

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Frau Professor Dr. med. Julia Mayerle

kumulative Habilitationsschrift

Epigenetische Veränderungen bei der Geweberegeneration
und der Onkogen-vermittelten Tumorentstehung im Pankreas und in
anderen Tumoren

Zum Erwerb der Lehrbefähigung
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von
Dr. rer. biol. hum. Ivonne Regel

2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis.....	2
1. Ausgewählte Publikationen für die kumulative Habilitationsschrift	3
2. Einleitung	4
3. Aktueller Stand der Forschung	6
4. Eigene Ergebnisse und Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext	10
4.1. Einfluss von epigenetisch-regulierten embryonalen Signalwegen auf die Tumorprogression	13
4.2. Auswirkung der epigenetischen Stilllegung von Differenzierungsgenen in der Tumorentstehung und epigenetische Inhibitoren für therapeutische Interventionen	17
4.3. Onkogen- und Pankreatitis-induzierte Dedifferenzierung und Redifferenzierung von Azinuszellen.....	22
5. Zusammenfassung und Ausblick	26
6. Literaturverzeichnis.....	29
7. Schriftenverzeichnis eigener wissenschaftlicher Veröffentlichungen	32
7.1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin	32
7.2. Originalarbeiten als Ko-Autorin.....	33
7.3. Übersichtsartikel / Reviews	35
7.4. Buchkapitel.....	35
8. Danksagung	36
9. Eidesstattliche Erklärungen.....	37

Abkürzungsverzeichnis

AA	adulte Azinuszellen
ADM	azinär-duktales Metaplasie
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CSC	Tumorstammzellen, <i>cancer stem cells</i>
DAMPs	Schadensassoziierte molekulare Muster, <i>damage-associated molecular patterns</i>
EA	embryonale Azinuszellen
ECM	extrazelluläre Matrix
E/F	Mausmodell: Ptf1a ^{Cre} ; Rosa26-LSL-EWSR1/FLI1
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
fl	flox
HB	Hepatoblastom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPF	Haupt Gesichtsfeld, <i>high power field</i>
K*	Mutiertes Kras
KC	Pankreastumormausmodell: Ptf1a ^{Cre} ;LSL-Kras ^{G12D}
KO	Knockout
KPC	Pankreastumormausmodell: Ptf1a ^{Cre} ;LSL-Kras ^{G12D} ;Tp53 ^{fl/+}
PanINs	pankreatisch intraepitheliale Neoplasie
PDAC	duktales Adenokarzinom des Pankreas, <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PRC1	<i>polycomb repressor complex 1</i>
PSCs	pankreatischen Sternzellen, <i>pancreatic stellate cells</i>
TC	Pankreastumorzellen, <i>tumor cells</i>
TSS	Transkriptionsstart

1. Ausgewählte Publikationen für die kumulative Habilitationsschrift

- 1) Fahr, L., Y. Sunami, N. Maeritz, K. Steiger, T.G.P. Grunewald, M. Gericke, B. Kong, S. Raulefs, J. Mayerle, C.W. Michalski, **I. Regel***, and J. Kleeff, *Expression of the EWSR1-FLI1 fusion oncogene in pancreas cells drives pancreatic atrophy and lipomatosis*. Pancreatology, 2020. 20(8): p. 1673-1681. *shared last authorship
- 2) **Regel, I.**, M. Eichenmuller, U.M. Mahajan, B. Hagl, S. Benitz, B. Haberle, C. Vokuhl, D. von Schweinitz, and R. Kappler, *Downregulation of SFRP1 is a protumorigenic event in hepatoblastoma and correlates with beta-catenin mutations*. J Cancer Res Clin Oncol, 2020. 146(5): p. 1153-1167.
- 3) **Regel, I.**, S. Raulefs, S. Benitz, C. Mihaljevic, S. Rieder, G. Leinenkugel, K. Steiger, A.M. Schlitter, I. Esposito, J. Mayerle, B. Kong, J. Kleeff, and C.W. Michalski, *Loss of TLR3 and its downstream signaling accelerates acinar cell damage in the acute phase of pancreatitis*. Pancreatology, 2019. 19(1): p. 149-157.
- 4) Benitz, S., T. Straub, U.M. Mahajan, J. Mutter, S. Czermel, T. Unruh, B. Wingerath, S. Deubler, L. Fahr, T. Cheng, S. Nahnsen, P. Bruns, B. Kong, S. Raulefs, G.O. Ceyhan, J. Mayerle, K. Steiger, I. Esposito, J. Kleeff, C.W. Michalski, and **I. Regel**, *Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis*. Gut, 2019. 68(11): p. 2007-2018.
- 5) Benitz, S., **I. Regel***, T. Reinhard, A. Popp, I. Schaffer, S. Raulefs, B. Kong, I. Esposito, C.W. Michalski, and J. Kleeff, *Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells*. Oncotarget, 2016. 7(10): p. 11424-33. *shared first authorship
- 6) Hausmann, S., **I. Regel**, K. Steiger, N. Wagner, M. Thorwirth, A.M. Schlitter, I. Esposito, C.W. Michalski, H. Friess, J. Kleeff, and M. Erkan, *Loss of Periostin Results in Impaired Regeneration and Pancreatic Atrophy after Cerulein-Induced Pancreatitis*. Am J Pathol, 2016. 186(1): p. 24-31.
- 7) Ilmer, M., A.R. Boiles, **I. Regel**, K. Yokoi, C.W. Michalski, Wistuba, II, J. Rodriguez, E. Alt, and J. Vykoukal, *RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells*. Cancer Res, 2015. 75(9): p. 1883-96.
- 8) **Regel, I.**, M. Eichenmuller, S. Joppien, J. Liebl, B. Haberle, J. Muller-Hocker, A. Vollmar, D. von Schweinitz, and R. Kappler, *IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors*. Mol Cancer, 2012. 11: p. 9.
- 9) **Regel, I.**, L. Merkl, T. Friedrich, E. Burgermeister, W. Zimmermann, H. Einwachter, K. Herrmann, R. Langer, C. Rocken, R. Hofheinz, R. Schmid, and M.P. Ebert, *Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2*. Gastroenterology, 2012. 143(1): p. 99-109 e10.

2. Einleitung

Komplexe Prozesse und Signalwege, die bei der Embryonalentwicklung zu einer kontrollierten Vermehrung von embryonalen Stammzellen führen, werden zu einem gewissen Grad bei der Tumorentstehung reaktiviert. Während embryonale Stammzellen zur Differenzierung fähig sind und die Zellteilung gestoppt wird, haben Tumorzellen diese Eigenschaften verloren. Embryonale Tumore, wie das Hepatoblastom, treten im Kindesalter auf und entwickeln sich wahrscheinlich durch Defekte in der Ausdifferenzierung der embryonalen Stammzellen. Bei adulten Tumoren, wie dem Pankreaskarzinom, verlieren normale Körperzellen ihren Differenzierungsstatus und teilen sich unkontrolliert. Die korrekte Regulierung von Differenzierungsmechanismen ist auch bei der Geweberegeneration ein wichtiger Prozess. Bei einer Schädigung des exokrinen Pankreasgewebes besitzen pankreatische Azinuszellen die Fähigkeit zur Dedifferenzierung und Zellproliferation, um zerstörtes Parenchym zu ersetzen. Hierbei unterliegen die Azinuszellen einer azinär-duktalem Metaplasie (ADM), die von einer Stilllegung von Differenzierungsgenen und einer Reaktivierung von Progenitorgenen geprägt ist.

Weitere Faktoren, wie immunregulatorische Signalwege oder extrazelluläre Matrixproteine, die aufgrund einer fibrotischen Reaktion sezerniert werden, bestimmen neben dem Schweregrad der Pankreatitis auch das Regenerationsverhalten der Azinuszellen. Interessanterweise tritt eine ADM-Formierung auch bei der Onkogen-vermittelten Pankreaskarzinogenese als initialer Schritt in der Tumorentstehung auf. Mutiertes KRAS ist hierbei ein spezifisches Onkogen für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms und kann bei fast allen Pankreaskarzinompatienten nachgewiesen werden.

Neben der Onkogen-vermittelten Karzinogenese sind epigenetische Mechanismen für die Tumorentstehung hoch relevant. Die Anreicherung von DNA-Methylierung im Promoterbereich von Tumorsuppressorgenen fördert die Tumorentstehung. Wichtige embryonale Signalwege sind in Tumorzellen durch die epigenetische Inaktivierung von inhibierenden Signalwegskomponenten aktiviert. Gleichzeitig werden Differenzierungsgene über repressive Histonmodifikationen epigenetisch stillgelegt und Progenitorgene über aktivierende Histonmodifikationen exprimiert. Diese epigenetischen Veränderungen tragen entscheidend zur Tumorentstehung und -progression bei. Ein wichtiges Merkmal der epigenetischen Veränderungen ist jedoch, dass diese reversibel sind und Angriffspunkte für therapeutische Interventionen sein können. Die Behandlung von Tumorzellen mit epigenetischen Medikamenten kann zum Beispiel eine erhöhte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika hervorrufen. Epigenetische Veränderungen bei der Geweberegeneration und der Onkogen-

vermittelten Tumorentstehung im Pankreas und in anderen Tumoren sind wichtige Forschungsschwerpunkte, die zum Verständnis der Tumorentstehung beitragen und neue Ansätze für Therapien bieten.

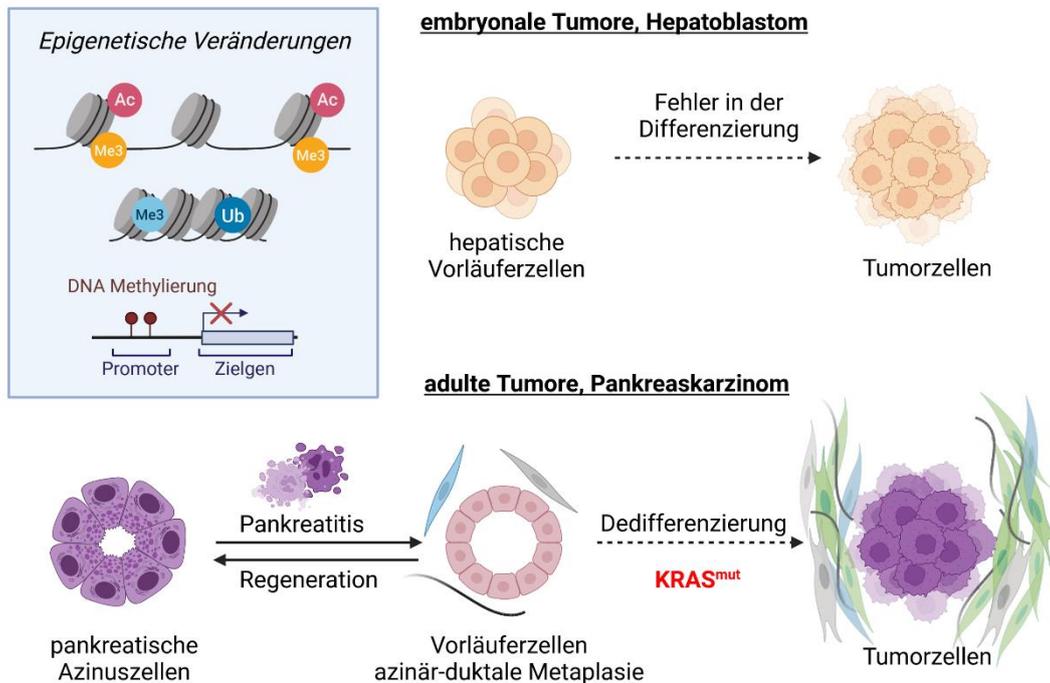


Abbildung 1: Übersicht über Differenzierungswege in embryonalen und adulten Tumoren. Blaue Box: Epigenetische Veränderungen bestimmen offene oder geschlossene Chromatinkonformationen, reguliert durch Histontrimethylierung (Me3), -acetylierung (Ac), oder -ubiquitinierung (Ub). DNA-Methylierungen im Promoterbereich unterbinden die Expression von Zielgenen. Embryonale Tumore, wie das Hepatoblastom, entstehen wahrscheinlich aufgrund einer fehlerhaften Differenzierung von hepatischen Vorläuferzellen. Im Pankreas besitzen Azinuszellen regenerative Eigenschaften nach einer Pankreatitis und unterliegen einer azinär-duktalem Metaplasie. Diese können als Vorläuferzellen über weitere Dedifferenzierungsschritte und durch die Expression von mutiertem KRAS zu Tumorzellen progressieren.

3. Aktueller Stand der Forschung

Bei der Embryonalentwicklung des Pankreas differenzieren sich pankreatische Vorläuferzellen, abhängig von ihrem Transkriptionsprofil, in Azinuszellen, duktale Zellen oder Inselzellen. Azinuszellen und duktale Zellen bilden das exokrine Kompartiment des Pankreas, dessen Hauptaufgabe die Produktion und Sezernierung von inaktiven Vorstufen der Verdauungsenzyme (Trypsin, Amylase, Lipase) sind. Inselzellen unterteilen sich in α -, β -, δ - und F-Zellen und bilden die endokrine Komponente, die für die Regulation des Blutzuckerspiegels verantwortlich ist (Witt 2013). Die Aktivierung und Expressionslevel verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z.B. PDX1 (*pancreatic and duodenal homeobox 1*), PTF1a (*pancreas associated transcription factor 1a*), RBPJ (*recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region*) und RBPJL (*RBPJ like*) bestimmen während der Organogenese den Differenzierungsgrad der Vorläuferzellen und die spätere Zellidentität. PDX1 wird in sehr frühen pankreatischen Vorläuferzellen exprimiert und ist im adulten Organ ein wichtiger Faktor für die Expression von β -Zellgenen. Die Azinuszelldifferenzierung wird hingegen über die Ausbildung eines PTF1A/RBPJ Komplexes initiiert und im weiteren Verlauf der Zellreifung wird im Komplex RBPJ durch RBPJL ausgetauscht. Der Komplex ist für die Aktivierung verschiedener Azinuszellgene verantwortlich und führt zu einer vollständigen Differenzierung der Azinuszellen (Benitez, Goodyer et al. 2012). Die Expression von HNF1B (*HNF1 homeobox B*) und SOX9 (*SRY-box transcription factor 9*) reguliert die Differenzierung in duktale Pankreaszellen (Reichert and Rustgi 2011). Neben der intrinsischen Regulation durch Transkriptionsfaktoren bestimmen ebenfalls extrinsische Signale und Zell-Zell Interaktionen die Organogenese des Pankreas. Die sich entwickelnden Pankreas- und Leberanlagen sind von verschiedenen mesenchymalen Geweben umgeben, welche Signalmoleküle sezernieren und sowohl Einfluss auf die pankreatische/hepatische, als auch auf die endokrine/exokrine Differenzierung nehmen (Puri and Hebrok 2010). Wichtige entwicklungsbiologische Signalwege, wie der WNT-Signalweg, regulieren die Ausbildung der unterschiedlichen Organanlagen und verhindern eine vorzeitige Differenzierung der Vorläuferzellen, indem sie die Zellen in einem undifferenzierten und proliferativen Zustand halten (Puri and Hebrok 2010). Interessanterweise werden viele biologische Prozesse, die bei der Embryonalentwicklung der Organanlagen eine wichtige Rolle spielen, bei der Pankreatitis-induzierten Geweberegeneration und bei der Onkogen-vermittelten Tumorentstehung im Pankreas und in embryonalen Tumoren, wie dem Hepatoblastom, wieder aufgegriffen.

