

AUS DER KLINIK FÜR ALLGEMEIN-, VISZERAL- UND TRANSPLANTATIONSCHIRURGIE

DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. MED. J. WERNER



SIGNALWEGSREGULATION VON KREBSSTAMMZELLEN SOLIDER,
GASTROINTESTINALER TUMOREN UND DEREN TRANSLATIONALE
BEHANDLUNGSSTRATEGIEN

HABILITATIONSSCHRIFT

ZUR ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI

FÜR DAS FACH CHIRURGIE

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

VORGELEGT VON DR. MED. MATTHIAS ILMER

2020

I	EINLEITUNG	3
II	TEILPROJEKTE UND BEDEUTUNG FÜR DAS FACHGEBIET	6
II.1	AUSWIRKUNGEN VON RSPO2-VERSTÄRKTEM KANONISCHEN WNT-SIGNALWEG AUF DAS DUKTALE ADENOKARZINOM DES PANKREAS UND SEINE KREBSSTAMMZELLEN (ILMER ET AL., CANCER RESEARCH, 2015).....	7
II.1.1	<i>Signifikanz</i>	7
II.1.2	<i>Wissenschaftlicher Hintergrund des Teilprojekts</i>	7
II.1.3	<i>Heterogene WNT-Aktivität führt zu funktionellen Unterschieden im PDAC</i>	8
II.1.4	<i>Tumorigenes und metastatisches Potential von WNT-aktiven PDAC Zellen</i>	10
II.1.5	<i>Erhöhte WNT - Aktivität fördert die Chemoresistenz im PDAC</i>	11
II.1.6	<i>RSPO2 beeinflusst vor allem WNT-responsive PDAC Zellen</i>	11
II.1.7	<i>Diskussion und Relevanz der Ergebnisse</i>	13
II.2	EINFLUSS DES JNK-SIGNALWEGS AUF DAS APOPTOSEVERHALTEN VON PDAC UND SEINEN CSCs NACH TRAIL- BEHANDLUNG (RECIO-BOILES UND ILMER ET AL., ONCOTARGET, 2016)	16
II.2.1	<i>JNK reguliert das Wachstum und Überleben im PDAC</i>	17
II.2.2	<i>JNKi sensibilisiert PDAC für TRAIL-induzierte Apoptose unabhängig von CSC- bzw. Resistenzstatus</i>	18
II.2.3	<i>JNKi und TRAIL in Kombination reduzieren PDAC Tumorwachstum</i>	20
II.2.4	<i>Diskussion und Relevanz der Ergebnisse</i>	20
II.3	THERAPEUTISCHER WERT DER NK1R-BLOCKADE IN SOLIDEN TUMOREN UND CSCs (ILMER ET AL., MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, 2015)	22
II.3.1	<i>NK1R Inhibition führt konsekutiv zur Hemmung von AKT und WNT</i>	22
II.3.2	<i>NK1R-Antagonismus hemmt das Wachstum von CSC-artigen Zellen im HB</i>	24
II.3.3	<i>Diskussion und Relevanz der Ergebnisse</i>	24
II.4	RETROSPEKTIVE ANALYSE NACH RESEKTION METACHRONER LUNGENMETASTASEN BEI PATIENTEN MIT PDAC (ILMER ET AL., SURGICAL ONCOLOGY, 2019)	26
II.4.1	<i>Einschlusskriterien</i>	26
II.4.2	<i>Ergebnisse</i>	27
II.4.3	<i>Diskussion und Relevanz der Ergebnisse</i>	27
III	ZUSAMMENFASSUNG	29
IV	LITERATUR	31
V	ORIGINALARBEITEN DER KUMULATIVEN HABILITATIONSLEISTUNG	35

I Einleitung

Unter den soliden Tumorerkrankungen des Menschen stellen die des Gastrointestinaltrakts und die des hepatopankreatobiliären Systems die häufigsten dar. Hierbei entfallen ca. 19 % auf den kolorektalen Bereich und ca. 9 % auf Tumoren des Pankreas bzw. der Leber (Schönfeld et al., 2018; Hermann et al., 2019; Hölzel et al., 1998). Dabei stellt die chirurgische Resektion dieser Neoplasien vollständig im Gesunden (R0) die einzige potentielle Heilungschance für die betroffenen Patienten dar. In Bezug auf ihre Tumorbiologie und Aggressivität unterscheiden sich die erwähnten Tumorentitäten allerdings deutlich, was auch ein Kriterium im Hinblick auf die Resektabilität darstellt.

Als häufigster bösartiger Tumor der Bauchspeicheldrüse weist das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) zwar weltweit keine hohe Inzidenz auf, jedoch zeigt sich in aktuellen Prognosen, dass es bis 2030 insbesondere in den USA und in Europa die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache sein wird (Malvezzi et al., 2016; Quante et al., 2016; Rahib, Smith, Aizenberg, Rosenzweig, Fleshman, & Matrisian, 2014a). Zum Zeitpunkt der Diagnose sind nur etwa 10% aller PDACs chirurgisch lokal resektabel Befunde mit einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von aktuell 32%. Hingegen gehören 29% in die Gruppe der regionalen bzw. lokal fortgeschrittenen Erkrankungen, die eine 5-JÜR von lediglich 12% aufweisen (Siegel, Miller, & Jemal, 2018). Einige Patienten der letzteren Gruppe können jedoch nach gutem Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie resektabel werden. Insgesamt wird leider bei der Mehrheit der Patienten (52%) weiterhin eine Erkrankung im metastasierten Stadium diagnostiziert (Werner et al., 2013). Zu diesem Zeitpunkt stehen dann allerdings nur relativ ineffiziente systemische Therapien zur Verfügung. In der Konsequenz hat diese Gruppe weiterhin derzeit nur eine ca. 3%-ige 5-JÜR aufzuweisen (Chan et al., 2019; Siegel et al., 2018). In Summe können daher nach sorgfältigem Staging lediglich 15-20% der Patienten mit PDAC einer primären Resektion zugeführt werden (Neoptolemos et al., 2017).

Obwohl einige Fortschritte zu verzeichnen sind, haben PDAC-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose wie eben geschildert immer noch eine ungünstige Prognose, so dass das 5-Jahres-

Gesamtüberleben (OS) aller PDAC-Patienten maximal etwa 10% beträgt (Nevala-Plagemann et al., 2019). Die Prävention ist schwierig, da nur wenige mit einer höheren Inzidenz verbundene Faktoren bekannt sind und nur eine geringe Anzahl spezifischer Risikofaktoren eng mit dem Auftreten von PDAC verbunden ist. Das randomisierte Screening von Patienten mit hohem Risiko, z. B. Patienten mit PDAC in der Familienanamnese, mittels MRT oder endoskopischem Ultraschall hat nicht zum erwarteten Erfolg geführt (Vasen et al., 2016). Derzeitige Tests zur frühzeitigen Entdeckung existieren nicht, was zum einen auf die wenigen spezifischen Symptome und zum anderen auf die schwierige räumliche Zugänglichkeit der Bauchspeicheldrüse zurückzuführen ist.

Das Hepatoblastom (HB) ist der häufigste bösartige Lebertumor im Kindesalter (Schweinitz et al., 2012). Ähnlich dem PDAC, ist die Prognose dieser jungen Patienten immer dann günstig, wenn eine vollständige chirurgische Resektion des Tumors möglich ist. Bei Hochrisikopatienten mit fortgeschrittenem Tumorleiden (SIOPEL PRETEXT IV oder COG Stadium IV) ist die Prognose hingegen viel schlechter (Schweinitz et al., 2012). Bei den letzteren Patienten ist neben einer entsprechenden chirurgischen Therapie eine zusätzliche Chemotherapie die treibende Kraft für ein längeres Überleben. Als Parallele zum PDAC ist auch hier zu erwähnen, dass nach einer Reihe von Chemotherapiezyklen eine rasche Resistenzentwicklung auftritt und damit die Behandlungsmöglichkeiten der Patienten deutlich eingeschränkt ist (Berger et al., 2014). Die Implementierung neuer Medikamente für zukünftige Therapien ist daher bei beiden Entitäten von entscheidender Bedeutung.

Ein Erklärungsansatz für die Aggressivität dieser Tumoren und die schnelle Entstehung der Chemoresistenz stellt das Konzept der Krebsstammzellen (CSCs) dar. Dieses postuliert, dass bei heterogenen (soliden) Tumoren eine Untergruppe von Zellen, die mit speziellen Eigenschaften ausgestattet sind, an der Spitze einer gewissen Hierarchie stehen könnte. Ursprünglich wurden CSCs als Gruppe von neoplastischen Zellen definiert, die sich unbegrenzt vermehren und einen neuen Tumor initiieren können (Selbsterneuerung und Tumorentstehung) (Valent et al., 2012); die aktuelle Literatur spricht CSCs aber auch viele weitere Eigenschaften zu, zu denen u.a. ein höherer Grad an Plastizität, Chemoresistenz sowie die Fähigkeit zur Metastasierung gehört. Diese

Eigenschaften werden möglicherweise durch die Aktivierung von CSC-assoziierten Signalwegen, zu denen auch der WNT-Signalweg gehört, modifiziert (Ilmer & Horst, 2015; Ilmer, Boiles, et al., 2015).

Wie bereits erwähnt gibt es bei beiden Tumorentitäten einen Mangel an Therapeutika, die effektiv und spezifisch in der Klinik eingesetzt werden können. Ein Ansatz zur schnellen Implementierung neuer Therapeutika ist daher das sogenannte ‚*Repurposing*‘ oder die Wiederverwendung von Medikamenten, die für andere Indikationen bereits etabliert und zugelassen sind. Eine immer größere Anzahl an Veröffentlichungen und klinischen Studien versucht daher antineoplastische Eigenschaften von solchen Präparaten zu erforschen. In eigenen Arbeiten konnten wir hier beispielsweise zeigen, dass die Beeinflussung der sympathischen bzw. parasympathischen Achse mittels Propranolol oder Bethanechol den Verlauf von PDAC *in vitro* und *in vivo* positiv beeinflusst (Renz et al., 2018; Renz et al., 2018).

Abgesehen von der Organspezifität kann der CSC-hemmende Therapieansatz ein wichtiger Baustein der Tumortherapie sein. Daher könnte das „Repurposing“ von Arzneimitteln eine faszinierende und schnelle Methode mit neuen therapeutischen Paradigmen bei der Krebsbehandlung darstellen.

Im vorliegenden Habilitationsprojekt wurde die Verknüpfung der beschriebenen Themenkomplexe untersucht. Als Schwerpunkt wurde die Signalwegsregulation von CSCs in den erwähnten Tumorentitäten und deren translationale Behandlungsstrategien durch wiederverwendete Arzneimittel gewählt.

II Teilprojekte und Bedeutung für das Fachgebiet

Sowohl das PDAC als auch das kindliche Hepatoblastom sind Tumorentitäten, bei denen der chirurgischen Resektion des Primärtumors, im Rahmen eines multimodalen Behandlungskonzepts, eine große Rolle zukommt. Selbst bei einer vollständig im Gesunden erfolgten chirurgischen Resektion besteht allerdings in vielen Fällen ein hohes Rezidiv- und Metastasierungsrisiko. Ferner ist eine Heilung in der metastasierten Situation annähernd unmöglich. Demzufolge gibt es eine erhebliche wissenschaftliche Notwendigkeit, was sowohl adjuvante als auch palliative Therapiekonzepte anbelangt. Grundlage zur Identifikation neuartiger therapeutischer Ansätze bildet sicherlich ein verbessertes Verständnis der Biologie beider Erkrankungen. Aus diesen Erkenntnissen lassen sich dann entsprechend vielversprechende Behandlungsstrategien entwickeln.

