

Entwicklung eines kombinierten Stuhl- und Blut-Tests für die Früherkennung von kolorektalen Karzinomen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Stefanie Rohrbach

aus Ostercappeln

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dimo Dietrich
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Aretz

Tag der Mündlichen Prüfung: 06.02.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Sebastian Strieth

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|----|
| | Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| 1. | Einleitung | 8 |
| 1.1 | Das kolorektale Karzinom | 8 |
| 1.1.1 | Karzinogenese | 11 |
| 1.1.1.1 | Genetik des Kolorektalkarzinoms | 13 |
| 1.1.1.2 | Epigenetik des Kolorektalkarzinoms | 15 |
| 1.1.1.2.1 | Septin 9 | 17 |
| 1.1.2 | Prävention und Früherkennung | 18 |
| 1.1.2.1 | Biomarker | 19 |
| 1.1.2.1.1 | Okkultes Blut im Stuhl | 20 |
| 1.1.2.1.2 | Zellfreie zirkulierende Tumor-DNA | 20 |
| 1.1.2.1.3 | <i>SEPT9</i> -Methylierung | 21 |
| 1.2 | Ziel der Arbeit | 23 |
| 2. | Material und Methoden | 23 |
| 2.1 | Patientenkollektiv | 23 |
| 2.2 | Immunologische Bestimmung okkulten Bluts im Stuhl | 24 |
| 2.3 | DNA-Methylierungsanalytik zellfreier zirkulierende DNA | 25 |
| 2.3.1 | Plasma-Präparation | 26 |
| 2.3.2 | Bisulfit-Konversion und Aufreinigung zellfreier zirkulierender DNA | 27 |
| 2.3.3 | Herstellung einer Positivkontrolle | 29 |
| 2.3.4 | Echtzeit-PCR-Analyse | 30 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.3.4.1 | <i>ACTB/SHOX2/SEPT9</i> -Assay | 32 |
| 2.3.4.2 | Der qPCR-Mastermix | 33 |
| 2.4 | Statistik | 35 |
| 3. | Ergebnisse | 36 |
| 3.1 | Studienpopulation | 36 |
| 3.2 | Klinische Leistungsfähigkeit des <i>mSEPT9</i> -Tests | 36 |
| 3.3 | Klinische Leistungsfähigkeit des iFOBT-Tests | 38 |
| 3.4 | Interassay-Übereinstimmung | 39 |
| 3.5 | Inkrementierung des iFOBT-Tests | 40 |
| 3.6 | Klinische Leistungsfähigkeit des iFOBT/ <i>mSEPT9</i> -Kombinationstests | 42 |
| 3.7 | Stadien-abhängige klinische Leistungsfähigkeit | 43 |
| 4. | Diskussion | 44 |
| 5. | Zusammenfassung | 52 |
| 6. | Abbildungsverzeichnis | 54 |
| 7. | Tabellenverzeichnis | 56 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 57 |
| 9. | Danksagung | 64 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| 95 % KI | 95 % Konfidenzintervall |
| <i>ACTB</i> | β-Aktin Gen |
| <i>APC</i> | Adenomatöse Polyposis coli Gen |
| AUC | Area Under the Curve |
| BHQ | Black Hole Quencher |
| <i>BMP3</i> | Bone morphogenetic protein 3 Gen |
| <i>BRAF</i> | B-rapidly accelerated fibrosarcoma Gen |
| CA19-9 | Carbohydrate antigen 19-9 |
| ccfDNA | Circulating cell-free <i>DNA</i> (zirkulierende zellfreie DNA) |
| CEA | Carcinoembryonic antigen |
| CIMP | CpG-Insel methylierter Phenotyp |
| CIN | Chromosomale Instabilität |
| CGIs | Cytosin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid-Inseln |
| CpG | Cytosin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid |
| CT | Computertomographie |
| C _T | Cycle Threshold (Zyklusschwellenwert) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| FAP | Familiäre adenomatöse Polyposis |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FN | Falsch Negative |
| FP | Falsch Positive |
| G-BA | Gemeinsamer Bundesausschuss |
| gFOBT | Guaiak-basierter Stuhltest |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HNPCC | Hereditäres nicht-polypöses Kolon-Karzinom |
| HNSCC | Plattenepithelkarzinom der Kopf-Halsregion |
| HP | Hyperplastischer Polyp |
| HWZ | Halbwertszeit |

| | |
|---------------|--|
| IEN | Intraepitheliale Neoplasie |
| iFOBT | Immunologischer fäkaler Okkultbluttest |
| IVD | In-vitro-Diagnostikum |
| <i>KRAS</i> | Kirsten rat sarcoma viral Gen |
| KRK | Kolorektales Karzinom |
| lncRNA | Long non-coding RNA (lange nicht kodierende RNA) |
| <i>mSEPT9</i> | Methyliertes Septin 9 Gen |
| miRNA | microRNA |
| <i>MLH1</i> | MutL homolog 1 Gen |
| MMR-Gen | Mismatch Reparaturgen |
| MSI | Mikrosatelliteninstabilität |
| <i>MSH2</i> | MutS homolog 2 Gen |
| <i>MSH6</i> | MutS-homolog 6 Gen |
| MSS | Mikrosatellitenstabilität |
| mtSDNA | Multi Target Stool DNA Test |
| <i>MUTYH</i> | Humanes mutY DNA Glycosylase Gen |
| ncRNA | non-coding RNA (nicht kodierende RNA) |
| <i>NDRG4</i> | N-myc downstream-regulated gene 4 |
| NPW | Negativ prädiktiver Wert |
| p53 | p53- Protein |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PJS | Peutz-Jeghers-Syndrom |
| <i>PMS2</i> | PMS1 homolog 2 Gen |
| qPCR | quantitative PCR |
| RN | Richtig negativ |
| ROC | Receiver Operating Characteristics |
| RP | Richtig positiv |
| SAK | Serratiertes Adenokarzinom |
| <i>SEPT9</i> | Septin 9 Gen |
| <i>SHOX2</i> | Short Stature Homeobox 2 Gen |
| SSA | Sessiles serratiertes Adenom |
| SSAD | Sessiles serratiertes Adenom mit Zelldysplasie |

| | |
|--------------|---|
| SSP | Sessiler serratierter Polyp |
| TGF- β | Transforming Growth Factor β |
| THFA | Tetrahydrofurfurylalkohol |
| TNM | Tumor Node Metastasis |
| <i>TP53</i> | Tumorsuppressorgen P53 |
| TSA | Traditionelles serratiertes Adenom |
| UICC | Union for International Cancer Control |
| USPSTF | United States Preventive Services Task Force |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |
| Wnt | Wingless Int1 |

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

Neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen Krebserkrankungen die häufigste Todesursache in der US-amerikanischen Bevölkerung dar (Tab. 1).

Hierbei kommt das kolorektale Karzinom (KRK) bei Männern und Frauen nach dem Prostata- bzw. Mammakarzinom und dem Bronchialkarzinom am häufigsten vor (Abb. 1). Das KRK umfasst von der Kolon- oder Rektummukosa ausgehende, maligne Zellen, die ein infiltratives Wachstum zeigen, also zumindest in der Submukosa nachweisbar sind (Fleming et. al., 2012). Je tiefer die Wandschichten von den entarteten Krebszellen infiltriert werden, desto größer ist das Risiko für die Ausbildung von Lymphknoten- und Fernmetastasen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

Tab. 1: Die zehn führenden Todesursachen in den vereinigten Staaten von Amerika 2019 (modifizierte Tabelle mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Siegel et al., 2022).

| Todesursache | Anzahl | Prozentualer Anteil |
|--|-----------|---------------------|
| Alle Ursachen | 2.854.838 | 100 % |
| Herzkrankungen | 659.041 | 23 % |
| Krebs | 599.601 | 21 % |
| Unfälle | 173.040 | 6 % |
| Chronische Erkrankung der unteren Atemwege | 156.979 | 5 % |
| Zerebrovaskuläre Erkrankung | 150.005 | 5 % |
| Alzheimer Erkrankungen | 121.499 | 4 % |
| Diabetes mellitus | 87.647 | 3 % |
| Nephritis, nephrotisches Syndrom und degenerative Nierenerkrankungen | 51.565 | 2 % |
| Influenza und Pneumonien | 49.783 | 2 % |
| Suizid | 47.511 | 2 % |

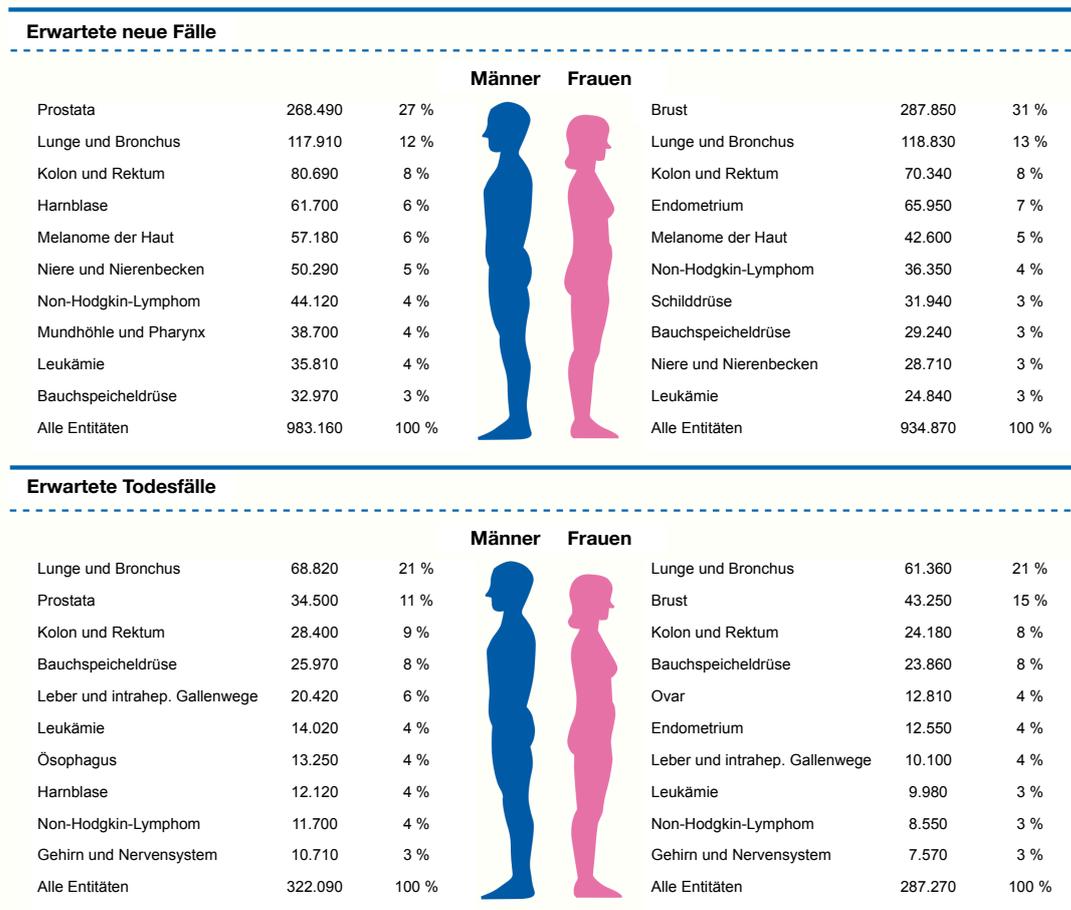


Abb. 1: Die zehn führenden Krebsarten mit der Anzahl geschätzter Krebsfälle und erwarteter Todesfälle in den vereinigten Staaten von Amerika im Jahr 2022, aufgeteilt nach Geschlechtern (Abbildung mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Siegel et al., 2022).

Histologisch wird zwischen Adeno-, Plattenepithel-, Siegelring-, Spindelzell-, adenosquamösen, muzinösen, medullären, mikropapillären, serratierten, cribriformen, neuroendokrinen und undifferenzierten Karzinomen unterschieden, wobei die Adenokarzinome mehr als 90 % aller KRK ausmachen (Fleming et. al., 2012). Daher werden in dieser Arbeit lediglich Patienten mit nachgewiesenem Adenokarzinom untersucht.

In den Jahren 2014 bis 2018 betrug die durchschnittliche, altersbezogene Inzidenz für KRK in den USA 36,5 und die Mortalität in den Jahren 2015 bis 2019 13,4 pro 100.000 Einwohner. Neoplasien der Appendix vermiformis wurden hierbei ausgeschlossen (Siegel

et al., 2022). Schätzungen ergaben eine Anzahl von 151.030 Neuerkrankungen für das Jahr 2022, wobei 52.580 Todesfälle erwartet wurden (Siegel et al., 2022). Während die Inzidenz bei den über 55-Jährigen insgesamt rückläufig ist, zeigt sich in der Altersgruppe 20 bis 39 Jahre ein Anstieg um 1 bis 2 % pro Jahr (Zeidler et al., 2019). Zu den vermeidbaren Risikofaktoren der KRK-Entstehung gehören das Rauchen, hoher Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung, körperliche Inaktivität und extremes Übergewicht (Jacobs und Pox, 2019; Siegel et al., 2020). Für die unterschiedliche Prävalenz von KRK in verschiedenen ethnischen Gruppen werden ein niedriger sozioökonomischer Status sowie die unterschiedliche Infrastruktur des Gesundheitssystems und Erreichbarkeit von präventiven Maßnahmen als ursächlich beschrieben (Siegel et al., 2020). Nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind vor allem das zunehmende Alter, Risikoerkrankungen und eine genetische Prädisposition (Siegel et al., 2020). Veränderungen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) können zur Ausbildung von Syndromen führen, die ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines KRK mit sich führen. Dazu gehören das Lynch-Syndrom, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), das Juvenile Polyposis-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) und die *MUTYH*-assoziierte Polyposis (Fleming et al., 2012). Männer haben ein höheres Risiko an Darmkrebs zu erkranken als Frauen. Die Ursache hierfür ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch gibt es Hinweise, dass eine geschlechtsspezifische vermehrte Aussetzung in Bezug auf bestimmte Risikofaktoren und der Einfluss von Sexualhormonen eine Rolle spielen können (Siegel et al., 2020). Zu den Risikoerkrankungen gehören die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn (Bye et al., 2017), wie auch das metabolische Syndrom (Jacobs und Pox 2019). Die 5-Jahres-Überlebensrate für US-amerikanische Patienten mit KRK betrug im Januar 2019 im lokal begrenzten Tumorstadium 90 % und 14 % im metastasierten Stadium (Siegel et al., 2020). Entscheidend für das Überleben ist eine Diagnosestellung im frühen Tumorstadium und die rasche Einleitung einer patientengerechten Therapie (Jung et al., 2020). Das leitliniengetreue Darmkrebs-Screening und die entsprechende Überwachung suspekter Befunde und Risikopatienten können die Morbidität und Mortalität von KRK signifikant senken (Siegel et al., 2020).

Die operative Tumoresektion inklusive zugehöriger Blutgefäße und Lymphknoten, die Chemotherapie und beim unteren Rektumkarzinom auch die Radiatio bilden die drei

Säulen der KRK-Therapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Nach histologischer Sicherung der Diagnose erfolgt im klinischen Setting eine Umfelddiagnostik, um eine mögliche Fernmetastasierung zu detektieren (Pox, 2019). Beim Rektumkarzinom müssen zusätzlich der Abstand des Tumors zur Anokutanlinie und mesorektalen Faszie sowie der Lymphknotenstatus im Beckenbereich evaluiert werden, um zu entscheiden, ob eine neoadjuvante Vorbehandlung mittels Radiochemotherapie erforderlich ist (Pox, 2019). Anhand des Operationspräparates können das endgültige histologische Tumorstadium nach den Tumor Node Metastasis (TNM)-Kriterien und das Stadium der Union for International Cancer Control (UICC) festgelegt und eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Hieraus ergibt sich die Bedeutung einer korrekten Einstufung des Tumorstadiums: Sollten Fernmetastasen im prätherapeutischen Staging trotz optimaler Bildgebung nicht detektiert werden, könnte die eingeleitete Behandlung unzureichend sein (Bergheim et al., 2018).

1.1.1 Karzinogenese

Dass sich kolorektale Malignome durch genetische Mutationen aus gutartigen Vorläuferläsionen entwickeln, wurde erstmals im Jahr 1990 von Fearon und Vogelstein als Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben (Hong 2018). Die genetischen und epigenetischen Veränderungen wurden im Laufe der Zeit weiter aufgeschlüsselt und es wurden verschiedene Krebsvorstufen differenziert. Man unterscheidet konventionelle und serratierte Adenome (Gibson und Odze 2016). Die konventionellen Adenome werden anhand ihres Phänotyps als tubulär, tubulo-villös und villös klassifiziert (Fleming et al., 2012). Die Häufigkeit, die Größe und das Risiko einer Entartung dieser Unterformen steigen in der eben genannten Reihenfolge und mit zunehmendem Alter (Tannapfel et al., 2010). Abb. 2 zeigt endoskopische Aufnahmen klassischer Adenome. Weiterhin differenziert die World Health Organization (WHO) das Ausmaß der neoplastischen Epithelproliferation der Adenome in niedrig- und hochgradige intraepitheliale Neoplasien (IEN), um das entsprechende Entartungsrisiko zu benennen (Tannapfel et al., 2010). Serratierte Adenome lassen sich in hyperplastische Polypen (HP), sessile serratierte Polypen bzw. Adenome (SSP/A) mit oder ohne Zelldysplasie (SSAD) und traditionelle serratierte Polypen bzw. Adenome (TSA) einteilen, wobei hyperplastische Polypen am häufigsten vorkommen (De

Palma et al., 2019; Gibson und Odze 2016). Endoskopische Aufnahmen serratierter Adenome werden in Abb. 3 präsentiert.



Abb. 2: Endoskopische Aufnahmen von klassischen kolorektalen Adenomen: a) Tubuläres Adenom (© Herr Prof. Dr. med. A. Meining, Uniklinikum Würzburg) b) Tubulo-villöses Adenom (© Dr. med. univ. Christoph Schwinghammer, Kepler Universitätsklinikum Linz, Österreich) c) Villöses Adenom (© Herr M. Oelckers, Albertinen Krankenhaus Hamburg).