Die Pankreatitis, ausgelöst durch z.B. übermäßigen Alkoholkonsum, Rauchen, Gallensteine oder genetische Faktoren, ist eine inflammatorische Erkrankung des Pankreas, wobei sich

wiederholte akute Verläufe in eine chronische Erkrankung manifestieren können. Jedoch ist das Pankreas auch zur Geweberegeneration fähig. Die akute Pankreatitis mit nachfolgender Geweberegeneration kann im Mausmodell nachgestellt werden. Wiederholte intraperitoneale Injektionen mit dem Cholecystokinin-Analogen Cerulein in supraphysiologischen Dosen bewirken eine vorzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme in den Azinuszellen und den Selbstverdau des Organs. Die partielle Zerstörung des Pankreasparenchyms durch Azinuszellapoptosen und -nekrosen löst im weiteren Verlauf eine inflammatorische und fibrotische Reaktion aus (Murtaugh and Keefe 2015). Ohne weitere pathologische Einflüsse sind die verbleibenden Azinuszellen zur Geweberegeneration fähig. Hierbei unterliegen die Azinuszellen einer azinär-duktalem Metaplasie (ADM) und können proliferieren (Kong, Bruns et al. 2018). In den ADM Zellen werden Progenitorgene aus der Embryogenese, wie *Pdx1*, *Rbpj* und *Sox9* reaktiviert, während Azinuszell-Differenzierungsgene, wie *Ptf1a* und *Rbpjl*, abgeschaltet werden (Jensen, Cameron et al. 2005). Mausmodelle haben gezeigt, dass wichtige Komponenten aus den entwicklungsbiologisch-relevanten Wnt-, Hedgehog- oder Notch-Signalwegen entscheidend zur ADM Bildung beitragen (Fendrich, Esni et al. 2008, Siveke, Lubeseder-Martellato et al. 2008, Morris, Cano et al. 2010). Zusätzlich regulieren inflammatorische und fibrotische Reaktionen den Verlauf der Entzündung und der Regeneration. Sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) sind Moleküle, die von den zerstörten Azinuszellen abgegeben werden und damit eine Immunantwort initiieren, bei der Leukozyten wie Makrophagen oder Neutrophile rekrutiert werden (Gukovsky, Li et al. 2013). Die Ausschüttung verschiedener Signalmoleküle durch Leukozyten und durch gestresste Azinuszellen aktiviert wiederum die Transdifferenzierung von mesenchymalen, pankreatischen Sternzellen (*pancreatic stellate cells*, PSCs) zu Myofibroblasten, die extrazelluläre Matrix (ECM) Proteine sezernieren und damit die fibrotische Reaktion bei der Pankreatitis definieren (Apte, Pirola et al. 2015). Die Funktion der Pankreasfibrose bei der Pankreatitis und anschließenden Pankreasregeneration ist immer noch weitgehend unverstanden. Nach etwa einer Woche bildet sich die fibroinflammatorische Reaktion im Cerulein-Mausmodell zurück, die ADM Zellen haben sich zu Azinuszellen redifferenziert und die Regeneration des Pankreas ist abgeschlossen.

Die beschriebene Plastizität von Azinuszellen bei regenerativen Ereignissen hat dazu geführt, dass die Azinuszelle in den Fokus als tumor-initiiierende Zelle für das duktalem Adenokarzinom des Pankreas (*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC) gerückt ist. *Lineage-tracing* Experimente in konditionellen Mausmodellen, mit Cre-Rekombinase Expression unter dem Azinuszellpromoter *Ptf1a*, konnten belegen, dass Azinuszellen unter onkogenem Stress entarten können (Morris, Cano et al. 2010, Kopp, von Figura et al. 2012). Bei der Expression von mutiertem

Kras während der Pankreas-Organogenese unterliegen die Azinuszellen einer ADM Formierung und 20% der Tiere entwickeln ein PDAC (Hingorani, Petricoin et al. 2003). Im Gegensatz dazu sind ausdifferenzierte Azinuszellen refraktär gegenüber mutiertem *Kras*. Das Pankreas von induzierbaren konditionellen Mausmodellen ist nach aktivierter Expression von mutiertem *Kras* im adulten Pankreas völlig unauffällig. Erst nach Cerulein-induzierter ADM Formierung entwickeln die Tiere Vorläuferläsionen und PDAC (Guerra, Schuhmacher et al. 2007, Benitz, Straub et al. 2019). Wie schon bei der Pankreasregeneration ist die Aktivierung von Progenitorgenen, wie *Rbpj*, *Pdx1*, *Sox9* und die Inaktivierung von azinären Differenzierungsgenen, wie *Ptf1a*, *Rbpjl* und *Bhlha15* (*Mist1*) ein wichtiger Schritt in der Tumorentstehung (Storz 2017). KRAS Mutationen wurden in über 90% aller Tumorproben von Patienten mit PDAC detektiert und sind bereits in Vorläuferläsionen, sogenannten PanINs (pankreatisch intraepitheliale Neoplasie), nachweisbar. Mehrheitlich tritt die Mutation im Exon 2, Codon 12 (*KRAS*^{G12D}) des *KRAS* Gens auf, was zu einer fortlaufenden Aktivierung des RAS/ERK Signalweges führt. Die konstitutive Aktivierung des Signalweges fördert die Zellteilung und begünstigt eine Entartung und Dedifferenzierung von Pankreaszellen (Lohr, Kloppel et al. 2005, Regel, Hausmann et al. 2016). Mutiertes KRAS wird zwar als wichtigster Faktor in der Entstehung von Pankreaskarzinomen beschrieben, allerdings führt die Expression von onkogenem KRAS nicht zwangsläufig zur Tumorentstehung. Etwa 20% der älteren Bevölkerung weisen *KRAS* Mutationen auf (Luttges, Reinecke-Luthge et al. 1999, Yan, McFaul et al. 2005), doch nur sehr wenige Personen (ASR-Inzidenz: 7,7/100.000) entwickeln ein Pankreaskarzinom. Daher stellt sich die Frage, welche Faktoren die Entstehung eines Karzinoms zusätzlich begünstigen. Neben *KRAS* Mutationen sind beim Pankreaskarzinom die Gene *CDKN2A* (p16), *TP53* und *SMAD4* am häufigsten genetisch verändert.

Generell wird die Tumorentstehung durch das Zusammenspiel von genetischen und epigenetischen Veränderungen ausgelöst und beschleunigt. Epigenetische Modifikationen, wie DNA Methylierungen oder Histonmodifikationen, bestimmen die Chromatinkonformation. Offenes Chromatin wird für eine aktive Transkription benötigt, während eine geschlossene Chromatinkonformation die Genexpression unterdrückt. Spezifische Histonmodifikationen, wie zum Beispiel die Trimethylierung von Lysin 4 am Histon H3 (H3K4me3) oder die Acetylierung von Lysin 9 und 27 am Histon H3 (H3K9ac, H3K27ac) sind charakteristische Marker für offenes Chromatin und eine aktive Transkription. Im Gegensatz dazu findet man DNA Methylierung, oder auch Histonmodifikationen, wie die Trimethylierung von Lysin 27 am Histon H3 (H3K27me3), oder auch Ubiquitinierung von Lysin 119 an Histon H2A (H2AK119ub) bei stillgelegten Genregionen. Verschiedene epigenetische Komplexe mit einer Vielzahl von regulatorischen

Komponenten katalysieren die epigenetischen Modifikationen (Zhang, Cooper et al. 2015). Sie regulieren somit das Transkriptionsprofil einer Zelle und bestimmen deren Differenzierungsgrad und die Zellidentität (Flavahan, Gaskell et al. 2017). Insbesondere bei embryonalen Tumoren, wie dem Hepatoblastom, sind epigenetische Veränderungen neben β -Catenin Mutationen ein starker onkogener Stimuli (Tomlinson and Kappler 2012). Es wurden sowohl DNA Hypomethylierungen an Enhancer Regionen, als auch DNA Hypermethylierungen an CpG Inseln in Promoterbereichen spezifischer Gene beschrieben (Carrillo-Reixach, Torrens et al. 2020, Nagae, Yamamoto et al. 2021). Das DNA Methylierungsmuster des *IGF2/H19* Genlokus im Hepatoblastom ähnelt der Signatur fetaler Leberläuferzellen, was darauf hindeutet, dass sich die Tumore aufgrund fehlender Differenzierungsereignisse ausbilden (Nagae, Yamamoto et al. 2021). Interessanterweise wurden epigenetische Veränderungen für eine Vielzahl von Tumoren beschrieben, allerdings hat man sich beim Pankreaskarzinom bisher auf die Auswirkungen der genetischen Mutationen konzentriert. Erst in den letzten Jahren sind epigenetische Mechanismen beim Pankreaskarzinom stärker in den Fokus gerückt. Aufgrund der Reversibilität der epigenetischen Modifikationen stellen sie eine mögliche Zielstruktur für therapeutische Interventionen dar (Pichlmeier and Regel 2020).

4. Eigene Ergebnisse und Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Ziel der hier zusammengefassten Arbeiten ist die Untersuchung von epigenetischen Veränderungen und weiteren regulatorischen Mechanismen bei Dedifferenzierungs- und Differenzierungsereignissen in verschiedenen Tumorerkrankungen und in Pankreatitis-induzierten regenerativen Prozessen. Ein wichtiger Aspekt in der Tumorentstehung und Tumorprogression ist die epigenetische Stilllegung von spezifischen Differenzierungsfaktoren und die Aktivierung embryonaler Signalwege sowohl in embryonalen als auch in adulten Tumoren. Embryonale Tumore, wie das Hepatoblastom, entwickeln sich aus Vorläuferzellen, in denen entwicklungsbiologische Signalwege aktiv bleiben; die Zellen können nicht mehr in somatische Zellen ausdifferenzieren. Im Gegensatz dazu werden bei adulten Tumoren Dedifferenzierungsprozesse aktiviert, die denen in der Embryonalentwicklung ähneln. In eigenen Arbeiten konnten wir aufzeigen, dass embryonale Signalwege wie der WNT-Signalweg beim embryonalen Hepatoblastom und auch beim adulten Pankreaskarzinom, eine wesentliche Rolle spielen. Die Aktivierung des WNT-Signalwegs ist im Hepatoblastom auf eine epigenetische Stilllegung von WNT-Signalwegsinhibitoren zurückzuführen. Die Herunterregulation des WNT-Inhibitors *secreted frizzled related protein 1 (SFRP1)* wird unter anderem über DNA-Methylierung hervorgerufen und fördert z.B. die Tumorzellproliferation (Regel, Eichenmuller et al. 2020). Interessanterweise ist beim Hepatoblastom ebenfalls der Signalwegsinhibitor *insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)* epigenetisch ausgeschaltet (Regel, Eichenmuller et al. 2012). IGFBP3 bindet normalerweise den wichtigen Wachstumsfaktor *insulin-like growth factor 2 (IGF2)* und unterdrückt somit die Signalwegsaktivität (Adamek and Kasprzak 2018). Ein Verlust des genetischen Imprintings am *IGF2/H19*-Lokus fördert aufgrund der Überexpression von *IGF2* zusätzlich die Tumorentstehung. Im Pankreaskarzinom konnten wir in einer Studie nachweisen, dass Tumorzellen mit einer erhöhten WNT-Signalwegsaktivität Eigenschaften für einen aggressiveren Tumorzellphänotyp aufwiesen (Ilmer, Boiles et al. 2015).

Die zelluläre Dedifferenzierung ist ein wichtiger Phänotyp in der Karzinogenese und tritt ebenfalls in regenerativen Prozessen, wie z.B. nach induzierter Pankreatitis, auf. In eigenen Arbeiten konnten wir belegen, dass bei der Regeneration des exokrinen Pankreasgewebes transiente epigenetische Veränderungen in den Azinuszellen auftreten, die für eine ADM Bildung mit Progenitor-ähnlichem Phänotyp verantwortlich sind. Hierbei wurden insbesondere Transkriptionsfaktoren, die die Azinuszelldifferenzierung regulieren, über die Anreicherung der repressiven Histonmodifikation H2AK119ub epigenetisch stillgelegt (Benitz, Regel et al. 2016). In einer darauffolgenden Studie haben wir gezeigt, dass die Aktivierung der katalytischen Komponente *ring finger protein 2 (Ring1b)* aus dem *polycomb repressor complex 1 (PRC1)* für

die Anreicherung von H2AK119ub und für die Dedifferenzierung der Azinuszellen bei der ADM Bildung verantwortlich ist. In diesem Zustand und beim Vorliegen von Kras Mutationen können die ADM Zellen zu Tumorzellen entarten und ihre epigenetische Signatur weiter verändern. In den generierten konditionellen Ring1b Knockout Mäusen war die ADM Bildung jedoch stark unterdrückt. Die Azinuszellen verblieben nach induzierter Pankreatitis in einem ausdifferenzierten Zustand und trotz onkogener Kras Expression entwickelten die Tiere keine Pankreastumore (Benitz, Straub et al. 2019). Wir konnten somit nachweisen, dass die epigenetisch regulierte Dedifferenzierung von Azinuszellen entscheidend für die Pankreastumorentstehung ist.

