

AUS DER KLINIK FÜR ALLGEMEINE, VISZERAL-, UND

TRANSPLANTATIONSCHIRURGIE DER

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. J. WERNER



NEURONALE SIGNALWEGE IN DER ENTSTEHUNG UND PROGRESSION

GASTROINTESTINALER TUMORE UNTER BESONDERER

BERÜCKSICHTIGUNG DES DUKTALEN PANKREASKARZINOMS

HABILITATIONSSCHRIFT

FÜR DAS FACH CHIRURGIE

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

VORGELEGT VON DR. MED. BERNHARD WILLIBALD RENZ

2018

<b>I EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
<b>II TEILPROJEKTE UND SIGNIFIKANZ .....</b>	<b>9</b>
II.1.1 Renz et al., <i>Cancer Cell</i> 2018.....	10
II.1.2 Renz et al., <i>Cancer Discov</i> 2018.....	18
II.1.3 Zhao,..., Renz et al., <i>Science Transl Med</i> 2014.....	24
II.1.4 Hayakawa,..., Renz et. <i>Cancer Cell</i> 2017 .....	30
<b>III ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>37</b>
<b>IV LITERATUR .....</b>	<b>40</b>
<b>V ORIGINALARBEITEN.....</b>	<b>45</b>

## I Einleitung

Die soliden Tumore des Gastrointestinaltraktes und des hepatopankreatobiliären Systems gehören zu den häufigsten Tumorerkrankungen des Menschen. In den meisten Fällen stellt die chirurgische Resektion die einzige potentielle Chance auf Heilung dar. Die verschiedenen Tumorentitäten unterscheiden sich allerdings bezüglich ihrer Aggressivität und dadurch auch im Hinblick auf die Resektabilität.

Das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) hat nach wie vor eine 5-Jahres Überlebensrate von nur 7-8% und wird bis 2030 sowohl in den USA als auch in Deutschland von aktuell vierter an die zweite Stelle der krebsbedingten Todesfälle gerückt sein (Quante et al., 2016; Rahib et al., 2014). Während die Überlebensraten für Patienten mit anderen gastrointestinalen Malignomen kontinuierlich über die letzten 30 Jahre angestiegen sind, hat sich in diesem Zeitraum das Überleben von Pankreaskarzinopatienten nicht signifikant verändert (J. Ma, Siegel, & Jemal, 2013). Mit wenigen spezifischen Symptomen und keinem zuverlässigen Test zur frühen Detektion, wird das PDAC typischerweise in einem lokal fortgeschrittenem oder bereits metastasiertem Stadium diagnostiziert (Werner et al., 2013). Dies führt dazu, dass sich nach einem sorgfältigem Staging lediglich 15-20% der Patienten für eine primäre Resektion qualifizieren (Neoptolemos et al., 2018). Selbst nach einer potentiell kurativen Resektion entwickeln allerdings die meisten Patienten ein Rezidiv und daher beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate sogar nach vollständiger Resektion lediglich 26% (Neoptolemos et al., 2018). Im metastasierten Stadium haben FOLFIRINOX (Conroy et al., 2011) und Nab-Paclitaxel-Gemcitabine (Hoff et al., 2013) einen Überlebensvorteil gezeigt und sind dementsprechend der Behandlungsstandard für geeignete Patienten in einem guten Allgemeinzustand. Das Gesamtüberleben bleibt allerdings auch in dieser hochselektiven Behandlungskohorte unbefriedigend.

Das Magenkarzinom hingegen ist weltweit der fünfhäufigste bösartige Tumor und steht an dritter Stelle der krebsbedingten Todesursachen. Wie in anderen Teilen der westlichen Welt

nimmt die Inzidenz auch in Deutschland, Österreich und der Schweiz in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich ab. Männer sind doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Eine kleine Gruppe von Patienten hat ein hereditäres Risiko. Zu den erworbenen Risikofaktoren gehört eine Helicobacter-pylori-Infektion der Magenschleimhaut. Ein bevölkerungsbezogenes endoskopisches Screening zum Nachweis von Magenfrühkarzinomen wird für Deutschland derzeit nicht empfohlen. Die Prognose der Patienten hängt vor allem vom Stadium, aber auch von Histologie, Allgemeinzustand und Komorbidität ab. In frühen und lokal begrenzten Stadien ist der Therapieanspruch kurativ, im metastasierten Stadium palliativ. Bei einem kurativen Therapieansatz stellt die chirurgische Resektion, eingebettet in ein multimodales Behandlungskonzept, den Mittelpunkt des Therapiekonzeptes dar. Trotz einiger Fortschritte in den letzten 10 Jahren ist die 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 25% (Siegel, Miller, & Jemal, 2018) immer noch schlecht.

Das Nervensystem besitzt theoretisch das Potential die Tumorprogression sowohl indirekt durch die Modulation des Immunsystems, des Tumormetabolismus, der Angiogenese und durch stromale Wechselwirkungen als auch direkt durch Effekte auf Tumorzellen, zu beeinflussen (Magnon et al., 2013; Zahalka et al., 2017). Des Weiteren wird das Nervensystem als zentraler Regulator von sowohl regulärer Stammzellfunktion als auch bösartigem Tumorwachstum in verschiedenen Geweben erkannt (Monje, 2017). Im pathologischen Kontext werden Neurone zunehmend als ein bedeutendes Element der Mikroumgebung mehrerer Krebsarten wahrgenommen. Dies trifft insbesondere für die Prostata (Magnon et al., 2013; Zahalka et al., 2017), Haut (Peterson et al., 2015), Magen (Hayakawa & Wang, 2017; Hayakawa et al., 2017; Zhao et al., 2014) und das Pankreas zu (Partecke et al., 2017; Renz, Takahashi, et al., 2018a; Renz, Tanaka, et al., 2018b; Saloman et al., 2016; Stopczynski et al., 2014). Hinzu kommt eine wachsende Evidenz für das Vorliegen von ausgeprägten Wechselwirkungen (crosstalk) zwischen Tumorzellen und Nerven, bei denen insbesondere Tumorzellen die Fähigkeit besitzen, aktiv die Axonogenese zu induzieren (Albo et al., 2011; Ayala et al., 2008; Hayakawa & Wang, 2017; Renz, Takahashi, et al., 2018a). In vielen Fällen scheinen Nerven das Tumorwachstum tatsächlich zu fördern, wobei der Effekt des neuronalen Inputs höchstwahrscheinlich tumorspezifisch ist. Dies

wiederum dürfte größtenteils durch spezifische Tumorzell-Nerveninteraktionen beeinflusst sein. Der Magen im Besonderen ist vornehmlich durch das parasympathische Nervensystem reguliert. In diesem Zusammenhang konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass eine Vagotomie die Dicke der gastralnen Mukosa und die zelluläre Proliferation verringert (Axelson, Ekelund, Håkanson, & Sundler, 1988; Håkanson, Vallgren, Ekelund, Rehfeld, & Sundler, 1984). Eine epidemiologische Studie stellte dar, dass das Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken [standardized incidence ratio (SIR)] in den ersten 10 Jahren nach Vagotomie nicht verringert ist. Allerdings war nach 20 Jahren das Risiko um 50% reduziert (SIR 0.5) (Bahmanyar, Ye, Dickman, & Nyrén, 2007; Lundegårdh, Ekbom, McLaughlin, & Nyrén, 1994). Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit der Effekt einer cholinergen Denervation des Magens auf die Entstehung und Progression des Magenkarzinoms in mehreren genetisch veränderten Mausmodellen (genetically engineered mouse model, GEMM) untersucht. In einer Folgearbeit wurden dann die Effekte von cholinergen Signalwegen auf das Tumorstammzellkompartiment im Magenkarzinom weiter untersucht.

Zusätzlich zu den direkten Effekten auf epitheliale Zellen wurde gezeigt, dass Nerven auch indirekt durch Effekte im Tumorstroma oder in der Mikroumgebung das Tumorwachstum beeinflussen können (Magnon et al., 2013; Zahalka et al., 2017). So fördern, beispielsweise in Mausmodellen des Prostatakarzinoms, cholinerge Signale durch den muskarinergen Rezeptor 1 (CHRM1) transduziert auf stromale Zellen die Tumorinvasion (Zahalka et al., 2017).

Wie viele andere solide Organe ist auch die Bauchspeicheldrüse sowohl von sympathischen als auch parasympathischen Nervenfasern innerviert, die für die Organentwicklung und die physiologische pankreatische Funktion von Bedeutung sind (Borden, Houtz, Leach, & Kuruvilla, 2013; Holmgren & Olsson, 2011).

Hierbei ist es wichtig zu bedenken, dass im Gegensatz zum gesunden Pankreasgewebe das PDAC durch eine erhöhte neuronale Dichte, eine ausgeprägte neuronale Hypertrophie und Überexpression von Norepinephrin (NE) gekennzeichnet ist. Dies lässt vermuten, dass PDAC

Zellen Nervenwachstum in ihrer Mikroumgebung stimulieren (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009a; Ceyhan, Demir, et al., 2009b). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen Nervenwachstum fördern können, mutmaßlich durch die Sekretion von Neurotrophinen wie nerve growth factor (NGF), brain derived nerve growth factor (BDNF) und neurotrophins 3 and 4 (NT3 und 4) (Griffin, Faulkner, Jobling, & Hondermarck, 2018). Neurotrophine sind eine Familie von hoch konservierten Polypeptiden, die Nervenwachstum stimulieren, axonale Orientierung (axonal guidance) lenken, synaptische Plastizität vermitteln und vor Verletzung schützen (Bapat, Munoz, Hoff, & Han, 2016). Das PDAC zeichnet sich auch durch eine ausgeprägte intra- und extrapankreatische perineurale Invasion durch Krebszellen aus, die in 71%-100% der resezierten Tumoren (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009a; Liebl et al., 2014; Nakao, Harada, Nonami, Kaneko, & Takagi, 1996) nachgewiesen werden kann. Der Grad der neuronalen Invasion wiederum korreliert mit einem schlechten Überleben der Patienten (Bockman, Büchler, & Beger, 1994; Esposito et al., 2008). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die lokale Sekretion von Neurotransmittern eine modulatorische Rolle in der Entwicklung des PDAC spielt.

Wie oben erwähnt zeigt sich, dass das PDAC oftmals refraktär gegenüber den meisten aktuellen Behandlungsmodalitäten, einschließlich der chirurgischen Resektion, verschiedenen chemotherapeutischen Regimen und der Strahlentherapie. In dem Versagen der existierenden, gegen den Tumor gerichteten Behandlungsoptionen, spiegelt sich teilweise die große Bedeutung des umgebenden Stromas in der Progression des PDAC wider (Demir, Friess, & Ceyhan, 2012; Feig et al., 2012; Ozdemir et al., 2014; Rhim et al., 2014). PDACs interagieren mit einem komplexen desmoplastischen Stroma, welches Immunzellen, endotheliale Zellen, Stern-Zellen, Matrixproteine und Nerven beinhaltet. Nerven im Besonderen stellen eine wichtige Ressource für Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren dar (Apte & Wilson, 2012; Demir et al., 2012; Hamada, Masamune, & Shimosegawa, 2013). Aus diesen Gründen werden neue und effektive Therapiestrategien benötigt, die nicht nur die malignen, epithelialen Zellen, sondern auch die Schlüsselkomponenten des umgebenden Stromas zielgerichtet attackieren.

Zu den bekannten Risikofaktoren des PDAC zählen Tabakkonsum, Fettleibigkeit und bestimmte genetische Prädispositionen. Des Weiteren scheinen Patienten, die vermehrt psychologischem

Stress (Distress) ausgesetzt sind, unter bestimmten Voraussetzungen, ein erhöhtes Risiko zu haben an einem PDAC zu erkranken. Hinzu kommt, dass in Patienten, bei denen die Diagnose eines PDAC gestellt wurde, höhere Distress-Levels nachzuweisen sind als bei Patienten, bei denen ein anderes Malignom diagnostiziert wurde (Clark, Loscalzo, Trask, Zabora, & Philip, 2010). Interessanterweise wurde diese Assoziation schon seit Jahrzehnten vermutet, die zugrundeliegenden Mechanismen, die das erhöhte Risiko für die Entwicklung eines PDAC in Individuen mit erhöhten Stresslevels erklären könnten, sind aber bislang nicht verstanden. Auch in orthotopen Mausmodellen gab es erste Hinweise auf eine negative Auswirkung von chronischem Stress auf das Tumorwachstum im PDAC (Kim-Fuchs et al., 2014; Partecke et al., 2016). Aus diesem Grund wurde die Rolle der adrenergen Signaltransduktion in dieser Arbeit untersucht. Hierzu wurden die in den letzten Jahren in der Pankreaskarzinomforschung entwickelten GEMMs verwendet, welche bereits eingesetzt wurden um die Pathophysiologie der Erkrankungen des exokrinen und endokrinen Pankreas besser zu verstehen (Westphalen & Olive, 2012). Im Weiteren wurden ebenfalls neue Mausmodelle im Rahmen dieser Arbeiten generiert.

