

Aus dem
Akademischen Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen
Robert Bosch Krankenhaus Stuttgart
Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin

**Überwindung von Resistenz gegenüber EGFR-spezifischen
Tyrosinkinaseinhibitoren in TP53-mutierten
Lungenkarzinomzelllinien durch Proteasominhibition**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Orth, Franziska Antonia**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Kopp

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 21.10.2025

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung.....	13
1.1 Häufigste Todesursachen	13
1.2 Maligne Tumoren der Lunge	13
1.2.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und histologische Subtypen.....	13
1.3 Resistenzentwicklung in Tumorzellen	14
1.3.1 Molekulargenetische Analysen / Treibermutationen	15
1.3.2 EGF-Rezeptor	16
1.4 Therapien des NSCLC	17
1.4.1 Zielgerichtete Tumorthherapie	18
1.4.2 Tyrosinkinase-Inhibitoren	18
1.4.3 EGFR-Inhibitoren.....	19
1.5 EGFR-Mutationen.....	23
1.5.1 Exon 19 Deletion	24
1.5.2 L858R Mutation	24
1.5.3 Exon 20 Insertion.....	24
1.5.4 Atypische / Uncommon Mutations.....	25
1.6 Erworbene EGFR-Mutationen unter EGFR-TKI-Therapie	25
1.6.1 TKI-sensitive, atypische EGFR-Mutationen	26
1.6.2 T790M-Mutation	26
1.6.3 C797S Mutation.....	27
1.7 Off-Target erworbene Mutationen unter EGFR-TKI-Therapie	28
1.7.1 EMT	28
1.7.2 Umwandlung zu SCLC	29
1.7.3 Umwandlung zu Plattenepithelkarzinom	29
1.7.4 Andere Signalwege	29
1.8 Tumorsuppressor p53	30
1.9 Apoptose und Zelltod	31
1.9.1 Extrinsischer Apoptose-Signalweg.....	33
1.9.2 Intrinsischer Apoptose-Signalweg	34
1.9.3 BCL-2-Proteinfamilie	34
1.9.4 Integrierte Stress Antwort.....	39

1.10	Ansatz der Krebs-Therapie: Proteasominhibitoren	40
1.10.1	Bortezomib	41
1.11	Kombinationstherapien	42
1.11.1	Kombination von Bortezomib mit BH3 Mimetika	42
1.11.2	Kombination von ALK-TKI mit Proteasominhibitor	42
1.11.3	Kombinierte Therapie mit EGFR	43
2	Zielsetzung der Arbeit	44
3	Material und Methoden	46
3.1	Geräte	46
3.2	Verbrauchsmaterialien	47
3.3	Verwendete Chemikalien	48
3.4	Zellkultur	49
3.4.1	Verwendete Zelllinien	49
3.5	Zellbiologische Methoden	51
3.5.1	Kultivierung der NSCLC-Zelllinien	51
3.5.2	Bestimmung der Zellzahl- und Vitalität	53
3.5.3	Kryokonservierung	53
3.5.4	Beginn einer neuen Zellkultur	53
3.6	Medikamente / Reagenzien	54
3.7	Durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels Annexin V und TMRM-Färbung	54
3.8	Proteinanalytik	56
3.8.1	Proteinlysate	56
3.8.2	SDS-PAGE	58
3.8.3	Western Blot	59
3.9	RNA-Analysen	63
3.9.1	RNA-Isolation	63
3.9.2	cDNA-Synthese	64
3.9.3	Analyse der Genexpression mit TaqMan-basiertem Assay	65
3.10	Mito Stress Test – Mitochondriale Funktion	66
3.11	Immunfluoreszenzmikroskopie / Morphologische Untersuchungen	68
3.11.1	Aussäen	68
3.11.2	Fixation	68
3.11.3	Permeabilisierung	68
3.11.4	Blocking	69
3.11.5	Primäre Antikörper	69
3.11.6	Sekundäre Antikörper	69

3.11.7	Mounting der Deckgläser.....	69
3.12	Statistik.....	69
4	Ergebnisse.....	71
4.1	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-Wildtyp-NSCLC- Zelllinien (H1299, A549).....	71
4.1.1	Lichtmikroskopische Aufnahme H1299.....	72
4.1.2	Lichtmikroskopische Aufnahme A549.....	72
4.1.3	H1299 und A549: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM.....	72
4.1.4	H1299 und A549: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf die Expression von Annexin V und TMRM.....	75
4.1.5	H1299 und A549: Kombination von PI und EGFR-TKI.....	77
4.2	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827Mai).....	79
4.2.1	Lichtmikroskopische Aufnahme HCC827Mai.....	80
4.2.2	HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM.....	80
4.2.3	HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf die Expression von Annexin V und TMRM.....	82
4.2.4	HCC827Mai: Kombination von BTZ und EGFR-TKI.....	82
4.3	Etablierung einer Osimertinib-resistenten Zelllinie aus HCC827Mai.....	84
4.4	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827WT).....	84
4.4.1	Lichtmikroskopische Aufnahme HCC827WT.....	85
4.4.2	HCC827WT: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf Expression von Annexin V und TMRM.....	85
4.4.3	HCC827WT: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf Expression von Annexin V und TMRM.....	87
4.4.4	HCC827WT: Kombination von PI und EGFR-TKI.....	88
4.5	Vergleich der HCC827Mai und der HCC827WT.....	89
4.5.1	Lichtmikroskopische Aufnahme der HCC827WT während der Etablierung der Osimertinibresistenz.....	92
4.6	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827Erl).....	93
4.6.1	Lichtmikroskopische Aufnahme HCC827Erl.....	93
4.6.2	HCC827Erl: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM.....	93
4.6.3	HCC827Erl: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf die Expression von Annexin V und TMRM.....	95
4.6.4	HCC827Erl: Kombination von PI und EGFR-TKI.....	95

4.7	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827ErlOsi)	97
4.7.1	Lichtmikroskopische Aufnahme der HCC827Erl bei der Etablierung einer Osimertinibresistenz	97
4.7.2	HCC827ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM	97
4.7.3	HCC827ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI.....	99
4.7.4	HCC827ErlOsi: Kombination von PI und EGFR-TKI.....	99
4.8	Vergleich: Kombinationstherapie nach 24 h in HCC827-Zelllinien	100
4.8.1	Vergleich: Ursprungszelllinie HCC827Erl mit HCC827ErlOsi	101
4.8.2	Untersuchung der Erlotinib-Resistenz	103
4.9	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (H1650WT)	103
4.9.1	Lichtmikroskopische Aufnahme H1650WT	104
4.9.2	H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM	104
4.9.3	H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf Annexin V und TMRM	105
4.9.4	H1650WT: Kombination von PI und EGFR-TKI	106
4.10	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (H1650Osi)	108
4.10.1	Lichtmikroskopische Aufnahme H1650Osi.....	108
4.10.2	H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM	108
4.10.3	H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf Annexin V und TMRM	110
4.10.4	H1650Osi: Kombination von PI und EGFR-TKI	110
4.10.5	Vergleich der Erlotinib- und Gefitinibresistenz in H1650WT und H1650Osi .	111
4.10.6	Vergleich: Ursprungszelllinie mit OSI-Zelllinie	112
4.11	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC4006WT).....	113
4.11.1	Lichtmikroskopische Aufnahme HCC4006WT	113
4.11.2	HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM	114
4.11.3	HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI.....	115
4.11.4	HCC4006WT: Kombination von PI und EGFR-TKI in EGFR-mutierten-Zelllinien.....	116
4.12	Etablierung einer Osimertinib resistenter Zelllinie aus HCC4006WT – Lichtmikroskopische Darstellung.....	117
4.13	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC4006Erl).....	118

4.13.1	Lichtmikroskopische Aufnahme HCC4006Erl	118
4.13.2	HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM	118
4.13.3	HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI.....	119
4.13.4	HCC4006Erl: Kombination von PI und EGFR-TKI	120
4.14	Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC4006ErlOsi)	121
4.14.1	Lichtmikroskopische Aufnahme HCC4006ErlOsi	121
4.14.2	HCC4006ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM	122
4.14.3	HCC4006ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI.....	123
4.14.4	HCC4006ErlOsi: Kombination von PI und EGFR-TKI.....	124
4.15	Vergleich: Kombinationsbehandlungen in HCC4006-Zelllinien.....	125
4.16	Erlotinib resistente Zelllinien mit Erlotinibbehandlung im Vergleich	128
4.17	Morphologische Untersuchungen mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie ...	129
4.18	Verhalten der Zelllinien bei längerer Inkubationszeit	130
4.18.1	HCC4006: Inkubation über 24 Stunden	131
4.18.2	HCC4006: Inkubation über 48 Stunden	133
4.18.3	HCC4006: Inkubation über 72 Stunden	134
4.18.4	Einfluss der Dauerinkubation mit Osimertinib über unterschiedliche Zeiträume auf Annexin V Expression	136
4.19	Unterschiede in der p53 Expression in den HCC4006.....	137
4.20	Einfluss der BCL-2-Proteine auf die Apoptose in HCC4006	140
4.20.1	NOXA.....	146
4.21	Mitochondriale Beteiligung in HCC4006.....	151
4.21.1	HCC4006: Sauerstoffverbrauchsrate	151
4.22	Einfluss der Inkubation mit EGFR-TKI und BTZ in HCC4006 auf integrierte Stressantwort.....	153
4.23	Unterschiede und Wirkungen in anderen NSCLC Zelllinien	158
4.23.1	H1650: Inkubation über 24 Stunden.....	159
4.23.2	H1650: Inkubation über 48 Stunden.....	160
4.23.3	H1650: Inkubation über 72 Stunden.....	161
4.24	Mitochondriale Beteiligung in H1650.....	162
4.24.1	H1650 Sauerstoffverbrauchsrate	163
4.25	Unterschiede in der EGF-Rezeptor Expression und der EGFR-Aktivierung in HCC4006 abhängig vom Mutationsstatus.....	163
4.26	Aktivierung weiterer Signalwege	165

5	Diskussion	168
5.1	Zelltodinduktion in EGFR-WT-Zelllinien mit EGFR-TKI	169
5.2	Zelltodinduktion in EGFR-WT-Zelllinien mit PI	171
5.3	Zelltodinduktion in EGFR-WT-Zelllinien mit EGFR-TKI + PI in Kombination	171
5.4	Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit EGFR-TKI	173
5.5	Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit PI	175
5.6	Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit EGFR-TKI und PI	176
5.7	Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit Resistenz gegen EGFR-TKI	177
5.8	Osimertinib resistente Zelllinien	183
5.9	Mitochondrium und Apoptose.....	185
5.10	Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien durch eine kombinierte Inkubation von EGFR-TKI+BTZ	186
5.11	BCL-2-Proteinfamilie	187
5.12	NOXA und integrierte Stressantwort	188
5.13	Ausblick	190
5.14	Schlussfolgerung	192
6	Zusammenfassung	193
7	Literaturverzeichnis	195
8	Erklärung zum Eigenanteil	213
9	Veröffentlichungen.....	214
10	Danksagung	215

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Maligne Lungentumoren nach Histologie.	14
Abb. 2: Anteile der klassischen Treibermutationen in Lungentumoren.	16
Abb. 3: Signalwege des EGF-Rezeptors.	17
Abb. 4: Therapieschema der EGFR-TKI	20
Abb. 5: Häufigkeit der erworbenen Mutationen nach Therapie mit OSI in Erst- und Zweitlinie ..	26
Abb. 6: Apoptose Signalweg	32
Abb. 7: BCL-2-Proteinfamilie.....	36
Abb. 8: NOXA-Regulation bei zellulärem Stress.....	38
Abb. 9: Struktur und Angriffspunkte eines 26S-Proteasoms und BTZ	41
Abb. 10: Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profil	67
Abb. 11 Zelllinie H1299 in der Lichtmikroskopie.	72
Abb. 12 Zelllinie A549 in der Lichtmikroskopie	72
Abb. 13 H1299: Dosisabhängiger Einfluss der Gabe von EGFR-TKI	74
Abb. 14 A549: Dosisabhängiger Einfluss der Gabe von EGFR-TKI	75
Abb. 15 H1299: Dosisabhängiger Einfluss der Gabe von BTZ.....	76
Abb. 16 A549: Dosisabhängiger Einfluss der Gabe von BTZ	76
Abb. 17 H1299: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI.....	78
Abb. 18 A549: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI	79
Abb. 19 Zelllinie HCC827Mai in der Lichtmikroskopie.	80
Abb. 20 HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss der Gabe von EGFR-TKI.....	81
Abb. 21 HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss der Gabe von BTZ.....	82
Abb. 22 HCC827Mai: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI	83
Abb. 23 Zelllinie HCC827Mai bei der dauerhaften Inkubation mit OSI über 4 Wochen in der Lichtmikroskopie.....	84
Abb. 24 Zelllinie HCC827WT in der Lichtmikroskopie	85
Abb. 25 HCC827WT: Dosisabhängiger Einfluss der Gabe von EGFR-TKI.....	87
Abb. 26 HCC827WT: Einfluss der dosisabhängigen Gabe von BTZ	87
Abb. 27 HCC827WT: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI	89
Abb. 28 HCC827WT und HCC827Mai: Vergleich der EGFR-TKI Gabe.....	90
Abb. 29 HCC827WT und HCC827Mai: Vergleich der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI.....	92
Abb. 30 HCC827KenWT und HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ.....	92
Abb. 31 Zelllinie HCC827WT bei der Etablierung einer OSI resistenten Zelllinie durch dauerhafte Inkubation mit OSI in der Lichtmikroskopie.	92
Abb. 32 Zelllinie HCC827Erl in der Lichtmikroskopie.	93
Abb. 33 HCC827Erl: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI	94
Abb. 34 HCC827Erl: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ.....	95

Abb. 35 HCC827Erl: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI	96
Abb. 36 Zelllinie HCC827ErlOsi in der Lichtmikroskopie	97
Abb. 37 HCC827ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI	98
Abb. 38 HCC82ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ	99
Abb. 39 HCC827ErlOsi: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI ...	100
Abb. 40 Vergleich: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI in HCC827KenWT, HCC827Erl, HCC827ErlOsi.....	101
Abb. 41 Vergleich: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI und BTZ in HCC827Erl und in HCC827ErlOsi.....	103
Abb. 42 HCC827WT, HCC827Erl, HCC827ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von ERLO	103
Abb. 43 Zelllinie H1650WT in der Lichtmikroskopie.....	104
Abb. 44 H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI	105
Abb. 45 H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ.....	106
Abb. 46 H1650WT: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI	107
Abb. 47 Zelllinie H1650Osi in der Lichtmikroskopie.....	108
Abb. 48 H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI	109
Abb. 49 H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ.....	110
Abb. 50 H1650Osi: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI.....	111
Abb. 51 Vergleich H1650WT und H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI.....	112
Abb. 52 Vergleich H1650WT und H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von OSI und BTZ und der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI.....	113
Abb. 53 Zelllinie HCC4006WT in der Lichtmikroskopie	114
Abb. 54 HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI	115
Abb. 55 HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ	116
Abb. 56 HCC4006WT: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI	117
Abb. 57 Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie HCC4006WT bei der Etablierung einer OSI resistenten Zelllinie	117
Abb. 58 Zelllinie HCC4006Erl in der Lichtmikroskopie.....	118
Abb. 59 HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI.....	119
Abb. 60 HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ.....	120
Abb. 61 HCC4006Erl: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI	121
Abb. 62 Zelllinie HCC4006ErlOsi in der Lichtmikroskopie	121
Abb. 63 HCC4006ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI	123
Abb. 64 HCC4006ErlOsi: Einfluss der dosisabhängigen isolierten Gabe von BTZ	124
Abb. 65 HCC4006ErlOsi: Kombiniertes Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI .	125
Abb. 66 HCC4006: Kombiniertes Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM GEF1	126
Abb. 67 HCC4006: Kombiniertes Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM AFA	127

Abb. 68 HCC4006: Kombiniertes Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM OSI.....	128
Abb. 69 HCC4006: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von ERLO	128
Abb. 70 Darstellung der Zelllinien in der Immunfluoreszenzmikroskopie	130
Abb. 71 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h.....	132
Abb. 72 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h.....	133
Abb. 73 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 48 h.....	133
Abb. 74 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 48 h.....	134
Abb. 75 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 72 h.....	135
Abb. 76 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 72 h.....	135
Abb. 77 HCC4006: Einfluss der Dauerinkubation mit OSI auf die kombinierte Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h	136
Abb. 78 H1650: Einfluss der Dauerinkubation mit OSI auf die kombinierte Gabe von 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h	137
Abb. 79 Proteinexpression von p53 in HCC4006WT	138
Abb. 80 Proteinexpression von p53 in HCC4006Erl	139
Abb. 81 Proteinexpression von p53 in HCC4006ErlOsi.....	140
Abb. 82 Proteinexpression von BCL-2-Proteinen in HCC4006WT.....	141
Abb. 83 Proteinexpression von BCL-2-Proteinfamilie in HCC4006Erl.....	143
Abb. 84 Proteinexpression von BCL-2-Proteinfamilie in HCC4006ErlOsi	145
Abb. 85 Proteinexpression von BH3-only-protein NOXA in HCC4006WT.	146
Abb. 86 mRNA-Genexpression von BH3-only-protein NOXA und MCL-1 in HCC4006WT.	147
Abb. 87 Proteinexpression von BH3-only-protein NOXA in HCC4006Erl.....	148
Abb. 88 mRNA-Genexpression von BH3-only-protein NOXA und MCL-1 in HCC4006Erl.....	149
Abb. 89 Proteinexpression von BH3-only-protein NOXA in HCC4006ErlOsi.	150
Abb. 90 HCC4006WT: Sauerstoffverbrauchsrate in Mito Stress Test Analyse	152
Abb. 91 HCC4006Erl: Sauerstoffverbrauchsrate in Mito Stress Test Analyse.	152
Abb. 92 HCC4006ErlOsi: Sauerstoffverbrauchsrate in Mito Stress Test Analyse	153
Abb. 93 Proteinexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006WT	154
Abb. 94 mRNA-Genexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006WT	155
Abb. 95 Proteinexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006Erl	156
Abb. 96 mRNA-Genexpression der ATF3 und ATF4 in HCC4006Erl.....	157
Abb. 97 Proteinexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006ErlOsi.....	158

Abb. 98 H1650: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h	160
Abb. 99 H1650: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 48 h	161
Abb. 100 H1650: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 72 h	162
Abb. 101 H1650WT und H1650Osi: Sauerstoffverbrauchsrate in Mito Stress Test Analyse ..	163
Abb. 102 Proteinexpression des EGF-Rezeptors in HCC4006WT.....	164
Abb. 103 Proteinexpression des EGF-Rezeptors in HCC4006Erl.....	165
Abb. 104 Proteinexpression des EGF-Rezeptors in HCC4006ErlOsi.....	165
Abb. 105 Proteinexpression des Akt-Signalwegs in HCC4006WT.....	166
Abb. 106 Proteinexpression des Akt-Signalwegs in HCC4006Erl.....	167
Abb. 107 Proteinexpression des Akt-Signalwegs in HCC4006ErlOsi.....	167

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auswahl der aktuell in Deutschland zugelassenen Medikamente	18
Tabelle 2 In Deutschland zugelassene EGFR-TKI	19
Tabelle 3 Übersicht über die verschiedenen häufigen on-target EGFR-Mutationen	24
Tabelle 4 Übersicht über die BCL-2-Proteinfamilie	35
Tabelle 5 ISR beteiligte Proteine.....	39
Tabelle 6 Zugelassene Proteasominhibitoren in Deutschland	40
Tabelle 7 Verwendete Geräte	46
Tabelle 8 Verwendete Verbrauchsmaterialien	47
Tabelle 9 Verwendete Chemikalien	48
Tabelle 10 Verwendete Zelllinien und generierte Zelllinien	50
Tabelle 11 Verwendete Medikamente.....	54
Tabelle 12 Verwendete Primärantikörper.....	60
Tabelle 13 Verwendete sekundäre Antikörper	61
Tabelle 14 qPCR-Protokoll.....	64
Tabelle 15 cDNA-Synthese-Reaktionsmixes	64
Tabelle 16 Assay-Mix für Fluidigm	65
Tabelle 17 Sample-Pre-Mix für Fluidigm.....	65
Tabelle 18 Verwendete TagMan-Assays und die Zielgene	65
Tabelle 19 Zusammenfassung von Ziel und Wirkung auf die mitochondriale Atmung durch die Modulatoren.....	68
Tabelle 20 Verwendete Antikörper und Farbstoffe.....	69

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
AFA	Afatinib
Akt	Proteinkinasen B (PKB $\alpha/\beta/\gamma$) (Gene: AKT1, AKT2, AKT3)
AMP	Adenosinmonophosphat
Apaf-1	<i>Apoptosis activating factor-1</i>
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF	aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
AURKA	Aurora kinase A
BAG 4	<i>BAG Cochaperone 4</i>
BCL-2	B-cell lymphoma 2, Apoptoseregulator Bcl-2
BH	BCL-2-Homologie
BRAF	<i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
BTZ	Bortezomib
CARD	Caspaseaktivierungs- und Rekrutierungsdomäne
c-Met	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
CReP	<i>constitutive repressor of eIF2α phosphorylation</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element binding</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERLO	Erlotinib
EtOH	Ethanol
Ex19del	Exon 19 Deletion
FACS	Durchflusszytometrie
FADD	FAS-assoziiertes Todesdomänenprotein (<i>death domain</i>)
FCS	fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCN2	general control nonderepressible 2
GEFI	Gefitinib
GSH	Glutathion
HEPES	4-(2 Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HGF	<i>hepatocyte growth/scatter factor</i> , Hepatozyten-Wachstumsfaktor
ICE	Interleukin-1 β Converting Enzyme
IP3R	Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor
ISR	integrierte Stress-Antwort
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MCL-1	myeloid leukemia 1
Met	Methionin
MET	<i>Mesenchymal-Epithelial Transition</i>

MOMP	Permeabilisierung der mitochondrialen Außenmembran, <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
ORF	offener Leserahmen
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate
OSI	Osimertinib
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
PERK	<i>protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PI	Proteasom-Inhibitor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMAIP1	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat induzierbares Protein 1
PS	Phosphatidylserin
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
Ras	rat sarcoma
RET	<i>rearranged during transfection</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RTKI	Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor
s.c.	subkutan
SCLC	<i>Small-cell lung cancer</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Smac/DIABLO	<i>second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI</i>
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- α	Transforming Growth Factor Alpha
TILA	TNF-Ligand 1
TK	Tyrosin-Kinase
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor(en)
TMD	Transmembrandomäne
TMRM	Tetramethylrhodamin-methylester
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53	Tumor Protein p53
TRADD	<i>tumor necrosis factor alpha receptor 1 associated death domain</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
UC	<i>Uncommon Mutations</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Häufigste Todesursachen

2019 waren laut der „*World Health Statistics 2023*“ der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 74 % der Todesfälle (entsprechend 41 Mio. Tote) auf nichtübertragbare Krankheiten zurückzuführen. Davon entfielen 17,9 Mio. Tote auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, gefolgt von 9,3 Mio. Krebstoten, von 4,1 Mio. Toten durch chronische Atemwegserkrankungen und 2,0 Mio. Toten durch Diabetes.

Neu an Krebs erkrankten weltweit im Jahr 2020 fast 20 Mio. Menschen (Sung et al., 2021). Nach dem Mammakarzinom (11,7 %) ist der Lungenkrebs die zweithäufigste neudiagnostizierte Krebserkrankung (11,4 %) im Jahr 2020 (Sung et al., 2021). An einem bösartigen Lungentumor sind 2020 1,8 Mio. Menschen verstorben. Lungenkrebs ist der Krebs mit den meisten Todesfällen weltweit, vor dem hepatobiliären und dem kolorektalen Karzinom (Sung et al., 2021).

1.2 Maligne Tumoren der Lunge

1.2.1 *Epidemiologie, Risikofaktoren und histologische Subtypen*

Lungenkarzinome sind primär in der Lunge entstandene epitheliale bösartige Tumoren. Lungenkarzinome werden in kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC = *small cell lung cancer*) und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC = *non small cell lung cancer*) eingeteilt.

Den größten Anteil an malignen Lungentumoren macht der NSCLC mit ca. 80-85 % aus (Rodriguez-Canales et al., 2016). Das NSCLC hat eine 5-Jahresüberlebensrate von 15 % (La Montagna et al., 2021).

Rauchen zählt weiterhin zum wichtigsten Risikofaktor für die Entstehung von malignen Lungentumoren, aber etwa 25 % der Lungenkrebsfälle weltweit treten bei Nichtrauchern auf (Okazaki et al., 2016, North and Christiani, 2013, MacRosty and Rivera, 2020, Dubin and Griffin, 2020). Bei Nichtrauchern ist der Lungenkrebs die siebthäufigste Krebstodesursache (Okazaki et al., 2016, North and Christiani, 2013). Es finden sich Geschlechtsunterschiede: so erkrankten nicht-rauchende Frauen häufiger an NSCLC im Vergleich zu nicht-rauchenden Männern (MacRosty and Rivera, 2020, Zhong and Borlak, 2023). Im asiatischen

Raum sind sogar >50 % der Lungenkrebs-erkrankten Frauen Nichtraucher (Dubin and Griffin, 2020, MacRosty and Rivera, 2020).

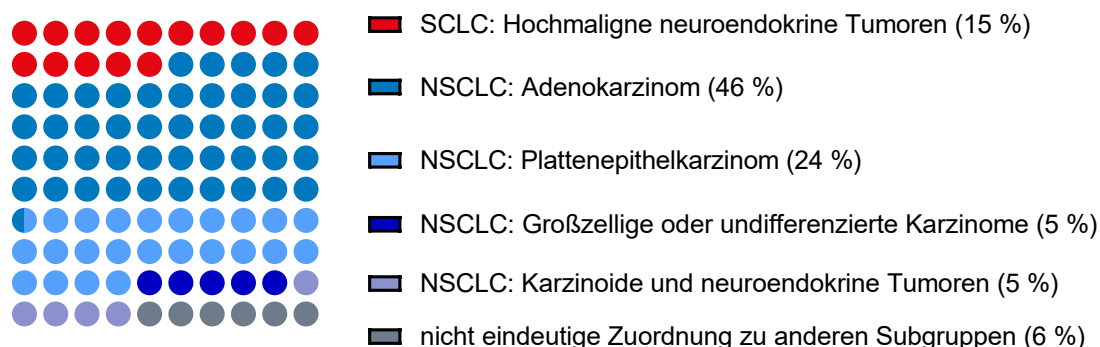


Abbildung 1: Maligne Lungentumoren nach Histologie (Zahlen aus den deutschen Krebsregisterdaten).

Der am häufigsten bei Nichtrauchern auftretende maligne Lungentumor ist das Adenokarzinom, bei *Never-Smokers* 88 % im Vergleich zu 62% bei *Ever-Smokers* (Tang et al., 2021). Dieses weist häufig spezifische Treibermutationen auf (Okazaki et al., 2016).

In NSCLCs findet sich in 10-15 % der Tumoren Mutationen im *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Leonetti et al., 2019), besonders in Adenokarzinomen. Einen mutierten EGFR findet sich insbesondere bei Frauen (69,7 %) und bei *Never-Smoker* (66,6 %) (Westover et al., 2018).

1.3 Resistenzentwicklung in Tumorzellen

Die „Hallmarks of Cancer“ wurden zum ersten Mal im Jahre 2000 von Hanahan und Weinberg definiert. Dabei beschrieben sie 6 Charakteristika von Krebszellen (Hanahan and Weinberg, 2000). Im Jahr 2011 und 2022 wurden diese 6 Charakteristika auf 10 erweitert (Hanahan and Weinberg, 2011, Hanahan, 2022).

Diese Charakteristika, die den Krebszellen ein Überleben sichern und die auch mögliche Angriffspunkte für Krebstherapien darstellen, sind

- a) Aufrechterhaltung proliferativer Signalübertragung
- b) Umgehen von Wachstumssuppressoren
- c) Widerstand gegen den Zelltod

- d) Replikative Unsterblichkeit
- e) Gefäßversorgung
- f) Gewebeinvasion und Metastasierung
- g) Genominstabilität und Mutationen
- h) Vermeidung der Immunzerstörung
- i) Deregulierung des Zellstoffwechsels
- j) Tumorvermittelte Entzündung.

1.3.1 Molekulargenetische Analysen / Treibermutationen

Wie in den „*Hallmarks of Cancer*“ beschrieben, sichern eine Aufrechterhaltung der proliferativen Signalübertragung und ein Widerstand gegen den Zelltod das Überleben der Tumorzellen. Die ursächlichen Mutationen in Tumorzellen als Grundlage dieser Zelleigenschaften werden als Treibermutationen bezeichnet.

In Tumorzellen führen verschiedene Mechanismen zur Überaktivierung der Signalübertragung. Durch Mutationen kommt es beispielsweise zu einer Überexpression und zu einer hohen Rezeptordichte und so zu einer verstärkten Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege.

In einem Großteil der NSCLC-Tumoren sind Treibermutationen in Proteinkinasen, insbesondere in Tyrosinkinasen, zu finden. Tyrosinkinasen sind eine Gruppe von Enzymen, die als assoziierter Rezeptorteil oder als Enzym an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Aktiviert durch Phosphorylierung beeinflussen sie die Proliferation und Differenzierung der Zellen. Die Tyrosinkinasen lassen sich in verschiedene Untergruppen einteilen. Es werden ungefähr 90 Tyrosinkinasen im menschlichen Genom kodiert, davon sind 58 Rezeptor-Tyrosinkinasen. Der EGFR ist eines von mehr als 20 bekannten Protoonkogenen und gehört zur Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen (RTKI) (Oxnard et al., 2013, Chevallier et al., 2021).

Die häufigste Mutation findet sich in der intrazellulären Ras-Kinase, die zweithäufigste im EGFR (König et al., 2021). Die Inzidenz von EGFR-Mutationen ist abhängig von der untersuchten Studienpopulation (Midha et al., 2015): Bei ca. 15 % der Kaukasier und knapp 50 % der Asiaten, die an einem NSCLC erkrankt sind, lässt sich eine EGFR-Mutation nachweisen (Leonetti et al., 2019). Die

Entdeckung von verschiedenen Mutationen führte zur Entwicklung von zielgerichteten Therapeutika (König et al., 2021).

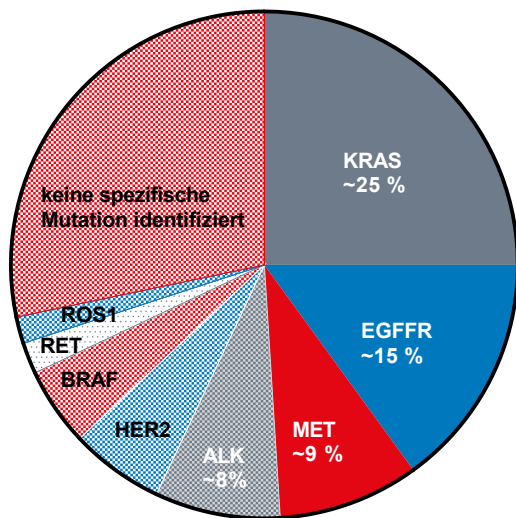


Abbildung 2: Anteile der klassischen Treibermutationen in Lungentumoren in einer kaukasischen Population (König et al., 2021, Froesch et al., 2021).

1.3.2 EGF-Rezeptor

Der EGFR gehört zu der Rezeptortyrosinkinasen Typ 1 Familie. Er wird mit 28 Exons auf Chromosom 7 kodiert. Die Bindung von EGF an den Rezeptor führt zur Dimerisierung und induziert über nachgeschaltete Kinasekaskaden die Zellproliferation (Abb. 3).

Der EGFR ist ein Transmembrannglykoprotein mit einer intrazellulären Tyrosin-kinasedomäne als Rezeptor für externe Liganden. EGFR, auch bekannt als ErbB-1, wurde als erster EGF-Rezeptor der ErbB-Familie entdeckt. Die weiteren Rezeptoren dieser Gruppe sind HER-2/neu, HER-3 und HER-4.

Die ErbB-Proteine besitzen zwei cysteinreiche Regionen in der extrazellulären Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zusammenhängende Tyrosin-kinasedomäne im zytoplasmatischen Teil.

