

Aus der Chirurgischen Klinik
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zu neuen diagnostischen und prognostischen Biomarkern bei
Patienten mit entzündlichen und onkologischen Erkrankungen des
gastrointestinalen Traktes

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Wizenty
aus Münster

Datum der Promotion: 18.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract (Deutsch)	1
Abstract (Englisch)	2
1. Einführung	3
2. Material und Methodik	6
2.1 Humane Proben	6
2.2 Patientencharakterisierung	6
2.3 Quantitative Real-Time RT PCR	7
2.4 Bioinformatische Analysen von Genexpressionsprofilen	8
2.5 Immunfluoreszenzfärbungen	8
2.6 Autofluoreszenzfärbungen	8
2.7 Statistische Analysen	8
3. Ergebnisse	9
3.1 Genexpression von <i>FNDCs</i> und <i>GPR116</i> in Gewebeproben von CED- und KRK-Patienten	9
3.2 <i>FNDCs</i> und <i>GPR116</i> Expressionen in GEO Datensets	10
3.3 Autofluoreszenz im Kolongewebe als effektives Diagnosewerkzeug	10
3.4 Autofluoreszenz im Kolongewebe als ungewolltes Signal	11
3.5 Prognostische Biomarker zur metabolischen Charakterisierung chirurgischer Patienten	12
4. Diskussion	13
Literaturverzeichnis	18
Eidesstattliche Versicherung	23
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	24
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	26
Lebenslauf	57
Publikationsliste	58
Danksagung	60

Zusammenfassung

Abstract (Deutsch)

Für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) als auch für das kolorektale Karzinom (KRK) existieren wenige etablierte Biomarker mit Relevanz für Diagnose, Prognose oder Therapieansprechen. Bislang fehlt es an Biomarkern, die die Progression einer CED zu einem KRK sicher abbilden. Die Identifizierung von neuen krankheitsspezifischen Biomarkern könnte daher zum besseren pathomechanistischen Verständnis und zur Behandlungsoptimierung beitragen. So wurde FNDC4 als antiinflammatorischer Faktor beschrieben, der in CED hochreguliert ist. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 116 (GPR116) wurde als potentieller FNDC4-Rezeptor gefunden. Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der mRNA Expression der *FNDC* Familie und *GPR116* in nicht-afektierten und afektierten Gewebeproben von Patienten mit CED oder KRK. Mukosaproben wurden von 30 Patienten im Rahmen von diagnostischen Koloskopien oder chirurgischen Resektionen von CED und KRK gewonnen. Die Genexpression wurde mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt. *FNDC1* und *FNDC4* waren in CED, im Vergleich zur nicht-afektierter Mukosa, signifikant hochreguliert. Keine der untersuchten *FNDCs* wurde im KRK different exprimiert. Die Versuche zur Etablierung einer Proteinfärbung von FNDC4 schlugen, bedingt durch eine fragliche Antikörperspezifität und Autofluoreszenz (AF) des verwendeten Gewebes, fehl. Allerdings konnten charakteristische AF-Musterstrukturen identifiziert werden. AF Signale wurden durch Lipofuszin verursacht und zeigten sich vermehrt in entzündetem Gewebe. Daher kann AF als diagnostischer Biomarker für intestinale Inflammation angesehen werden. In dieser Arbeit wird weiterhin das Wissen zu prognostischen Biomarkern im Blut von chirurgischen Patienten für eine optimale präoperative metabolische Vorbereitung erweitert. Bei Operationen des KRK bestehen bei Patienten oft präoperative Fastenperioden mit reduzierter postoperativer Rekonvaleszenz. An 50 Patienten mit elektiven Operationen am unteren und oberen GI-Trakt erfolgte eine Blutanalyse von möglichen Biomarkern im perioperativen Setting. Eine multivariate Regressionsanalyse zeigte Glutaminsäure und Valin als signifikante unabhängige Prädiktoren der präoperativen Fastenzeit. Zusammenfassend könnten *FNDC1* und *FNDC4* eine relevante Rolle in der Pathobiologie der CED spielen. Autofluoreszenz kann als diagnostischer Biomarker der CEDs angesehen werden, limitiert allerdings spezifische Immunfluoreszenzfärbungen. Im klinischen Kontext kann eine Messung des

Aminosäureprofilen eine zeitgerechte Nahrungsunterstützung bei länger fastenden Patienten vor Operationen erlauben.

Abstract (Englisch)

A few common biomarkers exist for inflammatory bowel disease (IBD) and colorectal cancer (CRC) with relevance for diagnosis, prognosis and therapy. The identification of new disease specific biomarkers could reveal a better pathomechanistic understanding, thus optimizing treatment. *FNDC4* was described as anti-inflammatory factor, upregulated in IBD. The G-protein-coupled receptor 116 (*GPR116*) was found to be a putative *FNDC4* receptor. This work first aims to analyze the mRNA expression of the *FNDC* family and *GPR116* in nonaffected and affected mucosal samples of patients with IBD or CRC. Mucosa samples were obtained from 30 patients undergoing diagnostic colonoscopy or from surgical resection of IBD or CRC. Gene expression was determined by quantitative real-time PCR. *FNDC1* and *FNDC4* were significantly upregulated in IBD, compared to unaffected mucosa. None of the investigated *FNDCs* was differentially expressed in CRC. The attempts to establish protein staining of *FNDC4* failed due to questionable antibody specification and autofluorescence (AF) of assessed tissue. Although, specific AF-structures were identified. AF signals were related with lipofuscin accumulation and appeared more pronounced in inflamed tissues. Therefore, AF appeared as a diagnostic biomarker for colonic inflammation. Within this study, it is further sought to advance the knowledge on prognostic biomarkers in the plasma that allow the metabolic characterization of surgical patients for an optimized preoperative metabolic preparation. In CRC surgery, patients often suffer from preoperative fasting periods leading to decelerate recovery after surgery. In 50 patients with elective surgery of the upper and lower gastrointestinal tract blood analysis of potential biomarkers in the perioperative setting was performed. A multivariate regression analysis revealed glutamic acid and valine as significant independent predictors of preoperative fasting periods. Taken together, *FNDC1* and *FNDC4* may play a relevant role in the pathobiology of IBD. AF is a diagnostic biomarker for IBD, although it limits specific immunofluorescence staining. In clinical context measurement of amino acids profiles allows timely nutritional support for prolonged fasted patient before surgery.

1. Einführung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind globale Erkrankungen mit einer Prävalenz von über 0,3% in Nordamerika und Europa sowie einer seit 1990 steigenden Inzidenz in neu industrialisierten Ländern, analog zu dem Trend in der westlichen Welt in dem frühen 20. Jahrhundert (1). Obwohl CEDs zu den meist erforschten menschlichen Erkrankungen zählen, ist ihre zugrundeliegende Pathophysiologie noch nicht vollständig verstanden. Maßgeblich sind eine überschießende Immunantwort auf das gastrointestinale Mikrobiom und eine genetische Veranlagung für die Entstehung einer CED (2). Die CEDs umfassen im Wesentlichen die Colitis ulcerosa (CU) sowie den Morbus Crohn (MC). Beide Erkrankungen sind mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (KRK) assoziiert, welches um das 2,4x für Patienten mit CU und um das 1,9x für Patienten mit MC mit der Erkrankungsdauer steigt (3, 4). Auch für das KRK auf dem Boden einer CED ist die Pathogenese noch nicht vollständig verstanden und basiert auf einem schädlichen Einfluss durch chronische entzündliche Effekte auf die Darmwand (5). Das KRK ist heute die dritthäufigste Krebserkrankung und die vierthäufigste krebisbezogene Todesursache weltweit mit stabiler Inzidenz in Industriestaaten sowie steigender Inzidenz in Entwicklungsländern (6). In den meisten Fällen tritt die maligne Erkrankung sporadisch auf, jedoch sind Interaktionen mit genetischen und epigenetischen Alterationen bekannt. Eine chirurgische Operation ist je nach Krankheitsstadium kurativ möglich. Sowohl für die CEDs als auch für das KRK existieren etablierte Biomarker mit Relevanz für Diagnose, Prognose oder Therapieansprechen. Für CEDs werden ASCA, pANCA, CRP im Serum und Calprotektin und Laktoferrin im Stuhl benutzt (7). ASCA ist ein Antikörper mit Affinität für ein Antigen der *Saccharomyces cerevisiae*. ANCAs sind Antikörper mit Affinität für neutrophile Granulozyten, die bei diversen Autoimmunerkrankungen beschrieben sind. Insbesondere Patienten mit CU weisen pANCA auf. CRP wird als Marker der akuten Inflammation verwendet. Calprotektin ist ein kalzium- und zinkbindendes Protein, das mit der Menge an neutrophilen Granulozyten in der Darmwand korreliert. Auch Laktoferrin, ein eisenbindendes Glykoprotein, wird im Rahmen der intestinalen Inflammation exprimiert. Im klinischen Management des KRK kann insbesondere die Detektion der Abwesenheit von *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* und *PIK3CA* Genmutationen einen Einfluss auf eine gezielte Therapie mittels anti-epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor-Antikörper nehmen (8).