In klinischen Arbeiten konnten erste Hinweise detektiert werden, die dafür sprechen, dass vagale Signale die pankreatische Tumorprogression unterdrücken (De Couck, Maréchal, Moorthamers, Van Laethem, & Gidron, 2016). Dementsprechend korrelierte eine höhere vagale Aktivität, gemessen an einer höheren Herzfrequenzvariabilität, mit einem signifikant geringeren Risiko an einem metastasiertem PDAC zu versterben. Diese Ergebnisse suggerieren eine mögliche neuronale Protektionsfunktion in dieser fatalen Erkrankung (De Couck et al., 2016). Interessanterweise konnte eine höhere PDAC Inzidenz in Patienten gefunden werden, bei denen in der Vergangenheit eine Vagotomie zur Behandlung der gastralnen Ulkuserkrankung durchgeführt wurde (De Couck, Mravec, & Gidron, 2012). In ähnlicher Weise zeigte eine Studie in orthotopen und syngenen PDAC Mausmodellen, dass die subdiaphragmale Vagotomie das Tumorwachstum fördert und das Gesamtüberleben verkürzt, obwohl diese Resultate größtenteils durch indirekte Effekte auf Tumor-assoziierte Makrophagen und erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel zurückgeführt wurden (Partecke et al., 2017). Trotz der Tatsache, dass diese früheren Studien

eine suppressive Funktion der vagalen Signalwege in einigen Tumormodellen vorgeschlagen haben, wurde weder die direkte Rolle des cholinergen Signalwegs in GEMMs oder Metastasierungsmodellen des PDAC noch der zu Grunde liegende Mechanismus bisher untersucht.

## II Teilprojekte und Signifikanz

Die Entitäten des Pankreaskarzinoms und des Magenkarzinoms sind häufige Tumorentitäten, bei denen die chirurgische Resektion, wenn der Primärtumor respektabel ist, die zentrale Rolle spielt.

Die Chirurgie muss dann in ein multimodales Behandlungskonzept eingebunden werden. Trotz der chirurgischen Resektion besteht allerdings in vielen Fällen ein hohes Rezidiv- und Metastasierungsrisiko. Hinzu kommt, dass eine Heilung in der metastasierten Situation praktisch unmöglich ist. Dementsprechend liegt hier ein erheblicher Forschungsbedarf sowohl bei adjuvanten und palliativen Therapieverfahren als auch im besseren Verständnis der Biologie dieser Erkrankungen vor, um weitere potentielle therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren und entsprechende Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Die hier vorliegende kumulative Habilitationsschrift beschäftigt sich mit dem Einfluss des autonomen Nervensystems auf die Initiierung und Progression des Pankreas und Magenkarzinoms. Die Schrift setzt sich aus Arbeiten zusammen, bei denen zum einen die Rolle des autonomen Nervensystems (Sympathikus und Parasympathikus) in der Initiierung und Progression des PDACs und zum anderen die Rolle des N. vagus in der Entwicklung des Magenkarzinoms untersucht wurden. Hierzu wurden aktuellste *in vitro* Methoden verwendet und teilweise neue GEMMs für *in vivo* Untersuchungen entwickelt. Im Rahmen der Arbeiten wurden einige dieser GEMMs neu generiert.

Aufgeführt werden hier die vier wichtigsten Arbeiten des Autors aus dem Bereich der Tumorneurobiologie.

## II.1 Adrenerge Signalwege in der Entstehung und Progression des PDAC

(Renz et al. Cancer Cell 2018)

### II.1.1 Signifikanz

Diese Arbeit untersucht den Einfluss von neuropsychologischen Stress und die extensiven Wechselwirkungen zwischen Krebszellen und sympathischen Nerven. Hierbei sind der adrenerge beta2-Rezeptor (ADRB2) und NGF-BDNF/Trk Signalwege entscheidende Elemente in der PDAC Biologie. Die zielgerichtete Therapie dieser adrenergen und neurotrophinergen Signalwege könnte sich als hilfreich in der Behandlung des PDAC erweisen.

#### II.1.1.1 *Chronischer neuropsychologischer Stress fördert die Kras-induzierte Tumorgenese*

Um die Effekte von systemischen Katecholaminen auf die Progression von pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN) und damit die Initiierung des PDAC zu untersuchen, wurden genetische veränderte KC (*Kras*<sup>+/LSL-G12D</sup>; *Pdx-1-Cre*) Mäuse verwendet. Diese wurden in einem etablierten Modell chronischem Stress (CRS) ausgesetzt, der bekanntermaßen zum Anstieg der systemischen Katecholaminspiegel führt (Hassan et al., 2013; Thaker et al., 2006). Histopathologische Untersuchungen der Pankreaten nach 20 Wochen zeigten, dass 38% der gestressten KC-Mäuse PDACs entwickelten, während die Kontrollgruppe keine PDACs aufwies ( $p<0.00019$  ( $n=13$ )). Es ist wichtig zu erwähnen, dass in der Regel Karzinome in KC Mäusen erst nach etwa 2-2,5 Jahren entstehen (Hingorani et al., 2003). Damit konnte demonstriert werden, dass chronischer Stress die Progression von frühen PanIN Läsionen zu fortgeschrittenen PanIN Läsionen und PDAC in einem onkogenen Kras Setting fördert.

Über den adrenergen beta2 Rezeptor (ADRB2) wurde berichtet, dass er ein wichtiger Mediator in Stress-induzierten Tumoren darstellt (Chang et al., 2016). In den hier dargestellten Untersuchungen konnte auch eine signifikant höhere Expression der ADRB2 mRNA in Pankreaten von KC- Mäusen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde eine Gruppe der gestressten KC Mäuse vor der Stress Applikation mit einem spezifischen ADRB2 Blocker (ICI 118,551) behandelt. Hierdurch konnte die PDAC Inzidenz wiederum signifikant gesenkt werden und war somit mit

der Inzidenz der Kontrollgruppe vergleichbar war ( $p<0.0001$ ). Um zu untersuchen, ob ein Agonist am adrenergen beta-Rezeptor ebenfalls in der Lage ist, die stress-induzierten Effekte auszulösen, wurden KC Mäuse über einen Zeitraum von 13-14 Wochen mit Isoproterenol (ISO) behandelt. Hierdurch konnte in 77% der Tiere ein murines PDAC induziert werden ( $p<0.0001$ ) ( $n=11$ ). Im Gegensatz dazu zeigten gestresste KC Mäuse mit einem ADRB2 KO in nur 12% ein PDAC ( $p<0.0001$ ) ( $n=8$ ). Um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen, wurden KC Mäuse Stress ausgesetzt, nachdem sie beidseits adrenalektomiert (ADx) wurden ( $n=11$ ). Hier zeigte sich ein Phänotyp, welcher vergleichbar zur ungestressten Kontrollgruppe und zu den mit ICI 118,551 behandelten Tieren war. Wie oben erwähnt zeichnet sich das humane PDAC durch ausgeprägte neuropathologische Veränderungen aus (Demir, Friess, & Ceyhan, 2015). Wir konnten in unseren Untersuchungen auch zeigen, dass es stressinduziert in den KC Mäusen zu einem Anstieg der neuronalen Dichte kommt und dies partiell durch die Aktivierung des ADRB2 erfolgt.

#### ***II.1.1.2 Blockade des ADRB2 verlängert das Gesamtüberleben von KPC Mäusen signifikant***

Im Folgenden wurde die Rolle der Nerven und des ADRB2 in etablierten PDAC Läsionen untersucht. Hierzu wurden KPC- Mäuse (*Kras<sup>+/LSL-G12D</sup>; p53<sup>+/R172H</sup>; Pdx-1-Cre*) verwendet, die die humane Erkrankung in vielen Aspekten relativ akkurat widerspiegeln (Hingorani et al., 2005). KPC Tumore zeigten eine signifikant höhere Expression des ADRB2 und neuropathologische Veränderungen, die mit denen des humanen PDAC vergleichbar sind (Ceyhan, Bergmann, et al., 2009a; Stopczynski et al., 2014).

Durch die Verwendung des pan-neuronalen Markers Peripherin war es möglich, die Verteilung der neuronalen Strukturen zu untersuchen und die Dichte der intrapankreatischen Nerven zu quantifizieren. Wir konnten hierbei herausarbeiten, dass eine Progression des Tumors mit einer intratumoralen Zunahme an neuronalen Strukturen in diesem PDAC Model einhergeht.

In fortgeschrittenen KPC Tumoren war auch perineurale Invasion zu detektieren. Eine Quantifizierung der intrapankreatischen Nerven mit einer sympathischen Qualität, welche sich mit einem Antikörper gegen die Tyrosin-Hydroxylase (TH) färben lassen und Norepinephrin (NE)

sezernieren, zeigte ebenfalls eine signifikant größere Fläche an positiven Strukturen im Vergleich zu Wild-Typ (WT)-Pankreata.

Um den sympathischen Input in den Tumor zur blockieren, verabreichten wir KPC Mäusen zusätzlich zu Gemcitabine (GEM) ICI118,551, wenn diese sonographisch nachgewiesen ein murines PDAC von 20-60mm<sup>3</sup> entwickelt hatten. Diese Behandlung verlängerte das Gesamtüberleben der Mäuse signifikant von 18 Tagen in der GEM Gruppe (n=16) auf 31 Tage in der GEM+ICI Gruppe (n=16; p=0.0038). Aus diesen Daten konnten wir schlussfolgern, dass adrenerge Signalwege, insbesondere vermittelt durch den ADRB2, eine bedeutsame Rolle in der Tumorgenese von KPC Mäusen spielen.

Um den Einfluss der lokalen Nerven, im Gegensatz zu den systemischen Kathecholaminen zu untersuchen, wurde in Pankreata von KPC Mäusen chirurgisch eine sympathische Denervation vorgenommen (Gx), wenn die Tumoren eine Größe von 20-60mm<sup>3</sup> erreicht hatten. Auch bei diesen Mäusen führte die Kombination von Gx+GEM zu einem signifikant längeren Gesamtüberleben im Vergleich zur Kontrollgruppe (GEM) (18 vs. 36 Tage). Hieraus kann gefolgert werden, dass auch die lokal sezernierten Kathecholamine zur Progression etablierter Tumore beitragen. Um im Weiteren die Frage zu untersuchen, ob Nervenwachstum und dadurch die lokale Anflutung von Kathecholaminen durch adrenerge Signalwege selbst induziert ist, quantifizierten wir die Peripherin-positiven Strukturen in KPC Mäusen, welche mit GEM, GEM+ICI und GEM+Gx behandelt wurden. Der Anteil der Peripherin-positiven Strukturen war signifikant reduziert in den GEM + ICI (p=0.0454) und den GEM + Gx (p=0.0129) Gruppen. Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass das Auswachsen von Nerven in der Pankreaskarzinogenese, zumindest teilweise, in Abhängigkeit des ADRB2 Signalwegs geschieht.

#### ***II.1.1.3 Kathecholamine fördern die azinäre-zu-duktaler Metaplasie (ADM) und haben einen proliferativen Einfluss auf die Tumorzellen***

Um die zu Grunde liegenden Mechanismen, durch die adrenerge Signalwege die Entwicklung des PDAC fördern, zu verstehen, wurden onkogen *Kras* mutierte 3D Organoide aus azinären Zellen

generiert und untersucht. Dieses etablierte *in vitro* System repräsentiert die ADM (Collins, Yan, Sebolt-Leopold, & Pasca di Magliano, 2014), was vermutlich den ersten Schritt in der Pankreaskarzinogense darstellt (Kopp et al., 2012). *Kras* mutierte Organoide wurden von LSL-*Kras*<sup>+/LSL-G12D</sup> Pankreata dadurch gewonnen, dass sie mit einer adenoviralen Cre-Rekombinase (Adeno-Cre) infiziert wurden. Kulturen, die daraufhin mit ISO behandelt wurden formten signifikant mehr Organoide als die Kontrollgruppen.

Dieser stimulatorische Effekt von ISO war durch eine Vorbehandlung mit dem nicht-selektiven Betablocker Propranolol und ICI blockierbar, aber nicht durch den beta1-selektiven Blocker Atenolol. Um diese ADRB2-abhängigen Beobachtungen zu validieren, wurden LSL-*Kras*<sup>+/LSL-G12D;Adrb2</sup> KO Organoide nach Adeno-Cre Infektion untersucht. Hier zeigte sich dieser stimulatorische Effekt auf die Organoide nach ISO Behandlung nicht mehr.

ADRB2 ist ein Gs-gekoppelter 7-transmembran Rezeptor, der den Phosphokinase A (PKA)- und den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg aktiviert (Lorton & Bellinger, 2015). Aus diesem Grund wurden die Kulturen mit einem PKA Inhibitor (KT5720) und/oder einem MAPK/ERK Kinase (MEK) Inhibitor (U0126) behandelt. Der MEK Inhibitor inhibierte die Spherenformation sogar unter die Basalrate, was durch die PKA Inhibition nicht möglich war. Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Aktivierung des PKA Signalwegs primär für den direkten Effekt der vermehrten Spherenformation verantwortlich ist und lassen vermuten, dass weitere wichtige Aktivierungsmöglichkeiten von MEK, zusätzlich zu den adrenergen Signalen, bestehen.

Nun entwickelten wir ein *in vitro* System, um den Effekt der lokalen Kathecholamin Sekretion während der ADM untersuchen zu können. Hierzu adaptierten wir ein in Matrigel eingebettetes Kultursystem (Ceyhan et al., 2008). Dabei wurden embryonale Hinterhornwurzelganglien (*dorsal root ganglia*, DRG) neben *Kras* mutierte Organoide platziert und mit einer Matrigelbrücke verbunden.

