

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. S. Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Untersuchungen zur Disseminierung von intestinalen Epithelzellen
in der inflammationsassoziierten Karzinogenese
des kolorektalen Karzinoms**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
JOHANNA BORN
aus Berlin
Kiel 2022

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. S. Sebens

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Aden

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 14.04.2023

gez.: Prof. Dr. rer. nat. S. Sebens

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

I	Glossarium	V
II	Abbildungsverzeichnis	IX
III	Tabellenverzeichnis	XII
1	Einleitung	1
1.1	<i>Entzündliche Veränderungen des Darms</i>	1
1.1.1	Divertikulose und Divertikulitis	1
1.1.2	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	2
1.1.2.1	Epidemiologie	3
1.1.2.2	Pathogenese und Risikofaktoren	3
1.1.2.3	Die Rolle von proinflammatorischen Makrophagen in der Darmschleimhaut von CED Patienten	4
1.1.2.4	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und kolorektale Karzinome	6
1.1.2.5	Symptomatik und Diagnostik	7
1.1.2.6	Therapeutische Möglichkeiten und Prognose	9
1.2	<i>Maligne Veränderungen des Darms</i>	11
1.2.1	Das kolorektale Adenokarzinom	11
1.2.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren	11
1.2.1.2	Die kolorektale Tumorgenese	12
1.2.1.3	Symptomatik und Diagnostik	13
1.2.1.4	Therapeutische Möglichkeiten und Prognose	14
1.3	<i>Zirkulierende Tumorzellen</i>	16
1.3.1	Klinische Bedeutung	16
1.3.2	Molekulare Marker zur Detektion zirkulierender Tumorzellen	17
1.3.2.1	Cytokeratin 20 (CK20)	17
1.3.2.2	Plastin 3 (PLS3)	19
1.3.2.3	Ladinin 1 (LAD1)	19
1.3.2.4	Defensin Alpha 5 (DEFA5)	20
1.3.2.5	Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 5 (CEACAM5)	21
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	23
2	Material	24
2.1	<i>Probenmaterial der CED und KRK Patienten sowie der Kontrollprobanden</i>	24
2.2	<i>Laborgeräte</i>	24
2.2.1	Zentrifugen	24
2.2.2	Inkubatoren	24
2.2.3	Messgeräte	25
2.2.4	Mikroskope	25
2.2.5	Pipetten	25
2.2.6	Sterilwerkbänke	25
2.2.7	Waagen	26
2.2.8	Weitere Geräte	26

2.3	<i>Verbrauchsmaterial</i>	27
2.4	<i>Kits</i>	27
2.5	<i>Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Rezepturen</i>	28
2.5.1	Chemikalien und Reagenzien.....	28
2.5.2	Puffer.....	29
2.6	<i>Material für die Western Blot Analyse</i>	30
2.7	<i>Material für zellbiologische Untersuchungen</i>	31
2.7.1	Zelllinien.....	31
2.7.2	Zellkulturreagenzien.....	31
2.7.3	Zusammensetzung von Zellkulturmedien.....	32
2.7.4	Small interfering RNA (siRNA).....	32
2.8	<i>Antikörper</i>	33
2.9	<i>Primer</i>	34
2.10	<i>Software</i>	35
3	Methoden	36
3.1	<i>Analyse von peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut von Patienten und gesunden Spendern</i>	36
3.1.1	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen.....	36
3.1.2	RNA Extraktion aus peripheren mononukleären Zellen.....	36
3.1.3	cDNA Synthese	37
3.1.4	Quantitative Real Time PCR	37
3.2	<i>In vitro Generierung von Makrophagen aus dem Blut gesunder Spender</i>	39
3.2.1	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut gesunder Spender..	39
3.2.2	<i>In vitro</i> Generierung von M1-Makrophagen aus Monozyten.....	41
3.3	<i>Zellkultur von intestinalen Epithelzellen und Makrophagen</i>	42
3.3.1	Kultivierung von Zellen.....	42
3.3.2	Cokultivierung von M1-Makrophagen und NCM-460 Zellen.....	43
3.4	<i>Charakterisierung und Analyse der NCM-460 Zellen</i>	44
3.4.1	Zellzahlbestimmung	44
3.4.2	Molekularbiologische Methoden	45
3.4.2.1	Extraktion von RNA.....	45
3.4.2.2	cDNA Synthese.....	45
3.4.2.3	Quantitative Real Time PCR	45
3.4.2.4	siRNA-vermittelter Knockdown von CK20 und CEACAM5	46
3.4.3	Western Blot.....	47
3.4.3.1	Herstellung von Ganzzelllysaten	47
3.4.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	47
3.4.3.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.4.3.4	Membrantransfer	48
3.4.3.5	Immunchemischer Nachweis von Proteinen	49
3.4.4	Boyden-Chamber-Migrationsassay	49
3.4.5	Boyden-Chamber-Invasionsassay.....	51
3.5	<i>Statistische Analyse</i>	51

4	Ergebnisse	53
4.1	<i>Der Einfluss von proinflammatorischen Makrophagen auf Eigenschaften und Verhalten der Kolonepithelzelllinie NCM-460</i>	<i>53</i>
4.1.1	NCM-460 Zellen nehmen unter Kokultur mit M1-Makrophagen vermehrt eine spindelförmige Zellform an und zeigen ein vermindertes Wachstum.....	53
4.1.2	EMT-assoziierte Veränderungen lassen sich bei Kolonepithelzellen nach einer Kokultur in inflammatorischer Umgebung nachweisen	55
4.1.3	Kolonepithelzellen zeigen in inflammatorischer Umgebung ein erhöhtes Migrationspotential	57
4.1.4	Die Invasionsfähigkeit von mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen zeigt keine Unterschiede	58
4.1.5	M1-Makrophagen beeinflussen die Expression CTC-assoziiierter Gene in NCM-460 Zellen	58
4.1.6	Der <i>Knockdown</i> von CK20 und CEACAM5 führt zu funktionellen Veränderungen in kokultivierten NCM-460 Zellen	60
4.2	<i>Untersuchung CTC-assoziiierter Marker an humanem Probenmaterial</i>	<i>64</i>
4.2.1	Probandencharakteristik.....	64
4.2.2	CK20 und DEFA5 zeigen eine variable Positivität innerhalb der drei Probandengruppen.....	65
4.2.3	Die verschiedenen Probandengruppen zeigen qualitative Unterschiede in der Markerexpression	68
4.2.4	Die Erkrankungsdauer von CED Patienten hat einen Einfluss auf die Quantität und teilweise auf die Qualität CTC-assoziiierter Marker.....	70
4.2.5	Eine immunsuppressive Medikation hat Einfluss auf die Expression CTC-assoziiierter Marker bei Patienten mit CED.....	73
4.2.6	Laborchemische Entzündungsparameter wie CRP und Leukozytenanzahl korrelieren nicht mit der Expression CTC-assoziiierter Marker im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen	74
4.2.7	Der Raucherstatus zeigt nur geringe Auswirkungen auf die Expression CTC-assoziiierter Marker im Blut	76
4.2.8	Die Detektion von PLS3 erlaubt mit hoher Sensitivität und Spezifität die Differenzierung von Patienten mit malignen Erkrankungen des Darms von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen und gesunden Spendern	78
5.	Diskussion.....	81
5.1	<i>In vitro Studie: Einfluss einer entzündlichen Umgebung auf die Expression CTC-assoziiierter Marker in intestinalen Epithelzellen</i>	<i>81</i>
5.1.1	Methodische Limitationen.....	84
5.2	<i>Analyse von Probandenmaterial</i>	<i>85</i>
5.2.1	Nachweis von CTC Markern im Blut von CED Patienten und gesunden Probanden...	85
5.2.2	Beeinflussung der Markerexpression durch ein dauerhaft systemisches und lokales Entzündungsgeschehen.....	89
5.2.3	Nutzbarkeit der Marker zur Diskriminierung von malignen und entzündlichen Erkrankungen des Darms.....	92
5.2.4	Methodische Limitationen.....	94
5.3	<i>Ausblick</i>	<i>96</i>
6.	Zusammenfassung	99

IV Literaturverzeichnis	101
V Anhang	112
Danksagung	
Publikationsverzeichnis	

I Glossarium

<	kleiner als
>	größer als
Δ CT	Delta Cycle-Threshold
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
A	Ampere
APC Gen	Adenomatösen-Polyposis-Coli Gen
APS	Ammonium Persulfat
ASCA	Anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper
AT	Österreich
AUC	Area Under The Curve
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CAC	Colitis-assoziiertes Karzinom
cDNA	Komplementäre DNA
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CEACAM5	Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 5
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CH	Schweiz
CK20	Cytokeratin 20
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
coM1	Cokultivierte NCM-460 Zellen mit M1-Makrophagen
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTC	Zirkulierende Tumorzellen
dd	doppelt destilliert
DE	Deutschland
DEFA5	Defensin Alpha 5

d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
engl.	Englisch
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EU	Expression Unit
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polypose
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	forward-scatter-channel
FR	Frankreich
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Ggf.	Gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-23	Interleukin-23
k.A.	Keine Angabe
kDA	Kilodalton
KRK	Kolorektales Karzinom
L	Liter
LAD1	Ladinin 1
MET	Mesenchymale-Epitheliale-Transition
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mono	Monokultivierte NCM-460 Zellen
mRNA	Messenger RNA

MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells
ng	Nanogramm
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NOD2	Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2
PAA	Polyacrylamid
pANCA	Anti-Neutrophile-zytoplasmatische Antikörper perinukleärer Anfärbung
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
(Pen/Strep)	Penicillin/Streptomycin
pH	Potential des Wasserstoffs
PLS3	Plastin 3
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion
rH ₂ O	relative Luftfeuchtigkeit
RNA	Ribonukleinsäure
ROC-Kurve	Receiver operating characteristic-Kurve
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SE	Schweden
siRNA	Small-Interfering RNA
sog.	Sogenannt
SSC	side-scatter-channel
s.u.	Siehe unten
TBP	TATA-bindendes Protein
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung
TNF-α	Tumornekrosefaktor-Alpha
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
TP53	Tumor Protein P53
TREM-1	Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells-1
u.a.	Unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich

USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt
(v/v)	Volumenprozent
vs.	Versus
(w/v)	Gewicht pro Volumen
z.B.	Zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufig eingesetzte Medikamente zur Remissionsinduktion bei CED Patienten.....	10
Abbildung 2: Die kolorektale Adenom-Karzinom-Sequenz.....	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung von NCM-460 Zellen (in Wells ausgesät) in Monokultur bzw. in indirekter Kokultur mit M1-Makrophagen (in Transwells ausgesät)	43
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Boyden-Chamber-Migrationsassays.....	50
Abbildung 5: Zellmorphologie von mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen.....	54
Abbildung 6: NCM-460 Zellen zeigen unter Anwesenheit von M1-Makrophagen ein vermindertes Wachstum.....	55
Abbildung 7: NCM-460 Zellen wurden für sechs Tage entweder alleine (mono) oder kokultiviert mit M1-Makrophagen (coM1). Anschließend erfolgte eine Expressionsanalyse mittels qRT-PCR und Westernblot.....	56
Abbildung 8: Relative Migrationsaktivität der mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen in der Boydenkammer.....	57
Abbildung 9: Relative Invasionsrate der mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen in der Boydenkammer.....	58
Abbildung 10: Genexpression CTC-assoziiierter Gene in mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen sowie in der kolorektalen Zelllinie HT29.....	60
Abbildung 11: Relative Expression von CK20 und CEACAM5 nach dem siRNA-vermittelten Knockdown in NCM-460 Zellen.....	62
Abbildung 12: Relative Migrations- und Invasionsrate der kokultivierten NCM-460 Zellen nach CK20- oder CEACAM5-Knockdown.....	63

Abbildung 13: Anzahl positiver CK20 Nachweise im Blut von Gesundspendern, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Tumorpatienten.....	67
Abbildung 14: Anzahl positiver DEFA5 Nachweise im Blut von Gesundspendern, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Tumorpatienten.....	67
Abbildung 15: Darstellung der relativen Markerexpression im Blut von Tumorpatienten, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Gesundspendern.....	69
Abbildung 16: Darstellung der relativen Markerexpression im Blut von Tumorpatienten nach UICC Stadien I + II und III + IV, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Gesundspendern.....	70
Abbildung 17: Anzahl positiver CK20 Nachweise im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gruppiert nach Anzahl der Jahre der Erkrankung seit der Erstdiagnose in ≤ 10 , 11-20 und ≥ 21 Jahre.....	71
Abbildung 18: Anzahl positiver DEFA5 Nachweise im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gruppiert nach Anzahl der Jahre der Erkrankung seit der Erstdiagnose in ≤ 10 , 11-20 und ≥ 21 Jahre.....	72
Abbildung 19: Die relative Expression CTC-assoziiertes Marker im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gruppiert nach Anzahl der Jahre der Erkrankung seit der Erstdiagnose in ≤ 10 , 11-20 und ≥ 21 Jahre.....	73
Abbildung 20: Die relative Expression CTC-assoziiertes Marker im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Abhängigkeit von der Therapie durch immunsuppressive Medikamente.....	74
Abbildung 21: Die relative Genexpression CTC-assoziiertes Marker im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen ist unabhängig vom Entzündungsparameter CRP.....	75
Abbildung 22: Die relative Genexpression CTC-assoziiertes Marker im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen ist unabhängig von der Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut.....	76
Abbildung 23: Relative Genexpression CTC-assoziiertes Marker im Blut in Abhängigkeit vom Raucherstatus der Probanden.....	77

Abbildung 24: Graphische Darstellung der ROC-Kurven-Analysen für die CTC-assoziierten Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5..... 80

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: UICC Klassifikation des kolorektalen Karzinoms..... 14

Tabelle 2: Zusammenstellung der Patientencharakteristika für Patienten mit malignen und entzündlichen Darmerkrankungen sowie für Gesundspender..... 65

Tabelle 3: Zusammenstellung der Markerpositivität im Blut von Patienten mit malignen und entzündlichen Darmerkrankungen sowie von Gesundspendern..... 66

1 Einleitung

1.1 Entzündliche Veränderungen des Darms

1.1.1 Divertikulose und Divertikulitis

Die Divertikulose zählt zu einem der häufigsten gastrointestinalen Krankheitsbilder und gilt in Deutschland als Zivilisationskrankheit mit einer Prävalenz von 50% ab dem 70. Lebensjahr (*Herold, 2019*). Dabei ist die Divertikulose durch das Vorhandensein von asymptomatischen Pseudodivertikeln gekennzeichnet. Hierbei handelt es sich um Ausstülpungen von Mukosa und Submukosa durch muskelschwache Bereiche der Darmwand. In Europa treten diese zum größten Teil im Colon sigmoideum auf. Neben dem Alter und der damit assoziierten zunehmenden Bindegewebsschwäche gelten vor allem Adipositas, Nikotinabusus und Alkoholkonsum als Risikofaktoren. Die Rolle der ballaststoffarmen westlichen Ernährungsweise ist in diesem Zusammenhang derzeit umstritten. Selten können auch genetischen Faktoren ursächlich sein (*S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014*).

Treten Symptome wie Unterbauchschmerzen oder Stuhlunregelmäßigkeiten auf, spricht man von einer Divertikelkrankheit. Dazu gehört ebenfalls die akute Divertikulitis, die als häufigste Komplikation der Divertikulose gilt (*Zeuzem et al., 2018*).

Der alleinige Nachweis von Kolondivertikeln, meist nebenbefundlich in einer Koloskopie zur Krebsvorsorge, ist primär nicht behandlungsbedürftig. Die Mehrheit der Patienten bleibt lebenslang symptomlos (*Lock und Germer, 2017*). Kommt es jedoch zu einer akuten Divertikulitis oder einer Divertikelblutung, besteht dringender Therapiebedarf, da vor allem bei immunsupprimierten Patienten eine nicht zu unterschätzende Letalität besteht (*S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014*). Das Risiko für das Auftreten von Komplikationen liegt bei der asymptomatischen Divertikulose bei ca. 4% pro Jahr (*Herold, 2019*).

Definiert ist die akute Divertikulitis durch die Entzündung einzelner Pseudodivertikel und im Verlauf auch von dem umgebenen Gewebe, meist ausgelöst durch eine Retention von Kotsteinen im Lumen der Divertikel (*Zeuzem et al., 2018*).

Klinisch äußert sie sich typischerweise in akut einsetzenden linksseitigen Unterbauchschmerzen, Stuhlunregelmäßigkeiten, Fieber und pathologisch erhöhten Entzündungswerten im Labor (C-reaktives Protein (CRP), Leukozyten). Bei einem komplizierten Verlauf mit Perforation kann auch

ein akutes Abdomen vorliegen. Die Abdomensonographie stellt bei der Primär- und Verlaufsdiagnostik das Verfahren erster Wahl dar, alternativ die Computertomographie (CT).

Die Behandlung der unkomplizierten Divertikulitis ohne Risikofaktoren kann ambulant symptomatisch und ggf. auch ohne antibiotische Therapie erfolgen. Liegen Risikofaktoren (u.a. erhöhte Infektparameter, starke abdominelle Schmerzen) oder der Nachweis von Komplikationen wie Perforation, Abszess oder Blutung vor, handelt es sich um einen komplizierten Verlauf, der einer stationären Behandlung bedarf. Hierbei steht die Beruhigung des Darms durch Nahrungskarenz und parenterale Ernährung unter antiinfektiver Therapie im Vordergrund. In 15-30% der Fälle wird eine chirurgische Therapie nötig. (*S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis, 2014; Zeuzem et al., 2018*).

Die Prognose der unkomplizierten akuten Divertikulitis ist gut, dennoch kommt es bei 20-30% zu rezidivierenden Beschwerden, die häufiger mit Komplikationen assoziiert sind (*Mueller et al., 2005*). Die akute komplizierte Divertikulitis hingegen zeigt eine Letalität von bis zu 15% (*Herold, 2019*).

Als entzündliches Krankheitsbild des Dickdarms sind Patienten mit einer Divertikulitis in der hier vorliegenden Studie mit zur Gruppe der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen gezählt worden, machen dabei aber nur einen geringen Teil der Gesamtkohorte aus. Aufgrund dessen werden im Folgenden die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) intensiver betrachtet.

1.1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Zu den CED zählen die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch schubweise Verläufe bei sehr unterschiedlichen Ausbreitungsmustern aus.

Die Colitis ulcerosa ist ein vom Rektum ausgehendes und sich kontinuierlich nach oral über das gesamte Kolon aszendierendes Entzündungsgeschehen, welches vor allem die Mukosa betrifft und sich in Ulzerationen und Schleimhautblutungen äußert.

Der Morbus Crohn hingegen zeigt ein diskontinuierliches, segmentales Ausbreitungsmuster über den gesamten Gastrointestinaltrakt (GIT) hinweg. Am häufigsten betroffen sind das terminale Ileum und das proximale Kolon. Es handelt sich hierbei um eine transmurale, granulomatöse Entzündungsreaktion (*Zeuzem et al., 2018*).

1.1.2.1 Epidemiologie

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen betreffen circa 2,5-3 Millionen Europäer. Dabei gibt es bezüglich der Prävalenz ein deutliches Nord-Süd und West-Ost Gefälle (*Burisch et al., 2013*).

In Deutschland wird die Inzidenz für Morbus Crohn auf 6,6/100.000, für Colitis ulcerosa auf 3,9/100.000 pro Jahr geschätzt (*Ott et al., 2008*). Aktuelle Studien belegen einen Anstieg der Prävalenz von CED in den letzten Jahren in nahezu allen westlichen Ländern (*Ng et al., 2017; Windsor und Kaplan, 2019*).

Für die Colitis ulcerosa liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 33 Jahren. Dabei existieren zwei Häufigkeitsgipfel: vom 20.-35. und vom 60.-80. Lebensjahr. Das Erkrankungsalter für Morbus Crohn hingegen liegt mit seinem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 15.-35. Lebensjahr etwas früher. Ein zweiter kleinerer Peak liegt mit circa 10-20% der Erkrankten über dem 65. Lebensjahr (*Dorreen et al., 2018; Herold, 2019; Loftus et al., 2007*).

Unterschiede zwischen den Geschlechtern konnten für Morbus Crohn nicht nachgewiesen werden. Bei der Colitis ulcerosa zeigte sich allerdings ein höheres Erkrankungsrisiko für weibliche Patienten während der Kindheit, umgekehrt wurde ab dem 35. Lebensjahr ein höheres Risiko bei Männern festgestellt (*Shah et al., 2018*).

1.1.2.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Die Ätiologie der CED ist bisher nicht vollständig geklärt. Sicher ist aber, dass es sich um ein komplexes multifaktorielles Geschehen handelt. Im Zentrum der aktuellen Forschung stehen genetische, immunologische und mikrobielle Veränderungen sowie Umweltfaktoren.

Eine genetische Komponente ist für beide Erkrankungen beschrieben und seit den frühen 2000er Jahren primär durch Untersuchungen an mono- und dizygoten Zwillingen vor allem für Morbus Crohn dokumentiert. Circa 5-10% der Patienten zeigen eine positive Familienanamnese (*Bonen und Cho, 2003*). Im Vordergrund stehen unter anderem Gene, die mit der epithelialen Abwehr und Barrierefunktion der Darmschleimhaut, der adaptiven Immunabwehr und der Proteinsynthese assoziiert sind. Die *Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 2* (NOD2)-Genmutation stellt beim Morbus Crohn eine der am längsten bekannten und wichtigsten erblichen Komponenten dar. Heterozygote Träger einer krankheitsassoziierten NOD2-Variante haben ein 2-3-fach, homozygote Träger sogar ein bis zu 40-fach erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Morbus Crohn. Pathogenetisch führen Veränderungen im NOD2-Genprodukt zu einer

Fehlfunktion eines Rezeptors in der Erkennung von Bestandteilen von Bakterienzellwänden, was zu einer beeinträchtigten Abwehr pathogener Mikroorganismen führt (*Rosenstiel et al., 2007*).

Ein weiteres Kennzeichen der Pathogenese der CED liegt in der Dysregulation des gastrointestinalen Immunsystems und einer massiven Infiltration der Mukosa durch Immunzellen (*Lee et al., 2018*). Das Überwiegen von proinflammatorischen Faktoren und die Unfähigkeit des angeborenen unspezifischen Immunsystems dagegen vorzugehen wird auch der Dysbalance der gastrointestinalen Mikrobiota zugeschrieben. Bakterielle Antigene, eine erhöhte Membranpermeabilität und eine überschießende Antwort der Immunzellen in Form der Sekretion proinflammatorischer Zytokine führen zur Chronifizierung des Entzündungsgeschehens, dessen Folge eine Gewebsdestruktion darstellt (*De Souza et al., 2017*). Eine entscheidende Rolle haben hierbei vor allem Interleukin-6 (IL-6) und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) (*Allocca et al., 2013; Reinecker et al., 1993*).

Studien, die die gastrointestinale Besiedelung mit Mikroorganismen untersuchten, konnten für CED Patienten eine reduzierte Menge und Diversität von Bakterien feststellen, davon ist aber keine der Veränderungen krankheitsspezifisch (*Knox et al., 2019; Ott et al., 2004*).

Darüber hinaus sind Umweltfaktoren und die Ernährungsweise (z.B. erhöhter Fleischkonsum) als Risikofaktoren für CED beschrieben worden (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa, 2018; Chiara et al., 2020; Guan, 2019*). Während Rauchen bei Patienten mit Morbus Crohn als Risikofaktor für die Entstehung der Erkrankung und als nachteilig für den Verlauf gilt (*Mahid et al., 2006*), scheint es bei Patienten mit Colitis ulcerosa eher ein protektiver Faktor zu sein (*Lawrance et al., 2013*).

1.1.2.3 Die Rolle von proinflammatorischen Makrophagen in der Darmschleimhaut von CED Patienten

Makrophagen sind Effektorzellen des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Abstammend von zirkulierenden Monozyten werden sie in die Gewebe rekrutiert und differenzieren sich zu reifen Makrophagen. Sie gehören zu den phagozytierenden Zellen und haben zusätzlich sekretorische und antigenpräsentierende Funktionen (*Hoffmann et al., 2009; Shapouri-Moghaddam et al., 2018*).

Vereinfacht können Makrophagen sich in zwei verschiedene Phänotypen polarisieren. Dabei spielen bei CED die sogenannten M1-Makrophagen in der Darmschleimhaut eine entscheidende Rolle, deren proinflammatorischer Phänotyp u.a. durch die Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und reaktiven Sauerstoffspezies charakterisiert ist (*Martinez et al., 2006*). Bei immunhistochemischen Untersuchungen von Darmschleimhautproben von CED Patienten und

Kontrollspendern konnten Lissner et al. eine signifikant höhere Anzahl an Makrophagen in Gewebeproben von CED Patienten feststellen. Auch waren diese verglichen mit Ergebnissen aus den Kontrollen in ihrer Verteilung nicht nur auf die Kryptenbasis beschränkt, sondern konnten auch abseits der subepithelialen Schicht nachgewiesen werden. Die anschließende Charakterisierung der Makrophagen zeigte sowohl in Patienten- als auch in Kontrollproben die Präsenz von M2-Makrophagen in ähnlicher Zahl, denen eher eine Rolle in der Gewebsreparatur und Proliferation von Geweben zugeschrieben wird. Ausschließlich im entzündeten Gewebe der CED Patienten konnte eine massive Infiltration durch M1-polarisierte Makrophagen nachgewiesen werden (Lissner et al., 2015).

Während in anderen Geweben die Polarisation der Makrophagen aufgrund ihrer hohen Plastizität wechseln kann und proinflammatorische Makrophagen im Verlauf einer Entzündung zu regulatorischen M2-Makrophagen werden, passiert dies bei CED nicht. Vermutet wird hierbei eine Störung im normalen Differenzierungsprozess, der einerseits durch fehlende Stimulation und andererseits durch den hohen Level an proinflammatorischen Zytokinen begründet sein kann (Bain und Schridde, 2018).

Verschiedene funktionelle Veränderungen in Makrophagen von CED Patienten tragen zur Pathogenese der chronischen Entzündung bei, z.B. die vermehrte Expression von Toll-Like-Rezeptoren (TLR), die bei Aktivierung zu überschießenden proinflammatorischen Immunantworten führen können sowie die verminderte IL-10 Produktion durch aktivierte Makrophagen, die zur Dysbalance des gastrointestinalen Mikrobioms beiträgt (Steinbach und Plevy, 2014). Das pathologische Sekretionsmuster der Makrophagen in CED Patienten betrifft auch TNF- α (Reinecker et al., 1993). Die erhöhte TNF- α Sekretion erleichtert weiteren Immunzellen die Infiltration des intestinalen Gewebes und die Produktion von proinflammatorischen und antiapoptotisch wirkenden Zytokinen (Hoffmann et al., 2009). Zusätzlich konnte eine erhöhte TNF- α Sekretion durch mononukleäre Zellen der Lamina propria von Morbus Crohn Patienten mit einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines akuten Schubes im folgenden Jahr assoziiert werden (Schreiber et al., 1999). Als prominente Entzündungszelle in der Darmschleimhaut von CED Patienten, die über zahlreiche Mechanismen den Krankheitsausbruch und die Chronifizierung mit beeinflusst, wurde sich in der vorliegenden Arbeit dafür entschieden, M1-Makrophagen stellvertretend für das proinflammatorische Entzündungsinfiltrat von CED Patienten in den *in vitro* Versuchen einzusetzen.

1.1.2.4 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und kolorektale Karzinome

Ein Colitis-assoziiertes Karzinom (CAC) gilt als die gefürchtetste Langzeitfolge einer CED. Erstmals 1925 wurde durch Crohn und Rosenberg ein Zusammenhang zwischen CED und der Entstehung von kolorektalen Karzinomen (KRK) erkannt (*Crohn und Rosenberg, 1925*). Zahlreiche Studien haben seither versucht, das Krebsrisiko für CED Patienten zu beziffern.

Die im Jahr 2001 von Eaden et al. durchgeführte Metaanalyse zeigte eine totale Inzidenz von 3/1000 Personenjahre für die Entwicklung eines CAC bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Abhängig von der Erkrankungsdauer ergaben sich kumulative Risiken von 2% nach 10 Jahren, 8% nach 20 und 18% nach 30 Jahren Erkrankung. Ab dem achten Jahr nach Symptommanifestation steigt das CAC Risiko jährlich um 0,5-1% (*Eaden et al., 2001*). 2012 zeigten Jess et al. ein 2,4-fach erhöhtes Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung (*Jess et al., 2012*).

Weiterhin wird vor allem bei der Colitis ulcerosa der Krebsprävention ein hoher Stellenwert zugeschrieben. Für den Morbus Crohn liegen weniger explizite Daten zur Karzinomwahrscheinlichkeit vor. Das liegt insbesondere an der höheren Rate an chirurgischen Interventionen bei Morbus Crohn Patienten, in denen das „Risikoorgan“ für die Entstehung eines Karzinoms meist (teil-)reseziert wird (*Hoffmann et al., 2009*). Doch auch hier konnten einzelne Studien eine Risikoerhöhung zeigen.

Gillen et al. zum Beispiel untersuchte das CAC Risiko in CED Patienten mit ausgedehnter Colitis. Hier zeigte sich sowohl für die Colitis ulcerosa als auch für den Morbus Crohn eine Risikoerhöhung um das 19- bzw. 18-fache im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung (*Gillen et al., 1994*).

Neben der Dauer könnten weitere Faktoren der Erkrankung eine besondere Rolle in der Entstehung eines malignen Tumors spielen. In Subanalysen konnte dies vor allem für das Patientenalter zur Diagnose, die anatomische Ausdehnung der Erkrankung und eine familiäre Vorbelastung dargelegt werden (*Askling et al., 2001; Eaden et al., 2001; Jess et al., 2012*).

Dabei unterliegt die Entstehung eines KRK auf Grundlage einer CED teilweise anderen Faktoren als beim sporadischen Kolonkarzinom. Dies führt dazu, dass der Prozess der Karzinogenese sich schneller und auch multifokal abspielen kann (*Axelrad et al., 2016*). Während beim sporadischen KRK vor allem genetische- und Umwelteinflüsse relevant sind, sind es beim CAC eher das chronische Entzündungsgeschehen sowie reaktive Sauerstoffspezies (*Foersch und Neurath, 2014*). Ein oxidativer Stress, ausgelöst von Zellen des unspezifischen Immunsystems führt auf Dauer zu einer Zunahme von genetischer Instabilität und Mutationen und kann so mit die Grundlage für eine maligne Veränderung sein (*Ferguson, 2010*). Die oben beschriebene erhöhte Konzentration

von proinflammatorischen Zytokinen in der Darmschleimhaut von CED Patienten ist neben der Aufrechterhaltung und Chronifizierung der Erkrankung auch im Verdacht die maligne Transformation voranzutreiben (*Taniguchi und Karin, 2014*).

Kim et al. konnten in einem Mausmodell die antikarzinogene Wirkung von TNF- α -Blockern zeigen. In Mäusen mit induzierter chronischer Colitis entwickelten sich unter Gabe von Infliximab, einem monoklonalen Anti-TNF- α -Antikörper, nur in 16,7% kolorektale Karzinome, während in der Kontrollgruppe mehr als 75% der Mäuse ein Malignom aufwiesen (*Kim et al., 2010*). Dabei liegt das karzinogene Potential von TNF- α vor allem in der Induktion von DNA-Schäden sowie in seiner pro-proliferativen und -angiogenetischen Wirkung (*Foersch und Neurath, 2014*).

Die antientzündliche Behandlung ist bei CED also nicht nur als eine Symptom-bekämpfende Therapie, sondern auch als präventive Maßnahme zur Vermeidung eines CAC anzusehen.

Angelehnt an die aktuellen Forschungsergebnisse gibt die deutsche Leitlinie für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn genaue Vorgaben zur Durchführung von Krebs-Vorsorgeuntersuchungen (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa, 2018; S3-Leitlinie Morbus Crohn, 2014*).

Berücksichtigt wird hier einerseits die Erkrankungsdauer andererseits auch die in einigen Studien nachgewiesene höhere Mortalität von CAC im Vergleich zum sporadischen KRK (*Munkholm, 2003*). Dies schlägt sich in den Leitlinien in periodisch stattfindenden Vorsorgekoloskopien des „Risikoorgans“ Kolon sowie der endoskopischen Entfernung von potentiell prämaligen Veränderungen der Darmschleimhaut nieder.

Bei der Colitis ulcerosa wird eine erste Vorsorgekoloskopie mit Biopsieentnahme nach 6-8 Jahren nach der Erstmanifestation empfohlen und je nach individueller Risikostratifikation in Intervallen von 1-4 Jahren wiederholt. Bei einem alleinigen Befall des Rektums wird von einer Aufnahme ins Vorsorgeprogramm bei fehlender CAC Risikoerhöhung bei der Proktitis ulcerosa abgesehen (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa, 2018*). Für Patienten mit Morbus Crohn und Befall des Dünndarms wird keine spezifische Überwachung empfohlen. Für alle anderen Patienten mit einem Morbus Crohn schließt sich die Leitlinie den Empfehlungen für die Überwachung der Colitis ulcerosa vollständig an (*S3-Leitlinie Morbus Crohn, 2014*).

1.1.2.5 Symptomatik und Diagnostik

Die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn unterscheiden sich teilweise durch ihr klinisches Bild, als allgemeine Leitsymptome für eine CED gelten aber Diarrhö und Bauchschmerzen (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa, 2018*).

Bei der Colitis ulcerosa stehen schleimig-blutige, teilweise auch eitrige Durchfälle im Vordergrund (Stange et al., 2008; Hoffmann et al., 2009). Die abdominellen Beschwerden werden dabei mehrheitlich im linken Unterbauch lokalisiert. Es werden drei Verlaufsformen einer Colitis ulcerosa unterschieden: Die Mehrheit der Patienten (85%) wird der Gruppe der *chronisch-rezidivierenden Colitis ulcerosa* zugerechnet. Hierbei wechseln sich komplette Remission mit akuten Exazerbationen ab. Bei einem *chronisch-persistierenden Verlauf* (10% der Patienten) bestehen dauerhaft Beschwerden unterschiedlicher Stärke. Fünf Prozent der Patienten zeigen einen *akut-fulminanten Verlauf*, der mit einer Letalität von 30% einhergeht. In Folge der Veränderungen der Darmschleimhaut und der blutigen Durchfälle können Gewichtsverlust, Leistungsminderung und Müdigkeit sowie Wachstumsstörungen im Kindesalter Folgeerscheinungen der Erkrankung sein (Stange et al., 2008; Herold, 2019). Zu den schwerwiegenden Komplikationen zählen massive Blutungen, das toxische Megakolon, die Darmperforation und das Kolonkarzinom (Zeuzem et al., 2018; Crohn und Rosenberg, 1925).

Der Morbus Crohn zeigt im akuten Schub bei 70-80% der Patienten vor allem schleimig-wässrige Durchfälle und kolikartige rechtsseitige Bauchschmerzen. Begleitendes Fieber oder perianale Blutungen kommen je nach Befallsmuster nur in 10-20% der Fälle vor. Im Verlauf der Erkrankung kommt es bei circa einem Drittel der Patienten zu einem Gewichtsverlust von bis zu 20% (Stange et al., 2006; Hoffmann et al., 2009). Häufige Komplikation des Morbus Crohn stellen Fisteln, Abszesse sowie Stenosen und Strikturen dar (Herold, 2019).

Die Diagnose einer CED besteht aus einer Kombination von Anamnese, klinischer Untersuchung sowie laborchemischer, endoskopischer, histologischer und radiologischer Befunde (S3-Leitlinie Colitis ulcerosa, 2018; S3-Leitlinie Morbus Crohn, 2014).

Zur Primärdiagnostik gehört immer die Ileokoloskopie mit Entnahme von Stufenbiopsien. Bei Verdacht auf einen Morbus Crohn muss zusätzlich eine Ösophagogastroduodenoskopie erfolgen. So können die typischen makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Schleimhaut nachgewiesen werden.

Eine Stuhldiagnostik dient einerseits dem Ausschluss infektiöser Darmerkrankungen, andererseits lässt sich Calprotectin als Marker einer intestinalen Entzündungsreaktion nachweisen (Zeuzem et al., 2018). Eine Metaanalyse von Mosli et al. konnte für Calprotectin eine Sensitivität für eine CED von 88% Prozent feststellen (Mosli et al., 2015).

Laborchemische Veränderungen lassen sich vorwiegend während eines aktiven Schubs nachweisen. Hier kommt es zur Erhöhung von Entzündungsparametern wie CRP, Leukozyten und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG).

1.1.2.6 Therapeutische Möglichkeiten und Prognose

Die Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist komplex, daher werden im folgenden Abschnitt nur die Grundzüge der Behandlung zusammengefasst.

Als primäres Therapieziel gilt die Remissionsinduktion und ein steroidfreier Remissionserhalt (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa*, 2018). Dabei sind das Befallsmuster, die aktuelle Krankheitsaktivität und der Verlauf entscheidend für die Therapieplanung. Primär steht die konservativ-medikamentöse Therapie im Vordergrund. Interventionelle oder chirurgische Optionen kommen vor allem bei Komplikationen zum Einsatz (*Zeuzem et al.*, 2018).

Bei leicht bis mäßig aktiver Colitis Crohn oder -ulcerosa wird Mesalazin (retardiert: 5-ASA) topisch und/oder oral zur primären Remissionsinduktion verwendet. Bei Nicht-Ansprechen auf die Therapie werden zusätzlich topische und systemische Steroide eingesetzt.

Eine initiale systemische Therapie mit Glukokortikoiden sollte bei einem schwer verlaufenden Schub zur Anwendung kommen.

Bei einer steroidrefraktären Situation oder beim Vorliegen von Kontraindikationen gegen eine systemische Glukokortikoidtherapie werden sowohl bei der Colitis ulcerosa als auch beim Morbus Crohn Anti-TNF- α -Antikörper (sog. Biologika) wie Infliximab oder Adalimumab verwendet. Bei der Colitis ulcerosa kommen als weitere Immunsuppressiva Calcineurininhibitoren (Ciclosporin, Tacrolimus) oder JAK-Hemmstoffe (Tofacitinib), beim Morbus Crohn Thiopurine wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin zum Einsatz (**Abbildung 1**) (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa*, 2018; *S3-Leitlinie Morbus Crohn*, 2014).

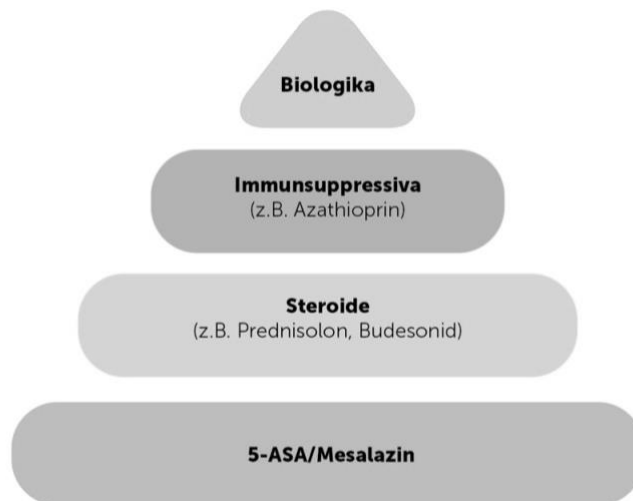


Abbildung 1: Häufig eingesetzte Medikamente zur Remissionsinduktion bei CED Patienten
 (Kompetenznetz Darmerkrankungen e.V. "Informationen zu häufig eingesetzten Medikamenten." Verfügbar unter <https://www.kompetenznetz-darmerkrankungen.de/medikamente> [14.09.2020])

Der Remissionserhalt sollte steroidfrei sein und kann langfristig mit Thiopurinen, Anti-TNF- α -Antikörpern und bei der Colitis ulcerosa auch mit 5-ASA erreicht werden (*Herold, 2019*).

Die chirurgische Therapie kommt beim Morbus Crohn nur bei Komplikationen zum Einsatz. Hierzu zählen in erster Linie dringliche Indikationen wie Perforation, akuter Ileus, Blutungen und die relativen Indikationen Fisteln, Abszesse, Strikturen und Stenosen. Da der Morbus Crohn im gesamten Gastrointestinaltrakt vorkommen kann und es bei der Mehrzahl der Patienten nicht bei nur einer Operation bleibt, sollte möglichst organerhaltend operiert werden, um unter anderem ein Kurzdarmsyndrom zu vermeiden.

