	0.00
ENSG00000104879	CKM	1.59	0.13	2.29	0.00
ENSG00000104886	PLEKHJ1	15.99	37.56	-1.22	0.00
ENSG00000104936	DMPK	34.43	6.79	2.30	0.00
ENSG00000105088	OLFM2	2.59	1.16	1.01	0.00
ENSG00000105137	SYDE1	9.43	2.55	1.79	0.00
ENSG00000105245	NUMBL	4.89	2.25	1.04	0.00
ENSG00000105270	CLIP3	23.26	3.57	2.62	0.00
ENSG00000105409	ATP1A3	1.97	0.53	1.52	0.00
ENSG00000105426	PTPRS	4.99	1.72	1.41	0.00
ENSG00000105427	CNFN	1.30	3.03	-1.08	0.00
ENSG00000105509	HAS1	1.65	0.21	2.04	0.00
ENSG00000105520	DKFZP761J1410	9.49	3.02	1.57	0.00
ENSG00000105559	PLEKHA4	7.80	2.81	1.40	0.00
ENSG00000105664	COMP	5.60	0.03	4.38	0.00
ENSG00000105737	GRIK5	3.86	0.54	2.38	0.00
ENSG00000105738	SIPA1L3	7.51	17.05	-1.16	0.01
ENSG00000105755	ETHE1	102.86	267.99	-1.38	0.01
ENSG00000105767	CADM4	11.12	2.05	2.30	0.00
ENSG00000105894	PTN	16.53	6.37	1.34	0.00
ENSG00000105963	ADAP1	14.06	29.12	-1.04	0.00
ENSG00000105971	CAV2	8.37	2.51	1.64	0.00
ENSG00000105974	CAV1	107.68	18.49	2.53	0.00
ENSG00000106018	VIPR2	2.37	0.44	1.92	0.00
ENSG00000106034	CPED1	14.06	1.93	2.71	0.00
ENSG00000106070	GRB10	4.95	1.57	1.51	0.00
ENSG00000106080	FKBP14	4.40	1.70	1.25	0.00
ENSG00000106089	STX1A	2.36	0.76	1.36	0.00
ENSG00000106236	NPTX2	2.08	0.75	1.22	0.00
ENSG00000106278	PTPRZ1	1.57	0.16	2.17	0.00
ENSG00000106299	WASL	25.70	51.92	-1.01	0.00

ENSG00000165868	HSPA12A	3.18	0.93	1.53	0.00
ENSG00000165886	UBTD1	4.07	1.81	1.07	0.00
ENSG00000165912	PACSIN3	14.77	1.20	3.37	0.00
ENSG00000165914	TTC7B	5.39	1.01	2.16	0.00
ENSG00000165966	PDZRN4	12.79	0.49	4.13	0.00
ENSG00000165995	CACNB2	3.10	1.32	1.09	0.00
ENSG00000165996	PTPLA	7.52	0.68	3.07	0.00
ENSG00000166016	ABTB2	3.07	6.76	-1.08	0.00
ENSG00000166025	AMOTL1	16.63	1.93	2.95	0.00
ENSG00000166033	HTRA1	52.38	15.10	1.78	0.00
ENSG00000166073	GPR176	1.97	0.73	1.19	0.00
ENSG00000166086	JAM3	22.40	3.90	2.45	0.00
ENSG00000166126	AMN	19.92	64.76	-1.69	0.01
ENSG00000166147	FBN1	7.85	2.41	1.61	0.00
ENSG00000166165	CKB	364.92	840.84	-1.20	0.00
ENSG00000166173	LARP6	5.03	1.16	1.90	0.00
ENSG00000166183	ASPG	1.49	6.19	-1.89	0.00
ENSG00000166250	CLMP	26.29	2.52	3.26	0.00
ENSG00000166313	APBB1	9.21	2.11	2.00	0.00
ENSG00000166333	ILK	114.11	33.91	1.74	0.00
ENSG00000166341	DCHS1	8.15	2.38	1.68	0.00
ENSG00000166352	C11orf74	5.26	1.84	1.40	0.00
ENSG00000166402	TUB	2.69	0.74	1.56	0.00
ENSG00000166444	ST5	9.82	3.93	1.27	0.00
ENSG00000166448	TMEM130	1.82	0.51	1.45	0.00
ENSG00000166482	MFAP4	132.97	51.26	1.37	0.00
ENSG00000166501	PRKCB	7.37	1.95	1.79	0.00
ENSG00000166503	HDGFRP3	10.58	2.54	1.96	0.00
ENSG00000166510	CCDC68	5.97	18.33	-1.58	0.01
ENSG00000166532	RIMKLB	3.37	1.11	1.42	0.00
ENSG00000166681	NGFRAP1	41.24	18.76	1.13	0.00
ENSG00000166736	HTR3A	2.03	0.61	1.41	0.01
ENSG00000166741	NNMT	14.12	5.77	1.26	0.00
ENSG00000166780	C16orf45	14.36	2.75	2.28	0.00
ENSG00000166813	KIF7	2.59	1.11	1.07	0.00
ENSG00000166816	LDHD	16.68	46.91	-1.48	0.01
ENSG00000166819	PLIN1	3.65	1.18	1.45	0.00
ENSG00000166822	TMEM170A	6.80	14.95	-1.11	0.00
ENSG00000166823	MESP1	1.40	3.25	-1.08	0.00
ENSG00000166831	RBPMS2	33.70	2.56	3.59	0.00
ENSG00000166833	NAV2	4.31	1.05	1.81	0.00
ENSG00000166886	NAB2	11.44	3.76	1.54	0.00
ENSG00000166963	MAP1A	10.14	1.00	3.05	0.00
ENSG00000167081	PBX3	11.11	2.58	2.00	0.00
ENSG00000167123	CERCAM	5.91	2.75	1.04	0.01
ENSG00000167136	ENDOG	9.88	22.31	-1.16	0.00

ENSG00000106366	SERPINE1	7.78	2.39	1.61	0.00
ENSG00000106483	SFRP4	4.41	0.73	2.25	0.00
ENSG00000106537	TSPAN13	20.35	41.87	-1.03	0.01
ENSG00000106571	GLI3	4.55	0.71	2.32	0.00
ENSG00000106605	BLVRA	17.03	4.43	1.88	0.00
ENSG00000106624	AEBP1	44.77	17.91	1.31	0.00
ENSG00000106771	TMEM245	16.15	6.84	1.21	0.00
ENSG00000106772	PRUNE2	32.38	2.40	3.62	0.00
ENSG00000106799	TGFBR1	9.05	4.32	1.03	0.00
ENSG00000106819	ASPN	14.89	3.18	2.14	0.00
ENSG00000106823	ECM2	3.39	1.13	1.40	0.01
ENSG00000107104	KANK1	9.29	3.13	1.50	0.00
ENSG00000107130	NCS1	47.42	3.46	3.68	0.00
ENSG00000107186	MPDZ	5.16	0.72	2.48	0.00
ENSG00000107518	ATRNL1	1.50	0.13	2.20	0.00
ENSG00000107560	RAB11FIP2	5.23	2.02	1.27	0.00
ENSG00000107562	CXCL12	28.51	12.95	1.12	0.00
ENSG00000107719	PALD1	6.08	2.23	1.35	0.00
ENSG00000107771	CCSER2	11.12	4.12	1.38	0.00
ENSG00000107789	MINPP1	5.38	11.55	-1.07	0.00
ENSG00000107796	ACTA2	577.83	70.12	3.04	0.00
ENSG00000107816	LZTS2	14.77	6.93	1.07	0.00
ENSG00000107954	NEURL1	2.09	5.73	-1.35	0.01
ENSG00000108342	CSF3	2.42	0.09	2.95	0.00
ENSG00000108370	RGS9	2.24	0.78	1.27	0.00
ENSG00000108691	CCL2	26.61	6.85	1.92	0.00
ENSG00000108797	CNTNAP1	5.52	1.21	1.98	0.00
ENSG00000108821	COL1A1	94.27	21.15	2.14	0.00
ENSG00000108823	SGCA	9.06	1.36	2.53	0.00
ENSG00000108828	VAT1	48.38	20.55	1.23	0.00
ENSG00000108830	RND2	1.65	0.19	2.10	0.00
ENSG00000108852	MPP2	2.66	0.40	2.16	0.00
ENSG00000108861	DUSP3	47.77	18.26	1.38	0.00
ENSG00000108924	HLF	7.29	0.96	2.64	0.00
ENSG00000109089	CDR2L	4.88	1.44	1.60	0.00
ENSG00000109099	PMP22	57.27	18.80	1.59	0.00
ENSG00000109113	RAB34	13.29	3.96	1.69	0.00
ENSG00000109205	ODAM	1.17	0.07	2.14	0.00
ENSG00000109501	WFS1	19.06	4.60	1.99	0.00
ENSG00000109572	CLCN3	13.28	27.97	-1.06	0.00
ENSG00000109705	NKX3-2	7.27	0.63	3.09	0.00
ENSG00000109738	GLRB	1.80	0.14	2.25	0.00
ENSG00000109790	KLHL5	13.48	1.69	2.82	0.00
ENSG00000109794	FAM149A	3.57	1.50	1.13	0.00
ENSG00000109846	CRYAB	52.78	6.10	3.06	0.00
ENSG00000109854	HTATIP2	22.93	46.30	-1.01	0.01

ENSG00000167281	RBFOX3	4.19	0.23	3.21	0.00
ENSG00000167332	OR51E2	3.84	0.57	2.32	0.00
ENSG00000167543	TP53I13	7.00	14.39	-1.01	0.00
ENSG00000167549	CORO6	3.13	0.70	1.83	0.00
ENSG00000167552	TUBA1A	131.06	17.99	2.85	0.00
ENSG00000167566	NCKAP5L	2.58	1.06	1.11	0.00
ENSG00000167588	GPD1	2.98	1.09	1.27	0.00
ENSG00000167601	AXL	16.83	4.85	1.74	0.00
ENSG00000167617	CDC42EP5	50.61	142.12	-1.49	0.00
ENSG00000167641	PPP1R14A	49.75	10.13	2.27	0.00
ENSG00000167676	PLIN4	41.70	1.94	4.26	0.00
ENSG00000167693	NXN	13.71	1.82	2.75	0.00
ENSG00000167700	MFS3	8.05	23.84	-1.54	0.00
ENSG00000167702	KIFC2	7.41	18.46	-1.29	0.01
ENSG00000167705	RILP	10.54	23.20	-1.12	0.00
ENSG00000167772	ANGPTL4	6.92	1.90	1.74	0.00
ENSG00000167964	RAB26	1.01	2.63	-1.19	0.01
ENSG00000167972	ABCA3	3.47	0.97	1.61	0.00
ENSG00000167996	FTH1	500.79	1042.14	-1.06	0.01
ENSG00000168004	HRASLS5	2.14	0.17	2.51	0.00
ENSG00000168005	C11orf84	6.41	2.58	1.23	0.00
ENSG00000168056	LTBP3	12.24	5.96	1.01	0.00
ENSG00000168077	SCARA3	13.94	4.51	1.58	0.00
ENSG00000168229	PTGDR	1.11	3.29	-1.38	0.00
ENSG00000168350	DEGS2	3.94	11.47	-1.49	0.01
ENSG00000168386	FILIP1L	32.43	5.85	2.42	0.00
ENSG00000168461	RAB31	18.01	4.84	1.84	0.00
ENSG00000168490	PHYHIP	2.85	0.43	2.19	0.00
ENSG00000168497	SDPR	56.21	7.63	2.84	0.00
ENSG00000168502	SOGA2	4.79	0.50	2.75	0.00
ENSG00000168542	COL3A1	187.02	58.34	1.68	0.00
ENSG00000168621	GDNF	3.86	0.88	1.86	0.00
ENSG00000168679	SLC16A4	1.84	0.70	1.14	0.00
ENSG00000168734	PKIG	51.72	22.32	1.20	0.00
ENSG00000168758	SEMA4C	14.07	3.76	1.84	0.00
ENSG00000168785	TSPAN5	2.64	0.91	1.32	0.00
ENSG00000168955	TM4SF20	1.80	4.52	-1.22	0.00
ENSG00000168994	PXDC1	13.75	4.40	1.59	0.00
ENSG00000169026	MFS3	1.81	4.18	-1.11	0.00
ENSG00000169047	IRS1	9.63	3.79	1.29	0.01
ENSG00000169057	MECP2	6.07	2.76	1.07	0.00
ENSG00000169071	ROR2	10.38	1.44	2.66	0.00
ENSG00000169122	FAM110B	2.20	0.48	1.74	0.00
ENSG00000169184	MN1	2.47	0.75	1.45	0.00
ENSG00000169231	THBS3	7.37	3.50	1.02	0.00
ENSG00000169255	B3GALNT1	1.77	0.62	1.21	0.00

