

Aus dem Pathologischen Institut
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Frederick Klauschen

Habilitationsschrift

Progression und Hierarchie des kolorektalen Karzinoms

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Peter Jung

2023

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung	3
2.1	Epidemiologie und Progression der Erkrankung Darmkrebs	3
2.2	Molekulare Stratifizierung des kolorektalen Karzinoms	4
2.3	Hierarchie des intestinalen Epithels und der zelluläre Ursprung des kolorektalen Karzinoms	5
2.4	Die Rolle des Wnt Signalwegs im intestinalen Epithel und im kolorektalen Karzinom	7
2.4.1	Der Wnt Signalweg – Komponenten und grundlegende Mechanismen	7
2.4.2	Wnt Signaltransduktion in adulten intestinalen Stammzellen und KRK Stammzellen	9
2.5	Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms	10
2.5.1	Zytostatische Chemotherapeutika in der KRK Therapie	11
2.5.2	Zielgerichtete Inhibition des EGFR-MAPK Signalweges	12
2.5.3	Therapeutische Beeinflussung der KRK Angiogenese	13
3	Zielsetzungen der Arbeit	15
4	Zusammenfassung und Diskussion themenbezogener eigener Arbeiten	16
4.1	Aufreinigung und molekulare Charakterisierung von adulten humanen Kolonstammzellen	16
4.1.1	Adulte humane Kolonstammzellen bilden Kolon-„Organoide“ in der Petrischale	18
4.2	Intratumorale Hierarchie des kolorektalen Karzinoms und Krebs-Stammzellen	19
4.3	Tumor-Organoid als präklinisches, personalisiertes Modell des kolorektalen Karzinoms	20
4.4	Wnt Effektoren und deren Funktionalität und Relevanz im KRK	22
4.4.1	Wnt/c-MYC/TFAP4 Signaltransduktion in der Homöostase und Transformation des Darmepithels	22
4.4.2	Wnt-induzierte Biomarker zur Aufreinigung und Charakterisierung von Kolon- und KRK-Stammzellen	23
4.4.3	Die Wnt-LARGE2- α DG Achse reguliert die Interaktion von Kolonepithel- und KRK Zellen mit der extrazellulären Matrixkomponente Laminin	25
4.5	Krankheits-Modellierung und präklinische Erprobung alter-nativer Therapieansätze an Tumor Organoiden	26
4.5.1	Die Rolle des Biomarkers AURKA in der Progression und Überlebens-Prognose des kolorektalen Karzinoms	29
4.5.2	Das Potential von klinisch erprobten und neuen präklinisch getesteten Inhibitoren von AURKA	30
5	Résumé und Ausblick	32
6	Verzeichnis der Abkürzungen	33
7	Referenzen	34
8	Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen (Stand 05/2022)	40
8.1	Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor	40
8.1.1	Übersichtsartikel/Reviews	41
8.2	Originalarbeiten als Koautor	41

9	Danksagung.....	44
10	Originalarbeiten der Habilitationsschrift	45

Progression und Hierarchie des kolorektalen Karzinoms

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie und Progression der Erkrankung Darmkrebs

Karzinome des epithelialen Dickdarm- und Rektalgewebes (Kolorektale Karzinome - KRK) zählen in den entwickelten westlichen Ländern zur zweithäufigsten Form der Krebserkrankungen bei Männern, bei Frauen zu den dritthäufigsten. Im Jahr 2020 wurden in der europäischen Union (EU, E27) circa 340,000 Fälle des KRK diagnostiziert, und rund 150,000 Todesfälle waren im Zusammenhang mit dieser Erkrankung zu beklagen, was wiederum 12.4% der Krebs-bedingten Mortalität ausmachte (Quelle:<https://ecis.jrc.ec.europa.eu>, © European Union, 2022). Die ökonomische Belastung (engl.: economic burden) von KRK innerhalb der EU macht rund 10% der gesamten in Verbindung mit Krebs entstehenden Kosten aus, und beläuft sich nach Schätzungen auf circa €15-€20 Milliarden Euro jährlich (2). Betrachtet man nun die Gesamtheit der KRK Diagnosen, so entfallen ungefähr 19% der Fälle auf das Union for International Cancer Control (UICC)-TNM (3) Stadium I, 26% werden mit Stadium II diagnostiziert, 26% mit Stadium III und schließlich 26% der Patienten erhält die Diagnose Stadium IV(4). Während die noch auf das Ursprungsorgan beschränkte Erkrankung den Krankheits-Stadien I oder II zuzuordnen ist, je nach räumlichem Ausmaß des Tumors und dessen lokaler invasiver Verbreitung, so sind beim Stadium III bereits ein oder mehrere regionale Lymphknoten von Tumorzellen befallen. Im ungünstigen Falle des UICC Stadiums IV haben die Tumorzellen bereits ferne Organe erreicht und sind dort zu Metastasen ausgewachsen(5). Beim KRK sind in diesem Stadium insbesondere die Leber und die Lunge betroffen, aber auch das Peritoneum und in selteneren Fällen das Gehirn können von metastasierenden Tumorzellen besiedelt werden.

In einer auf der europäischen Bevölkerung basierenden Studie der Abteilungen für präventive Onkologie und für klinische Epidemiologie und Altersforschung des Deutschen Krebsforschungszentrums (Prof. Dr. Michael Hofmeister und Prof. Dr. Hermann Brenner) konnte demonstriert werden, dass Länder mit einem gut organisierten und der breiten Öffentlichkeit zugänglichen KRK Früherkennungsprogramm (Koloskopie und/oder Stuhlprobenanalyse) sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität des KRK deutlich verringern konnten (4). Während diese Studie eindrucksvoll die Wichtigkeit einer frühen Erkennung des KRK verdeutlichte, machte sie auch eine dadurch bedingte Verschiebung hin zu diagnostizierten KRK Fällen des UICC Stadiums I und II, was der frühen und noch lokalisierten Form der Erkrankung entspricht, sichtbar. Während die klinische Vorgehensweise und die Entscheidungskriterien zur Gabe von adjuvanter Chemotherapie bei den fortgeschrittenen invasiven oder bereits fernmetastasierten Stadien (UICC III und IV) sehr gut definiert sind, trifft dies auf die UICC Stadium II Patientengruppe weniger zu(6, 7). Dies erschwert insbesondere die Entscheidungsfindung im klinischen Risiko-Management, gerade im Hinblick auf die Stratifizierung von Patienten mit lokalisiertem KRK in verschiedene Risikogruppen bzw. Untergruppen mit guter oder schlechter Prognose. Nichtsdestotrotz beträgt die fünf Jahre Überlebensrate

von Patienten des lokalisierten KRK mit Stadium II circa 80-85% (8-10). Die hauptsächlichen Hürden für den klinischen Erfolg der heutigen Krebstherapie stellen hingegen die Metastasierung (UICC Stadium IV) sowie das Auftreten von Chemotherapie-Resistenz dar. Zwar haben neue chirurgische Behandlungsmethoden und multimodale Therapieansätze bereits eine Verbesserung der Diagnose von spät diagnostiziertem KRK erreicht (11). Eine fünfjährige Überlebenswahrscheinlichkeit von nur circa 15-20% bei KRK Patienten mit Tumoren des UICC Stadiums IV bereits zum Zeitpunkt der Erst-Diagnose machen jedoch die weiterhin sehr hohe Problematik bei dieser Patientengruppe deutlich (10).

Die Evolution des sporadischen kolorektalen Karzinoms auf pathologischer und molekularer Ebene wird seit mehreren Jahrzehnten intensiv erforscht und ist sehr gut verstanden: Bis zu 80% aller diagnostizierten Fälle gehen auf die klassische „Adenom-Karzinom Sequenz“ zurück und sind meist durch chromosomale Instabilität (CIN) geprägt (12, 13). Seit den wegweisenden Arbeiten zur Aufklärung der molekularen Grundlagen dieser häufigsten Art des kolorektalen Karzinoms in den späten achtziger und neunziger Jahren, welche die Wnt/APC/c-MYC Signalwegs-Achse, das KRAS Proto-Onkogen sowie den Tumorsuppressor TP53 als Schlüsselfaktoren in der Entstehung und Progression des KRKs erstmals beschrieben (14-17), kommt der Erforschung der regulatorischen Mechanismen im Umfeld dieser Signalwegs-Komponenten eine wichtige Bedeutung zu. Daneben weisen circa 20% der KRKs eine Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) auf und haben ihren Ursprung meist in den „sessilen serratierten Adenomen“ (SSA) (18). Das Konzept der sogenannten „serratierten Route“ der KRK Entstehung ist jünger als das der klassischen Adenom-Karzinom Route, und insgesamt circa 20-35% der sporadischen KRK Fälle gehen nach heutigen Erkenntnissen auf SSAs zurück (18). Im Gegensatz zur klassischen Route der KRK Entstehung, deren initiierende Schlüsselmutation im Adenomatous Polyposis Coli (*APC*) Gen liegt, wird die KRK Evolution nach der serratierten Route durch aktivierende Mutationen im *BRAF*-Gen ausgelöst, gefolgt von konsekutiven Ausfällen von DNA-Reparatur Faktoren und einer dadurch bedingten hohen Mikrosatelliten-Instabilität (19, 20). Vom klinischen und Krebs-therapeutischen Standpunkt aus betrachtet nehmen aktivierende Veränderungen in den *RAS/RAF* Genen eine Schlüsselrolle ein, da diese eine Kontraindikation zur Anwendung von Antikörpern gerichtet gegen den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), wie z.B. Cetuximab oder Panitumumab, im Rahmen der Erstlinientherapie darstellen (21-23). Tumore mit ausgeprägter MSI sind aufgrund ihrer hohen Mutations-Last (Neoantigen-Dichte, engl.: „mutational burden“) und der damit verbundenen Neigung einer Immunaktivierung der modernen und sehr vielversprechenden „Immun-Checkpoint“ Therapie mit Antikörpern gerichtet gegen den Liganden PD-L1 zugänglich (24). Aber auch immunologisch „kalte“ CIN Tumore können, wie kürzlich gezeigt wurde, durch eine therapeutische Blockade der TGF- β Signalwegsaktivität in der Tumor-Mikroumgebung für die Immuntherapie re-sensitiviert werden (25).

2.2 Molekulare Stratifizierung des kolorektalen Karzinoms

Mit der Entwicklung und breiteren Anwendbarkeit von sogenannten „Omics“ Methoden, wie z.B. RNA/DNA Sequenzierungen der nächsten Generation (NGS) und quantitative Proteom Analysen, wurde in den letzten Jahren eine noch tiefgreifendere molekulare Charakterisierung des KRK möglich. Eine der

bekanntesten molekularen Klassifizierung des kolorektalen Karzinoms wurde von Guinney *et al.* vorgenommen und beschreibt vier molekulare Subtypen (Consensus Molecular Subtypes, CMS 1-4) des KRK (26). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass sich diese molekulare Klassifizierung in vielen Fällen nicht alleine auf die epithelialen Krebszellen zurückführen lässt. Mit der direkten Analyse von gesamtheitlichem primärem Tumorgewebe hatten auch die stromalen und immunologischen Gewebsbestandteile maßgeblichen Einfluss auf die molekulare Klassifizierung und dominierten insbesondere KRK Subtypen mit schlechter klinischer Prognose (27, 28). Diese für viele Anwendungen kritische Limitierung der CMS-Klassifizierung wurde mit der erst seit Kurzem zur Verfügung stehenden Methode der Einzelzell-Sequenzierung noch deutlicher gemacht. Danach enthalten die meisten Tumore des stromalen Subtyps CMS4 keine oder kaum mesenchymale Karzinomzellen, sind jedoch sehr stark von stromalen Zellen (Fibroblasten und endotheliale Zellen) infiltriert, welche das Transkriptom und Proteom dieser Tumor-Entität prägen (29). Auch durch einen alternativen Ansatz, in dem eine große Anzahl von Tumorzell-Proben verschiedener Patienten in immun-defiziente Mäuse transplantiert wurde (Xenotransplantation), versuchte man dieses Problem zu umgehen: Nach Charakterisierung der in den Mäusen ausgewachsenen Tumore ließen sich die auf die humanen epithelialen Karzinomzellen zurückgehenden molekularen Charakteristika mittels Computer-gestützter RNA-Dekonvolution isoliert von denen der Maus-spezifischen stromalen Mikroumgebung betrachten. Nach diesem Prinzip identifizierte Isella *et al.* fünf KRK-intrinsische Subtypen (engl.: CRC intrinsic subtypes, CRIS-A bis CRIS-E), welche neben der rein molekularen Klassifizierung auch eine robuste Assoziation mit dem klinischen Erfolg bestimmter Chemotherapien sowie der Patienten-Prognose zeigten (30). Eine sehr systematische und klinisch orientierte Einteilung von Subtypen des KRK wurde im Jahr 2016 auch vom OncoTrack Konsortium publiziert, welches neben primären Tumorproben auch die Übertragbarkeit der Daten auf präklinische Modelle, wie klassische Zelllinien, Tumor Organoide (siehe auch Kapitel 4.3) und xenotransplantierte Mäuse, untersuchte (31). Danach wurden drei molekulare Gruppen des KRK definiert, welche unterschiedlich gut auf zytostatische Substanzen (z.B. 5'-Fluoruracil) oder auf die gezielte Blockade des EGF-Rezeptors mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab ansprechen (31).

2.3 Hierarchie des intestinalen Epithels und der zelluläre Ursprung des kolorektalen Karzinoms

Das intestinale Epithel, aus dem heraus nach maligner Transformation das KRK hervorgeht, regeneriert sich durch die außerordentliche Funktionalität von gewebespezifischen Stammzellen, welche auch als adulte Stammzellen bezeichnet werden (32). Anders als die Mehrzahl der Darmepithelzellen, welche eine gewebetypische Differenzierung und funktionelle Spezialisierung besitzen und nur sehr kurzlebig sind (Lebensdauer: 3-5 Tage), haben die langlebigen adulten Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und bringen über die gesamte Lebenszeit des Menschen eine zelluläre Nachkommenschaft hervor, welche die fortwährende Gewebeintegrität sicherstellt. In den letzten 15 Jahren wurden verschiedene Zelloberflächenmarker identifiziert, über die diese multipotente Gewebezell-Subpopulation effizient

angereichert und molekular charakterisiert werden kann, darunter die Membran-ständigen Proteine LGR5 (33), EPHB2 (34, 35), und PTK7 (36). Die direkte Nachkommenschaft der Kolon-Stammzellen sind die sogenannten Progenitorzellen, welche im Englischen auch als „Transit-Amplifying Cells“ bezeichnet werden. Sie sind teilungsaktiv und durch eine hohe Expression von Proliferationsmarkern, wie z.B. c-MYC, TFAP4, AURKA, AURKB und MKI67 geprägt (34, 37-39). Im Laufe ihrer weiteren Proliferation und Wanderung entlang der vertikalen Kryptachse differenzieren die Progenitorzellen schließlich in die spezialisierten reifen Zelltypen des Darmgewebes: Enterozyten, Becherzellen, und enteroendokrine Zellen (40). Die Enterozyten sind hochprismatische Zellen und bilden den resorptiven Teil des Epithels. Sie exprimieren die Differenzierungs-Marker KRT20, ANPEP, und CA1. Becherzellen werden auch als Goblet-Zellen bezeichnet und stellen Schleim-bildende Drüsenzellen verantwortlich für die Bildung und Sekretion von Mucinen dar. Typische Biomarker dieser Zellen im humanen Dickdarm sind MUC2 und TFF3. Schließlich ist die heterogene Population von enteroendokrinen Zellen für die Produktion von Hormonen zuständig, und sie bilden nur einen kleinen Anteil (< 1 %) des Dickdarmepithels. Verschiedene Untergruppen dieses Zelltyps produzieren die Hormone Chromogranin A, Serotonin, Synaphophysin, Peptid YY, und viele mehr (40, 41). Nach einer Lebensdauer von nur drei bis fünf Tagen beenden die terminal differenzierten Zelltypen ihren Lebenszyklus und werden nach Absterben in das Darmlumen abgesondert, ein Prozess, den man im Englischen als „shedding“ bezeichnet.

Eine wichtige Frage, welche sich aufgrund des hierarchischen Aufbaus und der sich daraus ergebenden Heterogenität von intestinale Normalgewebe und entarteten kolorektalen Karzinomen ergab, bezog sich auf den tatsächlich zellulären Ursprung der Erkrankung Darmkrebs. Anhand von Analysen an mikrodissiziertem Gewebe von frühen sporadisch auftretenden Adenomen, welche mutierte Zellen vorwiegend in den oberen Kryptregionen enthielten, postulierte Bert Vogelstein ein sogenanntes „top-down“ Modell, wonach die Erkrankung aus einer differenzierten Darmepithelzelle hervorgeht und sich dann lateral und abwärts in Richtung Kryptbase ausbreitet (42). Dem gegenüber standen Beobachtungen an Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP), einer autosomal-dominant vererbaren Erkrankung, bei der es zu einem starken Befall des Dickdarms mit Polypen kommt. Die dabei ausschlaggebende bzw. initiiierende Mutation im *APC* Gen aufweisenden dysplastischen Zellen besiedelten hier meist die gesamte Krypteeinschließlich der Kryptbase, was auf ein sogenanntes „bottom-up“ Modell hindeutete. Hierbei ist eine adulte Stammzelle an der Kryptbase der Ursprung der Erkrankung und besiedelt nach ihrer *APC* Mutations-getriebenen Transformation gefolgt von ungezügelter Zell-Proliferationschlussendlich die gesamte Krypte (43). Eine Unterstützung für das „bottom-up“ Modell kam von genetischen Mausstudien, in denen ganz gezielt *APC* Gen-Mutationen entweder in den LGR5-positiven intestinalen Stammzellen oder in deren differenzierter Nachkommenschaft ausgelöst wurden (44). Während nach dieser Studie eine *APC* Mutation für sich alleine nur in den LGR5-positiven intestinalen Stammzellen die Tumorigenese auszulösen vermag, zeigten spätere Arbeiten, dass an Entzündungsprozessen beteiligte Mechanismen, wie z.B. eine durch *KRAS* Gen-Mutation ausgelöste Aktivierung des NFkappaB (NFkB) Signalweges, eine De-differenzierung von reifen intestinalen Epithelzellen bewirkt und im Zusammenspiel mit abnormaler Wnt-Aktivität eine Transformation und Tumorentstehung auch in diesem Gewebe-Kompartiment hervorrufen kann (45). Diese Arbeiten verteidigten die Relevanz des „top-down“

Mechanismus in der KRK Entstehung und deuteten bereits auf einen möglicherweise kritischen Einfluss von Entzündungsprozessen in diesem Kontext hin. Ein Durchbruch in dieser Debatte gelang schließlich mittels einer großangelegten Einzelzellen-Transkriptom-Studie an den zwei Haupttypen von humanen kolorektalen Polypen (konventionelle Adenome und serratierte Polypen) und deren KRK Ableger (46). Danach gehen konventionelle Adenome, welche sich durch eine relativ geringe Mutationslast auszeichnen, aus dem vor äußeren Stressfaktoren geschützten und immunologisch inaktiven Stammzell-Kompartiment an der Kryptbase hervor, unterliegen also zumeist einem „bottom-up“-Mechanismus der Krebsentstehung. Im Gegensatz dazu nehmen serratierte Polypen, welche eine MSI und damit eine sehr hohe Mutationslast aufweisen, ihren Anfang meist in der Mikrobiota-exponierten und dadurch stärker immunaktivierten Mikroumgebung an der Oberfläche des Darmepithels. Hier bewirken die luminalen Stressfaktoren eine Aktivierung von Entzündungs-Signalwegen, vermehrt auftretende DNA-Schädigungen sowie den Einsatz von bestimmten DNA-Reparaturmechanismen, was insgesamt eine zelluläre Plastizität und De-differenzierung fördert und dadurch einen „top-down“ Mechanismus der KRK Entstehung ermöglicht (46). Klassische Adenome und serratierte Polypen entstehen nach heutigem Stand der Erkenntnis also durch fundamental verschiedene Mechanismen und haben ihren Ursprung in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten des kolorektalen Epithelgewebes. Da hauptsächlich die aus klassischen Adenomen hervorgegangenen chromosomal instabilen und Mikrosatelliten-stabilen KRKs die Fähigkeit zur Fernmetastasierung besitzen, galt diesen in der vorliegenden Habilitations-Leistung ein besonderes Augenmerk.