Grundsätzlich kann die Colitis ulcerosa durch eine chirurgische Therapie kurativ behandelt werden. Eine totale Proktokolektomie kommt aber nur dann zum Einsatz, wenn unter optimaler remissionsinduzierender Therapie eine Beschwerdeverschlechterung oder keine -verbesserung innerhalb der ersten 4-7 Tage stattfindet, außerdem bei Komplikationen wie dem toxischen Megakolon oder massiver Blutung (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa, 2018; Zeuzem et al., 2018*).

Obwohl der Morbus Crohn nach wie vor nicht heilbar ist, besteht bei optimaler Therapie eine annähernd normale Lebenserwartung. Bei der Colitis ulcerosa ist das Überleben von der Krankheitsausdehnung abhängig. Für die alleinige Proktosigmoiditis besteht keine Einschränkung (*Herold, 2019*). Die Pankolitis, der akut fulminante Verlauf sowie die Komplikation des toxischen Megakolons sind mit eingeschränkter Lebenserwartung assoziiert. Insgesamt besteht ein 1,7-fach erhöhtes Sterblichkeitsrisiko (*Zeuzem et al., 2018*).

1.2 Maligne Veränderungen des Darms

1.2.1 Das kolorektale Adenokarzinom

1.2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Karzinome des Kolons und des Rektums sind mit 1,8 Millionen Neuerkrankungen im Jahr 2018 eine der häufigsten Krebsdiagnosen weltweit (*Globocan-The Global Cancer Observatory, 2019*). In Deutschland wurden 2018 circa 60.000 Neuerkrankungen registriert, 26.710 bei der Frau und 33.920 beim Mann. Dies entspricht bei der Frau der zweithäufigsten, beim Mann der dritthäufigsten Tumorlokalisation einer Krebsneuerkrankung. Innerhalb der Diagnosegruppe Darmkrebs stellen die KRK mit zwei Drittel aller Fälle die deutliche Mehrheit dar (*Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021*). Dabei befinden sich 50% der Malignome im Rektum, 30% im Sigma, 10% im Coecum/Colon ascendens und 10% im übrigen Kolon (*Herold, 2019*).

Das KRK ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters mit einem mittleren Erkrankungsalter zwischen 72 und 76 Jahren. Mehr als 50% der Neudiagnosen werden bei Patienten gestellt, die älter als 70 Jahre sind. Nur 10% der Patienten sind unter 55 (*Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021*).

Seit Einführung der Screening-Koloskopie im Jahr 2002 konnte sowohl ein Rückgang der Inzidenz um ca. 14% beobachtet werden als auch eine Abnahme der altersstandardisierten Mortalität bei Frauen um 26,5% und bei Männern um 20,8% (*Brenner et al., 2016*). Die aktuelle relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen und Männern liegt über alle Tumorstadien hinweg bei 65% bzw. 63% (*Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021*).

Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung eines sporadischen KRK sind neben dem Alter in erster Linie Tabakkonsum und Adipositas (*Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021*). Aber auch ernährungsbezogene Faktoren scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen: Unter anderem verarbeitetes Fleisch und eine ballaststoffarme Ernährung erhöhen das KRK-Risiko (*World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research, 2018*). Auch die fehlende regelmäßige körperliche Aktivität hat nachweislich einen negativen Einfluss (*S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*).

1.2.1.2 Die kolorektale Tumorgenese

Die überwiegende Mehrheit (95%) der KRK sind histologisch Adenokarzinome und entstehen aus adenomatösen Vorläuferläsionen. Hierbei folgen die meisten Tumore bei ihrer Entstehung der Adenom-Karzinom-Sequenz. Dieses Modell der Mehrschritt-Entstehung kolorektaler Karzinome wurde in den späten 1980er Jahren von Vogelstein und Fearon entwickelt (*Vogelstein et al., 1988; Fearon und Vogelstein, 1990*). Entscheidend für die Tumorprogression ist die schrittweise Akkumulierung genetischer Alterationen, die in ihrer Gesamtheit die Entwicklung zum Karzinom vorantreiben (**Abbildung 2**).

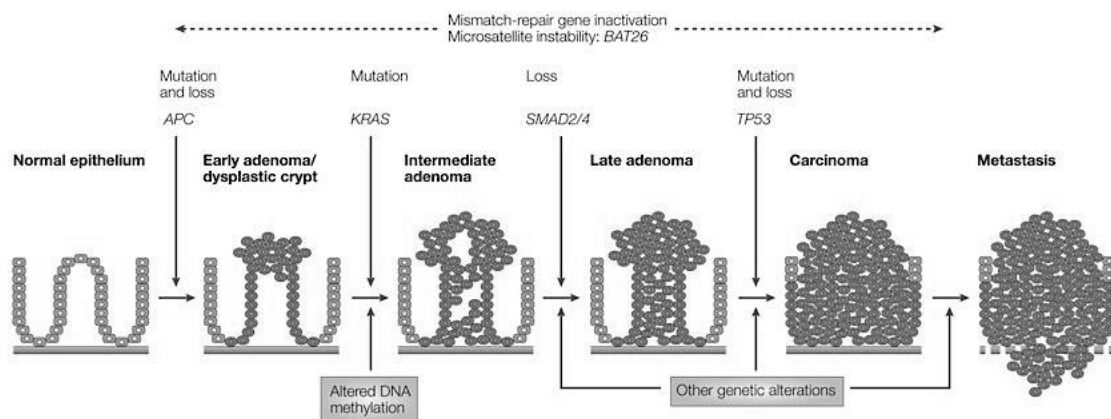


Abbildung 2: Die kolorektale Adenom-Karzinom-Sequenz: Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms nach der Adenom-Karzinom-Sequenz ist charakterisiert durch die Akkumulierung von Mutationen bestimmter Gene. Die jeweils zunehmende maligne Transformation der kolorektalen Epithelzellen führt über frühe Adenome bzw. niedriggradige Dysplasien zu späten Adenomen mit hochgradigen Dysplasien und zum invasiven Karzinom. Die Abbildung stellt eine mögliche Reihenfolge des Auftretens der Tumor-begünstigenden Mutationen dar.

(Entnommen aus: Davies et al., 2005)

Die kolorektale Epithelzellschicht ist der Bereich, in dem sich die meisten pathologischen Entwicklungen abspielen, die mit der Entstehung eines Karzinoms assoziiert werden. Einer der ersten Schritte der kolorektalen Tumorgenese ist der Verlust vom APC Gen auf Chromosom fünf, einem Tumorsuppressorgen (*Weinberg, 2007*). Im Anschluss gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Sequenzen, im Rahmen derer bestimmte Defekte im weiteren Verlauf der Tumorgenese entstehen. **Abbildung 2** zeigt schematisch eine der möglichen Abfolgen des Auftretens von Treibermutationen.

Als weitere bedeutende genetische Alterationen, neben dem Verlust der APC Genfunktion, tritt in 40-50% der Fälle eine K-Ras Mutation auf, der Verlust von p53 in 50-70% sowie in 80% eine Inaktivierung von Genen auf Chromosom 18q. Auch epigenetische Veränderungen wie die

Hypomethylierung, die zur genetischen Instabilität beitragen kann, stellt einen weiteren begünstigenden Faktor in der Adenom-Karzinom-Sequenz dar (*Weinberg, 2007*).

Neben der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz bestehen noch weitere Pfade der Entstehung eines KRK: Etwa 20% entstehen entlang des serratierten Karzinogenesewegs, bei dem die initialen Mutationen in den Protoonkogenen BRAF und KRAS auftreten (*Baretton, 2010; Herold, 2019*).

1.2.1.3 Symptomatik und Diagnostik

Vor allem in der frühen Erkrankungsphase zeigen KRK keine charakteristischen Symptome und werden daher meist erst in einem späteren Stadium entdeckt. Allerdings lassen sich Warnsignale definieren, deren längeres Auftreten einer Abklärung durch den Arzt bedürfen, da sie auf ein malignes Geschehen im Darm hinweisen. Hierzu zählen Änderungen der Stuhlgewohnheit z.B. Obstipationen oder paradoxe Diarrhöen, Verdauungsbeschwerden und rektale Blutabgänge (*Deutsches Krebsforschungszentrum, 2016*). Genauso können auch das Vorliegen einer Eisenmangelanämie und tastbare abdominelle Tumore für ein KRK sprechen (*Del Giudice et al., 2014*). Unspezifische, aber auch mit KRK assoziierte Symptome sind außerdem Leistungsminderung, Bauchschmerzen und vor allem in späten Stadien die klassische B-Symptomatik bestehend aus Gewichtsverlust, Fieber und Nachtschweiß sowie Ileuserscheinungen (*Herold, 2019; Deutsches Krebsforschungszentrum, 2016*).

In der Früherkennung spielen neben der Vorsorgekoloskopie auch der Test auf okkultes Blut im Stuhl eine entscheidende Rolle (*Bundesgesundheitsministerium, 2019; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*).

Die Diagnostik eines KRK besteht standardmäßig aus einer kompletten Koloskopie inklusive Biopsie-Entnahme zur histologischen Sicherung des Befundes. Zur Ausbreitungsdiagnostik gehört außerdem die digital-rektale Untersuchung, eine Abdomensonographie und ein Röntgen-Thorax. Laborchemisch sollte die Bestimmung des Tumormarkers Carcinoembryonales Antigen (CEA) erfolgen. Bei rektalen Karzinomen werden zur Therapieplanung außerdem eine starre Rektoskopie und ein MRT des Beckens zur Abklärung der lokalen Tumorausbreitung durchgeführt (*S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019; Lammert, 2019*).

1.2.1.4 Therapeutische Möglichkeiten und Prognose

Die Therapie kolorektaler Karzinome erfolgt stadienabhängig (**Tabelle 1**) und ist einerseits von der Lokalisation und Ausdehnung des Tumors sowie von den molekularbiologischen Eigenschaften der Tumorzellen, andererseits aber auch vom Allgemeinzustand des Patienten abhängig (*S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*).

Tabelle 1: UICC Klassifikation des kolorektalen Karzinoms: Die Tabelle zeigt eine vereinfachte Darstellung der Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome nach UICC 2010 (Union International for Cancer Control) (Entnommen aus: *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*)

UICC 2010	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1 / T2	N0	M0
Stadium II	T3 / T4	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1 / N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

In einem kurativen *Setting* erfolgt bei Karzinomen des Kolons eine primär chirurgische Therapie. Risikoarme Vorstufen oder frühe Formen eines malignen Tumors (UICC 0) lassen sich hierbei gegebenenfalls sogar endoskopisch reseziieren.

Die radikale Resektion des betroffenen Darmabschnitts sollte *en-bloc* und mit ausreichendem Sicherheitsabstand durchgeführt werden. Prognostisch entscheidend ist außerdem die Entfernung des regionären Lymphabflussgebiets. Dazu gehört die Resektion von mindestens zwölf Lymphknoten, die in die postoperative pathohistologische Untersuchung eingehen (N-Klassifikation) (*Herold, 2019; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*). Kann pathohistologisch ein Lymphknotenbefall nachgewiesen werden (UICC III), schließt sich eine adjuvante Chemotherapie an (*S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*).

Die Unterschiede in der Behandlung des nicht metastasierten Rektumkarzinoms bestehen in der Durchführung einer neoadjuvanten Radio- und/oder Chemotherapie bei klinisch T3/T4 und/oder N1 eingestuften Tumoren, wobei Karzinome des oberen Rektumdrittels wie Kolonkarzinome behandelt werden (*Feeney et al., 2019; S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*). Das anschließende Operationsverfahren ist vor allem in Hinblick auf einen möglichen Erhalt der Sphinkterfunktion auszuwählen.

Andere Therapiemöglichkeiten ergeben sich beim Vorliegen von Fernmetastasen (UICC IV). Etwa 25% der Patienten zeigen bereits zum Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen, circa 50% der Patienten entwickeln diese erst im Verlauf (*Heinrich und Lang, 2013*). Nach der Kaskadentheorie

werden primär Leber und Lunge infiltriert, erst später sind andere Organe betroffen (*Herold, 2019*). Die Therapieplanung ist hierbei vor allem von der möglichen Resektabilität der Fernmetastasen, dem Allgemeinzustand des Patienten und der Molekularbiologie des Tumors abhängig und sollte individuell für jeden Patienten in einer interdisziplinären Tumorkonferenz diskutiert werden. Auch in einem solchen fortgeschrittenen Krankheitsstadium kann ein kurativer Behandlungsansatz verfolgt werden, wenn es sich um resektable, gut zugängliche Metastasen der Leber oder der Lunge handelt. In diesem günstigen Fall kann sich die 5-Jahres-Überlebensrate für UICC IV Patienten von circa 10% auf 50% verbessern (*Heinrich und Lang, 2013*). Die Resektabilität der Metastasen kann hierbei auch durch eine präoperative Chemotherapie erreicht werden.

In der palliativen Behandlungssituation steht vor allem der Allgemeinzustand und die Lebensqualität des Patienten im Vordergrund und hat maßgeblichen Einfluss auf die Intensität einer systemischen Therapie. Je nach molekularpathologischer Subgruppe können zielgerichtete Substanzen mit Chemotherapeutika kombiniert werden (*S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*). Chirurgisch kommen hier außerdem Anus praeter- oder Stentanlagen und Umgehungsanastomosen zum Einsatz (*Herold, 2019*).

Die Prognose kolorektaler Karzinome ist stark abhängig vom jeweiligen Tumorstadium. Tumore des Stadiums UICC I zeigen mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von >90% die beste Langzeitprognose. Im Stadium II kann immer noch eine Rate von 83% erreicht werden. Die Prognose für das Stadium III ist vom pT- und pN-Stadium abhängig und liegt zwischen 44-83%. Beim Vorliegen von Metastasen (Stadium IV) sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate drastisch und liegt nur noch zwischen 8-16% (*Herold, 2019; Holmer und Kreis, 2017; Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021*).

1.3 Zirkulierende Tumorzellen

1.3.1 Klinische Bedeutung

Als zirkulierende Tumorzellen (CTC) werden diejenigen malignen Zellen bezeichnet, die entweder vom Primärtumor oder einer Metastase abstammen und im peripheren Blut nachweisbar sind. Sie gelten als Wegbereiter der Metastasierung (*Yang et al., 2019*).

Der Nachweis solcher CTC im Blut von Krebspatienten und deren Aussagekraft ist schon seit einigen Jahren Forschungsthema verschiedener Gruppen. Dabei sind vor allem Fragen zur optimalen Detektionsmethode zu klären sowie ihre diagnostische, prognostische, prädiktive und therapeutische Validität zu prüfen.

Metastasen gelten weiterhin als die Hauptursache für den Tod durch ein Karzinom (*Pantel und Brakenhoff, 2004*). Als potentielle Wegbereiter der Metastasierung spielen CTC hier eine entscheidende Rolle. Trotz erfolgreicher „kurativer“ Tumorresektion entstehen bei 10-30% der KRK Patienten im Verlauf Rezidive inklusive Metastasen. Dies lässt Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Loslösung der CTC von ihrem Primärtumor zu. CTC mit dem Potential zur Metastasenbildung müssen dementsprechend im Zuge der Operation oder bereits davor den Zugang zum Blut gefunden haben (*Hardingham et al., 2000*).

Die im Vergleich zu den Zellen des Blutes verschwindend niedrige Anzahl an Tumorzellen lässt sich durch herkömmliche bildgebende oder laborchemische Verfahren nicht nachweisen, daher erscheinen CTC vor allem mit Hinblick auf das Prinzip der *Liquid Biopsy* vielversprechend. Aktuell wird einerseits die Anzahl an CTC pro Blutvolumen und andererseits der Nachweis über die Expression von Tumorzell-assoziierten Markern genutzt.

Bislang kommt die Detektion von CTC bei soliden Tumoren allerdings zu keiner routinenhaften Anwendung in der klinischen Praxis. Verschiedene Studien zeigen aber schon jetzt wegweisende Ergebnisse zur Nutzbarkeit von CTC im zukünftigen klinischen Alltag in der Behandlung solider Tumore (*Jacobson et al., 2019; Wu et al., 2020*).

Der prognostische Nutzen von CTC ist der bisher am häufigsten untersuchte Aspekt. Eine negative Korrelation von einem Nachweis von CTC oberhalb eines Cut-Off Wertes und dem Überleben des Patienten konnte für verschiedene Krebsentitäten, unter anderem Mamma, Lunge und Kolon, nachgewiesen werden. Teilweise konnte hier auch eine Assoziation zum fortschreitenden Krankheitsstadium gezeigt werden (*Bidard et al., 2014; Hinz et al., 2017; Krebs et al., 2011; Yang et al., 2018*).

CTC als Indikator für eine systemische Erkrankung wurden vor allem bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinomen untersucht. Die Datenlage zur Nutzbarkeit der CTC-Detektion bei nicht-metastasierten Patienten ist noch nicht abschließend geklärt. In einer Metaanalyse konnte auch für solche Patienten eine negative Korrelation zwischen Positivität für CTC und dem krankheitsfreien- und Gesamtüberleben gezeigt werden (*Yang et al., 2017*).

Auch für das therapeutische Regime könnte der Nachweis von CTC Folgen haben. Eine Phase II Studie untersuchte die Anzahl von CTC in Patienten mit fortgeschrittenen KRK. Bei einem Nachweis einer hohen Anzahl an CTC zeigte sich ein Vorteil für die Anwendung einer intensiven 4-Komponenten Chemotherapie im Vergleich zu Patienten mit einem Nachweis auf einem niedrigeren Level (*Krebs et al., 2015*). Hier steht vor allem die Idee im Vordergrund, Patienten nach ihrem individuellen Rezidivrisiko zu stratifizieren und die Anwendung einer aggressiven adjuvanten Chemotherapie mit hoher Toxizität z.B. bei Patienten ohne positiven CTC Nachweis oder einem Nachweis unter dem Cut-Off Wert zu vermeiden.

Für das Therapieansprechen und die schnelle Identifizierung einer ineffektiven Behandlung konnten Li et al. die Nutzbarkeit von CTC-Veränderungen unter der Therapie von Patienten mit Magenkarzinomen nachweisen (*Li et al., 2016*).

Ausgehend davon, dass die Loslösung von Tumorzellen und die mögliche Metastasenbildung ein früher Schritt in der Karzinogenese sind, bietet der Nachweis von CTC außerdem die Möglichkeit für eine frühe Entdeckung einer malignen Erkrankung. Bisher kam dies aufgrund von unzureichender Sensitivität und Spezifität zu keiner Anwendung in der frühen klinischen Diagnostik oder gar in einem Screening der Allgemeinbevölkerung (*Yang et al., 2019*).

Der Nachweis von CTC gelingt mit verschiedenen Methoden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Anreicherung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) und damit der CTC über eine Dichtegradientenzentrifugation, in denen anschließend die Expression CTC-assoziiierter Gene mittels quantitativer Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) analysiert wurde. Die hierfür verwendeten molekularen Marker werden im Folgenden vorgestellt.

1.3.2 Molekulare Marker zur Detektion zirkulierender Tumorzellen

1.3.2.1 Cytokeratin 20 (CK20)

Cytokeratin 20 (CK20) zählt als Intermediärfilament zur Struktur des Zytoskeletts epithelialer Zellen. Hier trägt es entscheidend zur strukturellen Integrität der Zellen bei und schützt vor mechanischem und nicht-mechanischem Stress (*Fuchs und Weber, 1994; Zhou et al., 2003*).

Die Expression von CK20 konnte besonders für die epithelialen Zellen der Mukosa des Gastrointestinaltrakts, aber auch für andere Gewebe wie Blase, Prostata und Haut gezeigt werden (GeneCards®; Moll *et al.*, 1990; Polari *et al.*, 2020).

Von diesen Geweben abstammende Tumorzellen weisen im Regelfall auch eine Expression von CK20 auf, welche z.B. in der histopathologischen Beurteilung von Geweben und deren Herkunft zu Rate gezogen wird (Bayrak *et al.*, 2011).

Im Gegensatz zu anderen Zytokeratinen wird CK20 nicht in hämatopoetischen Zellen exprimiert und eignet sich daher besonders als Marker für die RT-PCR zur Detektion von CTC im peripheren Blut (Burchill *et al.*, 1995).

Mit Blick auf KRK konnten Hendricks *et al.* in einer Studie mit 381 Patienten mit KRK verschiedener Stadien bei 53% der Patienten mittels CK20-RT-PCR eine Positivität nachweisen und eine deutliche Korrelation mit der Prognose zeigen. Nach Bestimmung eines Cut-Off Wertes für die CK20 Expression zeigte sich für die Patientengruppe mit höherer Expression ein 5-Jahres-Gesamtüberleben von 39.8%, verglichen zu 69.6% in der Gruppe mit Expressionswerten unterhalb des Cut-Off Wertes. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der CK20-Expressionsstärke nachgewiesen werden: so zeigten UICC IV oder pT4 Tumore deutlich häufiger einen Wert oberhalb des Cut-Off Wertes (Hendricks *et al.*, 2018). Auch Hinz *et al.* kamen zu ähnlichen Ergebnissen. In einer Studie mit 299 Kolonkarzinompatienten korrelierten höhere UICC- oder pT-Stadien signifikant mit der Detektionsrate von CK20-positiven CTC. Im Einklang damit waren die höheren Detektionsraten in Patienten mit synchronen Lebermetastasen (M1: 62%; M0: 35%). Keine Korrelation konnte hingegen für das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (pN-Stadium) gezeigt werden (Hinz *et al.*, 2017).

Konträr dazu fanden Hinz *et al.* in einer weiteren Studie mit Rektumkarzinompatienten keine Assoziation zwischen dem Nachweis von CTC und Tumoreigenschaften oder dem Gesamtüberleben der Patienten. Die Detektionsrate von CTC war hier aber mit dem Ansprechen auf eine neoadjuvanten Radiochemotherapie korrelierbar. Ein Therapieansprechen drückte sich hier in einer niedrigeren Inzidenz von CTC im Blut der Patienten aus (Hinz *et al.*, 2015).

Aufgrund der oben beschriebenen Forschungsergebnisse gilt CK20 als einer der vielversprechendsten Marker für die Detektion und klinischen Nutzung von CTC bei KRK.

1.3.2.2 *Plastin 3 (PLS3)*

Plastin 3 (PLS3) gehört zur Familie der Aktin-bindenden Proteine. Aktin ist ein zytoplasmatisches Strukturprotein, welches als Teil der kontraktiven Einheit in Muskelzellen, aber auch als Bestandteil der Mikrofilamente in fast allen Geweben des menschlichen Körpers zu finden ist. Als organisierendes Element der Aktin-Mikrofilamente konnte PLS3 in intestinalen Mikrovilli, Stereozilien und Pseudopodien von Bindegewebszellen nachgewiesen werden (*Lin et al., 1993*; UniProt).

2013 hatte die Forschungsgruppe um Yokobori et al. PLS3 mit Hilfe einer Microarray-Analyse von 132 KRK Proben als neuen potentiellen Marker für die Detektion von CTC in Kolorektalkarzinompatienten identifiziert. Im weiteren Verlauf konnte PLS3 im Blut von Patienten mit KRK nachgewiesen werden, aber nicht im Blut gesunder Individuen. Eine hohe Expression war in der Kohorte außerdem mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer schlechteren Prognose assoziiert. Eine weitere Untersuchung bestätigte, dass auch Tumorzellen, die eine Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) durchlaufen hatten weiterhin PLS3 exprimierten und somit der Marker während der Tumorprogression nicht verloren geht (*Yokobori et al., 2013*). Trotz dieser Resultate haben sich bisher nur wenige andere Studien mit PLS3 als CTC-Marker befasst. Kujawski et al. konnten eine alters- oder geschlechtsabhängige Expression ausschließen. Allerdings konnte hier keine Assoziation zwischen dem T- oder M-Stadium des KRK und der PLS3 Expression gezeigt werden, dafür war das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (pN1) mit einer höheren PLS3 Expression signifikant korrelierbar (*Kujawski et al., 2015*).

Auch für andere solide Tumore wie dem Mammakarzinom könnte PLS3 eine Rolle spielen. Hier konnte der Nachweis von PLS3-positiven CTC mit einem schlechteren Gesamt- und krankheitsfreien Überleben in Zusammenhang gebracht werden (*Ueo et al., 2015*).

1.3.2.3 *Ladinin 1 (LAD1)*

Ladinin 1 (LAD1) gilt als Ankerfilament und Bestandteil der Basalmembran. Es nimmt hier eine stabilisierende Funktion zwischen der Epithelzellschicht und dem darunterliegenden Bindegewebe ein (*Uitto und Pulkkinen, 1996*). Die Expression von LAD1 ist für zahlreiche vor allem epitheliale Organe gezeigt, darunter auf höchstem Niveau in der Haut und im Gastrointestinaltrakt (GeneCards®).

Das Aufstellen von Proteom- oder Genexpressions-Profilen verschiedener Malignitäten im Vergleich zu ihrem jeweiligen Gesundheitsgewebe identifizierte LAD1 als hochexprimiertes Gen für

unter anderem Adenokarzinome der Lunge, das metastasierte Larynxkarzinom, Ovarialkarzinome und das Triple-negative Mammakarzinom (Codreanu et al., 2017; Klobučar et al., 2016; Santin et al., 2004; Wang und Guda, 2016). In der Datenbank *cBioPortal for Cancer Genomics* kann die vermehrte Expression von LAD1 für die verschiedensten Malignitäten eingesehen werden, darunter auch für kolorektale Karzinome (*cBioPortal for Cancer Genomics*).

Besonders beim Mammakarzinom konnte die erhöhte Expression von LAD1 bereits mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden. Außerdem scheint es als Bestandteil der Basalmembran mit Einfluss auf das zelluläre Zytoskelett ebenfalls an der Zellmigration und Proliferation beteiligt zu sein (Roth et al., 2018). Insgesamt ist LAD1 im Bereich der Onkologie bisher jedoch wenig untersucht.

Die Eignung des Markers für die Detektion von CTC in dieser Studie ergibt sich größtenteils aus der hohen Expression im Gastrointestinaltrakt sowie den bisherigen Erkenntnissen aus Untersuchungen an anderen Tumorentitäten.

1.3.2.4 *Defensin Alpha 5 (DEFA5)*

Defensine zählen zu den antimikrobiellen zytotoxischen Peptiden und gehören zur unspezifischen Immunabwehr (Salzman et al., 2007). Sie sind Bestandteil der sekretorischen Granula von Neutrophilen und werden im Oberflächenepithel verschiedener Organe exprimiert, hierbei insbesondere im Dün- und Dickdarm sowie in der Lunge (Genecards®). Defensin Alpha 5 (DEFA5) ist vor allem für seine hohe Expression in den sekretorischen Panethzellen des terminalen Ileums bekannt (Porter et al., 2002).

Daher konnte DEFA5 bisher vornehmlich im entzündlichen Kontext eine Rolle zugeschrieben werden. Verschiedene Gruppen konnten bei der Erstellung von Genexpressionsprofilen sowohl für die Colitis ulcerosa als auch für den Morbus Crohn eine Überexpression von DEFA5 im Vergleich zu Kontrollen zeigen (Dobre et al., 2018; Lawrance et al., 2001; Noble et al., 2008; Srivastava und Kulaylat, 2004).

Eine Verbindung des Markers zu malignen Prozessen wurde unter anderem durch Taman et al. verdeutlicht. Sie konnten eine erhöhte Expression von DEFA5 in mukosalen Biospien von unbehandelten Colitis ulcerosa Patienten im Vergleich zu Kontrollproben zeigen, dies vor allem bei Biopsien männlicher Patienten. Unter anderem brachten sie die unterschiedliche Genexpression in den Geschlechtern hier auch mit dem deutlich höheren Risiko von Männern für

die Entstehung eines Colitis assoziierten Karzinoms in Verbindung und postulierten DEFA5 als möglichen Risikofaktor für eine maligne Entartung (*Taman et al., 2018*).

Nastase et al. schlagen DEFA5 als frühen diagnostischen Marker vor. Sie konnten zeigen, dass DEFA5 besonders in Kolonadenomen eine erhöhte Expression aufweist und somit Bestandteil der Tumorgenese über die Adenom-Karzinom-Sequenz sein könnte (*Nastase et al., 2011*).

Auch bei anderen Tumorentitäten wurden Hinweise auf eine Einflussnahme in der Karzinogenese durch DEFA5 gefunden: Beispielsweise konnte für das Blasenkarzinom eine Assoziation von Alpha-Defensinen und der Invasivität hergestellt werden (*Holterman et al., 2006*). Des Weiteren wurde eine Beteiligung von DEFA5 bei der Progression von Ösophaguskarzinomen durch die negative Beeinflussung der E-Cadherin Expression beschrieben (*Nomura et al., 2013*).

In dieser Studie sollte DEFA5 als CTC Marker hinsichtlich seines Einsatzes als früher diagnostischer Marker für KRK Patienten geprüft und zusätzlich geklärt werden, inwieweit seine Expression im Blut durch entzündliche Geschehnisse beeinflusst wird.

1.3.2.5 *Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 5 (CEACAM5)*

CEA assoziierte Zelladhäsionsmoleküle (CEACAM) sind eine Familie von Glykoproteinen der Zelloberfläche. Neben ihrer Funktion als Adhäsionsmoleküle sind sie auch an Prozessen der Differenzierung und der Proliferation beteiligt (*Hammarström, 1999; Kelleher et al., 2019*).

CEACAM5 als prominentestes Mitglied der CEA-Familie ist vor allem als Tumormarker CEA für kolorektale Karzinome bekannt. 1965 wurde CEA/CEACAM5 als erstes Protein der Familie von Gold und Freedman entdeckt und sein Nutzen in der Versorgung von Patienten mit KRK erkannt (*Gold und Freedman, 1965*). Heute spielt CEA besonders in der Nachsorge von KRK Patienten eine entscheidende Rolle. Erhöhte Werte im Verlauf erfordern eine diagnostische Abklärung, da sich in Studien die Überlegenheit des Markers bei der Frühentdeckung von Lebermetastasen gezeigt hatte (*S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, 2019*).

Deutlich später, mit dem Beginn der Erforschung von CTC, rückte CEACAM5 auch als ein Marker zur Detektion dieser Zellen in den Fokus. Für verschiedenste epitheliale Gewebe konnte eine CEACAM5 Expression nachgewiesen werden, hier vor allem im Kolon auf erhöhtem Niveau, aber auch für verschiedene Tumorentitäten; darunter Lungen-, Mamma- und Pankreaskarzinome (*Chan und Stanners, 2007; Han et al., 2020*).

Vardakis et al. analysierten Blutproben von Kolonkarzinompatienten vor Einleiten einer adjuvanten Therapie. Die Detektion von CEACAM5-positiven CTC wurde hier mit einem signifikant

höheren Rezidivrisiko und einem niedrigeren Gesamtüberleben in Verbindung gebracht (*Vardakis et al., 2011*). Darüber hinaus konnten Messaritakis et al. einen negativ-prognostischen Wert der Detektion von CEACAM5-positiven CTC in Patienten mit metastasierten KRK zeigen. Der Zusammenhang bestand vor allem für BRAF- und KRAS-mutierte Karzinome (*Messaritakis et al., 2018*).

Auch für Mammakarzinome konnte der Nachweis von CEACAM5-positiven CTC mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden. Außerdem korrelierte die Rate an CEACAM5-positiven CTC positiv mit dem Krankheitsstadium (*Wang et al., 2019*). Im Metastasierungsprozess konnte für das Mamma-CA eine Bedeutung von CEACAM5 gezeigt werden. Powell et al. hoben den Marker als entscheidenden Kandidaten hervor, der das Metastasenwachstum fördert und zur Mesenchymalen-Epithelialen-Transition (MET) am Ort der Metastasierung beiträgt (*Powell et al., 2018*).

Für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome konnten Zhang et al. eine erhöhte Expression von CEACAM5 nachweisen, die mit dem T-Stadium und dem Befall von Lymphgefäßen assoziiert war. Experimentell konnte die Rolle von CEACAM5 in der Proliferation und der Migration von Tumorzellen gezeigt werden (*Zhang et al., 2020*).

Außerdem unterstreichen neue Erkenntnisse die Relevanz von CEACAM5 im inflammatorischen Kontext der CED. Für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zeigte sich eine erhöhte Expression des Proteins im erkrankten Gewebe. So wird CEACAM5 einerseits eine Rolle in der komplizierten Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zugeschrieben, andererseits aber auch als potentieller Wegbereiter im Prozess der Colitis assoziierten Karzinogenese gesehen (*Kelleher et al., 2019; Smithson et al., 1996*).

Daher sollte CEACAM5 hier als Marker für den CTC Nachweis sowohl in Tumorpatienten als auch in Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen untersucht werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

CED zeigen weltweit eine steigende Inzidenz (Ng et al., 2017; Windsor und Kaplan, 2019). Da sowohl die Colitis ulcerosa als auch der Morbus Crohn mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines KRK einhergehen, besteht die große Herausforderung aktuell darin, den Patienten intensive Präventionsmaßnahmen zuzuführen, um eine maligne Progression möglichst frühzeitig zu erkennen und zu therapieren (Clarke und Feuerstein, 2019). KRK tragen weiterhin, trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten, maßgeblich zur Krebs-assoziierten Mortalität bei (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021; Siegel et al., 2021).

Die Detektion von CTC könnte hierbei zukünftig einen wichtigen Stellenwert einnehmen. Besonders für den CTC-assoziierten Marker CK20 konnten bereits Korrelationen zum Überleben des Patienten und dem Krankheitsstadium hergestellt werden (Hendricks et al., 2018; Hinz et al., 2017). Dabei ist bisher noch nicht untersucht, ob ein Nachweis CTC-assoziiierter Marker tatsächlich ein malignes Ereignis anzeigt oder auch in benignen Erkrankungen des Organsystems vorkommen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher geprüft werden, ob sich die Expression CTC-assoziiierter Marker mittels RT-PCR auch im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen lassen. Hierbei wurden neben CK20 die Marker PLS3, LAD1, DEFA5 und CEACAM5 untersucht.

Mit Hilfe von Kokulturversuchen mit intestinalen Epithelzellen und proinflammatorischem M1-Makrophagen sollte der Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die Expression der CTC-assoziierten Marker untersucht werden sowie funktionelle Veränderungen in Hinblick auf die Proliferation, das Migrations- und Invasionsverhalten sowie Charakteristika der EMT in den Epithelzellen analysiert werden.

Ein Vergleich der Expressionswerte von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, Gesundspendern und KRK Patienten und die Korrelation des Expressionsniveaus mit klinischen Parametern sollte dabei helfen zu klären, inwieweit die Schwere der Darmentzündung die Markerexpression beeinflusst und ob sich die Marker zur Differenzierung von malignen bzw. entzündlichen Erkrankungen des Darms eignen.

Insgesamt kann die Arbeit zu einem verbesserten Verständnis beitragen, wie eine Entzündung die Progression von Krebs vorantreibt und ob die Detektion von CTC-assoziierten Markern spezifisch für ein KRK ist oder die Disseminierung von Epithelzellen ins periphere Blut auch entzündlich vermittelte Ursachen haben kann.

2 Material

2.1 Probenmaterial der CED und KRK Patienten sowie der Kontrollprobanden

Das Spenderblut für die Extraktion von Ribonukleinsäure (RNA) und die Analyse mittels qRT-PCR wurde von der Biomaterialbank BMB-CCC zur Verfügung gestellt.

Alle Spender wurden zuvor aufgeklärt und ihr Einverständnis mittels einer Einverständniserklärung schriftlich festgehalten (Abschnitt V).

Die Sammlung der Proben und dazugehöriger klinischer Daten und deren Verwendung für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Standort Kiel genehmigt (A 110/99).