ENSG00000109906	ZBTB16	1.61	0.42	1.47	0.00
ENSG00000110076	NRXN2	2.46	0.62	1.64	0.00
ENSG00000110108	TMEM109	41.95	19.64	1.09	0.00
ENSG00000110237	ARHGEF17	11.54	2.46	2.12	0.00
ENSG00000110318	KIAA1377	1.59	0.55	1.20	0.00
ENSG00000110328	GALNT18	6.67	1.87	1.71	0.00
ENSG00000110628	SLC22A18	8.42	23.95	-1.48	0.00
ENSG00000110651	CD81	72.44	22.94	1.65	0.00
ENSG00000110841	PPFIBP1	6.04	2.33	1.28	0.00
ENSG00000110880	CORO1C	45.96	17.38	1.39	0.00
ENSG00000110881	ASIC1	2.86	0.54	1.98	0.00
ENSG00000110900	TSPAN11	8.54	3.16	1.37	0.00
ENSG00000111077	TENC1	14.26	6.34	1.14	0.00
ENSG00000111186	WNT5B	5.51	2.40	1.12	0.00
ENSG00000111341	MGP	126.94	30.72	2.04	0.00
ENSG00000111450	STX2	8.97	2.11	1.97	0.00
ENSG00000111554	MDM1	4.13	1.13	1.67	0.00
ENSG00000111674	ENO2	13.43	3.96	1.70	0.00
ENSG00000111696	NT5DC3	13.59	1.35	3.11	0.00
ENSG00000111716	LDHB	64.25	28.13	1.18	0.00
ENSG00000111726	CMAS	31.85	67.76	-1.08	0.00
ENSG00000111799	COL12A1	14.30	2.56	2.37	0.00
ENSG00000111802	TDP2	55.05	150.89	-1.45	0.00
ENSG00000111907	TPD52L1	3.69	0.96	1.70	0.00
ENSG00000111961	SASH1	6.40	2.46	1.29	0.00
ENSG00000111962	UST	4.60	1.19	1.76	0.00
ENSG00000112078	KCTD20	17.64	7.50	1.21	0.00
ENSG00000112186	CAP2	17.55	1.72	3.17	0.00
ENSG00000112208	BAG2	41.28	3.23	3.58	0.00
ENSG00000112210	RAB23	38.66	3.69	3.30	0.00
ENSG00000112276	BVES	8.33	0.57	3.40	0.00
ENSG00000112290	WASF1	4.66	0.87	2.13	0.00
ENSG00000112320	SOBP	5.67	0.62	2.77	0.00
ENSG00000112425	EPM2A	6.87	1.00	2.51	0.00
ENSG00000112531	QKI	5.16	1.88	1.35	0.00
ENSG00000112562	SMOC2	15.20	5.84	1.34	0.00
ENSG00000112658	SRF	45.80	13.75	1.72	0.00
ENSG00000112759	SLC29A1	28.81	5.55	2.32	0.00
ENSG00000112769	LAMA4	19.21	4.44	2.05	0.00
ENSG00000112936	C7	52.30	8.58	2.57	0.00
ENSG00000113140	SPARC	159.97	47.34	1.75	0.00
ENSG00000113196	HAND1	33.00	1.12	4.60	0.00
ENSG00000113231	PDE8B	1.52	0.30	1.69	0.00
ENSG00000113296	THBS4	22.27	0.65	4.65	0.00
ENSG00000113389	NPR3	2.38	0.21	2.50	0.00
ENSG00000113494	PRLR	0.79	2.13	-1.19	0.01

ENSG00000169282	KCNAB1	1.90	0.32	1.93	0.00
ENSG00000169429	IL8	10.92	1.80	2.45	0.00
ENSG00000169439	SDC2	22.89	7.49	1.58	0.00
ENSG00000169504	CLIC4	69.06	22.69	1.60	0.00
ENSG00000169508	GPR183	16.98	5.83	1.50	0.00
ENSG00000169515	CCDC8	2.70	1.17	1.06	0.00
ENSG00000169604	ANTXR1	15.48	4.90	1.61	0.00
ENSG00000169692	AGPAT2	63.57	170.53	-1.42	0.00
ENSG00000169715	MT1E	54.93	143.50	-1.38	0.00
ENSG00000169740	ZNF32	22.27	10.04	1.13	0.00
ENSG00000169826	CSGALNACT2	7.62	3.32	1.14	0.00
ENSG00000169851	PCDH7	6.41	1.18	2.22	0.00
ENSG00000169855	ROBO1	3.70	1.16	1.49	0.00
ENSG00000169902	TPST1	4.89	2.11	1.12	0.00
ENSG00000169903	TM4SF4	1.92	0.16	2.39	0.00
ENSG00000169946	ZFPM2	1.68	0.44	1.48	0.00
ENSG00000169992	NLGN2	8.37	2.36	1.73	0.00
ENSG00000170017	ALCAM	6.92	3.15	1.08	0.00
ENSG00000170153	RNF150	6.70	0.43	3.36	0.00
ENSG00000170271	FAXDC2	13.54	3.33	1.95	0.00
ENSG00000170275	CRTAP	76.27	25.50	1.57	0.00
ENSG00000170276	HSPB2	8.77	2.23	1.86	0.00
ENSG00000170323	FABP4	28.91	5.20	2.42	0.00
ENSG00000170390	DCLK2	3.77	0.94	1.76	0.00
ENSG00000170464	DNAJC18	2.50	0.74	1.47	0.00
ENSG00000170500	LONRF2	2.85	0.21	2.75	0.00
ENSG00000170522	ELOVL6	5.29	13.05	-1.26	0.01
ENSG00000170558	CDH2	2.06	0.36	1.92	0.00
ENSG00000170624	SGCD	4.14	0.65	2.28	0.00
ENSG00000170684	ZNF296	1.15	3.04	-1.24	0.00
ENSG00000170801	HTRA3	13.42	4.07	1.66	0.00
ENSG00000170876	TMEM43	32.70	14.75	1.14	0.00
ENSG00000170954	ZNF415	2.96	1.22	1.13	0.00
ENSG00000171016	PYGO1	1.47	0.25	1.80	0.00
ENSG00000171033	PKIA	2.50	0.87	1.30	0.00
ENSG00000171051	FPR1	3.27	0.48	2.27	0.00
ENSG00000171119	NRTN	3.02	0.62	1.91	0.00
ENSG00000171130	ATP6VOE2	9.51	3.82	1.26	0.00
ENSG00000171219	CDC42BPG	6.48	19.39	-1.54	0.01
ENSG00000171222	SCAND1	17.15	43.80	-1.34	0.00
ENSG00000171246	NPTX1	15.28	0.78	3.92	0.00
ENSG00000171303	KCNK3	3.83	0.43	2.58	0.00
ENSG00000171357	LURAP1	1.64	0.48	1.38	0.00
ENSG00000171368	TPPP	9.32	2.04	2.06	0.00
ENSG00000171385	KCND3	4.72	1.05	1.94	0.00
ENSG00000171476	HOPX	9.72	2.01	2.14	0.00

ENSG00000113578	FGF1	1.63	0.23	1.98	0.00
ENSG00000113595	TRIM23	3.34	1.42	1.11	0.00
ENSG00000113657	DPYSL3	67.71	7.89	3.06	0.00
ENSG00000113721	PDGFRB	14.16	6.47	1.10	0.00
ENSG00000113739	STC2	1.34	0.17	1.92	0.00
ENSG00000113758	DBN1	16.61	4.24	1.91	0.00
ENSG00000113916	BCL6	11.43	2.42	2.13	0.00
ENSG00000114019	AMOTL2	8.74	3.56	1.24	0.00
ENSG00000114200	BCHE	23.57	2.04	3.38	0.00
ENSG00000114353	GNAI2	36.95	16.67	1.14	0.00
ENSG00000114395	CYB561D 2	8.39	17.72	-1.06	0.00
ENSG00000114439	BBX	6.86	2.47	1.39	0.00
ENSG00000114450	GNB4	5.45	1.64	1.59	0.00
ENSG00000114790	ARHGEF2 6	10.94	1.17	2.98	0.00
ENSG00000114853	ZBTB47	13.09	2.75	2.15	0.00
ENSG00000114923	SLC4A3	1.50	0.29	1.70	0.00
ENSG00000115041	KCNIP3	1.38	0.22	1.80	0.00
ENSG00000115159	GPD2	7.35	18.44	-1.30	0.00
ENSG00000115226	FNDC4	2.46	0.91	1.22	0.00
ENSG00000115252	PDE1A	2.33	0.77	1.33	0.00
ENSG00000115295	CLIP4	5.24	0.94	2.20	0.00
ENSG00000115355	CCDC88A	2.49	0.94	1.20	0.00
ENSG00000115414	FN1	110.74	11.70	3.22	0.00
ENSG00000115461	IGFBP5	149.77	29.86	2.32	0.00
ENSG00000115504	EHBP1	10.98	2.57	1.99	0.00
ENSG00000115526	CHST10	2.00	0.55	1.49	0.00
ENSG00000115556	PLCD4	2.82	0.35	2.34	0.00
ENSG00000115590	IL1R2	3.54	8.99	-1.28	0.01
ENSG00000115593	SMYD1	7.92	0.06	4.70	0.00
ENSG00000115825	PRKD3	5.82	2.76	1.01	0.00
ENSG00000115828	QPCT	8.96	2.81	1.59	0.00
ENSG00000115896	PLCL1	2.21	0.46	1.80	0.00
ENSG00000116106	EPHA4	3.65	1.48	1.17	0.00
ENSG00000116117	PARD3B	5.84	2.37	1.22	0.00
ENSG00000116141	MARK1	2.08	0.56	1.52	0.00
ENSG00000116157	GPX7	5.50	1.88	1.43	0.00
ENSG00000116194	ANGPTL1	21.70	3.23	2.66	0.00
ENSG00000116273	PHF13	8.97	4.04	1.10	0.00
ENSG00000116711	PLA2G4A	7.43	2.49	1.49	0.00
ENSG00000116741	RGS2	103.47	15.23	2.74	0.00
ENSG00000116774	OLFML3	37.46	10.80	1.77	0.00
ENSG00000116871	MAP7D1	32.17	13.61	1.23	0.00
ENSG00000116885	OSCP1	1.90	0.67	1.22	0.00
ENSG00000116962	NID1	33.92	7.03	2.23	0.00
ENSG00000116984	MTR	4.61	2.02	1.10	0.00
ENSG00000117013	KCNQ4	4.90	1.08	1.95	0.00