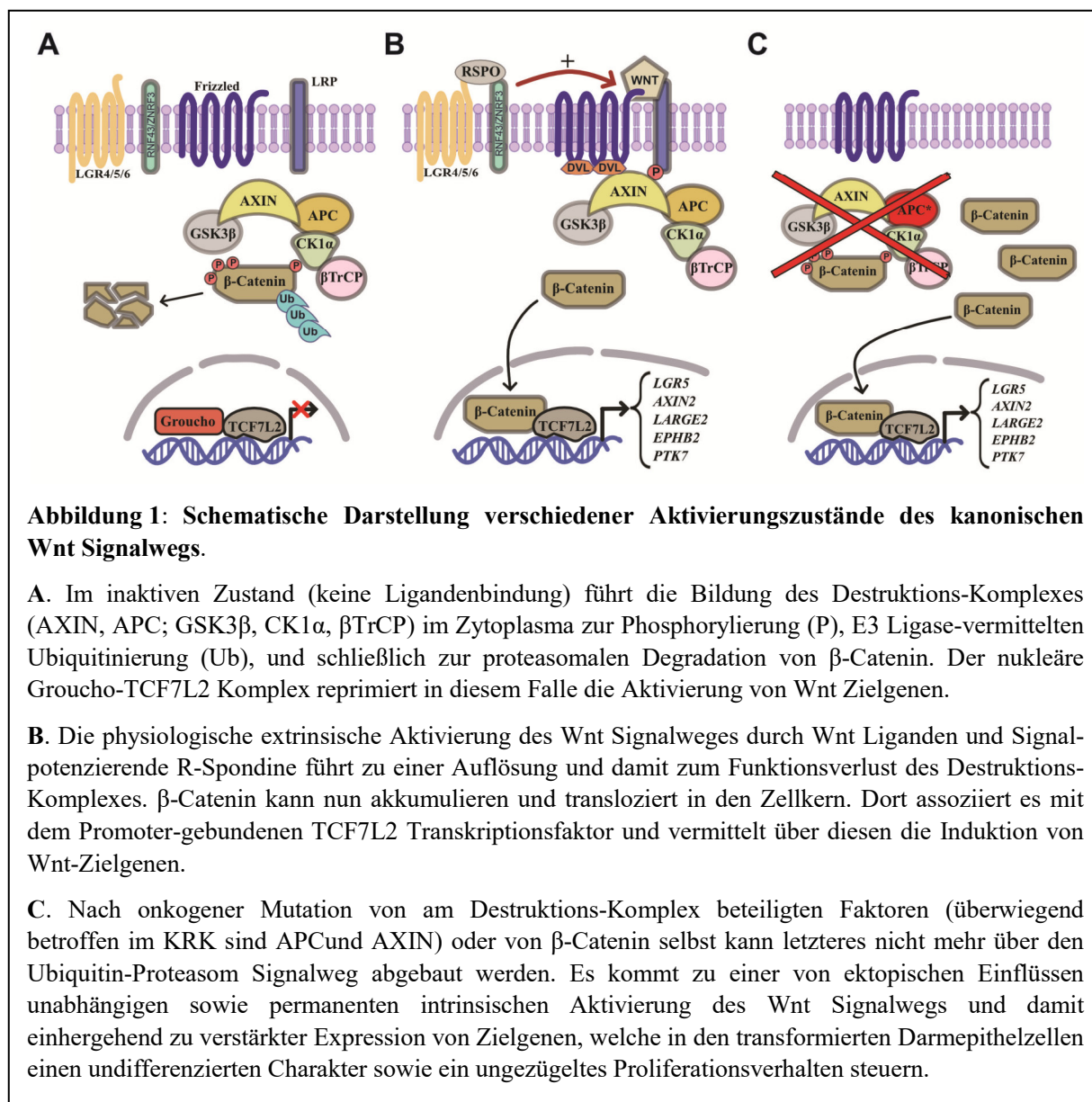
2.4 Die Rolle des Wnt Signalwegs im intestinalen Epithel und im kolorektalen Karzinom

2.4.1 Der Wnt Signalweg – Komponenten und grundlegende Mechanismen

Wnt Liganden sind von Emitter Zellen sezernierte Protein, welche über eine kurze Distanz hinweg zur Zell-Zell-Kommunikation beitragen. Somit nehmen sie nur auf direkt angrenzende oder nahe benachbarte Zellen Einfluss. Der sogenannte „Sortier-Rezeptor“ Evi/Wntless/Sprinter ist für den Transport der Wnt Faktoren an die Plasma-Membran notwendig (47, 48). Aktiv Wnt Signal-emittierende Zellen benötigen zur Liganden-Ausschüttung zudem die O-Acetyltransferase Porcupine, die im endoplasmatischen Retikulum eine Lipid-Modifikation an die Wnt Liganden anbringt (49). Dieser Lipid Anteil kontaktiert den auf der Oberfläche der Wnt Signal-Empfängerzellen vorhandenen heterodimeren Frizzled/LRP Rezeptor (47, 48) und ist für dessen Aktivierung erforderlich (50). Weiterhin binden Agonisten des Wnt Signalwegs, die R-Spondine, an die Rezeptoren LGR4, LGR5, and LGR6, was zu einer Amplifikation der Signalwegs-Aktivität führt (51). Wie dieses Zusammenspiel zwischen Wnt Liganden und R-Spondinen genau funktioniert, ergab sich erst mit der Identifizierung der E3 Ubiquitin-Ligasen RNF43/ZNFR3 als Ko-Rezeptoren für R-Spondine (52, 53). RNF43/ZNFR3 werden selbst durch den Wnt Signalweg transkriptionell aktiviert und sind Teil einer negativen Rückkopplungsschleife, die das Niveau des Frizzled-

LRP5/6 Komplexes an der Empfängerzell-Oberfläche und damit deren Sensitivität für Wnt Liganden senkt. Bindet jedoch ein R-Spondin an den LGR4/5/6-RNF43/ZNFR3 Komplex, führt dies zu dessen Endozytose, worauf der Wnt-Rezeptor Frizzled-LRP5/6 stabilisiert und die Signal-Empfängerzelle wesentlich sensitiver auf Wnt Liganden reagieren kann (53). Nach diesen Liganden-Rezeptor-Interaktionen wird der Wnt Signalweg in der Empfängerzelle nun stark aktiviert. Er wird auch als Wnt/ β -Catenin Signalweg bezeichnet, da der Transkriptions-Kofaktor β -Catenin das Wnt Signal aus dem Zytoplasma in den Zellkern überträgt (**Abbildung 1**). In unstimulierten Zellen wird der nicht an der Cadherin-vermittelten Zell-Zell Adhäsion beteiligte freie Pool des zytoplasmatischen β -Catenins von den Proteinen Axin und Adenomatous Polyposis Coli (APC) gebunden, durch die Glykogen-Synthase Kinase 3 (GSK3) und die Casein-Kinase 1 (CK1) phosphoryliert und somit für die Ubiquitinierung durch die E3-Ligase β TrCP lizenziert (54, 55). Durch diesen „Destruktions-Komplex“ wird sichergestellt, dass β -Catenin kontinuierlich über den Ubiquitin-Proteasom Weg degradiert wird, solange sich der Wnt Signalweg in seiner inaktiven Form befindet. Docken nun jedoch Wnt Liganden an den Frizzled-LRP5/6 Rezeptor-Komplex an, wird der zytoplasmatische Teil von LRP6 durch GSK3 und CK1 phosphoryliert, was wiederum zur Bindung von Axin an LRP6 führt (**Abbildung 1**). Bei dem darauffolgenden Prozess der „Signalosom“-Bildung ist zudem das Protein Dishevelled (Dsh) involviert und bindet an die zytoplasmatische Domäne von Frizzled (55).

Der Destruktions-Komplex wird im Zuge der Signalosom-Bildung aufgelöst und das β -Catenin in der Folge stabilisiert und aktiviert. β -Catenin transloziert nun in den Zellkern, wo es mit den Transkriptionsfaktoren TCF (TCF7L2 im Intestinum) und LEF assoziiert. In Abwesenheit von β -Catenin bewirken die TCF/LEF Faktoren eine Genrepression an vielen Gen Kontrollregionen (Promotoren), da Sie an Groucho/TLE Proteine gebunden sind (56). Im Zellkern akkumuliertes β -Catenin verdrängt jedoch Groucho/TLE von seiner Bindung an TCF/LEF, bindet selbst direkt an LEF, und führt somit ein Umschalten (engl.: switch) des TCF/LEF Komplexes hin zu einem transkriptionellen Aktivator herbei (57). Während sowohl die TCF und LEF Faktoren, sowie ein großer Anteil der Wnt-aktivierten Gene eine Gewebespezifität aufweisen, findet man als einheitliches Muster eine direkt durch Wnt-Aktivität induzierte Expression von Signalwegs-Komponenten sowie eine negative Feedback-Regulation, z.B. über das direkte Wnt Zielgen *AXIN2* (58).



2.4.2 Wnt Signaltransduktion in adulten intestinalen Stammzellen und KRK Stammzellen

Im intestinalen Epithelgewebe ist der für die Übersetzung der Liganden-vermittelten Wnt-Aktivierung in eine Wnt Zielgen-Induktion verantwortliche β-Catenin/TCF7L2 Komplex essentiell für die Aufrechterhaltung von dem sich an der Kryptbase befindlichen adulten Stammzell-Reservoir(59). Die Aktivierung des Wnt Signalwegs findet am stärksten in diesem Krypt-Kompartiment statt, welches Zellen mit nukleärer β-Catenin Lokalisation aufweist (60). Die Wnt Signalweg-Aktivität schwächt sich in einem Gradienten in Richtung der luminalen Seite der vertikalen Kryptachse ab (60). Verantwortlich für diesen Aktivitäts-Gradienten ist die hohe Abundanz der nur sehr lokal aktiven Wnt-Liganden an der Oberfläche von Zellen an der Kryptbase und deren sukzessiver Verdünnung mit jeder weiteren Zellteilung bzw. longitudinaler Zellwanderung in Richtung Darmlumen (61). Eine konstitutive Zell-intrinsische Aktivierung des Wnt

Signalwegs im Zuge der KRK-Initiation ist essentiell für die Aufrechterhaltung eines sogenannten „Krypt Vorläufer-Zell Phänotyps“, welcher sich durch eine ausbleibende Differenzierung und fortlaufende Proliferation des transformierten Gewebes auszeichnet (62). Wie man heute weiß, kann die aberrante Aktivierung des Wnt Signalweges im kolorektalen Karzinom durch unterschiedliche genetische Veränderungen hervorgerufen werden. Die bereits erwähnten Mutationen im *APC* Gen betreffen hierbei den größten Anteil der KRKs (~66.5%), während Mutationen in dem β -Catenin kodierenden Gen *CTNNB1* (5.7%) und *AXIN2* (5%) einen geringeren Prozentsatz der Fälle betreffen (63). Sie treten vorwiegend in chromosomal stabilen und MSI-negativen Tumoren der molekularen Subtypen CMS1 und CMS4 auf und führen zu einer intrinsischen Aktivierung des Wnt Signalwegs, bei dem eine konstitutive Aktivität unabhängig von äußeren Signalen (Wnt Ligand-Rezeptor-Interaktion) vorliegt (**Abbildung 1**). Dahingegen betreffen Mutationen in den E3 Ligase-codierenden Genen *RNF43* und *ZNRF3*, welche insgesamt bei 6 % bzw. 7 % der kolorektalen Tumor nachzuweisen sind, hauptsächlich die von MSI betroffenen Fälle des molekularen Subtyps CMS1 (63). In diesen Fällen kommt es zu einer Stabilisierung der Frizzled/LRP Rezeptor-Komplexe an der Zelloberfläche aufgrund ausbleibender Degradation durch den Ubiquitin-Proteasom Signalweg und damit zu einer gesteigerten Sensitivität aber auch Abhängigkeit der Tumorzellen gegenüber externen Wnt-aktivierenden Signalen. Aus diesem Grund spricht man hier von einer extrinsischen Aktivierung des Wnt Signalwegs. Interessanterweise stimulieren die Rezeptor-vermittelte, extrinsische und *APC* Mutations-getriebene intrinsische Aktivierung des Wnt-Signalwegs teilweise unterschiedliche Genexpressions-Programme und begünstigen das Auftreten von bestimmten molekularen Subtypen des KRK(64). Eine Stratifizierung von KRK Patienten nach extrinsischer und intrinsischer Wnt Signalwegs Aktivierung könnte zukünftig auch eine wichtige Rolle in der personalisierten therapeutischen Behandlung spielen. So sind Tumore mit bestimmten *APC*-Mutationen durch eine Inhibition mit sogenannten Tankyrase-Inhibitoren angreifbar, wodurch es zu einer Stabilisierung von AXIN1/2 und damit zu einer teilweise Reaktivierung des β -Catenin Destruktionskomplexes kommt (65). Für die Behandlung von KRK Patienten, deren Tumore Mutationen in *RNF43/ZNRF3* und daher eine abnormale extrinsische Wnt-Aktivierung aufweisen, haben sich Inhibitoren gegen die Wnt-spezifischen O-Acetyltransferase Porcupine (PORCN) als vielversprechend erwiesen. Ohne die durch PORCN vermittelte Acetylierung von Wnt-Faktoren wird die Wnt-Sekretion von Emitter-Zellen unterbunden. Durch diese therapeutische Strategie konnte das Wachstum von Wnt Liganden-abhängigen kolorektalen Karzinomen bereits in mehreren präklinischen Modellen inhibiert werden (66, 67). Neben den molekularen Kern-Komponenten des Wnt Signalwegs selbst stellen auch dessen stromabwärts gelegene Effektoren vielbeachtete und attraktive Ziele für eine therapeutische Intervention dar, und einige dieser Effektor-Signalwegskomponenten wurden in eigenen Arbeiten identifiziert und näher untersucht (siehe Kapitel4.4).

2.5 Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms

Zwar kann bei einem Auftreten von Fernmetastasen des KRK in sehr kleiner Anzahl und Größe deren Resektion parallel zu der des Primärtumors die Überlebenszeit von Patienten verlängern, der chirurgische Eingriff ist jedoch im Regelfall nicht ausreichend für eine Heilung der Erkrankung. Eine Chemotherapie

wird normalerweise im Anschluss an die Operation durchgeführt (Adjuvante Chemotherapie), kann jedoch bei dem Vorhandensein zu großer und zu zahlreicher Metastasen bereits vor der Operation appliziert werden (Neoadjuvante Chemotherapie). Die Therapie kann sowohl systemisch erfolgen, also oral oder intravenös verabreicht werden, so dass alle Bereiche des Körpers betroffen sind, oder alternativ in die Arterie gegeben werden, welche den von Krebs befallenen Teil des Körpers direkt erreicht(11). Letzteres soll vor allem die unerwünschten Nebenwirkungen einer meist sehr belastenden Therapie verringern. Ein Beispiel ist die Leberarterien Infusion, welche bei einer Ausbreitung von Darmkrebszellen in die Leber eingesetzt wird. Weiterhin werden die chemotherapeutischen Substanzen in Zyklen verabreicht gefolgt von einer Ruheperiode, um dem Patienten/der Patientin eine Erholung von den Auswirkungen der Therapie zu ermöglichen. Die Behandlungsdauer schwankt zwischen 3 und 6 Monaten und ist neben anderen Faktoren abhängig von der jeweilig empfohlenen Therapie, des generellen Zustands der zu behandelnden Person und der Schwere der auftretenden Nebenwirkungen(68).

2.5.1 Zytostatische Chemotherapeutika in der KRK Therapie

Anwendung als zytostatische Therapeutika beim kolorektalen Karzinom finden, meist in Kombination angewendet, die folgenden Medikamente:

- **5'-Fluoruracil (5-FU):** gehört zu der Gruppe der Zytostatika und hemmt die Thymidylat-Synthetase. Zudem kann es direkt in die RNA eingebaut werden. Insgesamt hemmt es sowohl die DNA- als auch die RNA Biosynthese, wodurch bei schnell proliferierenden Tumorzellen die Zellteilung zum Erliegen kommt und der Zelltod ausgelöst wird(69).
- **Folinsäure (Leucovorin, Oncofolic):** sie kann, in niedriger Dosierung eingesetzt, die Wirksamkeit des Zytostatikums 5'-Fluoruracil verstärken, indem sie dessen Metabolismus beeinflusst(70).
- **Oxaliplatin (Eloxantin):** ist der dritte Platinkomplex, der nach Cisplatin und Carboplatin in der Tumorthherapie eingesetzt wird. Wie auch die anderen Platinverbindungen reagiert Oxaliplatin bzw. dessen Stoffwechselprodukte mit DNA-Einzelsträngen und bildet dort Quervernetzungen, sogenannte DNA-Platin-Intrastrang-Addukte, aus. Im Gegensatz zu Cisplatin, welches ein eher kleines Molekül ist, ist Oxaliplatin ein sogenanntes „DACH“-Platin und besitzt einen großen, sperrigen DiAminoCycloHexan (DACH) Träger (Carrier)-Liganden. Damit hemmt es die DNA-Synthese noch effektiver als Cisplatin (71).
- **Irinotecan:** wird im Körper hauptsächlich von Leberzellen, aber auch in geringerem Maße in intestinalen Epithelzellen, durch das Enzym Carboxylesterase zu dem aktiven Stoffwechselprodukt SN-38 metabolisiert. Dieses wirkt als Hemmer der Topoisomerase-I und löst dadurch irreversible DNA-Strangbrüche aus. Die schädigende Wirkung ist damit größtenteils auf die S-Phase (DNA Synthese-Phase) des Zellzyklus beschränkt, und trifft damit teilungsaktive Tumorzellen(72).

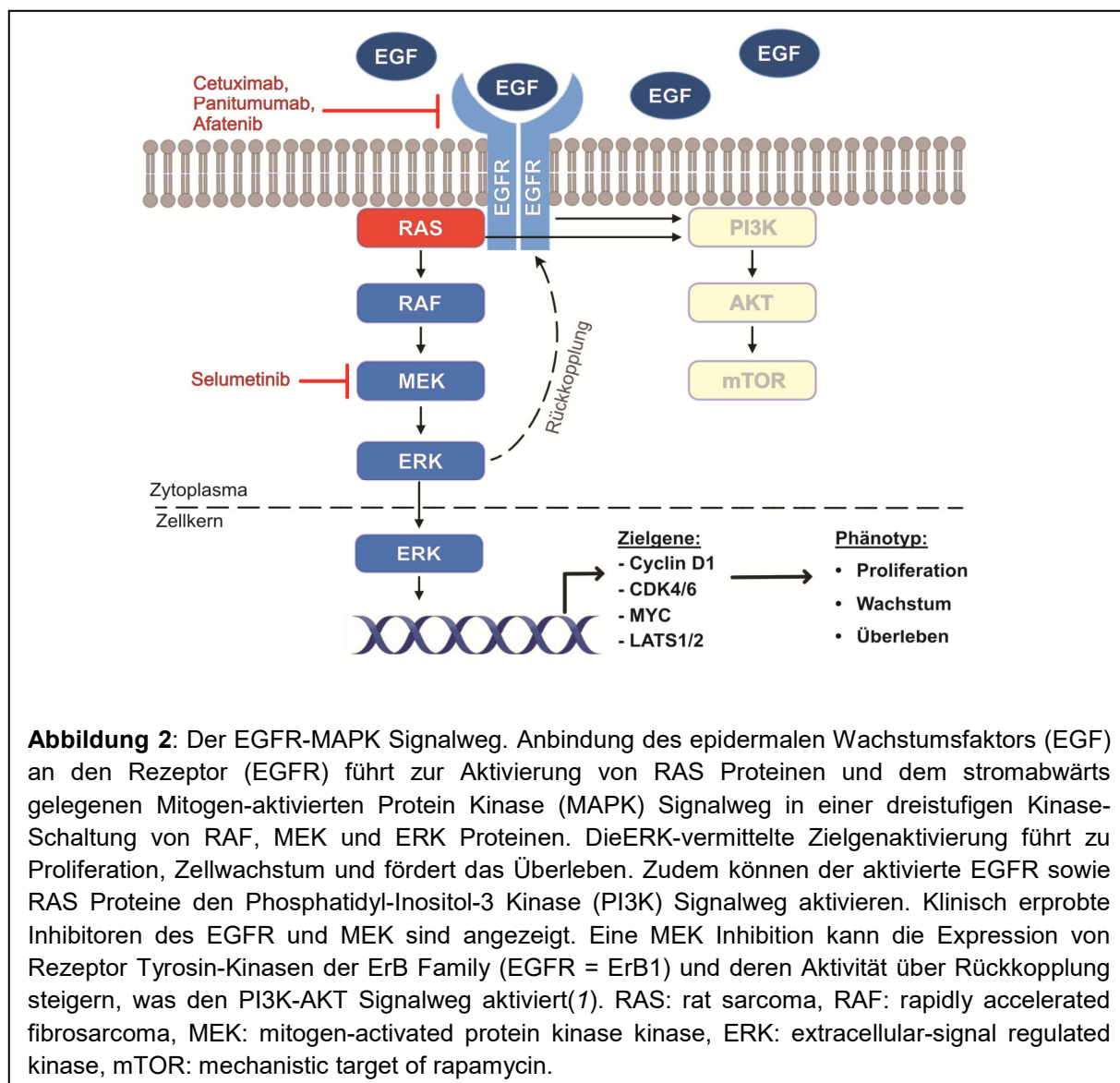
Häufig in der Erstlinien-Therapie eingesetzte Kombinationen aus diesen zytostatischen Wirkstoffen sind FOLFIRI (5-Fluoruracil, Folinsäure, und Irinotecan), sowie FOLFOX (5-Fluoruracil, Folinsäure, Oxaliplatin).