Die Identifizierung von neuen krankheitsspezifischen Biomarkern könnte zum weiteren pathomechanistischen Verständnis und der Entwicklungen von Behandlungsmöglichkeiten beitragen. So wurde 2016 Fibronectin Type III domain-containing 4 (FNDC4) als ein antiinflammatorischer Faktor, welcher in humaner und muriner intestinaler Inflammation hochreguliert ist und therapeutisches Potential aufweist, identifiziert (9). FNDC4 ist eins von insgesamt acht bisher identifizierten Mitgliedern der FNDC Proteinfamilie im Menschen. Diese Proteine sind durch mindestens eine Fibronectin Type III domain charakterisiert. Einige Studien zeigten, dass FNDCs durch microRNAs reguliert werden (10-12). Darüber hinaus sind weitere Regulationsmechanismen bekannt, wie die FNDC4 Regulation durch TGF β und eine Beteiligung des Kortikoidrezeptors für die Expression von *FNDC5* (9, 13). FNDC1 aktiviert G-protein signaling 8 (AGS8) und wurde als Regulator kardiovaskulärer Funktionen (VEGF-vermittelte Angiogenese, Hypoxie-induzierte Apoptose von Kardiomyozyten) beschrieben (14, 15). Auf der anderen Seite korreliert die FNDC1 Expression mit aggressivem Prostatakarzinom (11). FNDC3A leistet einen Beitrag zur Synthese der Extrazellulärmatrix in Odontoblasten sowie zur Spermatogenese (16, 17). Eine Expressionsanalyse zeigte eine Hochregulation im sporadischen KRK (18, 19). FNDC3B fördert die epithial-mesenchymale Transition und aktiviert multiple Krebs-Signalwege inklusive PI3-kinase/Akt, Rb1 und TGF β (20-23). Zurzeit ist FNDC5 das intensivste beforschte FNDC, da es das Ausgangsprotein des Peptidhormons Irisin darstellt, welches für seine Eigenschaft der Konversion von weißem in braunes Fettgewebe bekannt ist (24). Diese zumeist kürzlich veröffentlichten Daten zu FNDCs deuten auf eine Vielfältigkeit von Funktionen im Gesunden sowie unter erkrankten Konditionen in diversen Organen hin und belegen ein aufkommendes Interesse an einer strukturierten Analyse dieser Proteinfamilie als mögliche Biomarker-Kandidaten in CED und KRK. Der exakte Rezeptor oder Bindungspartner von FNDC4 ist bis dato noch nicht sicher bekannt. Jedoch konnte der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 116 (GPR116) als ein möglicher funktioneller FNDC4-Rezeptor-Kandidat in einer in-vitro Bindungsstudie vorgestellt werden (25). *GPR116* wird in verschiedenen Geweben, darunter Lunge, Niere und Fett exprimiert und ist hochreguliert in metastasierten KRK und Brustkrebs (26, 27). Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Genexpressionsanalyse von *FNDC1*, *FNDC3A*, *FNDC3B*, *FNDC4*, *FNDC5* und *GPR116* in nicht-afektierten und afektierten mukosalen Gewebeproben von Patienten mit CED oder KRK.

Im Rahmen der Proteinfärbungen dieser Arbeit zeigten sich antikörperunabhängige Signale durch natürliche Fluoreszenz, auch Autofluoreszenz (AF), genannt. AF wird hier ebenfalls als diagnostischer Biomarker, charakterisiert durch ein intrinsisches Vorkommen ohne Hinzugabe von Enzymen oder Farbstoffen, geprüft. Es konnten früher beispielsweise aromatische Aminosäuren, Zytokeratin, Kollagen, Elastin, NAD(P)H, Flavin, freie Fettsäuren, Vitamin A, Porphyrin und Lipofuszin als endogene Fluorophore identifiziert sowie anhand ihres AF-Spektrums und morphologischer Aspekte differenziert werden (28). Neben einer zu prüfenden Biomarkereigenschaft bei CEDs, kann AF allerdings auch spezifische Antikörpersignale überdecken und zu Fehlinterpretationen führen, sodass in dieser Arbeit auch der Versuch zur Reduktion von AF in Gewebsschnitten von CED-Patienten unternommen wurde.

Im Blut können Glykoproteine, die von Tumoren gebildet und ins Blut abgegeben werden als Tumormarker genutzt werden. Für das kolorektale Karzinom können die Tumormarker CEA und CA 19-9 für die Verlaufskontrolle herangezogen werden. Zur metabolischen Charakterisierung von Patienten kann der Aminosäuren-, Peptid- und Lipidstoffwechsel analysiert werden. Mitglieder der FNDC Proteinfamilie werden durch Fasten beeinflusst werden. Beispielsweise wird FNDC5 physiologischerweise während Fastenperioden in der Muskulatur induziert (29), während das klassische Fibronectin bei prolongiertem Fasten im Plasma herunterreguliert wird (30). Im perioperativen Setting, so auch bei der Resektion eines KRK, können prolongierte Fastenperioden zu einem katabolischen Status mit reduzierter postoperativer Rekonvaleszenz führen. Eine verkürzte Fastenzeit zeigte sich relevant für eine adäquate Wundheilung, Immunität, sowie eine Wiederherstellung der normalen gastrointestinalen Funktion nach Operation (31, 32). Kachektische onkologische Patienten weisen ein unterschiedliches Profil von biochemischen Plasmamarkern, beispielsweise eine Hypoalbuminämie, verglichen mit nicht-kachektischen Patienten auf (33). Allerdings gibt es bisher keine Studie, die zeitsensitive metabolische Biomarker bei Patienten bei gastrointestinalen Operationen als kurative Krebstherapie adressiert. So könnten aus klinischer Sicht Patienten bei Aufnahme im Krankenhaus hinsichtlich eines erhöhten Risikos für katabole Situationen mithilfe prognostischer Biomarker erkannt und bei Bedarf der Metabolismus gezielt optimiert werden. Das klassische Fibronectin wurde bereits vor ca. 30 Jahren als Biomarker für Fastenperioden diskutiert, allerdings bei weiteren Einflussfaktoren auf das

zirkulierende Protein, wie Bindung an Kollagene im Rahmen eines Traumas, nur als bedingt geeignet eingestuft (34). Jedoch könnten beispielsweise Plasmaamino­säurenkonzentrationen/ -alterationen als zeitsensitive Fastenmarker bedingt durch die Abwesenheit exogener Aminosäuren und den Muskelabbau zwecks hepatischer Glukoneogenese geeignet sein (35). Das dritte Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit die Erweiterung des Wissens zu prognostischen Biomarkern, die eine metabolische Charakterisierung von Patienten mit gastrointestinalen chirurgisch-onkologischen Erkrankungen erlauben.

2. Material und Methodik

2.1 Humane Proben

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Studien wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Registrierungsnummer EA2/021/16) und erfolgten in Einklang mit der Deklaration von Helsinki. Jeder Studienteilnehmer willigte schriftlich ein. Gewebeproben von Patienten mit CED oder KRK wurden in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Charité, der Chirurgischen Klinik der Charité sowie der Praxis Dr. med. Wolfgang Spitz im Rahmen von klinisch indizierten Endoskopien oder Operationen gesammelt. Die gesammelten Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Nutzung gelagert oder in Formalin fixiert, in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Analyse von perioperativen Fastenmarkern im Plasma erfolgte bei Patienten bei denen krebsbedingt eine klinisch indizierte Operation am oberen und unteren GI-Trakt in der Chirurgischen Klinik der Charité durchgeführt wurde. Es erfolgte eine Blutentnahme zur Bestimmung von Elektrolyten, Hämatologie, Aminosäuren, klinischer Chemie, Ketonkörpern und freier Fettsäuren am Tag der Aufnahme, kurz vor Hautschnitt, am 3. postoperativen Tag sowie am Tag der Entlassung.

2.2 Patientencharakterisierung

Von 20 CED- (10 CU, 10 MC) und 10 KRK-Patienten wurden affektierte sowie nicht-affektierte Gewebeproben entnommen. Die Krankheitsschwere der Patienten wurde mittels Mayo Score für CU und Harvey-Bradshaw Index für MC bestimmt. In die Gruppe der CU-affektierten Patienten wurden 7 Männer sowie 1 Frau eingeschlossen

mit einem Altersmedian von 39 Jahren. Der überwiegende Teil dieser Gruppe hatte eine Pankolitis (5/8) sowie eine milde Krankheitsaktivität (7/8). In die Gruppe der MC-
affektierten Patienten wurden 3 Männer sowie 5 Frauen mit einem Altersmedian von 32 Jahren eingeschlossen. Die Patienten hatten überwiegend eine ileozökale Manifestation und 50% befanden sich in klinischer Remission. Zum Zeitpunkt der Probengewinnung erhielten alle Patienten eine antiinflammatorische Medikation.

Die KRK-Kohorte bestand ausschließlich aus Männern mit einem Altersmedian von 64,5 Jahren. 6/11 Karzinomen (ein Patient mit Doppelkarzinom) entstammten dem Rektum. Das Krankheitsstadium der Kohorte war überwiegend UICC Stadium I oder II und das histologische Staging überwiegend G2. 8/11 Karzinomen waren mikrosatellitenstabil.

