

Abstract

Malignancies of the lung account for most of all cancer-related deaths worldwide, with non-small cell lung cancer (NSCLC) being the most frequent subtype of lung cancer. The discovery of therapeutically accessible driver mutations has turned unspecific treatment approaches towards cancer cell-specific, personalized medicine. In lung adenocarcinomas (LUAD), oncogenic drivers such as mutant KRAS or mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) are able to promote cancer cell growth constitutively. Consequently, KRAS^{G12C}-specific inhibitors such as sotorasib or EGFR kinase inhibitors such as osimertinib have been developed to treat patients. Despite remarkable response rates, therapy efficacy is limited by the emergence of resistance, which is commonly caused by a minority of the tumor cells. These drug-tolerant persister cells (DTPs) enter a reversible, senescent-like phenotype and persist the treatment. With prolonged survival, they acquire genetic mutations potentially promoting resistance. In triple mutant (*TP53*, *RB1*, *EGFR*) LUAD, transformation into small cell lung cancer (SCLC) has been observed as a mechanism to acquire resistance. This transformation limits patients' overall survival while impacting therapeutic options. SCLC patients are commonly treated with chemotherapy in combination with immunotherapy due to the lack of therapeutically exploitable cancer vulnerabilities. While the deficiency of RB Transcriptional Corepressor 1 (*RB1*) seems to be a pre-requisite for SCLC transformation, the loss of the tumor suppressor *RB1* is not sufficient to drive the process. Therefore, a genome-wide screening approach was applied to identify *RB1*-specific drivers of therapy resistance. To this end, a *RB1*-deficient cellular model was established that may escape EGFR sensitivity through altered NOTCH signaling and potentially other cellular pathways such as ALK signaling. Thereby, *RB1* affects resistance-promoting mechanisms prior to SCLC transformation.

Beyond SCLC transformation, another type of tumor plasticity program, namely epithelial to mesenchymal transition (EMT), is frequently associated with drug resistance against targeted therapy in LUAD. A systematic analysis of core EMT transcription factors (TF) identified increased expression exclusively for snail family transcriptional repressor 2 (SLUG). While involved in the transition, SLUG only partially drives EMT by regulating, among others, *FN1*. CUT&Tag analyses identified SLUG-regulated genes predominantly involved in cell cycle regulation, catabolic processes, and DNA damage response. Loss-of-function and reconstitution experiments demonstrated a so far unknown addiction of DTPs to SLUG. Consequently, SLUG enables DTP outgrowth by supporting proliferation- and maintenance-crucial processes upon targeted therapy in EGFR-mutant LUAD.

Finally, the evolution of resistance may involve the selection of pre-existing clones that harbor therapy-resistant mutations and escape mechanisms. We explored the therapy-relevant clonal composition within an EGFR-mutant LUAD population adjusted to the cell mass of a tumor. Identifying a finite number of pre-existing clones enabled us to exhaust all pre-existing clones through the iterative administration of kinase inhibitors. Furthermore, we

Abstract

found that adding the ferroptosis-inducer RSL3 may eliminate all cancer cells, demonstrating the necessity of combined treatment approaches to prevent relapse.

Taken together, multiple routes are causing resistance in LUAD. Despite being multifaceted, each route harbors individual vulnerabilities, and their exploitation could direct future therapies based on individual drug combinations.