Nach 7 Tagen zeigten sich signifikant mehr Spheren in DRG-Co-Kulturen als in den Kontrollen. Dieses vermehrte Wachstum ließ sich durch eine Vorbehandlung mit dem selektiven ADRB2 Blocker ICI unterbinden.

Diese Studien haben die Effekte des ADRB2-Signalwegs auf prä-neoplastisches Gewebe gezeigt; deshalb wurden in einem nächsten Schritt die Auswirkungen auf etablierte humane PDAC Zelllinien (BxPC-3, Mia PaCa-2, und Panc-1), von denen bekannt ist, dass sie ADRB1 und ADRB2 exprimieren (D. Zhang, Ma, Hu, & Zhang, 2010), untersucht. Nachdem wir die Expression der beiden Rezeptoren sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene bestätigen konnten, zeigte sich ein proliferativer Effekt von ISO auf diese Zelllinien, der durch Propranolol und ICI, aber nicht durch Atenolol inhibiert werden konnte. In weiteren Studien ließ sich nachweisen, dass die *phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK)/ERK Ratio* und die *phosphorylated cAMP response element binding protein (pCREB)/CREB Ratio* nach ISO und Norepinephrin (NE) Behandlung anstiegen, ein Effekt, der sich durch ICI Vorbehandlung aufheben ließ.

#### ***II.1.1.4 Über adrenerge Signalwege wird eine gesteigerte Neurotrophin-Sekretion induziert und die PDAC Entwicklung durch Tumor-assoziierte Axonogenese gefördert***

Katecholamine interagieren direkt mit Tumorzellen und der Anstieg des systemischen Levels an Epinephrin führte, wie oben erwähnt, zu einem Anstieg der neuronalen Dichte in Pankreata von KC Mäusen. Wir hypothesierten, dass Katecholamine die Nerv-Tumor Interaktionen durch Induktion von Neurotrophinen (NT) in einer Vorwärtsschleife beeinflussen. Aus diesem Grund untersuchten wir die NT-Expression in epithelialen Zellen (EpCAM<sup>+</sup>) aus KPC Tumoren, welche für EpCAM<sup>+</sup> und EpCAM<sup>-</sup> Zellen sortiert wurden. Diese Analyse zeigte, dass neben Genen, die für verschiedene NTs/ axonale guidance Proteine kodieren, *Ngf* die höchsten Expressionslevels hatte. Die Expression von anderen Genen, die für NTs kodieren (*Bdnf*, *Ntf3* und *Ntf4*), *Gdnf* und das axonale guidance Protein netrin1 (*Ntn1*) waren detektierbar, aber sehr viel niedriger exprimiert. *Ngf* war während der Karzinogense mit einem moderaten Anstieg in Pankreata mit PanIN Läsionen von KC Mäusen und einem deutlich höherem Level in KPC Tumoren exprimiert. Um zu

untersuchen ob Kathecholamine die NGF Sekretion von PDAC Zellen regulieren, wurden KPC Tumorzellen (K8282) mit NE behandelt. Höhere Konzentrationen von NE resultierten in einem dosis-abhängigen Anstieg der *Ngf* mRNA Expression. ELISA Untersuchungen bestätigten diese Beobachtung, so dass die NE Behandlung der Zellen zu einer vermehrten NGF Sekretion führte, ein Phänomen welches durch die Vorbehandlung mit ICI, Propranolol, KT5720 und U0126 reversibel war. Diese Ergebnisse bestätigen wiederum eine Rolle für PKA und ERK Signalwege in der kathecholamin- abhängigen NGF Sekretion.

Um die biologische Relevanz der Kathecholamin-induzierten NGF Sekretion zu beurteilen, wurden das oben beschrieben Co-Kultur-Modell mit PDAC Zellen und DRGs verwendet und das Auswachsen der Neuriten mittels konfokaler Mikroskopie quantifiziert. Die Behandlung von PDAC Zellen/DRG Co-Kultur Systemen mit ISO führte zu einer deutlichen Beschleunigung des Auswachsens der Neuriten aus DRGs nach 4, 6 und 10 Tagen. Eine Vorbehandlung mit ICI blockierte das Auswachsen nahezu vollständig am Tag 10. Diese Ergebnisse legen die Interpretation nahe, dass eine ADRB2-abhängige vermehrte Sekretion von NGF zu einer Nerv-Tumor Interaktion durch Axonogenese beiträgt.

In einem nächsten Schritt wurden KC Mäuse zu neu entwickelten *Rosa26-LSL-Ngf-IRES-eGFP* (N) knock-in Mäusen (Hayakawa et al., 2017) gekreuzt, um KC Mäuse zu erhalten, die pankreasspezifisch *Ngf* überexprimieren (KCN). Die Analyse dieser KCN Tiere zeigte deutlich mehr intrapankreatisches neuronales Gewebe im Allgemeinen und deutlich mehr TH<sup>+</sup>- Strukturen im Speziellen.

Als *Rosa26-LSL-Ngf-IRES-eGFP* Mäuse zu KPC Mäusen gekreuzt wurden um KPCN zu generieren, führte die *Ngf* Überexpression zu einer deutlich ausgeprägteren peri- und endoneuronalen Invasion und vergrößerten intratumoralen Nerven. Des Weiteren war das mediane Gesamtüberleben dieser Tiere signifikant kürzer als das von regulären KPC Mäusen (13 Wochen vs. 19 Wochen).

### **II.1.1.5 Die Blockierung des NGF/Trk Signalwegs inhibiert Proliferation und Innervation von PDAC-Zellen und führt zu einem längeren Gesamtüberleben in KPC Mäusen**

Um den Einfluss der erhöhten NGF Spiegel auf die Progression des PDAC zu untersuchen, verwendeten wir den pan-TRK Inhibitor PLX-7486 (PLX) (Hayakawa et al., 2017). Für NGF konnte gezeigt werden, dass es die Proliferation von PDAC Zellen stimuliert (Dang, Zhang, Ma, & Shimahara, 2006) und dass die NGF/TRK-A Interaktion wichtig für das Tumorwachstum und die Invasion im PDAC ist (Zhu et al., 1999). Wir konnten in diesem Zusammenhang darlegen, dass murine PDAC Zellen ebenfalls TRK- Rezeptoren exprimieren und PLX in der Lage ist den NGF-abhängige Proliferationstimulus zu blockieren. Dies ist ein Hinweis auf einen direkten Effekt von NGF auf das Tumorwachstum.

Die Effekte von PLX auf die Inzidenz und das Tumorwachstum von PDAC wurden in zwei Mausmodellen untersucht (KC und KPC), in denen Trk-Rezeptoren exprimiert sind. Cerulein behandelte KC Mäuse wurden als ein zusätzliches Modell verwendet, weil die ausgeprägte Inflammation die PADC Progression deutlich beschleunigt. In diesem Inflammations-getriebenen Modell zeigte PLX eine deutliche Reduktion der Krebsinzidenz von 60% auf 10% nach 24 Wochen ( $p<0.05$ ). Des Weiteren führten wir eine Überlebensstudie mit KPC Mäusen durch. Die Kombination von GEM und PLX verlängerte das Gesamtüberleben von 32 auf 45 Tage ( $p<0.005$ ). Die Quantifizierung der intratumoralen Nerven erbrachte signifikant weniger neuronaler Strukturen in KPC Mäusen, die mit GEM PLX behandelt wurden, ein Ergebnis, welches mit einer Reduktion des NGF Effektes einhergeht.

### **II.1.1.6 Nicht selektive Betablocker verlängern das Gesamtüberleben in Patienten nach PDAC**

#### ***Resektion***

Um die Relevanz des ADRB2-Signalwegs im humanen PDAC herauszuarbeiten, wurden primäre PDAC Organoide von Patienten generiert und untersucht. Nach 6 Tagen Behandlung mit GEM zeigten diese weniger sog. *relative light units* (RLU) als die Kontrollen ( $p<0.0001$ ). Die Behandlung mit Propranolol, einem nicht-selektiven Betablocker führte ebenfalls zu einem signifikanten

Abfall der RLU ( $p=0.0002$ ). Durch die Kombination von Propranolol und GEM konnte dies noch verstärkt werden ( $p=0.0071$ ). Diese Ergebnisse konnten durch die Behandlung mit dem beta2-selektiven Medikament ICI118,551, aber nicht durch Atenolol, einem selektiven Antagonisten am beta1-Rezeptor, reproduziert werden.

Um die klinische Bedeutung dieser Daten weiter zu untersuchen, wurde das Überleben einer Kohorte von insgesamt 631 resezierten PDAC Patienten retrospektiv analysiert. Hierbei zeigte sich, dass Patienten, die keine Betablocker in ihrer Medikation hatten ein medianes Gesamtüberleben von 23 Monaten aufwiesen. Patienten, die einen selektiven beta1-Blocker erhielten, unterschieden sich hinsichtlich des Gesamtüberlebens nicht (20,3 Monate). Allerdings hatten die 17 Patienten, welche einen nicht-selektiven Betablocker einnahmen, ein medianes Überleben von 40 Monaten.

Interessanterweise zeigte sich auch in den Patienten mit einer nicht selektiven Betablockermedikation eine deutlich geringere neuronale Dichte in den PDACs. Sicherlich müssen diese Daten mit den Einschränkungen, die sich aus einer retrospektiven Analyse ergeben, betrachtet werden. Allerdings geben sie einen Hinweis auf die klinische Relevanz der erarbeiteten grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisse in dieser Arbeit.

## II.2 Rolle des cholinergen Signalwegs in der Entstehung und Progression des PDAC (Renz et al. Cancer Discov 2018)

### II.2.1 Signifikanz

Die subdiaphragmatische Vagotomie oder der Knockout des *Chrm1* Gens beschleunigen partiell durch die Expansion des Krebsstammzell (CSC)-Kompartiments die pankreatische Tumorigenese. Eine systemische Verabreichung eines muskarinergen Agonisten supprimiert die Tumorigenese durch MAPK und PI3K/AKT Signalwege sowohl in einem frühen Tumorstadium als auch in weiter fortgeschrittenen und metastasierten Stadien. Aus diesen Gründen stellt der CHRM1 eine attraktive therapeutische Zielstruktur dar.

#### II.2.1.1 Subdiaphragmatische Vagotomie beschleunigt die pankreatische Tumorigenese

KC Mäuse wurden einer subdiaphragmalen Vagotomie mit Pyloroplastie (KC+VxPP) in einem Alter von acht Wochen unterzogen (KC+VxPP). Diese Tiere wurden dann nach 12 Wochen analysiert. Die pankreatische mRNA Expression des *Chrm1* zeigte einen signifikanten Anstieg. Im Gegensatz dazu ergaben sich keine Unterschiede in der Expression der anderen muskarinergen Rezeptoren im Vergleich zur Kontrollgruppe (KC+PP). Diese Ergebnisse konnten auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die morphometrische Quantifizierung der PanIN Läsionen in Pankreata von KC+VxPP Mäusen ergab eine signifikant größere Fläche, welche durch PanIN Läsionen affektiert war, als in KC+PP Mäusen. In 40% der Fälle bildeten sich in der KC+VxPP sogar PDACs aus ( $p<0.005$ ). Wie bereits erwähnt, benötigen KC regulär mindestens 2 Jahre, um ein PDAC zu entwickeln.

Wenn Bethanechol, ein systemischer muskarinerger Agonist, den KC+VxPP verabreicht wurde, führte dies zur Aufhebung des Vagotomie Effektes.

Interessanterweise zeigten sich höhere Levels an CD44<sup>+</sup> Zellen in den Pankreata von KC+VxPP gegenüber denen von KC+PP Mäusen mit 20 Wochen ( $p < 0.05$ ). Auch dieser Effekt konnte durch Bethanechol verhindert werden.

Des Weiteren führte die subdiaphragmatische Vagotomie zu einem Anstieg des systemischen TNF- $\alpha$  Spiegels in KC+VxPP Mäusen verglichen mit den Kontrollen (KC+PP). Weitere Analysen des Immunzellkompartiments zeigten auch höhere Level an CD11b $^{+}$  myeloiden Zellen und F4/80 $^{+}$  Zellen in den Pankreata von KC+VxPP Mäusen im Vergleich zu KC+PP Mäusen. Resultate, die für eine ausgeprägtere inflammatorische Reaktion sprechen. Auch diese Ergebnisse konnten durch die Behandlung mit Bethanechol neutralisiert werden. Insgesamt implizieren diese Daten, dass die vagale Denervation im Fall einer onkogenen *Kras*-Mutation, die pankreatische Tumorigenese durch eine Expansion der CD44 $^{+}$  Zellen und potentiell durch eine ausgeprägtere Inflammation fördert.

#### ***II.2.1.2 Muskarinerge Stimulation supprimiert die pankreatische Tumorigenese und verlängert das Gesamtüberleben von KPC Mäusen***

Wenn KPC Mäuse mit Tumoren von einer Größe von 3-5mm entweder mit Gemcitabine (GEM) alleine oder GEM+Bethanechol behandelt wurden, konnte das Gesamtüberleben von 2 auf 48 Tage verlängert werden ( $p < 0.001$ ). Des Weiteren führte die zusätzliche Behandlung mit Bethanechol zu einer Supprimierung der pankreatischen CD44 Expression ( $p < 0.05$ ). Um diese CD44 $^{+}$  Population weiter zu charakterisieren, untersuchten wir CD44 $^{+}$ CD133 $^{+}$  doppelt positive Zellen in KPC Tumoren mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern in der Durchflusszytometrie. Sowohl diese doppelt positive Zellpopulation als auch die Analyse der dreifach positiven CD44 $^{+}$ CD24 $^{+}$ EpCAM $^{+}$  Population zeigte eine Reduktion in GEM+Bethanechol behandelten KPC Tumoren im Vergleich zur Kontrolle (GEM). Zusammengefasst implizieren diese Daten, dass muskarinerge Agonisten die pankreatische Tumorigenese partiell durch Suppression des Krebsstammzell (CSC)- Kompartiments unterdrücken.