Eigene Daten haben ebenfalls gezeigt, dass die spezifische Expression von onkogenem Kras wichtig für die Pankreaskarzinogenese ist. Bei der Expression eines anderen Onkogens in den Azinuszellen, wie z.B. dem *EWSR1-FLI1* Onkogen, verlieren die Zellen zwar ihren Differenzierungsstatus und bilden ADMs, jedoch entwickelt das pankreas-spezifische, konditionelle *EWSR1-FLI1* Mausmodell keine Pankreastumore (Fahr, Sunami et al. 2020). Die epigenetischen Modifikationen spielen allerdings nicht nur bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle. Die epigenetischen Veränderungen, die sich im Laufe der Tumorprogression anreichern, bestimmen im Wesentlichen auch den Phänotyp der Tumorzellen. In einem aktuellen Projekt haben wir herausgefunden, dass die beschriebenen molekularen Pankreaskarzinom Subtypen (classical und basal-like PDAC, zusammengefasst in (Regel, Mayerle et al. 2020)) unterschiedliche Histonacetylierungsmuster aufweisen. Hierbei sind insbesondere Gene betroffen, die in Tumor-relevante zelluläre Prozesse eingreifen und die Zellcharakteristika des jeweiligen Subtyps bestimmen (Zhou, Pichlmeier et al., noch nicht publizierte Daten). Ein entscheidender Aspekt ist jedoch, dass epigenetische Veränderungen reversibel sind und somit eine geeignete Zielstruktur für therapeutische Ansätze sein können. In einer vorrangigen experimentellen Studie konnten wir zeigen, dass Magenkarzinom-Tumorzellen nach der Behandlung mit einem HDAC (*histone deacetylase*) Inhibitor sensitiver auf ein Chemotherapeutikum reagierten (Regel, Merkl et al. 2012).

Im Gegensatz zur Tumorentstehung ist die Ausbildung von ADMs während der Pankreatitis-induzierten Regeneration transient und im Mausmodell differenzieren sich die ADM Zellen nach einigen Tagen zurück zu Azinuszellen. Im Allgemeinen entsteht die Pankreatitis durch eine vorzeitige Aktivierung von Verdauungsenzymen in den Azinuszellen und eine Zerstörung des exokrinen Gewebes. Dabei wird eine Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung von DAMPs ausgelöst. Hierbei konnten wir in eigenen Studien nachweisen, dass ein globaler Verlust des *Toll-like* Rezeptor 3 (Tlr3) eine starke Azinuszellnekrose hervorruft und zu einer erhöhten

Entzündungsreaktion im Pankreas führt. Der Tlr3 Signalweg ist somit ein wichtiger Faktor, um eine überschießende Entzündungsreaktion bei der Pankreatitis einzudämmen (Regel, Raulefs et al. 2019). Interessanterweise folgt auf die Entzündung im Pankreas eine fibrotische Reaktion durch die Aktivierung von PSCs zu Myofibroblasten und die Sezernierung von ECM Proteinen. Fehlt ein wichtiger Faktor der ECM, wie z.B. Periostin, ist bei der Pankreatitis-induzierten Regeneration die Redifferenzierung der ADM Zellen in Azinuszellen gestört und es kommt zur Atrophie des exokrinen Gewebes (Hausmann, Regel et al. 2016). Die bisherigen Erkenntnisse, dass aktivierte PSCs hauptsächlich für die Pankreasfibrose verantwortlich sind, ist vorrangig auf in vitro Versuche zurückzuführen. Isolierte PSCs in der Zellkultur verändern sehr schnell ihren Phänotyp zu Myofibroblasten und exprimieren wichtige Fibrosemarker (Apte, Pirola et al. 2015). Ein in vivo Beweis, dass die Pankreasfibrose vorrangig durch aktivierte PSCs hervorgerufen wird, könnte z.B. durch *lineage-tracing* Experimente erbracht werden; dies steht jedoch immer noch aus. In einer aktuellen Studie untersuchen wir im akuten und chronischen Pankreatitis Mausmodell, inwieweit neben PSCs weitere Zellen im Pankreas mit mesenchymalem Ursprung an der Pankreasfibrose beteiligt sind (Fahr, Köpke et al., noch nicht publizierte Arbeit).

4.1. Einfluss von epigenetisch-regulierten embryonalen Signalwegen auf die Tumorprogression

IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors. Regel, I., M. Eichenmuller, S. Joppien, J. Liebl, B. Haberle, J. Muller-Hocker, A. Vollmar, D. von Schweinitz, and R. Kappler, *Mol Cancer*, 2012. 11: p. 9.

Das Hepatoblastom (HB) ist ein embryonaler Lebertumor im frühen Kindesalter, der beim Auftreten von Metastasen und Gefäßinvasion mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des *insulin-like growth factors 2* (IGF2) und der Verlust des genetischen Imprintings am *IGF2/H19*-Lokus gemeinsame Merkmale von HB sind. Dies weist darauf hin, dass die IGF-Achse eine entscheidende Funktion bei der Entwicklung von Hepatoblastomen einnimmt. In unserer Studie untersuchten wir die funktionelle Relevanz und den epigenetischen Status des *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP3) in pädiatrischen Lebertumoren. Hierbei konnten wir aufzeigen, dass das *IGFBP3* Gen in normalem Lebergewebe stark exprimiert wurde, jedoch in vier HB-Zelllinien und in der Mehrheit der Gewebe der pädiatrischen Lebertumore stark herunterreguliert war (Abbildung 2).

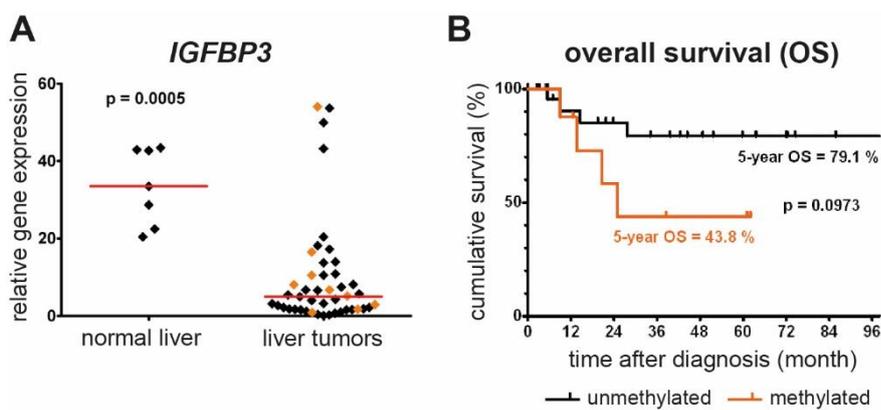


Abbildung 2: Genexpression und DNA Methylierung des Tumorsuppressors *IGFBP3* in HB. **(A)** Relative Genexpression von *IGFBP3* zum Standardgen *TBP* in HB (schwarz) und pädiatrischen HCC (orange) Tumoren und in normalem Lebergewebe. **(B)** Überlebenskurve (*overall survival*, OS) von 33 Lebertumorpatienten stratifiziert nach Methylierungsstatus von *IGFBP3*. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Regel, Eichenmuller et al. 2012).

Eine detaillierte DNA-Methylierungsanalyse ergab, dass der *IGFBP3* Promoterbereich eine starke Anreicherung von methyliertem Cytosin in CpG Inseln aufwies. Interessanterweise trat die *IGFBP3* Promoter-Methylierung vor allem bei metastasierten pädiatrischen Lebertumoren mit vaskulärer Invasion auf und war mit einer schlechten Prognose assoziiert (Abbildung 2). Die epigenetische Stilllegung von *IGFBP3* in den HB-Zelllinien konnte durch die Behandlung der Zelllinien mit dem DNA-Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2'-Desoxycytidin aufgehoben werden. Die Wiederherstellung der *IGFBP3*-Expression in den HB-Zelllinien führte zu einer reduzierten Koloniebildung, Migration und Invasion der Tumorzellen. Diese Studie lieferte den ersten direkten Beweis dafür, dass die epigenetische Reaktivierung von *IGFBP3* die aggressiven Eigenschaften von pädiatrischen Lebertumorzellen verringert, und dass die *IGFBP3* Promotermethylierung als Indikator für gefäßinvasives Tumorwachstum bei Lebertumor-Patienten im Kindesalter verwendet werden könnte.

Downregulation of SFRP1 is a protumorigenic event in hepatoblastoma and correlates with beta-catenin mutations. Regel, I., M. Eichenmuller, U.M. Mahajan, B. Hagl, S. Benitz, B. Haberle, C. Vokuhl, D. von Schweinitz, and R. Kappler, J Cancer Res Clin Oncol, 2020. 146(5): p. 1153-1167.

Sowohl das Hepatoblastom (HB), als auch das pädiatrische hepatozelluläre Karzinom (HCC) sind die häufigsten bösartigen Lebertumore im Kindesalter. Beide Tumorarten weisen genetische und epigenetische Veränderungen im WNT/ β -Catenin-Signalweg auf, der in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt. Die Tumore zeigen eine hohe Rate an β -Catenin Mutationen und Veränderungen der Genexpression verschiedener WNT-Antagonisten. Die Rolle des WNT-Inhibitors *secreted frizzled related protein 1* (*SFRP1*) wurde allerdings bisher nicht untersucht. In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass *SFRP1* in allen untersuchten HB-Zelllinien durch DNA-Promoter-Methylierung herunterreguliert war. Die induzierte Überexpression von *SFRP1* in HB-Zelllinien verringerte die Proliferation, die Koloniebildung und das Migrationspotenzial der Tumorzellen. Darüber hinaus zeigten die HB-Zelllinien mit überexprimiertem *SFRP1* eine verringerte WNT/ β -Catenin-Signalwegsaktivität und eine verminderte Expression von WNT-Zielgenen. Um den Nutzen von *SFRP1* als Biomarker bei pädiatrischen Lebertumoren zu bewerten, haben wir die Genexpression und den DNA-Methylierungsstatus von *SFRP1* in 45 pädiatrischen Lebertumorproben untersucht (Abbildung 3). Die Korrelationsanalyse verschiedener klinischer Parameter und Tumormerkmale ergab eine signifikante Korrelation der reduzierten *SFRP1*-Expression mit dem Vorhandensein von mutiertem β -Catenin. Der Methylierungsstatus von *SFRP1* wurde darüber hinaus mit einem

Lebertumortyp mit HCC-ähnlichen Merkmalen, TERT-Mutationen und einem höheren Alter bei der Diagnose assoziiert (Abbildung 3). Insgesamt zeigen unsere Daten, dass die epigenetische Stilllegung des WNT/ β -Catenin-Antagonisten *SFRP1* einen wichtigen Einfluss auf das maligne Verhalten von HB-Zellen hat. Obwohl die *SFRP1*-Methylierung ein häufiges Ereignis in HCC-ähnlichen pädiatrischen Lebertumoren ist, muss das Potenzial als prognostischer oder diagnostischer Biomarker weiter untersucht werden.

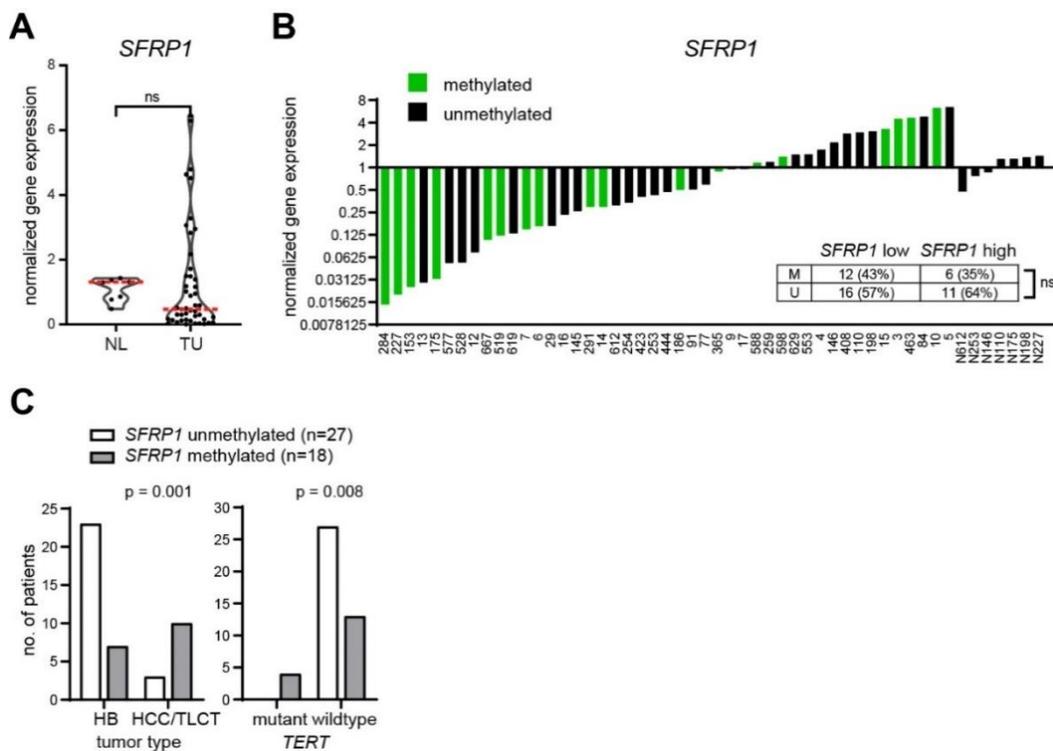


Abbildung 3: Herunterregulation des Tumorsuppressors *SFRP1* als tumorförderndes Ereignis. **(A)** Normalisierte Genexpression von *SFRP1* in Lebertumoren (TU) im Vergleich zu normalem Lebergewebe (NL). **(B)** Darstellung der *SFRP1* Genexpression und des Promoter Methylierungsstatus (schwarz: unmethyliert, grün: methyliert). **(C)** Korrelationsanalyse des *SFRP1* Methylierungsstatus zum Tumortyp und zum *TERT* Mutationsstatus. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Regel, Eichenmuller et al. 2020).

RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells. Ilmer, M., A.R. Boiles, I. Regel, K. Yokoi, C.W. Michalski, Wistuba, II, J. Rodriguez, E. Alt, and J. Vykoukal, *Cancer Res*, 2015. 75(9): p. 1883-96.