Die hier vorliegende kumulative Habilitationsschrift beschäftigt sich mit der Regulation und Behandlungsansätzen von Krebsstammzellen (CSC) mit dem Fokus auf pankreatischen und hepatischen Modellsystemen. Sie setzt sich aus mehreren Arbeiten zusammen, bei denen zum einen Signalwege zur Regulation von (Krebs-)Stammzellen und deren Rückkoppelungsschleifen analysiert werden und zum anderen die potentiell antineoplastische Wirkung von etablierten Medikamenten auf diese untersucht wird. Hierzu wurden sowohl „state of the art“ *in vitro* Methoden als auch etablierte *in vivo* Mausmodelle verwendet. Die Arbeit versucht damit einen Beitrag zu leisten, grundlagenwissenschaftliche Erkenntnisse translational umzusetzen. Zudem wurde in einem klinischen Teilprojekt eine Kohorte pulmonal metastasierter PDACs retrospektiv auf die Sinnhaftigkeit einer Metastasenresektion analysiert.

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

II.1 Auswirkungen von RSPO2-verstärktem kanonischen WNT-Signalweg auf das duktales Adenokarzinom des Pankreas und seine Krebsstammzellen (Ilmer et al., *Cancer Research*, 2015)

II.1.1 Signifikanz

Diese Arbeit untersucht den Einfluss des kanonischen WNT-Signalwegs und dessen Verstärker RSPO2 auf Krebsstammzellen (CSC) im PDAC. Hierbei sind sowohl die Empfindlichkeit auf diese Signale als auch Rückkopplungsmechanismen über ERK entscheidende Elemente in der PDAC Biologie. Eine zielgerichtete Therapie gegen diese Signalwege zusammen mit etablierten Chemotherapeutika zur Eradikation von sowohl CSCs als auch differenzierten Pankreaskarzinomzellen könnte sich als hilfreich in der Behandlung erweisen.

II.1.2 Wissenschaftlicher Hintergrund des Teilprojekts

Die 5-Jahres Überlebensrate des PDAC liegt nach wie vor nur bei unter 10% und das PDAC wird bis 2030 an die zweite Stelle der krebisbedingten Todesfälle in den westlichen Industrieländern, wie den USA oder auch Deutschland, rücken (Quante et al., 2016; Rahib et al., 2014). Patienten mit anderen gastrointestinalen Malignomen konnten über die letzten Jahrzehnte deutlich von einer verbesserten Therapie und damit verbunden einem längeren Überleben profitieren, wohingegen sich dies bei Pankreaskarzinompatienten im selben Zeitraum nicht signifikant verändert hat. Dafür werden verschiedenste Gründe angeführt. Unter anderem ist das PDAC häufig refraktär gegenüber den meisten etablierten und traditionellen Behandlungsmodalitäten. Hier eingeschlossen sind verschiedene chemotherapeutische Schemata, die chirurgische Resektion, Radiotherapie oder auch deren Kombination. Als ursächlich dafür angesehen wird unter anderem die deutlich vermehrte desmoplastische Reaktion des umgebenden Stromas, welche den Tumor durch den erhöhten intratumoralen Druck sowohl vor dem Erreichen von Chemotherapeutika als auch der körpereigenen Immunantwort schützt (Feig et al., 2012; Olive et al., 2009). Eine weitere Erklärung für die Unwirksamkeit bestimmter Therapien stellt die sog. ‚*Cancer Stem Cell*‘ (CSC) oder Krebsstammzell-Hypothese dar. Diese besagt, dass Tumoren in gewisser Weise hierarchisch

aufgebaut sind, bei der die CSC an der Spitze dieser Pyramide steht und sich durch eine erhöhte ‚Kapazität zur Selbsterneuerung‘ bzw. ‚Tumorbildungsrate‘ in Tiermodellen auszeichnet (Saygin et al., 2018). Zudem scheinen CSCs im Vergleich zu nicht-CSCs weitere besondere Eigenschaften, z.B. die Fähigkeit zur Metastasierung, Strahlen- oder Chemoresistenz, zu besitzen. CSCs werden von entwicklungsbiologischen und damit archaischen Signalkaskaden reguliert. Zu diesen gehören u.a. *Sonic Hedgehog*, *TGF- β* , *Nodal/Activin* sowie der kanonische und nicht kanonische WNT Signalweg. Aus den genannten Gründen werden neue und effektive Therapiestrategien benötigt, die nicht nur den Tumor im Allgemeinen in seinem Wachstum hindern, sondern auch ganz gezielt überaktivierte Signalwege in CSCs bzw. die Sekretion der jeweiligen Liganden aus dem umgebenden Stroma verhindern.

Der kanonische WNT-Signalweg wird von vielen verschiedenen Komponenten sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär kontrolliert. An der Zelloberfläche geschieht dies durch klassische Liganden-Rezeptor-Bindung aus WNT, LRP5/6 sowie Frizzled (Neth et al., 2007). Zudem gibt es Inhibitoren dieses Komplexes wie RNF43 und ZNRF3, welche wiederum durch den sogenannten Amplifikatorkomplex, bestehend aus den Rezeptoren LGR4/5/6 bzw. deren Liganden R-Spondin (RSPO) (RSPO1-4), gehemmt werden können. Dadurch wird ein bestehendes WNT-Signal deutlich verstärkt (Virshup, 2015). Welche Rolle der Amplifikatorkomplex in der Entstehung und Regulation des PDAC spielt, ist bislang unbekannt.

In diesem Teil des Habilitationsprojektes sollte daher die Rolle des kanonischen WNT Signalwegs und insbesondere des WNT-Amplifikators RSPO2 auf Krebsstammzeleigenschaften des PDACs untersucht werden.

II.1.3 Heterogene WNT-Aktivität führt zu funktionellen Unterschieden im PDAC

Um Effekte des kanonischen WNT-Signalwegs zu untersuchen, wurde zunächst das zugrunde liegende Aktivierungsniveau ohne Stimulation gemessen. Dazu wurden PDAC Zellen mit einem Luziferase-basierten SuperTOP/FOP (STF) Assay untersucht. Hier zeigte sich ein durchwegs niedriges Aktivierungsniveau insbesondere im Vergleich zu Zellen mit mutationsbedingter Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs wie HepG2. Da das STF-Reporter-System jedoch

die individuelle Zellvariabilität der einzelnen WNT-Aktivierung nicht berücksichtigt, verwendeten wir zusätzlich ein lentivirales GFP-gekoppeltes WNT-Reporterkonstrukt (Fuerer & Nusse, 2010), das die Expression von mCherry konstitutiv, die Expression von GFP jedoch nur in Zellen mit aktiviertem WNT-Signalweg liefert. Hier zeigten sich nur wenige Zellen WNT-aktiviert (WNT^{high}); im Durchschnitt waren dies etwa 0,5 – 3% aller PDAC-Zellen.

Berichte von Experimenten im Kolonkarzinom konnten bereits vor Erscheinen dieser Arbeit zeigen, dass Zellpopulationen mit unterschiedlicher intrinsischer WNT-Aktivierung verschiedene funktionelle Eigenschaften aufweisen können (Horst et al., 2012; Vermeulen et al., 2010). Daher wurden WNT^{high} und WNT^{low} PDAC Zellen angereichert und dann im Vergleich zueinander untersucht. Zunächst beobachteten wir deutliche morphologische Unterschiede zwischen WNT^{high} - und WNT^{low} - Populationen sowohl in zwei- als auch in dreidimensionalen Kulturen. Wie erwartet zeigten die WNT^{low} - Zellen epitheliale Zellcluster bzw. eng gepackte Strukturen in Spheroidform, die der der unsortierten L3.6pl-Zelllinie ähnlich waren. Im Gegensatz dazu bildeten die WNT^{high} - Zellen längliche Formen (2D) mit weniger Zell-Zell-Kontakten sowie traubenartiger Morphologie in 3D aus, die für mesenchymale PDAC-Zelltypen charakteristisch sind. Diese Effekte konnten teilweise durch Behandlung mit WNT Inhibitoren, wie z.B. dem niedermolekularen Inhibitor IWR1-Endo, rückgängig gemacht werden. Die Fähigkeit zur Spheroidformation (SFA) wird in diesem Zusammenhang häufig als funktioneller Surrogatmarker für CSCs *in vitro* verwendet und ist in WNT^{high} - Zellen des PDAC signifikant höher als in WNT^{low} -Zellen. Auffallend war der drastische Expressionsunterschied in der quantitativen RT-PCR-Analyse bei CSC-assoziierten Genen wie z. B. *SNAIL*, *NANOG*, *ZEB1* und WNT-Zielgenen in grün (*AXIN2*, *LGR5*, *RSPO2*), die im Vergleich von WNT^{high} - zu WNT^{low} - Zellen eine deutlich höhere Expression aufwiesen. Differenzierungsmarker (*MUC1*, *MUC4*, *CK20*) hingegen waren tendenziell in WNT^{high} - Zellen herabreguliert. Abschließend konnte auch auf Proteinebene mittels Western Blot gezeigt werden, dass eine Hochregulierung des mesenchymalen Markers Vimentin und der Transkriptionsfaktoren SNAIL und ZEB1 in WNT^{high} - Zellen im Vergleich zu WNT^{low} - Zellen stattfindet.

II.1.4 Tumorigenes und metastatisches Potential von WNT-aktiven PDAC Zellen

Im Folgenden wurde die Rolle von WNT^{high} bzw. WNT^{low} PDAC Zellpopulationen in Bezug auf ihr tumorigenes Potential in Xenotransplantaten der Maus untersucht. Hierzu wurden immunsupprimierte, athyme Nu/Nu-Mäuse verwendet. WNT^{high} - und WNT^{low} - Subpopulationen wurden, wie bereits beschrieben, angereichert und anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen in männliche athyme Nu/Nu-Mäuse subkutan implantiert. WNT^{high} bildeten zum einen bedeutend früher Tumoren aus, die zudem im Vergleich auch wesentlich schneller proliferierten. Mit verschiedenen Dilutionsreihen konnte dann gemäß Hu et al. (2009) die CSC-Frequenz der jeweiligen Subpopulation berechnet werden (Hu & Smyth, 2009).

Da subkutane Mausmodelle die Mikroumgebung der Organe nur ungenügend rekapitulieren, wurden in einem nächsten Schritt beide Subpopulationen in einem orthotopen Modell untersucht. Zu diesem Zweck reicherten wir erneut WNT^{high} - und WNT^{low} - Zellen an und implantierten je 100.000 Zellen in den Schwanz des Pankreas von männlichen athymen Nu/Nu-Mäusen. Alle implantierten Zellen bildeten Tumore, jedoch waren die Tumorumfänge in der WNT^{high} - Population signifikant höher. Aus dieser ersten Generation von orthotopen Tumoren isolierten wir Zellen und sortierten erneut die WNT^{high} - Zellen aus WNT^{high} - gebildeten Tumoren bzw. WNT^{low} - Zellen aus WNT^{low} - Tumoren aus. Diese wurden anschließend in Empfänger der zweiten Generation implantiert. Auch hier wuchsen Tumoren aus allen Injektionen, wobei bei Tumoren aus der WNT^{high} - Gruppe ein schnelleres Tumorstadium sowie deutlich größere Tumorumfänge beobachtet werden konnten. Zudem schien sich mit jeder weiteren, höheren Generation die Anzahl der WNT^{high} Zellen zu vermehren.