ENSG00000171533	MAP6	3.54	0.43	2.48	0.00
ENSG00000171703	TCEA2	3.94	1.48	1.27	0.00
ENSG00000171724	VAT1L	3.62	1.68	1.01	0.01
ENSG00000171793	CTPS1	6.89	1.86	1.76	0.00
ENSG00000171812	COL8A2	4.09	1.53	1.29	0.00
ENSG00000171813	PWWP2B	11.17	24.88	-1.14	0.00
ENSG00000171819	ANGPTL7	4.25	0.78	2.13	0.00
ENSG00000171867	PRNP	109.16	20.18	2.42	0.00
ENSG00000172005	MAL	8.42	2.90	1.46	0.01
ENSG00000172037	LAMB2	34.84	9.19	1.89	0.00
ENSG00000172059	KLF11	10.58	3.45	1.55	0.00
ENSG00000172115	CYCS	31.77	73.39	-1.20	0.00
ENSG00000172156	CCL11	12.60	4.21	1.53	0.00
ENSG00000172216	CEBPB	37.71	17.14	1.13	0.00
ENSG00000172260	NEGR1	12.30	2.22	2.35	0.00
ENSG00000172301	COPRS	25.42	10.07	1.31	0.00
ENSG00000172346	CSDC2	2.28	0.66	1.48	0.00
ENSG00000172366	FAM195A	13.23	34.32	-1.36	0.00
ENSG00000172379	ARNT2	3.05	0.79	1.66	0.00
ENSG00000172403	SYNPO2	178.22	7.39	4.55	0.00
ENSG00000172410	INSL5	2.94	21.40	-2.76	0.00
ENSG00000172465	TCEAL1	16.14	6.19	1.35	0.00
ENSG00000172548	NIPAL4	1.44	0.12	2.19	0.00
ENSG00000172638	EFEMP2	14.04	3.86	1.80	0.00
ENSG00000172731	LRRC20	5.86	1.83	1.55	0.00
ENSG00000172803	SNX32	1.11	3.42	-1.43	0.00
ENSG00000172915	NBEA	3.45	0.47	2.37	0.00
ENSG00000172935	MRGPRF	59.44	6.65	3.11	0.00
ENSG00000173068	BNC2	3.79	0.49	2.45	0.00
ENSG00000173083	HPSE	1.84	4.51	-1.19	0.00
ENSG00000173137	ADCK5	4.10	10.13	-1.26	0.00
ENSG00000173153	ESRRA	23.90	58.38	-1.28	0.00
ENSG00000173175	ADCY5	9.95	2.49	1.90	0.00
ENSG00000173210	ABLIM3	3.46	1.27	1.28	0.00
ENSG00000173432	SAA1	8.71	1.79	2.14	0.00
ENSG00000173482	PTPRM	7.18	2.47	1.45	0.00
ENSG00000173511	VEGFB	45.41	17.90	1.33	0.00
ENSG00000173546	CSPG4	20.74	2.36	3.01	0.00
ENSG00000173621	LRFN4	5.47	12.16	-1.12	0.00
ENSG00000173641	HSPB7	28.90	1.76	3.86	0.00
ENSG00000173706	HEG1	10.03	3.48	1.46	0.00
ENSG00000173757	STAT5B	18.86	8.95	1.05	0.00
ENSG00000173890	GPR160	7.05	18.01	-1.32	0.01
ENSG00000173917	HOXB2	5.29	1.82	1.42	0.00
ENSG00000173926	MARCH3	3.18	6.64	-1.01	0.01
ENSG00000173947	PIFO	1.85	0.13	2.47	0.00

ENSG00000117020	AKT3	8.87	1.57	2.32	0.00
ENSG00000117114	LPHN2	5.20	2.09	1.22	0.00
ENSG00000117152	RGS4	2.65	0.22	2.62	0.00
ENSG00000117155	SSX2IP	3.74	1.43	1.24	0.00
ENSG00000117226	GBP3	15.63	44.00	-1.48	0.01
ENSG00000117280	RAB7L1	8.62	3.41	1.28	0.00
ENSG00000117407	ARTN	0.56	1.65	-1.22	0.00
ENSG00000117528	ABCD3	9.09	19.07	-1.05	0.00
ENSG00000117569	PTBP2	9.35	2.46	1.82	0.00
ENSG00000117616	C1orf63	9.19	19.33	-1.05	0.00
ENSG00000117620	SLC35A3	12.51	31.38	-1.31	0.00
ENSG00000117643	MAN1C1	2.75	1.11	1.14	0.00
ENSG00000118160	SLC8A2	2.92	0.13	3.08	0.00
ENSG00000118200	CAMSAP2	5.20	2.25	1.13	0.00
ENSG00000118257	NRP2	15.81	1.09	3.58	0.00
ENSG00000118263	KLF7	4.81	1.13	1.87	0.00
ENSG00000118298	CA14	2.46	0.24	2.46	0.00
ENSG00000118407	FILIP1	8.31	0.53	3.45	0.00
ENSG00000118432	CNR1	2.30	0.62	1.55	0.00
ENSG00000118496	FBXO30	12.98	3.68	1.75	0.00
ENSG00000118523	CTGF	137.23	43.52	1.65	0.00
ENSG00000118707	TGIF2	5.74	2.26	1.26	0.00
ENSG00000118729	CASQ2	40.55	1.74	4.36	0.00
ENSG00000118762	PKD2	12.02	2.90	1.96	0.00
ENSG00000118785	SPP1	11.42	1.68	2.59	0.00
ENSG00000118965	WDR35	2.44	0.78	1.38	0.00
ENSG00000119138	KLF9	36.87	12.89	1.50	0.00
ENSG00000119147	C2orf40	8.28	2.05	1.89	0.00
ENSG00000119227	PIGZ	21.74	48.06	-1.14	0.01
ENSG00000119280	C1orf198	14.04	4.81	1.50	0.00
ENSG00000119403	PHF19	6.09	2.55	1.18	0.00
ENSG00000119431	HDHD3	35.20	77.73	-1.14	0.00
ENSG00000119508	NR4A3	10.76	0.65	3.61	0.00
ENSG00000119669	IRF2BPL	20.05	8.35	1.24	0.00
ENSG00000119681	LTPB2	3.80	1.67	1.07	0.00
ENSG00000119699	TGFB3	3.94	1.40	1.35	0.00
ENSG00000119729	RHOQ	15.33	3.99	1.88	0.00
ENSG00000119771	KLHL29	1.85	0.51	1.47	0.00
ENSG00000119865	CNRIP1	5.56	2.63	1.01	0.01
ENSG00000119938	PPP1R3C	14.76	1.51	3.09	0.00
ENSG00000120057	SFRP5	5.50	0.86	2.37	0.00
ENSG00000120129	DUSP1	352.96	151.46	1.22	0.01
ENSG00000120162	MOB3B	8.28	17.89	-1.09	0.00
ENSG00000120324	PCDHB10	1.62	0.33	1.68	0.00
ENSG00000120327	PCDHB14	2.68	0.84	1.42	0.00
ENSG00000120658	ENOX1	3.47	0.33	2.68	0.00

ENSG00000174059	CD34	18.63	7.77	1.24	0.00
ENSG00000174080	CTSF	21.80	6.95	1.61	0.00
ENSG00000174099	MSRB3	60.54	5.12	3.50	0.00
ENSG00000174282	ZBTB4	31.66	9.07	1.78	0.00
ENSG00000174306	ZHX3	4.93	2.17	1.10	0.00
ENSG00000174307	PHLDA3	39.32	7.34	2.38	0.00
ENSG00000174348	PODN	15.43	4.70	1.66	0.00
ENSG00000174514	MFS4	2.70	11.80	-2.03	0.00
ENSG00000174516	PELI3	3.86	1.11	1.59	0.00
ENSG00000174705	SH3PXD2B	6.70	2.40	1.39	0.00
ENSG00000174804	FZD4	8.67	2.97	1.47	0.00
ENSG00000174808	BTC	13.91	3.21	2.03	0.00
ENSG00000175084	DES	2924.23	114.29	4.67	0.00
ENSG00000175115	PACS1	8.95	3.74	1.21	0.00
ENSG00000175287	PHYHD1	3.11	0.92	1.53	0.00
ENSG00000175348	TMEM9B	18.07	41.06	-1.17	0.00
ENSG00000175395	ZNF25	7.20	1.88	1.81	0.00
ENSG00000175445	LPL	5.11	0.80	2.35	0.00
ENSG00000175591	P2RY2	2.40	6.57	-1.37	0.01
ENSG00000175592	FOSL1	3.24	0.44	2.34	0.00
ENSG00000175764	TTL11	3.57	1.16	1.44	0.00
ENSG00000175785	PRIMA1	17.10	3.09	2.38	0.00
ENSG00000175906	ARL4D	18.20	2.49	2.75	0.00
ENSG00000176014	TUBB6	42.11	7.13	2.52	0.00
ENSG00000176058	TPRN	13.55	36.27	-1.40	0.00
ENSG00000176171	BNIP3	3.18	1.10	1.35	0.00
ENSG00000176222	ZNF404	1.78	0.67	1.14	0.00
ENSG00000176273	SLC35G1	3.06	8.07	-1.33	0.00
ENSG00000176472	ZNF575	2.99	8.77	-1.48	0.00
ENSG00000176485	PLA2G16	11.66	3.36	1.72	0.00
ENSG00000176532	PRR15	55.46	170.43	-1.62	0.01
ENSG00000176720	BOK	24.46	6.52	1.87	0.00
ENSG00000176845	METRNL	18.61	38.02	-1.02	0.00
ENSG00000176903	PNMA1	44.45	13.54	1.70	0.00
ENSG00000176907	C8orf4	86.34	35.97	1.26	0.00
ENSG00000176919	C8G	2.15	9.20	-1.97	0.00
ENSG00000176956	LY6H	2.48	0.23	2.52	0.00
ENSG00000176971	FIBIN	9.94	1.24	2.78	0.00
ENSG00000177106	EPS8L2	18.49	43.75	-1.23	0.01
ENSG00000177119	ANO6	16.84	3.34	2.25	0.00
ENSG00000177181	RIMKLA	4.07	8.46	-1.01	0.00
ENSG00000177191	B3GNT8	18.10	43.84	-1.26	0.01
ENSG00000177380	PPFIA3	2.41	5.42	-1.09	0.00
ENSG00000177432	NAP1L5	5.33	1.15	1.99	0.00
ENSG00000177469	PTRF	198.00	31.48	2.64	0.00
ENSG00000177519	RPRM	3.74	0.22	3.07	0.00

ENSG00000120693	SMAD9	6.03	1.93	1.53	0.00
ENSG00000120709	FAM53C	8.62	3.77	1.14	0.00
ENSG00000120729	MYOT	2.14	0.78	1.21	0.00
ENSG00000120738	EGR1	318.28	68.13	2.22	0.00
ENSG00000120820	GLT8D2	5.16	2.12	1.19	0.00
ENSG00000120837	NFYB	7.16	3.29	1.06	0.00
ENSG00000120885	CLU	97.22	25.26	1.93	0.00
ENSG00000121005	CRISPLD1	1.31	0.24	1.68	0.00
ENSG00000121067	SPOP	18.13	7.08	1.33	0.00
ENSG00000121104	FAM117A	9.08	3.75	1.22	0.00
ENSG00000121236	TRIM6	1.40	0.38	1.39	0.00
ENSG00000121297	TSHZ3	7.26	1.36	2.22	0.00
ENSG00000121361	KCNJ8	7.50	0.85	2.82	0.00
ENSG00000121413	ZSCAN18	7.98	3.59	1.10	0.00
ENSG00000121440	PDZRN3	18.44	3.50	2.32	0.00
ENSG00000121577	POPDC2	34.40	2.02	3.93	0.00
ENSG00000121653	MAPK8IP1	2.72	1.05	1.20	0.00
ENSG00000121871	SLITRK3	2.34	0.31	2.22	0.00
ENSG00000121898	CPXM2	31.92	2.56	3.52	0.00
ENSG00000121900	TMEM54	159.83	383.76	-1.26	0.01
ENSG00000121905	HPCA	1.03	6.01	-2.29	0.00
ENSG00000122367	LDB3	12.40	0.89	3.47	0.00
ENSG00000122591	FAM126A	2.76	1.21	1.05	0.00
ENSG00000122643	NT5C3A	5.99	15.90	-1.37	0.00
ENSG00000122707	RECK	3.95	1.62	1.17	0.00
ENSG00000122786	CALD1	207.74	14.44	3.82	0.00
ENSG00000122824	NUDT10	1.36	0.35	1.42	0.00
ENSG00000122863	CHST3	5.41	0.79	2.44	0.00
ENSG00000122877	EGR2	5.73	1.35	1.90	0.00
ENSG00000122970	IFT81	1.70	0.64	1.13	0.00
ENSG00000122971	ACADS	43.55	102.48	-1.23	0.00
ENSG00000123094	RASSF8	6.69	0.87	2.63	0.00
ENSG00000123096	SSPN	7.40	2.33	1.57	0.00
ENSG00000123143	PKN1	20.60	9.23	1.14	0.00
ENSG00000123159	GIPC1	37.65	90.36	-1.26	0.00
ENSG00000123243	ITIH5	15.54	2.94	2.31	0.00
ENSG00000123358	NR4A1	87.38	12.93	2.73	0.00
ENSG00000123560	PLP1	12.39	2.72	2.09	0.00
ENSG00000123570	RAB9B	4.11	0.63	2.31	0.00
ENSG00000123600	METTL8	2.23	0.97	1.02	0.00
ENSG00000123610	TNFAIP6	1.86	0.49	1.51	0.00
ENSG00000123643	SLC36A1	7.32	18.57	-1.31	0.00
ENSG00000123689	G0S2	20.35	7.46	1.42	0.00
ENSG00000124006	OBSL1	5.22	1.74	1.46	0.00
ENSG00000124067	SLC12A4	7.61	2.29	1.63	0.00
ENSG00000124171	PARD6B	1.34	3.77	-1.34	0.00