50 Patienten mit einem Altersmedian von 58,4 Jahren und einem Anteil von 72% Männern wurden zur Untersuchung der Fastenmarker in eine Studie eingeschlossen. 23 Patienten unterzogen sich einer Operation am oberen und 27 Patienten einer Operation am unteren GI-Trakt. Die prä- und postoperativen Fastenzeiten wurde dokumentiert und der Ernährungsstatus mittels diverser Testinstrumente ermittelt.

2.3 Quantitative Real-Time RT PCR

Die RNA Extraktion erfolgte mittels PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, CA, USA) sowie mittels einem rotierenden Homogenisator (Retsch MM400, Haan, Deutschland) entsprechen den Herstellervorgaben. Qualitäts- und Quantitätskontrollen wurden für jedes Extrakt mit dem NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, DE, USA) durchgeführt. Sofort nach RNA Extraktion erfolge eine cDNA Synthese mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA). Die cDNA wurde bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert. Für qRT-PCR Reaktionen wurde der GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, WI, USA) und ein 7500 Real Time PCR Cycler System (Applied Biosystems, CA, USA) verwendet. Die Genexpression wurde zu den Housekeeping Genen *ACTB* und *TBP* und zu nicht-afektierten Proben entsprechend der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode normalisiert (36). qRT-PCR Produkte wurden mittels ihrer Amplikonlänge in der Gelelektrophorese verifiziert.

2.4 Bioinformatische Analysen von Genexpressionsprofilen

Aus der Gene Expression Omnibus (GEO) Datenbank wurden folgende Datensets mit arraybasierten Genexpressionsprofilen entnommen und analysiert: die Genexpression von *FNDCs* und *GPR116* in KRK-Zelllinien (GDS4296), in mikrosatelliteninstabilen KRK (GDS4515) sowie in früh und spät manifestierten KRK in Männern und Frauen (GDS5232).

2.5 Immunfluoreszenzfärbungen

Die generelle Gewebeaufbereitung erfolgte mittels Deparaffinisierung, Rehydratation in absteigenden Ethanolkonzentrationen, 15 Minuten Kochen in Citratpuffer (pH = 6,0), 30 Minuten Blockierung mit 5% entrahmter Milch und Deckelung mittels Vectashield (Vector Laboratories). Zum Versuch der Darstellung des FNDC4 Proteins wurden die Rabbit Anti-FNDC4 Antikörper (Sigma-Aldrich, HPA05180 oder Novus, NBP2-14023) mit dem Sekundärantikörper Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 594) (ab150080, Abcam) verwendet. Jede Probe wurde ebenfalls mittels H&E gefärbt. Die Mikroskopie erfolgte mittels einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z1, Zeiss oder BZ-9000, Keyence) und einem konfokalen Mikroskop (Eclipse Ti-E, Nikon oder SP8, Leica).

2.6 Autofluoreszenzfärbungen

Das generelle Protokoll entspricht der Immunfluoreszenz (IF)-Färbungen, allerdings wurden zur Darstellung der AF keine Antikörper verwendet. Zur Blockierung von AF wurde eine Sudanschwarz B (SBB)/ Ethanol-Lösung in verschiedenen Konzentrationen (0%, 0,1%, 0,5% und 1%) hergestellt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten nach der Blockierung mittels Milch auf die Gewebeschnitte in Dunkelheit aufgetragen. Eine zweite Blockademöglichkeit wurde mittels Ammoniumacetat-gepuffertem Kupfersulfat (pH = 5) für 5 Minuten durchgeführt.

2.7 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden mittels SPSS Version 25.0 (IBM, NY, USA) oder GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, USA) durchgeführt. Der t-Test wurde zum Vergleich zweier Gruppen bei normal verteilten Variablen verwendet. Bei qPCR

Daten wurden zuvor mittels Grubbs-Test Ausreißer identifiziert. Datenprofile der GEO Datenbank wurden mittels one-way ANOVA für multiple Vergleiche als auch dem t-Test zum Vergleich von zwei Gruppen analysiert. Zur Bestimmung der Relation zwischen Fastenzeit und Fastenmarkern wurde der Korrelationskoeffizient genutzt. Es erfolgte eine multivariate Analyse zur Identifizierung von unabhängigen Prädiktoren für präoperative Fastenzeiten. Im Regressionsmodell erfolgte eine rückwärtige Elimination von unabhängigen Variablen. Mittels ROC-Analyse wurde der beste Vorhersagewert der präoperativen Fastenzeit bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden definiert als $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Genexpression von *FNDCs* und *GPR116* in Gewebeproben von CED- und KRK-Patienten

Die basale *FNDC* Expression wurde zunächst in nicht-afektierten Gewebeproben entlang der proximal-distalen Achse von Ileum bis Rektum untersucht. Dabei zeigten sich *FNDC3A* und *FNDC5* im Ileum im Vergleich zu kolonischen Segmenten höher exprimiert. Für *FNDC1*, *FNDC3B*, *FNDC4* und *GPR116* wurden keine Expressionsunterschiede entlang der proximal-distalen Achse gefunden. Es erfolgte ein Vergleich der Genexpression von *FNDCs* und *GPR116* in nicht-afektierten Gewebeproben von CED- vs. KRK-Patienten. Signifikant höhere Level wurden für *FNDC3A* und *FNDC3B* in nicht-afektierten Gewebeproben von CED-Patienten verglichen mit nicht-afektierten Gewebeproben von KRK-Patienten gefunden. Für *FNDC1*, *FNDC4* und *FNDC5* wurden hierbei keine signifikanten Expressionunterschiede gefunden. *GPR116* war in nicht-afektierte Gewebeproben bei KRK-Patienten verglichen mit CED-Patienten höher exprimiert. In makroskopisch und mikroskopisch floride entzündlich veränderten Gewebeproben von CED-Patienten waren im Mittel *FNDC1* (5,5x) und *FNDC4* (13,8x) im Vergleich zu nicht-afektierten Gewebeproben signifikant höher exprimiert. *FNDC3A*, *FNDC3B*, *FNDC5* und *GPR116* zeigten keine Differenzen im Vergleich zu entzündlichen mit nicht-afektierten Gewebeproben. *FNDC4* ist in aktiver CU (7x) und in aktivem MC (22x) hochreguliert. *GPR116* war nicht spezifisch reguliert in CU oder MC, obwohl sich ein Trend zur Hochregulierung zeigte. Die Genexpression von allen untersuchten *FNDCs* und *GPR116* zeigte im entarteten mukosalen Gewebe in gepaarten Analysen mit

benachbarten nicht-afektierten Gewebeproben keine signifikanten Unterschiede. *FNDC3A* zeigte den stärksten Trend zur Hochregulation im KRK, bislang ohne Erreichen der statistischen Signifikanz ($p = 0,097$).

3.2 *FNDCs* und *GPR116* Expressionen in GEO Datensets

Die Analyse von öffentlich zugänglichen Datensets der GEO-Datenbank wurde zur Ergänzung der beschriebenen Expressionsergebnisse mit vergleichbaren Studien durchgeführt. Zunächst wurden aus dem NCI-60 Panel Mikroarray Daten von *FNDCs* in sieben humanen kolorektalen Tumorzelllinien entnommen. Alle *FNDCs* waren exprimiert, wobei *FNDC3A* die höchsten Expressionswerte in allen Zelllinien aufwies (+2,4x). In einem Datenset von mikrosatelliteninstabilen KRK (MSI KRK) wurde die Genexpression mit der in nicht-afektierte Mukosa verglichen. *FNDC4* war im MSI KRK signifikant herunterreguliert, während *FNDC3A* und *FNDC3B* unverändert reguliert waren. *GPR116* war im MSI KRK ebenfalls signifikant hochreguliert. Zur Testung des Alters- und Geschlechtseinflusses erfolgte eine Analyse von Früh- und Spätkarzinomen bei Männern und Frauen, welche keine geschlechts- oder altersabhängigen Unterschiede zeigte. Die eben beschriebenen Ergebnisse fanden Eingang in die Publikation:

Titel: Expression Analysis of Fibronectin Type III Domain-Containing (FNDC) Genes in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer.

Co-Autoren: Tilo Wuensch, Jonas Wizenty, Janina Quint, Wolfgang Spitz, Madeleen Bosma, Olaf Becker, Andreas Adler, Wilfried Veltzke-Schlieker, Martin Stockmann, Sascha Weiss, Matthias Biebl, Johann Pratschke, and Felix Aigner.

Journal: Gastroenterology Research and Practice.