Interessanterweise konnten wir auch isolierte Metastasen in WNT^{high} - Tumoren (z. B. in der Milz und im Peritoneum) nachweisen. Darüber hinaus lieferten von Metastasen abgeleitete Zellen in SFA-Experimenten eine höhere Anzahl von GFP-positiven Zellen und Sphären mit vermehrt mesenchymaler Morphologie als Tumorzellen aus dem Primärtumor (Ilmer, Boiles, et al., 2015). Des Weiteren besaßen von Metastasen abgeleitete PDAC-Zellen in der Regel eine ausgeprägtere Fähigkeit zur Sphäroidbildung als primäre Tumorzellen. Dies bestätigt, dass die Verwendung von

SFAs in unserem Modellsystem ein valides System zur Vorhersage von sowohl Anoikis-resistentem Wachstum *in vitro* als auch Tumorigenese und Metastasierungsfähigkeit *in vivo* ist.

II.1.5 Erhöhte WNT - Aktivität fördert die Chemoresistenz im PDAC

Wie einleitend beschrieben, ist die intrinsische oder erworbene Arzneimittelresistenz ein klinisch charakteristisches Kennzeichen von PDAC, insbesondere seiner CSCs (Domingo-Domenech et al., 2012). Um dies im Hinblick auf den WNT-Aktivierungsstatus im PDAC zu untersuchen, implantierten wir PDAC Zellen als orthotope Xenotransplantate und randomisierten diese in zwei Gruppen mit einer Kontrollgruppe und einer mit Gemcitabin behandelten Gruppe. Die resultierenden Tumore wurden nach 4 Wochen explantiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie auf ihre GFP-Positivität analysiert. Die Behandlung mit Gemcitabin erhöhte die Zahl der GFP-positiven, also WNT^{high}-Zellen *in vivo* um das 3,4- bis 15,5-fache. Als nächstes untersuchten wir, ob Gemcitabin ähnliche Wirkungen *in vitro* hat. Durch 72-stündige Exposition der Tumorzellen auf Gemcitabin erhöhte sich die relative Anzahl der GFP-positiven Zellen ebenfalls und zwar um das 1,7- bis 6,7-fache.

Im Umkehrschluss besaßen frisch sortierte WNT^{high}-Zellen eine signifikant höhere Resistenz gegenüber Gemcitabin und damit verbunden einen höheren IC₅₀ - Wert (15,12 ng/ml gegenüber 6,15 ng/ml). PDAC-Zellen, die von orthotopen WNT^{high} Xenotransplantaten der ersten oder zweiten Generation stammten, besaßen von Natur aus eine erhöhte Resistenz sowohl gegen Gemcitabin als auch gegen TRAIL (Ling Zhang et al., 2010).

II.1.6 RSPO2 beeinflusst vor allem WNT-responsive PDAC Zellen

Um ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Reaktionen von PDAC-Zellen auf extrinsische WNT-Liganden und -Amplifikatoren, wie auf Mitglieder der RSPO-Familie, zu erhalten, stimulierten wir verschiedene Zelllinien mit rekombinantem, humanen (rh) WNT3a, rhRSPO2 oder einer Kombination davon. Wie bereits berichtet (Arensman et al., 2013), können PDAC-Zellen in Zelllinien mit niedrigem Ansprechen (z. B. AsPC1, PATX1) bzw. hohem Ansprechen (z. B. BxPC3, L3.6pl) gruppiert werden; die erwähnte Studie konzentrierte sich jedoch

lediglich auf die Induktion des WNT-Signals durch Behandlung mit CHIR990221 oder WNT3-konditioniertem Medium. Laut den neuesten TCGA-Daten war RSPO2 der einzige WNT-Amplifikator, der im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe im PDAC hochreguliert war. Obwohl nicht statistisch signifikant, waren die RSPO2-Kopienzahlen in demselben Datensatz in fortgeschrittenen Tumor- und Lymphknotenstadien tendenziell höher exprimiert. N1-Stadien tendierten im Vergleich zu N0-Stadien dazu höhere RSPO2-Proteingehalte in Gewebe-Mikroarray zu exprimieren.

In weiteren *in vitro* Experimenten beobachteten wir, dass die Behandlung mit RSPO2 alleine oder in Kombination mit WNT3a sehr geringe Auswirkungen auf das WNT-Aktivierungsniveau in Zellen mit niedriger Empfänglichkeit hat, während schnellreagierende Zellen (BxPC3, L3.6pl) deutlich auf WNT3a, RSPO2 sowie deren Kombination reagierten.

Das Zusammenspiel bzw. Rückkopplung von kanonischem WNT- und dem ERK1/2-Signalweg wurde bereits in unterschiedlichen Organsystemen beschrieben. Eine erhöhte ERK1/2-Aktivierung scheint WNT im Melanom zu hemmen, während die Überaktivierung von WNT / β -Catenin im Darmkrebs ERK1/2 stimuliert (Biechele et al., 2012; Guardavaccaro & Clevers, 2012; Jeong et al., 2012). Aktuelle Daten zeigen eine gleichzeitige Aktivierung von WNT und ERK1/2 während der Tumorigenese von PDAC (Yaqing Zhang et al., 2013). Dementsprechend sollte hier untersucht werden, ob eine ähnliche Verbindung in unserem System besteht.

Um diese komplexen Wechselwirkungen besser zu verstehen, führten wir Behandlungen mit RSPO2 / WNT3a (R/W), dem ERK-Inhibitor UO126 oder dem WNT-Inhibitor IWP2 für 3 Tage durch. RSPO2 / WNT3a führte dabei zu erhöhtem p-LRP6 / LRP6, Aktivierung von pERK1/2, Verminderung von E-Cadherin und Induktion von SNAIL und ZEB1. Demgegenüber führte eine UO126-Behandlung zur Inhibition von pERK1/2 und SNAIL / ZEB1. IWP2 reduzierte p-LRP6, LRP5, Dvl2-, SNAIL- und p-ERK-Spiegel stark. Bemerkenswerterweise reduzierte sowohl die UO126- als auch die IWP2-Behandlung die p-ERK- und ZEB1-Spiegel während sich die E-Cadherin-Spiegel erhöhten. Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass ERK *downstream* von kanonischem WNT und ZEB1 reguliert wird. *In vivo* konnte pERK1/2 vorwiegend in Bereichen der Invasionsfront gefunden werden und korrelierte dort mit einer höheren Anzahl von GFP^{high}-,

also WNT-aktiven, Zellen. U0126 führte dosisabhängig zu erhöhten WNT-aktivierenden Effekten von RSPO2. Dies deutet somit in der Gesamtschau auf eine negative Rückkopplungsschleife von pERK1/2 auf LRP6 im PDAC hin.

PDAC-Zellen ändern ihr phänotypisches Erscheinungsbild bei konstanter WNT- oder ERK-Hemmung drastisch. Entsprechend der Herabregulierung der EMT-Transkriptionsfaktoren ZEB1 (durch U0126-Behandlung) oder SNAIL (durch IWP2-Behandlung) wurden PDAC-Zellen morphologisch epithelialer. Interessanterweise besitzen wohl insbesondere die meisten mesenchymalen im Vergleich zu epithelialen PDAC-Zelllinien höhere p-ERK-Werte (Ilmer, Boiles, et al., 2015a).

Hemmung von ERK oder β -Catenin oder deren Kombination durch siRNA wirkte sich deutlich inhibierend auf das Sphärenbildungspotential aus, womit sich die Bedeutung der beiden Signalwege für CSC-ähnliche Zellen im PDAC bestätigt.

II.1.7 Diskussion und Relevanz der Ergebnisse

Metastasenbildung und Medikamentenresistenz sind essentielle Tumormerkmale, die die Prognose, Morbidität und Mortalität von Patienten bestimmen und chirurgische Maßnahmen verhindern können. Das Krebsstammzellmodell wurde aus der Beobachtung entwickelt, dass in vielen Tumoren eine relativ seltene neoplastische Zellsubpopulation die Tumorausbreitung und das Überleben zu beeinflussen scheint (Ailles & Weissman, 2007; P. C. Hermann et al., 2007; Wellner et al., 2009). Das Verhalten von Krebsstammzellen (CSC) wird zum Großteil durch entwicklungsbiologische Signalwege wie Sonic Hedgehog (SHH), Notch und WNT (Scheel & Weinberg, 2012; Takebe, Harris, Warren, & Ivy, 2010; Vermeulen et al., 2010) reguliert, was darauf hindeutet, dass CSCs dynamisch sind und durch Veränderungen der Tumormikroumgebung beeinflusst werden könnten (Lu et al., 2013; Mani et al., 2008; Medema & Vermeulen, 2011). In dieser Arbeit beschäftigten wir uns daher mit der Frage, ob kanonische WNT-Signale eine Rolle bei der Regulierung von Stammzellqualitäten im PDAC spielen.

Wir konnten hier zum einen zeigen, dass eine hohe WNT-Aktivität mit einem EMT-Phänotyp korreliert, was mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von CSCs führt. Zweitens definieren dieselben Zellen eine stark tumorigene Subpopulation von PDAC-Zellen. Darüber hinaus zeigten unsere Experimente, dass WNT^{high}-Zellen *in vivo* bevorzugt WNT^{high}-Nachkommen hervorbringen, die mit höherer Wahrscheinlichkeit metastasierten und RSPO2 produzierten, während WNT^{low}-Zellen in Transplantaten der zweiten Generation nicht mehr dazu in der Lage waren und nie metastasierten. Drittens fanden wir in aggressiven, primären murinen PDAC-Zellen des KPC-Mausmodells, dass CSCs von PDACs WNT-Amplifikatormoleküle im Vergleich zu ihren differenzierteren Gegenstücken überexprimierten (Ilmer, Boiles, et al., 2015a). Bei weniger aggressiven murinen PDACs war dieser Effekt nur marginal. Viertens erwiesen sich WNT^{high}-sortierte Zellen und von WNT^{high}-Tumoren abgeleitete Zellen als resistenter sowohl gegen das Standardchemotherapeutikum Gemcitabin (einem Desoxycytidin-Analogon) als auch gegen TRAIL. Diese Ergebnisse zeigen, dass die intrinsisch hohe Aktivierung des kanonischen WNT-Signals in PDAC eine Population von (aggressiven) Zellen mit Krebsstammzeleigenschaften definieren kann.

Wir fanden zudem heraus, dass RSPO2 in WNT^{high} - Pankreaskarzinomzellen und -tumoren, mit CSC angereicherten Sphäroiden sowie in mit Gemcitabin behandelten Zellen überexprimiert wird, was auf eine hohe Bedeutung dieses WNT-Signalverstärkers im PDAC hindeutet. Darüber hinaus konnte RSPO2 allein das CSC-Verhalten *in vitro* erhöhen. Eine Datenbankanalyse ergab, dass eine mutmaßliche RSPO2-Amplifikation bei Bauchspeicheldrüsenkrebs in einer großen Anzahl (~8%) an Fällen vorliegen könnte (TCGA-Daten, www.cbioportal.org). Als einziges Mitglied der R-Spondin-Familie zeigte RSPO2 eine signifikant höhere Genexpression im PDAC im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe. Wir fanden geringfügig mehr RSPO2^{high} - H-Scores in N1 gegenüber N0 in TMA-Datensätzen und positive Korrelationen mit RSPO2^{high} - und Zeb1^{high} - H-Scores, was die Rolle von RSPO2 in Pankreas-CSCs zusätzlich unterstreicht.