ENSG00000177685	EFCAB4A	7.11	19.91	-1.45	0.00
ENSG00000177732	SOX12	4.63	1.93	1.16	0.00
ENSG00000177932	ZNF354C	1.92	0.69	1.22	0.00
ENSG00000177943	MAMDC4	3.28	8.12	-1.25	0.00
ENSG00000177989	ODF3B	3.84	8.46	-1.09	0.00
ENSG00000178053	MLF1	2.70	1.01	1.23	0.00
ENSG00000178184	PARD6G	3.00	0.93	1.47	0.00
ENSG00000178295	GEN1	1.41	3.18	-1.04	0.00
ENSG00000178301	AQP11	1.26	3.50	-1.31	0.00
ENSG00000178404	DDC8	7.89	2.94	1.35	0.00
ENSG00000178498	DTX3	12.12	3.13	1.87	0.00
ENSG00000178531	CTXN1	17.35	1.48	3.35	0.00
ENSG00000178726	THBD	9.78	4.63	1.04	0.00
ENSG00000178741	COX5A	69.18	154.00	-1.15	0.00
ENSG00000178814	OPLAH	5.00	12.43	-1.27	0.00
ENSG00000178878	APOLD1	13.93	3.41	1.95	0.00
ENSG00000178882	FAM101A	9.37	22.81	-1.26	0.01
ENSG00000178950	GAK	7.83	16.14	-1.02	0.00
ENSG00000179094	PER1	20.33	6.20	1.67	0.00
ENSG00000179104	TMTC2	6.41	1.76	1.72	0.00
ENSG00000179284	DAND5	1.37	0.08	2.32	0.00
ENSG00000179388	EGR3	8.43	1.25	2.53	0.00
ENSG00000179403	VWA1	25.54	11.51	1.13	0.00
ENSG00000179598	PLD6	3.63	1.02	1.61	0.00
ENSG00000179715	PCED1B	5.20	2.33	1.08	0.01
ENSG00000179761	PIPOX	1.95	0.26	2.12	0.00
ENSG00000179820	MYADM	102.33	22.40	2.18	0.00
ENSG00000179862	CITED4	17.14	1.86	3.04	0.00
ENSG00000179909	ZNF154	2.12	0.48	1.70	0.00
ENSG00000179915	NRXN1	1.54	0.37	1.52	0.00
ENSG00000179954	SSC5D	9.23	1.75	2.24	0.00
ENSG00000180044	C3orf80	4.82	0.56	2.64	0.00
ENSG00000180061	TMEM150 B	4.14	12.35	-1.52	0.01
ENSG00000180155	LYNX1	5.73	1.12	2.13	0.00
ENSG00000180233	ZNRF2	6.47	15.65	-1.24	0.00
ENSG00000180354	MTURN	15.17	3.03	2.23	0.00
ENSG00000180447	GAS1	15.97	1.99	2.86	0.00
ENSG00000180543	TSPYL5	6.35	1.27	2.12	0.00
ENSG00000180573	HIST1H2A C	22.44	48.92	-1.12	0.00
ENSG00000180694	TMEM64	5.59	1.91	1.43	0.00
ENSG00000180891	CUEDC1	10.55	5.04	1.03	0.00
ENSG00000180902	D2HGDH	5.83	13.55	-1.18	0.00
ENSG00000180957	PITPNB	2.33	1.00	1.04	0.00
ENSG00000181029	TRAPPC5	28.19	60.15	-1.09	0.00
ENSG00000181061	HIGD1A	75.02	166.98	-1.15	0.01
ENSG00000181072	CHRM2	10.33	0.27	4.36	0.00

ENSG00000124177	CHD6	3.83	1.71	1.06	0.00
ENSG00000124212	PTGIS	13.93	1.44	3.07	0.00
ENSG00000124216	SNAI1	2.36	0.82	1.28	0.00
ENSG00000124406	ATP8A1	5.95	12.17	-1.00	0.01
ENSG00000124440	HIF3A	2.90	0.72	1.70	0.00
ENSG00000124491	F13A1	13.99	6.50	1.08	0.01
ENSG00000124749	COL21A1	1.79	0.24	2.05	0.00
ENSG00000124785	NRN1	9.12	3.11	1.48	0.00
ENSG00000124942	AHNAK	166.67	71.73	1.21	0.01
ENSG00000125144	MT1G	96.73	375.31	-1.95	0.01
ENSG00000125148	MT2A	62.24	157.85	-1.34	0.00
ENSG00000125354	Sep 06	21.00	5.08	1.99	0.00
ENSG00000125458	NT5C	21.42	43.85	-1.02	0.00
ENSG00000125534	PPDPF	165.39	365.28	-1.14	0.00
ENSG00000125652	ALKBH7	31.36	65.80	-1.06	0.00
ENSG00000125730	C3	49.20	18.26	1.42	0.00
ENSG00000125740	FOSB	95.24	12.55	2.90	0.00
ENSG00000125744	RTN2	3.61	1.52	1.13	0.00
ENSG00000125827	TMX4	16.80	5.53	1.56	0.00
ENSG00000125841	NRSN2	10.73	4.94	1.08	0.00
ENSG00000125868	DSTN	578.65	163.50	1.82	0.00
ENSG00000125869	LAMP5	1.70	0.51	1.36	0.00
ENSG00000125968	ID1	104.53	248.78	-1.25	0.00
ENSG00000126091	ST3GAL3	3.50	1.08	1.49	0.00
ENSG00000126458	RRAS	94.75	43.20	1.13	0.00
ENSG00000126500	FLRT1	2.14	0.31	2.10	0.00
ENSG00000126603	GLIS2	6.03	1.94	1.52	0.00
ENSG00000126785	RHOJ	6.35	2.48	1.27	0.00
ENSG00000126803	HSPA2	60.42	11.69	2.35	0.00
ENSG00000126934	MAP2K2	10.57	23.06	-1.11	0.00
ENSG00000126947	ARMCX1	15.43	3.67	2.00	0.00
ENSG00000126950	TMEM35	20.85	1.56	3.54	0.00
ENSG00000126970	ZC4H2	3.57	1.59	1.06	0.00
ENSG00000127241	MASP1	7.98	0.50	3.46	0.00
ENSG00000127334	DYRK2	11.96	25.89	-1.10	0.00
ENSG00000127472	PLA2G5	6.71	0.53	3.15	0.00
ENSG00000127603	MACF1	10.64	3.78	1.43	0.00
ENSG00000127804	METTL16	5.54	2.61	1.02	0.00
ENSG00000127946	HIP1	3.63	1.57	1.09	0.00
ENSG00000127954	STEAP4	3.65	1.28	1.35	0.00
ENSG00000127955	GNAI1	12.99	5.40	1.23	0.00
ENSG00000127990	SGCE	18.07	3.98	2.12	0.00
ENSG00000128016	ZFP36	401.50	159.74	1.33	0.00
ENSG00000128228	SDF2L1	11.87	28.26	-1.23	0.00
ENSG00000128242	GAL3ST1	1.41	4.10	-1.39	0.00
ENSG00000128266	GNAZ	6.92	0.85	2.70	0.00

ENSG00000181092	ADIPOQ	4.42	0.66	2.35	0.00
ENSG00000181191	PJA1	8.87	3.05	1.47	0.00
ENSG00000181195	PENK	6.00	0.06	4.33	0.00
ENSG00000181284	TMEM102	4.69	11.41	-1.24	0.00
ENSG00000181449	SOX2	1.84	0.28	1.98	0.00
ENSG00000181495	AC026703.1	4.71	0.42	2.90	0.00
ENSG00000181541	MAB21L2	83.71	5.61	3.84	0.00
ENSG00000181649	PHLDA2	8.41	23.06	-1.43	0.01
ENSG00000181751	C5orf30	9.99	30.05	-1.57	0.00
ENSG00000181754	AMIGO1	4.36	1.32	1.55	0.00
ENSG00000181804	SLC9A9	4.63	1.91	1.18	0.00
ENSG00000181856	SLC2A4	19.58	1.56	3.45	0.00
ENSG00000182013	PNMAL1	2.79	0.61	1.81	0.00
ENSG00000182022	CHST15	12.77	2.99	2.01	0.00
ENSG00000182175	RGMA	19.44	4.19	2.15	0.00
ENSG00000182195	LDLC1	7.90	2.80	1.42	0.00
ENSG00000182247	UBE2E2	5.64	1.58	1.68	0.00
ENSG00000182253	SYNM	293.66	8.95	5.00	0.00
ENSG00000182287	AP1S2	7.85	2.84	1.39	0.00
ENSG00000182326	C1S	65.96	28.54	1.20	0.00
ENSG00000182463	TSHZ2	1.32	0.27	1.59	0.00
ENSG00000182492	BGN	43.13	11.40	1.90	0.00
ENSG00000182534	MXRA7	21.62	2.94	2.78	0.00
ENSG00000182568	SATB1	8.92	2.99	1.50	0.00
ENSG00000182575	NXPH3	5.58	0.71	2.60	0.00
ENSG00000182600	C2orf82	3.90	8.69	-1.11	0.00
ENSG00000182621	PLCB1	3.09	0.48	2.20	0.00
ENSG00000182667	NTM	2.57	0.47	1.96	0.00
ENSG00000182687	GALR2	2.64	0.11	3.02	0.00
ENSG00000182742	HOXB4	2.87	1.14	1.17	0.00
ENSG00000182749	PAQR7	3.81	1.67	1.08	0.00
ENSG00000182851	GPIHBP1	1.96	0.56	1.44	0.00
ENSG00000182909	LENG9	3.67	8.22	-1.11	0.00
ENSG00000182916	TCEAL7	9.86	2.73	1.76	0.00
ENSG00000182963	GJC1	7.96	0.44	3.57	0.00
ENSG00000182985	CADM1	3.77	1.25	1.42	0.00
ENSG00000183023	SLC8A1	14.36	1.36	3.18	0.00
ENSG00000183036	PCP4	39.40	1.33	4.65	0.00
ENSG00000183048	SLC25A10	18.02	38.08	-1.07	0.00
ENSG00000183098	GPC6	2.97	1.12	1.23	0.00
ENSG00000183111	ARHGEF37	12.62	5.73	1.11	0.00
ENSG00000183287	COBE1	9.02	0.50	3.62	0.00
ENSG00000183386	FHL3	12.47	2.49	2.21	0.00
ENSG00000183463	URAD	2.88	22.24	-2.85	0.00
ENSG00000183579	ZNRF3	3.40	1.45	1.10	0.00
ENSG00000183580	FBXL7	6.99	1.84	1.79	0.00