Bei vielen Tumorentitäten stellen Tumorstammzellen (*cancer stem cells*, CSC) eine enorme klinische Herausforderung dar, da sie sich einer therapeutischen Intervention entziehen und somit für das Wiederauftreten von Tumoren nach einer Behandlung verantwortlich sind. In der aufgeführten Arbeit konnten wir eine kleine Subpopulation von Pankreastumorzellen mit hoher intrinsischer Wnt-Aktivität identifizieren, die CSC Eigenschaften wie Therapieresistenz und Metastasierung zeigten, und ebenfalls Marker für eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) aufwies. Im Gegensatz dazu zeigte eine Tumorzell-Subpopulation mit geringer Wnt-Aktivität eine erhöhte Expression von Differenzierungsmarkern und geringere Tumorgößen im subkutanen Mausmodell (Abbildung 4). Der Wnt-Ligand *R-Spondin 2* (RSPO2) scheint für Tumorspezifische Eigenschaften wichtig zu sein, da er in Pankreastumorgewebe hochreguliert ist und insbesondere in Tumorzellen mit hoher WNT-Aktivität stark exprimiert wird. Stimuliert man PDAC Tumorzellen mit RSPO2 zeigen diese eine erhöhte Tumorzellsphärenbildung, ein charakteristisches Merkmal für CSCs. Die Inhibierung des WNT-Signalweges in Kombination mit Standard-Chemotherapeutika könnte eine neue Strategie sein, um CSCs und andere Tumorzellen gleichermaßen zu behandeln.

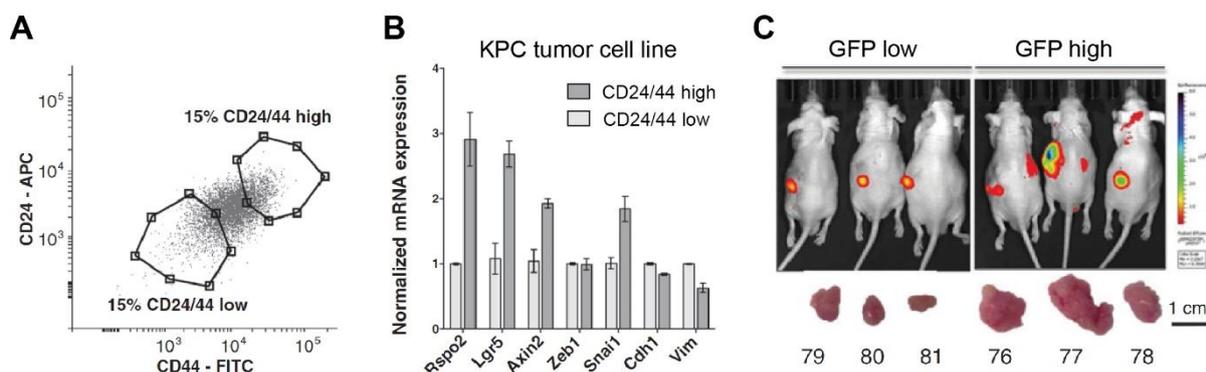


Abbildung 4: Hochregulation vom Wnt-Signalweg in PDAC Tumorstammzellen. **(A)** Von murinen Pankreastumorzellen wurden Zellen mit hoher (*high*) und niedriger (*low*) CD24/44 Expression isoliert. **(B)** Normalisierte Genexpression von WNT und EMT Markergenen in murinen Pankreastumorzellen mit hohem und niedrigem CD24/44 Level. **(C)** Tumorigenes Potenzial von humanen Pankreastumorzelllinien mit hoher (GFP high) und niedriger (GFP low) WNT Signalwegsaktivität wurden im subkutanen Xenograft Mausmodell untersucht. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Ilmer, Boiles et al. 2015).

4.2. Auswirkung der epigenetischen Stilllegung von Differenzierungsgenen in der Tumorentstehung und epigenetische Inhibitoren für therapeutische Interventionen

Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells. Benitz, S., **I. Regel***, T. Reinhard, A. Popp, I. Schaffer, S. Raulefs, B. Kong, I. Esposito, C.W. Michalski, and J. Kleeff, *Oncotarget*, 2016. 7(10): p. 11424-33.

Die azinär-duktales Metaplasie (ADM), die sowohl bei der Cerulein-vermittelten Pankreatitis als auch bei der Pankreastumorentstehung auftritt, wird von weitreichenden Veränderungen im Transkriptionsprofil der Azinuszellen begleitet. Die Azinuszellen schalten die Expression von Differenzierungsgenen aus und reexprimieren Gene, die normalerweise in embryonalen Vorläuferzellen des Pankreas zu finden sind. Frühere Studien haben gezeigt, dass Azinuszellen für eine onkogene Transformation zu Tumorzellen sensibilisiert werden, wenn ein Verlust von Azinuszell-spezifischen Transkriptionsfaktoren vorliegt. Allerdings ist der Mechanismus der transkriptionellen Inaktivierung der Differenzierungsgene bei der ADM und Tumorentstehung im Pankreas weitgehend unbekannt.

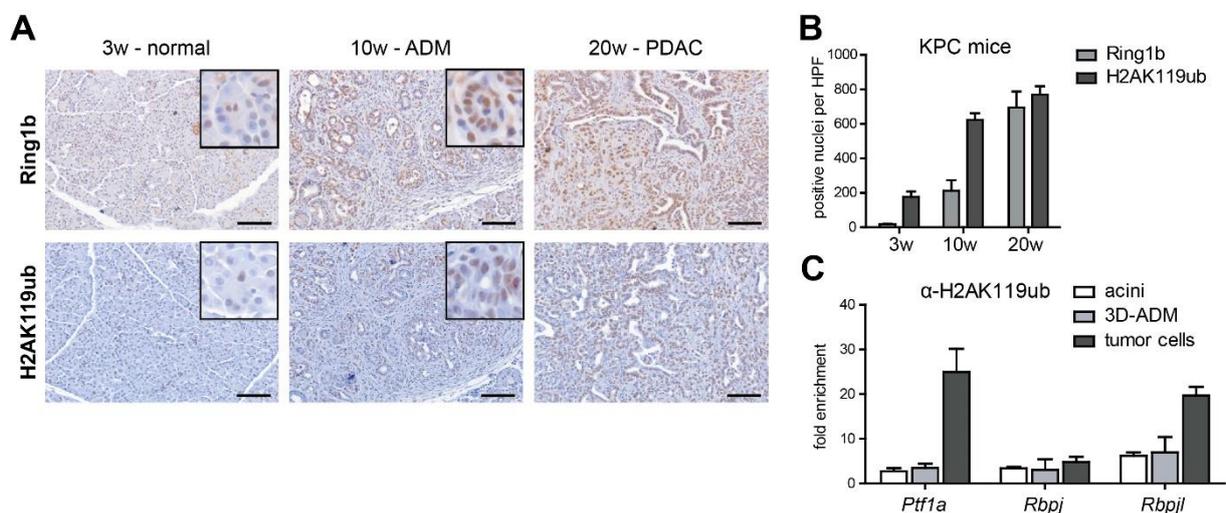


Abbildung 5: Anreicherung von H2AK119ub während der Pankreaskarzinogenese. **(A, B)** Immunhistochemische Färbung und Quantifizierung positiv gefärbter Kerne pro Hauptgesichtsfeld (*high power field*, HPF) von Ring1b und H2AK119ub von Pankreasgeweben aus 3, 10 und 20 Wochen (w) alten KPC Mäusen, mit normaler Pankreasmorphologie (3w), ADM Bildung (10w) und PDAC (20w). **(C)** Bestimmung der H2AK119ub Anreicherung mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) in der Promoterregion der Gene *Ptf1a*, *Rbpj* und *Rbpjl* in isolierten Azinuszellen, 3D-kultivierten ADM und Tumorzellen. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Benitz, Regel et al. 2016).

In dem aufgeführten Projekt konnten wir nachweisen, dass das Polycomb-Repressor Komplex 1 (PRC1) Protein *Ring Finger Protein 2* (Ring1b) und dessen katalysierte Histonmodifikation H2AK119ub in ADM und Tumorzellen eines Pankreastumor Mausmodells (KPC: Ptf1a^{Cre};LSL-Kras^{G12D};Tp53^{fl/+}) stark erhöht vorlagen (Abbildung 5). Mit Hilfe von Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) gegen die repressiven Histonmodifikationen H3K27me3 und H2AK119ub konnten wir in in vitro erzeugten ADMs und isolierten murinen Tumorzellen feststellen, dass wichtige Azinuszellgene, wie Ptf1a und Rpbjl, die den Transkriptionskomplex Ptf1-L kodieren, in ADMs und in Tumorzellen epigenetisch stillgelegt waren (Abbildung 5). In dieser Arbeit wurde somit zum ersten Mal gezeigt, dass Azinuszell-Differenzierungsgene in ADM und Pankreastumorzellen über epigenetische Mechanismen unterdrückt werden und damit die Dedifferenzierung von Azinuszellen in der Pankreaskarzinogenese unterstützen.

Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis. Benitz, S., T. Straub, U.M. Mahajan, J. Mutter, S. Czernel, T. Unruh, B. Wingerath, S. Deubler, L. Fahr, T. Cheng, S. Nahnsen, P. Bruns, B. Kong, S. Raulefs, G.O. Ceyhan, J. Mayerle, K. Steiger, I. Esposito, J. Kleeff, C.W. Michalski, and **I. Regel**, Gut, 2019. 68(11): p. 2007-2018.

Neben gut charakterisierten genetischen Veränderungen ist die Dedifferenzierung von Azinuszellen eine wichtige Voraussetzung für die Pankreaskarzinogenese. Azinuszell-spezifische Gene, die die Zellhomöostase kontrollieren, werden während der Tumorentstehung weitgehend herunterreguliert. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nur unzureichend verstanden. Mit Hilfe einer in vitro-generierten Sequenz der Pankreaskarzinogenese haben wir epigenetische Veränderungen in embryonalen Azinuszellen, ausdifferenzierten Azinuszellen, ADM und Tumorzellen bestimmt (Abbildung 6). Über eine globale Genexpressionsanalyse und ChIP DNA-Sequenzierung für die Histonmodifikationen H3K4me3, H3K27me3 und H2AK119ub wurden verschiedene Gencluster mit umfangreichen epigenetischen und transkriptionellen Umstrukturierung identifiziert. Hier konnten wir wiederholt feststellen, dass der epigenetische Faktor Ring1b und die Histonmodifikation H2AK119ub bei der Pankreaskarzinogenese eine entscheidende Rolle spielt. Insbesondere regulatorische Transkriptionsfaktoren der Azinuszellen werden durch die Ring1b-katalysierte Histonmodifikation H2AK119ub epigenetisch stillgelegt. Ring1b-Knockout-Mäuse zeigten nach Cerulein-induzierter Pankreatitis eine stark verminderte ADM Bildung und keine Ausbildung von Pankreastumoren (Abbildung 6).

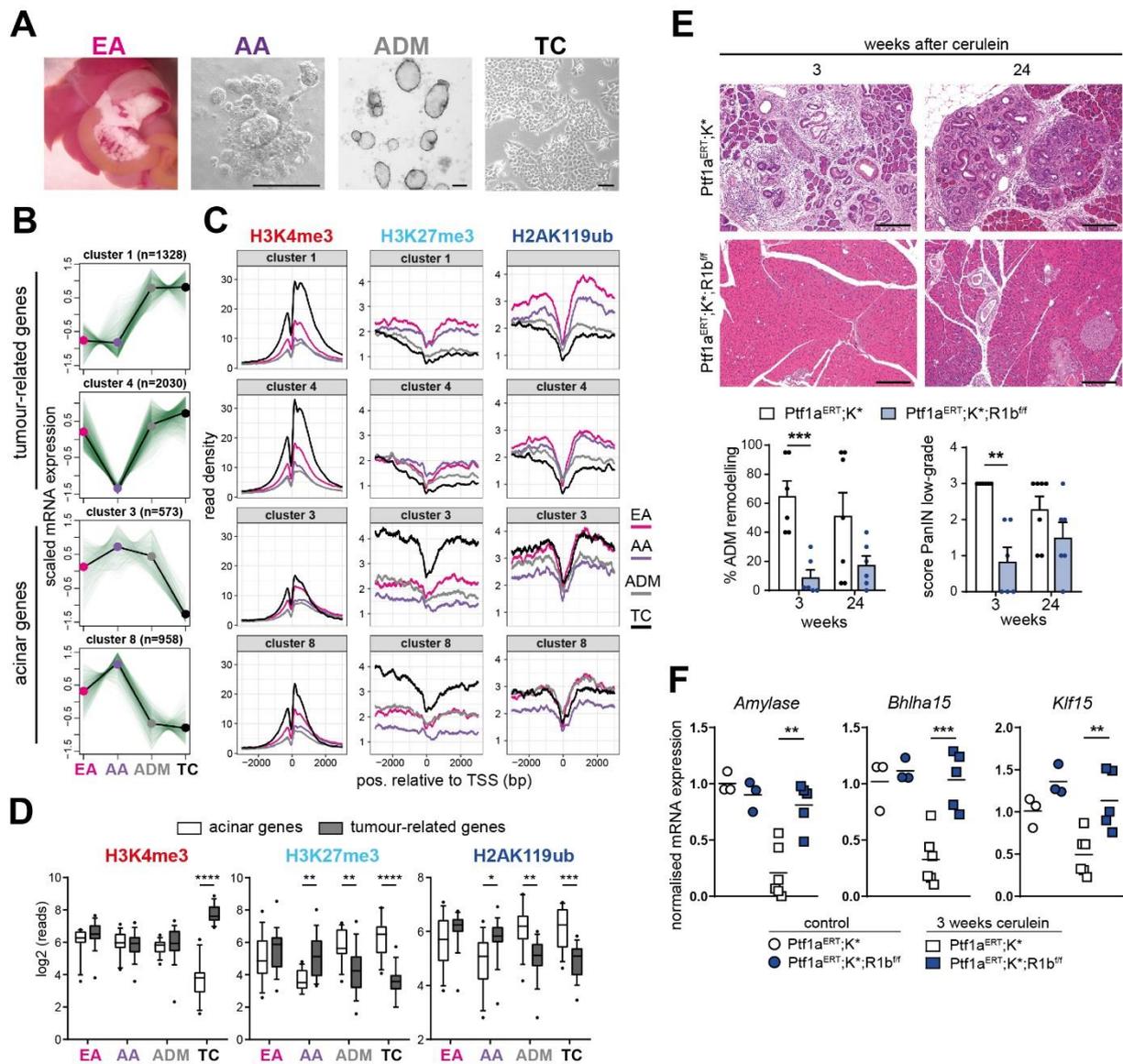


Abbildung 6: Ring1b-vermittelte epigenetische Stilllegung von Azinuszellendifferenzierungsgenen als wichtiger Faktor für die Pankreaskarzinogenese. **(A)** In vitro Karzinogenesemodell bestehend aus embryonalen Azinuszellen (EA), adulten Azinuszellen (AA), 3D-ADM Zellen (ADM) und Pankreastumorzellen (TC). **(B)** Clusteranalyse aus den Genexpressionsdaten von EA, AA, ADM und TC ergab jeweils 2 Cluster mit Tumor-relevanten und Azinuszellgenen. **(C)** Darstellung der Level der Histonmodifikationen H3K4me3, H3K27me3 und H2AK119ub am Transkriptionsstart (TSS) ermittelt mit ChIPs in EA, AA, ADM und TC für die jeweiligen Genexpressionscluster aus (B). **(D)** Vergleich der ChIP Signalintensität von H3K4me3, H3K27me3 und H2AK119ub in EA, AA, ADM und TC von Azinuszellgenen und Tumor-relevanten Genen. **(E)** HE Färbung von Pankreasgewebe aus Cerulein-behandelten Pankreastumormausmodellen mit (Ptf1a^{ERT};K*) und ohne (Ptf1a^{ERT};K*;R1b^{fl/fl}) Ring1b Expression. Quantifizierung der ADM Läsionen und low-grade PanIN Läsionen nach 3 und 24 Wochen nach Cerulein-Behandlung. **(F)** Normalisierte Genexpression von Azinuszellgenen in Kontroll- und Cerulein-behandelten Ptf1a^{ERT};K* und Ptf1a^{ERT};K*;R1b^{fl/fl} Mäusen. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Benitz, Straub et al. 2019).