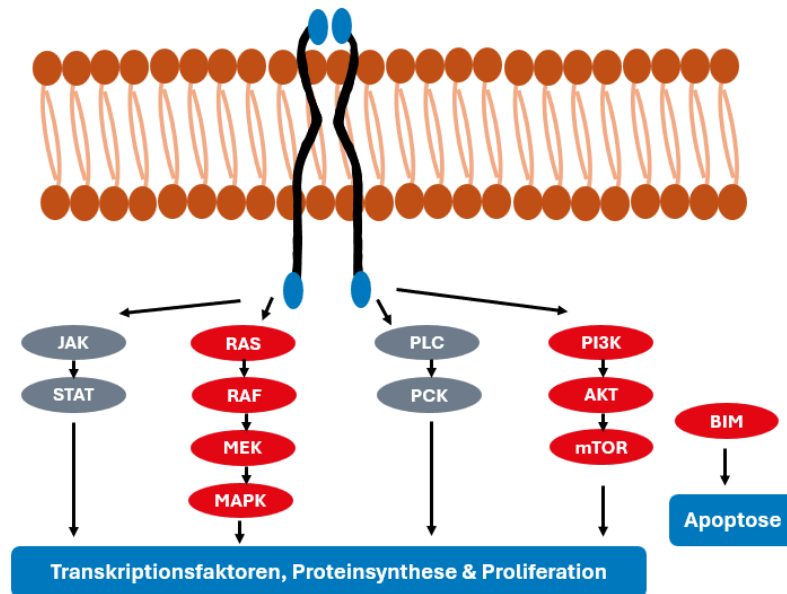


Abbildung 3: Signalwege des EGF-Rezeptors, modifiziert nach Dokala and Thakur, 2017 und Huang and Fu, 2015.

EGFR wird aktiviert durch Überexpression und durch einen Liganden-abhängigen und Liganden-unabhängigen Mechanismus. 10 verschiedene Liganden können an alle Rezeptoren binden und beeinflussen so den nachgeschalteten Signalweg.

Durch die dauerhafte Aktivität der Tyrosinkinase im EGF-Rezeptor kommt es spontan zu einer Dimerisierung der Rezeptormonomere und der Rezeptor wird aktiviert. Ein EGF bindet an zwei Rezeptormonomere gleichzeitig und aktiviert so den Rezeptor und den nachgeschalteten Signalweg. Bekannte Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie sind EGF, TGF- α , Epiregulin, Amphiregulin, Betacellulin und Neuregulin.

Der EGFR aktiviert die folgenden 4 wichtigen Signalwege (vgl. *Abbildung 3*): MAPK-Signalweg, PI3K/Akt-Signalweg, PLC1-PKC-Signalweg und JAK-STAT-Signalweg (Dokala and Thakur, 2017).

1.4 Therapien des NSCLC

In der Regel wird bei Patienten mit NSCLC ein multimodales Therapieregime verwendet. Das Tumorstadium und die molekulargenetischen Untersuchungen

sowie der Allgemeinzustand und Komorbiditäten der Patienten beeinflussen das verwendete Therapieschema.

Die medikamentösen Therapien umfassen in kurativer als auch in palliativer Absicht patientenindividuell eine (neo-) adjuvante Systemtherapie mit einer platinbasierten Chemotherapie und anderen Zytostatika. Als nichtmedikamentöse Therapien gibt es die Operation, eine Bestrahlung oder auch eine Kombination der verschiedenen Therapien, wie eine Radiochemotherapie (Powell et al., 2021).

Das medikamentöse Therapieregime beinhaltet darüber hinaus auch zielgerichtete Therapeutika und Immuntherapien, die abhängig von den vorliegenden Mutationen und anderen Tumorgegebenheiten sind. Aktuell zugelassene Medikamente für die Therapie des NSCLC sind in Tabelle 1 aufgeführt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Tabelle 1 Auswahl der aktuell in Deutschland zugelassenen Medikamente

Zytostatika	Immuntherapie	zielgerichtete Therapien (u.a. EGFR-, ALK-, MET-, BRAF- und RET-Inhibitoren)				Angiogenese-Inhibitoren
Carboplatin	Atezolizumab	Afatinib	Alectinib	Amivantamab	Crizotinib	Bevacizumab
Cisplatin	Durvalumab	Dacomitinib	Brigatinib	Capmatinib	Entrectinib	Nintedanib
Docetaxel	Ipilimumab	Erlotinib	Ceritinib	Tepotinib	Larotrectinib	Ramucirumab
Gemcitabin	Nivolumab	Gefitinib	Lorlatinib	Dabrafenib	Sotorasib	
Paclitaxel / nab-Paclitaxel	Pembrolizumab	Osimertinib		Pralsetinib	Trametinib	
Vinorelbin				Selpercatinib	Trastuzumab Deruxtecan	

1.4.1 Zielgerichtete Tumorthherapie

Fortschritte in der molekulargenetischen Forschung haben den Weg für eine zielgerichtete Tumorthherapie beim NSCL geschaffen. Neben der EGFR-Inhibition gibt es eine zielgerichtete Therapie für verschiedene Treibermutationen in anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen.

1.4.2 Tyrosinkinase-Inhibitoren

TKI blockieren proliferationsstimulierende Signale. Eingesetzt werden sie vor allem in Tumoren, in denen die Tyrosinkinase konstitutionell aktiviert ist und so zu einer unkontrollierten Proliferation führt.

1.4.3 EGFR-Inhibitoren

EGFR-TKI sind kleine Moleküle, die die enzymatische Aktivität der mutierten Rezeptorkinase hemmen und die Bindung von ATP verhindern.

Die Wirksamkeit der EGFR-TKI ist abhängig von deren pharmakologischen Eigenschaften sowie der Art der aktivierenden EGFR-Mutation (Thomson et al., 2022). In Deutschland sind EGFR-TKI verschiedener Generationen zugelassen, die spezifisch für aktivierende EGFR-Mutationen entwickelt wurden. Die EGFR-TKI setzen an unterschiedlichen Stellen am Rezeptor an (Passaro et al., 2021).

Die Tyrosinkinaseinhibitoren zeigen im Vergleich mit einer platinhaltigen Chemotherapie weniger Nebenwirkungen (Maemondo et al., 2010). Da die Therapeutika zielgerichtet wirken, erreichen sie eine hohe Ansprechrate. Diese liegt bei den TKI bei 50-90 %. Die Wirkung der TKI ist zeitnah, innerhalb von 4-6 Wochen. Jedoch ist das Auftreten von sekundären Resistenzen unvermeidlich und tritt normalerweise innerhalb von 12-24 Monaten auf (König et al., 2021).

Eine Auswahl dieser EGFR-TKI findet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2 In Deutschland zugelassene EGFR-TKI mit Handelsnamen und Zielmutation (Levantini et al., 2022)

Arzneimittel	Handelsname	Pharmaunternehmen	Generation	Ziel
Erlotinib	Tarceva	Roche	1. Generation	Ex19Del/L858R
Gefitinib	Iressa	AstraZeneca	1. Generation	Ex19Del/L858R
Afatinib	Giotrif	Boehringer Ingelheim	2. Generation	Ex19Del/L858R
Osimertinib	Tagrisso	AstraZeneca	3. Generation	Ex19Del/L858R/Ex19Del + T790M/L858R + T790M

Vereinfacht dargestellt wird folgendes Therapieschema angewendet:

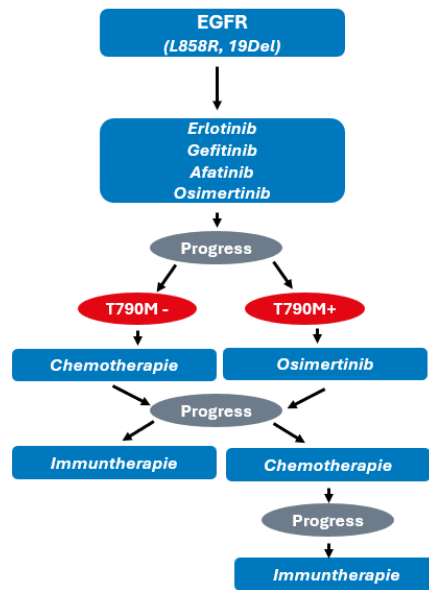


Abbildung 4: Therapieschema der EGFR-TKI (Shaurova et al., 2020).

Nur beim Vorhandensein einer Mutation in EGFR zeigen die EGFR-TKI in NSCLC einen klinischen Vorteil. In EGFR-Wildtyp NSCLC zeigt eine Therapie mit EGFR-TKI keinen klinischen Effekt auf die Tumore (Maemondo et al., 2010).

Erlotinib ist ein oraler reversibler EGFR-TKI der ersten Generation, der seit 2005 in Deutschland zugelassen ist (Shepherd et al., 2005). Zugelassen von der EMA ist ERLO zur Behandlung des fortgeschrittenen oder metastasierten NSCLC. ERLO kann in Kombination mit Gemcitabin auch beim metastasierten Pankreaskarzinom verwendet werden (Saito et al., 2019).

Gefitinib ist ein kompetitiv wirkender EGFR-TKI der ersten Generation, einzunehmen als Filmtablette. Zugelassen ist es als Monotherapie zur Behandlung von erwachsenen Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasierten NSCLC mit aktivierenden Mutationen der EGFR-Tyrosinkinase.

Da gegen die Erstgenerations EGFR-TKI eine Resistenz entsteht, wurden Zweitgenerations-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren wie Afatinib entwickelt. AFA ist ein irreversibler EGFR-TKI, auch einzunehmen als Filmtablette. AFA erhielt 2013 von der EMA die Zulassung bei erwachsenen Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC. AFA kann alle 4 Mitglieder der EGF-

Rezeptorfamilie irreversibel hemmen. Resistenz gegen AFA entwickelt sich allerdings durch Amplifikation des MET-Gens, durch die Überexpression des FGFR1-Gens oder durch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch eine aktivierende Mutation in der Kinase B-Raf.

In einer randomisierten Studie von AFA gegenüber GEFI waren das progressionsfreie Überleben länger und die Remissionsrate höher im Afatinib-Arm, die Rate der Therapieabbrüche aufgrund von Nebenwirkungen war gleich (Park et al., 2016).

Um NSCLC-Tumorzellen, die eine aktivierende Mutation T790M im EGFR-Rezeptor besitzen (siehe 1.6.2 Seite 26) und somit gegen die erste und die zweite Generation der RTK-Inhibitoren resistent sind, gezielt anzusprechen, wurde der Drittgenerations-EGFR TKI Osimertinib entwickelt. Dieser Inhibitor blockiert den T790M-aktivierten EGF-Rezeptor irreversibel, beeinflusst jedoch nicht die Aktivität der nichtmutierten Rezeptoren (Mok et al., 2016). Aufgrund der Daten der FLAURA- (Soria et al., 2018) und der ADAURA-Studie (Wu et al., 2020, Ballard et al., 2016) kam es zu Zulassungserweiterungen: In der FLAURA-Studie hat OSI in der *First-Line*-Therapie gegenüber den Erstgenerationen EGFR-TKI zu einer deutlichen Verlängerung des progressionsfreien Überlebens geführt und die Gesamtüberlebenszeit um fast 7 Monate verlängert. Der Überlebensvorteil der Patienten durch OSI war bei Vorliegen einer Ex19del Mutation ausgeprägter als bei Patienten ohne Ex19del Mutation. Bei der Therapie mit OSI zeigte sich eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zu Erstgenerationen-EGFR-TKI (Erlotinib, Gefitinib) mit einer Risikoreduktion für Tod oder Tumorprogress um mehr als die Hälfte (Ahn et al., 2018). OSI überwindet die Blut-Hirn-Schranke und kann somit auch bei Hirnmetastasen wirken (Ballard et al., 2016, Mok et al., 2016). Darüber hinaus bindet OSI selektiver bei Tumoren mit einer EGFR-Mutation als die vorher entwickelten EGFR-TKI (Soria et al., 2018). Aufgrund der besseren Verträglichkeit und Effektivität im Vergleich zu anderen EGFR-TKI hat sich OSI in der Erstlinientherapie des fortgeschrittenen NSCLCs mit EGFR-Mutation durchgesetzt (Ettinger et al., 2022).

OSI wird aufgrund seiner hohen Effektivität auch in der adjuvanten Therapie eingesetzt. OSI ist als Zweitlinientherapie der Platin-basierten Chemotherapie im Zentralnervensystem überlegen (Mok et al., 2016). In der ADAURA-Studie war das Risiko einer ZNS-Metastasierung in der OSI-Gruppe um ~90 % niedriger als in der Placebogruppe (Wu et al., 2020, Jiang et al., 2023).

In der ADAURA (NCT02511106) Studie wurden Patienten mit Stadium IB-III A NSCLC nach kompletter Tumorentfernung eingeschlossen. Die Studie ergab, dass die adjuvante Therapie mit OSI einen Vorteil gegenüber Placebo hat (Herbst et al., 2023).

In der randomisierten FLAURA-Studie (NCT02296125) konnte 2018 gezeigt werden, dass die Therapie mit OSI ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben erzielt im Vergleich zu Therapien mit anderen EGFR-TKI (Median 18,9 Monate vs. 10,2 Monate) (Soria et al., 2018). Patienten mit einer Ex19del Mutation zeigten einen deutlicheren Überlebensvorteil als Patienten ohne diese Mutation. Außerdem hatten Kaukasier einen Vorteil gegenüber Asiaten (Ramalingam et al., 2020).

GEFI als erster 2003 von der FDA zugelassener EGFR-TKI inhibiert EGFR selektiv durch eine reversible Bindung an der ATP-Bindungsstelle und der daraus resultierenden Blockierung des Signalweges (Amelia et al., 2022).

Erlotinib, ein Erstgenerations-EGFR-TKI wie Gefitinib, hat das gleiche Anilinochinazolin-Gerüst wie GEFI (Amelia et al., 2022). Das Interaktionsmuster mit der ATP-Bindungstasche ist ähnlich wie bei Gefitinib, es konkurriert um die ATP-Bindung.

AFA ist ein irreversibler EGFR-Inhibitor und bindet ähnlich wie GEFI mittels Wasserstoffbrückenbindungen in der Scharnierregion von Met793 (Amelia et al., 2022).

Mit dem 3. Generationen EGFR-TKI OSI wurde der erste EGFR-TKI mit einem Nicht-Chinazolin-Kern zugelassen. Es ist spezifisch für die T790M Mutation zugelassen und zeigt besonders in EGFR-Wildtypen weniger Aktivität.

1.5 EGFR-Mutationen

Der EGFR wird häufig auch in Blasen Tumoren, Glioblastomen und Ovarialkarzinomen (Xu et al., 2017) überexprimiert. Im NSCLC liegen vorwiegend aktivierende Mutationen vor. Eine EGFR-aktivierende Mutation kommt bei Nichtrauchern mit Lungenkrebs häufiger vor als bei Rauchern (Lee et al., 2011, Grosse et al., 2019).

Die EGFR-Mutationen, die zu Beginn der Therapie bestehen, lassen sich in 3 Kategorien einordnen. Die gewöhnliche EGFR L858R und Exon 19 Deletion, die *uncommon* EGFR-aktivierenden Mutationen (bspw. G719X, L861Q, S7681) und die EGFR-Exon 20 Insertionen (Rotow et al., 2023).

Die Einschränkung des progressionsfreien Überlebens unter einer Therapie mit EGFR-TKI kommt durch die Entstehung von erworbenen Mutationen gegen EGFR-TKI (Suda et al., 2012) (Sankar et al., 2020, Criscione et al., 2022). Bei einem Fortschreiten der Tumorerkrankung unter EGFR-TKI-Behandlung und des Verdachts auf eine Resistenzentwicklung sollte daher eine erneute Gewebsbiopsie oder eine *Liquid Biopsy* untersucht werden.

Im Folgenden werden die typischen primär vorhandenen und erworbenen EGFR-Mutationen vorgestellt.

Fast 90 % der aktivierenden EGFR-Mutationen in NSCLC sind *In-Frame* Deletionen in Exon 19 oder eine Punktmutation in Exon 21 (L858R). Seltener liegen Insertionen in Exon 20 und Punktmutationen in Exon 18 vor (Tumbrink et al., 2021).

Eine weitere klassische Mutation ist die T790M Mutation, die sich im Therapieverlauf entwickelt. Eine häufige Resistenzentwicklung unter OSI zeigt sich durch eine c-MET-Amplifikation und durch die EGFR C797S Mutation. Weitere Mutationen sind die HER2 Amplifikation, die PIK3CA und die Ras-Mutationen (Chmielecki et al., 2023).

Tabelle 3 Übersicht über die häufigen on-target EGFR-Mutationen

Mutation	Bemerkung
Exon 19 Deletion	Ideal für EGFR-TKI Therapie
L858R	Ideal für EGFR-TKI Therapie
Exon 20 Insertion	Ideal für EGFR-TKI Therapie
T790M	Erworben nach Therapie mit 1. oder 2. Generation EGFR-TKI
C797S	Erworben nach Therapie mit 3. Generation EGFR-TKI

1.5.1 Exon 19 Deletion

Die Ex19del ist die häufigste aktivierende EGFR-Mutation, die bereits zu Beginn der Therapie besteht. Bei Patienten mit dieser Mutation konnte man die längste Remissionsdauer und eine längere Überlebenszeit bei der Therapie mit EGFR-TKI beobachten (Tumbrink et al., 2021).

1.5.2 L858R Mutation

Eine L858R Mutation in Exon 21 ist die zweithäufigste aktivierende EGFR-Mutation. Bei dieser Mutation eingesetzte EGFR-TKI-Therapien zeigen eine Remissionsrate von 40-70 % und führen zur signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gegenüber einer platinhaltigen Chemotherapie. AFA führte jedoch in der Zulassungsstudie nicht zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur Chemotherapie (LUX-Lung 3) (Yang et al., 2015).

1.5.3 Exon 20 Insertion

Exon 20 Insertionen sind nach den beiden klassischen Treibermutationen die dritthäufigsten EGFR-Mutationen (Russo et al., 2019). Diese Mutation wurde früher als EGFR-TKI-resistent angesehen, durch die Weiterentwicklung der EGFR-TKI ist dies heute nicht mehr der Fall. Jedoch liegt die Ansprechrate der Erst- und Zweitgenerations-EGFR-TKI bei nur <15 %, das mittlere progressionsfreie Überleben liegt bei lediglich 2-3 Monaten (Russo et al., 2019). Inzwischen wurden jedoch Zweit- und Drittgenerations-EGFR-TKI entwickelt, die bei dieser Mutation wirksam sind. Exon 20 Insertionen finden sich bei bis zu 12 % der Patienten mit EGFR-Mutation (Riess et al., 2018).

1.5.4 Atypische / Uncommon Mutations

Die atypischen Mutationen, auch *uncommon mutations* genannt, sind EGFR-Mutationen, die in EGFR-TKI-sensitive und -resistente Mutationen unterschieden werden. Es ist eine sehr heterogene Gruppe (Robichaux et al., 2021). Ungefähr 20-25 % der EGFR-Mutationen in NSCLC fallen in diese Kategorie (Cho et al., 2020). Bei der Behandlung dieser Mutationen ist zu beachten, dass die EMA die zugelassenen EGFR-TKI nur für „aktivierende EGFR-Mutationen“ zugelassen hat.

1.6 Erworbene EGFR-Mutationen unter EGFR-TKI-Therapie

Für die erworbene Resistenz der EGFR-mutierten NSCLC Tumore werden die folgenden drei Resistenzmechanismen beschrieben, die auch simultan vorliegen können (Tulchinsky et al., 2019):

- a) Aktivierung alternativer Signalwege unter Umgehung des EGFR-Signalweges
- b) Zusätzliche Mutationen im EGFR-Gen
- c) Phänotypische Metaplasien
 - a. Mesenchymale Merkmale (EMT)
 - b. Weiterentwicklung zum SCLC (Sequist et al., 2011).

Trotz eines guten Ansprechens der Tumoren auf EGFR-TKI kommt es in der Mehrheit der Patienten nach einem progressionsfreien Überleben von 9-13 Monaten zu einem Fortschreiten des Tumors (Mok et al., 2016). In der großen Mehrheit der Patienten mit EGFR-TKI-Behandlung entwickelt sich eine Resistenz gegen die EGFR-TKI, was die Therapieoptionen drastisch einschränkt (Kobayashi et al., 2005, Kobayashi and Tan, 2023). Dabei entwickeln die Patienten eine oder mehrere Mutationen. Mögliche Mutationen sind eine T790M Mutation, eine MET-Amplifikation, eine Überexpression von HGF, eine C797S-Mutation oder andere Mutationen (Ma et al., 2011, Chmielecki et al., 2023).

Erworbene Resistanz nach Osimertinib first line Gabe

Erworbene Resistanz nach Osimertinib second line Gabe

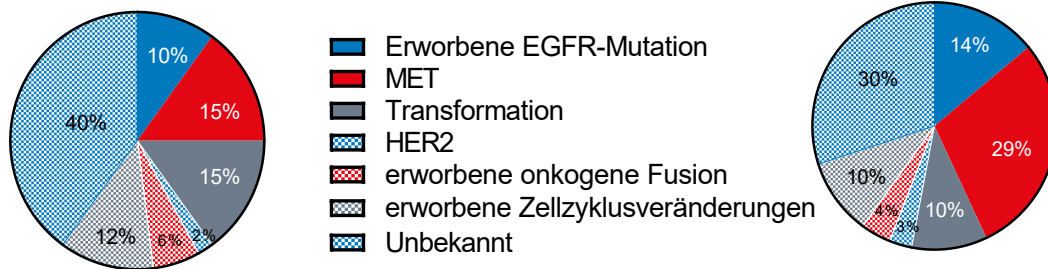


Abbildung 5: Häufigkeit der erworbenen Mutationen nach Therapie mit OSI in der Erst- und Zweitlinie (Sun et al., 2022).

Man unterscheidet eine *on-target* von einer *off-target*-Resistenz. ERLO und GEFI sind kompetitive TKI des EGF-Rezeptors. Sie wirken unabhängig vom Expressionslevel des EGFR. Resistenz gegen diese beiden Erstgeneration-TKI entsteht durch Mutationen in der ATP-Bindungsstasche, die zu einer geringeren Affinität von ERLO und von GEFI führen. Weitere Resistenzmechanismen sind aktivierende Mutationen im Ras-Gen im nachgeschalteten Signalweg und inaktivierende Mutationen in PTEN. Darüber hinaus kann die Wirkung von ERLO und GEFI durch hohe ATP-Konzentrationen aufgehoben werden.

1.6.1 TKI-sensitive, atypische EGFR-Mutationen

1.6.2 T790M-Mutation

Die T790M Mutation findet sich in Exon 20. Vor einer Therapie mit einem EGFR-TKI zeigen nur 0-3 % der Patienten mit einer EGFR-Mutation diese Mutation. Es gibt Hinweise, dass diese Mutation bereits in einer niedrigeren Frequenz vor der EGFR-TKI-Gabe im Tumor vorhanden ist, jedoch unter dem Selektionsdruck der EGFR-TKI diese Mutation vorherrschend wird (Su et al., 2012). In bis zu 60 % der Fälle tritt diese Resistenz bei der Therapie mit einem Erst- oder Zweitgenerations-EGFR-TKI auf (Ramalingam et al., 2020, Kobayashi et al., 2005).

OSI wurde genau für diese Mutation entwickelt und soll als Therapie bei dieser Mutation angewendet werden. Die Remissionsrate liegt bei 65-70 %, das progressionsfreie Überleben bei 9-11 Monaten. Kommt es unter der Therapie mit OSI zum Progress oder spricht die Therapie von Beginn nicht an, wird nach

Ausschluss zielgerichteter behandelbarer Resistenzmechanismen eine platinbasierte Chemotherapie als Therapie der Wahl empfohlen. Deswegen ist es wichtig, dass bei einem Progress unter EGFR-TKI-Therapie der Tumor erneut molekular-genetisch untersucht wird, um behandelbare Resistenzmechanismen zu finden.

In ca. 60 % dieser Patienten findet man dann eine sekundäre Punktmutation, mit einem Austausch von Methionin anstelle von Threonin an Position 790 der Kinase-Domäne (Kobayashi et al., 2005, Balak et al., 2006, Gazdar, 2009). Diese Mutation wurde unabhängig vom ethnischen Hintergrund entdeckt (Mok et al., 2016). Diese Mutation hat zur Folge, dass die Bindung von Erst- und Zweitgenerations-EGFR-TKI an die ATP-Bindungstasche am EGF-Rezeptor reduziert wird. Dadurch können die EGFR-TKI nur vermindert die nachgeschaltete Signalkaskade inhibieren und es ist ein Progress der Erkrankung möglich.

Beide Erstgenerations-TKI interagieren mit der T790M-„Gatekeeper“-Mutation, die durch seine Position und Größe, durch ATP und durch andere Moleküle den Zugang zur inneren hydrophoben Tasche hindert. Kommt es am Gatekeeper-Rest Tyr790 zu einem Austausch des kleineren Threonins zum größeren Methionin auf Exon 20, führt dies zu einer Konformationsänderung und allosterischen Hemmung. Darüber hinaus kann es auch zur erhöhten Affinität für ATP führen. Die T790M-Mutation zeigt eine erhöhte ATP-Affinität zur Bindungstasche und es kommt so zur Konkurrenz von EGFR-TKI und ATP. Sowohl Erst- als auch Zweitgenerations-EGFR-TKI können nicht mehr so effektiv an der Bindungstasche binden (Amelia et al., 2022, Huang et al., 2020) (Lim et al., 2018). Bis zu 60 % der Resistenzen gegen Erst- und Zweitgenerationen EGFR-TKI sind aufgrund einer T790M Mutation bedingt (Ramalingam et al., 2020, Kobayashi et al., 2005).

Es gibt noch weitere Mutationen wie L747S (Costa et al., 2008), D761Y (Balak et al., 2006) und T854A (Bean et al., 2008), bei denen eine Entstehung unter einer Therapie mit ERLO oder GEFI beschrieben wurde. Diese Mutationen sind jedoch selten.

1.6.3 C797S Mutation

Nachdem die Patienten OSI in der Erstlinientherapie erhalten, tritt die C797S Mutation als zweithäufigste Mutation nach der MET-Amplifikation auf (Leonetti et al.,

2019). Wenn die Patienten mit einem Erst- oder Zweitgenerations EGFR-TKI vorbehandelt wurden und anschließend eine Therapie mit OSI angeschlossen wurde, tritt die C797S Mutation mit am häufigsten auf (Chmielecki et al., 2023). Mit diesen Resistenzen (Ex19del/T790M/C797S und L858R/T790M/C797S) ist der Tumor auch resistent gegen EGFR-TKI der ersten Generation (Duggirala et al., 2022).

Es scheint auch ein Zusammenhang mit der Therapiedauer zu bestehen: Patienten, die nach kürzerer Zeit einen Progress haben, haben eher eine MET-Amplifikation und die Patienten, die erfolgreich länger mit OSI behandelt werden können, weisen eher eine C797S Mutation als Resistenzmechanismus auf (Chmielecki et al., 2023).

Es befinden sich EGFR-Inhibitoren der vierten Generation in der Entwicklung, wie beispielsweise BLU-945, die sich spezifisch gegen eine T790M- und C797S-EGFR-Mutation richten (Schalm et al., 2020, Lim et al., 2024).

1.7 Off-Target erworbene Mutationen unter EGFR-TKI-Therapie

1.7.1 EMT

Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist die reversible Differenzierung von polarisierten epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen. In der Onkologie spielt dies im Rahmen der Tumorzellplastizität eine große Rolle und ist ein weitverbreiteter Resistenzmechanismus gegen konventionelle und zielgerichtete Therapien. Eine Umwandlung zum mesenchymalen Phänotyp geht mit einer Reorganisation des gesamten Signalnetzwerkes einher.

In NSCLC ist EMT beschrieben worden (Ramirez et al., 2016). Durch die selektive Therapie werden die meisten EGFR-mutierten, aber EGFR-TKI-sensiblen, Zellen eliminiert und gehen in Apoptose. Durch die Therapie erfahren die Zellen, die eine Resistenz gegen die Medikamente entwickeln, einen Selektionsdruck. Ein geringer Anteil an Zellen, die die Therapie überleben, durchläuft eine genetische Evolution und wird schließlich zu resistenten Klonen (Tulchinsky et al., 2019). EMT ist im Gegensatz zu Punktmutationen in Exon 20 (wie T790M) sehr selten (Ramirez et al., 2016).

Durch eine Anwendung von weiteren Therapeutika wie Bruton-Tyrosinkinase Inhibitoren (Yeh et al., 2021) oder dem AURKA-Inhibitor Alisertib (Wang et al., 2021) konnten die Zellen wieder für eine EGFR-TKI Behandlung sensibel gemacht werden (Sun et al., 2022).

1.7.2 Umwandlung zu SCLC

In Studienkollektiven zeigten 3-14 % der Patienten, die eine Resistenz gegen EGFR-TKI zeigten, eine morphologische Umwandlung zu SCLC (Yu et al., 2013, Marcoux et al., 2019). Bei dieser Umwandlung zeigte sich eine persistierende EGFR-Aktivierung, jedoch bei einer verminderten EGFR-Expression (Niederst et al., 2015b). Es wird ein Zusammenhang von der Umwandlung und einer Inaktivierung von TP53, welche typischerweise in SCLC mutiert ist, beschrieben (Offin et al., 2019a, Shaurova et al., 2020).

Shaurova et al. diskutierten die Situation, dass ein Tumor sehr heterogen ist und insofern Zellen, die der EMT unterliegen und Zellen, die zu SCLC transformieren, gleichzeitig vorliegen können und diese Zellen auch ähnliche epigenetische Alterationen zeigen (Shaurova et al., 2020).

1.7.3 Umwandlung zu Plattenepithelkarzinom

Die Transformation von EGFR-mutierten NSCLC zu einem Plattenepithelkarzinom ist beschrieben und es findet sich dabei eine Assoziation mit der T790M Mutation. Diese Transformation ist selten, als Mechanismus wird eine Änderung im PI3K/AKT/mTOR Signalweg, während der EGFR-TKI-Therapie, vermutet (Park et al., 2019).

1.7.4 Andere Signalwege

1.7.4.1 c-MET

c-MET ist wie EGFR eine Rezeptor-Tyrosinkinase. c-MET wird in vielen soliden Tumoren exprimiert (Organ and Tsao, 2011) und spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation, dem Überleben und der Invasion der Krebszellen.

MET-Gen-Amplifikationen stellen einen häufigen Resistenzmechanismus gegen EGFR-TKI dar (Chabon et al., 2016). Durch die enge Beziehung von EGFR zu MET kommt es bei einer MET-Amplifikation auch zur Aktivierung von

Signalwegen, die der EGFR-Aktivierung nachgeschaltet sind. Beispielsweise wird der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt vermittelte Signalweg, unabhängig von der EGFR-Aktivierung, aktiviert (Leonetti et al., 2019). Es wird diskutiert, ob eine MET-Amplifikation auch eine intrinsische Resistenz gegenüber OSI vermittelt (Ortiz-Cuaran et al., 2016).

Li et al. konnten zeigen, dass die Proteasominhibition ein Ansatz ist, um die c-Met-Expression in einigen NSCLC-Zelllinie zu reduzieren und einen vermehrten Zelltod zu induzieren (Li et al., 2020). Die EGFR-WT-Zelllinie H1299 zeigte unter der Behandlung mit Bortezomib niedrigere Expressionslevel von c-MET. Dagegen zeigte sich in der A549-EGFR-WT-Zelllinie keine Verminderung der c-MET-Expression. Eine erhöhte Kopienzahl des MET-Gens ist nicht gleichbedeutend mit einer MET-Amplifikation. Die MET-Amplifikation ist eine Folge der EGFR-TKI-Resistenz bei NSCLC-Patienten (Lai et al., 2019).

Durch Überlappungen („*Cross-Communication*“) des MET- und des EGFR-Signalwegs wird eine Möglichkeit der Resistenzüberwindung in einer Kombination aus EGFR-TKI und MET-TKI gesehen (Bergström et al., 2000, Sun et al., 2022, Dong et al., 2022).

1.8 Tumorsuppressor p53

Der Transkriptionsfaktor p53 ist ein wichtiger Tumorsuppressor (Lane, 1992). Das menschliche Gen, das für p53 codiert, wird als TP53 bezeichnet. Es ist das häufigste mutierte Tumorsuppressorgen und liegt in circa 45-70 % aller NSCLC-Adenokarzinome in seiner mutierten Form vor (Liu et al., 2017). Die Konzentration des Genprodukts ist in vielen Tumoren mit TP53-Mutation erhöht, da das Genprodukt eine verlängerte Halbwertszeit besitzt. Eine TP53-Mutation zeigt sich vor allem bei Rauchern (Liu et al., 2017). EGFR-mutierte NSCLC mit TP53-Mutationen sprachen schlechter auf eine Therapie mit EGFR-TKI an und zeigten eine schlechtere Prognose als EGFR-mutierte-NSCLC-Tumoren mit TP53-WT (Bennett et al., 1999, Canale et al., 2017). Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (H1299, HCC827, HCC4006, H1650) besitzen eine TP53-Mutation, eine Ausnahme bildet die A549-Zelllinie.