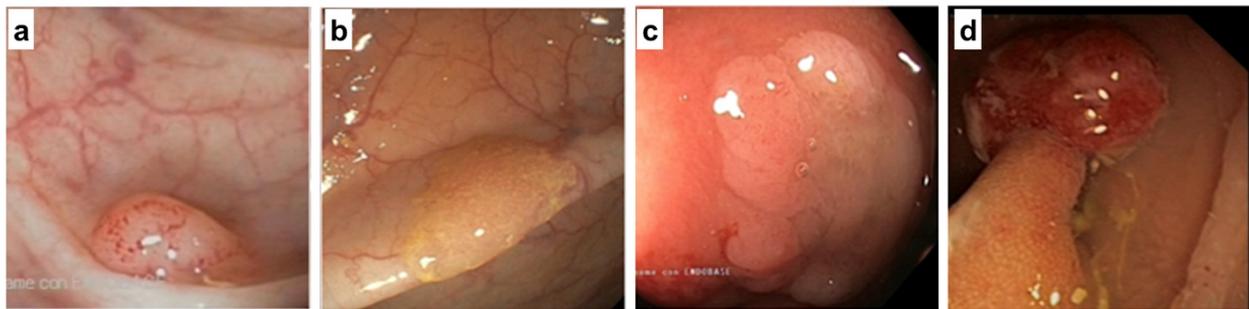


Abb. 3: Endoskopische Aufnahmen von serratierten kolorektalen Adenomen: a) Hyperplastischer Polyp b) Sessiles serratiertes Adenom c) Sessiles serratiertes Adenom mit Dysplasie d) Traditionelles serratiertes Adenom (© Prof. Dr. Giovanni D. De Palma, Universität von Neapel Federico II, Italien).

Kommt es im Verlauf zu weiteren Genmutationen, können die entarteten Zellen ein infiltratives Wachstum entwickeln (Markowitz et al., 2009). Daraus ergibt sich, dass die Entstehung eines KRK verhindert werden kann, indem die zugrundeliegende Vorläuferläsion entfernt wird (Fleming et al., 2012). Hierauf beruht die Sinnhaftigkeit der Vorsorgekolo- skopie (Zauber et al., 2012).

1.1.1.1 Genetik des Kolorektalkarzinoms

Die Adenom-Karzinom-Sequenz beschreibt eine durch aufeinanderfolgende Mutationen bedingte chromosomale Instabilität (CIN) oder Mikrosatelliteninstabilität (MSI), welche jeweils über eine Hyperproliferation der kolorektalen Mukosazellen und Bildung von konventionellen Adenomen zur Karzinogenese führt (De Palma et al., 2019). Eine Übersicht ist in Abb. 4 dargestellt. Charakteristisch für die CIN sind somatische, inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen, wie dem *APC*- und *TP53*-Gen, sowie aktivierende Mutationen in Protoonkogenen, wie *KRAS* (De Palma et al., 2019). Die MSI ist Folge von Mutationen in Mismatch-Reparatur-(MMR)-Genen (De Palma et al., 2019). Kurze, repetitive DNA-Sequenzen kommen genomweit verteilt vor und werden als Mikrosatelliten bezeichnet (Armaghany et al., 2012). Bei der DNA-Replikation kommt es häufiger im Bereich dieser Mikrosatelliten zu Ablesefehlern, welche normalerweise durch die DNA-Reparaturproteine des MMR-Systems korrigiert werden; bei ausbleibender Korrektur resultiert die MSI (Armaghany et al., 2012). Eine Keimbahnmutation in einem der MMR-Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* wird als Lynch-Syndrom bezeichnet (Lynch et al., 2015). Die Vererbung verläuft autosomal-dominant und stellt die häufigste hereditäre Form des KRK dar (Lynch et al., 2015). Eine MMR-Defizienz kann jedoch auch durch eine doppel-somatische Mutation, oder durch eine biallele Hypermethylierung der Promotorregion des *MLH1* bedingt sein (Jung et al., 2020). Hierauf wird im Folgenden noch weiter eingegangen. In KRK mit sporadischer MSI wird häufig eine *BRAF*-Mutation nachgewiesen. Des Weiteren wurde in den letzten Jahren der serratierte Karzinogeneseweg beschrieben (De Palma et al., 2019; Gibson und Odze 2016). Aus der normalen Mukosa entwickelt sich zumeist durch eine *BRAF*-Mutation ein hyperplastischer Polyp, oder seltener auf dem Boden einer *BRAF*- oder *KRAS*-Mutation ein traditionell serratiertes Adenom. Die weitere Krebsentwicklung ist insbesondere durch eine CpG-Insel-Methylierung gekennzeichnet, die im folgenden Abschnitt weiter erläutert wird (Hong, 2018; Jung et al. 2020). In Abb. 5 ist eine Übersicht der serratierten Karzinogenese dargestellt.

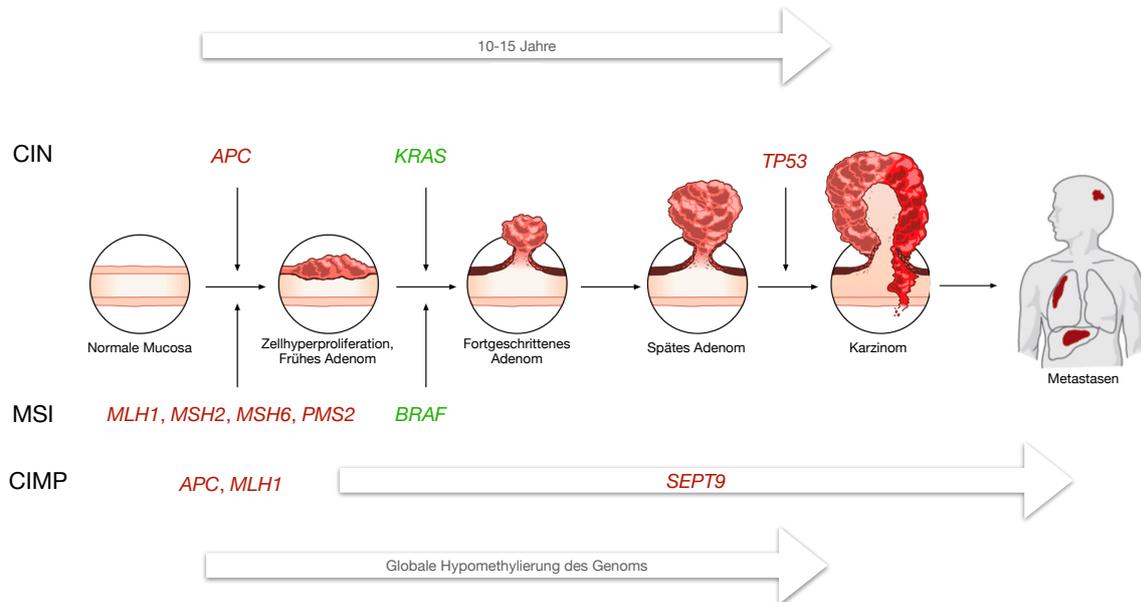


Abb. 4: Eine genetische Übersicht über die in der Adenom- Karzinom-Sequenz maßgeblich involvierten Gene und molekularen Pathomechanismen (modifizierte Abbildung aus De Palma et al. 2019, Open Access Lizenz, Beschriftung modifiziert anhand Angaben aus Hong, 2018 und Jung et al., 2020, Sun et. al., 2020). Aufeinanderfolgende Mutationen im Adenomatöse Polyposis coli Gen (*APC*), Kirsten rat sarcoma viral Gen (*KRAS*) und Tumorsuppressorgen P53 (*TP53*) bewirken eine chromosomale Instabilität (CIN). Die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) resultiert aus Mutationen in den Mismatch-Reparaturgenen MutL homolog 1 (*MLH1*), MutS homolog 2 (*MSH2*), MutS homolog 6 (*MSH6*) oder PMS1 homolog 2 (*PMS2*). Der Cytosin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid-Insel methylierte Phänotyp (CIMP) des *APC*, *MLH1* oder Septin 9 Gen (*SEPT9*) wurde beim kolorektalen Karzinom nachgewiesen. Der Grad der Promotorhypermethylierung von *SEPT9* steigt mit zunehmendem Tumorstadium an. Grün dargestellt ist die Aktivierung eines Onkogens; rot dargestellt die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens.

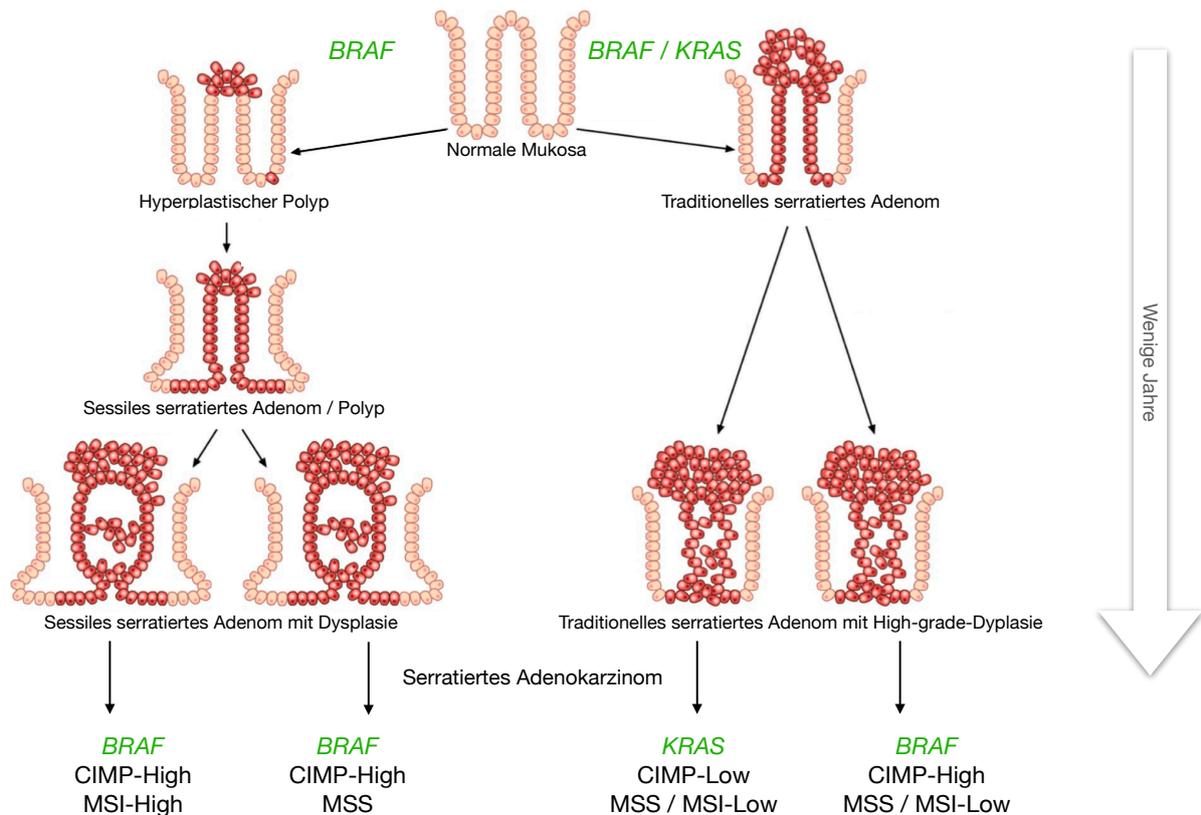


Abb. 5: Eine genetische Übersicht über maßgebliche molekulare Pathomechanismen des serratierten Karzinogeneseweges (modifizierte Abbildung aus De Palma et al., 2019, Open Access Lizenz). Beginnend mit einer Mutation im B-rapidly accelerated fibrosarcoma Gen (*BRAF*) oder Kirsten rat sarcoma viral Gen (*KRAS*) erfolgt die Karzinogenese über verschiedene weitere Mutationen. Exemplarisch erfolgt eine Gruppierung von Mutationsprofilen der serratierten Adenokarzinome in vier Unterformen: *BRAF*-Mutation mit ausgeprägtem Cytosin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid-Insel methyliertem Phänotyp (CIMP-High) und hochgradiger Mikrosatelliteninstabilität (MSI-High), geringgradiger Mikrosatelliteninstabilität (MSI-Low) oder Mikrosatellitenstabilität (MSS) sowie *KRAS*-Mutation mit geringem CIMP (CIMP-Low) und relativer Mikrosatellitenstabilität. Grün dargestellt ist die Aktivierung eines Onkogens.

1.1.1.2 Epigenetik des Kolorektalkarzinoms

Neben den Keimbahnmutationen und somatischen Mutationen haben auch epigenetische Veränderungen einen großen Einfluss auf die Genexpression und die Pathogenese diverser Krebserkrankungen (Jung et al., 2020). Solche werden definiert als vererbare Alterationen in der Genexpression, welche nicht aus einer dauerhaften Veränderung der primären Gensequenz hervorgehen (Jung et al., 2020). Beispielsweise kann durch

Änderungen des Gen-Methylierungsgrades, der DNA-Struktur oder der Aktivität von epigenetischen Regulatoren, wie den non-coding RNAs (ncRNAs), die Genexpression moduliert werden (Jung et al., 2020).

Die DNA-Methylierung erfolgt vor allem am 5'-C-Atom der DNA-Base Cytosin in Cytosin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotiden (CpG) (De Palma et al., 2019; Jung et al., 2020; Jones, 2012; Sun et al., 2020). Der überwiegende Anteil menschlicher Gene beinhaltet in der Promotorregion kurze, normalerweise nicht methylierte, CpG-reiche DNA-Abschnitte, sogenannte CpG-Inseln (CGIs), während das restliche Genom nur sehr wenige CGIs enthält (Jones, 2012; Jung et al., 2020). Die Methylierung von CGIs in der Promotorregion kann durch Inhibierung der Bindung von Transkriptionenzymen und -faktoren die Transkription dieser vermindern (Jones, 2012; Jung et al., 2020). Hingegen zeigen die Demethylierung von Promotorregionen und eine Methylierung von CpG-Arealen im Bereich der Genkörper eher eine Stimulation der Transkription (Jones, 2012; Jung et al., 2020). Beim KRK wurden beispielsweise hypermethylierte Promotorregionen der Tumorsuppressor-Gene *MLH1* und *APC* nachgewiesen (Jung et al., 2020). Die durch Hypermethylierung von CGIs in Promotorregionen von Tumorsuppressorgen gekennzeichnete epigenetische Instabilität wird CpG-Insel methylierter Phänotyp (CIMP) genannt (Hong 2018; Jung et al., 2020). Der CIMP ist der genetische Kernaspekt des serratierten Karzinogeneseweges und scheint als Biomarker prädestiniert zu sein, jedoch mangelt es aktuell an einer einheitlichen Definition von Schwellenwerten der Einteilung „CIMP high“ oder „CIMP low“ und standardisierter Testverfahren (Hong, 2018; Jung et al. 2020).

Daneben scheint die globale Hypomethylierung des Genoms in KRK ein frühes Ereignis in der Karzinogenese zu sein: Es zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen dem Grad der Demethylierung und dem Grad der Entartung von frühen Adenomen zu metastasierenden Adenokarzinomen (Jung et al., 2020). Globale Hypomethylierung wird auch im normalen Alterungsprozess beobachtet, sodass hier eine Ursache in der Korrelation zwischen dem zunehmenden Alter und der zunehmenden Karzinominzidenz zu suchen ist (Jung et al., 2020).

Des Weiteren hat der Verpackungsgrad des Chromatins Einfluss auf die Genexpression (Jung et al., 2020). Um die DNA in eine chromosomale Struktur zu verpacken, wird das Chromatin um Histone gewickelt, welche unter anderem durch Acetylierung und

Methylierung unterschiedlich konfiguriert sein können: Acetylierung schwächt die Chromatin-Histon-Interaktion und erleichtert dadurch die Bindung von Replikations-, beziehungsweise Transkriptionsenzymen, während durch Methylierung der Histonden Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren erzeugt werden (Jung et al., 2020).

Die non-coding RNAs (ncRNAs) gehören zum nicht-codierenden Genom und sind maßgeblich in der Modulation der Genexpression involviert (Jung et al., 2020). Insbesondere fungieren mikroRNAs (miRNAs) und long non-coding RNAs (lncRNAs) als positive oder negative Transkriptionsregulatoren in vielen krebsrelevanten Signalwegen, wie z. B. dem Wnt-, EGFR-, TGF- β und p53-Signalweg (Jung et al. 2020). Unter anderem in Geweben von KRK wurde gezeigt, dass die Methylierung von Promotorregionen auch die Expression von ncRNAs beeinflusst (Jung et al., 2020), was die Bedeutung der Genmethylierung in der Darmkrebsentstehung weiter unterstreicht.

1.1.1.2.1 Septin 9

SEPT9 kodiert als Tumorsuppressorgen für das GTP-bindende Protein Septin 9, welches einen elementaren Bestandteil des Zytoskeletts darstellt und wichtige Funktionen bei der Zellteilung, den intra- und extrazellulären Transportsystemen, der Zellmigration und der Apoptose innehat (Sun et al., 2020). In vielen Malignomen wurde ein aberrantes Expressionsmuster von *SEPT9* nachgewiesen (Sun et al., 2020), sodass von einer Assoziation mit der Tumorgenese auszugehen ist (Potter et al., 2014). Beim KRK fand man die Hypermethylierung von CGIs in der Promotorregion von *SEPT9* und somit eine verminderte Genexpression (Semaan et al., 2016, Sun et al., 2020). Pathophysiologisch hält man die verminderte Funktion zur Einleitung der Apoptose und Autophagie von Zellen für einen Auslöser der Darmkrebsentstehung (Sun et al., 2020). Semaan et al. untersuchten im Jahr 2016 Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben hinsichtlich ihrer *SEPT9* Methylierung, wobei sie eine graduelle Zunahme der Methylierung von *SEPT9* ($mSEPT9$) Promotorregionen in den Zellen gesunder Kolorektalschleimhaut, über frühen und fortgeschrittenen Adenomen zu den KRK feststellten. Hierbei war auch eine signifikante Differenzierung zwischen nicht fortgeschrittenen und fortgeschrittenen Adenomen und zwischen fortgeschrittenen Adenomen und Adenokarzinomen möglich (Semaan et

al., 2016). Somit ist davon auszugehen, dass die *SEPT9* Hypermethylierung ein frühes Ereignis in der KRK-Karzinogenese ist (Semaan et al., 2016), wie auch in Abbildung 4 dargestellt.