#### ***II.2.1.3 Cholinerge Signalwege fördern die Zellproliferation in Kras-mutierten Spheren direkt durch CHRM1 und regulieren das Krebsstammzellkompartiment***

Um zu untersuchen, ob cholinerge Agonisten die Tumorentwicklung teilweise durch direkte Stimulation von muskarinergen Rezeptoren auf pankreatischen epithelialen Zellen supprimieren,

analysierten wir die Spheren-Formations-Kapazität von *Kras*<sup>G12D</sup> pankreatischen Azinuszellen in dem oben erwähnten etablierten 3D Matrikel Kultursystem. *Kras*<sup>G12D</sup> mutierte Spheren wurden mit dem nicht-selektiven muskarinergen Agonisten Pilocarpine, dem nicht-selektiven muskarinergen Antagonisten Scopolamine, dem CHRM1-selektiven Agonisten McN-34A oder dem CHRM1-selektiven Antagonisten Pirenzepine behandelt. Pilocarpine- oder McN-34A- behandelte *Kras* mutierte Zellkulturen formten signifikant weniger und kleinere Spheren, während Kulturen, die mit Scopolamine oder Pirenzepine behandelt wurden, mehr und größere Spheren formten. Wir untersuchten diese Effekte auch in einem 3D Organoidmodell von primären humanen PDACs. Hier zeigte sich nach einer 6-tägigen Behandlung mit zunehmenden Konzentrationen von Pilocarpine (6.25 - 400  $\mu$ M) ein dosisabhängiger Effekt, so dass zunehmend weniger Spheren zu detektieren waren.

Des Weiteren ließ sich in MTT Assays durch Pilocarpine die Zellviabilität von humanen (Panc1) und murinen (K8282) PDAC Zellen verringern, wohingegen muskarinerge Agonisten (Scopolamine und Pirenzepine) einen gegensätzlichen Effekt hatten. Diese Beobachtungen haben zur Generierung der Hypothese geführt, dass der CHRM1 hauptsächlich für den antiproliferativen Effekt der muskarinergen Agonisten verantwortlich ist.

In weiteren Experimenten sollte der potentielle Effekt von muskarinergen Agonisten auf das CSC Kompartiment untersucht werden. Hierzu wurden sog. Softagar-Experimente durchgeführt. In diesen Experimenten führte eine Pilocarpine Behandlung zu einer reduzierten Spherenformation und ließ den Schluss zu, dass muskarinerge Agonisten in humanen und murinen PDAC Zelllinien das CSC Kompartiment i.S. einer Supprimierung modulieren. Da die Analyse der CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> Population eine Verringerung dieser dreifach-positiven Zellen erbrachte, wurden Panc1 Zellen (25.000) nach Pilocarpine Behandlung subkutan in die Flanke von immuninkompetenten NOD/SCID Mäusen implantiert. Die Vorbehandlung der Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumorinzidenz in diesen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0.05$ ). Zusammengefasst lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass

eine Behandlung mit muskarinergen Agonisten einen supprimierenden Einfluss auf das pankreatische CSC-Kompartiment hat.

#### ***II.2.1.4 Muskarinerge Signalwege inhibieren die nachgeschaltete EGFR/MAPK und PI3K/AKT***

##### ***Signaltransduktion in PDAC Zellen***

Um die Mechanismen, welche durch die muskarinerge Agonisten die Progression des PDACs möglicherweise hemmen, zu untersuchen, führten wir eine RNAseq Analyse von Panc1 Zellen nach Pilocarpine Behandlung durch. Gene, die im Zusammenhang mit Proliferation und Wachstums gebracht werden, einschließlich EGFR und PI3K, wurden durch Pilocarpine herunterreguliert. Eine detailliertere Analyse legte die Vermutung eines möglichen Mechanismus der Tumorsuppression durch den PI3K-AKT und den MAPK Signalweg nahe.

Anschließend wurde die Expression der phosphorylierten Formen von Schlüsselproteinen der erwähnten Signalwege mittels IHC dargestellt. Die Expression von p-EGFR, p-PI3K, und p-ERK1/2 war signifikant höher in Pankreata von KC+VxPP als in KC+PP Mäusen ( $p < 0.05$ ) und annähernd verringert zu Kontrolllevels (KC+PP), wenn KC+VxPP Mäuse mit Bethanechol (KC+VxPP+bethanechol) behandelt wurden ( $p < 0.05$ ). Ähnliche Ergebnisse ließen sich auch erzielen, wenn Bethanechol behandelte KPC Mäuse mit Kontrollen verglichen wurden.

Western Blot Untersuchungen, die im Folgenden durchgeführt wurden, konnten die beschriebenen Effekte der parasympathischen Signaltransduktion *in vitro* an humanen und murinen PDAC Zelllinien bestätigen.

Im nächsten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob cholinerge Signaltransduktion den EGFR/MAPK Signalweg tatsächlich direkt reguliert. Zu diesem Zweck wurden Panc1 Zellen mit Scopolamine und anschließend mit dem MEK-Inhibitor Selumetinib (AZD6244) behandelt. Diese Experimente zeigten, dass der MEK-Inhibitor die durch Scopolamine bedingte ERK Phosphorylierung aufheben kann. Um die biologische Relevanz dieser Beobachtungen *in vivo* zu erforschen, wurde KC+VxPP Mäusen Selumetinib (KC+VxPP+Selumetinib) verabreicht. Es zeigte sich, dass durch den MEK Inhibitor die PanIN Progression, welche durch die Vagotomie induziert

wurde, unterdrückt wurde. Zusammengefasst scheinen muskarinerge Rezeptoren, zumindest partiell, durch die Inhibierung des MAPK-Signalwegs die Tumorprogression zu unterdrücken.

#### ***II.2.1.5 Knockout von CHRM1 resultiert in einer höheren Tumorinzidenz in KC Mäusen und einem kürzeren Gesamtüberleben in KPC Mäusen***

Da nicht-selektive und selektive CHRM1 Agonisten und Antagonisten die pankreatische Tumorigenese modulierten, sollte die Rolle des CHRM1 in der Entstehung des PDAC durch genetische Deletion des Rezeptors bestätigt werden. KC Mäuse wurden daher zu *Chrm1*-KO Mäusen gekreuzt, um KC/*Chrm1*-KO (KCM) zu erhalten (n = 11). In Anlehnung an die Effekte der Vagotomie war die PDAC Inzidenz in KCM Mäusen signifikant höher als in den Kontroll-KC Mäusen (36.7% vs. 0%; p < 0.05). Des Weiteren zeigte sich in der IHC eine signifikant höhere Expression von CD44, p-EGFR, p-PI3K und p-ERK1/2 in KCM Mäusen verglichen mit KC Mäusen (jeweils p < 0.05).

Anschließend wurden noch KPC zu *Chrm1*-KO Mäusen gekreuzt, um KPC/*Chrm1*-KO (KPCM) Mäuse (n = 13) zu generieren. Das mediane Gesamtüberleben in KPCM Mäusen war signifikant verkürzt im Vergleich zu regulären KPC Mäusen (n = 18; p < 0.001). Daher implizieren diese Daten, dass es durch den Verlust der CHRM1-Signaltransduktion zur Verstärkung der EGFR/MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege, vermehrter CD44 Expression und letztlich beschleunigter PDAC Progression kommt.

#### ***II.2.1.6 Parasympathische Signalwege beeinflussen das Überleben in einem Modell der hepatischen Metastasierung***

Die zuvor beschriebenen Studien in KC und KPC Mäusen lassen den Schluss zu, dass durch muskarinerge Signaltransduktion am CHRM1 das Wachstum von primären PDACs unterdrückt wird. Da die meisten PDAC Patienten allerdings an einer Lebermetastasierung sterben, haben wir den Einfluss der parasympathischen Signalwege auf das Wachstum von hepatischen Metastasen untersucht. Hierzu wurde ein etabliertes syngenes Mausmodell der hepatischen Metastasierung des PDAC verwendet (Soares et al., 2014). WT C57BL/6 Mäuse erhielten intrasplenische

Injektionen von  $2 \times 10^6$  GFP-markierten Panc02 Zellen und wurden dann in folgende drei Gruppen randomisiert: unbehandelte Kontrollen (n = 10), Bethanechol Behandlung (n = 10), und selektive parasympathische Denervation der Leber durch Dissektion des hepatischen Vagusastes (SHVx) (n = 11). Mäuse in der Bethanechol-Gruppe hatten ein signifikant längeres Überleben ( $p < 0.001$ ), während die SHVx-Gruppe ein deutliches kürzeres Überleben aufwies ( $p < 0.01$ ). Wie die Quantifizierung der Metastasen und des maximalen Tumorvolumens zeigte, wurde das Metastasenwachstum durch die SHVx verstärkt ( $p < 0.05$ ) und durch Bethanechol inhibiert ( $p < 0.05$ ). Um zu bestätigen, dass parasympathische Signale auch direkt die metastastischen Tumorzellen regulieren, wurde die Expression von Ki-67, p-EGFR und CD44 quantifiziert. Es ergab sich eine signifikant geringere Expression dieser Proteine in der Bethanechol Gruppe ( $p < 0.05$ ) und die gegensätzliche Situation in der SHVx Gruppe ( $p < 0.05$ ). Diese Daten legen den Schluss nahe, dass parasympathische Signaltransduktion nicht nur das Wachstum des Primärtumors, sondern auch der hepatischen Metastasen hemmt.

## **II.3 Subdiaphragmale Vagotomie hemmt die gastrale Tumorigenese**

**(Zhao,....., Renz et al. Sci Transl Med 2014)**

### **II.3.1 Signifikanz**

Das autonome Nervensystem spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation vieler Organe, einschließlich des Gastrointestinaltrakts. In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass der N. vagus, der im Magen durch muskarinerge Rezeptoren (CHRM 1-5) seine Signale weiterleitet, zur Progression des Magenkarzinoms beiträgt. Die chirurgische Vagotomie kann die Entstehung des Magenkarzinoms in Mäusen verhindern. Des Weiteren können ähnliche Ergebnisse in Mäusen durch Botulinum Toxin A (Botox) Applikation oder durch die Verabreichung von anticholinergen Substanzen erzielt werden.

#### ***II.3.1.1 Die chirurgische Denervation unterdrückt die Tumorigenese in präneoplastischen Stadien des Magenkarzinoms in verschiedenen Mausmodellen***

Einhundert sieben INS-GAS Mäuse (Überexpression von pankreatischem Gastrin) wurden entweder bilateral subdiaphragmatisch vagotomiert (VxPP), unilaterals vagotomiert (UVx), *sham* operiert oder lediglich einer Pyloroplastie (PP) unterzogen. Die Tumorinzidenz war 17% nach VxPP vs. 86% nach PP, 14% in der Magenvorderwand und 76% in der Magenhinterwand nach linksseitiger (UVx) und 78% in den *sham* operierten Mäusen. Die histologische Untersuchung zeigte eine niedrigere Schleimhaut nach VxPP im Vergleich zu PP. Ähnlich verhielt es sich in UVx Mäusen, wenn dies zur korrespondierenden und damit nicht denervierten Hinterwand verglichen wurde. Die pathologische Evaluation (Rogers et al., 2005) zeigte in den vagotomierten Arealen weniger Dysplasie und eine geringere Proliferationsrate in den epithelialen Zellen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, untersuchten wir in gleicher Weise zwei weitere Magenkrebs-Mausmodelle: ein Karzinogen induziertes [N-nitroso-N-methylurea (MNU)] {Tomita:2011ce} und das *Helicobacter pylori* (Hp)-infizierte H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Adenosin-Triphosphatase)-IL-1b (Interleukin-1b) Mausmodel (Tu et al., 2008). Wenn die UVx 8,5 Monate nach der Hp Infektion

durchgeführt wurde, waren Tumorgröße und Proliferationsrate in 18 Monate alten Mäusen in der denervierten Wand des Magens geringer. Diese Ergebnisse in drei unabhängigen Modellen demonstrieren die Bedeutung einer funktionellen Innervation in der gastralnen Tumorigenese.

#### ***II.3.1.2 Auch die pharmakologische Denervierung unterdrückt die gastrale Tumorigenese im präneoplastischen Stadium***

Um zu beweisen, dass die Effekte der chirurgischen Denervation primär durch das Acetylcholins (ACh) aus den präsynaptischen Endigungen des N. vagus innerhalb der gastralnen Mukosa (lokal) bedingt waren, injizierten wir unilateral Botox in die Magenwand von 6 Monate alten INS-GAS Mäusen. Botox dringt in die präsynaptischen Endigungen durch Vesikel-Internalisierung ein und spaltet das synaptosomal-assoziierte Protein 25. Dies wiederum beeinflusst die Exozytose von Neurotransmittern einschließlich des ACh (Dressler & Adib Saberi, 2005). Botox wurde subserös entlang der großen Magenkurvatur injiziert. Nach 6 Monaten war die Tumorgröße, der Dysplasie Score und die Anzahl an proliferierenden Zellen signifikant im Vergleich zur Magenhinterwand reduziert. Diese Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle von lokaler cholinriger Signalwirkung in der frühen gastralnen Tumorigenese. Chirurgische oder pharmakologische Denervierung unterdrücken die gastrale Tumorprogression.