In Lungenkarzinomen dominiert eine G:C- zu T:A-Transversion. Diese Transversionen treten in der Regel nach Karzinogenexposition auf. Durch die spezifischen Mutationen können Rückschlüsse auf die Karzinogene gezogen werden.

Liegt p53 aktiviert, d.h. phosphoryliert, vor, fungiert es als Transkriptionsfaktor, der die Expression von verschiedenen proapoptotischen Proteinen wie BAX und NOXA fördert (Essmann et al., 2005). Es hemmt die BCL2-Expression und aktiviert die Expression der Gene PMAIP1 (NOXA) und BAX (Vousden and Lane, 2007).

P53 bindet an BCL-2-Proteine und beeinflusst dadurch MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*) (Green and Kroemer, 2009, Vaseva et al., 2012).

1.9 Apoptose und Zelltod

Apoptose ist der programmierte, kontrollierte und stufenweise Zelltod einer Zelle, die schädlich für den Organismus ist oder nicht mehr benötigt wird und daher entfernt werden soll, mit möglichst geringem Schaden im umliegenden Gewebe (Elmore, 2007, Kroemer and Reed, 2000, Xu et al., 2019). Demgegenüber steht die Nekrose als unkontrollierter Zelltodmechanismus.

Bei der Nekrose führt die unkontrollierte Zerstörung der Zelle, das Anschwellen, das Platzen und die inflammatorische Reaktion auf intrazelluläre Bestandteile zu Schäden im umliegenden Gewebe. Dies ist eine pathologische Reaktion. Dagegen tritt die Apoptose auch physiologisch permanent auf. Eine Unterscheidung zwischen apoptotischen Zellen und nekrotischen Zellen ist u.a. mittels Mikroskopie möglich.

Bei der Apoptose stirbt die Zelle kontrolliert und stufenweise. Angestoßen wird die Apoptose in An- bzw. Abwesenheit von externen oder internen Signalen.

Die Apoptose lässt sich in 4 Phasen gliedern

- Initiation
- Exekution
- Phagozytose der Vesikel durch umliegende Zellen und Makrophagen
- Abbau der Vesikel.

Die Zelle schrumpft zu Beginn der Apoptose und Regionen der Zellmembran stülpen sich aus und bilden „*Apoptotic Blebs*“. Zeitgleich schrumpft auch der Zellkern, Pyknose genannt und die genomische DNA wird abgebaut. Danach zerfällt die ganze Zelle in einzelne Vesikel, die sogenannten „*Apoptotic Bodies*“ (Galluzzi et al., 2007). Diese apoptotischen Vesikel mit intakten und stoffwechselaktiven Organellen bleiben intakt, bis sie von Makrophagen eliminiert werden. Während dieses Abbauprozesses laufen Transkription, ATP-Produktion und die Proteinsynthese weiter.

Man unterscheidet den intrinsischen und extrinsischen Apoptoseweg. Beide Wege sind jedoch nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich auch gegenseitig.

Im Folgenden wird genauer auf die Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen Apoptosesignalweges eingegangen.

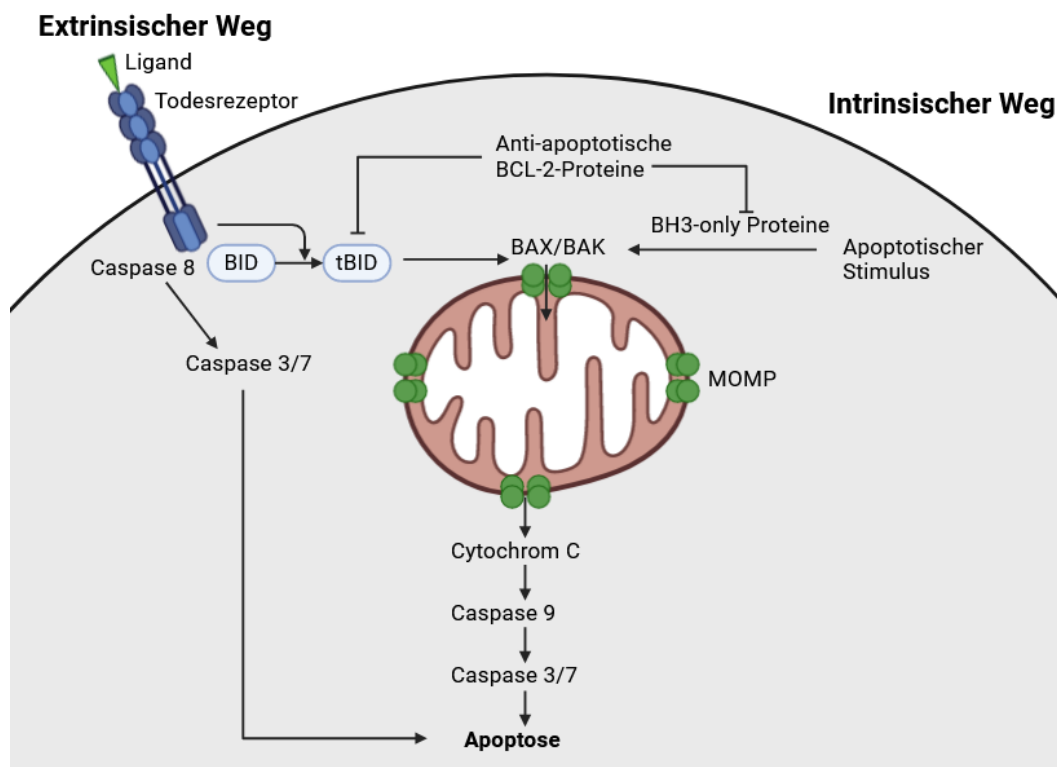


Abbildung 6: Apoptose Signalweg, modifiziert nach Bock and Tait, 2020. Apoptotische Stimuli sind u.a. DNA-Schäden, Wachstumsfaktorentzug und osmotischer Stress. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

1.9.1 Extrinsicischer Apoptose-Signalweg

Für den extrinsischen Apoptose-Signalweg gibt es zwei Aktivierungswege.

Zum einen vermittelt eine zytotoxische T-Zelle oder eine natürliche Killer-Zellen die Anheftung der Protease Granzym B an die Außenseite der Zielzelle. Granzym B wird durch Perforin unterstützt aufgenommen und spaltet eine Caspase, die Exekutionscaspase Caspase 3.

Caspasen sind Cysteinproteasen, die spezifisch Peptidbindungen schneiden. Sie werden als inaktive Proenzyme synthetisiert (Procaspasen). Es sind 14 Caspasen bekannt, die folgendermaßen eingeteilt werden: Die Initiationscaspasen (Caspase 2, 8, 9, 10), die autokatalytisch aktiviert werden, die Exekutionscaspasen (Caspase 3, 6, 7), die von den Initiationscaspasen gespalten und so aktiviert werden (Shi, 2002) und die Entzündungscaspasen, wie z.B. ICE (*Interleukin converting enzyme*) (Van Opdenbosch and Lamkanfi, 2019). Die zweite Möglichkeit besteht in der Aktivierung von Todesrezeptoren durch extrazelluläre Liganden wie TNF- α , Fas-Ligand CD95 L, TNF-Ligand 1 (TLA) und TRAIL (Apo2-L, *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), die nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip binden (Elmore 2007; Locksley et al. 2001).

Die an der Ligandenbindung beteiligten Todesrezeptoren sind membranständig und besitzen selbst keine intrazelluläre katalytische Aktivität. Eine funktionelle intrazelluläre Domäne, die „Death-Domäne“, ist jedoch vorhanden. Werden die Liganden gebunden, führt das zur Rezeptorclustering: Die zytoplasmatischen Domänen der einzelnen Monomere nähern sich an und dies führt zur Dissoziation der *Silencer of Death Domains* (Inhibitorprotein BAG-4). Das Adapterprotein TRADD (*tumor necrosis factor alpha receptor 1 associated death domain*) kann so an der „Death-Domäne“ binden und weiterführende Signalwege aktivieren, wie die Caspasen-Kaskade. Die aktive Caspase-8 aktiviert die Exekutivcaspasen und setzt so die weitere Apoptose fort (Fulda and Debatin, 2006, Elmore, 2007).

Durch das BH3-only Protein BID kommt es durch eine Aktivierung des extrinsischen Signalwegs über eine vermehrte BAX- und BAK-Aktivierung auch zu einer Aktivierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs. Dies führt zu einer Induktion von MOMP (Flores-Romero et al., 2023, Bock and Tait, 2020).

1.9.2 Intrinsischer Apoptose-Signalweg

Durch intrazelluläre Schäden wie bspw. DNA-Schäden, osmotischer Stress oder den Entzug von Wachstumsfaktoren (Elmore 2007) wird das Protein p53 aktiviert und so der intrinsische Weg der Apoptose ausgelöst.

Anti-apoptotische BCL-2-Proteine verhindern die Bildung von Homodimeren der Proteine BAX und BAK. Fehlt BCL-2, bilden BAX/BAX- und BAK/BAK-Dimere Poren in die äußere Mitochondrienmembran, was als MOMP bezeichnet wird (Saelens et al., 2004). Die Bildung des MOMP gilt als der „*point of no return*“ in der Apoptose, wodurch die Zelle unweigerlich in den apoptotischen Zelltod geht (Carneiro and El-Deiry, 2020, Leber et al., 2007, Fulda and Debatin, 2006).

Durch die Porenbildung kommt es zur Freisetzung proapoptotischer Proteine, insbesondere Cytochrom C, von Protonen und von Ca^{2+} Ionen. Smac/DIABLO (*second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI*) tritt aus dem Intermembranraum in das Zytosol aus (Flores-Romero et al., 2023). Dadurch bricht der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran zusammen. Im Zytosol initiiert Cytochrom c die Bildung eines Komplexes mit dem Protein Apaf-1 (*Apoptosis activating factor-1*). Durch diese Bindung kommt es zur Konformationsänderung von Apaf-1 und dessen *Caspase recruiting Domain* (CARD) bindet an der Pro-Caspase-9 im Apoptosom und die Pro-Caspase 9 wird autokatalytisch gespalten. Die so aktivierte Caspase 9 spaltet und aktiviert die Exekutionscaspasen-3, -6 und -7 und die Exekutionsphase der Zelle beginnt (Chinnaiyan, 1999).

Die mitochondrial vermittelte Apoptose wird streng durch komplexe Interaktionen der pro- und anti-apoptotischen Faktoren der BCL-2-Proteinfamilie reguliert (Galluzzi et al., 2007, Pistritto et al., 2016). Für dieses Zusammenspiel sind die BH3-only Proteine zentral (Lomonosova and Chinnadurai, 2008).

1.9.3 BCL-2-Proteinfamilie

Die BCL-2-Proteinfamilie ist eine Gruppe von Proteinen, die eine oder mehrere BCL-2-Domänen besitzen und die Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium kontrollieren.

Die >15 Proteine der BCL-2-Proteinfamilie lassen sich in 3 Untergruppen einteilen. Diese unterscheiden sich in ihrer Funktion als pro- oder als anti-apoptotisch (Pistritto et al., 2016, Pedley and Gilmore, 2016).

Die Regulation der Apoptose erfolgt über Interaktion, auch „*sibling rivalry*“ genannt. Die Homologie der BCL-2 Proteine lässt sich auf das Vorhandensein mindestens einer von vier verschiedenen BCL-2-Homologie-Domänen zurückführen (Youle und Strasser 2008). Während die pro-apoptotischen Proteine Multidomänen besitzen (BH1-4-Domänen), besitzen die pro-apoptotischen BH3-only Proteine nur die BH3-Domäne (vgl. *Abbildung 7*).

Die BH3-only Proteine reagieren auf apoptotische Stimuli, die anti-apoptotischen Proteine verhindern den Zelltod und die pro-apoptotischen Proteine sind verantwortlich für die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran (Moldoveanu and Czabotar, 2020). Insbesondere BAX und BAK und, etwas geringer, BOK und BID vermitteln MOMP (Flores-Romero et al., 2023, Kaloni et al., 2023).

Tabelle 4 Übersicht über die BCL-2-Proteinfamilie

Antiapoptotische BCL-2-Proteine	Proapoptotische BCL-2-Proteine	BH3-only Proteine
BCL-2	BAX	BAD
BCL-xL	BAK	BID
BCL-w	BOK	BIK
MCL-1		BIM
		BMF
		HKR
		NOXA/Pmaip1
		PUMA/BBC3

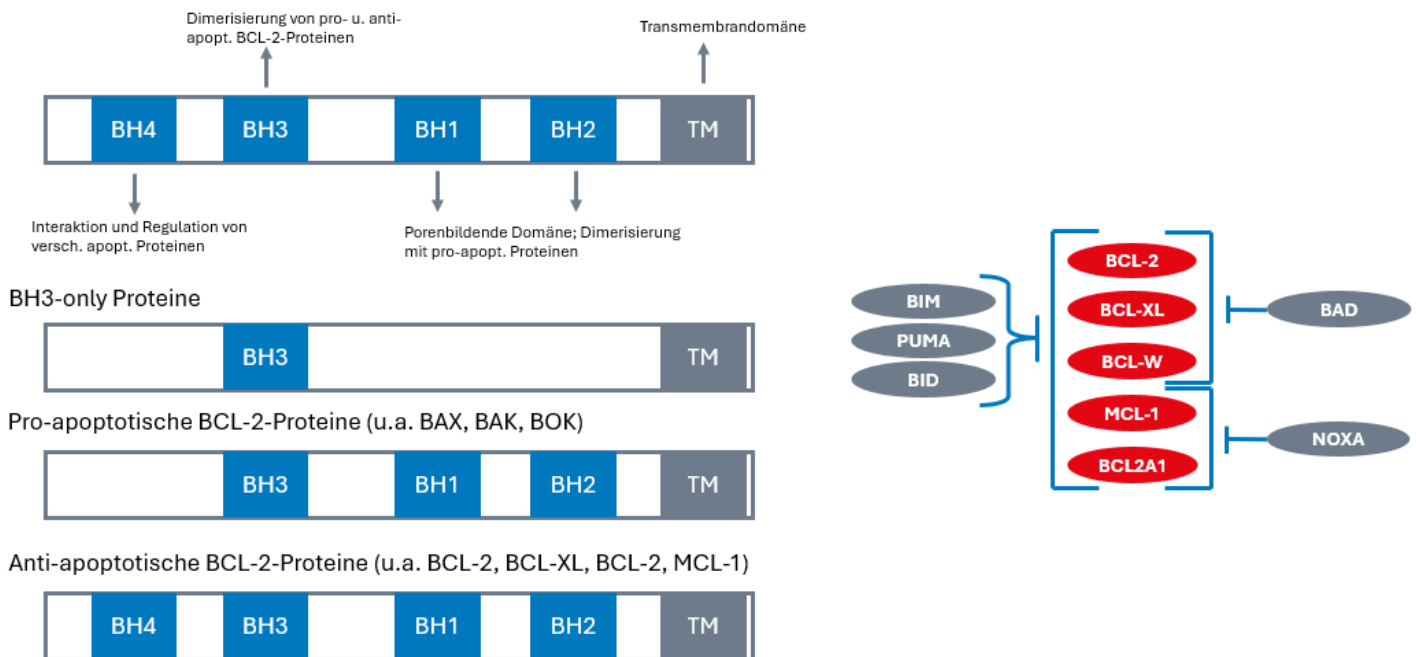


Abbildung 7: BCL-2-Proteinfamilie, modifiziert nach Bock and Tait, 2020 und Czabotar and Garcia-Saez, 2023.

Entscheidend für die Funktion der BCL-2-Proteine sind die BH-Domänen. Das Zusammenspiel der 3 verschiedenen Subgruppen der BCL-2-Proteine kann man sich als eine Art „Todesdreieck“ vorstellen: In einer Ecke stehen die pro-apoptischen Proteine, in der anderen Ecke die anti-apoptischen Proteine und in der dritten Ecke finden sich die indirekten und direkten Aktivatoren der BH3-only Proteine. Alle 3 Subgruppen interagieren miteinander. Bei Zellstress werden die BH3-only Proteine induziert oder aktiviert und inaktivieren die anti-apoptischen BCL-2-Proteine (Kehr and Vogler, 2021). Von entscheidender Bedeutung für die Vermittlung der Balance zwischen der Aktivität der anti-apoptischen BCL-2-Proteine und der proapoptischen Proteine ist die BCL-2-Homologen Domäne 3 (Sora and Papaleo, 2022, Dewson et al., 2012).

Betrachtet man die einzelnen Mitglieder BCL-2-Familie genauer, liegt BAK inaktiv im Zytosol vor und wird durch andere Mitglieder der BCL-2-Familie aktiviert. BAX kann durch alle anti-apoptischen Proteine der BCL-2-Familie in seiner Wirkung eingeschränkt werden, vor allem durch BCL2-2, BCL-xL und BCL-w (Czabotar and Garcia-Saez, 2023). Dagegen bindet BAK vor allem MCL-1 und BCL-xL,

nicht jedoch BCL-2. Bei apoptotischen Signalen werden BH3-only Proteine (wie NOXA) aktiviert und binden an MCL-1 und an BCL-xL. Dadurch wird BAK verdrängt und der Zelltod ausgelöst (King et al., 2022).

Im Signalweg finden sich anti-apoptotische BCL-2-Proteine, die durch zellulären Stress induziert werden und als „*Sensitizer*“ wirken. Werden sie gehemmt, induzieren BH3-only Proteine indirekt die intrinsische Apoptose (Gupta et al., 2021). Die letzte Untergruppe der BCL-2-Proteinfamilie wird induziert, die pro-apoptotischen Multidomänen-Proteine BAX, BAK und BOK, die auch als BH3-only-Aktivatoren bezeichnet werden (Goldar et al., 2015). Die Aktivierung von BAX, BAK und BOK führt zu einer Konformationsänderung und es kommt zu einer Homooligomerisierung der Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran. Dieser Prozess führt zur Porenbildung (MOMP) und Cytochrom C wird freigesetzt. Dies aktiviert im Zytosol wiederum die Caspasen (vgl. 1.9.2 S. 34).

Ein Überlebensmechanismus der Tumorzellen ist eine erhöhte Konzentration der anti-apoptotischen Proteine. Beispielsweise sind in soliden Tumoren häufiger MCL-1 und BCL-xL überexprimiert (Kehr and Vogler, 2021).

Die Rolle von BOK wird kontrovers diskutiert. Die Apoptoseinduktion durch BOK wird von MCL-1 gehemmt (Stehle et al., 2018). BOK kann unabhängig von anderen BCL-2-Proteinen aktiviert werden (Llambi et al., 2016).

Die Retrotranslokation der anti-apoptotischen BCL-2-Proteine BAK und BAX aus dem Mitochondrium ins Zytosol verhindert die Porenbildung der MOMP (Edlich et al., 2011, Sora and Papaleo, 2022).

1.9.3.1 BH3-only Proteine

BH3-only Proteine binden anti-apoptotische Proteine der BCL-2-Familie und verhindern so eine Sequestrierung der pro-apoptotischen Effektor-BCL-2-Proteine (Huang and Strasser, 2000).

Sie wirken zum einen über eine Konformationsänderung, die wiederum zur Freilegung der BH3 Domäne führt und so die MOMP-Poren entstehen lassen. Ein anderer Weg ist eine direkte Interaktion mit den pro-apoptotischen BCL-2-Proteinen. Nach diesem Modell gelten die BH3-only Proteine als „*Aktivator*“ bzw.

„Sensitizer“ und können anti-apoptotische Proteine sequestrieren (Du et al., 2011, Czabotar and Garcia-Saez, 2023).

1.9.3.1 Das BH3-only Protein NOXA (PMAIP1)

Das BH3-only Protein NOXA ist an einer Vielzahl von apoptotischen Signalwegen, TP53-abhängig und TP53-unabhängig, beteiligt (Morsi et al., 2018). NOXA spielt eine Schlüsselrolle bei der Reaktion der Zellen auf Stress und Schäden. Die pro-apoptotischen BCL-2-Proteine BIM, BID und PUMA binden an alle anti-apoptotischen BCL-2-Familienmitglieder. NOXA ist der einzig selektive Antagonist der BH3-only-Untergruppe. Es bindet das anti-apoptotisch wirkende MCL-1 und A1 (Chen et al., 2005) und bewirkt so eine Induktion des Zelltodes (Haschka et al., 2015).

NOXA wird zum einen über p53 induziert, zum anderen kann NOXA auch unabhängig von p53 die Apoptose induzieren (Qin et al., 2004, Albert et al., 2014). Dabei wird die NOXA-Induktion über ATF3 und ATF4 reguliert (Sharma et al., 2018, Weller et al., 2022) (siehe *Abbildung 8*).

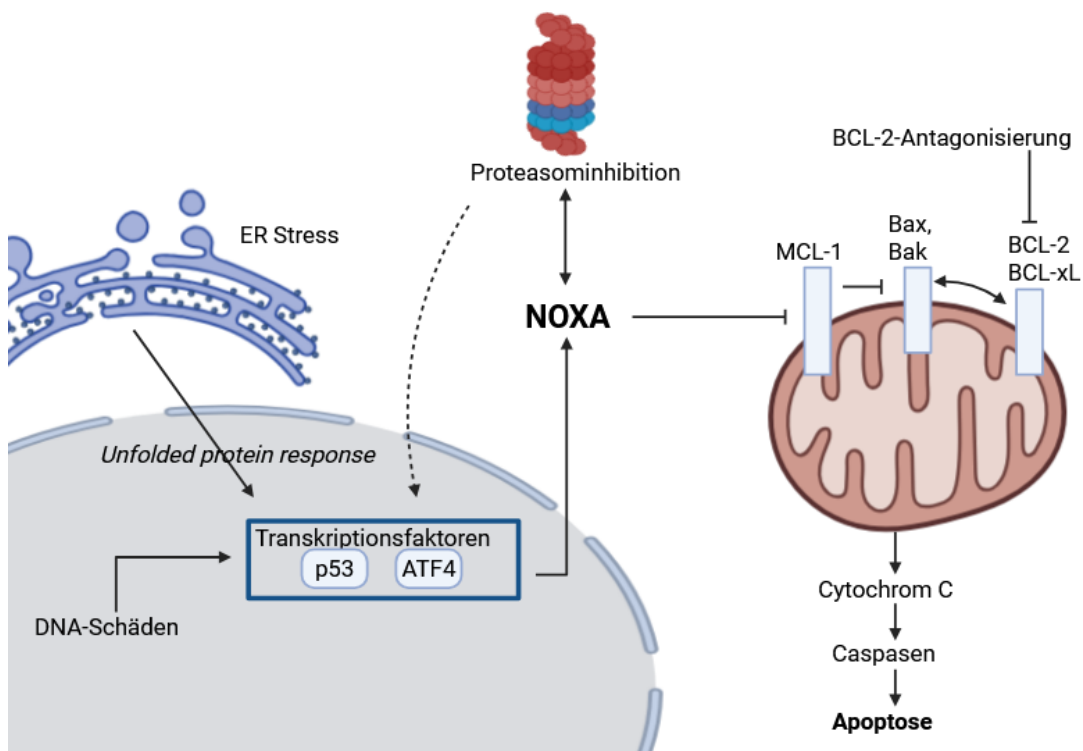


Abbildung 8: NOXA-Regulation bei zellulärem Stress, modifiziert nach Albert et al., 2014, erstellt mit BioRender.com.

1.9.4 Integrierte Stress Antwort

Die integrierte Stress-Antwort (ISR) ist ein zentraler Kontrollmechanismus der Zelle, um sich anzupassen und zu überleben (Szaruga et al., 2023). eIF2 α (*eukaryotic initiation factor 2*) wird an Serin 51 phosphoryliert, was zu einer Reduktion der Proteinsynthese und zu einer Umprogrammierung der Genexpression führt (Donnelly et al., 2013). Die Entwicklung von Medikamenten, die die Proteinkinasen wie PERK (*protein kinase double-stranded RNA-dependent-like ER kinase*) und GCN2 (*general control non-derepressible-2*), die die ISR aktivieren, ist Gegenstand aktueller Forschung (Takahashi et al., 2023). Krebszellen zeigen eine erhöhte Proteinsynthese, dies führt zu einer erhöhten Konzentration der ISR im Vergleich mit normalen Zellen (McConkey, 2017) (Takahashi et al., 2023).

Die integrierte Stress-Antwort umfasst verschiedene zelluläre Ereignisse wie virale Infektionen, Häm-Mangel oder auch ER-Stress. Es kommt zu einer Induktion der ATF4-Translation bzw. einer verstärkten eIF2 α -Phosphorylierung (Costa-Mattioli and Walter, 2020).

Die Hemmung von mutierten EGFR- oder PI3K-Proteinen, pharmakologisch oder durch genetischen Knockdown, hemmt die ATF4-Induktion und bietet so möglicherweise über den EGFR-PI3K-Signalweg eine Verbesserungsstrategie der EGFR-gerichteten NSCLC-Therapie (Takahashi et al., 2023).

ATF3 gehört zur ATF/CREB-Familie (*ATF/cyclic AMP response element binding*) der Transkriptionsfaktoren, welche an der Anpassung an extra-/intrazellulären Prozessen beteiligt sind. Die ATF3-Expression ist meist auf einem niedrigen bis nichtnachweisbaren Niveau. In malignen Zellen wie beim Darm-, Prostata, Ovarial-, Mammakarzinom und Bronchialkarzinom wurden Veränderungen in der ATF3 Expression beobachtet (Song et al., 2012, Yan et al., 2021, Ku and Cheng, 2020).

Tabelle 5 ISR beteiligte Proteine

ATF3	<i>Activating transcription factor 3</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>

1.10 Ansatz der Krebs-Therapie: Proteasominhibitoren

Zur Optimierung der Krebstherapie bietet sich als Ziel die Apoptose an. Ansatzpunkt dabei kann die Inhibition des Proteasoms sein mittels des Einsatzes von Proteasominhibitoren (PI).

Proteasome sind große, aus mehreren katalytischen Untereinheiten bestehende Proteinkomplexe, die zelluläre Proteine spalten und abbauen (Fricker, 2020). Das 26S-Proteasom ist die wichtigste Protease bei Eukaryoten (Collins and Goldberg, 2017).

Der primäre Wirkmechanismus der PIs ist die Hemmung des Proteasoms und damit die Hemmung des Proteinabbaus. Allerdings sind die dafür klinisch benötigten Konzentrationen deutlich höher, sodass die Vermittlung der Wirkungen der PI über andere Mechanismen angenommen wird (Fricker, 2020).

PI verstärken den TNF- α -induzierten Zelltod (Kusumoto et al., 2009). Der PI vermittelt darüber hinaus eine Stabilisierung von BOK, was wiederum zu Induktion der Apoptose führt. Weiter fördern PI die NOXA-Expression (Llambi et al., 2016, Muenchow et al., 2020).

Die Inhibition von Proteasomen blockiert den Abbau von EGFR und EGF und hemmt die Translokation des aktivierten EGFR von der äußeren Begrenzungs- membran zur inneren Membran der multivesikulären Körper (Longva et al., 2002).

Tabelle 6 Zugelassene Proteasominhibitoren in Deutschland

Wirkstoff	Handelsname	Pharmaunternehmen	Anwendung
Bortezomib	Velcade	Janssen-Cilag	Multiples Myelom, Mantelzell-Lymphom
Carfilzomib	Kyprolis	Amgen	Multiples Myelom, nur in Kombination
Ixazomib	Ninlaro	Takeda Pharma	Multiples Myelom, nur in Kombination

1.10.1 Bortezomib

Bortezomib (BTZ) ist ein selektiver PI, der reversibel an die $\beta 2$ und $\beta 5$ Untereinheiten des 26S-Proteasoms bindet. Insbesondere in maligne-transformierten Zellen wird dieser Komplex verstärkt exprimiert (Lawasut et al., 2012, Fricker, 2020, Sohn et al., 2006, Kusumoto et al., 2009).

Die Hemmung des 26S-Proteasoms führt zu einer veränderten Aktivierung bzw. Inaktivierung von Regulatorproteinen und einer fehlenden Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der für die Proliferation von Tumorzellen von zentraler Bedeutung ist (Scott et al., 2016, Bai et al., 2023).

Krebszellen weisen ein höheres Level an proteasomaler Aktivität auf als gesunde Zellen und reagieren somit sensitiver auf eine Inhibition des Proteasoms (Dou and Li, 1999, Moreau et al., 2012).

Anwendung als Therapeutikum findet BTZ bereits in der Behandlung des multiplen Myeloms und des Mantelzell-Lymphoms. Verabreicht wird BTZ i.v. oder s.c. (Tan et al., 2019).

In Mausmodellen konnte erfolgreich eine Verkleinerung eines NSCLC-Tumors durch die Gabe von BTZ erreicht werden, indem es die proliferierenden Zellen in den Zellzyklusarrest versetzt (Bai et al., 2023).

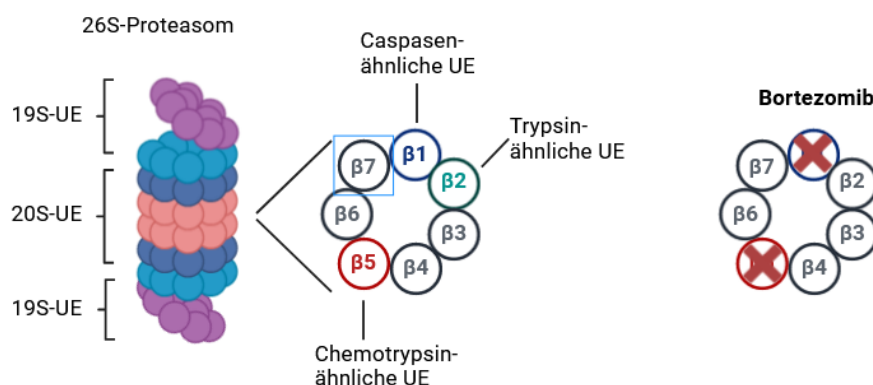


Abbildung 9: Struktur und Angriffspunkte eines 26S-Proteasoms und BTZ, modifiziert nach Wang et al., 2022, Ando et al., 2014, Bai et al., 2023, erstellt mit BioRender.com.

1.11 Kombinationstherapien

Die Kombination von Wirkstoffen aus verschiedenen Substanzklassen mit unterschiedlichen Angriffspunkten ermöglicht die Entwicklung effektiverer Behandlungsmöglichkeiten (Mazieres et al., 2020).

1.11.1 Kombination von Bortezomib mit BH3 Mimetika

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die synergistische Wirkung von Proteasominhibitoren mit BCL-2-Inhibitoren nachgewiesen. Die Induktion von NOXA ist dabei entscheidend für den Zelltod (Muenchow et al., 2020). Diese Untersuchungen erfolgten in verschiedenen Sarkomzelllinien mit einer Kombinationsbehandlung aus dem BH3-Mimetikum ABT-199 (Venetoclax) und dem PI Bortezomib. Dabei konnte eine Resistenz der Zellen gegenüber ABT-199 durch PI überwunden werden. Bei der molekularen Analyse und mittels CRISPR/Cas9 erzeugten knock-out Zelllinien konnte bei der Kombinationsbehandlung mit ABT-199 und BTZ die vorwiegende Abhängigkeit von BAX festgestellt werden (Weller et al., 2022). Experimente mit weiteren PIs konnten zeigen, dass der Synergismus klassenspezifisch ist, d.h. nicht auf BTZ beschränkt ist und p53 unabhängig ist (Muenchow et al., 2020, Weller et al., 2022).

1.11.2 Kombination von ALK-TKI mit Proteasominhibitor

Die Anaplastische Lymphom-Kinase (ALK) ist wie EGFR-TK eine Tyrosinkinase. Diese ist im gesunden Lungengewebe nicht aktiv. Ist ALK dauerhaft aktiv, kommt es zu unkontrollierter Zellteilung. Bei Patienten mit NSCLC lassen sich bei 4-5 % der Tumoren ein *ALK-Rearrangement* beobachten. Diese häufigste genetische Veränderung des Translokationspartners EML4 führt zur Überexpression von ALK (Golding et al., 2018).

In NSCLC-Patienten mit einem ALK-Rearrangement konnte gezeigt werden, dass bei einer kombinierten Behandlung der Zellen mit einem ALK-TKI und einem PI die Resistenz überwunden werden konnte und ein vermehrter Zelltod via Expression von NOXA induziert wurde (Tanimoto et al., 2021).