2.5.2 Zielgerichtete Inhibition des EGFR-MAPK Signalweges

Im Falle einer nicht beeinträchtigten Funktionalität des EGFR/MEK/ERK Signalwegs in den KRK Zellen, beispielsweise durch aktivierende Mutationen in den Proto-Onkogenen *KRAS*, *NRAS*, oder *BRAF*, liefert die adjuvante Behandlung mit dem EGFR-spezifischen, human-murin chimären IgG1 monoklonalen Antikörper Cetuximab (Cmab)(Erbix, Merck KGaA, Darmstadt) eine weitere vielversprechende Option (73) (**Abbildung 2**). Der EGFR ist eine membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinase und aktiviert mehrere intrazelluläre Signalwege, wie z.B. MAPK, PI3K/AKT, und JAK/STAT3, welche die Proliferation von Zellen antreiben (74). Kontra-Indikation für die Gabe von Cetuximab, welche in der Regel als adjuvante Behandlung zu FOLFIRI oder FOLFOX vorgenommen wird, sind bereits vorliegende Mutationen in den *RAS*, *BRAF* und *PIK3CA* Genen, da diese zu einer permanenten Aktivierung des MAPK Signalwegs unabhängig von der EGF Liganden-vermittelten EGFR Stimulierung führen (23, 75). Für metastasierte Tumore mit Wildtyp-Allelen für diese Faktoren konnte eine Verbesserung des allgemeinen Überlebens und des Progressions-freien Überlebens von KRK Patienten durch adjuvante Behandlung mit Cetuximab festgestellt werden (76-78). Ein ähnlicher Wirkmechanismus liegt dem ersten voll humanisierten anti-EGFR Antikörper Panitumumab zugrunde, und ein positives Nutzen-Risiko Profil sowie eine Verlängerung der Überlebenszeit konnte bei einer adjuvanten Behandlung von KRK-Patienten ohne diagnostizierbare *KRAS*-Mutation festgestellt werden (79).

Trotz dem prinzipiell erfolgreichen Einsatz EGFR-gerichteter Therapie in der Behandlung von Darmkrebs hat der Einsatz dieser monoklonalen Antikörper mehrere Einschränkungen. Neben der erwähnten Ineffizienz bei vorliegenden Mutationen in der RAS Onkogen Familie ist lediglich bei einer Fraktion von RAS wild-typ Tumoren ein substantieller therapeutischer Nutzen zu beobachten(77, 80, 81).Im Falle von *RAS*Gen-mutierten Tumoren haben sich Inhibitoren gerichtet gegen dessen stromabwärts des EGFR agierenden Effektor MEK (z.B. durch Selumetinib oder Trametinib) in Kombination mit dem pan-HER(EGFR = HER1/ErbB-1) Inhibitor Afatinib als erfolgversprechend erwiesen, und dieser Therapieansatz wird in mehreren klinischen Studien evaluiert (82, 83) (**Abbildung 2**).

Durch bispezifische Antikörper (bAb) gerichtet sowohl gegen den EGFR als auch gegen den Krebsstammzellmarker LGR5 konnte bei der zielgerichteten Therapie gegen EGFR Signaltransduktion im KRK nun ein Durchbruch erzielt werden: Der bAb MCLA-158 bindet selektiv an LGR5-hochoxprimierende KRK Stammzellen und induziert nach Anbindung an den EGFR dessen Internalisierung und schließlich dessen Degradation (84). Eine gute und im Vergleich zum Normalgewebe sehr spezifische und selektive Wirksamkeit konnte in der Tat sogar bei *RAS* mutierten Tumoren des KRK und anderen Tumorarten festgestellt werden, und eine klinische Evaluation in verschiedenen Populationen von Patienten mit soliden Tumoren wurde bereits auf den Weg gebracht (84).



2.5.3 Therapeutische Beeinflussung der KRK Angiogenese

Angiogenese bezeichnet den Prozess der Gefäßneubildung, und dieser unterliegt bei Tumorgewebe keinem regulatorischen Gleichgewicht. Durch eine fortwährende Proliferation und dem damit verbundenen steigenden Energie- und Sauerstoffbedarf wird das Tumorgewebe zunehmend hypoxisch (Sauerstoff-arm) und schüttet den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) aus. Dieser bindet an die zugehörigen Rezeptoren (VEGFRs) auf der Oberfläche von benachbarten Endothelzellen, was eine direkte Stimulierung der Gefäßneubildung und Wanderung der Endothelzellen herbeiführt (85). Der monoklonale Antikörper Bevacizumab bindet an VEGF-A, unterbindet dessen Anbindung an VEGFRs, und verhindert somit die Neoangiogenese im Tumorgewebe(86). Bevacizumab ist für die Erst- und Zweitlinien Therapie des KKRK zugelassen, und eine Verbesserung des Patienten-Überlebens sowie des Progressions-freien Überlebens konnte in mehreren klinischen Studien festgestellt werden (87). Einer Vergleichsstudie (FIRE-3) betrachtete den Therapieerfolg von FOLFIRI kombiniert mit entweder Cetuximab oder, alternativ, Bevacizumab in der Erstlinien-Therapie des KRAS-wildtyp KKRKs(77). Dabei erreichte die adjuvante

Behandlung mit Cetuximab nach der radiologischen Begutachtung von Computertomographie-Daten ein deutlich besseres Ergebnis im Hinblick auf eine frühe Tumor-Schrumpfung und Wirtiefe im Tumorgewebe, was mit einem generell längerem Überleben der FOLFIRI/Cetuximab behandelten Patientinnen und Patienten im Vergleich zur FOLFIRI/Bevacizumab-behandelten Studiengruppe verbunden war(77).

3 Zielsetzungen der Arbeit

Die Identität und die molekularen Eigenschaften von Kolonstammzellen und der sich daraus ableitenden Tumorstammzellen des kolorektalen Karzinoms liefern wichtige Anhaltspunkte für das Verständnis von Krankheits-spezifisch deregulierten Signaltransduktions-Prozessen und Veränderungen des Zellphänotyps. Eine Aufklärung dieser Aspekte und deren Untersuchung auf personalisierter Ebene sind von entscheidender Bedeutung für den klinischen Fortschritt im Bereich der regenerativen Medizin und der Patienten-spezifischen Behandlung von Krebs-bedingten Erkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit sollte Folgendes untersucht werden:

- (1) Die Identität und Eigenschaften von humanen adulten Kolonstammzellen im Hinblick auf deren Biomarker-Ausstattung, der Multipotenz, und Ähnlichkeit bzw. Unterschiede zu entarteten Tumor-Stammzellen des KRK.
- (2) Patienten-spezifische Charakterisierung und Einsatz von Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms. Darüberhinaus die Etablierung einer genetisch charakterisierten Biobank von primären Tumorzellen in Form von „Organoiden“ zu präklinischen Forschungs-Zwecken.
- (3) Aufklärung von Wnt- und c-MYC Effektor-Signalwegen und deren Bedeutung für die Progression des KRK und der Interaktion von Krebszellen mit der benachbarten Mikroumgebung.
- (4) Analyse der genetischen Veränderungen von kolorektalen Karzinomzellen während der Erstlinien Kombinations-Chemotherapie in Verbindung mit dem Auftreten von Behandlungstoleranz. Anhand der Ergebnisse sollten neue alternative Zweit-Linien Therapieansätze zur Wiederherstellung der Chemosensitivität erprobt werden.

Um diese herausfordernden Ziele zu erreichen, wurde ein neuartiges präklinisches Kulturmodell für primäre, vom Patienten abgeleitete Kolon- und KRK Zellen etabliert und vielfältig eingesetzt. Dieses (Tumor) Organoid Modell wurde dabei für personalisierte genetische Charakterisierungen, Chemotherapie-bedingte Krankheitsevolutions-Modellierung *ex vivo*, sowie für die CRISPR/Cas9 (Genschere) – vermittelte Genomeditierung zur Untersuchung des Einflusses von spontan auftretenden Mutationen in KRK Schlüsselgenen, wie z.B. *APC* und *KRAS* eingesetzt. Zudem wurden neuartige „Omics“ Methoden, darunter RNA, Exom-, sowie Genpanel-Sequenzierungen der nächsten Generation und auch quantitativ massenspektrometrische Proteom-Analysen mit klassischen Methoden der experimentellen Molekularbiologie kombiniert, um sowohl genetisch globale als auch molekular spezifische Fragestellungen zu beantworten. Eine Auswertung von KRK Kohorten-Datensätzen, entweder öffentlich verfügbar oder in eigener Arbeit generiert, brachte zudem Ergebnisse hervor, die die biologische und klinische Relevanz der experimentellen Ergebnisse aufzeigte.

4 Zusammenfassung und Diskussion themenbezogener eigener Arbeiten

4.1 Aufreinigung und molekulare Charakterisierung von adulten humanen Kolonstammzellen

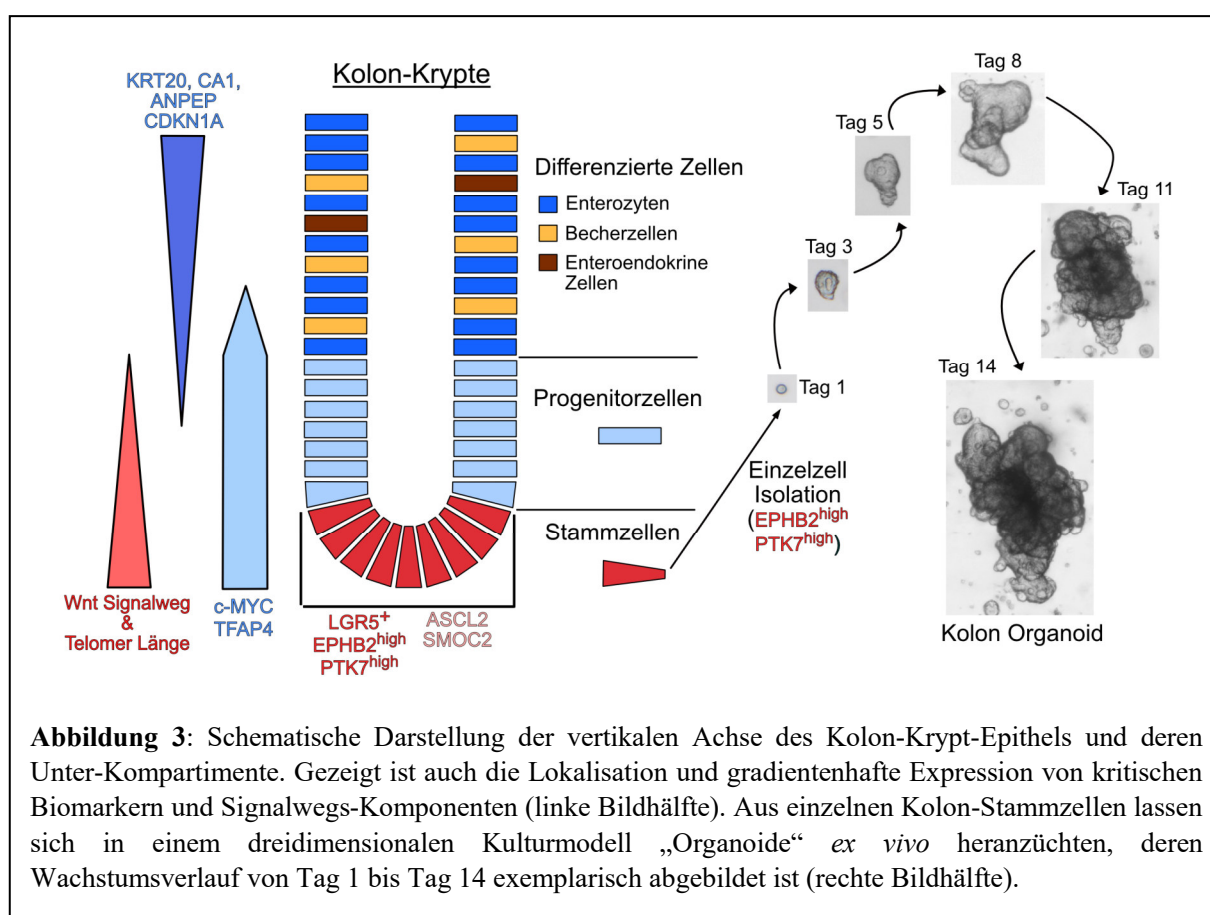
Jung P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H. Gallardo M.M., Blasco, M.A., Sancho, E., Clevers, H., Batlle, E. et al. (2011) "Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells", *Nature Medicine* 17,1225-1227.

Jung P., Sommer C., Barriga F., Buczacki, S.J., Hernando J., Sevillano M., Duran-Frigola M., Aloy P., Selbach M., Winton D.J., Batlle E. (2015) "Isolation of human colon stem cells using surface expression of Protein Tyrosine Kinase Receptor 7 (PTK7)", *Stem Cell Reports*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.003>.

Suárez, A., Barriga, F.M., **Jung P.**, Iglesias, M., Céspedes M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz P., Clevers, H., Sancho, E., Manges, R., Batlle, E (2011). "The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse", *Cell Stem Cell* 8, 5, 511-524.

Während man bereits sehr früh erkannte, dass epitheliale Krypten sowohl des Dünndarms als auch des Kolon ein adultes Stammzell-Kompartiment aufweisen (88, 89), konnte für lange Zeit aufgrund des Fehlens von eindeutigen molekularen Markern keine exakte Identifizierung und Charakterisierung dieser Zellpopulation vorgenommen werden. Anhand der sogenannten „Markierungs-Zurückhaltung“ (engl.: label-retaining) postulierte Chris Potten in den siebziger Jahren das „+4 Stammzell Modell“, wonach intestinale Stammzellen des Dünndarms die Krypt-Position +4 oberhalb von differenzierten Paneth-Zellen einnehmen (90). Der eindeutige Beweis für das Stammzell-Potential dieser Zellen, welcher das Aufzeigen der zellulären Nachkommenschaft und damit der Multipotenz von +4 Zellen ist, blieb jedoch aus. Eine konkurrierende Hypothese zur wahren Stammzellidentität wurde nach der Identifizierung von kleinen sich teilenden, stiftförmigen Zellen an der Kryptbase (engl.: crypt base columnar cells, CBCCs), die im Dünndarmepithel mit den deutlich größeren Panethzellen vermischt auftreten, aufgestellt (91): aus diesen CBCCs sollten danach sowohl die Panethzellen hervorgehen und an der Kryptbase verbleiben, sowie auch die anderen differenzierten Zelltypen, welche einer Krypt-aufwärts gerichteten Wanderung unterliegen. Aber auch hier blieb zunächst der funktionelle Beweis aus. Dies änderte sich schließlich mit der Identifizierung von bestimmten Zielgenen des Wnt-Signalweges (siehe unten), deren Expression entweder ausschließlich auf die Population der CBCCs beschränkt ist oder das relativ höchste Expressionsniveau in diesen Zellen aufweist (92). Der erste dieser zunächst im Mausmodell charakterisierten Stammzellmarker war das *Lgr5/Gpr49* Gen, welches für einen G Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptor kodiert und bis heute als „der“ echte Marker von multipotenten intestinalen Stammzellen angesehen wird (33). Aufgrund des Fehlens von LGR5 Antikörpern mit ausreichender Spezifität und Affinität wurde jedoch eine Aufreinigung und genetische sowie funktionelle Charakterisierung von humanen intestinalen Stammzellen mit diesem Biomarker bis heute nicht erreicht. In eigenen Arbeiten konnte diese wichtige Hürde durch die Anwendung von Biomarkern, deren Expression zwar nicht ausschließlich auf die Kryptbase des humanen

Dickdarms beschränkt, jedoch dort am höchsten ausgeprägt ist, überwunden werden. Zunächst gelang durch spezifische Antikörper gerichtet gegen den Zelloberflächenmarker EPHB2(34, 35) und später dann noch effizienter durch Antikörper gerichtet gegen die Protein Tyrosine Kinase PTK7 (36) die Durchflusszytometrie-gestützte Anreicherung einer stark *LGR5*-positiven Zell-Subpopulation (siehe auch **Abbildung 3**) aus humanen Kolonkrypten. Diese besaß die typischen molekularen Eigenschaften, welche bereits zuvor durch genetische Verfahren unterstützt in dem Modellorganismus Maus enthüllt und schließlich auch in eigener Arbeit am Mausmodell bestätigt werden konnten (33, 35). Weiterhin konnte dabei gezeigt werden, dass die DNA von epithelialen Stammzellen des humanen Dickdarms die vergleichsweise längsten Telomer-Strukturen in den Dickdarm-Krypten aufweisen, was wahrscheinlich zu der erhöhten genetischen Stabilität und dem lebenslangen Erneuerungspotential dieser Zellpopulation beiträgt (34) (siehe **Abbildung 3**).



Zudem konnte in einer späteren eigenen Arbeit enthüllt werden, dass die *LGR5*/*EPHB2*-positiven humanen Kolonepithel-Stammzellen eine erhöhte Affinität für das extrazelluläre Matrixprotein Laminin aufweisen, was zumindest teilweise einer erhöhten Abundanz von Laminin-affinen Zuckerstrukturen (O-Glykosylierung) auf der Oberfläche dieser Zellen geschuldet ist (93). Inwieweit diese Eigenschaft der verstärkten Zell-Matrix Interaktion zu der statischen, verankerten Position von Kolon-Stammzellen an der Kryptbase beiträgt, muss jedoch in weiteren Studien erörtert werden.

Hingegen fanden sich in der Kolonepithel-Zellpopulation mit mittlerer und geringerer *EPHB2*/*PTK7* Abundanz eine erhöhte Expression von bekannten Proliferationsmarkern dieses Kompartiments, wie z.B.

c-MYC, *TFAP4*, *AURKA*, *AURKB* und *MKI67*(34, 36-39). Die EPHB2 bzw. PTK7-negativen Subpopulationen zeigten hingegen genetische Eigenschaften von verschiedenen reifen bzw. terminal differenzierten Zelltypen des Darmgewebes, zu denen unter anderem die Enterozyten, Becherzellen, und enteroendokrine Zellen gehören(40), und wiesen eine stark vermehrte Expression der typischen Differenzierungs-Marker *KRT20*, *ANPEP*, *CA1*, *MUC2*, *TFF3*, und *CHGA* auf (34, 36). Während diese wichtigen Erkenntnisse über die adulten humanen Kolonstammzellen zunächst von rein diskriptiver Natur waren, konnte der funktionelle Beweis für deren Stammzellartigkeit über ein neuartiges *ex vivo* Kulturmodell erbracht werden, welches im Folgenden eingehender erläutert wird.