ENSG00000128274	A4GALT	9.25	3.54	1.33	0.00
ENSG00000128309	MPST	16.20	39.49	-1.27	0.00
ENSG00000128311	TST	102.99	268.32	-1.38	0.01
ENSG00000128536	CDHR3	1.73	0.55	1.31	0.00
ENSG00000128573	FOXP2	4.22	0.60	2.39	0.00
ENSG00000128581	RABL5	4.05	1.35	1.43	0.00
ENSG00000128591	FLNC	117.03	5.29	4.40	0.00
ENSG00000128595	CALU	51.78	13.75	1.89	0.00
ENSG00000128596	CCDC136	3.66	0.31	2.80	0.00
ENSG00000128602	SMO	4.78	1.79	1.30	0.00
ENSG00000128656	CHN1	2.56	0.81	1.41	0.00
ENSG00000128739	SNRPN	19.31	7.56	1.32	0.00
ENSG00000128791	TWGS1	13.28	6.08	1.10	0.01
ENSG00000128872	TMOD2	4.21	1.22	1.60	0.00
ENSG00000128881	TTBK2	2.50	1.11	1.01	0.00
ENSG00000129009	ISLR	34.03	10.38	1.69	0.00
ENSG00000129038	LOXL1	5.44	2.05	1.31	0.00
ENSG00000129116	PALLD	99.28	10.71	3.18	0.00
ENSG00000129167	TPH1	0.40	1.79	-1.64	0.00
ENSG00000129194	SOX15	2.59	0.57	1.80	0.00
ENSG00000129244	ATP1B2	2.62	0.83	1.41	0.00
ENSG00000129270	MMP28	12.25	25.03	-1.02	0.00
ENSG00000129473	BCL2L2	38.92	19.14	1.01	0.00
ENSG00000129596	CDO1	2.02	0.48	1.63	0.00
ENSG00000129675	ARHGEF6	6.54	3.14	1.00	0.00
ENSG00000129680	MAP7D3	2.10	0.83	1.12	0.00
ENSG00000129682	FGF13	3.08	1.00	1.42	0.00
ENSG00000129757	CDKN1C	8.24	2.69	1.53	0.00
ENSG00000129946	SHC2	3.94	1.65	1.14	0.00
ENSG00000130037	KCNA5	3.11	0.35	2.49	0.00
ENSG00000130176	CNN1	712.29	26.92	4.71	0.00
ENSG00000130224	LRCH2	3.40	0.48	2.32	0.00
ENSG00000130226	DPP6	2.45	0.12	2.85	0.00
ENSG00000130294	KIF1A	1.56	0.40	1.48	0.00
ENSG00000130489	SCO2	18.00	45.55	-1.33	0.00
ENSG00000130508	PXDN	10.11	3.39	1.51	0.00
ENSG00000130529	TRPM4	18.16	46.03	-1.33	0.00
ENSG00000130545	CRB3	13.76	43.56	-1.64	0.00
ENSG00000130559	CAMSAP1	4.29	2.00	1.01	0.00
ENSG00000130635	COL5A1	16.99	5.28	1.64	0.00
ENSG00000130702	LAMA5	12.85	3.98	1.63	0.00
ENSG00000130734	ATG4D	15.19	32.20	-1.07	0.00
ENSG00000130748	TMEM160	7.39	21.86	-1.53	0.00
ENSG00000130779	CLIP1	10.30	3.87	1.36	0.00
ENSG00000130818	ZNF426	2.95	1.05	1.31	0.00
ENSG00000130822	PNCK	10.55	0.69	3.53	0.00

ENSG00000183621	ZNF438	4.23	1.95	1.03	0.00
ENSG00000183722	LHFP	23.15	6.85	1.72	0.00
ENSG00000183741	CBX6	17.67	5.47	1.65	0.00
ENSG00000183773	AIFM3	5.83	18.06	-1.59	0.00
ENSG00000183853	KIRREL	8.12	2.22	1.76	0.00
ENSG00000183963	SMTN	110.24	9.43	3.51	0.00
ENSG00000184014	DENND5A	10.26	2.21	2.10	0.00
ENSG00000184163	FAM132A	2.81	12.41	-2.05	0.00
ENSG00000184205	TSPYL2	12.87	3.65	1.75	0.00
ENSG00000184254	ALDH1A3	4.99	1.82	1.34	0.00
ENSG00000184260	HIST2H2A C	0.75	1.75	-1.01	0.00
ENSG00000184271	POU6F1	2.74	1.14	1.10	0.00
ENSG00000184304	PRKD1	2.76	0.56	1.90	0.00
ENSG00000184307	ZDHHC23	2.65	6.55	-1.23	0.01
ENSG00000184343	SRPK3	4.23	0.64	2.34	0.00
ENSG00000184347	SLIT3	7.45	2.63	1.42	0.00
ENSG00000184363	PKP3	19.08	55.03	-1.52	0.01
ENSG00000184489	PTP4A3	17.04	5.46	1.60	0.00
ENSG00000184524	CEND1	1.96	0.56	1.46	0.01
ENSG00000184557	SOCS3	88.18	14.93	2.54	0.00
ENSG00000184602	SNN	12.57	4.37	1.47	0.00
ENSG00000184702	Sep 05	3.78	1.35	1.33	0.00
ENSG00000184709	LRRC26	2.21	17.31	-2.84	0.00
ENSG00000184785	SMIM10	8.59	2.08	1.92	0.00
ENSG00000184809	C21orf88	0.75	5.67	-2.56	0.00
ENSG00000184867	ARMCX2	9.29	2.44	1.83	0.00
ENSG00000184898	RBM43	3.49	1.41	1.17	0.00
ENSG00000184903	IMMP2L	2.21	0.88	1.12	0.00
ENSG00000184905	TCEAL2	14.31	0.89	3.67	0.00
ENSG00000185000	DGAT1	31.48	69.51	-1.14	0.00
ENSG00000185010	F8	1.71	0.51	1.36	0.00
ENSG00000185052	SLC24A3	9.84	1.98	2.18	0.00
ENSG00000185133	INPP5J	3.48	8.68	-1.26	0.00
ENSG00000185274	WBSCR17	3.67	0.36	2.69	0.00
ENSG00000185345	PARK2	1.88	0.54	1.43	0.00
ENSG00000185347	C14orf80	1.10	3.02	-1.27	0.00
ENSG00000185361	TNFAIP8L 1	10.80	2.59	1.96	0.00
ENSG00000185437	SH3BGR	13.26	1.66	2.83	0.00
ENSG00000185483	ROR1	2.94	0.58	1.95	0.00
ENSG00000185499	MUC1	36.11	90.76	-1.32	0.00
ENSG00000185507	IRF7	6.98	15.00	-1.08	0.00
ENSG00000185522	C11orf35	1.24	3.92	-1.48	0.00
ENSG00000185532	PRKG1	7.02	1.59	1.98	0.00
ENSG00000185561	TLCD2	5.04	14.06	-1.44	0.00
ENSG00000185565	LSAMP	6.20	0.59	2.95	0.00
ENSG00000185567	AHNAK2	15.03	0.99	3.63	0.00

ENSG00000130844	ZNF331	4.72	1.05	1.94	0.00
ENSG00000130956	HABP4	6.25	1.87	1.62	0.00
ENSG00000130988	RGN	2.16	0.39	1.91	0.00
ENSG00000131016	AKAP12	32.88	3.72	3.06	0.00
ENSG00000131018	SYNE1	2.78	0.71	1.66	0.00
ENSG00000131096	PYY	10.82	47.54	-2.11	0.00
ENSG00000131171	SH3BGRL	96.04	36.77	1.38	0.00
ENSG00000131187	F12	0.98	2.81	-1.32	0.00
ENSG00000131238	PPT1	30.77	14.58	1.06	0.00
ENSG00000131435	PDLIM4	13.53	2.74	2.20	0.00
ENSG00000131459	GFPT2	2.89	0.80	1.48	0.00
ENSG00000131471	AOC3	91.60	10.77	3.06	0.00
ENSG00000131591	C1orf159	1.65	3.70	-1.06	0.00
ENSG00000131620	ANO1	4.27	1.60	1.29	0.00
ENSG00000131711	MAP1B	8.29	1.87	2.01	0.00
ENSG00000131791	PRKAB2	14.19	6.50	1.10	0.00
ENSG00000131831	RAI2	12.99	3.64	1.77	0.00
ENSG00000131845	ZNF304	3.31	1.30	1.20	0.00
ENSG00000131979	GCH1	5.03	11.82	-1.19	0.00
ENSG00000132329	RAMP1	64.45	4.11	3.89	0.00
ENSG00000132535	DLG4	3.34	1.39	1.13	0.00
ENSG00000132563	REEP2	6.39	1.28	2.12	0.00
ENSG00000132613	MTSS1L	23.53	3.91	2.52	0.00
ENSG00000132639	SNAP25	3.19	0.60	2.02	0.00
ENSG00000132718	SYT11	11.64	3.02	1.86	0.00
ENSG00000132819	RBM38	40.29	19.44	1.04	0.00
ENSG00000132840	BHMT2	3.62	0.58	2.22	0.00
ENSG00000132872	SYT4	1.51	0.24	1.85	0.00
ENSG00000132970	WASF3	3.34	0.87	1.68	0.00
ENSG00000133019	CHRM3	3.06	0.52	2.11	0.00
ENSG00000133026	MYH10	4.95	1.05	2.00	0.00
ENSG00000133059	DSTYK	3.78	1.54	1.17	0.00
ENSG00000133065	SLC41A1	5.27	1.60	1.58	0.00
ENSG00000133104	SPG20	9.09	2.06	2.01	0.00
ENSG00000133107	TRPC4	1.20	0.12	1.97	0.00
ENSG00000133116	KL	1.58	0.38	1.54	0.00
ENSG00000133121	STARD13	8.16	3.15	1.30	0.00
ENSG00000133142	TCEAL4	31.62	10.11	1.62	0.00
ENSG00000133328	HRASLS2	4.39	22.78	-2.31	0.00
ENSG00000133392	MYH11	947.78	37.20	4.66	0.00
ENSG00000133619	KRBA1	1.86	0.70	1.16	0.00
ENSG00000133687	TMTC1	3.70	0.96	1.70	0.00
ENSG00000133731	IMPA1	7.94	19.50	-1.27	0.00
ENSG00000133742	CA1	81.94	448.02	-2.45	0.00
ENSG00000133800	LYVE1	15.51	4.82	1.64	0.00
ENSG00000133874	RNF122	6.81	2.62	1.30	0.00

ENSG00000185585	OLFML2A	17.52	3.13	2.39	0.00
ENSG00000185630	PBX1	9.78	2.86	1.69	0.00
ENSG00000185650	ZFP36L1	92.95	28.78	1.68	0.00
ENSG00000185681	MORN5	6.85	0.20	3.97	0.00
ENSG00000185774	KCNIP4	3.54	0.62	2.12	0.00
ENSG00000185909	KLHDC8B	27.37	5.21	2.34	0.00
ENSG00000185963	BICD2	9.77	3.66	1.36	0.00
ENSG00000185989	RASA3	8.94	3.92	1.14	0.00
ENSG00000186111	PIP5K1C	18.02	7.85	1.17	0.00
ENSG00000186188	FFAR4	3.98	13.30	-1.68	0.00
ENSG00000186310	NAP1L3	4.06	1.25	1.52	0.00
ENSG00000186318	BACE1	3.83	1.55	1.18	0.00
ENSG00000186340	THBS2	13.28	1.75	2.75	0.00
ENSG00000186417	GLDN	0.76	3.09	-1.72	0.00
ENSG00000186469	GNG2	9.56	4.26	1.12	0.00
ENSG00000186564	FOXO2	2.36	7.48	-1.57	0.00
ENSG00000186591	UBE2H	26.77	12.11	1.13	0.00
ENSG00000186642	PDE2A	4.87	1.30	1.72	0.00
ENSG00000186868	MAPT	1.64	0.24	1.94	0.00
ENSG00000186891	TNFRSF18	1.15	3.31	-1.35	0.00
ENSG00000187017	ESPN	6.38	20.20	-1.62	0.00
ENSG00000187068	C3orf70	8.79	2.77	1.58	0.00
ENSG00000187079	TEAD1	19.61	3.64	2.35	0.00
ENSG00000187098	MITF	5.40	0.83	2.39	0.00
ENSG00000187189	TSPYL4	9.05	3.81	1.20	0.00
ENSG00000187231	SESTD1	4.12	1.76	1.12	0.00
ENSG00000187239	FBNP1	41.15	10.65	1.93	0.00
ENSG00000187325	TAF9B	8.28	3.35	1.24	0.00
ENSG00000187498	COL4A1	55.33	9.21	2.55	0.00
ENSG00000187601	MAGEH1	15.97	6.61	1.24	0.00
ENSG00000187699	C2orf88	12.15	31.73	-1.37	0.00
ENSG00000187783	TMEM72	2.85	11.21	-1.88	0.01
ENSG00000187808	SOWAHD	1.02	2.62	-1.18	0.00
ENSG00000187955	COL14A1	13.85	6.38	1.09	0.00
ENSG00000187957	DNER	2.04	0.56	1.51	0.00
ENSG00000188026	RILPL1	3.67	0.79	1.91	0.00
ENSG00000188126	MYO15B	25.19	69.36	-1.45	0.01
ENSG00000188474	ZNF788	1.51	0.45	1.32	0.00
ENSG00000188486	H2AFX	14.06	28.38	-1.00	0.00
ENSG00000188549	C15orf52	17.95	6.56	1.42	0.00
ENSG00000188603	CLN3	10.68	22.51	-1.06	0.00
ENSG00000188641	DPYD	5.03	2.33	1.04	0.00
ENSG00000188677	PARVB	4.28	1.78	1.16	0.00
ENSG00000188747	NOXA1	9.13	28.27	-1.60	0.00
ENSG00000188783	PRELP	40.82	5.12	2.94	0.00
ENSG00000188785	ZNF548	3.75	1.73	1.01	0.00