2.2 Laborgeräte

2.2.1 Zentrifugen

Zentrifuge	Hersteller
Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Centrifuge 5452R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Heraeuss Multifuge X1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Rotina 420	Hettich, Tuttlingen, DE
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, DE
VWR® Galaxy Mini Zentrifuge	VWR International, Darmstadt, DE

2.2.2 Inkubatoren

Inkubator	Hersteller
BBD 6620 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Stuart SRT9 Rollenmischer	Bibby Scientific LTD., Stone, UK
WNB 7-45 Wasserbad	Memmert, Schwabach, DE

2.2.3 Messgeräte

Messgerät	Hersteller
FACScalibur Durchflusszytometer	Beckton Dickinson, Heidelberg, DE
Fusion SL Detektionssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell, DE
Infinite® 200 PRO, Mikroplatten Reader	Tecan, Crailsheim, DE
LightCycler® 480 II	Roche, Basel, CH
NanoDROP 2000c Spektrophotometer	peqLab, Erlangen, DE
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
pH 7110 Meter	inoLab, Weilheim, DE
StepOnePlus Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.2.4 Mikroskope

Mikroskop	Hersteller
AE 2000	Motic, Wetzlar, DE
Evos XL Core Cell Imaging System	AMG, Bothell, USA

2.2.5 Pipetten

Pipette	Hersteller
Finnpipette F1 0.2-2 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 1-10 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 2-20 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 20-200 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Finnpipette F1 100-1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Pipetboy-acu	Brand, Wertheim, DE

2.2.6 Sterilwerkbänke

Sterilwerkbank	Hersteller
HERA Safe	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
HERA Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.2.7 Waagen

Waage	Hersteller
Precisa BJ 2100D	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Precisa XB120A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

2.2.8 Weitere Geräte

Weitere Geräte	Hersteller
ARPEGE 110 Stickstofftank	AirLiquide, Paris, FR
CS-300V Power supply	Cleaver Scientific, West Sussex, UK
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
HERAfreeze Basic freezer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
JE-5.0 Elutriationsrotor	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, DE
Masterflex® Peristaltikpumpen L/S® Serie	Cole Parmer Instruments, Kehl/Rhein, DE
MILLI-Q Reagent Water System	Merck Millipore, Billerica, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, München, DE
MR Hei-Mix S Magnetprüher	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Skalpell	Novus Dahle, Lingen, DE
Thermozykler T-Gradient	Biometra, Göttingen, DE
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München, DE
TSX Freezer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Ultraschall-Homogenisator Sonopuls	Bandelin, Berlin, DE
VORTEX GENIUS 3 Vortex-Mischer	IKA-Werke, Staufen, DE

2.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, DE
0,1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht, DE
1,5 ml, 2 ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
15 ml, 50 ml Zentrifugengefäße	Sarstedt, Nümbrecht, DE
5 ml, 10 ml, 25 ml Serumpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
12-/24-/96-Well-Platten, Flachboden	Sarstedt, Nümbrecht, DE
96-Well-Platte, transparent	Sarstedt, Nümbrecht, DE
96-Well-Fast-PCR-Platte, Halbrand	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt, Nümbrecht, DE
FACS Röhrchen	Sterilin, London, UK
Immun-Blot® PVDF Membrane	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Inserts, 24-Well-Platte, PET 8µm	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Micro-Touch Nitril Handschuhe	Ansell, München, DE
Parafilm M	Brand, Wertheim, DE
Pasteur Pipette ISO 7712	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, DE
Spritzen	BD Discartid, Heidelberg, DE
TC-Inserts, 12-Well-Platte, PET, 0,4 µm	Sarstedt, Nümbrecht, DE
TC-Inserts, 12-Well-Platte, PET, 8 µm	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Vue-Life Makrophagenkulturbeutel 32-C	Saint-Gobain, Courbevoie, FR
Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz, Wetter, DE
Western Blotting Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Zellkulturflaschen T-25, Cell+, 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturflaschen T-75, Cell+, 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.4 Kits

Kit	Hersteller
DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Maxima™ Erststrang-cDNA-Synthesekit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
peqGOLD RNAPure™	peqLab, Erlangen, DE
TaqMan® Universal Master Mix II	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.5 Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Rezepturen

2.5.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller
2-Propanol	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE oder Merck Millipore, Darmstadt, DE
Advansta WesternBright™ ECL	Advansta Inc., San Jose, USA
Bovines Serumalbumin (BSA), fraction V	Biomol, Hamburg, DE
Bromphenolblau	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Chloroform	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Essigsäure	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Ethanol 99 %, vollvergällt	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen, DE
Ethanol, reinst	Merck Millipore, Darmstadt, DE
FACSflow sheath fluid	BD Bioscience, San Jose, USA
Ficoll-Paque™ PLUS	GE-Healthcare, Uppsala, SE
Grams Kristallviolett-Lösung	Merck Millipore, Darmstadt, DE
HiPerFect® Transfection Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
Kollagen Typ 1 (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München, DE
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel, CH
Methanol	Th. Geyer GmbH, Renningen, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra-pur	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Pancoll human	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Solution 555 Waschlösung	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, DE
Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypanblau Lösung Fluka 0,4 %	Sigma-Aldrich, München, DE
Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	PAA, Pasching, AT
Tween 20	Serva, Heidelberg, DE

2.5.2 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Elutriationspuffer	0,1 % (v/v) FCS in PBS 10 mM EDTA PBS pH 7,4
Ladepuffer (4x)	0,005 % (w/v) Bromphenolblau 2,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in Laemmli-Puffer (2x)
Laemmli-Puffer (2x)	128 mM Tris-Base 4,6 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 1 mM Natriumorthovanadat pH 7,6
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8
TBS (10x)	20 mM Tris-Base 140 mM Natriumchlorid pH 7,6
TBS-Tween (TBS-T)	10 % (v/v) TBS (10x) 0,05 % (v/v) Tween 20 in ddH ₂ O
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-Base 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8
Western Blot Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS in ddH ₂ O

2.6 Material für die Western Blot Analyse

Gel	Zusammensetzung pro Gel
Sammelgel	2000 µl Aqua dest. 765 µl Sammelgelpuffer 310 µl 40 % PAA 20 µl 10 % APS 3,0 µl TEMED
Trenngel (10 %)	4,0 ml Aqua dest. 2,0 ml Trenngelpuffer 2,0 ml 40 % PAA 30 µl 10 % APS 6,0 µl TEMED
Trenngel (12 %)	3,6 ml Aqua dest. 2,0 ml Trenngelpuffer 2,4 ml 40 % PAA 30 µl 10 % APS 6,0 µl TEMED
Trenngel (15 %)	3,0 ml Aqua dest. 2,0 ml Trenngelpuffer 3,0 ml 40 % PAA 30 µl 10 % APS 6,0 µl TEMED

2.7 Material für zellbiologische Untersuchungen

2.7.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung / Quelle
NCM-460	<i>normal-derived colon mucosa</i> , intestinale Epithelzelllinie: Expression von Kolonepithel-assoziierten Antigenen, negativ für typische Antigene anderer Zelltypen, keine kanzerogenen Eigenschaften (Moyer et al., 1996) / INCELL Corp., San Antonio, USA
HT29	Humane kolorektale Adenokarzinom Zelllinie (Fogh und Trempe, 1975; Martínez-Maqueda et al., 2015) / American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

2.7.2 Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagenzien	Hersteller
Dulbecco's PBS	Biochrom, Berlin, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, DE
Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), human recombinant	BioLegend, Fell, DE
L-Glutamin	PAA, Pasching, AT
M3:Base F™	INCELL Corporation, San Antonio, USA
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, DE
OPTI-MEM® I (1x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Biochrom, Berlin, DE

2.7.3 Zusammensetzung von Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
M1-Makrophagenmedium (500 ml)	RPMI 1640 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Pen/Strep 11 mM D-Glucose
Migrationsassay Medium (500 ml)	RPMI 1640 1 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Pen/Strep 11 mM D-Glucose
NCM-460 Medium (500 ml)	M3:Base F™ 10 % FCS

2.7.4 Small interfering RNA (siRNA)

siRNA	Stock	Hersteller
Control siRNA A	10 µM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
CK20 siRNA human	10 µM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
CEACAM5 siRNA human	10 µM	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE

2.8 Antikörper

Primäre Antikörper (Klon)	Spezies / Isotyp	Stock Konzentration	Verdünnungsfaktor	Hersteller
E-Cadherin (32A8)	Maus/ IgG1	k.A.	1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
HSP 90 (F-8)	Maus/ IgG2a	200 mg/ml	2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
L1CAM (14.10)	IgG1	10 mg/ml	1000	Zur Verfügung gestellt von Prof. Gerd Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, DE
Vimentin (V9)	Maus/ IgG1	200 µg/ml	200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
DEFA5 (8c8)	Maus/ IgG2b	200 µg/ml	200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Ceacam5 (CI-P83-1)	Maus/ IgG1	200 µg/ml	1000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
CK20 (D9Z1Z)	Kaninchen/ IgG	k.A.	1000	Cell Signaling, Frankfurt, DE

Sekundäre Antikörper	Spezies	Verdünnungsfaktor	Hersteller
anti-mouse IgG (HRP-gekoppelt)	Pferd	2000	Cell Signaling, Frankfurt, DE
anti-rabbit IgG (HRP-gekoppelt)	Ziege	2000	Cell Signaling, Frankfurt, DE

2.9 Primer

Hersteller: Eurofins, Ebersberg, DE

Primer		5`- 3`- Sequenz	Annealing Temperatur (°C)
GAPDH	forward	TCCATGACAACCTTTGGTATCGTGG	58
	reverse	GACGCCTGCTTCACCACCTTCT	

Hersteller: RealTimePrimers, Hamburg, DE

Primer		5`- 3`- Sequenz	Annealing Temperatur (°C)
E-Cadherin	forward	TGCTCTTGCTGTTTCTTCGG	55
	reverse	TGCCCCATTCGTTCAAGTAG	
L1CAM	forward	GAACTGGATGTGGTGGAGAG	58
	reverse	GAGGGTGGTAGAGGTCTGGT	
Vimentin	forward	TCCAAGTTTGCTGACCTCTC	58
	reverse	TCAACGGCAAAGTTCTCTTC	

Hersteller: Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

Primer	Assay ID	Hersteller
CEACAM5	Hs00944025_m1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
CK20	Hs00966063_m1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
DEFA5	Hs00360716_m1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
LAD1	Hs00194326_m1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
PLS3	Hs00958350_m1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
TBP	Hs00427620_m1	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE

2.10 Software

Software	Hersteller
FACScalibur CellQuest	BD Bioscience, San Jose, USA
GraphPad PRISM 7	GraphPad Software, San Diego, USA
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan, Crailsheim, DE
IBM SPSS®-Software	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, DE
LightCycler480 Software	Roche, Basel, CH
Mendeley Ltd. Reference Manager	Elsevier, Amsterdam, NL
Microsoft Office 2007/2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nano Drop 2000/2000c Software	Thermo Scientific, Schwerte, DE

3 Methoden

3.1 Analyse von peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut von Patienten und gesunden Spendern

3.1.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Vom Spenderblut wurden 20 ml in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 1:1 mit RPMI Medium verdünnt. Je 20 ml wurden dann vorsichtig auf 15 ml Separationsmedium (Pancoll) pipettiert. Anschließend erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation bei 400 x g und Raumtemperatur über 40 min. Durch die Zentrifugation mit dem Separationsmedium sammeln sich die PBMC als Zellphase zwischen dem Separationsmedium und einem Überstand aus Blutplasma. Diese Zellphase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und 30 min bei 500 x g zentrifugiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden nun auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Der entstandene Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, das Zellpellet dann in 2 ml kaltem PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zellzählung (Abschnitt 3.4.1). Je $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und bei 4°C 5 min bei 960 x g zentrifugiert. Sollten die Zellen im Anschluss für eine RNA Extraktion verwendet werden, wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in je 1 ml *RNAPure*TM pro Eppendorf-Tube resuspendiert und dann direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C verwahrt.

3.1.2 RNA Extraktion aus peripheren mononukleären Zellen

Für die Extraktion von RNA wurden zuerst je $1 \cdot 10^7$ Zellen in 1 ml *RNAPure*TM aufgenommen. Weiterhin wurde nach dem Protokoll vom *peqGOLD RNAPure*TM verfahren. Hierfür wurde die Probe, falls sie zwischenzeitlich bei -80°C gelagert wurde, 5 min bei Raumtemperatur angetaut, um eine vollständige Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Auf je 1 ml *RNAPure*TM in der Probe wurden 0,2 ml Chloroform gegeben und für mindestens 15 s kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Probe auf Eis für 5 min inkubiert und für die Phasenauffrennung bei 12000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die RNA reichert sich in der obersten wässrigen Phase an. Diese wurde vorsichtig mit einer Pipette in ein frisches 2 ml Eppendorfröhrchen überführt. Die Präzipitation erfolgte mit Isopropanol in einem, der abgenommenen wässrigen Phase, entsprechenden Volumen. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 4°C wurden die Proben bei

12000 x g und 4°C 10 min zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abgenommen und die Proben zweimal mit je 1 ml 75% Ethanol gewaschen und anschließend bei 4°C und 12000 x g 5 min zentrifugiert. Nach der zweiten Waschung und Abnahme des Überstandes wurden die Proben abschließend an der Luft getrocknet und zuletzt, je nach Pelletgröße, in 10 bis 20 µl RNase freiem Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260/280 nm gemessen. Die Proben standen anschließend direkt für die Synthese komplementärer DNA (cDNA) zur Verfügung oder konnten bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert werden.

3.1.3 cDNA Synthese

Um für die folgende qRT-PCR cDNA herzustellen, wurde der *Maxima™ Erststrang-cDNA-Synthesekit* verwendet. Die für die PCR benötigte Menge an RNA wurde den Proben entnommen und in den Folgeschritten weiterverarbeitet. Für jede Reaktion wurden folgende Komponenten benötigt:

Komponente	Volumen je Reaktion
5x Reaction Mix	4 µl
Maxima Enzyme Mix	2 µl
RNA Probe	1-2 µg
nuklease freies Wasser	auf 20 µl auffüllen
Gesamtvolumen	20 µl

Der Master Mix wurde für die benötigte Anzahl an Reaktionen aus dem *5x Reaction Mix* und dem *Maxima Enzyme Mix* hergestellt und gut gemischt. Zu jeder RNA Probe wurden anschließend 6 µl des Mastermixes gegeben und mit nuklease freien Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Im Thermocycler wurden die vorbereiteten Proben nun 10 min bei 25°C inkubiert, gefolgt von 30 min bei 50°C. Beendet wurde die Reaktion bei 85°C für 5 min. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -20°C.

3.1.4 Quantitative Real Time PCR

Für die relative Quantifizierung der Gene wurden von der zuvor hergestellten cDNA je 200 ng pro PCR Reaktion eingesetzt. Für jede Patientenprobe wurde hier eine Dreifachbestimmung durchgeführt, zusätzlich lief in jedem PCR Lauf eine Negativkontrolle aus Wasser mit.

Im Verlauf der Versuchsreihe wurden sowohl der *TaqMan® Universal Master Mix II* als auch *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* verwendet. Der Wechsel im Verlauf der Versuchsreihe wurde durch eine deutlich zeitsparendere Aufarbeitung der Proben mit dem *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* möglich. Die Äquivalenz der beiden Master Mixe wurde vor der Anwendung am Patientenmaterial überprüft. Abgesehen von der Konfiguration der PCR Reaktionen glichen sich die beiden Protokolle. Zuerst wurde in jedes Well einer 96-Well-PCR-Platte das entsprechende Volumen der cDNA und dem RNase freien Wasser pipettiert, sodass ein sich vorerst ein Volumen von 9 µl pro Well ergab. Dann wurde für die benötigte Menge an PCR Reaktionen ein Master Mix aus dem Primer und dem jeweiligen *TaqMan™ Master Mix* hergestellt. Anschließend wurden von dem jeweiligen Master Mix 11 µl in jedes Well gegeben. Es ergab sich so ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Well.

Die Komponentenzusammensetzung in jedem Well war wie folgt:

Komponente	Volumen/Well
TaqMan® Universal / Fast Advanced Master Mix	10 µl
Primer (TaqMan® Assay, 20x)	1 µl
cDNA + RNase freies Wasser	9 µl
Gesamtvolumen pro Well	20 µl

Zuletzt wurde die Platte mit einer selbstklebenden PCR-Folie bedeckt. Detektiert wurden hier die Marker CK20, PLS3, LAD1, DEFA5 und TBP.

Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, erfolgte die PCR Reaktion selbst räumlich getrennt von der cDNA Synthese und der Herstellung des PCR Master Mixes.

Die PCR lief im *StepOnePlus Real-Time PCR System* ab. Die Einstellungen der PCR-Reaktion unterschieden sich hier zwischen dem *TaqMan® Universal Master Mix II* und dem *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix*:

1. *TaqMan® Universal Master Mix II*

	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Polymerase Aktivierung	10:00	95
PCR Zyklus		
- Denaturierung	00:15	95
- Annealing / Extending	01:00	60

2. *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix*

	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Polymerase Aktivierung	02:00	95
PCR Zyklus		
- Denaturierung	00:01	95
- Annealing / Extending	00:20	60

Jede PCR lief über 60 Zyklen. Als Negativkontrolle diente Nuklease freies Wasser, als Positivkontrolle cDNA der Zelllinie HT29 bzw. NCM-460.

Die Datenanalyse erfolgte mit der *The StepOne™ Software*. Als interne Kontrolle diente für alle Versuche TBP. Aus den Dreifachbestimmungen der PCR auf die CTC-assoziierten Marker wurde ein Mittelwert errechnet, der auf die TBP Expression jeder Probe normalisiert wurde. Zeigten nicht alle drei PCR Reaktionen der CTC-assoziierten Marker einer Probe ein positives Signal, wurde der Mittelwert nur aus den vorhandenen Werten gebildet.

Diese ΔCT Werte wurden anschließend in folgender Form zur Berechnung der relativen Genexpression in der weiteren statistischen Analyse verwendet: $2^{(-\Delta CT)}$. Für eine einfachere Handhabung wurde je nach Gen hier noch mit einem Faktor zwischen 10^3 und 10^5 multipliziert.

3.2 In vitro Generierung von Makrophagen aus dem Blut gesunder Spender

3.2.1 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut gesunder Spender

Zur Gewinnung von M1-Makrophagen für die Cokulturversuche wurden PBMC aus dem Blut gesunder Spender gewonnen. Die Blutspende wurde freundlicherweise vom Blutspendezentrum im CITTI-Park Kiel zur Verfügung gestellt. Die Spender waren entsprechend den Vorgaben des Instituts für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein als gesund eingestuft und über die Verwendung des Blutes für medizinische Forschungszwecke aufgeklärt. Das Blut wurde nach Durchlaufen einer Leukozytenreduktionskammer zur Trennung von Thrombozyten in einem kegelförmigen Behältnis an das Institut für Experimentelle Tumorforschung geliefert. Das erhaltene Leuko- und Erythrozytenkonzentrat wurde in allen Folgeschritten unter der Sterilbank weiterverarbeitet.

Um die mononukleären Zellen von den Erythrozyten zu trennen, wurde zuerst eine Dichtegradientenzentrifugation mit Pancoll durchgeführt. Dafür wurde das Blutkonzentrat aus dem Kegel in eine Zellkulturflasche gegeben, in der bereits 20 ml PBS vorgelegt waren. Die Kulturflasche wurde dann mit PBS auf 140 ml aufgefüllt. Vier 50 ml Röhrchen wurden mit je 15 ml Pancoll-Separationsmedium gefüllt und dann je 35 ml des verdünnten Blutkonzentrats langsam auf das Pancoll pipettiert. Bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen zunächst bei $800 \times g$ für 25 min ohne Bremse zentrifugiert.

Durch die Zentrifugation erfolgt eine Trennung der Probe in vier Fraktionen. Von oben nach unten entsprechen diese erstens einem Pellet aus Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen und

zweitens dem Pancoll-Separationsmedium. Nun folgend lässt sich der sogenannte „buffy coat“ als dritte Fraktion zwischen dem Separationsmedium und der obersten vierten Fraktion aus Plasma ausmachen. Dabei handelt es sich um eine schmale trübe, weiß-gelbliche Grenzschicht, in der sich die PBMC angereichert haben. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgesaugt und der zellreiche Ring von zwei Röhrchen in je einem neuen 50 ml Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden nun bei 4°C durchgeführt.

Die gewonnenen PBMC wurden in 50 ml kaltem Elutriationspuffer resuspendiert und bei 4°C und 300 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und das Pellet in 20 ml Elutriationspuffer gelöst, wieder auf 50 ml aufgefüllt und nochmals bei 4°C und 300 x g für 7 min zentrifugiert. Abschließend folgten das Absaugen des Überstandes und das Lösen und Poolen des Pellets in 50 ml Elutriationspuffer.

Für die Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl sterilem PBS verdünnt und gut gemischt. Zur Vorbereitung der Zählkammer wurde das Deckgläschen mit leichtem Druck auf die Trägerstege gelegt. Bei korrektem und festem Sitz waren Newtonsche Ringe sichtbar. Anschließend wurden 10 µl in die Neubauer Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden alle vier großen Eckquadranten ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Die Zellzahl ergab sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Mittelwert der gezählten Zellen}}{\text{Volumen eines Eckquadranten (0,1 µl)} \times \text{Verdünnungsfaktor}} \times 1000 = \text{Zellen pro ml der Originalprobe}$$

Bei einer Zellzahl von größer 600*10⁶ pro 50 ml wurde die Zellsuspension auf zwei Röhrchen aufgeteilt und beide mit Elutriationspuffer auf 50 ml aufgefüllt.

Die nun folgende Gegenstrom-Zentrifugal-Elutriation dient der Auftrennung von gemischten Zellpopulationen in ihre Subpopulationen. Die Elutriation nutzt die verschiedenen Sedimentationseigenschaften der einzelnen Subpopulationen für die Trennung. Für die Generierung von M1-Makrophagen müssen in diesem Arbeitsschritt die Lymphozyten von den Monozyten getrennt werden.

Vor dem Start der Elutriation wurde das Schlauchsystem und die Zentrifuge mit 200 ml 70% Ethanol, 300 ml autoklaviertem Aqua bidest. und mindestens 200 ml Elutriationspuffer, sowohl durch den Proben- als auch durch den Trägereinlass, bei einer Flussrate von 65 ml/min gespült. Das System muss vor Beginn der Probenaufladung absolut blasenfrei sein. Zunächst wurde die Zentrifuge eingeschaltet, sie sollte stabil bei 3500 rpm und 4°C laufen, erst dann wurde bei Einstellung des Rotors auf 26 ml/min die Probe über den Probeneinlass aufgenommen. Es wurde

mit circa 200 ml Elutriationspuffer nachgespült bis keine Zellen mehr in der Blasenfalle sichtbar waren. Die Flussrate des Rotors wurde schrittweise in zwei Milliliter Schritten auf 32, von da an bis 41 ml/min in Einerschritten erhöht. Während der Zentrifugation gelangt die Zellsuspension in die Elutriationskammer. Hier entsteht eine Balance zwischen der zentrifugalen und der zentrifugalen Kraft. Das schrittweise Steigern der Zentrifugalkraft durch Erhöhung der Rotorgeschwindigkeit führt zur Ausschleusung von zuerst kleinen und später von größeren Partikeln abhängig von ihrem Sedimentationspotential. Da Monozyten im Vergleich zu Lymphozyten ein höheres Sedimentationspotential aufweisen, reichern sich diese erst in den Fraktionen ab 36 ml/min und aufwärts an. Daher wurden die Fraktionen ab 36 ml/min bis 41 ml/min inklusive der sogenannten Stopppraktion, die nach Abschalten der Zentrifuge entstand, in 50 ml Röhrchen aufgefangen und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Abschließend erfolgte eine Spülung der Zentrifuge mit Aqua bidest. und einer Waschlösung (Solution 555 1:10 mit Wasser verdünnt) mit einer Einwirkzeit von 30 min. Zuletzt wurde das System mit 70% Ethanol beladen, dies blieb bis zur nächsten Nutzung bestehen.

Für die Cokultur von M1-Makrophagen und NCM-460 Zellen wurden nur Monozytenfraktionen mit einer Reinheit von mindestens 90% bezüglich der Monozyten verwendet. Um dies zu gewährleisten, wurden die aufgefangenen Monozytenfraktionen im Anschluss an die Gegenstrom-Zentrifugal-Elutriation mittels der Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) auf ihre Reinheit analysiert. Die Zellpopulationen waren im FACS durch *forward-scatter-channel* (FSC) und *side-scatter-channel* (SSC) zu unterscheiden. Eine Fraktion wurde nur dann für die Generierung von M1-Makrophagen verwendet, wenn sich mindestens 90% der analysierten Zellen der Fraktion dem festgelegten Gate für Monozyten zuordnen ließen. Fraktionen mit einer Reinheit von weniger als 90% wurden verworfen.

3.2.2 *In vitro* Generierung von M1-Makrophagen aus Monozyten

Die gewonnenen Monozyten mussten nun zur Differenzierung in M1-Makrophagen gebracht werden. Dies wurde durch Kultivierung der Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF erreicht. Alle Fraktionen, die im FACS eine Reinheit von mindestens 90% gezeigt haben, wurden hierfür zunächst 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets zusammengeführt und in 10 ml M1-Makrophagenmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zellzählung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Je 20 Millionen Zellen wurden in 27 ml ihres Mediums in einem 50 ml Röhrchen resuspendiert und mit je 2 µg/ml GM-CSF versetzt. Der Inhalt

genau eines Röhrchens wurde dann in einen, zuvor mit autoklaviertem PBS gespülten, Vue-Life Makrophagenkulturbeutel pipettiert. Zuletzt wurde der Beutel entlüftet. Die befüllten und entlüfteten Beutel wurden für eine Differenzierungsphase von sieben Tagen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit (rH₂O) aufbewahrt.

3.3 Zellkultur von intestinalen Epithelzellen und Makrophagen

3.3.1 Kultivierung von Zellen

Die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Medium in Zellkulturflaschen mit einer Größe von 75 cm² im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 90% rH₂O kultiviert. Alle Arbeitsschritte zur Verwendung der Zellen für Versuche oder die Passagierung der Zellen wurden mit autoklavierten Materialien unter der Sterilbank mit zimmerwarmen Medien und Reagenzien durchgeführt, sofern nicht anders beschrieben.

Die NCM-460 Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Hierfür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche mittels Vakuumpumpe entfernt und anschließend einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS erfolgte die Ablösung der Zellen durch die Protease Trypsin. Hierfür wurden 5 ml Trypsin-EDTA auf den Zellrasen gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Der Ablöseprozess konnte nach einer zehnmütigen Wartezeit mechanisch durch Beklopfen der Zellkulturflasche optimiert werden. Anschließend wurde die Reaktion in der Zellkulturflasche mit 5 ml FCS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt. Der gesamte Inhalt der Flasche wurde nun in ein 50 ml Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugtion bei 300 x g bei Raumtemperatur über 5 min wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml des Zellkulturmediums resuspendiert. Für die Aussaat von Zellen für einen Versuch wurden diese nun gezählt (Abschnitt 3.4.1) und in benötigter Anzahl ausgesät. Wurden keine Zellen ausgesät, wurde das Zellpellet im Verhältnis 1:3 geteilt, in Zellkulturflaschen gegeben und mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt.

3.3.2 Kokultivierung von M1-Makrophagen und NCM-460 Zellen

Der Einfluss einer entzündlichen Umgebung auf die intestinalen Epithelzellen der Zelllinie NCM-460 wurde mittels einer indirekten Kokultur untersucht. Hierfür wurden NCM-460 Zellen in eine 12-Well-Platte ausgesät und mit M1-Makrophagen in einem indirekten Transwellsystem kokultiviert (**Abbildung 3**). Damit standen die Zellen also nicht im direkten Kontakt miteinander, sondern konnten nur über lösliche Botenstoffe kommunizieren und sich beeinflussen, die durch die Poren ($0,4\ \mu\text{m}$) des Transwells innerhalb des Kulturmediums migrieren konnten.

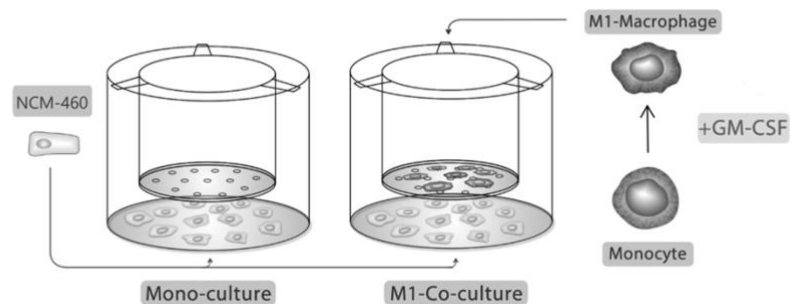


Abbildung 3: Schematische Darstellung von NCM-460 Zellen (in Wells ausgesät) in Monokultur bzw. in indirekter Kokultur mit M1-Makrophagen (in Transwells ausgesät)

Die Zellen wurden zunächst 24h in ihrem jeweiligen Medium kultiviert. In eine 12-Well-Platte wurden je $1 \cdot 10^5$ NCM-460 Zellen pro Well in 1 ml ihres Mediums ausgesät. Für die Aussaat der Makrophagen wurden die Vue-Life Makrophagenkulturbeutel für mindestens 30 min in Eis gelegt und anschließend mehrmals vorsichtig, aber kraftvoll mit der Seite, auf der die Makrophagen gewachsen sind, auf eine glatte Oberfläche geschlagen, um die Zellen abzulösen. Der Beutelinhalt wurde dann in ein 50 ml Röhrchen überführt. Der geleerte Beutel wurde anschließend einmal mit PBS gespült und der Inhalt wieder in das gleiche Röhrchen gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei $300 \times g$ über 10 min bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert. Nach einer weiteren zehnmütigen Zentrifugation bei $150 \times g$ und Raumtemperatur konnte der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml des M1-Makrophagenmediums resuspendiert werden. Wenn Makrophagen aus mehreren Beuteln zugleich geerntet wurden, konnten diese in diesem Schritt zusammengeführt werden. Nach einer Zellzählung wurden je $5 \cdot 10^5$ M1-Makrophagen in 0,5 ml ihres Mediums in ein Transwell mit einer Porengröße von $0,4\ \mu\text{m}$ ausgesät. Im darunterliegenden Well einer 12-Well-Platte wurde 1 ml

Medium vorgelegt. Die entleerten Makrophagenbeutel wurden zweimal mit PBS gespült und bis zum nächsten Gebrauch mit 70% Ethanol beladen und entlüftet bei Raumtemperatur gelagert.

Nach 24h wurden die Medien aller Wells abgesaugt. Für die Cokultur wurde nun nur M1-Makrophagenmedium verwendet und dafür 0,5 ml des Mediums in jedes Transwell mit den Makrophagen und 1 ml in die Wells mit NCM-460 Zellen gegeben. Die Transwells wurden anschließend in die Wells mit den NCM-460 Zellen gesetzt. Als Kontrolle dienten monokultivierte NCM-460 Zellen in 1,5 ml des M1-Makrophagenmediums. Nach einer Cokulturzeit von sechs Tagen wurden die Zellen, wie unter Abschnitt 3.4 beschrieben, für die Analyse weiterbearbeitet.

3.4 Charakterisierung und Analyse der NCM-460 Zellen

3.4.1 Zellzahlbestimmung

Sowohl für die Aussaat von Zellen für die Versuche als auch für die Beurteilung des Wachstumsverhaltens der Zellen nach einem Versuch erfolgte eine Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer. Die Bestimmung des Wachstums unter Co- und Monokulturbedingungen wurde nach sechs Tagen Kulturzeit durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mittel Trypsin-EDTA aus dem Well abgelöst, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

Für die Zellzählung wurden von der Zellsuspension pro Well je 10 µl mit 90 µl Wasser verdünnt und gut gemischt. Zur Vorbereitung der Zählkammer wurde das Deckgläschen mit leichtem Druck auf die Trägerstege gelegt. Bei korrektem und festem Sitz waren Newtonsche Ringe sichtbar. Anschließend wurden 10 µl in die Neubauer Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden alle vier großen Eckquadranten ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Die Zellzahl ergab sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Mittelwert der gezählten Zellen}}{\text{Volumen eines Eckquadranten (0,1 µl)} \times \text{Verdünnungsfaktor}} \times 1000 = \text{Zellen pro ml der Originalprobe}$$

3.4.2 Molekularbiologische Methoden

3.4.2.1 Extraktion von RNA

Für die Extraktion der RNA aus den Zellkulturversuchen wurde wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben nach dem *peqGOLD RNAPure™* Protokoll verfahren. Hierfür wurde das Zellkulturmedium aus den Wells abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen direkt in 0,4 ml *RNAPure™* aufgenommen. Durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette konnte eine suffiziente Lyse der Zellen erreicht werden. Das weitere Prozedere glich den in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Arbeitsschritten, hier allerdings mit einem Einsatz von 80 µl Chloroform.

3.4.2.2 cDNA Synthese

Für die Herstellung von cDNA aus den *in vitro* Versuchen wurde erneut der *Maxima™ Erststrang-cDNA-Synthesekit* verwendet. Siehe hierfür die Arbeitsschrittanweisungen unter Abschnitt 3.1.3.

3.4.2.3 Quantitative Real Time PCR

Die Analyse der Genexpression von CK20, PLS3, LAD1, DEFA5 und CEACAM5 erfolgte mittels qRT-PCR. Hierbei wurden je 100 ng cDNA in doppelten Ansatz mit dem *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* im *StepOnePlus Real-Time PCR System* analysiert. Das jeweilige Volumen an cDNA wurde mit RNase freiem Wasser auf 9 µl aufgefüllt und je 11 µl Mastermix, bestehend aus 1 µl Primer und 10 µl *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix*, wurden in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Die PCR-Platte wurde abschließend mit einer selbstklebenden Folie verschlossen und nach den PCR-Reaktionseinstellungen wie in Abschnitt 3.1.4 für den *TaqMan™ Fast Advanced Master Mix* beschrieben über 60 Zyklen durchgeführt. Aus den beiden CT-Werten wurde ein Mittelwert gebildet. Dieser wurde auf das Haushaltsgen TBP normalisiert und wie oben beschrieben als $2^{(-\Delta CT)}$ angegeben (Abschnitt 3.1.4).

Die Analyse der Gene L1CAM, E-Cadherin, und Vimentin erfolgte im *LightCycler® 480 II*. Hierfür wurden je 100ng cDNA in ihrem entsprechenden Volumen als Duplikate in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert. Jedem Well wurden 7,5 µl des fluoreszenzhaltigen Mastermixes hinzugefügt. Die Zusammensetzung des Mastermixes war abhängig vom Hersteller des Primers:

Eurofins Primer

5 µl Cyclcr SYBR Green I Master

1 µl Forward Primer

1 µl Reverse Primer

0,5 µl nuclease-freies Wasser

RealTimePrimers

5 µl Cyclcr SYBR Green I Master

1 µl Primermix (1:50)

1,5 µl nuclease-freies Wasser

Die PCR-Platte wurde nun mit einer *LightCycler 480 Sealing Foil* bedeckt und für 2 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Bei entsprechender Annealing Temperatur des jeweiligen Primers lief die qRT-PCR im *LightCycler® 480 II* für bis zu 60 Zyklen mit einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse als Qualitätskontrolle. Hier diente Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Haushaltsgen für die Auswertung. Der Mittelwert der beiden CT-Werte für L1CAM, E-Cadherin, und Vimentin wurde auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und als $2^{(-\Delta CT)}$ angegeben.

3.4.2.4 *siRNA-vermittelter Knockdown von CK20 und CEACAM5*

Der Einfluss von CK20 und CEACAM5 auf die Eigenschaften der intestinalen Epithelzelllinie NCM-460 wurde durch eine Herunterregulierung der Gene in den NCM-460 Zellen untersucht. Hierfür wurde ein siRNA-vermittelter *Knockdown* vorgenommen. Ziel dieser Methodik ist eine transiente selektive Blockade der gewünschten mRNA und die dadurch ausbleibende Translation des Zielproteins.

Die Transfektion wurde nach dem Protokoll des Herstellers mit dem *HiPerFect Transfection Reagent* von *Qiagen* durchgeführt. Die Transfektion der NCM-460 Zellen fand einen Tag vor Beginn der Cokultur statt. Dafür wurden $1 \cdot 10^5$ NCM-460 Zellen pro Well in einer 12-Well-Platte in 1 ml ihres Mediums ausgesät. Die Makrophagen wurden wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben geerntet und parallel in Transwells ausgesät. Für die Transfektion der NCM-460 Zellen wurde zuerst ein Medienwechsel zum Cokulturmedium durchgeführt, das heißt 1 ml pro Well M1-Makrophagenmedium. Anschließend wurden die Transfektionslösungen mit jeweils der CK20-siRNA, CEACAM5-siRNA und der Kontroll-siRNA hergestellt. Aus Voruntersuchungen zeigte sich eine Konzentration der siRNA von 4 µl pro Well sowohl für CK20 als auch für CEACAM5 als effektiv.

Die Transfektionslösung setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (Angaben in μl pro Well):

Komponente	Volumen
OPTI-MEM [®] I (FCS- freies Medium)	100
HiPerFect Transfection Reagent	6
siRNA	4

Nach gutem Mischen wurde die Lösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung von Transfektionskomplexen zu gewährleisten. Anschließend wurden je 110 μl der Lösung tröpfchenweise in das jeweilige Well gegeben. Die Zellen wurden nun für 24h bei 37°C, 5% CO₂ und 90% rH₂O kultiviert. Nach 24h erfolgte dann ein Mediumwechsel und die Cokultur wurde gestartet, indem die Transwells mit den Makrophagen in die Wells mit den NCM-460 Zellen gehängt wurden. Die Aufarbeitung erfolgte wie auch oben beschrieben (Abschnitt 3.4.2.1 - 3.4.2.3) nach sechs Tagen Cokulturzeit.

3.4.3 Western Blot

3.4.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Für den Nachweis von spezifischen Proteinen wurden Ganzzelllysate benötigt. Die Zelllyse konnte direkt im Well vorgenommen werden. Hierfür wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend je nach Zelldichte 100-200 μl 2 x Laemmli Puffer in das Well pipettiert. Die Zellen wurden nun mittels Zellschaber vom Boden des Wells gelöst und zusammen mit dem Puffer in ein Eppendorfröhrchen überführt. Für die Weiterverarbeitung der Proben wurden diese noch viermal eine Sekunde im Ultraschall-Homogenisator *SONOPULS* behandelt. Die Ganzzelllysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration der Ganzzelllysate wurde mit dem *Bio-Rad DCTM Protein Assay* bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein farbmatisches Verfahren, welches die Konzentration indirekt über die Absorption nach einer Reaktion der Proteine mit Kupfer und Folin-Reagenz bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer misst.

Es wurde nach dem Herstellerprotokoll für Mikroplatten vorgegangen. Zuerst wurden je 5 µl einer Probe in zweifacher Form in eine transparente 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden je fünf Proteinstandards verschiedener Konzentrationen auf dieselbe Platte gegeben.

Dann wurden in jedes Well 25 µl von Reagenz A und 200 µl von Reagenz B pipettiert. Es erfolgte anschließend eine 15-minütige Inkubation im Dunkeln. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 750 nm im Infinite[®] 200 PRO Microplate Reader (TECAN). Über die Proteinstandardkurve konnten die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

3.4.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach dem SDS-Page Verfahren. Hierbei wurden die Proteine innerhalb einer Polyacrylamidmatrix der Größe nach aufgetrennt.

Die nötige Überdeckung der Eigenladung der Proteine im elektrischen Feld wurde mit Hilfe von Natriumdodecylsulfat erreicht, ein anionisches Detergenz, welches die Proteinladungen gleichmäßig abdeckt und so eine Auftrennung nur anhand der Molekülgröße ermöglicht. Je Probe wurden 20 µg in ein Eppendorfröhrchen überführt, mit 2 x Laemmli Puffer auf ein Volumen von 33 µl aufgefüllt und mit je 11 µl 4 x Ladepuffer versetzt. Die Denaturierung der Proteine erfolgte nun für 5 min bei 95°C. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt und für einige Sekunden herunterzentrifugiert. Die Taschen des jeweiligen Gels wurden dann mit den Proben und mindestens einem Proteinstandard beladen. Es wurden je nach Zielprotein 10%, 12% und 15% Gele verwendet. Die Zusammensetzung der Puffer und der Gele ist in Abschnitt 2.5.2 und 2.6 beschrieben. Die Auftrennung erfolgte nach Anlegen einer Spannung von 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel.

3.4.3.4 Membrantransfer

Nach erfolgter Proteinauftrennung im Gel wurde der Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran nach dem *Semi-dry* Verfahren vorbereitet. Hierfür wurde die PVDF-Membran 1 min in Methanol aktiviert und anschließend 2 min in Transferpuffer equilibriert. Filterpapiere wurden 2 min in Transferpuffer gelegt und Luftblasen entfernt. Im Anschluss wurde das *Blotting-Sandwich* gebildet: Auf drei Filterpapiere und die PVDF-Membran wurde das Gel gelegt, gefolgt von drei weiteren Filterpapieren. Das *Sandwich* wurde in der Kassette des *Trans-Blot[®] Turbo[™] Blotting* Instruments platziert. Der Transfer erfolgte über 7 min bei 2,5 A / 25 V im Herstellerprogramm für *mixed-molecular-weights*. Abschließend wurde die PVDF-Membran

entnommen und 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für eine Stunde in 5% Milchsäure in TBS-T blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen an freie Bindungsstellen auf der Membran zu verhindern.

3.4.3.5 Immunchemischer Nachweis von Proteinen

Das Sichtbarmachen der aufgetrennten Proteine auf der Membran erfolgte über eine Antikörperbindungs- und Substratreaktion. Hierfür wurde die Membran zuerst in TBS-T gewaschen, bevor der jeweilige primäre Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaliger Waschung in TBS-T für je 10 min wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Erneut wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen und dann 2 min in *WesternBright™ ECL* inkubiert. Die Visualisierung erfolgte im *Fusion SL Detektor*.

3.4.4 Boyden-Chamber-Migrationsassay

Für die Bestimmung der Migrationsaktivität der mono- bzw. kokultivierten NCM-460 Zellen wurde ein Boyden-Chamber-Assay durchgeführt. Das Prinzip dieses Assays besteht darin, Zellen auf einer semipermeablen Membran auszusäen und nach einer definierten Zeit zu messen, wie viele Zellen durch diese Membran migriert sind und sich auf der Unterseite der Membran befinden. Der Anteil der Zellen an der gesamt ausgesäten Zellzahl gibt einen Hinweis auf die migratorischen Eigenschaften der Zellen. In dieser Arbeit wurde dafür ein Transwell-Migrations-Assay verwendet, das heißt, die Epithelzellen wurden in Transwells mit einer Porengröße von 8 µm ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die migrierten Zellen angefärbt und die Farbintensität über eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 595 nm im ELISA-Reader erfasst. **Abbildung 4** zeigt schematisch den Versuchsaufbau.

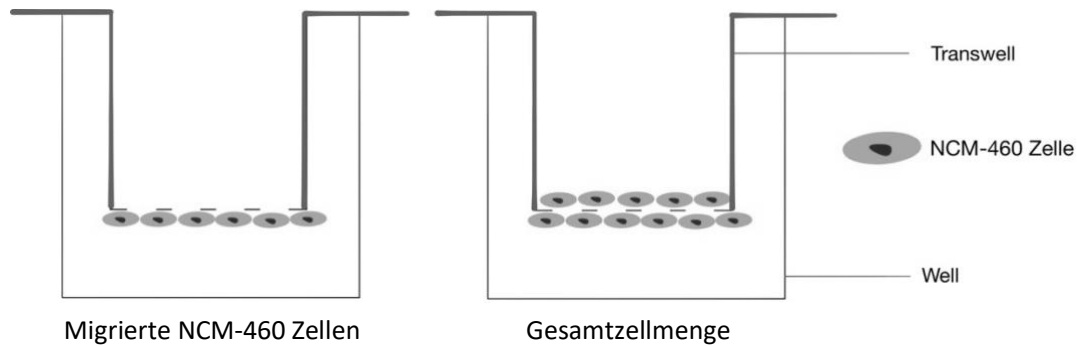


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Boyden-Chamber-Migrationsassays: Je $5 \cdot 10^4$ NCM-460 Zellen wurden in Transwells mit einer Porengröße von $8 \mu\text{m}$ in eine 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24h wurde die Oberseite eines Transwells mit einem Wattestäbchen gesäubert, um nur die migrierten Zellen auf der Unterseite des Transwells zu belassen; im zweiten Transwell wurden die Zellen auf der Oberseite nicht entfernt. Nach einer Färbung mit Kristallviolett, mehreren Waschvorgängen und einer Entfärbung der Zellen mit 10% Essigsäure wurde die Farbintensität als Indikator für die Anzahl der Zellen in ihrem jeweiligen Kompartiment im ELISA-Reader bestimmt.