4.1.1 Adulte humane Kolonstammzellen bilden Kolon-„Organoide“ in der Petrischale

Mit fortschreitendem Verständnis der Homöostase des intestinalen Gewebes und der molekularen Eigenschaften der Stammzell-Nische an der Basis von Krypten gelang zunächst einem Forscherteam des Hans Clevers Labors in Utrecht die drei-dimensionale Kultivierung von aus dem Mäuse Dünndarm abgeleiteten intestinalen Stammzellen, welche *ex vivo* in selbst-organisierende organotypische Strukturen auswuchsen (94). Den so gebildeten Zellstrukturen ließ man die einprägende Bezeichnung „Organoide“ zukommen. Durch eine Anpassung und Erweiterung der Kulturbedingungen und der im Kulturmedium eingesetzten Signalwegs-Modulatoren gelang schließlich kurz darauf in eigener Arbeit die Kultivierung von humanen Kolon-Organoiden ausgehend von aufgereinigten einzelnen Kolonstammzellen und eine funktionelle Charakterisierung dieser außergewöhnlichen Zellpopulation (34) (**Abbildung 3**). Zur Durchflusszytometrie-gestützten Isolation der multipotenten adulten Stammzellen, ausgehend von kurz zuvor von menschlichem Gewebe gewonnener Dickdarm-Mukosa, diente zuallererst der Oberflächenmarker EPHB2 und ein zu diesem Zeitpunkt von Genentech (CA, USA) kollaborativ zur Verfügung gestellter Antikörper gerichtet gegen eben dieses Membranprotein. Ähnlich wie bereits zuvor für Maus Dünndarm Organoide gezeigt (94), wurden verschiedene Faktoren, darunter der R-Spondin Rezeptor LGR5, der BMP-Inhibitor SMOC2, der Transkriptionsfaktor ASCL2 sowie die katalytische Untereinheit der Telomerase reverse Transkriptase (TERT), als stark angereichert in den undifferenziert wachsenden humanen Kolon-Organoiden identifiziert (34).

Wichtig ist hierbei festzustellen, dass humane Kolon-Organoiden, anders als Maus Dünndarm Organoide, aufgrund des Fehlens von Wachstumsfaktor-produzierenden Panethzellen (95) nur unter der Zuhilfenahme von Wnt Signalwegs-aktivierenden Liganden (Wnt3a und R-Spondin) als homogen undifferenzierte Organoid-Population langfristig in Kultur gehalten werden können. Durch die spontane Wegnahme eben dieser Faktoren, beziehungsweise durch die Applikation von speziellem Differenzierungs-Kulturmedium, gelang es jedoch den multipotenten Charakter der isolierten Kolon-Stammzellen nachzuweisen, also deren Fähigkeit in die drei wichtigsten spezialisierten Zelltypen des reifen Kolonepithels spontan zu differenzieren(34). Die Identität dieser Zelltypen *ex vivo* wurde dabei durch molekulare Charakterisierung, Marker-spezifische Immunfärbungen, sowie über zellmorphologische Charakterisierung unter Anwendung

der Elektronenmikroskopie festgestellt. Diese Art der Multi-Liniendifferenzierung gelang ebenfalls innerhalb einzelner, aus wiederum einzelnen Zellen hervorgegangenen Organoiden in zweiter *ex vivo* Generation, womit der multipotente und damit funktionelle Stammzellcharakter der über den Biomarker EPHB2 isolierten humanen Kolonstammzellen zweifelsfrei nachgewiesen war(34).

Um schließlich eine noch effizientere Anreicherung von humanen Kolonstammzellen ausgehend von Patienten-abgeleiteten Organoiden und direkt aus Frischgewebe zu ermöglichen, wurde in Kollaboration mit der Abteilung von Prof. Dr. Matthias Selbach (Max-Delbrück Institut, Berlin) eine quantitative massenspektrometrische Bestimmung von Zelloberflächen-Proteinen an Stammzell-artigen und differenzierten humanen Organoidkulturen durchgeführt: Hierbei wurde das Transmembranprotein PTK7 identifiziert, welches vermehrt auf der Oberfläche von proliferierenden und auch ruhenden („label-retaining“) humanen Kolonstammzellen vorliegt(36). Des Weiteren konnte die Erfahrung und das Wissen zu dieser damals noch sehr jungen Technologie des Organoid-Modells kollaborativ eingesetzt werden, und ermöglichte Studien zur Wirkung von Vitamin D auf die Homöostase von kolorektalen Stamm- und Tumorzellen, sowie zum Einfluss der sezernierten Wachstumsfaktoren IGF-I und IGFBP3 auf die Kolon-Stammzellfunktion im Kontext der diabetischen Enteropathie (96, 97). Eine langjährige und intensive Kollaboration mit dem Hospital Clínic in Barcelona führte zudem zum erfolgreichen Einsatz der Organoid-Technik in der Erforschung von entzündlichen Darmerkrankungen und deren molekularer Charakteristika (98, 99).

4.2 Intratumorale Hierarchie des kolorektalen Karzinoms und Krebs-Stammzellen

Suárez, A., Barriga, F.M., **Jung P.**, Iglesias, M., Céspedes M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz P., Clevers, H., Sancho, E., Manges, R., Batlle, E (2011). “The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse”, *Cell Stem Cell* 8, 5, 511-524.

Während das KKRK anfangs als homogene maligne Tumormasse betrachtet wurde, weiß man heute, dass diese Tumorart, ähnlich wie ihr gutartiges Ausgangsgewebe, eine heterogene Struktur und einen hierarchischen Aufbau aufweist. An der Spitze dieser Hierarchie stehen die sogenannten „Krebs-Stammzellen“ (im englischen „cancer stem cells“), welche ähnlich wie normale adulte Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und damit auch der Tumor-Neubildung besitzen(100). Typischerweise besitzen die aus Krebs-Stammzellen hervorgehenden kolorektalen Tumore eine vergleichbare Heterogenität wie die Ursprungstumore, aus denen sie anfangs isoliert wurden (35). Die Krebs-Stammzellen „betanken“ also den Tumor und bringen dabei differenziertere Tumorzelltypen hervor, welche meist den Großteil der Tumormasse ausmachen, jedoch kein oder kaum Potential zur Selbsterneuerung besitzen. Die beiden intestinalen Stammzellmarker LGR5 und EPHB2 zeichnen auch die zur Selbsterneuerung befähigte Krebs-Stammzell Population in Adenomen und Karzinomen des Dickdarms aus (35, 101-103). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass funktionelle Krebs-Stammzellen eine erhöhte Protein-Biosynthese Kapazität besitzen, und sie von dieser Eigenschaft stark abhängig sind um ihren undifferenzierten Charakter und ihr

Tumor-initiierendes Potential aufrecht zu erhalten (104). Zudem spielt die Tumor-Mikroumgebung, insbesondere die Krebs-assoziierten Fibroblasten, eine Schlüsselrolle in der extrinsischen Potenzierung der Krebsstammzell-Eigenschaften. In diesem Zusammenhang konnte man von den Fibroblasten-sezernierten Faktoren HGF (hepatocyte growth factor) und OPN (Osteopontin) zeigen, dass sie die Wnt-Signalwegs Aktivität und die Klonogenität von KRK maßgeblich fördern und eine Anreicherung von Krebsstammzellen unter dem Einfluss von chemotherapeutischem Stress begünstigen (105, 106). Da Krebs-Stammzellen des KRK nach neueren Erkenntnissen eine Schlüsselfunktion bei der Fern-Metastasierung einnehmen (101), und häufig mit Therapie-Resistenz in Verbindung gebracht werden (107), stehen sie im Fokus bei der Erforschung innovativer Therapieansätze zur Bekämpfung des KRK.

4.3 Tumor-Organoid als präklinisches, personalisiertes Modell des kolorektalen Karzinoms

Boos SL, Loevenich LP, Vosberg S, Engleitner T, Öllinger R, Kumbrink J, Rokavec M, Michl M, Greif PA, Jung A, Hermeking H, Neumann J, Kirchner T, Rad R, **Jung P** (2021). Disease modeling on tumor organoids implicates AURKA as a therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021 Oct 23:S2352-345X(21)00222-8. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.10.008. Epub ahead of print.

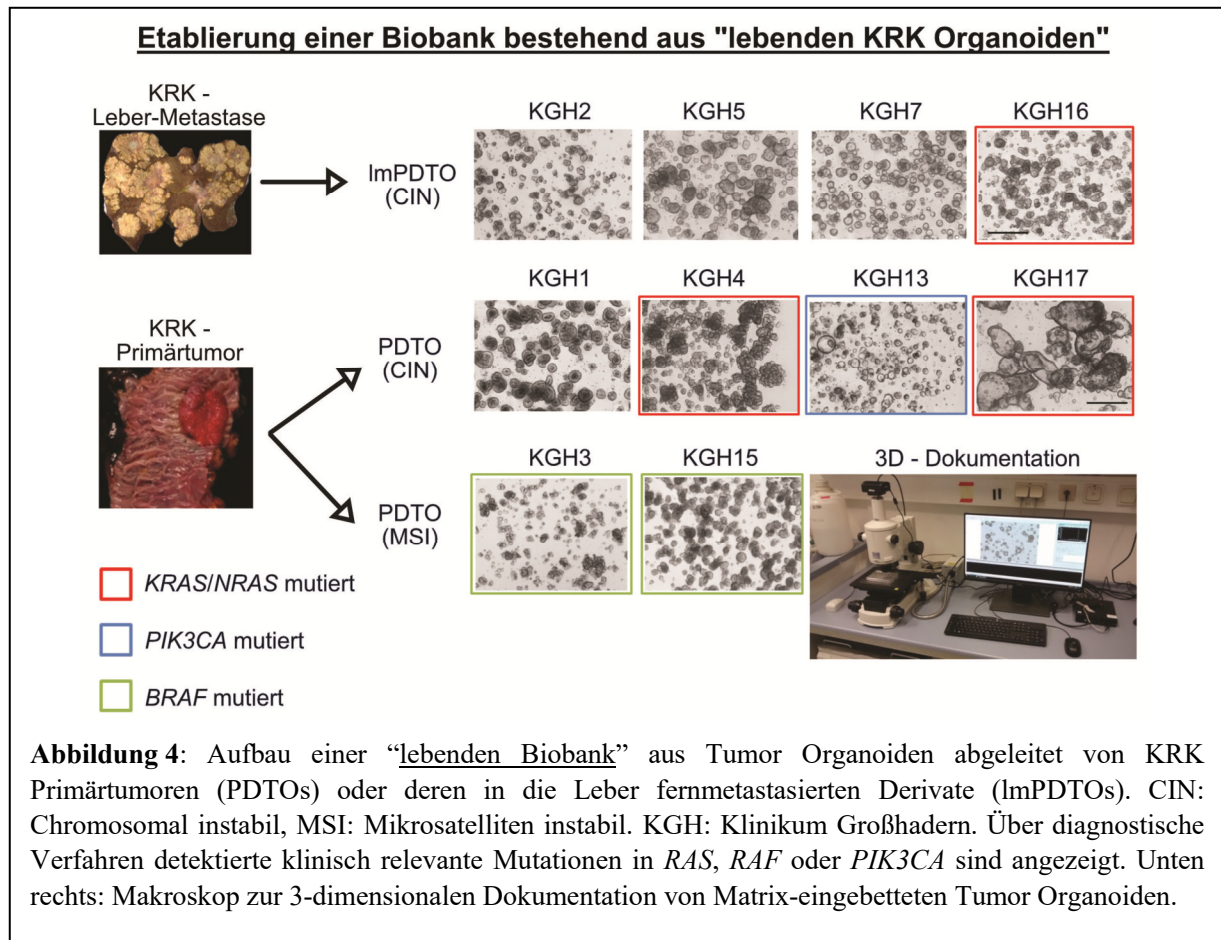
Dietinger V, García de Durango C, Wiechmann S, Boos S, Michl M., Neumann J, Hermeking H, Küster B, **Jung P** (2020). Wnt-driven LARGE2 mediates laminin-adhesive O-glycosylation in human colonic epithelial cells and colorectal cancer. *Cell Communication & Signaling*, Jun 25;18:102; doi: 10.1186/s12964-020-00561-6.

Fernández-Barral A, Costales-Carrera A, Buirra SP, **Jung P**, Ferrer-Mayorga G, Larriba MJ, Bustamante-Madrid P, Domínguez O, Real FX, Guerra-Pastrián L, Lafarga M, García-Olmo D, Cantero R, Del Peso L, Batlle E, Rojo F, Muñoz A, Barbáchano A (2020). Vitamin D differentially regulates colon stem cells in patient-derived normal and tumor organoids. *FEBS Journal*, Jan;287(1):53-72

Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V., Iglesias, M., Virtudes Céspedes, M., Sevillano, M., Nadal, C., **Jung, P.**, Zhang, XH, Rossell, D., Manges, R., Massague, J., Sancho, E., Batlle, E. (2012), "Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta transcriptional program in tumor-associated stromal cells for metastasis initiation", *Cancer Cell* 22, 571-584.

Klassische Zelllinien des kolorektalen Karzinoms und mit Primär-Tumorproben xeno-transplantierte Mäuse stellen weiterhin gebräuchliche Krebsmodelle dar. Die Adaption von Tumorzellen an das Wachstum in zweidimensionalen Kulturgefäßen ist jedoch extrem schwierig, und die sehr seltenen Subklone denen dieses gelingt sind nach vielen Passagen meist nicht mehr repräsentativ für die ursprüngliche Erkrankung. Zwar repräsentieren die in Mäuse überführten Primärtumore sehr viel besser die biologischen Charakteristika des KRK und können in vielen Fällen seriell transplantiert werden, was z.B. eine präklinische Testung von chemotherapeutischen Strategien prinzipiell ermöglicht. Diese Vorgehensweise ist jedoch extrem kostspielig sowie Zeit- und Ressourcen-aufwendig. Zudem sind die in der Maus Mikroumgebung auswachsenden Tumore in vielen Fällen einer Maus-spezifischen Progression bzw. Evolution ausgesetzt, so dass ein eindeutiger Vergleich mit der humanen Erkrankung oft nicht vorgenommen werden kann (108). Moderne dreidimensionale Kulturtechniken, bei denen die Gewebe- und Krebszellen in einer physiologischen extrazellulären Matrix eingebettet vorliegen, haben nun eine neue Generation von Modellen des gesunden Epithelgewebes und des Tumorepithelgewebes hervorgebracht. Zuerst gelang es im Jahr 2009, die aus dem Mäusedarm abgeleiteten intestinalen Stammzellen in

selbst-organisierende organotypische Strukturen auswachsen zu lassen, denen man die Bezeichnung „Organoide“ zukommen ließ(94). Schon bald darauf erfolgte durch eine Anpassung dieser bahnbrechenden Technologie in eigener Arbeit eine *ex vivo* Langzeit-Kultivierung von normalen humanen Kolonstammzellen sowie von KRK Stammzellen (engl: „colorectal cancer stem cells) in dreidimensionaler Form (34, 109). Diese Patienten-abgeleiteten Organoide und Tumor Organoide (PDOs und PDTOs), die aus LGR5/EPHB2-positiven Stammzellen des Darmepithels oder des Tumorepithels sehr effizient etabliert werden können, dienten schon bald dem Aufbau von sogenannten „lebenden Biobanken“, welche eine breite Spanne an genetischen Mutationen abbildeten und damit die genetische Diversität der Erkrankung KRK sehr gut widerspiegeln (110, 111). Am Institut für Pathologie der LMU München gelang in eigener Arbeit ebenfalls der Aufbau einer repräsentativen Biobank aus Patienten-abgeleiteten Organoiden und Tumor Organoiden, welche die klinisch wichtigen Subtypen im Hinblick auf Therapie-relevante Mutationen in den Genen *APC*, *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *SMAD2/3/4*, und *TP53* umfasste und in mehreren eigenen und kollaborativen Studien gewinnbringend eingesetzt wurden(37, 93, 112) (**Abbildung 4**). Organoide repräsentieren die Biologie und genetische Heterogenität des Ausgangstumors, und können mit Hilfe von modernen Sequenziermethoden dazu beitragen, die intratumorale genetische Diversität und klonale Hierarchie der individuellen Erkrankung aufzuschlüsseln (113). Auch bilden sie die für viele Behandlungsstrategien zu erwartende Chemosensitivität der eigentlichen Erkrankung zuverlässig ab(114, 115). Sie eignen sich zudem für die *ex vivo* Modellierung der Progression des humanen KRK im Hinblick auf die sequentielle Akquisition von onkogenen Mutationen (116, 117). Kürzlich konnte in eigener Arbeit die Krankheits-Modellierung an Tumor Organoiden auf den klinisch sehr wichtigen Aspekt der Chemoresistenz-Bildung während einer langzeitlichen Erstlinien-Kombinationstherapie erweitert, und auch der Einfluss des KRAS^{G12D} Onkoproteins in diesem Kontext untersucht werden (37). In Kollaboration unterstützte das in eigener Arbeit etablierte Organoidmodell weitere Studien, welche sich u.a. mit dem Einfluss von Vitamin D auf die Darmhomöostase und Entartung des Darmepithels beschäftigten (97), sowie mit den Eigenschaften von Darmepithelzellen und deren molekulare Veränderungen bei entzündlichen Erkrankungen (ulcerative Kolitis) (98). Des Weiteren gelang es anderen Forscherteams Ko-Kulturen von menschlichen Organoiden mit stromalen Zellen sowie Mikroben (Bakterien und Viren) anzulegen, wodurch nun weitere wichtige Aspekte der intestinalen Homöostase und deren Störung bei verschiedenen Erkrankungen in der Kulturschale studiert werden können (118, 119). Eine sehr große Rolle spielen auch die kürzlich etablierten Ko-Kultursysteme von KRK Tumor-Organoiden mit zellulären Komponenten des natürlichen humanen Immunsystems und mit sogenannten „chimären“ Antigenrezeptor-T (CAR-T) Zellen, womit nun modernste Immun-therapeutische Ansätze *ex vivo* erprobt und deren Wirk- sowie Resistenzmechanismen eingehend studiert werden können (120, 121). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass für die Erforschung der KRK-relevanten Signalwege und für die Aufklärung von Mechanismen der KRK Progression Tumor Organoide eine wertvolle neue Modell-Plattform darstellen und für die präklinische und translationale Forschung in Zukunft unverzichtbar sein werden.



4.4 Wnt Effektoren und deren Funktionalität und Relevanz im KRK

4.4.1 Wnt/c-MYC/TFAP4 Signaltransduktion in der Homöostase und Transformation des Darmepithels

Jung, P., Menssen, A., Mayr, D. & Hermeking, H (2008) "AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21", *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39), 15046-51

Jung, P.; Hermeking, H. (2009) "The c-MYC-AP4-p21 cascade" *Cell cycle* 8 (7), 982-9

Jaeckel S, Kaller M, Jackstadt R, Götz U, Müller S, Boos S, Horst D, **Jung P** & Hermeking H. (2018) "Ap4 is rate limiting for intestinal tumor formation by controlling the homeostasis of intestinal stem cells". *Nature Communications*, Sep 3;9(1):3573.