Wir konnten nachweisen, dass Ring1b-defiziente Azinuszellen ihren differenzierten Phänotyp, trotz onkogener Kras Expression, behielten und somit nicht mehr in der Lage waren zu ADM oder Tumorzellen zu transformieren. Die Inhibierung von Ring1b in Tumorzellen führte zu einer Reprogrammierung der Tumorzellen zu einem weniger aggressiven Phänotyp. Unsere Daten liefern deutliche Beweise, dass die epigenetische Stilllegung von Azinuszellgenen ein wichtiges Ereignis bei der ADM Formierung und Entwicklung von Pankreaskarzinomen ist. Die gezielte Beeinflussung des epigenetischen Repressors Ring1b könnte neue therapeutische Möglichkeiten bieten.

Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2. **Regel, L.**, L. Merkl, T. Friedrich, E. Burgermeister, W. Zimmermann, H. Einwachter, K. Herrmann, R. Langer, C. Rocken, R. Hofheinz, R. Schmid, and M.P. Ebert, *Gastroenterology*, 2012. 143(1): p. 99-109 e10.

Für Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom gehört die Chemotherapie mit Anthrazyklinen zur Standardtherapie. Um die Wirksamkeit der Chemotherapie zu erhöhen, wurde der epigenetische Pan-Histondeacetylase-Inhibitor LBH589 (Panobinostat) in Kombination mit Anthrazyklinen in vitro und in vivo getestet. In humanen Magentumorzelllinien, primären Tumorproben und in Magentumoren von transgenen CEA/Tag-Mäusen liegt die Histondeacetylase 2 (HDAC2), im Vergleich zu Normalgewebe, überexprimiert vor. Daraufhin wurden Magentumor-Zelllinien mit LBH589 inkubiert und wir konnten nachweisen, dass der Inhibitor die Tumorzellproliferation hemmt und Apoptose induziert. Zusätzlich werden in den Zelllinien nach LBH589 Behandlung Gene, wie z.B. *CITED2*, angeschaltet, die wiederum die Expression von Anthrazyklin-Resistenzgenen unterdrücken (Abbildung 7). Die Vorbehandlung von Tumorzellen mit LBH589 oder die Überexpression von *CITED2* erhöhte in Tumorzelllinien die Sensitivität gegenüber Anthrazyklin-basierten Chemotherapeutika, wie Doxorubicin und Epirubicin. Dies konnten wir ebenso in CEA/Tag-Mäusen nachweisen, die unter Kombinationsbehandlung ein stark verringertes Tumorstadium zeigten (Abbildung 7). Erhöhte Level an *CITED2* in Magentumoren korrelierte mit dem Ansprechen der Patienten auf Epirubicin. Eine Kombinationstherapie mit LBH589 könnte daher das Ansprechen von Magenkarzinom-Patienten auf Anthrazykline verbessern.

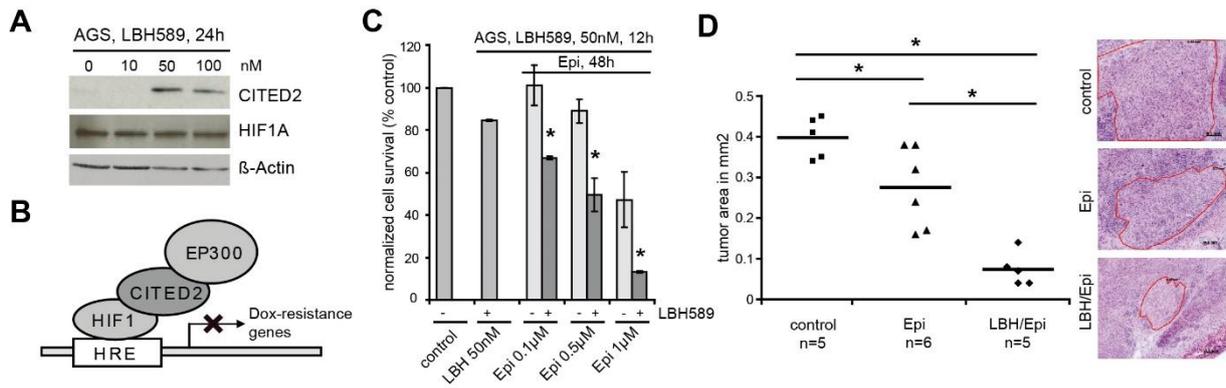


Abbildung 7: Das epigenetische Medikament Panobinostat sensibilisiert Magentumorzellen für ein besseres Chemotherapie-Ansprechen. **(A)** Behandlung der Magenkarzinomzelllinie AGS mit Panobinostat (LBH589) für 24 Stunden und Analyse der Proteinlevel von CITED2 und HIF1A im Western Blot. **(B)** Schematische Übersicht über den CITED2-vermittelten Mechanismus für eine Herunterregulation von Doxorubicin Resistenzgenen nach Panobinostat Behandlung. **(C)** Kombinationsbehandlung der Zelllinie AGS mit Epirubicin und Panobinostat; Ermittlung des Zellüberlebens mit MTT Assay. **(D)** Quantifizierung der Tumorgöße an HE Färbungen nach Behandlung eines Magenkarzinom-Mausmodells mit Epirubicin/Panobinostat Kombinationstherapie. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Regel, Merkl et al. 2012).

4.3. Onkogen- und Pankreatitis-induzierte Dedifferenzierung und Redifferenzierung von Azinuszellen

Expression of the EWSR1-FLI1 fusion oncogene in pancreas cells drives pancreatic atrophy and lipomatosis. Fahr, L., Y. Sunami, N. Maeritz, K. Steiger, T.G.P. Grunewald, M. Gericke, B. Kong, S. Raulefs, J. Mayerle, C.W. Michalski, **I. Regel***, and J. Kleeff, *Pancreatology*, 2020. 20(8): p. 1673-1681.

Mutiertes KRAS gilt als wichtigster Faktor in der Entstehung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC), da über 90% aller PDAC Patienten eine Mutation im *KRAS* Gen aufweisen. Ähnlich dazu wird für das Ewing Sarkom eine dominante genetische Veränderung, ein *EWSR1-FLI1* Fusionsonkogen, beschrieben. Hierbei beeinflusst die *EWSR1-FLI1* Expression tumorfördernde Signalwege und induziert die Zelltransformation. In unserer Studie wollten wir herausfinden, ob die Expression eines starken Onkogens, wie *EWSR1-FLI1*, in Azinuszellen zur Entstehung von Tumoren im Pankreas führt. Hierfür haben wir zwei konditionelle Mausmodelle miteinander verglichen, die mutiertes *Kras*^{G12D} (KC) oder *EWSR1-FLI1* Onkogen (E/F) in pankreatischen Azinuszellen exprimieren. Eine positive FLI1 Expression wurde in den Azinuszellen der E/F Mäuse mittels immunhistologischer Färbung bestätigt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten haben wir uns die morphologischen Veränderungen im Pankreasgewebe angeschaut und festgestellt, dass die Expression von *EWSR1-FLI1* eine starke Verringerung der Azinuszellmasse (Pankreasatrophie) und eine starke Lipomatose hervorruft (Abbildung 8). Die E/F Tiere zeigten, wie die KC Mäuse, eine spontane Dedifferenzierung der Azinuszellen zu azinär-duktales Metaplasie (ADM), jedoch konnten wir in den E/F Mäusen keine Ausbildung von neoplastischen Läsionen erkennen; auch nicht in älteren Tieren (Abbildung 8). Die KC Mäuse wiesen den typischen Verlauf der Pankreaskarzinogenese auf. Somit konnten wir nachweisen, dass die Entstehung von PDAC sehr stark vom *KRAS*-Onkogen abhängt. Das *EWSR1-FLI1* Fusionsonkogen war nicht in der Lage Pankreastumore zu induzieren.

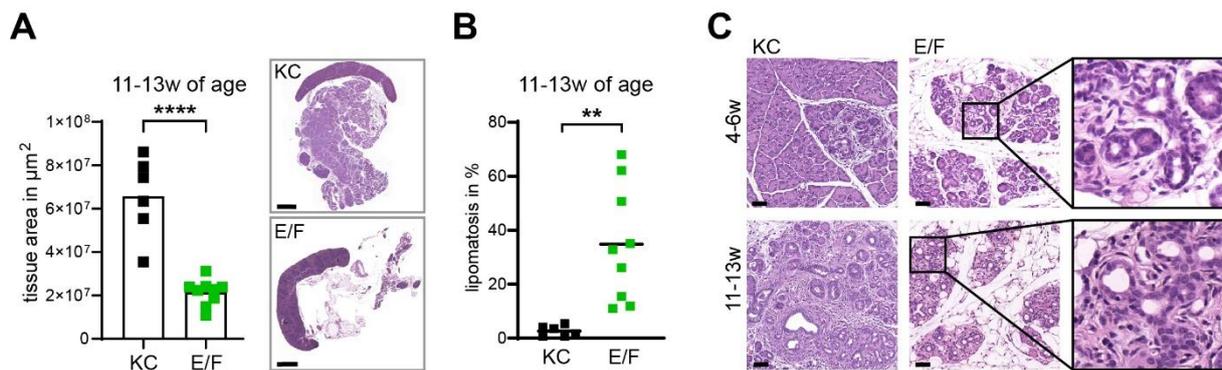


Abbildung 8: Expression des Fusionsonkogens *EWSR1-FLI1* in Pankreaszellen. **(A)** Quantifizierung des Pankreasgewebes von 11-13 Wochen alten KC und E/F Mäusen mittels HE Färbungen eines Gewebeschnitts des gesamten Organs. **(B)** Prozentuale Quantifizierung von Lipomatose im Pankreasgewebe von 11-13 Wochen alten KC und E/F Mäusen an HE Färbungen. **(C)** Darstellung von Gewebebereichen mit ADM Bildung im Pankreas von 4-6 und 11-13 Wochen alten KC und E/F Mäusen an HE Schnitten. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Fahr, Sunami et al. 2020).

Loss of TLR3 and its downstream signaling accelerates acinar cell damage in the acute phase of pancreatitis. [Regel, I.](#), S. Raulefs, S. Benitz, C. Mihaljevic, S. Rieder, G. Leinenkugel, K. Steiger, A.M. Schlitter, I. Esposito, J. Mayerle, B. Kong, J. Kleeff, and C.W. Michalski, *Pancreatology*, 2019. 19(1): p. 149-157.

Bei der akuten Pankreatitis werden durch die Schädigung der Azinuszellen *Toll-like* Rezeptor 3 Liganden, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt. Normalerweise kennt man TLR3-assoziierte Signale aus der Immunantwort und der Induktion einer Typ 1 Interferon Antwort. Ebenso wurde beschrieben, dass TLR3 Signalwege über die Aktivierung von Caspase 8 den programmierten Zelltod einleiten können. Jedoch ist die funktionale Rolle von TLR3 und dem nachgeschalteten Signalmolekül TICAM1 (oder auch TRIF genannt) bei der Pankreatitis bisher nicht bekannt. Interessanterweise zeigen Wildtyp Mäuse nach Cerulein-vermittelte Pankreatitis eine hohe Expression des endosomalen Tlr3 in den pankreatischen Azinuszellen. Für weitere Untersuchungen haben wir Tlr3- und Trif1-knockout (KO) Mäuse nach Induktion einer akuten Pankreatitis charakterisiert. Im Vergleich zu Wildtyp Tieren zeigen beide Mauslinien eine schwerere Pankreatitis (Abbildung 9) mit einer erhöhten Nfkb Aktivierung, und eine Überexpression der pro-inflammatorischen Cytokine *Il6* und *Tnf*, obwohl die Anzahl der infiltrierten Immunzellen im Pankreas nicht verändert war. Ebenfalls konnten wir in den Tlr3- und Trif1-KO Tieren eine starke Azinuszellnekrose und reduzierte Level von cleaved-Caspase 8 nachweisen. In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass der Tlr3 Signalweg ein wichtiger Faktor bei der Azinuszellschädigung und dem programmierten Zelltod

nach akuter Pankreatitis ist. Der Tlr3 Signalweg reguliert somit den Ausbruch und den Schweregrad der Erkrankung.

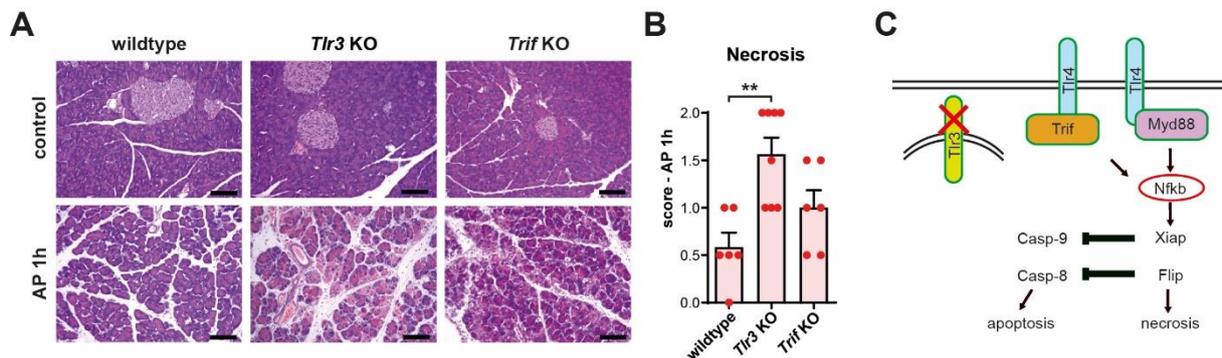


Abbildung 9: Der Verlust des Tlr3 Signalwegs erhöht die Azinuszellschädigung in der akuten Pankreatitis. **(A)** HE Färbung des Pankreas von Wildtyp-, Tlr3 Knockout (KO) und Trif KO Mäusen nach Kontroll- und Cerulein-Behandlung zur Induktion einer akuten Pankreatitis (AP). **(B)** Quantifizierung von Pankreasnekrose nach Cerulein-induzierter Pankreatitis mittels eines Scores in Wildtyp-, Tlr3 KO und Trif KO Mäusen. **(C)** Schematische Übersicht, inwieweit Azinuszellapoptose und -nekrose über den Tlr3 und Tlr4 / Trif Signalweg reguliert werden. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Regel, Raulefs et al. 2019).

