Aus der Abteilung Translationale Genomik der Universität zu Köln Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Thomas

# Die CD74-NRG1-Genfusion ist eine onkogene Treibermutation

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

> vorgelegt von Lisa Hanna Werr aus Köln

promoviert am 11. August 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

- 1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. R. K. Thomas
- 2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Fischer
- 3. Gutachter: Dr. med. univ. R. Sobert

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. Dennis Plenker Dr. Marcel Dammert Carina Lorenz Dr. Johannes Brägelmann Dr. Sebastian Klein Priv.-Doz. Dr. Thorsten Persigehl Prof. Dr. Christian Reinhardt Prof. Dr. Roman Thomas

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung von Herrn Dr. Dennis Plenker, Herrn Prof. Dr. Christian Reinhardt und Herrn Prof. Dr. Roman Thomas von mir selbst ausgeführt worden.

Die bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten erfolgte mit Unterstützung von Herrn Dr. Johannes Brägelmann und Frau Carina Lorenz.

Die in dieser Arbeit enthaltenen immunhistochemischen Färbungen wurden ohne meine Hilfe in dem Institut der Pathologie der Uniklinik Köln von Frau Alexandra Florin durchgeführt. Die Färbungen wurden gemeinsam mit Herrn Dr. Sebastian Klein ausgewertet.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkultur-Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. Marcel Dammert durchgeführt worden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten MRT-Bildgebungen von Mäusen wurden von mir im Institut für Radiologie der Uniklinik Köln nach entsprechender Anleitung von Herrn Dr. Thorsten Persigehl selbstständig durchgeführt und ausgewertet. Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen. Köln, den 29. November 2022

Unterschrift:

## Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Roman Thomas danke ich für die Betreuung sowie die Möglichkeit, in seinem Labor tätig zu sein. In den Jahren in seinem Labor sowie in fortlaufenden Projekten lernte ich, wissenschaftlich zu arbeiten. Danke für die Unterstützung bei der Entstehung dieses Projektes und das mir gegenübergebrachte Vertrauen. Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Christian Reinhardt, der mich vor allem bei den *in vivo* Experimenten mitbetreut und in der Durchführung der Experimente sehr unterstützt hat. Durch die Zusammenarbeit habt ihr mein Interesse und den Spaß an der experimentellen Forschung gefördert und meinen Karriereweg sehr beeinflusst. Vielen Dank euch beiden!

Herzlich danke ich außerdem Marcel Dammert, Hannah Tumbrink, Carina Lorenz, Dennis Plenker, Johannes Brägelmann und allen anderen aus den Laboren der Arbeitsgruppen Thomas, Sos und Reinhardt, die mich nicht nur bei Experimenten unterstützt haben, sondern ohne die die Zeit im Labor nicht die Gleiche gewesen wäre. Danke für wertvolle Diskussionen, Hilfe bei Experimenten und Unterstützung während meiner Zeit als Doktorandin und darüber hinaus!

Außerdem danke ich meinem aktuellen Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Matthias Fischer, der mir bereits vor Abschluss der Promotion das Vertrauen entgegengebracht hat, weiter wissenschaftlich tätig zu sein. Es macht mir viel Spaß, neue Projekte, auch in Zusammenarbeit mit vielen, bereits aus Promotionszeiten bekannten, Kollegen weiterzuentwickeln.

Ein sehr, sehr großer Dank geht auch an meine Familie, vor allem an meine Eltern Wolfgang Werr und Ellen Barzen und an meine Geschwister Sara und Tim, für die Unterstützung während meines ganzen Studiums und der Promotion. Beides wäre ohne euch nicht möglich gewesen und eure uneingeschränkte Unterstützung bedeutet mir sehr viel. Danke, dass ihr immer an mich glaubt! Für meine Eltern. Ihr bedeutet mir die Welt.

# Inhaltsverzeichnis

ABK	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 10		
1.	ZUSAMMENFASSUNG		13
2.	EIN	ILEITUNG	14
2.1.	Kre	bs	14
2.2. Signa	Tur Iweg	norentstehung durch Überaktivierung von Rezeptoren und nachfolgender aktivierung	15
2.2.	.1.	ErbB-Rezeptortyrosinkinasen als Beispiel	15
2.2.	.2.	ErbB-Rezeptoren als Zielstrukturen für Therapien	20
2.3.	Lur	ngenkrebs	23
2.3.	.1.	Epidemiologie	23
2.3.	.2.	Klassifikation	24
2.3.	.3.	Genetische Veränderungen in Adenokarzinomen der Lunge	25
2.3.	.4.	Zielgerichtete Therapien zur Behandlung von NSCLC	27
2.4.	CD	74-NRG1 als potentielle Treibermutation in Lungenadenokarzinomen	28
2.4. KR	.1. Ά <b>S</b> - ι	Entdeckung der <i>CD74-NRG1</i> -Fusion in einer Kohorte von Adenokarzinomen ohn und <i>EGFR</i> -Mutationen	e 28
2.4.	.2.	Häufung von CD74-NRG1-Genfusionen in invasiv muzinösen Adenokarzinomen	30
2.4.	.3.	NRG1-Genfusionen in soliden Tumoren	30
2.5.	Ger	netisch modifizierte Mausmodelle als präklinische Modelle der Tumorentstehung	32
2.5.	.1.	Knockout-Mausmodelle	33
2.5.	.2.	Cre- und Flp-vermittelte Rekombinationstechniken	34
2.5.	.3.	Knockin-Mausmodelle	35
2.6.	Ger	nerierung des induzierbaren CD74-NRG1-Mausmodells	35
2.7.	2.7. Fragestellung und Ziel der Arbeit 37		
3.	MA	TERIAL UND METHODEN	38

6

|--|

2	O
ം	α

3.1.1.	Verwendete Geräte	38
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien	39
3.1.3.	Verwendete Zelllinien	40
3.1.4.	Verwendete Software	41
3.1.5.	Tierversuchsvotum	41

#### 3.2. Methoden

3.2.1.	Ohrmarkierung der Mäuse	41
3.2.2.	Lyse der murinen Ohrbiopsien zur Gewinnung von DNA	41
3.2.3.	Genotypisierung R26.FSF.CD74-NRG1-Allel	42
3.2.4.	Genotypisierung des R26.FlpDel-Hintergrundes	42
3.2.5.	Generierung von murinen embryonalen Fibroblasten	42
3.2.6.	Zelllysate	43
3.2.7.	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE)	43
3.2.8.	Westernblot	44
3.2.9.	AdenoFlpO-Behandlung	44
3.2.10.	Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT)	44
3.2.11.	Immunhistochemische Untersuchungen	45
3.2.12.	RNA-Extraktion aus murinen Geweben und Zelllinien	45
3.2.13.	Reverse-Transkriptase-PCR/cDNA Synthese	45
3.2.14.	Proteinextraktion von Mausorganen	46
3.2.15.	Parentale BA/F3-Zellen	46
3.2.16.	BA/F3 ERBB2YF/ERBB3wt-Zellen	46
3.2.17.	Transiente Transfektion in HEK293T-Zellen und Virusproduktion	46
3.2.18.	Virusinfektion	47
3.2.19.	Proliferationsbestimmung der BA/F3-Zellen	47
3.2.20.	RNA-Sequenzierung	47
3.2.21.	Primer	47
3.2.22.	Antikörper	48

#### 4. ERGEBNISSE

4.1.	Genotypisierung chimärer Mäuse und Erzeugung von Kohorten für zwei Flp-		
Rekon	nbinationsstrategien	49	
4.2.	Flp-Rekombinase abhängige Exzision der Stoppkasette	50	
4.3.	Überprüfung der Transgen-Transkription nach Flp-Rekombination	52	
4.4.	Überprüfung der Proteinexpression nach Rekombination	54	

6.2	Nachweis der CD74-NRG1-Translation und des Fusionsproteins 55		
4.5.	. Mausmodelle zur Verifikation der CD74-NRG1-Fusion als Treibermutation 5		
4.6.	Tumore in <i>R26.CD74-NRG1:FlpDel</i> -Nachkommen	60	
4.7.	Charakterisierung der murinen Tumore mittels 3'-RNA-Sequenzierung	63	
4.7. 4.7. 4.7. Bau	<ol> <li>Ergebnisse der RNA-Sequenzierungsdaten: Sarkome</li> <li>RNA-Sequenzierungsergebnisse Teil II: Lebertumore</li> <li>3´-RNA-Sequenzierungsergebnisse Teil III: Nicht n\u00e4her klassifizierte Tumore im uchraum</li> </ol>	63 68 70	
4.8. Trans	BA/F3 ERBB2-YF/ERBB3wt-Zellen werden unabhängig von exogenem NRG1 nach fektion mit dem pBabe hygro CD74-NRG1-Vektor	71	
4.9. /ERBE	<i>CD74-NRG1</i> -abhängige Zellen sind empfindlich gegenüber verschiedenen ERBB2- 33-Inhibitoren	73	
5.	DISKUSSION	75	
5.1.	Das Mausmodell bestätigt CD74-NRG1 als Onkogen		
5.2.	. Es zeigte sich keine Tumorentwicklung in der Lunge		
5.3.	Charakterisierung der murinen Sarkome		
5.4.	NRG1-Genfusionen als potenzielle Therapieoption		
6.	LITERATURVERZEICHNIS		
7.	ANHANG	98	
7.1.	. Abbildungsverzeichnis		
7.2.	Tabellenverzeichnis		
7.3.	Anhang Abbildung 1: Schema STOP-EGFP-ROSA-CAG-Vektor	100	
7.4. pAd5	Anhang Abbildung 2: Plasmidkarte des Adeno-assozierten Rekombinationsvektors CMVFlpO	101	
7.5.	Anhang Abbildung 3: Schema pBabe hygro-CD74-NRG1-Vektors	102	

7.6.	7.6. Anhang Tabelle 1: Score Sheet zur Einschätzung des Gesundheitszustandes d	
in den	Versuchskohorten	103
7.7.	Anhang Tabelle 2: Daten der R26.CD74-NRG1/FlpDel-Kohorte	104
7.8.	Anhang Tabelle 3: Daten der AdenoFlp- und Kontrollkohorte	105
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN	106

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AKT	AKT Serine/Threonine Kinase
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AMP	Anchored Multiplex PCR
	(Verankerte Multiplex-PCR)
ATP	Adenosintriphosphat
AR	Amphiregulin
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA2	BReast CAncer 2
BTC	ß-Cellulin
CD74	Cluster of Differentiation 74
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
	(komplementäre DNS)
CHEK2	Checkpoint Kinase 2
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
	(chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
СРМ	Counts per Million reads Mapped
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DDR	DNA Damage Response
DNA	Deoxyribonucleic-Acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
	(epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
	(epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor)
EML4	Echinoderm Microtubule-associated protein-Like 4
EPGN	Epigen
EPR	Epiregulin
ErbB	Familie von membran-gebundenen EGFR-verwandten
	Rezeptortyrosinkinasen
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
e.v.	empty vector
	(Leervektor)
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
FlpDel	Flp Deleter-Allel
Flp	Flippase

FRT	Flp-Rekombinase-Erkennungsstelle
GAB1	GRB2-Associated Binding Protein 1
GEMM	Genetically engineered mouse model
	(genetisch modifiziertes Mausmodell)
GRB2	Growth Factor Receptor-Bounded 2
	(Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2)
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HBEGF	Heparin-Bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
IHC	Immun-Histochemie
IMA	Invasiv Muzinöses Adenokarzinom
KEAP1	Kelch-like ECH-Associated Protein 1
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
KRT7	Keratin-7
loxP	Cre-Rekombinase-Erkennungsstelle
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
	(Major Histocompatibility Complex)
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NF1	Neurofibromin 1
NF2	Neurofibromin 2
NGS	Next Generation Sequencing
NRG	Neuregulin
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
	(Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Principal Component Analysis
	(Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerase Chain Reaction
	(Polymerase-Ketten-Reaktion)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
РКВ	Proteinkinasen B
PFU	Plaque-Forming Unit
РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI (3,4) P2
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PI (3,4,5) P3
PH	Pleckstrin Homology
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Protoonkogen Serin/Threonin Kinase
RET	Ret Proto-Oncogene

RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribinucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	ROS Proto-Oncogene 1
ROSA26	Reverse Oriented Splice Acceptor, Clone 26
RTK	Rezeptortyrosin-Kinase
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
SCLC	Small Cell Lung Cancer
	(Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHC	SRC-Homologiedomänen enthaltend
STAT5	Signalwandler und Aktivator der Transkription 5
STK11	Serine/Threonine Kinase 11
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF-⊡alpha	Transformierender Wachstumsfaktor
ТКІ	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
TP53	Tumor Protein p53
TTF-1	Thyreoid Transcription Factor 1
	(Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1)
USA	United States of America
	(Vereinigte Staaten von Amerika)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VST	Variance Stabilizing Transformation
WHO	World Health Organization
	(Weltgesundheitsorganisation)
WRN	WRN-Helikase

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

#### 1. Zusammenfassung

*CD74-NRG1* ist eine in verschiedenen Tumorentitäten rekurrent auftretende Genfusion zwischen Chromosom 5 und Chromosom 8. Die Translokation führt zu einem membrangebundenen Fusionsprotein mit Expression der EGF-ähnlichen Domäne von Neuregulin auf der Zellmembran.<sup>1</sup> In seiner nativen Funktion als Ligand fördert NRG1 die Dimerisierung von Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Famlie und aktiviert so nachfolgende Signalwege. Das induzierbare *R26.FSF.CD74-NRG1*-Mausmodell zeigt, dass bei embryonaler Aktivierung des *CD74-NRG1*-Transgens langfristig, in der Versuchskohorte nach 49 Wochen, Tumore auftreten, wobei es sich überwiegend um Sarkome (8/15) handelt. Das Mausmodell beweist somit die Onkogenität der *CD74-NRG1*-Genfusion *in vivo*.<sup>2</sup>

Die Experimente in konditionierten BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt-*Zellen zeigen, dass bei Expression der CD74-NRG1-Fusion die BA/F3-Zellen unabhängig von exogenem NRG1 im Medium werden. Analog zur Wirkung von extrazellulärem nativem NRG1 kann diese Zellproliferation durch verschiedene Inhibitoren von ERBB2 und ERBB3 unterbunden werden. Membranständiges CD74-NRG1 kann somit die Heterodimerisierung von ERBB2/ERBB3 fördern und nachgeschaltete Signalwege aktivieren. Wie im transgenen Mausmodell erfüllt die *CD74-NRG1*-Fusion auch im zellulären BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt*-Testsystem in Bezug auf die Zellproliferation Kriterien eines Onkogens. Darüber hinaus erlauben die BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt*-Zellen eine Evaluation möglicher potenzieller Therapieoptionen *in vitro* und in Kombination mit dem verifizierten *R26.FSF.CD74-NRG1*-Mausmodell eine spätere Überprüfung *in vivo.*<sup>2</sup>

Zusammengefasst beweisen meine Arbeiten, dass die *CD74-NRG1*-Fusion onkogen ist, *in vitro* wie *in vivo*. Die Arbeiten in Zelllinien zeigen ferner, dass der plausibelste Mechanismus der Transformation in der parakrinen Aktivierung von ERBB2/ERBB3-Heterodimeren und nachgeschalteter Signalwege begründet liegt. Der Nachweis, dass die *CD74-NRG1*-Fusion als onkogener Treiber wirken kann, eröffnet ein exzellentes therapeutisches Ziel für neue Therapien. Aktuelle Studienergebnisse mit erfolgreichem Einsatz von therapeutischen ERBB2-/ERBB3-Antikörpern bei Patienten mit *NRG1*-rearrangierten Lungen- und Pankreaskarzinomen bestätigen dieses Ergebnis beim Menschen.<sup>2-5</sup>

## 2. Einleitung

#### 2.1. Krebs

Krebs ist ein Überbegriff für eine Gruppe von Erkrankungen, die jedes Organ des Körpers betreffen können. Synonym verwendet werden die Begriffe bösartige Tumore und Neoplasmen. Ursächlich sind das unkontrollierte Wachstum und Immortalität abnorm veränderter Zellen.<sup>6,7</sup>

Die häufigsten Krebserkrankungen (s. Abbildung 1) weltweit im Jahr 2018 waren:<sup>8</sup>

- Lungenkrebs (2,09 Millionen Fälle)
- Brustkrebs (2,09 Millionen Fälle)
- Kolorektale Karzinome (1,8 Millionen Fälle)
- Prostatakrebs (1,28 Millionen Fälle)
- Hautkrebs (1,04 Millionen Fälle; ohne Melanome)
- Magenkrebs (1,03 Millionen Fälle)<sup>8,9</sup>



Abbildung 1: Häufigkeit neu diagnostizierter Krebserkrankungen und Verteilung von Krebstodesfällen im Jahr 2018 in Anlehnung an: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf.<sup>9</sup>

Krebs führte weltweit im Jahr 2018 zu 9,6 Millionen Todesfällen; am häufigsten waren:8

- Lungenkrebs (1,76 Millionen Tote)
- Kolorektale Karzinome (862 000 Tote)

- Magenkrebs (783 000 Tote)
- Leberkrebs (782 000 Tote)
- Brustkrebs (627 000 Tote)<sup>9</sup>

Krebs entsteht durch die Umwandlung von normalen Zellen in Tumorzellen durch einen mehrstufigen Prozess, der im Allgemeinen von einer präkanzerösen Läsion zu einem bösartigen Tumor fortschreitet.<sup>6,7</sup> Dabei spielen endogene, genetische Faktoren sowie exogene Risikofaktoren eine Rolle.<sup>10</sup> Zu bekannten exogenen Risikofaktoren gehören:

- physikalische Karzinogene, wie zum Beispiel ultraviolette und ionisierende Strahlung
- chemische Karzinogene, wie zum Beispiel Asbest, Bestandteile von Tabakrauch, Aflatoxin und Arsen
- biologische Karzinogene, wie zum Beispiel Viren, Bakterien und Parasiten<sup>6,10</sup>

Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Alter, denn mit steigendem Alter steigt die Krebsinzidenz.<sup>10</sup>

Allen Faktoren gemein ist, dass sie schließlich zu einer irreversiblen Veränderung des Genoms der betroffenen Zellen führen. Krebs ist eine Erkrankung des Genoms.<sup>7</sup>

# 2.2. Tumorentstehung durch Überaktivierung von Rezeptoren und nachfolgender Signalwegaktivierung

Tumorzellen haben, im Gegensatz zum Großteil der normalen somatischen Zellen, die Fähigkeit erlangt, sich unbegrenzt und unkontrolliert zu teilen.<sup>7</sup> Vor allem genetische Alterationen in Genen und Signalwegen, die den Zellzyklus, die Zellproliferation und Apoptose regulieren, führen zur Tumorentstehung und Tumorerhaltung.<sup>7</sup> Mittlerweile konnten eine Vielzahl von genetischen Veränderungen in Tumorzellen und ihre Wirkung auf nachgeschaltete Signalwege identifiziert werden.<sup>11</sup> Eine große Rolle in verschiedenen Tumorentitäten spielen Rezeptortyrosinkinasen, wie zum Beispiel der Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR), und der Phosphatidylinositol-3-Kinase - und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg.<sup>12,13</sup>

#### 2.2.1. ErbB-Rezeptortyrosinkinasen als Beispiel

#### 2.2.1.1. Die Gruppe der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen

Die Familie der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen besitzt 4 Mitglieder (ERBB1 bis 4).<sup>14</sup> Vom Nzum C-Terminus untergliedern sich die Rezeptortyrosinkinasen in eine extrazelluläre Domäne, eine hydrophobe Transmembransequenz und eine intrazelluläre Kinase-Domäne.<sup>13,14</sup> Die

ErbB-Proteine interagieren miteinander als Homo- oder Heterodimere, eine Interaktion, die von der Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne induziert und intrazellulär zur Konformationsänderung sowie Aktivierung der Kinase-Domäne führt.<sup>15</sup> Die folgende Phosphorylierung aktiviert verschiedene intrazelluläre Signalwege.<sup>15</sup> Zu diesen Signal-Transduktionswegen gehören der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Signalweg, der Ras/Raf/MEK/ERK1/2-Signalweg und der Phospholipase C-Signalweg.<sup>13</sup> ErbB-Rezeptoren werden in vielen verschiedenen epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert.<sup>14</sup> Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivierung der Rezeptoren und der nachgeschalteten Signalwege durch die Expression der Liganden kontrolliert.<sup>14,16</sup> Mutationen in bzw. die Überexpression von ErbB-Rezeptortyrosinkinasen sind mit verschiedenen Krebsarten assoziiert, Beispiele sind Lungen-, Brust-, Magen-, Kopf-, Hals- und Pankreaskarzinome.<sup>13,15</sup> Die kausale Relevanz der auftretenden genetischen Alterationen differiert zwischen verschiedenen Tumorarten: in Lungenadenokarzinomen sind EGFR-Mutationen eindeutig onkogen, sobald sie die Rezeptoraktivität stimulieren und nachgeschaltete Signalwege aktivieren.<sup>17</sup> Während die onkogene Relevanz einer alleinigen Überexpression von ErbB-Rezeptortyrosinkinasen für Lungentumore oftmals im Gegensatz zu bestimmten Mutationen nicht eindeutig korreliert, ist die Überexpression von Erbb-Rezeptortyrosinkinasen in Brust- und Magenkarzinomen häufig onkogen.<sup>13,18</sup>

Es gibt eine Reihe von Liganden, die eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen ErbB-Rezeptoren aufweisen. Selektiv an den ERBB1-(EGF-) Rezeptor binden EGF (epidermal growth factor), transformierender Wachstumsfaktor a (TGF alpha) und Amphiregulin. Sowohl von ERBB1 als auch von ERBB2 werden der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (HB-EGF), Epiregulin und Betacellulin erkannt. Eine dritte Liganden-Gruppe bilden die Neurequline (NRG), die wiederum zwei Subgruppen bilden. NRG1 und NRG2 binden an den ERBB3- und ERBB4-Rezeptor (s. Abbildung 2). NRG2 and NRG3 binden nur an ERBB4.<sup>15,19</sup> Keine extrazellulären Liganden sind bisher für den ERBB2-Rezeptor bekannt.<sup>14</sup> Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die ERBB2-Aktivität von MUC4 moduliert wird.<sup>20</sup> Im Gegensatz zu ERBB1 (EGFR/HER1), ERBB2 (HER2) und ERBB4 (HER4) besitzt ERBB3 (HER3) eventuell keine aktive Tyrosinkinasedomäne, im reaktiven Zentrum wird anstelle der streng-konservierten Aminosäure Asparaginsäure ein basisches Asparagin kodiert.<sup>21-23</sup> Der ERBB3-Rezeptor weist jedoch mehrere H2-(Src-homology 2) und PH (Pleckstrin Homology)-Domänen auf, die beide Liganden binden.<sup>24</sup> Nach induzierter Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie können ebenfalls intrazelluläre Signalwege aktiviert werden.<sup>25</sup> Die Möglichkeit der Heterodimerisierung zwischen einzelnen Rezeptoren erhöht sowohl die Signalvielfalt, wie auch die Intensität der Aktivierung einzelner Signalwege, wobei ERBB2-ERBB3-Heterodimere scheinbar das stärkste Aktivierungspotential erreichen.<sup>25</sup> Als

bevorzugter Heterodimerisierungs-Partner der drei anderen ErbB-Rezeptoren spielt ERBB2 wahrscheinlich eine sehr zentrale Rolle in der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege.<sup>19,26</sup>



Abbildung 2: Überblick über die vier Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie. Gezeigt sind extrazelluläre Domäne, Transmembrandomäne und intrazelluläre Kinasedomäne. Soweit bekannt sind Liganden unter der jeweiligen Kinase aufgelistet, ebenso Aberrationen, die in verschiedenen Tumoridentitäten detektiert wurden. Amphiregulin (AR);  $\beta$ -Cellulin (BTC); epidermaler Wachstumsfaktor (EGF); EGF-Rezeptor (EGFR); Epigen (EPGN); Epiregulin (EPR); Wachstumsfaktor-Rezeptor-gebundenes Protein 2 (GRB2); Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor (HBEGF); Neuregulin (NRG); SRC-Homologiedomänen enthaltend (SHC); Signalwandler und Aktivator der Transkription 5 (STAT5); transformierender Wachstumsfaktor- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ). Abbildung modifiziert nach Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012.<sup>19</sup>

Abhängig vom gebildeten Homo- oder Heterodimer bzw. den extrazellulär-präsentierten Liganden-Bindungsdomänen werden intrazellulär verschiedene Signalwege aktiviert. Zwei der Haupt-Signalwege sind der MAPK-Signalweg und der PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase)-AKT-Signalweg.<sup>15,27</sup> Vor allem die Heterodimerisierung zwischen ERBB2 und ERBB3 spielt hier eine wichtige Rolle. Die Koexpression und Dimerisierung der beiden Rezeptoren stellt einen

hochaffinen Rezeptor für Neureguline dar.<sup>19,28</sup> Die beiden Rezeptoren aktivieren unterschiedlich stark die nachgeschalteten Signalwege: der zytoplasmatische Anteil von ERBB3 aktiviert nach ERBB2-ERBB3-Heterodimerisierung stark den PI3K-Signalweg; der zytoplasmatische Anteil von ERBB2 aktiviert vor allem den MAPK-Signalweg.<sup>29</sup> Das liegt daran, dass ERBB2 zwar über die Proteine GRB2 (Growth Factor Receptor-Bounded 2) und GAB1 (GRB2-Associated Binding Protein 1) mit PI3K interagieren kann, im Gegensatz zu ERBB3 aber keine direkte Bindungsstelle für PI3K besitzt.<sup>30</sup> In Kombination beider Signalwege wird einerseits die Zellproliferation stimuliert und andererseits werden Zelltod-Signale inhibiert.<sup>19,29,31</sup>

#### 2.2.1.2. Der PI3K-Signalweg

Nach Aktivierung des PI3K-Signalweges (siehe Abbildung 3A) an der Zellmembran verzweigen sich die Signal-Transduktionswege auf verschiedene Substrate, darunter zum Beispiel mTOR, einem Hauptregulator der Proteintranslation. Allerdings antwortet der PI3K-Signalweg nicht ausschließlich auf die Aktivierung von Tyrosinkinaserezeptoren, wie zum Beispiel ErbB-Rezeptoren oder den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-1R), sondern integriert weitere Stimuli ausgehend von Zelladhäsionsmolekülen wie Integrinen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Protoonkogenen wie Ras.<sup>32,33</sup> Aktiviertes PI3K phosphoryliert dann weitere Membranlipide, sogenannte Phosphoinositide, die in aktive Formen umgewandelt werden, sogenannte second messenger wie Phosphatidylinositol-3,4,5triphosphat (PI (3,4,5) P3, kurz PIP3) und Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PI (3,4) P2, kurz PIP2). Im Folgenden aktiviert z.B. PIP3 die Serin/Threonin-Kinase AKT, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB). AKT wiederum reguliert dann eine Reihe weiterer Proteine, die Prozesse wie Apoptose, Zellzyklus, Transkription und Translation steuern.<sup>34</sup> Ein wichtiges Substrat von AKT ist die Serin/Threonin-Kinase mTOR, die nachgeordnet die mTor-Effektor S6-Kinase-1 (S6K1) aktiviert. S6K1-Aktivität stimuliert die Protein-Biosynthese, die wiederum Proliferation und Zellwachstum regulieren. Alterationen im mTOR-Signalweg, die zu einer Überaktivierung führen, treten in einer Vielzahl von Tumorentitäten auf.<sup>34-36</sup>