In NSCLC-Zellen mit einem ALK-Rearrangement und ohne p53 Funktion konnte durch eine Behandlung mit Alectinib keine Apoptose induziert werden. Bei der Hinzugabe des PI Ixazomib konnte Zelltod induziert werden. Bei der

Kombinationsbehandlung mit Alectinib und Ixazomib wurde eine prompte Tumorregression und Apoptose induziert (Tanimoto et al., 2021).

1.11.3 Kombinierte Therapie mit EGFR

Bereits im Jahr 2007 wurde *in vitro* der Effekt einer Kombinationsbehandlung von BTZ mit ERLO untersucht (Piperdi et al., 2007). Dabei wurden Zelllinien ungeachtet ihres EGFR-Mutationsstatus verwendet: Bei der Kombinationsbehandlung in den H358 konnte ein vermehrter Zelltod induziert werden, obwohl es eine EGFR-WT-Zelllinie ist (Alemany et al., 1996, Chen et al., 2012).

Ein ähnliches Ergebnis ergab sich bei einer kombinierten Behandlung von BTZ mit GEF1 (Sooman et al., 2017). Die verwendete SCLC-Zelllinien U-2020 erwiesen sich als resistent gegen Gefitinib, in der Kombination mit BTZ konnte aber auch ein vermehrter Zelltod detektiert werden (Sooman et al., 2017).

2 Zielsetzung der Arbeit

NSCLC entwickeln nach einer gewissen Zeit der spezifischen zielgerichteten Therapie regelmäßig eine Resistenz gegen die EGFR-TKI. Dies bedeutet eine schlechte Prognose und eine Einschränkung der weiteren Therapieoptionen. So muss unter Umständen auf die schlechter verträgliche (platinhaltige) Chemotherapie zurückgegriffen werden.

Folglich werden dringend neue Therapiestrategien benötigt.

In Vorarbeiten konnte in Sarkomzelllinien eine synergistische Reduktion vitaler Zellen durch die kombinierte Anwendung von Venetoclax und BTZ nachgewiesen werden (Muenchow et al., 2020, Weller et al., 2022). Ähnliche Effekte zeigten sich auch in Vorarbeiten in EGFR-Wildtyp-Zelllinien bei der Kombination von einem PI mit einem BH3-Mimetikum (Weller et al., 2022). In NSCLC Zelllinien konnte die Kombination von zugelassenen PI mit ALK-TKI eine Resistenz gegenüber ALK-TKI überwinden (Tanimoto et al., 2021). In diesen Vorarbeiten konnte die Verstärkung der Apoptose auf die NOXA-Transaktivierung zurückgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion zwischen EGFR-TKI und PI in NSCLC-Zelllinien zu untersuchen und den EGFR-TKI-Resistenzmechanismus besser zu verstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Fragen bearbeitet:

- a) Induzieren PI und EGFR-TKI in EGFR-WT Zelllinien und EGFR-mutierten Zelllinien Zelltod?
- b) Wird die EGFR-TKI- und PI-vermittelte Apoptoseinduktion durch eine gleichzeitige Proteasom-Inhibition (über BTZ) in EGFR-WT-Zelllinien und EGFR-mutierten-Zelllinien verstärkt?
- c) Wird dabei die NOXA-Degradierung in EGFR-mutierten Zelllinien reduziert und verstärkt das so die Apoptose?
- d) Kann man *in vitro* resistente NSCLC-Zelllinien etablieren?
- e) Wirkt die Kombinationsbehandlung mithilfe von on- oder off-target-Effekten?

- f) Welchem Mutationsmechanismus bedienen sich die EGFR-mutierten EGFR-TKI resistenten Zelllinien und inwieweit ist der TP53 Status entscheidend?
- g) Wie ändern sich bei der Kombinationsbehandlung die Protein- und RNA-Expression der BCL-2-Proteinfamilie als wichtige Akteure der Apoptose, insbesondere der verschiedenen BCL-2-Proteine (BAK, BOK, BAX, NOXA)?

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 7 Verwendete Geräte

Verwendete Geräte	Geräte-Eigenname	Marke
Absaugsystem	Integra Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Autoklav	TOMY SX-700E Varioklav Typ 500	TOMY Digital Biology Co., LTD., Tokyo, Japan H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Blotter	Biometra Fastblot B44	Biometra GmbH, Göttingen
Brutschrank	CB150	Binder GmbH, Tuttlingen
Durchflusszytometer	BD FACS Lyric	BD Biosciences, Heidelberg
FLUIDIGM BioMark qPCR	FLUIDIGM BioMark qPCR	Standard BioTools Inc., South San Francisco, US
Gelkammer	Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Heizblock	DRI-BLOCK DB-2A	Techne, Staffordshire, UK
Kamera	X Stella raytest LAS 1000 Stella chemiluminescent CCD camera	Medical Systems, Stamford, CT, USA
Magnetrührer	IKA RET basic safety control	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop	Leica DM IL LED Leica TCS SP8	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Objekträger	Menzel-Gläser Superfrost Plus Objekträger	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
pH-Meter	Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Plattenleser	EnSpire Multimode Plate Reader	PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA
Ein- und Mehrkanalpipetten		Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer	PIPETBOY accu 2	Integra Biosciences

qPCR	CFX96	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Rollenmischer	RM5 Assistent 348 RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen
Zellstoffwechsellanalysator	Seahorse XFe96 Analyzers	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
Sterillbank		Heraeus Instruments, Düsseldorf
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply peqlab EV231 Power PAC 1000 Power PAC 200	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Ultraschallgerät/ Sonifier	Bioruptor UCD-200	Diagenode, BE-Liege
Vortexer	Reax top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Wippschüttler	GFL 3013 GFL 3014	GFL, Burgwedel GFL, Burgwedel
Wasseraufbereitung	Milli-Q Integral 10	Millipore, Temecula, CA, USA
Wasserbad	Lauda 012T	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zellzähler	EVE Automatic Cell Counter NanoEnTek	VWR, Darmstadt
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D Centrifuge 5417C Rotina 35R Corning LSE Mini Micro- centrifuge 6766/C1501EU	Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen Corning, Inc., Corning, NY, USA

3.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant
Amersham Protran 0,1 µm NC	GE Healthcare Life Science, Freiburg

Cell Culture Dishes, PS, 100x20 mm Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Runde Glasplättchen für Well-Platten Menzel-Gläser Deckgläser	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA / Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger für Zellzählung (EVS-050)	Peter Oehmen GmbH, Essen
EVE Cell Counting Slide NanoEnTek	VWR, Darmstadt
5 ml FACS-Röhrchen, 75x12 mm, PS	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Gelloader Pipette Tips 70.1190.100 1- 200 µl	Sarstedt AB & Co. KG, Nümbrecht
Pasteur Pipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eber- stadt
Precision Pipette Tips, BioClean,	Rainin, Gießen
Purple Nitrile* Extra Gloves	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
Safe-Lock Tubes 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Spritze 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Stripette Disposable Serological Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning, Inc., Corning, NY, USA
T25, T75, T175 Cell Culture Flasks Cel- Istar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tube 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Vasco Nitril blue	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Corning™ Costar™ 12-well Clear TC- treated Multiple Well Plates, einzeln ver- packt, steril, 6-Well - 64 Well flach, be- schichtet und steril, Well abgerundet	Corning, Inc., Corning, NY, USA
6, 12, 96 Well Cell Culture Plate, Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Fluidigm BioMark plate	Standard BioTools Inc., South San Francisco, CA, USA
Seahorse Cell Culture Microplates	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA

3.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 9 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Lieferant
Acrylamide-Solution (40 %) Mix 29:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat, APS	Merck, Darmstadt

BD CS&T Beads	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat $\geq 99\%$, p.a., ACS	Roth, Karlsruhe
Color Protein Standard Broad Range	New England BioLabsInc., Frankfurt am Main
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako Fluorescence Mounting Medium	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycine	Merck, Darmstadt
Hoechst 34580	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
KCl	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Merck, Darmstadt
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pierce BCA Protein Assay Kit	VWR International - Germany GmbH, Darmstadt
Ponceau S solution	Roth, Karlsruhe
2-Propanol 70 % (V/V)	Merck, Darmstadt
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Roti-Histofix 4 % (phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4 %)	Roth, Karlsruhe
Roti-Stock 20 % SDS	Roth, Karlsruhe
SDS Pellets	Merck, Darmstadt

3.4 Zellkultur

3.4.1 Verwendete Zelllinien

Verwendet wurden humane, immortalisierte NSCLC-Zelllinien. In Tabelle 10 sind die verwendeten Zelllinien aufgelistet. Die bereits ERLO-resistenten Zelllinien wurden von der „*The Resistant Cancer Cell Line (RCCL) collection*“ der

Universität Kent (Vereintes Königreich) bezogen. Aus den bereits etablierten Zelllinien wurden durch Hinzugabe von OSI in aufsteigenden Konzentrationen in der Dauerkultur Osimertinib-resistente Zelllinien etabliert. Die Zelllinien H1650 und HCC827Mai wurden von Prof. Krishnaraj Rajalingam der Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10 Verwendete Zelllinien und generierte Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	TP53-Status	EGFR-Mutation, soweit bekannt	Medium	Herkunft
A549	NSCLC, Adenokarzinom	WT	WT	Suppl. RPMI 1640	ATCC CCL-185
H1299	NSCLC, Großzeller	Deletion	WT	Suppl. RPMI 1640	ATCC CRL-5803
H1650WT	NSCLC, Adenokarzinom	c.892G>T, c.673-2A>G, Deletion	E746_A750	Suppl. RPMI 1640	ATCC CRL-5883
H1650Osi	H1650			Suppl. RPMI 1640	Selbst generiert
HCC4006WT	NSCLC, AD	SNP	L747_E749, A750P	Suppl. DMEM/F-12	ATCC CRL-2871
HCC4006ErlOsi	HCC4006			Suppl. DMEM/F-12	Selbst generiert
HCC4006Erl	HCC4006		L747_E749, A750P	Suppl. DMEM/F-12	RCCL
HCC827Mai	NSCLC, AD	Deletion	E746_A750	Suppl. IMDM	ATCC CRL-2868
HCC827WT	NSCLC, AD	Deletion	E746_A750	Suppl. IMDM	ATCC CRL-2868
HCC827Erl	NSCLC, AD	Deletion	E746_A750	Suppl. IMDM	RCCL

HCC827ErlOsi	NSCLC, AD				Suppl. IMDM	Selbst gene- riert
EGFR-TKI resistente Zelllinien mit EGFR-TKI-Konzentration bei Dauereexposition						
Zelllinie	Ursprung	Konzentration	TP53- Status	EGFR-Mu- tation, so- weit bekannt	Medium	Herkunft
H1650Osi	NSCLC, Adeno- karzinom	Osi 2 µM		E746_A750	Suppl. RPMI 1640	Selbst gene- riert
HCC4006Erl	NSCLC, AD	Erl 1 µM	SNP	L747_E749, A750P	Suppl. RPMI 1640	RCCL
HCC4006ErlOsi	HCC4006	Erl 1 µM, Osi 1 µM			Suppl. DMEM/F- 12	Selbst gene- riert
HCC827ErlRes	NSCLC, AD	Erl 2 µM	Dele- tion	E746_A750	Suppl. IMDM	RCCL
HCC827ErlOsi	HCC827	Erl 2 µM, Osi 5 µM			Suppl. IMDM	Selbst gene- riert

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Kultivierung der NSCLC-Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte unter S1-Laborrichtlinien und es wurde stets unter der Sterilbank gearbeitet.

HCC4006 Zelllinien wurden in DMEM/F-12 + 10 % FCS + 5 % AddR bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. HCC827 Zelllinien wurden in IMDM + 10 % FCS + 5 % AddR bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. H1650 Zelllinien wurden in RPMI + 10 % FCS + 5 % AddR bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die ERLO-resistenten HCC4006 Zelllinien wurden in DMEM/F-12 + 10 % FCS + 5 % AddR bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit und zusätzlich einer Konzentration von 1 µM ERLO kultiviert. Die ERLO- und OSI-resistenten HCC4006 Zelllinien wurden in DMEM/F-12 + 10 % FCS + 5 % AddR bei 37 °C,

5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit und zusätzlich einer Konzentration von 1 µM ERLO und 1 µM OSI kultiviert.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % passagiert. Die Ablösung vom Boden der Zellkulturflaschen erfolgt mit Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat). Die enzymatische Reaktion wurde durch Hinzugabe des entsprechenden Mediums gestoppt und der gewünschte Anteil der Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und das Volumen in diesen Flaschen entsprechend der Flaschengröße angepasst (T25, T75 und T175). Nach Zentrifugation (340 x g, 5 min, RT) wurde der entsprechende Anteil an Zellpellet im frischen Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

AddR-Lösung	
L-Asparagin 2,6 mM	20 ml 10 mg/ml
HEPES (0.172 M), pH 7,29	100 ml 1 M
L-Glutamin-Lösung (34,48 mM)	100 ml 200 mM
Natriumpyruvat-Lösung (17,24 mM)	100 ml 100 mM
Nichtessentielle Aminosäuren	60 ml (100x)
Penicillin/Streptomycin (P/S) (1,72 g/l)	100 ml
β-Mercaptoethanol-Lösung (0,862 mM)	100 ml 5 mM

Steril filtrieren, 29 ml AddR-Stammlösung auf 500 ml Medium

Supplementiertes Medium (1x)		
AddR-Lösung	5,8 % (% v/v)	
Fetal bovine serum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, US	1 % (% v/v)
0.05 % Trypsin/EDTA	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE	
In		
DMEM/F-12	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE	
RPMI 1640	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE	
IMDM	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE	

Weitere Chemikalien für Zellkultur	
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
L-Asparagin Monohydrat	Biochrom AG, Berlin, DE

L-Glutamin-Lösung	Biochrom AG, Berlin, DE
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG, Berlin, DE
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, DE
Penicillin (10 ⁷ U/l) / Streptomycin (10 g/l) (P/S)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

3.5.2 Bestimmung der Zellzahl- und Vitalität

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung (0,4 %) gemischt und mittels automatisierten Zellzähler (EVE Automatic cell counter) die Anzahl vitaler Zellen bestimmt.

Automatisierter Zellzähler EVE Automatic cell counter NanoEnTek	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
EVE Cell counting slide NanoEnTek	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

3.5.3 Kryokonservierung

Je nach Größe der einzelnen Zellen wurden für die Kryokonservierung $2 \cdot 10^6$ oder $1 \cdot 10^6$ in 1 ml Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) aufgenommen, in einer Einfrierbox für eine Nacht bei -80 °C gelagert und dann die einzelnen Röhrchen in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
fetal calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Kryo-Röhrchen (1,8 mL CryoPure Gefäße)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

3.5.4 Beginn einer neuen Zellkultur

Nach circa 25 Passagen wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien durch kryokonservierte Zelllinien ersetzt. Für 1-2 min werden die Kryoröhrchen bei 37 °C ins Wasserbad gestellt. Nach Zugabe von 9 mL supplementiertem Medium wurden sie bei 340 x g für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Medium resuspendiert und nach Verdünnung mit 11 mL supplementiertem Medium in eine Zellkulturflasche (T75) überführt.

3.6 Medikamente / Reagenzien

Alle verwendeten Inhibitoren und BH3-Mimetika wurden in Aliquots in DMSO gelöst bei -20 °C gelagert. In der Arbeit wurden mit allen EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren Titrationsreihen erstellt, bei denen die aufsteigenden Konzentrationen 0,5 µM, 5 µM und 50 µM verwendet wurden. Bei BTZ wurden die Konzentrationen 5 nM, 50 nM und 500 nM verwendet. In der Kombinationsbehandlung aus PI + EGFR-TKI wurde jeweils 5 nM BTZ mit 5 µM EGFR-TKI eingesetzt.

Tabelle 11 Verwendete Medikamente

Inhibitor	Zielmolekül	Hersteller
Bortezomib (BTZ)	Proteasom-Inhibition der β 1 und β 5-UE	Absource Diagnostics GmbH, München, DE
Afatinib (AFA)	EGF-Rezeptor	Selleckchem, München, DE
Erlotinib (ERLO)	EGF-Rezeptor	Selleckchem, München, DE
Gefitinib (GEFI)	EGF-Rezeptor	Selleckchem, München, DE
Osimertinib (OSI)	EGF-Rezeptor	Selleckchem, München, DE
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE	
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, DE	

3.7 Durchflusszytometrische Analyse des Zelltods mittels Annexin V und TMRM-Färbung

Mit der Durchflusszytometrie (FACS - fluorescence activated cell sorting) kann man zelluläre Charakteristika mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenz-markierten Antikörpern analysieren.

In dieser Arbeit wurde eine Annexin V-APC/TMRM-Färbung zur Untersuchung der Zelltodinduktion verwendet.

Zu Beginn der Apoptose transloziert Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite der Plasmamembran. Das mit dem Fluorophor Allophycocyanin (APC) konjugierte Annexin V bindet mit hoher Affinität an PS. In dieser durchflusszytometrischen Analyse wird die PS-Exposition apoptotischer Zellen als Fluoreszenzsignal detektiert. Im Verlauf der Apoptose geht die Zellintegrität verloren und auch die nekrotisierenden Zellen würden Annexin V positiv erscheinen.

Es wurde eine Doppelfärbung mit dem Farbstoff Tetramethylrhodamin-methylester (TMRM) durchgeführt. In den negativ geladenen intakten Mitochondrien akkumuliert das positiv geladene TMRM. Im frühen Stadium der Apoptose depolarisieren die Mitochondrien und setzen ihre gespeicherten Anionen frei, so wird die TMRM-Akkumulation in apoptotischen Mitochondrien aufgrund des mitochondrialen Membranpotentials vermindert und es kommt zu einem Verlust der TMRM-Konzentration. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Zellen ausgesät und 20 min bei RT bis zu einer gleichmäßigen Verteilung stehen gelassen und danach über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und gegen frisches Medium mit den entsprechenden Zusätzen getauscht. Nach 24, 48 und 72 h Inkubation wurde der Überstand in FACS-Röhrchen überführt, die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit dem Überstand vereinigt und mit 500 µL 1x PBS abgewaschen. Bei 1800 rpm für 5 min bei RT wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 500 µL 1x PBS + 2 % FCS + TMRM (1:1.000) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (1800 rpm, 5 min, RT) wurde das Zellpellet auf Eis gestellt und mit 1x Annexin-V Bindepuffer (ABP) + 1:100 Annexin V-APC resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte im BD FACS Lyric und die Auswertung der Messergebnisse mit der BD FACSuite Research Software.

Annexin V-Allophycocyanin (APC)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, DE
BD CS&T Beads	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACSDiv	BD Biosciences, Heidelberg, DE
BD FACSuite Research Software	BD Biosciences, Heidelberg, DE
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Durchflusszytometer BD FACSLyric	BD Biosciences, Heidelberg, DE
fetal calf serum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, DE
Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

Annexin-Bindepuffer (10x)	
CaCl ₂	0,025 M
1 M HEPES-Puffer	0,1 M
NaCl	1,4 M
in ddH ₂ O	

3.8 Proteinanalytik

3.8.1 Proteinlysate

Zellernte: Für die Proteinextraktion wurden die Zellen in 6-Well bzw. T25-Flaschen ausgesät, 20 min bei RT stehen gelassen und dann bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und gegen frisches Medium mit den entsprechenden Zusätzen getauscht. Nach 24, 48 und 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mittels Trypsins und Nachspülen von 1x PBS geerntet und auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4 °C) und das Zellpellet in 1x PBS überführt, erneut zentrifugiert, der Überstand quantitativ entfernt und das Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zellyse: Der verwendete Lysepuffer setzt sich zusammen aus Lysepuffer mit 7x PIC und 10x PS (Protease- und Phosphatase-Inhibitoren). Auf Eis wurden die Pellets in je 50 µL Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (für 6 Zyklen a 20 sec). Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm wird der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

BCA-Assay: Mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits wurde die relative Proteinkonzentration ermittelt. Pro Well bei einer 96-Wellplatte wurde jeweils 200 µL der BCA-Reagenz (Lösung A:B 1:50) mit 1 µL des Zellysats vermischt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Triplikaten.

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Absorption bei 562 nm im Multimode Plattenlesegerät ermittelt und die Proteinkonzentration relativ zur BSA-Standardkurve errechnet. Die Proteinlysate wurden für die Weiterverwendung mit SDS-Blauprobenpuffer (4x Lämmli-Probenpuffer/15-30 µM) auf

gleiche Konzentration (2 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$) verdünnt und bis zur weiteren Verwendung wurde die Proteinlysate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Lysepuffer	
EDTA	5 mM
NaCl	250 mM
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
Triton X-100	0,1 % (% v/v)
in ddH ₂ O	

Lämmli-Puffer (5x)	
Bromphenolblau	3 mM
Glycerin	50 % (% v/v)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	0,3 M
1 M Tris-Hydrochlorid (HCl) (pH 6,8)	0,2 M
β -Mercaptoethanol-Lösung	25 % (% v/v)

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
EnSpire Multimode Plattenlesegerät	PerkinElmer, Inc, Waltham, USA
EnSpire 2300	PerkinElmer, Inc, Waltham, USA
EnSpire Software 4.1	PerkinElmer, Inc, Waltham, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, DE
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, DE
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
1 % Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ultraschallgerät Bioruptor UCD-200-TM-EX	Diagenode Inc. USA, Denville, NJ, USA

3.8.2 SDS-PAGE

Für die in der Arbeit verwendeten Gradientengele wurden aus gleichen Volumina einer 12 %igen- und einer 20 %igen bzw. einer 8 %igen und einer 20 %igen Polyacrylamid-Lösung erstellt.

Komponenten	Gradientengel	Sammelgel
8 %iges Trenngel	2,5 mL	
12 %iges Trenngel	2,5 mL	
20 %iges Trenngel	2,5 mL	
Sammelgel-Stocklösung		2 mL
APS (10 %)	50 µL	20 µL
TEMED	5 µL	2 µL

Die SDS-PAGE-Gele wurden mit jeweils 30 µg pro Kamm gefüllt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden 3 µL Proteinmarker mitgeführt.

Die Separation erfolgte bei anfangs 80 V bis zum Erreichen des Trenngels, danach für 60-90 min bei 160 V.

Acrylamid [29:1] Stocklösung (8 %)	
40 % Acrylamid [29:1]	8 % (% v/v)
SDS	0,4 M
Tris-HCl (pH 8,8)	0,4 M
in ddH ₂ O	

Acrylamid [29:1] Stocklösung (12 %)	
40 % Acrylamid [29:1]	12 % (% v/v)
SDS	0,1 % (% v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	0,4 M
in ddH ₂ O	

Acrylamid [29:1] Stocklösung (20 %)	
40 % Acrylamid [29:1]	20 % (% v/v)
Glycerin	10 % (% v/v)
SDS	0,1 % (% v/v)
Tris-HCl (pH 8,8)	0,4 M
in ddH ₂ O	

Elektrophorese-Puffer (10x)	
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (% v/v)
Tris	0,25 M
in ddH ₂ O	

Sammelgel-Stocklösung	
30 % Acrylamid [37.5:1]	3,4 % (% v/v)
SDS	0,08 % (% v/v)
0,5 M Tris (pH 6,8)	0,1 M
in ddH ₂ O	

Acrylamid/Bis Solution (30 %) Mix 37.5:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US
Acrylamide/Bis Solution (40 %) Mix 29:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, US
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Proteinmarker Color Protein Standard Broad Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., DE
Roti-Stock 20 % SDS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE

3.8.3 Western Blot

Die mittels Elektrophorese aufgetrennten Proteine im Polyacrylamid-Gel werden im Western Blot auf eine Trägermembran übertragen. Die Zielproteine werden anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen.

Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran findet im Semi-Dry-Verfahren mit Semi-Dry-Transfer-Puffer (40 mA, 1,5 h) statt. Nach dem Transfer auf die Trägermembran wird diese mit ddH₂O gewaschen und mit Ponceau-S gefärbt. Die gefärbte Membran wurde daraufhin in mehrere Abschnitte eingeteilt, sodass ein paralleler Nachweis von Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts möglich war.

Dreimal wurde die Membran zum Entfärben in 1x TBS-T gewaschen und zur Sättigung freier Bindestellen 1 h bei RT in 5 % Magermilch in 1x TBS-T auf einem Rollmischer inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut in 1x TBS-T gewaschen und bei 4 °C über Nacht in der Lösung (5 % BSA in 1x TBS-T) mit dem Primär-Antikörper auf einem Schüttelrollmischer inkubiert. Nachdem die Membran 3x für 10 min mit 1x TBS-T gewaschen wurde, wurde sie mit dem Spezies-spezifischen Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper in 5 % Magermilch in 1x TBS-T 1 h bei RT auf dem Rollmischer inkubiert. Daraufhin erfolgte wieder ein 3x zehnmütiger Waschschrift mit 1x TBS-T und die Membran wurde 5 min in Substrat-Lösung (Extended Duration Substrate (EDS), Super Signal West Dura) inkubiert und sofort mit Hilfe einer CCD-Kamera im Geldokumentationsgerät die Lumineszenz-Signale der spezifischen Banden detektiert. Nach der Dokumentation wurden ggf. die gebundenen Antikörper durch Inkubation mit Restore PLUS Western Blot Stripping-Puffer für 10 min gelöst und die freigewordenen Bindungsstellen erneut mit 5 % Magermilch in 1x TBS-T gesättigt.

Das Housekeeping Protein (β -AKTIN) wurde durch erneute Antikörper-Inkubation über Nacht bei 4 °C nachgewiesen.

Tabelle 12 Verwendete Primärantikörper

Primär- Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-AKT	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, US	4685S
Anti-ATF3 (C-19)	Kaninchen, polyklonal	1:500	Santa Cruz, Dallas, Texas, US	sc-188
Anti-ATF4 (D4D8)	Kaninchen, monoklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	11815
Anti-BAK	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	3814
Anti-BAX	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	2772
Anti-BCL-2 (124)	Maus, monoklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	15071

Anti-BCL-xL	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	2762
Anti-BOK	Kaninchen, monoklonal	1:500	Abcam, Berlin DE	Ab186745
Anti-EGFR	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling, Danvers, US	4267
Anti-GAPDH	Kaninchen, monoklonal	1:5000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	2118
Anti-MCL-1	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, US	5453
Anti-NOXA	Maus, mo- noklonal	1:500	Calbiochem, Merck, Darm- stadt, DE	OP-180
Anti-pAKT	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling, Danvers, US	9271S
Anti-pEGFR- 1608	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling, Danvers, US	2234S
Anti-p53 (DO-1)	Maus, mo- noklonal	1:1000	Santa Cruz, Dallas, Texas, US	Sc-126 HRP
Anti-β-AKTIN (AC-74)	Maus, mo- noklonal	1:5000	Merck KGaA, Darmstadt, DE	A5316

Tabelle 13 Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundär- körper	Anti-	Ursprung	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Anti-mouse HRP-linked body	IgG, Anti-	Pferd	1:2000	Cell Signaling Tech- nology, Beverly, MA, US	7076S
Anti-rabbit HRP-linked body	IgG, Anti-	Ziege	1:2000	Cell Signaling Tech- nology, Beverly, MA, US	7074S

BSA-Lösung (5 %)	
BSA	5 % (% w/v)
in 1x TBS-T	
Magermilch-Lösung (5 %)	
Magermilchpulver	5 % (% w/v)

in 1x TBS-T	
-------------	--

TBS (10x)	
Kaliumchlorid (KCl) 0,027 M	0,027 M
NaCl	1,369 M
Tris	0,028 M
Tris-HCl	0,25 M
in ddH ₂ O	

TBS-T (1x)	
TBS (10x)	0,025 M
Tween20	0,1 % (% v/v)
in ddH ₂ O	

Transferpuffer (semi-dry)	
Ethanol (EtOH)	20 % (% v/v)
Glycin	0,039 M
SDS	0,037 % (% v/v)
Tris	0,048 M
in ddH ₂ O	

Amersham Protran Nitrocellulose Blotting Membrane (0,1 µm NC)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, DE
Biometra Fastblot B44	Analytik Jena GmbH, Jena, DE
bovine serum albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Geldokumentation X Stella raytest LAS 1000 Stella chemiluminescent CCD camera	Medical Systems, Stamford, Connecticut, US
99,8 % EtOH	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, DE
ImageJ-Fiji64 Software	National Institutes of Health, Bethesda, MD, US
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ponceau-S	Sigma Life Science, Steinheim, DE
Reinstwasser (ddH ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
Roti-Stock 20 % SDS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat (EDS)	Thermo Scientific, Rockford, IL, US
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt, DE
X Stella Software Version 2.1.3.271	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt, DE

3.9 RNA-Analysen

3.9.1 RNA-Isolation

Analog zum Vorgehen zur Gewinnung der Zellproben für den Western Blot wurde auch mit den Proben zur RNA-Isolation vorgegangen.

Für die RNA-Isolation wurden die Zellen in 6-Well bzw. T25-Flaschen ausgesät, 20 min bei RT stehen gelassen und dann bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und gegen frisches Medium mit den entsprechenden Reagenzien getauscht. Nach 24, 48 und 72 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mittels Trypsins und Nachspülen von 1x PBS geerntet und auf Eis gestellt. Die entstandene Zellsuspension wurde zentrifugiert (1800 rpm, 5 min, 4 °C) und das entstandene Zellpellet in 1x PBS überführt, erneut zentrifugiert, der Überstand quantitativ entfernt und das Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die RNA mittels des Qiagen RNeasy Mini Kits (QIAGEN GmbH, Hilden) gemäß dem Kit-Protokoll isoliert.

Die Absorption bzw. Konzentration der isolierten RNA-Proben wurde mit einem UV-Spektralphotometer (NanoDrop2000c, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE) gemessen bei 260 nm und 280 nm.

3.9.2 cDNA-Synthese

Eine reverse Transkription der isolierten RNA in DNA erfolgte zur Synthese der cDNA. 500 ng RNA, 250 ng Oligo-dT Primer wurde mit Nuklease-freiem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 15 µL aufgefüllt.

Um ein Annealing des Primers zu erreichen, wurde die Mischung bei 5 min für 70 °C inkubiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Danach wurde der Mastermix (cDNA-Synthese-Reaktionsmix) hinzugegeben, der aus einer Mischung von M-MLV 5x reaction buffer, dNTP (10 mM), RNAsen Inhibitor und M-MLV [200 U/µL] und Nuklease-freiem H₂O besteht. Der darauffolgende Ablauf der reversen Transkription wird in *Tabelle 14* genauer beschrieben. Nach Ablauf im PCR-Thermocycler wurde die cDNA entweder auf Eis gestellt und mit 1:4 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und entweder bei -20 °C eingefroren oder unmittelbar für die Genexpressionsanalyse verwendet.

Tabelle 14 qPCR-Protokoll

Temperatur	Zeit
42 °C	60 min
60 °C	10 min
4 °C	Unendlich

Tabelle 15 cDNA-Synthese-Reaktionsmixes

Komponenten	Volumen pro Probe [µL]
M-MLV Reaction Puffer (5x)	5 µL
dNTP-Mix (10 mM)	1,25 µL
RNasin Ribonuclease Inhibitor	0,5 µL
M-MLV RT (5 U)	0,5 µL
Nuklease-freies Wasser	2,75 µL
dNTPs	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., DE
M-MLV RT (200 U)	Promega, Madison, Wisconsin, US
M-MLV Reaction Puffer (5x)	Promega, Madison, Wisconsin, US
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, DE

Oligo-dT Primer	Promega, Madison, Wisconsin, US
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, Wisconsin, US

3.9.3 Analyse der Genexpression mit TaqMan-basiertem Assay

Der TaqMan Gene Expression Assay wurde mit den Komponenten in

Tabelle 15 durchgeführt. Die Zielgene wurden mittels quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR - quantitative real-time polymerase chain reaction) quantifiziert.

Die cDNA und die Reagenzien des TaqMan Gene Expression Assays werden im Dunkeln auf Eis aufgetaut.

Die untersuchten Gene sind in *Tabelle 18* aufgeführt. Die PreAmp cDNA (1:10) wurde mit 1,8 µL pro Well verwendet.