ENSG00000134013	LOXL2	8.99	2.61	1.69	0.00
ENSG00000134030	CTIF	7.94	2.20	1.74	0.00
ENSG00000134107	BHLHE40	40.67	19.95	1.02	0.00
ENSG00000134121	CHL1	3.12	1.19	1.23	0.00
ENSG00000134138	MEIS2	5.87	0.57	2.89	0.00
ENSG00000134198	TSPAN2	23.65	2.44	3.15	0.00
ENSG00000134202	GSTM3	10.38	2.65	1.87	0.00
ENSG00000134247	PTGFRN	41.73	14.94	1.47	0.00
ENSG00000134250	NOTCH2	10.62	5.08	1.03	0.00
ENSG00000134259	NGF	1.75	0.54	1.34	0.01
ENSG00000134278	SPIRE1	4.21	1.23	1.59	0.00
ENSG00000134363	FST	3.13	1.04	1.39	0.00
ENSG00000134443	GRP	1.69	0.08	2.55	0.00
ENSG00000134533	RERG	8.31	1.40	2.38	0.00
ENSG00000134590	FAM127A	70.21	30.53	1.19	0.00
ENSG00000134758	RNF138	5.10	12.00	-1.19	0.00
ENSG00000134769	DTNA	4.40	0.45	2.74	0.00
ENSG00000134775	FHOD3	2.91	0.76	1.65	0.00
ENSG00000134824	FADS2	3.05	1.03	1.37	0.00
ENSG00000134871	COL4A2	92.72	17.01	2.43	0.00
ENSG00000134874	DZIP1	3.52	0.73	1.95	0.00
ENSG00000134901	KDELC1	1.94	0.73	1.16	0.00
ENSG00000134917	ADAMTS8	5.35	0.55	2.82	0.00
ENSG00000134986	NREP	4.22	1.55	1.31	0.00
ENSG00000135002	RFK	12.61	36.00	-1.49	0.00
ENSG00000135046	ANXA1	22.10	7.39	1.55	0.00
ENSG00000135047	CTSL	51.61	22.16	1.21	0.00
ENSG00000135074	ADAM19	9.16	3.33	1.39	0.00
ENSG00000135205	CCDC146	3.45	1.53	1.06	0.00
ENSG00000135269	TES	62.50	28.75	1.11	0.00
ENSG00000135272	MDFIC	7.09	3.30	1.05	0.00
ENSG00000135333	EPHA7	9.47	0.55	3.59	0.00
ENSG00000135365	PHF21A	4.32	1.96	1.05	0.00
ENSG00000135378	PRRG4	2.86	7.19	-1.26	0.00
ENSG00000135414	GDF11	3.00	1.04	1.33	0.00
ENSG00000135424	ITGA7	28.15	3.31	2.99	0.00
ENSG00000135447	PPP1R1A	4.62	0.25	3.29	0.00
ENSG00000135472	FAIM2	2.96	1.00	1.36	0.00
ENSG00000135535	CD164	53.26	124.76	-1.22	0.00
ENSG00000135636	DYSF	5.36	0.99	2.18	0.00
ENSG00000135643	KCNMB4	2.86	0.81	1.55	0.00
ENSG00000135702	CHST5	9.53	37.88	-1.96	0.00
ENSG00000135722	FBXL8	2.12	5.90	-1.37	0.00
ENSG00000135736	CCDC102A	5.05	1.63	1.49	0.00
ENSG00000135750	KCNK1	5.52	15.10	-1.41	0.01
ENSG00000135835	KIAA1614	1.27	0.24	1.62	0.00

ENSG00000188906	LRRK2	1.90	0.61	1.32	0.00
ENSG00000188921	PTPLAD2	4.73	1.63	1.41	0.00
ENSG00000189058	APOD	16.11	6.66	1.24	0.00
ENSG00000189367	KIAA0408	3.46	0.93	1.65	0.00
ENSG00000196159	FAT4	4.08	0.66	2.24	0.00
ENSG00000196233	LCOR	2.97	8.53	-1.45	0.00
ENSG00000196263	ZNF471	1.98	0.61	1.38	0.00
ENSG00000196368	NUDT11	1.62	0.36	1.62	0.00
ENSG00000196376	SLC35F1	1.48	0.38	1.45	0.00
ENSG00000196378	ZNF34	3.10	1.35	1.06	0.00
ENSG00000196408	NOXO1	3.70	11.69	-1.60	0.00
ENSG00000196507	TCEAL3	12.05	3.55	1.69	0.00
ENSG00000196557	CACNA1H	29.76	2.98	3.22	0.00
ENSG00000196569	LAMA2	3.08	1.32	1.09	0.00
ENSG00000196628	TCF4	4.12	1.74	1.13	0.00
ENSG00000196700	ZNF512B	4.76	1.76	1.32	0.00
ENSG00000196730	DAPK1	7.51	2.49	1.50	0.00
ENSG00000196843	ARID5A	16.51	6.55	1.30	0.00
ENSG00000196866	HIST1H2AD	0.77	2.20	-1.26	0.00
ENSG00000196923	PDLIM7	61.29	7.81	2.93	0.00
ENSG00000196924	FLNA	826.01	64.77	3.67	0.00
ENSG00000197043	ANXA6	43.76	10.95	1.97	0.00
ENSG00000197045	GMFB	6.23	14.63	-1.20	0.00
ENSG00000197070	ARRDC1	10.30	25.86	-1.31	0.00
ENSG00000197256	KANK2	79.91	10.25	2.93	0.00
ENSG00000197283	SYNGAP1	4.07	1.88	1.02	0.00
ENSG00000197321	SVIL	79.14	7.54	3.35	0.00
ENSG00000197361	FBXL22	13.05	1.31	3.09	0.00
ENSG00000197375	SLC22A5	3.74	8.91	-1.20	0.01
ENSG00000197380	DACT3	14.77	1.62	3.00	0.00
ENSG00000197381	ADARB1	6.58	1.42	2.03	0.00
ENSG00000197405	C5AR1	7.22	2.20	1.61	0.00
ENSG00000197409	HIST1H3D	0.86	2.39	-1.25	0.00
ENSG00000197576	HOXA4	2.87	1.29	1.01	0.00
ENSG00000197614	MFAP5	11.77	5.55	1.05	0.01
ENSG00000197702	PARVA	26.38	7.40	1.80	0.00
ENSG00000197763	TXNRD3	1.61	0.59	1.15	0.00
ENSG00000197872	FAM49A	4.72	1.62	1.41	0.00
ENSG00000197885	NKIRAS1	3.23	1.02	1.45	0.00
ENSG00000197951	ZNF71	1.90	0.76	1.09	0.00
ENSG00000198087	CD2AP	14.84	37.68	-1.33	0.00
ENSG00000198093	ZNF649	2.99	1.34	1.03	0.00
ENSG00000198105	ZNF248	4.40	1.88	1.13	0.00
ENSG00000198113	TOR4A	9.71	26.72	-1.44	0.00
ENSG00000198211	TUBB3	8.99	3.53	1.29	0.00
ENSG00000198300	PEG3	2.72	0.51	1.96	0.00

ENSG00000135842	FAM129A	47.55	4.46	3.34	0.00
ENSG00000135862	LAMC1	40.19	9.17	2.10	0.00
ENSG00000135914	HTR2B	4.19	0.28	3.06	0.00
ENSG00000135931	ARMC9	2.01	0.52	1.55	0.00
ENSG00000135940	COX5B	100.51	201.51	-1.00	0.00
ENSG00000136002	ARHGEF4	2.41	0.20	2.55	0.00
ENSG00000136010	ALDH1L2	1.53	0.51	1.22	0.00
ENSG00000136052	SLC41A2	6.38	13.46	-1.05	0.01
ENSG00000136141	LRCH1	5.20	1.87	1.37	0.00
ENSG00000136193	SCRN1	17.34	3.95	2.07	0.00
ENSG00000136244	IL6	5.38	0.24	3.53	0.00
ENSG00000136274	NACAD	2.79	0.66	1.74	0.00
ENSG00000136379	ABHD17C	23.86	65.68	-1.45	0.01
ENSG00000136383	ALPK3	3.16	0.35	2.50	0.00
ENSG00000136546	SCN7A	12.06	1.49	2.83	0.00
ENSG00000136630	HLX	5.34	2.08	1.26	0.01
ENSG00000136643	RPS6KC1	4.70	2.11	1.07	0.00
ENSG00000136732	GYPC	17.04	4.96	1.73	0.00
ENSG00000136842	TMOD1	11.03	1.92	2.38	0.00
ENSG00000136854	STXBP1	6.41	2.25	1.41	0.00
ENSG00000136859	ANGPTL2	33.63	6.87	2.25	0.00
ENSG00000137033	IL33	14.30	4.17	1.72	0.00
ENSG00000137054	POLR1E	7.24	3.37	1.05	0.00
ENSG00000137076	TLN1	96.18	23.96	1.99	0.00
ENSG00000137094	DNAJB5	17.42	1.36	3.45	0.00
ENSG00000137124	ALDH1B1	50.97	18.83	1.42	0.00
ENSG00000137198	GMPR	4.00	0.93	1.84	0.00
ENSG00000137267	TUBB2A	19.15	8.70	1.12	0.00
ENSG00000137269	LRRC1	10.58	24.36	-1.18	0.01
ENSG00000137273	FOXF2	25.91	8.35	1.61	0.00
ENSG00000137285	TUBB2B	3.98	1.07	1.68	0.00
ENSG00000137338	PGBD1	2.84	0.80	1.56	0.00
ENSG00000137364	TPMT	14.85	34.02	-1.18	0.00
ENSG00000137558	PI15	5.30	0.86	2.32	0.00
ENSG00000137563	GGH	5.74	12.42	-1.08	0.01
ENSG00000137573	SULF1	17.60	3.07	2.43	0.00
ENSG00000137693	YAP1	23.47	9.51	1.28	0.00
ENSG00000137710	RDX	8.68	2.55	1.67	0.00
ENSG00000137726	FXYD6	43.62	4.64	3.17	0.00
ENSG00000137752	CASP1	7.64	15.56	-1.00	0.00
ENSG00000137757	CASP5	5.69	23.52	-2.00	0.00
ENSG00000137801	THBS1	64.40	24.44	1.39	0.00
ENSG00000137825	ITPKA	8.32	27.22	-1.68	0.00
ENSG00000137875	BCL2L10	0.61	1.77	-1.23	0.01
ENSG00000137941	TTL7	1.86	0.56	1.39	0.00
ENSG00000138080	EMILIN1	80.56	21.03	1.93	0.00