**Abbildung 3: Vereinfachter Vergleich der PI3K/AKT und MAPK Signalwege.** Beiden gemeinsam ist die extrazelluläre Bindung von Wachstumsfaktoren, die zur Dimerisierung von Rezeptortyrosinkinase-Monomeren und Autophosphorylierung der intrazelluären Kinasedomänen führt. **A**: Sukzessive werden PI3K, AKT, mTOR und die Proteinkinase S6K1 phosphoryliert. **B**: Nachgeschaltet im MAP-Kinaseweg ist die Ras-GTPase und anschließend eine Kaskade von Zielproteinen, welche unter anderem die RAF-sowie MEK- und ERK-Kinasen umfasst. In beiden Fällen führt die veränderte Genexpression zur Zellproliferation, Zellüberleben und Angiogenese. Abbildungen angelehnt an Paton, E.L., J.A. Turner, and I.R. Schlaepfer, Overcoming Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutated Tumours. *J Oncol*, 2020.<sup>33</sup>

#### 2.2.1.3. Der MAPK-Signalweg

Auch der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg reguliert Zellproliferation und Differenzierung (siehe Abbildung 3B).<sup>33,37</sup> Die Aktivierung des Signalweges erfolgt sowohl durch intra- als auch durch extrazelluläre Stimuli, unter anderem durch metabolischen Stress, DNA-Schädigungen, Zytokine und Wachstumsfaktoren.<sup>38</sup> Häufig erfolgt die initiale Aktivierung durch Wachstumsfaktoren und die Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen. Neben den ErbB-Rezeptoren gehören hierzu der PDGF- (Platelet Derived Growth Factor-) Rezeptor und der VEGF- (Vascular Endothelial Growth Factor) Rezeptor.<sup>33,39-41</sup> Alternativ wird der MAPK-Signalweg auch hormonell über den Progesteron- und Östrogenrezeptor stimuliert.<sup>42,43</sup> Wie in Abbildung 3B dargestellt, handelt es sich um eine Phosphorylierungskaskade, welche über

RAS z.B. die RAF-, MEK- und ERK-Kinasen aktiviert.<sup>33,44,45</sup> Die Sequenz der Kinasen ist hochkonserviert und sie werden ubiquitär exprimiert; ihre funktionelle Spezifität entsteht vor allem durch die dreidimensionale Struktur.<sup>33</sup> Ihre Vielzahl ermöglicht es, verschiedene intraund extrazelluläre Stimuli flexibel zu integrieren.<sup>46,47</sup> Hierbei spielt auch der MAPK-Signalweg eine zentrale Rolle in nahezu jedem Zelltyp. Mutationen, die eine Überstimulation oder Überexpression von Rezeptoren, eine RAS-Aktivierung (siehe Abbildung 3B) oder nachrangige Kinase-Hyperaktivität bewirken, führen oft zur Tumorentstehung.<sup>33,48</sup> Eine der häufigsten Mutationen ist BRAF V600E, eine Punktmutation im Protoonkogen B-RAF, wo der Valins Position Austausch eines an 600 gegen Glutaminsäure zu einer Konformationsänderung der Kinasedomäne führt.<sup>49</sup> Unabhängig von der Stimulation durch Ras<sup>33,50</sup> verursacht sie eine Autoaktivierung der Kinase-Domäne und eine verstärkte Kinaseaktivität.<sup>32,49,51</sup> In Konsequenz wird das Zielprotein MEK verstärkt phosphoryliert, wodurch einer vermehrten Aktivierung von Proliferations-fördernden es zu Transkriptionsfaktoren kommt (siehe Abbildung 3). Häufig assoziiert mit BRAF-Mutationen sind Melanome, Schilddrüsen- und Dickdarmkarzinome.<sup>33,49,52</sup>

#### 2.2.2. ErbB-Rezeptoren als Zielstrukturen für Therapien

Wie für die PI3K- oder MAPK-Signalwege dargestellt, spielt die Familie der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen eine wichtige Rolle in der Entstehung verschiedener Tumorarten, insbesondere Brust-, Lungen-, Gehirn-, Kopf/Hals- und Dickdarmtumore.<sup>19</sup> Verschiedene Therapien, die das Tumorwachstum reduzieren, in dem sie die Funktion der ErbB-Rezeptoren hemmen, sind bereits zugelassen.<sup>19,25</sup>



Abbildung 4: Überblick über mögliche Therapieoptionen bei Überaktivität/-expression von ErbB-Rezeptoren und nachgeschalteten Signalwegen. Schema in Anlehnung an Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012.<sup>19</sup>

Therapieoptionen, die entweder bereits zugelassen sind oder aktuell in klinischen Studien evaluiert werden, sind in Abbildung 4 aufgelistet.<sup>19</sup> Beispiele für Inhibitoren von EGFR sind Erlotinib (für die Behandlung von nichtkleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) und Pankreaskarzinomen zugelassen) und Gefitinib (für die Behandlung von NSCLC zugelassen). Beispiele für Inhibitoren, die sich sowohl gegen EGFR als auch gegen ERBB2 richten, sind Lapatinib (für die Behandlung von Mammakarzinomen zugelassen) und Neratinib. Desweiteren können Antikörper gegen EGFR (Cetuximab) und ERBB2 (Trastuzumab) zur Behandlung von Darmkrebs, Kopf/Hals- und Mamma-Karzinomen eingesetzt werden.<sup>19,53</sup> Weitere Optionen, wie Antikörper gegen ERBB3, werden im Rahmen klinischer Studien

sowohl individuell als auch in Kombination mit anderen Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit hin untersucht.<sup>25</sup>

Die Ursachen für ErbB-vermittelte Tumore sind divergent; so kann eine Überaktivität von ERBB1 (EGFR) und ERBB2 durch Genamplifikationen, Punktmutationen, partielle Deletionen oder autokrine Stimulation der Rezeptoren über Sekretion der jeweils aktivierenden Liganden verursacht werden.<sup>25</sup> Andererseits wirkt ERBB3 aufgrund seiner fehlenden oder verminderten Kinase-Aktivität vor allem im Kontext seiner Heterodimerisierung mit ERBB1/EGFR und ERBB2 onkogen.<sup>14</sup> Onkogene Punktmutationen im *ERBB4*-Gen sind für verschiedene Tumorentitäten, insbesondere Melanome, beschrieben.<sup>54</sup>

Therapieseitig sind für NSCLC, Kolon- und Pankreaskarzinome bereits oral verabreichbare Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI) zugelassen, die selektiv den ERBB1 (EGF)-Rezeptor hemmen.<sup>53,55</sup> EGFR-TKI der ersten Generation wie Erlotinib und Gefitinib sind kompetitive Inhibitoren, die mit ATP um die Bindung an der Kinase-Domäne des Rezeptors konkurrieren.<sup>19,25</sup> Die Inhibitoren erwiesen sich als besonders wirksam bei Patienten mit bestimmten *EGFR*-Mutationen.<sup>56</sup> Alternativ wurden Antikörper entwickelt, die spezifisch an die extrazelluläre Domäne von EGFR binden und mit der Ligandeninteraktion bzw. der Homo-und Heterodimerisierung interferieren; sie sind zur Behandlung von Darm- und Kopf-Hals-Tumoren zugelassen.<sup>53</sup> Die Wirkung solcher EGFR-Antikörper beschränkt sich allerdings auf bestimmte Tumor-Subtypen, insbesondere auf Tumore mit fehlender *KRAS*-Mutation, und verlängern das Überleben der Patienten meist nur um einige Monate.<sup>57</sup>

Spezifische Inhibitoren für ERBB2 wurden bislang nicht entwickelt. TKIs der zweiten Generation wie Afatinib, Lapatinib und Neratinib inhibieren sowohl EGFR als auch ERBB2 und binden im Gegensatz zu TKIs der ersten Generation irreversibel an die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren. Da ERBB2 selbst keine Liganden bindet, interferieren die TKIs nicht mit der Bindung extrazellulärer Liganden, sondern inhibieren die Heterodimerisierung mit möglichen Interaktionspartnern und somit sekundär eine Aktivierung von Rezeptoren.<sup>58</sup> Beispiele für ERBB2-Antikörper sind Trastuzumab und Pertuzumab, die zur Behandlung von ERBB2-positivem Brustkrebs eingesetzt werden.<sup>59,60</sup> Unter der Behandlung entwickeln die Tumore häufig Resistenzmechanismen gegen Inhibitoren und Antikörper.<sup>25</sup> Dazu gehören Resistenz-Mutationen wie *EGFR T790M*, oder die Hochregulierung und Aktivierung anderer nicht-inhibierter ErbB-Rezeptoren, zum Beispiel ERBB3.<sup>25,55,61</sup> Kombinationen von verschiedenen Inhibitoren und Antikörpern werden derzeit in vitro und im Rahmen von klinischen Studien evaluiert.<sup>25</sup>

#### 2.3. Lungenkrebs

#### 2.3.1. Epidemiologie

Im Jahr 2018 erkrankten in Deutschland etwa 66 000 Menschen an bösartigen Neoplasien der Lunge. Männer sind mit rund 54 % der Neuerkrankungen häufiger betroffen als Frauen.<sup>62</sup>

Aufgrund veränderter Rauchgewohnheiten entwickeln sich die Erkrankungs- und Sterberaten bei Männern und Frauen seit Ende der 1990er Jahre gegenläufig. Während die Raten bei Männern in diesem Zeitraum abnahmen, stiegen Neuerkrankungs- und Sterberaten für Bronchialkarzinome bei Frauen an.<sup>8,63,64</sup> Seitdem auch vermehrt Frauen mit dem Rauchen begannen, nähern sich die Neuerkrankungs- und Sterberaten der beiden Geschlechter an.<sup>64,65</sup> Korreliert mit dem Beginn der sogenannten "Tabak-Epidemie" unterscheiden sich Neuerkrankungs- und Sterberaten zwischen verschiedenen Ländern. In einigen Ländern zeigen die WHO-Empfehlungen zur Reduktion des Tabakkonsums bereits eine Wirkung, so dass die Neuerkrankungsraten sinken.<sup>65,66</sup> In anderen Ländern, z.B. China, hat der Tabakkonsum in den vergangen zwei Jahrzehnten deutlich zugenommen und es wird prognostiziert, dass die Lungenkrebs-Inzidenz in Zukunft steigt.<sup>67</sup>

Rauchen ist ein entscheidender Risikofaktor: In den Vereinigten Staaten von Amerika ist der größte Anteil von Lungenkarzinomen durch Rauchen bedingt und weltweit überwiegen Lungenkarzinome bei den durch Rauchen verursachten Krebstoten (60%).<sup>68,69</sup> Da die Krebserkrankung bei den meisten Patienten erst in späten Stadien diagnostiziert wird und Bronchialkarzinome zudem eine hohe Metastasierungstendenz aufweisen, besitzt Lungenkrebs eine ungünstige Prognose.<sup>67,69-71</sup> Erst in den letzten Jahren konnte durch eine verbesserte Früherkennung und die Etablierung zielgerichteter Therapiemöglichkeiten die Prognose von nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen verbessert und die Mortalität reduziert werden.<sup>72,73</sup>

#### 2.3.2. Klassifikation

Histologisch werden Bronchialkarzinome in verschiedene Haupttypen klassifiziert: kleinzelliges Bronchialkarzinom (Small Cell Lung Cancer, SCLC) und nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC).<sup>74</sup> Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome werden in Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome unterteilt.<sup>67</sup>

#### 2.3.2.1. Kleinzelliger Lungenkrebs (SCLC)

SCLC-Tumore machen 15% aller Lungenkrebserkrankungen aus.<sup>75</sup> Sie zeichnen sich durch eine hohe Zellteilungsrate, schnelles Wachstum und frühe Metastasenbildung aus.<sup>74,76,77</sup> Patienten mit SCLC sind typischerweise über 70 Jahre alt und haben eine positive Raucher-Anamnese; oft haben die Patienten außerdem Komorbiditäten wie COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) oder kardiovaskuläre Erkrankungen.<sup>78</sup> Die Prognose der Patienten ist schlecht, das mediane Überleben ohne Therapie liegt bei 2 bis 4 Monaten.<sup>78</sup> Aber auch nach initial gutem Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie erleidet der Großteil der betroffenen Patienten innerhalb von wenigen Monaten ein Rezidiv.<sup>74,77,79</sup>

Die Erstlinien-Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem SCLC besteht aus 4 bis 6 Zyklen Etoposid in Kombination mit Cis- oder Carboplatin.<sup>74</sup> Das mediane Überleben unter dieser Therapie liegt bei 8 bis 13 Monaten und die 2-Jahres-Überlebensrate bei 5%.<sup>80</sup> Patienten im Frühstadium erhalten das gleiche Chemotherapie-Regime sowie eine thorakale Radiotherapie.<sup>74,77</sup> Hier liegt das mediane Überleben bei 15 bis 20 Monaten mit einer 2-Jahres-Überlebensrate von 20 bis 40%.<sup>74</sup> Die 5-Jahres-Überlebensrate für alle Patienten mit SCLC liegt bei ungefähr 6%.<sup>81</sup> Typisch für kleinzellige Lungenkarzinome ist der biallelische Verlust der Tumorsuppressorgene *TP53* und *RB1*, sowie die daraus resultierende Inaktivierung entsprechender Tumorsuppressorproteine.<sup>75</sup> Leider konnten bislang für die meisten SCLC-Tumore keine genetischen Veränderungen identifiziert werden, die sich gut als Angriffspunkte für spezifische zielgerichtete Therapien eignen. Daher sind bislang für die Behandlung von Patienten mit SCLC keine zielgerichteten Therapien etabliert bzw. mögliche Therapieoptionen befinden sich noch im Versuchsstadium.<sup>82,83</sup>

#### 2.3.2.2. Nichtkleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC)

Die häufigsten histologischen Subtypen der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (85% der Lungenkarzinome) sind Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome.<sup>67,69</sup> In ungefähr 50% der Fälle handelt es sich um Adenokarzinome, die vermehrt in den distalen Atemwegen entstehen, eine drüsenartige Histologie aufweisen und histologische Marker wie TTF1 (Thyreoid Transcription Factor 1) und KRT7 (Keratin 7) exprimieren.<sup>84</sup> In etwa 40% der NSCLC-Fälle handelt es sich um Plattenepithelkarzinome, die eher in den proximalen Atemwegen auftreten und stark mit Rauchen und chronischen Entzündungen der Atemwege assoziiert sind.<sup>84,85</sup> Bei Nichtrauchern ist das Adenokarzinom der häufigste Typ des Lungenkarzinoms. NSCLC sind mit Passivrauchen, Luftverschmutzung, beruflicher Karzinogenexposition sowie genetischer Veranlagung assoziiert.<sup>69,86-88</sup>

Die ursprünglich rein histologische Einteilung in SCLC und NSCLC konnte mittlerweile mit spezifischen molekularen Aberrationen assoziiert und in Subgruppen unterteilt werden.<sup>84,85</sup> Zu diesen Aberrationen gehören unter anderem Mutationen, chromosomale Translokationen oder Gen-Amplifikationen, die gegebenenfalls eine zielgerichtete Therapie des Tumors ermöglichen.<sup>84</sup> Mittlerweile gehört zur Diagnostik bei NSCLC-Patienten zwar weiterhin eine histologische Beurteilung des Tumors, aber die Charakterisierung des Tumors im Hinblick auf genetische Veränderungen ist entscheidend für die weitere Therapie.<sup>89,90</sup> Die grobe Einteilung in Lungenadenokarzinome und Plattenepithelkarzinome ist heute nicht mehr zielführend, sondern die Klassifizierung erfolgt anhand genetischer Alterationen, z.B. hat der Nachweis eines *EGFR*-mutierten NSCLC therapeutische Bedeutung.<sup>89</sup> Zunehmend erlauben molekulardefinierte NSCLC-Subtypen zielgerichtete Therapiemöglichkeiten, die einer konventionellen Chemotherapie überlegen sind.<sup>73,89,90</sup>

#### 2.3.3. Genetische Veränderungen in Adenokarzinomen der Lunge

Mit Lungenadenokarzinomen am häufigsten assoziiert sind Mutationen in den Genen *KRAS*, *EGFR* sowie in den Tumorsuppressorgenen *TP53*, *KEAP1*, *STK11* und *NF1*.<sup>91</sup> Interessanterweise variiert die Häufigkeit von *EGFR*-Mutationen zwischen Populationen je nach regionaler Herkunft und ethnischem Hintergrund der Patienten.<sup>92</sup> Demgegenüber scheinen in Plattenepithelkarzinomen der Lunge vor allem das Tumorsupressorgen *TP53* und das Gen *CDKN2A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) betroffen zu sein. *TP53* ist in Plattenepithelkarzinomen der Lunge in über 90 % der Fälle inaktiviert, während Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen (z.B. *EGFR*-Amplifikationen) im Vergleich zu Lungenadenokarzinomen selten sind.<sup>91,93</sup>

25

Die in den verschiedenen Subtypen von NSCLC auftretenden genetischen Veränderungen unterscheiden sich deutlich zwischen Nichtrauchern und Rauchern. Bei Nichtrauchern werden vorzugsweise Cytosin zu Thymin (C>T) Transitionen beobachtet.<sup>94</sup> Außerdem findet sich eine signifikant höhere Prävalenz von aktivierenden *EGFR*-Mutationen sowie *ROS1*- und *ALK*-Translokationen, die einer zielgerichteten Therapie zugänglich sind.<sup>69,91,95</sup> Im Gegensatz dazu zeigen Raucher vorwiegend Cytosin zu Adenin (C>A) Transversionen und zusätzlich eine signifikant höhere Mutationslast in den Genen *KRAS* und *TP53*.<sup>94</sup> Aktivierende Mutationen im *KRAS*-Gen finden sich in 32 % der Lungenadenokarzinome; trotz dieser Häufung konnte allerdings lange Zeit keine zielgerichtete Therapie für diesen Karzinomtyp etabliert werden.<sup>96</sup> Hoffnung macht jetzt ein im Jahr 2019 vorgestellter Inhibitor für die *KRAS* (*G12C*)-Mutation, der in ersten klinischen Studien Anti-Tumor-Aktivität zeigte und somit eine mögliche Therapieoption für *KRAS*-mutierte Karzinome darstellt.<sup>97,98</sup>



**Abbildung 5: Genetische Veränderungen in Lungenadenokarzinomen**. Modifiziert nach The Cancer Genome Atlas Research, *Nature*, 2014.<sup>91</sup>

Allerdings finden sich in 10% bis 15% der Patienten mit Lungenadenokarzinom Mutationen im *EGFR*-Gen, welche auf EGFR-Inhibitoren ansprechen. <sup>91,99-101</sup> Beide Therapieansätze verlängern im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie die Lebensqualität, das progressionsfreie Überleben sowie die Gesamtüberlebensrate signifikant.<sup>100</sup> Verschiedene Treibermutationen sind in Abbildung 5 zusammengefasst und es gibt für spezifische Genalterationen mittlerweile neue zugelassene Therapieoptionen, wie zum Beispiel ALK-Inhibitoren zur Behandlung von Tumoren mit *EML4-ALK*-Fusionen.<sup>102</sup> Im Rahmen dieser Dissertation können diese aber nicht vertieft diskutiert werden. Allgemein lässt sich zusammenfassen, dass aktivierende Mutationen in Protoonkogenen oder veränderte Genexpressionslevel, wie sie durch Kopienzahlveränderungen oder aktivierte Signalwege

entstehen, zu einer gesteigerten Proliferation von Tumorzellen führen.<sup>7</sup> Im Umkehrschluss ist das Wachstum von Tumoren abhängig von gestörten, proliferationsfördernden Signalwegen und die Inhibition solcher Signalwege bietet konkrete Ansatzpunkte für Therapieoptionen, wie sie mit EGFR- oder ALK-Inhibitoren bereits Realität sind.<sup>89,90,103</sup>

#### 2.3.4. Zielgerichtete Therapien zur Behandlung von NSCLC

In Abhängigkeit vom molekularen Subtyp der Lungenadenokarzinome hat sich die Therapie in den letzten 20 Jahren deutlich verändert. Spezifische oder personalisierte Therapien sind sowohl wirksamer als auch in ihrer Verträglichkeit besser als zuvor empirisch eingesetzte zytotoxische Therapien.<sup>69</sup> Zuvor war der Erstlinientherapie-Standard eine Kombinations(radio-)chemotherapie auf Platinbasis (zum Beispiel Cisplatin in Kombination mit einem anderen Zytostatikum) bei fortgeschrittenem NSCLC und einem guten Performance-Index des Patienten.<sup>104,105</sup> Die chirurgische Resektion bleibt die wirksamste Therapie für die Stadien I bis II und ausgewählte Fälle von NSCLC im Stadium IIIA.<sup>69,106</sup> Dennoch rekurriert trotz kurativem Therapieansatz in einer Vielzahl von Fällen der Tumor. Das 5-Jahres-Gesamtüberleben reicht von 83% für Stadium IA bis 36% für Stadium IIIA.<sup>69,71</sup> Die hohe Mortalität von NSCLC ist vor allem durch die Metastasierung bedingt, so dass die Langzeitüberlebensrate nur durch effektivere systemische Therapien gesteigert werden kann.<sup>69,107</sup> In den 1990er Jahren wurde erstmals eine zielgerichtete Therapie für Patienten mit NSCLC eingesetzt: Gefitinib, ein EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor (siehe Abbildung 4).<sup>69,108</sup> Der Einsatz von Gefitinib wurde zunächst in einem unselektierten Patientenkollektiv getestet und zeigte eine Ansprechrate von ungefähr 10 %.<sup>103,108-110</sup> Es folgte die Entwicklung des EGFR-Inhibitors Erlotinib; für den ein Ansprechen in vortherapierten Patienten mit NSCLC mit beiden EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren gezeigt werden konnte.<sup>110,111</sup> Im Jahre 2004 gelang es spezifische EGFR-Mutationen in Lungenadenokarzinomen zu identifizieren, die zu einer Aktivierung von EGFR und nachgeschalteter Signalwege führen. Die gesteigerte Aktivität kann durch eine Therapie mit den EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefitinib inhibiert werden.<sup>69,103</sup> Die Entdeckung von ALK-Translokationen ermöglichte eine zielgerichtete Therapie mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib.<sup>102,112</sup> Sowohl die zielgerichtete Therapie mit Erlotinib als auch die Therapie mit Gefitinib in EGFR-mutierten NSCLC sowie die Therapie mit Crizotinib in ALK-positiven Tumoren zeigte sich der empirischen Chemotherapie überlegen.<sup>109,113-118</sup> In der Folgezeit wurden dann weitere genetische Veränderungen, darunter RET- und ROS-Fusionen, in Lungenadenokarzinomen identifiziert, die ebenfalls einer spezifischen Therapie zugänglich sind.<sup>119-125</sup> Sowohl *RET* wie *ROS1* kodieren für Rezeptortyrosinkinasen und in Fusion mit dem Gen CD74 wird ROS1 konstitutiv aktiviert.<sup>126</sup> Eine Behandlung mit dem Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor Crizotinib verlängert bei Patienten mit ROS1-positiven Tumoren das Überleben.<sup>127</sup>

Unbefriedigend bleibt, dass bei rund einem Viertel der Patienten mit Lungenadenokarzinomen zum Zeitpunkt der Diagnose keine genetischen Alterationen identifiziert werden, für die aktuell eine zielgerichtete Therapien existiert.<sup>91,128</sup> Ohne Optionen für eine personalisierte Therapieoption muss auf eine konventionelle Chemotherapie zurückgegriffen werden.<sup>128</sup>

#### 2.4. CD74-NRG1 als potentielle Treibermutation in Lungenadenokarzinomen

# 2.4.1. Entdeckung der *CD74-NRG1*-Fusion in einer Kohorte von Adenokarzinomen ohne *KRAS*- und *EGFR*-Mutationen

Da in rund 25 % der Lungenadenokarzinome die onkogenen Treibermutationen bislang unbekannt waren und für diese Patienten somit auch keine zielgerichteten Therapiemöglichkeiten existieren, wurde in der Abteilung Translationale Genomik der Universität zu Köln das Transkriptom von Adenokarzinomen der Lunge von 25 Nichtrauchern sequenziert, die negativ für die beiden häufigsten Mutationen in *KRAS* und *EGFR* waren.<sup>1,91</sup> In dieser Kohorte konnte eine bis dahin unbekannte somatische Translokation entdeckt werden, die zu einer Fusion der Gene *CD74* (Chromosom 5) und *NRG1* (Chromosom 8) führt.<sup>1</sup>

CD74 kodiert für ein Transmembran-Glykoprotein (Typ II), das im Rahmen des Major Histocompatibility Complex (MHC) als MHC-II-Molekül dient, und wie oben erwähnt, bereits in onkogenen Fusionen mit ROS1 gefunden wurde.<sup>127,129,130</sup> Als Typ II-Transmembranprotein besitzt CD74 einen intrazellulären N-Terminus und einen extrazellulären C-Terminus und durchdringt die zelluläre Phospholipid-Doppelmembran vollständig.<sup>131-133</sup> Der extrazelluläre C-Terminus von CD74 wird auf der Zelloberfläche von unterschiedlichen Zelltypen präsentiert, dazu gehören vor allem menschliche Immunzellen, einschließlich B-Zellen, aktivierten T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, aber auch dendritische Zellen und Stroma-, Epithel- sowie Endothelzellen.<sup>130,134,135</sup> Studien haben kürzlich gezeigt, dass CD74 auch vermehrt in hämatologischen Tumoren wie B-Zell-Lymphomen und nicht-hämatologischen Tumoren wie Magenkarzinomen, Nierenkarzinomen, NSCLC, Neoplasien des Thymus und Dickdarmkarzinomen sowie in Subtypen von Sarkomen exprimiert wird.<sup>130,136-141</sup>

Der Translokations- bzw. Fusionspartner von *CD74* ist das Gen *NRG1* (Neuregulin 1), das für einen extrazellulären Liganden der ErbB-Familie von Rezeptortyrosinkinasen kodiert, von denen Mutationen in *EGFR* und *ERBB2* als genetische Veränderungen in Adenokarzinomen bekannt sind.<sup>142-144</sup> NRG1 ist ein Wachstumsfaktor, der eine EGF-ähnliche Domäne enthält, die ErbB-Rezeptortyrosinkinasen aktivieren kann.<sup>142</sup> NRG1 gehört zu der Familie von Neuregulinen, die von vier Genen (*NRG1* bis *NRG4*) kodiert werden.<sup>142</sup> Durch alternatives Spleißen werden vom *NRG1*-Gen sechs verschiedene Proteintypen (I bis VI) mit mindestens 31 Isoformen translatiert.<sup>142,145,146</sup> Neureguline sind Signalproteine, die Zell-Zell-Interaktionen in verschiedenen Organen vermitteln. Dabei binden die NRG-Proteine an die Rezeptortyrosinkinasen ERBB3 oder ERBB4, was zu Homo- oder Heterodimerisation der Rezeptoren führt und intrazelluläre Signalwege aktiviert.<sup>145</sup>