Mechanistisch konnten wir zeigen, dass intrinsische oder extrinsische WNT-Stimuli zu einer konsekutiven ERK-Aktivierung führen. Beide Wege (WNT und ERK) schienen die EMT-

Transkriptionsfaktoren SNAIL (über WNT) und ZEB1 (über ERK) unabhängig zu kontrollieren. Die Aktivierung von ERK durch erhöhte WNT-Aktivität könnte darüber hinaus in diesem Fall ein negativer Regulator in einem fein abgestimmten Rückkopplungsmechanismus von CSCs im PDAC sein.

Zusammenfassend bietet diese Arbeit Einblicke in die interzelluläre WNT-Heterogenität in PDAC-Zellen sowohl desselben Tumors als auch in verschiedenen Tumoren. Wir konnten auch zum ersten Mal zeigen, dass der kanonische WNT-Signalweg amplifiziert durch RSPO2 in einer Untergruppe von Zellen CSC-Merkmale verstärkt und dass die RSPO2-Produktion vermutlich von der PDAC Zelle selbst oder aus benachbarten Zellen in der Tumormikroumgebung stammen könnte. Die nachfolgende ERK-Aktivierung verstärkt oder reguliert WNT am ehesten in einem negativen Feedback-Loop. Daher könnte ein Test auf RSPO2-Überexpression PDAC-Patienten identifizieren, die von einer Kombinationstherapie, z. B. mit Gemcitabin sowie alternierend ERK bzw. kanonischer WNT-Inhibitoren, profitieren könnte.

Das Konzept der phänotypischen EMT / MET-Plastizität im Vergleich zur genetischen Prädisposition (stationärer EMT / CSC-Zustand) im Kontext der Metastasierung wurde kürzlich in einem wegweisenden Übersichtsartikel diskutiert (Brabletz, 2012). Hier wurde erörtert, ob im Falle von EMT / MET-fähigen Krebszellen epigenetische Faktoren epitheliale Tumorzellen modifizieren, die dann als EMT-transformierte CSCs zirkulieren und nach MET eine differenzierte epitheliale Metastase bilden. Im übertragenen Sinn könnten in unserem Modell RSPO2-responsive Zellen für diesen phänotypischen Plastizitäts-typ repräsentativ sein, während RSPO2-unempfindliche Zellen die Zellen des "Steady-State" -Typs verkörpern könnten. Letztendlich nehmen wir an, dass nicht das Basisniveau von WNT, sondern die funktionelle Reaktion und Anpassungsfähigkeit an kontextabhängige WNT-Signale die Determinante für CSC-Artigkeit im PDAC sein könnte.

II.2 Einfluss des JNK-Signalwegs auf das Apoptoseverhalten von PDAC und seinen CSCs nach TRAIL-Behandlung (Recio-Boiles und Ilmer et al., Oncotarget, 2016)

Das PDAC ist, wie bereits erwähnt, typischerweise mit Medikamentenresistenz, früher Metastasierung und somit auch einem ungünstigen Gesamtüberleben vergesellschaftet. Derzeit ist die Resektion die einzige potenziell kurative therapeutische Option für PDAC-Patienten (Hartwig, et al., 2013). Der frühe Nachweis dieses stromareichen, desmoplastischen Tumors ist wegen langer symptomfreier Intervalle schwierig (Olson & Hanahan, 2009). Obwohl zahlreiche Anstrengungen unternommen wurden, um das molekulare und klinische Verständnis des PDAC zu verbessern, ist eine medikamentöse Behandlung bisher unbefriedigend und das 5-Jahres-Überleben hat sich in den letzten Jahrzehnten nur geringfügig, dank des zunehmenden Einsatzes von FOLFIRINOX, verbessert (Conroy et al., 2011; 2018).

Spontane genetische Mutationen machen eine erfolgreiche Behandlung relativ schwierig, da damit den Pankreastumoren Mittel zur Verfügung stehen, um verfügbaren Therapien zu entgehen. Der c-Jun N-terminale Kinase (JNK) - Signalweg ist einer der im PDAC aktivierten Wege. Sein Transkriptionsfaktor c-Jun kann durch zellulären Stress, z. B. Hypoxie oder Entzündungssignale, induziert werden und reguliert neben anderen zellulären Prozessen auch Apoptose (Takahashi et al., 2013). JNK1 inhibiert Apoptose und JNK2 erhöht die Überlebensrate von Tumorzellen durch Aktivierung von AKT. Beide Isoformen sind an der Endothel-Anheftung beteiligt und JNK3 kann die Extravasation zirkulierender Tumorzellen (CTCs) erleichtern. Die verschiedenen JNK-Isoformen spielen auch eine Rolle bei der Besiedlung metastatischer Nischen. Angesichts dessen könnte sich eine pan-JNK-Hemmung im Rahmen der Krebstherapie als besonders wirksam erweisen (Ebelt et al., 2013). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass JNK häufig in PDAC *downstream* von onkogenem KRAS aktiv ist (Davies et al., 2014) und dass die Inaktivierung des JNK-Signals über verschiedene Mechanismen die Apoptose-Induktion in einigen hepatozellulären Karzinomzellen (HCC) erhöhen kann. Der JNK-Signalweg spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Selbsterneuerung und der Tumorigenese von Krebsstammzellen (CSCs) bei Gliomen (Yoon et al., 2012) und im PDAC (Okada et al., 2014).

CSCs weisen bemerkenswerte Fähigkeiten zur Selbsterneuerung, Tumorigenese, Medikamentenresistenz und Anpassungsfähigkeit an die sich verändernde Mikroumgebung auf. Als solche werden CSCs als Treiber in der Chemoresistenz und Metastasierung angesehen (Y. Liu et al., 2015; Lonardo et al., 2011; Todaro et al., 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es selektiv molekulare Wege zu identifizieren, die das Krebswachstum, insbesondere das von CSCs, wirksam hemmen können. Im Mittelpunkt stand daher, ob JNK-Signale eine entscheidende Rolle bei differenzierten PDAC bzw. bei Pankreas-CSCs spielen. Daraus abgeleitet sollte ein Weg identifiziert werden, der zu einer Herabregulierung der Decoy-Rezeptoren 1 und 2 (DcR1 / 2) führt, ohne die Physiologie normaler gewebeständiger Stammzellen zu beeinträchtigen. Dies sollte auch unter hypoxischen Bedingungen, ähnlich der desmoplastischen Umgebung von PDACs, gelten. Dementsprechend haben wir das Konzept der niedrig dosierten JNK-Inhibition in Kombination mit niedrig dosiertem TRAIL als möglichen neuen und selektiven therapeutischen Ansatz für CSCs im PDAC untersucht.

II.2.1 JNK reguliert das Wachstum und Überleben im PDAC

Um die Rolle und den Mechanismus von JNK im PDAC zu verstehen, behandelten wir verschiedene gut charakterisierte Pankreaskarzinom-Zelllinien mit dem JNK-Inhibitor SP600125 in Konzentrationen zwischen 0,5 und 20 μM , was bis zu 20-fach unterhalb der typischerweise in *in-vitro*-Studien verwendeten Dosis liegt (Konno et al., 2014; Mingo-Sion et al., 2004; Tinghu Zhang et al., 2012). In vorausgehenden Publikationen wurde gezeigt, dass SP600125 ein selektiver Inhibitor von JNK ist und eine 300-fache Selektivität für JNK im Vergleich zu ERK2, p38 und der nicht verwandten Serin-Threonin-Kinase PKA aufweist (Bennett et al., 2001).

Die Behandlung mit niedrigen Dosen SP600125 (0,5 μM oder 1,0 μM) führte zu keiner signifikanten Auswirkung auf die Viabilität in Panc1-, MiaPaCa2-, L3.6pl-, Patx1- und HS766T-Zellen. Erst hohe Dosen (5,0 bis 20,0 μM) verringerten die Viabilität der Zellen deutlich. Die Auswirkung von JNKi auf das klonogene Wachstumsverhalten von PDAC Zellen wurde mit Hilfe von Koloniebildungsassays bestimmt. Eine quantitative Analyse nach 10 Tagen zeigte eine

dosisabhängige Hemmung sowohl der Anzahl als auch der Größe der Kolonien. Dies war bereits bei niedrig dosiertem JNKi signifikant (0,5 μ M).

Um den mechanistischen Hintergrund zu beleuchten, führten wir qRT-PCR Analysen für etablierte JNK-Zielgene (darunter c-Jun, Survivin, CKD1, MMP1 und c-Myc) in unbehandelten und mit JNKi-behandelten PDAC Zellen in niedriger Dosierung (0,5 μ M) durch (Kuntzen et al., 2005). JNK- sowie CSC-Zielgene (CD24, EpCAM, BMI1 und LGR5) waren nach der Behandlung signifikant herunterreguliert.

Da JNKi bekannte CSC-Zielgene zu hemmen schien, sollte die Rolle von JNK in CSCs genauer untersucht werden. Zur quantitativen Schätzung der Anzahl der CSCs wurde erneut ein SFA, wie in 5.1 beschrieben, verwendet. Ähnlich wie bei der JNKi-induzierten Reduktion der Koloniebildung reduzierte eine Behandlung mit JNKi bereits ab einer Konzentration von nur 0,5 μ M sowohl die Anzahl als auch die Größe der Sphäroide in MiaPaCa2 und L3.6pl signifikant, während Panc1 1 μ M benötigte.

Um die Auswirkungen von JNKi auf die CSC-Eigenschaften besser zu verstehen, führten wir qRT-PCR Experimente der CSC-Marker Oct3/4, Nanog, Sox2 und CD44 durch. Es zeigte sich, dass die Expression dieser CSC-Marker in Sphäroiden signifikant höher war als bei differenzierten PDAC Zellen. Niedrig dosiertes (0,5 μ M) JNKi senkte jedoch die Expression dieser CSC-Marker in CSCs auf Werte, die annähernd denen differenzierter PDAC Zellen waren, was darauf hindeutet, dass JNKi-behandelte CSCs ihren CSC-Phänotyp in der Sphäroidkultur zumindest teilweise verlieren könnten.

II.2.2 JNKi sensibilisiert PDAC für TRAIL-induzierte Apoptose unabhängig von CSC- bzw. Resistenzstatus

Krebszellen zeigen im Vergleich zu nicht-malignen Zellen eine erhöhte Expression der TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5, was TRAIL zu einem natürlichen Apoptoseinduktor mit einer bevorzugten Wirkung auf Krebszellen macht (Lemke et al., 2010). MTT-Assays zeigten jedoch, dass CSCs gegenüber TRAIL-induziertem Zelltod signifikant resistenter sind als differenzierte PDAC Zellen. Weitere Apoptose-experimente konnten zeigen, dass niedrig dosiertes JNKi

(SP600125 oder JNK-IN-8 mit 500nM) bzw. TRAIL (10 ng/ml) allein nur einen mäßigen Effekt auf die Viabilität von PDAC Zellen hatte.