Hierfür mussten die Zellen nach sechs Tagen Mono- bzw. Kokultur zuerst mit Trypsin aus ihren Wells abgelöst werden. Das verbrauchte Kulturmedium wurde aus den Wells abgesaugt und jedes Well wurde einmal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden 0,5 ml Trypsin-EDTA in jedes Well pipettiert. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit je 0,5 ml FCS-haltigen Medium je Well gestoppt. Der Inhalt eines jeden Wells wurde in ein 2 ml Tube überführt und bei Raumtemperatur 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 1 ml Migrationsassay Medium resuspendiert, gezählt und dann in die Transwells ausgesät. Hierfür wurden in einer neuen 24-Well-Platte je 500 μl Medium vorgelegt und die Transwells eingehängt. Anschließend wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen in 500 μl Migrationsassay Medium in die Transwells ausgesät. Jeder Ansatz wurde hierbei doppelt ausgesät, um bei der Aufarbeitung einmal die Gesamtzellzahl und in einem anderen Ansatz den Anteil der migrierten Zellen bestimmen zu können. Nach 24h wurde das Medium im Transwell und Well abgesaugt. Je ein Transwell eines Ansatzes wurde mit einem Wattestäbchen innen gesäubert, sodass nur die migrierten Zellen an der Unter- bzw. Außenseite des Transwells verblieben. Das zweite Transwell blieb ohne Behandlung mit Wattestäbchen, um die Gesamtzellzahl jeder Probe zu erfassen. Alle Transwells wurden anschließend in eine neue 24-Well-Platte umgesetzt. Nach Zugabe von 100 μl Kristallviolett, 1:4 verdünnt, in das Transwell und 400 μl in das Well wurde unter dem Abzug 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Farbstoff wurde abpipettiert und Wells und Transwells wurden mit je 1000 μl bzw. 500 μl Aqua dest. fünfmal für 15 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Entfärbung der Zellen mit 10% Essigsäure. Hierfür wurden 200 μl in das Transwell und 300 μl in das Well pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur entfärbt. Die gefärbte Essigsäure aus je einem Well und dem dazugehörigen Transwell wurden in einer neuen 24-Well-

Platte zusammengeführt. Die Messung der Farbkonzentration erfolgte in einer flachen 96-Well Platte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm. Für jeden Ansatz erfolgte eine Doppelbestimmung aus je 100 µl. Als Referenz diente 10% Essigsäure. Der prozentuale Anteil an migrierten Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ migrierte Zellen} = \text{migrierte Zellen} \times 100\% / \text{Gesamtzellmenge}$$

3.4.5 Boyden-Chamber-Invasionsassay

Zur Bestimmung der Invasionsfähigkeit der Zellen wurde das unter Abschnitt 3.4.4 beschriebene Prinzip des Migrationsassays abgewandelt. Dafür wurden die Transwells vor der Aussaat der Zellen auf ihrer Außenseite mit je 50 µl Kollagen 1 (mit PBS auf 0,4 mg/ml verdünnt) beschichtet. Nach 2h Trocknung bei Raumtemperatur unter der Sterilbank wurden die Zellen ausgesät. Das anschließende Verfahren erfolgte wie oben beschrieben.

Die Beschichtung der Transwells mit Kollagen 1 simuliert in diesem Versuch eine wesentliche Komponente der extrazellulären Matrix, durch die die Zellen, mit Hilfe von Proteasen invadieren müssen, um auf die Unterseite des Transwells zu gelangen. In diesem Assay werden also neben der Fähigkeit zur Mobilität und Migration, die Zellen auch auf Eigenschaften untersucht, die ihnen erlauben, sich durch eine extrazelluläre Matrix zu bewegen.

3.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Ergebnisse aus der CTC-Marker Detektion wurde mittels der *IBM SPSS®Software* und der Unterstützung durch Dr. Alexander Bernsmeier aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Testung auf Normalverteilung mittels *Shapiro-Wilk-Test*. Zur Analyse der Mittelwerte zweier parametrischer Datensätze wurde ein *t-Test* bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Für nicht parametrische Datensätze erfolgte ein *Mann-Whitney-U-Test*. Die Analyse von drei oder mehr Stichproben erfolgte mittels *einfaktorieller ANOVA* (analysis of variance) bzw. bei nicht normalverteilten Daten mit dem *Kruskal-Wallis-Test*. Die Überprüfung auf Abhängigkeit zwischen kategorialen Variablen wurde mit Hilfe von Kreuztabellen und einem *Chi-Quadrat-Test* analysiert. Zur Einordnung der diagnostischen Stärke der untersuchten Marker wurde eine *ROC* (receiver operating characteristic)-*Kurven-Analyse* erstellt und der Cut-Off Wert mittels *Youdens-Index* festgelegt.

Die statistische Analyse der *in vitro* Versuche erfolgte mit *GraphPad PRISM 7*. Zuerst wurden die Ergebnisse sämtlicher Versuche auf ihre Normalverteilung und gleiche Varianzen mittels *Shapiro-Wilk* und *Equal-Variance Test* untersucht. Normalverteilte Daten zweier Stichproben wurden mittels *t-Test* analysiert. Bei nicht-normalverteilten Datensätze mit zwei Stichproben erfolgte die Auswertung durch den *Mann-Whitney-U-Test*. Zur statistischen Analyse von Mittelwerten parametrischer Datensätze von mehr als zwei Stichproben wurde eine *one-way-analysis of variances* (one-way ANOVA) durchgeführt.

Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von kleiner 0,05 angenommen und mittels Sternchen wie folgt in den Abbildungen markiert: $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$.

4 Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von proinflammatorischen Makrophagen auf Eigenschaften und Verhalten der Kolonepithelzelllinie NCM-460

4.1.1 NCM-460 Zellen nehmen unter Cokultur mit M1-Makrophagen vermehrt eine spindelförmige Zellform an und zeigen ein vermindertes Wachstum

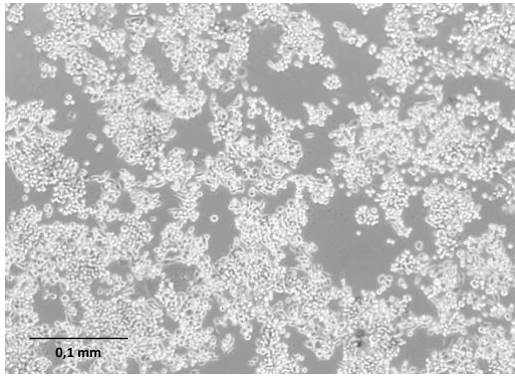
Um den Einfluss von proinflammatorischen M1-Makrophagen auf die Morphologie und das Wachstum der NCM-460 Zellen zu untersuchen, erfolgte nach einer 6-tägigen indirekten Cokultur bzw. Monokultur zunächst eine morphologische Analyse.

Dafür wurden $1 \cdot 10^5$ NCM-460 Zellen ausgesät. 24h darauf wurden die Makrophagen in den Transwells in die, für die Cokultur vorgesehenen, Wells gehängt. Als Kontrolle dienten monokultivierte NCM-460 mit nur mit Medium gefüllten eingehängten Transwells.

Abbildung 5 zeigt die Zellen nach der gesamten Kulturdauer einerseits unter Einfluss von M1-Makrophagen andererseits aus der Monokultur. Die NCM-460 Zellen alleine zeigten ein klassisches epitheliales Zellmuster. Erkennbar war ein Wachstum in Clustern mit festen Zell-Zellverbindungen. Morphologisch betrachtet war der Großteil der Zellen kubisch bis polygonal. Die Zellen zeigten außerdem das für sie typische gemischte Wachstumsmuster aus Monolayerzellen und Zellen in Suspension, sodass sich mikroskopisch häufig das Bild angehäufter Zellmassen in mehreren Ebenen ergab (*Moyer et al., 1996*). Das morphologische Bild ließ sich damit gut mit dem epithelialen Charakter der Zellen verbinden.

Nach Cokultur mit M1-Makrophagen waren bei den NCM-460 Zellen jedoch deutliche morphologische Veränderungen erkennbar. Es zeigte sich bereits optisch ein vermindertes Zellwachstum, was nach Zellzählungen bestätigt werden konnte (s.u.). Auch das clusterartige Wachstumsmuster der Zellen war hier vermindert und es ließen sich vermehrt Zellen mit spindelförmiger Zellform ausmachen, welche eher charakteristisch für mesenchymale Zelltypen ist. Zusätzlich zeigte sich eine Dissoziation der Zellen voneinander, auch die zuvor beschriebenen dichten Zell-Zellkontakte schienen hier loser.

Monokultur



Cokultur

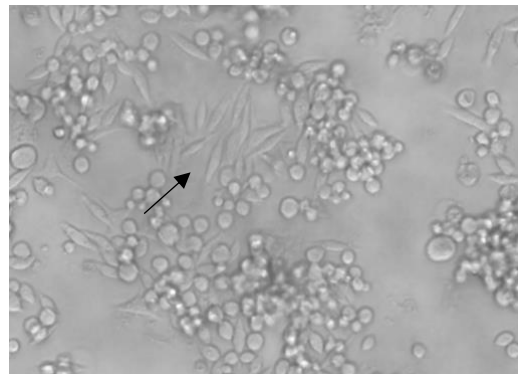
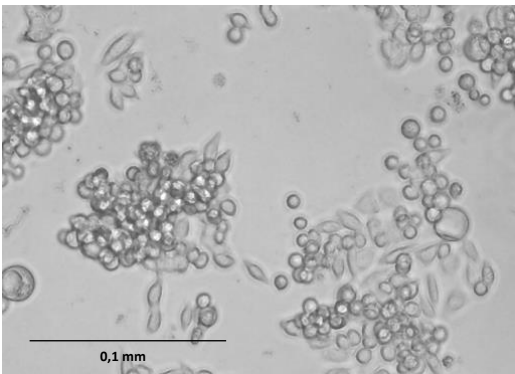
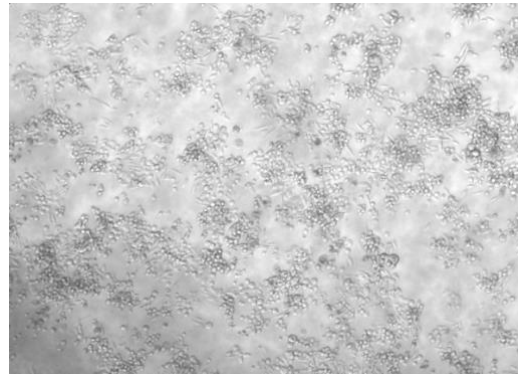


Abbildung 5: Zellmorphologie von mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen: Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Zellen nach 6-tägiger Monokultur oder Cokultur mit M1-Makrophagen (obere Reihe 130-fache-, untere Reihe 260-fache Vergrößerung). Der Pfeil markiert eine Ansammlung spindelförmiger Zellen.

Um das im Mikroskop dargestellte verminderte Wachstum der kokultivierten Zellen zu verifizieren, wurden die Zellen gezählt.

Nach sechs Tagen zeigten die monokultivierten Zellen durchschnittlich eine Zellzahl von $11,5 \cdot 10^5$, während in kokultivierten Wells im Mittel nur $5,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well gezählt werden konnten. Es ergab sich eine signifikante Differenz von $-6,063 \cdot 10^5$ Zellen (95% KI $[-9,104] - [-3,021]$, $p=0,008$). Dies entspricht prozentual einem Unterschied von 52% (**Abbildung 6**).

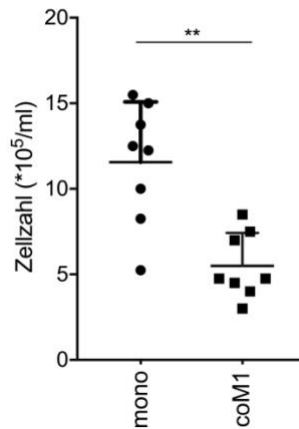


Abbildung 6: NCM-460 Zellen zeigen unter Anwesenheit von M1-Makrophagen ein vermindertes Wachstum: Aufgetragen sind die Mittelwerte der Zellzahlen in $1 \cdot 10^5/\text{ml}$ mit Standardabweichung nach einer Kulturzeit von sechs Tagen für mono- und kokultivierte NCM-460 Zellen von acht verschiedenen Versuchen. (** = $p < 0,01$)

4.1.2 EMT-assoziierte Veränderungen lassen sich bei Kolonepithelzellen nach einer Kokultur in inflammatorischer Umgebung nachweisen

Ob die morphologische Veränderung der Zellform mit anderen EMT-assoziierten Veränderungen einhergeht, wurde im Folgenden sowohl auf RNA, als auch auf Proteinebene analysiert.

Um dies zu prüfen, wurden die mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen auf EMT-assoziierte Marker wie E-Cadherin, L1CAM und Vimentin untersucht.

E-Cadherin als epithelialer Marker zeigte in der qRT-PCR Analyse eine leicht erhöhte Expression in den kokultivierten Zellen im Vergleich zu monokultivierten Zellen (**Abbildung 7A**). Im Westernblot zeigte sich hingegen ein deutlicher Abfall der Expression des epithelialen Markers nach der Kokultur, was in Einklang mit den morphologischen Veränderungen steht (**Abbildung 7B**).

Damit konform waren außerdem die Resultate aus RNA- und Proteinanalyse bezüglich des mesenchymalen Markers L1CAM. Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass Kolonbiopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in der immunhistochemischen Färbung eine vermehrte Expression von L1CAM gegenüber Geweben von gesunden Spendern aufwiesen (Schäfer *et al.*, 2013). So zeigte sich auch hier eine erhöhte L1CAM Expression auf RNA Ebene in den NCM-460 kokultivierten Zellen (**Abbildung 7A**), die sich im Westernblot bestätigen ließ (**Abbildung 7B**).

Als zusätzlicher mesenchymaler Marker wurde Vimentin untersucht, welches eine deutlich erhöhte Expression in NCM-460 Zellen nach der Kokultur in der qRT-PCR auf das fast dreifache der Monokultur zeigte (**Abbildung 7A**). Der Westernblot für Vimentin zeigte hingegen uneindeutige Ergebnisse und ließ eher auf eine unveränderte Expression schließen (**Abbildung 7B**).

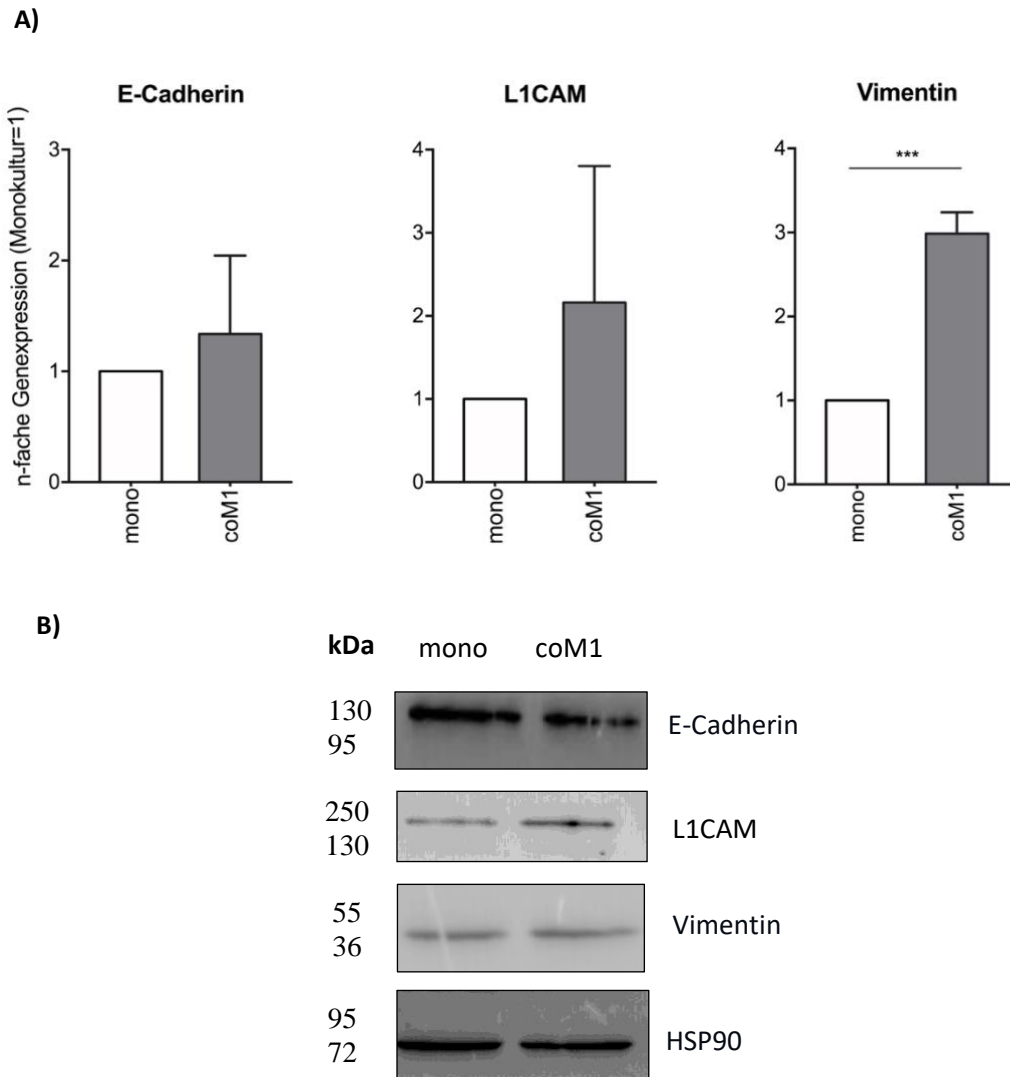


Abbildung 7: NCM-460 Zellen wurden für sechs Tage entweder alleine (mono) oder kokultiviert mit M1-Makrophagen (coM1). Anschließend erfolgte eine Expressionsanalyse von EMT-Markern mittels qRT-PCR und Westernblot:
 A) Analyse der Genexpression von E-Cadherin, L1CAM und Vimentin mittels qRT-PCR. Die Expression der verschiedenen Gene wurde zunächst auf die Expression des Haushaltgens TBP normalisiert und ist hier als n-faches, normalisiert auf die Expression der monokultivierten NCM-460 Zellen, dargestellt. Die Werte wurden aus drei verschiedenen Versuchen generiert und sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. (***) = $p < 0,001$
 B) Analyse der Proteinexpression von L1CAM, E-Cadherin und Vimentin. Als Haushaltprotein diente HSP90. Gezeigt ist je ein repräsentativer Westernblot von $n=3$. kDa = Kilodalton

In der Zusammenschau deuten die Daten daraufhin, dass eine inflammatorische Umgebung aus M1-Makrophagen einen deutlichen Einfluss auf EMT-assoziierte Veränderungen in NCM-460 Zellen hat, welche sich an der morphologischen Transformation sowie der höheren Expression von mesenchymalen Markern festmachen lassen. Im Folgenden wurden die Zellen daher funktionell hinsichtlich EMT-typischer Veränderungen analysiert.

4.1.3 Kolonepithelzellen zeigen in inflammatorischer Umgebung ein erhöhtes Migrationspotential

Zum Test funktioneller Auswirkungen der M1-Makrophagen auf die NCM-460 Zellen wurde unter anderem ihre Migrationsfähigkeit untersucht. Mit dem Boyden-Chamber-Migrationsassay wurde nach 24h die relative Migrationsrate bestimmt. Die kokultivierten NCM-460 Zellen zeigten gegenüber den monokultivierten Zellen nur eine geringe Steigerung ihrer Migrationsaktivität. Normiert auf die Migrationsraten der monokultivierten Zellen konnte eine 1,25-fach höhere Migration in den kokultivierten Zellen beobachtet werden (**Abbildung 8**).

Der, wenn auch geringe, Anstieg der Migrationsrate steht im Einklang mit den morphologischen Veränderungen, dem Verlust der starken Zelladhäsion, und stützt die These, dass eine inflammatorische Umgebung mit M1-Makrophagen zu mehr Zellmobilität, einer verminderten Expression von E-Cadherin, einer erhöhten Expression von L1CAM sowie zu einem Verlust von epithelialen Zellcharakteristika in Kolonepithelzellen beiträgt.

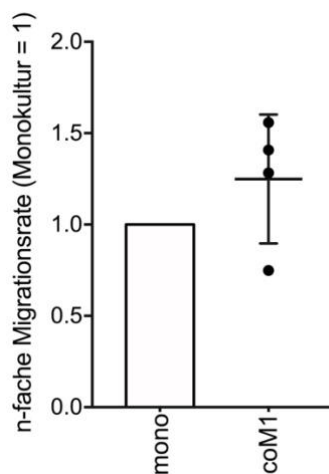


Abbildung 8: Relative Migrationsaktivität der mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen in der Boydenkammer: Nach 6-tägiger Mono- bzw. Kokultur mit M1-Makrophagen wurden je $5 \cdot 10^4$ Zellen für das Boyden-Chamber-Migrationsassay im doppelten Ansatz in einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 24h erfolgte die Auswertung. Ein Versuchsansatz wurde dafür auf die Gesamtzellzahl und der zweite auf die Anzahl der migrierten Zellen überprüft. Für die kokultivierten NCM-460 Zellen sind die Einzelergebnisse der vier durchgeführten Versuche als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt, normiert auf die Versuche mit monokultivierten NCM-460 Zellen.

4.1.4 Die Invasionsfähigkeit von mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen zeigt keine Unterschiede

Die Untersuchung zur Invasionsfähigkeit folgte dem gleichen Aufbau wie das Boyden-Chamber-Assay für die Migration mit dem Unterschied, dass die Transwells hier mit Kollagen Typ I beschichtet waren. Zusätzlich zur Mobilität mussten die Zellen, um durch das Transwell invadieren zu können, Fähigkeiten aufweisen, die ihnen die Proteolyse und die Degradation von Bestandteilen der extrazellulären Matrix erlauben. Im Vergleich der Invasionsraten von NCM-460 Zellen allein und NCM-460 Zellen nach Kultivierung unter Anwesenheit von proinflammatorischen M1-Makrophagen zeigte sich im Gesamtbild kein Unterschied zwischen den beiden Bedingungen (**Abbildung 9**).

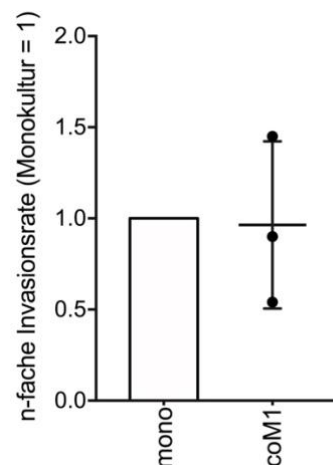


Abbildung 9: Relative Invasionsrate der mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen in der Boydenkammer: Nach 6-tägiger Mono- bzw. Kokultur mit M1-Makrophagen wurden je $5 \cdot 10^4$ NCM-460 Zellen im doppelten Ansatz in einer 24-Well-Platte, in mit zuvor mit Kollagen Typ I beschichteten Transwells mit $8 \mu\text{m}$ Poren, ausgesät. Nach 24h erfolgte die Auswertung. Für die kokultivierten NCM-460 Zellen sind die Einzelergebnisse der drei durchgeführten Versuche als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt, normiert auf die Versuche mit monokultivierten NCM-460 Zellen.

4.1.5 M1-Makrophagen beeinflussen die Expression CTC-assoziiierter Gene in NCM-460 Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass inflammatorische M1-Makrophagen zu EMT-assoziierten Veränderungen in Kolonepithelzellen führen, sollte als nächstes überprüft werden, wie sich ein entzündliches Milieu auf die Expression von Genen auswirkt, die zur Detektion von zirkulierenden Epithel-/Tumorzellen verwendet werden.

Nach Ablauf der Kokulturzeit von sechs Tagen wurde daher aus den verschiedenen Zellansätzen RNA gewonnen, um die Genexpression von CK20, DEFA5, PLS3, CEACAM5 und LAD1 zu

analysieren. Hierfür wurde neben den mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen auch die kolorektale Zelllinie HT29 untersucht, die als Vergleichswert für die Expression der Gene in einer malignen Zelllinie des Kolons diente.

Die Genexpression zeigte für alle Marker Unterschiede zwischen den drei untersuchten Zellpopulationen (**Abbildung 10**).

Die Expression von CK20 zeigte schon in kokultivierten Zellen verglichen zu den monokultivierten NCM-460 Zellen eine deutliche Reduktion. Jedoch fiel besonders bei Betrachtung der malignen Zelllinie HT29 auf, dass die CK20 Expression nicht nur noch geringer als die der kokultivierten Zellen war, sondern auch insgesamt nur circa ein Drittel des Niveaus der monokultivierten Zellen aufwies (**Abbildung 10A**).

In Hinblick auf DEFA5 zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Expression bei kokultivierten NCM-460 Zellen auf ein Zehntel der Expression in monokultivierten Zellen. In der kolorektalen Zelllinie HT29 konnte in keinem der drei Versuche eine Expression von DEFA5 nachgewiesen werden (**Abbildung 10B**).

Diese zwei Gene zeigten somit eine gestaffelte Reduktion ihrer Expression vom benignen Kolonepithel, zum induziert entzündlichen und letztlich zu einer malignen kolorektalen Zelllinie.

Ein anderes Bild zeigte sich bei der Untersuchung der weiteren Marker.

Für PLS3 ergab sich sowohl in kokultivierten NCM-460 Zellen als auch in den HT29 Zellen eine signifikant verminderte Expression auf einem ähnlichen Level verglichen mit monokultivierten NCM-460 Zellen. Die Expression in den malignen Zellen war mit 0,75 verglichen zu 0,59 bei den kokultivierten NCM-460 Zellen jedoch tendenziell etwas höher (**Abbildung 10C**).

Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM5 zeigte in der Analyse mittels qRT-PCR die höchste Expression in den kokultivierten NCM-460 Zellen, im Mittel fast doppelt so hoch wie in NCM-460 Zellen der Monokultur. Für HT29 konnte eine vergleichbar sehr niedrige Expression von CEACAM5 nachgewiesen werden (**Abbildung 10D**).

In der Analyse der Expression von LAD1 konnte zwischen keiner der drei Gruppen ein signifikanter Unterschied dargestellt werden. Die kokultivierten NCM-460 Zellen zeigten allerdings eher einen Trend zu einer etwas niedrigeren Expression im Vergleich zur Monokultur (**Abbildung 10E**).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Kokultur von intestinalen Epithelzellen und proinflammatorischen M1-Makrophagen einen wesentlichen Einfluss auf die Expression von CK20, DEFA5, PLS3 sowie CEACAM5 hat, wobei es einerseits zu einer verminderten Expression (CK20, DEFA5, PLS3), andererseits jedoch auch zu einer erhöhten Genexpression (CEACAM5) kam.

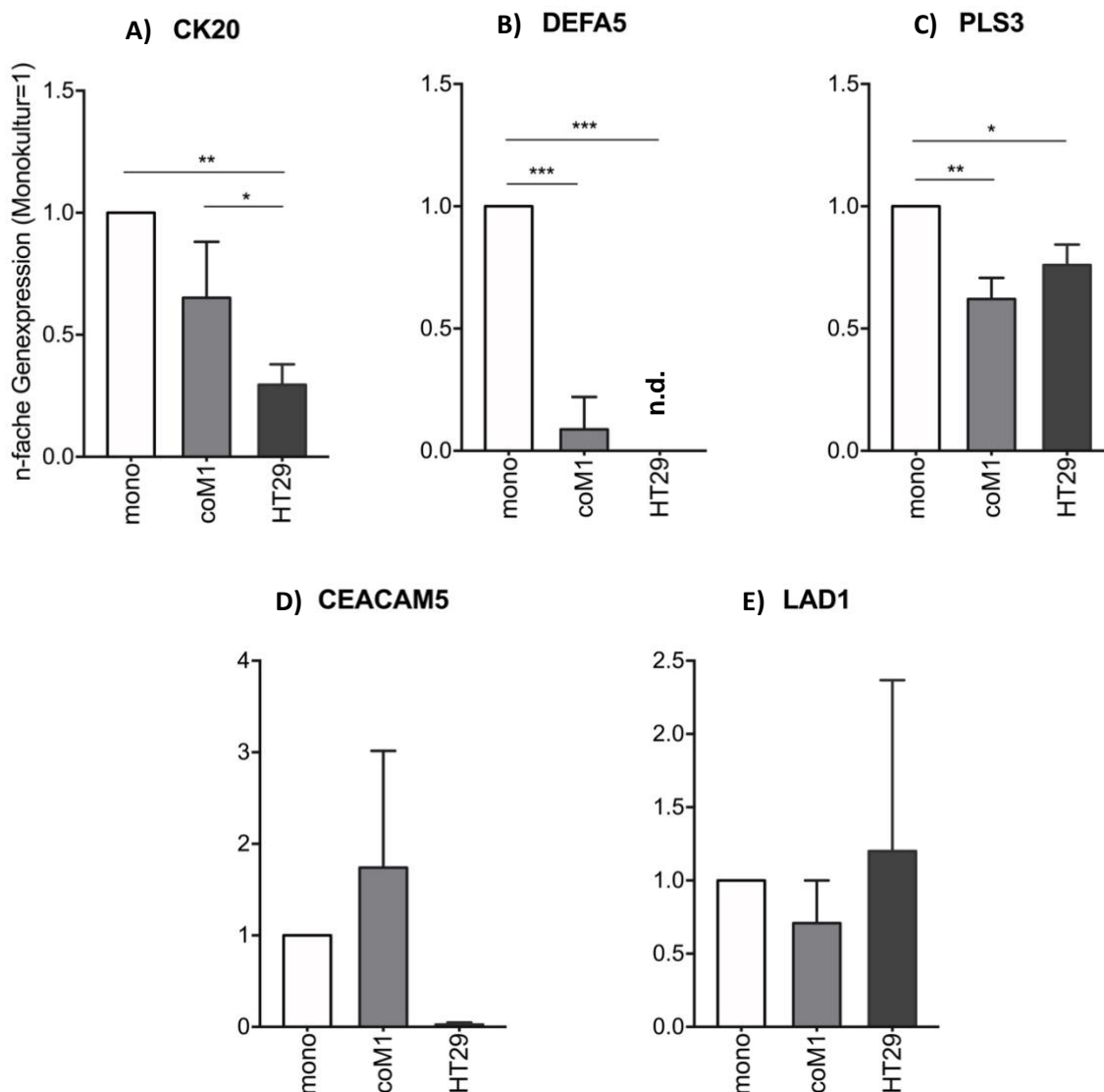


Abbildung 10: Genexpression CTC-assoziiierter Gene in mono- und kokultivierten NCM-460 Zellen sowie in der kolorektalen Zelllinie HT29: Die NCM-460 Zellen wurden sechs Tage mono- bzw. mit M1-Makrophagen kokultiviert. Die Expression der verschiedenen Gene wurde zunächst normalisiert auf die Expression des Haushaltsgens TBP und ist hier als n-faches, normalisiert auf die Expression der monokultivierten NCM-460 Zellen, dargestellt. Die Werte wurden aus drei verschiedenen Versuchen generiert und als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Untersucht wurden die Gene A)CK20, B)DEFA5, C)PLS3, D)CEACAM5 und E)LAD1. Der Mittelwert für HT29 bei der Expression von CEACAM5 wurde aufgrund eines fehlenden Nachweises in einem der Versuche hier nur aus den zwei verbliebenen Werten gebildet. n.d. = nicht detektierbar. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

4.1.6 Der Knockdown von CK20 und CEACAM5 führt zu funktionellen Veränderungen in kokultivierten NCM-460 Zellen

In einem weiteren Schritt wurde die Bedeutung von CK20 und CEACAM5 auf funktioneller Ebene analysiert. CK20 als Marker intestinaler Zellen war aus Vorarbeiten für seine prognostische Relevanz bei Patienten mit Kolonkarzinomen bekannt (Hinz et al., 2017) und zeigte sich in den

Versuchen mit NCM-460 Zellen in der Cokultur mit M1-Makrophagen sowie in der kolorektalen Zelllinie HT29 erniedrigt gegenüber der NCM-460 Monokultur. Um zu überprüfen, inwieweit die verminderte CK20-Expression in den zwei Zellpopulationen gegenüber monokultivierten intestinalen Epithelzellen eine funktionelle Bedeutung für die Zellen hat, wurde ein CK20 spezifischer siRNA-vermittelter Gen-*Knockdown* durchgeführt.

Gleiches geschah mit dem Marker CEACAM5. Als Zelladhäsionsmolekül spielt CEACAM5 eine wichtige Rolle in der epithelialen Integrität und ist an zahlreichen zellulären Prozessen wie der Proliferation und Tumorsuppression beteiligt (*Beauchemin und Arabzadeh, 2013*). Während eine Bedeutung von CEACAM5 für die Tumorgenese in verschiedenen Organen nachgewiesen werden konnte und CEACAM5 als Serummarker *CEA* vor allem in der Verlaufskontrolle von kolorektalen Adenokarzinomen eine wichtige Rolle spielt, ist der Stellenwert dieses Markers im inflammatorischen Kontext noch unklar, bei bekannter prominenter Expression von CEACAM5 im intestinalen Epithel von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen (*Kelleher et al., 2019*).

Zunächst wurde mittels qRT-PCR und Bestimmung der relativen Genexpression die Auswirkung des *Knockdowns* auf die Expression des entsprechenden Zielgens überprüft (**Abbildung 11**).

Hierbei ergab sich für CK20 unter Monokulturbedingungen eine signifikante Reduktion der Genexpression um mehr als die Hälfte in den spezifisch transfizierten Zellen im Vergleich zu den kontroll-transfizierten Zellen. Die schon bekannte verminderte Expression von CK20 in kokultivierten NCM-460 Zellen konnte hier ebenfalls in kontroll- und CK20-siRNA transfizierten Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 11A**).

CEACAM5 hatte unter Cokulturbedingungen einen Anstieg der Expression gezeigt. Dieser Trend konnte hier auch in den Kontroll-transfizierten NCM-460 Zellen unter Cokultur bestätigt werden. Der spezifische *Knockdown* konnte die CEACAM5 Expression in den kokultivierten Zellen signifikant senken, sodass keine vermehrte Expression verglichen zur transfizierten Monokultur mehr nachweisbar war (**Abbildung 11B**).

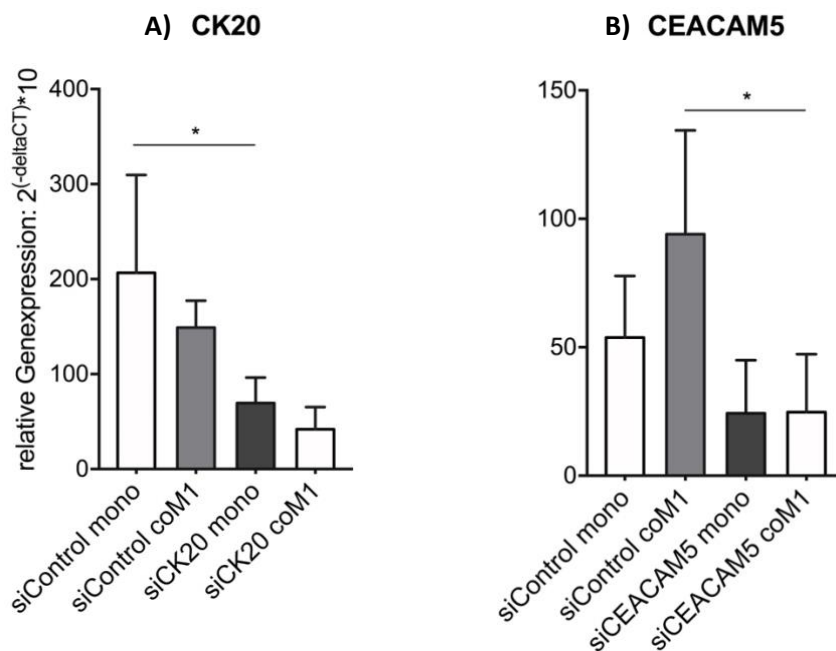


Abbildung 11: Relative Expression von CK20 und CEACAM5 nach dem siRNA-vermittelten Knockdown in NCM-460 Zellen: Nach erfolgtem siRNA-vermitteltem Knockdown von A)CK20 bzw. B)CEACAM5 wurde die relative Genexpression der entsprechenden Gene nach einer 6-tägigen Kultur in mono- und kokultivierten (coM1) NCM-460 Zellen analysiert. Die Genexpression wurde jeweils auf das Haushaltsgen TBP normalisiert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung aus mit spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA behandelten Zellen aus vier verschiedenen Versuchen. (* = $p < 0,05$)

Nach Prüfung der Funktionsfähigkeit des *Knockdowns* erfolgte eine funktionelle Analyse der Zelleigenschaften über das Boyden-Chamber-Migrations- und Invasionsassay (**Abbildung 12**).

Die Untersuchung der Migrationsfähigkeit von kokultivierten NCM-460 Zellen nach einem CK20-*Knockdown* ergab einen Anstieg der Migrationsrate auf das 1,67-fache, wenn die CK20 Expression im Vergleich zur Kontrolle vermindert war. Ein geringer Anstieg auf 1,13 war auch nach einem CEACAM5 *Knockdown* sichtbar (**Abbildung 12A**). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die Zellinvasion. Ein CK20 spezifischer *Knockdown* hatte hier eine signifikant erhöhte Steigerung der Invasionsrate von 1,0 auf 1,28 zur Folge. Ein Trend zu erhöhter Invasionsrate ließ sich auch in CEACAM5-siRNA transfizierten NCM-460 Zellen nach Kokultur mit M1-Makrophagen nachweisen (**Abbildung 12B**).

Passend zu den Vorergebnissen zeigten in der Funktionsanalyse vor allem die NCM-460 Zellen mit siRNA-vermittelter Verminderung der CK20-Expression eine vermehrte Migrations- und Invasionsrate, die darauf hindeutet, dass der Verlust von CK20 im Rahmen von entzündlichen

Prozessen die Zellmotilität und damit die Disseminierung von intestinalen Epithelzellen begünstigt.