#### ***II.3.1.3 Chirurgische oder pharmakologische Denervierung unterdrücken die gastrale Tumorprogression***

Da die Vagotomie und die Behandlung mit Botox einen protektiven Effekt auf die präneoplastischen Stadien hatte, untersuchten wir, ob die Tumorprogression auch in späteren Stadien durch Denervierung des Magen zu inhibieren sein würde. Hierzu wurden INS-GAS Mäuse in einem Alter von 8, 10, oder 12 Monaten einer anterioren UVx unterzogen und mit 18 Monaten analysiert. Die Tumoren in diesen Mäusen waren kleiner und wiesen weniger schwere Dysplasien in der Vorderwand im Vergleich zur Hinterwand auf. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch hier durch die Botox Behandlung erzielt

werden. Diese Daten lassen vermuten, dass gastrale Denervierung die Tumorprogression auch in etablierten Tumoren supprimiert

#### ***II.3.1.4 Die Denervierung verstört chemotherapeutische Effekte in der Behandlung des Magenkarzinoms***

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob die vagale Denervierung auch den Effekt einer systemischen Chemotherapie verstören kann. INS-GAS Mäuse im Alter von 12 bis 14 Monaten erhielten systemisch 5-FU + Oxaliplatin oder NaCL 0.9% zusammen mit unilateraler Botox Behandlung oder UVx. Nach 2 Monaten war die Tumorgre in der Chemotherapiegruppe - und hier im Speziellen in den denervierten Arealen des Magens nach UVx oder Botox Injektion - signifikant kleiner. Die Kombinationstherapie aus Botox oder UVx und Chemotherapie verlängerte das berleben im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie. Zusammengefasst implizieren diese Ergebnisse, dass es einen additiven Effekt durch die Kombination von Chemotherapie und Denervierung in der Maus gibt, der das Tumorwachstum hemmt und das berleben verlängert.

#### ***II.3.1.5 Die Denervierung inhibiert gastrale Wnt Signale und unterdrükt die Stammzellexpansion durch CHRM3***

Sowohl in INS-GAS Mäusen als auch in Wild-Typ (WT) Mäusen und UVx INS-GAS Mäusen wurde eine Genexpressionsanalyse durchgefürt. Diese zeigte sich eine Hochregulierung des Wnt-Signalwegs im Vergleich von INS-GAS Mäusen mit Wild-Typ Mäusen. Durch den Vergleich zwischen der vagotomierten Magenvorderwand und der intakt innervierten Magenhinterwand wurden viele unterschiedlich exprimierte KEGG Signalwege gefunden, einschließlich solcher, die in die Säuresekretion involviert sind, mitogen aktivierte Proteinkinase Signalwege, Zellzyklus-, Apoptose-, Autophagie-, VEGF- und dem Aktin-Zytoskelett assoziierte Signalwege. Der Wnt und der Notch Signalweg waren deutlich inhibiert in den vagotomierten Arealen.

Der Wnt Signalweg ist ein bedeutender Regulator gastrointestinaler Stammzellen und der Tumorigenese (Polakis, 2012; Takahashi-Yanaga & Kahn, 2010). CD44 ist eine bekannte

Zielstruktur des Wnt Signalwegs, welches eine Krebs initiierende Zellpopulation kennzeichnet (Takaishi et al., 2009).

Lgr5 ist ein Marker gastraler Stammzellen sowohl in normalen als auch in neoplastischen Geweben und ebenso eine Zielstruktur des Wnt Signalwegs (Schuijers & Clevers, 2012). Durch die Vagotomie und auch durch Botox Applikation konnte eine niedrigere Expression von CD44 (und CD44v6) erzielt werden. Die Vagotomie führte auch zu einer verminderten Expression weiterer Wnt Zielgene, wie Cyclin D1, Axin2, Myc, Lgr5 und CD44 in MNU behandelten Mäusen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Unterbrechung neuronaler Signale Wnt und damit die Stammzellexpansion inhibiert. Dies wiederum resultiert in einer Unterdrückung der Tumorentwicklung in INS-GAS und MNU Mausmodellen des Magenkarzinoms.

Im nächsten Schritt gingen wir der Frage nach, ob die Vagotomie die Lgr5 Expression durch muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren beeinflusst. Gastrale Epithelzellen von Lgr5-GFP Mäusen wurden auf der Basis der Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) sortiert. Wir konnten hierbei eine Co-Expression von Lgr5 und CHRM3 nachweisen. Andere muskarinerge Rezeptoren hingegen waren in Lgr5<sup>+</sup> Zellen nur gering exprimiert. Um den Einfluss des CHRM3 in der gastralen Tumorigenese zu untersuchen, behandelten wir INS-GAS Mäuse mit dem spezifischen M3 Rezeptor Antagonisten Darifenacin in Kombination mit Chemotherapie. Hierbei zeigte sich, dass die Kombination aus Darifenacin und Chemotherapie die Proliferation der Tumoren reduziert. Wir analysierten auch den Wnt-Signalweg in M3KO vs. Wild-Typ Mäusen und sahen, dass etliche Schlüsselgene, einschließlich des beta-Catenins, in geringerem Maß exprimiert wurden.

Des Weiteren wiesen MNU behandelte M3KO nach 7,5 Monaten eine deutlich niedrigere Tumorinzidenz im Vergleich zu WT-Kontrollen auf (57.1% vs. 100%).

Wir beobachteten im Folgenden auch, dass in gastralen Organoidkulturen, nach Behandlung mit einem mukarinerigen Agonisten, die Supplementierung eines Wnt-Liganden nicht mehr

notwendig war. Dieses Phänomen impliziert eine die Fähigkeit von cholinergem Signalwegen Liganden-unabhängige Wnt Signale zu induzieren. Zusammengefasst scheint der N. vagus die gastrale Tumorigenese, zumindest teilweise, durch den CHRM3 zu regulieren.

#### ***II.3.1.6 Neurone aktivieren Wnt Signaltransduktion in gastralen Stammzellen durch CHRM3***

Um die potentielle regulatorische Rolle von Nerven in der Aufrechterhaltung der Homöostase des gastralen Epithels zu zeigen, verwendeten wir ein etabliertes *in vitro* Co-Kultursystem (Barker et al., 2010). Primäre murine Rückenmarksneurone wurden mit gastralen Epithelzellen co-kultiviert (Barker et al., 2010). Die Neuronen wuchsen aus und hatten einerseits direkten Kontakt zu den gastralen Organoiden und förderten andererseits signifikant das Wachstum der Organoide. Die Behandlung der Kulturen mit entweder Botox oder Scopolamine verhinderte diesen stimulatorischen Effekt, während Pilocarpine weiteres Wachstum stimulierte. Des Weiteren kam es durch Pilocarpine dosisabhängig zu einer Hochregulation von gastralen Stammzellmarken und den Wnt Zielgenen Lgr5, CD44 und Sox9 (Barker et al., 2010). In gastralen Organoiden von M3KO konnten diese Effekte nicht nachgewiesen werden. Eine Zugabe von Wnt3a, einem typischen Vertreter kanonischer Wnt-Liganden, in dies Co-Kulturen war nicht notwendig, obwohl das Wachstum von gastralen Organoiden, wie oben erwähnt, abhängig von Wnt-Liganden ist. Diese Beobachtung bestätigt die Fähigkeit, von cholinergen Signalen Liganden unabhängige Wnt Signalwirkung in diesem *in vitro* System zu induzieren.

#### ***II.3.1.7 Magenkarzinompatienten weisen eine Dysregulation von Wnt Signaltransduktion und Tumorinnervation auf***

Um den Einfluss des Wnt Signalwegs sowie der Innervation auf die gastrale Tumorprogression im Menschen weiter zu untersuchen, analysierten wir drei separate Kohorten von Magenkarzinompatienten. In 17 primären Magenkarzinomen waren Wnt Signalwege, neurotrophine und *axonale guidance* Signalwege (zusammen mit anderen Signalwegen) im Tumorgewebe aktiviert, wenn dies zu gesundem Magengewebe verglichen wurde. In einer weiteren Kohorte von 120 Magenkarzinomen korrelierte die neuronale Dichte mit weiter

fortgeschrittenen Tumoren. Ähnliche Beobachtungen haben wir auch in MNU behandelten Mäusen gemacht. In der dritten Kohorte analysierten wir Gewebe von 37 Patienten, die ein Karzinom am Magenstumpf nach distaler Gastrektomie mit oder ohne Vagotomie in der Vergangenheit entwickelten. Von diesen Patienten hatten 13 (35%) eine Vagotomie (dorsal) erhalten hat. Lediglich ein Patient aus dieser Gruppe entwickelte einen Tumor an der Magenhinterwand und keiner in der Magenvorderwand. In der nicht vagotomierten Gruppe (24 Patienten), zeigten sich die Karzinome sowohl an der Vorderwand als auch an der Hinterwand des Magens.

**II.4 Der Nerven Wachstumsfaktor (NGF) fördert die gastrale Tumorigenese durch aberrante cholinerge Signaltransduktion (Hayakawa, ...., Renz et al. Cancer Cell 2017)**

**II.4.1 Signifikanz**

Sowohl die Faktoren, die für die Nervenexpansion während der Tumorigenese verantwortlich sind als auch die nachgeschalteten Signalwege der Nerven-Signaltransduktion sind weitestgehend nicht verstanden. Diese Arbeiten untersuchen die extensiven Wechselwirkungen, die zwischen Krebszellen und Nerven während der gastralen Tumorigenese stattfinden. Des Weiteren identifizieren sie die ACh-NGF-M3R-YAP Achse als zentrales Element in der Magenkarzinobiologie. Diese Studie schlägt NGF und den CHRM3 als potentielle Zielstrukturen für die Magenkarzinomtherapie vor, die in naher Zukunft Anwendung finden könnten.

**II.4.1.1 *ChAT<sup>+</sup> Tuft Zellen und Nerven expandieren innerhalb der gastralen Mukosa während der Tumorigenese***

Mit Hilfe einer *Chat*-GFP transgenen Maus konnten wir zeigen, dass *Chat*-GFP in den Nervenfasern der Lamina propria sowie in submukösen und myenterischen Ganglien exprimiert wird. GFP<sup>+</sup> Nervenfasern sind in der Nähe von Lgr5<sup>+</sup> Zellen an der Kryptenbasis zu finden, was die Hypothese unterstützt, dass cholinerge Nerven Teil der gastrointestinalen Stammzellniche sind. Wie bereits gezeigt, ist *Chat*-GFP auch in *Tuft*-Zellen exprimiert, die positiv für den Marker DCLK1 sind (Schütz et al., 2015). IHC bestätigte, dass DCLK1 ausgeprägt in *Tuft*-Zellen exprimiert wird, aber auch in *Chat*-GFP<sup>+</sup> cholinergen Nervenfasern und Ganglien. Unsere *Dclk1*-CreERT Maus (Westphalen et al., 2014; 2016) bestätigte die DCLK1 Expression in einer Subgruppe von ENS Zellen und epithelialen *Tuft*-Zellen, welche auch positiv für ACh waren.

Diese Untersuchungen legen nahe, dass durch die Expression von DCLK1 die meisten cholinergen Zellen innerhalb des gastrointestinalen Systems identifiziert werden. Dies beinhaltet sowohl epitheliale *Tuft*-Zellen als auch stromale Neurone.

Wie oben erwähnt, haben wir berichtet, dass Lgr5<sup>+</sup> gastrale Stammzellen hohe Level an CHRM3 exprimieren und durch cholinerge Signale während der Tumorigenese expandieren (Zhao et al., 2014). In MNU Magenkarzinomen fanden wir eine dynamische Beziehung zwischen Epithel und Stroma, was die cholinerge Zellverteilung während der Tumorentwicklung betrifft. Zu einem frühen Zeitpunkt (3 Monate nach MNU Behandlung) zeigten sich signifikant mehr *Chat*-GFP<sup>+</sup> *Tuft*-Zellen im Epithel. Nach 9 Monaten war ein allmählicher Verlust von epithelialen *Chat*- GFP<sup>+</sup> *Tuft*-Zellen zu vermerken. Dieser war begleitet durch Axonogenese cholinriger Nervenfasern.