Da wir nach der Behandlung mit JNKi eine erhebliche Verringerung des CSC-Potentials beobachtet hatten, untersuchten wir die Auswirkungen der Kombination JNKi und TRAIL unter der Annahme, dass eine Kombination aus niedrig dosiertem JNKi (0,5 μ M) bzw. TRAIL (10 ng/ml) klinisch erreichbar und damit ein günstiges Nebenwirkungsprofil hat. Die Kombination führte zu einer deutlichen Verringerung der Viabilität in allen drei getesteten Krebszelllinien. Zusätzlich zeigte sich, dass PDAC Sphäroide hochsignifikant auf die Kombination sowohl in Anzahl als auch Größe ansprachen. Darüber hinaus wurde deutlich, dass mit JNKi und TRAIL in Kombination eine erhöhte Apoptose-Aktivität im Vergleich zu TRAIL alleine in einem FITC-Annexin-V-Apoptose-Detektionsassays erreicht wurde.

In einem weiteren Schritt sollte überprüft werden, ob PDAC-Zellen mit erworbener TRAIL-Resistenz durch JNKi gegenüber einer Behandlung mit TRAIL-induzierter Apoptose sensibilisiert werden können. Dazu wurde eine TRAIL-resistente Zelllinie mit erworbener Resistenz erstellt und mit ihrer nicht sensibilisierten Mutter-Zelllinie verglichen. Die Wirkung des bereits etablierten Regimes mit niedrig dosiertem JNKi (0,5 μ M) und TRAIL (10 ng/ml) zeigte auch hier Wirkung in Bezug auf Zelltodinduktion sowie SFA-Formation.

Gleichzeitig konnten wir aber in einem zentralen Punkt dieser Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit den Wirkstoffen alleine bzw. deren Kombination auf gewebeständige Stammzellen des Fettgewebes (hASCs) weder eine Auswirkung auf ihr Proliferations- noch auf ihr Differenzierungsverhalten hatte. Somit kann postuliert werden, dass JNKi und TRAIL alleine oder in Kombination die Funktionalität von adulten hASCs in der angewendeten Dosis nicht beeinträchtigt. Dasselbe konnte auch unter hypoxischen Bedingungen repliziert werden (Recio Boiles et al., 2016).

II.2.3 JNKi und TRAIL in Kombination reduzieren PDAC Tumorwachstum

Um der klinischen Situation gerecht zu werden, injizierten wir PDAC Zelllinien in orthotopen Xenomodellen wiederum in den Pankreasschwanz von männlichen, athymen Nu/Nu- Mäusen und behandelten die Tiere nach einer entsprechender Wachstumsvalenz mit TRAIL, JNKi, der Kombination sowie dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabin für vier Wochen. Wir konnten zeigen, dass TRAIL und vor allem die Kombination mit JNKi, das Tumorwachstum sowie das Tumorgewicht deutlich reduzierten. Wie bereits *in vitro* beobachtet, stellten wir fest, dass die p-c-Jun-Expression als Zeichen des aktivierten JNK-Signalwegs in mit JNKi/TRAIL behandelten Tumoren im Vergleich zur Vehikelkontrolle stark reduziert war.

Um die zugrunde liegende molekulare Assoziation von JNK-Aktivierung und TRAIL-Resistenz besser zu verstehen, behandelten wir PDAC mit JNKi, TRAIL oder der Kombination für 24h. In Sandwich-ELISA Versuchen zeigte sich eine erhöhte Sekretion von IL-8 nach TRAIL-Behandlung, was durch zusätzliches JNKi merklich inhibiert wurde. IL-8 wiederum induzierte DcR1, den IL-8 – Rezeptor CXCR1 sowie IL-8, was letztendlich zu einer positiven Rückkoppelung führen könnte. JNKi hingegen verminderte diese Effekte auf das Ausgangsmaß oder sogar darunter.

Zusammengefasst ergeben unsere Ergebnisse das folgende Modell: Pankreas-CSCs entgehen der TRAIL-induzierten Apoptose durch Aktivierung des JNK-Signals, was wiederum zu einer erhöhten IL-8-Sekretion und TRAIL-Resistenz durch Herunterregulierung von DR4 / DR5 und Hochregulierung von DcR1 führt. IL-8 induziert die Expression seines eigenen Zelloberflächenrezeptors CXCR1, was zu einer autokrinen Rückkopplungsschleife führt. Dies könnte vermutlich die TRAIL-Resistenz in Pankreaskarzinomen aufrechterhalten. Andererseits könnte diese Rückkoppelung durch JNKi (SP600125), α IL-8 oder α CXCR1 auf mehreren Ebenen unterbrochen werden, wodurch der TRAIL-empfindliche PDAC-Subtyp wiederhergestellt wird.

II.2.4 Diskussion und Relevanz der Ergebnisse

JNK reguliert vermutlich CSCs und stellt einen möglichen Ausweg aus der Apoptose dar, wobei der Großteil dieser Daten aus Studien mit hepatozellulärem Karzinom stammt (Choi, 2013; Mucha

et al., 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CSC-ähnliche Gliomzellen vom JNK-Signalweg abhängen, was diesen als attraktives Ziel für therapeutische Strategien prädestiniert (Chen, 2012; Yoon et al., 2012). Interessanterweise zeigen neuere Studien, dass onkogenes KRAS eine essentielle Achse mit dem JNK-Weg, der die Bildung von Pankreastumoren regulieren kann, bildet (Okada et al., 2014).

In dieser Arbeit fanden wir heraus, dass eine niedrig dosierte JNK-Hemmung (JNKi) die Wachstumsmuster und Funktionalität verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien, mit CSC angereicherter Sphäroide und Tumoren *in vivo*, signifikant verringert. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass JNK im PDAC für proliferative Aktivitäten von differenzierten Tumorzellen sowie die Regulierung der Selbsterneuerung in Pankreas-CSCs wichtig sind.

In einem Versuch, den antiproliferativen Effekt von JNKi für einen translationalen Antitumor-Ansatz zu potenzieren, kombinierten wir niedrig dosiertes JNKi mit einem natürlichen Apoptose-induzierenden Wirkstoff. Hier entschieden wir uns für TRAIL, welches von vielen Geweben produziert wird und aufgrund seiner Expression durch die funktionellen TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 hauptsächlich in neoplastischen Zellen extrinsische Apoptose induziert (Mohr, Yu, & Zwacka, 2015). Im Falle von PDAC wird der TRAIL-induzierte Zelltod hauptsächlich durch DR4 vermittelt (Lemke et al., 2010). Viele Tumore entwickeln jedoch auch Resistenzmechanismen, indem sie intrinsische Inhibitoren der Apoptose, z. B. c-FLIP oder die nicht funktionalen Decoy-TRAIL-Rezeptoren DcR1 oder DcR2 (Lidong Zhang & Fang, 2005; Ling Zhang et al., 2010) hochregulieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von JNKi und TRAIL die Viabilität in Tumorzellen und in noch stärkerem Maße in CSCs reduziert. Bemerkenswerterweise überwindet JNKi sogar die erworbene TRAIL-Resistenz in PDAC und CSCs, indem DR4 und DR5 hoch- und DcR1 und DcR2 herunterreguliert werden. Ähnliche Effekte wurden in mehreren orthotopen Pankreastumoren beobachtet und das bei bis zu 40-fach niedrigeren Konzentrationen als in anderen Arbeiten (Waugh & Wilson, 2008).

Darüber hinaus zeigen wir, dass JNKi, TRAIL und die Kombination dieser beiden Wirkstoffe (in bis zu fünffacher Dosierung der in unseren *in vivo*-Experimenten verwendeten Dosen) keinen Einfluss auf die Proliferation, das Überleben und vor allem auf die funktionelle

Differenzierungsfähigkeit von hASCs hatten. Dies deutet darauf hin, dass das Konzept der JNKi / TRAIL-Kombinationstherapie von Patienten mit Bauchspeicheldrüsenkrebs klinisch gut vertragen werden könnte.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass JNK ein wichtiger regulatorischer Signalweg in Pankreas-CSCs ist. Seine Hemmung bietet einen neuartigen, selektiven Ansatz zur Behandlung von PDAC, indem er sowohl auf differenzierte als auch (resistente) CSCs abzielt.

II.3 Therapeutischer Wert der NK1R-Blockade in soliden Tumoren und CSCs (Ilmer et al., Molecular Cancer Therapeutics, 2015)

Wir konnten in vorhergehenden Publikationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass die Blockade des Neurokinin 1 Rezeptors (NK1R), dem entscheidenden Rezeptor für Substanz P (SP), zu einem deutlich verminderten Tumorzellwachstum im Hepatoblastom (Berger et al., 2014) und kolorektalen Karzinom (CRC) (Garnier et al., 2015) führt. Bis dato war der molekulare Mechanismus als Treiber hinter dieser Inhibition aber völlig unklar. Daher sollte in diesem Teilprojekt dieser Aspekt erforscht werden. Als Modell wurde das Hepatoblastom (HB), die häufigste maligne Lebererkrankung im Kindesalter, herangezogen. Ähnlich dem PDAC entwickelt es schnell Resistenzen gegen multiple Therapien.

II.3.1 NK1R Inhibition führt konsekutiv zur Hemmung von AKT und WNT

Um zu untersuchen, welche Signalwege von der NK1R-Hemmung betroffen sind, behandelten wir die humanen HB-Zelllinien HepT1, HepG2 und HuH6 mit 20 und 40 μM Aprepitant. Diese wurden dann auf Änderungen ihres Proteinexpressionsniveaus mittels ‚Reverse Phase Protein Array‘ (RPPA) durchgemustert (Hennessy et al., 2010). In diesem Array werden Proben auf 172 Proteine und Phosphoproteine analysiert, die mit häufig dysregulierten Tumorsignalwegen assoziiert sind. Wir fanden heraus, dass sich nur wenige dieser Signalwege signifikant veränderten. Wie aus der bereits erwähnten Arbeit erwartet (Berger et al., 2014), induziert eine Behandlung mit Aprepitant die Hochregulierung von Caspase 7, die maßgeblich zur Apoptose beiträgt. Zudem deutete dieses

Screening darauf hin, dass mehrere Proteine, die dem AKT / mTOR – bzw. WNT – Signalwegen zuzuordnen sind, signifikant modifiziert werden.

Um die Ergebnisse der RPPA-Analyse zu validieren, wurde zunächst der AKT-Weg genauer untersucht. Wir behandelten die HB-Zelllinien HepT1, HepG2 und HuH6 24 Stunden lang mit Aprepitant und analysierten die mRNA-Expressionsniveaus von *AKT1* und *AKT2* mittels qRT-PCR. Steigende Aprepitant-Dosen führten zu einer Abnahme von *AKT1* und *AKT2*. Zusätzliche Immunfluoreszenzfärbungen von p-mTOR (S2448) in behandelten HB-Zellen deuteten auf eine Aktivierung von mTOR durch Translokation in den Zellkern hin.