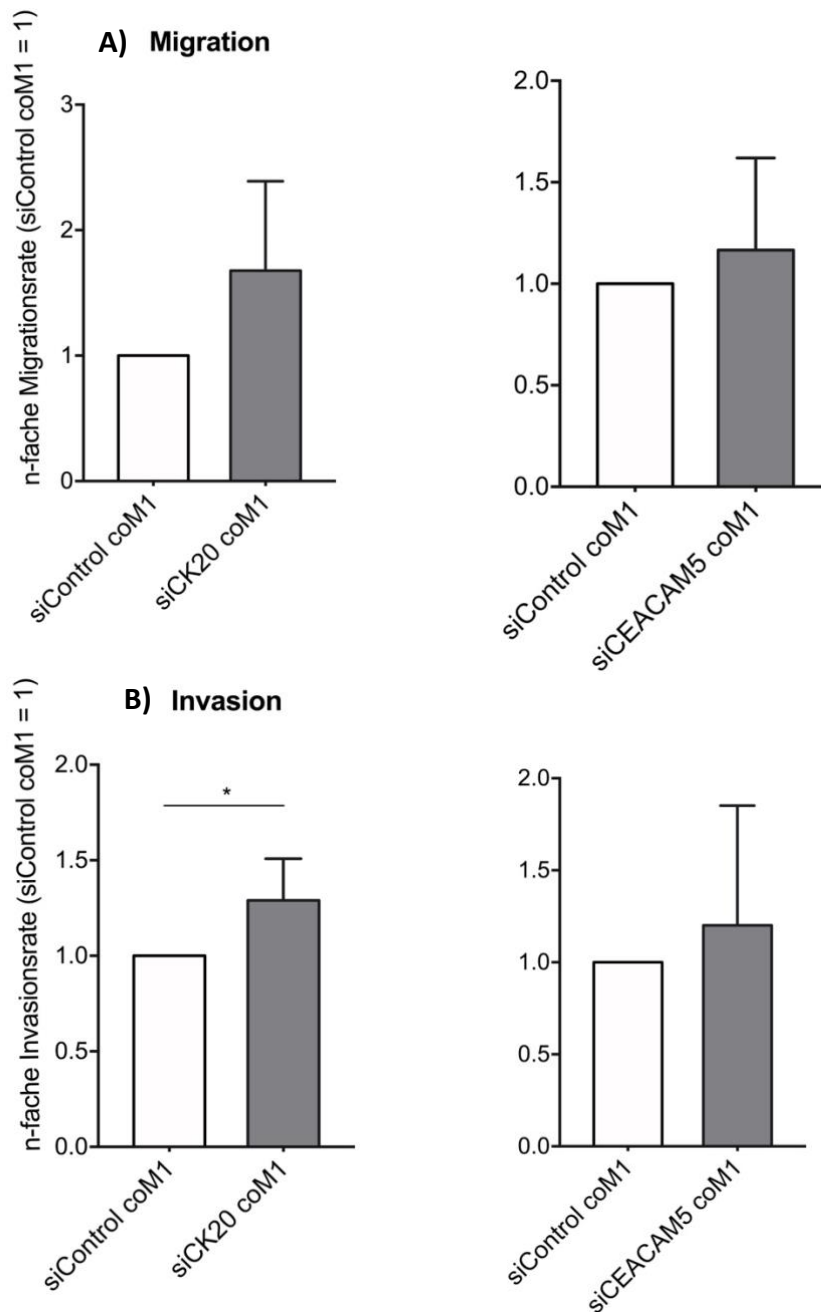


Abbildung 12: Relative Migrations- und Invasionsrate der kokultivierten NCM-460 Zellen nach CK20- oder CEACAM5-Knockdown: Nach 6-tägiger Kokultur mit M1-Makrophagen und Behandlung mit Kontroll-siRNA oder CK20- bzw. CEACAM5-spezifischer siRNA wurden je $5 \cdot 10^4$ Zellen im doppelten Ansatz in einer 24-Well-Platte in unbeschichtete Transwells für die Untersuchung der Migration (A) oder in zuvor mit Kollagen Typ I beschichtete Transwells für die Analyse der Invasion (B) ausgesät. Nach 24h erfolgte die Auswertung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus vier unabhängigen Versuchen. Die Werte der spezifisch transfizierten kokultivierten Zellen wurden normiert auf kontroll-transfizierte kokultivierte NCM-460 Zellen. (* = $p < 0,05$)

4.2 Untersuchung CTC-assoziiierter Marker an humanem Probenmaterial

4.2.1 Probandencharakteristik

Zur Untersuchung CTC-assoziiierter Marker in Blutproben wurden drei verschiedene Probandengruppen für die Studie akquiriert, darunter 98 Kolorektalkarzinompatienten, 64 Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und 40 gesunde Spender. Die Blutproben wurden durch die Biomaterialbank BMB-CCC zur Verfügung gestellt. **Tabelle 2** gibt einen Überblick über die Probandencharakteristika Geschlecht, Alter, Raucherstatus sowie für Tumore die UICC-Stadien-Zugehörigkeit und für Patienten mit entzündlichen Erkrankungen eine Aufschlüsselung über die Art der entzündlichen Erkrankung (Morbus Crohn/Colitis ulcerosa/Colitis indeterminata/Sigmadivertikulitis). Bei der Wahl der Probanden sollte möglichst auf eine ähnliche Altersstruktur und Geschlechtsverteilung geachtet werden. Hierbei unterschieden sich aber vor allem die Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und die Gesundspender bezüglich eines jüngeren Alters von den Tumorpatienten. Wird jedoch der typische Zeitpunkt des Auftretens eines Kolonkarzinoms berücksichtigt, erklärt sich hier die Verschiebung des Alters der Probanden in die höheren Bereiche. Für die Geschlechterverteilung konnte insgesamt eine gute Aufteilung zwischen den männlichen und weiblichen Probanden erreicht werden, allerdings waren bei den Gesundspendern die weiblichen Probanden stärker vertreten.

Für die weiteren Analysen wurden die Tumorpatienten teilweise nach ihrem UICC Stadium in zwei Gruppen (UICC I + II und UICC III + IV) geteilt, auch hier zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der 98 Probanden in die zwei Gruppen.

Bei den Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen waren größtenteils Patienten mit CED vertreten, weniger als ein Viertel der Patienten hatte eine Sigmadivertikulitis. Daher wurde in den folgenden Ergebnissen auch ein besonderer Fokus auf die Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa gelegt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Probandencharakteristika für Patienten mit malignen und entzündlichen Darmerkrankungen sowie für Gesundspender

	Patienten mit malignen Darmerkrankungen	Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen	Gesunde Spender	Gesamt
Gesamt N	98	64	40	202
Geschlecht N [%]				
weiblich	41 (42)	34 (53)	25 (62,5)	100 (50)
männlich	57 (58)	30 (47)	15 (37,5)	102 (50)
Alter in Jahren N [%]				
20-29	0 (0)	11 (17)	10 (25)	21 (10)
30-39	1 (1)	9 (14)	10 (25)	20 (10)
40-49	5 (5)	13 (20)	8 (20)	26 (13)
50-59	14 (14)	15 (24)	10 (25)	39 (19)
60-69	24 (25)	8 (13)	2 (5)	34 (17)
70-79	40 (41)	6 (9)	0 (0)	46 (23)
>80	14 (14)	2 (3)	0 (0)	16 (8)
∅	69	48	40	56
Rauchen N [%]				
ja	21 (22)	18 (28)	6 (15)	45 (22)
nein	60 (61)	41 (64)	34 (85)	135 (67)
Z.n.	7 (7)	4 (6)	0 (0)	11 (5.5)
k.A.	10 (10)	1 (2)	0 (0)	11 (5.5)
UICC Stadium N [%]				
UICC I	7 (7)	-	-	-
UICC II	43 (44)	-	-	-
UICC III	6 (6)	-	-	-
UICC IV	42 (43)	-	-	-
Entzündliche Darmerkrankungen N [%]				
Morbus Crohn	-	26 (41)	-	-
Colitis Ulcerosa	-	22 (34)	-	-
Colitis Indeterminata	-	2 (3)	-	-
Sigmadivertikulitis	-	14 (22)	-	-

∅ = Durchschnitt; Z.n. = Zustand nach; k.A. = keine Angabe

4.2.2 CK20 und DEFA5 zeigen eine variable Positivität innerhalb der drei Probandengruppen

Die Analyse der CTC-assoziierten Marker erfolgte über eine qRT-PCR nach Isolation der RNA aus PBMC. Für jede Patientenprobe wurde der jeweilige Marker dreifach getestet. Ein positiver Nachweis wurde hierbei als das Vorliegen von mindestens einem von drei Signalen in der PCR gewertet. In **Tabelle 3** sind die Informationen zur Quantität der analysierten molekularen Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 zur Detektion von CTC aufgeführt.

Während PLS3 mit einer Ausnahme und LAD1 bei allen Probanden drei positive Nachweise in der qRT-PCR zeigten, konnte für CK20 und DEFA5 Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Tabelle 3: Zusammenstellung der Markerpositivität im Blut von Patienten mit malignen und entzündlichen Darmerkrankungen sowie von Gesundspendern: Für die Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 ist jeweils die absolute und prozentuale Anzahl an positiven und negativen Proben in der qRT-PCR für die drei Probandengruppen angegeben. Für CK20 und DEFA5 ist zusätzlich die Positivität nach Anzahl der positiven Signale in der qRT-PCR von mindestens einem bis maximal drei dargestellt.

	Patienten mit malignen Darmerkrankungen	Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen	Gesunde Spender	Gesamt
Gesamt N	98	64	40	202
CK20 Positivität N [%]				
+	56 (57)	39 (61)	24 (60)	119 (59)
-	42 (43)	25 (39)	16 (40)	83 (41)
CK20 Anzahl positiv N [%]				
0	42 (43)	25 (39)	16 (40)	83 (41)
1	24 (25)	12 (19)	16 (40)	52 (26)
2	15 (15)	9 (14)	6 (15)	30 (15)
3	17 (17)	18 (28)	2 (5)	37 (18)
PLS3 Positivität N [%]				
+	97 (99)	64 (100)	40 (100)	201 (99.5)
-	1 (1)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)
LAD1 Positivität N [%]				
+	98 (100)	63 (100)	40 (100)	201 (100)
-	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
DEFA5 Positivität N [%]				
+	68 (69)	45 (73)	22 (55)	135 (67.5)
-	30 (31)	17 (27)	18 (45)	65 (32.5)
DEFA5 Anzahl positiv N [%]				
0	30 (31)	17 (27)	18 (45)	65 (32.5)
1	24 (24)	16 (26)	12 (30)	52 (26)
2	19 (19)	13 (21)	6 (15)	38 (19)
3	25 (26)	16 (26)	4 (10)	45 (22.5)

+ = positives qRT-PCR Ergebnis, d.h. mindestens eins von drei möglichen Ergebnissen positiv; 0 oder - = negatives qRT-PCR Ergebnis

Für CK20 zeigte sich in allen drei Gruppen eine Positivrate von ca. 60% (**Tabelle 3**). Allerdings ergaben sich deutliche Unterschiede, wenn die Anzahl positiver Nachweise von mindestens ein bis maximal drei betrachtet wurde (**Tabelle 3 und Abbildung 13**). Zwei Drittel der positiv getesteten Gesundspender zeigten nur ein positives Signal. Lediglich in 20% der Proben gesunder Spender konnten zwei oder mehr positive Signale detektiert werden. Beim Vergleich der Rate von drei Nachweisen in der qRT-PCR ergaben sich für Tumorpatienten 17%, für Patienten mit entzündlichen Erkrankungen 28% und für Gesundspender nur 5% ($p=0,048$). Wird die Gruppe der Tumorpatienten nach ihrem UICC-Stadium in UICC I + II (frühes Tumorstadium) und UICC III + IV (spätes Tumorstadium) unterteilt, ergab sich im Chi-Quadrat-Test für die Gruppe der UICC III + IV Tumore deutlich häufiger ein hochpositives Ergebnis ($p=0,002$). 50% der fortgeschrittenen Tumore und nur 16% der Tumore des Stadiums UICC I + II zeigten zwei bzw. drei positive Nachweisen (Ergebnis nicht dargestellt). Ein hochpositives Testergebnis konnte hier mit einem höheren Tumorstadium assoziiert werden.

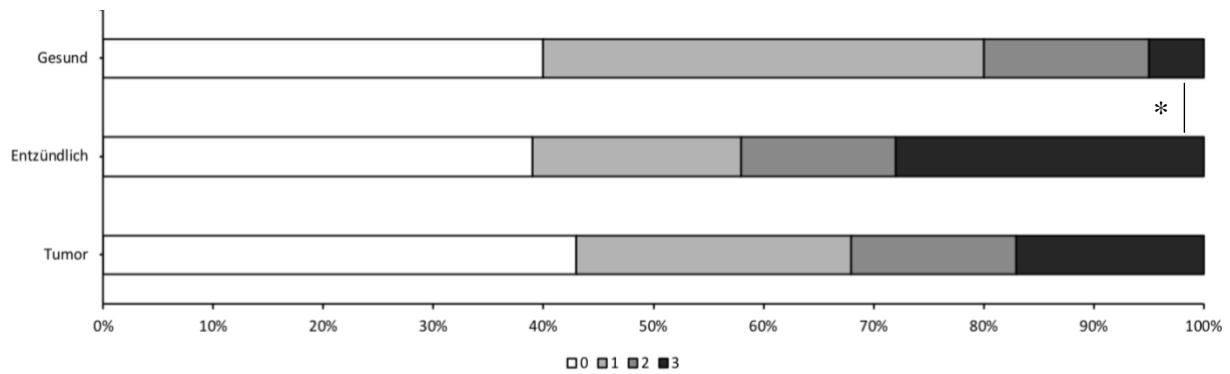


Abbildung 13: Anzahl positiver CK20 Nachweise im Blut von Gesundspendern, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Tumorpatienten: Die Expressionsanalyse des CTC-assoziierten Markers CK20 erfolgte mittels qRT-PCR in Blutproben von Gesundspendern (n=40), Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen (n=64) und Tumorpatienten (n=98). Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Aufgetragen ist jeweils der prozentuale Anteil der Probanden, die keinen (0), einen (1), zwei (2) oder drei (3) Nachweise für CK20 in der qRT-PCR zeigten. (Drei Nachweise Gesund vs. Entzündlich * = $p < 0,05$)

Für DEFA5 zeigten entzündlich Erkrankte und Tumorpatienten in 73 bzw. 69% eine Positivität, wohingegen nur 55% der Gesundspender positiv getestet wurden (**Tabelle 3**). Die Anzahl positiver Nachweise war für Tumorpatienten und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen fast identisch (**Tabelle 3 und Abbildung 14**). Je 26% der Proben zeigten hierbei drei, 19% bzw. 21% immerhin noch zwei positive Signale in der DEFA5-qRT-PCR. Für Gesundspender lagen die Werte hier nur bei 10% für drei und 15% für zwei positive Nachweise.

Auch für DEFA5 ergab sich eine Korrelation zwischen der Markerpositivität und dem Tumorstadium. Die Unterteilung der Tumorpatienten in UICC I + II und UICC III + IV in der Analyse zeigte, dass Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren deutlich häufiger (35%) drei positive Nachweise zeigten als Patienten mit Tumoren der Stadien UICC I oder II (8%) ($p = 0,021$, Ergebnis nicht dargestellt).

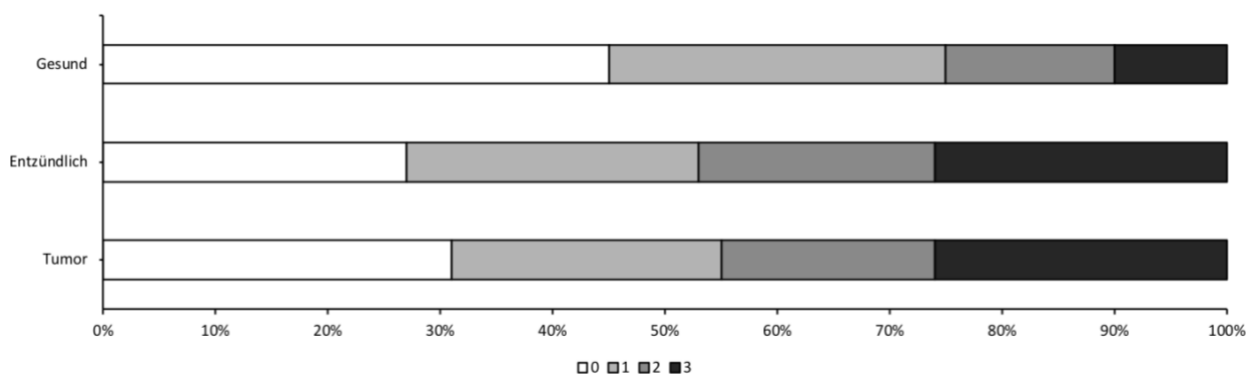


Abbildung 14: Anzahl positiver DEFA5 Nachweise im Blut von Gesundspendern, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Tumorpatienten: Die Expressionsanalyse des CTC-assoziierten Markers DEFFA5 erfolgte mittels qRT-PCR in Blutproben von Gesundspendern (n=40), Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen (n=64) und Tumorpatienten (n=98). Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Aufgetragen ist jeweils der prozentuale Anteil der Probanden, die keinen (0), einen (1), zwei (2) oder drei (3) Nachweise von DEFA5 in der qRT-PCR zeigten hatten.

4.2.3 Die verschiedenen Probandengruppen zeigen qualitative Unterschiede in der Markerexpression

Im Anschluss an die quantitative Analyse der PCR-Signale der Markerausprägung sollte die Qualität, d.h. die Expressionsstärke jedes Markers zwischen den drei Probandengruppen verglichen werden. Hierfür wurden Gruppenunterschiede mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests und einem anschließenden paarweisen Vergleich analysiert. **Abbildung 15** zeigt die relative Genexpression für die vier Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 für Tumorpatienten, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Gesundspender.

Für CK20 konnten mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zeigten jedoch tendenziell die höchste Expression und Tumorpatienten die schwächste (**Abbildung 15A**).

Hierbei gilt allerdings zu beachten, dass sich die Variationsbreite der Werte für CK20 zwischen den Gruppen stark unterschied. Hervorzuheben ist, dass bei positiven Gesundspendern relative Genexpressionswerte von maximal 15,2 EU (Expression Unit) (Median: 3,03 EU; 95% Konfidenzintervall [0; 3,73]) vorkamen, während Tumorpatienten und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen Maximalwerte von 118 EU (Median: 1,84 EU; 95% Konfidenzintervall [0; 2,87]) bzw. 97,5 EU (Median: 3,82; 95% Konfidenzintervall [0; 5,35]) zeigten. Die relative Genexpression von PLS3 ergab für Gesundspender und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen deutlich höhere Werte als für Tumorpatienten. Die Expressionswerte lagen in der letzteren Gruppe ca. zwei Drittel niedriger als für die anderen beiden Gruppen (**Abbildung 15B**).

Anders waren die Unterschiede für den Marker LAD1. Hier zeigten sich signifikant höhere Expressionswerte der Tumorpatienten gegenüber den beiden anderen Gruppen (**Abbildung 15C**). Die Expressionsanalyse des Markers DEFA5 ergab, dass Tumorpatienten und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen DEFA5 auf einem ähnlichen Niveau exprimierten, während Gesundspender eine signifikant niedrigere Expression zeigten (**Abbildung 15D**).

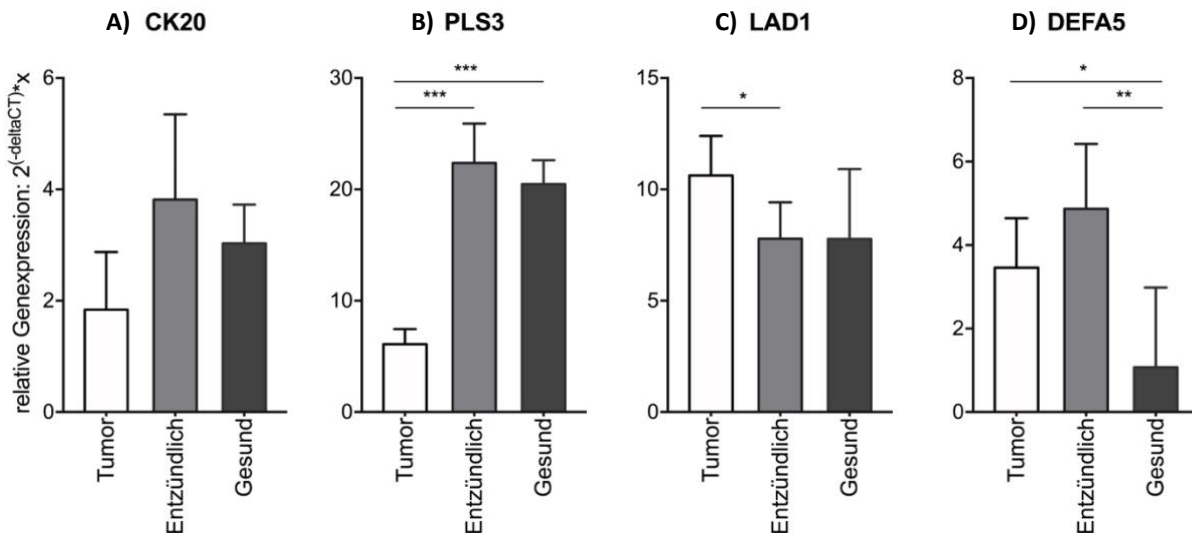


Abbildung 15: Darstellung der relativen Markerexpression im Blut von Tumorpatienten, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Gesunden: Die Expression von CTC-assoziierten Markern A)CK20, B)PLS3, C)LAD1 und D)DEFA5 wurde mittels qRT-PCR im Blut der drei Probandengruppen detektiert. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Jeweils der Mittelwert der spezifischen Genexpression wurde auf die Expression des Haushaltgens TBP normalisiert. Der Vergleich der mittleren Expressionswerte erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Angegeben sind hier die Mediane mit 95%igen Konfidenzintervall. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

Abbildung 16 zeigt die Analyse der Markerexpression nach Unterteilung gemäß des UICC Stadiums in ein niedriges (UICC I + II) und ein höheres Tumorstadium (UICC III + IV). Unterschiede ergeben sich vor allem für die Marker CK20 und LAD1. Für die Expression des Markers CK20 in Tumorpatienten wurde nach der Unterteilung gemäß der UICC-Stadien deutlich, dass hohe Expressionswerte vor allem in Proben von Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien der Gruppe UICC III+IV zu finden waren (**Abbildung 16A**).

Die Marker PLS3 (**Abbildung 16B**) und DEFA5 (**Abbildung 16D**) zeigten keine Differenzen in der Markerexpression zwischen Patienten mit niedrigen und hohen Tumorstadien. In beiden Gruppen von Tumorpatienten ließen sich signifikant geringere Expressionslevel von PLS3 gegenüber Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen oder Gesunden nachweisen.

Für den Marker LAD1 hatten Tumorpatienten eine leicht höhere Expression gegenüber Gesunden und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt (**Abbildung 15C**). In der Differenzierung der Tumorkohorte nach Tumorstadien wurde deutlich, dass die höhere Expression vor allem in Patienten mit Tumoren der Stadien UICC I + II detektiert wurde, die somit eine signifikante Erhöhung gegenüber den Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zeigten (**Abbildung 16C**).

In einer Subanalyse wurde auch die Gruppe der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen in Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn geteilt. Hier konnte für keinen der Marker Unterschiede in der Markerexpression zwischen den beiden Erkrankungen festgestellt werden (Ergebnis nicht dargestellt).

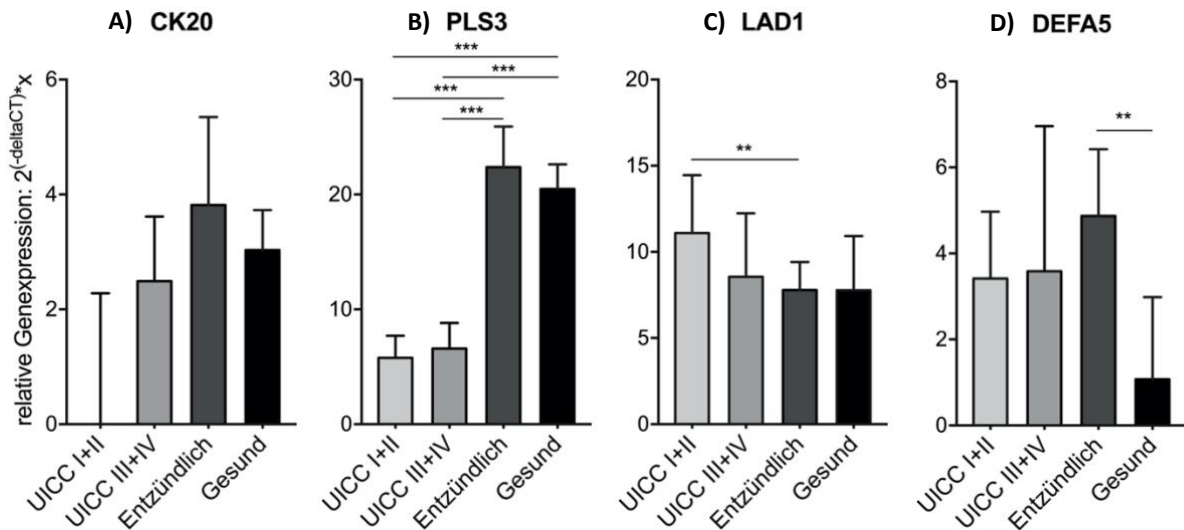


Abbildung 16: Darstellung der relativen Markerexpression im Blut von Tumorpatienten nach UICC Stadien I + II und III + IV, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Gesunden: Die Expression CTC-assoziiierter Marker A)CK20, B)PLS3, C)LAD1 und D)DEFA5 wurde mittels qRT-PCR im Blut der drei Probandengruppen detektiert. Patienten mit einem KRK wurden unterteilt in UICC I + II und UICC III + IV. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Jeweils der Mittelwert der spezifischen Genexpression wurde auf die Expression des Haushaltgens TBP normalisiert. Der Vergleich der mittleren Expressionswerte erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Angegeben sind hier die Mediane mit 95%igen Konfidenzintervall.
(** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigte vor allem der Marker PLS3 deutliche Expressionsunterschiede zwischen Patienten mit einer malignen kolorektalen Erkrankung und Probanden mit einer entzündlichen Erkrankung bzw. Gesunden.

Ein Einfluss des Tumorstadiums auf die Markerexpression ergab sich vor allem für die Marker CK20 und LAD1 und könnte Hinweise auf mögliche Beteiligung dieser an der Tumorprogression liefern.

4.2.4 Die Erkrankungsdauer von CED Patienten hat einen Einfluss auf die Quantität und teilweise auf die Qualität CTC-assoziiierter Marker

CED Patienten haben ein erhöhtes Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Einer der Hauptrisikofaktoren ist dabei die Dauer der Erkrankung (Eaden et al., 2001; Gillen et al., 1994; Jess et al., 2012). Daher sollte als nächstes geprüft werden, ob die Expression CTC-assoziiierter Marker mit der Erkrankungsdauer seit der Erstdiagnose in Verbindung steht. Angelehnt an Forschungsergebnisse von Eaden et al. wurden die CED Patienten hierfür in drei Gruppen (≤ 10 ,

11-20 und ≥ 21 Jahre mit Erkrankung) gegliedert, die sich durch ihr Risiko für eine KRK-Entstehung unterscheiden (Eaden et al., 2001). Anschließend wurde einerseits die Quantität der Markerepression von CK20 und DEFA5, also die Positivrate in der qRT-PCR und die Anzahl positiver Nachweise in den Gruppen analysiert, andererseits die qualitative Markerepression aller vier Marker geprüft.

In der Analyse von CK20 zeigte sich die Gruppe mit einer Erkrankungsdauer von 11-20 Jahren einerseits auffällig für ihre niedrige Negativrate (9%) und andererseits für die vermehrte Anzahl an drei positiven Nachweisen in der PCR von knapp 50% verglichen mit den beiden anderen Gruppen, die nur in 33 bzw. 24% der Fälle drei positive Nachweise zeigten (**Abbildung 17**). Interessanterweise fand sich in der Gruppe mit der längsten Erkrankungsdauer und damit dem größten KRK-Risiko (≥ 21 Jahre) die niedrigste Positivrate für CK20 in der PCR von nur 50%, gleichzeitig zeigten aber auch verhältnismäßig viele Blutproben dieser Gruppe (33%) drei positive Nachweise.

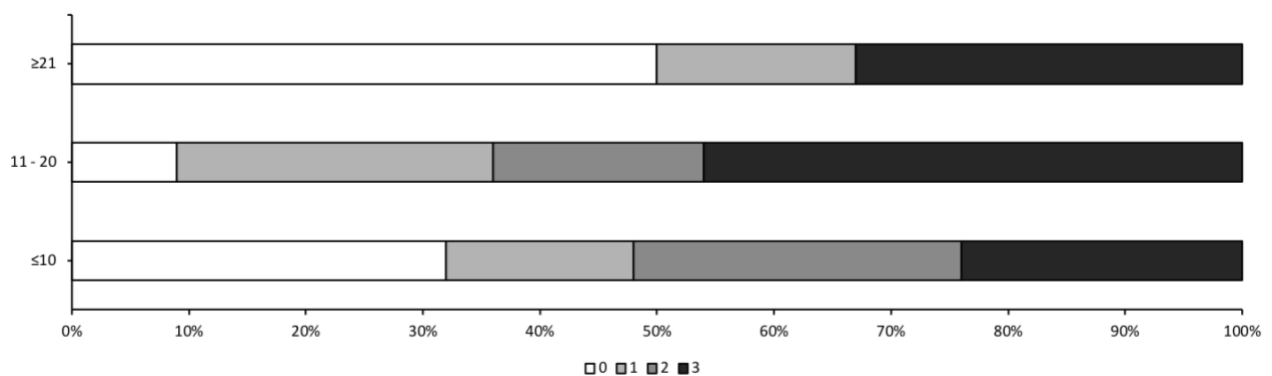


Abbildung 17: Anzahl positiver CK20 Nachweise im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gruppiert nach Anzahl der Jahre der Erkrankung seit der Erstdiagnose in ≤ 10 , 11-20 und ≥ 21 Jahre: Die Expressionsanalyse des CTC-assoziierten Markers CK20 erfolgte mittels qRT-PCR in Blutproben von Patienten mit CED. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Aufgetragen ist jeweils der prozentuale Anteil der Probanden, die keinen (0), einen (1), zwei (2) oder drei (3) Nachweise in der qRT-PCR gezeigt hatten.

DEFA5 hatte für alle Entzündungspatienten eine Negativrate von knapp 30% und eine 3fach Positivrate von 26% ergeben (**Abbildung 14**). Bei Betrachtung der CED Patienten und deren Erkrankungsdauer zeigte sich die Gruppe mit 11-20 Jahren Erkrankungsdauer vermehrt negativ (37%) und weniger häufig dreimal positiv (18%) als die anderen beiden Gruppen (**Abbildung 18**). Während die Gruppe mit der längsten Erkrankungsdauer und damit dem höchsten KRK-Risiko insgesamt die höchste Positivrate zeigte (82%), ergab sich bei der Gruppe ≤ 10 Jahre seit Beginn der Erstdiagnose die höchste Rate an drei positiven Nachweisen in der qRT-PCR (33%).

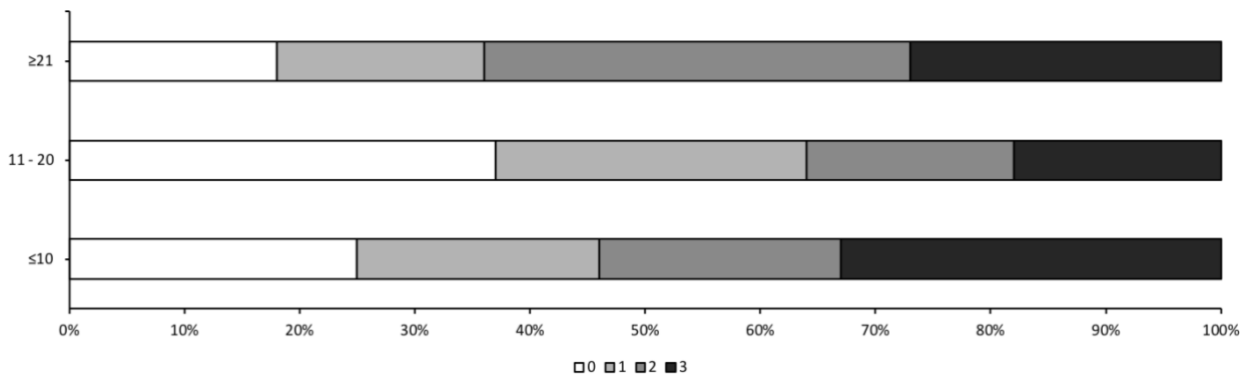


Abbildung 18: Anzahl positiver DEFA5 Nachweise im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gruppiert nach Anzahl der Jahre der Erkrankung seit der Erstdiagnose in ≤ 10 , 11-20 und ≥ 21 Jahre: Die Expressionsanalyse des CTC-assoziierten Markers DEFA5 erfolgte mittels qRT-PCR in Blutproben von Patienten mit CED. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Aufgetragen ist je der prozentuale Anteil der Probanden, die keinen (0), einen (1), zwei (2) oder drei (3) Nachweise in der qRT-PCR gezeigt hatten.

Im zweiten Schritt wurde die Qualität der Markerexpression zwischen den drei Gruppen analysiert (**Abbildung 19**).

Passend zu den Ergebnissen aus der Quantitätsanalyse war CK20 hier im Blut der Gruppe der CED Patienten mit 11-20 Jahren Erkrankungsdauer am stärksten exprimiert und unterschied sich signifikant zu Patienten mit einer Erkrankungsdauer von ≥ 21 Jahren (**Abbildung 19A**). In einer Subanalyse wurden die CED Patienten mit einer Erkrankungsdauer zwischen 11 und 20 Jahren bezüglich des Geschlechts, Alters, Raucherstatus und der Medikation sowie der Laborparameter CRP und Anzahl der Leukozyten mit den anderen Gruppen verglichen, um Verzerrungseffekte durch ebendiese Faktoren auszuschließen. Als einzige Auffälligkeit gegenüber den anderen Gruppen ergab sich hierbei, dass fast alle Patienten der Gruppe 11-20 Jahre Erkrankungsdauer eine immunsuppressive Therapie erhielten (Daten nicht gezeigt).

Für die Marker PLS3, LAD1 und DEFA5 waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den CED Patienten mit unterschiedlicher Erkrankungsdauer feststellbar (**Abbildung 19B, C, D**).

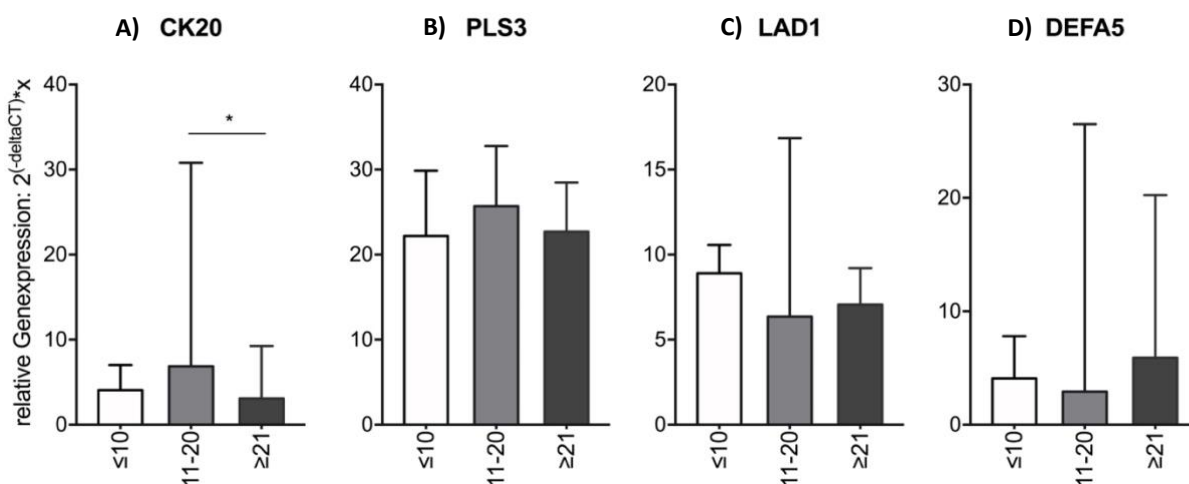


Abbildung 19: Die relative Expression CTC-assoziiierter Marker im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gruppiert nach Anzahl der Jahre der Erkrankung seit der Erstdiagnose in ≤ 10 , 11-20 und ≥ 21 Jahre: Die Expression CTC-assoziiierter Marker A)CK20, B)PLS3, C)LAD1, und D)DEFA5 wurde mittels qRT-PCR im Blut der CED Patienten detektiert. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Jeweils der Mittelwert der spezifischen Genexpression wurde auf die Expression des Haushaltsgens TBP normalisiert. Der Vergleich der mittleren Expressionswerte erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test. Angegeben sind hier die Mediane mit 95%igen Konfidenzintervall. (* = $p < 0,05$)

4.2.5 Eine immunsuppressive Medikation hat Einfluss auf die Expression CTC-assoziiierter Marker bei Patienten mit CED

Eine immunsupprimierende Therapie gehört zum Standardverfahren in der Therapie von CED Patienten. Hier kommen sie für die Behandlung akuter Schübe und die Aufrechterhaltung einer Krankheitsremission zum Einsatz (Abschnitt 1.1.2.6) (*S3-Leitlinie Colitis ulcerosa*, 2018; *S3-Leitlinie Morbus Crohn*, 2014).

Um einen bestehenden Zusammenhang zwischen der Einnahme immunsupprimierender Medikamente und der Expression CTC-assoziiierter Marker zu überprüfen, wurde die Expression der vier Marker in Blutproben von CED Patienten mit bzw. ohne immunsupprimierende Therapie verglichen (**Abbildung 20**). Für die CTC-assoziierten Marker CK20 und PLS3 konnten keine Unterschiede zwischen den zwei Gruppen festgestellt werden (**Abbildung 20A, B**). Hinsichtlich der LAD1 Expression zeigten Patienten, die immunsupprimierende Medikamente bekamen, eine deutlich niedrigere Expression als Patienten ohne Therapie (**Abbildung 20C**). Ein entgegengesetzter Trend ließ sich für DEFA5 zeigen. Hier wiesen vor allem Patienten mit immunsupprimierender Therapie eher eine höhere Expression auf (**Abbildung 20D**). Zusammenfassend zeigte sich hier, dass eine immunsupprimierende Therapie keinen Einfluss auf die Expression der CTC-assoziierten Marker CK20 und PLS3 hat, wohingegen vor allem für den Marker LAD1 ein Zusammenhang mit einer solchen Behandlung bei CED Patienten deutlich wurde.

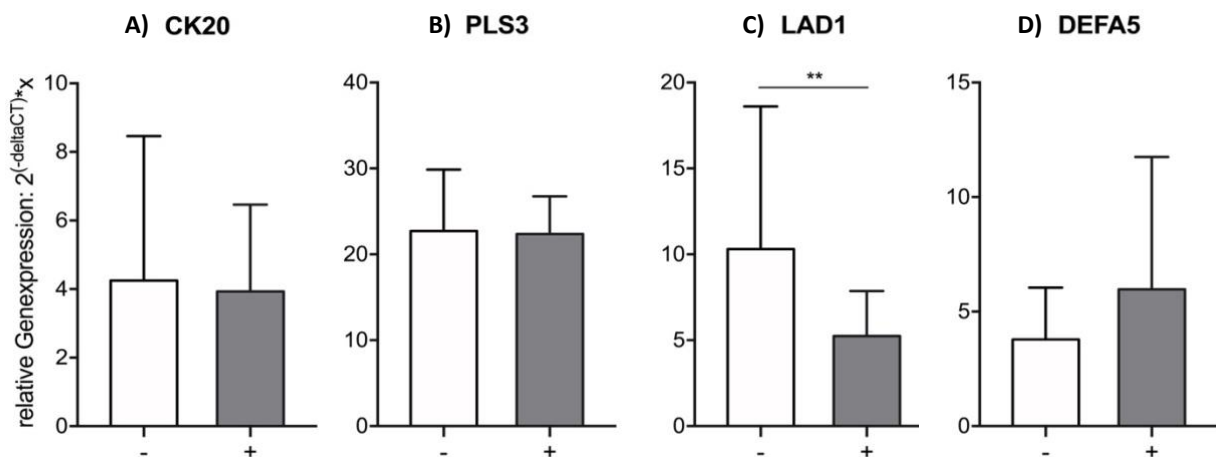


Abbildung 20: Die relative Expression CTC-assoziiierter Marker im Blut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Abhängigkeit von der Therapie durch immunsuppressive Medikamente Die Expression CTC-assoziierte Marker A)CK20, B)PLS3, C)LAD1, und D)DEFA5 wurde mittels qRT-PCR im Blut der CED Patienten detektiert. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Jeweils der Mittelwert der spezifischen Genexpression wurde auf die Expression des Haushaltgens TBP normalisiert. Der Vergleich der mittleren Expressionswerte erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Patienten, die zum Zeitpunkt der Blutspende immunsupprimierende Medikamente einnahmen sind hier mit „+“ (n=35), Patienten ohne immunsuppressive Therapie mit „-“ (n=15) gekennzeichnet. Angegeben sind die Mediane mit 95%igen Konfidenzintervall. (** = $p < 0,01$)

4.2.6 Laborchemische Entzündungsparameter wie CRP und Leukozytenanzahl korrelieren nicht mit der Expression CTC-assoziiierter Marker im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen

CRP und Leukozytenanzahl sind typische laborchemische Entzündungsparameter, die in der Klinik zur Diagnose und Beurteilung von inflammatorischen Erkrankungen genutzt werden (Graf und Gürkov, 2013; Sproston und Ashworth, 2018). Um zu klären, ob Entzündungsprozesse des Darms, die sich in einer Erhöhung dieser Parameter äußern, mit der Expression der CTC-assoziierten Marker im Blut der Patienten im Zusammenhang stehen, wurden präoperative Laborwerte der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen erhoben und mit der Genexpression der Marker in Verbindung gesetzt. Hierfür wurden die Patienten anhand der Referenzwerte für CRP und Leukozyten des Instituts für Klinische Chemie des Campus Kiel nach erhöhten bzw. normwertigen Laborparametern klassifiziert.

Bezüglich des CRP-Wertes ließen sich für keinen der Marker wesentliche Unterschiede zwischen normwertigen ($< 5 \text{ mg/l}$) und erhöhten ($\geq 5 \text{ mg/l}$) CRP-Werten nachweisen (Abbildung 21). Ein Trend konnte lediglich für den Marker PLS3 festgestellt werden: Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen mit CRP-Werten oberhalb des Normbereichs tendierten eher zu einer höheren Expression von PLS3 als Patienten mit normwertigem CRP (Abbildung 21B).