3.3 Autofluoreszenz im Kolongewebe als effektives Diagnosewerkzeug

Im Rahmen der IF-Proteinfärbungen von *FNDC4* zeigten sich subepithelial Fluoreszenzsignale, voranging in der Lamina propria mucosae lokalisiert. In IF-Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper und mit verschiedenen Sekundärantikörpern (Goat Anti-Rabbit, Alexa Fluor 594 und Goat Anti-Mouse, FITC) erschienen die fluoreszierenden Zellen unabhängig von Ab- und Anwesenheit und Art der verwendeten Sekundärantikörper. Zum Ausschluss einer Bindung von Fc-Rezeptoren an die Antikörper erfolgte die Blockierung mit Ziegenserum. Die unspezifischen

Signale tauchen auch bei Kontrollfärbungen gänzlich ohne Antikörper auf und können somit als AF angesehen werden. Damit wurde gezeigt, dass anstatt eines spezifischen Rabbit Anti-FNDC4 Antikörpersignals (Sigma-Aldrich, HPA05180 oder Novus, NBP2-14023) lediglich AF besteht. IF-Signale waren prädominant basal der Krypten lokalisiert. Die Dichte der AF-Signale steigerte sich im entzündlichen CED Gewebe im Vergleich zu gesundem Darmgewebe um etwa die 10-fache Zellzahl. AF existierte über ein breites Emissionsspektrum hinweg, am geringsten war das Signal im blauen Wellenlängenbereich. In der Konfokalmikroskopie war AF auf eine grüne (488,5 nm) und rote (561,4 nm) Laserexzitation nur in den korrespondierenden Kanälen detektierbar. Ein sehr schwaches Signal konnte mittels blauer (403,6 nm) und dunkelroter (638,7 nm) Exzitation gesehen werden.

3.4 Autofluoreszenz im Kolongewebe als ungewolltes Signal

Neben der Funktion als intrinsischer Biomarker stört AF spezifische Antikörpersignale in der Fluoreszenzmikroskopie. Daher wurden in der Literatur verschiedene Strategien zur Reduktion der AF beschrieben. Ein Beispiel ist SBB mit seiner Eigenschaft der Lösung von Lipofuszin (37), einer typischen Quelle von partikulärer AF in Immunzellen (38). Eine dieser Dissertation zugrunde liegenden Studie zeigte eine dosisabhängige Reduktion der AF mit SBB. Jedoch erschien die Reduktion mehr als eine generelle Verdunkelung denn als ein pigmentspezifischer Effekt. Mit verlängerter Expositionszeit in der Fluoreszenzmikroskopie konnte der Reduktionseffekt kompensiert werden. Eine zweite Chemikalie, die zur AF Reduktion beschrieben wurde, ist hochkonzentriertes Kupfersulfat. Wir erreichten eine vergleichbare Reduktion der AF im Vergleich zu SBB in Erythrozyten und in der Mukosa. Die eben beschriebenen Ergebnisse fanden Eingang in die Publikation:

Titel: Autofluorescence: A potential pitfall in immunofluorescence-based inflammation grading.

Co-Autoren: Jonas Wizenty, Muhammad Imtiaz Ashraf, Nadine Rohwer, Martin Stockmann, Sascha Weiss, Matthias Biebl, Johann Pratschke, Felix Aigner, Tilo Wuensch.

Journal: Journal of Immunological Methods.

3.5 Prognostische Biomarker zur metabolischen Charakterisierung chirurgischer Patienten

Es existieren bisher keine zeitsensitiven Biomarker zur metabolischen Charakterisierung von chirurgischen Patienten. So könnten Biomarker mangelernährte Patienten feststellen, die postoperativ eine erhöhte Morbidität aufweisen. In unserer chirurgisch-klinischen Patientenkohorte waren laut Mini Nutritional Assessment 33,3% der Patienten mit unter GI-Trakt Malignität und 59,1% der Patienten mit oberer GI-Trakt Malignität mangelernährt oder hatten ein Risiko für Mangelernährung. Patienten mit Mangelernährung oder Risiko für Mangelernährung hatten einen signifikant reduzierten BMI verglichen mit Patienten mit normalem Ernährungszustand. Patienten mit einem Risiko für Mangelernährung hatten signifikant geringere Nüchternplasmaspiegel von Asparagin, Citrullin, Ornithin, Lysin und Erythrozyten verglichen mit Patienten mit normalem Ernährungsstatus. Die präoperative Fastenzeit korrelierte signifikant positiv mit den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Leucin, sowie Serin, α -Aminobuttersäure, freien Fettsäuren, 3-Hydroxybutansäure und signifikant negativ mit Chlorid, Glutaminsäure und dem Alanin/Lysin-Verhältnis. Die postoperative Fastenzeit korrelierte mit Erythrozyten, Leukozyten und Plasmaspiegel von Albumin, CRP, HDL-Cholesterin, Asparagin und 3-Methylhistidin. In einer multivariaten Regressionsanalyse wurden schrittweise Plasmamarker identifiziert, die unabhängig mit der Fastenzeit assoziiert sind. Das finale Regressionsmodell enthielt zwei Prädiktoren, Glutaminsäure und Valin. Mittels ROC-Kurvenanalyse wurde der Vorhersagewert des Regressionsmodells bestimmt. Die AUC stieg mit steigender Fastenzeit und die beste Kombination aus Sensitivität und Spezifität wurde für eine Fastenzeit von über 20 Stunden (Sensitivität 90,91%, Spezifität 92,31%) bestimmt. Die eben beschriebenen Ergebnisse fanden Eingang in die Publikation:

Titel: Identification of serological markers for pre- and postoperative fasting periods.

Co-Autoren: Tilo Wuensch, Janina Quint, Verena Mueller, Anne Mueller, Jonas Wizenty, Magnus Kaffarnik, Barbara Kern, Martin Stockmann, Matthias Biebl, Johann Pratschke, Felix Aigner.

Journal: Clinical Nutrition ESPEN.

4. Diskussion

Diese Dissertation zielte auf die Analyse von neuen diagnostischen und prognostischen Biomarkern für CED und das KRK ab. Es erfolgten Genexpressionsuntersuchungen zur Identifizierung von signifikant hochregulierten Genen in CED und KRK, histologische Untersuchungen zur Charakterisierung von endogenen Fluorophoren, welche krankheitsspezifisch präsent sind sowie Blutuntersuchungen von potentiellen metabolischen Biomarker im perioperativen Setting.

Die explorative Genexpressionsanalyse von Mitgliedern der *FNDC* Familie und *GPR116* erfolgte in humanen CED- und KRK-Mukosagewebeproben. Die Untersuchung der basalen Genexpression entlang der proximal-distalen Achse des Darms ergab, dass *FNDC1*, *FNDC3B*, *FNDC4* und *GPR116* nicht unterschiedlich exprimiert sind, während *FNDC3A* und *FNDC5*, im Vergleich zum Kolon, vermehrt im Ileum exprimiert waren. Die lokalisationsunabhängige Expression von *FNDC4* wurde bereits in einer anderen Studie beschrieben (9). Die biologische Relevanz einer variablen regionalen Expression bleibt unklar. Im CED-Gewebe wurde früher beschrieben, dass *FNDC4* in der Mukosa hochreguliert ist und als antiinflammatorischer Faktor via Herabregulation von proinflammatorischen Genen und der Phagozytose wirkt (9). Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen die Hochregulation von *FNDC4* in CU und MC. Außerdem konnte *FNDC1* als zweites Gen der *FNDC* Familie identifiziert werden, welches in CED hochreguliert ist. Dies deutet auf eine funktionale Rolle von *FNDC1* in CED hin, welches bislang meist in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen und Prostatakrebs diskutiert wurde (10, 14, 15, 39). Die Hochregulation der Expression von *FNDC1* und *FNDC4* mit nachfolgender Translation könnte intrazelluläre oder Zell-Zell Signalkontakte vermitteln. Bislang wurden unterschiedliche *FNDC*-Rezeptorkandidaten in verschiedenen Organen oder Zellen beschrieben. So ist bekannt, dass *FNDC1* den Androgenrezeptor im Prostatakrebs reguliert (10). Weiterhin bildet *FNDC1* Komplexe mit der G-Protein beta gamma Untereinheit und Connexinen in Kardiomyozyten und reguliert diverse VEGF-Rezeptoren in Endothelzellen (14, 40). Ein *FNDC4*-Rezeptorkandidat wurde von Georgiadi *et al.* postuliert, die eine Bindung von *FNDC4* an *GPR116* fanden (25). In der Analyse der vorliegenden Arbeit war *GPR116* im CED-Gewebe nicht signifikant reguliert. Physiologische Funktionen von *FNDC5*, das unter anderem durch Bewegung freigesetzt wird, inkludieren metabolische Effekte wie eine