In einer ersten Genom-weiten Studie, welche die differenzielle Genexpression nach gezielter Blockade des β -Catenin/TCF7L2-Komplexes analysierte, wurden unter anderem die bereits bekannten Wnt-Zielgene *AXIN2*, *c-MYC(15)*, *ASCL2(122)* und *LGR5/GPR49(123)* als Wnt Zielgene in intestinalen Zellen, Adenomen, und kolorektalen Karzinomen bestätigt (92). Interessanterweise ist das c-MYC Onkogen für die Homöostase des gesunden Darmepithelgewebes nicht essentiell (39). Dahingegen spielt c-MYC bei der durch aberrante Wnt-Aktivierung induzierten KRK Induktion eine Schlüsselrolle und wird für die

konstitutive Aktivierung von Wnt Zielgenen nach APC-Verlust sowie für die damit einhergehenden pathologischen Veränderungen in den Prozessen Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose benötigt (124). In diesem Zusammenhang vermittelt c-MYC die reduzierte Expression des Zellzyklus-Inhibitors CDKN1A (p21)(62). c-MYC kann eine Repression von *CDKN1A* zum einen durch eine indirekte Bindung an den *CDKN1A* Promoter über den Transkriptionsfaktor MIZ1 erreichen (125). Daneben konnte in eigener Arbeit gezeigt werden, dass das direkte c-MYC Zielgen *TFAP4* an den Promoter des *CDKN1A* Gens bindet und dadurch die Expression von *CDKN1A* reprimiert (38). Der identifizierte c-MYC/TFAP4/CDKN1A Effektorsignalweg beeinflusst die Zellantwort auf DNA Schädigung und den durch den Wachstumsfaktor TGF- β vermittelten G1 Zellzyklus-Arrest in Tumorzellen(38). Die Expression von TFAP4 im Epithelgewebe des humanen Kolons ist dabei auf die Stammzellen und die sich aktiv teilenden Vorläuferzellen (engl.: transit amplifying cells) im unteren Drittel der Krypten beschränkt und erfolgt damit gegenläufig zur Expression von CDKN1A/p21, welche in denterminal differenzierten und proliferativ ruhenden Zellen im oberen Bereich der Kolon-Krypten zu finden ist(38). Im intestinalen Epithelgewebe reguliert die Wnt/c-MYC/TFAP4-Achse die Homöostase von epithelialen Stamm- und Paneth-Zellen, indem sie die ausreichende Expression von intestinalen Stammzell-Genen, Wnt-Zielgenen, und Notch-Zielgenen sicherstellt(126). Zudem ist TFAP4 in diesem Kontext ein limitierender(engl.: rate-limiting) Faktor für die Adenom-Entstehung, da er die Anzahl an funktionellen intestinalen Stammzellen, welche den Ausgangspunkt der Tumorigenese darstellen, begrenzt (44, 126).

4.4.2 Wnt-induzierte Biomarker zur Aufreinigung und Charakterisierung von Kolon-und KRK-Stammzellen

Jung P., Sommer C., Barriga F., Buczacki, S.J., Hernando J., Sevillano M., Duran-Frigola M., Aloy P., Selbach M., Winton D.J., Batlle E. (2015) "Isolation of human colon stem cells using surface expression of Protein Tyrosine Kinase Receptor 7 (PTK7)", *Stem Cell Reports*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.003>.

Jung P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H. Gallardo M.M., Blasco, M.A., Sancho, E., Clevers, H., Batlle, E. et al.(2011) "Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells", *Nature Medicine* 17,1225-1227.

Suárez, A., Barriga, F.M., **Jung P.**, Iglesias, M., Céspedes M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz P., Clevers, H., Sancho, E., Manges, R., Batlle, E (2011). "The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse", *Cell Stem Cell* 8, 5, 511-524.

Das heute wohl am meisten beachtete Wnt Zielgen kodiert für den R-Spondin Rezeptor LGR5 (leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5), welches initial als Marker für säulenförmige Stammzellen des Darmepithels (englisch: crypt base columnar cells, CBC) identifiziert wurde (33).LGR5 markiert auch adulte Stammzellen in zahlreichen weiteren Geweben, wie z.B. dem Magen, der Bauchspeicheldrüse, der Leber, der Niere, sowie der Brustdrüse (127). Wie auch LGR4 und LGR6 repräsentiert LGR5 ein Mitglied der Rhodopsin Familie an G Protein-gekoppelten Rezeptoren, und ist auch unter der Bezeichnung GPR49 bekannt (127). Eine Ko-Deletion von LGR4 und LGR5 führt zu einer verminderten Proliferation von Stammzellen an der Kryptbase, wodurch es zu einem kompletten Verlust

des intestinalen Stammzell-Kompartiments kommt (51). In Dickdarmzellen ist LGR5 durch die aberrante Aktivierung des Wnt Signalweges stark exprimiert, und LGR5-positive Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Selbsterneuerung von Adenomen und kolorektalen Karzinomen (103)(102). Zudem konnte gezeigt werden, dass gerade die Fernmetastasierung von KRK Zellen in die Leber und das Auswachsen bzw. Überdauern von KRK in dieser fremden Mikroumgebung maßgeblich von LGR5-positiven Krebsstammzellen getragen wird (101). Antikörper gerichtet gegen LGR5 mit ausreichender Spezifität und Affinität zur Aufreinigung bzw. Anreicherung von humanen Kolonstammzellen und KRK Stammzellen sind bis heute kommerziell nicht verfügbar. Daher wurden und werden große Forschungs-Anstrengungen unternommen, um alternative und mit LGR5 ko-exprimierte Stammzell-Biomarker zu identifizieren, über die diese außerordentlich wichtige Zellpopulation aus Darmepithelgewebe und KRK Gewebe effizient isoliert und untersucht werden kann. Dies gelang in eigener Arbeit mit den folgenden Biomarkern:

Das Wnt Zielgen *EPHB2* kodiert ein Mitglied der Eph Rezeptor Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Transmembran Glykoproteine. *EPHB2* und das verwandte *EPHB3* werden am stärksten in intestinalen Stammzellen an der Kryptbasis exprimiert und ihre Expression nimmt in Form eines longitudinalen Gradienten in Richtung der Krypt-Oberseite ab. Im Gegensatz dazu zeigen die Liganden dieser Rezeptoren, die Ephrine, ihr höchstes Expressionsniveau in den differenzierten Kolonepithelzellen. Die Eph-Ephrin Signaltransduktion, welche im Effekt die Dynamik des Aktin-Zytoskelett mitsteuert, ist für die Architektur und Kompartimentierung von sich teilenden und differenzierten Epithelgeweben von hoher Bedeutung (128). Im kolorektalen Karzinom wirkt dieser Mechanismus eher tumorsuppressiv, da er die Ausbreitung und Migration von *EPHB2*-positiven transformierten Zellen in die Region des Ephrin-positiven, differenzierten Normalgewebes einschränkt (129). Mechanistisch betrachtet wird dieses Sortieren von Zellpopulationen durch die von der Metalloproteinase ADAM10 vermittelte Spaltung und dadurch hervorgerufene asymmetrische Lokalisation von E-Cadherin auf der Oberfläche von jenen Krebszellen vermittelt, deren *EPHB2*-Rezeptor durch die Ephrin Liganden Bindung aktiviert wird (130). Neben der Isolation von humanen LGR5-positiven und multipotenten Kolonstammzellen gelang in eigenen Arbeiten mit einem Antikörper gerichtet gegen *EPHB2/Ephb2* auch die Aufreinigung und molekulare Charakterisierung von adulten intestinalen Lgr5-positiven Stammzellen von Mäusen, wobei sowohl mehrere Parallelen als auch bestimmte molekulare Unterschiede zwischen den Spezies *Homo sapiens* und *Mus musculus* aufgedeckt werden konnten (34, 35).

Die Protein Tyrosine Kinase 7 (PTK7) wurde ursprünglich als aktiviertes Gen in KRK Zellen beschrieben und daher initial „colon carcinoma kinase 4“ (CCK-4) genannt (131). Erst relativ kürzlich wurde PTK7 als Wnt-reguliertes Gen in durch Genomeditierung induzierten humanen Adenom-Organoiden charakterisiert (64). PTK7 ist an vielfältigen Prozessen der Zell-Zell Kommunikation und der Zell-Motilität beteiligt und beeinflusst die Zell-Polarität, die Regeneration von Geweben, sowie die Wundheilung (132). Es ist zudem an der adulten Gewebs-Homöostase beteiligt, und die Deregulation von PTK7 wurde vielfach mit der Entwicklung von Krebs und dessen Progression in das metastatische Stadium in Verbindung gebracht (133). Mechanistisch betrachtet reguliert PTK7 die sogenannten „nicht-kanonischen“ Wnt Signalwege, welche ein komplexes Netzwerk aus Signalvermittlern darstellen, die allesamt nicht zu einer Stabilisierung

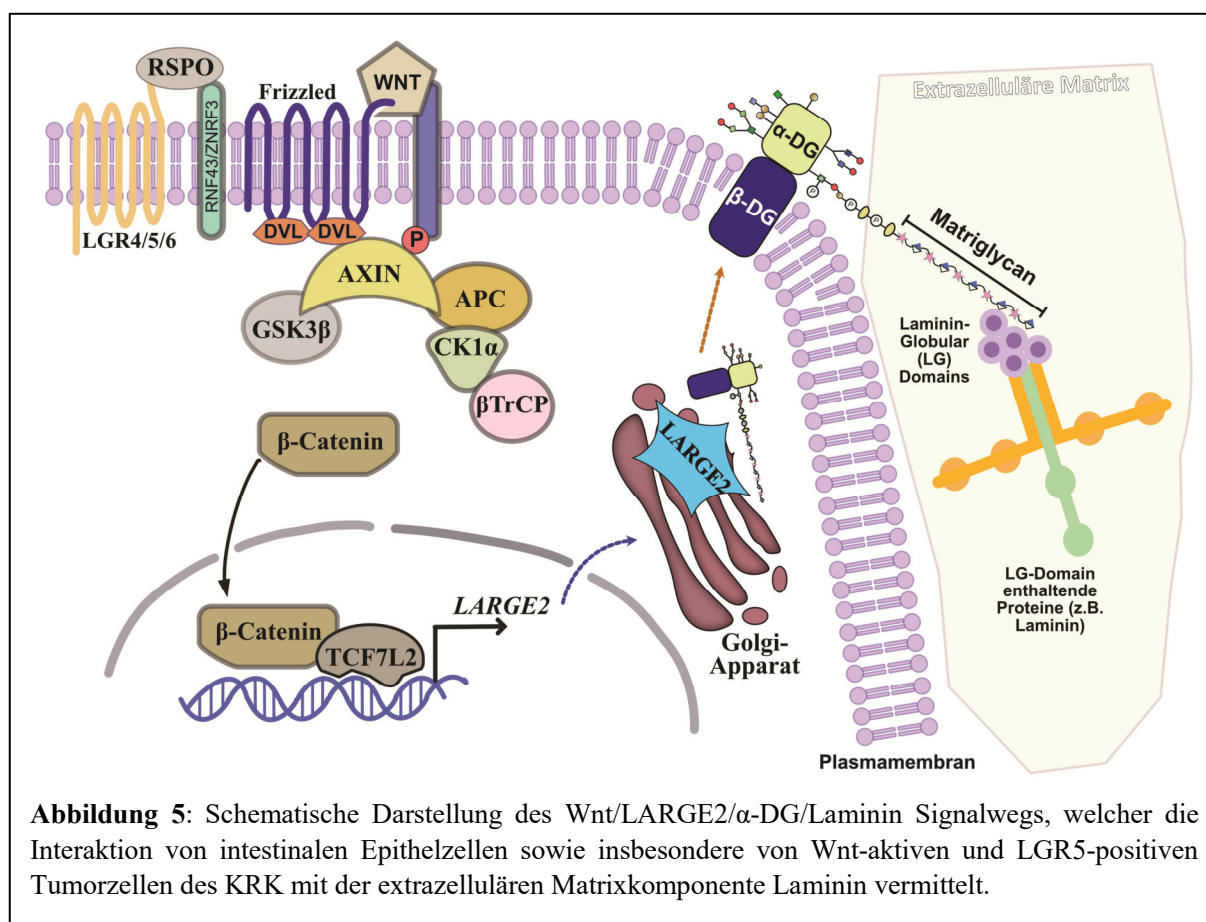
von β -Catenin beitragen, sondern alternative molekulare Prozesse steuern (134). Hierbei sei insbesondere der Planare Zell Polaritätsweg (engl.: Planar Cell Polarity, PCP) erwähnt, welcher die Orientierung von Zellen in der Ebene eines Epithels festlegt, und dessen Aktivität durch PTK7 beeinflusst wird (132). PTK7 wurde schließlich bei einer quantitativen massenspektrometrischen Bestimmung von Zelloberflächen-Proteinen an Stammzell-artigen und differenzierten humanen Kolon-Organoidkulturen identifiziert, und experimentell als adulter Stammzellmarker für das humane Kolon Epithelgewebe charakterisiert (36). Neben dieser Eigenschaft markiert PTK7 auch eine Subpopulation von ruhenden (engl. „label-retaining“) Kolonstammzellen (LRCs), welche neben dem Marker LGR5 auch den Enteroendozyten-typischen Marker Chromogranin A (CHGA) exprimieren und funktionell betrachtet eine Vorläuferstufe der sekretorischen Paneth'schen Körnerzellen und enteroendokrinen Zellen sind (36, 135). Diese proliferativ eher ruhenden Zellen bilden ein langlebiges Reservoir an der Kryptbase und dienen quasi als klonogene Reserve, welche im Falle einer Schädigung des Darmgewebes reaktiviert werden kann und so die verlorengegangenen klassischen Stammzellen ersetzt (135). Während die LRCs zunächst nur im Mäusedarm identifiziert und charakterisiert werden konnten, legte die Aufreinigung und die Enthüllung des genetischen Profils von PTK7-positiven humanen Kolonstammzellen deren Existenz erstmalig auch im humanen Darmgewebe nahe (36).

4.4.3 Die Wnt-LARGE2- α DG Achse reguliert die Interaktion von Kolonepithel- und KRK Zellen mit der extrazellulären Matrixkomponente Laminin

Dietinger V, García de Durango C, Wiechmann S, Boos S, Michl M., Neumann J, Hermeking H, Küster B, **Jung P** (2020). Wnt-driven LARGE2 mediates laminin-adhesive O-glycosylation in human colonic epithelial cells and colorectal cancer. *Cell Communication & Signaling*, Jun 25;18:102; doi: 10.1186/s12964-020-00561-6.

Ein von seiner Entdeckung her sehr junger Wnt-Effektor Signalweg beeinflusst die Interaktion bzw. Affinität von normalen intestinalen Epithelzellen und kolorektalen Karzinomzellen mit deren extrazellulärer Matrix: Nach dem Einsatz von microRNAs gerichtet gegen das APC Tumorsuppressor-Gen sowie nach einer CRISPR/Cas9-vermittelten gezielten Trunkierung des APC Proteins konnte mit Hilfe von Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) eine Heraufregulierung des Faktors LARGE2 in KRK Zellen und humanen Adenom-Organoiden (ADOs) beobachtet werden (93). LARGE2 ist ein Enzym aus der Klasse der O-Glycosyltransferasen und synthetisiert ein als Matriglycan bezeichnetes und modular aufgebautes Zuckermolekül an die OH-Gruppen-haltigen Aminosäurereste (Tyrosin, Serin, oder Threonin) von Zielproteinen (136). Diese Zuckerstrukturen besitzen eine hohe Affinität zu sogenannten Laminin-globulären (LG) Domänen, wie sie z.B. im Laminin vorkommen. Laminin repräsentiert einen hochmolekularen Proteinbestandteil der extrazellulären Matrix und bildet die Hauptkomponente der Basalmembran. Umfassende molekularbiologische Analysen zeigten eine direkte Regulation des LARGE2 Gens durch den Wnt-Transkriptionsfaktor TCF7L2 sowie eine Wnt Signalwegs-gesteuerte O-Glykosylierung und damit Funktionalisierung des Laminin-bindenden Zelloberflächenproteins alpha-Dystroglykan (α -DG) in Abhängigkeit von der Wnt Signalwegs-vermittelten LARGE2 Induktion (Dietinger

et al., 2020). Funktionell reguliert der neu aufgeklärte Wnt/LARGE2/ α -DG/Laminin Signalweg die Interaktion von normalen humanen Kolonstammzellen und undifferenzierten, Wnt/LGR5-positiven KRK Zellen mit der Laminin-haltigen extrazellulären Matrix der Mikroumgebung (**Abbildung 5**). Dabei wirkt er sich auf das Adhäsionsverhalten und die Migrations- bzw. Invasions-Fähigkeit der kolorektalen Krebszellen aus (Dietinger et al., 2020). In Leber-metastasierten KRK Zellen fand sich zudem eine sehr heterogene Komplexität der durch LARGE2 vermittelten Zuckerstrukturen an α -DG, deren differenzieller Einfluss auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten sowie auf die Aggressivität von KRK Zellen noch näher untersucht werden muss. Transplantations-Experimente am Mausmodell sollen künftig den Einfluss des Wnt/LARGE2/ α -DG/Laminin Signalwegs auf den Prozess der KRK Lebermetastasierung aufklären.



4.5 Krankheits-Modellierung und präklinische Erprobung alternativer Therapieansätze an Tumor Organoiden

Boos SL, Loevenich LP, Vosberg S, Engleitner T, Öllinger R, Kumbrink J, Rokavec M, Michl M, Greif PA, Jung A, Hermeking H, Neumann J, Kirchner T, Rad R, **Jung P**(2022). Disease modeling on tumor organoids implicates AURKA as a therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*.13(2):517-540. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.10.008, Epub 2021 Oct 23.

Neben der Aufklärung von den an Krebs beteiligten molekularbiologischen Prozessen und Signal-Transduktions-Kaskaden liefert das Tumor-Organoid Modell eine vielsprechende präklinische Plattform für die Erprobung neuer oder alternativer Therapieansätze und Entschlüsselung von Chemoresistenz-

Mechanismen. Insbesondere bilden Patienten-abgeleitete Tumor Organoide, im Gegensatz zu klassischen etablierten Zelllinien, sowohl die intratumorale Heterogenität als auch die individuellen genetischen und phänotypischen Merkmale der Erkrankung kolorektales Karzinom ab. Sie sind daher geradezu prädestiniert für den routinemäßigen Einsatz in der personalisierten Krebsmedizin (137)(138). Eine großangelegte Studie verglich weiterhin das Ansprechen von Tumor Organoiden auf Chemotherapie sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, nach deren Xenotransplantation in Mäuse, mit der Therapie-Antwort des jeweiligen Patienten in der Klinik (139). Dabei konnte gezeigt werden, dass Tumor Organoide das tatsächliche Therapie-Ansprechen von KRKs gut rekapitulieren und somit bereits bestehende Ansätze der Patienten-Stratifizierung gut komplementieren sowie die Erfolgsaussichten einer Behandlung erhöhen können (139). Eine weitere an einer klinischen Studie angelehnte Forschungsarbeit ergab eine gute Übereinstimmung des Erfolgs einer 5-Fluoruracil- und Irinotecan-basierten Chemotherapie mit der *ex vivo* Sensitivität von aus diesen Fällen abgeleiteten Tumor Organoiden gegenüber dieser Behandlungsstrategie (115). Dies bestärkte die Relevanz und Wichtigkeit der eigenen Arbeit hinsichtlich der sogenannten Krankheits-Modellierung („disease modeling“) an Patienten-abgeleiteten Tumor Organoid-Modellen (37). Als Grundlage dienten hierbei chromosomal instabile und mikrosatelliten stabile Tumor Organoide mit inaktivierenden *APC*- und *TP53*-Genmutationen. Diese molekulare Unterklasse repräsentiert jenen KRK Prototyp, welcher sich durch häufig auftretende Fernmetastasierung im Krankheitsverlauf auszeichnet. Durch ihren *KRAS/NRAS/BRAF* wild-type Status waren die für dieses Projekt ausgewählten Tumor Organoid-Linien zudem der Behandlung mit dem EGFR-inhibitorischen Antikörper Cetuximab (Cmab) gut zugänglich. Die Applikation von FOLFIRI/Cmab führte zu einem initialen „Schrumpfungsprozess“ der Tumor Organoid-Masse gefolgt von einem Gleichgewicht aus Absterben (Apoptose) und Überleben sowie einer langsamen Proliferation von „Widersteher“-Zellen („drug persister cells“). Nach mehreren Monaten trat eine Chemotherapie-Toleranz auf, wobei die Widersteher-PDTCO-Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) umgingen und ihre Fähigkeit zur DNA-Replikation größtenteils wiedererlangten (37). Diese chemoresistenten Tumor-Organoid-Linien wurden einer umfangreichen genomischen und transkriptomischen Analyse mittels Sequenzierungen der nächsten Generation (engl.: next generation sequencing (NGS)) unterzogen. Dadurch wurde enthüllt, dass durch die Langzeitbehandlung der Patienten-abgeleiteten Tumor Organoidlinien mit einer klinisch relevanten Erst-Linien Kombinationstherapie eine Veränderung des Genexpressions-Programms, jedoch keine klinisch relevanten genetischen Mutationen aufgetreten waren. Insbesondere wiesen chemotolerante KRK Organoide eine Anreicherung des Onkoproteins c-MYC sowie eine verstärkte Expression von c-MYC und E2F Zielgenen auf und umgingen zum größten Teil den programmierten Zelltod (Apoptose) (**Abbildung 6**). Durch die Substitution von Cetuximab durch einen klinisch erprobten Inhibitor (Alisertib) der G2/M-Kontrollpunkt („Checkpoint“) Kinase AURKA, welcher sich auch indirekt inhibitorisch auf die c-MYC Aktivität auswirkt (140), konnte das Wachstum der chemotoleranten Tumor Organoide gebremst, das c-MYC Proteinniveau gesenkt, und gleichzeitig Apoptoseausgelöst werden (37). Die Inhibition von AURKA war also in der Lage, die erworbene Resistenz der KRK Zellen gegenüber einer EGFR-Blockade auszuhebeln. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass AURKA eine Resistenz gegenüber modernen EGFR-gerichteten Inhibitoren in Lungenkrebs fördert (141), was mit den eigenen Beobachtungen im Einklang steht. Weiterhin wendeten wir CRISPR/Cas9-Genomeditierung an,

um in mehreren chemotoleranten Organoid-Überleberkulturen ein spontanes Auftreten der klinisch problematischen KRAS^{G12D} Variante zu modellieren. Dies führte selbst in chemotoleranten Organoiden zu einer deutlichen Zunahme der Resilienz gegen verschiedene therapeutische Strategien der EGFR-MEK-ERK Signalwegs-gerichteten Inhibition(37). Eine Blockade von AURKA in chemotoleranten, KRAS-mutierten KRK Organoiden löste nach einem sogenannten „Priming“ (= Bahnung) durch klinisch erprobte duale EGFR-MEK-ERK Inhibition den programmierten Zelltod aus und konnte ein Wiederauswachsen der KRAS-mutierten Tumor Organoiden auch nach Absetzen der Behandlung größtenteils verhindern (**Abbildung 6**). Ein ähnliches Phänomen des apoptotischen Primings durch duale EGFR Signalwegsblockade wurde zuvor unabhängig von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet, jedoch nicht im Kontext einer bereits erworbenen Chemotherapie-Toleranz (142). Dieser therapeutisch vielversprechende Effekt war insbesondere in solchen Organoid-Modellen sichtbar, welche im Zuge der initialen Chemotoleranz-Bildung ein erhöhtes c-MYC Protein Expressions-Niveau und eine Anreicherung des c-MYC Genexpressions-Programms erfahren hatten. Eine potentielle klinische Relevanz von AURKA als Marker und potentielles Behandlungsziel für Leber-metastasierende KRKs konnten wir schließlich anhand einer Patienten-gepaarten KRK Kohorte bestehend aus Primärtumoren und den jeweils aus diesen abgeleiteten Lebermetastasen aufzeigen (37).