Die frühe Expansion von *Chat*- GFP<sup>+</sup> *Tuft*-Zellen während der Karzinogense, gefolgt von einer Vermehrung der cholinergen Innervation mit Progression zur Dysplasie, impliziert einen Bedarf für eine ACh Produktion in der Tumorigenese aus unterschiedlichen Quellen, abhängig vom Tumorstadium

#### ***II.4.1.2 ACh Signaltransduktion stimuliert NGF Produktion in gastralen Epithelzellen***

Die Behandlung von gastralen Organoiden mit cholinergen Agonisten führte zu einer CHRM3 abhängigen Hochregulation der *Ngf* Expression. In murinen gastralen Tumoren, gab es ebenfalls eine spezifische Hochregulation von *Ngf* (fast 20x höher als in normalem Magengewebe). Diese Hochregulierung konnte für andere Neurotrophine nicht beobachtet werden. Interessanterweise führte die Aufhebung der cholinergen Signaltransduktion im Magen durch eine chirurgische Vagotomie zur Inhibierung der *Ngf* Hochregulierung in murinen Magenkarzinomen. IHC und *in situ* Hybridisierung bestätigten die NGF Expression innerhalb des neoplastischen Epithels. Organoide von MNU-Tumoren, die separiert von ihrer Mikroumgebung kultiviert wurden, verloren ihre Fähigkeit zur NGF Expression innerhalb von sieben Tagen. Allerdings führte die Behandlung mit dem Ach-Mimetikum Carbachol zur Reexpression von *Ngf*. Zusammengefasst scheint ACh, was initial möglicherweise in *Tuft*-Zellen produziert wird und später von innervierten Nerven durch Axogenese abstammt, zumindest partiell für die neoplastische Hochregulierung von NGF verantwortlich zu sein.

#### **II.4.1.3 Der NGF/Trk Signalweg reguliert die muköse Innervation**

Basierend auf der Hypothese, dass NGF eine Rolle in der Tumor assoziierten Innervation spielt, verwendeten wir die oben erwähnte Knock-in Maus, die das murine *Ngf* Gen konditional überexprimiert. Um NGF im gastralen Epithel zu überexprimieren, benützten wir eine *Tff2*-BAC-Cre line (Dubeykovskaya et al., 2016). Diese *Tff2*-Cre; *R26-Ngf* Mäuse exprimierten hohe Spiegel an NGF im gastralen Epithel, was zu einer gestörten glandulären Architektur und vermehrten Stromazellen innerhalb der Lamina propria führt. IHC bestätigte, dass diese Stromazellen sowohl adrenerge (TH<sup>+</sup>) als auch cholinerge (VACHT<sup>+</sup>) Nerven und Glia Zellen sind, die DCLK1 exprimieren. Die Expansion von stromalen Nerven in NGF-überexprimierenden Mäusen konnte durch die Behandlung mit dem Trk-Inhibitor PLX-7486 (PLX) unterdrückt werden, obwohl die Nerven nach Absetzen der Medikation wieder zügig reexpandierten.

In erwachsenen *Dclk1*-CreERT; *R26-mTmG* Mäuse, die mit Tamoxifen behandelt wurden, zeigten sich GFP<sup>+</sup> Nerven zunächst in der Nähe der gastralen Drüsenbasis. Nach einem Jahr jedoch expandierten diese rekombinierten Zellen allmählich in Richtung der Spitze der Drüse, was ein zeitabhängiges axonales Wachstum und/oder Nervenumumsatz unter normalen homöostatischen Bedingungen, wie bereits von anderen gezeigt, nahelegt (Kabouridis et al., 2015). PLX Applikation unterdrückte dieses stromale *lineage tracing* in *Dclk1*-CreERT; *R26-mTmG* Mäusen, was eine Bedeutung von NGF im stromalen *Remodeling* nahelegt. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung war in MNU behandelten *Dclk1*-CreERT; *R26-mTmG* Mäusen, die hohe Levels an NGF exprimieren, ein ausgeprägteres stromales *lineage tracing* zu beobachten. Um diese Beziehungen weiter zu untersuchen, co-kultivierten wir sortierte Epcam<sup>+</sup>Dclk1<sup>+</sup> Neurone mit gastralen Organoiden aus WT oder *Tff2*-Cre; *R26-NGF* Mäusen. Während kultivierte Neuronen selten neuronales Auswachsen zeigen, induzierte die Co-Kultivierung mit WT Organoiden oder NGF-überexprimierenden Organoiden das Auswachsen signifikant. Dies spiegelt das *in vivo* NGF abhängige axonale Wachstum der Dclk1<sup>+</sup> Neurone wider.

#### **II.4.1.4 ACh/CHRM3 Signalwege regulieren die muköse Proliferation und die klonale Stammzellexpansion**

Um die Rolle der muskarinergen Signale in diesem Prozess zu untersuchen, benützten wir *Tff2-Cre; Chrm3<sup>fl/fl</sup>* Mäuse, in denen das *Chrm3* Gen konditionell im Magenepithel abladiert wird. Der Verlust des epithelialen CHRM3 resultiert in einer verringerten Proliferation nach MNU-induzierter Epithel Verletzung, während es keine Unterschiede unter normalen Bedingungen gab.

Durch die Generierung einer *Lgr5-CreERT; R26-Confetti* Maus mit oder ohne *Chrm3<sup>fl/fl</sup>* Transgen war es möglich, die Effekte der CHRM3 Signaltransduktion zu untersuchen. Wie bereits beschrieben (Leushacke, Ng, Galle, Loeffler, & Barker, 2013), war ein *lineage tracing* von multiplen *Lgr5<sup>+</sup>* Zellen in jeder Drüse zu beobachten. Einige Drüsen zeigten alle 4 unterschiedlichen fluoreszierenden Reporter. Nach 2 Monaten allerdings konsolidierten die meisten Drüsen zu einer einzigen Farbe („neutral drift“). Diese *single-color* Konversion war häufiger in MNU-behandelten als in nicht behandelten Mäusen zu sehen. Diese Beobachtung spricht für einen schnellen Verlust der Progenitorzellen oder ein schnelleres Auftauchen eines dominanten Klons nach MNU Behandlung. Der *Chrm3* Knock out in der *Lgr5<sup>+</sup>* Population unterdrückte die *single-color* Konversion. Dementsprechend scheint der CHRM3 die epitheliale Proliferation und die Stammzellteilung während der Regeneration zu regulieren.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten *Tff2-Cre; R26-NGF* Mäuse eine vermehrte Proliferation im Magen. Diese Proliferationssteigerung wurde durch den Knock out von *Chrm3* aufgehoben. Die Behandlung mit PLX reduzierte die Nervendichte und das Level der epithelialen Proliferation. Nach Absetzen von PLX kam es im Magenepithel jedoch wieder zur Hyperproliferation. Diese Untersuchungen legen dar, dass gastrale ACh/NGF/Trk Signaltransduktionen sowohl für das muköse Nervenwachstum als auch die epitheliale Proliferation von Bedeutung sind.

#### **II.4.1.5 Das Initiiieren der ACh -NGF Achse ist zur Entwicklung des Magenkarzinoms ausreichend**

Mit 18 Monaten entwickelten *Tff2-Cre; R26-NGF* Mäuse große gastrale Tumoren mit intramukösen Adenokarzinomen. Diese NGF vermittelten Effekte konnten durch den Knock out

von *Chrm3* im Magenepithel abgemildert werden. Die Überexpression von *Ngf* in den *Tff2-Cre; R26-NGF* Mäusen beschleunigte signifikant das Tumorwachstum und die Invasion nach MNU Gabe. Ein Knock out von *Chrm3* im Magenepithel blockierte die MNU abhängige Tumorentwicklung in Anwesenheit einer *Ngf* Überexpression.

Die Ablation von ACh produzierenden *Dclk1<sup>+</sup> Tuft*-Zellen im MNU Modell durch die Behandlung von *Dclk1-CreERT; R26-DTR* Mäusen mit Diphtheria Toxin unterdrückte ebenfalls die Tumorentwicklung mit einer Reduktion der NGF Expression und Innervation. Die Behandlung mit PLX verhinderte das MNU induzierte Tumorwachstum sowohl in WT als auch in *Ngf*-überexprimierenden Mäusen und reduzierte die peritumorale Nervendichte, CD44 Zellexpansion und nukleäre Translokation von beta-Catenin.

Wir untersuchten die Effekte der NGF Inhibition auch in einem allogenen Tumormodeltransplantationsmodel. *Kras*, *Apc*, und *Tp53*-mutierte Magendrüsen wurden aus Tamoxifen behandelten *Lgr5-CreERT; LSL-Kras<sup>G12D</sup>; LSL-p53<sup>R172H/+</sup>; Apc<sup>flox/flox</sup>* Mäusen isoliert und als Tumororganoide kultiviert. Diese Organoide wurden dann in immundefiziente NOD-SCID Mäuse implantiert. Die Tiere wurden mit Placebo oder PLX behandelt, Nach 3 Wochen war die Tumorgröße durch die Trk-Inhibition signifikant kleiner und die peritumorale Nervenexpansion war unterdrückt. Zusammengefasst wird durch diese Experimente eine zentrale Rolle für NGF/Trk Signaltransduktion in der Initiierung und Progression des Magenkarzinoms, welche durch die cholinerge Nische vermittelt wird, vorgeschlagen.

#### ***II.4.1.6 CHRM3 Signaltransduktion reguliert Apc-abhängiges Tumorwachstum durch YAP***

##### ***Aktivierung***

Kürzlich haben wir beschrieben, dass *Mist1<sup>+</sup>* Stammzellen im proximalen Magen als Krebs initierende Zellen (CIC) dienen können (Hayakawa et al., 2015). Obwohl die Deletion des *Apc*-Gens (*Mist1-CreERT; Apc<sup>flox/flox</sup>*) nicht ausreichend ist, um Tumoren im proximalen Magen zu induzieren, entwickelten diese Tiere interessanterweise makroskopische Tumore im Magenantrum. Um die Rolle der Signaltransduktion des CHRM3 im Apc/beta-Catenin abhängigen

Tumorwachstum zu untersuchen, generierten wir *Mist1*-CreERT; *Apc*<sup>fl/fl</sup>*Chrm3*<sup>fl/fl</sup> Mäuse. Hier fanden wir eine nahezu vollständige Unterdrückung der Tumorentwicklung in homozygoten *Chrm3*-knock out Mäusen. Die NGF Expression und die Nervendichte waren in *Apc* und *Chrm3* doppelten knock out Mäusen signifikant reduziert, was für eine Rolle der cholinergen Signaltransduktion in der NGF-vermittelten Innervation spricht. IHC Analysen zeigten eine starke nukleäre Akkumulation von beta-Catenin sowohl in *Chrm3*-WT als auch *Chrm3*-null Mägen. Daher scheint der Knock out des CHRM3 das Tumorwachstum unterhalb der nukleären beta-Catenin Translokation, möglicherweise durch Inhibierung der transkriptionalen TCF Aktivität, zu unterdrücken.

YAP moduliert die Wnt/ beta-Catenin Signaltransduktion als ein transkriptioneller Co-Aktivator und ist notwendig für intestinales Tumorwachstum nach dem Verlust von *Apc* (Azzolin et al., 2014). Während YAP nur sehr niedrig in normalem Magenepithel oder kultivierten Organoiden exprimiert war, beobachteten wir eine höhere Expression in dysplastischem Gewebe oder Organoiden nach *Apc* Deletion, nicht jedoch in der Magenschleimhaut von *Chrm3* null Mäusen.

Die Wnt Targetgene *Sox9* und *CD44* waren auch stark exprimiert in *Chrm3*-WT, nukleären beta-Catenin<sup>+</sup> Zellen, aber nicht in *Chrm3*-null/beta-Catenin<sup>+</sup> Zellen. Der Vergleich der Microarray Daten (GEO: GSE30295) (Zhao et al., 2014) zeigte eine niedrige Expression von YAP assoziierten Genen mit einer Hochregulierung von inhibitorischen YAP Genen in den vagotomierten Magenanteilen von INS-GAS Mäusen. Diese Ergebnisse implizieren, dass durch die Inhibition der ACh-Signaltransduktion, als Folge der Vagotomie, die YAP Aktivität in diesem Modell gehemmt wird. Der CHRM3 Signalweg könnte daher das Tumorwachstum durch die Kontrolle der YAP Aktivität regulieren.

Der CHRM3, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR), koppelt selektiv zu G-Proteinen der Gq/11 Familie. In der Vergangenheit wurde bereits vorgeschlagen, dass GPCRs die YAP Aktivität durch die großen Tumorsuppressor Kinasen kontrollieren könnten (Yu et al., 2012). ,

In der TMK1 Magenkarzinom Zelllinie, die CHRM3 exprimiert, führte die Behandlung mit Carbachol zu einem reduzierten Level an phosphoryliertem YAP, bei gleichen Spiegeln von Gesamt-YAP. In ähnlicher Weise führte die Carbachol Behandlung in Apc-deletierten gastralen Organoiden zu reduzierten Leveln von phosphoryliertem YAP. Die Behandlung mit dem Gq/11-spezifischen Inhibitor YM254890 wiederum blockierte die YAP Phosphorylierung nach Carbachol Behandlung. Dies impliziert, dass cholinerge Stimulation YAP tatsächlich durch ein Protein aus der Gq/11 Familie dephosphoryliert.

Im nächsten Schritt transfizierten wir ein humanes *Chrm3* Gen-Expressionskonstrukt in die *Chrm3* negative AGS Zelllinie. Die Überexpression von *Chrm3* führte Gq-abhängig zu niedrigeren Spiegeln an phosphoryliertem YAP. YAP Zielgene inklusive *AREG*, *BIRC5*, und *BCL2L1* waren signifikant durch die *Chrm3* Überexpression hochreguliert. In Übereinstimmung mit den murinen Daten führt die Carbachol Behandlung und die *Chrm3* Überexpression zur Hochregulierung der NGF Expression in humanen Krebszellen.