verbesserte Glukosetoleranz durch Hochregulation von Thermogenin über eine Phosphorylierung der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase (41). Die vorliegende Arbeit bestätigte das Expressionsprofil von *FNDC5* in CED-Geweben. Wie Bosma *et al.* in verschiedenen chemisch-entzündlichen Mausmodellen bereits zeigten konnten, ist *FNDC5* entweder runterreguliert oder unverändert (9). Eine *FNDC5* Expression scheint somit nicht durch Inflammation getriggert zu sein. Im KRK waren weder *FNDCs* noch *GPR116* signifikant reguliert. Bisher gab es keine Information über die Regulation von *FNDC1* und *FNDC4* im KRK, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Gene keine relevanten Faktoren für intestinale Dysplasien sind, limitiert durch mögliche Regulationen auf Proteinebene. Im untersuchten MSI KRK-Datenset wies *FNDC4* eine geringe, jedoch signifikante Herabregulation (-2,8%) auf. Dies ist im Einklang mit 2017 veröffentlichten Affymetrix Mikroarrayanalysen, die ebenfalls eine Herabregulation (4x) von *FNDC4* in murinen KRK-Zelllinien beschreiben (42). Diese Daten deuten auf eine supprimierte Transkription von *FNDC4* in den beschriebenen KRK-Pathologien hin, jedoch bleibt die biologische Relevanz dieser Expressionsunterschiede ungewiss. *GPR116*, als ein *FNDC4*-Rezeptorkandidat war der Analyse der vorliegenden Arbeit im Vergleich zwischen nicht affizierten, entzündeten und entarteten Gewebe konstant reguliert. Yang *et al.* fanden eine Korrelation zwischen hoch exprimierten *GPR116* und einem reduzierten Überleben im fortgeschrittenen KRK (n=90) (26). In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten wurde weiterhin eine geringe *GPR116* Expression in moderat differenzierten KRK (n=56) gefunden. Aufgrund der überwiegenden Anzahl von mikrosatellitenstabilen Karzinomen in der vorliegenden Arbeit erfolgte ergänzend die Analyse eines Datensets mit MSI KRK, welches eine Hochregulation (+6,5%) von *GPR116* zeigte. Die funktionale Beziehung zwischen *FNDC4* und *GPR116* muss in weiteren Studien untersucht werden. Eine Studie zeigte eine vermehrte *FNDC5*-Immunoreaktivität bei Ösophagus-, Magen-, Leber- und Darmkrebs (43). Dies konnte mit der methodologischen Differenz zwischen Proteinlevel und mRNA Expression hier nicht bestätigt werden. Aufgrund der erhöhten KRK-Rate bei CED-Patienten, könnte eine Expression der *FNDCs* im Verlauf einer CED Hinweise auf eine mögliche pathologische Rolle dieser spielen. Diese Frage konnte in der Arbeit aufgrund der ausschließlich sporadischen KRK nicht näher beantwortet werden. Bisher ist sehr wenig über die Funktion der *FNDCs* in der Pathogenese des KRK bekannt, noch weniger für ein KRK basierend auf einer CED. Von Shivakumar *et al.* wurde eine

vermehrte Amplifizierung von *FNDC3A* im sporadischen KRK, aber nicht im CU-assoziierten KRK beschrieben. Jedoch konnte eine Immunreaktivität für *FNDC3A* in CU mit neoplastischen Veränderungen gezeigt werden (19). In den in der vorliegenden Arbeit analysierten KRK-Gewebeproben war *FNDC3A*, im Vergleich zum gesunden Kolongewebe, nicht signifikant reguliert. Allerdings zeigte sich eine Tendenz hin zu einer erhöhten *FNDC3A* Expression im KRK-Gewebe. Untersuchungen mit höheren n-Zahlen könnten weiteren Aufschluss bringen. Auch die funktionalen Auswirkungen von *FNDC3A* auf das KRK bedürfen weiterer Untersuchungen. *FNDC3B*, welches 50% der Aminosäuren mit *FNDC3A* teilt, ist im Ösophagus-, Lungen-, Ovarialkarzinom sowie im Brustkrebs hochexprimiert und wurde mit der Aktivierung diverser Krebswege inklusive PI3-Kinase/Akt, Rb1 und TGF- β assoziiert (20). 2017 schlugen Chen *et al.* *FNDC3B* als potentiellen Biomarker für das nodal metastasierte KRK vor (44). *FNDC3B* ist somit ein Kandidatengewebe, welches sich als Biomarker für eine Subgruppe von KRK eignen könnte.

Eine Proteinfärbung von *FNDC4* in der IF gelang in dieser Arbeit bei fraglicher Spezifität des Antikörpers und autofluoreszierendem CED-Gewebe nicht. AF-Signale wurden hier zellulär disseminiert in der Lamina propria mukosae beschrieben. Anhand der Daten können als Hauptsignalort Immunzellen diskutiert werden, die im entzündlichen Gewebe vermehrt sind. Daher zeigte sich AF als intrinsischer diagnostischer Biomarker für Koloninflammation. Die AF war dabei über ein breites Emissionsspektrum hinweg detektierbar und daher auch mit Fluorophoren in unterschiedlichen Spektren bei spezifischen Antikörperfärbungen nicht zu umgehen. In den Blockierungsversuchen zeigte sich ein vergleichbares Resultat mit SBB und Kupfersulfat. Jedoch kann aufgrund der einfacheren Handhabung Kupfersulfat primär empfohlen werden. Als intrinsisches Fluorophor kommen unterschiedliche Moleküle wie Retinol, Strukturproteine wie Elastin oder beispielsweise NAD(P)H in Betracht (28). Diese emittieren Fluoreszenz in einem schmalen Peakmaximum und erscheinen mikroskopisch deutlich diffus verteilt. Im Gegensatz dazu emittiert das in dieser Arbeit analysierte Fluorophor in einem breiten Spektrum und erscheint mikroskopisch partikulär. Das einzige Fluorophor mit breiter Emission von 480 nm bis 700 nm ist Lipofuszin, eine polymere Substanz bestehend aus vernetzten Lipiden und Proteinresten aufgrund oxidativer Prozesse (45). Lipofuszin akkumuliert in Lysosomen als Aggregat unter physiologischen (z.B. Leber- und Gehirnalterung) als auch

pathologischen neoplastischen und nicht-neoplastischen Konditionen zum Beispiel im Pankreaskarzinom oder der altersbedingten Makuladegeneration (46-48). Mahmoud *et al.* beschrieben eine Lipofuszinakkumulation bei epithelialer Nekrose und Inflammation der Schilddrüse. Dabei war Lipofuszin ebenfalls in Immunzellen enthalten (49). In einer 2017 veröffentlichten Arbeit von Vida *et al.* zeigte sich Lipofuszin-AF im Zuge mit einem erhöhten oxidativen Stresslevel gemessen an der Katalaseaktivität in peritonealen Makrophagen von natürlich gealterten Mäusen (38). Auch CEDs führen bei chronischer Inflammation zu einer mukosalen Makrophageninfiltration, welche schlussfolgernd Lipofuszin enthalten können. Somit gelingt unter Ausnutzung von AF-Phänomenen eine Untersuchung in direkter Abhängigkeit der Fluorophore und damit der biologischen Struktur von Zellen oder Geweben.

Die vorliegende Arbeit untersuchte weiterhin prognostische Blutparameter im direkten Klinikkontext, nämlich bei chirurgischen Eingriffen am GI-Trakt. Ziel dieser Analysen war es, fastensensitive metabolische Marker zu identifizieren. In der multivariaten Regressionsanalyse waren Valin und Glutaminsäure die einzig signifikanten Prädiktoren für die präoperative Fastenzeit. Der Anstieg der Valinspiegel während Fastenzeiten ist im Einklang mit früheren Studien. So wurde bereits gezeigt, dass in gesunden Männern nach 36 Stunden die verzweigt-kettigen Aminosäuren (Valin, Isoleucin, Leucin) im Plasma ansteigen (50). Dies könnte mit dem erhöhten Muskelabbau zur Bereitstellung von Substraten für die hepatische Glukoneogenese erklärt werden (35, 51). Auch für Alanin wurde eine Freisetzung aus der Muskulatur während Fasten beschrieben (52). In dieser Arbeit konnten das nicht bestätigt werden, was durch zu kurze Fastenperioden (<48h) sowie einen vermehrten Umsatz von Alanin im Rahmen der Glukoneogenese in der Leber bedingt sein könnte. Chiasson *et al.* konnten beim Fasten eine effizientere hepatische Konversion von Alanin zu Glukose spektrophotometrisch in gesunden oder übergewichtigen Patienten messen (53). Plasmaspiegel der Glutaminsäure sanken durch das Fasten. Dies könnte durch eine verstärkte Glutamatdehydrogenaseaktivität im Fasten erklärt sein, wie eine Studie im Mausmodell (auf 2 Stunden pro Tag reduzierter Nahrungszugang) mit Protein- und Aktivitätsmessungen des Enzyms zeigten konnte (54). Aminosäurespiegel hängen von multiplen weiteren Faktoren neben der Fastenzeit ab, wie dem Alter, dem BMI und dem Geschlecht (55-57). Die Länge der postoperativen Fastenzeit ist unter anderem

mit alterierten CRP- und 3-Methylhistidinspiegel assoziiert. Erhöhte postoperative CRP-Spiegel sind bekannt und können durch frühe postoperative Ernährung nach KRK-Resektionen reduziert werden (58). Ob CRP als Biomarker für die postoperative Rekonvaleszenz dienen kann sollte in weiteren Studien eruiert werden. Ein gut erforschter Faktor für die postoperative Rekonvaleszenz ist eine Mangelernährung der Patienten, assoziiert mit reduzierter Immunfunktion, Wundheilung und erhöhten postoperativen Komplikationsraten wie der Anastomoseninsuffizienz bei kolorektaler Chirurgie (59). Für 3-Methylhistidin, ein Muskelabbaumarker, konnte früher eine vermehrte Freisetzung in den Urin von Patienten mit neuromuskulären Erkrankungen festgestellt werden (60). Die vorliegende Arbeit zeigte nun auch bei Patienten mit gastrointestinalen Malignomen eine positive Korrelation von 3-Methylhistidine im Serum mit der postoperativen Fastenzeit. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die optimale prä- und postoperative Diät und Proteinzufuhr von Patienten mit Operationen am GI-Trakt unklar, jedoch ist für GI Tumore bekannt, dass ein Energiedefizit ein unabhängiger Risikofaktor für die postoperative Morbidität und Mortalität ist (61).