Zusammenfassung

Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) ist die häufigste Form von Lungenkrebs. Die Karzinome der Lunge sind für die meisten krebsbedingten Todesfälle verantwortlich. Nach der Entdeckung, dass Krebszellen von ihren Onkogenen abhängig sind, hat sich die bis dahin unspezifische Behandlung von NSCLC Patienten zur einer tumorzellspezifischen und personalisierten Therapie entwickelt. Diese wird vor allem bei dem Adenokarzinom der Lunge (LUAD) angewendet. Häufig wird das Wachstum der Krebszellen in LUAD durch mutiertes KRAS oder durch den mutierten epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) getrieben. Aus diesem Grund wurden KRAS-G12C spezifische Inhibitoren wie Sotorasib oder EGFR-spezifische Inhibitoren wie Osimertinib entwickelt. Diese zielgerichteten Behandlungen führen zu einem deutlichen Therapieansprechen. Jedoch limitieren wenige Tumorzellen einen langfristigen Behandlungserfolg, da sie zu einer Resistenzentwicklung führen. Diese therapie-tolerierenden Zellen (DTPs) nehmen einen reversiblen und seneszenzähnlichen Zustand ein und persistieren über die Behandlungsdauer. Dabei können sie weitere Mutationen erlangen, die eine Resistenzbildung ermöglichen. RB Transkriptioneller Korepressor 1 (RB1)-mutierte LUAD Primärtumore können als Resistenzmechanismus unter Therapie in das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) transformieren. Diese Transformation senkt die Überlebenswahrscheinlichkeit und hat therapeutische Konsequenzen, da durch das Fehlen von spezifischen Zielmolekülen die SCLC-Behandlung auf einer unspezifischen Chemo- und Immuntherapie beruht. Zwar ist der Verlust des Tumorsuppressors RB1 eine Voraussetzung für die Transformation, jedoch reicht das Fehlen von RB1 nicht aus. Daher wurde ein genomweiter Ansatz verfolgt, um das RB1-spezifische Therapieansprechen vor der SCLC Transformation zu untersuchen. Das generierte RB1-defiziente Zellmodell konnte zeigen, dass unter anderem ein veränderter NOTCH-Signalweg zu einem Verlust der Sensitivität gegenüber EGFR-Inhibitoren beitragen könnte. Somit konnte gezeigt werden, dass RB1 die Präferenz für resistenzvermittelnde Signalwege beeinflussen kann.

Neben der Transformation in SCLC, ist die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) mit einer Resistenzentwicklung assoziiert. Neben einer verstärken EMT-Signatur in DTPs, ergab die Analyse der fünf zentralen EMT-Transkriptionsfaktoren (TF) einen selektiven und therapieinduzierten Expressionsanstieg von snail family transcriptional repressor 2 (SLUG). SLUG ist in den EMT-Prozess involviert, kann EMT aber nur teilweise induzieren wie z.B. durch die Regulation von *FN1*. Direkte SLUG-regulierte Gene konnten durch CUT&Tag Analysen identifiziert werden. Diese sind vor allem in der Zellzyklus-Kontrolle, in katabolen Stoffwechselprozessen und in Reparatursystemen von DNA Schäden relevant. Durch Funktionsverlust- und Wiederherstellungsexperimente konnte eine bisher unbekannte, direkte Abhängigkeit der DTPs von SLUG gezeigt werden. Folglich ermöglicht SLUG das

Zusammenfassung

Auswachsen von DTPs durch Unterstützung von proliferationsfördernden und erhaltungskritischen Prozessen unter zielgerichteter Therapie in EGFR-mutierten LUAD.

Neben der Entstehung von DTPs kann ein Rezidiv auch aus wenigen vor Therapie vorhandenen und bereits resistenten Tumorzellen entstehen. Zur weiteren Untersuchung der therapierelevanten und klonalen Zusammensetzung wurde eine EGFR-mutierte LUAD Population verwendet, die in der Anzahl einem Tumor entspricht. Hier wurde eine begrenzte Zahl an resistenztragenden Klonen identifiziert, welche durch iterative Behandlung mit verschiedenen Kinase-Hemmern eliminiert werden konnten. Die Therapieerweiterung durch den Ferroptose-Aktivator RSL3 hat zum kompletten Tumorzellverlust geführt. Dadurch wird die Notwendigkeit einer kombinierten Behandlung zur Vermeidung eines Rezidivs bestärkt.

Zusammenfassend gibt es verschiedene Routen, die eine Resistenzentwicklung in LUAD ermöglichen. Trotz der Vielseitigkeit beinhalten die diversen Möglichkeiten auch individuelle Schwachstellen, welche therapeutisch zur Gestaltung effizienter Kombinationsbehandlungen der Zukunft ausgenutzt werden können.