1.1.2 Prävention und Früherkennung

Um die Mortalität des KRK zu senken, werden in der aktuellen S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019 primäre und sekundäre Präventionsmaßnahmen empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Durch den Verzicht auf Alkohol und Nikotin, durch Einhalten eines Body-Mass-Index zwischen 18,5 und 27,5 kg/m² und regelmäßige körperliche Aktivität wird die KRK-Inzidenz signifikant gesenkt (Jacob und Pox, 2019). Auch die Detektion und Entfernung von KRK-Vorläuferläsionen zählen zu den primär-präventiven Maßnahmen; die frühzeitige Erkennung von KRK in kurativ behandelbaren Stadien hingegen zählt zu den Sekundärpräventionen (Jacobs und Pox, 2019). Die vollständige Koloskopie ist mit der höchsten Sensitivität und Spezifität als Goldstandard in der primären und sekundären Prävention des KRK etabliert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Die endoskopische Polypektomie reduziert signifikant das Risiko, an KRK zu erkranken und folglich daran zu versterben (Zauber et al., 2012). Seit dem Jahr 2019 rät der gemeinsame Bundesausschuss (G-BA) in Deutschland zur Darmkrebsvorsorge mittels Koloskopie ab einem Alter von 50 Jahren bei Männern und 55 Jahren bei Frauen; bei unauffälligem Befund wird eine Kontrolle nach zehn Jahren empfohlen (Jacobs und Pox, 2019). Zudem haben Männer und Frauen zwischen 50 und 54 Jahren Anspruch auf einen jährlichen, quantitativen immunologischen Test auf okkultes Blut im Stuhl (iFOBT), wobei dieser Anspruch ab 55 Jahren nur noch alle zwei Jahre besteht, solange keine Vorsorgekoloskopie erfolgt ist. Bei auffälligem iFOBT-Test soll eine Koloskopie stattfinden (Jacobs und Pox, 2019). Weitere bildgebende Screening-Methoden stellen die Kapselendoskopie und die CT-Kolonographie dar, welche derzeit aufgrund mangelnder Validierung, der Strahlenbelastung, hoher Kosten und kurzer Kontrollintervalle, lediglich als Reservemaßnahmen zur Verfügung stehen (Jacobs und Pox, 2019).

1.1.2.1 Biomarker

Unter Biomarkern versteht man messbare Indikatoren, die eine Aussage über einen physiologischen oder pathologischen Zustand von einzelnen Zellen bis hin zu Organismen ermöglichen (Pfarr et al., 2017). Sie lassen sich in diagnostische, prädiktive, prognostische und Prädispositionsbiomarker gliedern und sollen entsprechend zwischen physiologischen und pathologischen Zuständen differenzieren, die Einschätzung einer geeigneten Therapie ermöglichen und Aufschluss über einen Krankheitsverlauf sowie ein individuelles Erkrankungsrisiko geben (Dietrich, 2014). Da der Krebsentstehung komplexe genetische und epigenetische Veränderungen zugrunde liegen, eignen sich Nukleinsäuren sehr gut als molekularer Biomarker für Malignome (Dietrich et al., 2014). Die heutzutage breit verfügbaren sequenzspezifischen Hybridisierungs- und Amplifikationstechnologien ermöglichen die präzise Quantifizierung dieser Nukleinsäuren aus diversen Probematerialien, wie beispielsweise Blut, Stuhl und Tumorbiopsien (Dietrich et al., 2014). Molekulare Biomarker sollen im Hinblick auf eine zunehmend individualisierte Patientenbetreuung eine verbesserte Abschätzung über das Risiko, einen malignen Tumor zu entwickeln, eine frühestmögliche Diagnose und die Überwachung des Therapieansprechens generieren (Dietrich, 2014). Zudem ermöglicht die genaue Quantifizierung eines molekularen Biomarkers ein molekulares Staging mit Aussage über das Risiko eines Lymphknotenbefalls oder einer Fernmetastasierung bevor bildgebende Verfahren greifen (Dietrich et al., 2014). In der Nachsorge des KRK wird in der aktuellen S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019 die Bestimmung des carcinoembryonalen Antigens (CEA) im Blut alle sechs Monate über mindestens zwei Jahre empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Es handelt sich um einen unspezifischen Serumprotein-Biomarker, der laut Bergheim und Kollegen eine gute Korrelation mit dem UICC-Stadium des KRK aufweist; dies allerdings unterhalb des gängigen Schwellenwertes von 5ng/ml, der wiederum aufgrund der hohen Beeinflussung durch Komorbiditäten und Nikotinkonsum gefordert wird (Bergheim et al., 2018). Insofern wird das CEA weder als diagnostischer, noch als prognostischer Biomarker verwendet (Bergheim et al., 2018). Für die Einschätzung einer geeigneten Chemotherapie werden anhand von Tumorbiopsien, Operationspräparaten oder ccfDNA der Mutationszustand von *BRAF*, *KRAS* bzw. *NRAS*, sowie der MSI-Status als prädiktive und prognostische Biomarker bestimmt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

1.1.2.1.1 Okkultes Blut im Stuhl

An KRK erkrankte Patienten zeigen keine spezifischen Frühsymptome (Herold, 2020). Wie viele andere Neoplasien sind größere Adenome und KRK häufig kontaktvulnerabel und geben über oberflächliche Gefäßläsionen kontinuierlich oder diskontinuierlich Blut in das Darmlumen ab (Jacobs, und Pox, 2019), sodass sich eine chronische Anämie entwickeln kann (Herold, 2020). Die Blutmenge ist insgesamt so gering, dass sie im Stuhl nicht sichtbar ist und als okkult bezeichnet wird. Sichtbares Blut im Stuhl findet sich am häufigsten bei Rektumkarzinomen (Herold, 2020). Wie bereits oben aufgeführt, sind Tests auf okkultes Blut im Stuhl im aktuellen KRK-Screening-Programm enthalten. Seit 2017 werden primär die fäkalen immunologischen Tests auf okkultes Blut im Stuhl (iFOBT) empfohlen, welche spezifisch humanes Hämoglobin nachweisen und dem lange Zeit am häufigsten genutzten Guaiak-basierten Stuhltest (gFOBT) in Sensitivität und Spezifität überlegen sind (Jacobs und Pox, 2019). In einer großen Querschnittsstudie ermittelten Imperiale et al. im Jahr 2014 für den iFOBT-Test eine Sensitivität von 73,8 % für die Detektion eines KRK, für fortgeschrittenen präkanzerösen Läsion eine Sensitivität von 23,8 %, für Polypen mit high-grade Dysplasie von 46,2 % und für sessile serratierte Polypen größer als 1 cm von 5,1 %. Die Testspezifität wurde zwischen 94,9 % und 96,4 % angegeben (Imperiale et al., 2014). Problematisch bei Hämoglobin-nachweisenden Stuhltests im Rahmen eines KRK-Screenings ist einerseits, dass nicht alle KRK oder Vorläuferläsionen jederzeit bluten und somit unerkannt bleiben (Ahlquist et al., 2000). Andererseits gibt es diverse andere Ursachen von Hämoglobin im Stuhl, wie beispielsweise eine obere gastrointestinale Blutungsquelle, blutende Divertikel, Hämorrhoiden und die akute Analfissur, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können (de Klerk et al. 2018) und weiterhin zu einer unnötigen Koloskopie (Ahlquist et al., 2000).

1.1.2.1.2 Zellfreie zirkulierende Tumor-DNA

Zirkulierende zellfreie DNA (ccfDNA) im Blutplasma wurde erstmals 1948 durch Mandel und Métais beschrieben und ist mittlerweile als potenzieller Biomarker für das Vorhandensein einer Krebserkrankung bekannt (Schwarzenbach et al., 2011). Die ccfDNA-Konzentrationen bei Krebspatienten zeigen sich gegenüber der Norm deutlich erhöht und fallen

nach einer onkologischen Tumorresektion auf normale Werte ab (Schwarzenbach et al., 2011). Die Freisetzung von ccfDNA ins Blut erfolgt zum einen durch Zellnekrose und Apoptose: Abgestorbene Zellen werden phagozytiert und die verdaute DNA von den Makrophagen freigesetzt (Schwarzenbach et al., 2011). Zum anderen können im Blut zirkulierende Tumorzellen und metastatische Zellansammlungen auch aktiv ccfDNA sezernieren (Schwarzenbach et al., 2011). Die Menge an freigesetzter ccfDNA variiert je nach Tumorstadium, Tumorgröße und der Clearance bedingt durch Leber und Nieren; die Halbwertszeit der ccfDNA rangiert zwischen 15 Minuten und einigen Stunden (Schwarzenbach et al., 2011). Erhöhte ccfDNA-Konzentrationen wurden allerdings auch bei Patienten mit benignen Tumoren, entzündlichen Erkrankungen oder Gewebstraumata festgestellt. Weitere Analysen der ccfDNA auf Mutationen und epigenetische Veränderungen können eine genauere Differenzierung hinsichtlich der Genese ermöglichen (Schwarzenbach et al., 2011). Werden posttherapeutisch anhaltend hohe ccfDNA-Konzentrationen gemessen, kann dies auf eine verbliebene Tumorlast hindeuten (Bergheim et al., 2018; Schwarzenbach et al., 2011), sodass ccfDNA auch als Therapieverlaufs-Biomarker geeignet wäre.

1.1.2.1.3 *SEPT9*-Methylierung

Seit 2008 werden viele Studien zur Validierung von *mSEPT9* in ccfDNA als qualifizierten Biomarker für das Screening, die Diagnose, Prognose und Nachsorge von KRK veröffentlicht (Sun et al., 2020). Die German Epigenomics AG entwickelte den Echtzeit-PCR-basierten, in-vitro-diagnostischen (IVD) Bluttest Epi proColon® für die Messung der Methylierung von *SEPT9* in ccfDNA des Blutplasmas als Hinweis für das Vorliegen eines KRK und erhielt im Jahr 2011 die CE-Kennzeichnung (Epigenomics AG, Berlin, 2020), sowie 2016 die Zulassung von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) (Epigenomics AG, Berlin, 2016 und 2020). Die Epigenomics AG gibt bei der aktuellen 2. Testgeneration Epi proColon® 2.0 CE für die Detektion von KRK eine Sensitivität von 81 % und eine Spezifität von 97 % an (Epigenomics AG, Berlin, 2022). Positive Testergebnisse wurden auch bei Schwangeren und Patienten mit chronischer Gastritis, Ösophagitis, nicht-rheumatoider Arthritis sowie Bronchial-, Mamma-, oder Prostatakarzinomen beobachtet, sodass eine ärztliche Interpretation des Tests empfohlen wird (Epigenomics AG, Berlin, 2022). Wie bereits erwähnt, haben Semaan et al. (2016) in Gewebeproben von

gesunder Kolorektalmukosa, verschiedenen Adenomen und KRK einen signifikanten Anstieg der *SEPT9*-Methylierung mit zunehmender Malignität nachgewiesen. Bergheim, Semaan und Kollegen konnten hierauf aufbauend im Jahr 2018 anhand von *^mSEPT9* Messungen in ccfDNA in Blutplasmen eine deutliche Assoziation der prätherapeutischen *^mSEPT9* Level mit den UICC-Stadien und darüber hinaus auch differenzierte *^mSEPT9* Anstiege mit steigender T-, N-, und M-Kategorie, histologischem Grading, der Lymphgefäßinvasion und dem extrakapsulärem Tumorwachstum im Lymphknoten zeigen. Zudem konnten Mikrofernmetastasen detektiert werden, welche in der radiologischen Bildgebung verborgen blieben (Bergheim et al., 2018). Somit gilt *^mSEPT9* als potenter Biomarker im Screening, in der Diagnosestellung des KRK und durch die hohe Korrelation mit dem UICC-Stadium auch als nützlicher Prognosemarker (Bergheim et al., 2018).

Die Leistungsfähigkeit von Methylierungsbiomarkern hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie beispielsweise der Probenqualität, dem Patientenalter, den Komorbiditäten und, da die ccfDNA-Spiegel im Blut auch einer zirkadianen Rhythmik unterliegen, auch vom Zeitpunkt der Blutprobenentnahme (Bergheim et al., 2018). Weiterhin verlangen der Anstieg freier DNA in den Blutprobenröhrchen durch Leukozytolyse und die kurze Halbwertszeit der ccfDNA in vitro eine rasche Prozessierung des Blutes (de Vos et al., 2017, Bergheim et al., 2018). Die Festlegung von Schwellenwerten (Cut-offs) sind notwendig, da eine geringe *SEPT9*-Methylierung auch sporadisch in Blutplasmen von gesunden Patienten auftritt (de Vos et al., 2017). De Vos et al. untersuchten verschiedene PCR-Analysemethoden zur Bestimmung der Methylierungsspiegel von *SEPT9* in ccfDNA. Verglichen wurden hierbei quantitative Analysen mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode mit einer quasi-digitale Auswertung der positiven PCR-Replikate. Hierbei zeigte sich, dass die Unterschiede in Sensitivität und Spezifität nur marginal waren (de Vos et al., 2017). In den meisten *^mSEPT9* KRK-Studien wird die quasi-digitale PCR-Methode mit drei PCR-Replikaten genutzt (Triplex-Assay), wobei die Untersuchungsprobe in drei Echtzeit-PCR-Reaktionen aufgeteilt wird und *^mSEPT9* DNA in einer, zwei oder allen drei Reaktionen nachgewiesen werden kann (de Vos et al., 2017). De Vos und Kollegen bestätigten die Zunahme der Testsensitivität durch die Nutzung von sechs anstatt drei Replikaten, bei nur geringer Abnahme der Spezifität. Die Interpretation der Schwellenwerte und die Testmethode können also einen erheblichen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit von *^mSEPT9* ausüben (de Vos et al., 2017, Semaan et al., 2016).

1.2 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit zielte zum einen auf einen Vergleich der diagnostischen Leistungsfähigkeit von iFOBT und *mSEPT9* hinsichtlich der akkuraten Diagnose von KRK. Zum anderen zielte die Arbeit auf der Entwicklung eines kombinierten iFOBT- und *mSEPT9*-Tests, der die Vorteile der beiden Einzeltest verbinden und so die Sensitivität und die Spezifität der Einzeltest erhöhen kann. Hierfür zielte die Arbeit auf die Entwicklung eines Algorithmus, mittels dessen eine Kombination der numerischen iFOBT- und *mSEPT9*-Testergebnisse bei optimaler diagnostischer Leistungsfähigkeit möglich ist. Zur Erreichung dieser Ziele sollten Patienten mit KRK prospektiv eingeschlossen werden und Blutplasmen sowie Stuhlproben gewonnen und hinsichtlich okkulten Hämoglobins bzw. *mSEPT9* analysiert werden. Als Kontrollgruppe sollten Probanden ohne Nachweis einer malignen Erkrankung und mit vergleichbarem Risikoprofil (Alter, Geschlecht) rekrutiert werden. Der so etablierte Algorithmus zur kombinierten Auswertung der iFOBT- und *mSEPT9*-Tests könnte zukünftig die Basis für eine prospektive Validierungsstudie bilden.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie wurden zwei Patientengruppen, bestehend aus $n = 100$ KRK-Patienten und $n = 100$ Kontrollpersonen, gebildet. Die KRK-Patienten wurden in den Jahren 2016 bis 2020 rekrutiert. Der histologische Nachweis eines Adenokarzinoms erfolgte präoperativ anhand koloskopisch entnommener Biopsien und postoperativ anhand der Operationspräparate. Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen vor der Vorstellung bereits ein wesentlicher Teil des Karzinoms in der Koloskopie entfernt wurde, Patienten mit synchronem Karzinom einer anderen Dignität, sowie jene, bei denen innerhalb von fünf Jahren vor Studieneinschluss eine weitere maligne Erkrankung diagnostiziert wurde. Ausgeschlossen wurden zudem Patienten mit einem innerhalb der letzten 10 Jahre aufgetretenem Prostata- bzw. Mamma-Karzinom. Die Kontrollgruppe

umfasste Patienten ohne maligne Erkrankung und gesunde Probanden mit vergleichbarem Risikoprofil hinsichtlich Alter, Geschlecht, Nikotin- und Alkoholkonsum. Ein diagnostischer Ausschluss eines KRK erfolgte nicht. Insgesamt wurden Teilnehmer mit zeitgleich bestehendem Blutungsnachweis im Nasopharynxbereich und Gastrointestinaltrakt, sowie entzündlichen Darmerkrankungen nicht eingeschlossen. Alle Patienten wurden in den viszeralchirurgischen Abteilungen der Betriebsstätten St. Marien und St. Josef der GFO-Kliniken Bonn, sowie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie und der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Uniklinik Bonn behandelt. Für die Studienteilnahme spendeten alle Teilnehmer eine Blut- und Stuhlprobe. Zuvor erfolgten jeweils eine umfassende Aufklärung über Ziel und Zweck der Studie, die Analyse und Aufbewahrung der Proben und Daten, sowie die schriftliche Einwilligungserklärung. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Uniklinik Bonn und der Ärztekammer Nordrhein genehmigt (Ethikvotum Lfd. Nr. 115/16 und Lfd. Nr. 2020406). Eine Übersicht des Arbeitsablaufes ist Abb. 6 zu entnehmen.

Die im Folgenden angewendeten Methoden und Materialien sind lediglich für Forschungszwecke geeignet und entsprechen nicht der Verordnung über In-vitro-Diagnostika (IVDR).

2.2 Immunologische Bestimmung okkulten Bluts im Stuhl

Für die Bestimmung der Konzentration okkulten Blutes in den Stuhlproben erfolgte ein immunologischer Nachweis von Hämoglobin. Der Stuhl wurde vor der Therapie mittels OC-Sensor Testkit (Eiken Chemical CO., LTD., Tokyo, Japan) entsprechend der Herstelleranleitung gewonnen und im Probenröhrchen in dem vorliegenden Stabilisierungspuffer aufgenommen. Die Probe wurde anschließend für maximal vier Wochen bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die immunologische Bestimmung des Hämoglobins wurde durch das Labor Bioscientia Healthcare GmbH (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden keinerlei Patientendaten übermittelt. Die Konzentration des Hämoglobins in der Stuhlprobe wurde in ng/ml im Stabilisierungspuffer angegeben. Messwerte geringer als 50 (< 50) ng/ml oder größer als 1.000 (>1.000) ng/ml wurden nicht weiter quantifiziert. Um unsere Ergebnisse standardisierter vergleichen zu können, rechneten wir die Einheit nach der von Fraser et al. (2012) empfohlenen Formel in µg Hämoglobin / g Fäces um:

$$\mu\text{gHämoglobin/gFäces} = \frac{\text{ngHämoglobin/ml Pufferlösung} \times \text{ml Pufferlösung}}{\text{gesammeltem g Fäces}}$$

Gemäß den Angaben des Herstellers ist das OC-Sensor-Probenröhrchen so konstruiert, dass von der Stuhlprobenmenge genau 10 mg Fäces in 2 ml Pufferlösung untersucht werden (Eiken Chemical Co, LTD, Tokyo, Japan). Die neuen Ergebnisse variierten zwischen < 10 und > 200 µg / g Fäces. Basierend auf den Ergebnissen in der Literatur zählten wir ein iFOBT-Ergebnis als positiv, wenn mehr als 10 µg Hämoglobin / g Fäces gemessen wurden (Westwood et al., 2017).