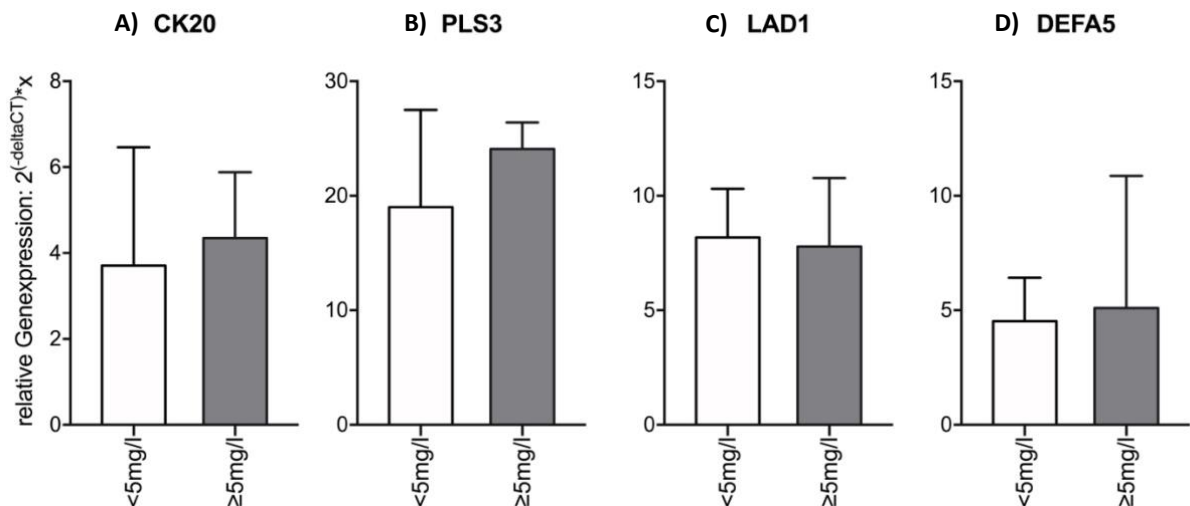


Abbildung 21: Die relative Genexpression CTC-assoziiierter Marker im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen ist unabhängig vom Entzündungsparameter CRP: Die Expression CTC-assoziierte Marker A)CK20, B)PLS3, C)LAD1 und D)DEFA5 wurde mittels qRT-PCR im Blut der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen detektiert. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Jeweils der Mittelwert der spezifischen Genexpression wurde auf die Expression des Haushaltsgens TBP normalisiert. Der Vergleich der mittleren Expressionswerte erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt ist die relative Genexpression von CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 in Blutproben von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen als Median mit 95%igen Konfidenzintervall bezogen auf ein normwertiges (<5mg/l) bzw. erhöhtes CRP (≥5mg/l) zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

Auch die Anzahl der Leukozyten gemessen im peripheren Blut der Patienten konnte nicht mit der Expression der Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 assoziiert werden. Patienten mit einer physiologischen Anzahl an Leukozyten ($3,9-10,2 \times 10^9/l$) zeigten ähnliche Expressionslevel wie Patienten mit erhöhter Anzahl im peripheren Blut ($>10,2 \times 10^9/l$) (**Abbildung 22**).

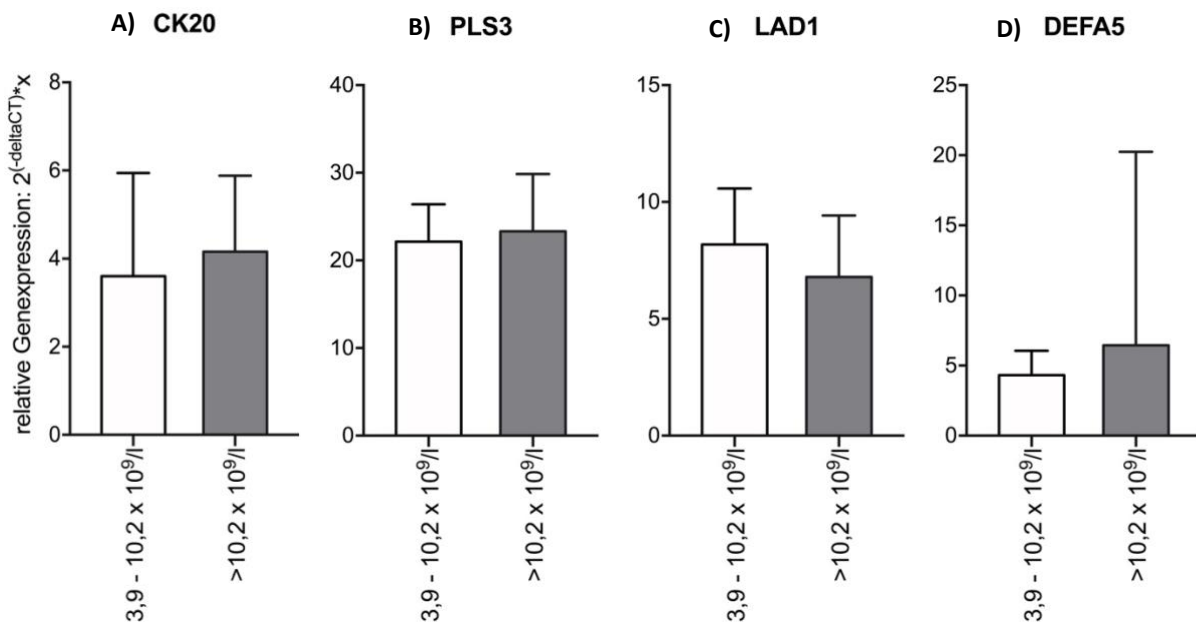


Abbildung 22: Die relative Genexpression CTC-assoziiierter Marker im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen ist unabhängig von der Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut: Die Expression CTC-assoziiierter Marker A)CK20, B)PLS3, C)LAD1 und D)DEFA5 wurde mittels qRT-PCR im Blut der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen detektiert. Jede Probe wurde hierbei dreimal gemessen. Jeweils der Mittelwert der spezifischen Genexpression wurde auf die Expression des Haushaltsgens TBP normalisiert. Der Vergleich der mittleren Expressionswerte erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt ist die relative Genexpression von CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 in Blutproben von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen als Median mit 95%igen Konfidenzintervall bezogen auf eine normwertige (3,9-10,2 x 10⁹/l) bzw. erhöhte Anzahl von Leukozyten (>10,2 x 10⁹/l) zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

4.2.7 Der Raucherstatus zeigt nur geringe Auswirkungen auf die Expression CTC-assoziiierter Marker im Blut

Rauchen hat sowohl Einfluss auf die Manifestation als auch auf den Verlauf einer CED. Hierbei gilt das Rauchen beim Morbus Crohn als Risikofaktor für die Entstehung und einen schwereren Krankheitsverlauf (Mahid et al., 2006). Den Patienten wird daher dringend eine Nikotinabstinenz empfohlen, um einen effektiven Remissionserhalt zu gewährleisten und die Rezidivrate zu senken (S3-Leitlinie Morbus Crohn, 2014). Bei der Colitis ulcerosa hingegen hat sich das Rauchen als protektiver Faktor sowohl für die Entstehung als auch für die Krankheitsschwere herausgestellt (Mahid et al., 2006).

Zusätzlich gilt Nikotinabusus als anerkannter Risikofaktor für die Entstehung verschiedener Tumore, darunter auch für kolorektale Karzinome (Tsoi et al., 2009). Auf Basis dieser Erkenntnisse sollte geprüft werden, ob sich der Raucherstatus der Probanden auf die Expression der CTC-assoziierten Marker auswirkt. Hierfür wurden sowohl Tumorpatienten, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen als auch Gesundspender nach ihrem Raucherstatus gruppiert und die Expression der Marker analysiert und innerhalb der Gruppen verglichen (Abbildung 23).

Im Blut von rauchenden Patienten mit einer entzündlichen Erkrankung des Darms konnte eine geringfügig höhere CK20 Expression festgestellt werden als im Blut der nicht-rauchenden entzündlich Erkrankten. Gegensätzliches zeigte sich bei den Gesundspendern. Hier ließ sich eine leicht höhere CK20 Expression im Blut der Nichtraucher feststellen (**Abbildung 23A**). Ähnliche Befunde waren auch für die CTC-assoziierten Marker PLS3 und LAD1 feststellbar. Entzündungspatienten und hier auch Gesundspender mit positiver Raucheranamnese wiesen tendenziell eine höhere Expression dieser Marker auf als Probanden aus der Nichtraucher-Kohorte (**Abbildung 23BC**). Die Expression des Markers DEFA5 war geringfügig höher im Blut von Tumorpatienten und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen mit negativer Raucheranamnese. Im Blut der Gesundspender zeigte sich hingegen eine höhere Expression in der Gruppe der Raucher (**Abbildung 23D**).

Abschließend ist in der hier vorliegenden Analyse kein deutlicher Einfluss des Rauchens auf die Expression der analysierten CTC-assoziierten Marker im Blut der verschiedenen Probandengruppen erkenntlich. Tendenziell waren die Expressionswerte für die CTC-assoziierten Marker im Blut von nichtrauchenden Tumorpatienten höher, während sie sich bei nichtrauchenden Gesunden oder Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen teilweise eher erniedrigt zeigten.

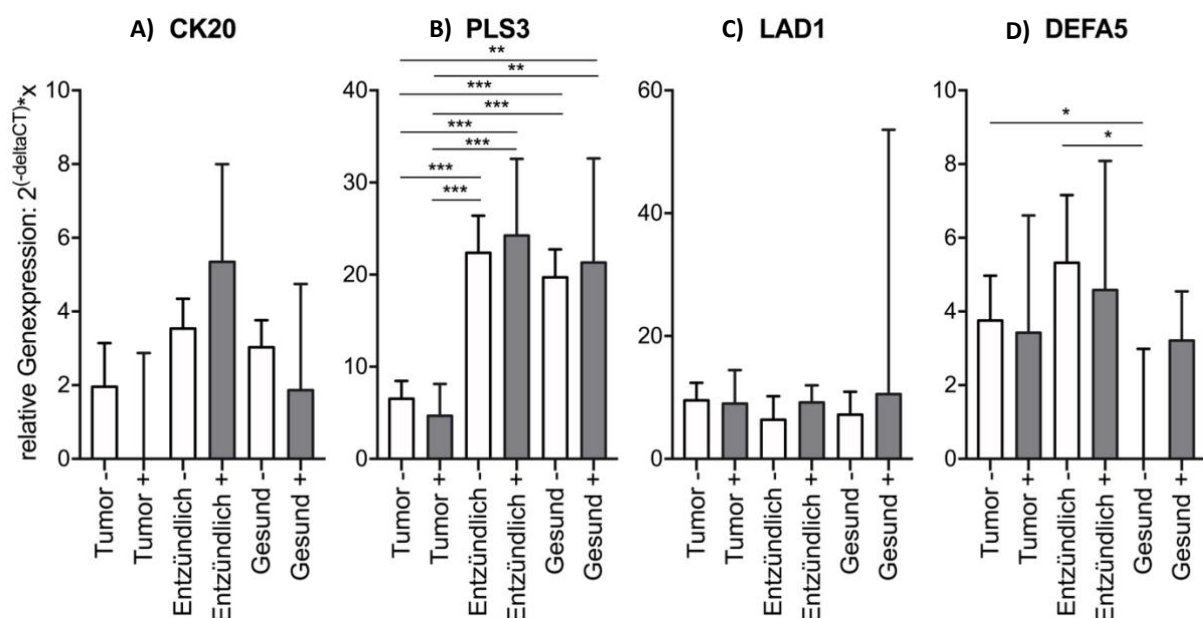


Abbildung 23: Relative Genexpression CTC-assoziiierter Marker im Blut in Abhängigkeit vom Raucherstatus der Probanden: Mittels qRT-PCR wurde die relative Genexpression von A)CK20, B)PLS3, C)LAD1 und D)DEFA5 im peripheren Blut von Tumorpatienten, Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen und Gesundspendern bestimmt und auf die Expression des Haushaltsgens TBP normalisiert. Die relative Genexpression ist hier als Median mit 95%igen Konfidenzintervall aufgetragen, „-“ steht hierbei für Nichtraucher, „+“ für aktiv rauchende Patienten. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$)

4.2.8 Die Detektion von PLS3 erlaubt mit hoher Sensitivität und Spezifität die Differenzierung von Patienten mit malignen Erkrankungen des Darms von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen und gesunden Spendern

Die diagnostische Wertigkeit von CTC-assoziierten Markern ist weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Bisher wurde der Fokus hier allerdings vor allem auf eine mögliche Erkennung von Patienten mit kolorektalen Karzinomen und die Unterscheidung von gesunden Patienten durch die Detektion von CTC gelegt. Nicht untersucht wurde hingegen, ob diese Marker auch zur Diskriminierung einer malignen Erkrankung von einer benignen, entzündlichen Erkrankung des Darms geeignet sind.

Daher sollte hier abschließend die Frage geklärt werden, ob sich die hier untersuchten Marker zur Diskriminierung zwischen den drei Probandengruppen eignen.

Dafür wurden die Expressionslevel der Marker CK20, PLS3 und LAD1 für Gesundspender, Tumor- und Entzündungspatienten mit Hilfe einer ROC-Kurven-Analyse bezüglich der Trennschärfe zwischen den Zustandsvariablen maligne Erkrankung vs. benigne Erkrankung bzw. Gesundheit analysiert. **Abbildung 24** zeigt die ROC-Kurven für die vier Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 unter Angabe der *area under the curve* (AUC). Aus den Koordinaten der ROC-Kurve konnte im Anschluss mit Hilfe des Youdens-Index ein Cut-Off Wert bestimmt werden, an dem die Sensitivität und Spezifität maximal waren. Kamen hierfür mehrere Werte in Betracht, wurde derjenige Wert mit der höchsten Sensitivität gewählt.

In der hier vorliegenden Kohorte konnte für CK20 kein Cut-Off Wert bestimmt werden, der mit zufriedenstellender Sensitivität und Spezifität die Patientengruppen klassifizieren konnte. Die fehlende Trennschärfe wurde auch durch den niedrigen AUC-Wert von 0,55 ($p = 0,198$) in der ROC-Kurve veranschaulicht (**Abbildung 24A**). Nach Anwendung des idealen Cut-Off Werts von 3,06 EU wurden circa ein Drittel der Tumorpatienten falsch negativ eingestuft und fast die Hälfte der Gesunden bzw. Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zeigte ein falsch positives Ergebnis.

PLS3 hingegen zeigte einen AUC-Wert von $> 0,9$ ($p < 0,001$) und konnte bei einem Cut-Off Wert von 13,28 EU mit annähernd 90%iger Sensitivität und Spezifität Patienten mit malignen Darmerkrankungen aus der Gesamtheit der Probanden detektieren und damit auch von den Patienten mit benignen Darmerkrankungen diskriminieren (**Abbildung 24B**). Unter den 13 falsch-positiv erkannten Probanden waren sechs Patienten mit Morbus Crohn, ein Patient mit Colitis ulcerosa und sechs Gesundspender. Sechs der sieben falsch klassifizierten CED-Patienten nahmen Immunsuppressiva ein. Bezüglich anderer Patientencharakteristika konnten keine Auffälligkeiten

festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt zeigten elf Patienten mit kolorektalem Karzinom ein falsch-negatives Testergebnis. Hinsichtlich des TNM-Stadiums oder anderer Faktoren konnten ebenfalls keine erklärenden Einflüsse unter den erhobenen Daten gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

LAD1 zeigte bei einem Cut-Off Wert von 5,65 EU eine gute Sensitivität von 81%, bei einer jedoch unzureichenden Spezifität von 38%, erkenntlich durch eine hohe Falsch-Positiv-Rate und den niedrigen AUC-Wert von 0,62 ($p = 0,003$) (**Abbildung 24C**).

Für den Marker DEFA5 war aus den Expressionsanalysen (Abschnitt 4.2.3) deutlich geworden, dass hier keine Trennung zwischen maligner und benigner (entzündlicher) Erkrankung des Organsystems möglich ist, sondern lediglich zwischen einem pathologischen Prozess (maligne / benigne Erkrankung) und Gesundheit diskriminiert werden könnte. Daher wurde für DEFA5 die Trennkategorie Krank vs. Nicht Krank verwendet. Die ROC-Kurven-Analyse ergab bei einem optimalen Cut-Off von 3,18 EU eine Spezifität von 70%, bei unzureichender Sensitivität (56%) und einen ebenfalls niedrigen AUC-Wert von 0,65 ($p = 0,002$) (**Abbildung 24D**).

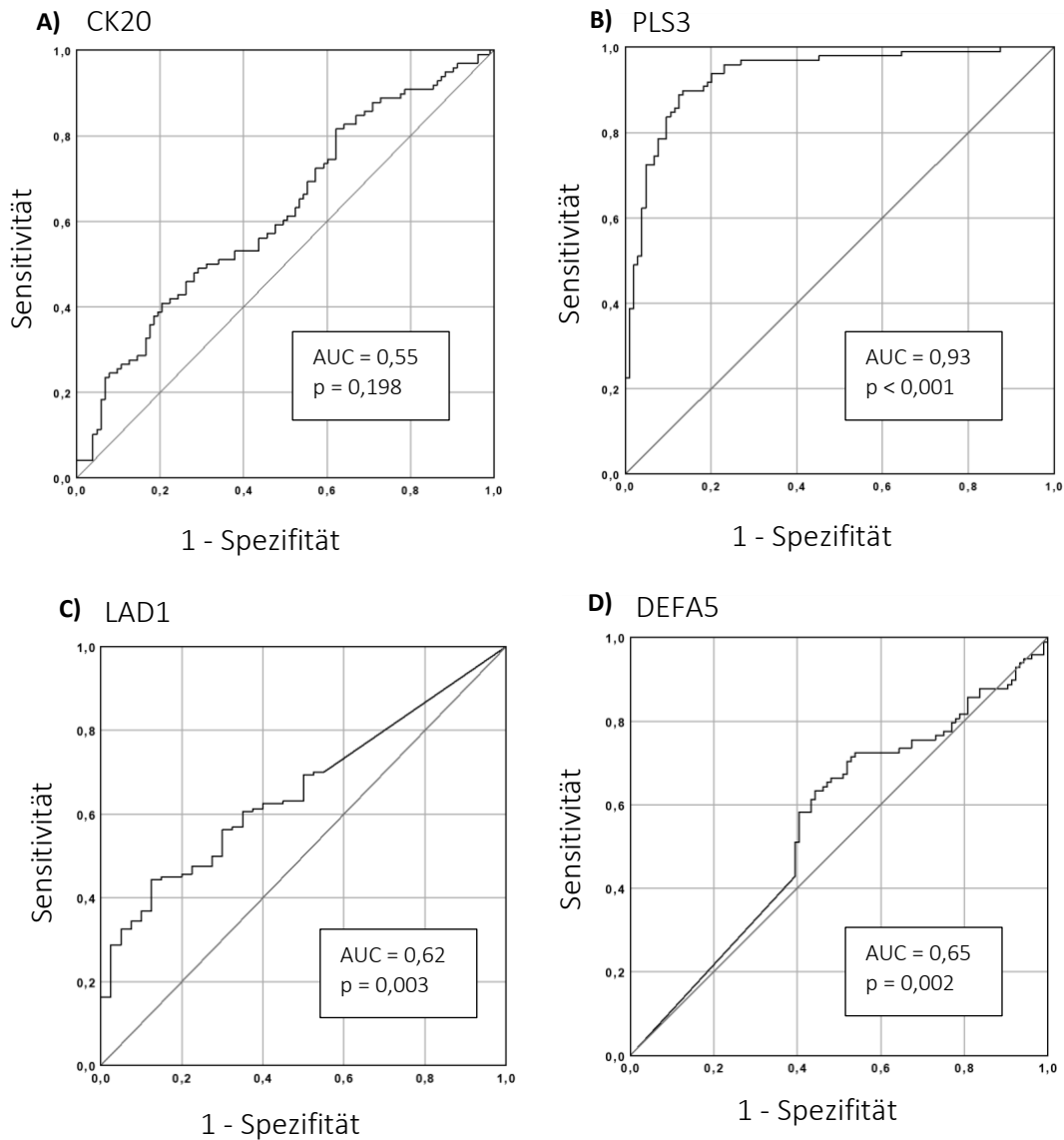


Abbildung 24: Graphische Darstellung der ROC-Kurven-Analysen für die CTC-assoziierten Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5: Die Expressionslevel von A)CK20, B)PLS3, C)LAD1 und D)DEFA5 wurden bezüglich ihrer Trennschärfe zwischen einer malignen Erkrankung und benignen Erkrankungen bzw. Gesundheit untersucht, mit Ausnahme von DEFA5. Hier wurde aufgrund von Erkenntnissen aus den Expressionsanalysen als Trennkategorie die Unterscheidung von Krankheit (maligne/benigne) gegen Gesundheit gewählt. Mit Hilfe der ROC-Kurven konnte der Youdens-Index als Punkt der besten Sensitivität und Spezifität festgelegt werden, aus dem sich im Anschluss der Cut-Off Wert ergab. Die rote Linie stellt eine diagonale Bezugslinie dar. AUC = area under the curve. Der jeweilige p-Wert der statistischen Signifikanz ist unter dem AUC-Wert genannt.

Zusammenfassend deuten die Befunde aus dieser Analyse an der vorliegenden Probandengruppe darauf hin, dass vor allem PLS3 als sensitiver und spezifischer Marker zur Detektion von malignen Erkrankungen des Darms und zur Diskriminierung von benignen Erkrankungen dieses Organsystems geeignet ist.

5. Diskussion

Karzinome des Dickdarms und Rektums sind bei Frauen die zweithäufigste, bei Männern die dritthäufigste Krebsneuerkrankung in Deutschland (*Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021*). Neben umwelt- und ernährungsbezogenen Risikofaktoren werden auch die CED mit dem Auftreten von KRK assoziiert (*Eaden et al., 2001; Gillen et al., 1994*). Eine frühe Diagnosestellung des KRK geht hierbei mit einer höheren Heilungschance einher (*Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021*).

Der Nutzen der Detektion von CTC beim KRK könnte in Zukunft sowohl zu diagnostischen Zwecken als auch im Bereich der Therapieüberwachung und -entscheidung an Wichtigkeit gewinnen. Für die Expression des CTC Markers CK20 konnten Hinz et al. bereits eine Assoziation zum Überleben von KRK Patienten zeigen sowie Hendricks et al. das Expressionsniveau von CK20 mit dem Tumorstadium korrelieren (*Hendricks et al., 2018; Hinz et al., 2017*). In der vorliegenden Doktorarbeit sollten neben CK20 andere Marker, die zur CTC Detektion verwendet bzw. mit der Tumorprogression des KRK assoziiert werden, validiert und zusätzlich geprüft werden, ob diese auch im Blut von Patienten mit entzündlichen, aber benignen Erkrankungen des Darms detektierbar sind. Hierzu gehörten Patienten mit Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Sigmadivertikulitis. Mit Analysen von 202 Blutproben von Patienten mit malignen und benignen intestinalen Erkrankungen sowie gesunden Spendern konnte die Expression verschiedener CTC-assoziiertes Marker bestimmt und mit der Art der Erkrankung (benigne, maligne) sowie verschiedenen klinischen und pathologischen Parametern assoziiert werden.

Ergänzend dazu wurde *in vitro* unter Nutzung von Kokulturen aus M1-Makrophagen und der intestinalen Epithelzelllinie NCM-460 der Einfluss einer entzündlichen Umgebung auf die Expression CTC-assoziiertes Marker in intestinalen Epithelzellen sowie auf funktionelle Veränderungen untersucht.

5.1 *In vitro* Studie: Einfluss einer entzündlichen Umgebung auf die Expression CTC-assoziiertes Marker in intestinalen Epithelzellen

In diesem Teil der Studie erfolgte die experimentelle Untersuchung, ob eine entzündliche Umgebung einen Einfluss auf die Expression CTC-assoziiertes Marker in intestinalen Epithelzellen hat und wie sich diese funktionell auf die Zellen auswirkt. Dazu wurde die humane intestinale Epithelzelllinie NCM-460 mit humanen *in vitro* differenzierten M1-Makrophagen über sechs Tage indirekt kokultiviert.

Vor allem für die Marker CK20, DEFA5 und PLS3 konnte gezeigt werden, dass die kokultivierten NCM-460 Zellen eine deutlich niedrigere Expression aufwiesen als monokultivierte NCM-460 Zellen, teilweise bis auf ein sehr ähnliches Niveau wie Zellen der malignen kolorektalen Zelllinie HT29. Die kokultivierten NCM-460 Zellen und die HT29 Zellen unterschieden sich in ihrer Expression insgesamt signifikant von den monokultivierten NCM-460 Zellen. Diese Ergebnisse zusammen mit der Funktionsanalyse zur Migration und der Expressionsanalyse der EMT-Marker untermauern die Hypothese, dass intestinale Epithelzellen im Rahmen einer chronisch entzündlichen Umgebung malignitäts-assoziierte Veränderungen erfahren (*Schäfer et al., 2013; Taniguchi und Karin, 2014*) und sind passend zu der Annahme einer erhöhten Karzinomwahrscheinlichkeit in CED Patienten nach langjähriger Erkrankung.

Insgesamt konnten die *in vitro* beobachteten EMT-assoziierten Veränderungen wie eine gesteigerte L1CAM- und Vimentin-Expression, die Annahme einer mesenchymalen Zellform und Auflösung der Zell-Zellkontakte in der NCM-460 Zelllinie unter dem Einfluss proinflammatorischer Makrophagen Hinweise liefern, welche Faktoren auch *in vivo* zur Disseminierung von intestinalen Epithelzellen in die Blutbahn führen könnten.

CK20 ist zwar auf KRK-Zellen zu detektieren und wurde als CTC-assoziiertes Marker bereits verwendet (*Hendricks et al., 2018; Hinz et al., 2017*), allerdings weisen die Daten aus der Kokultur darauf hin, dass die CK20 Expression unter Einfluss von M1-Makrophagen vermindert wird (auf ein ähnliches Niveau wie in der KRK-Zelllinie HT29) und mit einer gesteigerten Migrationsfähigkeit assoziiert ist.

Im Einklang dazu stehen auch die Auswirkungen des CK20 spezifischen Knockdowns in den NCM-460 Zellen. Der durch den spezifischen Knockdown verursachte Verlust von CK20 zeigte eine zusätzliche Steigerung der Migrationsrate und unterstützt die These einer Loslösung der Zellen im Rahmen einer in der Tumorgenese veränderten Genexpression (*Stratton et al., 2009*). Die Marker CK20 und PLS3 stellen in ihrer Funktion stabilisierende Elemente der Epithelzelle dar, die auch mit der Zellintegrität und dem Zellzusammenhalt in Verbindung gebracht werden (*Coulombe und Omary, 2002; Pollard und Cooper, 2009*). Ein Absinken der Expression im Laufe der Karzinogenese passt demnach zur Bildung von Metastasen und dem Nachweis von losgelösten zirkulierenden malignen Zellen im Blut. Der Verlust der Expression von Zytokeratinen ist bereits für Karzinomzellen im Rahmen der EMT beschrieben worden (*Knösel et al., 2006; Shi et al., 2020; Werner et al., 2020*), was im Einklang steht mit der niedrigsten CK20 Expression in der Karzinomzelllinie und der höchsten in der monokultivierten NCM-460 Zellen.

Neben den „*Hallmarks of Cancer*“, einem Konzept, das die grundlegenden im Mehrschrittprozess der Karzinogenese erworbenen Fähigkeiten einer malignen Läsion beschreibt, definierten die Autoren zusätzlich die sogenannten *Enabling Characteristics of Cancer* (d.h.: Charakteristika, die die Tumorentstehung ermöglichen). Die *Tumor promoting inflammation* (d.h.: Tumorbegünstigende Entzündung) wurde als ein *Enabling Characteristic* definiert, da entzündliche Prozesse den Erwerb der anderen *Hallmarks of Cancer* fördern und damit z.B. die Zellproliferation, das Zellüberleben sowie die Gefäßneubildung oder auch die Invasion von Zellen erhöhen (Hanahan und Weinberg, 2011).

Vor allem für die in dieser Studie verwendeten Makrophagen konnte vielfach gezeigt werden, dass diese nicht nur eine Rolle in der inflammatorischen, sondern auch in der malignitäts-assoziierten Veränderung von Epithel-/Karzinomzellen spielen (Helm et al., 2014; Ostuni et al., 2015; Rahn et al., 2019; Schäfer et al., 2013; Singh et al., 2019). Die Bedeutung von TNF- α , einem der wichtigsten sekretorischen Faktoren von proinflammatorischen Makrophagen (Martinez et al., 2006) in der Entwicklung einer malignen Neoplasie, konnte von Yan et al. gezeigt werden. In der Studie wurde die Auswirkung von TNF- α auf die chromosomale Stabilität von kultivierten KRK-Zellen geprüft. Hierbei konnte festgestellt werden, dass TNF- α durch die Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies eine oxidative DNA-Schädigung hervorruft, was in seiner Schadenshöhe mit ionisierender Strahlung vergleichbar war. Hierfür wurden unter anderem neu aufgetretene chromosomale Aberrationen und Genamplifikationen zwischen den kultivierten Zellen unter Zugabe von TNF- α oder unter ionisierter Bestrahlung verglichen. TNF- α zeigte hier sehr ähnliche Effekte, d.h. es konnte eine vergleichbare mutagene Potenz von TNF- α im Vergleich zur ionisierenden Strahlung festgestellt werden. TNF- α könnte demnach als fast gleichwertiges potentiell Karzinogen behandelt werden (Yan et al., 2006). Darüber, ob TNF- α auch in dem hier verwendeten Cokulturmodell zu den beobachteten Veränderungen führt, lässt sich bisher nur spekulieren. Weitere Untersuchungen z.B. unter Nutzung von blockierenden TNF- α Antikörpern wären sinnvoll, um zu klären, ob TNF- α zu den Makrophagen-vermittelten Veränderungen in den NCM-460 Zellen beiträgt. Die Ergebnisse der Studie von Yan et al. sowie die hier erhobenen Befunde passen in das Bild, dass eine chronisch-proinflammatorische Umgebung zu malignitäts-assoziierten Veränderungen beiträgt.

Hervorzuheben ist außerdem, dass sich im Rahmen der analysierten EMT-assoziierten Veränderungen wie der erhöhten Expression der Marker L1CAM und Vimentin, eine Veränderung der Zellmorphologie in Richtung eines mesenchymalen Zelltyps und auch eine veränderte Expression der CTC-assoziierten Gene beobachten ließ. Beispielsweise gilt CK20 als Zeichen für

eine bestehende Zelldifferenzierung. Die hier in den kokultivierten NCM-460 Zellen gemessene Reduktion der CK20 Expression, dem typischen zytoskelettalen Strukturprotein kolorektaler Epithelzellen, passt somit zu den beobachteten morphologischen Veränderungen, kann mit den erhöhten migratorischen Fähigkeiten in Zusammenhang gebracht werden und kann somit insgesamt für eine Entfernung der Zelle von ihrem ursprünglichen Phänotyp gesehen werden.

Insgesamt stehen die hier gewonnen Erkenntnisse im Einklang mit der aktuellen Datenlage zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms auf dem Boden einer chronischen Entzündung wie der CED (*Eaden et al., 2001; Jess et al., 2012; Gillen et al., 1994*). Sie unterstützen weiterhin die Bedeutung von Vorsorgeuntersuchungen für die betroffenen Patienten, da solche chronischen Entzündungsgeschehen und die daraus resultierende Erhöhung von proinflammatorischen Stimuli und reaktiven Sauerstoffspezies langfristig zu irreparablen DNA-Schäden und damit zu einer Dysplasie der Zellen führen können (*Foersch und Neurath, 2014; Ferguson, 2010*). Die vorgesehenen regelmäßigen histopathologischen Untersuchungen betroffener Gewebsabschnitte und die prophylaktische Entfernung von dysplastischem Gewebe ist in Hinblick auf die hier gesammelten Daten eine unbedingt durchzuführende Vorsichtsmaßnahme zur Prävention einer malignen Entartung.

Die Tatsache, dass CK20 wie auch andere epitheliale Marker während der Tumorgenese im Rahmen der EMT verloren gehen (*Wildi et al., 1999; Gorges et al., 2012; Thiery, 2002*), wirft allerdings die Frage auf, ob diese Marker überhaupt geeignet sind für die Detektion von CTC. Vor allem aufgrund dieser bekannten und viel kritisierten Problematik ist die Suche nach geeigneteren CTC-assoziierten Markern, die nicht abhängig sind von der EMT bzw. MET, intensiv. In der hier vorliegenden Arbeit sollten daher weitere bisher noch nicht geprüfte Marker für die Detektion von CTC analysiert werden.

5.1.1 Methodische Limitationen

Eine Einschränkung des hier vorliegenden Versuchsaufbaus ist, dass eine indirekte Kokultur von Kolonepithel mit Makrophagen ein komplexes Entzündungsgeschehen, wie es bei Patienten mit CED vorkommt, nur vereinfacht widerspiegelt. Das direkte und indirekte Zusammenspiel von intestinalen Epithelzellen mit verschiedensten Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems wurde hier nicht vollständig nachgebildet. Da jedoch Makrophagen eine der prominentesten Immunzellpopulation im Entzündungs- und Tumorgeschehen ist (*Lissner et al.,*

2015; *Qian und Pollard, 2010*), wurde in dieser Studie isoliert der Einfluss von parakrinen Effekten von M1-Makrophagen untersucht.

Auch wenn in diesem Teil der Studie mittels der Untersuchung parakriner Effekte bekannte Zusammenhänge zwischen einer entzündlichen Umgebung und kolorektalen Epithelzellen validiert und neue Erkenntnisse gewonnen werden konnten, könnte eine Untersuchung des Einflusses von direkten Zell-Zellkontakten zwischen Entzündungs- und kolorektalen Zellen eine weitere wichtige Einsicht in die Veränderungen im kolorektalen Epithel durch proinflammatorische Einflüsse erlauben.

Des Weiteren wurde bisher nur eine einzige intestinale Zelllinie sowie eine KRK Zelllinie untersucht. Eine Steigerung der Aussagekraft der Ergebnisse könnte sich aus der Verwendung zusätzlicher Zelllinien oder sogar Primärzellen aus dem Gewebe der betroffenen Patienten ergeben.

5.2 Analyse von Probandenmaterial

5.2.1 Nachweis von CTC Markern im Blut von CED Patienten und gesunden Probanden

Die Analyse des Probandenmaterials erfolgte mittels qRT-PCR auf molekulare Marker, die bereits für die Detektion von CTC verwendet oder mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht werden. Ziel der Studie war es zu prüfen, ob ein Nachweis solcher CTC-assoziiierter Marker auch in Patienten mit benignen intestinalen Erkrankungen, wie einer CED, möglich ist, auf welchem Niveau eine solche Expression vorliegt und ob diese mit klinischen Parametern der Patienten zu korrelieren ist. Ferner sollte überprüft werden, ob sich darüber Patienten mit einer malignen Erkrankung von Patienten mit einer benignen Erkrankung des Organsystems differenzieren lassen. Als eine weitere Kontrolle dienten Blutproben von gesunden Probanden. Eine primäre Erkenntnis dieser Studie war einerseits, dass sich die CTC-assoziierten Marker durchaus auch im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen ließen, andererseits zeigten aber auch die Proben der gesunden Probanden positive PCR Ergebnisse. Die verschiedenen Marker präsentierten sich hierbei allerdings unterschiedlich. Auffällig waren vor allem die Ergebnisse aus den PLS3- und LAD1-Analysen, in denen alle Gesundspender mit drei Nachweisen positiv waren. Insgesamt stellt sich hier die kritische Frage der Spezifität der Untersuchung. Diese war für die CK20-qRT-PCR u.a. von *Hinz et al.* dokumentiert worden, in deren Studie keiner der gesunden Probanden ein positives Ergebnis zeigte (*Hinz et al., 2017*). Auch für PLS3 konnte ein Nachweis im

Blut gesunder Spender bisher nicht erbracht werden (*Yokobori et al., 2013*). Für LAD1 und DEFA5, als bisher wenig erforschte Marker für die Detektion von CTC, gab es vor Studienbeginn keinen Hinweis auf eine Expression der Marker im Blut von Gesundspendern.

An dieser Stelle sollte allerdings nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei den hier untersuchten Markern nicht um tumorspezifische, sondern lediglich um tumorassoziierte Marker handelt. Bei den oben genannten Studien wurde die Expression der CTC-assoziierten Marker jeweils im Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen und im Blut von Gesundspendern analysiert. Patienten mit entzündlichen Erkrankungen gehörten hier weder zur Patienten- noch zur Kontrollkohorte. Ein Vorkommen in Entzündungspatienten ist also primär nicht unmöglich, jedoch sollten mögliche (patho)physiologische Vorgänge, die im Rahmen einer solchen Expression eine Rolle spielen könnten, betrachtet werden.

Dennoch bringt die Detektion der Marker in der Kontrollgruppe grundsätzlich eine limitierte Spezifität mit sich, die für CK20 schon intensiv von *Vlems et al.* diskutiert wurde (*Vlems et al., 2002*). Hier wird unter anderem postuliert, dass eine Aktivierung universeller Transkriptionsfaktoren sowie Promoterregionen in Zelltypen, die normalerweise keine CK20 Expression aufweisen, zu einer unspezifischen CK20 Expression in verschiedenen Geweben und auch in hämatopoetischen Zellen führen könnten. So konnten *Jung et al.* eine geringe Expression von CK20 in Granulozyten ausmachen (*Jung et al., 1999*). Granulozyten sollten in dieser Studie allerdings durch die Dichtegradientenzentrifugation nicht mehr in dem untersuchten Probenmaterial enthalten sein und so nicht zu einem falsch-positiven Ergebnis beitragen.

Für CK20 und DEFA5, bei denen 60 bzw. 55% der Gesundspender ein positives Testergebnis hatten, könnten aber auch bestimmte Umstände vor oder zum Zeitpunkt der Blutspende das Ergebnis verfälschen, z.B. beginnende entzündliche Prozesse im Darm, der Zustand nach einer kürzlich zurückliegenden Untersuchung des GIT oder ähnliche Faktoren, die in der vorliegenden Studie nicht erfasst wurden. Für einen eher krankheitsabhängigen Nachweis in gesunden Spendern sprechen auch die deutlichen Unterschiede in der Anzahl der Nachweise bei der PCR Testung. Positive Gesundspender hatten hier vor allem für den Marker CK20 in der Mehrzahl nur einen von drei Nachweisen in der PCR, wohingegen KRK-Patienten oder Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen größtenteils mindestens zwei positive Nachweise hatten. Dies belegt einerseits die hohe Sensitivität des PCR Verfahrens und andererseits wie selten ein solches positives Ereignis in Gesunden vorkommt.

Neben der Anzahl an Nachweisen in der PCR wurde für jeden Marker auch die relative Genexpression in der Probandengruppe untersucht. Hierbei zeigte sich bei CK20, dass die

Genexpression in Gesunden und Entzündungspatienten tendenziell höher war als in Patienten mit kolorektalen Tumoren. Dieser Befund könnte dadurch erklärt werden, dass in den ersten beiden Gruppen noch intestinale Epithelzellen mit einer physiologisch hohen Expression von CK20 nachgewiesen wurden, während in Proben von Tumorpatienten vor allem Zellen mit EMT-assoziiierter herunterreguliertem CK20 in hoher Zahl detektiert wurden. Dies steht auch im Einklang mit den Ergebnissen aus der *in vitro* Studie. Die höchste CK20 Expression konnte hier in monokultivierten NCM-460 Zellen nachgewiesen werden, während die maligne kolorektale Zelllinie HT29 eine signifikant niedrigere Expression aufwies (Abschnitt 4.1.5). Gleichwohl sind die hier detektierten hohen Expressionswerte von CK20 im Blut gesunder Probanden kaum mit der Annahme zu vereinen, dass im Blut von Gesunden ein Nachweis epithelialer- bzw. CTC-assoziierte Marker nicht möglich sein sollte.