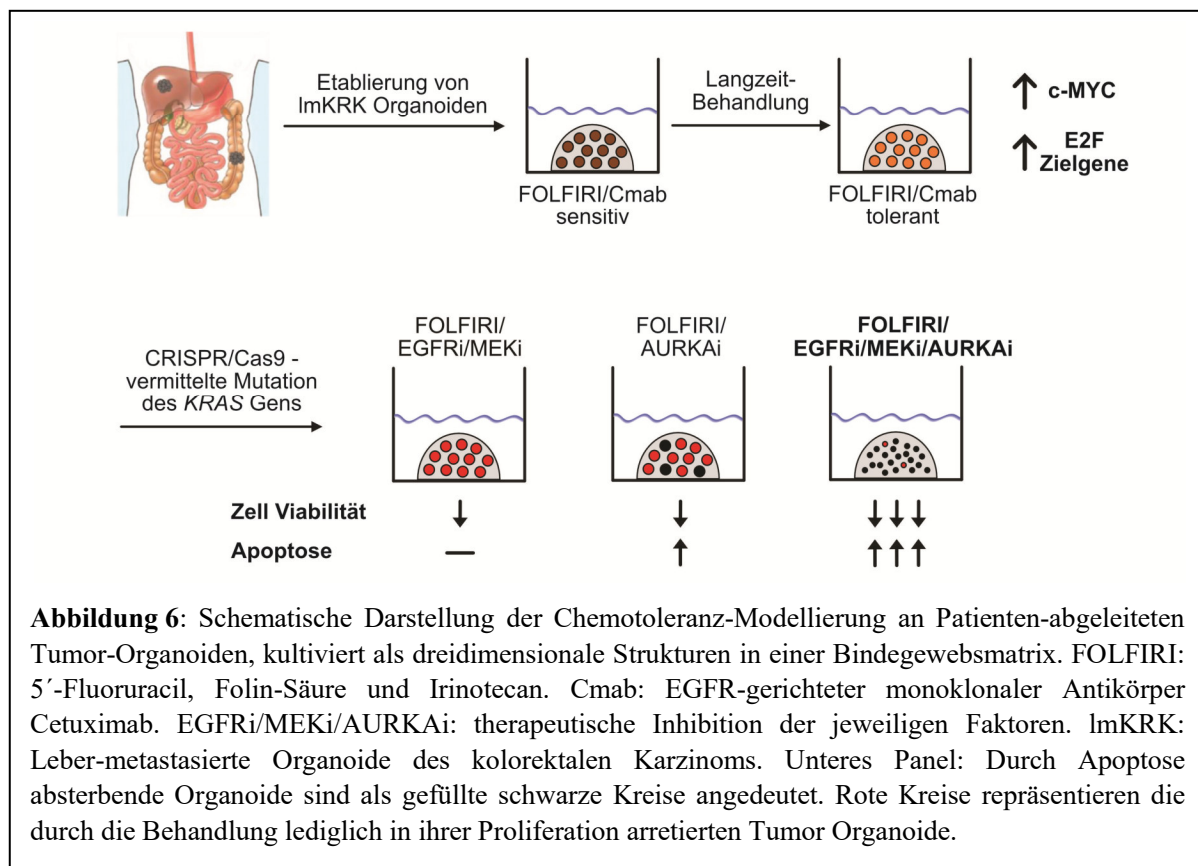


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Chemotoleranz-Modellierung an Patienten-abgeleiteten Tumor-Organoiden, kultiviert als dreidimensionale Strukturen in einer Bindegewebsmatrix. FOLFIRI: 5'-Fluoruracil, Folin-Säure und Irinotecan. Cmab: EGFR-gerichteter monoklonaler Antikörper Cetuximab. EGFRi/MEKi/AURKAi: therapeutische Inhibition der jeweiligen Faktoren. ImKRK: Leber-metastasierte Organoiden des kolorektalen Karzinoms. Unteres Panel: Durch Apoptose absterbende Organoiden sind als gefüllte schwarze Kreise angedeutet. Rote Kreise repräsentieren die durch die Behandlung lediglich in ihrer Proliferation arretierten Tumor Organoiden.

4.5.1 Die Rolle des Biomarkers AURKA in der Progression und Überlebens-Prognose des kolorektalen Karzinoms

Peter Jung, David Horst, Thomas Kirchner, Frederick Klauschen, Jens Neumann (2022). AURKA is a prognostic biomarker for good overall survival in stage II colorectal cancer patients. *Pathology - Research and Practice*, 153936, ISSN 0344-0338, <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153936>

Die Aurora Kinase A (AURKA) ist ein Mitglied der Aurora/IPL1-verwandten Kinasen, welche wiederum der Familie der Serine/Threonine Kinasen angehören. Aurora/IPL1-verwandte Kinasen spielen eine evolutionär konservierte Rolle in Zellteilungs-Prozessen, wie dem Zell-Eintritt in die Mitose, der bipolaren Spindelbildung, und der Zentrosomen-Segregation (143). AURKA besitzt ein katalytisch wichtiges Asp-Phe-Gly (DFG) Motiv, welches in der flexiblen Aktivierungsschleife lokalisiert ist und sich je nach Aktivierungszustand der Kinase in einer inaktiven (DFG-out) oder aktiven (DFG-in) Konformation befindet. Dabei führt die Phosphorylierung oder Bindung des Mitosespindel-Montage-Faktors TPX2 zur allosterischen Ausbildung der aktiven Konformation von AURKA(144). Das Expressions-Niveau der AURKA ist in Tumoren des KKR erhöht, und dies korreliert mit einer häufig auftretenden Amplifikation des 20q Chromosomen-Arms, welcher das *AURKA* Gen enthält(145). Erst kürzlich wurde AURKA anhand einer Meta-Analyse der Status „Drehscheiben-Gen“ (engl.: hub gene) im kolorektalen Karzinom zugesprochen (146). In einer eigenen Studie konnte dieser Zusammenhang zwischen Amplifikation und Überexpression von AURKA am Tumor-Organoid-Modell ebenfalls beobachtet werden (37). Die erhöhte Aktivität von AURKA führt zu einer gesteigerten Rate der Mikrotubuli-Bildung, welches eine abnormale Spindelgeometrie hervorruft und das Auftreten von zurückgebliebenen Chromosomenfragmenten fördert (147). Dadurch wird die chromosomale Instabilität (CIN) von KKR Zellen gefördert, und ein erhöhtes AURKA-Niveau wurde als unabhängiger Marker für das Auftreten von Amplifikation oder Deletion bestimmter chromosomaler Abschnitte im KKR vorgeschlagen (148). Interessanterweise konnte diese Studie jedoch keine Assoziation von AURKA Expression und Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) feststellen, und eigene Arbeiten haben bestätigt, dass MSI und CIN aufweisende Tumore des KKR ein ähnliches Expressionsniveau von *AURKA* mRNA besitzen (149). In vorangegangenen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde eine Korrelation von AURKA mit unterschiedlichen klinisch-pathologischen Aspekten im fortgeschrittenen KKR festgestellt. So untersuchte Goos *et al.* die AURKA Expression in „Tissue-Microarrays (TMAs)“, welche aus Resektaten von Leber-metastasierten KKR zusammengestellt waren und fand heraus, dass erhöhte AURKA Niveaus ein generell schlechtes Überleben in diesem fortgeschrittenen Krankheitsstadium prognostizieren (150). In dieser Studie wurde auch ein vergleichbares Niveau von AURKA in primärem Tumorgewebe und den sich daraus ableitenden Lebermetastasen gefunden (150). Eine ähnliche Expression von AURKA in KKR Primärtumoren und deren fernmetastasierten Ablegern konnte in eigener Arbeit an einer Patienten-gepaarten KKR Kohorte unabhängig bestätigt werden (37). Des Weiteren ergaben Untersuchungen an gemischten Populationen von Stadium I, II, und III diagnostizierten KKR Fällen eine Assoziation von erhöhter AURKA Abundanz mit schlechtem Progressions-freien Überleben (151, 152), jedoch konnte eine Korrelation von AURKA mit generellem Überleben unter anderem wegen einer zu geringen Nachverfolgungszeit der Patienten nicht gezeigt werden. Die in eigener Arbeit durchgeführte Analyse von AURKA Abundanz in einer reinen UICC

Stadium II Kohorte und mit ausreichend langer Nachverfolgungszeit (> 14 Jahre) ergab hingegen eine Assoziation von hohem AURKA H-Score (Kombination aus Intensität und prozentualer Anteil der positiv färbenden Zellen) mit gutem generellen Überleben, während keine signifikante Assoziation zwischen dem AURKA Status und dem Progressions-freien Überleben in dieser Kohorte gefunden wurde (149). Eine Erklärung für diese Diskrepanz zu anderen Studien könnte das Nicht-Vorhandensein von UICC Stadium III Fällen in dieser Kohorte sein, da diese Patienten eine erhöhte Neigung zur Bildung eines Rezidivs nach initialer Behandlung besitzen. Eine unabhängige Studie über das prognostische Potential von AURKA in dieser Patientengruppe sollte jedoch durchgeführt werden, um diese Hypothese zu stützen. Insbesondere da eine Analyse des AURKA mRNA Niveaus in der Fernmetastasen-freien Untergruppe der UICC Stadium I-III Fälle in der TCGA Kohorte (n=503 Patienten) des kolorektalen Karzinoms ebenfalls eine Assoziation mit gutem generellen Überleben ergab, welches im Einklang mit den eigenen Daten (149). Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass niedrige AURKA H-Scores, welche der klinischen Entscheidungsfindung durch die routinemäßige Anwendung klassischer immunhistochemischer Methodik leicht zugänglich gemacht werden können, als Biomarker für die Stratifizierung von Hochrisiko-Patienten des Stadium II KRKs Anwendung finden könnten. Für diese Patientengruppe wäre dann wiederum eine adjuvante Chemotherapie und/oder eine engmaschigere Routine-Nachuntersuchung empfehlenswert.

4.5.2 Das Potential von klinisch erprobten und neuen präklinisch getesteten Inhibitoren von AURKA

Boos SL, Loevenich LP, Vosberg S, Engleitner T, Öllinger R, Kumbrink J, Rokavec M, Michl M, Greif PA, Jung A, Hermeking H, Neumann J, Kirchner T, Rad R, **Jung P** (2022). Disease modeling on tumor organoids implicates AURKA as a therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 13(2):517-540. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.10.008, Epub 2021 Oct 23.

Neben dem bereits diskutierten prognostischen Potential von AURKA repräsentiert diese Zellzyklus Kontrollpunkt-Kinase außerdem ein vielversprechendes therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Krebs (153). In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe von Inhibitoren entwickelt, die sich spezifisch gegen AURKA oder, im Falle von pan-Aurora Kinase Inhibitoren, gegen alle Mitglieder dieser Kinase-Familie richten und von denen sich einige bereits in der klinischen Erprobungsphase befinden (153). Bei diesen klassischen, aus kleinen Molekülen bestehenden Inhibitoren (engl.: small molecule inhibitors, SMDs) lassen sich prinzipiell zwei Klassen mit verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden: typische Klasse I Inhibitoren, zu denen beispielsweise S1451 und PHA-739358 zählen, inhibieren zwar die katalytische Aktivität von AURKA durch Bindung an die aktive „DFG-in“ Form, induzieren jedoch eher geringfügige Konformationsänderungen des AURKA Proteins (140, 154). Dahingegen binden Klasse II Inhibitoren, wie z.B. MLN-8237 (Alisertib), CD532, und AMG-900 die inaktive „DFG-out“ Form von AURKA, und insbesondere AMG-900 ruft eine ungewöhnlich große Konformationsänderung hervor (140, 154). AURKA bindet an ein N-terminales Segment von N-MYC und c-MYC, welches mit der Erkennungssequenz der Ubiquitin-Ligase SCF_{Fbxw7} überlappt, und verhindert somit die proteolytische Degradation dieser onkogenen Transkriptionsfaktoren (140, 155, 156). Diese stabilisierende Bindung kann

durch Klasse II, „DFG-out“ AURKA Inhibitoren gestört werden, so dass diese bevorzugt in Tumoren mit MYC-Amplifikation oder auch mit Wnt Signalwegs Aktivierung-getriebener MYC Überexpression eingesetzt werden sollten. Einer dieser Inhibitoren, welcher in einer der eigenen Studien zum Einsatz kam, ist das ATP-kompetitive kleine Molekül Alisertib (MLN-8237) (37), welches nach Anbindung an AURKA dessen Konformation verändert und dessen aktivierende Phosphorylierung an Thr288 verhindert. Zudem ist die Affinität von Alisertib gegenüber AURKA circa 150 Mal größer als die gegenüber der nahe verwandten Aurora Kinase B (AURKB), welches eine sehr hohe Spezifität dieses Inhibitors nahelegt (157). Verschiedene klinische Phase II Studien wurden mit Alisertib alleine oder in Kombination mit anderen therapeutischen Agenzien durchgeführt und dabei eine gute Effizienz bei tolerablen Dosierungen festgestellt (158-161). Die einzige bis jetzt vollendete klinische Phase III Studie zu Alisertib zeigte eine mit Vergleichs-Präparaten ähnlich gutes Progressions-freies Überleben von T Zell Lymphom Patienten, wurde jedoch von den Patient*innen besser toleriert (162). Die Ergebnisse der eigenen Arbeit am Tumor Organoid Modell legen hierbei nahe, dass die Wirksamkeit und der langfristige Erfolg von AURKA-Inhibition bei der Therapie des KRK wahrscheinlich insbesondere in Kombination mit zielgerichteten Inhibitoren des EGFR-MAPK Signalwegs zu erwarten sind (37). Zusammenfassend unterstützen die bislang durchgeführten experimentellen und klinischen Studien die Anwendbarkeit von Alisertib in der Behandlung von Krebspatienten und ermutigen zur weiteren Forschung an effizienten und auch neuartigen Inhibitoren gerichtet gegen die Aurora Kinase A.

Eine dieser neuen vielversprechenden Inhibitor-Klassen, die hier abschließend auch aufgrund ihrer momentanen Aktualität erwähnt werden soll, sind die Proteolyse-erzielenden Chimäre (proteolysis targeting chimeras, PROTACs), die aus einem Zielprotein-bindenden Anteil und einem E3 Ligase-affinen Anteil bestehen und somit die zielgerichtete Degradation des onkogenen Faktors bewirken. PROTACs wird auch ein großes Potential zugesprochen, bislang nicht der therapeutischen Intervention zugängliche Faktoren, wie z.B. c-MYC, STAT3, oder KRAS, außer Gefecht zu setzen (163). Durch sie konnte kürzlich sowohl die katalytische, also auch die nicht-katalytische Funktion von AURKA spezifisch in verschiedenen Krebszellarten inhibiert werden, wobei Chimäre bestehend aus Alisertib und dem CEREBLON E3 Ligase-bindenden Molekül Thalidomid eingesetzt wurden (164). Im Gegensatz zu einer rein ATP-kompetitiven, katalytischen Inhibition unterbindet der bimodale Angriff auf Aurora Kinase A durch PROTACs zudem dessen „Gerüst“ Funktion (engl.: scaffolding) und bewirkt einen S-Phase Arrest sowie Apoptose in Tumorzellen (164). Inwieweit sich diese Strategie der AURKA Inhibition unter klinischen Gesichtspunkten bewährt muss allerdings in künftigen Studien umfassend aufgeklärt werden.

5 Résumé und Ausblick

Im Kontext des vorliegenden Habilitationsprojekts wurden grundlegende Erkenntnisse zu der Hierarchie, der Tumor-Mikroumgebungs-Interaktion, sowie der Chemotherapie-begleitenden Evolution des kolorektalen Karzinoms (KRK) gewonnen. So wurden die Zelloberflächen-Marker EPHB2 und PTK7 zur Aufreinigung und genetischen Charakterisierung von humanen adulten Kolonstammzellen eingesetzt und dabei interessante Parallelen zu der Organisation und dem Aufbau kolorektaler Karzinome entschlüsselt. Zudem gelang es, die so isolierten adulten (Tumor)-Stammzellen mittels eines innovativen dreidimensionalen Kultursystems außerhalb des Organismus in Form von sogenannten (Tumor) „Organoiden“ langfristig und in multipotenter Form zu propagieren. Damit wurde eine unverzichtbare Plattform für die personalisierte Medizin geschaffen. Weiterhin wurde mit Hilfe des Patienten-abgeleiteten Organoidmodells der Wnt/LARGE2/ α -DG/Laminin Effektor-Signalweg entdeckt und charakterisiert, welcher die Interaktion von Krebszellen mit der extrazellulären Matrix der Mikroumgebung vermittelt. Schließlich konnte die phänotypische und molekulare Anpassung von KRK Organoiden, abgeleitet von verschiedenen Patienten, an die Kombinations-Erstlinientherapie in der Kulturschale nachgestellt und ein alternativer Behandlungsansatz zur Überwindung der erworbenen Chemotoleranz erfolgreich erprobt werden. Hierbei wurde Aurora Kinase A therapeutisch angegriffen, und damit eine Inhibition der im Zuge der Chemotoleranz erhöhten Aktivität des Onkogens c-MYC sowie eine Resensitivierung der KRK Organoiden gegenüber dem programmierten Zelltod (Apoptose) erreicht.

In den Folgeprojekten sollen die Vorteile und der personalisierte Charakter des KRK Organoid-Modells mit physiologischen Aspekten und Gewebekontext-bezogenen Informationen mittels einer Endoskop-gestützten orthotopen Transplantation von Organoiden in die Dickdarmwand von Mäusen komplementiert werden. Dadurch wird insbesondere der Einfluss der Tumor-Mikroumgebung berücksichtigt, welcher bei bestimmten Formen der Signaltransduktion in KRK Zellen sowie bei der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik in personalisierten Chemotherapie-Ansätzen eine entscheidende Rolle spielt. Zudem sollen mit diesem präklinischen und translationalen Ansatz verschiedene genetische Faktoren und Signalübertragungsprozesse, wie z.B. der Wnt/LARGE2/ α -DG/Laminin Signalweg sowie weiterein eigenen Arbeiten neu gefundene potentielle therapeutische Ziele, auf ihre Wichtigkeit für die Progression und Fernmetastasierung des KRK hin untersucht werden.