In der ursprünglich entdeckten *CD74-NRG1*-Translokation wird der C-Terminus des *NRG1*-Gens unter Kontrolle des *CD74*-Promotors exprimiert. Entsprechende Translokationen wurden anschließend in vier weiteren Patienten verifiziert; einschließlich des Indexfalls handelte es sich in allen fünf Fällen um invasive, muzinöse Adenokarzinome, die alle negativ für Veränderungen in anderen bekannten Onkogenen waren.<sup>1</sup> FISH-Analysen zeigten, dass es sich um eine somatische Translokation zwischen Chromosom 5 und Chromosom 8 handelte.<sup>1</sup>

Wie in Abbildung 6A skizziert, ist das CD74-NRG1-Fusionsprotein an der Membran lokalisiert und die Epidermal-Growth-Factor-like (EGF-like) Domäne von NRG1 wird extrazellulär präsentiert. Als Membran-gebundener Ligand könnte sie daher mit den Rezeptorkinasen wie ERBB2 oder ERBB3 interagieren (Abbildung 6B) und so den PI3K-Signalweg aktivieren.<sup>147</sup>



Abbildung 6: Schematische Darstellung und mögliche Wirkung des CD74-NRG1-Fusionsproteins. A: CD74-NRG1-Fusionsprotein mit extrazellulärer EGF-ähnlicher Domäne (orange); die potenziellen ERBB2- und ERBB3-Rezeptormonomere sind nicht phosphoryliert. B: Wird die EGFähnliche Domäne erkannt, führt dies zur Heterodimerisierung und intrazellulär zur Autophosphorylierung und Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Abbildung in Anlehnung an Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, et al. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2014.<sup>1,148,149</sup>

# 2.4.2. Häufung von *CD74-NRG1*-Genfusionen in invasiv muzinösen Adenokarzinomen

Unter den Lungenadenokarzinomen macht das invasiv muzinöse Adenokarzinom der Lunge (IMA) etwa 5% bis 10% der Fälle aus.<sup>150,151</sup> Nichtraucher sind deutlich überrepräsentiert; je nach Studie sind bis zu 72 % der IMA-Patienten Nichtraucher und ungefähr 5000 Todesfälle in den USA werden diesem Subtyp zugeordnet.<sup>150,152,153</sup> Insgesamt haben IMA-Patienten eine schlechtere Prognose als Patienten mit anderen Lungenadenokarzinom-Subtypen.<sup>154-156</sup> Histologisch zeichnet sich der IMA-Subtyp durch eine Becherzellmorphologie aus, die reichlich intrazytoplasmatisches Muzin enthält.<sup>152,157,158</sup> Auf molekulargenetischer Ebene stellen *KRAS*-Mutationen die häufigste Onkogenmutation (40-62%) dar.<sup>1,159</sup> *EGFR*-Mutationen sind hingegen selten, aber die Assoziation von *NRG1*-Fusionen charakterisiert mit 7-27 % einen beträchtlichen Anteil der IMA-Patienten.<sup>152,160-162</sup>

#### 2.4.3. NRG1-Genfusionen in soliden Tumoren

Rekurrente balancierte Chromosomenumlagerungen treten in verschiedenen Tumoren auf. Es handelt sich meist um somatische Umlagerungen, die sowohl initial zur Tumorentwicklung beitragen, zum anderen aber auch im Verlauf zusätzlich zu anderen Mutationen im Tumor entstehen können.<sup>163</sup> Translokationen können durch unterschiedliche Mechanismen onkogen wirken: durch die Überexpression benachbarter Gene oder die Expression eines Hybridgens, wie es im Falle von *CD74-NRG1* durch eine Fusion innerhalb der proteincodierenden Region zweier Gene entsteht.<sup>163</sup>

Somatische genetische Rearrangements können ganz unterschiedliche Effekte auf das entstehende Protein haben. Sogenannte *in frame*-Fusionsgene, wozu auch die *CD74-NRG1*-Genfusion gehört, führen zur Expression eines chimären Fusionsproteins.<sup>1</sup> Mittlerweile wurden mehr als 350 Genfusionen in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert, wobei die Prävalenz zwischen den verschiedenen Krebsarten variiert und Genfusionen in hämatologischen Neoplasien, Sarkomen und Karzinomen vergleichsweise häufig auftreten.<sup>163</sup>



Abbildung 7: Relative Häufigkeit von *NRG1*-Fusionen in verschiedenen soliden Tumoren. Darstellung in Anlehnung an Jonna S, Feldman RA, Swensen J, et al. Detection of NRG1 Gene Fusions in Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019.<sup>164</sup>

NRG1-Genfusionen sind nicht auf Lungenadenokarzinome beschränkt, sondern finden sich auch in weiteren soliden Tumorentitäten.<sup>164,165</sup> Eine Reanalyse von Tumorproben mittels verankerter Multiplex-PCR (Anchored Multiplex PCR, AMP) erlaubte die Detektion weiterer Genfusionen sowie die Identifikation von neuen Fusionspartnern.<sup>164,166,167</sup> Unter 21858 Tumorproben konnte eine NRG1-Genfusion in 41 Fällen (0,2%) verifiziert werden, am häufigsten in NSCLC-Tumoren.<sup>164</sup> Dies steht einerseits im Einklang mit der erstmaligen Detektion der CD74-NRG1-Genfusion in Lungenadenokarzinomen, andererseits blieben NRG1-Genfusionen bei Lungenkarzinomen insgesamt selten.<sup>1</sup> In 9592 reanalysierten NSCLC-Tumorproben konnte in 25 Fällen (0,3%) eine NRG1-Fusion nachgewiesen werden.<sup>164</sup> Allerdings fanden sich NRG1-Fusionen auch in anderen soliden Tumoren, wie Gallenblasenkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Blasenkarzinomen. Ovarialund Pankreastumoren, neuroendokrinen Tumoren, kolorektalen Karzinomen sowie Sarkomen.<sup>164</sup> Die Inzidenz zeigte sich abhängig von der jeweils untersuchten Tumorentität (siehe Abbildung 7).164

In NSCLC-Tumoren blieb *CD74-NRG1* die häufigste Fusion (n=12), aber es fanden sich auch eine Reihe von anderen *NRG1*-Partnern (siehe Abbildung 8), abhängig von den untersuchten Tumorentitäten.<sup>164</sup>



**Abbildung 8: Bekannte Fusionspartner in soliden Tumoren mit NRG1-Fusionen.** Darstellung in Anlehnung an Jonna S, Feldman RA, Swensen J, et al. Detection of NRG1 Gene Fusions in Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019.<sup>164</sup>

In der Mehrzahl von Tumoren mit *NRG1*-Fusionen konnten keine weiteren onkogenen Mutationen, wie zum Beispiel in *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1* und *RET*, nachgewiesen werden. In einer Tumorprobe befand sich eine zusätzliche *BRAF G466A*-Mutation, in einem kolorektalen Karzinom eine weitere *KRAS G12D*-Mutation sowie in drei Fällen je eine zweite *NF1*- oder *NF2*-Mutation. In den meisten Fällen (n=30) waren hingegen Tumorsuppressorgene wie *TP53* oder *CHEK2*, *BRCA2* und *WRN* verändert.<sup>164</sup>

# 2.5. Genetisch modifizierte Mausmodelle als präklinische Modelle der Tumorentstehung

Um eine onkogene Wirkung genetischer Veränderungen zu untersuchen, finden Tiermodelle Verwendung; in der Krebsforschung zu 95% das Modellsystem Maus als präklinisches Modell der Tumorentstehung.<sup>168</sup> Eine große Vielfalt an Methoden und Mausstämmen steht für unterschiedliche Fragestellungen zur Verfügung und erlauben, Mechanismen der Tumorentstehung zu untersuchen.<sup>169</sup> Einmal etabliert sind Mausmodelle auch führend im Hinblick auf mögliche Therapieoptionen, zum Beispiel der Bioverfügbarkeit, Verträglichkeit und Wirkung tumorsupprimierender Substanzen.<sup>168</sup> Man kann verschiedene Modelle unterscheiden: Modelle, in denen Tumorzellen in die Mäuse injiziert oder transplantiert werden, und Modelle, in denen Tumore spontan oder induziert auftreten.<sup>168</sup> Erstere werden wiederum in syngene und xenogene Modelle unterteilt. In syngenen Modellen werden Zellen derselben Spezies zur Tumorinitiation verwendet, dadurch erfolgt keine Abstoßung dieser Zellen. In xenogenen Modellen werden immunkomprimierte Mäuse verwendet, dadurch können auch humane Zellen verwendet werden.<sup>170</sup> Modelle, in denen Tumore spontan oder induziert auftreten, können weiter unterteilt werden in Mausstämme, die anfällig sind für eine spontane Tumorentwicklung, und gentechnisch veränderte Mauslinien. Zur Induktion von spontanen Tumoren werden unter anderem chemische Karzinogene, radioaktive Strahlung sowie virale oder bakterielle Erreger verwendet.<sup>168</sup> In gentechnisch veränderten Mausmodellen sollen genetische Veränderungen, die in humanen malignen Erkrankungen identifiziert wurden, nachgeahmt und diese genauer untersucht werden. Verschiedene gentechnische Methoden erlauben mittlerweile die induzierbare Expression von (Proto-)Onkogenen oder die gezielte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in diesen Mausmodellen.<sup>168,171</sup> Ein wesentlicher methodischer Durchbruch im Modellsystem Maus waren gezielte Veränderungen der murinen Keimbahn mittels homologer Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen, deren Reimplantation und Austragung in Leihmüttern sowie die stabile Transmission der Transgene in Folgegenerationen.<sup>172</sup> Eine Technik, die heute sowohl eine gezielte Inaktivierung von Genen als auch die Integration und Expression veränderter Gene für immer neue, bis hin zu konditionalen Mausmodellen ermöglicht.<sup>173</sup> Ein weiterer Durchbruch ist die Möglichkeit, CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) zur Generation genetisch modifizierter Mausmodelle (GEMM) zu nutzen.<sup>174</sup> Dadurch wurde es möglich, neue GEMM deutlich schneller zu generieren, verschiedene Gene parallel zu modifizieren und so den Effekt von genetischen Alterationen deutlich effizienter in vivo evaluieren zu können.<sup>174-176</sup>

#### 2.5.1. Knockout-Mausmodelle

Um den Funktionsverlust eines Gens zu untersuchen, werden häufig Knockout-Mausmodelle verwendet. In diesen Mausmodellen wird das Gen, dessen Funktionsverlust untersucht werden soll, entweder konstitutiv oder konditional vollständig oder teilweise entfernt.<sup>177</sup> Vor allem in der onkologischen Grundlagenforschung sind Knockout-Mausmodelle entscheidend, um den Einfluss eines Gen- beziehungsweise Proteinverlustes auf die Tumorigenese evaluieren zu können. Im Falle eines Tumorsuppressorgens führt der biallelische Funktionsverlust erwartungsgemäß zu einer Tumor-Prädisposition. In murinen Knockout-Modellen zeigen heterozygote Tiere entweder aufgrund des Funktionsverlustes eines Allels des Tumorsuppressorgenes dosisabhängig (Haploinsuffizienz) oder durch somatische

Mutationen und dem daraus resultierenden Funktionsverlust des zweiten Allels eine gehäufte Tumorentwicklung, die sich teilweise auch erst im Verlauf in Kombination mit weiteren Mutationen zeigt.<sup>177</sup> Es können zwei Arten von Knockout-Mausmodellen unterschieden werden: konstitutive und konditionale Mausmodelle. In konstitutiven Mausmodellen wird das entsprechende Gen ubiquitär ausgeschaltet, so dass es zu einem Funktionsverlust in nahezu allen murinen Geweben, aber auch zum Funktionsverlust während der Embryogenese kommt. Dies kann bei bestimmten Genen zu unerwünschten Effekten wie embryonaler Letalität, Entwicklungsstörungen oder Sterilität führen.<sup>177</sup> Um dies zu umgehen, wurden konditionale Techniken entwickelt, die genetische Veränderungen zeitlich und gewebespezifisch Verwendet dafür ermöglichen. werden häufig Creund Flp-vermittelte Rekombinationstechniken. Cre- und Flp-Rekombinasen sind Enzyme, die eine Rekombination zwischen loxP- (locus of crossover (x) im Bakteriophagen P1) und FRT- (Flp recombinase recognition target) Rekombinationsstellen katalysieren.<sup>177,178</sup>

#### 2.5.2. Cre- und Flp-vermittelte Rekombinationstechniken

Cre-Rekombinase ist ein Enzym aus dem Bakteriophagen P1; Flp-Rekombinase stammt aus dem Hefepilz Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae). Bei beiden Enzymen handelt es sich um Rekombinasen, die bestimmte DNA-Sequenzen als Bindungsstellen erkennen und eine homologe Rekombination zwischen zwei spezifischen DNA-Sequenzen vermitteln können.<sup>178</sup> Durch die paarweise Integration von l*oxP*- oder *FRT*- Erkennungssequenzen in das murine Genom können mithilfe der Cre- oder Flp-. Rekombinasen sowohl Deletionen, Insertionen und Inversionen erzeugt und die Expression von möglichen Onkogenen vermittelt oder abgeschaltet werden. Die Ausrichtung der Erkennungssequenzen wiederum bestimmt das Ergebnis der Rekombination.<sup>179</sup> Zwei gleich ausgerichtete Rekombinationsstellen resultieren in einer Deletion der von den *loxP*- oder *FRT*-flankierten Sequenzen. Zwei gegenläufig ausgerichtete Rekombinationsstellen dagegen resultieren in einer Inversion der dazwischenliegenden DNA-Sequenz (siehe Abbildung 9). Die Veränderungen können sowohl zeitlich, zum Beispiel durch die Gabe eines Cre- oder Flp-exprimierenden Virus zu einem bestimmten Zeitpunkt, als auch gewebespezifisch gesteuert werden.<sup>178</sup>



**Abbildung 9: Exzision oder Inversion durch Cre- oder Flp-vermittelte Rekombination**. Exzision bzw. Inversion werden definiert durch die Orientierung der *IoxP*- bzw. *FRT*-Erkennungssequenzen (Dreiecke) in direkter Orientierung (**A**) bzw. inverser Anordnung (**B**). Abbildung nach Branda CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 2004.<sup>178</sup>

#### 2.5.3. Knockin-Mausmodelle

Um potentielle Onkogene in Mausmodellen zu untersuchen, werden häufig Knockin-Mausmodelle verwendet. Unterschieden werden Modelle, in denen das Gen konstitutiv überexprimiert wird, und konditionale Knockin-Mausmodelle, in denen das entsprechende Gen nur zeit- oder gewebespezifisch exprimiert wird. Prinzipiell könnten Transgene an zufälligen Stellen des murinen Genoms inserieren, was aber gegenüber der zielgerichteten Integration über homologe Rekombination einige Nachteile hat, auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden kann.<sup>177</sup> Ein häufiger Ziel-Locus für homologe Rekombination im murinen Genom ist der Locus *ROSA26* (Reverse Oriented Splice Acceptor, Clone 26) auf Chromosom 6.<sup>180</sup> Eine unerwünschte Expression des integrierten Transgens kann durch eine Stoppkassette vor der kodierenden Region des Transgens verhindert werden. Von *loxP*- oder *FRT*-Sequenzen flankiert kann die Stoppkassette bei Bedarf mittels Cre- oder Flp-vermittelter Rekombination ausgeschnitten werden. Erst dann erfolgt Transkription und Expression des Transgens.<sup>181</sup>

#### 2.6. Generierung des induzierbaren CD74-NRG1-Mausmodells

Um die *CD74-NRG1*-Fusion als onkogene Treibermutation zu validieren, wurde ein konditionales transgenes Mausmodell generiert. Details der Klonierung sind in der Dissertationsschrift von Dr. Dennis Plenker beschrieben.<sup>149</sup> Basierend auf dem *STOP-EGFP-ROSA-CAG*-Vektor (siehe Anhang Abbildung 1) wurde ein chimäres *CD74-NRG1*-Leseraster mittels homologer Rekombination in den *ROSA26*-Locus integriert.<sup>149,182</sup> Bei korrekter
homologer Rekombination in den ROSA26-Locus werden die inserierten Expressionskassetten stark und ubiquitär in verschiedenen Geweben transkribiert.<sup>180,183</sup> Die Expression des CD74-NRG1-Leserasters wird über den CAG-Promotor getrieben, aber durch eine Kanamycin-Stopp-Kassette inhibiert.<sup>184</sup> Die Kanamycin-Stopp-Kassette wird von FRT-Rekombinationsstellen (Flp-Rekombinase-Erkennungsstellen) flankiert und die Stoppkassette kann mittels Flp-Rekombinase ausgeschnitten werden, wodurch die Transkription des CD74-NRG1-Leserasters und die Expression des CD74-NRG1-Fusionsproteins ermöglicht werden kann. Zusätzlich wird das chimäre CD74-NRG1-Leseraster von loxP-Rekombinationsstellen flankiert, was in einem Folgeschritt die Deletion der codierenden CD74-NRG1-Sequenz mittels Cre-Rekombinase ermöglicht.<sup>149</sup> Das fertige CAG-CD74-NRG1-Transgen im STOP-EGFP-ROSA-CAG-Vektor wurde zur Transformation von embryonalen Stammzellen verwendet und die homologe Rekombination in den ROSA26-Locus verifiziert.<sup>182</sup> Nach Injektion der embryonalen Stammzellen stand eine chimäre Maus zur Verfügung, bei der eine Keimbahntransmission an die Nachkommen gesichert werden konnte.

#### 2.7. Fragestellung und Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die in Vorarbeiten identifizierte *CD74-NRG1*-Genfusion ein Onkogen ist. Ausgehend von einer generierten chimären Maus (*R26.FSF.CD74-NRG1*), die eine positive Keimbahntransmission des *CD74-NRG1*-Transgens am *ROSA26*-Locus zeigte, sollte im Rahmen dieser Arbeit die mendelsche Transmission des Transgens verifiziert, heterozygote sowie homozygote Nachkommen identifiziert und durch genetische Kreuzungen statistisch relevante Kohorten generiert werden. Da die *CD74-NRG1*-Fusion in verschiedenen Tumorarten rekurrent nachgewiesen wurde, war eine grundlegende Frage, ob die Genfusion ein initiales Ereignis in der Tumorigenese darstellt und sich mit Hilfe des Mausmodells eine Onkogenität der CD74-NRG1-Expression *in vivo* zeigen lässt.

Meine Arbeit adressiert vier experimentelle Fragestellungen:

- 1) Wird das unrekombinierte R26.FSF.CD74-NRG1-Allel stabil vererbt und ist es aphänotypisch?
- 2) Führt die Exzision der Stoppkassette mittels Flp-Rekombinase zur Expression des CD74-NRG1-Transgens?
- 3) Können im Mausmodell nach Expression des *CD74-NRG1*-Transgens Lungenadenokarzinome induziert werden?
- 4) Führt eine ubiquitäre Expression von *CD74-NRG1* zur Tumorigenese in murinen Geweben außerhalb der Lunge?

Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Tumore zeigen, dass die Maus als Modell dienen kann und Therapiemöglichkeiten für *NRG1*-Fusions-positive Tumore *in vivo* getestet bzw. in einem präklinischen Modell evaluiert werden können. Diese Ergebnisse sind bereits im Rahmen dieser Doktorarbeit veröffentlich worden.<sup>2</sup>

# 3. Material und Methoden

## 3.1. Material

### 3.1.1. Verwendete Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller	
Inkubatoren	HERACell 150i CO <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific	
	Inkubator		
Zentrifugen	Centrifuge 5417R	Eppendorf	
Mikroskop	Axio Vert.A1	Zeiss	
Einkanalpipetten	Research Plus	Eppendorf	
Mehrkanalpipette	Research Plus	Eppendorf	
Sicherheitswerkbank	HeraSafe 2025	Thermo Fisher Scientific	
Gerät zur Zellzählung	Z2 Particle Counter	Beckman Coulter	
Mikroplatten-Reader	Tecan Infinite M1000 pro	Tecan	
Imager Gelelektrophorese	Gel Doc Imaging System,	Biorad	
	Gel Doc XR+		
Westernblot-Kammer	Mini-Gel-Tank, A25977	Thermo Fisher Scientific	
Westernblot-Blot-Modul	Mini-Blot-Modul, B1000	Invitrogen/Thermo Fisher	
		Scientific	
Imager Westernblot	Odyssey CLx Imaging	Licor	
	System		
MRT-Gerät	3.0T MRI system (Igenia)	Philips	
Kleintier-MRT-Spule	40-mm diameter	Philips Research Europe	
PCR-Cycler	Mastercycler nexus GSX1	Eppendorf	
	Vapo.protect	Eppendorf	
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific	
	(ND2000)		

Tabelle 2: Verwendete Geräte

## 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Verwendetes Material	Produktbezeichnung		
AdenoFlpO	Replikations-defizienter Adenovirus zur FLP		
	Rekombination erhalten von: University of		
	Iowa, Viral Core Unit		
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. 23225		
CellTiter Glo Luminescent Cell Viability	Promega, Art. Nr. G7570		
Assay	0: 411:1.4.4.1.4.4000450004		
Complete Mini Proteasehemmer Cocktail	Sigma Aldrich, Art. Nr. 11836153001		
DNase I DMFM (Dulhassala Madified Fagle	RNase-Free DNase Qlagen, Art.Nr. 79256		
	Scientific Art Nr 61065 026		
Dimethylsulfoxid	Carl Poth Art. Nr. 4720.4		
DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered	Gibco DPBS Thermo Fisher Scientific		
saline)	Art Nr 14190235		
EDTA	Carl Roth. Art.Nr. 986.1		
FBS (Fetales Bovines Serum)	Gibco Art.Nr. 10270106		
Gelatin from cold water fish skin	Sigma Aldrich, Art.Nr. G7041-100G		
Histofix 4%	säurefreie (pH 7), phosphatgepufferte		
	Formaldehydlösung 4%, Carl Roth, Art.Nr.		
	P087.5		
Hygromycin B	Life Technologies, Art.Nr. 10687010		
IL-3, rekombinantes murines Interleukin-	Peprotech, Art.Nr. 213-13-10		
3			
Isofluran	Piramal Critical Care Deutschland GmbH,		
Katamin	201INI. 30372.00.00		
Retainin	Katzan Injektionsflasche Zoetis Zul-Nr.		
	6187926 00 00		
Lipofectamine 2000	1mg/ml, Invitrogen, Thermo Scientific Fisher,		
	Art.Nr. 11668019		
MassRuler Express DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. SM1283		
Maxima Hot Start Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. EP0602		
MEM Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco MEM NEAA (100x), Thermo Fisher		
	Scientific, Art.Nr. 11140050		
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Natriumpyrophosphat, Sigma Aldrich, Art.Nr.		
	P8010		
Na <sub>3</sub> vO <sub>4</sub>	Natriumortnovanadat, Sigma Aidrich, Art. Nr.		
Na-dooxycholato	Sigma Aldrich Art Nr. D6750		
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, Art. Nr. 53014		
NaF	Natriumfluorid Sigma Aldrich Art Nr.		
	450022		
Natriumpyruvat	100 mM. Thermo Fisher Scientific. Art.Nr.		
	11360070		
Neuregulin (NRG1), rekombinantes	Human recombinant NRG1-beta1/HRG1-		
//	beta1 EGF domain protein,		
	R&D Systems, Art.Nr. : 396-HB-050		
OptiMEM	Gibco Opti-MEM I (1X), Reduced Serum		
	Medium, Thermo Fisher Scientific, Art.Nr.		
	31985-062		

Novex® 4-20% Tris-Glycin Polyacryl-	Proteingel, 1.0 mm dick, Thermo Fisher		
amid Gel	Scientific, Art.Nr. EC6026BOX		
Page Ruler Plus Prestained Protein	vorgefärbte Proteinleiter (10 – 250 kDa),		
Ladder	Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. 26620		
PBS	Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. 4040133		
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. 15070-063		
Phosphatase Inhibitor Cocktail set 3	Sigma Aldrich, Art.Nr. P0044		
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid,		
	Sigma Aldrich, Art.Nr. 78830		
Polybrene	Santa Cruz Biotechnology, Art.Nr. sc-134220		
Polyvinylidene-Fluorid (PVDF) Membran	Western-Blotting Membrane, 0.45 µm		
	Porengröße, Thermo Fisher Scientific, Art.Nr.		
	88018		
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	EDTA-freier Protease Inhibitor Cocktail,		
	Roche Diagnostics, Art.Nr. 11836170001		
RDD	Qiagen, Art.Nr. 1011132		
Red Taq Polymerase	PCR Reaktions Mix, Sigma-Aldrich, Art.Nr.		
	R2523		
RLT	Qiagen, Art.Nr. 79216		
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Art.Nr. 74104		
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Art.Nr. 79256		
RNase A Solution	Qiagen, Art.Nr. 158922		
RPMI Medium mit GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Art.Nr. 61870010		
Supplement			
ROTI Histofix 4%	Carl Roth, Art.Nr. P087.1		
SDS	Natriumdodecylsulfat, Sigma Aldrich, Art.Nr.		
	L3771		
SuperScript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Art.Nr.		
	18080093		
Tris pH 7,4	Sigma Aldrich, Art. Nr. GE17-1321-01		
Triton X-100	Sigma Aldrich, Art. Nr. 93443		
Trypsin-EDTA	0,05% Trypsin-EDTA, Thermo Fisher		
	Scientific, Art.Nr. 25300054		
Xylazin	Injektionslösung 20 mg/ml, Bayer Vital		
	GmBH, ZulNr.: 6293841.00.00		

Tabelle 3: Verwendete Materialien

## 3.1.3. Verwendete Zelllinien

Name	Kulturmedium	Herkunft	
Ba/F3	Roswell Park Memorial	Zur Verfügung gestellt von	
	Institute (RPMI) Medium	Nikolas von Bubnoff	
	mit 20% FBS and 1%		
	Penicillin–Streptomycin,		
	supplementiert mit II-3		
	(10ng/ml) oder Wehi3b-		
	Überstand (10% des		
	Gesamtvolumens)		

Wehi3b	Roswell Park M	Memorial	Deutsche	Sammlung	g von
	Institute (RPMI)	Medium	Mikroorgan	ismen	und
	mit 10% FBS a	and 1%	Zellkulturen	(DSMZ)	
	Penicillin–Streptor	nycin			
HEK293T	Roswell Park N	Memorial	American	Туре	Culture
	Institute (RPMI)	Medium	Collection (	ATCC)	
	mit 10% FBS a	and 1%			
	Penicillin–Streptor	nycin			

Tabelle 4: verwendete Zelllinien

#### 3.1.4. Verwendete Software

Name	Firma	
GraphPad Prism 8	Graphpad	
Adobe Illustrator 8	Adobe Inc.	
Horos v3.3.6	Horos Project	
R 4.1	The R project, R Core Team	
GSEA 4.1	The Broad Institute	
SnapGene 5.1	Dotmatics	

Tabelle 5: Verwendete Software

#### 3.1.5. Tierversuchsvotum

Die Zucht der Mäuse inklusive der Durchführung der Bildgebung wurden vom örtlichen Tierschutzausschuss und den zuständigen Behörden genehmigt (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, AZ: 84-02.04.2014.A146, 84-02.04.2016.A300).

#### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Ohrmarkierung der Mäuse

Zur Individualisierung der Mäuse erfolgte eine Ohrlochmarkierung gemäß internem Schema; die Ohrbiopsien dienten anschließend zur Genotypisierung. Alternativ wurden Schwanzspitzenbiopsien eingesetzt, um DNA für die Genotypisierung zu gewinnen.

#### 3.2.2. Lyse der murinen Ohrbiopsien zur Gewinnung von DNA

Durch Ohrmarkierung/Schwanzspitzenbiopsie gewonnenes Mausgewebe wurde zunächst in 50 µl Lysispuffer (2,5 ml 10M NaOH plus 1,0 ml 0,5M EDTA pH 8,0 mit destilliertem Wasser auf 1I)

aufgenommen und für eine Stunde bei 95°C inkubiert. Neutralisierung mit 50 µl 40mM Tris-HCl (pH 7), der Überstand wurde nach einer weiteren Stunde bei 95°C direkt in Genotypisierungs-PCRs eingesetzt.

## 3.2.3. Genotypisierung R26.FSF.CD74-NRG1-Allel

Der Genotyp von *R26.FSF.CD74-NRG1*-Mäusen wurde mit einer Kombination von drei Primern detektiert, das *ROSA26*-Wildtyp Allel liefert ein 570 Bp PCR-Produkt und das transgene Allel *ROSA26-CAGGS*-flox ein 380 Bp Produkt.<sup>180,183</sup>

#### Typischer PCR-Ansatz

Primer 1: ROSA26 Forw, 10 µM	(AAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC)	1.0 µl
Primer 2: ROSA26 Rev, 10 µM	(GATATGAAGTACTGGGCTCTT)	1,0 µl
Primer 3: CAGGS Rev, 10 µM	(TGTCGCAAATTAACTGTGAATC)	1,0 µl
Sigma Red Taq Polymerase 2-fach	Mix	12,5 µl
Wasser		8,5 µl
Maus DNA		1,0 µl
PCR Programm		
Schritt 1: Initiale Denaturierung	95°C	2:00 Min.
Schritt 2: Denaturierung	95°C	0:30 Min.
Schritt 3: Annealing	56°C	0:45 Min.
Schritt 4: Elongation	72°C	1:30 Min.
Schritt 5: Finale Elongation	72°C	5:00 Min.
Die Schritte 2 bis 4 wurden 44x wie	derholt: insgesamt 45 Zyklen	

Die Schritte 2 bis 4 wurden 44x wiederholt; insgesamt 45 Zyklen.

Anschließend Lagerung bei 4°C bis zur Gelelektrophorese.

## 3.2.4. Genotypisierung des R26.FlpDel-Hintergrundes

Die Transmission des *R26.FlpDel*-Allels wurde mit den Primern TTA GTT CAG CAG CAC ATG ATG und GGA GGA TTT GAT ATT CAC CTG verifiziert. Trägt die Maus das *FlpDeleter*-Allel im Rosa26-Locus erhält man ein PCR-Produkt mit einer Länge von 450 Basenpaaren.<sup>185,186</sup> PCR-Ansatz und Amplifikation erfolgte analog zu den oben beschriebenen Bedingungen.

#### 3.2.5. Generierung von murinen embryonalen Fibroblasten

Für die Generation von murinen embryonalen Fibroblasten (Mouse Embryonic Fibroblasts; MEFs) wurden Männchen und Weibchen mit dem entsprechenden Genotyp zusammengesetzt und in den darauffolgenden Tagen wurde überprüft, ob die Tiere sich verpaart haben. Dazu wurde beim

Weibchen früh morgens das Vorhandensein eines sogenannten Vaginalpropfens überprüft ("Plugcheck"); er besteht aus Sekreten der vesikulären Drüsen des Männchens und ist ein Zeichen, dass eine Verpaarung stattgefunden hat. Die Detektion eines Vaginalpropfens gilt als Tag 0; an Tag 13,5 wurde dann überprüft, ob das Weibchen trächtig erscheint. Offensichtlich trächtige Weibchen wurden dann mittels zervikaler Dislokation euthanasiert und der Uterus inklusive Embryos entnommen. Embryos wurden unter sterilen Bedingungen vereinzelt, Plazenta und Dottersack abgetrennt sowie zur Genotypisierung der Kopf jedes Embryos entnommen. Das verbliebene Embryogewebe wurde jeweils in eine neue 10 cm-Platte überführt, nach Zugabe von 1 ml Trypsin mithilfe einer Skalpellklinge zerkleinert. und für 45 Min. bei 37°C inkubiert. Die Trypsinreaktion wird durch Zugabe von 9 ml Kulturmedium (DMEM mit L-Glutamin-GlutaMax Supplement + 1% Penicillin/Streptomycin + 10% FBS + 1% Natriumpyruvat + 1% nicht-essentielle Aminosäuren) gestoppt und die Gewebesuspension 10-20 x in einer Pipette aufgezogen, um Zellen zu vereinzeln. Abschließend werden die Zellen jeweils in eine neue T75-Flasche gefüllt und für 2-4 Tage im Inkubator (HERACell 150i CO<sub>2</sub> Inkubator) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz propagiert.<sup>187</sup>

#### 3.2.6. Zelllysate

Vor dem lytischen Aufschluss werden die embryonalen Fibroblasten mit PBS gewaschen; und in sterilem RIPA-Puffer (siehe Tab. 6) resuspendiert. Der Lysepuffer (1ml 10xPuffer, Tabelle 6, verdünnt mit 9ml H<sub>2</sub>O) wird mit 200 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail (Set 3), einer Tablette Complete Mini Proteaseinhibitor sowie 5 µl (200 mM) PMSF supplementiert (Endkonzentration: 1 mM) und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zelllysate bei 20000 rcf und 4°C zentrifugiert, der Überstand in neue Eppendorftubes überführt und die Proteinkonzentration mithilfe des BCA Protein Assay (Thermo Scientific Fisher) bestimmt. Die Zelllysate können direkt für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt oder bei -80°C längerfristig gelagert werden.

Bestandteil	Zielkonzentration	
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM	
Tris pH 7,4	50 mM	
Triton X-100	1%	
Na-deoxycholate	0,5%	
SDS	0,1%	
EDTA	1 mM	
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	1 mM	
NaF	100 mM	
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	2 mM	

Tabelle 6: Zusammensetzung RIPA-Puffer

## 3.2.7. SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (PAGE)

Die Proben werden vor der SDS-PAGE 1:6 mit 5x Laemmli buffer (250mM Tris (pH 6.8), 50% Glycerol, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% SDS and 0.05% Bromphenolblau) versetzt und für 8

Minuten bei 95°C denaturiert. Anschliessend werden 20-30 µg Protein auf ein Novex® 4-20% Tris-Glycin Polyacrylamid Gel geladen. Als Marker wird der Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Proteine werden bei 120 V und 40 mA aufgetrennt.

#### 3.2.8. Westernblot

Zum Blotten der Proteine auf eine PolyVinylidene-DiFluorid (PVDF)-Membran wird die Membran zunächst für eine Minute in Methanol aktiviert und dann in Transferbuffer (25mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20% Methanol) äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wird zwischen PVDF-Membran, Whatman-Papier und Schwämme gelegt und zwischen Anode und Kathode eingespannt, um die Proteine auf die PVDF-Membran zu transferieren. Der Transfer erfolgt bei 25V, 150 mA für 2:15 Stunden.

Nach dem Transfer wird die Membran für eine Stunde getrocknet und, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, erneut in Methanol aktiviert bevor die Membran in 5% Milch/TBS (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wird. Primäre Antikörper werden entsprechend Tab. 8 in TBST (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4, 0,2% Tween-20) verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag werden die Membranen mindestens viermal für mindestens 10 Min. in TBST-Buffer gewaschen. Anschließend erfolgt eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (TBS, 0,2% Tween20, 0,01% SDS, Antikörper 1:20000) bei Dunkelheit. Die Membran wird lichtgeschützt zunächst in TBST und vor dem Imaging in TBS gewaschen, bevor Signale im *Li-cor Odyssey® CLx Imaging*-Gerät detektiert werden.

#### 3.2.9. AdenoFlpO-Behandlung

Im Lungen-spezifischen Ansatz erfolgt die Induktion der *CD74-NRG1* Genexpression per intratrachealer Induktion mittels eines Replikations-defizienten Adenovirus (AdenoFlpO, siehe Anhang Figur 2) mit einer PFU von 5x10<sup>7</sup>. Diese Virusinhalation erfolgt im Alter von 8-12 Wochen unter intraperitonealer Anästhesie mit Ketamin (100mg/kg) und Xylazin (20mg/kg). Das AdenoFlpO-Virus wird dafür in OptiMEM-Medium supendiert, mit 10 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Inhalation der Mäuse mit dem Virus erfolgt.

#### 3.2.10. Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Zum Zeitpunkt 0, 4 Wochen, 8 Wochen, 12 Wochen, 16 Wochen etc. (bis zum Erreichen der Abbruchkriterien) nach Induktion werden die Tiere mittels MRT unter Inhalationsnarkose mit Isofluran untersucht. Für die Bildgebung werden die Tiere mit 3,5% Isofluran in einer Induktionskammer anästhesiert. Als Trägergas wird 100% Sauerstoff verwendet. Nach Verlust der

Stellreflexe wird die Isofluran-Zufuhr auf 2,5% reduziert und während der Scans über eine Atemmaske bedarfsgesteuert appliziert. Die Untersuchung dauert ungefähr 10 Minuten abhängig von der Größe der jeweiligen Maus. Herzschlag und Körpertemperatur werden während der Narkose gemessen und das Wärmebett, auf dem die Maus liegt, wird entsprechend der Körpertemperatur angepasst. Die Augen werden mit Bepanthen-Augensalbe geschützt.

#### 3.2.11. Immunhistochemische Untersuchungen

Tumore und Organe von Mäusen wurden entnommen und in 4% PBS-gepuffertem Formalin für die Paraffineinbettung (FFPE) fixiert. Schnitte aus FFPE-Gewebe (3 µm dick) wurden gemäß den Standardprotokollen der Routinediagnostik (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Köln, Deutschland) behandelt. Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und mit Haemtoxylin und Eosin angefärbt. Die Tumorklassifizierung erfolgte verblindet durch einen zertifizierten Pathologen (AMS) anhand der H&E-gefärbten Objektträger. Zur Beurteilung der Proliferationsaktivität wurde eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt: Verwendet wurde der primäre Antikörper gegen Ki67 (Klon: D3B5; Verdünnung 1:50; Cell Signaling Technology, Cambridge, UK). Die Färbung erfolgte mit dem Leica BOND-MAX Färbegerät (Leica Biosystems, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers. Die Färbung für Ki67 wurde mit dem LabVision Autostainer 480S (Thermo Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

#### 3.2.12. RNA-Extraktion aus murinen Geweben und Zelllinien

Zur RNA-Extraktion aus Mausorganen wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet, seziert, die Mausorgane umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Von jedem Organ wurden 20-30 20 µm Schnitte, abhängig von der Organgröße hergestellt, in Precelllys Lysing Kit Tubes überführt und nach Zugabe von 600 µl RLT-Buffer, 1% ß-Mercaptoethanol nach Herstellerangaben des RNeasy Mini Kits (Qiagen) im TissueLyser (Qiagen) lysiert. Analog wurden aus Zelllinien 600.000 Zellen im RLT-Buffer, 1% ß-Mercaptoethanol lysiert. Zu den Lysaten wurde ein gleiches Volumen 70%iges Ethanol zugegeben und die RNA laut dem Herstellerprotokoll über das RNeasy Mini Kits gereinigt. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Nanodrop (ThermoFisher Scientific), die Lagerung der RNA bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C.

#### 3.2.13. Reverse-Transkriptase-PCR/cDNA Synthese

Um jegliche Kontamination genomischer DNA auszuschließen, wurde die RNA nach Extraktion und vor der Reverse-Transkriptase (RT) Reaktion grundsätzlich mit DNase (1500 Kunitz units) verdaut. Dazu werden 15  $\mu$ I der RNA mit 10  $\mu$ I RDD-Buffer und 2,5  $\mu$ I DNase I (RNase-Free DNase Set, Qiagen) versetzt und das Volumen anschließend auf 100  $\mu$ I mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Min. wird die DNase I über eine

RNeasy Spin-Säule (Qiagen) abgetrennt und die RNA Endkonzentration via Nanodrop erneut gemessen. Als Primer der cDNA-Synthese diente oligo-dT; das SuperScript III Reverse Transkriptase Kit (Invitrogen) wurde exakt nach den Angaben des Herstellers verwendet. Generell wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, in Anwesenheit des oligo-dT Primers, der vier dNTPs für 5 Min. bei 65°C denaturiert und abgekühlt, bevor 5x RT-Puffer, Dithiothreitol und Superscript Reverse Transkriptase (RT) zugegeben wurden. Die RT-Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 50 Min. bei 50°C.

#### 3.2.14. Proteinextraktion von Mausorganen

Ähnlich zur RNA-Isolation wurden Proteine aus 20-30 20µm Gefrierschnitten isoliert. Mausgewebe wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, in RIPA-Lysepuffer lysiert und die Proteinmenge wurde mit dem BCA Protein Assay (Thermo Scientific Fisher) bestimmt.

#### 3.2.15. Parentale BA/F3-Zellen

Die BA/F3-Zelllinie ist eine murine, IL-3 abhängige pro-B-Zelllinie. Diese Zelllinie wird in RPMI-Medium kultiviert, zu dem im Verhältnis 1:10 der filtrierte Überstand einer Interleukin 3sezernierenden Zelllinie (*Wehi3b*) zugefügt wird. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um murine myelomonozytäre Leukämie-Zellen, die hohe Level von Interleukin-3 sezernieren.

#### 3.2.16. BA/F3 ERBB2YF/ERBB3wt-Zellen

Zur weiteren Analyse des Effektes der CD74-NRG1-Fusion auf Zellebene wurde eine BA/F3-Zelllinie verwendet, die so konditioniert wurde, dass sie von NRG-induzierten ERBB2/ERBB3-Heterodimeren abhängig ist. Die Zellen haben wir von Kevan M. Shokat erhalten. BA/F3-Zellen sind normalerweise abhängig von der IL-3-Signalgebung. Die erhaltene Zelllinie wurde von Kevan M. Shokat so verändert, dass sie von exogener NRG1-Zugabe abhängig ist. Dazu wurden BA/F3-Zellen sequentiell erst mit ERBB3 dann mit ERBB2YF Konstrukten transduziert; im rekombinanten ERBB2YF-Protein sind die 9 C-terminalen Tyrosine der Phenylalanin mutiert und können Rezeptorkinase zu im Rahmen der Autophosphorylierung/Aktivierung daher nicht mehr phosporyliert werden. Selektioniert wurden dann ERBB2YF und ERBB3 stabil exprimierende Zellen, die von extrazellulärer Neuregulin Gabe, nicht aber Interleukin-3 im Medium abhängig sind.<sup>188</sup>

#### 3.2.17. Transiente Transfektion in HEK293T-Zellen und Virusproduktion

HEK293T-Zellen wurden mit 70 % Konfluenz in RPMI-Medium (ergänzt mit 10 % FCS und 1% Penicillin/Streptomycin) ausplattiert bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht. Zur Transfektion in T25-Zellkulturflaschen am nächsten Tag wird zunächst OptiMEM-Medium (486 µl) und die benötigte Plasmidmenge (pCLeco für murine Zelllinien) und pBabe Vektor (mit entsprechendem integriertem Gen oder Leervektor, jeweils 4,6 µg Plasmidmenge) inkubiert. Anschließend werden 14 µl TransIT-LT1 Transfektionsreagenz zugegeben.<sup>189</sup> Der Transfektionsansatz wird dann für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und vorsichtig auf die HEK293T-Zellen getröpfelt. Zur Virusernte wird der Zellmediumüberstand (nach 48-72 Stunden Inkubationszeit, je nach Zustand der HEK294T-Zellen und Verfärbung des Zellkulturmediums) abgenommen und zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend mit 0.45 µm Spritzenfiltern steril filtriert und entweder direkt für die Virusinfektion muriner Zelllinien verwendet oder bei -80°C eingefroren.<sup>149</sup>

#### 3.2.18. Virusinfektion

Die Zellen wurden mit einer 50% Konfluenz ausgesät. Viraler Überstand (80% des Endvolumens) und 20% frisches Wachstumsmedium wurden gemischt und 0,7 µg/ml Polybrene wurde zu den Zellen gegeben. Der virale Überstand wurde für 24 bis 48 Stunden auf die Zellen gegeben, um eine Infektion der Zellen zu ermöglichen. 48 Stunden nach Beginn der Transduktion wurde das Medium durch vollständiges Wachstumsmedium ausgetauscht, das 800 µg/ml Hygromycin enthielt, um die transduzierten Zellen zu selektionieren. Das Antibiotikum wurde alle 4 Tage ausgetauscht, bis Kontrollzellen (nicht transduzierte Zellen) negativ selektiert waren.<sup>149</sup>

## 3.2.19. Proliferationsbestimmung der BA/F3-Zellen

Pro Zelllinie wurden initial 30000 Zellen ausplattiert (Tag 0) und die Zunahme des Zelltiters nach 24 bzw. 96 Stunden sowie 8 Tagen mittels eines Beckmann Coulter Particle Counter Z1 bestimmt.

## 3.2.20. RNA-Sequenzierung

Die 3' RNA-Sequenzierung der RNA-Proben erfolgte im *Cologne Center for Genomics* (CCG). Ausgangsmaterial waren 2 µg RNA mit einer Konzentration von 150ng/µl, RIN >8, DNA-frei, OD260/280 zwischen 1,8 und 2,1 und OD260/230 >1,5. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm R und folgenden Paketen analysiert: *AnnotationDbi, org.Mm.eg.db, fgsea, ggpubr* und *stringr*.

Primername	Primersequenz
FLP_NR_1F	ATATCACGGGTAGCCAACGC
FLP_NR_1R	CCTCGCTAGCATCTGTAGGG
FLP_ex_1F	GTTACTCCCACAGGTGAGCG
FLP_ex_1R	TGCTTCTCCTCCTGTGCATG

#### 3.2.21. Primer

CD74-NRG1_Primer39	CTTCCCGGAGAACCTGAGAC
CD74-NRG1_Primer40	ATCTCGAGGGGTTTGAAAGG
Primer1_ROSA26_Forw	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC
Primer2_ROSA26_Rev	GATATGAAGTACTGGGCTCTT
Primer3_CAGGS_Rev	TGTCGCAAATTAACTGTGAATC
FlpDel_483	TTA GTT CAG CAG CAC ATG ATG
FlpDel_608	GGA GGA TTT GAT ATT CAC CTG

Tabelle 7: Verwendete Primer

# 3.2.22. Antikörper

Protein	Firma	Bestellnummer	Verdünnung
CD74	Abcam	ab22603	1:1000 (Westernblot)
HSP90	Cell Signaling	4877S	1:1000 (Westernblot)
NRG1 ß1	R&D systems	AF-396-NA	1:200 (Westernblot)
IRDye800CW Donkey	Licor	925-32214	1:20000 (Westernblot)
anti-Goat IgG (H+L)			
IRDye 680LT Donkey	Licor	925-68022	1:2000 (Westernblot)
anti-Mouse IgG (H+L)			
IRDye 800CW Goat	Licor	926-32211	1:20000 (Westernblot)
anti-Rabbit IgG (H+L)			
Ki67 (Klon: D3B5)	Cell Signaling	12202	1:50 (IHC)

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

## 4. Ergebnisse

# 4.1. Genotypisierung chimärer Mäuse und Erzeugung von Kohorten für zwei Flp-Rekombinationsstrategien

Ausgangspunkt meiner Arbeiten war eine einzelne chimäre Maus mit Keimbahntransmission des *CD74-NRG1*-Transgens, die mit negativen F1-Nachkommen verpaart worden war. Die Kreuzungshistorie von 6 F2-Nachkommen, positiv für das *R26.FSF.CD74-NRG1* Allel und ihr Genotyp, homozygot bzw. heterozygot, waren unbekannt; die Fertilität war generell unbefriedigend.

In Rücksprache mit Prof. Dr. Thomas Wunderlich, aus dessen Labor, der zur Generation der chimären Mäuse verwendete *STOP-EGFP-ROSA CAG*-Vektor (siehe Anhang Fig. 1) stammte, gelang es mir nachzuweisen, dass nur 1 von 19 Mäusen für das *CD74-NRG1*-Transgen heterozygot war. Die zuvor verwendeten Primer CD74-NRG1\_Primer39 und CD74-NRG1\_Primer40 konnten zwar die Transmission des Transgens zeigen, aber aufgrund ihrer Position in der *CD74-NRG1*-Sequenz nicht zwischen homozygoten und heterozygoten Mäusen unterscheiden (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: Schematische Darstellung der *CD74-NRG1*-cDNA, die zur Erzeugung der *Rosa26FSF.CD74-NRG1*-Mäuse verwendet wurde. Schwarze Dreiecke markieren die Positionen der Primer innerhalb des Transgens.<sup>2</sup>

Die Kreuzungshistorie legte außerdem die Vermutung nahe, dass sich die reduzierte Fertilität über Inzucht erklärt. Als erster Schritt wurde die heterozygote *R26.FSF.CD74-NRG1*-Maus daher mit Wildtyp-C57BL/6N-Mäusen verpaart, was die Fertilität deutlich verbesserte. Die Segregation des *R26.FSF.CD74-NRG1*-Allels in den Folgegenerationen folgte strikt den Mendelschen Regeln und unterstützte die Inaktivität des *CD74-NRG1*-Leserasters hinter der FRT-flankierten Stoppkassette (siehe Abbildung 11).



Abbildung 11: Schematische Darstellung der STOP-EGFP-ROSA CAG-CD74-NRG1-Sequenz<sup>2</sup>

Für meine beabsichtigten Studien zur Onkogenität der *CD74-NRG1*-Fusion konnten jetzt zwei experimentelle Ansätze parallel verfolgt und 3 Kohorten von je 15 Nachkommen generiert werden:

- Verpaarung von R26.FSF.CD74-NRG1-Mäusen mit einer etablierten Flp-Deleter-Mauslinie (*FlpDel*).<sup>190</sup> In *FlpDel*-Mäusen beginnt die Flp-Rekombinase-Expression in der Zygote und setzt sich in den meisten embryonalen Zellen fort.<sup>190</sup> In Kombination mit dem R26.FSF.CD74-NRG1-Allel sollte die FRT-flankierte Stoppkassette so in nahezu allen Geweben und Organen der Maus durch Flp-vermittelte Rekombination deletiert werden und das CD74-NRG1-Fusionsprotein ausgeprägt werden.
- 2. Eine weitere Kohorte von *R26.FSF.CD74-NRG1*-Mäusen für die intratracheale Instillation mittels adenoviral exprimiertem Flp (*AdenoFlp-Virus*), wodurch eine lungenspezifische Rekombination im Alter von 12 Wochen induziert werden sollte.
- 3. Als Kontrolle wurde eine dritte *R26.FSF.CD74-NRG1*-Kohorte als Referenz für die *FlpDel-* und AdenoFlp-Kohorten verwendet.

#### 4.2. Flp-Rekombinase abhängige Exzision der Stoppkasette

Um intakte *FRT*-Rekombinationsstellen im *R26.FSF.CD74-NRG1*-Allel nachzuweisen wurden aus genomischer Maus-DNA die Regionen zu beiden Seiten der Stoppkassette mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzanalyse bestätigte intakte *FRT*-Sequenzen an beiden Seiten der Stoppkassette vor dem *CD74-NRG1*-Fusionsleseraster in den überprüften Mäusen. Aus der *FRT*-Perspektive ergab sich somit kein Anlass die Flp-vermittelte Rekombination und Exzision der Stoppkassette und die konditionale Aktivierung des *CD74-NRG1*-Transgens in Frage zu stellen.



Abbildung 12: Nachweis der Flp-mediierten Rekombination in doppelt-transgenen *R26.CD74*-*NRG1/FlpDel-Mäusen*. A: Primer-Positionen (rote Pfeile) im *R26.CD74-NRG1*-Allel. Unter den gewählten PCR-Bedingungen wird nur nach erfolgter Exzision der Stoppkassette ein PCR-Produkt von 505 Basenpaaren (Bp) Länge gebildet. B: PCR-Ergebnis in *R26.CD74-NRG1/FlpDel-Mäusen* mit dem Primerpaar FLP\_ex\_1F und FLP\_ex\_1R. C: Primer-Positonen im unrekombinierten *R26.CD74-NRG1*-Allel Ausgangsprodukt, erwartet wird ein PCR-Produkt vor Rekombination von 367 Bp. D: PCR- Analyse der gleichen *R26.CD74-NRG1/FlpDel* Nachkommen wie in B mit Primerpaar FLP\_nr\_1F und FLP\_nr\_1R; beachte Maus 9 mit negativem Ergebnis in B. E: Genotypisierung der getesteten *R26.CD74-NRG1/FlpDel*-Nachkommen in B bzw. D. In Abwesenheit des *FlpDel*-Allels zeigt Maus 9 keine Exzision der Stoppkassette in B, aber das unrekombinierte Ausgangsallel in D.

Generell konnte die Exzision der Stoppkassette mittels PCR in doppelt-transgenen *R26.CD74-NRG1/FlpDel-*Mäusen nachgewiesen werden. Ergebnisse mit zwei verschiedenen Primerpaaren sind in Abbildung 12 exemplarisch dargestellt. Die beiden Primer (FLP\_ex\_1F und FLP\_ex\_1R) zum Nachweis der Exzision binden außerhalb der beiden *FRT*-Rekombinationsstellen, distal bzw. proximal des *CD74-NRG1*-Leserasters. Bei erfolgter Flp-spezifischer Rekombination und Exzision der Stopp-Kassette wird ein PCR-Produkt von 505 Basenpaaren erwartet. In den doppelt transgenen Mäusen (4, 5, 7, 11, 12, 14), die sowohl das *R26.FSF.CD74-NRG1* als auch das *FlpDel*-Transgen tragen (siehe Abbildung 12E), ist die

Stopp-Kassette ausgeschnitten und ein PCR-Produkt von 505 Bp sichtbar. Mit dem inaktiven, unrekombinierten Transgen (z.B. Maus 9 in Abbildung 12B) entsteht bei den gewählten PCR-Bedingungen kein Produkt; die Distanz von 2,7 kb zwischen beiden Primern beim Überlesen der Stoppkassette ist zu groß (siehe Abbildung 12A). Ebenso entsteht in Mäusen (z.B. Maus 3), die nur das *FlpDel*-Transgen tragen, kein Produkt, da die Zielsequenzen der Primer fehlen.