Bei Gesunden war ein Nachweis von DEFA5 seltener und auf niedrigerem Niveau möglich, wohingegen vor allem entzündliche aber auch KRK Patienten vergleichsweise hohe Expressionen von DEFA5 im Blut zeigten. Diese Befunde stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass die DEFA5 Expression im Darmgewebe von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöht ist (*Dobre et al., 2018; Lawrance et al., 2001; Noble et al., 2008; Srivastava und Kulaylat, 2004*). Diese Erhöhung könnte genauso auch im Zuge einer Aktivierung des intestinalen Immunsystems in Folge einer malignen Erkrankung geschehen. Somit ist vorstellbar, dass intestinale Epithelzellen unter Einfluss des inflammatorischen Milieus u.a. zur vermehrten DEFA5 Expression stimuliert werden und aufgrund der damit auch einhergehenden erhöhten Permeabilität des Endothels Zugang zur Blutbahn erlangen. In diesem Kontext könnte die Loslösung von Epithelzellen also als eine entzündlich-vermittelte Disseminierung von Epithelzellen gedeutet werden. Hiermit vereinbar sind auch die Befunde zur sogenannten Panethzell-Metaplasie in Patienten mit CED. Panethzellen sind hochspezialisierte sekretorische Zellen, die physiologischerweise vornehmlich im terminalen Ileum vorkommen, eine der am häufigsten befallenen Lokalisation des Morbus Crohn. Sie zeichnen sich vor allem durch die hohe Konzentration an intrazellulärer Granula aus, die eine Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden sowie immunmodulatorischen Molekülen enthalten (*Lueschow und McElroy, 2020; Porter et al., 2002*), wie z.B. DEFA5 (*Wehkamp und Stange, 2020*). Eine Panethzell-Metaplasie in Darmabschnitten, in denen normalerweise keine dieser Zellen nachweisbar sind, konnte in Darmgewebe von CED Patienten gezeigt werden: hier ließen sich diese histologisch in den Krypten des Dickdarms sowie bei der Colitis ulcerosa auch im Rektum nachweisen (*Mitsuhashi et al., 2005; Simmonds et al., 2014*).

Der Nachweis vom vermehrten Vorkommen der Panethzellen an atypischen Stellen im Darmgewebe könnte mit den in dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen im Einklang stehen, unter der Annahme, dass die Absiedlung der Panethzellen durch entzündliche Vorgänge getriggert wird und zu einer Disseminierung in die Blutbahn führt.

PLS3 konnte im Blut von allen drei Probandengruppen nachgewiesen werden. Dennoch konnten für diesen Marker Unterschiede in der Expression in den verschiedenen Probandengruppen gezeigt werden. Besonders auffällig war hier die signifikant niedrigere Expression von PLS3 in der Gruppe der Tumorpatienten. Zwischen Gesunden und Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen war hingegen kein Unterschied detektierbar. Bisherige Erkenntnisse zur Funktion von PLS3 können hierfür keinen eindeutigen Erklärungsansatz geben. Stattdessen machen diese Befunde auf ein mögliches Problem der CTC-Detektion mithilfe von gewebespezifischen Markern aufmerksam. Für PLS3 hatten Yokobori et al. den Nachweis erbracht, dass der Marker sowohl im kolorektalen Primärtumor als auch in Metastasen exprimiert wird und somit nicht dem Prozess der EMT unterliegt (Yokobori et al., 2013). Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse vermitteln eher einen entgegengesetzten Eindruck, denn das niedrige Expressionsniveau von PLS3 im Blut von Tumorpatienten könnte durch die im Verlauf der Karzinogenese veränderte Genexpression, z.B. im Rahmen der EMT, erklärt werden. Hier zeigen sich auch Parallelen zu den *in vitro* Daten, wo die KRK-Zelllinie HT29 und die kokultivierten NCM-460 Zellen signifikant niedrigere Expressionsniveaus im Vergleich zu den monokultivierten NCM-460 Zellen gezeigt hatten. Der hochgradige Nachweis von PLS3 in Gesunden und Entzündungspatienten deutet auf eine entzündlich bedingte und auch im physiologischen Kontext stattfindende Disseminierung von Epithelzellen in den Blutkreislauf hin. Der Einfluss proinflammatorischer Mediatoren auf ein erhöhtes Migrationspotenzial epithelialer Zellen ist bekannt, welche Faktoren im Gesunden zu einer Absiedlung von Zellen in die Blutbahn führen ist bisher allerdings ungeklärt (Coussens und Werb, 2002; Pantel et al., 2012).

Allerdings könnte es auch sein, dass PLS3 in Blutzellen exprimiert wird, was zu den hier erhobenen Daten führt. Aber auch dann bliebe PLS3 als Marker weiterhin interessant und mit Forschungsbedarf verbunden, da sich die Expression stark abhängig vom Vorliegen einer malignen Erkrankung gezeigt hat und zur Diskriminierung zwischen den Probandengruppen maligne und benigne/gesund eignet.

Die Expression des Markers LAD1 hatte sich in der Analyse der Probandenproben für Tumorpatienten erhöht gezeigt und entsprach so auch den bisherigen Erkenntnissen einer Hochregulierung von LAD1 in malignem Gewebe (Codreanu et al., 2017; Roth et al., 2018).

Gleichzeitig war der Nachweis des Markers auch im Blut von Patienten mit benignen Darmerkrankungen sowie auch bei Gesundspendern möglich, was die diagnostische Wertigkeit des Markers zur Früherkennung deutlich einschränkt. Bei der Trennung der KRK Patienten nach UICC Stadien konnte tendenziell eher eine erhöhte Expression für die Diagnosegruppe UICC I und II nachgewiesen werden. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu neuen Erkenntnissen zur Rolle des LAD1 in der Progression des metastasierten KRK. Moon et al. postulierten hier erstmalig einerseits einen Zusammenhang einer hohen LAD1 Expression im KRK Gewebe mit einer schlechteren Prognose des Patienten und andererseits auch eine gesteigerte Migrations- und Invasionsfähigkeit in malignen kolorektalen Zelllinien mit erhöhter LAD1 Expression (Moon et al., 2020). Damit konnte LAD1 hier sowohl eine Rolle in der Mobilität von malignen kolorektalen Zellen als auch im metastatischen Fortschreiten der Erkrankung nachgewiesen werden.

Somit weisen die hier erhobenen Erkenntnisse zu LAD1 auf eine fehlende Spezifität und damit eingeschränkte Nutzbarkeit für diagnostische Zwecke hin, unterstreichen aber in Verbindung mit den Erkenntnissen von u.a. Moon et al. zur prognostischen Relevanz des LAD1, dass der Marker im therapeutischen oder prognostischen *Setting* des KRK durchaus eine Relevanz haben könnte. Der Marker CEACAM5 hatte in den *in vitro* Analysen eine erhöhte Expression in kokultivierten intestinalen Epithelzellen sowie eine verminderte Expression in den HT29 Zellen gezeigt. Aufgrund einer breiten Expression des Markers in den verschiedensten epithelialen Geweben des Körpers sowie in daraus hervorgehenden Karzinomen (GeneCards®; Hammarström, 1999) und der damit einhergehenden geringen Spezifität für KRK wurde unter Rücksichtnahme eines materialsparenden Umgangs mit Proben aus der Biobank CEACAM5 für die Analyse am Patientenmaterial nicht weiter genutzt.

5.2.2 Beeinflussung der Markerexpression durch ein dauerhaft systemisches und lokales Entzündungsgeschehen

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, klinische Parameter des akuten Entzündungsgeschehen zusammen mit der Expression CTC-assoziiertes Marker an Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen zu analysieren. Weder für den Laborwert CRP noch für die Anzahl der Leukozyten im Blut konnte eine Korrelation mit der Markerexpression gezeigt werden. Vor allem für den Parameter CRP ist eine relativ verlässliche Korrelation zwischen dem Nachweis einer aktiven mukosalen Entzündung in einer Ileokoloskopie und einem erhöhten CRP Wert im Labor von Patienten mit CED nachgewiesen (Chang et al., 2015). Für KRK konnte gezeigt werden, dass der CRP Level im Blut der Patienten mit der Tumorgröße und dem Tumorstadium in positiver

Korrelation stehen (*Koper-Lenkiewicz et al., 2021*). Hinz et al. stellte außerdem einen Zusammenhang zwischen einem hohen Tumorstadium und dem vermehrten Vorliegen von CK20-positiven CTC her. Auch im Blut von Patienten mit Nierenzellkarzinom konnte ein erhöhtes CRP mit einem vermehrten Nachweis von CTC und einer schlechteren Prognose assoziiert werden (*Wen et al., 2019*). Vor allem der laborchemische Entzündungsparameter CRP zeigt also Assoziationen zu einem malignen Geschehen sowie zu aktiven mukosalen Entzündungsprozessen im Darm. Für zirkulierende Epithelzellen im Blut von CED Patienten gibt es bisher keine Studie, die deren Vorliegen in Abhängigkeit von Entzündungsparametern prüft. Die hier gezeigte Unabhängigkeit der Expression der CTC-Marker vom CRP oder den Leukozyten steht damit der Theorie einer im entzündlichen Kontext herbeigeführten Disseminierung von Zellen des intestinalen Epithels in die Blutbahn entgegen. Gleichzeitig lassen sich die Ergebnisse auch nicht mit einer möglichen Loslösung von Zellen im Rahmen einer beginnenden malignen Transformation in Einklang bringen, wobei hierbei zu beachten ist, dass eine mögliche Korrelation von CTC und CRP vor allem in frühen Tumorstadien noch gering ist (*Wen et al., 2019; Koper-Lenkiewicz et al., 2021*).

Für CK20 und PLS3 konnte auch in der Untersuchung der Markerexpression im Zusammenhang mit einer immunsuppressiven Therapie bestätigt werden, dass es sich hier eher um entzündungsunabhängige Marker handelt. Ein deutlicher Einfluss einer immunsuppressiven Therapie ließ sich lediglich für LAD1 beobachten, der sich mit einer verminderten Expression dieses Markers im Blut der Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen äußerte. Dabei bleibt jedoch unklar, durch welchen Mechanismus Immunsuppressiva die Expression von LAD1 beeinflussen. Einerseits könnte die LAD1 Expression mit dem akuten Entzündungsgeschehen im Darm assoziiert sein, obwohl die Unabhängigkeit von den Entzündungsparametern CRP und Leukozyten eher dagegen spricht. Andererseits wären auch langfristige Effekte der Therapie und die Beeinflussung von Signalwegen, die zur veränderten LAD1 Expression führen, möglich. Da jedoch eine höhere Expression von LAD1 sowohl in Tumorpatienten als auch im entzündlichen Kontext unter Nichteinnahme immunsupprimierender Medikamente beobachtet werden konnte, könnte LAD1 ein Marker einer malignen Progression sein. Dieser Zusammenhang konnte bereits für das Mammakarzinom gezeigt werden. Hier war eine erhöhte LAD1 Expression mit einer schlechteren Prognose der Patienten assoziiert. Dabei steht vor allem die mögliche Funktion im Bereich der Zellmigration von LAD1 im Vordergrund (*Roth et al., 2018*).

Gerade in diesem Zusammenhang wäre die Korrelation zwischen der CTC-Markerexpression und dem histopathologischen Befund bezüglich des Dysplasiegrades oder der Krankheitsaktivität

mithilfe der krankheitsspezifischen Aktivitätsscores bei CED Patienten interessant. Ein erhöhter Dysplasiegrad bei gleichzeitig hoher Markerexpression könnte auf eine Disseminierung im Kontext eines beginnenden malignen Prozesses schließen lassen. Eine veränderte Markerexpression im Zusammenhang mit einem hohen Aktivitätsscore, also dem Vorliegen eines akuten Schubes bei CED, würde hingegen eher auf eine entzündlich bedingte Loslösung der Zellen aus dem Zellverband hindeuten. Hierbei würden vor allem Daten, die im Verlauf der Erkrankung gesammelt würden, Rückschlüsse ermöglichen, wie z.B. die Markerexpression zu verschiedenen Zeitpunkten bei variablen Krankheitsaktivitäten. In der hier vorhandenen Kohorte waren diese Daten für die CED Patienten in den Patientenakten leider nicht verfügbar und Analysen diesbezüglich nicht möglich.

Als weiterer entscheidender Faktor sollte die Erkrankungsdauer von CED Patienten mit der Expression der vier Marker in Verbindung gesetzt werden. Mit steigender Dauer der Erkrankung erhöht sich, vor allem bei der Colitis ulcerosa, das Risiko für die Entwicklung eines KRK. Eaden et al. hatten das kumulative Risiko auf bis zu 18% nach 30jähriger Erkrankung beziffert (*Eaden et al., 2001*). Zugrunde legend, dass die Metastasierung ein früher Schritt in der Karzinogenese ist (*Bernards und Weinberg, 2002; Hu et al., 2017*), könnte vor allem bei Patienten mit einer langjährigen CED und einem damit verbundenen höheren Karzinomrisiko eine Erhöhung der CTC-assozierten Marker im Blut erwartet werden. Die Analyse der Blutproben der CED Patienten unterstützen diese Hypothese allerdings nicht. Einzig beim CK20 zeigte sich ein Anstieg der Expression in der Gruppe mit einer Erkrankungsdauer von 11 bis 20 Jahren. Insgesamt war aber kein Nachweis über einen Zusammenhang zwischen der Dauer einer bestehenden CED und der Expression der CTC-Marker im Blut möglich. Hierbei darf allerdings nicht vergessen werden, dass keine Patienten mit einem natürlichen Verlauf der Erkrankung, d.h. ohne medizinische Eingriffe, untersucht wurden. Alle hier eingeschlossenen Probanden befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder generell in ihrem bisherigen Krankheitsverlauf schon unter einer Therapie und waren ggf. schon in die von der deutschen Leitlinie empfohlene intensive KRK-Vorsorge bei CED Patienten eingebunden. Folglich sind die hier gewonnen Erkenntnisse zur CTC-Detektion abhängig von der Zeit seit der Erstdiagnose durch teilweise langjährige antientzündliche Therapien oder Interventionen im Zuge einer Vorsorgekoloskopie, wie die endoskopische Entfernung von potentiell dysplastischen Geweben, beeinflusst.

5.2.3 Nutzbarkeit der Marker zur Diskriminierung von malignen und entzündlichen Erkrankungen des Darms

Abschließend sollte für jeden Marker mit Hilfe einer ROC-Kurven-Analyse und der Festlegung eines Cut-Off Wertes die diagnostische Wertigkeit zur spezifischen Detektion eines Malignoms im Darm geprüft werden. Für den Marker CK20 war einerseits an der ROC-Kurve und andererseits an den Ergebnissen nach Anwendung des Cut-Off Wertes zu erkennen, dass dieser nicht ausreichend zwischen einer malignen und einer entzündlich bedingten Erkrankung des Darms bzw. Gesundheit trennen kann. In der aktuellen Literatur besteht kein Cut-Off Wert, der mit dem hier vorliegenden verglichen werden könnte, da ein solcher bisher nur in einer reinen Tumorkohorte definiert wurde (*Hendricks et al., 2018; Hinz et al., 2017*). Die Daten aus früheren Studien sowie der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass sich der Nutzen einer CK20-qRT-PCR zur Detektion von CTC eher für prognostische und prädiktive Aussagen bezüglich Tumorpatienten eignet, aber weniger zur Früherkennung. Eine Stratifikation von Tumorpatienten mithilfe der CK20 Expression im Blut könnte daher durchaus Anwendung in der klinischen Praxis finden. So war in der Studie von Hinz et al. das Ansprechen auf eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit einer gesunkenen CK20 Expression im Blut der KRK Patienten assoziiert (*Hinz et al., 2015*).

LAD1 hatte in den bisherigen Untersuchungen eine erhöhte Expression im Blut von Tumorpatienten mit leichter UICC-Stadien-Abhängigkeit gezeigt, ebenso einen Zusammenhang mit der Einnahme von Immunsuppressiva bei CED-Patienten. Die Spezifität zeigte sich allerdings von Anfang an limitiert, da die LAD1-qRT-PCR ausnahmslos für alle Gesundspender ein positives Ergebnis ergeben hatte. Diese Erkenntnisse spiegeln sich abschließend auch in der ROC-Kurven Analyse wider. Mit dem Youdens-Index ließ sich zwar ein Cut-Off Wert festlegen, der eine ausreichende Sensitivität ermöglichte, durch seine niedrige Spezifität allerdings zu einer sehr hohen falsch-positiven Rate führte. Ähnlich zum CK20 konnte für LAD1 hier daher keine diagnostische Wertigkeit identifiziert werden. In Hinblick auf die Erkenntnisse des prognostischen Nutzens beim Mammakarzinom von Roth et al. sowie neuen Erkenntnissen der Forschungsgruppe um Moon et al. sollte der Marker jedoch weiteren Testungen zugeführt werden, um seinen Nutzen ggf. nur in einer Kohorte aus Tumorpatienten oder ausschließlich CED Patienten zu untersuchen (*Moon et al., 2020; Roth et al., 2018*).

DEFA5 zeigte als einziger Marker eine sehr ähnliche Expression zwischen Tumor- und Entzündungspatienten, daher wäre die Anwendung dieses Markers in der Diagnostik eher für eine Unterscheidung zwischen Krankheit und Gesundheit geeignet. In der Zusammenschau weisen die Ergebnisse für DEFA5 darauf hin, dass der Marker sowohl im Blut von Patienten mit malignen als

auch benignen Erkrankungen des Kolons nachweisbar ist. Dabei kann aufgrund der Funktion der Defensine als antimikrobielle Peptide (*Salzman et al., 2007*) und der bekannten Überexpression in entzündetem Gewebe (*Dobre et al., 2018; Lawrance et al., 2001; Noble et al., 2008; Srivastava und Kulaylat, 2004*) davon ausgegangen werden, dass der inflammatorische Kontext zur Loslösung der Zellen in die Blutbahn beiträgt. In Verbindung mit den hier gewonnen Erkenntnissen der hohen Expression im Blut von Tumorpatienten und dem Nachweis von DEFA5 in Adenomen, kann DEFA5 andererseits durchaus als Marker für CTC angesehen werden kann (*Nastase et al., 2011*). Da DEFA5 sowohl im Blut von Tumor- als auch im Blut von Entzündungspatienten mittels DEFA5-qRT-PCR nachgewiesen werden konnte, ist der Marker allerdings nicht für eine reine Verlaufsbeobachtung von Tumorpatienten geeignet, da seine Anfälligkeit für ein entzündliches Geschehen die Spezifität zu stark beeinflussen würde.

PLS3 hatte sich angesichts der ROC-Kurven-Analyse mit einer AUC von 0,93 und einer Spezifität und Sensitivität von annähernd 90% als trennschärfster Marker zur Diskriminierung von Patienten mit Kolonkarzinomen von Gesundspendern bzw. Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen hervorgetan. Das bisher wenig untersuchte PLS3 zeigte in dieser Arbeit eine deutlich geringere Expression im Blut von Tumorpatienten gegenüber Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen bzw. Gesundspendern. Daher erfolgte eine Cut-Off Festlegung dessen Wertunterschreitung für Malignität steht. Die auffällig höheren Expressionsniveaus in Gesunden und entzündlich Erkrankten stehen dem Konzept der CTC-Detektion allerdings grundsätzlich entgegen. Der Nachweis eines CTC-assoziierten Markers müsste idealerweise nur im Blut von Tumorpatienten möglich sein und nicht in Patienten mit benignen Erkrankungen und Gesundspendern. Die für PLS3 gemessene hohe Expression in Gesundspendern lässt sich daher möglicherweise durch ein bisher unbekanntes Vorkommen von PLS3 in Zellen des Blutes erklären. Abgesehen davon bleibt PLS3 in dieser Arbeit dennoch der Marker mit der höchsten Trennschärfe zwischen einer malignen Erkrankung des Darms und einer benignen Erkrankung dieses Organsystems bzw. Gesundheit. In einer anschließenden Analyse war auffällig, dass es sich bei den falsch-positiv getesteten Entzündungspatienten fast ausschließlich um Morbus Crohn Patienten handelte. Allerdings konnte für keinen dieser Patienten ein Hinweis auf ein malignes Ereignis zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der Krankenakte gefunden werden. Ein bisher nicht diagnostiziertes malignes Geschehen kann auch für die falsch-positiven Gesundspender nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt wäre eine longitudinale Untersuchung von PLS3 an Gesunden oder CED Patienten sinnvoll, um zu klären, mit welchen klinischen Veränderungen das Absinken des Expressionsniveaus von PLS3 einhergeht und ggf. ob es mit der Entstehung eines Tumors

korreliert. Weiterhin interessant wäre, inwieweit PLS3 zur Risikostratifikation für eine zukünftige maligne Erkrankung einsetzbar wäre.

So sollten mit Hinblick auf eine mögliche Nutzung von PLS3 als diagnostischen Marker zusätzliche Untersuchungen an einer größeren Patientenkohorte durchgeführt und die Rolle des PLS3 in der inflammationsassoziierten kolorektalen Karzinogenese intensiver analysiert werden.

Vor allem in Hinblick auf die Marker CK20 und DEFA5 und die oben beschriebenen Ergebnisse zur variablen Quantität der PCR-Ergebnisse besteht die Möglichkeit einer Optimierung der Trennschärfe durch eine Erhöhung des Schwellenwerts für die Wertung eines positiven PCR-Ergebnisses. Dies könnte z.B. bedeuten, dass bei einer Durchführung von Triplikaten in der qRT-PCR eine Probe erst dann als positiv zu werten ist, wenn mindestens zwei der drei möglichen Nachweise positiv sind. Gesundspender hatten im Vergleich zu den anderen beiden Probandengruppen deutlich seltener mehrfach positive Ergebnisse gezeigt, was einhergeht mit der Annahme, dass die CTC-Zahl in Tumorpatienten und ggf. Patienten mit entzündlichen Erkrankungen höher ist als bei Gesunden, sodass hier eine Abgrenzung am ehesten optimiert werden könnte.

5.2.4 Methodische Limitationen

CTC sind insgesamt ein sehr seltenes Ereignis im Blut. Bei schätzungsweise einer von einer Milliarde Blutzellen handelt es sich um eine maligne zirkulierende Zelle (*Yu et al., 2011*).

Die Rationale zur Durchführung einer qRT-PCR zur Detektion der CTC lässt sich vor allem durch die hohe Sensitivität und Spezifität des Verfahrens begründen. Basierend auf der Amplifikation einer spezifischen mRNA kann die qRT-PCR bei Auswahl adäquater Marker einen Nachweis mit sehr hoher Sicherheit erbringen (*Alix-Panabières und Pantel, 2014; Joosse et al., 2015*). Voraussetzung für die Detektion von CTC im Blut von Patienten ist hierfür, dass die Marker einerseits im Tumor bzw. im vom Tumor abstammenden Gewebe exprimiert werden und andererseits nicht als Bestandteil des Blutes oder dessen Zellen vorkommen. Das vorherige Anreichern der PBMC mithilfe der Dichtegradientenzentrifugation, d.h. das Nutzen einer physikalischen Kenngröße zur primären Zellsortierung, erhöht zusätzlich die Sensitivität des Verfahrens. Allerdings geht die Methode auch mit einigen Nachteilen einher: Die qRT-PCR erlaubt keinen direkten Nachweis der CTC. Dieses Problem zeigt sich vor allem im Umgang mit den PCR Ergebnissen, die immer zwei mögliche Interpretationswege offenlassen. Eine PCR kann mit ihrem Ergebnis keine Aussage darüber treffen, ob die gemessene Probe eine hohe Anzahl von Zellen enthalten hat, die den

Marker auf einem niedrigen Niveau exprimieren oder ob es sich um vereinzelte Zellen mit sehr hoher Expression handelt. In der Summe können beide Möglichkeiten das gleiche Ergebnis der PCR ergeben. Beispielsweise ist für CK20 eine hohe Expression im gesunden kolorektalen Epithel bekannt (GeneCards®; Polari et al., 2020). Moll et al. konnte nachweisen, dass auch 95% aller kolorektalen Tumore und ihre Metastasen eine CK20 Expression aufweisen (Moll et al., 1992). Wie auch in den *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit sichtbar, zeigte Wildli et al. jedoch, dass diese Expression im Vergleich zu gesundem kolorektalen Gewebe eher erniedrigt war (Wildli et al., 1999).

Daher wäre besonders im Aufbau dieser Studie eine Expressionsmusteranalyse von Zellen aus malignen und benignen Blutproben, d.h. die Verteilung des Markers in den detektierten Zellen, und deren Vergleich hilfreich um die gemessenen Werte in der qRT-PCR besser einordnen zu können. Hierfür müssten allerdings zusätzlich andere Methoden zum Einsatz kommen, bei der ein direkter Zelnachweis erfolgt und die Zelle nach der Detektion *in sano* erhalten bleibt, sodass sich z.B. eine Markermarkierung mittels fluoreszierender Antikörper anschließen könnte.

Alternative Vorgehensweisen zeigen hier teilweise Vorteile. Beim bisher einzigen von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* zugelassenen Verfahren handelt es sich um das *CellSearch*® System (Allard et al., 2004; Riethdorf et al., 2018). Hierbei werden die CTC primär mit Hilfe eines Antikörpers gegen das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM), ein Oberflächenprotein epithelialer Zellen, angereichert (Keller et al., 2019). Anschließend erfolgt eine Multi-Marker-Immunfluoreszenzanalyse, bei der die CTC mithilfe weiterer epithelialer Kennmarker identifiziert und im Anschluss gezählt werden können. Für das *CellSearch*® System hat sich hierbei der folgende Zellphänotyp für die CTC Detektion etabliert: EpCAM+, Panzytokeratin+, CD45– und DAPI+. Mit dieser Konstellation werden einerseits epitheliale intakte Zellen eingeschlossen, während Leukozyten (CD45+) und avitale Zellen (DAPI-) ausgeschlossen werden (Allard et al., 2004; Alix-Panabières und Pantel, 2014). Im Unterschied zur Detektion der CTC mittels qRT-PCR beruht die Aussagekraft des *CellSearch*® Systems hier nicht auf der Expressionstärke eines spezifischen Markers, sondern auf der Anzahl an detektierten CTC pro ml Blut. Die prognostischen Nutzbarkeit der CTC-Detektion mittels des *CellSearch*® Systems konnte bereits für verschiedene Tumorentitäten gezeigt, darunter metastasierte Kolon-, Mamma-, und Prostatakarzinome (Cohen et al., 2008; Cristofanilli et al., 2004; de Bono et al., 2008). Die Patientengruppe mit der besseren Prognose zeigte <5 CTC/7,5 ml Blut, während ≥5 CTC/7,5 ml Blut prognostisch eher ungünstig waren. Ein Wechsel von der unvorteilhaften zur prognostisch

günstigen Gruppe im Verlauf der Therapie konnte außerdem als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf die Therapie interpretiert werden (*Andree et al.*, 2016).

Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist der mögliche Anschluss weiterer analytischer Methoden zur Untersuchung von u.a. Mutationen oder Expressionsmuster verschiedener Proteine in den isolierten Zellen (*Andree et al.*, 2016).

Doch auch bei diesem Verfahren bestehen Nachteile: Die Detektion der CTC mit zumeist epithelialen Markern stellt hierbei ein generelles Problem dar, da diese Marker im Rahmen der EMT verloren gehen können, wie z.B. auch im *in vitro* Teil der vorliegenden Promotionsarbeit gezeigt werden konnte. Dieser Prozess beinhaltet eine Dedifferenzierung der epithelialen Zellen zu einem eher mesenchymalen Phänotyp und ist auch für kolorektale Karzinome beschrieben (*Teeuwssen und Fodde*, 2019). Betroffen könne hier auch die Expression eben jener Marker sein, die für die CTC-Detektion verwendet werden, d.h. EpCAM oder Zytokeratine (*Alix-Panabières et al.*, 2017; *Keller et al.*, 2019). Ein Nachweis einzelner Tumorzellen im Blut betroffener Patienten mit Hilfe eines Markers, der im Prozess der Karzinogenese herunterreguliert wird, könnte sich negativ auf die Sensitivität des gewählten Testverfahrens auswirken.

Diese Problematik trifft sowohl auf die Detektion der CTC mittels qRT-PCR als auch das *CellSearch*[®] System zu (*Gorges et al.*, 2012), sodass neuste Entwicklungen darauf abzielen, neben epithelialen Markern auch mesenchymale Marker zur Detektion von CTC zu verwenden (*Lecharpentier et al.*, 2011; *Pantazaka et al.*, 2021; *Rushton et al.*, 2021).

5.3 Ausblick

Der Nachweis CTC-assoziiertes Marker gelang in dieser Studie sowohl im Blut von Patienten mit KRK als auch bei benignen entzündlichen Erkrankungen des Darms und teilweise auch in Gesundspendern. Für die klinische Anwendung der Marker besteht weiterhin Forschungsbedarf, vor allem zur Klärung der Frage, in welchem Zusammenhang auch im Blut von Gesundspendern ein Nachweis erfolgen kann. Hierfür könnte eine umfassende Analyse der Marker in ihrem molekularen Kontext und ihrer gewebespezifischen Funktionen nötig sein, um mögliche Veränderungen in der Expression, die nicht auf malignen Prozessen beruhen, erklären zu können. Abschließend lassen die Ergebnisse die Überlegung zu, eine Markerkombination zur Detektion von CTC im Blut von Tumorpatienten zu nutzen. Vor allem eine Kombination eines positiven CK20 und DEFA5 Nachweises könnte hierbei sinnvoll sein. Diese Kombination zeigt sich vor allem deshalb als geeignet, da einerseits CK20 eine Assoziation zum Tumorstadium und zum Gesamtüberleben

von Tumorpatienten aufweist und andererseits DEFA5 eine im Vergleich zu Gesundspendern hohe Expression in Tumorpatienten gezeigt hat. Gleichzeitig könnte hier weiterhin das Problem der Beeinflussung der Markerexpression durch inflammatorische Aktivitäten im Darm bestehen, denn beide Marker zeigten auch in Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen hohe positive Expressionswerte im Blut. Shen et al. zeigten in ihrer Studie einen Anstieg der Sensitivität der CTC-PCR bei Nutzung eines Markerpanels aus CK20, CEACAM5 und Survivin. Als Kontrollproben dienten hier auch gesunde Probanden sowie Patienten mit benignen Darmerkrankungen (*Shen et al., 2008*). Spannend könnte hier eine Verifizierung dieser Resultate sowie die Anwendung einer Markerkombination aus CK20, DEFA5 und CEACAM5 sein und deren Auswirkung auf die Sensitivität und Spezifität vor allem in Hinblick auf die Unterscheidung von Patienten mit maligner Erkrankung von Patienten mit entzündlicher Erkrankung des Organsystems.

Während weiterhin die Optimierung der bisherigen Strategien zur Detektion von CTC stattfindet, rücken nun auch vielversprechende Ansätze in den Vordergrund, die die Detektion nicht von den CTC selbst, sondern von Tumor-assoziierten Bestandteilen wie zirkulierender Tumor-DNA oder microRNA beinhalten und eine Alternative oder Ergänzung zu den bisherigen Methoden darstellen (*Marcuello et al., 2019*).

Die hier vorgelegten Ergebnisse legen außerdem nahe, dass chronisch inflammatorische Stimuli in intestinalen Epithelzellen einerseits zu Veränderungen führen, die mit Malignität assoziiert werden und andererseits auch eine Disseminierung von Zellen in die Blutbahn begünstigen könnten. Insgesamt kann eine entzündlich vermittelte Disseminierung von Epithelzellen die Nutzbarkeit der verwendeten Marker stark beeinflussen, sodass hier für den spezifischen Nachweis von CTC im Blut z.B. eine wie oben beschriebene Markerkombination nötig wäre, um zweifelsfrei maligne Zellen zu detektieren und disseminierte benigne Epithelzellen aufgrund eines entzündlichen Geschehens auszuschließen.

Die diagnostische Nutzbarkeit der Marker wird in dieser Studie, mit Ausnahme vom Marker PLS3, durch die unzureichenden Sensitivitäts- und Spezifitätswerte allerdings so stark limitiert, dass von deren Anwendung zum aktuellen Zeitpunkt abgesehen werden sollte. Die Anwendung innerhalb einer reinen Tumorkohorte erscheint dennoch vielversprechend, vor allem auch in der Zusammenschau anderer Studien (*Hendricks et al., 2018; Hinz et al., 2017*).

Aktuell ist das *CellSearch*[®] System die bisher einzige von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* zugelassene Detektionsmethode von CTC in Patienten mit metastasiertem Mamma-, Pankreas- und Kolonkarzinom. Doch besonders im Vergleich zu anderen Tumorentitäten ist die Detektionsrate von CTC im Blut von KRK Patienten mittels *CellSearch*[®]

gering (*Gorges et al.*, 2016). Der Bedarf an der Erforschung neuer Marker zur CTC-Detektion ist hier vor allem auf dem Gebiet der Früherkennung besonders groß. Die vorliegende Promotionsarbeit hatte das Ziel, CTC-assoziierte Marker auf ihre Nutzbarkeit der Diskriminierung eines KRK von einer benignen Erkrankung des Darms zu untersuchen. Obwohl die Ergebnisse hier zu einem deutlichen Erkenntnisgewinn beigetragen haben, benötigen die hier geprüften Marker weitere Validierungen in größeren Patientenkohorten.

6. Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome (KRK) sind eine der häufigsten Tumorentitäten in beiden Geschlechtern. Stadienabhängig liegt das 5-Jahres-Überleben zwischen >90% und <10%. Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTC) im Blut von KRK Patienten konnte mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und mit einer nachteiligen Prognose assoziiert werden. Ein Risikofaktor für die Entstehung eines KRK stellen chronisch entzündliche Darmerkrankungen dar, deren Inzidenz vor allem in der westlichen Welt ansteigt. In der vorliegenden Arbeit sollten daher CTC-assoziierte Marker im Blut von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen untersucht werden. Ein Nachweis in diesen Patienten kann einerseits mit einer entzündlichen Loslösung von Zellen in die Blutbahn oder andererseits mit einer malignen Progression zusammenhängen. Hierfür wurden klinische Parameter, die das Entzündungsgeschehen in den Patienten widerspiegeln sowie Faktoren, die das KRK-Risiko in den Entzündungspatienten beeinflussen, mit der Markerexpression in Verbindung gebracht. Ferner sollte geprüft werden, ob sich die analysierten Marker zur Diskriminierung zwischen einer malignen und benignen Erkrankung des Darms bzw. Gesundheit eignen. Hierfür wurde die Expression der CTC-assoziierten Marker CK20, PLS3, LAD1 und DEFA5 im Blut von KRK Patienten (n=98), Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen (n=64) und Gesundspendern (n=40) analysiert. In Cokulturversuchen mit intestinalen Epithelzellen und proinflammatorischem M1-Makrophagen sollte der Einfluss einer entzündlichen Umgebung auf die Expression der CTC-assoziierten Marker untersucht werden. Zusätzlich sollten mögliche funktionelle Veränderungen der Epithelzellen in Hinblick auf die Proliferation, das Migrations- und Invasionsverhalten sowie Charakteristika der EMT analysiert werden.

Primär konnte ein deutlicher Unterschied in der Quantität der Markerexpression von CK20 und DEFA5 zwischen den Probandengruppen festgestellt werden. Vor allem positiv getestete Gesundspender zeigten hier häufig eine niedrigere Anzahl an Nachweisen. Für LAD1 und PLS3 waren alle Probanden im gleichen Maße positiv. Dennoch konnten für alle Marker qualitative Unterschiede in der relativen Genexpression zwischen Gesundspendern, Tumor- und Entzündungspatienten festgestellt werden. DEFA5 zeigte ähnlich höhere Expressionswerte bei Tumor- und Entzündungspatienten im Vergleich zu Gesundspendern. Für CK20 und PLS3 konnte eine deutlich geringere Expression im Blut von KRK Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden und Probanden mit entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt werden. Insgesamt waren die CTC-assoziierten Marker auch im Blut von Patienten mit entzündlichen Erkrankungen des Darms detektierbar. Klinische Parameter dieser Patienten konnten hingegen nur teilweise mit den

Expressionsstärken der einzelnen Marker in Zusammenhang gebracht werden, sodass sich keine eindeutige Assoziation zwischen der Schwere der Entzündung und der Expression der CTC-Marker ergab. In weiterführenden Analysen zeigte sich PLS3 mit einer Sensitivität und Spezifität von circa 90% als trennschärfster Marker zur Unterscheidung zwischen malignen und benignen Darmerkrankungen bzw. Gesundheit. Hier sollten allerdings weitere Untersuchungen an einer größeren Kohorte stattfinden, um dieses Resultat und die Nutzbarkeit in der Früherkennung des KRK zu validieren.

In einer Kokultur der kolorektalen Epithelzelllinie NCM-460 mit M1-Makrophagen konnte der Einfluss einer proinflammatorischen Umgebung *in vitro* durch eine erhöhte Migrationsrate, phänotypischer- und EMT-assoziiierter Modifikationen sowie Veränderungen in der Expression der CTC-Marker verdeutlicht werden.

Abschließend wird in dieser Arbeit der Einfluss entzündlicher Stimuli auf malignitäts-assoziierte Veränderungen in Kolonepithelzellen deutlich. Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von CTC-assoziierten Markern im Blut von Patienten nicht grundsätzlich mit einer malignen Erkrankung des Darms einhergeht. Ein Nachweis auch in Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen gibt Aufschluss darüber, dass die Disseminierung von Zellen ins Blut auch entzündlich vermittelte Ursachen haben kann.