Die Färbung von 36 humanen Magenkarzinomen mit einem NGF Antikörper zeigte, dass NGF in 63,9% moderat und in 5,6% der Tumore stark exprimiert war, während NGF oder YAP in nicht-dysplastischen Magenanteilen nicht exprimiert war. Es zeigte sich auch eine signifikante Korrelation zwischen YAP Immunoreaktivität und NGF oder ChAT Immunoreaktivität. Des Weiteren evaluierten wir die NGF und YAP Expression in weiteren 97 humanen Magenkarzinomen und korrelierten die Expression mit klinischen und histopathologischen Daten. In dieser zweiten Kohorte war NGF in 53,6% der Fälle exprimiert. Die NGF Expression war signifikant assoziiert mit einem höheren Tumorstadium (adjustierte odds ratio [AOR] von 4.57) und die Expression war evident in Karzinomen sowohl vom intestinalen Typ als im diffusen Typ. YAP Expression war auch signifikant assoziiert mit dem Tumorstadium (AOR von 5.71) und einem höheren Risiko an Lymphknotenmetastasen (AOR von 6.55). Zusammengefasst unterstützen diese Daten die Signifikanz der NGF-ACh-YAP Achse in humanen Magenkarzinomen, insbesondere in fortgeschrittenen Tumoren vom intestinalen Typ.

### III Zusammenfassung

In der Vergangenheit konnte zunehmend Evidenz für eine Schlüsselrolle des autonomen Nervensystems in der Tumorentwicklung generiert werden (Chen & Ayala, 2018; Monje, 2017).

In den hier zitierten Arbeiten konnten für das sympathische und das parasympathische Nervensystem gegensätzliche Funktionen in der Entstehung und Progression des PDAC herausgearbeitet werden. So wurde gezeigt, dass Katecholamine die ADRB2-abhängige PDAC Entwicklung, die Nervenwachstumsfaktor (NGF) Sekretion und die innerpankreatische neuronale Dichte steigern. Des Weiteren beschleunigt pankreatische NGF-Überexpression die Tumorentwicklung in LSL-Kras<sup>+/G12D</sup>; Pdx1-Cre (KC) Mäusen. ADRB2 Blockade zusammen mit Gemcitabine unterdrückt die NGF Expression, die intratumorale Nervendichte und verlängert das Überleben von LSL- Kras<sup>+/G12D</sup>; LSL-Trp53<sup>+/R172H</sup>; Pdx1-Cre (KPC) Mäusen. Die Therapie mit einem Trk Inhibitor in Kombination mit Gemcitabine führte ebenfalls zu einem verlängerten Gesamtüberleben in KPC Mäusen. Die Analyse einer PDAC Patientenkollektiv zeigt eine Korrelation zwischen brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Expression, neuronaler Dichte und besserem Überleben von Patienten mit nicht-selektiven Betablockern. Diese Ergebnisse implizieren eine Vorwärtschleife, wobei die Hochregulierung von Neurotrophinen die sympathische Innervation erhöht und dadurch zu einer Akkumulation von Noradrenalin führt.

Auf der anderen Seite konnte für den Parasympathikus gezeigt werden, dass die subdiaphragmatische Vagotomie in KC Mäusen die PDAC Entwicklung beschleunigt. Im Gegensatz dazu supprimierte die systemische Applikation eines muskarinergen Agonisten (Bethanechol) die Effekte der Vagotomie. In KPC Mäusen mit bereits etablierten PDAC wurde durch die Behandlung mit Bethanechol das Gesamtüberleben der KPC Mäuse signifikant verlängert. Diese Effekte wurden teilweise durch den cholinergen muskarinergen Rezeptor 1 (CHRM1) vermittelt. Dieser wiederum inhibierte die nachgeschalteten MAPK/EGFR und PI3K/AKT Signalwege in PDAC Zellen. Vermehrte cholinerge Aktivität hatte einen supprimierenden Effekt auf das Krebsstammzellkompartiment (CSC), die CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen, den systemischen TNF- $\alpha$

Spiegel und das metastatische Wachstum in der Leber. Aus diesen Gründen legen diese Daten nahe, dass cholinerge Signalwege direkt und indirekt das Wachstum von PDAC Zellen unterdrücken. Therapeutische Modalitäten, die muskarinerge Rezeptoren stimulieren oder die ADRB2 und/oder den NGF-BDNF/Trk Signalwege blockieren, könnten sich in der Behandlung des PDAC daher als nützlich erweisen (Renz, Takahashi, et al., 2018a; Renz, Tanaka, et al., 2018b).

Im Magenkarzinom konnte für die Funktion des N. vagus eine gegensätzliche Funktion aufgezeigt werden. Die Untersuchungen arbeiten die zentrale Rolle der Innervation während aller Stadien der gastralnen Tumorigenese heraus. In drei unabhängigen Mausmodellen des Magenkarzinoms führte die chirurgische oder pharmakologische Denervation des Magens (bilaterale oder unilaterale Vagotomie oder Injektion von Botulinum Toxin A) zu einer signifikant geringeren Tumorinzidenz und Unterdrückung der Progression in den denervierten Arealen des Magens. Die Vagotomie oder die Botox Behandlung verstärkten außerdem die therapeutischen Effekte der systemischen Chemotherapie und verlängerten dadurch das Gesamtüberleben. Die Suppression der Tumorigenese, welche durch die Denervation induziert wurde, war assoziiert mit der Inhibierung des Wnt Signalwegs und mit einer Hemmung der Expansion des Stammzellkompartiments. Des Weiteren unterdrückte die pharmakologische Inhibition oder der genetische knockout des muskarinergen Acetylcholin M3 Rezeptors (CHRM3) die gastrale Tumorigenese. In Magenkarzinompatienten korrelierte das Tumorstadium mit der neuronalen Dichte und aktiverter Wnt Signaltransduktion. Zusammengefasst legt dieser Teil der Arbeiten dar, wie die vagale Innervation des Magens durch CHRM3 vermittelte Wnt Signaltransduktion in den Stammzellen zur gastralnen Tumorigenese beiträgt (Zhao et al., 2014).

In einer weiteren Arbeit konnte eine Co-Expression von DCLK1 und ChAT sowohl in *Tuft*-Zellen als auch in Nerven des Magens und des Darm gezeigt werden. Innerhalb der gastrointestinalen Stammzellnische scheinen sie teilweise sowohl im normalen als auch neoplastischen Gewebe die Stammzell-Dynamik zu regulieren. In diesen Arbeiten konnten wir einen zugrunde liegenden Mechanismus dieser Tumorzell-Nerv-Interaktion darlegen. Es konnte dargestellt werden, dass

DCLK1<sup>+</sup>-*Tuft*-Zellen und Nerven als die Hauptresource von ACh innerhalb der Magenschleimhaut anzusehen sind. Cholinerge Stimulation des gastralnen Epithels induzierte NGF Expression und NGF Überexpression innerhalb des Magenepithels wiederum führte zu einer Expansion der enterischen Nerven und beschleunigte die Karzinogense. Die genetische Ablation von DCLK1<sup>+</sup>-Zellen oder die Blockierung des NGF/Trk Signalwegs unterdrückte CHRM3-abhängig die epitheliale Tumorigenese. Partiell geschah das durch Inhibierung der Funktion des YAP Proteins. Diese ACh-CHRM3-NGF-YAP Achse aktiviert die Magenkarzinom Nische und bietet eine interessante Zielstruktur zur Therapie und Prävention dieser Erkrankung (Hayakawa et al., 2017).

#### IV Literatur

- Albo, D., Akay, C. L., Marshall, C. L., Wilks, J. A., Verstovsek, G., Liu, H., et al. (2011). Neurogenesis in colorectal cancer is a marker of aggressive tumor behavior and poor outcomes. *Cancer*, 117(21), 4834–4845. <http://doi.org/10.1002/cncr.26117>
- Apte, M. V., & Wilson, J. S. (2012). Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27 Suppl 2, 69–74. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07000.x>
- Axelson, J., Ekelund, M., Håkanson, R., & Sundler, F. (1988). Gastrin and the vagus interact in the trophic control of the rat oxyntic mucosa. *Regulatory Peptides*, 22(3), 237–243.
- Ayala, G. E., Dai, H., Powell, M., Li, R., Ding, Y., Wheeler, T. M., et al. (2008). Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(23), 7593–7603. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1164>
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., et al. (2014). YAP/TAZ Incorporation in the  $\beta$ -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. *Cell*, 158(1), 157–170. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.013>
- Bahmanyar, S., Ye, W., Dickman, P. W., & Nyrén, O. (2007). Long-term risk of gastric cancer by subsite in operated and unoperated patients hospitalized for peptic ulcer. *The American Journal of Gastroenterology*, 102(6), 1185–1191. <http://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01161.x>
- Bapat, A. A., Munoz, R. M., Hoff, Von, D. D., & Han, H. (2016). Blocking Nerve Growth Factor Signaling Reduces the Neural Invasion Potential of Pancreatic Cancer Cells. *PloS One*, 11(10), e0165586. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0165586>
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H. J., van Es, J. H., et al. (2010). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, 6(1), 25–36. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>
- Bockman, D. E., Büchler, M., & Beger, H. G. (1994). Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage. *Ygast*, 107(1), 219–230.
- Borden, P., Houtz, J., Leach, S. D., & Kuruvilla, R. (2013). Sympathetic innervation during development is necessary for pancreatic islet architecture and functional maturation. *Cell Reports*, 4(2), 287–301. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.019>
- Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., et al. (2009a). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain--a comprehensive pathomorphological study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136(1), 177–186.e1. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.029>
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Altintas, B., Rauch, U., Thiel, G., Müller, M. W., et al. (2008). Neural invasion in pancreatic cancer: a mutual tropism between neurons and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 374(3), 442–447. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.035>
- Ceyhan, G. O., Demir, I. E., Rauch, U., Bergmann, F., Müller, M. W., Büchler, M. W., et al. (2009b). Pancreatic neuropathy results in “neural remodeling” and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *The American Journal of Gastroenterology*, 104(10), 2555–2565. <http://doi.org/10.1038/ajg.2009.380>
- Chang, A., Le, C. P., Walker, A. K., Creed, S. J., Pon, C. K., Albold, S., et al. (2016).  $\beta$ 2-Adrenoceptors on tumor cells play a critical role in stress-enhanced metastasis in a mouse model of breast cancer. *Brain, Behaviour, and Immunity*, 57, 106–115. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.011>
- Chen, D., & Ayala, G. E. (2018). Innervating Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 378(7), 675–677. <http://doi.org/10.1056/NEJMcb1714003>
- Clark, K. L., Loscalzo, M., Trask, P. C., Zabora, J., & Philip, E. J. (2010). Psychological distress in patients with pancreatic cancer—an understudied group. *Psycho-Oncology*, 19(12), 1313–1320. <http://doi.org/10.1002/pon.1697>
- Collins, M. A., Yan, W., Sebolt-Leopold, J. S., & Pasca di Magliano, M. (2014). MAPK signaling is required for dedifferentiation of acinar cells and development of pancreatic intraepithelial

- neoplasia in mice. *Gastroenterology*, 146(3), 822–834.e7. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.052>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., et al. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817–1825. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Dang, C., Zhang, Y., Ma, Q., & Shimahara, Y. (2006). Expression of nerve growth factor receptors is correlated with progression and prognosis of human pancreatic cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 21(5), 850–858. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04074.x>
- De Couck, M., Maréchal, R., Moorthamers, S., Van Laethem, J.-L., & Gidron, Y. (2016). Vagal nerve activity predicts overall survival in metastatic pancreatic cancer, mediated by inflammation. *Cancer Epidemiology*, 40, 47–51. <http://doi.org/10.1016/j.canep.2015.11.007>
- De Couck, M., Mravec, B., & Gidron, Y. (2012). You may need the vagus nerve to understand pathophysiology and to treat diseases. *Clinical Science*, 122(7), 323–328. <http://doi.org/10.1042/CS20110299>
- Demir, I. E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2012). Nerve-cancer interactions in the stromal biology of pancreatic cancer. *Frontiers in Physiology*, 3, 97. <http://doi.org/10.3389/fphys.2012.00097>
- Demir, I. E., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2015). Neural plasticity in pancreatitis and pancreatic cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 12(11), 649–659. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.166>
- Dressler, D., & Adib Saberi, F. (2005). Botulinum toxin: mechanisms of action. *European Neurology*, 53(1), 3–9. <http://doi.org/10.1159/000083259>
- Dubeykovskaya, Z., Si, Y., Chen, X., Worthley, D. L., Renz, B. W., Urbanska, A. M., et al. (2016). Neural innervation stimulates splenic TFF2 to arrest myeloid cell expansion and cancer. *Nature Communications*, 7, 10517. <http://doi.org/10.1038/ncomms10517>
- Esposito, I., Kleeff, J., Bergmann, F., Reiser, C., Herpel, E., Friess, H., et al. (2008). Most pancreatic cancer resections are R1 resections. *Ann Surg Oncol*, 15(6), 1651–1660. <http://doi.org/10.1245/s10434-008-9839-8>
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., & Tuveson, D. A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(16), 4266–4276. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3114>
- Griffin, N., Faulkner, S., Jobling, P., & Hondermarck, H. (2018). Targeting neurotrophin signaling in cancer: The renaissance. *Pharmacological Research*, 135, 12–17. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.019>
- Hamada, S., Masamune, A., & Shimosegawa, T. (2013). Alteration of pancreatic cancer cell functions by tumor-stromal cell interaction. *Frontiers in Physiology*. <http://doi.org/10.3389/fphys.2013.00318/abstract>
- Hassan, S., Karpova, Y., Baiz, D., Yancey, D., Pullikuth, A., Flores, A., et al. (2013). Behavioral stress accelerates prostate cancer development in mice. *J Clin Invest*, 123(2), 874–886. <http://doi.org/10.1172/JCI63324>
- Hayakawa, Y., & Wang, T. C. (2017). Nerves switch on angiogenic metabolism. *Science*, 358(6361), 305–306. <http://doi.org/10.1126/science.aaq0365>
- Hayakawa, Y., Ariyama, H., Stancikova, J., Sakitani, K., Asfaha, S., Renz, B. W., et al. (2015). Mist1 Expressing Gastric Stem Cells Maintain the Normal and Neoplastic Gastric Epithelium and Are Supported by a Perivascular Stem Cell Niche. *Cancer Cell*, 28(6), 800–814. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.10.003>
- Hayakawa, Y., Sakitani, K., Konishi, M., Asfaha, S., Niikura, R., Tomita, H., et al. (2017). Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. *Cancer Cell*, 31(1), 21–34. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.11.005>
- Håkanson, R., Vallgren, S., Ekelund, M., Rehfeld, J. F., & Sundler, F. (1984). The vagus exerts trophic control of the stomach in the rat. *Ygast*, 86(1), 28–32.
- Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437–450.