Zusammenfassend legte diese Arbeit erste Daten zu Fibronektin Typ III domain-containing Proteinen in CED und KRK dar. *FNDC1* und *FNDC4* sind in der intestinalen Mukosa von CED-Patienten hochreguliert, während keine signifikanten Veränderungen für *FNDCs* und *GPR116* im KRK detektierbar waren. Das diagnostische Potential und pathomechanistische Einflüsse von *FNDCs* sind somit am ehesten bei CED, aber nicht beim KRK zu erwarten. Der potentielle FNDC-Rezeptor *GPR116* ist im fortgeschrittenen und MSI KRK hochreguliert. Weitere Forschung ist nötig um Expressionsdaten auf Proteinlevel und funktionelle Konsequenzen, inklusive FNDC-Rezeptorinteraktionen zu verstehen. Autofluoreszenzphänomene können als intrinsischer Biomarker zukünftig mit Fortschritt von makroskopischen und mikroskopischen visuellen Systemen zur Untersuchung von gesundem und erkranktem Gewebe herangezogen werden. Vor Operation einer GI-Malignität kann ein präoperatives Screening mittels Bestimmung der zeitsensitiven Biomarker Valin und Glutaminsäure zur Identifizierung von Patienten, die eine Ernährungsunterstützung benötigen, erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Anknüpfungspunkte für zukünftige Forschungsfragen hinsichtlich der gezielten klinischen Anwendung und des Nutzens diagnostischer oder Verlaufs-Biomarker.

Literaturverzeichnis

1. Ng S. C., Shi H. Y., Hamidi N., Underwood F. E., Tang W., Benchimol E. I., Panaccione R., Ghosh S., Wu J. C. Y., Chan F. K. L., Sung J. J. Y., Kaplan G. G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018;390(10114):2769-78. DOI: 10.1016/s0140-6736(17)32448-0.
2. Zhang Y. Z., Li Y. Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(1):91-9. DOI: 10.3748/wjg.v20.i1.91.
3. Jess T., Rungoe C., Peyrin-Biroulet L. Risk of Colorectal Cancer in Patients With Ulcerative Colitis: A Meta-analysis of Population-Based Cohort Studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2012;10(6):639-45. DOI: 10.1016/j.cgh.2012.01.010.
4. Jess T., Gomborg M., Matzen P., Munkholm P., Sørensen T. I. A. Increased Risk of Intestinal Cancer in Crohn's Disease: A Meta-Analysis of Population-Based Cohort Studies. *The American Journal Of Gastroenterology*. 2005;100:2724. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.00287.x.
5. Kim E. R., Chang D. K. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(29):9872-81. DOI: 10.3748/wjg.v20.i29.9872.
6. Arnold M., Sierra M. S., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017;66(4):683-91. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
7. Bennike T., Birkelund S., Stensballe A., Andersen V. Biomarkers in inflammatory bowel diseases: current status and proteomics identification strategies. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(12):3231-44. DOI: 10.3748/wjg.v20.i12.3231.
8. Vacante M., Borzi A. M., Basile F., Biondi A. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World journal of clinical cases*. 2018;6(15):869-81. DOI: 10.12998/wjcc.v6.i15.869.
9. Bosma M., Gerling M., Pasto J., Georgiadi A., Graham E., Shilkova O., Iwata Y., Almer S., Soderman J., Toftgard R., Wermeling F., Bostrom E. A., Bostrom P. A. FNDC4 acts as an anti-inflammatory factor on macrophages and improves colitis in mice. *Nat Commun*. 2016;7:11314. DOI: 10.1038/ncomms11314.
10. Das D. K., Naidoo M., Ilboudo A., Park J. Y., Ali T., Krampis K., Robinson B. D., Osborne J. R., Ogunwobi O. O. miR-1207-3p regulates the androgen receptor in prostate cancer via FNDC1/fibronectin. *Experimental cell research*. 2016;348(2):190-200. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.09.021.
11. Fan X., Chen X., Deng W., Zhong G., Cai Q., Lin T. Up-regulated microRNA-143 in cancer stem cells differentiation promotes prostate cancer cells metastasis by modulating FNDC3B expression. *BMC Cancer*. 2013;13:61. DOI: 10.1186/1471-2407-13-61.
12. Xu H., Hu Y., Qiu W. Potential mechanisms of microRNA-129-5p in inhibiting cell processes including viability, proliferation, migration and invasiveness of

- glioblastoma cells U87 through targeting FNDC3B. *Biomed Pharmacother.* 2017;87:405-11. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.100.
13. Kim H. K., Jeong Y. J., Song I. S., Noh Y. H., Seo K. W., Kim M., Han J. Glucocorticoid receptor positively regulates transcription of FNDC5 in the liver. *Scientific reports.* 2017;7:43296. DOI: 10.1038/srep43296.
 14. Hayashi H., Al Mamun A., Sakima M., Sato M. Activator of G-protein signaling 8 is involved in VEGF-mediated signal processing during angiogenesis. *J Cell Sci.* 2016;129(6):1210-22. DOI: 10.1242/jcs.181883.
 15. Sato M., Jiao Q., Honda T., Kurotani R., Toyota E., Okumura S., Takeya T., Minamisawa S., Lanier S. M., Ishikawa Y. Activator of G protein signaling 8 (AGS8) is required for hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes: role of G betagamma and connexin 43 (CX43). *J Biol Chem.* 2009;284(45):31431-40. DOI: 10.1074/jbc.M109.014068.
 16. Carrouel F., Couble M. L., Vanbelle C., Staquet M. J., Magloire H., Bleicher F. HUGO (FNDC3A): a new gene overexpressed in human odontoblasts. *J Dent Res.* 2008;87(2):131-6. DOI: 10.1177/154405910808700209.
 17. Obholz K. L., Akopyan A., Waymire K. G., MacGregor G. R. FNDC3A is required for adhesion between spermatids and Sertoli cells. *Dev Biol.* 2006;298(2):498-513. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.06.054.
 18. Silva G. L., Junta C. M., Sakamoto-Hojo E. T., Donadi E. A., Louzada-Junior P., Passos G. A. Genetic susceptibility loci in rheumatoid arthritis establish transcriptional regulatory networks with other genes. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1173:521-37. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04629.x.
 19. Shivakumar B. M., Chakrabarty S., Rotti H., Seenappa V., Rao L., Geetha V., Tantry B. V., Kini H., Dharamsi R., Pai C. G., Satyamoorthy K. Comparative analysis of copy number variations in ulcerative colitis associated and sporadic colorectal neoplasia. *BMC Cancer.* 2016;16:271. DOI: 10.1186/s12885-016-2303-4.
 20. Cai C., Rajaram M., Zhou X., Liu Q., Marchica J., Li J., Powers R. S. Activation of multiple cancer pathways and tumor maintenance function of the 3q amplified oncogene FNDC3B. *Cell Cycle.* 2012;11(9):1773-81. DOI: 10.4161/cc.20121.
 21. Zhong Z., Zhang H., Hong M., Sun C., Xu Y., Chen X., Gao C., He M., Liu W., Liang J. FNDC3B promotes epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma cells in a hypoxic microenvironment. *Oncology reports.* 2018;39(4):1853-9. DOI: 10.3892/or.2018.6231.
 22. Cheng C. K., Wang A. Z., Wong T. H. Y., Wan T. S. K., Cheung J. S., Raghupathy R., Chan N. P. H., Ng M. H. L. FNDC3B is another novel partner fused to RARA in the t(3;17)(q26;q21) variant of acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 2017;129(19):2705-9. DOI: 10.1182/blood-2017-02-767707.
 23. Lin C. H., Lin Y. W., Chen Y. C., Liao C. C., Jou Y. S., Hsu M. T., Chen C. F. FNDC3B promotes cell migration and tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(31):49498-508. DOI: 10.18632/oncotarget.10374.
 24. Bostrom P., Wu J., Jedrychowski M. P., Korde A., Ye L., Lo J. C., Rasbach K. A., Bostrom E. A., Choi J. H., Long J. Z., Kajimura S., Zingaretti M. C., Vind B. F., Tu H., Cinti S., Hojlund K., Gygi S. P., Spiegelman B. M. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481(7382):463-8. DOI: 10.1038/nature10777.
 25. Georgiadi A., Ma X., Bosma M., Graham E., Shilkova O., Mattijssen F., Khan A. A., Higareda J. C. A., Wunsch T., Johansson M., Seaman S., Croix B. S., Ritvos O., Nakamura N., Hirose S., Scheideler M., Herzig S., Bostrom P. A. Fndc4, a highly identical ortholog of Irisin binds and activates a novel orphan receptor G-protein