6 Verzeichnis der Abkürzungen

α -DG	Alpha-Dystroglykan
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AURKA	Aurora Kinase A
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A (p21)
ChIP	Chromatin Immun-Präzipitation
CMS	Consensus molecular subtype
CRIS	Colorectal Cancer Intrinsic Subtypes
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR-associated protein 9
KRK	Kolorektales Karzinom
EGF(R)	Epidermaler Wachstumsfaktor (Rezeptor)
EPHB2	Ephrin Receptor B2
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FOLFIRI	5'-Fluoruracil, Folinsäure, Irinotecan
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LARGE2	LARGE Xylosyl- And Glucuronyltransferase 2)
LGR5	leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 5
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
NGS	Next generation sequencing
PDTO	Patient-derived tumor organoid
PTK7	Protein Tyrosine Kinase 7 (Inactive)
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TFAP4 (oder AP4)	Transcription Factor AP-4
UICC	Union for International Cancer Control
Wnt	Wingless/Integrated

7 Referenzen

1. A. B. Turke *et al.*, MEK inhibition leads to PI3K/AKT activation by relieving a negative feedback on ERBB receptors. *Cancer Res***72**, 3228-3237 (2012).
2. T. Hofmarcher, P. Lindgren, N. Wilking, B. Jonsson, The cost of cancer in Europe 2018. *Eur J Cancer***129**, 41-49 (2020).
3. B. O'Sullivan *et al.*, The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol***18**, 849-851 (2017).
4. R. Cardoso *et al.*, Colorectal cancer incidence, mortality, and stage distribution in European countries in the colorectal cancer screening era: an international population-based study. *Lancet Oncol***22**, 1002-1013 (2021).
5. R. D. Rosen, A. Sapra, in *StatPearls*. (Treasure Island (FL), 2022).
6. G. Argiles *et al.*, Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol***31**, 1291-1305 (2020).
7. N. N. Baxter *et al.*, Adjuvant Therapy for Stage II Colon Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*, JCO2102538 (2021).
8. J. B. O'Connell, M. A. Maggard, C. Y. Ko, Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst***96**, 1420-1425 (2004).
9. V. L. Tsikitis, D. W. Larson, M. Huebner, C. M. Lohse, P. A. Thompson, Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer. *BMC Cancer***14**, 336 (2014).
10. M. Richter *et al.*, German oncology certification system for colorectal cancer - relative survival rates of a single certified centre vs. national and international registry data. *Innov Surg Sci***6**, 67-73 (2021).
11. T. S. Schiergens *et al.*, Multidisciplinary treatment of colorectal liver metastases. *Minerva Med***108**, 527-546 (2017).
12. E. R. Fearon, B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell***61**, 759-767 (1990).
13. B. C. Morson, Precancerous lesions of the colon and rectum. Classification and controversial issues. *JAMA***179**, 316-321 (1962).
14. S. J. Baker *et al.*, Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science***244**, 217-221 (1989).
15. T. C. He *et al.*, Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science***281**, 1509-1512 (1998).
16. K. W. Kinzler *et al.*, Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science***253**, 661-665 (1991).
17. J. L. Bos *et al.*, Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature***327**, 293-297 (1987).
18. S. D. Crockett, D. C. Snover, D. J. Ahnen, J. A. Baron, Sessile serrated adenomas: an evidence-based guide to management. *Clin Gastroenterol Hepatol***13**, 11-26 e11 (2015).
19. N. J. Carr, H. Mahajan, K. L. Tan, N. J. Hawkins, R. L. Ward, Serrated and non-serrated polyps of the colorectum: their prevalence in an unselected case series and correlation of BRAF mutation analysis with the diagnosis of sessile serrated adenoma. *J Clin Pathol***62**, 516-518 (2009).
20. R. Rad *et al.*, A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell***24**, 15-29 (2013).
21. R. G. Amado *et al.*, Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol***26**, 1626-1634 (2008).
22. C. S. Karapetis *et al.*, K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med***359**, 1757-1765 (2008).
23. W. De Roock *et al.*, Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol***11**, 753-762 (2010).
24. D. T. Le *et al.*, PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med***372**, 2509-2520 (2015).
25. D. V. F. Tauriello *et al.*, TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature***554**, 538-543 (2018).
26. J. Guinney *et al.*, The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med***21**, 1350-1356 (2015).
27. A. Calon *et al.*, Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet***47**, 320-329 (2015).
28. C. Isella *et al.*, Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nat Genet***47**, 312-319 (2015).
29. H. O. Lee *et al.*, Lineage-dependent gene expression programs influence the immune landscape of colorectal cancer. *Nat Genet***52**, 594-603 (2020).

30. C. Isella *et al.*, Selective analysis of cancer-cell intrinsic transcriptional traits defines novel clinically relevant subtypes of colorectal cancer. *Nat Commun***8**, 15107 (2017).
31. M. Schutte *et al.*, Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors. *Nat Commun***8**, 14262 (2017).
32. H. Clevers, The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell***154**, 274-284 (2013).
33. N. Barker *et al.*, Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature***449**, 1003-1007 (2007).
34. P. Jung *et al.*, Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med***17**, 1225-1227 (2011).
35. A. Merlos-Suarez *et al.*, The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell***8**, 511-524 (2011).
36. P. Jung *et al.*, Isolation of Human Colon Stem Cells Using Surface Expression of PTK7. *Stem Cell Reports***5**, 979-987 (2015).
37. S. L. Boos *et al.*, Disease Modeling on Tumor Organoids Implicates AURKA as a Therapeutic Target in Liver Metastatic Colorectal Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol***13**, 517-540 (2021).
38. P. Jung, A. Menssen, D. Mayr, H. Hermeking, AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci U S A***105**, 15046-15051 (2008).
39. M. D. Bettess *et al.*, c-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol***25**, 7868-7878 (2005).
40. L. G. van der Flier, H. Clevers, Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol***71**, 241-260 (2009).
41. A. R. Gunawardene, B. M. Corfe, C. A. Staton, Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol***92**, 219-231 (2011).
42. I. M. Shih *et al.*, Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A***98**, 2640-2645 (2001).
43. S. L. Preston *et al.*, Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res***63**, 3819-3825 (2003).
44. N. Barker *et al.*, Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature***457**, 608-611 (2009).
45. S. Schwitalla *et al.*, Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell***152**, 25-38 (2013).
46. B. Chen *et al.*, Differential pre-malignant programs and microenvironment chart distinct paths to malignancy in human colorectal polyps. *Cell***184**, 6262-6280 e6226 (2021).
47. C. Banziger *et al.*, Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell***125**, 509-522 (2006).
48. K. Bartscherer, N. Pelte, D. Ingelfinger, M. Boutros, Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell***125**, 523-533 (2006).
49. R. Takada *et al.*, Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell***11**, 791-801 (2006).
50. C. Y. Janda, D. Waghay, A. M. Levin, C. Thomas, K. C. Garcia, Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science***337**, 59-64 (2012).
51. W. de Lau *et al.*, Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature***476**, 293-297 (2011).
52. P. H. Chen, X. Chen, Z. Lin, D. Fang, X. He, The structural basis of R-spondin recognition by LGR5 and RNF43. *Genes Dev***27**, 1345-1350 (2013).
53. H. X. Hao *et al.*, ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature***485**, 195-200 (2012).
54. S. Basu, G. Haase, A. Ben-Ze'ev, Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. *F1000Res***5**, (2016).
55. Z. Steinhart, S. Angers, Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development***145**, (2018).
56. A. Hurlstone, H. Clevers, T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *EMBO J***21**, 2303-2311 (2002).
57. D. L. Daniels, W. I. Weis, Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol***12**, 364-371 (2005).
58. E. H. Jho *et al.*, Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol***22**, 1172-1183 (2002).
59. V. Korinek *et al.*, Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet***19**, 379-383 (1998).
60. A. Gregorieff *et al.*, Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology***129**, 626-638 (2005).
61. H. F. Farin *et al.*, Visualization of a short-range Wnt gradient in the intestinal stem-cell niche. *Nature***530**, 340-343 (2016).

62. M. van de Wetering *et al.*, The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell***111**, 241-250 (2002).
63. J. M. Bugter, N. Fenderico, M. M. Maurice, Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer. *Nat Rev Cancer***21**, 5-21 (2021).
64. B. E. Michels *et al.*, Human colon organoids reveal distinct physiologic and oncogenic Wnt responses. *J Exp Med***216**, 704-720 (2019).
65. E. M. Schatoff *et al.*, Distinct Colorectal Cancer-Associated APC Mutations Dictate Response to Tankyrase Inhibition. *Cancer Discov***9**, 1358-1371 (2019).
66. B. K. Koo, J. H. van Es, M. van den Born, H. Clevers, Porcupine inhibitor suppresses paracrine Wnt-driven growth of Rnf43;Znrf3-mutant neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A***112**, 7548-7550 (2015).
67. B. Madan *et al.*, Wnt addiction of genetically defined cancers reversed by PORCN inhibition. *Oncogene***35**, 2197-2207 (2016).
68. R. Vera *et al.*, Multidisciplinary management of liver metastases in patients with colorectal cancer: a consensus of SEOM, AEC, SEOR, SERVEI, and SEMNIM. *Clin Transl Oncol***22**, 647-662 (2020).
69. D. B. Longley, D. P. Harkin, P. G. Johnston, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer***3**, 330-338 (2003).
70. D. Machover, A comprehensive review of 5-fluorouracil and leucovorin in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer***80**, 1179-1187 (1997).
71. J. Graham, M. Mushin, P. Kirkpatrick, Oxaliplatin. *Nat Rev Drug Discov***3**, 11-12 (2004).
72. C. Bailly, Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacol Res***148**, 104398 (2019).
73. D. Cunningham *et al.*, Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med***351**, 337-345 (2004).
74. I. H. Sahin, A. A. Oktay, EGFR signalling and oncogenic pathway signature in colorectal cancer. *Gut***62**, 1670 (2013).
75. A. Lievre *et al.*, KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res***66**, 3992-3995 (2006).
76. S. Kasper *et al.*, Biweekly Cetuximab Plus FOLFOX6 as First-Line Therapy in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The CEBIFOX Trial. *Clin Colorectal Cancer***19**, 236-247 e236 (2020).
77. S. Stintzing *et al.*, FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol***17**, 1426-1434 (2016).
78. W. De Roock *et al.*, KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol***19**, 508-515 (2008).
79. J. Y. Douillard *et al.*, Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol***25**, 1346-1355 (2014).
80. M. Peeters *et al.*, Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res***19**, 1902-1912 (2013).
81. E. Van Cutsem *et al.*, Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol***33**, 692-700 (2015).
82. E. M. J. van Brummelen *et al.*, Phase I Study of Afatinib and Selumetinib in Patients with KRAS-Mutated Colorectal, Non-Small Cell Lung, and Pancreatic Cancer. *Oncologist***26**, 290-e545 (2021).
83. G. C. A. German Guideline Programm in Oncology (German Cancer Society, AWMF). (2019).
84. B. Herpers *et al.*, Functional patient-derived organoid screenings identify MCLA-158 as a therapeutic EGFR x LGR5 bispecific antibody with efficacy in epithelial tumors. *Nat Cancer***3**, 418-436 (2022).
85. E. L. LaGory, A. J. Giaccia, The ever-expanding role of HIF in tumour and stromal biology. *Nat Cell Biol***18**, 356-365 (2016).
86. N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber, W. Novotny, Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov***3**, 391-400 (2004).
87. J. H. Strickler, H. I. Hurwitz, Bevacizumab-based therapies in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncologist***17**, 513-524 (2012).
88. M. Bjerknes, H. Cheng, Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods Enzymol***419**, 337-383 (2006).
89. E. Marshman, C. Booth, C. S. Potten, The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays***24**, 91-98 (2002).
90. C. S. Potten, L. Kovacs, E. Hamilton, Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet***7**, 271-283 (1974).
91. H. Cheng, C. P. Leblond, Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat***141**, 537-561 (1974).
92. L. G. Van der Flier *et al.*, The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology***132**, 628-632 (2007).

93. V. Dietinger *et al.*, Wnt-driven LARGE2 mediates laminin-adhesive O-glycosylation in human colonic epithelial cells and colorectal cancer. *Cell Commun Signal***18**, 102 (2020).
94. T. Sato *et al.*, Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature***459**, 262-265 (2009).
95. T. Sato *et al.*, Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature***469**, 415-418 (2011).
96. F. D'Addio *et al.*, Circulating IGF-I and IGFBP3 Levels Control Human Colonic Stem Cell Function and Are Disrupted in Diabetic Enteropathy. *Cell Stem Cell***17**, 486-498 (2015).
97. A. Fernandez-Barral *et al.*, Vitamin D differentially regulates colon stem cells in patient-derived normal and tumor organoids. *FEBS J***287**, 53-72 (2020).
98. I. Dotti *et al.*, Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut***66**, 2069-2079 (2017).
99. R. Mora-Buch *et al.*, Epithelial IL-1R2 acts as a homeostatic regulator during remission of ulcerative colitis. *Mucosal Immunol***9**, 950-959 (2016).
100. L. Walcher *et al.*, Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol***11**, 1280 (2020).
101. F. de Sousa e Melo *et al.*, A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature***543**, 676-680 (2017).
102. M. Shimokawa *et al.*, Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature***545**, 187-192 (2017).
103. A. G. Schepers *et al.*, Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science***337**, 730-735 (2012).
104. C. Morral *et al.*, Zonation of Ribosomal DNA Transcription Defines a Stem Cell Hierarchy in Colorectal Cancer. *Cell Stem Cell***26**, 845-861 e812 (2020).
105. K. Moreau, S. Luo, D. C. Rubinsztein, Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol***22**, 206-211 (2010).
106. L. Vermeulen *et al.*, Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol***12**, 468-476 (2010).
107. F. M. Barriga *et al.*, Mex3a Marks a Slowly Dividing Subpopulation of Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Stem Cell***20**, 801-816 e807 (2017).
108. U. Ben-David *et al.*, Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet***49**, 1567-1575 (2017).
109. A. Calon *et al.*, Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell***22**, 571-584 (2012).
110. M. Fujii *et al.*, A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell***18**, 827-838 (2016).
111. M. van de Wetering *et al.*, Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell***161**, 933-945 (2015).
112. L. Brandl *et al.*, Targeting c-MYC through Interference with NAMPT and SIRT1 and Their Association to Oncogenic Drivers in Murine Serrated Intestinal Tumorigenesis. *Neoplasia***21**, 974-988 (2019).
113. S. F. Roerink *et al.*, Intra-tumour diversification in colorectal cancer at the single-cell level. *Nature***556**, 457-462 (2018).
114. H. C. Clevers, Organoids: Avatars for Personalized Medicine. *Keio J Med***68**, 95 (2019).
115. S. N. Ooft *et al.*, Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Sci Transl Med***11**, (2019).
116. J. Drost *et al.*, Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature***521**, 43-47 (2015).
117. M. Matano *et al.*, Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat Med***21**, 256-262 (2015).
118. M. H. Mosa *et al.*, A Wnt-Induced Phenotypic Switch in Cancer-Associated Fibroblasts Inhibits EMT in Colorectal Cancer. *Cancer Res***80**, 5569-5582 (2020).
119. J. Puschhof *et al.*, Intestinal organoid cocultures with microbes. *Nat Protoc***16**, 4633-4649 (2021).
120. T. E. Schnalzger *et al.*, 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids. *EMBO J***38**, (2019).
121. K. Yuki, N. Cheng, M. Nakano, C. J. Kuo, Organoid Models of Tumor Immunology. *Trends Immunol***41**, 652-664 (2020).
122. A. M. Jubb *et al.*, Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. *Oncogene***25**, 3445-3457 (2006).
123. Y. Yamamoto *et al.*, Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology***37**, 528-533 (2003).

124. O. J. Sansom *et al.*, Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature***446**, 676-679 (2007).
125. S. Wu *et al.*, Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene***22**, 351-360 (2003).
126. S. Jaeckel *et al.*, Ap4 is rate limiting for intestinal tumor formation by controlling the homeostasis of intestinal stem cells. *Nat Commun***9**, 3573 (2018).
127. W. de Lau, W. C. Peng, P. Gros, H. Clevers, The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev***28**, 305-316 (2014).
128. A. Merlos-Suarez, E. Batlle, Eph-ephrin signalling in adult tissues and cancer. *Curr Opin Cell Biol***20**, 194-200 (2008).
129. C. Cortina *et al.*, EphB-ephrin-B interactions suppress colorectal cancer progression by compartmentalizing tumor cells. *Nat Genet***39**, 1376-1383 (2007).
130. G. Solanas, C. Cortina, M. Sevillano, E. Batlle, Cleavage of E-cadherin by ADAM10 mediates epithelial cell sorting downstream of EphB signalling. *Nat Cell Biol***13**, 1100-1107 (2011).
131. K. Mossie *et al.*, Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene***11**, 2179-2184 (1995).
132. H. Berger, A. Wodarz, A. Borchers, PTK7 Faces the Wnt in Development and Disease. *Front Cell Dev Biol***5**, 31 (2017).
133. N. R. Dunn, N. S. Tolwinski, Ptk7 and Mcc, Unfancied Components in Non-Canonical Wnt Signaling and Cancer. *Cancers (Basel)***8**, (2016).
134. C. Niehrs, The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol***13**, 767-779 (2012).
135. S. J. Buczacki *et al.*, Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing Lgr5. *Nature***495**, 65-69 (2013).
136. M. O. Sheikh, S. M. Halmo, L. Wells, Recent advancements in understanding mammalian O-mannosylation. *Glycobiology***27**, 806-819 (2017).
137. N. Sasaki, H. Clevers, Studying cellular heterogeneity and drug sensitivity in colorectal cancer using organoid technology. *Curr Opin Genet Dev***52**, 117-122 (2018).
138. F. Schutgens, H. Clevers, Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. *Annu Rev Pathol***15**, 211-234 (2020).
139. G. Vlachogiannis *et al.*, Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science***359**, 920-926 (2018).
140. D. Dauch *et al.*, A MYC-aurora kinase A protein complex represents an actionable drug target in p53-altered liver cancer. *Nat Med***22**, 744-753 (2016).
141. K. N. Shah *et al.*, Aurora kinase A drives the evolution of resistance to third-generation EGFR inhibitors in lung cancer. *Nat Med***25**, 111-118 (2019).
142. C. S. Verissimo *et al.*, Targeting mutant RAS in patient-derived colorectal cancer organoids by combinatorial drug screening. *Elife***5**, (2016).
143. A. S. Nikonova, I. Astasurov, I. G. Serebriiskii, R. L. Dunbrack, Jr., E. A. Golemis, Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci***70**, 661-687 (2013).
144. N. M. Levinson, The multifaceted allosteric regulation of Aurora kinase A. *Biochem J***475**, 2025-2042 (2018).
145. A. H. Sillars-Hardebol *et al.*, TPX2 and AURKA promote 20q amplicon-driven colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut***61**, 1568-1575 (2012).
146. L. Niu, C. Gao, Y. Li, Identification of potential core genes in colorectal carcinoma and key genes in colorectal cancer liver metastasis using bioinformatics analysis. *Sci Rep***11**, 23938 (2021).
147. N. Ertych *et al.*, Increased microtubule assembly rates influence chromosomal instability in colorectal cancer cells. *Nat Cell Biol***16**, 779-791 (2014).
148. Y. Baba *et al.*, Aurora-A expression is independently associated with chromosomal instability in colorectal cancer. *Neoplasia***11**, 418-425 (2009).
149. P. Jung, D. Horst, T. Kirchner, F. Klauschen, J. Neumann, AURKA is a prognostic biomarker for good overall survival in stage II colorectal cancer patients. *Pathol Res Pract***235**, 153936 (2022).
150. J. A. Goos *et al.*, Aurora kinase A (AURKA) expression in colorectal cancer liver metastasis is associated with poor prognosis. *Br J Cancer***109**, 2445-2452 (2013).
151. H. M. Koh *et al.*, Aurora Kinase A Is a Prognostic Marker in Colorectal Adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med***51**, 32-39 (2017).
152. E. J. Belt *et al.*, Cell cycle proteins predict recurrence in stage II and III colon cancer. *Ann Surg Oncol***19 Suppl 3**, S682-692 (2012).
153. R. Du, C. Huang, K. Liu, X. Li, Z. Dong, Targeting AURKA in Cancer: molecular mechanisms and opportunities for Cancer therapy. *Mol Cancer***20**, 15 (2021).
154. E. W. Lake *et al.*, Quantitative conformational profiling of kinase inhibitors reveals origins of selectivity for Aurora kinase activation states. *Proc Natl Acad Sci U S A***115**, E11894-E11903 (2018).