2.3 DNA-Methylierungsanalytik zellfreier zirkulierender DNA

Der sensitive, semiquantitative Nachweis methylierter *SEPT9* DNA-Kopien im Blut erfolgte mittels quasi-digitaler Echtzeit-PCR. Diese ist definiert als die Anzahl der PCR-Replikate, die eine positive Amplifikation zeigten. Jede Plasmaprobe wurde sechs PCR-Replikationen unterzogen. Somit ergab sich als quasi-digitales Ergebnis ein Wert zwischen 0 und 6 für jede Patientenprobe. Zunächst wurde das Blut zentrifugiert und so das Blutplasma gewonnen. Anschließend wurde die ccfDNA aus dem Plasma durch Zugabe von Silika-Magnetpartikeln extrahiert und mit Ammoniumbisulfit konvertiert. Mittels Bisulfit werden alle Cytosine der DNA in Uracile umgewandelt, während methylierte Cytosine unverändert bleiben (Dietrich, 2014). Dadurch lässt sich im Anschluss an die Bisulfit-Konversion die DNA-Methylierung per methylierungsspezifischer PCR analysieren. Die Bisulfit umgewandelte DNA wurde ebenfalls mittels Silika-Magnetpartikel aufgereinigt. Die Schritte der Plasma-Präparation, DNA-Extraktion, Bisulfit-Konversion und Aufreinigung, sowie der quasi-digitalen Echtzeit-PCR sind im Folgenden beschrieben.

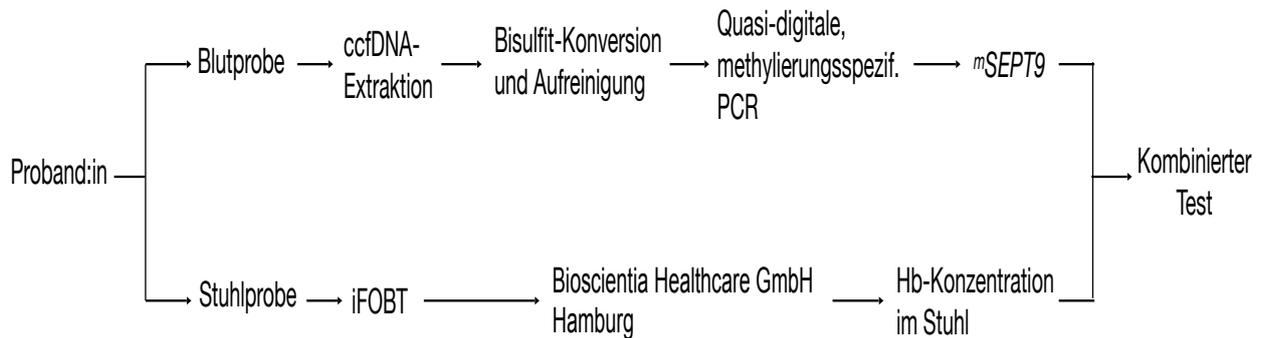


Abb. 6: Übersicht des Arbeitsablaufes.

2.3.1 Plasma-Präparation

Die Blutprobengewinnung erfolgte in zwei 9 ml EDTA S-Monovetten® K3 (Sarstedt AG & Co., Nuembrecht, Deutschland) im Rahmen klinisch indizierter Blutentnahmen als Mehrentnahme vor Therapiebeginn. Die Plasma-Präparation erfolgte innerhalb von sechs Stunden nach Blutentnahme – so lange wurden die Proben im Kühlschrank gelagert. Die Blutprobenröhrchen wurden für 6 min bei 1.350 g in einer Plasma-zentrifuge (CompactStar CS4; VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma mittels einer 4,6 ml Transferpipette (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) überführt. Das Plasma einer teilnehmenden Person wurde hierbei aus den zwei S-Monovetten® zusammengeführt und dann in einer Zentrifuge mit freischwingendem Rotor (Hettich Rotanda; Hettich GmbH, Kirchenlengern, Deutschland) bei 3.000 g für 6 min erneut zentrifugiert. Hiernach wurden von dem Plasma vorsichtig 3 ml in ein neues 15 ml Zentrifugationsröhrchen übertragen, wobei ein Aufwirbeln des Pellets vermieden wurde. Das restliche Plasma wurde in Aliquots à 1,5 ml in Kryoröhrchen (CryoPure; Sarstedt AG&Co. KG, Nuembrecht, Deutschland) verteilt und als Rückstellprobe eingefroren. Alle Plasmaproben wurden bis zur weiteren Analyse zunächst für maximal 4 Wochen bei -20 °C und bei längerer Lagerung bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Bisulfit-Konversion und Aufreinigung zellfreier zirkulierender DNA

Die gefrorenen Plasmaproben wurden 45 min bei 37 °C im forced convection VENTI-Line® (VWR International, Radnor, PA, USA) inkubiert. Dann erfolgte die Extraktion der ccfDNA aus dem Plasma. Hierzu wurden direkt 3 ml Silane Lyse-/Bindepuffer (viral NA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zu dem Plasma gegeben, gründlich vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 2,2 ml Ethanol (99,8 %, Molekularbiologie-Grad, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 65 µl Magnetpartikel (Silane Dynabeads® MyOne™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zugegeben. Hierbei wurde drauf geachtet, dass unmittelbar vorab die Magnetpartikel gründlich gemischt wurden (VWR Mini Star Silverline, VWR International), damit diese nicht sedimentieren. Das Gemisch wurde nun für 45 min bei Raumtemperatur und 20 rpm in einem SB3-Rotator (Stuart Equipment, Staffordshire, UK) gemischt und inkubiert. Im Anschluss wurde das 15 ml Zentrifugationsröhrchen mit dem Extraktionsgemisch in einen DynaMag™ -15 Magneten (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) überführt und dort für 5 min inkubiert, sodass alle Magnetpartikel sich am Magneten angesammelt hatten. Mittels einer Transferpipette (4,6 ml, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) wurde nun die Flüssigkeit entfernt und verworfen, ohne dabei die an den Magneten gebundenen Partikel zu irritieren. Daraufhin wurden 1,5 ml Waschpuffer I (50 % (v/v) Silane Lyse-/Bindepuffer, 50 % (v/v) Ethanol 99,8 %, Molekularbiologie-Grad) zu den Magnetpartikeln in dem 15 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben, das Röhrchen vom Magneten entfernt, die Magnetpartikel in dem Waschpuffer I resuspendiert und die Suspension mit einer 5,5 ml Transferpipette (VWR International) in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Das Zweite Reaktionsgefäß wurde kurz in einer Rotilabo® Mini Zentrifuge (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) zentrifugiert und dann in einem DynaMag™ -2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 3 min lang bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich wieder alle Magnetpartikel am Magneten gesammelt hatten. Die transparente Flüssigkeit wurde nun vorsichtig mit einer 100-1.000 µl Pipette abgenommen und verworfen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass kein Restvolumen in dem Reaktionsgefäß verblieb, welches zu einem Übertrag von Verunreinigungen hätte führen können. Das Reaktionsgefäß wurde aus dem Magneten genommen und die Magnetpartikel kurz mittels einer Tischzentrifuge (Carl Roth GmbH,

Karlsruhe, Germany) herunter zentrifugiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß wieder in den Magneten gegeben und restliches Volumen der Flüssigkeit sorgfältig abgenommen und verworfen. Nun wurden 100 µl Elutionspuffer (1 % (v/v) 1M Tris, pH = 8,0, 99 % (v/v) Wasser) hinzugegeben, das Reaktionsgefäß aus dem Magneten genommen und die Magnetpartikel / Elutionspuffer-Suspension gründlich gemischt und für 10 min bei 85 °C und 1.000 rpm im Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß wieder in den DynaMag™-2 Magneten gestellt, dort für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann das Eluat in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Bisulfitumwandlung wurde direkt in dem 2 ml Reaktionsgefäß mit dem DNA-Eluat durchgeführt. Hierzu wurden 150 µl Ammoniumbisulfit (70 %, pH = 5,3, TIB Chemicals, Mannheim, Germany) und 25 µl Denaturierungspuffer (70 mg/ml Trolox in Tetrahydrofurfuryl-Alkohol (THFA, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben und das Gemisch gründlich mit dem Vortex (VWR Mini Star Silverline, VWR International, PA, USA) vermengt. Das Gemisch wurde kurz in einer Tischzentrifuge (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) zentrifugiert, um eine Tröpfchenbildung im Deckel des Reaktionsgefäßes zu vermeiden. Anschließend wurde das Gemisch für 45 min bei 85 °C im Wasserbad (Mettler GmbH, Freiburg, Deutschland) inkubiert.

Um die Bisulfit-Konversion zu stoppen wurden 1.000 µl Waschpuffer I und 15 µl Dynabeads® Magnetpartikel hinzugefügt, kurz gemischt und zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte eine 45-minütige Inkubation und 1.000 rpm bei Raumtemperatur. Hiernach folgten insgesamt vier Waschungen: Die Proben wurden erst gemischt, zentrifugiert und dann im DynaMag™-2 für 2 min inkubiert. Die Lösung wurde mittels 100-1.000 µl Pipette verworfen und dann erneut der Waschpuffer hinzugefügt. Die Proben wurden gemischt, zentrifugiert und nochmals im DynaMag™-2 inkubiert. Es wurden die Waschpuffer-Lösungen I und II (15 % (v/v) Wasser, 85 % (v/v) Ethanol 99,8 %) verwendet. Das Protokoll lautete: Runde 1: 800 µl Waschpuffer I; Runde 2: 800 µl Waschpuffer II; Runde 3: 900 µl Waschpuffer II; Runde 4: 1.000 µl Waschpuffer II. Nach der vierten Runde wurde der Überstand verworfen und die Magnetpartikel herunter zentrifugiert. Die Proben wurden erneut für 2 min im DynaMag™-2 inkubiert. Mit einer 2,5 - 10 µl Pipette wurden verbliebene Überstände verworfen. Anschließend wurden die Proben mit geöffnetem Deckel für 10 min bei 60 °C im

Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Für die DNA-Auswaschung wurden 65 µl Elutionspuffer zu den getrockneten Magnetpartikeln hinzugegeben. Das Gemisch wurde vermengt und für 10 min bei 85 °C und 1.000 rpm im Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Zuletzt erfolgten die Zentrifugierung und Inkubation der Proben im DynaMag™ -2 für 2 min. Das Eluat war nun für die PCR vorbereitet.

2.3.3 Herstellung einer Positivkontrolle

Die Qualität der quasi-digitalen Real-Time PCR wurde anhand einer Positivkontrolle überprüft. Die Positivkontrolle bestand aus Bisulfit konvertierter, künstlich durch *M.SssI* Methyltransferase methylierter DNA aus peripheren Blutleukozyten (CpGenome™ Universal Methylated DNA, Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Für die Erzielung eines hohen Reinheitsgrads wurde die DNA nach Bisulfitkonversion mittels Ultrafiltration aufgereinigt. Diese künstlich methylierte DNA dient für das Echtzeit-PCR-*ACTB*-Assay sowie das methylierungsspezifische Echtzeit-PCR Assay für *mSEPT9* als Positivkontrolle. Insgesamt 2 µg künstlich methylierter DNA wurden in die Bisulfit-Reaktion eingesetzt. Hierzu wurde die DNA in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und mit Wasser (Molekularbiologie-Grad, W4502-1L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) auf ein Volumen von 160 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 160 µl Ammoniumbisulfit (70 %, pH 5,3, TIB Chemicals Mannheim, Deutschland) und 80 µl Denaturierungspuffer (70 mg/ml Trolox (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in THFA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)) hinzugegeben, gründlich mit dem Vortex (VWR Mini Star Silverline, VWR International, PA, USA) gemischt und kurz mit einer Tischzentrifuge (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) zentrifugiert, um eine Tröpfchenbildung im Deckel des Reaktionsgefäß zu vermeiden. Das Bisulfit-Reaktionsgemisch wurde dann für 45 min bei 85 °C und 1.000 rpm im Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Unmittelbar nach dieser Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl Natronlauge (NaOH, 1M, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) gestoppt. Nach gründlicher Mischung und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit der Ultrafiltration begonnen. Hierzu wurde die erste Hälfte des Reaktionsgemisches in das Probenreservoir eines Nanosep Filters (10K, OD010C34, Pall Corporation, NY, Port

Washington, USA) überführt, ohne dabei die Filtermembran mit der Pipettenspitze zu berühren und dadurch zu perforieren. Anschließend wurde der Filter für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5425; Eppendorf AG, Hamburg Deutschland) und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die zweite Hälfte des Bisulfit-Reaktionsgemisches in das Probenreservoir des Filters gegeben, erneut zentrifugiert und der Durchfluss ebenfalls verworfen. Nun wurden 400 µl Wasser (Molekularbiologie-Grad, W4502-1L, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) auf die Filtermembran gegeben und der Filter erneut für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5425; Eppendorf AG, Hamburg Deutschland). Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Dieser Waschschrift wurde daraufhin zweimal wiederholt, bevor die aufgereinigte DNA von der Filtermembran eluiert wurde. Hierzu wurden 50 µl auf 50°C vorgewärmten Wassers (Molekularbiologie-Grad, W4502-1L, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in das Probenreservoir des Filters pipettiert und für 10 min bei 1.000 rpm und 50°C im Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Das Eluat wurde dann vorsichtig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Die Elution wurde dann mit weiteren 50 µl vorgewärmtem Wasser wiederholt und das Eluat ebenfalls in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte per UV-Spektrophotometrie unter Verwendung eines Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, USA). Da Bisulfit-DNA vorrangig in Einzelsträngen vorliegt, wurde der Faktor 33 für die Berechnung der DNA-Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm verwendet. Anschließend wurde die DNA-Konzentration auf 20 ng/µl eingestellt. Hierfür wurde die Menge zur Verdünnung benötigten Wassers anhand folgender Formel berechnet:

$$\left(\frac{\text{DNA Konzentration}}{20} - 1 \right) \times \text{DNA Volumen}$$

2.3.4 Echtzeit-PCR-Analyse

In einer quantitativen PCR (qPCR) wurde in Form einer Triplex über ein methylierungsunspezifisches Assay die Gesamt-DNA und über ein methylierungsspezifisches Assay die am *SEPT9* Genlokus methylierte DNA amplifiziert. Hierfür wurden eine MicroAmp® Fast optical 96-well Reaktionsplatte (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und das

Applied Biosystem® 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) genutzt. Es galten die Temperatureinstellungen: 20 min bei 95 °C, gefolgt von 50 Zyklen mit 2 s bei 62 °C, 45 s bei 56 °C (jeweils bei 100 % Heizrate), und 15 s bei 95 °C (jeweils bei 75 % Heizrate). Die PCR zur Bestimmung der Gesamt-DNA umfasste einen Vorwärts- und einen Rückwärtsprimer sowie eine Sonde, die einen Abschnitt des Housekeeping-Gen β -Aktin (*ACTB*) amplifizierten und detektierten. Housekeeping-Gene sind für alle Zellen essentiell und werden daher ubiquitär synthetisiert und konstant im Körper exprimiert (Eisenberg und Levanon, 2013). Das *ACTB* Gen enthält keine Cytosine und wurde damit unabhängig von dem Methylierungszustand der DNA amplifiziert. Die spezifische Amplifikation methylierter *SEPT9* Genkopien erfolgte mittels eines Blockeroligonukleotids, welches an Bisulfit-konvertierter, unmethylierter DNA bindet und mit der Primerbindesequenz des Rückwärtsprimers überlappte, sodass der Rückwärtsprimer nicht an unmethylierte Templat-DNA binden konnte. Die Primer selbst sind methylierungsunspezifisch und binden sowohl Bisulfit-umgewandelte methylierte als auch unmethylierte DNA. Die Sonde des methylierungsspezifischen *SEPT9* Assays bindet spezifisch an eine Sequenz, die CpGs enthält, wodurch die Sonde methylierungsspezifisch nur das Vorliegen methylierter DNA-Kopien nachweist. Bisulfit-DNA aus jeder Plasma-Probe wurde in sechs PCR-Replikaten mit jeweils 10 μ l eluierter Bisulfit-konvertierter DNA überführt. Insgesamt wurden damit 60 μ l Bisulfit-DNA pro Probe analysiert, was dem Gesamtvolumen der generierten Bisulfit-DNA pro Probe entspricht. Die Validität jedes PCR-Laufs wurde mittels einer Positivkontrolle getestet. Als Positivkontrolle wurde je 3 ng Bisulfit-konvertierte künstlich methylierte DNA in Triplikat-Messung eingesetzt. Ein Lauf galt als valide, wenn sowohl *ACTB* als auch *SEPT9* in allen drei Reaktionen der Positivkontrolle eine Amplifikation zeigten. Die Schwellenwertlinie (Baseline) wurde für alle Amplifikationskurven auf 3 - 24 festgelegt. Die Schwellenwerte (Thresholds) für *SEPT9* wurde bei 0,01 und für *ACTB* bei 0,02 gewählt. Als Negativkontrolle wurde 10 μ l Wasser eingesetzt. Der PCR-Lauf galt als valide, wenn die Negativkontrolle keine PCR-Amplifikation zeigte. Die Validität einer Patientenprobe wurde anhand der *ACTB* Amplifikation bewertet. Eine Probenmessung galt als valide, wenn alle sechs PCR-Replikate eine Amplifikation des *ACTB* Assays mit $C_T < 31,5$ aufwiesen. Als C_T -Wert (Cycle Threshold, Zyklusschwellenwert) wird die Anzahl der PCR-Zyklen bezeichnet, die benötigt werden, um das Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA erstmals zu detektieren. Je mehr DNA in der Probe vor der PCR

schon vorhanden war, desto weniger Amplifikationszyklen sind nötig, um den Schwellenwert zu erreichen. Der C_T -Wert ist also antiproportional zur Menge des eingesetzten Templats, sodass dieses über den C_T -Wert berechnet werden kann. Für *mSEPT9* galt der $C_T < 40$. Invalide Probenmessungen wurden einmalig wiederholt. Bei wiederholter invalider Messung galt die Probe als invalide. Die methylierungsspezifische Echtzeit-PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt: Pro Replikat wurden 10 μ l ausgelöste Bisulfit-DNA und 10 μ l Mastermix (Tab. 2) aufgetragen. Das Triplex beinhaltete ebenfalls eine Analyse des Short Stature Homeobox 2 Gens (*SHOX2*). In vorherigen Arbeiten wurde allerdings gezeigt, dass die Methylierung von *SHOX2* weniger gut als Biomarker für das KRK geeignet ist als die von *SEPT9* (Bergheim et al., 2018; Semaan et al., 2016), sodass die Ergebnisse in unserer Studie nicht mit ausgewertet wurden. Die Zusammensetzung der PCR sowie die PCR-Bedingungen sind im Folgenden beschrieben.