IV Literaturverzeichnis

- Alix-Panabières, C., Mader, S., Pantel, K. (2017): Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *Journal of Molecular Medicine*, 95(2), 133–142.
- Alix-Panabières, C., Pantel, K. (2014): Technologies for detection of circulating tumor cells: Facts and vision. *Lab on a Chip*, 14(1), 57–62.
- Allard, W. J., Matera, J., Miller, M. C., Repollet, M., Connelly, M. C., Rao, C., Tibbe, A. G. J., Uhr, J. W., Terstappen, L. W. M. M. (2004): Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, 10, 6897–6904.
- Allocca, M., Jovani, M., Fiorino, G., Schreiber, S., Danese, S. (2013): Anti-IL-6 treatment for inflammatory bowel diseases: next cytokine, next target. *Current Drug Targets*, 14, 1508–1521.
- Andree, K. C., van Dalum, G., Terstappen, L. W. M. M. (2016): Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Molecular Oncology*, Vol. 10, pp. 395–407.
- Askling, J., Dickman, P. W., Karlén, P., Broström, O., Lapidus, A., Löfberg, R., Ekblom, A. (2001): Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 120, 1356–1362.
- Axelrad, J. E., Lichtiger, S., Yajnik, V. (2016): Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 22, 4794–4801.
- Bain, C. C., Schridde, A. (2018): Origin, differentiation, and function of intestinal macrophages. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Baretton, G. B. (2010): Serrated pathway of colorectal carcinogenesis. *Der Pathologe*, 31(1), 9–15.
- Bayrak, R., Yenidünya, S., Haltas, H. (2011): Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in colorectal adenocarcinomas. *Pathology Research and Practice*, 207, 156–160.
- Beauchemin, N., Arabzadeh, A. (2013): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, Vol. 32, 643–671.
- Bernards, R., Weinberg, R. A. (2002): A progression puzzle. *Nature*, 418(6900), 823.
- Bidard, F. C., Peeters, D. J., Fehm, T., Nolé, F., Gisbert-Criado, R., Mavroudis, D., Grisanti, Salvatore, Generali, D., Garcia-Saenz, J. A., Stebbing, J., Caldas, C., Gazzaniga, P., Manso, L., Zamarchi, R., de Lascoiti, A. F., De Mattos-Arruda, L., Ignatiadis, M., Lebofsky, R., van Laere, S. J., Meier-Stiegen, F., Sandri, M. T., Vidal-Martinez, J., Politaki, E., Consoli, F., Bottini, A., Diaz-Rubio, E., Krell, J., Dawson, S. J., Raimondi, C., Rutten, A., Janni, W., Munzone, E., Carañana, V., Agelaki, S., Almici, C., Dirix, L., Solomayer, E. F., Zorzino, L., Johannes, H., Reis-Filho, J. S., Pantel, K., Pierga, J. Y., Michiels, S. (2014): Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: A pooled analysis of individual patient data. *The Lancet Oncology*, 15, 406–414.
- Bonen, D. K., Cho, J. H. (2003): The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, Vol. 124, 521–536.
- Brenner, H., Schrotz-King, P., Holleczek, B., Katalinic, A., Hoffmeister, M. (2016): Rückgang der Inzidenz und Mortalität von Darmkrebs in Deutschland. *Deutsches Arzteblatt International*, 113, 101–106.
- Bundesgesundheitsministerium (2019): Weil früher besser ist – die wichtigsten Fragen zur Darmkrebs-Vorsorge. Verfügbar unter <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/frueherkennung->

- vorsorge/fragen-zur-darmkrebs-vorsorge.html [03.09.2020]
- Burchill, S. A., Bradbury, M. F., Pittman, K., Southgate, J., Smith, B., Selby, P. (1995): Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase–polymerase chain reaction. *British Journal of Cancer*, 71, 278–281.
- Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P. L. (2013): The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn’s and Colitis*, Vol. 7, 322–337.
- cBioPortal for Cancer Genomics. Verfügbar unter https://www.cbioportal.org/results/expression?cancer_study_list=5c8a7d55e4b046111fee2296&case_set_id=all&gene_list=LAD1&plots_coloring_selection=%7B%7D&plots_horz_selection=%7B%22dataType%22%3A%22MRNA_EXPRESSION%22%7D&plots_vert_selection=%7B%22dataType%22%3A%22clinical_attribute%22%7D [22.09.2020]
- Chan, C. H. F., Stanners, C. P. (2007): Recent advances in the tumour biology of the GPI-anchored carcinoembryonic antigen family members CEACAM5 and CEACAM6. *Current Oncology*, 14, 70–73.
- Chang, S., Malter, L., Hudesman, D. (2015): Disease monitoring in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 11246–11259.
- Chiara, M. M., Franco, S., Marco, P., Antonio, G., Donato, M. G. A. (2020): Nutrition, ibd and gut microbiota: A review. *Nutrients*, Vol. 12.
- Clarke, W. T., Feuerstein, J. D. (2019): Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: Practice guidelines and recent developments. *World Journal of Gastroenterology*, 25(30), 4148–4157.
- Codreanu, S. G., Hoeksema, M. D., Slebos, R. J. C., Zimmerman, L. J., Rahman, S. M. J., Li, M., Chen, S.-C., Chen, H., Eisenberg, R., Liebler, D. C., Massion, P. P. (2017): Identification of proteomic features to distinguish benign pulmonary nodules from lung adenocarcinoma. *Journal of Proteome Research*, 16, 3266–3276.
- Cohen, S. J., Punt, C. J. A., Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M. C., Doyle, G. V., Tissing, H., Terstappen, L. W.M.M., Meropol, N. J. (2008): Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(19), 3213–3221.
- Coulombe, P. A., Omary, M. B. (2002): “Hard” and “soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 14, 110–122.
- Coussens, L. M., Werb, Z. (2002): Inflammation and cancer. *Nature*, Vol. 420, 860–867. *Nature*.
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Allard, W. J., Terstappen, L. W.M.M., Hayes, D. F. (2004): Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 351(8), 781–791.
- Crohn, B., Rosenberg, H. (1925): The sigmoidoscopic picture of chronic ulcerative colitis (non-specific). *Am J Med Sci*, 170, 220–228.
- Davies, J. R., Miller R., Coleman, N. (2005): Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis. *Nature Reviews Cancer* 5(3):199–209.
- De Bono, J. S., Scher, H. I., Montgomery, R. B., Parker, C., Miller, M. C., Tissing, H., Doyle, G. V., Terstappen, L. W.W.M., Pienta, Kenneth J., Raghavan, D. (2008): Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(19), 6302–6309.
- De Souza, H. S. P., Fiocchi, C., Iliopoulos, D. (2017): The IBD interactome: An integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, Vol.

14, 739–749.

- Del Giudice, M. E., Vella, E. T., Hey, A., Simunovic, M., Harris, W., Levitt, C. (2014): Systematic review of clinical features of suspected colorectal cancer in primary care. *Canadian Family Physician*, 60, e405.
- Deutsches Krebsforschungszentrum (2016): Krebsinformationsdienst – Darmkrebs. Verfügbar unter <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/darmkrebs/index.php> [18.08.2020]
- Dobre, M., Milanese, E., Mănuc, T. E., Arsene, D. E., Țieranu, C. G., Maj, C., Becheanu, G., Mănuc, M. (2018): Differential intestinal mucosa transcriptomic biomarkers for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of Immunology Research*, 2018. 9208274.
- Dorreen, A., Heisler, C., Jones, J. (2018): Treatment of inflammatory bowel disease in the older patient. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24, 1155–1166.
- Eaden, J. A., Abrams, K. R., Mayberry, J. F. (2001): The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: A meta-analysis. *Gut*, 48, 526–535.
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, Vol. 61, 759–767.
- Feeney, G., Sehgal, R., Sheehan, M., Hogan, A., Regan, M., Joyce, M., Kerin, M. (2019): Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer management ORCID number: Conflict-of-interest statement. *World J Gastroenterol*, 25, 4850–4869.
- Ferguson, L. R. (2010): Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 690, 3–11.
- Foersch, S., Neurath, M. F. (2014): Colitis-associated neoplasia: Molecular basis and clinical translation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 71, 3523–3535.
- Fogh, J., Trempe, G. (1975): New human tumor cell lines. *Human Tumor Cells in Vitro*, 115–159.
- Fuchs, E., Weber, K. (1994): Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 63, 345–382.
- GeneCards®: The human gene database. Verfügbar unter <https://www.genecards.org/> [21.09.2020]
- Gillen, C. D., Walmsley, R. S., Prior, P., Andrews, H. A., Allan, R. N. (1994): Ulcerative colitis and Crohn's disease: A comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*, 35, 1590–1592.
- Globocan-The Global Cancer Observatory 2018 (2019): Cancer fact sheets – colorectal cancer. Verfügbar unter https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf [24.07.2020]
- Gold, P., Freedman, S. O. (1965): Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *The Journal of Experimental Medicine*, 122, 467–481.
- Gorges, T. M., Stein, A., Quidde, J., Hauch, S., Röck, K., Riethdorf, S., Joosse, S. A., Pantel, K. (2016): Improved detection of circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer by the combination of the CellSearch® System and the AdnaTest®. *PLoS ONE*, 11.
- Gorges, T. M., Tinhofer, I., Drosch, M., Röse, L., Zollner, T. M., Krahn, T., von Ahsen, O. (2012): Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 12.
- Graf, N., Gürkov, R. (2013): *Basics Klinische Chemie* (3. Auflage). ELSEVIER URBAN & Fischer, München
- Guan, Q. (2019): A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, 2019.
- Hammarström, S. (1999): The carcinoembryonic antigen (CEA) family: Structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in Cancer Biology*, 9, 67–81.

- Han, Z. W., Lyv, Z. W., Cui, B., Wang, Y. Y., Cheng, J. T., Zhang, Y., Cai, W. Q., Zhou, Y., Ma, Z. W., Wang, X. W., Peng, X. C., Cui, S. Z., Xiang, Y., Yang, M., Xin, H. W. (2020): The old CEACAMs find their new role in tumor immunotherapy. *Investigational New Drugs*.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, Vol. 144, 646–674.
- Hardingham, J. E., Hewett, P. J., Sage, R. E., Finch, J. L., Nuttall, J. D., Kotasek, D., Dobrovic, A. (2000): Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease. *International Journal of Cancer*, 89, 8–13.
- Heinrich, S., Lang, H. (2013): Neoadjuvante chemotherapie oder primäre Chirurgie bei kolorektalen Lebermetastasen. *Pro primäre Chirurgie*. *Chirurg*, 85, 17–23.
- Helm, O., Held-Feindt, J., Schäfer, H., Sebens, S. (2014): M1 and M2: there is no “good” and “bad”- How macrophages promote malignancy-associated features in tumorigenesis. *Oncoimmunology*, 3(7).
- Hendricks, A., Eggebrecht, G. L., Bernsmeier, A., Geisen, R., Dall, K., Trauzold, A., Becker, T., Kalthoff, H., Schafmayer, C., Röder, C., Hinz, S. (2018): Identifying patients with an unfavorable prognosis in early stages of colorectal carcinoma. *Oncotarget*, 9, 27423–27434.
- Herold, G. und Mitarbeiter (2019): *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Gerd Herold, Köln.
- Hinz, S., Hendricks, A., Wittig, A., Schafmayer, C., Tepel, J., Kalthoff, H., Becker, T., Röder, C. (2017): Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients – a prospective study. *BMC Cancer*, 17, 53.
- Hinz, S., Röder, C., Tepel, J., Hendricks, A., Schafmayer, C., Becker, T., Kalthoff, H. (2015): Cytokeratin 20 positive circulating tumor cells are a marker for response after neoadjuvant chemoradiation but not for prognosis in patients with rectal cancer. *BMC Cancer*, 15, 953.
- Hoffmann, J. C., Kroesen, A. J., Klump, B. (2009): *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - Handbuch für Klinik und Praxis (2. Auflage)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Holmer, C., Kreis, M. E. (2017): Darmkrebs — das Neueste in Diagnostik und Therapie. *MMW-Fortschritte Der Medizin*, 159, 54–62.
- Holterman, D. A., Diaz, J. I., Blackmore, P. F., Davis, J. W., Schellhammer, P. F., Corica, A., Semmes, O. J., Vlahou, A. (2006): Overexpression of α -defensin is associated with bladder cancer invasiveness. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 24, 97–108.
- Hu, Y., Yu, X., Xu, G., Liu, S. (2017): Metastasis: an early event in cancer progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(5), 745–757.
- Jacobson, R. A., Munding, E., Hayden, D. M., Levy, M., Kuzel, T. M., Pappas, S. G., Masood, A. (2019): Evolving clinical utility of liquid biopsy in gastrointestinal cancers. *Cancers*, Vol. 11.
- Jess, T., Rungoe, C., Peyrin-Biroulet, L. (2012): Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 10(6), 639–645.
- Joose, S. A., Gorges, T. M., Pantel, K. (2015): Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine*, 7(1), 1.
- Jung, R., Petersen, K., Krüger, W., Wolf, M., Wagener, C., Zander, A., Neumaier, M. (1999): Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *British Journal of Cancer*, 81, 870–873.
- Kelleher, M., Singh, R., O’Driscoll, C. M., Melgar, S. (2019): Carcinoembryonic antigen (CEACAM) family members and Inflammatory Bowel Disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 47, 21–31.
- Keller, L., Werner, S., Pantel, K. (2019): Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*, 3(6), 165

- Kim, Y. J., Hong, K. S., Chung, J. W., Kim, J. H., Hahm, K. B. (2010): Prevention of colitis-associated carcinogenesis with infliximab. *Cancer Prevention Research*, 3, 1314–1333.
- Klobučar, M., Sedić, M., Gehrig, P., Grossmann, J., Bilić, M., Kovač-Bilić, L., Pavelić, K., Kraljević Pavelić, S. (2016): Basement membrane protein laminin-1 and the MIF-CD44- β 1 integrin signaling axis are implicated in laryngeal cancer metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862, 1938–1954.
- Knox, N. C., Forbes, J. D., Van Domselaar, G., Bernstein, C. N. (2019): The Gut Microbiome as a Target for IBD Treatment: Are We There Yet? *Current Treatment Options in Gastroenterology*, 17, 115–126.
- Knösel, T., Emde, V., Schlüns, K., Schlag, P. M., Dietel, M., Petersen, I. (2006): Cytokeratin profiles identify diagnostic signatures in colorectal cancer using multiplex analysis of tissue microarrays. *Cellular Oncology : The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology*, 28(4), 167–175.
- Kompetenznetz Darmerkrankungen e.V.: Informationen zu häufig eingesetzten Medikamenten. Verfügbar unter <https://www.kompetenznetz-darmerkrankungen.de/medikamente> [14.09.2020]
- Koper-Lenkiewicz, O. M., Dymicka-Piekarska, V., Milewska, A. J., Zińczuk, J., Kamińska, J. (2021): The relationship between inflammation markers (CRP, IL-6, sCD40L) and colorectal cancer stage, grade, size and location. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*.
- Krebs, M. G., Renehan, A. G., Backen, A., Gollins, S., Chau, I., Hasan, J., Valle, J. W., Morris, K., Beech, J., Ashcroft, L., Saunders, M. P., Dive, C. (2015): Circulating tumor cell enumeration in a phase II trial of a four-drug regimen in advanced colorectal cancer. *Clinical Colorectal Cancer*, 14, 115-122.e2.
- Krebs, M. G., Sloane, R., Priest, L., Lancashire, L., Hou, J. M., Greystoke, A., Ward, T. H., Ferraldeschi, R., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Dive, C., Blackhall, F. H. (2011): Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29, 1556–1563.
- Kujawski, R., Przybyłowska-Sygut, K., Mik, M., Lewandowski, M., Trzciński, R., Berut, M., Dziki, Ł., Majsterek, I., Dziki, A. (2015): Expression of the PLS3 gene in circulating cells in patients with colorectal cancer. *Polski Przegląd Chirurgiczny/ Polish Journal of Surgery*, 87, 59–64.
- Kurashige, J., Yokobori, T., Mima, K., Sawada, G., Takahashi, Y., Ueo, H., Takano, Y., Matsumura, T. A. E., Uchi, R., Eguchi, H., Sudo, T., Sugimachi, K., Mori, M., Baba, H., Mimori, K. (2019): Plastin3 is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in gastric cancer. *Oncology Letters*, 17, 2393–2399.
- Lammert, F., Jansen, P. L., Lerch, M. M. (2019): *Weissbuch Gastroenterologie 2020/21*. Berlin/Boston: De Gruyter.
- Lawrance, I. C., Fiocchi, C., Chakravarti, S. (2001): Ulcerative colitis and crohn's disease: Distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Human Molecular Genetics*, 10, 445–456.
- Lawrance, I. C., Murray, K., Batman, B., Geary, R. B., Grafton, R., Krishnaprasad, K., Andrews, Jane, M., Prosser, R., Bampton, P. A., Cooke, S. E., Mahy, G., Radford-Smith, G., Croft, A., Hanigan, K. (2013): Crohn's disease and smoking: Is it ever too late to quit? *Journal of Crohn's and Colitis*, 7.
- Lecharpentier, A., Vielh, P., Perez-Moreno, P., Planchard, D., Soria, J. C., Farace, F. (2011): Detection of circulating tumour cells with a hybrid (epithelial/mesenchymal) phenotype in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 105(9), 1338.
- Lee, S. H., Kwon, J., Cho, M. L. (2018): Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, Vol. 16, 26–42.
- Li, Y., Gong, J., Zhang, Q., Lu, Z., Gao, J., Li, Y., Cao, Y., Shen, L. (2016): Dynamic monitoring of

- circulating tumour cells to evaluate therapeutic efficacy in advanced gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 114, 138–145.
- Lin, C., Park, T., Chen, Z., Leavitt, J. (1993): Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem.*, 268, 2781–2792.
- Lissner, D., Schumann, M., Batra, A., Kredel, L. I., Kühl, A. A., Erben, U., May, C., Schulzke, J. D., Siegmund, B. (2015): Monocyte and M1 macrophage-induced barrier defect contributes to chronic intestinal inflammation in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, 21, 1297–1305.
- Lock, J. F., Germer, C. T. (2017): Erste deutsche Leitlinie zur Divertikelkrankheit - Bayerisches Ärzteblatt. *Bayerisches Ärzteblatt* 12/17, 640–646.
- Loftus, C. G., Loftus, E. V., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., Tremaine, W. J., Melton, L. J., Sandborn, W. J. (2007): Update on the incidence and prevalence of crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13, 254–261.
- Lueschow, S. R., McElroy, S. J. (2020): The paneth cell: the curator and defender of the immature small intestine. *Frontiers in Immunology*, Vol. 11, 587.
- Mahid, S. S., Minor, K. S., Soto, R. E., Hornung, C. A., Galandiuk, S. (2006): Smoking and inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*, 81, 1462–1471.
- Marcuello, M., Vymetalkova, V., Neves, R. P. L., Duran-Sanchon, S., Vedeld, H. M., Tham, E., van Dalum, G., Flügen, G., Garcia-Barberan, V., Fijneman, R. J., Castells, A., Vodicka, P., Lind, G. E., Stoecklein, N. H., Heitzer, E., Gironella, M. (2019): Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, Vol. 69, pp. 107–122.
- Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A. (2006): Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression. *The Journal of Immunology*, 177, 7303–7311.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Ranquena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. (2015): HT29 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, 113–124
- Messaritakis, I., Sfakianaki, M., Papadaki, C., Koulouridi, A., Vardakis, N., Koinis, F., Hatzidaki, D., Georgoulia, N., Kladi, A., Kotsakis, A., Souglakos, J., Georgoulis, V. (2018): Prognostic significance of CEACAM5mRNA-positive circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 82, 767–775.
- Mitsuhashi, J., Mikami, T., Saigenji, K., Okayasu, I. (2005): Significant correlation of morphological remodeling in ulcerative colitis with disease duration and between elevated p53 and p21WAF1 expression rectal mucosa and neoplastic development. *Pathology International*, 55, 113–121.
- Moll, R., Löwe, A., Laufer, J., Franke, W. (1992): Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *AM J Pathol.*, 140, 427–447.
- Moll, R., Schiller, D. L., Franke, W. (1990): Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *Journal of Cell Biology*, 111, 567–580.
- Moon, B., Yang, S.-J., Park, S. M., Lee, S.-H., Song, K. S., Jeong, E.-J., Park, M., Kim, J.-S., Yeom, Y., Kim, J.-A. (2020): LAD1 expression is associated with the metastatic potential of colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, 20.
- Mosli, M. H., Zou, G., Garg, S. K., Feagan, S. G., MacDonald, J. K., Chande, N., Sandorn, W. J., Feagan, B. G. (2015): C-reactive protein, fecal calprotectin, and stool lactoferrin for detection of endoscopic activity in symptomatic inflammatory bowel disease patients: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, Vol. 110, 802–819.

- Moyer, M. P., Manzano, L. A., Merriman, R. L., Stauffer, J. S., Tanzer, L. R. (1996): NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, Vol. 32, 315–317.
- Mueller, M. H., Glatzle, J., Kasperek, M. S., Becker, H. D., Jehle, E. C., Zittel, T. T., Kreis, M. E. (2005): Long-term outcome of conservative treatment in patients with diverticulitis of the sigmoid colon. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17, 649–654.
- Munkholm, P. (2003): Review article: The incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement*, 18, 1–5.
- Nastase, A., Pâslaru, L., Niculescu, A. M., Ionescu, M., Dumitrașcu, T., Herlea, V., Dima, S., Gheorghe, C., Lazar, V., Popescu, I. (2011): Prognostic and predictive potential molecular biomarkers in colon cancer. *Chirurgia (Bucur)*, 106, 177–185.
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C.Y., Chan, F. K.L., Sung, J.Y., Kaplan, G. G. (2017): Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390, 2769–2778.
- Noble, C. L., Abbas, A. R., Cornelius, J., Lees, C. W., Ho, G. T., Toy, K., Modrusan, Z., Pal, N., Zhong, F., Chalasani, S., Clark, H., Arnott, I. D., Penman, I. D., Satsangi, Diehl, J. L. (2008): Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis. *Gut*, 57, 1398–1405.
- Nomura, Y., Tanabe, H., Moriichi, K., Igawa, S., Ando, K., Ueno, N., Kashima, S., Tominaga, M., Goto, T., Inaba, Y., Ito, T., Ishida-Yamamoto, A., Fujiya, M., Kohgo, Y. (2013): Reduction of E-cadherin by human defensin-5 in esophageal squamous cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439, 71–77.
- Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J., Natoli, G. (2015): Macrophages and cancer: From mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology*, Vol. 36, 229–239.
- Ott, C., Obermeier, F., Thieler, S., Kemptner, D., Bauer, A., Schölmerich, J., Rogler, G., Timmer, A. (2008): The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: A prospective population-based study. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 20, 917–923.
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R., Timmis, K. N., Schreiber, S. (2004): Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53, 685–693.
- Pantazaka, E., Vardas, V., Roumeliotou, A., Kakavogiannis, S., Kallergi, G. (2021): Clinical relevance of mesenchymal- and stem-associated phenotypes in circulating tumor cells isolated from lung cancer patients. *Cancers*, 13(9).
- Pantel, K., Brakenhoff, R. H. (2004): Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, 448–456.
- Pantel, K., Denève, E., Nocca, D., Coffy, A., Vendrell, J. P., Maudelonde, T., Riethdorf, S., Alix-Panabières, C. (2012): Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clinical Chemistry*, 58, 936–940.
- Polari, L., Alam, C. M., Nyström, J. H., Heikkilä, T., Tayyab, M., Baghestani, S., Toivola, D. M. (2020): Keratin intermediate filaments in the colon: guardians of epithelial homeostasis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 129, 105878.
- Pollard, T. D., Cooper, J. A. (2009): Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, Vol. 326, 1208–1212.
- Porter, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D., Ganz, T. (2002): The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 59, 156–170.
- Powell, E., Shao, J., Picon, H. M., Bristow, C., Ge, Z., Peoples, M., Robinson, F., Jeter-Jones, S. L.,

- Schlosberg, C., Grzeskowiak, C. L., Yang, F., Wu, Y., Wistuba, I., Moulder, S. L., Symmans, W. F., Scott, K. L., Edwards, J. R., Liang, H., Heffernan, Timothy P., Piwnica-Worms, H. (2018): A functional genomic screen in vivo identifies CEACAM5 as a clinically relevant driver of breast cancer metastasis. *Npj Breast Cancer*, 4.
- Qian, B. Z., Pollard, J. W. (2010): Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141, 39.
- Rahn, S., Barbosa, S.D., Möller, J.L., Ammar, N., Demetrowitsch, T., Helm, O., Wesch, D., Sipos, B., Röcken, C., Schwarz, K., Schäfer, H., Sebens, S. (2019): Inflammation associated pancreatic tumorigenesis: Upregulation of succinate dehydrogenase (Subunit B) reduces cell growth of pancreatic ductal epithelial cells. *Cancers*, 12(1):42.
- Reinecker, H. C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R. P., Raedler, A. (1993): Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 94, 174–181.
- Riethdorf, S., O'Flaherty, L., Hille, C., Pantel, K. (2018): Clinical applications of the CellSearch platform in cancer patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 125, 102–121.
- Rosenstiel, P., Till, A., Schreiber, S. (2007): NOD-like receptors and human diseases. *Microbes and Infection*, Vol. 9, 648–657.
- Roth, L., Srivastava, S., Lindzen, M., Sas-Chen, A., Sheffer, M., Lauriola, M., Eneka, Yehoshua, Noronha, A., Mancini, M., Lavi, S., Tarcic, G., Pines, G., Nevo, N., Heyman, O., Ziv, T., Rueda, O. M., Gnocchi, D., Pikarski, E., Admon, A., Caldas, Carlos, Yarden, Y. (2018): SILAC identifies LAD1 as a filamin-binding regulator of actin dynamics in response to EGF and a marker of aggressive breast tumors. *Science Signaling*, 11.
- Rushton, A. J., Nteliopoulos, G., Shaw, J. A., Coombes, R. C. (2021): A review of circulating tumour cell enrichment technologies. *Cancers*, 13(5), 1–33.
- S2k-Leitlinie Divertikelkrankheit/Divertikulitis (2014): AWMF Registernummer 021/20. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 52(7):663–710.
- S3-Leitlinie Colitis ulcerosa (2018): Updated S3-Guideline colitis ulcerosa german society for digestive and metabolic diseases (DGVS): AWMF Registry 021/009. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 56(9):1087–1169.
- S3-Leitlinie Morbus Crohn (2014): Aktualisierte S3-Leitlinie - Diagnostik Und Therapie Des Morbus Crohn, 2014: AWMF-Registriernummer: 021-004. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 52(12):1431–84.
- S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2019): Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL. Verfügbar unter <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [27.07.2020]
- Salzman, N. H., Underwood, M. A., Bevins, C. L. (2007): Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology*, Vol. 19, 70–83. *Semin Immunol.*
- Santin, A. D., Zhan, F., Bellone, S., Palmieri, M., Cane, S., Bignotti, E., Anfossi, Simone, Gokden, M., Dunn, D., Roman, J. J., O'Brien, T. J., Tian, E., Cannon, M. J., Shaughnessy, J., Pecorelli, S. (2004): Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: Identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Cancer*, 112, 14–25.
- Schäfer, H., Struck, B., Feldmann, E. M., Bergmann, F., Grage-Griebenow, E., Geismann, C., Ehlers, S., Altevoigt, P., Sebens, S. (2013): TGF- β 1-dependent L1CAM expression has an essential role in macrophage-induced apoptosis resistance and cell migration of human intestinal epithelial cells. *Oncogene*, 32, 180–189.

- Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J., Hämling, J., Koop, I., Groessner, B., Lochs, H., Raedler, A. (1999): Tumour necrosis factor α and interleukin 1β in relapse of Crohn's disease. *Lancet*, 353, 459–461.
- Shah, S. C., Khalili, H., Gower-Rousseau, C., Olen, O., Benchimol, E. I., Lynge, E., Nielsen, K. R., Brassard, P., Vutcovici, M., Bitton, A., Bernstein, C. N., Leddin, D., Tamim, H., Stefansson, T., Loftus, E. V., Moum, B., Tang, W., Ng, S. C., Garry, R., Sincic, B., Bell, S., Sands, B. E., Lakatos, P. L., Végh, Z., Ott, C., Kaplan, G. G., Burisch, J., Colombel, J. F. (2018): Sex-based differences in incidence of inflammatory bowel diseases—Pooled analysis of population-based studies from western countries. *Gastroenterology*, 155, 1079-1089.e3.
- Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., Sahebkar, A. (2018): Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425–6440.
- Shen, C., Hu, L., Xia, L., Li, Y. (2008): Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 38, 770–776.
- Shi, R., Liu, L., Wang, F., He, Y., Niu, Y., Wang, C., Zhang, X., Zhang, X., Zhang, H., Chen, M., Wang, Y. (2020): Downregulation of cytokeratin 18 induces cellular partial EMT and stemness through increasing EpCAM expression in breast cancer. *Cellular Signalling*, 76.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., Jemal, A. (2021): Cancer statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33.
- Simmonds, N., Furman, M., Karanika, E., Phillips, A., Bates, A. W. H. (2014): Paneth cell metaplasia in newly diagnosed inflammatory bowel disease in children. *BMC Gastroenterology*, 14, 93.
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J., Patil, P., Thakkannavar, S., Pujari, V. (2019): Inflammation and cancer. *Annals of African Medicine*, 18, 121–126.
- Smithson, J. E., Warren, B. F., Young, S., Pigott, R., Jewell, D. P. (1996): Heterogeneous expression of carcinoembryonic antigen in the normal colon and upregulation in active ulcerative colitis. *Journal of Pathology*, 180, 146–151.
- Sproston, N. R., Ashworth, J. J. (2018): Role of C-reactive protein at sites of inflammation and infection. *Frontiers in Immunology*, Vol. 9, 754.
- Srivastava, M., Kulaylat, M. (2004): Gene expression profiles of late colonic Crohn's disease - PubMed. *J. Med*, 35, 233–255.
- Stange, E. F., Travis, S. P. L., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von Herbay, A., Warren, B. F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, Stefan W., Schölmerich, J., Reinisch, W. (2006): European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut*, 55(Suppl 1), i1.
- Stange, E. F., Travis, S. P. L., Vermeire, S., Reinisch, W., Geboes, K., Barakauskiene, A., Feakins, R., Fléjou, J. F., Herfarth, H., Hommes, D. W., Kupcinkas, L., Lakatos, P. L., Mantzaris, G. J., Schreiber, S., Villanacci, V., Warren, B. F. (2008): European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's & Colitis*, 2(1), 1–23.
- Steinbach, E. C., Plevy, S. E. (2014): The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, Vol. 20, 166–175.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., Futreal, P. A. (2009): The cancer genome. *Nature*, 458, 719.
- Taman, H., Fenton, C. G., Hensel, I. V., Anderssen, E., Florholmen, J., Paulssen, R. H. (2018): Transcriptomic landscape of treatment-naïve ulcerative colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 12, 327–336.
- Taniguchi, K., Karin, M. (2014): IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*, 26, 54–74.

- Teeuwssen, M., Fodde, R. (2019): Cell heterogeneity and phenotypic plasticity in metastasis formation: The case of colon cancer. *Cancers*, Vol. 11.
- Thiery, J. P. (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454.
- Tsoi, K. K. F., Pau, C. Y. Y., Wu, W. K. K., Chan, F. K. L., Griffiths, S., Sung, J. J. Y. (2009): Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: A Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7.
- Ueo, H., Sugimachi, K., Gorges, T. M., Bartkowiak, K., Yokobori, T., Müller, V., Shinden, Y., Ueda, M., Ueo, H., Mori, M., Kuwano, H., Maehara, Y., Ohno, S., Pantel, K., Mimori, K. (2015): Circulating tumour cell-derived platin3 is a novel marker for predicting long-term prognosis in patients with breast cancer. *British Journal of Cancer*, 112, 1519–1526.
- Uitto, J., Pulkkinen, L. (1996): Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. *Molecular Biology Reports*, Vol. 23, 35–46.
- UniProt: The Universal Protein Resource. Verfügbar unter <https://www.uniprot.org/> [22.09.2020]
- Vardakis, N., Messaritakis, I., Papadaki, C., Agoglossakis, G., Sfakianaki, M., Saridaki, Z., Apostolaki, S., Koutroubakis, I., Perraki, M., Hatzidaki, D., Mavroudis, D., Georgoulas, V., Souglakos, J. (2011): Prognostic significance of the detection of peripheral blood CEACAM5mRNA-positive cells by real-time polymerase chain reaction in operable colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 17, 165–173.
- Vlems, F. A., Diepstra, J. H. S., Cornelissen, I. M. H. A., Ruers, T. J. M., Ligtenberg, M. J. L., Punt, C. J. A., Van Krieken, J. H. J. M., Wobbles, T. H., van Muijen, G. N. P. (2002): Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Molecular Pathology* : MP, 55, 156–163.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Smits, A. M. M., Bos, J. L. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*, 319, 525–532.
- Wang, X., Guda, C. (2016): Integrative exploration of genomic profiles for triple negative breast cancer identifies potential drug targets. *Medicine (United States)*, 95.
- Wang, X. M., Zhang, Z., Pan, L. H., Cao, X. C., Xiao, C. (2019): KRT19 and CEACAM5 mRNA-marked circulated tumor cells indicate unfavorable prognosis of breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 174, 375–385.
- Wehkamp, J., Stange, E. F. (2020): An update review on the paneth cell as key to ileal Crohn's disease. *Frontiers in Immunology*, Vol. 11, 646.
- Weinberg, R. A. (2007): *The biology of cancer*. Garland Science.
- Wen, L., Guo, L., Zhang, W., Li, Y., Jiang, W., Di, X., Ma, J., Feng, L., Zhang, K., Shou, J. (2019): Cooperation between the inflammation and coagulation systems promotes the survival of circulating tumor cells in renal cell carcinoma patients. *Frontiers in Oncology*, 9(JUN), 504.
- Werner, S., Keller, L., Pantel, K. (2020): Epithelial keratins: Biology and implications as diagnostic markers for liquid biopsies. *Molecular Aspects of Medicine*, 72 .
- Wildi, S., Kleeff, J., Maruyama, H., Maurer, C. A., Friess, H., Büchler, M. W., Lander, A. D., Korc, M. (1999): Characterization of cytokeratin 20 expression in pancreatic and colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*, 5, 2840–2847.
- Windsor, J. W., Kaplan, G. G. (2019): Evolving epidemiology of IBD. *Current Gastroenterology Reports*, Vol. 21.
- World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (2018): Continuous update project expert report 2018. Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer. Verfügbar unter <https://www.wcrf.org/sites/default/files/Colorectal-cancer-report.pdf> [27.07.2020]
- Wu, C., Zhang, J., Li, H., Xu, W., Zhang, X. (2020): The potential of liquid biopsies in gastrointestinal

- cancer. *Clinical Biochemistry*, Vol. 84, 1–12.
- Xin, Z., Li, D., Mao, F., Du, Y., Wang, X., Xu, P., Li, Z., Qian, J., Yao, J. (2020): PLS3 predicts poor prognosis in pancreatic cancer and promotes cancer cell proliferation via PI3K/AKT signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 235, 8416–8423.
- Yan, B., Wang, H., Rabbani, Z. N., Zhao, Y., Li, W., Yuan, Y., Li, F., Dewhirst, M. W., Li, C. Y. (2006): Tumor necrosis factor- α is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Research*, 66, 11565–11570.
- Yang, C., Chen, F., Wang, S., Xiong, B. (2019): Circulating tumor cells in gastrointestinal cancers: Current status and future perspectives. *Frontiers in Oncology*, Vol. 9, 1427.
- Yang, C., Shi, D., Wang, S., Wei, C., Zhang, C., Xiong, B. (2018): Prognostic value of pre-and post-operative circulating tumor cells detection in colorectal cancer patients treated with curative resection: A prospective cohort study based on iset device. *Cancer Management and Research*, 10, 4135–4144.
- Yang, C., Zou, K., Zheng, L., Xiong, B. (2017): Prognostic and clinicopathological significance of circulating tumor cells detected by rt-pcr in non-metastatic colorectal cancer: A meta-analysis and systematic review. *BMC Cancer*, 17.
- Yokobori, T., Iinuma, H., Shimamura, T., Imoto, S., Sugimachi, K., Ishii, H., Iwatsuki, Masaaki, Ota, D., Ohkuma, M., Iwaya, T., Nishida, N., Kogo, R., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Toh, H., Sato, T., Barnard, G. F., Fukagawa, T., Yamamoto, S., Nakanishi, H., Sasaki, S., Miyano, S., Watanabe, T., Kuwano, H., Mimori, K., Pantel, K., Mori, M. (2013): Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Research*, 73, 2059–2069.
- Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., Haber, D. A. (2011): Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *Journal of Cell Biology*, Vol. 192, 373–382.
- Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert-Koch-Institut und GEKID (2021): Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/krebs_in_deutschland_2021.pdf?__blob=publicationFile [18.02.2022]
- Zeuzem, S., Schöffauer, M., Rösch, W. (2018): *Duale Reihe Innere Medizin - Teil E Gastroenterologie* (4. Auflage). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Zhang, X., Han, X., Zuo, P., Zhang, X., Xu, H. (2020): CEACAM5 stimulates the progression of non-small-cell lung cancer by promoting cell proliferation and migration. *Journal of International Medical Research*, 48, 030006052095947.
- Zhou, Q., Toivola, D. M., Feng, N., Greenberg, H. B., Franke, W. W., Bishr Omary, M. (2003): Keratin 20 helps maintain intermediate filament organization in intestinal epithelia. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 2959–2971.



Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

Einwilligungserklärung

Version 1.2.- 22.02.2018

Patient (Name, Vorname): _____

Geburtsdatum (tt.mm.jjjj): _____

Bitte lesen Sie folgenden Text aufmerksam durch, kreuzen Sie Zutreffendes an und unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung anschließend am Ende dieser Doppelseite.

Ich willige ein, dass meine Biomaterialien und Daten, wie in der Informationsschrift beschrieben, an die Biomaterialbank BMB-CCC im Institut für Experimentelle Tumorforschung, Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel und Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Campus gegeben und für medizinische Forschungszwecke verwendet werden. Ich willige ein, dass die Zwecke wissenschaftlich-medizinischer Forschung, für die meine Biomaterialien und Daten verwendet werden, nicht eingegrenzt werden.

Das Eigentum an den Biomaterialien übertrage ich an das Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH).

Ich willige ein, dass die nachfolgend aufgeführten Biomaterialien in der Biobank BMB-CCC gesammelt und für die biomedizinische Forschung verwendet werden (**falls nicht gewünscht, bitte „nein“ ankreuzen**):

- Gewebeproben aus meinem entfernten Gewebe Nein
- maximal 45 ml Blut Nein
- maximal 10 ml Knochenmarkblut Nein
- Urin-, Stuhl- sowie Speichelproben Nein

Ich habe die Patienten-Informationsschrift gelesen und hatte die Gelegenheit, Fragen zu stellen. Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Ich willige ein, dass ich evtl. zu einem späteren Zeitpunkt erneut kontaktiert werde (**falls nicht gewünscht, bitte „nein“ ankreuzen**)

- zum Zweck der Gewinnung weiterer Informationen / Biomaterialien, Nein
- zum Zweck der Einholung meiner Einwilligung in die Verknüpfung mit medizinischen Daten aus anderen Datenbanken Nein

Datenschutzerklärung

Ich willige ein, dass meine behandelnde Klinik und die Biomaterialbank BMB-CCC, wie in der Information beschrieben,

- personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, von mir erhebt und speichert,
- weitere personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit aus meinen Krankenunterlagen entnimmt,
- und die Daten gemeinsam mit meinen Biomaterialien pseudonymisiert (d.h. kodiert) an das Institut für Experimentelle Tumorforschung, Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel und Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Campus Kiel für medizinische Forschungsvorhaben zur Verfügung stellt.

Meine Biomaterialien und Daten dürfen unbefristet für medizinische Forschungsvorhaben verwendet werden. Sie dürfen pseudonymisiert an Universitäten, Forschungsinstitute und forschende Unternehmen zu Zwecken medizinischer Forschung weitergegeben werden. Dies schließt unter Umständen auch die Weitergabe für Forschungsprojekte im Ausland mit möglicherweise niedrigerem Datenschutzniveau ein.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich meine Einwilligung gegenüber der Biobank BMB-CCC im Institut für Experimentelle Tumorforschung, Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel und Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Campus Kiel ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen kann. Beim Widerruf werden auf mein Verlangen die verbliebenen Biomaterialien und die erhobenen Daten vernichtet bzw. gelöscht oder anonymisiert. Daten aus bereits durchgeführten Analysen können nicht mehr entfernt werden.

Eine Kopie der Patienteninformation und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt bei der behandelnden Klinik.

Name des Patienten in Druckbuchstaben

Ort, Datum (vom Patienten/Probanden einzutragen), Unterschrift des Patienten/Probanden

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Patienten/Probanden eingeholt.

Name der aufklärenden Person in Druckbuchstaben

Ort, Datum, Unterschrift der aufklärenden Person

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Susanne Sebens für die Bereitstellung des Themas und die herausragende Betreuung. Ihre wissenschaftliche Begeisterung sowie ihre fachliche Unterstützung haben mich stets motiviert und meine Zeit im Labor zu einer besonderen Erfahrung gemacht.

Für seine tatkräftige Unterstützung in methodischen, statistischen und inhaltlichen Fragen danke ich außerdem ganz besonders Dr. Christian Röder, der immer ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art hatte.

Danken möchte ich außerdem meiner Arbeitsgruppe aus dem *Institut für experimentelle Tumorforschung*. Bianca Zinke und Dagmar Leisner danke ich für die tolle Einarbeitung und den anhaltenden Beistand während meiner gesamten Laborzeit. Sascha Rahn danke ich herzlich für seine fachliche Kompetenz und Anleitung. Ein besonderer Dank gilt auch allen studentischen Kolleginnen und Kollegen: Tina, Silje, Frederik, Lisa, Nadja, Luisa, Elsa, Lilly und Lauritz danke ich sowohl für die fachliche Unterstützung als auch für das entspannte Arbeitsklima.

Mein Dank gilt außerdem Julia und Liane, die mich als Mitarbeiterinnen der Biobank stets in meinem Projekt unterstützt haben.

Für die Unterstützung von klinischer Seite möchte ich Dr. Alexander Hendricks und Dr. Alexander Bernsmeier aus der Klinik für Allgemeine, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie danken. Dr. Alexander Bernsmeier gebührt außerdem mein besonderer Dank für die tatkräftige Mithilfe bei der statistischen Analyse und Auswertung.

Ein weiterer Dank gilt der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die mich in der Phase der experimentellen Arbeit finanziell durch ein Promotionsstipendium unterstützte.

Meiner Familie und meinem Freund danke ich für die immerwährende Unterstützung und ihre aufbauenden Worte. Danke, dass ihr mich auf diesem Weg begleitet und motiviert habt!

Publikationsverzeichnis

Originalarbeit:

Born, J., Hendricks, A., Hauser, C., Egberts, J.-H., Becker, T., Röder, C., Sebens, S. (2022): Detection of marker associated with CTC in colorectal cancer in mononuclear cells of patients with benign inflammatory intestinal diseases. *Cancers (Basel)*, 14(1), 47

Tagungsbeitrag (Poster):

Born, J., Hendricks, A., Bernsmeier, A., Rahn, S., Röder, C., Sebens, S. (2020): Dissemination of intestinal epithelial cells in inflammation-associated-colorectal-carcinogenesis. Vorgelegt auf dem 34. Deutschen Krebskongress, 19.02. bis 22.02.2020, Berlin