- coupled receptor. *Diabetologie und Stoffwechsel*. 2016;11(S 01):P67. DOI: 10.1055/s-0036-1580814.
26. Yang L., Lin X. L., Liang W., Fu S. W., Lin W. F., Tian X. Q., Gao Y. J., Chen H. Y., Dai J., Ge Z. Z. High expression of GPR116 indicates poor survival outcome and promotes tumor progression in colorectal carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(29):47943-56. DOI: 10.18632/oncotarget.18203.
27. Tang X., Jin R., Qu G., Wang X., Li Z., Yuan Z., Zhao C., Siwko S., Shi T., Wang P., Xiao J., Liu M., Luo J. GPR116, an adhesion G-protein-coupled receptor, promotes breast cancer metastasis via the Galphaq-p63RhoGEF-Rho GTPase pathway. *Cancer Res*. 2013;73(20):6206-18. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-13-1049.
28. Croce A. C., Bottiroli G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry : EJH*. 2014;58(4):2461. DOI: 10.4081/ejh.2014.2461.
29. Li X., Fang W., Hu Y., Wang Y., Li J. Characterization of fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5) gene in chickens: Cloning, tissue expression, and regulation of its expression in the muscle by fasting and cold exposure. *Gene*. 2015;570(2):221-9. DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.022.
30. Nardelli G. M., Guastamacchia E., Di Paolo S., Lacasella R., Balice A., Montedoro P., Cospite M. R., Giorgino R. Plasmatic levels of fibronectin in diabetics with and without retinopathy. Correlation with some hormonal and metabolic parameters. *Acta diabetologica latina*. 1987;24(3):255-62.
31. Wild T., Rahbarnia A., Kellner M., Sobotka L., Eberlein T. Basics in nutrition and wound healing. *Nutrition*. 2010;26(9):862-6. DOI: 10.1016/j.nut.2010.05.008.
32. Jeong O., Ryu S. Y., Jung M. R., Choi W. W., Park Y. K. The safety and feasibility of early postoperative oral nutrition on the first postoperative day after gastrectomy for gastric carcinoma. *Gastric Cancer*. 2014;17(2):324-31. DOI: 10.1007/s10120-013-0275-5.
33. Schwarz S., Prokopchuk O., Esefeld K., Gröschel S., Bachmann J., Lorenzen S., Friess H., Halle M., Martignoni M. E. The clinical picture of cachexia: a mosaic of different parameters (experience of 503 patients). *BMC Cancer*. 2017;17(1):130. DOI: 10.1186/s12885-017-3116-9.
34. Howard L., Dillon B., Saba T. M., Hofmann S., Cho E. Decreased plasma fibronectin during starvation in man. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 1984;8(3):237-44. DOI: 10.1177/0148607184008003237.
35. Adibi S. A. Metabolism of branched-chain amino acids in altered nutrition. *Metabolism: clinical and experimental*. 1976;25(11):1287-302.
36. Pfaffl M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):e45-e.
37. Schnell S. A., Staines W. A., Wessendorf M. W. Reduction of Lipofuscin-like Autofluorescence in Fluorescently Labeled Tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1999;47(6):719-30. DOI: doi:10.1177/002215549904700601.
38. Vida C., de Toda I. M., Cruces J., Garrido A., Gonzalez-Sanchez M., De la Fuente M. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox biology*. 2017;12:423-37. DOI: 10.1016/j.redox.2017.03.005.
39. Deng A. Y., Chauvet C., Menard A. Alterations in Fibronectin Type III Domain Containing 1 Protein Gene Are Associated with Hypertension. *PLoS One*. 2016;11(4):e0151399. DOI: 10.1371/journal.pone.0151399.
40. Sakima M., Hayashi H., Mamun A. A., Sato M. VEGFR-3 signaling is regulated by a G-protein activator, activator of G-protein signaling 8, in lymphatic endothelial

- cells. *Experimental cell research*. 2018;368(1):13-23. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.04.007.
41. Mahgoub M. O., D'Souza C., Al Darmaki R., Baniyas M., Adeghate E. An update on the role of irisin in the regulation of endocrine and metabolic functions. *Peptides*. 2018;104:15-23. DOI: 10.1016/j.peptides.2018.03.018.
 42. Zhang W., Zhang B., Vu T., Yuan G., Zhang B., Chen X., Manne U., Datta P. K. Molecular characterization of pro-metastatic functions of β 4-integrin in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(54):92333-45. DOI: 10.18632/oncotarget.21290.
 43. Aydin S., Kuloglu T., Ozercan M. R., Albayrak S., Aydin S., Bakal U., Yilmaz M., Kalayci M., Yardim M., Sarac M., Kazez A., Kocdor H., Kanat B., Ozercan I. H., Gonen M., Bilgen M., Balgetir F. Irisin immunohistochemistry in gastrointestinal system cancers. *Biotech Histochem*. 2016;91(4):242-50. DOI: 10.3109/10520295.2015.1136988.
 44. Chen S., Wang Y., Zhang L., Su Y., Zhang M., Wang J., Zhang X. Exploration of the mechanism of colorectal cancer metastasis using microarray analysis. *Oncology Letters*. 2017;14(6):6671-7. DOI: 10.3892/ol.2017.7044.
 45. Brunk U. T., Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free radical biology & medicine*. 2002;33(5):611-9.
 46. Terman A., Kurz T., Navratil M., Arriaga E. A., Brunk U. T. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12(4):503-35. DOI: 10.1089/ars.2009.2598.
 47. Di Guardo G. Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. 2015. 2015;59(1). DOI: 10.4081/ejh.2015.2485.
 48. Dorey C. K., Wu G., Ebenstein D., Garsd A., Weiter J. J. Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1989;30(8):1691-9.
 49. Mahmoud I., Colin I., Many M. C., Deneff J. F. Direct toxic effect of iodide in excess on iodine-deficient thyroid glands: epithelial necrosis and inflammation associated with lipofuscin accumulation. *Experimental and molecular pathology*. 1986;44(3):259-71.
 50. Krug S., Kastenmuller G., Stuckler F., Rist M. J., Skurk T., Sailer M., Raffler J., Romisch-Margl W., Adamski J., Prehn C., Frank T., Engel K. H., Hofmann T., Luy B., Zimmermann R., Moritz F., Schmitt-Kopplin P., Krumsiek J., Kremer W., Huber F., Oeh U., Theis F. J., Szymczak W., Hauner H., Suhre K., Daniel H. The dynamic range of the human metabolome revealed by challenges. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(6):2607-19. DOI: 10.1096/fj.11-198093.
 51. Pozefsky T., Tancredi R. G., Moxley R. T., Dupre J., Tobin J. D. Effects of brief starvation on muscle amino acid metabolism in nonobese man. *The Journal of clinical investigation*. 1976;57(2):444-9. DOI: 10.1172/jci108295.
 52. Felig P., Wahren J. Protein turnover and amino acid metabolism in the regulation of gluconeogenesis. *Federation proceedings*. 1974;33(4):1092-7.
 53. Chiasson J. L., Atkinson R. L., Cherrington A. D., Keller U., Sinclair-Smith B. C., Lacy W. W., Liljenquist J. E. Effects of fasting on gluconeogenesis from alanine in nondiabetic man. *Diabetes*. 1979;28(1):56-60. DOI: 10.2337/diab.28.1.56.
 54. Vazquez-Martinez O., Mendez I., Turrubiate I., Valente-Godinez H., Perez-Mendoza M., Garcia-Tejada P., Diaz-Munoz M. Restricted feeding modulates the daily variations of liver glutamate dehydrogenase activity, expression, and histological location. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2017;242(9):945-52. DOI: 10.1177/1535370217699533.

55. Sarwar G., Botting H. G., Collins M. A comparison of fasting serum amino acid profiles of young and elderly subjects. *Journal of the American College of Nutrition*. 1991;10(6):668-74.
56. Ottosson F., Brunkwall L., Ericson U., Nilsson P. M., Almgren P., Fernandez C., Melander O., Orho-Melander M. Connection Between BMI-Related Plasma Metabolite Profile and Gut Microbiota. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2018;103(4):1491-501. DOI: 10.1210/jc.2017-02114.
57. Slupsky C. M., Rankin K. N., Wagner J., Fu H., Chang D., Weljie A. M., Saude E. J., Lix B., Adamko D. J., Shah S., Greiner R., Sykes B. D., Marrie T. J. Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Analytical chemistry*. 2007;79(18):6995-7004. DOI: 10.1021/ac0708588.
58. Lidder P., Thomas S., Fleming S., Hosie K., Shaw S., Lewis S. A randomized placebo controlled trial of preoperative carbohydrate drinks and early postoperative nutritional supplement drinks in colorectal surgery. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2013;15(6):737-45. DOI: 10.1111/codi.12130.
59. Lee S. Y., Jung M. R., Kim C. H., Kim Y. J., Kim H. R. Nutritional risk screening score is an independent predictive factor of anastomotic leakage after rectal cancer surgery. *European journal of clinical nutrition*. 2018;72(4):489-95. DOI: 10.1038/s41430-018-0112-3.
60. McKeran R. O., Halliday D., Purkiss P., Royston P. 3-Methylhistidine excretion as an index of myofibrillar protein catabolism in neuromuscular disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1979;42(6):536-41. DOI: 10.1136/jnnp.42.6.536.
61. Shpata V., Prendushi X., Kreka M., Kola I., Kurti F., Ohri I. Malnutrition at the time of surgery affects negatively the clinical outcome of critically ill patients with gastrointestinal cancer. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*. 2014;68(4):263-7. DOI: 10.5455/medarh.2014.68.263-267.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jonas Wizenty, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zu neuen diagnostischen und prognostischen Biomarkern bei Patienten mit entzündlichen und onkologischen Erkrankungen des gastrointestinalen Traktes“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Jonas Wizenty hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Tilo Wuensch*, **Jonas Wizenty***, Janina Quint, Wolfgang Spitz, Madeleen Bosma, Olaf Becker, Andreas Adler, Wilfried Veltzke-Schlieker, Martin Stockmann, Sascha Weiss, Matthias Biebl, Johann Pratschke, and Felix Aigner. Expression Analysis of Fibronectin Type III Domain-Containing (FNDC) Genes in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. Gastroenterology Research and Practice. 2019

*geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen: In dieser Publikation war ich als Erstautor in wesentlichen Teilen an dem Studiendesign sowie an der Strategie des Forschungsprojektes beteiligt. In meiner Verantwortlichkeit lag zu wesentlichen Anteilen die Patienten- und Probenrekrutierung im Operationssaal und in der Endoskopie, die Charakterisierung der Patientenkohorte, das Lagern und Aufarbeiten der humanen Proben, sowie die Planung, Durchführung und Analyse der PCR-Experimente. Die bioinformativ Analyse von Genexpressionsprofilen führte ich ebenfalls durch. Zudem leistete ich einen wesentlichen Beitrag zur Interpretation und Einordnung der neu gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse in die aktuelle Literatur. Ich erstellte die erste Version des Manuskripts einschließlich aller Figuren und Tabellen und war führend an dem Einreichungs- und Peer-Review-Prozess mit Überarbeitung des Manuskripts beteiligt.

Publikation 2: **Jonas Wizenty**, Muhammad Imtiaz Ashraf, Nadine Rohwer, Martin Stockmann, Sascha Weiss, Matthias Biebl, Johann Pratschke, Felix Aigner, Tilo Wuensch. Autofluorescence: A potential pitfall in immunofluorescence-based inflammation grading. Journal of Immunological Methods. 2018

Beitrag im Einzelnen: Das in dieser Publikation diskutierte Phänomen der Autofluoreszenz entdeckte ich im Rahmen der histologischen Färbungen von Darmgewebe von unserer CED-Patientenkohorte. So entwickelte ich die für die Publikation zugrunde liegende Forschungsidee und weiterführende Fragestellungen. In meiner Verantwortlichkeit lag die Durchführung von HE- und Immunfluoreszenz - Färbungen einschließlich der Blockierungen der Autofluoreszenz mittels Sudanschwartz B und Kupfersulfat. Als Erstautor erstelle ich zudem zu wesentlichen Anteilen die erste Version des Manuskripts einschließlich der Figuren 2,3,4,6,7 und 8. Die Journalauswahl und das Einreichen des Manuskripts erfolgten durch mich.

Publikation 3: Tilo Wuensch, Janina Quint, Verena Mueller, Anne Mueller, **Jonas Wizenty**, Magnus Kaffarnik, Barbara Kern, Martin Stockmann, Matthias Biebl, Johann Pratschke, Felix Aigner. Identification of serological markers for pre- and postoperative fasting periods. Clinical Nutrition ESPEN. 2019

Beitrag im Einzelnen: In dieser Publikation war ich an dem Erheben und der Zusammenstellung klinischer und paraklinischer Daten beteiligt. Zudem überarbeitete ich das Manuskript.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

1. Wuensch T.*, **Wizenty J.***, Quint J., Spitz W., Bosma M., Becker O., Adler A., Veltzke-Schlieker W., Stockmann M., Weiss S., Biebl M., Pratschke J., Aigner F. Expression Analysis of Fibronectin Type III Domain-Containing (FNDC) Genes in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Gastroenterology research and practice*. 2019; 1-11 p. URL: <https://doi.org/10.1155/2019/3784172>

* geteilte Erstautorenschaft

2. **Wizenty J.**, Ashraf M. I., Rohwer N., Stockmann M., Weiss S., Biebl M., Pratschke J., Aigner F., Wuensch T. Autofluorescence: A potential pitfall in immunofluorescence-based inflammation grading. *Journal of immunological methods*. 2018;456:28-37. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.02.007>

3. Wuensch T., Quint J., Mueller V., Mueller A., **Wizenty J.**, Kaffarnik M., Kern B., Stockmann M., Biebl M., Pratschke J., Aigner F. Identification of serological markers for pre- and postoperative fasting periods. *Clinical nutrition ESPEN*. 2019;30:131-7. URL: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2019.01.004>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Publikationen

1. **Wizenty J.**, Ashraf M. I., Rohwer N., Stockmann M., Weiss S., Biebl M., Pratschke J., Aigner F., Wuensch T. Autofluorescence: A potential pitfall in immunofluorescence-based inflammation grading. Journal of immunological methods. 2018;456:28-37. DOI: 10.1016/j.jim.2018.02.007. JIF: 1,913

2. Wuensch T.*, **Wizenty J.***, Quint J., Spitz W., Bosma M., Becker O., Adler A., Veltzke-Schlieker W., Stockmann M., Weiss S., Biebl M., Pratschke J., Aigner F. Expression Analysis of Fibronectin Type III Domain-Containing (FNDC) Genes in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. Gastroenterology research and practice. 2019; 1-11 p. DOI: 10.1155/2019/3784172. JIF: 1,825

* geteilte Erstautorenschaft

3. Wuensch T., Heucke N., **Wizenty J.**, Quint J., Sinn B., Arsenic R., Jara M., Kaffarnik M., Pratschke J., Stockmann M. Hepatic CYP1A2 activity in liver tumors and the implications for preoperative volume-function analysis. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2019. DOI: 10.1152/ajpgi.00335.2018. JIF: 3,729

4. Wuensch T., Quint J., Mueller V., Mueller A., **Wizenty J.**, Kaffarnik M., Kern B., Stockmann M., Biebl M., Pratschke J., Aigner F. Identification of serological markers for pre- and postoperative fasting periods. Clinical nutrition ESPEN. 2019;30:131-7. DOI: 10.1016/j.clnesp.2019.01.004. JIF: NA

2. Kongressbeiträge

1. Wuensch T., Ollrogge J., **Wizenty J.**, Aigner F., Maibier M., Pratschke J., Stockmann M. Branched-chain amino acids inhibit colorectal cancer growth, 54. Wissenschaftlicher DGE-Kongress, Kiel, 01.03.2017

2. **Wizenty J.***, Wuensch T., Ashraf M.I., Weiss S., Biebl M., Pratschke J., Aigner F. Stolperstein Autofluoreszenz bei Immunfluoreszenz-basierter Entzündungsgraduierung in CED-Gewebe. Viszeralmedizin 2017, Dresden, 14.09.2017

* Vortragender

3. Wuensch T., **Wizenty J.**, Klingberg O., Maibier M., Pratschke J., Aigner F., Stockmann M. Verzweigt-kettige Aminosäuren inhibieren das Wachstum von kolorektalen Tumorzellen. Viszeralmedizin 2017, Dresden, 14.09.2017

4. Wuensch T., **Wizenty J.***, Weiss S., Biebl M., Veltzke-Schlieker W., Maibier M., Becker O., Stockmann M., Pratschke J., Aigner F. Expressionsanalyse des neuen inflammatorischen Regulators FNDC4 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und kolorektalem Karzinom. Viszeralmedizin 2017, Dresden, 15.09.2017

* Vortragender

5. Wuensch T., Heucke N., **Wizenty J.**, Quint J., Sinn B., Arsenic R, Kaffarnik M., Jara M., Pratschke J., Stockmann M. Untersuchung der hepatischen CYP1A2-Aktivität im gesunden und krankhaft veränderten Lebergewebe, Viszeralmedizin 2018, München, 14.09.2018

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Zunächst gilt ein herzlicher Dank meinem Doktorvater PD Dr. med. Felix Aigner, der mir diese Promotion ermöglicht hat und mich bereits seit der ebenfalls bei ihm durchgeführten Hausarbeit im 6. Semester wissenschaftlich fördert.

Ganz besonders möchte ich meinem Betreuer Dr. rer. nat. Tilo Wunsch danken, der mir das Handwerkszeug für die Laborarbeit von Beginn an gezeigt hat und der meinen Fragen und Anregungen jederzeit offen gegenüberstand.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der „Workgroup for the liver“ sowie der experimentellen Chirurgie für die wissenschaftliche Plattform, den wissenschaftlichen Diskurs sowie das Bereitstellen von Laborräumen und -ausstattung. Hier möchte ich noch explizit meinem Studien- und Forschungskollegen Niklas Heucke für die schöne Zeit danken.

Außerdem danke ich sämtlichen Co-Autoren der hier vorgestellten Originalarbeiten, insbesondere den Operateuren und Endoskopikern für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt gilt ein besonderer Dank meiner Familie und meiner Freundin Teresa Schumann für das aufrichtige Interesse an meiner Forschung und die stetige Unterstützung während der Promotionsjahre.