2.3.4.1 *ACTB/SHOX2/SEPT9*-Assay

In einem Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurden 1,5 ml vorgewärmtes Dimethylsulfoxid (DMSO (40°C, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) zu 25 mg 5(6)-Carboxy-X-rhodamine (ROX, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hinzugefügt und für 20 Sekunden gevortext. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Lösung im Thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 99°C für vier Stunden bei 1.400 rpm. Dann wurde die Lösung für 10 min bei 20.000 g zentrifugiert (Mikrozentrifuge 5425; Eppendorf AG, Hamburg Deutschland) und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Hierbei wurde beachtet, die verbliebenden ROX-Kristalle nicht zu berühren. Die optische Dichte der ROX-Lösung wurde auf 580nm = 1.74 eingestellt. Der Oligonucleotid-Mix wurde vorbereitet und beinhaltete alle benötigten Primer, Blocker, Oligonukleotide und Proben für die simultane Quantifizierung der Referenz- und Ziel-Gene. Der Mix enthielt jedes Oligonucleotid in einer vierfach höheren Konzentration, als in der PCR-Reaktion benötigt. Ein exemplarischer Oligonukleotid-Mix für die simultane Quantifizierung von *ACTB*, *SHOX2* und *SEPT9* wurde folgendermaßen entworfen: 1.6 μ M von jeweils *SHOX2*- und *SEPT9*-Primern, 3 μ M der *SHOX2*- und *SEPT9*-Blocker-Oligonukleotide und entsprechend 1.2 μ M der *SHOX2*-

und *SEPT9*-Sonden, 0.3 μM der *ACTB*-Primer und 0.04 μM der *ACTB*-Sonde. Die Primer-DNA-Sequenzen sind in Tab. 3 aufgeführt.

2.3.4.2 Der qPCR-Mastermix

Der qPCR Mastermix wurde zweifach konzentriert angesetzt und beinhaltete 70 mM Tris-HCl pH = 8,4, 12 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 8 % Glycerol, 0,5 mM von jedem Desoxynucleosidtriphosphat (dNTP) (wie in Tab. 2 zusammengefasst), 2 U FastStart Taq DNA Polymerase und 0,006 μl ROX Lösung in einem Volumen von 10 μl . 5 μl der jeweiligen Oligonucleotide und 10 μl qPCR Mastermix wurden anschließend zu 5 μl der Probenlösung hinzugegeben. Die PCR erfolgte nach folgendem Zyklusprotokoll: 20 min bei 95 °C und 50 Zyklen mit 2 sec bei 62°C, 45 s bei 56°C (jeweils bei einer 100 % Heizrate) und 15 s bei 95 °C (bei einer 75 % Heizrate). Die Daten wurden während der Elongations-Phase erhoben (45 s bei 56°C).

Tab. 2: Zusammensetzung von 10 µl Mastermix.

| Inhaltsstoff | Volumen, Mengen bzw. Endkonzentrationen |
|--|---|
| 1M Tris pH 8,4 | 35 mM, pH 8,4 |
| MgCl ₂ , 1M | 4,5 mM |
| KCl, 3M | 49,5 mM |
| Glycerol | 0,80 µl |
| ROX-Lösung | 0,0012 µl |
| <i>SHOX2</i> -MSP-F | 400 nM |
| <i>SHOX2</i> -R | 400 nM |
| <i>SHOX2</i> -RB | 750 nM |
| <i>SHOX2</i> -P | 300 nM |
| <i>SEPT9</i> -F | 400 nM |
| <i>SEPT9</i> -R | 400 nM |
| <i>SEPT9</i> -B | 750 nM |
| <i>SEPT9</i> -P | 300 nM |
| <i>ACTB</i> -F | 75 nM |
| <i>ACTB</i> -R | 75 nM |
| <i>ACTB</i> -P | 100 nM |
| dNTP/dUTP-Mix | 250 µM |
| HotStart <i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl). | 2 U |

Tab. 3: Beschreibung der Primer-DNA-Sequenzen.

| Primer | DNA-Sequenz |
|------------------------------------|--|
| ACTB - vorwärts (ACTB-F) | 5'-gtgatggaggagggttagtaagtt-3' |
| ACTB - rückwärts (ACTB-R) | 5'-ccaataaaacctactcctccctaa-3' |
| ACTB - Sonde (ACTB-P) | 5'-ATTO647N-accaccaccaacacacaataacaaacaca-BHQ-2-3' |
| SEPT9 - vorwärts (SEPT9-F) | 5'-aaataatcccatccaacta-3' |
| SEPT9 - rückwärts (SEPT9-R) | 5'-gttgtttattagttattatgt-3' |
| SEPT9 - Blocker (SEPT9-B) | 5'-gttattatgttgattttgtggttaatgtgtag-SpacerC3-3' |
| SEPT9 - Sonde (SEPT9-P) | 5'-JOE-ttaaccgcgaaatccgac-BHQ-1-3' |
| SHOX2 - vorwärts (SHOX2-F) | 5'-taaccgcactaaacgacga-3' |
| SHOX2 - rückwärts (SHOX2-R) | 5'-gtttttggatagtaggtaat-3' |
| SHOX2 - Blocker (SHOX2-B) | 5'-taattttgtttgtttgtttgattggggtgtatga-SpacerC3-3' |
| SHOX2 - Sonde (SHOX2-P) | 5'-6-FAM-ctcgtacgaccccgatcg-BBQ650-3' |

2.4 Statistik

Die Verwaltung und Bearbeitung der Daten erfolgten über das Programm Microsoft EXCEL Version 2010 für Windows. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics, Version 27 für Windows durchgeführt. Die Leistungsfähigkeit des Tests wurde anhand von Sensitivität und Spezifität bestimmt. Die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität erfolgte mittels Schwellenwerten, anhand derer eine Patientenprobe als positiv bzw. als negativ gewertet wurde. Die Wahl dieser Schwellenwerte ist im Ergebnisteil beschrieben. Die Sensitivität und Spezifität wurden nach den folgenden Formeln bestimmt:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Richtig Positive}}{\text{Richtig Positive} + \text{Falsch Negative}}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Richtig Negative}}{\text{Richtig Negative} + \text{Falsch Positive}}$$

Die Genauigkeit des Tests wurde anhand einer Receiver Operating Characteristic (ROC) Analyse bestimmt und in Form der Area Under the Curve (AUC) berichtet. Als Referenz wurde eine AUC = 1,0 als ideale Testperformance und eine AUC = 0,5 als ungeeignete Testperformance gewertet. Die AUC wurde inklusive 95 % Konfidenzintervalle (95 % KI) dargestellt. Die Übereinstimmung des iFOBT- und des *mSEPT9*-Tests wurden mittels Cohens κ bestimmt. *P*-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Die für diese Studie prospektiv erstellte KRK-Kohorte für den Vergleich der iFOBT-*mSEPT9*-Tests bzw. die Entwicklung eines kombinierten *mSEPT9*/iFOBT-Tests bestand aus $n = 49$ Frauen und $n = 51$ Männern, welche zwischen 2016 und 2020 eingeschlossen wurden. Die Anzahl der KRK-Patienten in den einzelnen UICC-Stadien betrug $n = 23$ UICC Stadium I, $n = 37$ UICC Stadium II, $n = 24$ UICC Stadium III und $n = 16$ UICC Stadium IV. Als Kontrollgruppe wurden ebenfalls $n = 100$ Probanden eingeschlossen, für die kein Verdacht auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung bestand, welche jedoch nach Risikoprofil passend ausgewählt wurden. Das Durchschnittsalter der KRK-Patienten betrug 69 und der Kontrollpatienten 68 Jahre.

3.2 Klinische Leistungsfähigkeit des *mSEPT9*-Tests

Die qPCR zur Bestimmung der Konzentration von *mSEPT9* wurde quasi-digital ausgewertet, was bedeutet, dass die Anzahl positiver PCR-Reaktionen ausgezählt wurde. Pro Patientenprobe wurden sechs PCR-Reaktionen durchgeführt, von denen die Reaktion mit detektierter Amplifikationskurve als positiv galt. Folglich konnten für eine Probe sieben ordinale Zustände (0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 positive Reaktionen) entsprechend dem Konzept einer quasi-digitalen qPCR erreicht werden. In Tab. 4 ist die klinische Leistungsfähigkeit von *mSEPT9* zur Detektion von KRK in Abhängigkeit verschiedener Schwellenwerte zur Kategorisierung einer Plasmaprobe als positiv aufgelistet. Bei dem Vorliegen von mindestens einem positiven PCR-Replikat zeigten sich für $n = 78$ von $n = 100$ KRK-Patienten

(RP: 78, FN: 22) und $n = 25$ von $n = 100$ Kontrollpersonen ein positives Testergebnis. Daraus ergibt sich für diesen Schwellenwert (≥ 1) eine Sensitivität von 78 % und eine Spezifität von 75 %. Mit Erhöhung des Schwellenwerts steigt die Spezifität bei abnehmender Sensitivität. Bei einem Schwellenwert von ≥ 4 positiven PCR-Reaktionen erreicht die Spezifität mit 100 % ihr Maximum. Die Schwellenwert-unabhängige Bestimmung der klinischen Leistungsfähigkeit mittels ROC ergab eine AUC von 0,82 (95 % KI: 0,76 – 0,88) und ist in Abb. 7 dargestellt.

Tab. 4: Klinische Leistungsfähigkeit des Tests auf Septin 9 - Genmethylierung (*^mSEPT9*) bei der Detektion von kolorektalen Karzinomen (KRK) in einer Fall-Kontrollstudie mit $n = 100$ KRK-Patienten und $n = 100$ Kontrollprobanden.

| Anzahl positiver qPCR-Reaktionen | Klinische Leistungsfähigkeit | |
|----------------------------------|------------------------------|----------------|
| | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
| ≥ 0 | 100 | 0 |
| ≥ 1 | 78 | 75 |
| ≥ 2 | 59 | 90 |
| ≥ 3 | 47 | 97 |
| ≥ 4 | 39 | 100 |
| ≥ 5 | 33 | 100 |
| ≥ 6 | 31 | 100 |

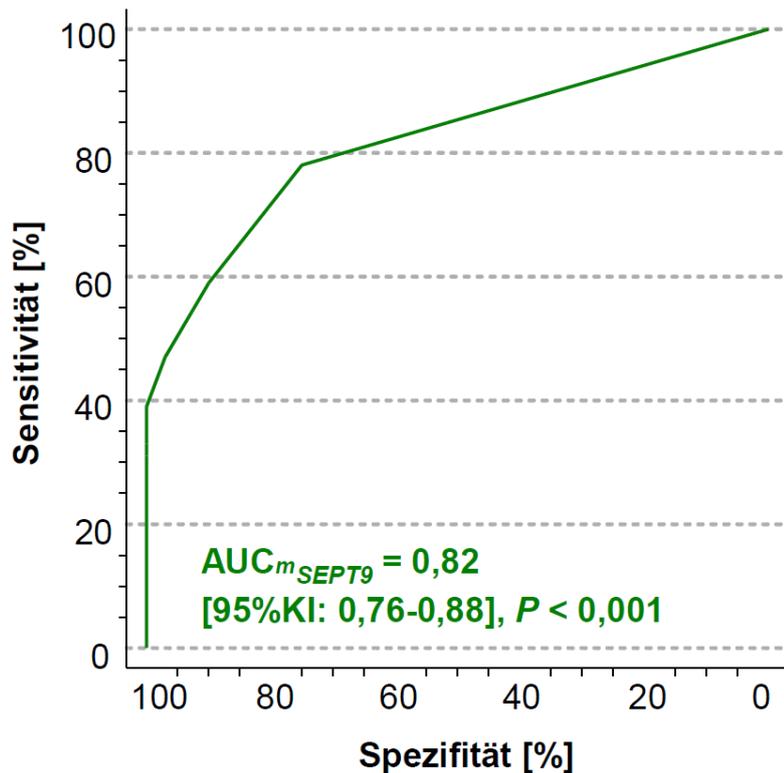


Abb. 7: Receiver Operating Characteristics (ROC) -Analyse mit resultierender Area under the Curve (AUC) des quasi-digitalen Tests auf Septin 9 - Genmethylierung ($mSEPT9$) zur Detektion von kolorektalen Karzinomen (KRK) in einer Fall-Kontroll-Studie mit $n = 100$ KRK-Patienten und $n = 100$ Kontrollprobanden.

3.3 Klinische Leistungsfähigkeit des iFOBT-Tests

Für die Beurteilung des iFOBT-Tests wurde ein Schwellenwert von $10 \mu\text{g}$ Hämoglobin / g Fäces (bzw. $\geq 10,1 \mu\text{g}$ Hämoglobin / g Fäces) angenommen (Westwood et al., 2017). Stuhlproben, die $>10 \mu\text{g}$ Hämoglobin / g Fäces aufwiesen, wurden als positiv bewertet. Der iFOBT-Test identifizierte $n = 85$ von $n = 100$ KRK-Patienten bei einem Schwellenwert von $>10 \mu\text{g}$ Hämoglobin / g Fäces korrekt (richtig positiv (RP): 85). $n = 15$ KRK-Patienten wiesen fälschlicherweise ein negatives Ergebnis von $\leq 10 \mu\text{g}$ Hämoglobin / g Fäces auf und waren daher falsch negativ (FN). Daraus ergibt sich eine Sensitivität des iFOBT-Tests von 85 %. Bei $n = 78$ der $n = 100$ Kontrollprobanden war das iFOBT-Testergebnis bei Verwendung des oben genannten Schwellenwertes richtig negativ (RN) und bei $n = 12$ Probanden falsch positiv (FP), woraus sich eine Spezifität von 78 % für den iFOBT-Test bei dem gegebenen Schwellenwert ergibt.

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte im Bereich zwischen 10 und 200 µg Hämoglobin / g Fäces quantitativ, während Werte außerhalb dieses dynamischen Messbereiches qualitativ als ≤ 10 bzw. ≥ 200 berichtet wurden. Die Spezifität des iFOBT-Tests nimmt bei höherem Schwellenwert zu, während die Sensitivität abnimmt (Hol et al., 2009). Abb. 8 zeigt die Schwellenwert-unabhängige Bestimmung der klinischen Leistungsfähigkeit mittels der ROC-Analyse mit einer AUC von 0,88 (95 % KI: 0,83 - 0,93, $P < 0,001$).

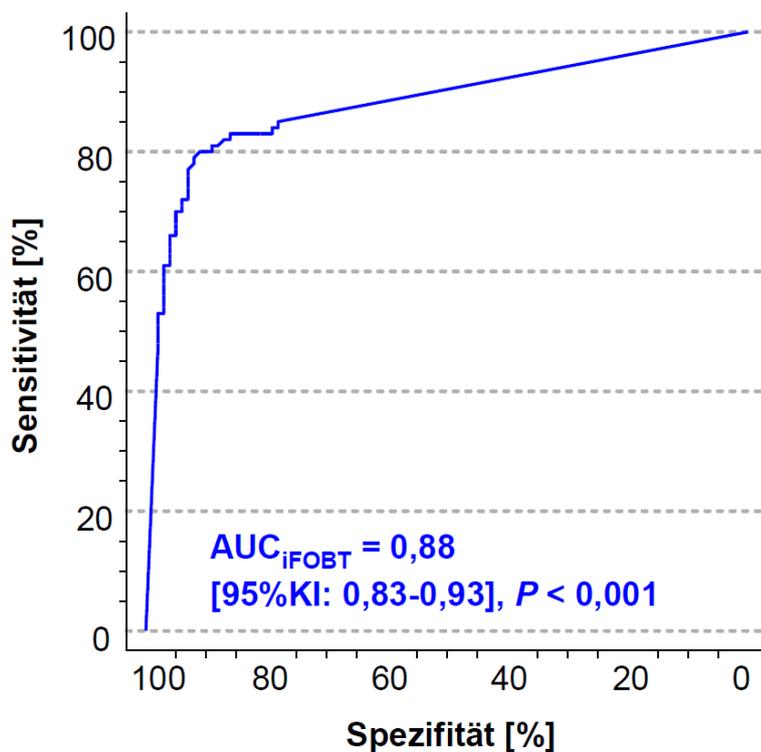


Abb. 8: Receiver Operating Characteristics (ROC)-Analyse mit resultierender Area under the Curve (AUC) der quantitativen Ergebnisse des immunologischen fäkalen Okkultbluttest (iFOBT) zur Detektion von kolorektalen Karzinomen (KRK) in einer Fall-Kontroll-Studie mit $n = 100$ KRK-Patienten und $n = 100$ Kontrollprobanden.