Zum Nachweis des nicht rekombinierten *R26.FSF.CD74-NRG1*-Transgens wurde das Primerpaar FLP\_nr\_1F und FLP\_nr\_1R kombiniert, letzterer bindet innerhalb der Stoppkassette (siehe Abbildung 12C) und seine Erkennungssequenz fehlt bei Exzision der Stoppkassette. Das entsprechende nicht-rekombinierte PCR-Produkt ist 367 Bp lang und in Maus 9 (Abbildung 12D), die kein *FlpDel*-Allel besitzt (Abbildung 12E) und in der dementsprechend auch keine Exzision der Stoppkassette erfolgt (Abbildung 12B) nachweisbar. Die FLP\_nr\_1F/R-Primerkombination erlaubt es die Effizienz der Flp-medierten Exzision grob abzuschätzen. In Maus 7 (Abbildung 12D) war die Exzision der Stoppkassette wahrscheinlich partieller als in den anderen Mäusen, wo keine oder nur sehr schwache PCR-Produkt-Banden nachweisbar waren. Relativ zu Maus 9, ohne *FlpDel*-Transgen, ist die Menge des PCR-Produkts allerdings gering, während das Exzisions-PCR-Produkt in Abbildung 12B prominent ist; selbst in Maus 7 ist das nicht-rekombinierte *R26.FSF.CD74-NRG1*-Allel daher unterrepäsentiert.

#### 4.3. Überprüfung der Transgen-Transkription nach Flp-Rekombination

Die Transkription des *CD74-NRG1*-Transgens aus dem *ROSA26*-Locus wurde in doppelttransgenen *R26.FSF.CD74-NRG1/FlpDel*-Nachkommen und in verschiedenen murinen Geweben untersucht. Konstruktionsbedingt enthält das chimäre *CD74-NRG1* Leseraster am *ROSA26*-Locus keine Introns; es war damit nicht möglich, mRNA-spezifische, zum Beispiel Intron-überspannende Primer für die Reverse-Transkriptase (RT)-PCR zu generieren.<sup>149</sup> Um falsch-positive PCR-Ergebnisse aufgrund genomischer DNA-Kontaminationen in Gesamt-RNA aus verschiedenen Mausgeweben auszuschließen, wurden PCR-Analysen jeweils vor und nach einer Desoxyribonuclease I (DNase I) Behandlung sowie nach Überschreiben von RNA in cDNA durch Reverse Transkriptase (RT) durchgeführt. Alle PCR-Reaktionen erfolgten unter identischen Reaktionsbedingungen, wobei der verwendete Forward Primer (CD74-NRG1-39) innerhalb der N-terminalen CD74-Sequenz bindet und die Position des Reverse Primers (CD74-NRG1-40) mehr C-terminal im Bereich des NRG1-Leserasters liegt. Ein PCR-Produkt kann daher nur vom chimären *CD74-NRG1*-Transgen stammen und Abbildung 13 zeigt exemplarisch die Analyse der doppelt transgenen *R26.FSF.CD74-NRG1* +/ *Flp Del*+ Maus A12.55. Das PCR-Produkt von 263 Bp Länge in unbehandelter Gesamt-RNA in Abbildung 13A basiert auf kontaminierender genomischer DNA des *CD74-NRG1*-Allels. Nach DNase I Behandlung (Abbildung 13B) ist das PCR-Produkt in keinem Gewebe mehr nachweisbar, taucht aber nach RT-Reaktion, das heißt dem Überschreiben der RNA in cDNA-Template, in der RT-PCR Reaktion wieder auf (Abbildung 13C). Die Menge des RT-PCR Produktes in Abbildung 13C nimmt von Niere und Lunge über Herz zu Milz und Gehirn ab. In Abwesenheit des *FlpDel*-Transgens war in keinem *R26.FSF.CD74-NRG1*-positiv-getesteten Tier ein spezifisches RT-PCR Produkt nachweisbar. Für Maus A12.55 zeigt das RT-PCR-Ergebnis in Abbildung 13C exemplarisch ein CD74-NRG1-Transkript in allen getesteten Geweben. Eine Aktivierung des chimären *CD74-NRG1*-Fusionsgens ist somit konditional über Flp-Rekombinase-vermittelte Rekombination möglich.



Abbildung 13: Transkription des *CD74-NRG1*-Transgens in Maus A12.55. A: Genomische PCR auf Gesamt-RNA. Das PCR-Produkt des fusionierten *CD74-NRG1*-Leserasters in den getesteten Geweben Milz, Niere, Lunge, Herz und Gehirn beruht auf Kontamination mit genomischer DNA. B: Wiederholung der PCR-Reaktion wie in A nach DNasel-Behandlung der Gesamt RNA. C: Reverse Transkriptase-PCR nach DNasel-Behandlung der Gesamt-RNA. Ein cDNAabhängiges 263 Bp PCR-Produkt des *CD74-NRG1* Fusionsleserasters ist in allen 5 Geweben nachweisbar.

#### 4.4. Überprüfung der Proteinexpression nach Rekombination

Der Test auf Transkription nach Flp-Rekombinase-vermittelter Exzision der Stoppkassette wurde mit Murinen Embryonalen Fibroblasten (MEF) wiederholt. Hierzu wurden Mäuse der R26.FSF.CD74-NRG1-Mauslinie mit FlpDel-Mäusen verpaart. Doppelt-transgene F1-Nachkommen, heterozygot für das R26.FSF.CD74-NRG1-Transgen, wurden per PCR identifiziert und wiederum verpaart. Erwartet werden in der F2-Generation bezüglich des R26.FSF.CD74-NRG1-Allels homozygote, heterozygote und Wildtyp-Embryonen, die sich mit den Primern ROSA26 Forw, ROSA26 Rev, CAGGS Rev mittels genomischer PCR unterscheiden lassen. Der FlpDel-Genotyp segregiert unabhängig und spielt in der F2-Generation nur noch eine untergeordnete Rolle, da die Stoppkassette wahrscheinlich bereits in elterlichen F1-Embryos ausgeschnitten wurde. Trächtige Weibchen wurden an Tag 13.5 getötet und aus den Embryonen (F3) wurden jeweils MEFs generiert.<sup>191</sup> Ein typisches Genotypisierungsergebnis ist in Abbildung 14A dargestellt. Homozygot für das aktivierte R26.FSF.CD74-NRG1-Transgen sind die F3-Embryonen E1 und E7 (380 Bp PCR-Produkt), das originäre nicht-rekombinierte R26.FSF.CD74-NRG1 tragen E3 und E8 (570 Bp PCR-Produkt), die restlichen Embryonen (E2, E4 und E6) tragen jeweils ein rekombiniertes und ein nicht rekombiniertes Allel.

Aus den in Abbildung 14A genotypisierten Embryonen wurden embryonale Fibroblasten generiert und analog zum dreistufigen Ansatz (siehe Abbildung 13A-C) auf Transkription des *CD74-NRG1*-Transgens hin untersucht. Wie in Organen transgener Mäuse war die Gesamt-RNA genomisch kontaminiert. Das genomische PCR-Produkt (Abbildung 14B Mitte) konnte in allen *CD74-NRG1*-positiven murinen embryonalen Fibroblasten durch DNase I-Behandlung beseitigt werden (Abbildung 14B), in der abschließenden Reverse Transkriptase-PCR entstand erwartungsgemäß nur in *CD74-NRG1*-positiven MEFs ein Produkt der erwarteten Größe von 263 Bp (Abbildung 14B). Die schwache RT-PCR Bande für Embryo E8 erklärt sich durch eine defekte Geltasche und Kontamination aus der Nachbarprobe E7. Zusammenfassend zeigten Mausgewebe und MEFs eindeutig, dass Flp-mediierte Rekombination und Exzision der Stoppkasette vor dem *CD74-NRG1*-Leseraster die Transkription des Transgens ermöglicht.



Abbildung 14: Genotypisierung des R26.FSF.CD74-NRG1-Allels in Mausembryonen sowie anschließende Transkription und Translation des CD74-NRG1-Transgens in MEFs. A: Segregation des R26.FSF.CD74-NRG1-Transgens in 8 Mausembryonen, Embryonen E1 und E7 homozygot für das Transgen, E2, E4 und E6 heterozygot und E3, E8 Wildtyp. B: Transkription des CD74-NRG1-Transgens in murinen embryonalen Fibroblasten. PCR-Analyse analog zu Abb 13. Die Fotos zeigen von oben nach unten: PCR auf Gesamt-RNA und genomische Kontaminationen in E1, E2, E4, E6 sowie E7; keine Amplifikationsprodukte nach DNasel Behandlung sowie cDNA abhängige PCR Produkte nach Reverser Transkription in homo- bzw. heterozygoten R26.FSF.CD74-NRG1-Nachkommen. Blaue Pfeile deuten auf das CD74-NRG1-PCR-Produkt hin. C: Translation der CD74-NRG1 mRNA in MEF-Proteinextrakten und Nachweis per Western-Blot: oben HSP90 Ladekontrolle, darunter immunhistochemischer Nachweis des Tranlationsproduktes (35 kDa) mit den anti-CD74 bzw. anti-NRG1 Antikörpern. Die Proteinmengen reflektieren zwei Transgenkopien in den Linien E1 und E7 bzw. je eine Kopie in E2, E4 und E6. D: Doppelfärbung des Fusionsproteins (gelb, Höhe markiert mit gelbem Pfeil) mit anti-CD74 bzw. anti-NRG1 und grün- bzw. rot-markierten sekundären Antikörpern. Homozygote (E1, E7) bzw. heterozygote (E2, E4, E6) R26.FSF.CD74-NRG1-MEFs unterscheiden sich wie bei den Einzelfärbungen in ihrer Signalstärke; wildtypische Linien sind signalfrei.<sup>2</sup>

#### 6.2 Nachweis der CD74-NRG1-Translation und des Fusionsproteins

Als letzter Schritt wurde immunhistologisch über Western-Blots überprüft, ob Transkription und Translation korrelieren. Hierzu wurden Proteinextrakte aus den MEFs von homozygoten, heterozygoten und Wildtyp-Embryonen hergestellt. Das Ergebnis des Western-Blots nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine ist in Abbildung 14D dargestellt, es wurden vergleichbare Proteinmengen aufgetragen (Ladekontrolle: HSP90). Das Fusionsprotein CD74-NRG1 ist sowohl mit dem anti-CD74 Antikörper als auch mit dem anti-NRG1-Antikörper nachweisbar und erwartungsgemäß nur in MEFs aus Embryos, in denen die Stoppkassette via Flp-Rekombinase ausgeschnitten wurde (vergleiche mit Abbildung 14A). Die detektierbare

Proteinmenge scheint bei Homozygotie des *R26.FSF.CD74-NRG1*-Allels in den Linien E1 und E7 höher zu sein als in den heterozygoten Linien E2, E4 und E6. Die immunologische Reaktion mit beiden Antikörpern zeigt, dass nach Exzision der Stoppkassette ein Protein, mit dem für CD74-NRG1 vorhergesagten apparenten Molekulargewicht von 35 kDa translatiert wird. Die beobachtete positive Korrelation zwischen Proteinmenge und Anzahl aktiver Transgene in MEFs suggeriert, dass die Translation mit der mRNA-Menge korreliert.<sup>2</sup>

Der anti-CD74 und der anti-NRG1 Antikörper reagieren zwar unabhängig voneinander im Western-Blot mit einem Protein gleichen Molekulargewichts, aber ein Antikörper spezifisch nur für das CD74-NRG1-Fusionsprotein ist nicht verfügbar. Um zu zeigen, dass es sich bei den detektierbaren Proteinbanden um das Fusionsprotein handelt, wurden beide primären Antikörper in Kombination verwendet (siehe Abbildung 14D) und mit unterschiedlichen Fluoreszenz-markierten spezies-spezifischen sekundären Antikörpern nachgewiesen. Der monoklonale anti-CD74-Antikörper stammt aus der Maus, die anti-NRG1 Antikörper aus der Ziege, die sekundären anti-Maus und anti-Ziege Antikörper waren rot bzw. grün fluoreszenz-markiert. Proteinbanden, an denen beide sekundären Antikörper binden, fluoreszieren daher gelb. Eine entsprechende gelbe Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht des CD74-NRG1-Fusionsproteins ist sowohl in homozygoten (E1, E7) als auch schwächer in heterozygoten (E2, E4 E6) MEFs detektierbar (Abbildung 14D). Sowohl der Einzelnachweis wie die kombinierte Detektion mit CD74- oder NRG1-Antikörpern unterstützen die Translation des CD74-NRG1-Fusionsproteins in murinen embryonalen Fibroblasten, wobei die nachweisbare Menge mit der Kopienzahl korreliert.

Im Gegensatz zu MEF-Zelllinien war der Nachweis der Expression des CD74-NRG1-Fusionsproteins in verschiedenen murinen Geweben bisher nicht erfolgreich. Obwohl mehrere *R26.FSF.CD74-NRG1+/FlpDel+* Mäuse und verschiedene Methoden der Proteinextraktion getestet wurden, gelang es nicht das CD74-NRG1-Fusionsprotein zweifelsfrei nachzuweisen. Ein typisches Resultat zeigt Abbildung 15 für die Maus A12/55, für die auf der RNA-Ebene die Transkription des *CD74-NRG1*-Transgens in verschiedenen Geweben (siehe Abbildung 13) eindeutig nachweisbar war.



Abbildung 15: Westernblot-Ergebnisse in Proteinlysaten aus verschiedenen Mausgeweben. Die Gewebetypen sind über der jeweiligen Spur angegeben, analog zu Abbildung 14 D wurden die Antikörper anti-CD74 und anti-NRG1 simultan verwendet und mit grün- bzw. rot-fluoreszierenden sekundären Antikörpern detektiert.

Die Proteindetektion mit den primären anti-CD74- und anti-NRG1-Antikörpern sowie unterschiedlichen, fluoreszierenden sekundären Antikörpern erfolgte wie für MEFs (Abbildung 14D) erfolgreich durchgeführt. Allerdings wurde eine prominente, grün-fluoreszierende Bande mit dem anti-NRG1 Antikörper nur in Hirn-Extrakten beobachtet. Nach dem Molekulargewicht entspricht sie am ehesten dem endogenen murinen NRG1-Protein von 44 kDa. Hingegen ist das rot-markierte, native CD74 Protein (24 kDa) in allen Geweben nachweisbar. Eine Bande mit der erwarteten Größe des CD74-NRG1-Fusionsprotein war leider weder in dieser Doppelfärbung noch mit den individuellen anti-CD74 oder anti-NRG1 Antikörpern nachzuweisen. Teilweise mit anti-CD74 oder anti-NRG1 detektierbare Banden im erwarteten Größenbereich von 35 kDa waren im Gegensatz zu den MEF-Ergebnissen (Abbildung 14D) in der Doppelfärbung von Gewebeextrakten nie positiv. Charakteristisch waren Ergebnisse wie im Herzproteinextrakt (Abbildung15), wo ein ca. 40 kDa Peptid im NRG1-Nachweis detektierbar ist, aber nicht mit dem anti-CD74 Antikörper reagiert. Im Gegensatz zu MEFs und trotz nachgewiesener Transkription des R26.FSF.CD74-NRG1-Transgens in den jeweiligen Organen der A12.55 Maus blieb die Translation, d.h. die Expression des CD74-NRG1-Fusionsproteins in vivo leider offen und müsste weiter analysiert werden.

#### 4.5. Mausmodelle zur Verifikation der CD74-NRG1-Fusion als Treibermutation

Wie zu Beginn des Ergebnisteils beschrieben, wurden zwei Rekombinationsstrategien verfolgt. Neben der bisher ausführlich analysierten Rekombination in der *R26.CD74-NRG1/FlpDel*-Kohorte in frühen Embryonalstadien, wurde eine lungenspezifische Rekombination mittels *AdenoFlpO*-Inhalation (siehe Anhang Abbildung 2) im Alter von 12 Wochen induziert (siehe Abbildung 16A). Die Konsequenzen der Expression des CD74-NRG1-Fusionsproteins beider *R26.FSF.CD74-NRG1*-Kohorten wurden über monatliche MRT-Untersuchungen ab der 16. Woche nach Geburt verfolgt. Bis auf den Zeitpunkt der Flpmediierten Exzision der Stoppkassette im *CD74-NRG1*-Transgen sind die Versuchsschemata für beide Kohorten identisch (Abbildung 16A mit B).<sup>2</sup>



Abbildung 16: Schematischer Versuchsaufbau der *in vivo*-Experimente. A: Versuchsablauf in der *AdenoFlpO*-Kohorte mit *AdenoFlpO*-Inhalation nach 12 Wochen B: Versuchsablauf in der *R26.CD74*-*NRG1/FlpDel*-Kohorte (*FlpDel*-Transgen schon im frühen Embryo exprimiert, Rekombination des *R26.CD74*-*NRG1*-Allels schon bei Geburt). Eine MRT-Bildgebung erfolgte ab einem Alter von 16 Wochen in vierwöchigem Abstand bis zum Erreichen eines Abbruchkriteriums.<sup>2</sup> Nicht dargestellt ist die Kontrollkohorte von *R26.FSF.CD74-NRG1-*Mäusen, die nicht Flpinduziert wurden, aber ebenfalls zu den jeweiligen Zeitpunkten auf eine Tumorentwicklung hin untersucht wurden. Während nach *AdenoFlpO*-Inhalation Lungentumore erwartet wurden, da die *CD74-NRG1*-Translokation ursprünglich in NSCLC-Tumoren entdeckt wurde, bestand zur Identität möglicher Tumore bei früher embryonaler Aktivierung der *R26.FSF.CD74-NRG1*-Expression im *FlpDel*-Hintergrund keine dezidierte Erwartung.

Die Tiere wurden mittels Score Sheet (siehe Anhang Tabelle 1) beurteilt; MRT-Bildgebungen erfolgten im Abstand von 4 Wochen bis zum Erreichen von Abbruchkriterien. Die Summe der Beurteilungspunkte im Score Sheet führt zur Unterteilung in vier Belastungsgruppen: keine Belastung (Punkte = 0), geringe Belastung (1 bis 9 Punkte), mittelgradige Belastung (10 bis 19 Punkte) und hochgradige Belastung (20 Punkte). Generelles Abbruchkriterium war das Erreichen einer mittelgradigen Belastung. Das betroffene Tier wurde dann mittels zervikaler Dislokation schmerzlos getötet. Tumor- und Normal-Gewebe wurden für weitere Analysen sowohl in Formaldehydlösung (ROTI Histofix 4%) fixiert als auch kryokonserviert aufbewahrt.



Abbildung 17: Vergleich von Überlebenskurven und Tumorentwicklung in den Versuchskohorten. Links: Überlebenskurven in verschiedenen Kohorten nach Kaplan-Meier: schwarz=unbehandelte *R26.CD74-NRG1*-Kontroll-Kohorte, gelb=*R26.CD74-NRG1/Adeno*Flp-Kohorte und rot=*R26.CD74-NRG1/FlpDel*-Kohorte. **Rechts:** Tumorentwicklung als Endpunkt in der *R26.CD74-NRG1/FlpDel*-Kohorte; spontane Todeszeitpunkte bzw. das Erreichen von Abbruchkriterien sind linear oben aufgetragen.<sup>2</sup>

Bei Übertragung der Überlebensraten in vergleichende Diagramme werden Unterschiede sehr deutlich (Abbildung 17). Für die unbehandelte Kontrollgruppe (schwarze Linie) und AdenoFlp-Kohorte (gelbe Linie) ist die Lebenserwartung bis zur 80. Woche sehr ähnlich und nimmt dann mit dem Erreichen von Abbruchkriterien ab. Demgegenüber erscheint die Lebenserwartung in der *R26.CD74-NRG1/FlpDel-*Kohorte (rote Linie) früher reduziert, was sich bei einer

Fokussierung auf das Abbruchkriterium Tumorentwicklung rechts in Abbildung 17 deutlich darstellt.

Zusammenfassend lassen sich aus den Kohorten mit initial je 15 Tieren drei Schlussfolgerungen ziehen:

- Das inaktive R26.FSF.CD74-NRG1-Allel vor Flp/FRT-mediierter Exzision der Stoppkassette besitzt keine nachweisbaren Tumor-fördernden Eigenschaften über einen Testzeitraum von bis zu 137 Wochen.
- 2. Bei später Aktivierung des *CD74-NRG1*-Transgens über AdenoFlp-Inhalation ließ sich weder mittels MRT-Bildgebung noch histologisch eine Tumor-treibende Aktivität in der Lunge nachweisen.
- Im Gegensatz zur AdenoFlp-Induktion nach 12 Wochen entwickeln bei früher embryonaler Aktivierung des *CD74-NRG1*-Transgens im *FlpDel*-Hintergrund 11 von 15 Mäusen Tumore, eine eindeutige Präferenz besteht für subkutane Sarkome (8/11).

Im Ergebnis unterstützen die Tumore im *FlpDel*-Hintergrund die Arbeitshypothese, dass die mit menschlichen Tumoren assoziierte interchromosomale Translokation zwischen *CD74* auf Chr.5 und *NRG1* auf Chromosom 8 onkogen ist. Im *R26.FSF.CD74-NRG1*-Mausmodell zeigt sich allerdings nur bei frühzeitiger Aktivierung der *CD74-NRG1*-Expression in der Embryonalentwicklung eine Tumor-fördernde Eigenschaft. Entgegen der frühzeitigen nachweisbaren Exzision der Stoppkassette im Embryo (siehe Abbildung 12) treten Tumore allerdings zeitlich sehr verzögert erst nach 72 Wochen auf. In Abweichung zur Assoziation der *CD74-NRG1*-Translokation in NSCLC-Patienten ließen sich im Mausmodell nach AdenoFlp-Inhalation in der 12. Lebenswoche keine Lungentumore induzieren.<sup>2</sup>

#### 4.6. Tumore in R26.CD74-NRG1:FlpDel-Nachkommen

Zur Detektion möglicher Tumore wurden alle Mäuse der drei Kohorten alle 4 Wochen narkotisiert und mittels MRT-Bildgebung untersucht. In der *R26.FSF.CD74-NRG1-* Kontrollgruppe sowie in der *AdenoFlpO*-induzierten Kohorte konnten in keinem Tiere Tumore nachgewiesen werden. Hingegen waren in den Nachkommen der *R26.FSF.CD74-NRG1:FlpDel*-Kreuzungen Tumore sowohl mittels MRT als auch teilweise visuell subkutan erkennbar und klinisch beurteilbar (siehe Abbildung 18).



Abbildung 18: Typische Unterhaut-Tumore an unterschiedlicher Lokalisation. A: Tumor am linken Ohr B: Tumor am Rücken C: Tumor am Rücken D: Tumor Flanke E: Tumor am Schwanzansatz

In den MRT-Untersuchungen waren tieferliegende und kleinere Tumore besser nachweisbar. Der radiologische Befund zeigt meist unscharf berandete, ovalär konfigurierte, subkutan gelegene Raumforderungen mit inhomogenem Binnensignal (T1-intermediär, T2-hyperintens ohne Signalunterdrückung in den fettgesättigten Sequenzen; siehe Abbildung 19). Die Mehrzahl der Tumore lag im Unterhautgewebe der *R26.FSF.CD74-NRG1/FlpDel*-Mäuse; ihr Wachstum hier war nicht sichtbar infiltrativ.<sup>2</sup>



Abbildung 19: Exemplarische MRT-Bilder von Sarkomen in der *R26.CD74-NRG1/FlpDel*-Kohorte. Mäuse wurden monatlich im MRT untersucht. Die Kästchen zeigen die subkutanen Tumore in drei verschiedenen Mäusen an verschiedenen Lokalisationen. Die Kästchen zeigen vergrößerte Ausschnitte der subkutanen Tumore, Pfeile zeigen hierbei auf die Tumore. Buchstaben weisen auf die jeweiligen Organe/Gewebe hin (**a** Wirbelsäule **b** paravertebrales Muskelgewebe **c** Darm **d** Harnblase **e** Gehirn **f** Ohr).<sup>2</sup>

Seltener im Vergleich zu den Tumoren im Unterhautgewebe traten in drei *R26.CD74-NRG1/FlpDel-*Mäusen Tumore im Bauchraum, der Leber und dem Darm auf. Am zweithäufigsten (3/15) war die Leber betroffen, sowohl unabhängig als auch gemeinsam mit einem der subkutanen Tumore. Bei einer Kohortengröße von nur 15 Tieren sind vereinzelte Bauch-, Leber- oder Darmtumore wenig repräsentativ; weitere Analysen wurden daher weitgehend auf die vorwiegende Tumorart "subkutanes Sarkom" (8/15) beschränkt.<sup>2</sup>



**Abbildung 20: Histologische Dokumentation eines typischen murinen Sarkoms; A:** HE-Färbungen. Pfeil in Teil A deutet auf eine Metaphase (Mitose) **B:** Ki67-Färbungen<sup>2</sup>

Mikroskopisch handelt es sich bei den Tumoren des Unterhautgewebes um Neoplasien, die Zellen besitzen runde bis langgestreckte große, pleomorph fokale atypische Kerne. Einzelne Mitosen sind erkennbar (siehe Pfeil in Abbildung 20A), Zellmembranen sind nicht sichtbar. Der Hintergrund ist gefüllt mit einem eosinophilen retikulären Netzwerk. Zu erkennen ist eine unorganisierte Architektur der Läsionen unter Einbeziehung von Adnexstrukturen. Teilweise ist in den Präparaten eine regelmäßige Hautoberfläche mit Verhornung erkennbar, die zu der subkutanen Lokalisation der Tumore passt. Histologisch lassen sich die subkutanen Tumore am ehesten malignen Spindelzellneoplasien mit neurogener oder myogener Differenzierung zuordnen. Mögliche Differenzialdiagnosen wären neurogenes oder myogenes Sarkom, myofibroblastischer Tumor, Melanom oder Zuckerzelltumor. Die Ki67-Färbung (Abbildung 20B) zeigt einen signifikanten Anteil proliferativer dunkel gefärbter Zellen im Tumor.<sup>2</sup>

#### 4.7. Charakterisierung der murinen Tumore mittels 3'-RNA-Sequenzierung

Transkriptomdaten für Tumorgewebe im Vergleich zu nicht-betroffenem Normalgewebe verschiedener Organe (Hirn, Darm, Niere, Leber, Lunge, Muskel/Zunge und Milz) wurden über 3'-RNA-Sequenzierung generiert. Verglichen werden konnten Tumor- und Normalgewebe in einzelnen Tieren sowie auch innerhalb der *R26.CD74-NRG1/FlpDel* -Kohorte zwischen verschiedenen Tieren. Zur Charakterisierung der murinen Tumore wurde zunächst orientierend eine Hauptkomponenten-Analyse durchgeführt und durch eine hierarchische Clusteranalyse ergänzt. Anschließend wurden die unterschiedlichen Tumore mit passendem Normalgewebe mittels differentieller Genexpressions-Analyse und Gene Set Enrichment-Analysen (GSEA) verglichen. Da insbesondere die Expressionslevel von *Cd74*, *Nrg1* sowie die von *ErbB*-Rezeptoren in den verschiedenen Tumoren und Normalgeweben von Interesse waren, wurden diese zusätzlich noch auf Ebene einzelner Gene untersucht.