Um den Einfluss von Aprepitant auf den kanonischen WNT - Signalweg weiter zu untersuchen, führten wir STF-Assays durch und fanden nach Behandlung mit zunehmenden Aprepitant-Dosen eine robuste Hemmung der WNT-Aktivität in allen HB-Zelllinien. Diese Ergebnisse wurden durch qRT-PCR validiert. Hier zeigte sich, dass *LGR5*, *CTNNB1* und *AXIN2* nach AP-Behandlung dosisabhängig herunterreguliert wurde. Kürzlich wurde gezeigt, dass FOXM1 eine wesentliche Rolle als Shuttle-Protein bei der Translokation von β -Catenin in den Nukleus und der anschließenden Aktivierung der kanonischen WNT-Signalkaskade in Gliomzellen spielt (Nu Zhang et al., 2011). Unsere RPPA-Daten deuteten auf eine verminderte FOXM1-Expression nach AP - Behandlung hin. Um die Auswirkungen auf die WNT / β -Catenin-Kaskade weiter zu analysieren, behandelten wir die Zellen 24 Stunden lang mit Aprepitant oder SP (70 nM), färbten sie auf β -Catenin und analysierten sie mittels konfokaler Mikroskopie. Wir beobachteten eine Anreicherung von membrangebundenem β -Catenin nach AP, was auf eine Inaktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs hindeutet. Im Gegensatz dazu veränderte die Stimulation mit SP die WNT-Aktivierung, vermutlich aufgrund der hohen WNT-Grundlinienaktivität in β -Catenin-mutierten HB-Zelllinien, nicht signifikant. Zudem färbten wir die HB-Zellen für FOXM1. Im Gegensatz zu β -Catenin translozierte FOXM1 bei AP-Behandlung in den Zellkern und bewegte sich damit in entgegengesetzter Richtung zu β -Catenin.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass der Antagonismus gegen den SP / NK1R-Komplex durch Aprepitant in HB-Zellen zu einer verringerten Expression und veränderten Lokalisation von β -

Catenin und damit verbunden zu einer verminderten kanonischen WNT-Signalwegsaktivität durch Beeinflussung des Shuttle-Proteins FOXM1 führt.

II.3.2 NK1R-Antagonismus hemmt das Wachstum von CSC-artigen Zellen im HB

Es ist bekannt, dass der WNT-Weg in CSCs stark aktiviert ist. Daher untersuchten wir, ob solche Zellen tatsächlich eine hohe WNT-Aktivität im HB besitzen und ob sie durch Aprepitant inhibiert werden können. CSC-ähnliche Zellen im HB exprimieren vermehrt die embryonalen Stammzellmarker *SOX2*, *OCT4* und *NANOG* sowie die verkürzte Version von NK1R (tr-TACR1) im Vergleich zu nicht-CSCs, wohingegen NK1R (fl-TACR1) mit voller Länge weitgehend unverändert bleibt. Die WNT-Zielgene *LGR5*, *AXIN2* und *CTNNB1* waren in CSCs weitgehend auch überexprimiert (Ilmer, Garnier, et al., 2015b). Hemmung des NK1R-Komplexes mit AP führte in unseren Untersuchungen sowohl zu einer dosisabhängigen Herunterregulierung der WNT-Zielgene *LGR5*, *AXIN2* und *CTNNB1* als auch der zuvor beschriebenen leberspezifischen CSC-Markern (*AFP*, *CD13*, *CD133*, *CK19*, *DLK1*, *EPCAM* und *GEP* (Ilmer, Garnier, et al., 2015b). Schließlich zeigte sich noch eine deutlich signifikante Verminderung der funktionellen Anoikis-Resistenz in SFAs, was auf eine Hemmung der CSC-Funktionalität schließen lässt.

Diese Daten zeigten zum ersten Mal eine Deaktivierung des WNT- sowie AKT/mTOR - Signalwegs durch Hemmung des SP / NK1R-Komplexes in HB-Zellen. Hierbei scheint die Interaktion mit FOXM1 essentiell zu sein. Zudem wurde das CSC-Potential der behandelten Zellen deutlich reduziert. Zusammengefasst unterstreichen die Ergebnisse das Potenzial von NK1R-Antagonisten als wirksame und potentiell additive neue Krebsmedikamente.

II.3.3 Diskussion und Relevanz der Ergebnisse

In dieser Studie untersuchten wir Downstream-Mechanismen im HB nach Hemmung des NK1R Systems durch Aprepitant. Sowohl AKT- als auch WNT-Signalwege konnten gehemmt werden; dies ist ein wichtiger Aspekt, da beide Signalwege an der Tumorigenese verschiedenster Tumorarten beteiligt sind und Inhibition derselben daher potente Antikrebsmedikamente darstellen könnten.

Interessanterweise stellten wir in dieser Studie fest, dass p-AKT (S473 und T308) sowie p-mTOR (S2448) 24 Stunden nach der Behandlung mit Aprepitant erhöht waren. Die frühzeitige Analyse von p-AKT nach wenigen Stunden zeigte jedoch eine verringerte Expression von p-AKT (Daten nicht gezeigt). Im Allgemeinen wird angenommen, dass aktivierte AKT- und mTOR-Signale das Überleben von Krebszellen über mTORC2 vermitteln, wohingegen wir in einer früheren Arbeit bereits zeigen konnten, dass Aprepitant Apoptose in HB-Zelllinien induzieren kann (J. Liu & Brown, 2011). Somit ist die wahrscheinlichste Erklärung für unsere Beobachtungen der späten AKT- und mTOR-Aktivierung eine verzögerte Reaktion der Tumorzellen, um dem induzierten Zelltod zu entgehen, während die nachgeschaltete AKT-Signalübertragung unterdrückt bleibt. Eine weitere mögliche Erklärung ist die Sperrung einer Rückkopplungsschleife durch die NK1R Inhibition. Ähnliche Effekte wurden bei der Behandlung mit Everolimus beobachtet, das die negative Rückkopplungsschleife von AKT über mTORC1, nicht jedoch die positive Rückkopplungsschleife von mTORC2 hemmt und damit im Allgemeinen zu einer Hyperaktivierung von AKT führt (Jhanwar-Uniyal et al., n.d.). Somit identifizieren unsere Daten den AKT-Signalweg eindeutig als einen der wichtigsten Downstream-Mechanismen, der durch den NK1R-Antagonismus gehemmt wird.

Zusätzlich dazu beobachteten wir eine starke Reduktion von FOXM1, einem Schlüsselprotein für die Translokation von β -Catenin in den Zellkern (Nu Zhang et al., 2011). Dieser Effekt scheint insbesondere auf Zellen mit Mutationen des WNT-Weges bzw. Zellen, in denen der Weg extrinsisch aktiviert wurde, aufzutreten. Mechanistisch fanden wir heraus, dass Aprepitant zu vermehrt membrangebundenem β -Catenin sowie einer Störung des für die WNT-Aktivitätsregulation wichtigen FOXM1- β -Catenin-Komplexes führt (Nu Zhang et al., 2011). Zusätzlich zeigte sich auch eine Abnahme des Stammzellpotentials, was ein direkter Effekt auf CSCs sein könnte, aber auch durch die Hemmung der zentralen CSC-Signalwege WNT, AKT und mTOR erklärbar wäre. Eine entscheidende Komponente in dieser Interaktion scheint wiederum FOXM1 zu sein. Die genaueren weiteren molekularen Einflüsse bzw. Vorgänge werden durch diese Arbeit allerdings nicht beleuchtet und sind Gegenstand weiterer zukünftiger Arbeiten.

Zusammengefasst unterstreichen unsere Ergebnisse das Potenzial von NK1R-Antagonisten sowohl auf differenzierte Krebszellen als auch auf CSCs derselben soliden abdominalen Tumoren als wirksame antiproliferative Medikamente.

II.4 Retrospektive Analyse nach Resektion metachroner Lungenmetastasen bei Patienten mit PDAC (Ilmer et al., Surgical Oncology, 2019)

Die meisten Patienten mit PDAC erleiden entweder eine lokale Rezidivrezidiv oder eine metastatische Streuung des Tumors in sekundäre Organe. Dies kann auch als Ausdruck der ausgeprägten CSC-Biologie im PDAC verstanden werden. Dabei zählen metachrone hepatische Fernmetastasen zu den häufigsten (47%), gefolgt von der pulmonalen (22%), der regional nodulären (17%) und der peritonealen Aussaat (13%) (Katz et al., 2009). Auf der einen Seite stellt die Lunge dabei das führende Zielorgan bei Rezidiven drei Jahre nach der primären Operation dar; auf der anderen Seite zeigt sich aber auch, dass die Lunge das häufigste Organ der metachronen Metastasierung bei Langzeitüberlebenden des PDAC ist (Arnaoutakis et al., 2011). Aktuell findet ein Paradigmenwechsel hin zu einem aggressiveren chirurgischen Vorgehen gegenüber pulmonaler Metastasenresektionen (PM) mit ermutigenden Ergebnissen beim kolorektalen Karzinom, beim Weichteilsarkom oder auch beim Nierenzellkarzinom statt (Kawashima et al., 2011; Treasure et al., 2012; Younes et al., 2013). Die Rolle der Chirurgie in der Resektion von pulmonalen metachronen Metastasen des PDAC hingegen bleibt derzeit kontrovers.

II.4.1 Einschlusskriterien

Zur genaueren Einordnung der operativen Therapieoption von pulmonalen Metastasen wurden onkologische und chirurgische Verläufe von Patienten über einen Zeitraum von 12 Jahren an zwei Pankreaszentren Münchens (Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) sowie der Technischen Universität (TUM)) erfasst. Eingeschlossen wurden Patienten, die nach einem primär resezierten PDAC sekundär bei Verdacht auf pulmonale Metastasen chirurgisch behandelt wurden (n = 15). Patienten mit synchroner Lebermetastasierung oder Metastasierung in andere

Sekundärorgane wurden ausgeschlossen. Die Angaben aus den Datenbanken wurden retrospektiv analysiert und univariate Überlebensanalysen durchgeführt.

II.4.2 Ergebnisse

Insgesamt konnten 11 Patienten identifiziert werden, bei denen wegen Verdachts auf metachrone Metastasierung nach PDAC eine Lungenteilresektion dieser Metastasen durchgeführt werden konnte und die anschließende histopathologische Auswertung auch tatsächlich eine Lungenmetastase des PDACs ergab (73,3%). Das mediane krankheitsfreie Überleben (DFS) und das Gesamtüberleben (OS) nach PM-Diagnose betrugen 18 Monate bzw. 26 Monate. Die mediane Zeit bis zur metachronen Metastasierung (TMM) betrug 17 Monate [3–64 Monate] und war damit etwas länger als in vergleichbaren Studien (Wangjam et al., 2015). Es zeigte sich eine geringe perioperative Morbidität (8,3%) ohne perioperative Mortalität. Interessanterweise zeigten Patienten, die später als 17 Monate (mediane TMM) nach der primären Operation eine Lungenmetastasierung entwickelten, ein besseres OS als diejenigen, die früher pulmonale Metastasen entwickelten (32,2 vs. 14,75 Monate, $p = 0,025$). Darüber hinaus hatten Patienten mit höher graduierten und damit schlechter differenzierten Tumoren ein schlechteres Überleben (12,4 vs. 31 Monate, $p = 0,02$). Weder höhere CEA- oder CA 19-9-Spiegel im Serum noch die Anzahl der detektierten pulmonalen Noduli korrelierte signifikant mit einem veränderten OS.

Die erhobenen Daten zeigen zum einen, dass Patienten mit einem späterem Auftreten der metachronen pulmonalen Erkrankung mehr von einer Resektion zu profitieren scheinen und zum anderen, dass der differenzierten Einstufung der primären Tumorbologie anhand seiner Graduierung eine übergeordnete Bedeutung im Hinblick auf eine Metastasenresektion zukommen könnte.

II.4.3 Diskussion und Relevanz der Ergebnisse

Zusammengefasst legt diese Studie nahe, dass eine Metastasektomie von metachronen Lungenherden nach PDAC sicher und wirksam ist. Patienten mit verlängertem DFS nach einer primären Pankreasoperation sowie einer günstigen Tumorklassifizierung anhand des Gradings

scheinen besonders von einer Lungenoperation zu profitieren. Von Nachteil sind sicherlich die Einschränkungen bezüglich des retrospektiven Charakters der Studie und die begrenzte Anzahl von Fällen in dieser Serie. Zukünftige prospektive Studien werden notwendig sein, um unsere Ergebnisse an großen Kohorten zu validieren.