Loss of Periostin Results in Impaired Regeneration and Pancreatic Atrophy after Cerulein-Induced Pancreatitis. Hausmann, S., I. Regel, K. Steiger, N. Wagner, M. Thorwirth, A.M. Schlitter, I. Esposito, C.W. Michalski, H. Friess, J. Kleeff, and M. Erkan, Am J Pathol, 2016. 186(1): p. 24-31.

Das extrazelluläre Matrix (ECM) Protein Periostin (Postn) wird von aktivierten pankreatischen Sternzellen sezerniert und liegt bei der chronischen Pankreatitis und im Pankreaskarzinom stark überexprimiert vor. Die Funktion von Postn bei der akuten Pankreatitis und den nachfolgenden regenerativen Ereignissen ist bisher nicht bekannt. Im Pankreatitis Mausmodell konnten wir zeigen, dass Postn nach der akuten inflammatorischen Phase, d.h. während der Ausbildung der azinär-duktalem Metaplasie (ADM) am stärksten exprimiert vorliegt und im Zuge der Regeneration langsam wieder auf das Ursprungsniveau absinkt (Abbildung 10). Interessanterweise zeigen Postn-defiziente (Postn^{-/-}) Mäuse keine Unterschiede im Schweregrad der akuten Pankreatitis, jedoch auffällige Unterschiede im Regenerationsverhalten des Pankreas. Der Verlust von Postn hatte eine starke Pankreasatrophie und Lipomatose im Verlauf der Regeneration zur Folge. Die Postn^{-/-} Mäuse wiesen eine anhaltende ADM Bildung auf, welche sich auch im Genexpressionsmuster von Progenitorgenen, wie *Hes1* und *Pdx1*, und

Azinuszellgenen, wie *Rbpjl*, widerspiegelte. In den *Postn*^{-/-} Mäusen waren die ADM-Zellen nicht mehr in der Lage in Azinuszellen zu redifferenzieren und das Pankreas zeigte eine starke Pankreasatrophie, Lipomatose und eine Hochregulation des wichtigen Fettstoffwechsel-Transkriptionsfaktors *Ppar-γ* (Abbildung 10). Somit konnten wir nachweisen, dass Periostin ein wichtiger Mediator für die Regeneration der Azinuszellen nach akuter Pankreatitis ist.

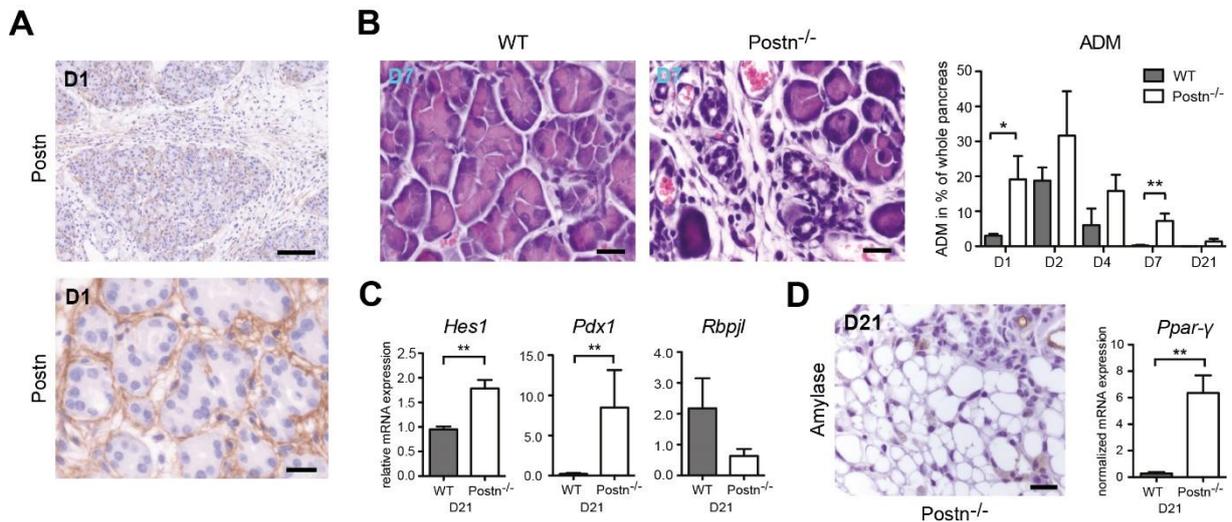


Abbildung 10: Der Verlust von Periostin resultiert in einer verzögerten Pankreasregeneration und Pankreasatrophie nach Pankreatitis. **(A)** Immunhistochemische Färbung von Periostin im Pankreasgewebe von Wildtyp-Mäusen 1 Tag (D1) nach Cerulein-induzierter Pankreatitis. **(B)** HE Färbung und Quantifizierung von ADM Läsionen in Periostin Knockout-Mäusen (*Postn*^{-/-}) an verschiedenen Zeitpunkten (1 – 21 Tage) nach Pankreatitis. **(C)** Relative mRNA Expression der Progenitorgene *Hes1* und *Pdx1* und des Azinuszellgens *Rbpjl* an Tag 21 nach Pankreatitis in Wildtyp und *Postn*^{-/-} Mäusen. **(D)** Immunhistochemische Färbung von Amylase an Tag 21 nach Pankreatitis in lipomatösen Bereichen des Pankreas und normalisierte mRNA Expression des *Ppar-γ* Gens im Pankreasgewebe von Wildtyp und *Postn*^{-/-} Mäusen. Graphiken entnommen und modifiziert aus (Hausmann, Regel et al. 2016).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Wichtige Signalwege, die vorrangig während der Embryonalentwicklung aktiv sind, beeinflussen sowohl in pädiatrischen Lebertumoren als auch im adulten Pankreaskarzinom die Tumorprogression und das Differenzierungsverhalten von Tumorzellen. In meinen Arbeiten konnte ich in pädiatrischen Lebertumoren eine epigenetische Inaktivierung der wichtigen IGF- und WNT-Signalwegsinhibitoren *IGFBP3* und *SFRP1* nachweisen. Beide Gene waren über DNA Methylierungen in den Promoterbereichen ausgeschaltet, was mit einem aggressiveren Tumorphänotyp assoziiert war (Regel, Eichenmuller et al. 2012, Regel, Eichenmuller et al. 2020). Im Pankreaskarzinom zeigten Tumorzellen mit erhöhter WNT-Signalwegsaktivität eine Dedifferenzierung in Tumorzellen mit einem Tumorstammzell- und EMT-Phänotyp. Dieser Subtyp von Tumorzellen weist erhöhte Therapieresistenzen auf, besitzt Tumor-initiiierende Eigenschaften und bildet vermehrt Metastasen aus (Ilmer, Boiles et al. 2015). Für das Pankreaskarzinom wurden mittlerweile verschiedene molekulare Subtypen beschrieben, die sich nicht nur auf Genexpressionsebene unterscheiden, sondern ebenfalls in ihren Tumorcharakteristika. Der basale Subtyp zeigt einen EMT Phänotyp und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert, während der klassische Subtyp ein besseres Therapieansprechen aufweist; zusammengefasst in (Regel, Mayerle et al. 2020). In einer aktuellen Studie haben wir in den beschriebenen molekularen Subtypen des Pankreaskarzinoms verschiedene epigenetische Histonacetylierungsmuster nachgewiesen (Zhou, Pichlmeier et al., eigene nicht publizierte Daten). Über eine epigenetische Reprogrammierung der Tumorsubtypen mit Histonacetyltransferase (HAT)- oder Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren wollen wir nun das Ansprechen auf Chemotherapie verbessern. Im Magenkarzinom konnten wir über eine epigenetische Intervention sehr gute Ergebnisse erzielen. Eine Kombinationstherapie mit dem HDAC-Inhibitor Panobinostat (LBH589) und Epirubicin, einem Standardtherapeutikum für das Magenkarzinom, zeigte sowohl in vitro als auch in vivo die stärksten Ansprechraten (Regel, Merkl et al. 2012). Aufgrund der Reversibilität sind epigenetische Modifikationen attraktive Zielstrukturen für neue therapeutische Optionen.

Epigenetische Veränderungen spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in regenerativen und Tumor-initiiierenden Prozessen. Nach einer akuten Pankreatitis besitzen Azinuszellen regenerative Eigenschaften und unterliegen einer ADM Formierung um geschädigtes Gewebe zu ersetzen. In meinen Arbeiten konnten wir herausfinden, dass es bei der ADM Bildung zu einer epigenetischen Stilllegung von Differenzierungsgenen in den Azinuszellen kommt. Die Anreicherung der repressiven Histonmodifikation H2AK119ub durch die katalytische Komponente Ring1b vom PRC1 ist ein entscheidender Faktor bei der ADM Bildung. In Ring1b-

defizienten Mäusen war nicht nur die ADM Bildung unterdrückt, sondern auch die Entstehung von Pankreasvorläuferläsionen und Tumoren, trotz aktivierter Expression von mutiertem *Kras* (Benitz, Regel et al. 2016, Benitz, Straub et al. 2019). Unsere Daten konnten belegen, dass die epigenetische Stilllegung von Differenzierungsgenen und die Dedifferenzierung von Azinuszellen ein essentieller Schritt in der Tumorentstehung ist. Verbleiben die Azinuszellen in ihrem differenzierten Zustand, unterdrückt dies die Tumorentstehung. Im Verlauf der Progression von ADM zu Tumorzellen kommen weitere epigenetische Veränderungen hinzu. So konnten wir feststellen, dass Differenzierungsgene weitere repressive Histonmodifikationen, wie H3K27me3, anreichern und Tumor-relevante Gene vermehrt aktive Histonmodifikationen, wie H3K4me3, aufweisen (Benitz, Straub et al. 2019). In einem aktuellen Projekt untersuchen wir daher die Möglichkeit über epigenetische Modifikationen herauszufinden, inwieweit eine Entartung von regenerativen ADMs zu Tumor-initiiierenden ADMs stattgefunden hat. Das epigenetische Profil von ADMs und Vorläuferzellen könnte als Indikator für die Tumorentstehung dienen und damit für die Früherkennung von Pankreaskarzinomen relevant sein. Das alleinige Auftreten von *KRAS* Mutationen kann für eine Früherkennung von Tumoren nicht herangezogen werden, da ältere Menschen häufig *KRAS* Mutationen aufweisen, ohne dass sie Tumore entwickeln (Luttges, Reinecke-Luthge et al. 1999, Allenson, Castillo et al. 2017). Spezifische epigenetische Muster können daher eine wichtige Rolle spielen, ob es zu einer Entartung und zur Entwicklung von Pankreaskarzinomen kommt.

Für das Pankreaskarzinom ist die *KRAS* Mutation die wichtigste genetische Veränderung. Die Expression eines anderen Onkogens, wie dem Fusionsprotein *EWSR1-FLI1*, in pankreatischen Azinuszellen löste zwar eine ADM Bildung aus, jedoch entwickelte das pankreas-spezifische *EWSR1-FLI1* Mausmodell keine Pankreastumore. Die Tiere zeigten lediglich eine starke Pankreasatrophie und Lipomatose (Fahr, Sunami et al. 2020). Einen ähnlichen Phänotyp konnten wir in Periostin-defizienten Mäusen nach Induktion einer akuten Pankreatitis nachweisen. Neben einer inflammatorischen Reaktion kommt es bei der akuten Pankreatitis ebenfalls zur Aktivierung von PSCs im Pankreas und zu einer Ausschüttung von ECM Proteinen, wie Periostin. In den Periostin-defizienten Mäusen war die Regenerationsfähigkeit der Azinuszellen stark eingeschränkt. Die Tiere zeigten eine anhaltende ADM Bildung und ebenfalls eine verstärkte Pankreasatrophie und Lipomatose (Hausmann, Regel et al. 2016). Inwieweit Onkogene oder extrinsische Faktoren, wie Periostin, das epigenetische Profil von Azinuszellen beeinflussen, und damit das Differenzierungsverhalten von Azinuszellen bestimmen, muss in weiteren Studien analysiert werden. Aktuell untersuchen wir die Rolle des inflammatorischen *Tlr3/Irf3/Irf7* Signalwegs in Azinuszellen und in der Pankreaskarzinogenese. Der Signalweg

wurde bisher vorrangig in Immunzellen untersucht, allerdings haben wir in einer Studie herausgefunden, dass der Signalweg nach induzierte akuter Pankreatitis auch in Azinuszellen aktiv ist und den Schweregrad der Pankreatitis reguliert (Regel, Raulefs et al. 2019). In weiteren Arbeiten haben wir entdeckt, dass die Transkriptionsfaktoren Irf3 und Irf7 die Tumorentwicklung fördern und in ADM- und Pankreastumorzellen stark exprimiert werden. Interessanterweise sind die bekannten Irf3/Irf7-Zielgene wie *Ifna* und *Ifnb* in den Tumorzellen epigenetisch stillgelegt und nach Stimulation durch einen Tlr3-Liganden nicht induzierbar, was auf eine Regulierung von anderen Zielgenen in der Pankreaskarzinogenese schließen lässt. Weitere Daten deuten darauf hin, dass trotz des Vorhandenseins von mutiertem Kras ein globaler Verlust von Irf3/Irf7 die Etablierung eines epigenetischen tumorfördernden Programms in ADM-Läsionen verhindert. Eine Depletion von Irf3/Irf7 in Pankreastumorzellen bewirkt Veränderungen im epigenetischen Profil und resultiert in einem weniger aggressiven Tumorphänotyp (Fahr et al., noch nicht publizierte Daten).