3.4 Interassay-Übereinstimmung

Um die Übereinstimmung der Resultate des iFOBT- und des $mSEPT9$ -Tests miteinander vergleichen zu können, wurde im nächsten Schritt die anhand der Schwellenwerte

dichotomisierten (iFOBT >10 µg Hämoglobin / g Fäces und *mSEPT9* ≥ 1 positive PCR-Reaktionen) Testergebnisse verglichen. Von den n = 100 KRK-Blutproben waren n = 69 bzw. n = 6 für beide Tests übereinstimmend positiv bzw. negativ. Auf der anderen Seite waren n = 16 KRK-Patientenproben nicht-übereinstimmend für iFOBT positiv und für *mSEPT9* negativ bzw. n = 9 für iFOBT negativ und für *mSEPT9* positiv. Die Übereinstimmung wurde mittels des Cohens κ bestimmt und ergab mit $\kappa = 0,178$ nur eine leichte Übereinstimmung, die statistisch auch nur einen Trend aufwies ($P = 0,068$). Von den n = 100 Kontrollprobanden waren n = 61 bzw. n = 8 für beide Tests übereinstimmend negativ bzw. positiv. Proben von n = 14 Kontrollprobanden waren diskordant für iFOBT positiv und für *mSEPT9* negativ bzw. von n = 17 Proben iFOBT negativ und für *mSEPT9* positiv. Dies ergab eine ebenfalls schwache Konkordanz ($\kappa = 0,139$), die ebenfalls nicht signifikant war ($P = 0,163$). Aus dieser Beobachtung ließ sich ableiten, dass beide Tests teilweise unabhängige Informationen lieferten und eine Kombination beider Tests der klinischen Leistungsfähigkeit der beiden einzelnen Tests überlegen sein könnte.

3.5 Inkrementierung des iFOBT-Tests

Um die Ergebnisse der iFOBT- und *mSEPT9*-Tests miteinander zu kombinieren, mussten die Werte miteinander verrechnet werden. Durch die quasi-digitale Auswertung der qPCR ergaben sich bereits natürlicherweise sieben ordinale Zustände. Um die iFOBT - und *mSEPT9* -Testergebnisse gleichgewichtet miteinander verrechnen zu können, wurden die iFOBT- Ergebnisse ebenfalls in sieben Inkremente aufgeteilt. Diese Aufteilung erfolgte empirisch, wobei darauf gezielt wurde, dass kein Verlust der klinischen Leistungsfähigkeit (bestimmt über die ROC-Analyse, siehe Abb. 9) auftrat. Es ergab sich der Faktor von 1,65 für die inkrementale Zunahme als besonders günstig. Entsprechend ergaben sich die in Tab. 5 erfassten Inkremente, welche im weiteren ordinal verwendet wurden.

Tab. 5: Die Einteilung der Ergebnisse des immunologischen fäkalen Okkultbluttest (iFOBT) in Inkremente.

| (μg Hämoglobin/g Fäces) | iFOBT-Inkrement |
|-------------------------------------|-----------------|
| ≤ 10 | 0 |
| 10,1-17 | 1 |
| 17,1-27 | 2 |
| 27,1-45 | 3 |
| 45,1-74 | 4 |
| 74,1-122 | 5 |
| $\geq 122,1$ | 6 |

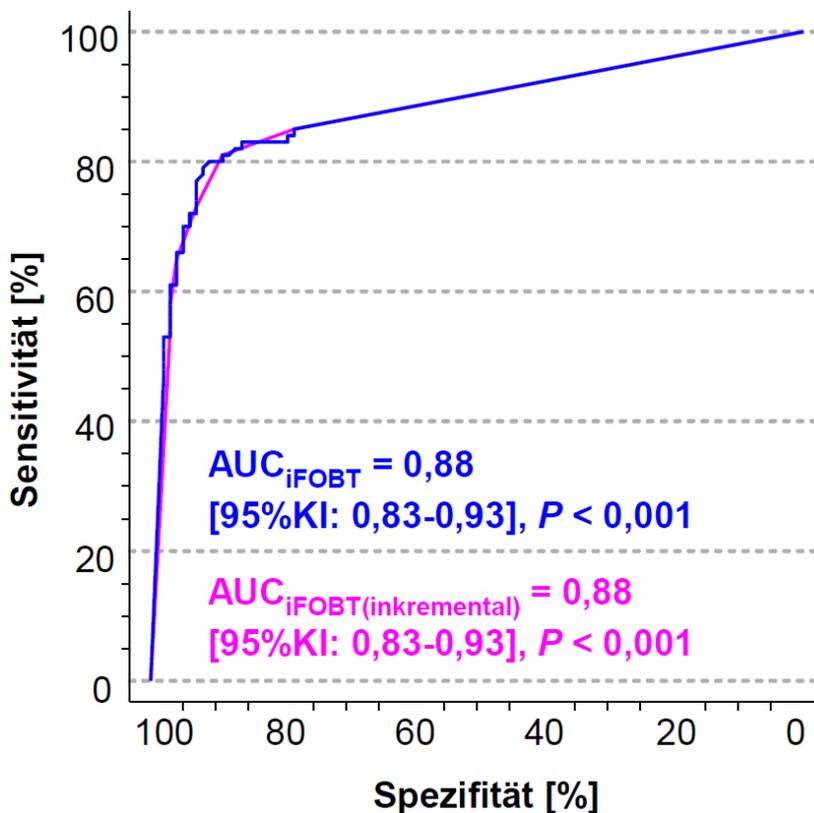


Abb. 9: Vergleichende Receiver Operating Characteristics (ROC) -Analyse mit resultierender Area under the Curve (AUC) des quantitativen immunologischen fäkalen Okkultbluttest (iFOBT)-Ergebnisses (quantitativ (wie Abbildung 8) und ordinal inkremental) zur Detektion von kolorektalen Karzinomen (KRK) in einer Fall-Kontroll-Studie mit $n = 100$ KRK-Patienten und $n = 100$ Kontrollprobanden.

3.6 Klinische Leistungsfähigkeit des iFOBT/^mSEPT9-Kombinationstests

Für den iFOBT/^mSEPT9-Kombinationstest wurden die Anzahl der positiven PCR-Reaktionen mit den iFOBT-Inkrementen addiert, sodass sich ein Wert zwischen 0 und 14 ergab. Der kombinierte Test zeigte eine AUC = 0,92 (95 % KI 0,88 - 0,96), $P < 0,001$, abgebildet in Abb. 10. Die Kombination beider Tests erreichte ein besseres Ergebnis als die einzelnen Tests (Abb. 7 und 8). Mit einem Schwellenwert von ≥ 1 zeigte der kombinierte Test eine Sensitivität von 94 % und Spezifität von 61 %. Mit einem Schwellenwert von ≥ 4 wurde eine Sensitivität von 75 % und Spezifität von 94 % erreicht. Die jeweiligen Ergebnisse unter Verwendung möglicher anderen Schwellenwerte ist in Tab. 6 aufgelistet.

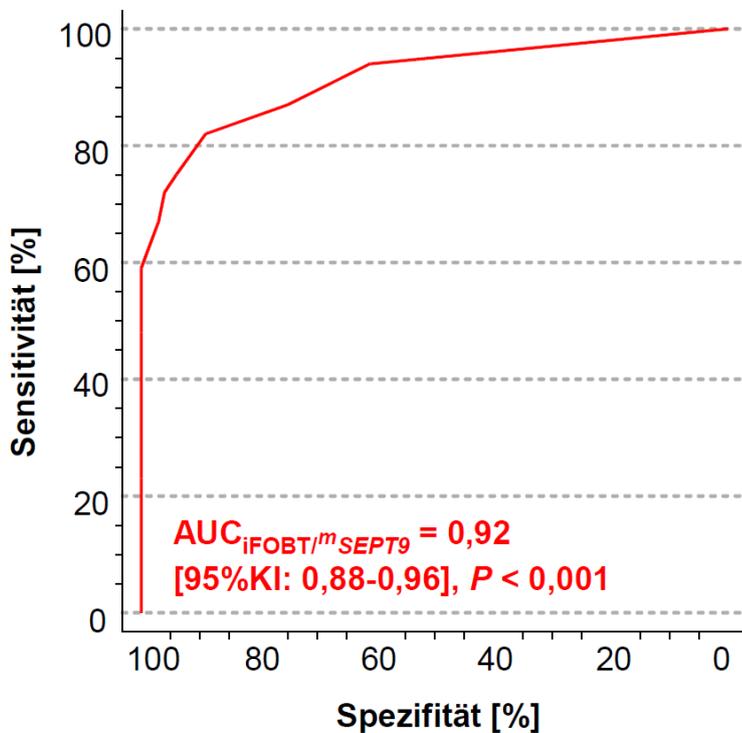


Abb. 10: Receiver Operating Characteristics (ROC) -Analyse mit resultierender Area under the Curve (AUC) des kombinierten Tests aus quantitativem immunologischem fäkalem Okkultbluttest (iFOBT) und Test auf Septin 9 - Genmethylierung (^mSEPT9) zur Detektion von kolorektalen Karzinomen (KRK) in einer Fall-Kontroll-Studie mit $n = 100$ KRK-Patienten und $n = 100$ Kontrollprobanden.

Tab. 6: Sensitivität und Spezifität des kombinierten Tests aus quantitativem immunologischem fäkalem Okkultbluttest (iFOBT) und Test auf Septin 9 - Genmethylierung (*mSEPT9*) in Abhängigkeit der Schwellenwerte anhand derer die Klassifikation als Test-positive bzw. Test-negative Probe durchgeführt wurde.

| Ordinale iFOBT/ <i>mSEPT9</i> Ergebnis | Klinische Leistungsfähigkeit | |
|---|------------------------------|-----------------|
| | Sensitivität (%) | Spezifität (%) |
| ≥ 0 | 100 | 0 |
| ≥ 1 | 94 | 61 |
| ≥ 2 | 87 | 75 |
| ≥ 3 | 82 | 89 |
| ≥ 4 | 75 | 94 |
| ≥ 5 | 72 | 96 |
| ≥ 6 | 67 | 97 |
| ≥ 7 | 59 | 100 |
| ≥ 8 | 48 | 100 |
| ≥ 9 | 37 | 100 |
| ≥ 10 | 32 | 100 |
| ≥ 11 | 27 | 100 |
| ≥ 12 | 23 | 100 |
| ≥ 13 | 0 | 100 |
| = 14 | 0 | 100 |

3.7 Stadien-abhängige klinische Leistungsfähigkeit

Im Rahmen einer erfolgreichen Screenigmaßnahme ist insbesondere die Diagnose von KRK in frühen Stadien relevant. Tab. 7 zeigt die Stadien-abhängigen Sensitivitäten des *mSEPT9*-Tests, des iFOBT-Tests und des *mSEPT9*/iFOBT-Tests. Für letzteren wurden exemplarisch die Sensitivitäten für drei verschiedene Schwellenwerte (≥ 7 , ≥ 4 und ≥ 2) dargestellt, welche zu einer Spezifität von 100 %, 94 % bzw. 75 % führten. Bei einer Spezifität von 75 % konnten so beispielsweise 65 % bzw. 83 % der Stadien I bzw. II Tumoren richtig diagnostiziert werden.

Tab. 7: Stadien-abhängige klinische Leistungsfähigkeiten des Tests auf Septin 9 - Genmethylierung (*mSEPT9*) (Schwellenwert ≥ 1 positive PCR-Reaktionen), des quantitativen immunologischen fäkalen Okkultbluttest (iFOBT) (Schwellenwert $> 10 \mu\text{g}$ Hämoglobin / g Fäces) und des kombinierten *mSEPT9*/iFOBT-Tests (für drei exemplarische Schwellenwerte: ≥ 7 , ≥ 4 und ≥ 2).

| Stadium | <i>mSEPT9</i> (≥ 1 ; 75 % Spezifität) | iFOBT ($>10\mu\text{g/g}$; 78 % Spezifität) | <i>mSEPT9</i> /iFOBT (≥ 7 ; 100 % Spezifität) | <i>mSEPT9</i> /iFOBT (≥ 4 ; 94 % Spezifität) | <i>mSEPT9</i> /iFOBT (≥ 2 ; 75 % Spezifität) |
|---------|---|---|---|--|--|
| IV | 100 % (16/16) | 88 % (14/16) | 88 % (14/16) | 100 % (16/16) | 100 % (16/16) |
| III | 67 % (16/24) | 79 % (19/24) | 50 % (12/24) | 71 % (17/24) | 88 % (21/24) |
| II | 84 % (31/37) | 97 % (36/37) | 68 % (25/37) | 78 % (29/37) | 83 % (35/37) |
| I | 65 % (15/23) | 70 % (16/23) | 35 % (8/23) | 57 % (13/23) | 65 % (15/23) |

4. Diskussion

Das seit dem Jahr 2003 etablierte KRK-Screening mittels Koloskopie hat zu einem deutlichen Rückgang der KRK-Inzidenz geführt (Zeidler et al. 2019). Allerdings könnte diese noch weiter gesenkt werden, wenn die Teilnahme-Compliance und Test-Effizienz verbessert würden.

Laut Roth et al. ergab eine Umfrage von mehr als 200.000 US-Amerikanern im Jahr 2012, dass lediglich ein Anteil von 65 % der Erwachsenen im Alter von 50 bis 75 Jahren ein Leitlinien-konformes KRK-Screening erhielt (Roth et al., 2019). Auch Potter und Kollegen beschrieben, dass einer von drei Erwachsenen nicht an einem KRK-Screening teilnahm (Potter et al., 2016). Globale Screening-Raten sind teilweise noch geringer: In China wurde die Teilnahmerate an der Vorsorgekoloskopie auf $< 3 \%$ geschätzt (Wu et al., 2016). Die Koloskopie wird von einem Großteil der Bevölkerung aufgrund des Aufwandes und der unkomfortablen Darmreinigung, aus Angst vor einer Darmkrebsdiagnose oder vor der Prozedur einer Darmspiegelung an sich, aus Scham und mancherorts auch aufgrund von schlechter medizinischer Infrastruktur abgelehnt (Adler et al., 2014). In einigen Ländern, wie beispielsweise Alaska, ist die Endoskopie gar nicht flächendeckend verfügbar (Siegel et al., 2020). Die Komplikationsrate der Koloskopie ist mit unter einem Prozent

sehr gering (Zwink et al., 2017), jedoch ist eine Nachblutung potenziell lebensbedrohlich; ebenso eine iatrogene Kolonperforation, die in der Regel einer Notoperation bedarf.

Ergänzende nicht-invasive Früherkennungsmethoden, welche flächendeckend kostengünstig zugänglich und leicht durchführbar sind, werden dringend benötigt, um Individuen, die eine Koloskopie verweigern oder keinen, beziehungsweise einen erschwerten Zugang zur Koloskopie haben zu screenen.

Adler und Kollegen belegten eine Verbesserung der KRK-Screeningteilnahmerate durch das Angebot von Blut- und Stuhl- basierter Diagnostik für Koloskopieverweigernde in Deutschland: 172 Personen ohne Risikofaktoren oder Symptome für ein KRK zwischen 50 und 75 Jahren wurden während einer regulären ärztlichen Konsultation eine Vorsorgekoloskopie empfohlen. Auch nach entsprechender Aufklärung über die jeweilige Testperformance akzeptierten nur 36,6 % der Probanden eine Koloskopie. Von den 63,4 % der Koloskopie-Ablehnenden wählten 82 % einen *mSEPT9* Bluttest, 14,7 % einen Stuhltest und 2,8 % lehnten das Screening vollständig ab. Der primäre Grund, einen nicht-invasiven Test zu wählen, war die einfache Durchführbarkeit. Der Vorzug des Bluttests gegenüber dem Stuhltest wurde in erster Linie durch den Komfort einer Blutabnahme durch den Hausarzt begründet (Adler et al., 2014).

Jacobs und Pox berichteten, dass mehr als 70 % der Vorsorgekoloskopien einen unauffälligen Befund zeigen (Jacobs und Pox, 2019). Wie bereits erwähnt, schließt das Darmkrebs-Screening in Deutschland Männer ab einem Alter von 50 Jahren und Frauen von 55 Jahren ein. Individuen mit anderen Risikofaktoren für die Entwicklung eines KRK werden nicht systematisch erfasst und daher nicht in das Screeningprogramm aufgenommen (Jacobs und Pox, 2019), was den bereits genannten Anstieg der KRK-Inzidenz in der Altersgruppe 20 bis 39 Jahren bei sinkender Inzidenz bei Personen über 55 Jahren möglicherweise erklärt.

Prädispositions- und frühdiagnostische Biomarker aus Blut und Stuhl können eine optimierte Auswahl der Screening-Population ermöglichen, zu einer effizienteren Nutzung der endoskopischen Ressourcen führen, unnötige Darmspiegelungen vermeiden und gleichzeitig die Akzeptanz der Prävention steigern. Im Hinblick auf die zunehmende

durchschnittliche Lebenserwartung wird die Notwendigkeit der Anpassung der Screening-Gruppe noch deutlicher.

Die aktuelle vom deutschen gemeinsamen Bundesausschuss empfohlene und von den Krankenkassen finanzierte Testalternative zur Koloskopie ist eine Untersuchung des Stuhls auf okkultes Blut mittels iFOBT-Test. Problematisch bei Hämoglobin-nachweisenden Stuhltests ist jedoch einerseits, dass nicht alle KRK oder Vorläuferläsionen bluten und somit unerkant bleiben (Ahlquist et al., 2000). Andererseits gibt es diverse andere Ursachen von Hämoglobin im Stuhl, wie zum Beispiel eine obere gastrointestinale Blutung, blutende Divertikel, Hämorrhoiden und die akute Analfissur, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können (de Klerk et al. 2018) und folglich zu einer unnötigen Koloskopie (Ahlquist et al., 2000).

In den USA und China ist der *mSEPT9*-Test als Früherkennungstest zugelassen (deVos und Molnar, 2017). In den letzten Jahren haben Verbesserungen des Testdesigns zu einem suffizienten Anstieg von Sensitivität und Spezifität geführt, sodass der Rahmen für die Einführung in das Screening-Programm erfüllt ist: Die Centers for Medicare & Medicaid Services ist verantwortlich für die Generierung U.S- amerikanischer Gesundheitsleitlinien und fordert für blut-basierte Biomarkertests in der KRK-Vorsorge eine Test-Sensitivität von mindestens 74 % und eine Spezifität von 90 % im Vergleich zur Koloskopie (Centers for Medicare and Medicaid Services, 2021). Wie bereits erwähnt, gibt der Hersteller des Epi proColon® 2.0 für die Detektion von KRK eine 81 %-ige Sensitivität und 97 %-ige Spezifität an (Epigenomics AG, 2020). Das Studienkollektiv bestand aus n = 149 prospektiv gesammelten Proben von Screening-Patienten ohne Krankheitssymptome und ohne koloskopischen Befund sowie einer Fall-Kontroll-Studie, bestehend aus 98 Darmkrebspatienten und 99 Studienteilnehmern ohne bestätigte Darmkrebsdiagnose (Epigenomics AG, 2020). Ein von Wu et al. vorgestelltes äquivalentes *mSEPT9* Assay zeigte in einer großen chinesischen Screening-Kohorte mit 1.031 Teilnehmern eine Testsensitivität von 76.6 % und Spezifität von 95.9 % für KRK (Wu et al., 2016).