III Zusammenfassung

Immer mehr Arbeiten konnten in der Vergangenheit zeigen, dass das Modellsystem der CSCs nicht nur in liquiden, sondern auch in soliden Tumoren zutreffend sein kann (Prager et al., 2019). Entsprechend sind hier auch das PDAC (P. C. Hermann et al., 2007) sowie primäre Tumoren der Leber (Rountree et al., 2012) eingeschlossen. In den hier vorgestellten Arbeiten konnte herausgearbeitet werden, dass entwicklungsbiologisch wichtige Signalkaskaden, wie z. B. der kanonische WNT-, der JNK-, Hedgehog- sowie der AKT/mTOR-Weg, wichtige Rollen in der Regulation von CSC im PDAC und HB spielen. Dazu zählt auch, dass differenziertere empfindliche Zellen zu CSCs de-differenzieren können. Noch wichtiger erscheint die Tatsache, dass durch die intrinsische oder extrinsische Aktivierung eine Resistenz gegenüber bekannten Chemotherapeutika entstehen kann. Diese Erkenntnis führt auch dazu, dass gezielte und gerichtete Therapien zur Durchbrechung dieses Kreislaufs eingesetzt werden könnten.

Auf der anderen Seite war es auch möglich zu zeigen, dass bereits etablierte Medikamente, wie der NK1-Rezeptor Antagonist Aprepitant, ein häufig verwendetes Präparat gegen Chemotherapie-induzierte Übelkeit und Erbrechen, ein weitaus größeres Potential in Form einer antineoplastischen Wirkung besitzen können. Ergebnisse der vorgestellten Arbeiten konnten zeigen, dass Aprepitant das Wachstum von Tumorzellen hemmt, teilweise Apoptose induziert und vor allem CSC und damit verbundene Signalwegskaskaden unterbinden kann. Die Resultate implizieren ein hohes therapeutisches Potential bei gleichzeitig überschaubaren Nebenwirkungen für den betroffenen Patienten.

Entscheidend ist darüber hinaus die Unterbrechung von Rückkoppelungsschleifen bzw. *Escape*-Mechanismen der Tumorzellen. Dies konnte u.a. durch die zusätzliche Unterbrechung von ERK (Ilmer, Boiles, et al., 2015), aber auch durch die gleichzeitige Anwendung von JNK-Inhibition und TRAIL gezeigt werden (Recio Boiles et al., 2016). Letzteres erscheint durch sein geringes Nebenwirkungsprofil auf normale Stammzellen eine vielversprechende Behandlungsstrategie zu sein.

Abgesehen von der medikamentösen Behandlung stellt die operative Entfernung von Metastasen in potentiell resektablen Fällen eine weitere Option dar. Im Falle von pulmonalen Metastasen des PDAC scheint dies insbesondere von der Tumorbiologie des Primärtumors abzuhängen. Obwohl dies im Moment eher Einzelfallentscheidungen sind, sind diese Operationen sicher und effektiv (Ilmer et al., 2019).

Die vorgelegten Daten implizieren daher, dass ein grundlegendes Verständnis der molekularbiologischen Zusammenhänge durchaus auch therapeutische Relevanz haben kann. Perspektivisch werden sowohl der grundlagenwissenschaftliche Ansatz der Signalwegsregulation von CSCs als auch die translationale Erforschung von etablierten Medikamenten und deren therapeutische Potenz weiterverfolgt.

Insgesamt sind auf Grund der weiterhin schlechten Prognose der vorgestellten Tumorerkrankungen neue therapeutische Modalitäten zur Behandlung dringend notwendig und werden in dem Umfeld auch weiter erforscht werden.

IV Literatur

- Ailles, L. E., & Weissman, I. L. (2007). Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(5), 460–466. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.007>
- Arensman, M. D., Kovochich, A. N., Kulikauskas, R. M., Lay, A. R., Yang, P.-T., Li, X., et al. (2013). WNT7B mediates autocrine Wnt/ β -catenin signaling and anchorage-independent growth in pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*, -. <http://doi.org/10.1038/onc.2013.23>
- Arnautakis, G. J., Rangachari, D., Laheru, D. A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Hruban, R. H., Herman, J. M., et al. (2011). Pulmonary resection for isolated pancreatic adenocarcinoma metastasis: an analysis of outcomes and survival. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 15(9), 1611–1617. <http://doi.org/10.1007/s11605-011-1605-8>
- Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., et al. (2001). SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13681–13686. <http://doi.org/10.1073/pnas.251194298>
- Berger, M., Neth, O., Ilmer, M., Garnier, A., Salinas-Martín, M. V., de Agustín Asencio, J. C., et al. (2014). Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *Journal of Hepatology*, 60(5), 985–994. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.024>
- Biechele, T. L., Kulikauskas, R. M., Toroni, R. A., Lucero, O. M., Swift, R. D., James, R. G., et al. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and AXIN1 Regulate Apoptosis Triggered by Inhibition of the Mutant Kinase BRAFV600E in Human Melanoma. *Science Signaling*, 5(206), ra3–ra3. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2002274>
- Brabletz, T. (2012). To differentiate or not—routes towards metastasis. *Nature Reviews Cancer*.
- Chan, K. K. W., Guo, H., Cheng, S., Beca, J. M., Misner, R. R., Isaranuwachai, W., et al. (2019). Real-world outcomes of FOLFIRINOX vs gemcitabine and nab-paclitaxel in advanced pancreatic cancer: A population-based propensity score-weighted analysis. *Cancer Medicine*, 68(2), 7. <http://doi.org/10.1002/cam4.2705>
- Chen, F. (2012). JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Research*, 72(2), 379–386. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1982>
- Choi, Y. (2013). Cordycepin increases sensitivity of Hep3B human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by inactivating the JNK signaling pathway. *Oncology Reports*, 30(3), 1257–1264. <http://doi.org/10.3892/or.2013.2589>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., et al. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817–1825. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J.-L., et al. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(25), 2395–2406. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- Davies, C. C., Harvey, E., McMahon, R. F. T., Finegan, K. G., Connor, F., Davis, R. J., et al. (2014). Impaired JNK Signaling Cooperates with KrasG12D Expression to Accelerate Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Research*. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2941>
- Domingo-Domenech, J., Vidal, S. J., Rodriguez-Bravo, V., Castillo-Martin, M., Quinn, S. A., Rodriguez-Barrueco, R., et al. (2012). Suppression of Acquired Docetaxel Resistance in Prostate Cancer through Depletion of Notch- and Hedgehog-Dependent Tumor-Initiating Cells. *Cancer Cell*, 22(3), 373–388. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.07.016>
- Ebelt, N. D., Cantrell, M. A., & Van Den Berg, C. L. (2013). c-Jun N-Terminal Kinases Mediate a Wide Range of Targets in the Metastatic Cascade. *Genes & Cancer*, 4(9-10), 378–387. <http://doi.org/10.1177/1947601913485413>
- 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>
- Fuerer, C., & Nusse, R. (2010). Lentiviral Vectors to Probe and Manipulate the Wnt Signaling Pathway. *PloS One*, 5(2), e9370. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009370.g003>
- Garnier, A. S., Vykoukal, J., Hubertus, J., Alt, E., Schweinitz, von, D., Kappler, R., et al. (2015). Targeting the neurokinin-1 receptor inhibits growth of human colon cancer cells. *International Journal of Oncology*. <http://doi.org/10.3892/ijo.2015.3016>
- Guardavaccaro, D., & Clevers, H. (2012). Wnt/ β -Catenin and MAPK Signaling: Allies and Enemies in Different Battlefields. *Science Signaling*, 5(219), pe15. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2002921>
- Hartwig, W., Werner, J., Jäger, D., Debus, J., & Büchler, M. W. (2013). Improvement of surgical results for pancreatic cancer. *The Lancet Oncology*, 14(11), e476–e485. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70172-4](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70172-4)
- Hennessy, B. T., Lu, Y., Gonzalez-Angulo, A. M., Carey, M. S., Myhre, S., Ju, Z., et al. (2010). A Technical Assessment of the Utility of Reverse Phase Protein Arrays for the Study of the Functional Proteome in Non-microdissected Human Breast Cancers. *Clinical Proteomics*, 6(4), 129–151. <http://doi.org/10.1007/s12014-010-9055-y>
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., et al. (2007). Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313–323. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>
- Hermann, S., Onkologe, Der, K. K., 2019. (n.d.). Epidemiologie des Pankreaskarzinoms in Deutschland. *Springer*. <http://doi.org/10.1007/s00761-019-0623-0>
- Horst, D., Chen, J., Morikawa, T., Ogino, S., Kirchner, T., & Shivdasani, R. A. (2012). Differential WNT Activity in Colorectal Cancer Confers Limited Tumorigenic Potential and Is Regulated by MAPK Signaling. *Cancer Research*, 72(6), 1547–1556. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3222>