Insgesamt konnte ich in meinen Arbeiten aufzeigen, wie wichtig epigenetische Veränderungen bei der Geweberegeneration und der Onkogen-vermittelten Tumorentstehung im Pankreas und in anderen Tumoren sind.

6. Literaturverzeichnis

- Adamek, A. and A. Kasprzak (2018). "Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases." *Int J Mol Sci* 19(5).
- Allenson, K., J. Castillo, F. A. San Lucas, G. Scelo, D. U. Kim, V. Bernard, G. Davis, T. Kumar, M. Katz, M. J. Overman, L. Foretova, E. Fabianova, I. Holcatova, V. Janout, F. Meric-Bernstam, P. Gascoyne, I. Wistuba, G. Varadhachary, P. Brennan, S. Hanash, D. Li, A. Maitra and H. Alvarez (2017). "High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients." *Ann Oncol* 28(4): 741-747.
- Apte, M., R. C. Pirola and J. S. Wilson (2015). "Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer." *Curr Opin Gastroenterol* 31(5): 416-423.
- Benitez, C. M., W. R. Goodyer and S. K. Kim (2012). "Deconstructing pancreas developmental biology." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(6).
- Benitz, S., I. Regel, T. Reinhard, A. Popp, I. Schaffer, S. Raulefs, B. Kong, I. Esposito, C. W. Michalski and J. Kleeff (2016). "Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells." *Oncotarget* 7(10): 11424-11433.
- Benitz, S., T. Straub, U. M. Mahajan, J. Mutter, S. Czernmel, T. Unruh, B. Wingerath, S. Deubler, L. Fahr, T. Cheng, S. Nahnsen, P. Bruns, B. Kong, S. Raulefs, G. O. Ceyhan, J. Mayerle, K. Steiger, I. Esposito, J. Kleeff, C. W. Michalski and I. Regel (2019). "Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis." *Gut* 68(11): 2007-2018.
- Carrillo-Reixach, J., L. Torrens, M. Simon-Coma, L. Royo, M. Domingo-Sabat, J. Abril-Fornaguera, N. Akers, M. Sala, S. Ragull, M. Arnal, N. Villalmanzo, S. Cairo, A. Villanueva, R. Kappler, M. Garrido, L. Guerra, C. Sabado, G. Guillen, M. Mallo, D. Pineyro, M. Vazquez-Vitali, O. Kuchuk, M. E. Mateos, G. Ramirez, M. L. Santamaria, Y. Mozo, A. Soriano, M. Grotzer, S. Branchereau, N. G. de Andoin, B. Lopez-Ibor, R. Lopez-Almaraz, J. A. Salinas, B. Torres, F. Hernandez, J. J. Uriz, M. Fabre, J. Blanco, C. Paris, V. Bajciová, G. Laureys, H. Masnou, A. Clos, C. Belendez, C. Guettier, L. Sumoy, R. Planas, M. Jorda, L. Nonell, P. Czauderna, B. Morland, D. Sia, B. Losic, M. A. Buendia, M. R. Sarrias, J. M. Llovet and C. Armengol (2020). "Epigenetic footprint enables molecular risk stratification of hepatoblastoma with clinical implications." *J Hepatol* 73(2): 328-341.
- Fahr, L., Y. Sunami, N. Maeritz, K. Steiger, T. G. P. Grunewald, M. Gericke, B. Kong, S. Raulefs, J. Mayerle, C. W. Michalski, I. Regel and J. Kleeff (2020). "Expression of the EWSR1-FLI1 fusion oncogene in pancreas cells drives pancreatic atrophy and lipomatosis." *Pancreatology* 20(8): 1673-1681.
- Fendrich, V., F. Esni, M. V. Garay, G. Feldmann, N. Habbe, J. N. Jensen, Y. Dor, D. Stoffers, J. Jensen, S. D. Leach and A. Maitra (2008). "Hedgehog signaling is required for effective regeneration of exocrine pancreas." *Gastroenterology* 135(2): 621-631.
- Flavahan, W. A., E. Gaskell and B. E. Bernstein (2017). "Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer." *Science* 357(6348).
- Guerra, C., A. J. Schuhmacher, M. Canamero, P. J. Grippo, L. Verdaguer, L. Perez-Gallego, P. Dubus, E. P. Sandgren and M. Barbacid (2007). "Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice." *Cancer cell* 11(3): 291-302.
- Gukovsky, I., N. Li, J. Todoric, A. Gukovskaya and M. Karin (2013). "Inflammation, autophagy, and obesity: common features in the pathogenesis of pancreatitis and pancreatic cancer." *Gastroenterology* 144(6): 1199-1209 e1194.

- Hausmann, S., I. Regel, K. Steiger, N. Wagner, M. Thorwirth, A. M. Schlitter, I. Esposito, C. W. Michalski, H. Friess, J. Kleeff and M. Erkan (2016). "Loss of Periostin Results in Impaired Regeneration and Pancreatic Atrophy after Cerulein-Induced Pancreatitis." *Am J Pathol* 186(1): 24-31.
- Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy and D. A. Tuveson (2003). "Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse." *Cancer cell* 4(6): 437-450.
- Ilmer, M., A. R. Boiles, I. Regel, K. Yokoi, C. W. Michalski, Wistuba, II, J. Rodriguez, E. Alt and J. Vykoukal (2015). "RSPO2 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells." *Cancer Res* 75(9): 1883-1896.
- Jensen, J. N., E. Cameron, M. V. Garay, T. W. Starkey, R. Gianani and J. Jensen (2005). "Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration." *Gastroenterology* 128(3): 728-741.
- Kong, B., P. Bruns, N. A. Behler, L. Chang, A. M. Schlitter, J. Cao, A. Gewies, J. Ruland, S. Fritzsche, N. Valkovskaya, Z. Jian, I. Regel, S. Raulefs, M. Irmeler, J. Beckers, H. Friess, M. Erkan, N. S. Mueller, S. Roth, T. Hackert, I. Esposito, F. J. Theis, J. Kleeff and C. W. Michalski (2018). "Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy." *Gut* 67(1): 146-156.
- Kopp, J. L., G. von Figura, E. Mayes, F. F. Liu, C. L. Dubois, J. P. t. Morris, F. C. Pan, H. Akiyama, C. V. Wright, K. Jensen, M. Hebrok and M. Sander (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.
- Lohr, M., G. Kloppel, P. Maisonneuve, A. B. Lowenfels and J. Luttges (2005). "Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis." *Neoplasia* 7(1): 17-23.
- Luttges, J., A. Reinecke-Luthge, B. Mollmann, M. A. Menke, A. Clemens, M. Klimpfinger, B. Sipos and G. Kloppel (1999). "Duct changes and K-ras mutations in the disease-free pancreas: analysis of type, age relation and spatial distribution." *Virchows Arch* 435(5): 461-468.
- Morris, J. P. t., D. A. Cano, S. Sekine, S. C. Wang and M. Hebrok (2010). "Beta-catenin blocks Kras-dependent reprogramming of acini into pancreatic cancer precursor lesions in mice." *J Clin Invest* 120(2): 508-520.
- Murtaugh, L. C. and M. D. Keefe (2015). "Regeneration and repair of the exocrine pancreas." *Annu Rev Physiol* 77: 229-249.
- Nagae, G., S. Yamamoto, M. Fujita, T. Fujita, A. Nonaka, T. Umeda, S. Fukuda, K. Tatsuno, K. Maejima, A. Hayashi, S. Kurihara, M. Kojima, T. Hishiki, K. Watanabe, K. Ida, M. Yano, Y. Hiyama, Y. Tanaka, T. Inoue, H. Ueda, H. Nakagawa, H. Aburatani and E. Hiyama (2021). "Genetic and epigenetic basis of hepatoblastoma diversity." *Nat Commun* 12(1): 5423.
- Pichlmeier, S. and I. Regel (2020). *Epigenetic Targeting. Translational Pancreatic Cancer Research: From Understanding of Mechanisms to Novel Clinical Trials.* C. W. Michalski, J. Rosendahl, P. Michl and J. Kleeff. Cham, Springer International Publishing: 169-182.
- Puri, S. and M. Hebrok (2010). "Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development." *Dev Cell* 18(3): 342-356.
- Regel, I., M. Eichenmuller, S. Joppien, J. Liebl, B. Haberle, J. Muller-Hocker, A. Vollmar, D. von Schweinitz and R. Kappler (2012). "IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors." *Mol Cancer* 11: 9.

- Regel, I., M. Eichenmuller, U. M. Mahajan, B. Hagl, S. Benitz, B. Haberle, C. Vokuhl, D. von Schweinitz and R. Kappler (2020). "Downregulation of SFRP1 is a protumorigenic event in hepatoblastoma and correlates with beta-catenin mutations." *J Cancer Res Clin Oncol* 146(5): 1153-1167.
- Regel, I., S. Hausmann, S. Benitz, I. Esposito and J. Kleeff (2016). "Pathobiology of pancreatic cancer: implications on therapy." *Expert Rev Anticancer Ther* 16(2): 219-227.
- Regel, I., J. Mayerle and U. M. Mahajan (2020). "Current Strategies and Future Perspectives for Precision Medicine in Pancreatic Cancer." *Cancers (Basel)* 12(4).
- Regel, I., L. Merkl, T. Friedrich, E. Burgermeister, W. Zimmermann, H. Einwachter, K. Herrmann, R. Langer, C. Rocken, R. Hofheinz, R. Schmid and M. P. Ebert (2012). "Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2." *Gastroenterology* 143(1): 99-109 e110.
- Regel, I., S. Raulefs, S. Benitz, C. Mihaljevic, S. Rieder, G. Leinenkugel, K. Steiger, A. M. Schlitter, I. Esposito, J. Mayerle, B. Kong, J. Kleeff and C. W. Michalski (2019). "Loss of TLR3 and its downstream signaling accelerates acinar cell damage in the acute phase of pancreatitis." *Pancreatology* 19(1): 149-157.
- Reichert, M. and A. K. Rustgi (2011). "Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia." *J Clin Invest* 121(12): 4572-4578.
- Siveke, J. T., C. Lubeseder-Martellato, M. Lee, P. K. Mazur, H. Nakhai, F. Radtke and R. M. Schmid (2008). "Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis." *Gastroenterology* 134(2): 544-555.
- Storz, P. (2017). "Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14(5): 296-304.
- Tomlinson, G. E. and R. Kappler (2012). "Genetics and epigenetics of hepatoblastoma." *Pediatr Blood Cancer* 59(5): 785-792.
- Witt, H. (2013). *Physiologie und Embryologie des Pankreas. Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. B. Rodeck and K.-P. Zimmer. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 547-555.
- Yan, L., C. McFaul, N. Howes, J. Leslie, G. Lancaster, T. Wong, J. Threadgold, J. Evans, I. Gilmore, H. Smart, M. Lombard, J. Neoptolemos and W. Greenhalf (2005). "Molecular analysis to detect pancreatic ductal adenocarcinoma in high-risk groups." *Gastroenterology* 128(7): 2124-2130.
- Zhang, T., S. Cooper and N. Brockdorff (2015). "The interplay of histone modifications - writers that read." *EMBO Rep* 16(11): 1467-1481.

7. Schriftenverzeichnis eigener wissenschaftlicher Veröffentlichungen

7.1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin

1. Goni, E., **I. Regel***, U.M. Mahajan, A. Amodio, G. De Marchi, G. Beyer, et al., HLA-DRB1 *16 and -DQB1 *05 alleles are strongly associated with autoimmune pancreatitis in a cohort of hundred patients. *Pancreatology*, 2022, DOI: 10.1016/j.pan.2022.03.015, *shared first author
2. Mahajan, U.M., A. Alnatsha, Q. Li, B. Oehrle, F.U. Weiss, M. Sendler, M. Distler, W. Uhl, T. Fahlbusch, E. Goni, G. Beyer, A. Chromik, M. Bahra, F. Klein, C. Pilarsky, R. Grutzmann, M.M. Lerch, K. Lauber, N. Christiansen, B. Kamlage, **I. Regel***, and J. Mayerle, Plasma Metabolome Profiling Identifies Metabolic Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cells*. 2021 Jul 19;10(7):1821. *shared senior author
3. **Regel, I.**, M. Eichenmuller, U.M. Mahajan, B. Hagl, S. Benitz, B. Haberle, C. Vokuhl, D. von Schweinitz, and R. Kappler, Downregulation of SFRP1 is a protumorigenic event in hepatoblastoma and correlates with beta-catenin mutations. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020. 146(5): p. 1153-1167.
4. Fahr, L., Y. Sunami, N. Maeritz, K. Steiger, T.G.P. Grunewald, M. Gericke, B. Kong, S. Raulefs, J. Mayerle, C.W. Michalski, **I. Regel***, and J. Kleeff, Expression of the EWSR1-FLI1 fusion oncogene in pancreas cells drives pancreatic atrophy and lipomatosis. *Pancreatology*, 2020. 20(8): p. 1673-1681. *shared senior author
5. Benitz, S., T. Straub, U.M. Mahajan, J. Mutter, S. Czernmel, T. Unruh, B. Wingerath, S. Deubler, L. Fahr, T. Cheng, S. Nahnsen, P. Bruns, B. Kong, S. Raulefs, G.O. Ceyhan, J. Mayerle, K. Steiger, I. Esposito, J. Kleeff, C.W. Michalski, and **I. Regel**, Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis. *Gut*, 2019. 68(11): p. 2007-2018.
6. **Regel, I.**, S. Raulefs, S. Benitz, C. Mihaljevic, S. Rieder, G. Leinenkugel, K. Steiger, A.M. Schlitter, I. Esposito, J. Mayerle, B. Kong, J. Kleeff, and C.W. Michalski, Loss of TLR3 and its downstream signaling accelerates acinar cell damage in the acute phase of pancreatitis. *Pancreatology*, 2019. 19(1): p. 149-157.
7. Benitz, S., **I. Regel***, T. Reinhard, A. Popp, I. Schaffer, S. Raulefs, B. Kong, I. Esposito, C.W. Michalski, and J. Kleeff, Polycomb repressor complex 1 promotes gene silencing through H2AK119 mono-ubiquitination in acinar-to-ductal metaplasia and pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 2016. 7(10): p. 11424-33. *shared first author
8. **Regel, I.**, L. Merkl, T. Friedrich, E. Burgermeister, W. Zimmermann, H. Einwachter, K. Herrmann, R. Langer, C. Rocken, R. Hofheinz, R. Schmid, and M.P. Ebert, Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2. *Gastroenterology*, 2012. 143(1): p. 99-109 e10.
9. **Regel, I.**, M. Eichenmuller, S. Joppien, J. Liebl, B. Haberle, J. Muller-Hocker, A. Vollmar, D. von Schweinitz, and R. Kappler, IGFBP3 impedes aggressive growth of pediatric liver cancer and is epigenetically silenced in vascular invasive and metastatic tumors. *Mol Cancer*, 2012. 11: p. 9.