Mit unserem *mSEPT9*-Assay erzielten wir bei einem Schwellenwert von ≥ 1 eine Sensitivität von 78 % und Spezifität von 75 % für die Detektion von KRK. Der OC-Sensor iFOBT erwies in unserer Studie eine Sensitivität von 85 % und Spezifität von 78 %. Die bessere

klinische Leistungsfähigkeit des iFOBT-Tests im Vergleich zu der des *mSEPT9*-Tests, wurde auch von Church et al., sowie Johnson et al. beschrieben (Church et al., 2014; Johnson et al., 2014). Wir stellten heraus, dass die Testperformance sowohl des *mSEPT9*-Tests als auch des iFOBT-Tests bereits durch die Kombination beider Tests in einem entsprechenden Algorithmus deutlich angehoben werden kann: Die AUC des kombinierten Tests (0,92) übertraf die AUC des jeweiligen Einzeltests, iFOBT (0,88) und *mSEPT9* (0,82). Darüber hinaus würde der kombinierte Test mit einem Schwellenwert von ≥ 4 (Sensitivität: 75 %, Spezifität: 94 %) die geforderten Rahmenbedingungen für ein KRK-Screening erfüllen und die geforderte Spezifität um 4 %-Punkte übertreffen. Diese auf den ersten Blick nur gering höhere Spezifität würde in einer asymptomatischen Screening-Population zu einer drastischen Reduktion der FP-Testresultate sowie einem hohen negativ prädiktiven Wert (NPW) führen und damit ein Screening signifikant verbessern.

Neben der Spezifität ist das wichtigste Charakteristikum eines Screening-Tests eine hohe Sensitivität, da allem voran das Vorhandensein einer Krankheit verlässlich angezeigt werden sollte. Unser kombinierter Test erlaubte bei einem Schwellenwert von ≥ 1 (Sensitivität: 94 %, Spezifität 61 %) eine nahezu 100 %-ige Detektion von KRK im Stadium II. In diesem Stadium liegen noch keine Lymphknotenmetastasen vor und die Heilungschancen sind gut.

Die American Cancer Society erwartet im Jahr 2023 153.020 neu diagnostizierte KRK-Fälle (American Cancer Society Inc., 2023). Nimmt man ein ideales Szenario an, in welchem alle Patienten das KRK-Screening-Angebot nutzten, würde der kombinierte *mSEPT9*/iFOBT-Kombinationstest 143.839 Patienten identifizieren. Im Vergleich würde der iFOBT-Test allein nur 130.067 und der *mSEPT9*-Test allein nur 119.356 KRK-Fälle erkennen. Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten in einer größeren Validierungskohorte in weiteren Studien überprüft werden.

Jedes positive Ergebnis unseres kombinierten *mSEPT9*/iFOBT-Tests sollte durch eine Koloskopie korreliert werden und gilt daher als Ergänzung für das Screening. Da die Methylierung von *SEPT9* ein frühes Ereignis in der KRK-Karzinogenese ist, können auch Vorläuferläsionen zu einem positiven Testergebnis führen (Semaan et al., 2016) und die Krebserkrankung verhindert werden. In einer US-amerikanischen Studie zur Überprüfung

der Akzeptanz für den Epi proColon Bluttest wurde gezeigt, dass 67 % der Probanden mit einem positiven Testergebnis eine Koloskopie durchführen ließen und bei 59 % von jenen fanden sich Schleimhautläsionen, welche histologischer Abklärung bedurften (deVos und Molnar, 2017). In der Literatur wird die Situation, in der eine nach positivem *mSEPT9-Test* durchgeführte Koloskopie unauffällig verbleibt als problematisch angesehen, da die Konsequenz bislang unklar ist (Jakobs und Pox, 2019). *mSEPT9* kann auch bei anderen Karzinomentitäten in Blutplasmen erhöht gemessen werden (de Vos et al., 2020)., sodass dann eine weitere Tumorsuche angeschlossen werden müsste. Hierfür ist noch die Definition eines genauen Konzepts erforderlich. Dieser Aspekt beleuchtet jedoch auch einen Vorteil des *mSEPT9/iFOBT-Tests*, da bei positivem Testergebnis und gleichzeitiger negativer Koloskopie auch weitere okkulte Tumoren gefunden werden können. Insbesondere wenn das Testergebnis aufgeschlüsselt und *mSEPT9* und iFOBT getrennt betrachtet würden, könnte bei einem negativen iFOBT- und positiven *mSEPT9-Testergebnis* ein starkes Indiz für das Vorliegen einer anderen okkulten malignen Erkrankung gegeben sein. Anhand von Risikoprofilen können Patienten systematisch weiter untersucht werden. De Vos et al. wiesen (2020) in Geweben verschiedener Tumoren eine hohe *SEPT9*-Methylierung nach; insbesondere (mit einer AUC > 0,9) bei KRK, Urothelkarzinomen der Harnblase, Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Halsregion (HNSCC), Prostatakarzinomen und Ösophaguskarzinomen (de Vos et al., 2020). Beispielsweise könnte bei einem Patienten mit hohem Alkohol- und Nikotinkonsum, positivem *mSEPT9-Test*, negativem iFOBT-Test und negativer Koloskopie zunächst nach einem HNSCC gesucht werden, da diese häufig zu einem positivem *mSEPT9-Test* führen (Schröck et al., 2017). Dies müsste in weiteren Studien gezeigt werden.

Ein weiterer Vorteil unseres Tests ist das semiquantitative Ergebnis mit Werten zwischen 0 und 14, wonach bei der Auswertung entsprechend die Sensitivität und die Spezifität für das jeweilige individuelle Testergebnis berücksichtigt werden kann.

Die Qualität einer Koloskopie hängt in hohem Maße von der Expertise der untersuchenden Person ab, sodass bereits Qualitätsmarker, wie die Adenom-Detektionsrate, die Zökum-Intubationsrate und Rückzugszeit etabliert und eine eigene S2K-Leitlinie von der DGVS „Qualitätsanforderungen der gastrointestinalen Endoskopie“ verfasst wurden. Manche Vorläuferläsionen, wie die sessilen serratierten Adenome, sind sehr schlecht von

der gesunden Mukosa abzugrenzen und können leicht übersehen werden (Tannapfel et al., 2010; De Palma et al., 2019). Ein KRK, das innerhalb kurzer Zeit nach einer unauffälligen Koloskopie detektiert wird, bezeichnet man als Intervallkarzinom (Pabby et al., 2003). In verschiedenen Studien wurde das Auftreten solcher Intervallkarzinome untersucht und Raten zwischen 0,04 % und 6 % angegeben (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). In einer von García-Boruell et al. durchgeführten großen Studie zwischen den Jahren 1997 und 2014 zeigte sich in einem Zeitraum von zehn Jahren nach erfolgter Koloskopie eine Intervallkarzinomsrate von 6,7 % (García-Boruell et al., 2018). Unser Kombinationstest könnte die Screening-Sicherheit während des 10 Jahres Intervalls zwischen den empfohlenen Vorsorgekoloskopien deutlich erhöhen.

Eine Limitierung dieser Studie ist das Design als Fall-Kontroll-Studie. In einer echten Screening-Population, welche sich regelmäßigen Screens unterzieht, ist eine Verschiebung hin zu frühen Tumorstadien zu erwarten. Da die Sensitivität des *mSEPT9/iFOBT*-Tests für Tumoren niedriger Stadien geringer ist, ist die hier berichtete Sensitivität für alle Stadien wahrscheinlich überschätzt. Hier könnte eine regelmäßige Durchführung des Tests in engen Zeitintervallen Abhilfe schaffen. Auf der anderen Seite liegt das mediane Alter der Tumorpatienten einer Screening-Population über dem medianen Alter der gesamten Screening-Population, da die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer malignen Darmerkrankung mit zunehmendem Alter steigt. Da die Methylierung im Blutplasma altersabhängig ist (Jung et al., 2012) ist die hier berichtete Spezifität aufgrund der Altersanpassung der Kontrollgruppe an die KRK-Gruppe voraussichtlich unterschätzt. Eine weitere Unterschätzung der Spezifität des *mSEPT9/iFOBT*-Tests könnte daher rühren, dass die Kontrollgruppe in dieser Studie nicht koloskopisch als tumorfrei verifiziert wurden, so dass bei n = 100 eingeschlossenen Kontrollprobanden mit dem vorliegenden Risikoprofil durchaus Kontrollpatienten mit einem okkulten Tumorgeschehen fälschlicherweise mit eingeschlossen sein könnten.

Des Weiteren war eine der Basisideen, dass *mSEPT9* die Hauptschwäche des iFOBT abdeckt und die nicht-blutenden Tumoren detektiert. Allerdings haben 22 % der Karzinome unserer Studie keine *SEPT9* Promotormethylierung gezeigt. DNA-basierte Stuhltests können diesbezüglich eine Lösung darstellen: Durch Abschilferung gelangen Kolon- bzw. Tumorepithelzellen in den Stuhl und mittels DNA-Amplifikation können bereits

kleinste Mengen auf aberrante genetische Muster untersucht werden (Ahlquist et al., 2000). In der bereits erwähnten Studie von Imperiale et al. wurde ein Vergleich zwischen einem iFOBT und einem Multitarget-Stuhl-DNA-Test (mtSDNA) vorgenommen: Der mtSDNA erzielte im Hinblick auf die Testsensitivität in allen Untersuchungen bessere (92,3 % vs. 73,8 % für KRK, 69,2 % vs. 46,2 % für Polypen mit hochgradigen Dysplasien) und bezüglich der Testspezifität weniger gute (86,6 % vs. 94,9 % für den Ausschluss von KRK, 89,8 % vs. 96,4 % für den Ausschluss von KRK und Vorläuferläsionen) Ergebnisse als der iFOBT (Imperiale et al., 2014). Als Referenzuntersuchung diente die Koloskopie. Auch Berger und Kollegen beschrieben eine bessere Testsensitivität des mtSDNA im Vergleich zum iFOBT, insbesondere bei der Detektion von frühen KRK-Stadien und fortgeschrittenen und nicht-fortgeschrittenen Adenomen (Berger et al., 2016). Der mtSDNA wurde in den USA durch die FDA zugelassen und wird von der United States Preventive Services Task Force (USPSTF) seit dem Jahr 2015 als Screening-Tool alle drei Jahre empfohlen (Berger et al., 2016; USPSTF, 2021). Der Test hat auch die CE-Kennzeichnung erhalten, ist in Europa jedoch nicht breit verfügbar (Berger et al., 2016). Laut der Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019 werden die DNA-Stuhltests angesichts hoher Kosten und aufwendiger Testdurchführung sowie unter Berücksichtigung der Studienergebnisse noch nicht in der Darmkrebsfrüherkennung empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Aus dem Literaturverzeichnis der Leitlinie geht jedoch hervor, dass sich die Autoren auf die von Imperiale et al. im Jahr 2004 durchgeführte Studie bezogen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019), in welcher die Testperformance eines fäkalen DNA-Test mit der eines gFOBT verglichen wurde und eine deutlich schlechtere Sensitivität von 51,6 % für den Nachweis von KRK zeigte (Imperiale et al., 2004). Das Testpanel in der Studie 2004 untersuchte Loci von *KRAS*, *APC* und *TP53* sowie der repetitiven BAT-26 Sequenz (Imperiale et al., 2004); das Testpanel 2014 beinhaltete *KRAS*, *ACTB*, aberrant methylierte Promotoreregionen von *BMP3* und *NDRG4* und ein immunhistochemisches Assay für Hämoglobin (Imperiale et al., 2014).

Es gilt bereits seit einigen Jahren die breite Annahme, dass die Testperformance von *mSEPT9* durch Kombination mit weiteren DNA-Mutationsanalysen noch weiter gesteigert werden kann. Um einen bestmöglichen Bluttest zu entwickeln, wäre die Entwicklung eines Testpanels ideal, in welchem die häufigsten KRK-Mutationen, wie beispielsweise das

TP53, *BRAF* und *KRAS* in ccfDNA nachgewiesen werden können. Methylierungs- und Mutationsanalysen können in einer Single-Tube-Reaktion getestet werden und eine Next-Generation-Sequenzierung kann nach Bisulfit-Konversion erfolgen. mtSNDA-Tests sind bereits mit solchen breit aufgestellten Testpanels ausgestattet. Es ist zu erwarten, dass die Kosten für solche Analysen in den nächsten Jahren weiter fallen und zum Standard in der täglichen Diagnostik werden. Die Kombination von *mSEPT9* und einem kommerziellen iFOBT beläuft sich derzeit auf etwa 155€ pro Patient (ISG Intermed Service GmbH & Co, 2023; MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund, 2022) und ist daher relativ kostengünstig. Wu et al. haben zudem eine weitere Steigerung der KRK-Detektionsrate durch zusätzliche Kombination des *mSEPT9* und iFOBT mit dem Plasmabiomarker CEA gezeigt. Die weitere Untersuchung von potenziellen Biomarker-Kombinationen wird die Entwicklung von nicht-invasiven Screening-Tests für das KRK vorantreiben und eine individualisierte und risiko-adaptierte Vorsorgestruktur erschaffen, die in der Bevölkerung auf breite Akzeptanz stoßen wird.

Neben dem Nutzen für die Früherkennung von KRK, bietet *mSEPT9* großes Potenzial in der Entwicklung eines molekularen Stagings (Bergheim et al., 2019). Die aktuell genutzte TNM-Klassifizierung ist unzureichend für Aussagen bezüglich der Prognose und die klinische Therapieentscheidung, insbesondere für die mittleren Stadien. Es werden dringend prognostische und prädiktive Biomarker benötigt, welche solche Patienten selektieren, welche eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv und frühes Versterben aufweisen und solche Patienten, welche wahrhaftig von einer Chemo- oder Immuntherapie profitieren würden. Hierdurch könnte die Prognoseabschätzung verbessert und eine unnötige therapeutische Toxizität vermieden werden.

5. Zusammenfassung

Darmkrebs ist ein signifikantes Gesundheitsproblem, welches durch Screening-Programme deutlich vermindert werden kann. Die Koloskopie ist der aktuelle Goldstandard, wird allerdings von einem Großteil der Bevölkerung nicht angenommen. Es werden dringend weitere nicht-invasive, individualisierte und risikoadaptierte sowie leicht zugängliche Screeningmethoden benötigt.

Aktuell wird bei Verweigerung einer Koloskopie die Stuhluntersuchung auf okkultes Hämoglobin mittels immunologischem fäkalem Okkultbluttest (iFOBT) empfohlen. Der Epi proColon[®] Bluttest weist Tumor-DNA im Blut anhand aberranter Methylierung des Septin 9-Genlokus (^mSEPT9) nach und ist seit einigen Jahren für das Darmkrebsscreening zugelassen. Ein direkter Vergleich der diagnostischen Leistungsfähigkeit von immunologischem fäkalem Okkultbluttest und der Methylierung des Septin-9-Gens in derselben Patientenkohorte wurde bisher nicht durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Proben-typen (Stuhl versus Blut) und Analyten (Hämoglobin versus DNA-Methylierung) könnte eine geeignete Kombination beider Testverfahren dazu die jeweiligen diagnostischen Leistungsfähigkeiten der Einzeltest übertreffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden $n = 100$ Patienten mit kolorektalem Karzinom eingeschlossen, welche Stuhl- und Blutproben für die Studie zur Verfügung stellten. Als Vergleich wurden weitere $n = 100$ Probanden ohne maligne Erkrankungen aber vergleichbarem Risikoprofil eingeschlossen. Die Bestimmung der Septin-9-Genmethylierung der zirkulierenden zellfreien DNA im Blutplasma erfolgte mittels einer an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Bonn etablierten quasi-digitalen Echtzeit-PCR. Das Hämoglobin im Stuhl wurde mit dem fäkal-immunohistochemischen „OC-Sensor“-Test (Eiken Chemical Co, Ltd., Japan) durch das Labor Dr. von Foreich GmbH als Service bestimmt. Die diagnostische Leistungsfähigkeit wurde anhand der Receiver Operating Characteristics (ROC)-Kurve und der resultierenden Area Under the Curve (AUC) beschrieben.

Der immunologische fäkale Okkultbluttest zeigte mit $AUC_{iFOBT} = 0,88$ eine bessere Leistungsfähigkeit als der Methylierungstest des Septin-9-Gens mit $AUC^{mSEPT9} = 0,82$. Die quantitativen Hämoglobinwerte im Stuhl wurden empirisch in sieben ordinale Inkremente

aufgeteilt und diese mit der Anzahl der methylierten Septin-9-Gen-PCR-Replikate addiert. Hieraus ergab sich eine im Vergleich zu den Areas Under the Curve der einzelnen Tests höhere Area Under the Curve ($AUC^{m_{SEPT9}iFOBT} = 0,92$). Bei einem optimierten Schwellenwert (≥ 4) wurden mit dem kombinierten Test aus immunologischem fäkalem Okkultbluttest und Methylierungstest des Septin-9-Gens eine Sensitivität von 75 % bei einer Spezifität von 94 % erreicht. Dies übertrifft das von den Centers for Medicare and Medicaid Services (2021) geforderte Kriterium (75 % Sensitivität, 90 % Spezifität) in Bezug auf Spezifität deutlich und erfüllt die Anforderungen bezogen auf Sensitivität.