- Hölzel, D., Schubert-Fritschle, G., Schmidt, M., München, W. T. T., 1998. (n.d.). Schwerpunkt: Kolorektales Karzinom aus klinisch-epidemiologischer Sicht.
- Hu, Y., & Smyth, G. K. (2009). ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of Immunological Methods*, *347*(1-2), 70–78. <http://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.008>
- Ilmer, M., & Horst, D. (2015). Pancreatic CSCs and microenvironment. *Genes & Cancer*, *6*(9-10), 365–366. <http://doi.org/10.18632/genesandcancer.80>
- Ilmer, M., Boiles, A. R., Regel, I., Yokoi, K., Michalski, C. W., Wistuba, I. I., et al. (2015a). RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research*, *75*(9), 1883–1896. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1327>
- Ilmer, M., Garnier, A., Vykoukal, J., Alt, E., Schweinitz, von, D., Kappler, R., & Berger, M. (2015b). Targeting the Neurokinin-1 Receptor Compromises Canonical Wnt Signaling in Hepatoblastoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, *14*(12), 2712–2721. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0206>
- Ilmer, M.; Schiergens, T. S.; Renz, B. W.; Schneider, C.; Sargut, M.; Waligora, R.; Weniger, M.; Hartwig, W.; Ceyhan, G. O.; Friess, H.; Werner, J.; D'Haese, J. G. Oligometastatic pulmonary metastasis in pancreatic cancer patients_ Safety and outcome of resection. *Surg Oncol* 2019, *31*, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2019.08.010>
- Jeong, W.-J., Yoon, J., Park, J.-C., Lee, S.-H., Lee, S.-H., Kaduwal, S., et al. (2012). Ras Stabilization Through Aberrant Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Intestinal Tumorigenesis. *Science Signaling*, *5*(219), ra30. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2002242>
- Jhanwar-Uniyal, M., Gillick, J., Neil, J., Tobias, M., Thwing, Z., & Murali, R. (n.d.). *Advances in Biological Regulation*. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212492614000438>
- Katz, M. H. G., Wang, H., Fleming, J. B., Sun, C. C., Hwang, R. F., Wolff, R. A., et al. (2009). Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, *16*(4), 836–847. <http://doi.org/10.1245/s10434-008-0295-2>
- Kawashima, A., Nakayama, M., Oka, D., Sato, M., Hatano, K., Mukai, M., et al. (2011). Pulmonary metastasectomy in patients with renal cell carcinoma: a single-institution experience. *International Journal of Clinical Oncology*, *16*(6), 660–665. <http://doi.org/10.1007/s10147-011-0244-0>
- Konno, T., Ninomiya, T., Kohno, T., Kikuchi, S., Sawada, N., & Kojima, T. (2014). c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 enhances barrier function and elongation of human pancreatic cancer cell line HPAC in a Ca-switch model. *Histochemistry and Cell Biology*, 1–9. <http://doi.org/10.1007/s00418-014-1300-4>
- Kuntzen, C., Sonuc, N., De Toni, E. N., Opelz, C., Mucha, S. R., Gerbes, A. L., & Eichhorst, S. T. (2005). Inhibition of c-Jun-N-terminal-kinase sensitizes tumor cells to CD95-induced apoptosis and induces G2/M cell cycle arrest. *Cancer Research*, *65*(15), 6780–6788. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2618>
- Lemke, J., Noack, A., Adam, D., Tchikov, V., Bertsch, U., Röder, C., et al. (2010). TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *88*(7), 729–740. <http://doi.org/10.1007/s00109-010-0619-0>
- Liu, J., & Brown, R. E. (2011). Morphoproteomics demonstrates activation of mammalian target of rapamycin pathway in papillary thyroid carcinomas with nuclear translocation of MTOR in aggressive histological variants. *Modern Pathology: an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *24*(12), 1553–1559. <http://doi.org/10.1038/modpathol.2011.121>
- Liu, Y., Zhang, X., Wang, J., Yang, J., & Tan, W.-F. (2015). JNK is required for maintaining the tumor-initiating cell-like properties of acquired chemoresistant human cancer cells. - PubMed - NCBI. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*(9), 1099–1106. <http://doi.org/10.1038/aps.2015.58>
- Lonardo, E., Hermann, P. C., Mueller, M.-T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., et al. (2011). Nodal/Activin Signaling Drives Self-Renewal and Tumorigenicity of Pancreatic Cancer Stem Cells and Provides a Target for Combined Drug Therapy. *Cell Stem Cell*, *9*(5), 433–446. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2011.10.001>
- Lu, J., Ye, X., Fan, F., Xia, L., Bhattacharya, R., Bellister, S., et al. (2013). Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell*, *23*(2), 171–185. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.12.021>
- Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Rosso, T., Boffetta, P., Levi, F., et al. (2016). European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. *Annals of Oncology*, *27*(4), 725–731. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdw022>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, *133*(4), 704–715. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Medema, J. P., & Vermeulen, L. (2011). Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*, *474*(7351), 318–326. <http://doi.org/10.1038/nature10212>
- Mingo-Sion, A. M., Marietta, P. M., Koller, E., Wolf, D. M., & Van Den Berg, C. L. (2004). Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, *23*(2), 596–604. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207147>
- Mohr, A., Yu, R., & Zwacka, R. M. (2015). TRAIL-receptor preferences in pancreatic cancer cells revisited: Both TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have a licence to kill. *BMC Cancer*, *15*(1), 2233. <http://doi.org/10.1186/s12885-015-1508-2>
- Mucha, S. R., Rizzani, A., Gerbes, A. L., Camaj, P., Thasler, W. E., Bruns, C. J., et al. (2009). JNK inhibition sensitises hepatocellular carcinoma cells but not normal hepatocytes to the TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Gut*, *58*(5), 688–698. <http://doi.org/10.1136/gut.2008.154625>
- Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., et al. (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic

- cancer (ESPA-4): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 389(10073), 1011–1024. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32409-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6)
- Neth, P., Ries, C., Karow, M., Egea, V., & Ilmer, M. (2007). The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Reviews and ...*
- Nevala-Plagemann, C., Hidalgo, M., & Garrido-Laguna, I. (2019). From state-of-the-art treatments to novel therapies for advanced-stage pancreatic cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 1–16. <http://doi.org/10.1038/s41571-019-0281-6>
- Okada, M., Shibuya, K., Sato, A., Seino, S., Suzuki, S., Seino, M., & Kitanaka, C. (2014). Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation. *Oncotarget*.
- Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science*, 324(5933), 1457–1461. <http://doi.org/10.1126/science.1171362>
- Olson, P., & Hanahan, D. (2009). Breaching the Cancer Fortress. *Science*, 324(5933), 1400–1401. <http://doi.org/10.1126/science.1175940>
- Prager, B. C., Xie, Q., Bao, S., & Rich, J. N. (2019). Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem. *Stem Cell*, 24(1), 41–53. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.009>
- 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. (2014a). 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>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014b). 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>
- Recio Boiles, A., Ilmer, M., Rhea, P. R., Kettlun, C., Heinemann, M. L., Ruetering, J., et al. (2016). JNK pathway inhibition selectively primes pancreatic cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis without affecting the physiology of normal tissue resident stem cells. *Oncotarget*, 7(9), 9890–9906.
- Renz, B. W., Takahashi, R., Tanaka, T., Macchini, M., Hayakawa, Y., Dantes, Z., et al. (2018a). β 2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, 33(1), 75–90.e7. <http://doi.org/10.1016/j.ccell.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*, 8(11), 1458–1473. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0046>
- Rountree, C. B., Mishra, L., & Willenbring, H. (2012). Stem cells in liver diseases and cancer: recent advances on the path to new therapies. *Hepatology*, 55(1), 298–306. <http://doi.org/10.1002/hep.24762>
- Saygin, C., Matei, D., Majeti, R., Reizes, O., & Lathia, J. D. (2018). Targeting Cancer Stemness in the Clinic: From Hype to Hope. *Cell Stem Cell*. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.017>
- Scheel, C., & Weinberg, R. A. (2012). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.semcan.2012.04.001>
- Schönfeld, I., Kraywinkel, K. Epidemiologie des hepatozellulären Karzinoms in Deutschland. *Onkologie* 24, 653–658 (2018). <http://doi.org/10.1007/s00761-018-0438-4>
- Schweinitz, von, D. (2012). Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Seminars in Pediatric Surgery*, 21(1), 21–30. <http://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2011.10.011>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7–30. <http://doi.org/10.3322/caac.21442>
- Takahashi, R., Hirata, Y., Sakitani, K., Nakata, W., Kinoshita, H., Hayakawa, Y., et al. (2013). Therapeutic effect of c-Jun N-terminal kinase inhibition on pancreatic cancer. *Cancer Science*, 104(3), 337–344. <http://doi.org/10.1111/cas.12080>
- Takebe, N., Harris, P. J., Warren, R. Q., & Ivy, S. P. (2010). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nature Publishing Group*, 8(2), 97–106. <http://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.196>
- Todaro, M., Alea, M. P., Di Stefano, A. B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., et al. (2007). Colon Cancer Stem Cells Dictate Tumor Growth and Resist Cell Death by Production of Interleukin-4. *Cell Stem Cell*, 1(4), 389–402. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.001>
- Treasure, T., Fiorentino, F., Scarci, M., Möller, H., & Utley, M. (2012). Pulmonary metastasectomy for sarcoma: a systematic review of reported outcomes in the context of Thames Cancer Registry data. *BMJ Open*, 2(5), e001736–e001736. <http://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001736>
- Valent, P., Bonnet, D., de Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., et al. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*. <http://doi.org/10.1038/nrc3368>
- Vasen, H., Ibrahim, I., Ponce, C. G., Slater, E. P., Matthäi, E., Carrato, A., et al. (2016). Benefit of Surveillance for Pancreatic Cancer in High-Risk Individuals: Outcome of Long-Term Prospective Follow-Up Studies From Three European Expert Centers. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(17), 2010–2019. <http://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.0730>
- Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., der Heijden, van, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., et al. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology*, 12(5), 468–476. <http://doi.org/10.1038/ncb2048>

- Virshup, D. M. (2015). Moving upstream in the war on WNTs. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 975–977. <http://doi.org/10.1172/JCI80819>
- Wangjam, T., Zhang, Z., Zhou, X. C., Lyer, L., Faisal, F., Paronetto, M. P., et al. (2015). Resected pancreatic ductal adenocarcinomas with recurrence limited in lung have a significantly better prognosis than those with other recurrence patterns. *Oncotarget*, 5(0). <http://doi.org/10.18632/oncotarget.5054>
- Waugh, D. J. J., & Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(21), 6735–6741. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4843>
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., et al. (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature Cell Biology*, 11(12), 1487–1495. <http://doi.org/10.1038/ncb1998>
- Werner, J., Combs, S. E., Springfeld, 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>
- Yoon, C.-H., Kim, M.-J., Kim, R.-K., Lim, E.-J., Choi, K.-S., An, S., et al. (2012). c-Jun N-terminal kinase has a pivotal role in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity in glioma stem-like cells. *Oncogene*. <http://doi.org/10.1038/onc.2011.634>
- Younes, R. N., Abrao, F., & Gross, J. (2013). Pulmonary metastasectomy for colorectal cancer: Long-term survival and prognostic factors. *International Journal of Surgery*, 11(3), 244–248. <http://doi.org/10.1016/j.ijssu.2013.01.003>
- Zhang, Lidong, & Fang, B. (2005). Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Therapy*, 12(3), 228–237. <http://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700792>
- Zhang, Ling, Ren, X., Alt, E., Bai, X., Huang, S., Xu, Z., et al. (2010). Chemoprevention of colorectal cancer by targeting APC-deficient cells for apoptosis. *Nature*, 464(7291), 1058–1061. <http://doi.org/10.1038/nature08871>
- Zhang, Nu, Wei, P., Gong, A., Chiu, W.-T., Lee, H.-T., Colman, H., et al. (2011). FoxM1 promotes β -catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell*, 20(4), 427–442.
- Zhang, Tinghu, Inesta-Vaquera, F., Niepel, M., Zhang, J., Ficarro, S. B., Machleidt, T., et al. (2012). Discovery of potent and selective covalent inhibitors of JNK. - PubMed - NCBI. *Chemistry & Biology*, 19(1), 140–154. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.11.010>
- Zhang, Yaqing, Yan, W., Collins, M. A., Bednar, F., Rakshit, S., Zetter, B. R., et al. (2013). Interleukin-6 Is Required for Pancreatic Cancer Progression by Promoting MAPK Signaling Activation and Oxidative Stress Resistance. *Cancer Research*. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1558-T>

V Originalarbeiten der kumulativen Habilitationsleistung

1. **Ilmer, M.**; Boiles, A. R.; Regel, I.; Yokoi, K.; Michalski, C. W.; Wistuba, I. I.; Rodriguez, J.; Alt, E.; Vykoukal, J. RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res* **2015**, *75*, 1883–1896.
2. Recio Boiles, A.*; **Ilmer, M.***; Rhea, P. R.; Kettlun, C.; Heinemann, M. L.; Ruetering, J.; Vykoukal, J.; Alt, E. JNK pathway inhibition selectively primes pancreatic cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis without affecting the physiology of normal tissue resident stem cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 9890–9906. (*equal contribution)
3. **Ilmer, M.**; Garnier, A.; Vykoukal, J.; Alt, E.; Schweinitz, von, D.; Kappler, R.; Berger, M. Targeting the Neurokinin-1 Receptor Compromises Canonical Wnt Signaling in Hepatoblastoma. *Mol Cancer Ther* **2015**, *14*, 2712–2721.
4. **Ilmer, M.**; Schiergens, T. S.; Renz, B. W.; Schneider, C.; Sargut, M.; Waligora, R.; Weniger, M.; Hartwig, W.; Ceyhan, G. O.; Friess, H.; Werner, J.; D'Haese, J. G. Oligometastatic pulmonary metastasis in pancreatic cancer patients_ Safety and outcome of resection. *Surg Oncol* **2019**, *31*, 16–21.