#### 4.7.1. Ergebnisse der RNA-Sequenzierungsdaten: Sarkome

Die Hauptkomponenten oder *Principle Component Analysis (PCA)* in Abbildung 21 auf Basis der 1000 höchstvariablen Gene zeigt, dass die prädominanten Sarkome (blaue Quadrate) untereinander sehr ähnlich sind.<sup>2</sup>



Abbildung 21: Hauptkomponentenanalyse der 1000 höchstvariablen Gene Kreise markieren Daten aus Normalgewebe, Quadrate solche aus Tumoren. Die untersuchten Normalgewebe sind farblich unterschieden. Sarkome, deren Ursprung unklar ist, sind blau markiert, erwartungsgemäß gruppieren die 3 Lebertumore in enger Nachbarschaft zu Leber-Normalgewebe.<sup>2</sup>

Die jeweiligen Verwandtschaften werden deutlicher in der hierarchischen Clusteranalyse (Abbildung 22), wo in der oberen Zeile zwischen Normalgewebe (blau) und Tumor (gelb) farblich unterschieden wird. Die 3 Lebertumore gruppieren sich jeweils benachbart rechts bzw. links des Leber-Normalgewebe-Clusters. Demgegenüber bilden alle Sarkome ein diskretes

Cluster, was in dieser Clusteranalyse zwar zwischen Milz- und Lungengewebe liegt, aber kein eindeutiges Vergleichsgewebe identifiziert.<sup>2</sup>



**Abbildung 22: Hierarchische Clusteranalyse.** Die oberste Zeile der hierarchische Clusteranalyse unterscheidet Tumore (gelb) und Normalgewebe (grün).<sup>2</sup>

Das Referenzgewebe stellt ein grundsätzliches Problem in der bioinformatischen Analyse der prädominanten murinen sarkomatösen Tumore aus der *R26.CD74-NRG1/FlpDel*-Kohorte dar. Deshalb wurden 3'-RNA-Seq Sarkom-Daten mit den entsprechenden 3'-RNA-Seq Ergebnissen der gleichzeitig entnommenen Normalgewebeproben verglichen. Hierbei zeigten die bilateralen Vergleiche Sarkom zu Zunge/Muskelgewebe bzw. Sarkom zu Lungengewebe die beste Abgrenzung zu Sarkomen und die größte Übereinstimmung an hoch- bzw. herabregulierten Genen. Die Ergebnisse sind in Vulkandiagrammen (Abbildung 23 A, B) dargestellt.



Abbildung 23: Vulcano-Plots hoch- und herabregulierter Gene in den bilateralen Vergleichen Sarkom/Lunge (A) und Sarkom/Muskel (B). C: Gemeinsam ähnlich veränderte Gene im Vergleich Sarkom/Lunge bzw. Sarkom/Muskel, mit n=873 konzertiert hochregulierten und n=696 gemeinsam herabregulierten Genen.<sup>2</sup>

Eine Detailanalyse einzelner Gene ist in Abbildung 24 dokumentiert; verglichen wurden die Transkriptlevel von *Nrg1* und *Cd74* zwischen Sarkom-, Lungen- und Muskelgewebe. Für *Nrg1* ergibt sich bis auf die Fehlertoleranzen kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Geweben; demgegenüber ist die *Cd74*-Expression in der Lunge sowohl im Vergleich zu Muskel wie auch im Vergleich zu Sarkomen deutlich erhöht.





Da es sich um 3'-RNA-Sequenzierungs-Ergebnisse handelt, kann die erhöhte *Cd74*-Expression in der Lunge nicht auf die Expression des *CD74-NRG1*-Transgens zurückzuführen sein; der *CD74*-Anteil befindet sich am 5' Ende, sodass es sich bei den unterschiedlichen Expressionswerten um gewebespezifische Unterschiede handeln muss.



Abbildung 25: Transkriptionslevel von *Egfr, Erbb2, Erbb3* und *Erbb4* im Vergleich von Lunge, Muskel und Sarkom<sup>2</sup>

In Analogie zur *Nrg-* und *Cd74*-Transkription werden in Abbildung 25 die Expressionswerte der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen verglichen. Sowohl die *Egfr-* als auch die *Erbb2-* und *Erbb3-*Transkriptmengen sind in Sarkomen signifikant erhöht, sowohl im Unterschied zu Lungen- wie auch Muskel-Gewebe. Die *Erbb2-* und *Erbb3-*Expression in Lungen- und Muskelgewebe zeigt keine signifikanten Unterschiede (p>0,05), insgesamt ist die *Erbb3-*Transkription am deutlichsten erhöht. Für *Erbb4* ist das Expressionsniveau im Muskelgewebe deutlich höher als in der Lunge oder den Sarkomen.<sup>2</sup>

#### 4.7.1.1. Gene Set Enrichment-Analyse der murinen Sarkome

Die Gene Set Enrichment Analyse (https://www.gsea-msigdb.org) in Abbildung 26 zeigt für die Sarkome im Vergleich zu Lungen- und Muskelgewebe deutliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten. In beiden Analysen hochreguliert finden sich die Gen-Sets: epitheliale/mesenchymale Transition, E2F-Zielgene, Angiogenese sowie G2M Zellzyklusregulation einschließlich des mitotischen Spindelapparats im Vergleich zu Muskel. Die letzten Gen-Sets sind typischerweise in Tumorgeweben hochreguliert.<sup>192,193</sup>



Abbildung 26: Gene Set Enrichment-Analysen. Sarkome im Vergleich zu Lunge (A) bzw. Muskel (B)

Konträr ausgeprägt zwischen Lunge und Muskel ist das Gen-Set MYC Targets V1 (Abbildung 26A und B). Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von Genen reguliert, die an Zellproliferation, Zellzykluskontrolle und Differenzierung beteiligt sind.<sup>194</sup> Aufgrund seiner zentralen Rolle in diesen biologischen Prozessen gilt Myc als Protoonkogen.<sup>194</sup> Das MYC Targets V1-Gen-Set enthält Gene, die von Myc direkt oder indirekt reguliert werden. In Myc-abhängigen Zellen wird somit eine verstärke Expression der darin enthaltenen Gene erwartet. Diese Gene sind im Vergleich Muskel/Sarkom deutlich unterrepräsentiert, im Vergleich Lunge/Sarkom hingegen überrepräsentiert: ein Ergebnis, dass auf eine unterschiedliche Myc-Expression zwischen Lunge und Muskel zurückzuführen sein könnte. Unterstützend hierfür finden sich auf der Internetseite https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136997-MYC/tissue (abgerufen am 26.12.2020) deutlich höhere Myc-RNA-Expressionswerte für Muskelgewebe im Vergleich zu Lungengewebe, die diesen Unterschied erklären könnten.

Auch mehrere weitere, mit einer Immunantwort einhergehende Gen-Sets verhalten sich in den beiden Vergleichen genau gegensätzlich: diese sind im Vergleich zur Lunge in den Sarkomen runterreguliert und im Vergleich zum Muskelgewebe verstärkt exprimiert. Analog zu Myc-Zielgenen wären unterschiedliche Genexpressionlevel zwischen beiden Normalgeweben eine mögliche Erklärung hierfür. Andererseits könnte aber auch eine unterschiedliche Immunzellinfiltration vorliegen, wozu zu murinen Geweben entsprechende Daten leider nicht zur Verfügung stehen.

Interessanterweise ist in beiden Gene Set Enrichment-Analysen das Gen-Set Angiogenese hochreguliert. Es enthält Gene, die während der Bildung von Blutgefäßen verstärkt exprimiert werden und die bekannterweise mit vielen Tumoridentitäten assoziiert sind.<sup>195</sup>

#### 4.7.2. RNA-Sequenzierungsergebnisse Teil II: Lebertumore

In den *R26.CD74-NRG1/FlpDel-*Mäusen wurden drei Lebertumore gefunden, die sich in der hierarchischen Cluster- und der Hauptkomponenten-Analyse (Abbildungen 21 und 22) eindeutig zum Lebergewebe gruppieren. Das Vulkandiagramm in Abbildung 27A mit einem Schwellenwert FC=2 p<0,0001 zeigt die Verteilung signifikant hoch- bzw. runterregulierter Gene im Vergleich zwischen Tumoren der Leber und Normalgewebe.





Anders als in den Sarkomvergleichen zeigte die genauere Betrachtung der Transkriptmengen von *Nrg1*, *Cd74*, *Akt1*, *Erbb2* und *Erbb3* keine signifkanten Veränderungen (Abbildung 27B).

In Abbildung 27C dargestellt ist die Gene Set Enrichment-Analyse der Tumore auf der http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jspl Homepage im Vergleich zum Leber-Normalgewebe. Deutlich herabreguliert in den Tumoren sind metabolische Gen-Sets der normalen Leberfunktion, Gallensäuren- oder Häm-Metabolismus und der Abbau xenobiotischer Stoffe.<sup>192</sup> Lebertumore verlieren typischerweise diese Funktionen, sodass die dieser Gen-Sets den Erwartungen entspricht. Hochreguliert werden Repression demgegenüber verschiedene Tumor-assoziierte Gen-Sets wie Hypoxia, Angiogenese, Zellzykluskontrolle und Zellteilung.7,192

# 4.7.3. 3'-RNA-Sequenzierungsergebnisse Teil III: Nicht näher klassifizierte Tumore im Bauchraum

In einer der *R26.CD74-NRG1/FlpDel-*Mäuse wurden zwei Tumore im Bauchraum identifiziert, deren Ursprungsgewebe nicht zuzuordnen war. Beide Tumore zeigen in der Hauptkomponentenanalyse sowie in der hierarchischen Clusteranalyse (siehe Abbildungen 21 und 22) eine starke Ähnlichkeit mit Milzgewebe und wurden so im Vergleich zu Milz-Normalgewebe untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

Analog zur Analyse der Lebertumore (siehe Abbildung 27) zeigt der Volcano-Plot in Abbildung 29A signifikant hoch- und herabregulierte Gene im Vergleich von Tumor- und Milzgewebe. Obwohl die Schwellenwerte (FC=2 p<0,0001) identisch sind, zeigen sich keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten. Während die Transkripte von *Nrg1*, *Cd74* und *Akt1* in beiden Bauchraumtumoren erhöht sind, zeigen *Erbb2* und *Erbb3* keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 28B). Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass es sich nur um Daten von zwei Tumoren handelt.

Mit dieser Beschränkung ist auch die Gene Set Enrichment-Analyse in Abbildung 28C zu betrachten, die einige deutliche Unterschiede im Vergleich zur Leber aufweist. Konträr betroffen sind die Gen-Sets Angiogenese, Mitotische Spindel und Epithelial-Mesenchymale-Transition. Andere wie Allotransplantat-Abstoßung, Entzündungsantwort, Interferon alpha oder gamma Antwort bzw. IL6-JAK-STAT3 und TNFA-Aktivierung via NFKB-Signaltransduktion stimmen in ihrer verstärkten Expression hingegen überein.



Abbildung 28: Transkriptomanalyse von Bauchtumoren im Vergleich zu Milznormalgewebe. A: Volcano-Plot des RNASeq Vergleichs B: Steady-State Expressionlevel der Gene *Nrg1*, *Cd74*, *Akt1*, *Erbb2* und *Erbb3*. C: Gene Set Enrichment-Analyse Tumorgewebe aus dem Bauchraum und Milzgewebe der betroffenen Maus A12.31.

# 4.8. *BA/F3 ERBB2-YF/ERBB3wt*-Zellen werden unabhängig von exogenem NRG1 nach Transfektion mit dem *pBabe hygro CD74-NRG1-*Vektor

Komplementär zu den beschriebenen Untersuchungen in genetisch manipulierten Mäusen, sollte die *NRG1*-Fusion in zellulären Modellen charakterisiert werden. Zur Überprüfung, ob die Expression des CD74-NRG1-Fusionsproteins zur Dimerisierung und nachfolgender Aktivierung der ERBB2- und ERBB3-Oberflächenrezeptoren führt, wurde eine modifizierte
murine Ba/F3 Zelllinie verwendet, die stabil ein mutiertes ERBB2 Y<sup>877</sup>F-Allel und ein Wildtyp-ERBB3 ausprägt (ERBB2-YF/ERBB3wt). Parentale Ba/F3-Zellen sind abhängig von Interleukin-3. Der Austausch von Tyrosin an der Position 877 gegen Phenylalanin (Y<sup>877</sup>F) in ERBB2 in ERBB2-YF/ERBB3wt Ba/F3-Zellen unterbindet die Bildung von ERBB2-Homodimeren auf der Zelloberfläche, erlaubt aber weiterhin die Heterodimerisierung mit ERBB3 in strikter Abhängigkeit von der NRG1-Bindung. Die Aktivität von ERBB2-YF/ERBB3wt-Heterodimeren stimuliert dann die Zellproliferation der BA/F3-Zellen unabhängig von Interleukin-3.<sup>188</sup> Die Proliferation von Ba/F3 ERBB2-YF/ERBB3wt Zellen ist daher abhängig von exogen zugeführtem NRG1, aber unabhängig von IL3.<sup>188</sup> Die vorkonditionierten Zellen, zur Verfügung gestellt von Professor Dr. Kevan Shokat (Howard Hughes Medical Institute and Department of Cellular and Molecular Pharmacology, University of California San Francisco, San Francisco, CA 94158, USA), wurden mit dem retroviralen Vektor pBabe hygro CD74-NRG1 (siehe Anhang Abbildung 4) bzw. als Kontrolle mit dem leeren Empfängervektor pBabe hygro transduziert.<sup>149</sup> Nach der Transduktion mit beiden pBabe hygro-Vektoren und Selektion der transduzierten Zellen auf Hygromycin-Resistenz wurden die mit dem CD74-NRG1-Konstrukt transduzierten Zellen unabhängig vom exogen appliziertem NRG1. Kontrollzellen mit dem Leervektor hingegen benötigten weiterhin exogenes NRG1 zur Proliferation. Die Divergenz in den Zellzahlen zu zwei Zeitpunkten nach Absetzen von exogenem NRG1 ist in Abbildung 29 dargestellt.<sup>2</sup>



**Abbildung 29: Zellzahl-Bestimmung der transduzierten Zellen**. Wachstum von Zellen nach Transduktion mit dem *pBabe hygro CD74-NRG1*-Vektor im Vergleich zu Kontrollen mit dem *pBabe hygro*-Leervektor (e.v. = empty vector) in zwei biologischen Replikaten, sowie An- bzw. Abwesenheit von extrazellulärem NRG1-Protein im Medium. X-Achse Zeitraum nach Beginn der Hygromycin-Selektion, Y-Achse die gemessene Zellzahl.<sup>2</sup>

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden jeweils 30.000 Zellen unter Hygromycin-Selektion ausplattiert. Die graphische Darstellung in Abbildung 29 zeigt, dass sich *ERBB2-YF/ERBB3wt*-Zellen transduziert mit dem Leervektor *pBabe hygro* in Abwesenheit von extrazellulärem NRG1 nicht teilen (graue Kurve), aber bei Supplementation des Mediums mit NRG1 die Zellzahl bis zum Tag 5 (Zeitpunkt 2) leicht und bis zum Tag 8 (weitere 72 Std, Zeitpunkt 3) deutlich ansteigt (grüne Kurve). Demgegenüber teilen sich *ERBB2-YF/ERBB3wt*-Zellen nach Transduktion mit dem Vektor *pBabe hygro CD74-NRG1* sowohl ohne NRG1 im Medium (gelbe Kurve) wie mit extrazellulärem NRG1 im Medium (rote Kurve). Die endogene Expression der CD74-NRG1-Fusion ist demnach ausreichend, um die Zellproliferation in Ba/F3-Zellen zu stimulieren. Analog zu anderen Onkogenen im Ba/F3-Testsystem führt die Transkription von *CD74-NRG1* somit zur Zellproliferation und Unabhängigkeit der Ba/F3-Zellen von Interleukin-3. Das Experiment impliziert auch, dass die Präsentation des CD74-NRG1-Fusionsproteins auf der Zelloberfläche die Heterodimerisierung von ERBB2 und ERBB3 vermitteln kann.<sup>2</sup>

# 4.9. *CD74-NRG1*-abhängige Zellen sind empfindlich gegenüber verschiedenen ERBB2-/ERBB3-Inhibitoren

Die proliferierenden *ERBB2-YF/ERBB3wt CD74-NRG1* Zellen wurden anschließend verwendet, um zu untersuchen, ob bekannte Inhibitoren für ERBB2/ERBB3 eine mögliche Therapieoption für Tumore sind, bei denen eine *NRG1*-Fusion nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde das in Abbildung 29 beschriebene Experiment abgewandelt und Hygromycinresistente *ERBB2-YF/ERBB3wt* mit dem *pBabe hygro CD74-NRG1* Vektor transduzierte Zellen mit verschiedenen ERBB2/ERBB3-Inhibitoren behandelt (Abbildung 30).<sup>2</sup>

Evaluiert wurde der Effekt von Afatinib, Lapatinib (Abbildung 30 A, B) und Compound 3 (Abbildung 30C und D), das die Heterodimerisierung von ERBB2 und ERBB3 hemmt und ebenso wie die vorkonditionierte *ERBB2-YF/ERBB3wt*-Zelllinie von Prof. Dr. Kevan M. Shokat zur Verfügung gestellt wurde.<sup>188</sup> Afatinib inhibiert alle Mitglieder der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen, wohingegen Lapatinib nur EGFR und ERBB2 inhibiert.<sup>13</sup>

Als Kontrollen dienen originäre BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* Zellen und Zellen transduziert mit dem Leervektor *pBabe hygro* in Anwesenheit von extrazellulärem NRG1 im Medium. Sie werden verglichen zu *pBabe hygro CD74-NRG1* transduzierten Zellen in An- bzw. Abwesenheit von NRG1 im Medium. Alle drei verwendeten Inhibitoren hemmen erfolgreich die Zellproliferation der CD74-NRG1 exprimierenden BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* Zellen (Abbildung 30 A-C).<sup>2</sup>

Alle vier verwendeten BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* Zelllinien zeigen sich ähnlich empfindlich gegenüber dem Inhibitor Afatinib (Abbildung 30A). Hingegen scheinen *CD74-NRG1*-abhängige *BA/F3 ERBB2-YF/ERBB3wt* Zellen (gelbe Kurven) stärker empfindlich gegenüber

einer Behandlung mit Lapatinib und Compound 3 (Abbildung 30 B+C) zu sein, wenn kein zusätzliches NRG1 als Ligand im Medium vorhanden ist (gelbe und rote Graphen in Abbildung 30 B und C).<sup>2</sup>



Abbildung 30: Wachstum von verschiedenen *ERBB2-YF/ERBB3wt* BA/F3 Zelllinien bei Exposition mit verschiedenen ERBB2/ERBB3-Inhibitoren. Die Inhibitorbezeichnung ist über dem jeweiligen Diagramm angegeben, die Kurven zeigen die Überlebensrate (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration (X-Achse). Farbcode: SCHWARZ, BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* Zellen in Anwesenheit von NRG1, GRÜN, BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* e.v.Zellen transfiziert mit *pBabe hygro* in Anwesenheit von NRG1; ROT, BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* CD74-NRG1 in Anwesenheit von exogenem NRG1, GELB BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* CD74-NRG1 ohne die exogene Zugabe von NRG1<sup>2,188</sup>

Zusammengefasst zeigen meine Experimente in konditionierten BA/F3 Zellen:

- *CD74-NRG1* kann zusammen mit ERBB2 und ERBB3 die Zellproliferation stimulieren und als onkogener Treiber wirken.
- Die Inhibitorexperimente suggerieren, dass membran-gebundenes CD74-NRG1 ähnlich zu freiem extrazellulärem NRG1 die Heterodimerisierung von Rezeptortyrosinkinasen bewirken kann.
   Allerdings deutet die höhere Sensitivität von chimärem, membrangebundenem CD74-NRG1 im Vergleich zu nativem, diffusiblem NRG1 gegenüber Lapatinib und Compound 3 auch auf Unterschiede hin.<sup>2</sup>

## 5. **DISKUSSION**

#### 5.1. Das Mausmodell bestätigt CD74-NRG1 als Onkogen

Die Ergebnisse mit dem konditional über Flp-Rekombinase aktivierbaren CD74-NRG1-Transgen am murinen ROSA26-Locus belegen die Onkogenität der CD74-NRG1-Fusion. Ohne Exzision der Stoppkassette vor dem CD74-NRG1-Leseraster wurden in keinem transgenen Tier über den Beobachtungszeitraum von 132 Wochen Tumore beobachtet, weder in der unbehandelten Kontrollkohorte noch nach AdenoFlp-Inhalation im Alter von 12 Wochen. Demgegenüber konnten in der R26.CD74-NRG1:FlpDel-Kohorte in 11 von 15 Tieren Tumore detektiert werden. Genotypisch war sowohl die Exzision der Stoppkassetten früh im Embryo nachweisbar, wie auch die anschließende Transkription des CD74-NRG1-Transgens in Organen transgener Mäuse oder in MEFs. Für die MEFs konnte sogar eine Korrelation zwischen Transkriptmenge und Kopienzahl des Transgens in homozygoten bzw. heterozygoten Embryonen nachgewiesen werden. Leider gelang nur für die MEFs ein schlüssiger Nachweis der Translation des mRNA-Transkripts, wiederum war die Menge des chimären Fusionsproteins bei Homozygotie des Transgens deutlich höher als bei nur einer Transgenkopie in heterozygoten Linien.<sup>2</sup> Warum sich die Expression des CD74-NRG1-Fusionsproteins in Organen transgener Nachkommen nicht bestätigen ließ, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht abschließend geklärt werden. Am wahrscheinlichsten handelt es sich um ein methodisches Problem, da verschiedene Extraktionsmethoden verglichen wurden und trotz der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren ein Nachweis des Fusionsproteins in Mausorganen mit verschiedenen verfügbaren Antikörpern erfolglos blieb.

Obwohl die *Flp*-vermittelte Exzision der Stoppkassette früh im Embryo induziert wird (Abbildung 12A) und die Transkription früh im Embryo (Abbildung 12B) und später in

verschiedenen Organen (Abbildung 13) nachweisbar ist, wurden Tumore frühestens in Woche 49 entdeckt (siehe Anhang Tabelle 1). Alle Tumore waren beschränkt auf die R26.CD74-NRG1:FlpDel-Kohorte und zeigten mit 8 von 11 eine starke Präferenz für murine Sarkome, in deutlich niedrigerer Frequenz für Leber (n=3, davon 2 zusammen mit Sarkomen) oder Bauchraum (n=2). Die Lunge war nicht betroffen, obwohl die CD74-NRG1-Genfusion 2014 dort in Adenokarzinomen entdeckt und erst anschließend auch rekurrent in anderen Tumorarten außerhalb der Lunge nachgewiesen wurde.<sup>1</sup> Obwohl die *CD74-NRG1-*Genfusion in verschiedenen anderen Tumorentitäten nur in niedriger Frequenz auftritt, könnte sie Rolle spielen.<sup>164</sup> Sowohl trotzdem eine wichtige in invasiv muzinösen Lungenadenokarzinomen als auch in Pankreaskarzinomen sind KRAS-Mutationen prädominant und für diese Tumorentitäten sind aktuell wenig zielgerichtete Therapien etabliert.<sup>4,160</sup> Je nach IMA-Kohorte wird in bis zu 27% der Fälle ebenfalls eine korrelierte CD74-NRG1-Fusion beobachtet. Im Gegensatz zu Mutationen im KRAS-Gen als Treiber könnten zumindest in dieser Subgruppe möglicherweise zielgerichtete Therapien gegen CD74-NRG1 besser wirken. Auch in 8-10% der Pankreaskarzinome, die keine KRAS-Mutation aufweisen, konnten NRG1-Genfusionen identifiziert werden.<sup>4,196</sup> Hier traten als Fusionspartner von NRG1 zwar verschiedene Gene auf, aber in jedem Fall handelte es sich um translationale in-frame-Fusionen, bei denen die EGF-ähnliche extrazelluläre Domäne von NRG1 erhalten blieb. Dies passt zu der Hypothese, dass es bei NRG1-Fusionen unter Kontrolle des Promotors des 5'-Fusionspartners zur Expression eines Fusionsproteins kommt, bei der der funktionell aktive Teil des 3'-Fusionspartners, die EGF-ähnliche Domäne von NRG1 erhalten bleibt.1,165

Obwohl es sich um ein seltenes Ereignis handelt, hat das Screening in größeren Kohorten verschiedener Krebsarten gezeigt, dass NRG1-Fusionen mit verschiedenen Arten von soliden assoziiert sind, darunter Darmkrebs, duktales Adenokarzinom Tumoren der Bauchspeicheldrüse, Cholangiokarzinom, Ovarialkarzinom und Sarkom.<sup>164,197</sup> Die im Rahmen dieser Arbeit gelungene Verifikation von CD74-NRG1 als onkogener Treiber eröffnet somit die Möglichkeit, NRG1-rearrangierte Karzinome mit therapeutischen Strategien zu behandeln, die ErbB-assoziierte Signalwege abzielen. Jüngste Berichte in Zelllinienauf und Xenotransplantatmodellen sowie frühe Daten bei Patienten bestätigen diese Annahme. Klinisches Ansprechen wurde vereinzelt bei Patienten beobachtet, die mit dem Pan-ErbB-Kinase-Inhibitor Afatinib, einem Anti-ERBB3-Antikörper behandelt wurden.<sup>198,199</sup> Eine deutlich erhöhte therapeutische Wirksamkeit scheint jedoch der bispezifische Anti-ERBB2/ERBB3-Antikörper Zenocutuzumab zu besitzen.<sup>5</sup> Vorläufige Ergebnisse einer klinischen Phase-I/II-Studie mit Zenocutuzumab bei NRG1-Fusions-positiven soliden Tumoren zeigten eine Ansprechrate von 42% (N=5/12), 25% (N=6/24) und 22% (N= 2/9) bei mehrfach

vorbehandeltem Bauchspeicheldrüsenkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkrebs bzw. anderen soliden Tumoren. Diese vielversprechenden Daten deuten darauf hin, dass eine genomgesteuerte Therapie, die auf *NRG1*-Fusionen abzielt, zum Behandlungsstandard für Patienten mit entsprechenden Veränderungen werden könnte.<sup>5,200,201</sup> Vielversprechend sind auch erste Ergebnisse in aus Patientenmaterial generierten Zelllinien und Xenograft-Modellen. Auch hier zeigte sich, dass Zenocutuzumab über eine Inhibierung von ERBB3 und AKT das Wachstum von *NRG1*-Fusions-positiven Zelllinien bzw. Xenograft-Tumoren hemmt. Auch Patienten mit nachgewiesenen *NRG1*-Fusionen zeigten ein Ansprechen auf eine Therapie mit Zenocutuzumab, auch nach bereits erfolgter Therapie mit Afatinib.<sup>202</sup>

Mechanistisch könnte eine atypische Präsentation der NRG1-EGF-Domäne zu einer verstärkten Aktivität nachgeschalteter Signalwege führen, eine Hypothese, die konsistent ist mit *in vitro* Ergebnissen.<sup>1,149</sup> Bei CD74-NRG1-Expression in Lungenkarzinom-Zelllinien werden die PI3K- und MAPK-Signalwege aktiviert, andere Zelllinien zeigen diese Signalweg-Aktivierung nicht.<sup>1,149</sup> Da NRG1 über Oberflächenrezeptoren wie ERBB2, ERBB3 sowie ERBB4 wirkt, ist für die onkogene Funktion die Expression passender Oberflächenrezeptoren wahrscheinlich essentiell. Die erfolgreiche Konditionierung der BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt*-Zellen und die Ergebnisse mit CD74-NRG1 in diesem Hintergrund unterstreichen dies nachdrücklich. Kritische Parameter scheinen somit die Expressionsniveaus entsprechender *NRG1*-Partner in Zelllinien, Organen oder bei obligaten Heterodimeren die Verfügbarkeit weiterer Partner zu sein. Solche gewebespezifischen Limitationen könnten zum Beispiel erklären, warum die CD74-NRG1-Expression im Mausmodell die Bildung von Sarkomen fördert, aber Lungenkarzinome im Rahmen dieser Arbeit nicht nachweisbar waren.<sup>2</sup>

Ebenfalls entscheidend sind Transkription, Translation und zelluläre Funktion der jeweiligen *NRG1*-Fusionspartner. Im Falle der *CD74-NRG1*-Translokation in Adenokarzinomen ist die Transkription unter Kontrolle des humanen *CD74*-Promotors.<sup>1</sup> Im untersuchten Mausmodell erfolgte die Expression des CD74-NRG1-Fusionsprotein idealerweise ubiquitär unter der Kontrolle des *CAG*-Promotors nach Integration des Konstruktes in den *ROSA26*-Locus.<sup>2,182</sup> Bei dem *CAG*-Promotor handelt es sich um ein synthetisches Element, was häufig verwendet wird, weil es transkriptional zu einer hohen Genexpression führt.<sup>184</sup> Zumindest theoretisch sollte das CD74-NRG1-Fusionsprotein daher ubiquitär exprimiert werden, sobald das Transgen konditional durch Ausschneiden der Stoppkassette mittels *Flp*-Rekombinase aktiviert wird. Diese Annahme konnte auf Transkriptionsebene mittels Reverse Transkriptase-PCR-Analyse bewiesen werden, ebenso die Translation des CD74-NRG1-Fusionsproteins in MEFs.<sup>2</sup> Interessant in weiterführenden Arbeiten wird die Frage nach der Expression und der

biologischen Verfügbarkeit des Fusionsproteins in Organen rekombinierter *R26.CD74-NRG1*-Mäuse sein.

