

## Summary

Lung cancer comprises the entities of non-small cell lung carcinomas (NSCLC) and small cell lung carcinomas (SCLC) and represents the cancer type with the highest rates of mortality.

SCLC accounts for 14 % of lung cancer cases and is characterized by typical small cell morphology, neuroendocrine differentiation, aggressive tumor biology and early systemic metastases. These features of 'small cell-ness' were also identified in other extrapulmonary small cell carcinomas (SCC) found for example in the prostate. SCLC and SCC harbor dominant oncogenic lesions in *RB1* and *TP53*. The synchronous bi-allelic functional loss of both factors is potent to trigger SCLC in *in vivo* models. SCLC occurs as a pure primary pulmonary tumor or as a combined tumor with non-small cell components or as a relapse after targeted therapy of NSCLC which we define as secondary SCLC.

Since SCLC predominantly originates from neuroendocrine precursor cells, we propose an alternative signaling pathway for secondary SCLC, for which we suggest a non-small cell tumor precursor.

Thus, we identified a NOTCH - ascl1 dependent pathway which contributed to 'small cell-ness' and mediated the pathology of SCLC together with synchronously functionally inactive RB and p53. Importantly, we found inactivating NOTCH mutations and synchronous lesions in *RB1* and *TP53* in neuroendocrine differentiated lung carcinomas especially in secondary SCLC. Moreover, we showed a morphological switch towards 'small cell-ness' upon ASCL1 expression. Thereby ASCL1 was targeted by NOTCH signaling and itself triggered canonical wingless-type (WNT) signaling.

Taken together, we define 'small cell-ness' *in vitro* and *in vivo* mediated by a NOTCH-ASCL1-RB-p53 driven pathway which is especially important in secondary SCLC.

Unpublished data from a NOTCH1 knock-out in a KRAS<sup>G12V</sup> driven murine lung carcinoma model indicated an effect of functional NOTCH1 loss on tumor induction. However, a phenotypical switch towards 'small cell-ness' was not observed.

## Zusammenfassung

Lungenkrebs gehört weltweit zu den Krebserkrankungen mit der höchsten Mortalitätsrate. Dabei umfasst Lungenkrebs die Tumorentitäten des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (*engl. non-small cell lung carcinoma, NSCLC*) und des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (*engl. small cell lung carcinoma, SCLC*).

Das SCLC liegt etwa bei 14 % aller Lungenkrebserkrankungen vor und zeichnet sich durch eine äußerst aggressive Tumorbilologie mit früher Metastasierung aus. Außerdem zeigt das SCLC eine charakteristische kleinzellige Morphologie und neuroendokrine Differenzierung, was man auch in extrapulmonären kleinzelligen Karzinomen (*engl. small cell carcinoma, SCC*) findet.

Die dominanten onkogenen Treibermutationen im SCLC liegen im *RB1* (codiert für das Retinoblastomprotein, RB) und dem *TP53* Gen (codiert für das Tumorsuppressorprotein 53, p53). Der gleichzeitige bi-allelische funktionelle Verlust von *RB1* und *TP53* ist die dominante genetische Läsion, die im SCLC identifiziert wurde, und ist ebenfalls notwendig, um es in *in vivo* Modellen zu induzieren. Die genannten genetischen Veränderungen wurden auch in anderen SCC, wie dem Prostatakarzinom, gefunden.

Das SCLC tritt zum einen als reiner pulmonärer Primärtumor, zum anderen als kombinierter Tumor mit einer nicht-kleinzelligen Komponente, oder als Rezidiv insbesondere nach zielgerichteter Behandlung eines NSCLC, auf. Dieses SCLC Rezidiv bezeichnen wir als sekundäres SCLC, da wir vermuten, dass es aus einem nicht-neuroendokrinen mitunter auch nicht-kleinzelligen Vorläufer hervorgeht.

Da das SCLC neuroendokrin differenziert ist und vornehmlich aus neuroendokrinen pulmonären Vorläuferzellen entsteht, gehen wir von einem alternativen Signalweg für die neuroendokrine Differenzierung und die „Kleinzelligkeit“ (*engl. „small cell-ness“*) im sekundären SCLC an.

So haben wir einen NOTCH-ASCL1 (*engl. achaete-scute homologue 1*) abhängigen Signalweg identifiziert, der maßgeblich zur „Kleinzelligkeit“ beiträgt und zusammen mit einem bi-allelischen funktionellen Verlust von *RB1* und *TP53* der Pathologie eines SCLC und auch eines SCC zu Grunde liegen kann.

Besonders wichtig war dabei die Identifizierung von inaktivierenden NOTCH Mutationen und der gleichzeitige Verlust von funktionellem RB und p53 in neuroendokrinen Lungenkarzinomen vor allem im sekundären SCLC.

Außerdem konnten wir die morphologische Veränderung zur „Kleinzelligkeit“ durch ASCL1 Expression zeigen. Dabei wurde ASCL1 Expression durch den NOTCH

Signalweg reguliert und vermittelt selbst die Aktivierung des kanonischen WNT (*engl. wiggless-type*) Signalwegs.

Zusammenfassend definieren wir hier die „Kleinzelligkeit“ *in vitro* und *in vivo* und identifizierten den NOTCH-ASCL1-RB-p53 getriebenen Signalweg, der dieser „Kleinzelligkeit“ zu Grunde liegt, insbesondere im sekundären SCLC.

Bislang unpublizierte Daten eines NOTCH1 knock-outs in einem KRAS<sup>G12V</sup> getriebenen murinen Lungenkarzinommodell, zeigten einen Effekt von funktionellem NOTCH1 Verlust auf die Tumorentstehung. Ein neuroendokriner oder kleinzelliger Phänotyp konnte unter Verwendung dieses *in vivo* Modells jedoch nicht erzeugt werden.