Die vorliegende Arbeit zeigt Machbarkeit bezüglich der Kombination von Tests auf okkultes Hämoglobin im Stuhl und frei-zirkulierender zellfreier methylierter Tumor-DNA im Blut für die Darmkrebsdiagnostik und liefert die Rationale und Methodik für eine prospektive Validierung, idealerweise in einer asymptomatischen Risikopopulation.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die 10 führenden Krebsarten mit der Anzahl geschätzter Krebsfälle und erwarteter Todesfälle in den USA im Jahr 2022, modifizierte Abbildung aus Siegel et al., 2022. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons, Lizenznummer 5558891115020 vom 30.05.2023 9
- Abbildung 2: Endoskopische Aufnahmen von klassischen kolorektalen Adenomen: 12
- a) Tubuläres Adenom, aus „Krebsvorsorge: Abführmittel vor Darmspiegelung sollte an zwei Tagen eingenommen werden“ mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. med. A. Meining, Uniklinik Würzburg, <https://mt-portal.de/aktuell/ab-fuehrmittel-vor-darmspiegelung-sollte-an-zwei-tagen-eingenommen-werden/> (Zugriffsdatum: 01.06.2023)
- b) Tubulo-villöses Adenom, aus der Online-Endothek des Kepler Universitätsklinikums Linz in Österreich, <https://www.endothek.at/colon/polypektomie/>, (Zugriffsdatum: 15.06.2023), Creative Commons Lizenz, abrufbar unter <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
- c) Villöses Adenom, aus dem Bild-Atlas der gastroenterologischen Endoskopie des Albertinen Krankenhauses Hamburg mit freundlicher Genehmigung von Herrn M. Oelckers, Leitender Oberarzt der Klinik für Innere Medizin, <https://www.endoskopiebilder.de/villoeses-adenom> (Zugriffsdatum: 01.06.2023)
- Abbildung 3: Endoskopische Aufnahmen von serratierten kolorektalen Adenomen: a) Hyperplastischer Polyp b) Sessiles serratiertes Adenom c) Sessiles serratiertes Adenom mit Dysplasie d) Traditionelles serratiertes Adenom, modifiziert aus De Palma, 2019, Open Access Lizenz, abrufbar unter <https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1017> 12

| | | |
|--------------|---|----|
| Abbildung 4: | Eine genetische Übersicht über die in der Adenom- Karzinom-Sequenz maßgeblich involvierten Gene und molekularen Pathomechanismen. Modifizierte Abbildung aus De Palma et al., 2019, Open Access Lizenz, abrufbar unter https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1017 , Beschriftung modifiziert anhand Angaben aus Hong, 2018; Jung et al., 2020 und Sun et al., 2020 | 14 |
| Abbildung 5: | Eine genetische Übersicht über maßgebliche molekulare Pathomechanismen des serratierten Karzinogeneseweges, modifizierte Abbildung aus De Palma et al., 2019, Open Access Lizenz, abrufbar unter https://www.mdpi.com/2072-6694/11/7/1017 | 15 |
| Abbildung 6: | Übersicht des Arbeitsablaufes | 26 |
| Abbildung 7: | ROC-Analyse mit resultierender AUC des quasi-digitalen <i>mSEPT9</i> -Tests zur Detektion von KRK in einer Fall-Kontroll-Studie mit n = 100 KRK-Patienten und n = 100 Kontrollprobanden. | 38 |
| Abbildung 8: | ROC-Analyse mit resultierender AUC des quantitativen iFOBT-Ergebnis zur Detektion von KRK in einer Fall-Kontroll-Studie mit n = 100 KRK-Patienten und n = 100 Kontrollprobanden. | 39 |
| Abbildung 9: | Vergleichende ROC-Analyse mit resultierender AUC des iFOBT-Ergebnis zur Detektion von KRK in einer Fall-Kontroll-Studie mit n = 100 KRK-Patienten und n = 100 Kontrollprobanden. | 41 |
| Abbildung10: | ROC-Analyse mit resultierender AUC des kombinierten <i>mSEPT9</i> /iFOBT-Tests zur Detektion von KRK in einer Fall-Kontroll-Studie mit n = 100 KRK-Patienten und n = 100 Kontrollprobanden. | 42 |

7. Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---|----|
| Tabelle 1: | Die führenden Todesursachen in den USA 2019, modifizierte Tabelle aus Siegel et al., 2022, mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons, Lizenznummer 5558891115020 vom 30.05.2023. | 8 |
| Tabelle 2: | Zusammensetzung von 10 µl Mastermix. | 34 |
| Tabelle 3: | Beschreibung der Primer-DNA-Sequenzen. | 35 |
| Tabelle 4: | Klinische Leistungsfähigkeit des <i>mSEPT9</i> -Tests bei der Detektion von KRK in einer Fall-Kontrollstudie mit n = 100 KRK-Patienten und n = 100 Kontrollprobanden. | 37 |
| Tabelle 5: | Die Einteilung der iFOBT-Ergebnisse in Inkremente. | 41 |
| Tabelle 6: | Klinische Leistungsfähigkeit von <i>mSEPT9</i> bei der Detektion von KRK in einer Fall-Kontroll-Studie mit n = 100 KRK-Patienten und n = 100 Kontrollprobanden. Sensitivität und Spezifität des kombinierten <i>mSEPT9</i> /iFOBT-Tests in Abhängigkeit der Schwellenwerte anhand derer die Klassifikation als Test-positive bzw. Test-negative Probe durchgeführt wurde. | 43 |
| Tabelle 7: | Stadien-abhängige klinische Leistungsfähigkeiten des <i>mSEPT9</i> -Tests (Schwellenwert ≥ 1 positive PCR-Reaktionen), des iFOBT-Test (Schwellenwert > 10 µg Hämoglobin / g Fäces) und des <i>mSEPT9</i> /iFOBT-Tests (für drei exemplarische Schwellenwerte: ≥ 7 , ≥ 4 und ≥ 2). | 44 |

8. Literaturverzeichnis

Adler A, Geiger S, Keil A, Bias H, Schatz P, deVos T, Dhein J, Zimmermann M, Tauber R, Wiedenmann B. Improving compliance to colorectal cancer screening using blood and stool based tests in patients refusing screening colonoscopy in Germany. *BMC Gastroenterol* 2014; 14: 183

Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP. Colorectal Cancer Screening by Detection of Altered Human DNA in Stool: Feasibility of a Multitarget Assay Panel. *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-1227

American Cancer Society Inc., 2023. Colorectal Cancer Facts & Figures 2023-2025. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/colorectal-cancer-facts-and-figures/colorectal-cancer-facts-and-figures-2023.pdf>
(Zugriffsdatum: 13.05.2023)

Armaghany T, Wilson JD, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2012; 5: 19-27

Berger BM, Levin B, Hilsden RJ. Multitarget stool DNA for colorectal cancer screening: A review and commentary on the United States Preventive Services Draft Guidelines. *World J Gastrointest Oncol* 2016; 8: 450-458

Bergheim J, Semaan A, Gevensleben H, Groening S, Knoblich A, Dietrich J, Weber J, Kalff JC, Bootz F, Kristiansen G, Dietrich D. Potential of quantitative *SEPT9* and *SHOX2* methylation in plasmatic circulating cell-free DNA as auxiliary staging parameter in colorectal cancer: a prospective observational cohort study. *Br J Cancer* 2018; 118: 1217-1228

Bye WA, Nguyen TM, Parker CE, Jairath V, East JE. Strategies for detecting colon cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 9: CD000279

Centers for Medicare and Medicaid Services. Screening for Colorectal Cancer - Blood-Based Biomarker Tests. Decision Memo, 2021. <https://www.cms.gov/medicare-coverage-database/view/ncacal-decision-memo.aspx?proposed=N&NCAId=299> (Zugriffsdatum: 14.05.2023)

Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, Castaños-Vélez E, Blumenstein BA, Rösch T, Osborn N, Snover D, Day RW, Ransohoff DF. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in Plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* 2014; 63: 317-325

de Klerk CM, Vendrig LM, Bossuyt PM, Dekker E. Participant-Related Risk Factors for False-Positive and False-Negative Fecal Immunochemical Tests in Colorectal Cancer Screening: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2018; 113: 1778-1787

De Palma FDE, D'Argenio V, Pol J, Kroemer G, Maiuri MC, Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2019; 11: 1017

de Vos L, Gevensleben H, Schröck A, Franzen A, Kristiansen G, Bootz F, Dietrich D. Comparison of quantification algorithms for circulating cell-free DNA methylation biomarkers in blood plasma from cancer patients. *Clin Epigenet* 2017; 9: 125

de Vos L, Jung M, Koerber RM, Bawden EG, Holderried TAW, Dietrich J, Bootz F, Brossart P, Kristiansen G, Dietrich D. Treatment Response Monitoring in Patients with Advanced Malignancies Using Cell-Free *SHOX2* and *SEPT9* DNA Methylation in Blood: An Observational Prospective Study. *J Mol Diagn* 2020. 22: 920-933

deVos T, Molnar B. Screening for Colorectal Cancer Based on the Promoter Methylation Status of the Septin 9 Gene in Plasma Cell Free DNA. *J Clin Epigenet* 2017; 3: 1

Dietrich D. Entwicklung von DNA-Methylierungsbiomarkern für das personalisierte klinische Management von Krebserkrankungen. Habilitationsschrift aus der hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2014)

Dietrich D, Meller S, Uhl B, Ralla B, Stephan C, Jung K, Ellinger J, Kristiansen G. Nucleic acid-based tissue biomarkers of urologic malignancies. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 51: 173-199

Eiken Chemicals Co, 2023: OC-SENSOR io. <https://www.eiken.co.jp/en/products/fit/io/> (Zugriffsdatum 21.03.2023)

Epigenomics AG, 2016: Epigenomics AG erhält FDA-Zulassung für Epi proColon®. <https://www.epigenomics.com/de/epigenomics-ag-erhalt-fda-zulassung-fur-epi-procolonr/> (Zugriffsdatum: 19.12.2022)

Epigenomics AG, 2020: Leben retten mittels blutbasierter Krebserkennung Geschäftsbericht 2019. https://www.epigenomics.com/wp-content/uploads/2020/04/EPI_D_GB2019_sec.pdf (Zugriffsdatum: 21.12.2022)

Epigenomics AG, 2022: Wie präzise ist Epi proColon 2.0 CE?. <https://www.epiprocolon.com/de/patienten/testgenauigkeit/> <https://www.epiprocolon.com/de/aerzte/ueber-epiprocolon/>

Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genet* 2013; 29: 569-574

Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol* 2012; 3: 153-173

Fraser CG, Allison JE, Halloran SP, Young GP. A Proposal to Standardize Reporting Units for Fecal Immunochemical Tests for Hemoglobin. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 810-814

García-Borruel MM, Molina AJH, Perálvarez MLR, Rincón EM, Medrano IP, Ruiz FJS, Juanena LLC, Navarro MP, Rodríguez AN, Pastor CV. Post-colonoscopy colorectal cancer: Characteristics and predictive factors. *Medicina Clínica (English Edition)* 2018; 150: 1-7

Herold G et al. Kolorektales Karzinom (KRK). In: Herold, Hrsg. *Innere Medizin*, 2020. Köln: Gerd Herold, 2020: 490-496

Hol L, Wilschut JA, van Ballegooijen M, van Vuuren AJ, van der Valk H, Reijerink JCIY, van der Togt ACM, Kuipers EJ, Habbema JDF, van Leerdam ME. Screening for colorectal cancer: random comparison of guaiac and immunochemical faecal occult blood testing at different cut-off levels. *Br J Cancer* 2009; 100: 1103 - 1110

Hong SN. Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intest Res* 2018; 16: 327-337

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist DA, Berger BM. Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal Cancer Screening. *N Engl J Med* 2014; 370: 1287-1297

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; 351: 2704-2714

ISG Intermed Service GmbH & Co. KG. Geesthacht, 2023: iFOBT/OC-Sensor Pat.-Set inkl. Stuhlfänger 1x20 Set. <https://shop.intermed.de/Injektion-Infusion-Entnahme/Sonstiges-Entnahme/Entnahme-Patienten-Sets/iFOBT-OC-Sensor-Pat-Set-inkl-Stuhlfaenger-1x20-Set.html> (Zugriffsdatum: 14.05.2023)

Jacobs R, Pox CP. Darmkrebsvorsorge - Medizinische Übersicht. In: Lammert F, Lynen Jansen P, Lerch MM, Hrsg. Weissbuch Gastroenterologie 2020/21 - Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, der Leber und Bauchspeicheldrüse - Gegenwart und Zukunft. Berlin - Boston: Walter de Gruyter, 2019: 206-215

Johnson DA, Barclay RL, Mergener K, Weiss G, König T, Beck J, Potter NT. Plasma Septin9 versus fecal immunochemical testing for colorectal cancer screening: a prospective multicenter study. *PLoS One* 2014; 9: e98238

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 484-492

Jung G, Hernández-Illán E, Moreira L, Balaguer F, Goel A. Epigenetics of colorectal cancer: biomarker and therapeutic potential. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020; 17: 111-130

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) 2019: S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1. 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL. <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> (Zugriffsdatum: 06.12.2022)

Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. Milestones of Lynch syndrome 1895 - 2015. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 181-194

Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 2449-2460

MVZ Dr. Eberhard & Partner Dortmund, 2022: SEPTIN 9 – Bluttest zur Darmkrebsvorsorge in zweiter Generation. Laborinformation Nr. 107 / 2-2012, Update 12-2022. https://www.medizin-zentrum-dortmund.de/fileadmin/user_upload/labmed_letters/II-107-septin9.pdf (Zugriffsdatum: 14.05.2023)

Pabby A, Schoen RE, Weissfeld JL, Burt R, Kikendall JW, Lance P, Shike M, Lanza E, Schatzkin A. Analysis of colorectal cancer occurrence during surveillance colonoscopy in the dietary Polyp Prevention Trial. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 385-391

Pfarr N, Specht K, Weichert W. Bestimmung molekularer Biomarker in der Behandlung solider Tumoren. *Forum* 2017; 32: 222-229

Potter NT, Hurban P, White MN, Whitlock KD, Lofton-Day CE, Tetzner R, Koenig T, Quigley NB, Weiss G. Validation of Real-Time PCR-Based Qualitative Assay for the Detection of Methylated SEPT9 DNA in Human Plasma. *Clin Chem* 2014; 60: 1183-1191

Pox CP. Kolorektales Karzinom - Medizinische Übersicht. In: Lammert F, Lynen Jansen P, Lerch MM, Hrsg. *Weissbuch Gastroenterologie 2020/21 - Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, der Leber und Bauchspeicheldrüse - Gegenwart und Zukunft*. Berlin - Boston: Walter de Gruyter, 2019: 146-148

Roth JA, deVos T, Ramsey SD. Clinical and Budget Impact of Increasing Colorectal Cancer Screening by Blood and Stool-Based Testing. *Am Health Drug Benefits* 2019, 12: 256-262

Schröck A, Leisse A, de Vos L, Gevensleben H, Dröge F, Franzen A, Wachendörfer M, Schröck F, Ellinger J, Teschke M, Wilhelm-Buchstab T, Landsberg J, Holdenrieder S, Hartmann G, Field JK, Bootz F, Kristiansen G, Dietrich D. Free-Circulating Methylated DNA in Blood for Diagnosis, Staging, Prognosis, and Monitoring of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients: An Observational Prospective Cohort Study. *Clin Chem* 2017; 63: 1288-1296

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426-437

Semaan A, van Ellen A, Meller S, Bergheim D, Branchi V, Lingohr P, Goltz D, Kalff JC, H Matthaei, Pantelis D, Dietrich D. SEPT9 and SHOX2 DNA methylation status and its utility in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal adenocarcinomas. *Clin Epigenet* 2016; 8: 100

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022; 72: 7-33

Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal Cancer Statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; 70: 145-164

Sun J, Zheng MY, Li YW, Zhang SW. Structure and function of Septin 9 and its role in human malignant tumors. *World J Gastrointest Oncol* 2020; 12: 619-631

Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G. The Origins of Colorectal Carcinoma: Specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107: 760-766

U.S. Preventive Service Taskforce, 2021: Final Recommendation Statement Colorectal Cancer: Screening. <https://www.uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/recommendation/colorectal-cancer-screening>_(Zugriffsdatum: 14.05.2023)

Westwood M, Lang S, Armstrong N, van Turenhout S, Cubiella J, Stirk L, Ramos IC, Luyendijk, Zaim R, Kleijnen J, Fraser CG. Faecal immunochemical tests (FIT) can help to rule out colorectal cancer in patients presenting in primary care with lower abdominal symptoms: a systematic review conducted to inform new NICE DG30 diagnostic guidance. *BMC Med* 2017; 15: 189

Wu D, Zhou G, Jin P, Zhu J, Li S, Wu Q, Wang G, Sheng J, Wang J, Song L, Han X, Qian J. Detection of Colorectal Cancer Using a Simplified SEPT9 Gene Methylation Assay Is a Reliable Method for Opportunistic Screening. *J Mol Diagn* 2016; 18: 535-545

Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M, Hankey BF, Shi W, Bond JH, Schapiro M, Panish JF, Stewart ET, Waye JD. Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths. *N Engl J Med* 2012; 366: 687-696

Zeidler J, Lange A, von der Schulenburg JM. Kolorektales Karzinom - Epidemiologie und Gesundheitsökonomie. In: Lammert F, Lynen Jansen P, Lerch MM, Hrsg. *Weissbuch Gastroenterologie 2020/21 - Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, der Leber und Bauchspeicheldrüse - Gegenwart und Zukunft*. Berlin - Boston: Walter de Gruyter, 2019: 148-154

Zwink N, Holleczeck B, Stegmaier C, Hoffmeister M, Brenner H. Komplikationsrate der Vorsorgekoloskopie im Krebsfrüherkennungsprogramm. *Dtsch Arztebl Int* 2017; 114: 321-327

9. Danksagung

Frau Dr. Julia Weber hat mir in der Klinik, in der ich tätig bin, die Aufgabe der Studienarbeit übertragen und den Kontakt zu Herrn PD Dr. Dimo Dietrich hergestellt. Dank seiner Überzeugung entschied ich mich zur Anfertigung dieser Dissertation und erhielt neben meiner klinischen Tätigkeit einen umfassenden Einblick in die Wissenschaft. Trotz langjähriger akademischer Ausbildung habe ich erst durch die Promotion intensives wissenschaftliches Arbeiten gelernt und werde immer davon profitieren. Die tiefgreifende Auseinandersetzung mit dem Thema 'kolorektales Karzinom' hat mich in dem Vorhaben bestärkt, mich in der Kolorektalchirurgie zu spezialisieren.

Ich danke Herrn PD Dr. Dimo Dietrich für all seine Unterstützung und Motivation. Darüber hinaus danke ich Frau Romina Zarbl, ohne deren Tätigkeit diese Studie nicht möglich gewesen wäre. Weiterer Dank gilt Frau Ann-Kathrin Glosch, Frau Dr. Luka de Vos und Herrn PD Dr. Alexander Semaan für die Zusammenarbeit und Unterstützung.

Zudem möchte ich meiner Familie und meinen Freunden von Herzen für den ständigen Beistand auf dem Weg meiner Ausbildung danken.