- Hingorani, S. R., Wang, L., Multani, A. S., Combs, C., Deramaudt, T. B., Hruban, R. H., et al. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469–483. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.023>
- Hoff, Von, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., et al. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691–1703. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>
- Holmgren, S., & Olsson, C. (2011). Autonomic control of glands and secretion: A comparative view. *Autonomic Neuroscience*, 165(1), 102–112. <http://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.10.008>
- Kabouridis, P. S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S. H., Snippert, H. J., Clevers, H., et al. (2015). Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. *Neuron*, 85(2), 289–295. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.037>
- Kim-Fuchs, C., Le, C. P., Pimentel, M. A., Shackleford, D., Ferrari, D., Angst, E., et al. (2014). Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: A critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.bbci.2014.02.019>
- Kopp, J. L., Figura, von, G., Mayes, E., Liu, F.-F., Dubois, C. L., Morris Iv, J. P., et al. (2012). Identification of Sox9-Dependent Acinar-to-Ductal Reprogramming as the Principal Mechanism for Initiation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 22(6), 737–750. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.10.025>
- Leushacke, M., Ng, A., Galle, J., Loeffler, M., & Barker, N. (2013). Lgr5(+) gastric stem cells divide symmetrically to effect epithelial homeostasis in the pylorus. *Cell Reports*, 5(2), 349–356. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.025>
- Liebl, F., Demir, I. E., Mayer, K., Schuster, T., D'Haese, J. G., Becker, K., et al. (2014). The impact of neural invasion severity in gastrointestinal malignancies: a clinicopathological study. *Ann Surg*, 260(5), 900–907– discussion 907–8. <http://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000968>
- Lorton, D., & Bellinger, D. L. (2015). Molecular mechanisms underlying  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5635–5665. <http://doi.org/10.3390/ijms16035635>
- Lundegårdh, G., Ekbom, A., McLaughlin, J. K., & Nyrén, O. (1994). Gastric cancer risk after vagotomy. *Gut*, 35(7), 946–949.
- Ma, J., Siegel, R., & Jemal, A. (2013). Pancreatic cancer death rates by race among US men and women, 1970–2009. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(22), 1694–1700. <http://doi.org/10.1093/jnci/djt292>
- Magnon, C., Hall, S. J., Lin, J., Xue, X., Gerber, L., Freedland, S. J., & Frenette, P. S. (2013). Autonomic Nerve Development Contributes to Prostate Cancer Progression. *Science*, 341(6142), 1236361–1236361. <http://doi.org/10.1126/science.1236361>
- Monje, M. (2017). Settling a Nervous Stomach: The Neural Regulation of Enteric Cancer. *Cancer Cell*, 31(1), 1–2. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.12.008>
- Nakao, A., Harada, A., Nonami, T., Kaneko, T., & Takagi, H. (1996). Clinical significance of carcinoma invasion of the extrapancreatic nerve plexus in pancreatic cancer. *Pancreas*, 12(4), 357–361.
- Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., & Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 15(6), 333–348. <http://doi.org/10.1038/s41575-018-0005-x>
- Ozdemir, B. C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J. L., Zheng, X., Wu, C.-C., Simpson, T. R., et al. (2014). Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell*, 25(6), 719–734. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.005>
- Partecke, L. I., Käding, A., Trung, D. N., Diedrich, S., Sendler, M., Weiss, F., et al. (2017). Subdiaphragmatic vagotomy promotes tumor growth and reduces survival via TNF $\alpha$  in a murine pancreatic cancer model. *Oncotarget*, 8(14), 22501–22512. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.15019>

- Partecke, L. I., Speerforck, S., Käding, A., Seubert, F., Kühn, S., Lorenz, E., et al. (2016). Chronic stress increases experimental pancreatic cancer growth, reduces survival and can be antagonised by beta-adrenergic receptor blockade. *Pancreatology : Official Journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [Et Al.],* 16(3), 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.pan.2016.03.005>
- Peterson, S. C., Eberl, M., Vagnozzi, A. N., Belkadi, A., Veniaminova, N. A., Verhaegen, M. E., et al. (2015). Basal Cell Carcinoma Preferentially Arises from Stem Cells within Hair Follicle and Mechanosensory Niches. *Cell Stem Cell,* 16(4), 400–412. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.006>
- Polakis, P. (2012). Drugging Wnt signalling in cancer. *The EMBO Journal,* 31(12), 2737–2746. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.126>
- Quante, A. S., Ming, C., Rottmann, M., Engel, J., Boeck, S., Heinemann, V., et al. (2016). Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany by 2020 and 2030. *Cancer Medicine,* 5(9), 2649–2656. <http://doi.org/10.1002/cam4.767>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research,* 74(11), 2913–2921. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Renz, B. W., Takahashi, R., Tanaka, T., Macchini, M., Hayakawa, Y., Dantes, Z., et al. (2018a).  $\beta 2$  Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer Cell,* 33(1), 75–90.e7. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.007>
- Renz, B. W., Tanaka, T., Sunagawa, M., Takahashi, R., Jiang, Z., Macchini, M., et al. (2018b). Cholinergic Signaling via Muscarinic Receptors Directly and Indirectly Suppresses Pancreatic Tumorigenesis and Cancer Stemness. *Cancer Discovery,* CD-18-0046. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0046>
- Rhim, A. D., Oberstein, P. E., Thomas, D. H., Mirek, E. T., Palermo, C. F., Sastra, S. A., et al. (2014). Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.021>
- Rogers, A. B., Taylor, N. S., Whary, M. T., Stefanich, E. D., Wang, T. C., & Fox, J. G. (2005). Helicobacter pylori but not high salt induces gastric intraepithelial neoplasia in B6129 mice. *Cancer Res,* 65(23), 10709–10715. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1846>
- Saloman, J. L., Albers, K. M., Li, D., Hartman, D. J., Crawford, H. C., Muha, E. A., et al. (2016). Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 201512603–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1512603113>
- Schuijers, J., & Clevers, H. (2012). Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. *The EMBO Journal,* 31(12), 2685–2696. <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.149>
- Schütz, B., Jurastow, I., Bader, S., Ringer, C., Engelhardt, von, J., Chubanov, V., et al. (2015). Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Frontiers in Physiology,* 6(182), 87. <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00087>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: a Cancer Journal for Clinicians,* 97(suppl 12), 3133–24. <http://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Soares, K. C., Foley, K., Olino, K., Leubner, A., Mayo, S. C., Jain, A., et al. (2014). A preclinical murine model of hepatic metastases. *J Vis Exp,* (91), 51677–e51677. <http://doi.org/10.3791/51677>
- Stopczynski, R. E., Normolle, D., Hartman, D. J., Ying, H., Deberry, J. J., Bielefeldt, K., et al. (2014). Neuroplastic changes occur early in the development of pancreatic ductaladenocarcinoma. *Cancer Research,* 74(6), 1718–1727. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2050>
- Takahashi-Yanaga, F., & Kahn, M. (2010). Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research,* 16(12), 3153–3162. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2943>
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S. W., Shibata, W., Vigneshwaran, R., et al. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells,* 27(5), 1006–1020. <http://doi.org/10.1002/stem.30>

- Thaker, P. H., Han, L. Y., Kamat, A. A., Arevalo, J. M., Takahashi, R., Lu, C., et al. (2006). Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Medicine*, 12(8), 939–944. <http://doi.org/10.1038/nm1447>
- Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E. A., Rickman, B., et al. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*, 14(5), 408–419. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.011>
- Werner, J., Combs, S. E., Springfield, C., Hartwig, W., Hackert, T., & Büchler, M. W. (2013). Advanced-stage pancreatic cancer: therapy options. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(6), 323–333. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.66>
- Westphalen, C. B., & Olive, K. P. (2012). Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18(6), 502–510. <http://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31827ab4c4>
- Westphalen, C. B., Asfaha, S., Hayakawa, Y., Takemoto, Y., Lukin, D. J., Nuber, A. H., et al. (2014). Long-lived intestinal tuft cells serve as colon cancer-initiating cells. *J Clin Invest*, 124(3), 1283–1295. <http://doi.org/10.1172/JCI73434>
- Westphalen, C. B., Takemoto, Y., Tanaka, T., Macchini, M., Jiang, Z., Renz, B. W., et al. (2016). Dclk1 Defines Quiescent Pancreatic Progenitors that Promote Injury-Induced Regeneration and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 18(4), 441–455. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.016>
- Yu, F.-X., Bin Zhao, Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., et al. (2012). Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell*, 150(4), 780–791. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.037>
- Zahalka, A. H., Arnal-Estabé, A., Maryanovich, M., Nakahara, F., Cruz, C. D., Finley, L. W. S., & Frenette, P. S. (2017). Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. *Science*, 358(6361), 321–326. <http://doi.org/10.1126/science.aah5072>
- Zhang, D., Ma, Q.-Y., Hu, H.-T., & Zhang, M. (2010).  $\beta$ 2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NF $\kappa$ B and AP-1. *Cancer Biology & Therapy*, 10(1), 19–29.
- Zhao, C.-M., Hayakawa, Y., Kodama, Y., Muthupalani, S., Westphalen, C. B., Andersen, G. T., et al. (2014). Denervation suppresses gastric tumorigenesis. *Science Translational Medicine*, 6(250), 250ra115–250ra115. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009569>
- Zhu, Z., Friess, H., diMola, F. F., Zimmermann, A., Gruber, H. U., Korc, M., & Büchler, M. W. (1999). Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(8), 2419–2428. <http://doi.org/10.1200/jco.1999.17.8.2419>

## V Originalarbeiten

1. **Renz BW**, Takahashi R, Tanaka T, Macchini M, Hayakawa Y, Dantes Z, Maurer HC, Chen X, Jiang Z, Westphalen CB, Ilmer M, Valenti G, Mohanta SK, Habenicht AJR, Middelhoff M, Chu T, Nagar K, Tailor Y, Casadei R, Di Marco M, Kleespies A, Friedman RA, Remotti H, Reichert M, Worthley DL, Neumann J, Werner J, Iuga AC, Olive KP, Wang TC.  
β2 Adrenergic-Neurotrophin Feed-Forward Loop Promotes Pancreatic Cancer  
*Cancer Cell.* 2018 Jan 8;33(1):75-90.e7. doi: 10.1016/j.ccr.2017.11.007. Epub 2017 Dec 14
2. **Renz BW**, Tanaka T, Sunagawa M, Takahashi R, Jiang Z, Macchini M, Dantes Z, Valenti G, White RA, Middelhoff MA, Ilmer M, Oberstein PE, Angele MK, Deng H, Hayakawa Y, Westphalen CB, Werner J, Remotti H, Reichert M, Tailor Y, Nagar K, Friedman RA, Iuga AC, Olive KP, Wang TC.  
Cholinergic Signaling via Muscarinic Receptors Directly and Indirectly Suppresses Pancreatic Tumorigenesis and Cancer Stemness  
*Cancer Discov.* 2018; 8(11): 1458-73. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0046
3. Zhao CM, Hayakawa Y, Kodama Y, Muthupalani S, Westphalen CB, Andersen GT, Flatberg A, Johannessen H, Friedman RA, **Renz BW**, Sandvik AK, Beisvag V, Tomita H, Hara A, Quante M, Li Z, Gershon MD, Kaneko K, Fox JG, Wang TC, Chen D.  
Denervation Suppresses Gastric Tumorigenesis  
*Sci Transl Med.* 2014 Aug 20;6(250):250ra115. doi: 10.1126/scitranslmed.3009569.
4. Hayakawa Y, Sakitani K, Konishi M, Asfaha S, Niikura R, Tomita H, **Renz BW**, Tailor Y, Macchini M, Middelhoff M, Jiang Z, Tanaka T, Dubeykovskaya ZA, Kim W, Chen X, Urbanska AM, Nagar K, Westphalen CB, Quante M, Lin CS, Gershon MD, Hara A, Zhao CM, Chen D, Worthley DL, Koike K, Wang TC.  
Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling  
*Cancer Cell.* 2017 Jan 9;31(1):21-34. doi: 10.1016/j.ccr.2016.11.005. Epub 2016 Dec 15.