Tabelle 16 Assay-Mix für Fluidigm

Komponenten	Volumen pro Probe [µL] im 96-Well-Format
TaqMan Gen-Expressions Assay (20x)	1,5 µL
2x Assay Loading Reagent	1,5 µL

Tabelle 17 Sample-Pre-Mix für Fluidigm

Komponenten	Volumen pro Probe [µL] im 96-Well-Format
TaqMan Universal Master Mix (2x)	1,5 µL
20x GE Sample Reagent	0,15 µL

Tabelle 18 Verwendete TagMan-Assays und die Zielgene

Zielgen	Farbstoff	TagMan-Assay	Herkunft
ATF3	FAM-MGB	Hs00231069_m1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US
ATF4	FAM-MGB	Hs00909569_g1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US
ACTB	VIC-MGB_PL	Hs03023943_g1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US
GAPDH	VIC-MGB_PL	Hs02758991_g1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US

MCL-1	FAM-MGB	Hs01050896_m1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US
PMAIP1	FAM-MGB	Hs00560402_m1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US
TP53	FAM-MGB	Hs01034249_m1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US
TUBA1A	VIC-MGB_PL	Hs00362387_m1	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, US

Fluidigm	Standard BioTools Inc., South San Francisco, CA, USA
Fluidigm BioMark plate	Standard BioTools Inc., South San Francisco, CA, USA
RNase-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden, DE
SDS Automation Controller 2.4 TaqMan Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
TaqMan Universal Master Mix (20x)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE
TaqMan Universal Master Mix (2x)	Life Technologies Gibco, Darmstadt, DE

3.10 Mito Stress Test – Mitochondriale Funktion

Für die Analyse der mitochondrialen Funktion und der Sauerstoffverbrauchrate wurde ein Mito Stress Test durchgeführt. Der Assay wurde nach Anleitung vorbereitet und die Zellen in der 96-Well-Platte ausgebracht. Am Versuchstag bei voller Konfluenz der Zellen wurden die Ports nach Protokoll geladen und im Seahorse XF Cell Culture der Versuch gestartet. Ausgewertet wurde mit der Seahorse XF Mito Stress Test Report Generator Software.

Bestandteil der Seahorse XF-Technologie ist eine Standardlösung für die Funktionsanalyse der mitochondrialen Atmung. Diese wird durch direkte OCR-Messung von Zellen in Echtzeit gemessen. Bei diesem Protokoll werden eine Reihe von Modulatoren nacheinander injiziert, Oligomycin (OXPHOS-Inhibitor), FCCP (Entkoppler) und Rotenon/Antimycin A (Rot/AA, ETC-Inhibitoren), Oligomycin, Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), Rotenone, and Antimycin (Divakaruni et al., 2014).

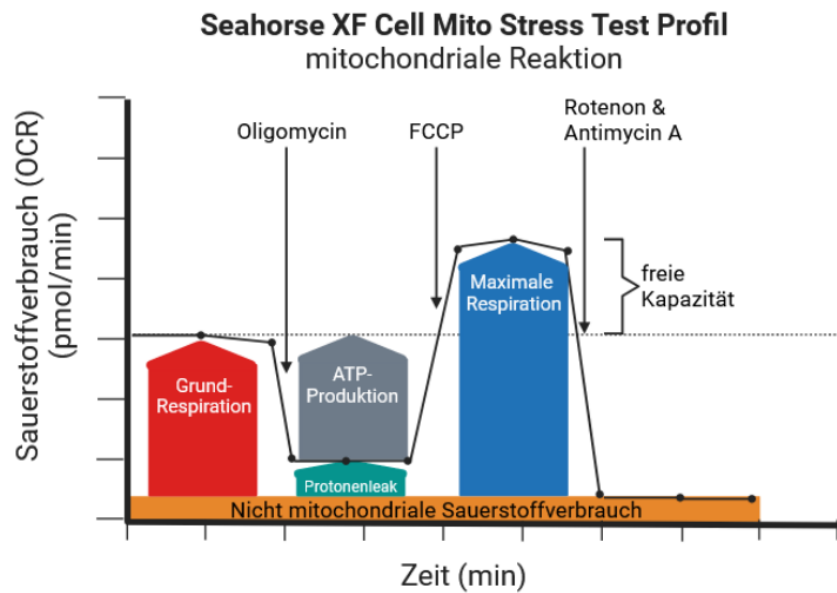


Abbildung 10: Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profil, modifiziert nach Gebrauchsanleitung des Seahorse XF

Bei der Versuchsdurchführung werden eine Reihe von einzelnen Aspekten untersucht:

Basale Atmung: Dies zeigt den Energiebedarf der Zelle zum Start in Ausgangsbedingungen an. Es ergibt sich aus dem Sauerstoffverbrauch, der zur Deckung des zellulären ATP-Bedarfs nötig ist und dem Protonenleck.

ATP-Produktion: Bildet das ATP ab, welches für den Energiebedarf der Zelle wichtig ist. Der Rückgang der Sauerstoffverbrauchsrate nach der Injektion des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin ist der Anteil der Basalatmung, der für die ATP-Produktion verwendet wurde.

H⁺ (Protonen)-Leck: Dies ist die verbleibende Basalatmung, die unabhängig von der Kopplung an die ATP-Produktion ist. Dies kann ein Zeichen für die Schädigung der Mitochondrien sein oder ein Regulationsmechanismus der mitochondrialen ATP-Produktion.

Maximale Atmung: Durch Zugabe von FCCP wird der physiologische Energiebedarf stimuliert. Dies erfolgt durch Stimulierung der Atmungskette, die zu einer maximalen Kapazität angeregt wird, was eine schnelle Oxidation von Substraten

(Kohlenhydrate, Lipide, Aminosäuren) zur Folge hat. Es ist die maximale Atmung, die die Zelle erreichen kann.

Reserve-Atmungskapazität: Hier wird die Fähigkeit der Zelle gemessen, auf eine Nachfrage nach Energie zu reagieren. Außerdem wird gemessen, wie weit die Zelle ihr theoretisches Maximum erreichen kann. Dies sind Indikatoren für die Flexibilität und Fitness der Zelle.

Nichtmitochondriale Atmung: Dies ist der Sauerstoffverbrauch, der auch nach Zugabe von Rotenon und Antimycin A fortbesteht. Grundlage dafür ist eine Untergruppe von zellulären Enzymen, die die Atmung unterhält. Um die mitochondriale Atmung genau zu bestimmen, muss die nichtmitochondriale Atmung gemessen werden.

Tabelle 19 Zusammenfassung von Ziel und Wirkung auf die mitochondriale Atmung durch die Modulatoren

Injektion	Elektronentransportkette	Effekte auf OCR
Oligomycin	ATP-Synthase (Komplex V)	Verringerung
Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone / FCCP	Innere Mitochondrienmembran	Zunahme
Rotenon/Antimycin A	Komplex I und III (jeweils)	Verringerung

3.11 Immunfluoreszenzmikroskopie / Morphologische Untersuchungen

3.11.1 Aussäen

Die morphologischen Untersuchungen erfolgten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Die Zellen wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Well in 12-Well-Platten auf (\varnothing 12 mm) Deckgläsern ausgesät.

3.11.2 Fixation

Nach Erreichen der passenden Konfluenz wurden die Zellen mit einer 3 % phosphatgepufferten Formaldehydlösung für 25 min bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

3.11.3 Permeabilisierung

Mithilfe einer 0,1 % Triton-X 100 Lösung wurden die Zellen für 10 min bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

3.11.4 Blocking

Zum Blocking wird eine 1 % BSA-Lösung und 2 % FCS in PBS gemischt und auf die Coverslips für 1h auf dem Shaker inkubiert bei RT. Erneut wird mit PBS dreimal gewaschen. Die Deckgläser verbleiben auf PBS über Nacht im Kühlschrank.

3.11.5 Primäre Antikörper

Die Deckgläser werden für mindestens 2 h mit dem der verdünnten Blockinglösung (1:5 mit PBS) und dem primären Antikörper (1:500) gemischt, anschließend wird dreimal mit PBS gewaschen.

Entweder verbleiben die behandelten Deckgläser über Nacht im Kühlschrank oder man behandelt sie gleich weiter, indem sie für 30 min auf der Rüttelplatte mit PBS inkubiert werden.

3.11.6 Sekundäre Antikörper

Die Blockinglösung wird erneut 1:5 verdünnt und der sekundäre Antikörper hinzugegeben (siehe Tabelle) und für eine Stunde inkubiert. Ab diesem Schritt sind die Deckgläser lichtgeschützt zu handhaben.

Tabelle 20 Verwendete Antikörper und Farbstoffe

Antikörper/Farbstoffe		
Alexa Fluor 594 chicken anti-rabbit	Rot /TOM20	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	Grün / Tubulin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Mounting Solution	Blau / DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

3.11.7 Mounting der Deckgläser

Die Deckgläser werden in MiliQ gewaschen, dann wird Invitrogen Prolong Diamond Antifade Mount mit DAPI aufgetragen und auf einem Objektträger platziert. Bei RT werden die Objektträger zum Trocknen über Nacht gelagert und am nächsten Tag in den Kühlschrank für eine längere Aufbewahrung verbracht.

3.12 Statistik

Die statische Auswertung und Präsentation der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 9.3.0 (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

In den Abbildungen dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Eine Ausnahme bilden die Mito Stress Test Experimente, bei denen zwei unabhängige Experimente durchgeführt wurden.

4 Ergebnisse

Um die möglichen Effekte einer Kombinationsbehandlung mit einem PI und einem EGF-Rezeptor-Inhibitor beurteilen zu können, müssen zuerst die alleinigen Wirkungen auf NSCLC-Zelllinien unabhängig voneinander untersucht werden. Zur Abbildung der Heterogenität der Zellmutationen der NSCLC-Tumoren werden verschiedene bereits etablierte NSCLC-Zelllinien verwendet. Diese Zelllinien weisen unterschiedliche Mutationen auf (vgl. Tabelle 10).

Für die Untersuchungen zur Resistenzentstehung unter der Behandlung mit EGFR-TKI werden sowohl auf bereits etablierte resistente NSCLC-Zelllinien zurückgegriffen als auch weitere resistente Zelllinien etabliert.

Zur Aufklärung des Resistenzmechanismus auf morphologischer und mitochondrialer Ebene werden die Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Mito Stress Test Analysen untersucht.

Für die Aufklärung der Wirkung durch die kombinierte Inkubation eines PI mit einem EGFR-Inhibitor werden Western Blot Analysen der an der Apoptose beteiligten Proteine sowie qPCR zur Genexpression durchgeführt.

4.1 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-Wildtyp-NSCLC- Zelllinien (H1299, A549)

Um die selektive, dosisabhängige Zelltodinduktion durch EGFR-TKI zu untersuchen, werden zwei EGFR-WT-Zelllinien, H1299 und A549, für jeweils 24 h mit EGFR-TKI verschiedener Generationen inkubiert und mittels Durchflusszytometrie die Anteile von Annexin V-APC und TRMR low positiven Zellen bestimmt. Annexin V-APC und TMRM low sind Marker für Zelltodinduktion. In dieser Arbeit werden die Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen mit Zelltod/Apoptose gleichgesetzt. Um den Einfluss von BTZ in EGFR-WT-Zelllinien zu untersuchen, werden die Zelllinien H1299 und A549 für 24 h mit BTZ inkubiert.

4.1.1 Lichtmikroskopische Aufnahme H1299

Es zeigen sich polymorph-spindelförmige Zellen nahezu gleicher Größe unter Kontrollbedingungen (ohne PI- und EGFR-TKI-Inkubation), die adhärent wachsen. Die abgerundeten (hellen) Zellen sind nicht mehr adhärent.

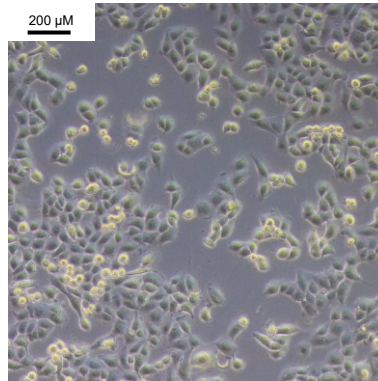


Abbildung 11 Zelllinie H1299 in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~70 %.

4.1.2 Lichtmikroskopische Aufnahme A549

Die Zellen der Zelllinie A549 sind etwas kleiner und rundlicher als H1299. Das Wachstum in der Dauerkultur (ohne PI- und EGFR-TKI-Inkubation) ist konfluierender als bei den H1299, sie wachsen mehr im Verbund.

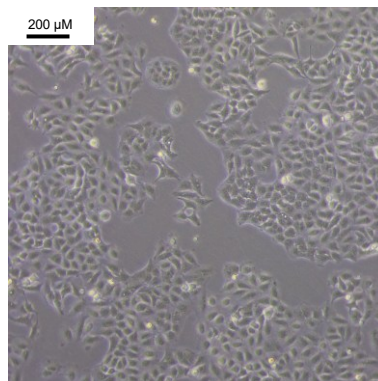


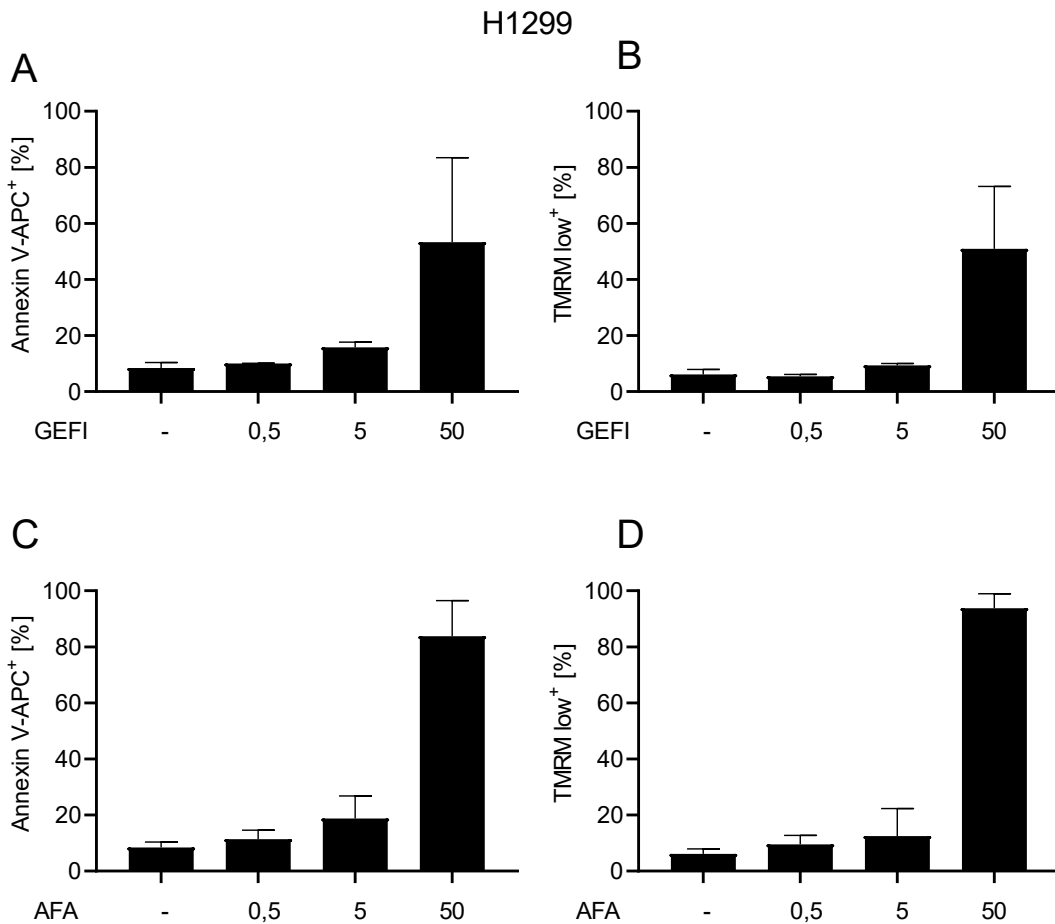
Abbildung 12 Zelllinie A549 in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~70 %.

4.1.3 H1299 und A549: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Die Inkubation der EGFR-Wildtyp Zelllinien A549 und H1299 mit den EGFR-TKI Gefitinib, AFA und OSI für 24 h führt bei den Konzentrationen von 0,5 µM und 5 µM zu keinem signifikant gesteigerten Nachweis von Annexin V-APC positiven

Zellen und TMRM low gefärbten Zellen. Die Untersuchung erfolgt mittels Durchflusszytometrie (FACS) (Abbildung 13).

In den niedrigen Konzentrationen zeigt die Inkubation mit EGFR-TKI keinen Effekt auf den Anteil von TMRM low positiven und Annexin V-APC positiven Zellen. Lediglich bei jeweils 50 μM des EGFR-TKI kann in H1299 und A549 mittels FACS-Untersuchung >50 % Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 13). Allerdings findet sich in A549 bei Inkubation mit 50 μM GEFI nur ein sehr geringer Effekt auf Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺.



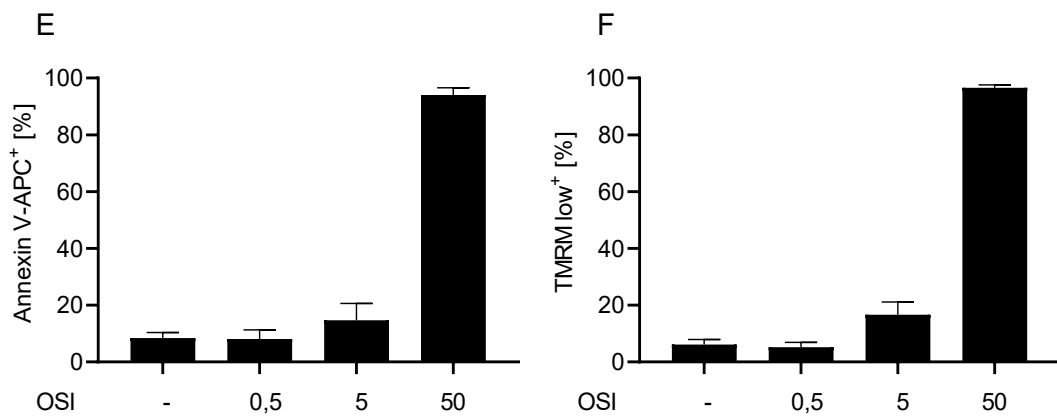
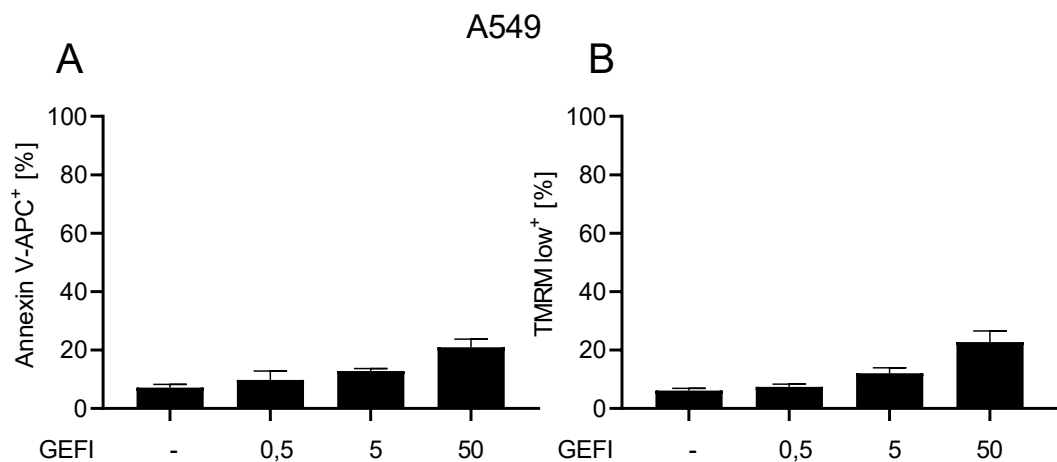


Abbildung 13 H1299: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Nach Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von EGFR-TKI über 24 h wurde der Anteil der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die EGFR-TKI (GEFI, AFA und OSI) wirkten besonders in höheren Konzentrationen [in μM] in einem unterschiedlichen Ausmaß; Mittelwert ± SD; n=3.

In der Konzentration von 50 μM zeigt GEF1 in A549 einen deutlich geringeren Anteil von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ positiven Zellen als bei der Inkubation mit AFA und OSI in gleicher Konzentration (jeweils ~50 % im Vergleich zu AFA und OSI 50 μM mit jeweils > 80 %) (vgl. Abbildung 14).

EGFR-TKI sollten in den EGFR-WT-Zelllinien H1299 und A549 keine oder nur eine sehr geringe Wirkung zeigen. Das trifft für 0,5 μM und 5 μM bei allen untersuchten EGFR-TKI zu. Bei 50 μM dagegen erfolgt eine Zelltodinduktion bei GEF1, AFA und OSI, eine selektive Zelltodinduktion ist in dieser hohen Konzentration somit nicht mehr gewährleistet.



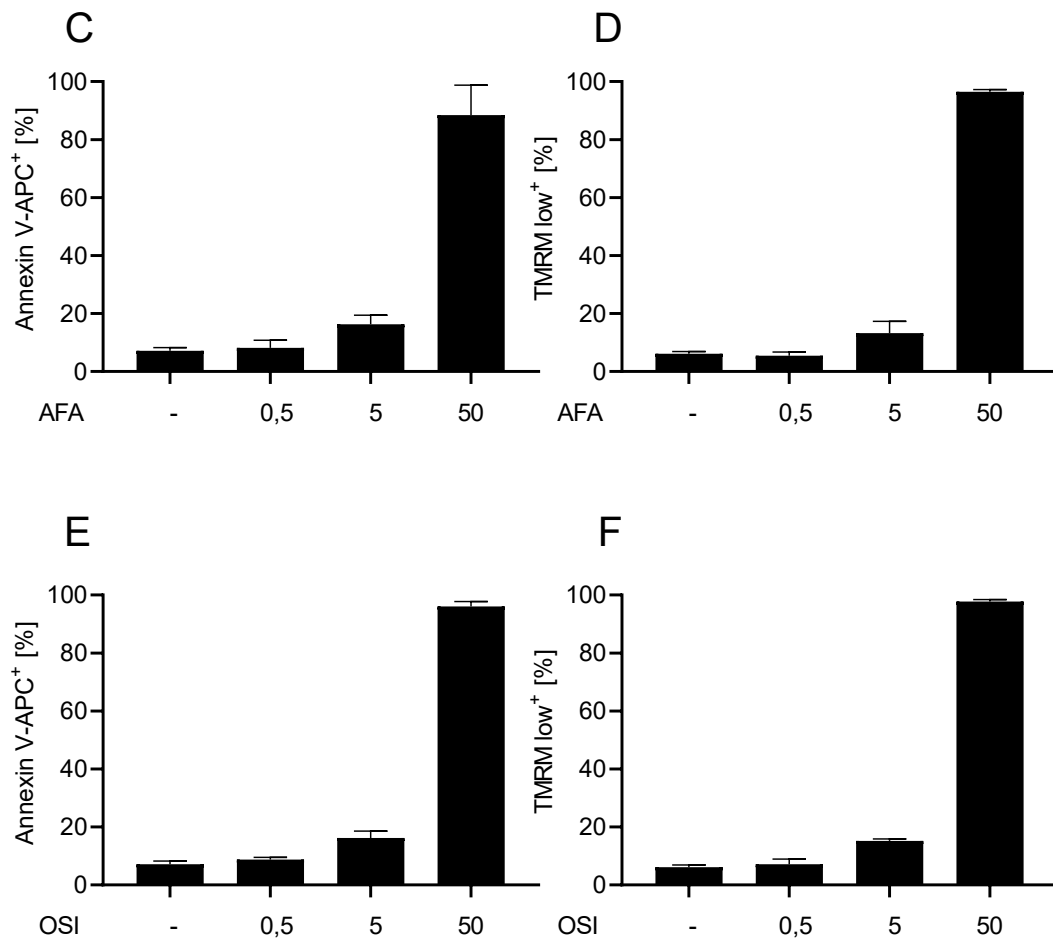


Abbildung 14 A549: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Nach Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen von EGFR-TKI über 24 h wurde der Anteil der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die EGFR-TKI (AFA und OSI) wirkten besonders in höheren Konzentrationen [in μ M]. GEF1 induziert mit 50 μ M nur einen geringen Anteil von TMRM low⁺ und Annexin V-APC⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwert \pm SD; n=3.

4.1.4 H1299 und A549: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Konzentrationsabhängig führt BTZ in den H1299 zu einer Zunahme der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen (Abbildung 15). Die Wirkung von BTZ auf den Anteil der TMRM low⁺ und Annexin V⁺ Zellen in der Konzentration 500 nM ist geringer als in der höchsten getesteten EGFR-TKI-Konzentration (50 μ M) (vgl. Abbildung 13, Abbildung 14).

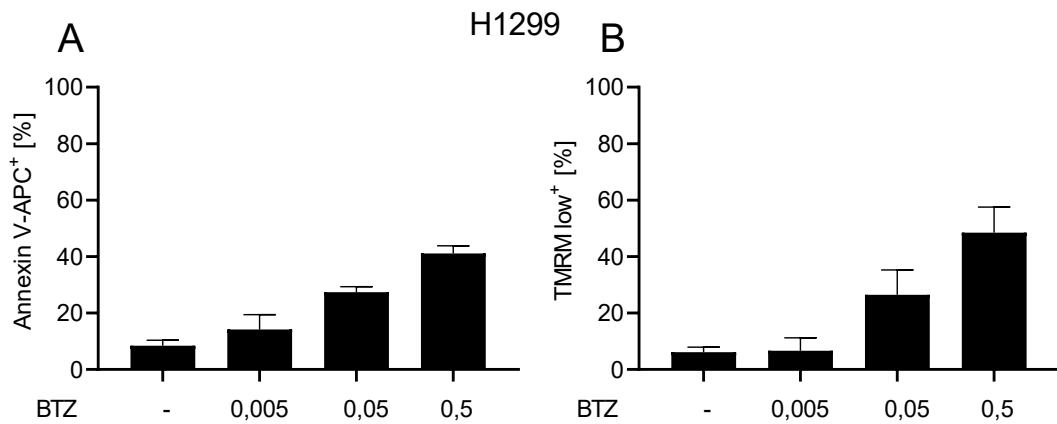


Abbildung 15 H1299: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie. Mit Zunahme der Konzentration zeigt sich eine Zunahme der Annexin V⁺ und TMRM low⁺ Zellen. Mittelwert ± SD; n=3.

Konzentrationsabhängig führt BTZ in A549 zu einer Zunahme der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen (*Abbildung 16*). Die Wirkung von BTZ in der höchsten Konzentration (500 nM) ist in A549 im Vergleich zu den H1299 deutlich ausgeprägter (~80 % vs. ~40 %). Der Anteil der TMRM low⁺ Zellen ist etwas geringer als der Anteil der Annexin V-APC⁺ Zellen.

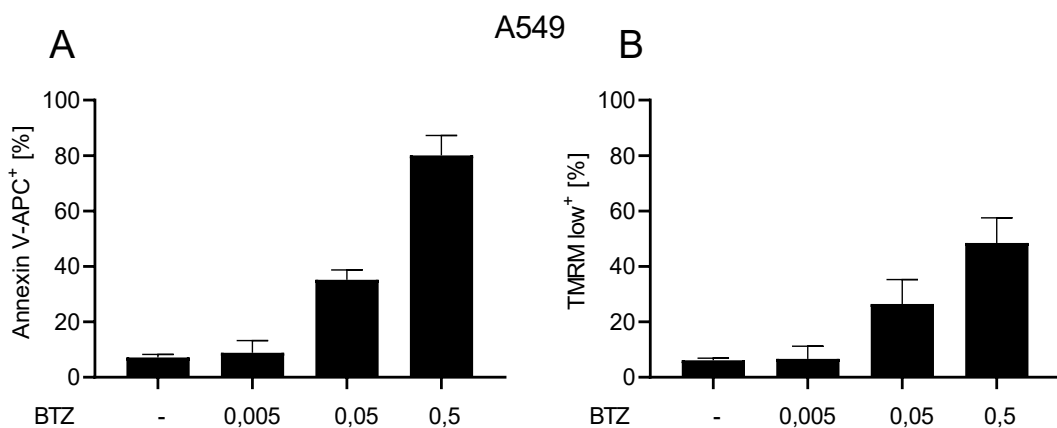


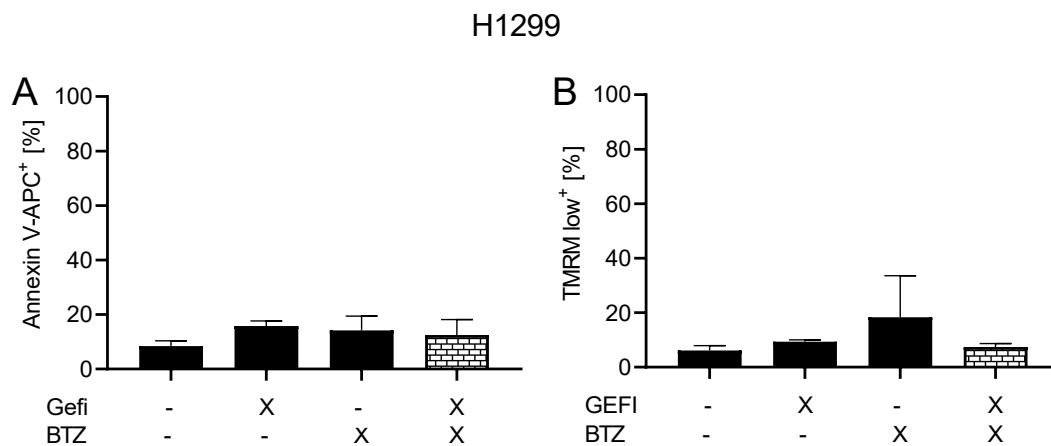
Abbildung 16 A549: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=3.

4.1.5 H1299 und A549: Kombination von PI und EGFR-TKI

In der Einzelinkubation von EGFR-TKI in H1299 und A549 zeigen sich in den selektiv an EGFR-Mutation bindenden Konzentrationen kein vermehrter Zelltod. BTZ dagegen kann in beiden Zelllinien mit 50 nM mehr Zelltod induzieren. Das wirft die Frage auf, ob eine kombinierte Anwendung der beiden unterschiedlich bindenden und wirkenden Wirkstoffe, ein vermehrten bzw. übermäßigen Zelltod in EGFR-WT-Zelllinien aufweisen kann, obwohl keine EGFR-Mutation vorliegt. Aufgrund der Ergebnisse zur Dosisabhängigkeit der Inkubation mit EGFR-TKI und BTZ werden die folgenden Untersuchungen mit 5 µM EGFR-TKI und 5 nM BTZ durchgeführt.

In der Kombination der 3 EGFR-TKI (in der jeweiligen Konzentration von 5 µM) mit BTZ (5 nM) kann bei den H1299 mittels FACS-Untersuchung kein erhöhter Anteil von Annexin V-APC⁺ Zellen festgestellt werden (*Abbildung 17*).

In den A549 kann auch keine vermehrte Zelltodinduktion induziert werden. Es zeigt sich in der Kombination von BTZ mit einem EGFR-TKI im Vergleich zur isolierten Inkubation mit BTZ und den EGFR-TKI sogar geringere Anteile von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen (*Abbildung 18*).