ENSG00000198315	ZKSCAN8	4.04	1.87	1.02	0.00
ENSG00000198417	MT1F	10.33	38.29	-1.86	0.00
ENSG00000198467	TPM2	500.01	29.42	4.08	0.00
ENSG00000198483	ANKRD35	2.07	0.54	1.55	0.00
ENSG00000198523	PLN	124.79	8.97	3.76	0.00
ENSG00000198576	ARC	2.09	0.24	2.25	0.00
ENSG00000198624	CCDC69	59.67	7.82	2.89	0.00
ENSG00000198753	PLXNB3	6.23	0.78	2.65	0.00
ENSG00000198756	COLGALT2	1.48	0.15	2.12	0.00
ENSG00000198814	GK	1.20	4.25	-1.64	0.00
ENSG00000198835	GJC2	2.96	0.66	1.82	0.00
ENSG00000198838	RYR3	1.23	0.15	1.90	0.00
ENSG00000198846	TOX	10.10	4.04	1.27	0.00
ENSG00000198848	CES1	14.54	2.93	2.22	0.00
ENSG00000198853	RUSC2	11.76	2.40	2.18	0.00
ENSG00000198873	GRK5	10.07	4.85	1.02	0.00
ENSG00000198892	SHISA4	4.34	1.58	1.33	0.00
ENSG00000198908	BHLHB9	1.73	0.51	1.39	0.00
ENSG00000198909	MAP3K3	9.54	3.72	1.30	0.00
ENSG00000198910	L1CAM	10.40	3.34	1.57	0.00
ENSG00000198932	GPRASP1	7.75	1.56	2.14	0.00
ENSG00000198933	TBKBP1	4.09	1.42	1.38	0.00
ENSG00000198934	MAGEE1	1.79	0.56	1.34	0.00
ENSG00000198947	DMD	9.28	0.94	3.01	0.00
ENSG00000198960	ARMCX6	3.50	1.58	1.04	0.00
ENSG00000203685	C1orf95	7.84	0.98	2.72	0.00
ENSG00000203778	FAM229B	3.44	0.66	2.02	0.00
ENSG00000203813	HIST1H3H	2.28	6.68	-1.45	0.00
ENSG00000203867	RBM20	1.29	0.21	1.74	0.00
ENSG00000203896	LIME1	5.43	11.40	-1.04	0.00
ENSG00000204099	NEU4	2.87	12.20	-1.99	0.00
ENSG00000204131	NHSL2	1.52	0.19	2.00	0.00
ENSG00000204186	ZDBF2	1.56	0.49	1.28	0.00
ENSG00000204262	COL5A2	16.55	5.05	1.66	0.00
ENSG00000204291	COL15A1	20.75	3.74	2.40	0.00
ENSG00000204323	SMIM5	2.55	6.96	-1.37	0.00
ENSG00000204381	LAYN	8.02	1.19	2.52	0.00
ENSG00000204406	MBD5	2.32	0.80	1.29	0.00
ENSG00000204424	LY6G6F	1.20	0.11	2.02	0.00
ENSG00000204525	HLA-C	332.39	834.60	-1.33	0.00
ENSG00000204610	TRIM15	9.38	29.89	-1.65	0.01
ENSG00000204616	TRIM31	24.80	79.66	-1.67	0.01
ENSG00000204632	HLA-G	4.19	9.88	-1.19	0.01
ENSG00000204642	HLA-F	17.90	44.63	-1.31	0.00
ENSG00000204950	LRRC10B	1.50	0.48	1.26	0.00
ENSG00000204956	PCDHGA1	17.30	7.00	1.28	0.00

ENSG00000138131	LOXL4	5.26	0.69	2.55	0.00
ENSG00000138175	ARL3	16.11	7.59	1.06	0.00
ENSG00000138443	ABI2	8.86	2.55	1.70	0.00
ENSG00000138495	COX17	12.59	5.90	1.06	0.00
ENSG00000138600	SPPL2A	10.50	24.00	-1.17	0.00
ENSG00000138606	SHF	2.53	0.99	1.17	0.00
ENSG00000138615	CILP	11.60	3.22	1.77	0.00
ENSG00000138639	ARHGAP24	2.13	0.81	1.16	0.00
ENSG00000138685	FGF2	5.69	1.11	2.13	0.00
ENSG00000138735	PDE5A	20.07	6.72	1.54	0.00
ENSG00000138744	NAAA	14.08	35.04	-1.30	0.00
ENSG00000138759	FRAS1	1.67	0.29	1.82	0.00
ENSG00000138821	SLC39A8	4.12	10.69	-1.33	0.00
ENSG00000138944	KIAA1644	12.31	0.75	3.66	0.00
ENSG00000139132	FGD4	2.89	6.58	-1.12	0.00
ENSG00000139174	PRICKLE1	2.39	0.92	1.18	0.00
ENSG00000139211	AMIGO2	20.94	2.43	2.98	0.00
ENSG00000139278	GLIPR1	4.87	2.31	1.00	0.00
ENSG00000139329	LUM	102.29	50.78	1.01	0.01
ENSG00000139567	ACVRL1	18.78	43.78	-1.21	0.00
ENSG00000139641	ESYT1	29.59	13.08	1.16	0.00
ENSG00000139737	SLAIN1	1.61	0.42	1.47	0.00
ENSG00000139835	GRTP1	9.50	19.92	-1.05	0.00
ENSG00000139910	NOVA1	1.47	0.44	1.32	0.00
ENSG00000139926	FRMD6	4.62	1.49	1.48	0.00
ENSG00000139970	RTN1	2.45	0.98	1.14	0.00
ENSG00000140092	FBLN5	12.26	3.58	1.71	0.00
ENSG00000140285	FGF7	5.73	1.33	1.92	0.00
ENSG00000140323	DISP2	2.28	5.72	-1.24	0.00
ENSG00000140367	UBE2Q2	13.36	5.60	1.22	0.00
ENSG00000140416	TPM1	292.40	50.98	2.51	0.00
ENSG00000140577	CRTC3	6.05	2.67	1.11	0.00
ENSG00000140682	TGFB111	29.96	4.82	2.58	0.00
ENSG00000140718	FTO	3.79	1.52	1.19	0.00
ENSG00000140807	NKD1	2.57	0.42	2.08	0.00
ENSG00000140836	ZFXH3	2.73	1.11	1.13	0.00
ENSG00000140859	KIFC3	2.21	0.91	1.08	0.00
ENSG00000140937	CDH11	3.76	1.55	1.15	0.00
ENSG00000140993	TIGD7	2.14	0.84	1.13	0.00
ENSG00000141034	GID4	4.78	1.67	1.39	0.00
ENSG00000141052	MYOCD	14.30	1.28	3.25	0.00
ENSG00000141401	IMPA2	11.72	24.73	-1.06	0.00
ENSG00000141404	GNAL	3.64	1.31	1.32	0.00
ENSG00000141424	SLC39A6	10.23	4.91	1.02	0.00
ENSG00000141448	GATA6	6.41	16.37	-1.32	0.00
ENSG00000141526	SLC16A3	7.72	17.01	-1.12	0.00

ENSG00000205002	AARD	1.31	0.16	1.92	0.00
ENSG00000205011	AC073082.1	1.55	0.40	1.47	0.00
ENSG00000205060	SLC35B4	3.02	1.37	1.02	0.00
ENSG00000205090	TMEM240	4.10	0.83	2.02	0.00
ENSG00000205213	LGR4	14.47	32.22	-1.14	0.00
ENSG00000205363	C15orf59	3.21	0.86	1.64	0.00
ENSG00000205364	MT1M	22.35	80.01	-1.83	0.00
ENSG00000205413	SAMD9	7.34	20.44	-1.45	0.00
ENSG00000205436	EXOC3L4	1.90	5.59	-1.44	0.00
ENSG00000205795	CYS1	8.84	2.19	1.90	0.00
ENSG00000206077	ZDHHC11B	2.28	0.86	1.19	0.01
ENSG00000206418	RAB12	15.37	6.86	1.14	0.00
ENSG00000206535	LNP1	1.56	0.53	1.22	0.00
ENSG00000206538	VGLL3	2.49	0.40	2.08	0.00
ENSG00000212123	PRR22	0.96	2.37	-1.11	0.00
ENSG00000212747	FAM127C	7.96	1.93	1.91	0.00
ENSG00000212950	RP11-476E15.3	2.36	0.14	2.73	0.00
ENSG00000213047	DENND1B	1.57	3.92	-1.20	0.00
ENSG00000213160	KLHL23	12.17	3.27	1.82	0.00
ENSG00000213190	MLLT11	4.30	1.11	1.74	0.00
ENSG00000213638	ADAT3	1.88	7.31	-1.83	0.00
ENSG00000213694	S1PR3	4.67	1.11	1.86	0.00
ENSG00000213760	ATP6V1G2	2.42	0.84	1.29	0.00
ENSG00000213949	ITGA1	16.78	3.17	2.32	0.00
ENSG00000213977	TAX1BP3	114.17	229.04	-1.00	0.00
ENSG00000214265	SNURF	13.42	5.28	1.30	0.00
ENSG00000214338	SOGA3	2.22	0.63	1.49	0.00
ENSG00000214435	AS3MT	3.29	0.79	1.77	0.00
ENSG00000214530	STARD10	20.92	58.74	-1.48	0.00
ENSG00000214934	AC103681.1	3.22	1.12	1.34	0.00
ENSG00000215018	COL28A1	3.32	0.93	1.60	0.00
ENSG00000215218	UBE2QL1	3.01	0.46	2.20	0.00
ENSG00000215375	MYL5	2.05	4.84	-1.15	0.00
ENSG00000215462	AL136218.1	2.74	1.23	1.01	0.01
ENSG00000215621	AC174470.1	14.29	6.54	1.10	0.00
ENSG00000215788	TNFRSF25	3.30	8.50	-1.30	0.00
ENSG00000218336	TENM3	1.81	0.19	2.23	0.00
ENSG00000219438	FAM19A5	1.54	0.40	1.46	0.00
ENSG00000221890	NPTXR	5.83	0.85	2.47	0.00
ENSG00000224051	GLTPD1	15.44	36.61	-1.23	0.00
ENSG00000225485	ARHGAP23	5.29	1.53	1.64	0.00
ENSG00000225663	FAM195B	14.14	6.51	1.09	0.00
ENSG00000226742	HSBP1L1	8.54	17.65	-1.03	0.00
ENSG00000227051	C14orf132	7.95	1.64	2.12	0.00
ENSG00000227164	AL354993.1	2.57	0.54	1.84	0.00
ENSG00000233041	PHGR1	490.70	2923.31	-2.57	0.00

ENSG00000141574	SECTM1	23.76	69.92	-1.55	0.00
ENSG00000141639	MAPK4	2.68	0.21	2.66	0.00
ENSG00000141698	NT5C3B	10.68	4.74	1.13	0.00
ENSG00000141720	PIP4K2B	13.65	6.26	1.09	0.00
ENSG00000141753	IGFBP4	279.85	115.16	1.28	0.00
ENSG00000141756	FKBP10	11.82	5.41	1.09	0.00
ENSG00000141905	NFIC	15.96	5.75	1.43	0.00
ENSG00000142089	IFITM3	205.86	90.36	1.19	0.01
ENSG00000142156	COL6A1	132.69	38.82	1.77	0.00
ENSG00000142173	COL6A2	167.75	60.11	1.48	0.00
ENSG00000142178	SIK1	36.56	7.78	2.20	0.00
ENSG00000142227	EMP3	26.06	9.75	1.40	0.00
ENSG00000142230	SAE1	35.14	16.93	1.04	0.00
ENSG00000142686	C1orf216	7.58	1.78	1.95	0.00
ENSG00000142798	HSPG2	39.89	13.24	1.57	0.00
ENSG00000142871	CYR61	171.55	39.37	2.12	0.00
ENSG00000143001	TMEM61	1.54	3.78	-1.17	0.01
ENSG00000143028	SYPL2	1.87	0.20	2.25	0.00
ENSG00000143126	CELSR2	1.63	0.59	1.17	0.00
ENSG00000143147	GPR161	1.95	0.54	1.48	0.00
ENSG00000143196	DPT	132.77	23.64	2.48	0.00
ENSG00000143248	RGS5	71.54	12.86	2.45	0.00
ENSG00000143318	CASQ1	1.36	0.09	2.24	0.00
ENSG00000143320	CRABP2	9.89	2.02	2.16	0.00
ENSG00000143333	RGS16	8.27	1.45	2.33	0.00
ENSG00000143337	TOR1AIP1	21.98	7.52	1.52	0.00
ENSG00000143416	SELENBP1	165.10	441.83	-1.42	0.01
ENSG00000143507	DUSP10	8.07	1.53	2.23	0.00
ENSG00000143515	ATP8B2	6.55	2.85	1.14	0.00
ENSG00000143546	S100A8	13.95	1.19	3.30	0.00
ENSG00000143603	KCNN3	1.93	0.47	1.61	0.00
ENSG00000143702	CEP170	1.77	0.70	1.09	0.00
ENSG00000143753	DEGS1	25.73	10.12	1.33	0.00
ENSG00000143772	ITPKB	19.08	4.02	2.18	0.00
ENSG00000143799	PARP1	20.51	9.00	1.17	0.00
ENSG00000143816	WNT9A	5.28	1.17	1.96	0.00
ENSG00000143867	OSR1	2.98	0.99	1.38	0.01
ENSG00000143878	RHOB	462.56	88.76	2.38	0.00
ENSG00000143995	MEIS1	7.93	1.65	2.11	0.00
ENSG00000144191	CNGA3	1.57	0.25	1.86	0.00
ENSG00000144218	AFF3	2.42	0.75	1.41	0.00
ENSG00000144369	FAM171B	1.75	0.63	1.19	0.00
ENSG00000144642	RBMS3	2.10	0.79	1.18	0.00
ENSG00000144647	POMGNT2	7.27	3.34	1.07	0.00
ENSG00000144655	CSRNP1	46.43	14.02	1.71	0.00
ENSG00000144668	ITGA9	7.32	2.00	1.75	0.00