Eindeutig hingegen zeigt die beobachtete Tumorentwicklung nach Exzision der Stoppkassette in der *R26.CD74-NRG1:FlpDel-*Kohorte, dass die Expression der *CD74-NRG1* Fusion onkogen ist.<sup>2</sup> Die späte Detektion der Tumore ab der 49. Woche könnte jedoch bedeuten, dass die Tumorprogression erst über sekundäre Ko-Mutationen ermöglicht wird. Hierzu wurden im Rahmen dieser Dissertation noch keine Daten erhoben, was über die Sequenzierung der murinen Tumorgenome jedoch in Zukunft möglich wäre. Eine Erklärung für die beobachteten Tumorentitäten im Mausmodell wäre, wenn es nur wenige murine Zelltypen gibt, die Proteinpartner zum Beispiel ERBB2 und ERBB3 koexprimieren, wodurch eine onkogene Wirkung des CD74-NRG1-Fusionsproteins limitiert wird. Eine offene interessante Fragestellung ist auch, ob die entstandenen Tumore weiterhin auf die Expression des CD74-NRG1-Proteins zur Proliferation angewiesen sind. Die Ergebnisse in den BA/F3 *ERBB2-2YF/ERBB3wt* Zellen nach *CD74-NRG1*-Transduktion deuten aber in diese Richtung.

Bei der sehr verzögerten Tumorentwicklung relativ zur FlpDel-Aktivierung im Embryo ließe sich diese Frage mit den vorhandenen R26.CD74-NRG1-Mauslinien klären. Im initialen CD74-NRG1-Vektor sind neben den FRT-Sequenzen zur Exzision der Stoppkassette via Flp-Rekombinase auch noch loxP-Rekombinationsstellen zu beiden Seiten des CD74-NRG1-Leserasters vorhanden. Sie erlauben es, dass chimäre Leseraster in einem zweiten Schritt mittels Cre-Rekombinase auszuschneiden.<sup>149</sup> Somit wäre es möglich, das CD74-NRG1-Transgen im *FlpDel*-Hintergrund im frühen Embryo zu induzieren, nach Ablauf einer gewissen Zeit in den heranwachsenden Mäusen wieder zu entfernen und die Auswirkung auf das Tumorwachstum zu untersuchen. Zu diesem Zweck würde man R26.FSF.CD74-NRG1-Nachkommen zuerst mit einer CreERT2-Cre-Deleter Mauslinie kreuzen, in der die Cre-Rekombinase-Expression durch Tamoxifen-Gabe induziert werden kann.<sup>203</sup> In einer weiteren Kreuzung wäre die R26.FSF.CD74-NRG1/Cre-Deleter-Kombination mit FlpDel-Mäusen zu verpaaren. In den dreifach-transgenen Nachkommen ließe sich dann klären, ob das CD74-NRG1-Transgen als Treibermutation hinreichend ist oder nur als verstärkender Hintergrund für somatische Mutationen wirkt, zum Beispiel nach Konversion von Protoonkogenen zu Onkogenen. Die Anzucht dieser Mauslinie ist aber sehr zeitaufwendig, im Rahmen dieser Dissertation musste darauf verzichtet werden.

#### 5.2. Es zeigte sich keine Tumorentwicklung in der Lunge

Die CD74-NRG1-Genfusion war ursprünglich in Lungenadenokarzinomen identifiziert worden und die primäre Frage zu Beginn des Projektes war, ob sich die Genfusion im Mausmodell als Onkogen in Lungenkarzinomen würde bestätigen lassen. Dies konnte so im beschriebenen Mausmodell nicht bestätigt werden. Weder ließen sich über AdenoFlp-Gabe noch bei früher Aktivieruna des R26.FSF.CD74-NRG1-Alles in *FlpDel*-positiven Embrvonen lungenspezifische Tumore nachweisen. Konträr zu Sarkomen scheint die Expression des CD74-NRG1-Fusionsproteins für die Entwicklung von Lungentumoren im Mausmodell nicht ausreichend zu sein. Hierfür bieten sich verschiedene Erklärungen an. Zum einen könnte es an der Wirkungsweise von CD74-NRG1 als Ligand liegen, wenn Rezeptoren wie ERBB2 und ERBB3 essentiell sind, um nachgeschaltete Signalwege zu aktivieren. Die alleinige Expression von CD74-NRG1 kann dann nicht zu einer Tumorentwicklung führen, wenn das Signal nicht weitergeleitet wird. Möglich wäre, dass z.B. die ERBB2- und ERBB3-Expressionsniveaus in der Lunge im Mausmodell nicht ausreichend für eine Tumorentwicklung sind oder nicht beide Rezeptoren exprimiert werden.<sup>2</sup>

Zur Beantwortung der Frage, ob die *CD74-NRG1*-Genfusion Lungentumore induzieren kann, wäre es alternativ möglich, dass *R26.FSF.CD74-NRG1*-Allel in einen tumorpermissiveren genetischen Hintergrund zu bringen. Möglicherweise wäre dadurch nicht nur die Latenz bis zur Tumorentwicklung in den *R26.FSF.CD74-NRG1/FlpDel*-Mäusen verkürzt und es würden weitere Tumoridentitäten einschließlich Lunge entstehen. Permissiver könnte das Mausmodell auch durch die Kombination mit weiteren Mutationen, zum Beispiel in Tumor-Suppressorgenen, werden, wogegen sich zu Beginn bewusst entschieden wurde, da im initialen Tumor, der zur Entdeckung der *CD74-NRG1*-Translokation führte, keine solchen genetischen Veränderungen in Protoonkogenen oder Tumorentwicklung im Mausmodell erleichtern und zu einem früheren Auftreten, einem aggressiveren Wachstum oder Onkogenität in anderen Geweben einschließlich der Lunge führen.

#### 5.3. Charakterisierung der murinen Sarkome

In der Tumor-bildenden *CD74-NRG1/FpIDel-*Mauskohorte erfolgt die *Flp*-abhängige Aktivierung des *CD74-NRG1-*Transgens früh im Embryo und das Leseraster wird über den *CAG-*Promotor ubiquitär transkribiert. Insgesamt entwickelten 11 von 15 Mäusen Tumore, in der Mehrzahl Sarkome. Ein grundlegendes Problem bei der Auswertung der Transkriptom-

Daten stellte die Wahl eines geeigneten Vergleichsgewebes dar, das grundsätzlich parallel aus transgenen *R26.FSF.CD74-NRG1:FlpDel-*Mäusen aus nicht-befallenem Organ isoliert wurde und unter identischen RNA-Sequenzierungs-Bedingungen analysiert wurde. Da die murinen Sarkome alle spät detektiert wurden und ihre Transkriptom-Daten somit einen manifesten Tumorzustand abbilden, geben sie daher wenig Information über initiale Vorgänge der Tumorentstehung. Lokalisation und Histologie der späten Tumore passte am ehesten zu Unterhautgewebe und obwohl die Sarkome in ihrer Entstehung unabhängig sind, gruppieren sie in der Hauptkomponenten- und hierarchischen Cluster-Analyse generell eng benachbart (siehe Abbildungen 21 und 22). Die ähnliche Histologie aller Sarkome spiegelt sich in einer hohen Verwandtschaft auf Transkriptom-Ebene ab, wobei die Unschärfe bezüglich des Referenzgewebes die bioinformatische Aufarbeitung der 3'-RNA-Seq Daten erschwert.

#### 5.4. NRG1-Genfusionen als potenzielle Therapieoption

Genfusionen, in denen *NRG1* als Fusionspartner involviert ist, konnten mittlerweile in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert werden (siehe Abbildung 7).<sup>164</sup> Hierzu gehören auch Tumorentitäten, für die bislang noch keine zielgerichteten Therapien etabliert sind. In mehreren Fällen wurde mittlerweile von einem Ansprechen von Patienten mit nachgewiesener *NRG1*-Fusion auf zielgerichtete Therapieansätze berichtet.<sup>198-200,202</sup> Da *NRG1*-Veränderungen den ERBB2/ERBB3-Signalweg aktivieren, erscheint eine gezielte Behandlung mit Inhibitoren dieses Weges eine erfolgversprechende therapeutische Strategie.<sup>3,4</sup> Vereinzelt wurde bei Tumorpatienten mit *NRG1*-Fusionen ein Ansprechen auf eine Therapie mit Afatinib beobachtet, einem irreversiblen Tyrosinkinaseinhibitor, der die Signalwirkung aller Homo- und Heterodimere der verschiedenen ErbB-Rezeptoren inhibiert.<sup>198,204,205</sup> Wirksam zeigte sich vereinzelt auch eine Therapie mit einem monoklonalen ERBB3-Antikörper, GSR2849330, und die Kombination eines anderen monoklonalen ERBB3-Antikörpers (Lumretuzumab) mit einem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor in einer Fallserie mit zwei Patienten.<sup>199,206</sup>

Mechanistisch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *CD74-NRG1*-Fusion ERBB2/ERBB3-Heterodimere aktiviert, die dann für die Tumorzellproliferation entscheidend sind. Bei der *CD74-NRG1*-Fusion handelt es sich daher um ein *bona fide* Onkogen, das somit über die Inhibition von ERBB2/ERBB3-Heterodimeren ein vielversprechendes Ziel für zielgerichtete Therapien darstellt.<sup>2</sup> Das zeigen auch erste, Ergebnisse einer klinischen Studie mit Zenocutuzumab bei Patienten mit soliden Tumoren mit *NRG1*-Fusionen, die auf eine erhebliche Wirksamkeit hinweisen.<sup>5,200</sup> Diese vielversprechenden Ergebnisse, auch in aggressiven Tumoren wie Pankreaskarzinomen, zeigen die Relevanz von *NRG1*-Fusionen. *NRG1*-Fusionen stellen somit das erste molekulare Ziel für zielgerichtete Therapien in

Pankreaskarzinomen dar, für die bislang keine zielgerichteten Therapien etabliert werden konnten.<sup>4,5</sup> Auch in invasiv muzinösen Adenokarzinomen der Lunge stellen *NRG1*-Fusionen somit die ersten therapierelevanten Genomveränderungen dar.<sup>1</sup>

Zusammengefasst suggerieren diese Daten, dass NRG1-Fusionen ein potenzielles therapeutischen Ziel darstellen können. Dafür wäre es wichtig, dass Tumore, deren Treibermutation unbekannt ist, auf NRG1-Fusionen hin untersucht werden. Laskin et al. (2020) haben verschiedene Detektionsmethoden miteinander verglichen, um solche NRG1-Fusionen zu identifizieren: FISH, verankerte Multiplex-RNA-Sequenzierung (AMP), Next-Generation-DNA-Sequenzierung, gezielte RNA-Sequenzierung sowie Immunhistochemie (IHC).<sup>3</sup> Besonders IHC ist eine breit verfügbare Screening-Methode und leicht durchführbar. Der Nachweis von phosphorylierten ERBB3-Oberflächenrezeptoren korrelierte in Patientenproben gut mit FISH-Ergebnissen, die NRG1-Fusionen in Tumoren zeigten.<sup>165</sup> Im Mausmodell ist die Transkription von Erbb3 in den Sarkom-RNA-Sequenzierungsdaten deutlich erhöht (siehe Abbildung 25).<sup>2</sup> Der immunhistochemische Nachweis des CD74-NRG1-Fusionsproteins ist in murinen Gewebeproben leider methodisch nicht gelungen, was eventuell an den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern gelegen haben könnte, deren Qualität für IHC-Detektion höchste Kriterien erfüllen muss.<sup>165</sup> Alle getesteten Detektionsmethoden haben Vor- und Nachteile wie: Verfügbarkeit, Sensitivität, Dauer, Aussagekraft und letztlich Kosten.<sup>165</sup> Voraussetzung jeder zielgerichteten Therapie ist aber die Eingrenzung des genauen Ziels, prospektive Studien an Patienten inklusive der zweifelsfreien Diagnose einer NRG1-Fusion bieten hier einen interessanten weiteren Ansatz. Als Goldstandard für den direkten und sensitiven Nachweis von NRG1-Genfusionen erscheint heute die genomische Sequenzierung von Tumorproben, die zum Beispiel auf der Grundlage von hybrid-capture-basierenden Verfahren auch noch sehr zielgerichtet erfolgen kann.<sup>165</sup>

In einzelnen Fällen wurde für Patienten mit *CD74-NRG1*-positiven Tumoren ein Ansprechen auf ERBB2- und ERBB3-Inhibitoren gezeigt. Nach derzeitigem Kenntnisstand gab es aber keine etablierte Zelllinie mit *CD74-NRG1* als onkogenem Treiber, um mögliche Inhibitoren zu testen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten murine BA/F3 *ERBB2-YF/ERBB3wt* Zellen durch endogene CD74-NRG1-Expression unabhängig von exogener NRG1-Gabe gemacht werden. Der Austausch von Tyrosin an Position 877 gegen Phenylalanin (Y<sup>877</sup>F) in *ERBB2* unterbindet die Bildung von ERBB2-Homodimeren auf der Zelloberfläche, erlaubt aber weiterhin die Heterodimerisierung mit ERBB3 in strikter Abhängigkeit von der NRG1-Bindung. Die Aktivität von *ERBB2-YF/ERBB3wt*-Heterodimeren stimuliert dann die Zellproliferation der BA/F3-Zellen unabhängig von Interleukin-3.<sup>188</sup> Nach Transfektion mit dem Expressionsvektor *pBabe\_Hygro\_CD74-NRG1* und endogener Expression von CD74-NRG1 proliferierten die Zellen unabhängig von exogenem NRG1 im Medium. Somit ließ sich zeigen, dass die Expression von CD74-NRG1 vergleichbar zu exogenem NRG1 zur Heterodimerisierung der beiden Rezeptor-Untereinheiten führt und nachgeschaltete Signalwege aktiviert. Analog zu den Sarkomen im in vivo Mausmodell wirkt CD74-NRG1 in den vorkonditionierten ERBB2-YF/ERBB3wt-Zellen daher als Onkogen und stimuliert die Zellproliferation unabhängig von exogenen Liganden (siehe Abbildung 29). Die ERBB2-YF/ERBB3wt CD74-NRG1 Zellen zeigten sich dabei sensitiv gegenüber Afatinib, Lapatinib und einem ERBB2/ERBB3-Heterodimerisierungs-Inhibitor.<sup>2</sup> Mithilfe Zelllinie können dieser nun mögliche Therapieoptionen für CD74-NRG1 positive Tumore in vitro getestet werden. BA/F3 ERBB2-YF/ERBB3wt CD74-NRG1 Zellen stellen so ein schnelles Testsystem für die Wirkung von Substanzen dar, die gezielt in die Erkennung von Liganden, die Dimerisierung und Autoaktivierung von ErbB-Rezeptoren bzw. nachgeschalteter Signale eingreifen. Noch näher an der humanen Situation wäre es jedoch, wenn es gelänge menschliche Zelllinien mittels ERBB2 Y<sup>877</sup> F/ERBB3/CD74-NRG1 entsprechend zu konditionieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Fernandez-Cuesta L, Plenker D, Osada H, et al. CD74-NRG1 fusions in lung adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2014; **4**(4): 415-22.

2. Werr L, Plenker D, Dammert MA, et al. CD74-NRG1 Fusions Are Oncogenic In Vivo and Induce Therapeutically Tractable ERBB2:ERBB3 Heterodimerization. *Mol Cancer Ther* 2022; **21**(5): 821-30.

3. Jones MR, Lim H, Shen Y, et al. Successful targeting of the NRG1 pathway indicates novel treatment strategy for metastatic cancer. *Ann Oncol* 2017; **28**(12): 3092-7.

4. Jones MR, Williamson LM, Topham JT, et al. NRG1 Gene Fusions Are Recurrent, Clinically Actionable Gene Rearrangements in KRAS Wild-Type Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019; **25**(15): 4674-81.

5. Schram AM. Efficacy and safety of zenocutuzumab in advanced pancreas cancer and other solid tumors harboring NRG1 fusions. American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2021 Annual Meeting; 2021 June 4, 2021; 2021.

6. Cooper G. The Cell: A Molecular Approach.The Cell: A Molecular Approach. 2000. <u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/</u> (Zuletzt abgerufen am 21.11.2022).

7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**(1): 57-70.

8. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019; **144**(8): 1941-53.

9. Ferlay J EM, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Lung: Source Globocan 2018. <u>https://gco.iarc.fr/today</u> (Zuletzt abgerufen am 20.11.2019).

10. Collaborators GBDRF, Forouzanfar MH, Alexander L, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; **386**(10010): 2287-323.

11. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* 2018; **173**(2): 321-37 e10.

LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008; **11**(1-2): 32-50.

13. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 2014; **79**: 34-74.

14. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**(5): 341-54.

15. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**(2): 127-37.

16. Riese DJ, 2nd, Stern DF. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. *Bioessays* 1998; **20**(1): 41-8.

17. Mok TS, Wu YL, Papadimitrakopoulou VA. Osimertinib in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; **376**(20): 1993-4.

18. Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, Haustermans K, Prenen H. Gastric cancer. *Lancet* 2016; **388**(10060): 2654-64.

19. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**(8): 553-63.

20. Ramsauer VP, Carraway CA, Salas PJ, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, translocates ErbB2 to the apical surface in polarized epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; **278**(32): 30142-7.

21. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 1988; **241**(4861): 42-52.

22. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB3. *Exp Cell Res* 2003; **284**(1): 54-65.

23. Sierke SL, Cheng K, Kim HH, Koland JG. Biochemical characterization of the protein tyrosine kinase homology domain of the ErbB3 (HER3) receptor protein. *Biochem J* 1997; **322** (**Pt 3**): 757-63.

24. Hause RJ, Jr., Leung KK, Barkinge JL, Ciaccio MF, Chuu CP, Jones RB. Comprehensive binary interaction mapping of SH2 domains via fluorescence polarization reveals novel functional diversification of ErbB receptors. *PLoS One* 2012; **7**(9): e44471.

25. Tebbutt N, Pedersen MW, Johns TG. Targeting the ERBB family in cancer: couples therapy. *Nat Rev Cancer* 2013; **13**(9): 663-73.

26. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997; **16**(7): 1647-55.

27. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; **19**(13): 3159-67.

28. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, et al. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem* 1994; **269**(20): 14661-5.

29. Alimandi M, Romano A, Curia MC, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 1995; **10**(9): 1813-21.

30. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**(7): 463-75.

31. Wallasch C, Weiss FU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A. Heregulindependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 1995; **14**(17): 4267-75.

32. Haling JR, Sudhamsu J, Yen I, et al. Structure of the BRAF-MEK complex reveals a kinase activity independent role for BRAF in MAPK signaling. *Cancer Cell* 2014; **26**(3): 402-13.

33. Paton EL, Turner JA, Schlaepfer IR. Overcoming Resistance to Therapies Targeting the MAPK Pathway in BRAF-Mutated Tumours. *J Oncol* 2020; **2020**: 1079827.

34. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**(12): 921-9.

35. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer* 2019; **18**(1): 26.

36. Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem* 2001; **276**(29): 27462-9.

37. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1802**(4): 396-405.

38. Burotto M, Chiou VL, Lee JM, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer* 2014; **120**(22): 3446-56.

39. Yadav V, Zhang X, Liu J, et al. Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma. *J Biol Chem* 2012; **287**(33): 28087-98.

40. Doanes AM, Hegland DD, Sethi R, Kovesdi I, Bruder JT, Finkel T. VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **255**(2): 545-8.

41. Graves LM, Bornfeldt KE, Sidhu JS, et al. Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; **271**(1): 505-11.

42. Vicent GP, Nacht AS, Zaurin R, Ballare C, Clausell J, Beato M. Minireview: role of kinases and chromatin remodeling in progesterone signaling to chromatin. *Mol Endocrinol* 2010; **24**(11): 2088-98.

85

43. Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, et al. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 1996; **15**(6): 1292-300.

44. Ahn NG. The MAP kinase cascade. Discovery of a new signal transduction pathway. *Mol Cell Biochem* 1993; **127-128**: 201-9.

45. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995; **9**(9): 726-35.

46. Vaillancourt RR, Gardner AM, Johnson GL. B-Raf-dependent regulation of the MEK-1/mitogen-activated protein kinase pathway in PC12 cells and regulation by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* 1994; **14**(10): 6522-30.

47. Gardner AM, Vaillancourt RR, Lange-Carter CA, Johnson GL. MEK-1 phosphorylation by MEK kinase, Raf, and mitogen-activated protein kinase: analysis of phosphopeptides and regulation of activity. *Mol Biol Cell* 1994; **5**(2): 193-201.

48. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 2012; **72**(10): 2457-67.

49. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**(6892): 949-54.

50. Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011; **480**(7377): 387-90.

51. Thevakumaran N, Lavoie H, Critton DA, et al. Crystal structure of a BRAF kinase domain monomer explains basis for allosteric regulation. *Nat Struct Mol Biol* 2015; **22**(1): 37-43.

52. Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; **95**(8): 625-7.

53. Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* 2006; **33**(4): 369-85.

54. Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* 2009; **41**(10): 1127-32.

55. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; **7**(9): 493-507.

56. Bria E, Milella M, Cuppone F, et al. Outcome of advanced NSCLC patients harboring sensitizing EGFR mutations randomized to EGFR tyrosine kinase inhibitors or chemotherapy as first-line treatment: a meta-analysis. *Ann Oncol* 2011; **22**(10): 2277-85.

57. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; **101**(19): 1308-24.

58. Schmitz KR, Ferguson KM. Interaction of antibodies with ErbB receptor extracellular regions. *Exp Cell Res* 2009; **315**(4): 659-70.

59. Gao J, Swain SM. Pertuzumab for the treatment of breast cancer: a safety review. *Expert Opin Drug Saf* 2016; **15**(6): 853-63.

60. Swain SM, Baselga J, Kim SB, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2015; **372**(8): 724-34.

61. Garrett JT, Sutton CR, Kuba MG, Cook RS, Arteaga CL. Dual blockade of HER2 in HER2-overexpressing tumor cells does not completely eliminate HER3 function. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013; **19**(3): 610-9.

62. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; **68**(6): 394-424.

63. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; **136**(5): E359-86.

64. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; **65**(2): 87-108.

65. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. International variation in lung cancer mortality rates and trends among women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014; **23**(6): 1025-36.

66. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med* 2011; **32**(4): 605-44.

67. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008; **83**(5): 584-94.

68. Ezzati M, Henley SJ, Lopez AD, Thun MJ. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *Int J Cancer* 2005; **116**(6): 963-71.

69. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018; **553**(7689): 446-54.

70. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* 2020; **383**(14): 1328-39.

71. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016; **11**(1): 39-51.

72. Schilsky RL, Nass S, Le Beau MM, Benz EJ, Jr. Progress in Cancer Research, Prevention, and Care. *N Engl J Med* 2020; **383**(10): 897-900.

73. Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, et al. The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med* 2020; **383**(7): 640-9.

74. van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruysscher DK. Small-cell lung cancer. *Lancet* 2011; **378**(9804): 1741-55.

87

75. George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015; **524**(7563): 47-53.

76. Rossi A. Relapsed small-cell lung cancer: platinum re-challenge or not. *J Thorac Dis* 2016; **8**(9): 2360-4.

77. Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *Lancet* 2005; **366**(9494): 1385-96.

78. De Ruysscher D, Botterweck A, Dirx M, et al. Eligibility for concurrent chemotherapy and radiotherapy of locally advanced lung cancer patients: a prospective, population-based study. *Ann Oncol* 2009; **20**(1): 98-102.

79. Chute JP, Chen T, Feigal E, Simon R, Johnson BE. Twenty years of phase III trials for patients with extensive-stage small-cell lung cancer: perceptible progress. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999; **17**(6): 1794-801.

Rosell R, Wannesson L. A genetic snapshot of small cell lung cancer. *Cancer Discov* 2012; **2**(9): 769-71.

81. Dayen C, Debieuvre D, Molinier O, et al. New insights into stage and prognosis in small cell lung cancer: an analysis of 968 cases. *J Thorac Dis* 2017; **9**(12): 5101-11.

82. Abidin AZ, Garassino MC, Califano R, Harle A, Blackhall F. Targeted therapies in small cell lung cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol* 2010; **2**(1): 25-37.

83. Poirier JT, George J, Owonikoko TK, et al. New Approaches to SCLC Therapy: From the Laboratory to the Clinic. *J Thorac Oncol* 2020; **15**(4): 520-40.

84. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**(8): 535-46.

85. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; **5 Suppl 5**: S463-78.

86. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013; **143**(5 Suppl): e1S-e29S.

87. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997; **315**(7114): 980-8.