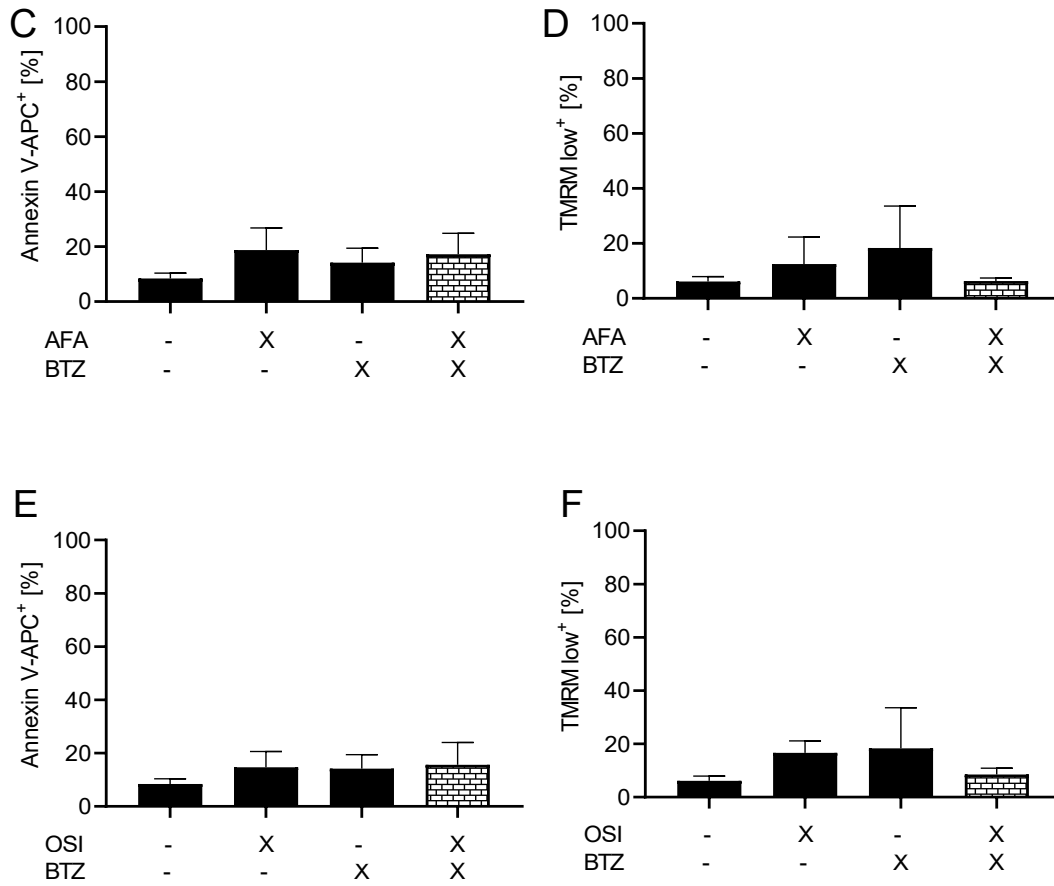
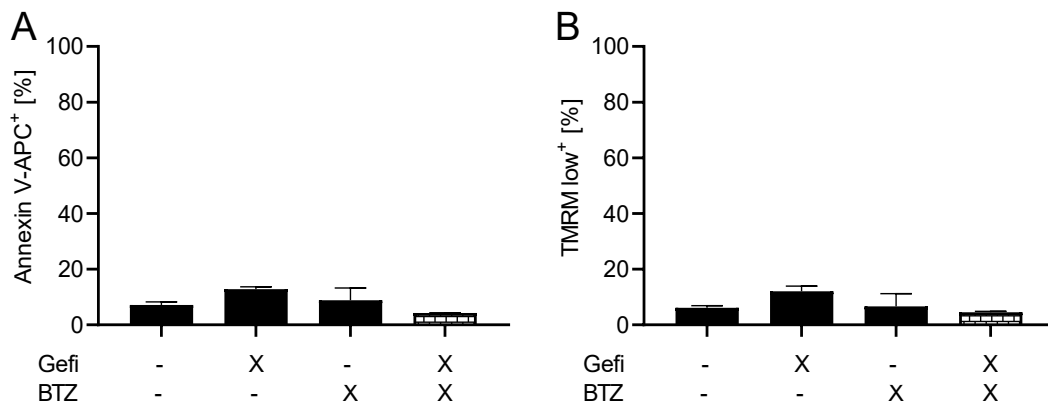


Abbildung 17 H1299: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie. Es findet sich keine Zunahme der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen durch kombinierte Inkubation; Mittelwert \pm SD; n=3.

A549



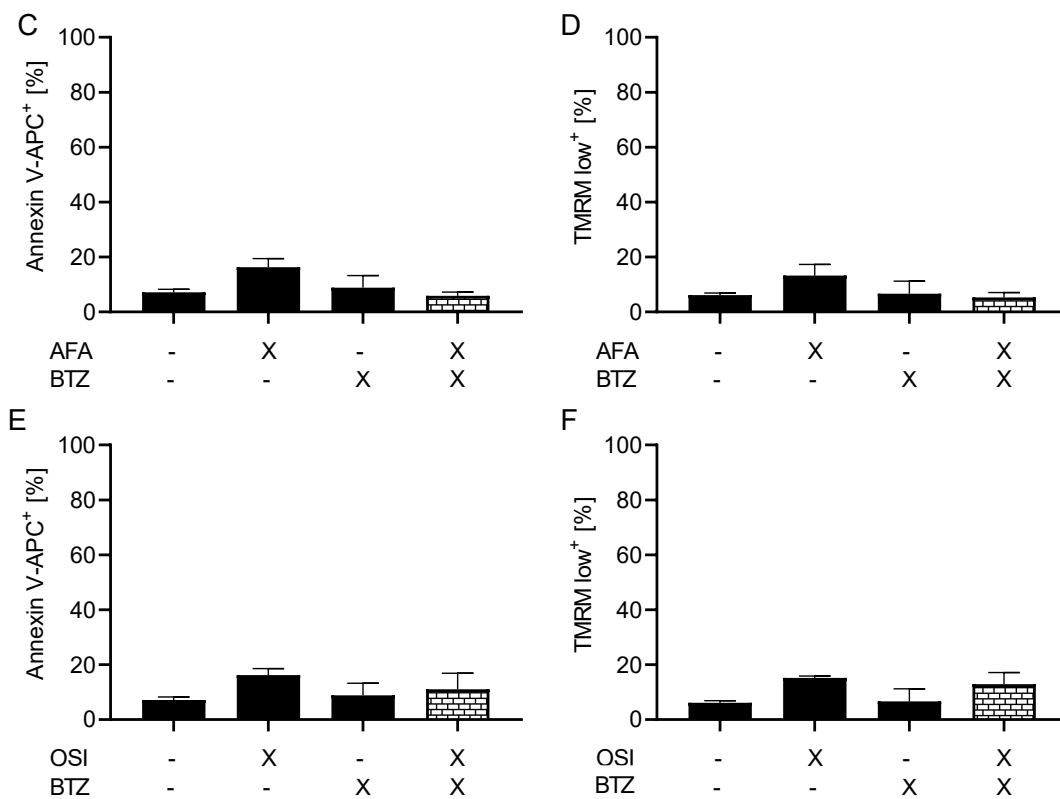


Abbildung 18 A549: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie. Es findet sich keine Zunahme der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen durch kombinierte Inkubation; Mittelwert \pm SD; n=3

4.2 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827Mai)

In den EGFR-WT-Zelllinien H1299 und A549 zeigt die Inkubation mit EGFR-TKI keinen vermehrten Zelltod. Die EGFR-TKI wurden jedoch für Tumoren mit einer aktivierenden EGFR-Mutation entwickelt. Wegen dieser anzunehmenden selektiven Zelltodinduktion durch EGFR-TKI in EGFR-mutierten Zellen wurden im Folgenden ausschließlich NSCLC-Zelllinien mit einer aktivierenden EGFR-Mutation für jeweils 24 h mit EGFR-TKI verschiedener Generationen inkubiert und mittels Durchflusszytometrie die Anteile von Annexin V-APC und TRMR low positiven Zellen bestimmt. Um die Wirkung von Proteasominhibitoren auf EGFR-mutierte NSCLC Zelllinien zu untersuchen, wird die NSCLC EGFR-mutierten Zelllinien auch mit BTZ über 24 h inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen

der Wirkstoffe sind identisch wie bei den Versuchen mit den EGFR-WT-Zelllinien. Um die Wirkung der kombinierten Inkubation von EGFR-TKI und BTZ zu sehen, werden alle in Kombination verwendeten Wirkstoffe auch in der Einzelinkubation untersucht. Die HCC827 weist eine EGFR-Exon 19 Treibermutation (19del) auf.

4.2.1 Lichtmikroskopische Aufnahme HCC827Mai

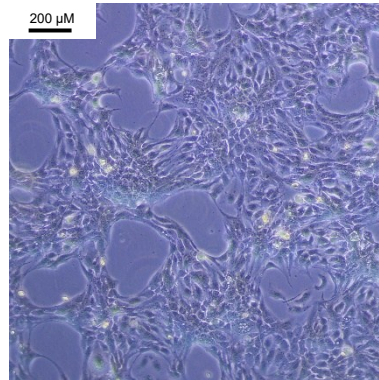


Abbildung 19 Zelllinie HCC827Mai in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~70 %

Die Zelllinie HCC827Mai zeigt unter Kontrollbedingungen lange spindelförmige Ausläufer zu benachbarten Zellen. Sie bilden eine Art Brücke zwischen den verschiedenen Zellhaufen und wachsen stark konfluierend.

4.2.2 HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Die Inkubation der EGFR-mutierten Zelllinie HCC827Mai mit der Exon 19 Treibermutation (19del) mit den EGFR-TKI GEFI, AFA und OSI für 24 h führt konzentrationsabhängig zu einer Zunahme von Annexin V-APC positiven Zellen und TMRM low gefärbten Zellen in der FACS (*Abbildung 20*).

Bei der höchsten eingesetzten Konzentration (d.h. bei jeweils 50 µM des EGFR-TKI) kann bei allen EGFR-TKI mittels FACS-Untersuchungen >50 % Annexin V-APC positive Zellen und TMRM low gefärbte Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 20*). Auffällig ist, dass bei der Inkubation mit GEFI (als Erstgenerations EGFR-TKI) in der höchsten Konzentration (50 µM) im Vergleich zu AFA und OSI nur ein sehr geringer Effekt auf Annexin V-APC⁺ (ca. 60 %) und TMRM low⁺ (ca. 55 %) zu beobachten ist. Dagegen finden sich bei AFA und OSI >90 % Annexin V und TMRM low positive Zellen.

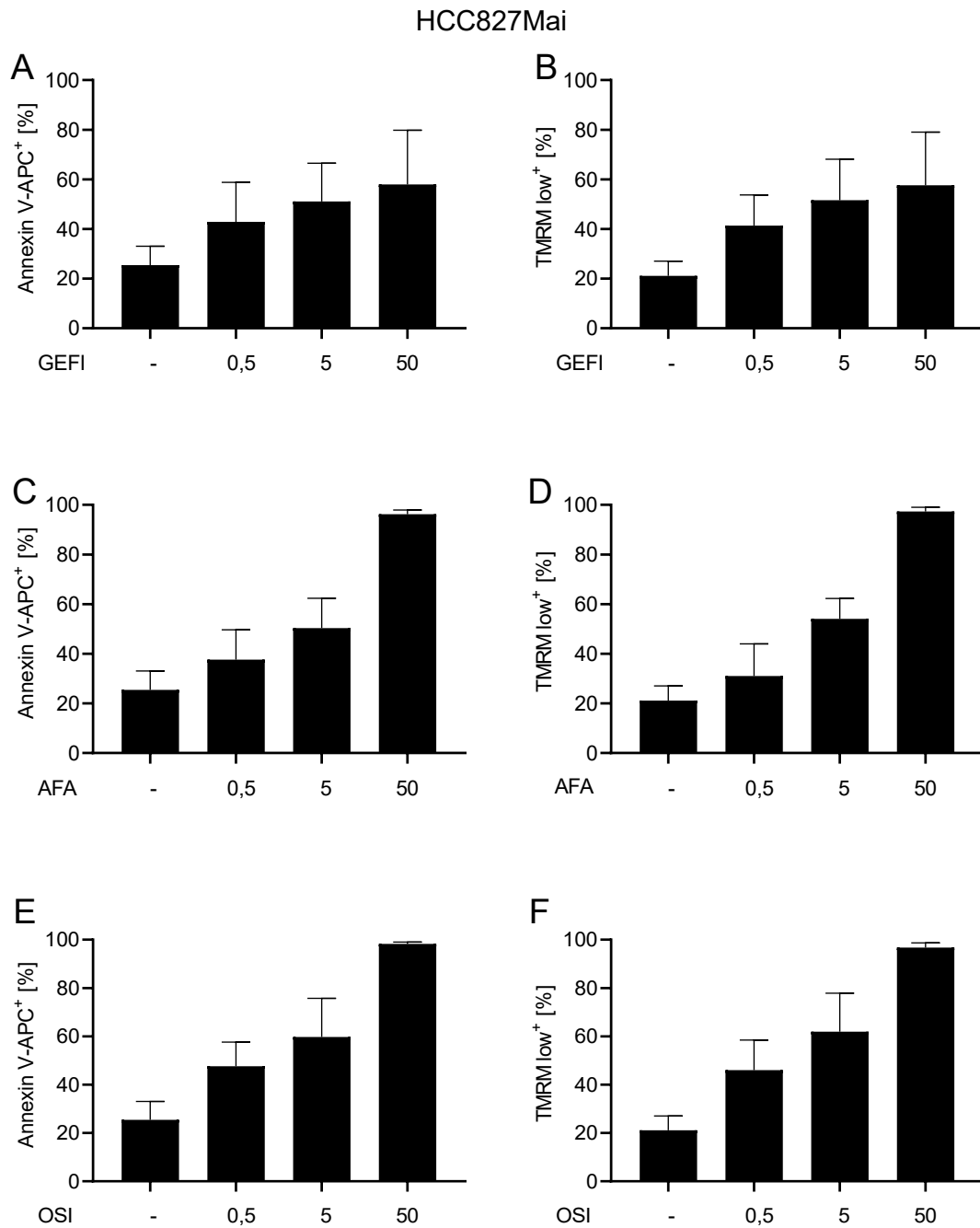


Abbildung 20 HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=4.

4.2.3 HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Eine 24-stündige Inkubation mit BTZ (Abbildung 21) führt bei Konzentrationen von 50 nM und 500 nM bei HCC827Mai zu ähnlichen Anteilen (von 60-80 %) von Annexin V-APC⁺ Zellen und TMRM low⁺ Zellen.

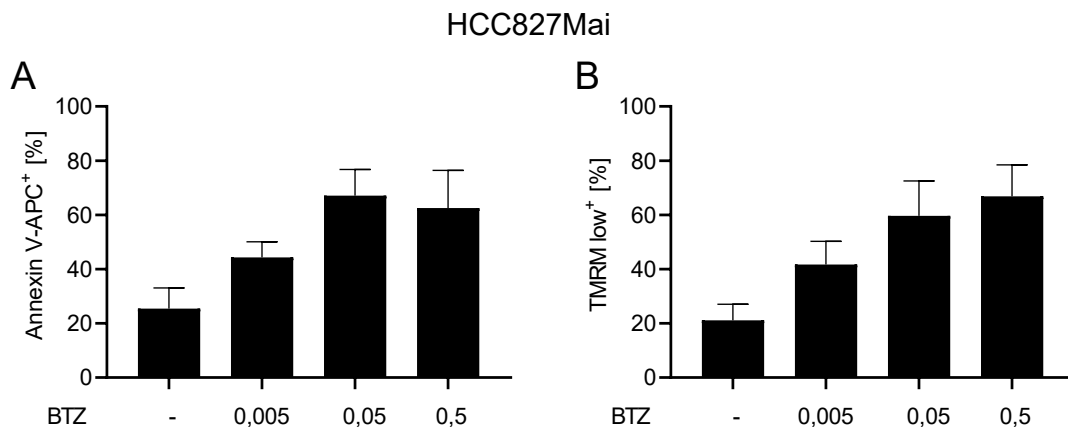


Abbildung 21 HCC827Mai: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4.

4.2.4 HCC827Mai: Kombination von BTZ und EGFR-TKI

Die Kombination wird mit 5 nM BTZ mit jeweils einem der 3 EGFR-TKI mit einer Konzentration von 5 μ M durchgeführt. Nach 24 h Inkubation kann bei den HCC827Mai kein signifikant erhöhter Anteil von Annexin-V APC⁺ Zellen festgestellt werden. Es werden ähnlich große Anteile von Annexin-V APC positiven Zellen in der kombinierten Inkubation im Vergleich zu den Einzelinkubationen mit RKI und BTZ gefunden (Abbildung 22). Ein additiver Effekt der Wirkstoffe auf die in Einzelinkubation beobachtete Zelltodinduktion bleibt bei der kombinierten Anwendung aus.

HCC827Mai

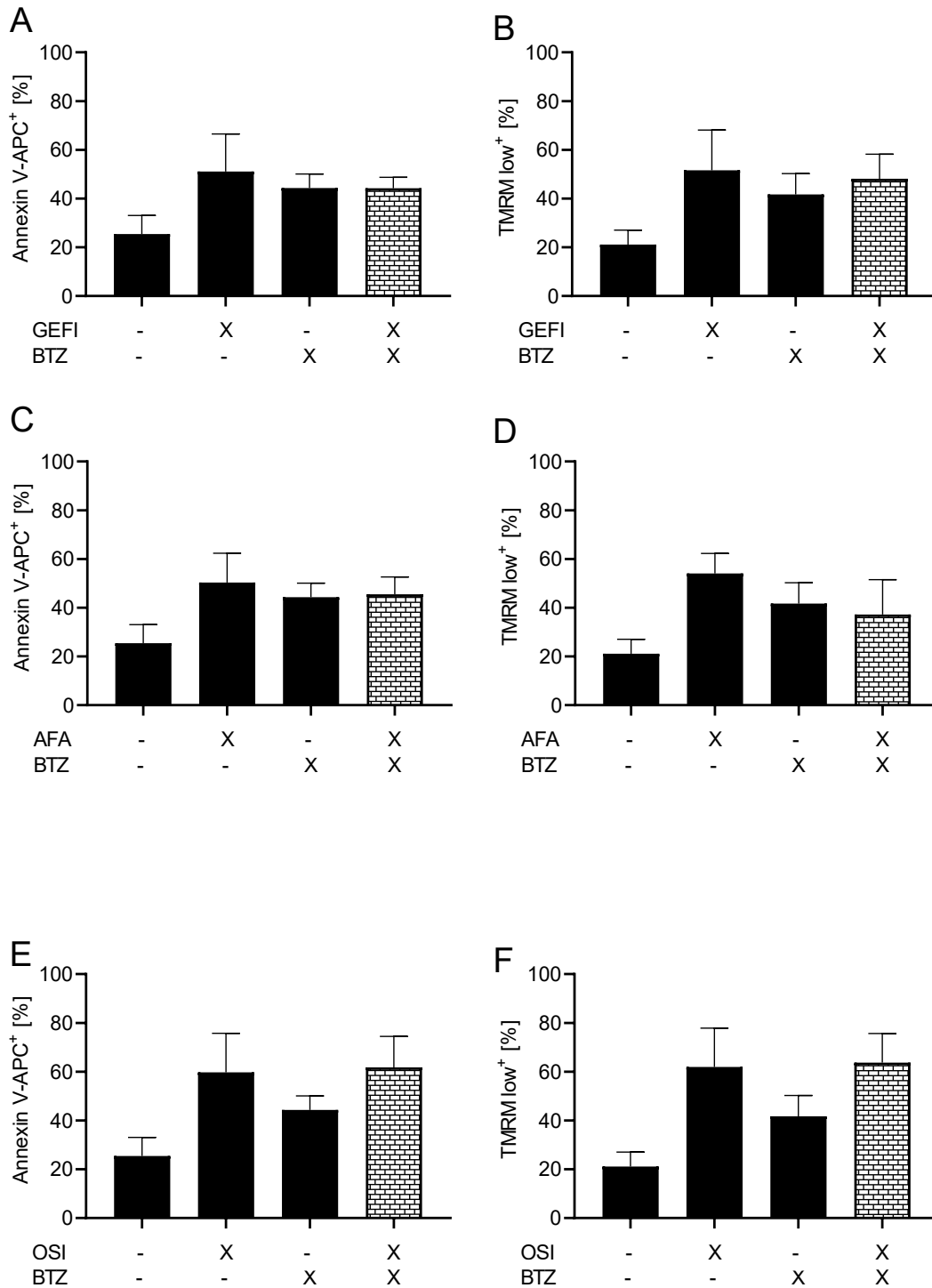


Abbildung 22 HCC827Mai: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Es findet sich keine Zunahme der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen durch kombinierte Inkubation; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.3 Etablierung einer Osimertinib-resistenten Zelllinie aus HCC827Mai

Der Versuch, eine Osimertinib-resistente Zelllinie aus der HCC827Mai WT Zelllinie durch die Dauerexposition und im Verlauf einer geplanten Erhöhung der Konzentration von OSI im Medium zu etablieren, verlief frustant. Unter der dauerhaften Inkubation mit OSI in einer gleichbleibenden Konzentration von 1 μM entwickeln sich Zellen, die sich morphologisch von der Ursprungszelllinie unterscheiden. Ein Teil der Zellen wächst sehr im Cluster konfluierend und dicht, ein anderer Teil wächst dagegen spindelförmiger und länglicher und die einzelnen Zellen werden größer (*Abbildung 23*). Das Zellwachstums in der Kultur ist sehr gering, sodass ein wöchentliches Passagieren der Zellen nicht nötig ist. Nach wenigen Wochen wachsen die Zellen allerdings nicht mehr adhären. Versuche, die Zelllinie mit niedrigeren Konzentrationen von OSI ($<1\mu\text{M}$) zu etablieren, führen auch zu diesem Phänotyp, d.h. einen Verlust der Adhärenz und eine fehlende Proliferation.

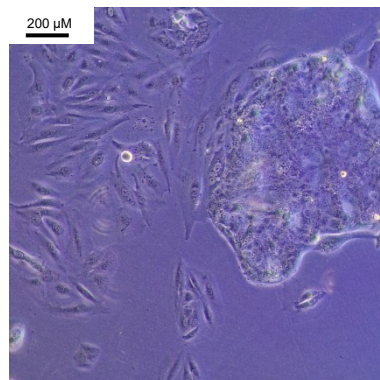


Abbildung 23 Zelllinie HCC827Mai bei der dauerhaften Inkubation mit 1 μM OSI über 4 Wochen in der Lichtmikroskopie.

4.4 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827WT)

Die Zelllinie HCC827WT soll sich von der HCC827Mai Zelllinien nicht unterscheiden, da die beiden Zelllinien dem gleichen Ursprung entstammen.

Die Universität Kent hat verschiedene Zelllinien mit verschiedenen Resistenzen etabliert. Dabei hat sie aus der HCC827WT-Zelllinie auch eine ERLO resistente Zelllinie durch die Dauerinkubation mit ERLO etabliert. Die HCC827WT ist somit die parentale Zelllinie zu der HCC827KenErl.

Auch diese Zelllinie wurde für jeweils 24 h mit EGFR-TKI verschiedener Generationen inkubiert und mittels Durchflusszytometrie die Anteile von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen bestimmt. Um die Wirkung von Proteasominhibitoren auf EGFR-mutierte NSCLC-Zelllinien zu untersuchen, wird die HCC827WT auch mit BTZ über 24 h inkubiert. Die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe und das Vorgehen sind identisch wie bei den vorangegangenen Versuchen.

4.4.1 Lichtmikroskopische Aufnahme HCC827WT

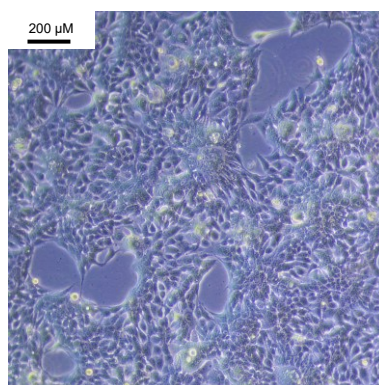


Abbildung 24 Zelllinie HCC827WT in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~90 %.

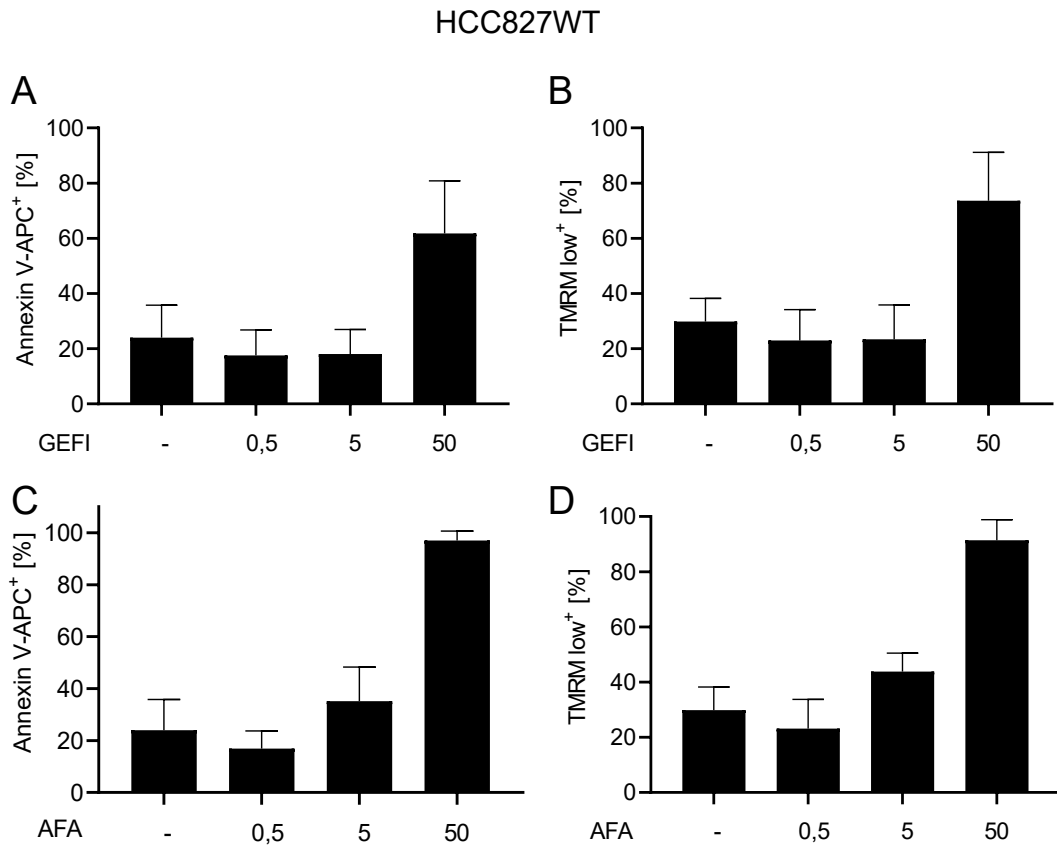
Die Morphologie der Zelllinie gleicht der HCC827Mai (vgl. *Abbildung 19*). Die Zellen zeigen in der Dauerkultur (ohne EGFR-TKI und PI-Gabe) lange spindelförmige Ausläufer zu benachbarten Zellen, sind insgesamt eher kleiner und bilden eine Art Brücke zwischen den verschiedenen Zellhaufen und wachsen stark konfluierend.

4.4.2 HCC827WT: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf Expression von Annexin V und TMRM

Bei der Inkubation der EGFR-mutierte Zelllinie HCC827WT mit der Exon 19 Mutation mit GEFI für 24 h führt dies in den Konzentrationen von 0,5 μM und 5 μM zu einem ähnlichen Anteil von Annexin V-APC positiven und TMRM low positiven Zellen wie in der Kontrolle. Ausschließlich bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 μM GEFI wird ein signifikant höherer Anteil von APC-V positiven und TMRM low positiven Zellen bei der FACS-Messung detektiert.

Bei der Inkubation mit AFA und OSI in der Konzentration 5 μM EGFR-TKI werden mehr Annexin positive Zellen und TMRM low positive Zellen gemessen als im Vergleich zur Kontrolle (jeweils 35 % vs. 20 %). Dagegen zeigt sich bei der Konzentration von 0,5 μM AFA bzw. OSI ein ungefähr gleich großer Anteil von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle (~20 %).

Lediglich bei der höchsten getesteten Konzentration (d.h. bei jeweils 50 μM des EGFR-TKI) kann bei GEF1 ein Anteil von 50 % Annexin V-APC positiven Zellen nachgewiesen werden. Bei den beiden weiteren EGFR-TKI können >90 % Annexin V-APC positive Zellen und TMRM low gefärbten Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 25*).



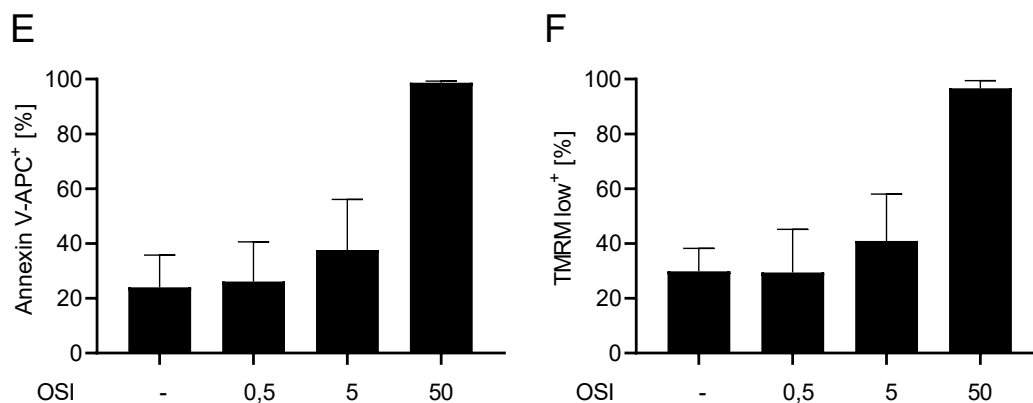


Abbildung 25 HCC827WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.4.3 HCC827WT: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf Expression von Annexin V und TMRM

Eine 24-stündige Inkubation mit BTZ führt bei Konzentrationen von 50 nM und 500 nM bei der HCC827 Zelllinie zu ähnlichen Anteilen von Annexin V-APC⁺ Zellen von 60-80 % und TMRM low⁺ Zellen (*Abbildung 26*). Bei der Konzentration von 5 nM BTZ zeigen sich Annexin V-APC positive und TMRM low positive Zellen in einem ähnlichen Anteil wie in der Kontrolle.

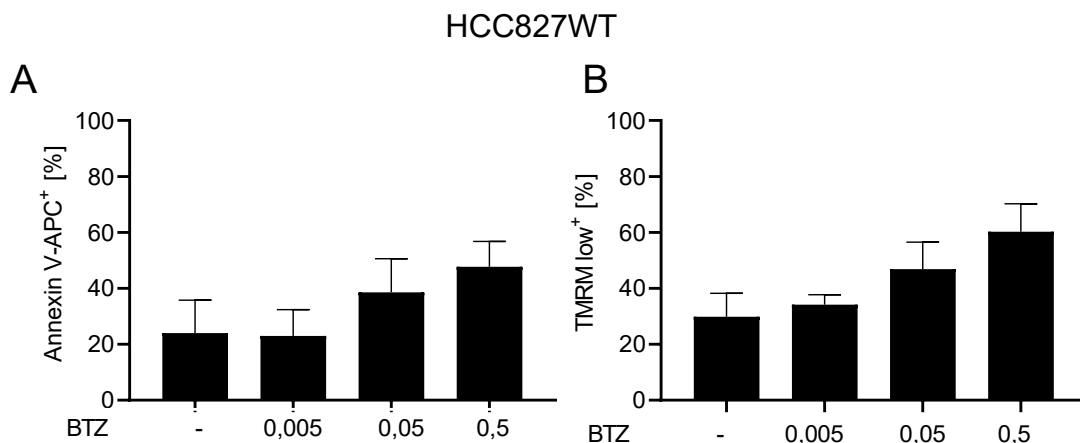
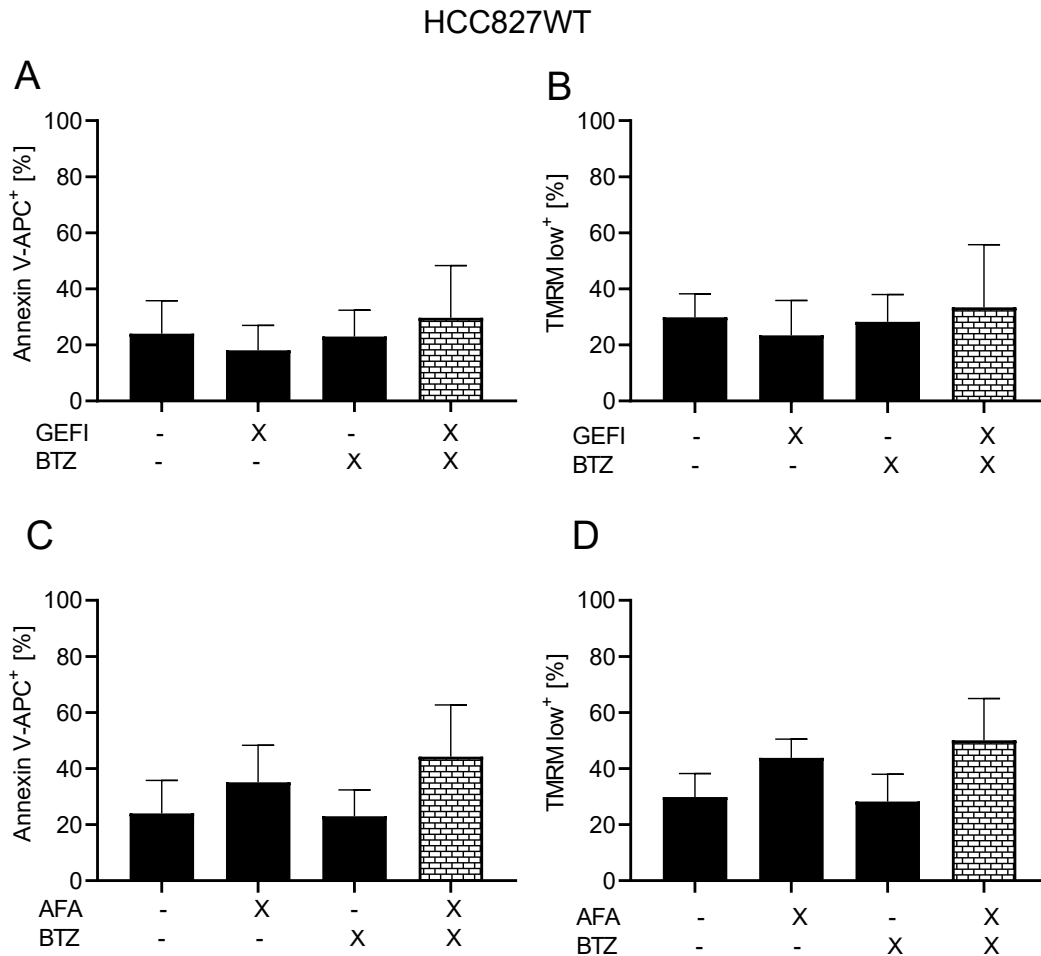


Abbildung 26 HCC827WT: Einfluss der dosisabhängigen isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.4.4 HCC827WT: Kombination von PI und EGFR-TKI

In der Kombination der 3 EGFR-TKI mit Bortezomib, wobei hier aufgrund der Ergebnisse der vorherigen Untersuchungen die Konzentration 5 μ M für die EGFR-TKI und 5 nM für BTZ verwendet wird, kann nach 24 h Inkubation bei den HCC827 kein signifikant erhöhter Anteil von Annexin V-APC⁺ Zellen festgestellt werden (Abbildung 27).