155. M. Brockmann *et al.*, Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma. *Cancer Cell***24**, 75-89 (2013).
156. W. C. Gustafson *et al.*, Drugging MYCN through an allosteric transition in Aurora kinase A. *Cancer Cell***26**, 414-427 (2014).
157. T. B. Sells *et al.*, MLN8054 and Alisertib (MLN8237): Discovery of Selective Oral Aurora A Inhibitors. *ACS Med Chem Lett***6**, 630-634 (2015).
158. P. M. Barr *et al.*, Phase II Intergroup Trial of Alisertib in Relapsed and Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma and Transformed Mycosis Fungoides: SWOG 1108. *J Clin Oncol***33**, 2399-2404 (2015).
159. H. Beltran *et al.*, A Phase II Trial of the Aurora Kinase A Inhibitor Alisertib for Patients with Castration-resistant and Neuroendocrine Prostate Cancer: Efficacy and Biomarkers. *Clin Cancer Res***25**, 43-51 (2019).
160. A. M. Brunner *et al.*, Alisertib plus induction chemotherapy in previously untreated patients with high-risk, acute myeloid leukaemia: a single-arm, phase 2 trial. *Lancet Haematol***7**, e122-e133 (2020).
161. G. Falchook *et al.*, Alisertib in Combination With Weekly Paclitaxel in Patients With Advanced Breast Cancer or Recurrent Ovarian Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol***5**, e183773 (2019).
162. O. A. O'Connor *et al.*, Randomized Phase III Study of Alisertib or Investigator's Choice (Selected Single Agent) in Patients With Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol***37**, 613-623 (2019).
163. M. Bekes, D. R. Langley, C. M. Crews, PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov***21**, 181-200 (2022).
164. B. Adhikari *et al.*, PROTAC-mediated degradation reveals a non-catalytic function of AURORA-A kinase. *Nat Chem Biol***16**, 1179-1188 (2020).

8 Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen (Stand 05/2022)

8.1 Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

Jung P, Horst D, Kirchner T, Klauschen F, Neumann J. AURKA is a prognostic biomarker for good overall survival in stage II colorectal cancer patients. *Pathol Res Pract*. 2022 May 6;235:153936.

DOI: [10.1016/j.prp.2022.153936](https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153936)

Impact factor: 3.25

Boos, S., Kumbrink, J., Voßberg, S., Engleitner T., Loevenich, Kaller, M., L., Michl M., Jung A., Greif, P., Hermeking H., Neumann, J., Kirchner T., Rad. R., **Jung, P.** (2022). Chemotolerance modeling on tumor organoids reveals AURKA as a promising therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2022;13(2):517-540. Epub 2021 Oct 23.

DOI: [10.1016/j.jcmgh.2021.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.10.008)

Impact factor: 9.225

Dietinger V, García de Durango C, Wiechmann S, Boos S, Michl M., Neumann J, Hermeking H, Kuster B, **Jung P** (2020). Wnt-driven LARGE2 mediates laminin-adhesive O-glycosylation in human colonic epithelial cells and colorectal cancer. *Cell Communication & Signaling*, Jun 25;18:102; doi: 10.1186/s12964-020-00561-6.

DOI: [10.1186/s12964-020-00561-6](https://doi.org/10.1186/s12964-020-00561-6)

Impact factor: 5.712

Jung P., Sommer C., Barriga F., Buczacki, SJ., Hernando J., Sevillano M., Duran-Frigola M., Aloy P., Selbach M., Winton D.J., Batlle E. (2015) "Isolation of human colon stem cells using surface expression of Protein Tyrosine Kinase Receptor 7 (PTK7)", *Stem Cell Reports*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.003>.

DOI: [10.1016/j.stemcr.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.003)

Impact factor: 8.01

Jung P.*, Sato, T.*, Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H. Gallardo M.M., Blasco, M.A., Sancho, E., Clevers, H., Batlle, E. et al.(2011)"Isolation and *in vitro* expansion of human colonic stem cells", *Nature Medicine* 17,1225-1227.

DOI: [10.1038/nm.2470](https://doi.org/10.1038/nm.2470)

* these authors contributed equally to this work

Impact Factor: 22.462

Jung, P., Menssen, A., Mayr, D. & Hermeking, H (2008) "AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21", *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(39), 15046-51

DOI: [10.1073/pnas.0801773105](https://doi.org/10.1073/pnas.0801773105)

Impact Factor: 9.38

Jung, P., Verdoodt, B., Bailey, A., Yates, JR 3rd, Menssen, A. & Hermeking, H. (2007)"Induction of Cullin 7 by DNA damage attenuates p53 function", *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11388-93

DOI: [10.1073/pnas.0609467104](https://doi.org/10.1073/pnas.0609467104)

Impact Factor: 9.598

Jung, P.*, Epanchintsev, A.*, Menssen, A. & Hermeking, H. (2006)"Inducible microRNA expression by an all-in-one episomal vector", *Nucleic Acids Research* **34** (18):e119

DOI: [10.1093/nar/gkl624](https://doi.org/10.1093/nar/gkl624)

* these authors contributed equally to this work

Impact Factor: 7.531

8.1.1 Übersichtsartikel/Reviews

Jung, P.; Hermeking, H. (2009) "The c-MYC-AP4-p21 cascade" *Cell cycle* **8** (7), 982-9

DOI: [10.4161/cc.8.7.7949](https://doi.org/10.4161/cc.8.7.7949)

Impact Factor: 4.374

8.2 Originalarbeiten als Koautor

Woischke C, **Jung P**, Jung A, Kumbrink J, Eisenlohr S, Auernhammer CJ, Vieth M, Kirchner T, Neumann J (2021). Mixed large cell neuroendocrine carcinoma and squamous cell carcinoma of the colon: detailed molecular characterisation of two cases indicates a distinct colorectal cancer entity. *J Pathol Clin Res.* Jan;7(1):75-85.

DOI: [10.1002/cjp2.183](https://doi.org/10.1002/cjp2.183)

Impact Factor: 3.426

Fernández-Barral A, Costales-Carrera A, Buirra SP, **Jung P**, Ferrer-Mayorga G, Larriba MJ, Bustamante-Madrid P, Domínguez O, Real FX, Guerra-Pastrián L, Lafarga M, García-Olmo D, Cantero R, Del Peso L, Batlle E, Rojo F, Muñoz A, Barbáchano A (2020). Vitamin D differentially regulates colon stem cells in patient-derived normal and tumor organoids. *FEBS Journal*, Jan;287(1):53-72

DOI: [10.1111/febs.14998](https://doi.org/10.1111/febs.14998)

Impact Factor: 4.392

Brandl L, Zhang Y, Kirstein N, Sendelhofert A, Boos S, **Jung P**, Greten F, Rad R, Menssen A (2019). Targeting c-MYC through Interference with NAMPT and SIRT1 and Their Association to Oncogenic Drivers in Murine Serrated Intestinal Tumorigenesis. *Neoplasia*, Oct;21(10):974-988.

DOI: [10.1016/j.neo.2019.07.009](https://doi.org/10.1016/j.neo.2019.07.009)

Impact Factor: 5.696

Jaeckel S, Kaller M, Jackstadt R, Götz U, Müller S, Boos S, Horst D, **Jung P** & Hermeking H. (2018) "Ap4 is rate limiting for intestinal tumor formation by controlling the homeostasis of intestinal stem cells". *Nature Communications*, Sep 3;9(1):3573.

DOI: [10.1038/s41467-018-06001-x](https://doi.org/10.1038/s41467-018-06001-x)

Impact Factor: 12.121

Dotti I, Mora-Buch R, Ferrer-Picón E, Planell N, **Jung P**, Masamunt MC, Leal RF, Martín de Carpi J, Llach J, Ordás I, Batlle E, Panés J, Salas A. (2017) Alterations in the epithelial stem cell compartment could contribute to permanent changes in the mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut*, 2017 Dec;66(12):2069-2079.

DOI: [10.1136/gutjnl-2016-312609](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312609)

Impact Factor: 17.016

Mora-Buch R., Dotti I., Planell N., Calderón-Gómez E., **Jung P.**, Masamunt MC, Llach J., Ricart E., Batlle E., Panés J., Salas A. (2016) "Epithelial IL-1R2 acts as a homeostatic regulator during remission of ulcerative colitis", *Mucosal Immunology*, 2016 Jul;9(4):950-9.

DOI: [10.1038/mi.2015.108](https://doi.org/10.1038/mi.2015.108)

Impact Factor: 7.478

D'Addio F., La Rosa S., Maestroni A., **Jung P.**, Orsenigo E., Ben Nasr M., Tezza S., Bassi R., Finzi G., Marando A., Vergani A, Frego R., Albarello L., Andolfo A., Manuguerra R., Corradi D., Viale E., Batlle E., Staudacher C., Breault D., Secchi A., Folli F. and Fiorina P. (2015) "The peripheral IGF-I/IGFBP3 dyad controls the intestinal stem cell niche in humans", *Cell Stem Cell*, Oct 1;17(4):486-98.

DOI: [10.1016/j.stem.2015.07.010](https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.010)

Impact Factor: 22.387

Whissell G., Montagni E., Martinelli P., Hernando-Momblona X., Sevillano M., **Jung P.**, Cortina C., Calon A., Abuli A., Castells A., Castellvi-Bel S., Nacht AS., Sancho E., Stephan-Otto Attolini C., Vicent GP., Real FX., Batlle E. (2014) "The transcription factor GATA6 enables self-renewal of colon adenoma stem cells by repressing BMP gene expression", *Nat Cell Biol.* Jul;16(7):695-707

DOI: [10.1038/ncb2992](https://doi.org/10.1038/ncb2992)

Impact Factor: 19.679

Jackstadt R., **Jung P.**, Hermeking, H., (2013) "AP4 directly down-regulates the tumor suppressor p16/INK4A and p21/WAF1 to suppress senescence and mediate transformation", *Cell Death Dis.* 2013, 4:e775.

DOI: [10.1038/cddis.2013.282](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.282)

Impact Factor: 8.928

Jackstadt R., Röh S., Neumann S, **Jung P.**, Hoffmann R., Horst D., Berens C., Bornkamm GW, Kirchner T., Menssen A. and Hermeking H. (2013), "AP4 is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in colorectal cancer", *J Exp Med.* 210(7):1331-50.

DOI: [10.1084/jem.20120812](https://doi.org/10.1084/jem.20120812)

Impact Factor: 13.912

Calon, A., Espinet, E., Palomo-Ponce, S., Tauriello, D.V., Iglesias, M., Virtudes Céspedes, M., Sevillano, M., Nadal, C., **Jung, P.**, Zhang, XH, Rossell, D., Manges, R., Massague, J., Sancho, E., Batlle, E. (2012), "Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta transcriptional program in tumor-associated stromal cells for metastasis initiation", *Cancer Cell* 22, 571-584.

DOI: [10.1016/j.ccr.2012.08.013](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.08.013)

Impact Factor: 24.755

Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., **Jung P.**, Iglesias, M., Céspedes M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz P., Clevers, H., Sancho, E., Manges, R., Batlle, E (2011). "The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse", *Cell Stem Cell* 8, 5, 511-524.

DOI: [10.1016/j.stem.2011.02.020](https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.020)

Impact Factor: 25.421

Mathivanan S, Ahmed M, Ahn NG, Alexandre H, Amanchy R, Andrews PC, Bader JS, Balgley BM, Bantscheff M, Bennett KL, Björling E, Blagoev B, Bose R, Brahmachari SK, Burlingame AS, Bustelo XR, Cagney G, Cantin GT, Cardasis HL, Celis JE, Chaerkady R, Chu F, Cole PA, Costello CE, Cotter RJ, Crockett D, DeLany JP, DeMarzo AM, DeSouza LV, Deutsch EW, Dransfield E, Drewes G, Droit A, Dunn MJ, Elenitoba-Johnson K, Ewing RM, Van Eyk J, Faca V, Falkner J, Fang X, Fenselau C, Figeys D, Gagné P, Gelfi C, Gevaert K, Gimble JM, Gnad F, Goel R, Gromov P, Hanash SM, Hancock WS, Harsha HC, Hart G, Hays F, He F, Hebbar P, Helsens K, Hermeking H, Hide W, Hjernø K, Hochstrasser DF, Hofmann O, Horn DM, Hruban RH, N, James P, Jensen ON, Jensen PH, **Jung P.**, Kandasamy K, Kheterpal I, Kikuno RF, Korf U, Körner R, Kuster B, Kwon MS, Lee HJ, Lee YJ, Lefevre M, Lehvaslaiho M, Lescuyer P, Levander F, Lim MS, Löbke C, Loo JA, Mann M, Martens L, Martinez-Heredia J, McComb M, McRedmond J, Mehrle A, Menon R, Miller CA, Mischak H, Mohan SS, Mohmood R, Molina H, Moran MF, Morgan JD, Moritz R, Morzel M, Muddiman DC, Nalli A, Navarro JD, Neubert TA, Ohara O, Oliva R, Omenn GS, Oyama M, Paik YK, Pennington K, Pepperkok R, Periaswamy B, Petricoin EF, Poirier GG, Prasad TS, Purvine SO, Rahiman BA, Ramachandran P, Ramachandra YL, Rice RH, Rick J, Ronnholm RH, Salonen J, Sanchez JC, Sayd T, Seshi B, Shankari K, Sheng SJ, Shetty V, Shivakumar K, Simpson RJ, Sirdeshmukh R, Siu KW, Smith JC, Smith RD, States DJ, Sugano S, Sullivan M, Superti-Furga G, Takatalo M, Thongboonkerd V, Trinidad JC, Uhlen M, Vandekerckhove J, Vasilescu J, Veenstra TD, Vidal-Taboada JM, Vihinen M, Wait R, Wang X, Wiemann S, Wu B, Xu T, Yates JR, Zhong J, Zhou M, Zhu Y, Zurbig P, Pandey A. (2008) Human Proteinpedia enables sharing of human protein data. *Nature Biotechnology*, Feb;26(2):164-7.

DOI: [10.1038/nbt0208-164](https://doi.org/10.1038/nbt0208-164)

Impact Factor: 22.297

Tarasov, V., **Jung, P.**, Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G. & Hermeking, H. (2007)“Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G₁-arrest”, *Cell cycle* **6** (13), 1586-93

DOI: [10.4161/cc.6.13.4436](https://doi.org/10.4161/cc.6.13.4436)

Impact Factor: 3.570

Menssen, A., Epanchintsev, A., Lodygin, D., Rezaei, N., **Jung P.**, Verdoodt, B., Diebold, J. & Hermeking, H. (2007)“c-MYC Delays Prometaphase by Direct Transactivation of MAD2 and BubRI: Identification of Mechanisms Underlying c-MYC-Induced DNA damage and Chromosomal Instability”, *Cell cycle* **6** (3), 339-352

DOI: [10.4161/cc.6.3.3808](https://doi.org/10.4161/cc.6.3.3808)

Impact Factor: 3.570

9 Danksagung

Ohne die Unterstützung meiner direkten Kollegen, Kollaborationspartner, Freunde, und meiner Familie wäre die Verwirklichung dieses Habilitationsprojekts nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken!

Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Pathologie, und Herrn Prof. Dr. Heiko Hermeking sowie Herrn Prof. Dr. Jens Neumann für die langjährige Unterstützung, Kollaboration, und deren Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken, welches mir eine große Stütze bei der Verwirklichung von mehreren Forschungsprojekten war.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner und Herrn Prof. Dr. Frederick Klauschen, dem Direktor des Instituts für Pathologie, für die Möglichkeit der Durchführung der dem Habilitationsprojekt zugrundeliegenden Studien in einem angenehmen und inspirierenden Arbeitsumfeld bedanken, ebenso wie am Institut für biomedizinische Forschung (IRB) in Barcelona bei Herrn Dr. Eduard Batlle.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Frederick Klauschen, Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner und Herrn Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt, dem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik III sowie DKTK Standortsprecher für die hervorragende und sehr konstruktive Betreuung als Mitglieder des Fachmentorats danken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den weiteren Kollaborationspartnern Prof. Dr. Bernhard Küster und Dr. Svenja Wiechmann (TUM Freising), Prof. Dr. Roland Rad, Prof. Dr. Dieter Saur, Dr. Markus Tschurtschenthaler (DKTK/TUM München), Prof. Dr. Matthias Selbach (MDC-Berlin), Prof. Dr. David Horst (Charité Berlin), Prof. Dr. Hans Clevers (Hubrecht Institute, Utrecht, Niederlande) und Dr. Toshiro Sato (Keio University, Japan), sowie Prof. Dr. Andreas Jung und Priv.-Doz. Dr. Jörg Kumbrink (Institut für Pathologie, LMU).

Persönlich bedanke ich mich besonders bei meinen Eltern Gudrun und Hans-Joachim sowie meiner Großmutter Liselotte für ihre persönliche Unterstützung und ihr Verständnis in Forschungs-intensiven Zeiten.

10 Originalarbeiten der Habilitationsschrift

AURKA is a prognostic biomarker for good overall survival in stage II colorectal cancer patients.

Jung P, Horst D, Kirchner T, Klauschen F, Neumann J (2022).
Pathol Res Pract. 235:153936. PMID: 35576834.

Disease modeling on tumor organoids implicates AURKA as a therapeutic target in liver metastatic colorectal cancer.

Boos SL, Loevenich LP, Vosberg S, Engleitner T, Öllinger R, Kumbrink J, Rokavec M, Michl M, Greif PA, Jung A, Hermeking H, Neumann J, Kirchner T, Rad R, Jung P (2022).
Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 13(2):517-540. PMID: 34700030.

Wnt-driven LARGE2 mediates laminin-adhesive O-glycosylation in human colonic epithelial cells and colorectal cancer.

Dietinger V, García de Durango C, Wiechmann S, Boos S, Michl M., Neumann J, Hermeking H, Küster B, Jung P (2020). PMID: 32586342.

Ap4 is rate limiting for intestinal tumor formation by controlling the homeostasis of intestinal stemcells.

Jaeckel S, Kaller M, Jackstadt R, Götz U, Müller S, Boos S, Horst D, Jung P & Hermeking H. (2018).
Nature Communications, Sep 3;9(1):3573. PMID: 30177706.

Isolation of human colon stem cells using surface expression of Protein Tyrosine Kinase Receptor 7 (PTK7).

Jung P., Sommer C., Barriga F., Buczacki, S.J., Hernando J., Sevillano M., Duran-Frigola M., Aloy P., Selbach M., Winton D.J., Batlle E. (2015).
Stem Cell Reports, 5(6):979-987. PMID: 26549850

Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells.

Jung P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F.M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H. Gallardo M.M., Blasco, M.A., Sancho, E., Clevers, H., Batlle, E. et al.(2011).
Nature Medicine 17,1225-1227. PMID: 21892181

The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse.

Suárez, A., Barriga, F.M., Jung P., Iglesias, M., Céspedes M.V., Rossell, D., Sevillano, M., Hernando-Momblona, X., da Silva-Diz, V., Muñoz P., Clevers, H., Sancho, E., Mangues, R., Batlle, E (2011).
Cell Stem Cell 8, 5, 511-524. PMID: 21419747.

The c-MYC-AP4-p21 cascade.

Jung, P.; Hermeking, H. (2009).
Cell cycle 8 (7), 982-9. PMID: 19270520

AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21.

Jung, P., Menssen, A., Mayr, D. & Hermeking, H (2008).
Proc Natl Acad Sci U S A 105(39), 15046-51. PMID: 18818310