7.2. Originalarbeiten als Ko-Autorin

1. Mahajan, U.M., Q. Li, A. Alnatsha, J. Maas, M. Orth, S.H. Maier, J. Peterhansl, **I. Regel**, M. Sendler, P.R. Wagh, N. Mishra, Y. Xue, P. Allawadhi, G. Beyer, J.P. Kuhn, T. Marshall, B. Appel, F. Lammerhirt, C. Belka, S. Muller, F.U. Weiss, K. Lauber, M.M. Lerch, and J. Mayerle, Tumor-Specific Delivery of 5-Fluorouracil-Incorporated Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Aptamers as an Efficient Treatment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Models. *Gastroenterology*, 2021.
2. Reiter, F.P., L. Ye, F. Bosch, R. Wimmer, R. Artmann, A. Ziesch, V. Kanitz, D. Mayr, C.J. Steib, M. Trauner, **I. Regel**, A.L. Gerbes, J. Mayerle, S. Hohenester, E.N. de Toni, and G. Denk, Antifibrotic effects of hypocalcemic vitamin D analogs in murine and human hepatic stellate cells and in the CCl4 mouse model. *Lab Invest*, 2019.
3. Kong, B., P. Bruns, N.A. Behler, L. Chang, A.M. Schlitter, J. Cao, A. Gewies, J. Ruland, S. Fritzsche, N. Valkovskaya, Z. Jian, **I. Regel**, S. Raulefs, M. Irmiler, J. Beckers, H. Friess, M. Erkan, N.S. Mueller, S. Roth, T. Hackert, I. Esposito, F.J. Theis, J. Kleeff, and C.W. Michalski, Dynamic landscape of pancreatic carcinogenesis reveals early molecular networks of malignancy. *Gut*, 2018. 67(1): p. 146-156.
4. Mahajan, U.M., E. Langhoff, E. Goni, E. Costello, W. Greenhalf, C. Halloran, S. Ormanns, S. Kruger, S. Boeck, S. Ribback, G. Beyer, F. Dombrowski, F.U. Weiss, J.P. Neoptolemos, J. Werner, J.G. D'Haese, A. Bazhin, J. Peterhansl, S. Pichlmeier, M.W. Buchler, J. Kleeff, P. Ganeh, M. Sendler, D.H. Palmer, T. Kohlmann, R. Rad, **I. Regel**, M.M. Lerch, and J. Mayerle, Immune Cell and Stromal Signature Associated With Progression-Free Survival of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*, 2018. 155(5): p. 1625-1639 e2.
5. Schlitter, A.M., A. Segler, K. Steiger, C.W. Michalski, C. Jager, B. Konukiewicz, N. Pfarr, V. Endris, M. Bettstetter, B. Kong, **I. Regel**, J. Kleeff, G. Kloppel, and I. Esposito, Molecular, morphological and survival analysis of 177 resected pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs): Identification of prognostic subtypes. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 41064.
6. Hausmann, S., **I. Regel**, K. Steiger, N. Wagner, M. Thorwirth, A.M. Schlitter, I. Esposito, C.W. Michalski, H. Friess, J. Kleeff, and M. Erkan, Loss of Periostin Results in Impaired Regeneration and Pancreatic Atrophy after Cerulein-Induced Pancreatitis. *Am J Pathol*, 2016. 186(1): p. 24-31.
7. Kong, B., W. Wu, T. Cheng, A.M. Schlitter, C. Qian, P. Bruns, Z. Jian, C. Jager, **I. Regel**, S. Raulefs, N. Behler, M. Irmiler, J. Beckers, H. Friess, M. Erkan, J.T. Siveke, A. Tannapfel, S.A. Hahn, F.J. Theis, I. Esposito, J. Kleeff, and C.W. Michalski, A subset of metastatic pancreatic ductal adenocarcinomas depends quantitatively on oncogenic Kras/Mek/Erk-induced hyperactive mTOR signalling. *Gut*, 2016. 65(4): p. 647-57.
8. Cheng, T., Z. Jian, K. Li, S. Raulefs, **I. Regel**, S. Shen, X. Zou, J. Ruland, G.O. Ceyhan, H. Friess, C.W. Michalski, J. Kleeff, and B. Kong, In vivo functional dissection of a context-dependent role for Hif1alpha in pancreatic tumorigenesis. *Oncogenesis*, 2016. 5(12): p. e278.
9. Nitsche, U., D. Stangel, Z. Pan, A.M. Schlitter, I. Esposito, **I. Regel**, S. Raulefs, H. Friess, J. Kleeff, and M. Erkan, Periostin and tumor-stroma interactions in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*, 2016. 12(5): p. 3804-3810.
10. Muller, S., S. Raulefs, P. Bruns, F. Afonso-Grunz, A. Plotner, R. Thermann, C. Jager, A.M. Schlitter, B. Kong, **I. Regel**, W.K. Roth, B. Rotter, K. Hoffmeier, G. Kahl, I. Koch, F.J. Theis, J. Kleeff, P. Winter, and C.W. Michalski, Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol Cancer*, 2015. 14(1): p. 94.
11. Schlitter, A.M., K.T. Jang, G. Kloppel, B. Saka, S.M. Hong, H. Choi, G.J. Offerhaus, R.H. Hruban, Y. Zen, B. Konukiewicz, **I. Regel**, M. Allgauer, S. Balci, O. Basturk, M.D. Reid, I. Esposito, and V. Adsay,

Intraductal tubulopapillary neoplasms of the bile ducts: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 20 cases. *Mod Pathol*, 2015. 28(9): p. 1249-64.

12. Kong, B., T. Cheng, C. Qian, W. Wu, K. Steiger, J. Cao, A.M. Schlitter, **I. Regel**, S. Raulefs, H. Friess, M. Erkan, I. Esposito, J. Kleeff, and C.W. Michalski, Pancreas-specific activation of mTOR and loss of p53 induce tumors reminiscent of acinar cell carcinoma. *Mol Cancer*, 2015. 14(1): p. 212.
13. Miller, K.J., S. Raulefs, B. Kong, K. Steiger, **I. Regel**, A. Gewies, J. Kleeff, and C.W. Michalski, Loss of *Ifnar1* in Pancreatic Acinar Cells Ameliorates the Disease Course of Acute Pancreatitis. *PLoS One*, 2015. 10(11): p. e0143735.
14. Ilmer, M., A.R. Boiles, **I. Regel**, K. Yokoi, C.W. Michalski, Wistuba, II, J. Rodriguez, E. Alt, and J. Vykoukal, RSP02 Enhances Canonical Wnt Signaling to Confer Stemness-Associated Traits to Susceptible Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res*, 2015. 75(9): p. 1883-96.
15. Kong, B., T. Cheng, W. Wu, **I. Regel**, S. Raulefs, H. Friess, M. Erkan, I. Esposito, J. Kleeff, and C.W. Michalski, Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 2015. 6(31): p. 32154-60.
16. Yuan, G., **I. Regel**, F. Lian, T. Friedrich, I. Hitkova, R.D. Hofheinz, P. Strobel, R. Langer, G. Keller, C. Rocken, W. Zimmermann, R.M. Schmid, M.P. Ebert, and E. Burgermeister, WNT6 is a novel target gene of caveolin-1 promoting chemoresistance to epirubicin in human gastric cancer cells. *Oncogene*, 2013. 32(3): p. 375-87.
17. Elyenstein, A., S. Schmidt, S. Gu, W. Yang, E. Schmidt, E.M. Schmidt, I. Alesutan, K. Szteyn, **I. Regel**, E. Shumilina, and F. Lang, Transcription factor NF-kappaB regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, *Orai1*, and its activator, *STIM1*, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions. *J Biol Chem*, 2012. 287(4): p. 2719-30.
18. Burgermeister, E., T. Friedrich, I. Hitkova, **I. Regel**, H. Einwachter, W. Zimmermann, C. Rocken, A. Perren, M.B. Wright, R.M. Schmid, R. Seger, and M.P. Ebert, The Ras inhibitors caveolin-1 and docking protein 1 activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through spatial relocalization at helix 7 of its ligand-binding domain. *Mol Cell Biol*, 2011. 31(16): p. 3497-510.
19. Elyenstein, A., E.M. Gehring, N. Heise, E. Shumilina, S. Schmidt, K. Szteyn, P. Munzer, M.K. Nurbaeva, M. Eichenmuller, L. Tyan, **I. Regel**, M. Foller, D. Kuhl, J. Soboloff, R. Penner, and F. Lang, Stimulation of Ca²⁺-channel *Orai1*/*STIM1* by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *FASEB J*, 2011. 25(6): p. 2012-21.
20. Tang, C., C. Zelenak, J. Volkl, M. Eichenmuller, **I. Regel**, H. Frohlich, D. Kempe, L. Jimenez, L. Le Bellego, S. Vergne, and F. Lang, Hydration-sensitive gene expression in brain. *Cell Physiol Biochem*, 2011. 27(6): p. 757-68.
21. Eichenmuller, M., **I. Gruner**, B. Hagl, B. Haberle, J. Muller-Hocker, D. von Schweinitz, and R. Kappler, Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology*, 2009. 49(2): p. 482-90.
22. Klaus, F., E.M. Gehring, A. Zurn, J. Laufer, R. Lindner, N. Strutz-Seebohm, J.M. Tavaré, J.D. Rothstein, C. Boehmer, M. Palmada, **I. Gruner**, U.E. Lang, G. Seebohm, and F. Lang, Regulation of the Na⁽⁺⁾-coupled glutamate transporter EAAT3 by PIKfyve. *Neurochem Int*, 2009. 54(5-6): p. 372-7.
23. Rexhepaj, R., A. Rotte, D.S. Kempe, M. Sopjani, M. Foller, E.M. Gehring, M. Bhandaru, **I. Gruner**, A.F. Mack, I. Rubio-Aliaga, A.M. Nassl, H. Daniel, D. Kuhl, and F. Lang, Stimulation of electrogenic intestinal dipeptide transport by the glucocorticoid dexamethasone. *Pflugers Arch*, 2009. 459(1): p. 191-202.

7.3. Übersichtsartikel / Reviews

1. **Regel, I.**, J. Mayerle, and U.M. Mahajan, Current Strategies and Future Perspectives for Precision Medicine in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(4).
2. Khomiak, A., M. Brunner, M. Kordes, S. Lindblad, R.C. Miksch, D. Ohlund, and **I. Regel**, Recent Discoveries of Diagnostic, Prognostic and Predictive Biomarkers for Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(11).
3. **Regel, I.**, S. Hausmann, S. Benitz, I. Esposito, and J. Kleeff, Pathobiology of pancreatic cancer: implications on therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2016. 16(2): p. 219-27.
4. **Regel, I.**, B. Kong, P. Bruns, C.W. Michalski, and J. Kleeff, Complexity of molecular alterations impacts pancreatic cancer prognosis. *World J Gastrointest Oncol*, 2013. 5(1): p. 1-3.
5. **Regel, I.**, B. Kong, S. Raulefs, M. Erkan, C.W. Michalski, M. Hartel, and J. Kleeff, Energy metabolism and proliferation in pancreatic carcinogenesis. *Langenbecks Arch Surg*, 2012. 397(4): p. 507-12.

7.4. Buchkapitel

1. Pichlmeier, S. and **I. Regel**, Epigenetic Targeting, in *Translational Pancreatic Cancer Research: From Understanding of Mechanisms to Novel Clinical Trials*, C.W. Michalski, et al., Editors. 2020, Springer International Publishing: Cham. p. 169-182.
2. Messmann, H., A. Tannapfel, and J. Werner, Kapitel 6.4 Irene Esposito und **Ivonne Regel**, Pankreaskarzinom, Histopathologie und Tumorbilogie Gastrointestinale Onkologie. 2018: Georg Thieme Verlag. p. 238.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Julia Mayerle, der Direktorin der Medizinischen Klinik und Poliklinik II für die großartige Unterstützung in den letzten fünf Jahren und der Möglichkeit zur Habilitation. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Stefan Böck und besonders Herrn Prof. Dr. Roland Kappler für die Begleitung meines Habilitationsverfahrens und die guten Ratschläge und offenen Worte.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Ebert, Prof. Dr. Jörg Kleeff, Prof. Dr. Christoph Michalski und Prof. Dr. Irene Esposito bedanken. Sie haben meine wissenschaftlichen Projekte und meine wissenschaftliche Laufbahn maßgeblich geprägt.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die Projektmitarbeiter, Doktoranden, Studenten und technischen Assistenten, die an meinen Forschungsprojekten mitgewirkt haben. Ohne euch wären die vorliegenden Arbeiten nicht möglich gewesen. Hier möchte ich besonders Dr. Simone Benitz, Dr. Ujjwal Mukund Mahajan, Dr. Elisabetta Goni, Dr. Susanne Raulefs, Dr. Tobias Straub, Dr. Simone Hausmann, Dr. Melanie Eichenmüller, Lisa Merkl, Lisa Fahr, Isabell Schäffer und Maria del Socorro Escobar Lopez erwähnen.

Bei meinem aktuellen Team, Lisa Fahr, Nicole Schreiner, Quan Zhou, Julia Wolff, Elisabeth Orgler, Svenja Pichlmeier, und Lisa Wurdak bedanke ich mich für das großartige Engagement, das sie in die laufenden Forschungsprojekte einbringen.

Von ganzem Herzen möchte ich meiner Familie und meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt haben. Ganz besonders möchte ich meinem Mann Andreas danken für den Freiraum an den vielen Wochenenden zum Schreiben von Anträgen und Manuskripten. Vielen Dank für dein Verständnis, und dass du immer für mich da bist.

9. Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit versichere ich, dass ich die schriftliche Habilitationsleistung selbständig verfasst und die Herkunft des verwendeten oder zitierten Materials ordnungsgemäß kenntlich gemacht habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich bisher keine weiteren Habilitationsgesuche an einer anderen Hochschule eingereicht habe. Mir wurde bisher kein akademischer Grad entzogen und ein entsprechendes Verfahren, das die Entziehung eines akademischen Grades zur Folge haben könnte, ist mir nicht anhängig.

München, 18.05.2022

Dr. Ivonne Regel