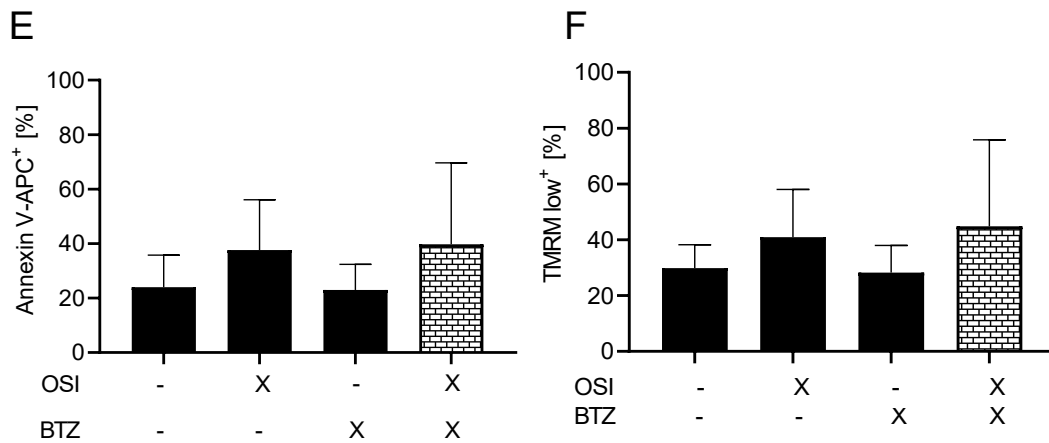


Abbildung 27 HCC827WT: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.5 Vergleich der HCC827Mai und der HCC827WT

Bei einer externen molekulargenetischen Analyse wird bestätigt (Benjamin Schäfer, persönliche Mitteilung), dass es sich bei diesen beiden Zelllinien um die Zelllinie HCC827 handelt. Die Ergebnisse aus der FACS-Untersuchung zeigen Unterschiede bei den Anteilen der Annexin V-APC positiven Zellen.

In den FACS-Messungen zeigen beide Zelllinien in der Kontrolle ungefähr den gleichen Anteil an Annexin V-APC positiven Zellen. Bei der Inkubation mit den EGFR-TKI unterschieden sich die Ergebnisse in den Konzentrationen 0,5 μ M und 5 μ M (Mai zw. ~40-50 %, WT ~20-30 %) bei der höchsten getesteten Konzentration zeigen die beiden Zelllinien dagegen wieder einen ähnlichen Anteil an Annexin V-APC⁺ Zellen (> 80%). Auffallend bei der Konzentration von 50 μ M ist, dass bei GEF1 der gleiche Anteil an Annexin V-APC⁺ Zellen in beiden Zelllinien besteht (~60 %), in den anderen Konzentrationen von GEF1 unterscheiden sich die Anteile (~20 % WT vs. ~40-50 % Mai).

Auffällig ist darüber hinaus in beiden Zelllinien, dass bereits in der Kontrolle ~30 % Annexin V positive Zellen vorhanden sind (*Abbildung 28*).

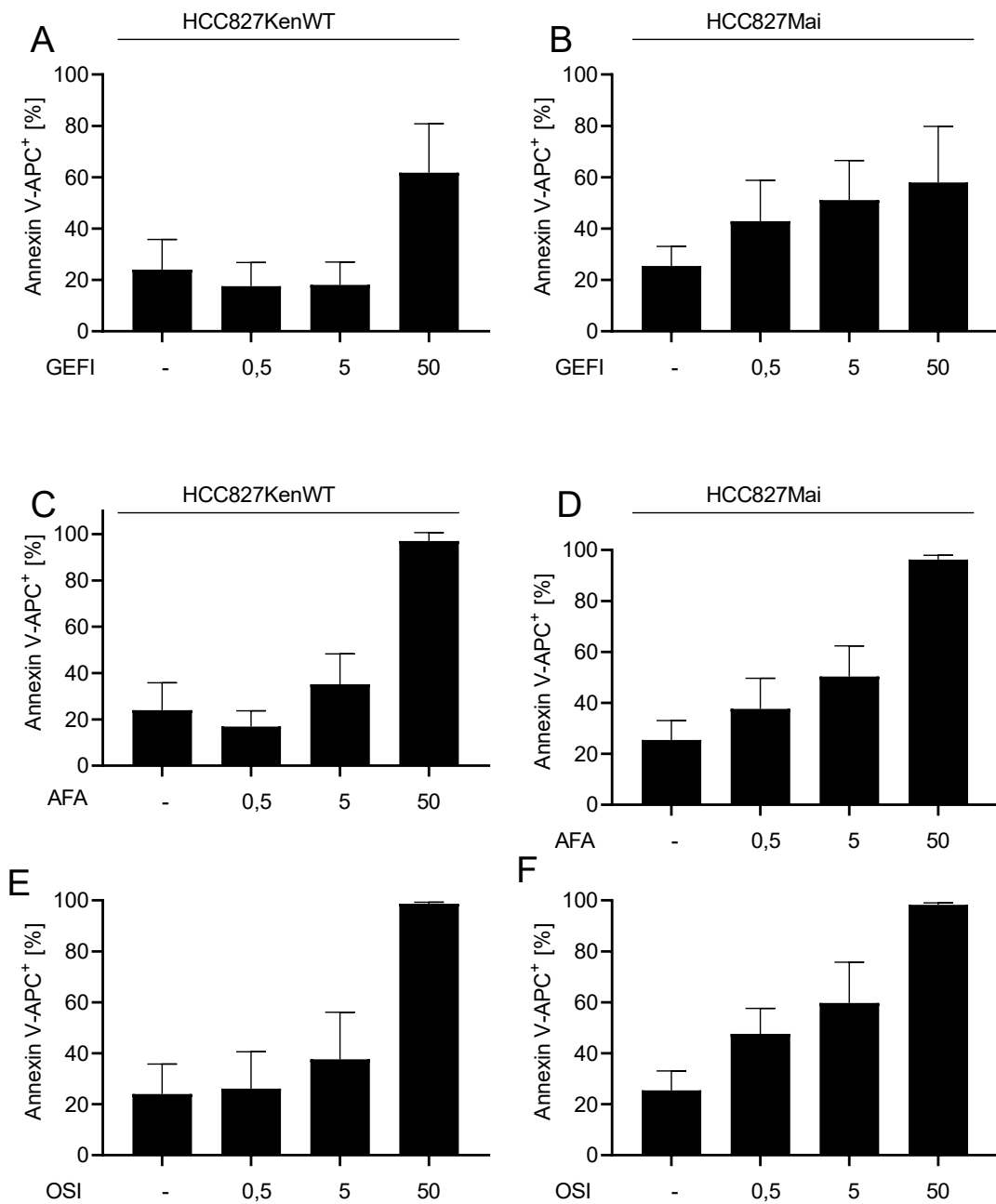


Abbildung 28 HCC827WT und HCC827Mai: Vergleich der EGFR-TKI Gabe nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

Bei der kombinierten Inkubation mit EGFR-TKI und BTZ zeigen sich trotz Unterschieden in der Einzelinkubation von BTZ und AFA in beiden Zelllinien gleiche Anteile (~50 %) von Annexin V positiven Zellen (Abbildung 29). Dagegen unterscheiden sich die Ergebnisse der Kombinationsbehandlungen aus GEFI+BTZ

und OSI+BTZ. Die Anteile der apoptotischen Zellen sind in den HCC827WT geringer.

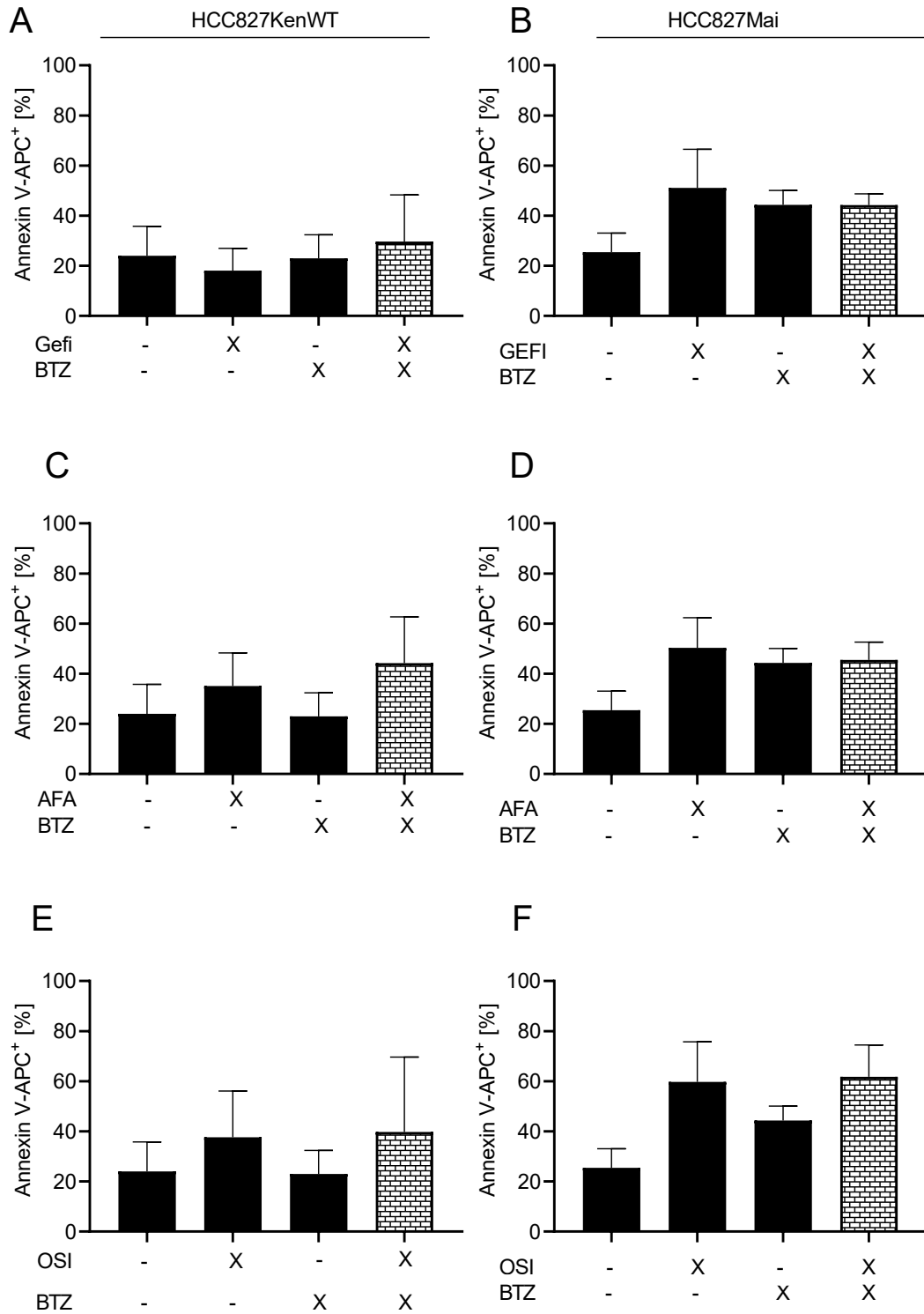


Abbildung 29 HCC827WT und HCC827Mai: Vergleich der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

Die HCC827Mai zeigen in allen getesteten Konzentrationen von BTZ einen höheren Anteil von Annexin V positiven Zellen als bei HCC827WT (20-40 % vs. 40-60%) (Abbildung 30). Die Wirkung von BTZ in der höchsten Konzentration (500 nM) ist in den HCC827WT geringer (~40 %) als in den HCC827Mai (~60 %).

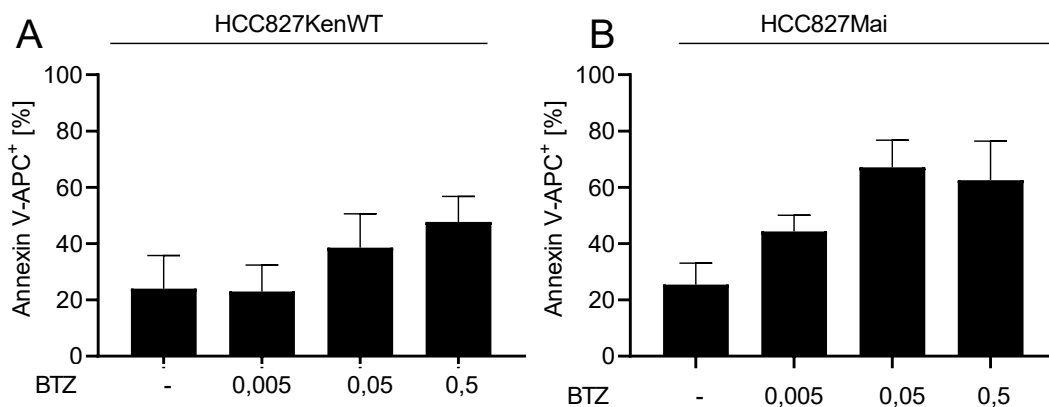


Abbildung 30 HCC827KenWT und HCC827Mai: Vergleich des dosisabhängigen Einflusses der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.5.1 Lichtmikroskopische Aufnahme der HCC827WT während der Etablierung der Osimertinibresistenz

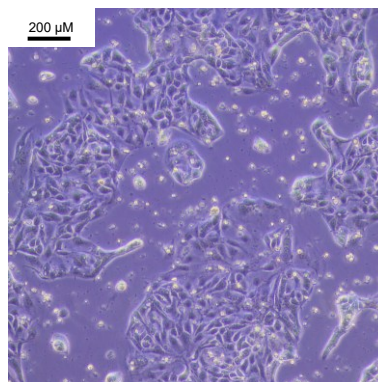


Abbildung 31 Zelllinie HCC827WT bei der Etablierung einer OSI resistenten Zelllinie durch dauerhafte Inkubation mit OSI in der Lichtmikroskopie.

Die versuchte Etablierung einer OSI resistenten Zelllinie durch eine Konzentration von 0,1 μM OSI in der Dauerkultur verlief frustan. *Abbildung 31* zeigt einen repräsentativen Ausschnitt bei einem Versuch der Etablierung dieser Zelllinie. Man sieht bereits sehr viele abgelöste Zellen und Zellfragmente, nach weiteren Tagen bis Wochen lösen sich alle Zellen ab. Dieses Verhalten der Zellen zeigt sich stets auch bei erneuten Ansätzen. Damit ist die Etablierung einer OSI resistenten Zelllinie wie auch bei den HCC827Mai in den HCC827WT frustan.

4.6 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827Erl)

4.6.1 Lichtmikroskopische Aufnahme HCC827Erl

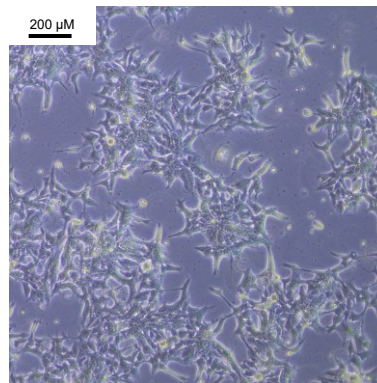


Abbildung 32 Zelllinie HCC827Erl in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~40 %.

Die Zellen wachsen im Vergleich zu ihrer Wildtyp-Zelllinie sternförmiger und gitterartiger in der Dauerkultur (ohne EGFR-TKI- und PI-Gabe). Sie zeigen längere Ausläufer als ihre parentalen Zellen. Insgesamt sind Zellkörper eher kleiner und sie wachsen in Haufen.

4.6.2 HCC827Erl: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Diese Zelllinie zeigt bereits in der Kontrolle fast 30 % Annexin V-APC positiven Zellen (*Abbildung 33*).

Eine Inkubation mit GEFI, AFA oder OSI für 24 h in aufsteigender Konzentration zeigt keinen konzentrationsabhängigen Anstieg der Annexin V-APC positiven Zellen bei den Konzentrationen 0,5 μM und 5 μM , der Anteil der TMRM low positiven Zellen bewegt sich in Höhe der Kontrolle. Ausnahme bildet der Anteil an

TMRM low positiven Zellen bei der 24-stündigen Inkubation mit 5 μ M Osimertinib. Die jeweils höchste getestete Konzentration von EGFR-TKI (50 μ M) führt bei allen drei EGFR-TKI zu einem Anteil von >60 % Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass eine Resistenz gegen das Erstgenerations-EGFR-TKI Gefitinib besteht, aber darüber hinaus auch eine Resistenz gegen AFA als Zweitgenerations-EGFR-TKI und eine eingeschränkte Resistenz gegenüber OSI als Drittgenerations-EGFR-TKI besteht.

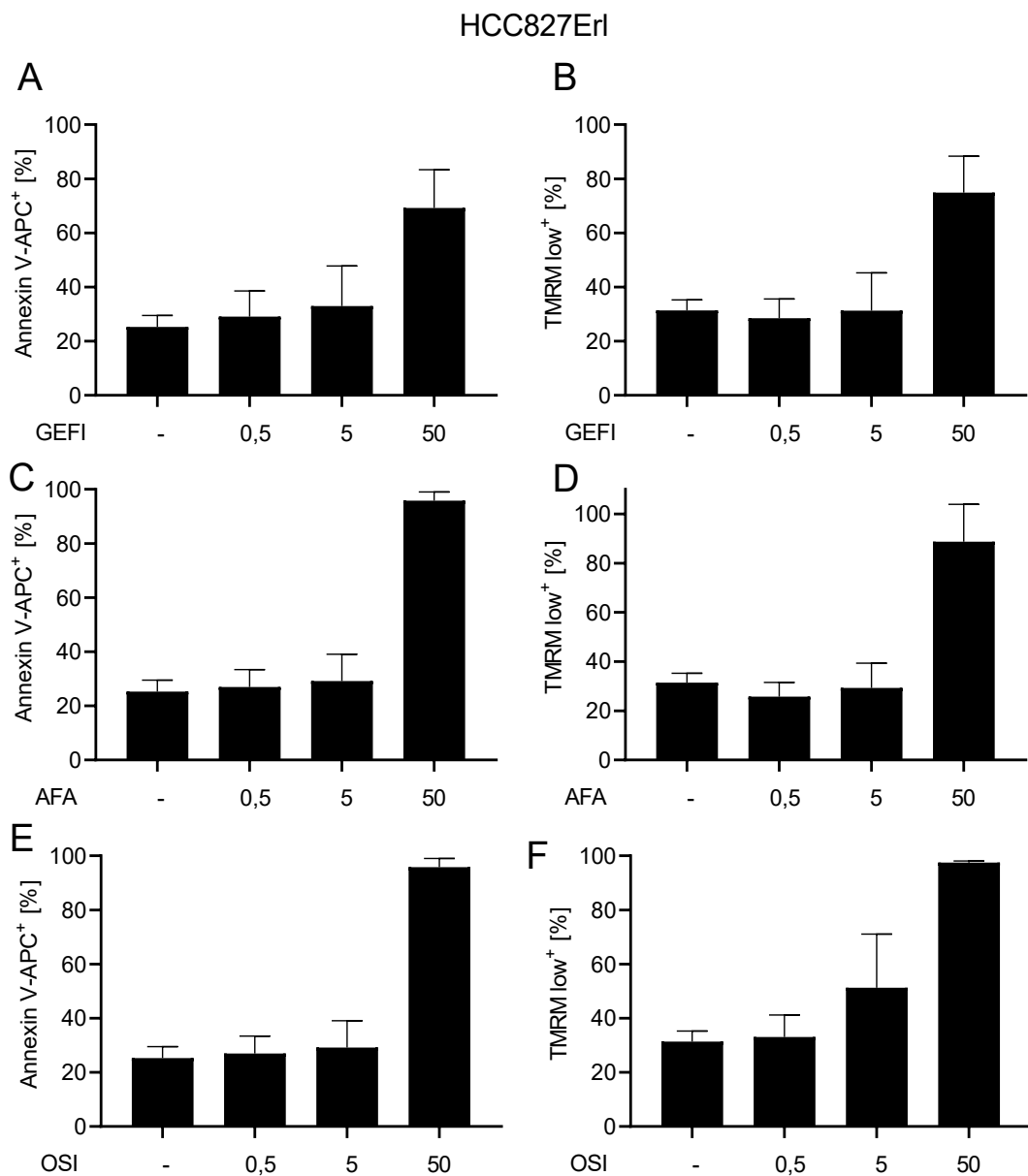


Abbildung 33 HCC827ErI: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von

EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.6.3 HCC827Erl: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Konzentrationsabhängig führt BTZ zu einer Zunahme der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen. Die Wirkung von BTZ in der höchsten Konzentration (500 nM) ist geringer als in der höchsten getesteten EGFR-TKI-Konzentration (Abbildung 34).

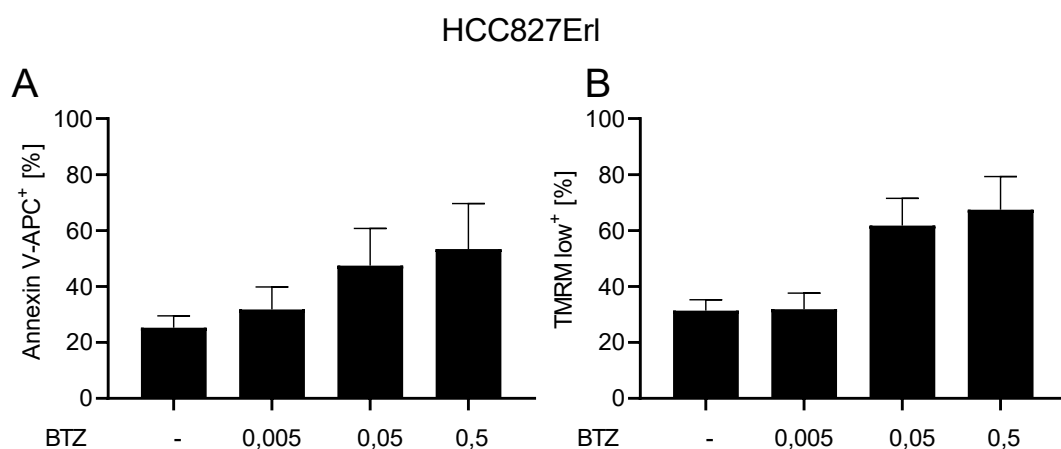


Abbildung 34 HCC827Erl: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ-Inkubation (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.6.4 HCC827Erl: Kombination von PI und EGFR-TKI

In der Kombination der 3 EGFR-TKI mit Bortezomib, wobei hier aufgrund der Titrationsreihen die Konzentration 5 μ M für die EGFR-TKI und 5 nM für BTZ verwendet wurden, kann nach 24 h Inkubation bei den HCC827Erl kein signifikant erhöhter Zelltod festgestellt werden.

Nach 24 h Inkubation zeigt sich bei der Inkubation von GEFI+BTZ mehr Annexin V positive Zellen (~60 %) als bei der isolierten Inkubation mit GEFI (~30 %) oder BTZ (~30 %). Auch bei AFA zeigt sich nach der kombinierten Inkubation mit BTZ ein größerer Anteil von Annexin V und TMRM low positiven Zellen (~60 %) als bei der alleinigen Inkubation mit AFA (~25 %) oder BTZ (~30 %) (Abbildung 35).

Auch die kombinierte Inkubation von OSI und BTZ zeigt mehr Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen (~60 %) als die Einzelinkubation mit dem EGFR-TKI OSI (~25 %).

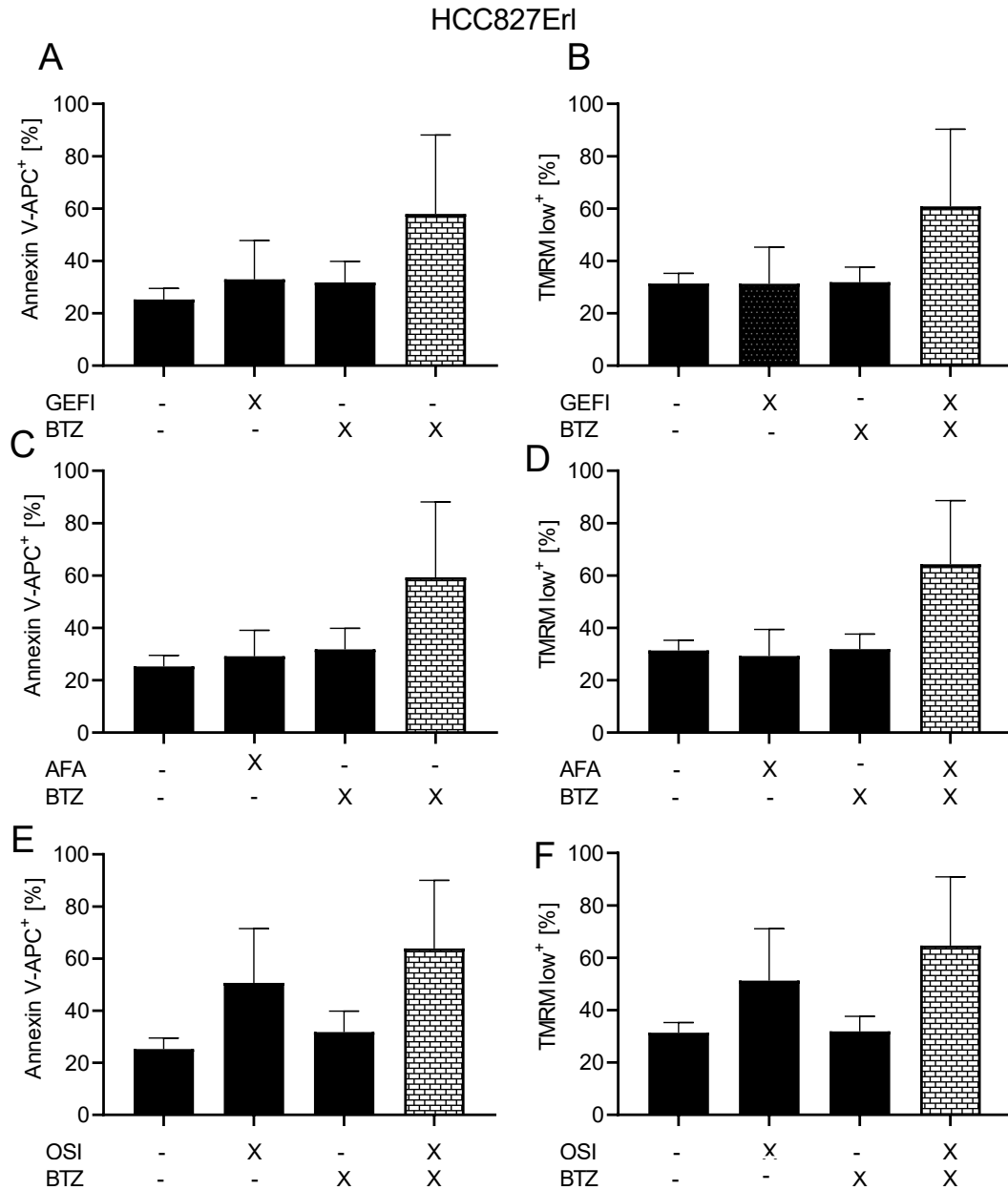


Abbildung 35 HCC827Erl: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.7 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC827ErIosi)

4.7.1 Lichtmikroskopische Aufnahme der HCC827ErI bei der Etablierung einer Osimertinibresistenz

Die Etablierung einer Osimertinib-resistenten Zelllinie aus der bereits ERLO-resistenten HCC827 Zelllinie stellt sich herausfordernd dar, obwohl die HCC827ErI sich bereits gegenüber einer Behandlung mit OSI weniger sensibel zeigt als ihre parentale HCC827WT Zelllinie. Bei einer Hinzugabe von OSI zum Medium für die Dauerkultur (1 μM) gruppieren sich die Zellen in sehr dichten Zellclustern und Haufen, werden sehr klein und wachsen in den Raum, statt auf dem Boden der Zellkulturflaschen. Die Zellen gruppieren sich als Inseln, die keine oder nur sehr wenige Ausläufer zu anderen Inseln ausbilden (*Abbildung 36*). Darüber hinaus teilen sich die Zellen in einer Zellkulturflasche so zahlreich, dass das Medium innerhalb von 24 h verbraucht ist.

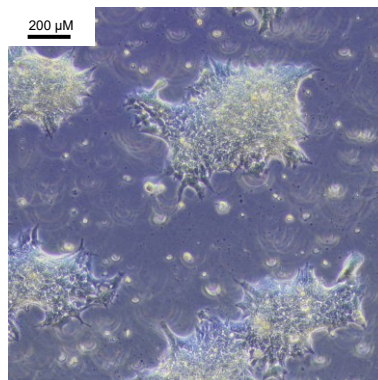


Abbildung 36 Zelllinie HCC827ErIosi in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~50 %.

4.7.2 HCC827ErIosi: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Bei der Inkubation mit dem Erstgeneration EGFR-TKI GEFI und dem Zweitgeneration EGFR-TKI AFA zeigt sich bei 0,5 μM und 5 μM kein größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen und TMRM low positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle (~30 %). Allein 50 μM zeigt bei beiden EGFR-TKI einen Annexin V-APC positiven Anteil von mehr als 70 %.

Die Inkubation mit 5 μM OSI für 24 h zeigt einen höheren Anteil an Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen im Vergleich zu der Inkubation mit 5 μM GEFI und 5 μM AFA (Abbildung 37).