ENSG00000233280	CRYBG3	4.46	1.61	1.34	0.00
ENSG00000233404	FLJ20373	10.19	4.54	1.12	0.00
ENSG00000233493	TMEM238	5.01	19.60	-1.92	0.00
ENSG00000235098	ANKRD65	5.34	1.53	1.66	0.00
ENSG00000235471	AL033532.1	4.39	1.09	1.79	0.00
ENSG00000236609	ZNF853	6.42	1.31	2.09	0.00
ENSG00000237330	RNF223	0.63	2.07	-1.40	0.01
ENSG00000237651	C2orf74	12.44	2.70	2.10	0.00
ENSG00000240184	PCDHGC3	21.91	8.83	1.29	0.00
ENSG00000240583	AQP1	62.85	16.41	1.92	0.00
ENSG00000240694	PNMA2	1.48	0.46	1.29	0.00
ENSG00000240764	PCDHGC5	17.27	7.00	1.27	0.00
ENSG00000240771	ARHGGEF2.5	32.88	3.97	2.97	0.00
ENSG00000241644	INMT	4.04	1.78	1.08	0.01
ENSG00000241697	TMEFF1	1.77	0.49	1.44	0.00
ENSG00000241839	PLEKHO2	14.18	6.37	1.12	0.00
ENSG00000241978	AKAP2	19.74	6.60	1.55	0.00
ENSG00000242013	USP27X	2.11	0.78	1.20	0.00
ENSG00000242252	BGLAP	3.11	1.25	1.16	0.00
ENSG00000242265	PEG10	5.59	0.71	2.61	0.00
ENSG00000242419	PCDHGC4	17.37	7.02	1.28	0.00
ENSG00000242441	GTF2A1L	2.75	0.16	2.85	0.00
ENSG00000242732	RGAG4	3.04	0.77	1.69	0.00
ENSG00000243244	STON1	14.71	1.43	3.15	0.00
ENSG00000243279	PRAF2	11.17	4.57	1.25	0.00
ENSG00000243449	C4orf48	5.36	27.82	-2.32	0.00
ENSG00000244355	LY6G6D	2.77	0.25	2.60	0.00
ENSG00000245848	CEBPA	19.77	47.88	-1.27	0.00
ENSG00000248485	PCP4L1	8.54	0.46	3.62	0.00
ENSG00000249240	AC069368.3	4.51	1.63	1.34	0.00
ENSG00000249242	TMEM150.C	4.72	1.38	1.61	0.00
ENSG00000250424	AQP1	44.67	11.09	1.99	0.00
ENSG00000250588	IQCJ-SCHIP1	6.58	1.18	2.26	0.00
ENSG00000250641	MEGT1	1.30	0.12	2.08	0.00
ENSG00000251184	RP11-101E3.5	5.07	2.21	1.11	0.00
ENSG00000251349	MSANTD3-TMEFF1	2.32	0.64	1.53	0.00
ENSG00000253159	PCDHGA1.2	17.17	6.96	1.27	0.00
ENSG00000253250	C8orf88	13.28	1.11	3.31	0.00
ENSG00000253304	TMEM200.B	11.10	2.71	1.94	0.00
ENSG00000253305	PCDHGB6	18.07	7.25	1.29	0.00
ENSG00000253368	TRNP1	5.84	1.26	2.02	0.00
ENSG00000253485	PCDHGA5	17.63	7.11	1.28	0.00
ENSG00000253537	PCDHGA7	17.63	7.13	1.28	0.00
ENSG00000253731	PCDHGA6	17.82	7.17	1.28	0.00
ENSG00000253767	PCDHGA8	17.36	7.04	1.27	0.00
ENSG00000253846	PCDHGA1.0	17.81	7.49	1.22	0.00

ENSG00000144681	STAC	1.15	0.13	1.87	0.00
ENSG00000144712	CAND2	2.98	0.51	2.09	0.00
ENSG00000144730	IL17RD	4.61	0.35	3.02	0.00
ENSG00000144749	LRIG1	33.88	8.27	2.00	0.00
ENSG00000144810	COL8A1	3.99	0.76	2.06	0.00
ENSG00000144815	NXPE3	2.64	1.14	1.06	0.00
ENSG00000144824	PHLDB2	7.00	1.15	2.37	0.00
ENSG00000144834	TAGLN3	4.09	0.47	2.59	0.00
ENSG00000144843	ADPRH	3.24	1.49	1.00	0.00
ENSG00000144857	BOC	7.12	1.12	2.42	0.00
ENSG00000144891	AGTR1	6.78	0.51	3.21	0.00
ENSG00000144935	TRPC1	2.56	0.70	1.56	0.00
ENSG00000145012	LPP	28.56	8.04	1.80	0.00
ENSG00000145147	SLIT2	4.02	0.87	1.93	0.00
ENSG00000145214	DGKQ	10.72	22.76	-1.07	0.00
ENSG00000145284	SCD5	6.16	1.28	2.07	0.00
ENSG00000145335	SNCA	2.89	0.70	1.72	0.00
ENSG00000145362	ANK2	5.45	1.04	2.15	0.00
ENSG00000145391	SETD7	12.92	4.01	1.63	0.00
ENSG00000145431	PDGFC	5.15	1.32	1.78	0.00
ENSG00000145623	OSMR	4.81	1.99	1.17	0.00
ENSG00000145649	GZMA	6.62	16.30	-1.27	0.00
ENSG00000145687	SSBP2	2.96	1.03	1.32	0.00
ENSG00000145730	PAM	20.64	7.30	1.47	0.00
ENSG00000145936	KCNMB1	55.95	3.75	3.81	0.00
ENSG00000145945	FAM50B	5.76	2.54	1.10	0.00
ENSG00000146070	PLA2G7	1.01	2.62	-1.18	0.00
ENSG00000146112	PPP1R18	20.54	8.18	1.30	0.00
ENSG00000146122	DAAM2	7.43	3.28	1.12	0.00
ENSG00000146197	SCUBE3	1.80	0.06	2.70	0.00
ENSG00000146205	ANO7	1.69	4.86	-1.40	0.01
ENSG00000146243	IRAK1BP1	1.77	0.76	1.00	0.00
ENSG00000146267	FAXC	6.47	0.46	3.24	0.00
ENSG00000146373	RNF217	2.03	0.71	1.24	0.00
ENSG00000146411	SLC2A12	1.77	0.38	1.68	0.00
ENSG00000146477	SLC22A3	3.01	0.88	1.53	0.00
ENSG00000146535	GNA12	16.09	7.53	1.07	0.00
ENSG00000146555	SDK1	1.81	0.61	1.27	0.00
ENSG00000146826	C7orf43	10.38	21.99	-1.07	0.00
ENSG00000147027	TMEM47	18.08	4.89	1.84	0.00
ENSG00000147065	MSN	73.99	28.86	1.35	0.00
ENSG00000147100	SLC16A2	4.25	1.43	1.42	0.00
ENSG00000147166	ITGB1BP2	2.30	0.38	2.01	0.00
ENSG00000147224	PRPS1	11.98	5.49	1.09	0.00
ENSG00000147251	DOCK11	4.11	1.29	1.50	0.00
ENSG00000147400	CETN2	25.03	8.98	1.45	0.00

ENSG00000253873	PCDHGA1 1	14.28	5.31	1.39	0.00
ENSG00000253910	PCDHGB2	17.73	7.16	1.28	0.00
ENSG00000253953	PCDHGB4	17.72	7.20	1.27	0.00
ENSG00000253958	CLDN23	26.04	103.98	-1.99	0.00
ENSG00000254122	PCDHGB7	19.22	7.45	1.34	0.00
ENSG00000254221	PCDHGB1	17.53	7.08	1.28	0.00
ENSG00000254245	PCDHGA3	17.50	7.06	1.28	0.00
ENSG00000254918	RP11- 259P6.1	3.33	0.29	2.73	0.00
ENSG00000254959	INMT- FAM188B	2.77	1.08	1.19	0.00
ENSG00000255103	KIAA0754	1.73	0.44	1.51	0.00
ENSG00000255245	FXYD6- FXYD2	16.08	1.73	3.04	0.00
ENSG00000255302	EID1	84.15	37.71	1.15	0.00
ENSG00000255330	SOGA3	2.40	0.68	1.51	0.00
ENSG00000255767	RP13- 512J5.1	10.25	4.65	1.10	0.00
ENSG00000256018	HIST1H3G	0.47	1.48	-1.27	0.00
ENSG00000256060	TRAPP2 P1	4.97	2.31	1.03	0.00
ENSG00000256100	AP000721 .4	85.18	201.63	-1.24	0.00
ENSG00000258247	RP11- 167N24.6	3.67	0.06	3.66	0.00
ENSG00000258508	RP11- 73E17.1	0.87	2.20	-1.13	0.00
ENSG00000258865	AL049836. 1	1.22	3.92	-1.50	0.01
ENSG00000258947	TUBB3	3.83	1.41	1.30	0.00
ENSG00000259207	ITGB3	8.70	1.12	2.71	0.00
ENSG00000259662	FBXL22	16.51	1.49	3.27	0.00
ENSG00000259741	ZMYND11	30.35	10.23	1.55	0.00
ENSG00000259753	ITGB3	7.73	1.02	2.65	0.00
ENSG00000259784	ATP6C	26.20	60.08	-1.19	0.00
ENSG00000260092	RP11- 77K12.7	12.44	51.41	-2.03	0.00
ENSG00000260230	FRRS1L	1.29	0.15	1.94	0.00
ENSG00000260836	RP11- 152F13.10	2.85	0.62	1.83	0.00
ENSG00000261130	RP11- 1021N1.1	6.47	1.35	2.08	0.00
ENSG00000261359	C16orf98	0.97	3.13	-1.47	0.00
ENSG00000261832	CLN3	21.47	43.59	-1.01	0.00
ENSG00000261857	MIA	2.82	0.99	1.31	0.00
ENSG00000261934	PCDHGA9	18.03	7.18	1.30	0.00
ENSG00000262209	PCDHGB3	17.10	6.91	1.28	0.00
ENSG00000262323	AC009133 .19	9.78	25.40	-1.36	0.00
ENSG00000262355	SAMD4A	11.42	1.87	2.46	0.00
ENSG00000262543	RP3- 422G23.4	1.41	0.21	1.87	0.00
ENSG00000262576	PCDHGA4	17.68	7.08	1.29	0.00
ENSG00000263264	CTB- 133G6.1	2.56	0.49	1.93	0.00
ENSG00000263281	AC103702 .1	7.80	0.82	2.91	0.00
ENSG00000264545	RP11- 145E5.5	2.12	0.81	1.16	0.00
ENSG00000265690	RP11- 5A19.5	2.44	6.80	-1.39	0.00
ENSG00000265969	BACE1	6.81	2.37	1.43	0.00
ENSG00000266714	MYO15B	19.78	54.63	-1.45	0.01
ENSG00000267060	PTGES3L	3.18	1.29	1.16	0.00

ENSG00000147408	CSGALNA CT1	1.70	0.69	1.05	0.00
ENSG00000147526	TACC1	27.01	8.50	1.64	0.00
ENSG00000147655	RSPO2	3.56	1.26	1.34	0.00
ENSG00000147676	MAL2	35.64	119.45	-1.74	0.01
ENSG00000147813	NAPRT1	19.08	48.26	-1.33	0.00
ENSG00000147883	CDKN2B	20.60	60.43	-1.54	0.01
ENSG00000148120	C9orf3	4.41	1.81	1.18	0.00
ENSG00000148175	STOM	89.67	36.33	1.30	0.00

ENSG00000268133	AC003002 .4	7.10	2.76	1.29	0.00
ENSG00000268434	AC011530 .4	29.56	8.34	1.80	0.00
ENSG00000269028	MTRNR2L 12	0.54	2.60	- 1.84	0.00
ENSG00000269095	AC010646 .3	12.69	43.23	- 1.75	0.00
ENSG00000269190	FBXO17	3.15	0.72	1.81	0.00
ENSG00000269279	AL136376. 1	1.79	8.24	- 2.06	0.01
ENSG00000269430	LRRC3DN	3.85	1.28	1.42	0.00
ENSG00000269690	AC096677 .1	1.32	0.27	1.58	0.00
ENSG00000269711	CTD- 3214H19.1 6	29.81	63.20	- 1.08	0.00