88. Vineis P, Airoldi L, Veglia F, et al. Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study. *BMJ* 2005; **330**(7486): 277.

89. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med* 2020; **382**(1): 41-50.

90. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020; **383**(21): 2018-29.

91. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014; **511**(7511): 543-50.

92. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, et al. The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016; **7**(48): 78985-93.

93. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012; **489**(7417): 519-25.

94. Luo W, Tian P, Wang Y, et al. Characteristics of genomic alterations of lung adenocarcinoma in young never-smokers. *Int J Cancer* 2018; **143**(7): 1696-705.

95. Ding L, Getz G, Wheeler DA, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 2008; **455**(7216): 1069-75.

96. Roman M, Baraibar I, Lopez I, et al. KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. *Mol Cancer* 2018; **17**(1): 33.

97. Canon J, Rex K, Saiki AY, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 2019; **575**(7781): 217-23.

98. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med* 2021; **384**(25): 2371-81.

99. Morgensztern D, Campo MJ, Dahlberg SE, et al. Molecularly targeted therapies in nonsmall-cell lung cancer annual update 2014. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2015; **10**(1 Suppl 1): S1-63.

100. Popat S. Osimertinib as First-Line Treatment in EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2018; **378**(2): 192-3.

101. Novello S, Barlesi F, Califano R, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO
Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27(suppl 5): v1-v27.

102. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in nonsmall-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2010; **363**(18): 1693-703.

103. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; **350**(21): 2129-39.

104. Hanna N, Johnson D, Temin S, et al. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2017; **35**(30): 3484-515.

105. Hanna N. Current Standards and Clinical Trials in Systemic Therapy for Stage III Lung Cancer: What Is New? *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015: e442-7.

106. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet* 2017; **389**(10066): 299-311.

89

107. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008; **359**(13): 1367-80.

108. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003; **290**(16): 2149-58.

109. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; **361**(10): 947-57.

110. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003; **21**(12): 2237-46.

111. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; **353**(2): 123-32.

112. Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007; **131**(6): 1190-203.

113. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-smallcell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010; **362**(25): 2380-8.

114. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; **11**(2): 121-8.

115. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; **368**(25): 2385-94.

116. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; **371**(23): 2167-77.

117. Lee CK, Wu YL, Ding PN, et al. Impact of Specific Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutations and Clinical Characteristics on Outcomes After Treatment With EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Versus Chemotherapy in EGFR-Mutant Lung Cancer: A Meta-Analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2015; **33**(17): 1958-65.

118. Reck M, Rabe KF. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; **377**(9): 849-61.

119. Rossi G, Jocolle G, Conti A, et al. Detection of ROS1 rearrangement in non-small cell lung cancer: current and future perspectives. *Lung Cancer (Auckl)* 2017; **8**: 45-55.

120. Facchinetti F, Rossi G, Bria E, et al. Oncogene addiction in non-small cell lung cancer: Focus on ROS1 inhibition. *Cancer Treat Rev* 2017; **55**: 83-95. 121. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2012; **18**(3): 375-7.

122. Lim SM, Kim HR, Lee JS, et al. Open-Label, Multicenter, Phase II Study of Ceritinib in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring ROS1 Rearrangement. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2017; **35**(23): 2613-8.

123. Cardarella S, Ogino A, Nishino M, et al. Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013; **19**(16): 4532-40.

124. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov* 2015; **5**(8): 850-9.

125. Gautschi O, Milia J, Filleron T, et al. Targeting RET in Patients With RET-Rearranged Lung Cancers: Results From the Global, Multicenter RET Registry. *Journal of clinical oncology* : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2017; **35**(13): 1403-10.

126. Davies KD, Le AT, Theodoro MF, et al. Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; **18**(17): 4570-9.

127. Shaw AT, Solomon BJ. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; **372**(7): 683-4.

128. Pao W, Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med* 2012; **18**(3): 349-51.

129. Matsuura S, Shinmura K, Kamo T, et al. CD74-ROS1 fusion transcripts in resected non-small cell lung carcinoma. *Oncol Rep* 2013; **30**(4): 1675-80.

130. Zhao S, Molina A, Yu A, et al. High frequency of CD74 expression in lymphomas: implications for targeted therapy using a novel anti-CD74-drug conjugate. *J Pathol Clin Res* 2019; **5**(1): 12-24.

131. Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003; **197**(11): 1467-76.

132. Ssadh HA, Spencer PS, Alabdulmenaim W, et al. Measurements of heterotypic associations between cluster of differentiation CD74 and CD44 in human breast cancerderived cells. *Oncotarget* 2017; **8**(54): 92143-56.

133. Becker-Herman S, Arie G, Medvedovsky H, Kerem A, Shachar I. CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol Biol Cell* 2005; **16**(11): 5061-9.

91

134. Stein R, Mattes MJ, Cardillo TM, et al. CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007; **13**(18 Pt 2): 5556s-63s.

135. Dou D, da Silva DV, Nordholm J, Wang H, Daniels R. Type II transmembrane domain hydrophobicity dictates the cotranslational dependence for inversion. *Mol Biol Cell* 2014; **25**(21): 3363-74.

136. Datta MW, Shahsafaei A, Nadler LM, Freeman GJ, Dorfman DM. Expression of MHC class II-associated invariant chain (Ii;CD74) in thymic epithelial neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; **8**(3): 210-5.

137. Ioachim HL, Pambuccian SE, Hekimgil M, Giancotti FR, Dorsett BH. Lymphoid monoclonal antibodies reactive with lung tumors. Diagnostic applications. *Am J Surg Pathol* 1996; **20**(1): 64-71.

138. Young AN, Amin MB, Moreno CS, et al. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am J Pathol* 2001; **158**(5): 1639-51.

139. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Invariant chain expression in gastric cancer. *Cancer Lett* 2001; **168**(1): 87-91.

140. Norton AJ, Isaacson PG. Detailed phenotypic analysis of B-cell lymphoma using a panel of antibodies reactive in routinely fixed wax-embedded tissue. *Am J Pathol* 1987; **128**(2): 225-40.

141. Lazova R, Moynes R, May D, Scott G. LN-2 (CD74). A marker to distinguish atypical fibroxanthoma from malignant fibrous histiocytoma. *Cancer* 1997; **79**(11): 2115-24.

142. Mei L, Xiong WC. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2008; **9**(6): 437-52.

143. Rachwal WJ, Bongiorno PF, Orringer MB, Whyte RI, Ethier SP, Beer DG. Expression and activation of erbB-2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1995; **72**(1): 56-64.

144. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**(3): 169-81.

145. Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 2003; **284**(1): 14-30.

146. Meyer D, Yamaai T, Garratt A, et al. Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 1997; **124**(18): 3575-86.

147. Holmes D. PI3K pathway inhibitors approach junction. *Nature reviews Drug discovery* 2011; **10**(8): 563-4.

148. Fernandez-Cuesta L, Sun R, Menon R, et al. Identification of novel fusion genes in lung cancer using breakpoint assembly of transcriptome sequencing data. *Genome biology* 2015; **16**: 7.

149. Plenker D. Functional analysis of CD74-NRG1- a new recurrent oncogenic gene fusion in lung adenocarcinoma [Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät]. Köln: Universität zu Köln; 2015.

150. Cai D, Li H, Wang R, et al. Comparison of clinical features, molecular alterations, and prognosis in morphological subgroups of lung invasive mucinous adenocarcinoma. *Onco Targets Ther* 2014; **7**: 2127-32.

151. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol* 2011; **6**(9): 1496-504.

152. Guo M, Tomoshige K, Meister M, et al. Gene signature driving invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *EMBO Mol Med* 2017; **9**(4): 462-81.

153. Qu Y, Zhao D, Mu J, et al. Prognostic analysis of primary mucin-producing adenocarcinoma of the lung: a comprehensive retrospective study. *Tumour Biol* 2016; **37**(1): 887-96.

154. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. *Proc Am Thorac Soc* 2011; **8**(5): 381-5.

155. Warth A, Muley T, Meister M, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012; **30**(13): 1438-46.

156. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* 2011; **24**(5): 653-64.

157. Hata A, Katakami N, Fujita S, et al. Frequency of EGFR and KRAS mutations in Japanese patients with lung adenocarcinoma with features of the mucinous subtype of bronchioloalveolar carcinoma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2010; **5**(8): 1197-200.

93

158. Kunii R, Jiang S, Hasegawa G, et al. The predominant expression of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1)-negative pulmonary adenocarcinoma. *Histopathology* 2011; **58**(3): 467-76.

159. Nakaoku T, Tsuta K, Ichikawa H, et al. Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014; **20**(12): 3087-93.

160. Maeda Y, Tsuchiya T, Hao H, et al. Kras(G12D) and Nkx2-1 haploinsufficiency induce mucinous adenocarcinoma of the lung. *J Clin Invest* 2012; **122**(12): 4388-400.

161. Shin DH, Lee D, Hong DW, et al. Oncogenic function and clinical implications of SLC3A2-NRG1 fusion in invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Oncotarget* 2016; **7**(43): 69450-65.

162. Fernandez-Cuesta L, Thomas RK. Molecular Pathways: Targeting NRG1 Fusions in Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015; **21**(9): 1989-94.

163. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**(4): 233-45.

164. Jonna S, Feldman RA, Swensen J, et al. Detection of NRG1 Gene Fusions in Solid Tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019; **25**(16): 4966-72.

165. Laskin J, Liu SV, Tolba K, et al. NRG1 fusion-driven tumors: biology, detection, and the therapeutic role of afatinib and other ErbB-targeting agents. *Ann Oncol* 2020; **31**(12): 1693-703.

166. Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, et al. Anchored multiplex PCR for targeted nextgeneration sequencing. *Nat Med* 2014; **20**(12): 1479-84.

167. Beadling C, Wald AI, Warrick A, et al. A Multiplexed Amplicon Approach for Detecting Gene Fusions by Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn* 2016; **18**(2): 165-75.

168. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 2010; **102**(11): 1555-77.

169. Lampreht Tratar U, Horvat S, Cemazar M. Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front Oncol* 2018; **8**: 268.

170. Dong X, Guan J, English JC, et al. Patient-derived first generation xenografts of nonsmall cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010; **16**(5): 1442-51.

171. Sharpless NE, Depinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**(9): 741-54.

172. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Res* 2012; **21**(2): 327-49.

173. Van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell* 2002; **108**(2): 135-44.

174. Wang G, Chow RD, Zhu L, et al. CRISPR-GEMM Pooled Mutagenic Screening Identifies KMT2D as a Major Modulator of Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discov* 2020; **10**(12): 1912-33.

175. Wang G, Chow RD, Ye L, et al. Mapping a functional cancer genome atlas of tumor suppressors in mouse liver using AAV-CRISPR-mediated direct in vivo screening. *Sci Adv* 2018; **4**(2): eaao5508.

176. Chow RD, Guzman CD, Wang G, et al. AAV-mediated direct in vivo CRISPR screen identifies functional suppressors in glioblastoma. *Nat Neurosci* 2017; **20**(10): 1329-41.

177. Walrath JC, Hawes JJ, Van Dyke T, Reilly KM. Genetically engineered mouse models in cancer research. *Adv Cancer Res* 2010; **106**: 113-64.

178. Branda CS, Dymecki SM. Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 2004; **6**(1): 7-28.

179. Hoess RH, Wierzbicki A, Abremski K. The role of the loxP spacer region in P1 sitespecific recombination. *Nucleic Acids Res* 1986; **14**(5): 2287-300.

180. Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 1991; **5**(9): 1513-23.

181. Lakso M, Sauer B, Mosinger B, Jr., et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**(14): 6232-6.

182. Belgardt BF, Husch A, Rother E, et al. PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab* 2008; **7**(4): 291-301.

183. Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999; **21**(1): 70-1.

184. Alexopoulou AN, Couchman JR, Whiteford JR. The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol* 2008; **9**: 2.

185. Awatramani R, Soriano P, Mai JJ, Dymecki S. An Flp indicator mouse expressing alkaline phosphatase from the ROSA26 locus. *Nat Genet* 2001; **29**(3): 257-9.

186. Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 2000; **25**(2): 139-40.

187. Jozefczuk J, Drews K, Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp* 2012; (64): 3854.

188. Novotny CJ, Pollari S, Park JH, Lemmon MA, Shen W, Shokat KM. Overcoming resistance to HER2 inhibitors through state-specific kinase binding. *Nat Chem Biol* 2016; **12**(11): 923-30.

189. Morgenstern JP, Land H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 1990; **18**(12): 3587-96.

190. Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM. Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 2000; **28**(3-4): 106-10.

191. Tan YS, Lei YL. Generation and Culture of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Methods Mol Biol* 2019; **1960**: 85-91.

192. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(43): 15545-50.

193. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; **34**(3): 267-73.

194. Sabo A, Kress TR, Pelizzola M, et al. Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature* 2014; **511**(7510): 488-92.

195. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**(8): 457-74.

196. Aguirre AJ. Oncogenic NRG1 Fusions: A New Hope for Targeted Therapy in Pancreatic Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2019; **25**(15): 4589-91.

197. Heining C, Horak P, Uhrig S, et al. NRG1 Fusions in KRAS Wild-Type Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* 2018; **8**(9): 1087-95.

198. Gay ND, Wang Y, Beadling C, et al. Durable Response to Afatinib in Lung Adenocarcinoma Harboring NRG1 Gene Fusions. *J Thorac Oncol* 2017; **12**(8): e107-e10.

199. Drilon A, Somwar R, Mangatt BP, et al. Response to ERBB3-Directed Targeted Therapy in NRG1-Rearranged Cancers. *Cancer Discov* 2018; **8**(6): 686-95.

200. Schram AM, Drilon AE, Macarulla T, et al. A phase II basket study of MCLA-128, a bispecific antibody targeting the HER3 pathway, in NRG1 fusion-positive advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* 2020; **38**(15\_suppl): TPS3654-TPS.

201. A.M. S. Clinical proof of concept for MCLA-128, a bispecific HER2/HER3 antibody therapy, in NRG1 fusion-positive cancers. *Mol Cancer Ther* 2019; **18**.

202. Schram AM, Odintsov I, Espinosa-Cotton M, et al. Zenocutuzumab, a HER2xHER3 bispecific antibody, is effective therapy for tumors driven by NRG1 gene rearrangements. *Cancer Discov* 2022.

203. Seibler J, Zevnik B, Kuter-Luks B, et al. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**(4): e12.

204. Cheema PK, Doherty M, Tsao MS. A Case of Invasive Mucinous Pulmonary Adenocarcinoma with a CD74-NRG1 Fusion Protein Targeted with Afatinib. *J Thorac Oncol* 2017; **12**(12): e200-e2.

205. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013; **31**(27): 3327-34.

206. Kim HS, Han JY, Shin DH, et al. EGFR and HER3 signaling blockade in invasive mucinous lung adenocarcinoma harboring an NRG1 fusion. *Lung Cancer* 2018; **124**: 71-5.

207. Iowa VVCUo. U of Iowa-530 Ad5CMVFLP0. https://medicine.uiowa.edu/vectorcore/sites/medicine.uiowa.edu.vectorcore/files/U%20of%20 Iowa-530%20Ad5CMVFLPO%20Biosafety%20Information.pdf (Zuletzt abgerufen am 20.11.2022).

208. Anderson RD, Haskell RE, Xia H, Roessler BJ, Davidson BL. A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther* 2000; **7**(12): 1034-8.

### 7. Anhang

#### 7.1. Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Häufigkeit neu diagnostizierter Krebserkrankungen und Verteilung von Krebstodesfällen im Jahr 2018

Abbildung 2: Überblick über die vier Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie

Abbildung 3: Vereinfachter Vergleich der PI3K/AKT- und MAPK-Signalwege

**Abbildung 4:** Überblick über mögliche Therapieoptionen bei Überaktivität/-expression von ErbB-Rezeptoren und nachgeschalteten Signalwegen

Abbildung 5: Genetische Veränderungen in Lungenadenokarzinomen

**Abbildung 6:** Schematische Darstellung und mögliche Wirkung des CD74-NRG1-Fusionsproteins

Abbildung 7: Relative Häufigkeit von NRG1-Fusionen in verschiedenen soliden Tumoren

Abbildung 8: Bekannte Fusionspartner in soliden Tumoren mit NRG1-Fusionen

Abbildung 9: Exzision oder Inversion durch Cre- oder Flp-vermittelte Rekombination

**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der *CD74-NRG1-*cDNA, die zur Erzeugung der *Rosa26FSF.CD74-NRG1-*Mäuse verwendet wurde

Abbildung 11: Schematische Darstellung der STOP-EGFP-ROSA CAG-CD74-NRG1-Sequenz

Abbildung 12: Nachweis der Flp-vermittelten Rekombination in doppelt-transgenen *R26.CD74-NRG1/FlpDel-*Mäusen

Abbildung 13: Transkription des CD74-NRG1-Transgens in Maus A12.55

**Abbildung 14:** Genotypisierung des *R26.FSF.CD74-NRG1*-Allels in Mausembryonen sowie anschließende Transkription und Translation des *CD74-NRG1*-Transgens in MEFs

Abbildung 15: Westernblot-Ergebnisse in Proteinlysaten aus verschiedenen Mausgeweben

Abbildung 16: Schematischer Versuchsaufbau der in vivo-Experimente

Abbildung 17: Vergleich von Überlebenskurven und Tumorentwicklung in den Versuchskohorten

Abbildung 18: Typische Unterhaut-Tumore an unterschiedlicher Lokalisation

Abbildung 19: Exemplarische MRT-Bilder von Sarkomen in der *R26.CD74-NRG1/FlpDel*-Kohorte

Abbildung 20: Histologische Dokumentation eines typischen murinen Sarkoms

Abbildung 21: Hauptkomponentenanalyse der 1000 höchstvariablen Gene

Abbildung 22: Hierarchische Clusteranalyse

**Abbildung 23:** Vulcano-Plots hoch- und herabregulierter Gene in den bilateralen Vergleichen Sarkom/Lunge (A) und Sarkom/Muskel (B)

**Abbildung 24:** Transkriptionslevel von Nrg1 und Cd74 im Vergleich von Lunge, Muskel und Sarkom

**Abbildung 25**: Transkriptionslevel von *Egfr, Erbb2, Erbb3* und *Erbb4* im Vergleich von Lunge, Muskel und Sarkom

Abbildung 26: Gene Set Enrichment-Analysen

Abbildung 27: Transkriptomanalyse von Lebertumoren im Vergleich zu Lebernormalgewebe

Abbildung 28: Transkriptomanalyse von Bauchtumoren im Vergleich zu Milznormalgewebe

Abbildung 29: Zellzahl-Bestimmung der transduzierten Zellen

**Abbildung 30:** Wachstum von verschiedenen *ERBB2-YF/ERBB3wt* BA/F3-Zelllinien bei Exposition mit verschiedenen ERBB2/ERBB3-Inhibitoren

#### 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

- Tabelle 2: Verwendete Geräte
- Tabelle 3: Verwendete Materialien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete Software

Tabelle 6: Zusammensetzung RIPA-Puffer

Tabelle 7: Verwendete Primer

Tabelle 8: Verwendete Antikörper



#### 7.3. Anhang Abbildung 1: Schema STOP-EGFP-ROSA-CAG-Vektor

Anhang Abbildung 1: Schematische Darstellung des *STOP-EGFP-ROSA-CAG-Vektors*. Als Rezipient des fusionierten *CD74-NRG1-*Leserasters für die Generierung des konditionalen Mausmodells.<sup>149,182</sup>



# 7.4. Anhang Abbildung 2: Plasmidkarte des Adeno-assozierten Rekombinationsvektors *pAd5CMVFlpO*

Anhang Abbildung 2: Plasmidkarte des Adeno-assozierten Rekombinationsvektors pAd5CMVFIpO, Flp-Rekombinase-Leseraster (lila), CMV Enhancer und CMV-Promotor (dunkelgelb), PolyA Terminator (grau), bakterielles Ampicillin-Resistenzgen (dunkelrot). Die Karte wurde mit dem Programm Snapgene Plasmidsequenz erstellt, die stammt aus: https://medicine.uiowa.edu/vectorcore/sites/medicine.uiowa.edu.vectorcore/files/U%20of%20Iowa-530%20Ad5CMVFLPO%20Biosafety%20Information.pdf.207,208



#### 7.5. Anhang Abbildung 3: Schema pBabe hygro-CD74-NRG1-Vektors

Anhang Abbildung 3: Schematische Darstellung des *pBabe hygro-CD74-NRG1-Vektors*. In dunkelgrün dargestellt ist die *CD74-NRG1-*Sequenz, grau dargestellt ist die bakterielle Ampicillin-Resistenz; in gelb das *Hygromycin*-Resistenzgen zur Selektion der transfizierten Zellen unter Kontrolle des *SV40-*Promotors (hellgrün).<sup>149,189</sup>

# 7.6. Anhang Tabelle 1: Score Sheet zur Einschätzung des Gesundheitszustandes der Mäuse in den Versuchskohorten

Beobachtungen	Punkte						
Auffälligkeiten im Körpergewicht							
Änderungen < 5%	1						
Gewichtsreduktion 5-10%	5						
Gewichtsreduktion 11-20%, bzw. Wirbel und Beckenknochen sichtbar	10						
Gewichtsreduktion >20%, bzw. Wirbel und Beckenknochen deutlich	20						
sichtbar							
Auffälligkeiten im Allgemeinzustand							
Felldefekte (verminderte oder vermehrte Körperpflege)	1						
Fell stumpf, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb, erhöhter	5						
Muskeltonus, kleinere (punktförmige) Verletzungen der Haut							
Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale	10						
Haltung, Augen trüb, hoher Muskeltonus, mittlere Verletzungen der Haut							
Verkrampfungen, Lähmungen, Atemgeräusche, großflächige	20						
Verletzungen der Haut							
Auffälligkeiten im Spontanverhalten							
Geringe Abweichungen von Normalverhalten	1						
Ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5						
Selbstisolation, Lethargie, ausgeprägte Hyperkinetik,	10						
Verhaltensstereotypie, Koordinationsstörungen							
Schmerzlaute beim Ergreifen, Automutilation, Kannibalismus	20						
Auffälligkeiten klinischer Befund							
Geringe Abweichungen von der Normalsituation	1						
Sichtbarer Einzeltumor, Durchmesser 1,5 cm	20						
Mehrere Tumore, gemeinsamer Durchmesser 3 cm	20						
Sichtbare (verschiebliche) Hauttumore, maximaler Durchmesser 2 cm	20						
Ulzerierende (mit Verletzungen der Haut) Tumore	20						
Rektumprolaps (Mastdarmvorfall)	20						
Besonderheiten bei Würfen							
Isolation von Neugeborenen im Wurf	10						
MangeInde Pflege durch Muttertier (kein Milchspot)	20						
Kümmerer	20						

Anhang Tabelle 1: Generelles Score Sheet zur Erfassung der individuellen experimentellen Belastung jeder Maus in den verschiedenen Versuchskohorten.

#### 7.7. Anhang Tabelle 2: Daten der R26.CD74-NRG1/FlpDel-Kohorte

Maus-ID	Geburt	Tod	Alter in Wochen	Todesursache	Histologischer Befund
00A12-00004	02.02.17	10.08.17	27	Narkose	Negativ
00A12-00005 (M00238)	02.02.17	23.08.18	81	Tumor	subkutanes Sarkom (Flanke)
00A12-00007 (M00236)	02.02.17	26.07.18	77	Tumor	subkutanes Sarkom (lateral), Lebertumor
00A12-00011	02.02.17	13.01.18	49	Tumor	subkutanes Sarkom (Schwanz)
00A12-00012 (M00237)	02.02.17	23.08.18	81	Tumor	subkutanes Sarkom (Ohr)
00A12-00014	02.02.17	20.05.19	119	spontan	subkutanes Sarkom (Rücken)
00A12-00019 (M00235)	27.02.17	26.07.18	73	Tumor	subkutanes Sarkom (Flanke)
00A12-00020 (M00248)	27.02.17	06.03.19	105	Tumor	subkutanes Sarkom (Schwanz), Lebertumor
00A12-00026	26.02.17	23.08.18	77	Score	Negativ
00A12-00027 (M00249)	26.02.17	18.12.18	94	Tumor	Lebertumor
00A12-00030	27.02.17	25.03.19	108	spontan	Negativ
00A12-00031	27.02.17	29.07.19	126	Score	Tumor (Bauch)
00A12-00043 (M00247)	23.04.17	15.08.19	120	Tumor	Tumore (Darm, Bauch a.e. invasiv von Leber)
00A12-00045 (M00245)	12.05.17	04.02.19	90	Tumor	subkutane Sarkome (Rücken,Schwanz)
00A12-00046	12.05.17	01.10.18	72	spontan	Negativ

Anhang Tabelle 2: Analyse der *R26.CD74-NRG1/FlpDel-Kohorte* nach Maus-Identifikationsnumer (Maus-ID), Geburts- bzw. Todeszeitpunkt, dem erreichten Alter und Todesursache. Mäuse mit nachgewiesenem Tumor wurden zur histologischen Untersuchung und der Gewinnung von Tumor- und Gewebematerial getötet. In der Spalte histologischer Befund ist das spätere Ergebnis genauerer Untersuchungen eingetragen.

# 7.8. Anhang Tabelle 3: Daten der AdenoFlp- und Kontrollkohorte

AdenoFlp Induktion		unbehandelte Kontrollkohorte			
Maus-ID	Alter in	Todesursache	Maus-ID	Alter in	Todesursache
	Wochen			Wochen	
00A11-00057	117	spontan	00A11-00064	107	Score
00A11-00058	95	spontan	00A11-00067	129	Score
00A11-00059	89	Score	00A11-00069	85	Score
00A11-00060	83	spontan	00A11-00082	116	spontan
00A11-00061	91	spontan	00A11-00083	78	Score
00A11-00062	100	spontan	00A11-00084	89	Score
00A11-00070	116	spontan	00A11-00085	137	Score
00A11-00071	96	Score	00A11-00086	132	spontan
00A11-00074	122	spontan	00A11-00087	124	spontan
00A11-00076	96	Score	00A11-00088	110	Score
00A11-00077	17	Narkose	00A11-00089	91	Score
00A11-00078	100	spontan	00A11-00090	63	Score
00A11-00079	90	Score	00A11-00091	91	spontan
00A11-00080	132	Score	00A11-00092	129	Score
00A11-00081	132	Score	00A11-00093	129	Score

Anhang Tabelle 3: Vergleich der Abbruchkriterien in der AdenoFlp- und Kontrollkohorte. Alle Tiere waren heterozygot für das R26.FSF.CD74-NRG1-Transgen, nachweisbare Tumore traten in keiner der beiden Kohorten auf.

## 8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Werr L, Plenker D, Dammert MA, Lorenz C, Brägelmann J, Tumbrink HL, Klein S, Schmitt A, Büttner R, Persigehl T, Shokat KM, Wunderlich FT, Schram AM, Peifer M, Sos ML, Reinhardt HC, Thomas RK.

## "CD74-NRG1 Fusions Are Oncogenic In Vivo and Induce Therapeutically Tractable ERBB2:ERBB3 Heterodimerization."

Mol Cancer Ther. 2022 May 4;21(5):821-830. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0820. PMID: 35247925.