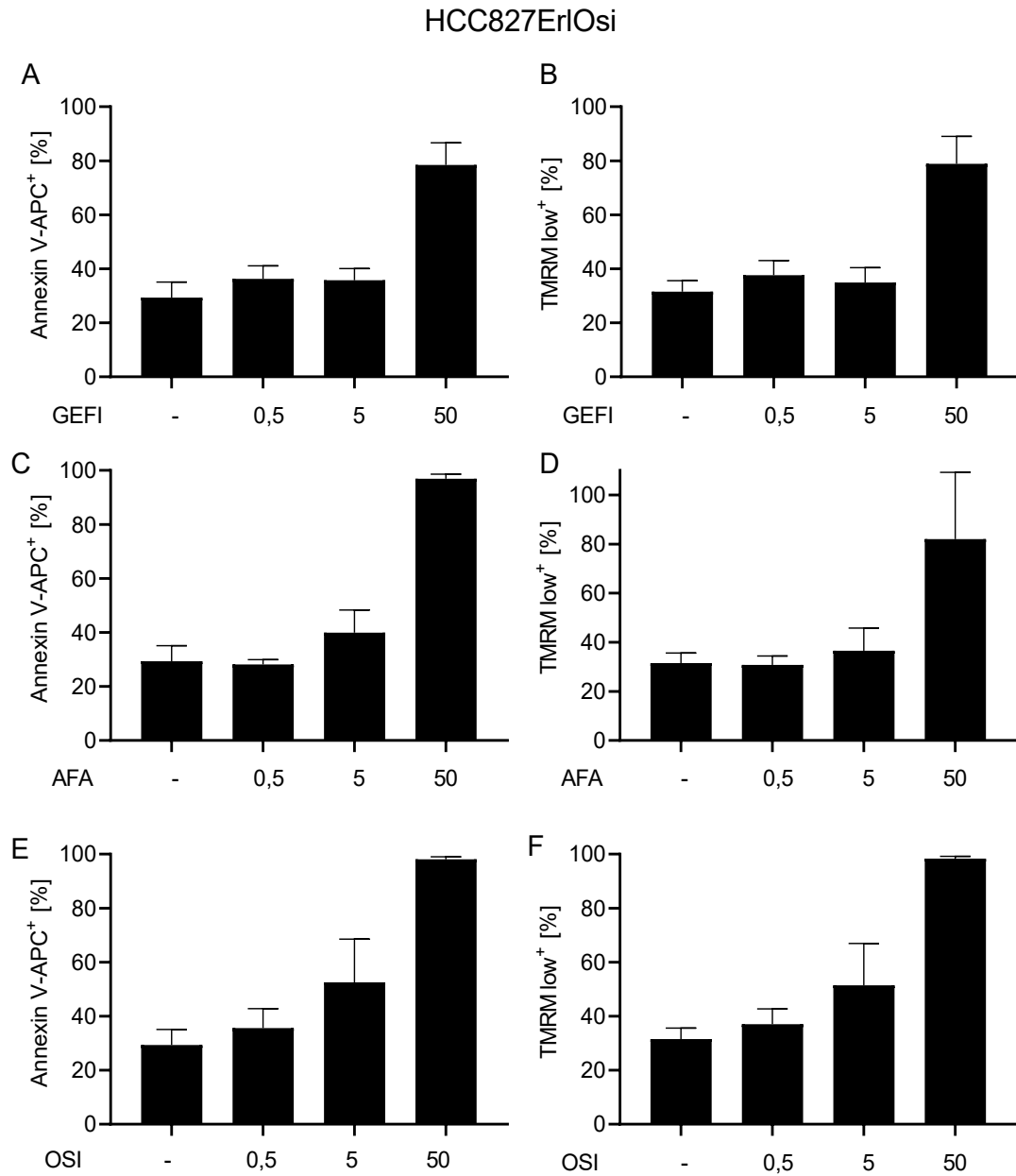


Abbildung 37 HCC827Er/Osi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.7.3 HCC827ErLOsi: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI

Konzentrationsabhängig führt BTZ zu einer Zunahme der Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen. Die Wirkung von BTZ in der höchsten Konzentration (500 nM) ist geringer als die der in der höchsten getesteten EGFR-TKI-Konzentration (Abbildung 38).

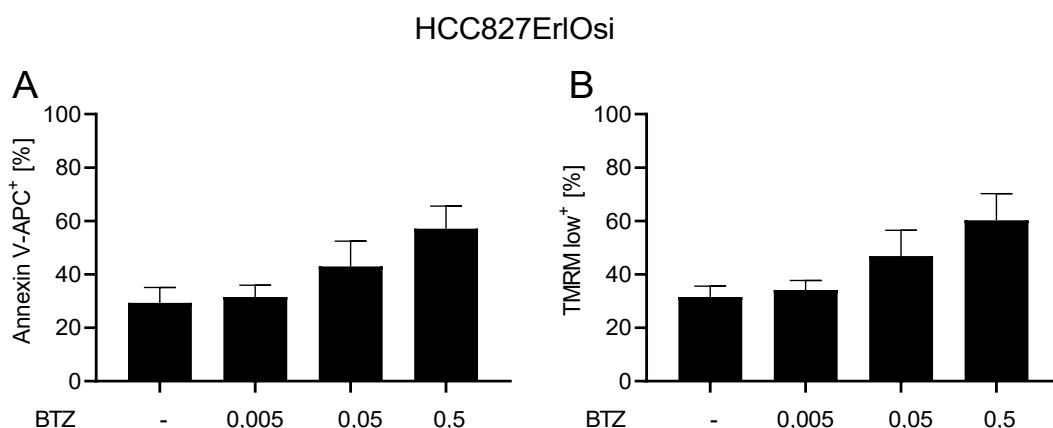


Abbildung 38 HCC82ErLOsi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=3.

4.7.4 HCC827ErLOsi: Kombination von PI und EGFR-TKI

In der Kombination der 3 EGFR-TKI mit Bortezomib, aufgrund der Ergebnisse der Titrationsreihen wird 5 μM EGFR-TKI und 5 nM BTZ verwendet, kann nach 24 h Inkubation bei den HCC827ErLOsi kein signifikant erhöhter Anteil von Annexin V⁺-APC Zellen festgestellt werden (Abbildung 39).

In dieser Zelllinie zeigt eine kombinierte Inkubation von GEF1 + BTZ und AFA + BTZ einen etwa gleich großen Anteil von Zelltodinduktion im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Inkubation mit OSI zeigt sich ein etwas größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen als in der Kontrolle. In der kombinierten Inkubation von OSI+BTZ zeigt sich ein etwas erhöhter Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen (~38 %) im Vergleich zur Kontrolle (~30 %).

HCC827Er/Osi

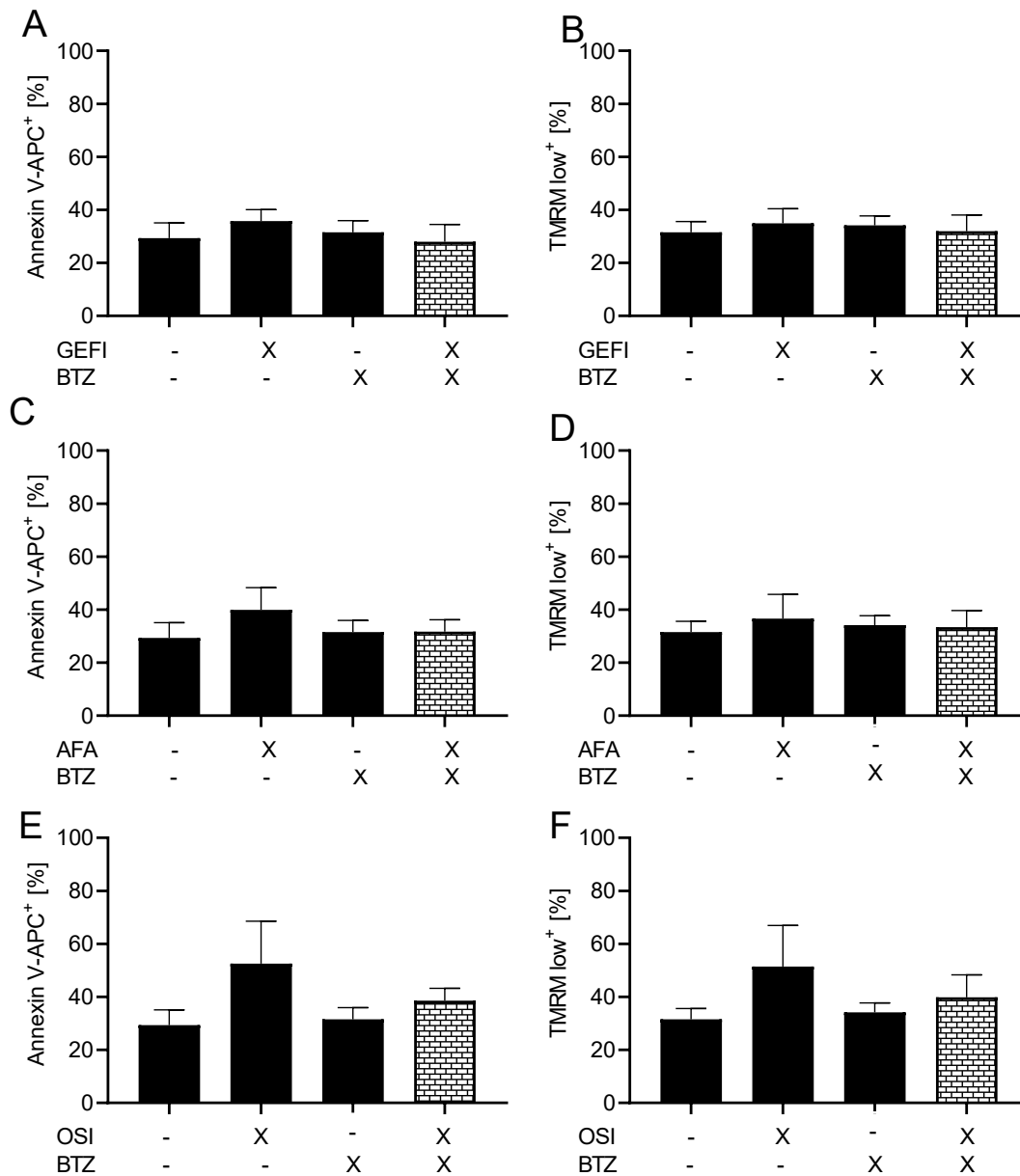


Abbildung 39 HCC827Er/Osi: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.8 Vergleich: Kombinationstherapie nach 24 h in HCC827-Zelllinien

Die folgenden Untersuchungen erfolgten mit OSI als denjenigen Drittgenerations-EGFR-TKI, welcher sich in niedriger Konzentration in den vorausgegangenen

FACS-Untersuchungen als am wirksamsten auf den Anteil von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen herausgestellt hat (Abbildung 43).

Der größte Anteil an Annexin V-APC positiven Zellen bei der kombinierten Inkubation von OSI+BTZ zeigt sich bei den HCC827Erl Zellen (~60 %). Die Anteile der Annexin V-APC positiven Zellen bei der Inkubation mit 5 μ M über 24 h unterscheiden sich zwischen den HCC827Erl und HCC827ErlOsi nicht (jeweils ~50 %). Insofern scheinen beide Zelllinien gleich sensibel bzw. resistent gegenüber einer 24-stündigen Inkubation mit OSI zu sein. Die beiden Zelllinien unterscheiden sich jedoch in der Zelltodinduktion in der Kombinationstherapie von OSI+BTZ. Während in HCC827Erl ~60% Annexin V-APC Zellen positiv sind, sind in HCC827ErlOsi nur ungefähr halb so viele Zellen Annexin V-APC⁺ (~30 %).

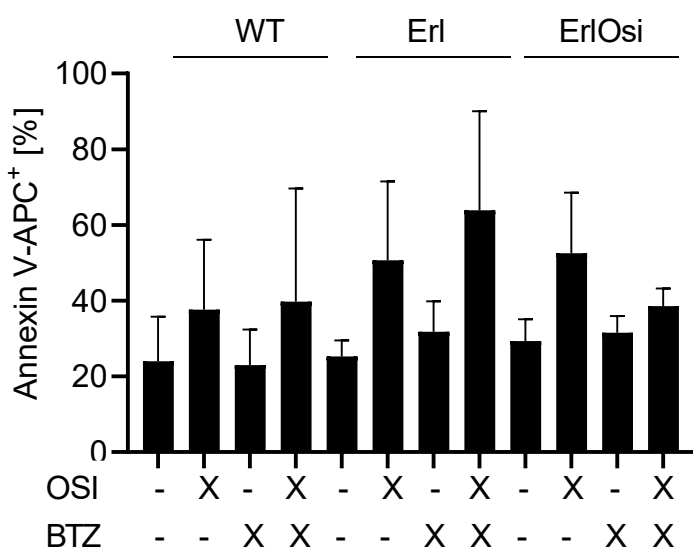


Abbildung 40 Vergleich: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI in HCC827KenWT, HCC827Erl, HCC827ErlOsi. Zelllinien nach Inkubation über 24 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.8.1 Vergleich: Ursprungszelllinie HCC827Erl mit HCC827ErlOsi

Bei der Inkubation für 24 h mit ERLO zeigen sich mit Zunahme der Konzentration leicht abnehmende Anteile an Annexin V-APC positiven Zellen in der zusätzlich OSI resistenten Zelllinie. Bei der Inkubation mit GEFI zeigt sich bei der ERLO-

resistenten Zelllinie eine konzentrationsabhängige Zunahme der Annexin V-APC positiven Zellen. Dagegen bleiben die Anteile bei beiden niedrigeren Konzentrationen 0,5 μM und 5 μM in HCC827ErlOsi gleich (*Abbildung 41*). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich kein signifikanter Unterschied in den Apoptose-raten der beiden Zelllinien nach der 24-stündigen Inkubation zeigt.

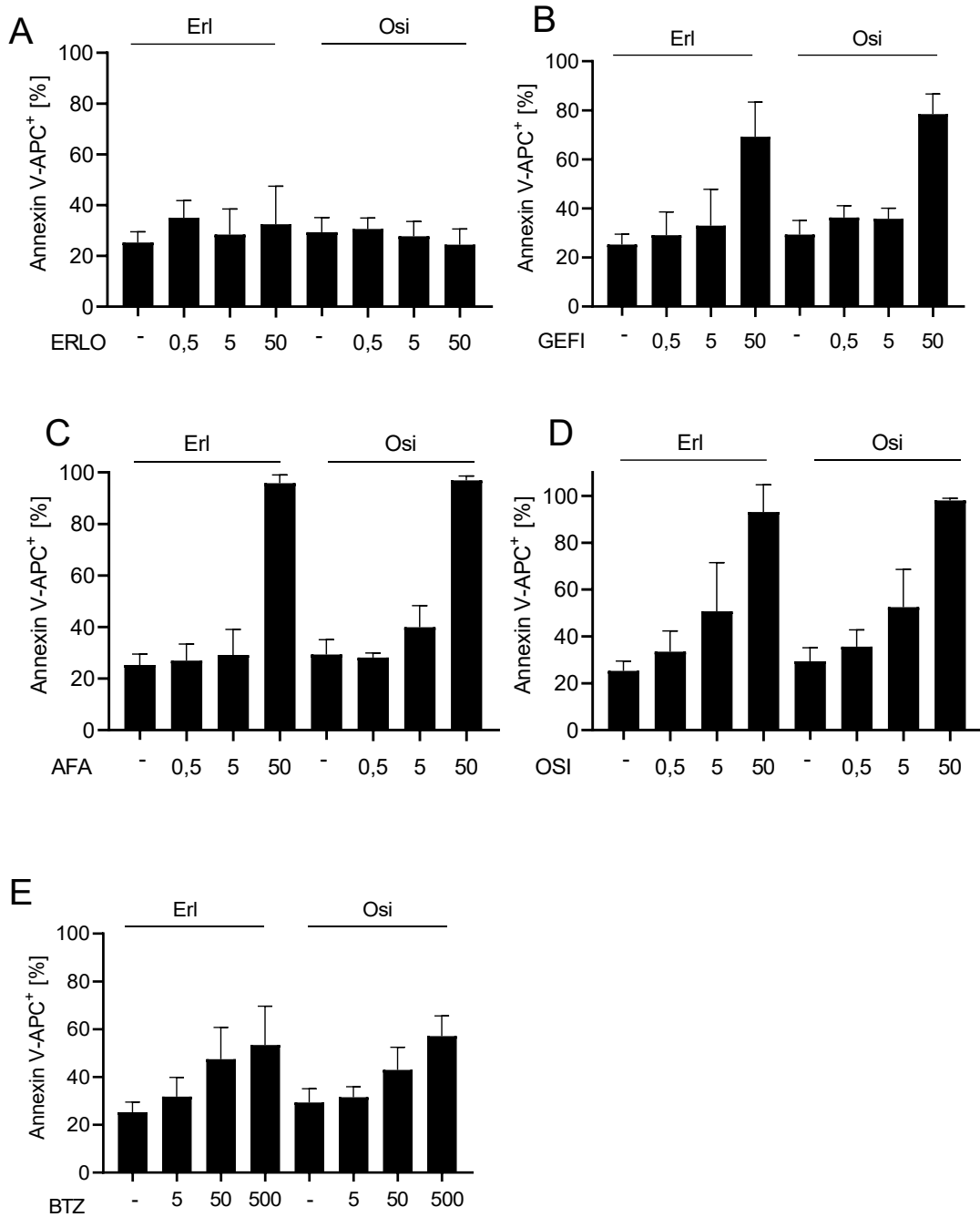


Abbildung 41 Vergleich: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI und BTZ in HCC827Erl und in HCC827ErlOsi (A-E). Inkubation über 24 h, Konzentration in $[\mu\text{M}]$ bei EGFR-TKI, bei PI in $[\text{nM}]$, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.8.2 Untersuchung der Erlotinib-Resistenz

Bei der Testung der Titrationsreihen mit ERLO zeigen sich in den HCC827WT, HCC827Erl, HCC827ErlOsi keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen der Annexin V-APC positiven Zellen (Abbildung 42). Die HCC827WT-Zelllinie zeigt bei der Konzentration von 0,5 μM ERLO im Vergleich zur HCC827Erl und HCC827ErlOsi-Zelllinie den geringsten Anteil von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen. Damit zeigt sich keine Bestätigung der ERLO-Resistenz bei der Inkubation mit ERLO. Bei der Inkubation mit anderen EGFR-TKI zeigen sich jedoch Unterschiede (vgl. Abbildung 25, Abbildung 33, Abbildung 37).

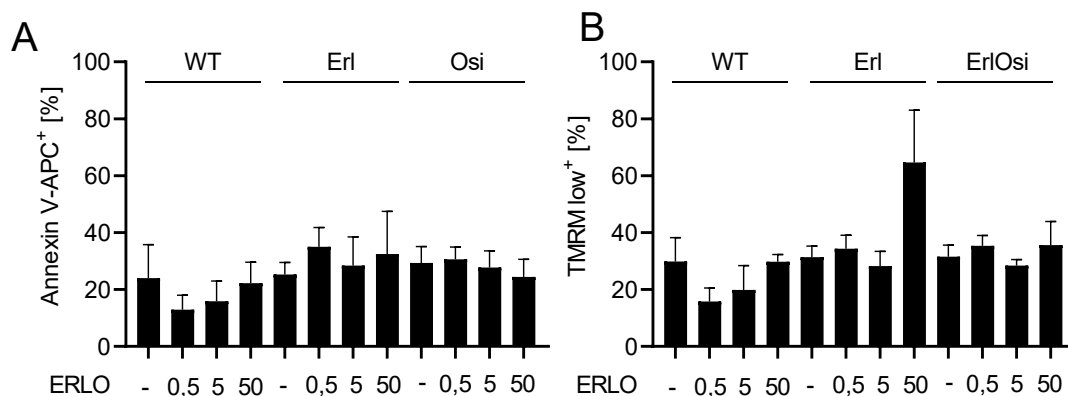


Abbildung 42 HCC827WT, HCC827Erl, HCC827ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von ERLO (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in $[\mu\text{M}]$, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.9 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (H1650WT)

Um die gefundenen Effekte in anderen NSCLC-Zelllinien zu untersuchen, werden die FACS-Versuche auch in der H1650 Zelllinie durchgeführt. Die Zelllinie weist eine Deletion in Exon 19 des EGFR-Gens (del E746-A750) auf. Dies ist dieselbe Mutation, die auch die HCC827 Zelllinie aufweist (del E746-A750). Ob sich die

Wirkung der EGFR-TKI und PI bzw. ihrer Kombination in den H1650 von denen der HCC827 unterscheiden, wurde in den folgenden Versuchen untersucht.

4.9.1 Lichtmikroskopische Aufnahme H1650WT

Die Zellen zeigen eine eher kleine und rundlich bis dreieckige Morphologie in der Dauerkultur. Sie wachsen in Haufen, zeigen jedoch keine spindelförmigen Ausläufer wie die HCC827 (vgl. *Abbildung 24*).

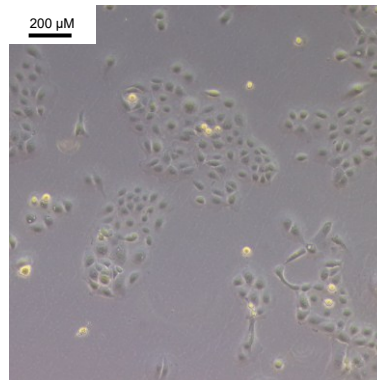


Abbildung 43 Zelllinie H1650WT in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~30 %.

4.9.2 H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Die Inkubation mit GEFI für 24 h induziert auch in der höchsten getesteten Konzentration von 50 μM weniger als 40 % Annexin V-APC⁺ Zellen (*Abbildung 44*). Dies ist deutlich geringer als bei den HCC827 Zellen (~60 %).

Bei der 24-stündigen Inkubation mit AFA sind bei Konzentrationen 50 μM >70 % und bei OSI bei Konzentration von 50 μM >90 % der Zellen Annexin-V-APC positiv. Insgesamt werden in allen drei EGFR-TKI (GEFI, AFA, OSI) konzentrationsabhängig Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen induziert. Bei AFA lassen sich weniger Annexin V-APC positive Zellen (~70 %) nachweisen als bei der gleichen Konzentration von OSI (~90 %), bei GEFI in allen Konzentrationen am wenigsten Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen (~25 %) im Vergleich zu den EGFR-TKI in der gleichen Konzentration.

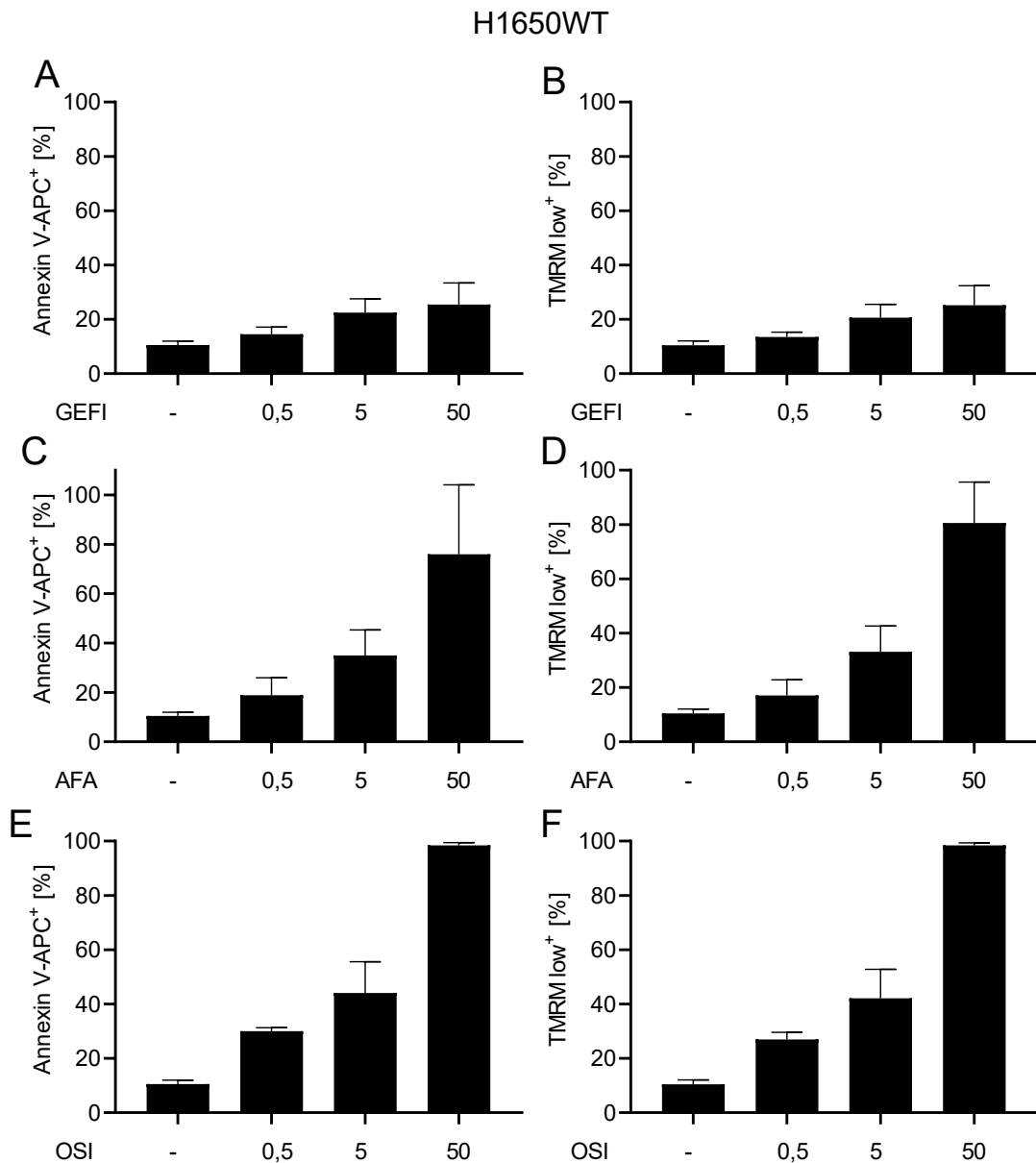


Abbildung 44 H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=3.

4.9.3 H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf Annexin V und TMRM

Im Gegensatz zu den vorherigen Zelllinien (H1299, A549, HCC827) wird durch die Inkubation mit BTZ mehr Zelltod induziert. Diese Zelltodinduktion scheint nicht konzentrationsabhängig zu sein (Abbildung 45).

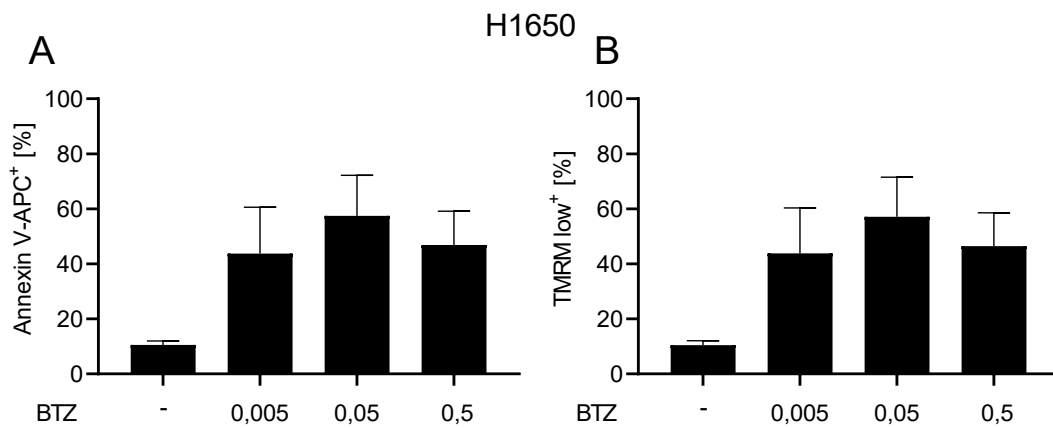


Abbildung 45 H1650WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=3.

4.9.4 H1650WT: Kombination von PI und EGFR-TKI

Nach 24 h Inkubation zeigt sich kein signifikant erhöhter Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen oder TMRM low positiven Zellen in der kombinierten Behandlung von EGFR-TKI+BTZ. Die kombinierte Inkubation zeigt geringere Anteile an Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen als die Einzelinkubation mit BTZ (*Abbildung 46*).

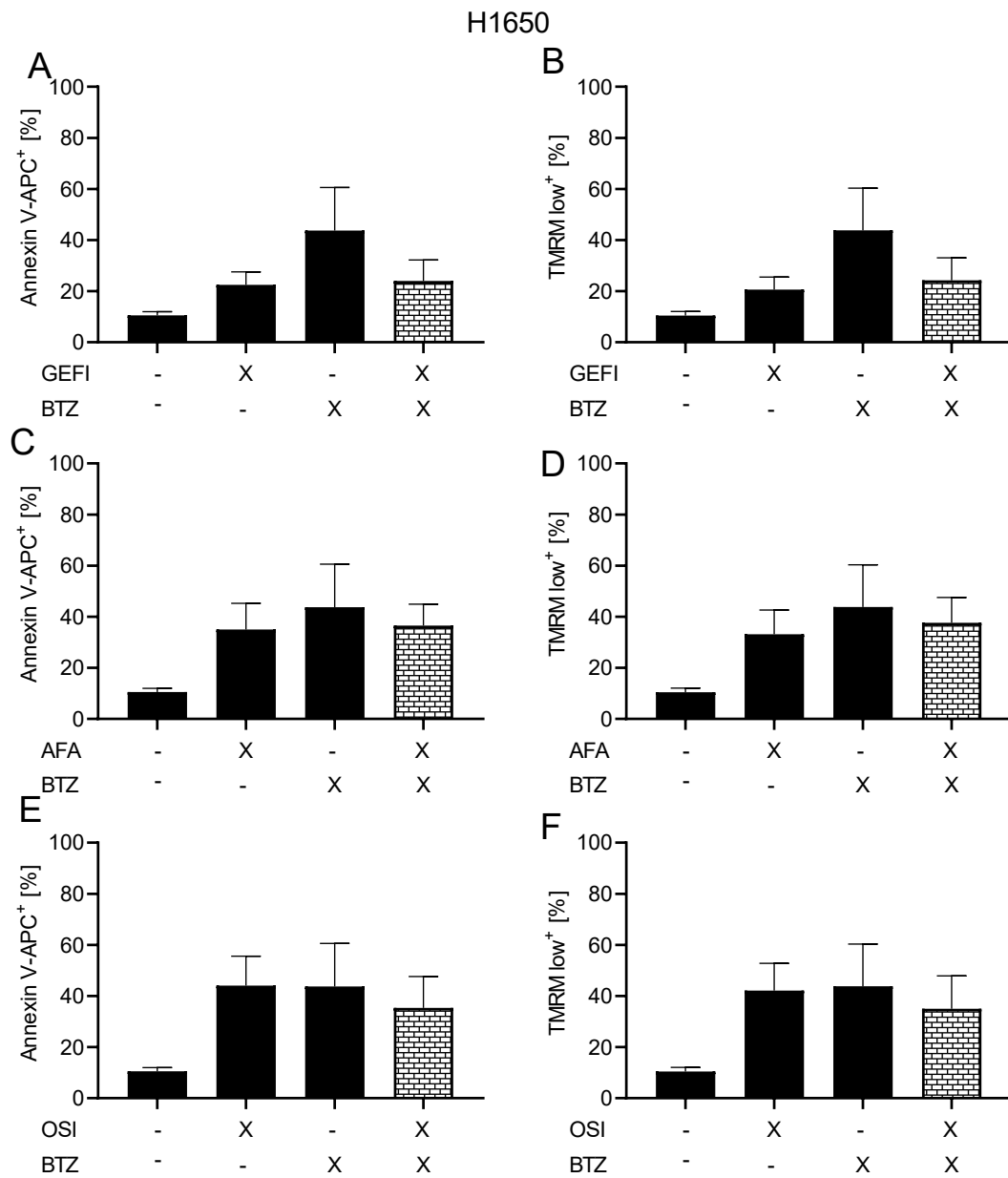


Abbildung 46 H1650WT: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.10 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (H1650Osi)

4.10.1 Lichtmikroskopische Aufnahme H1650Osi

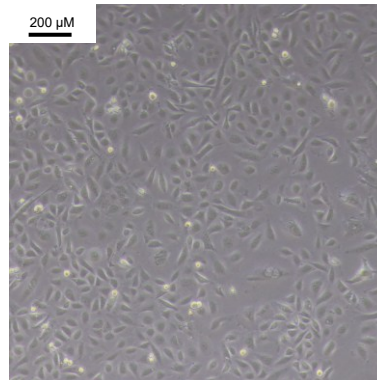


Abbildung 47 Zelllinie H1650Osi in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~95 %

Die H1650Osi zeigen sich in der Dauerkultur unter dauerhafter Exposition mit 2 µM OSI etwas größer im Vergleich zu ihrer WT-Zelllinie. Sie besitzen einen etwas länglichen Zellkörper und zeigen mehr spindelförmige Ausläufer als ihre Ursprungszelllinie, die H1650WT.

4.10.2 H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Es findet sich eine konzentrationsabhängige Induktion der Annexin V-APC positiven und TMRM low positiven Zellen (*Abbildung 48*). Bei AFA lassen sich weniger Annexin V-APC positive Zellen nachweisen als bei der gleichen Konzentration von GEFI und OSI (0,5 µM). In der höchsten getesteten Konzentration von 50 µM EGFR-TKI zeigt sich bei der Inkubation mit GEFI ein Anteil von 60 % Annexin und TMRM low positiven Zellen, während bei der Inkubation mit AFA und OSI ein Anteil von >80 % Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen gemessen wird.

H1650Osi

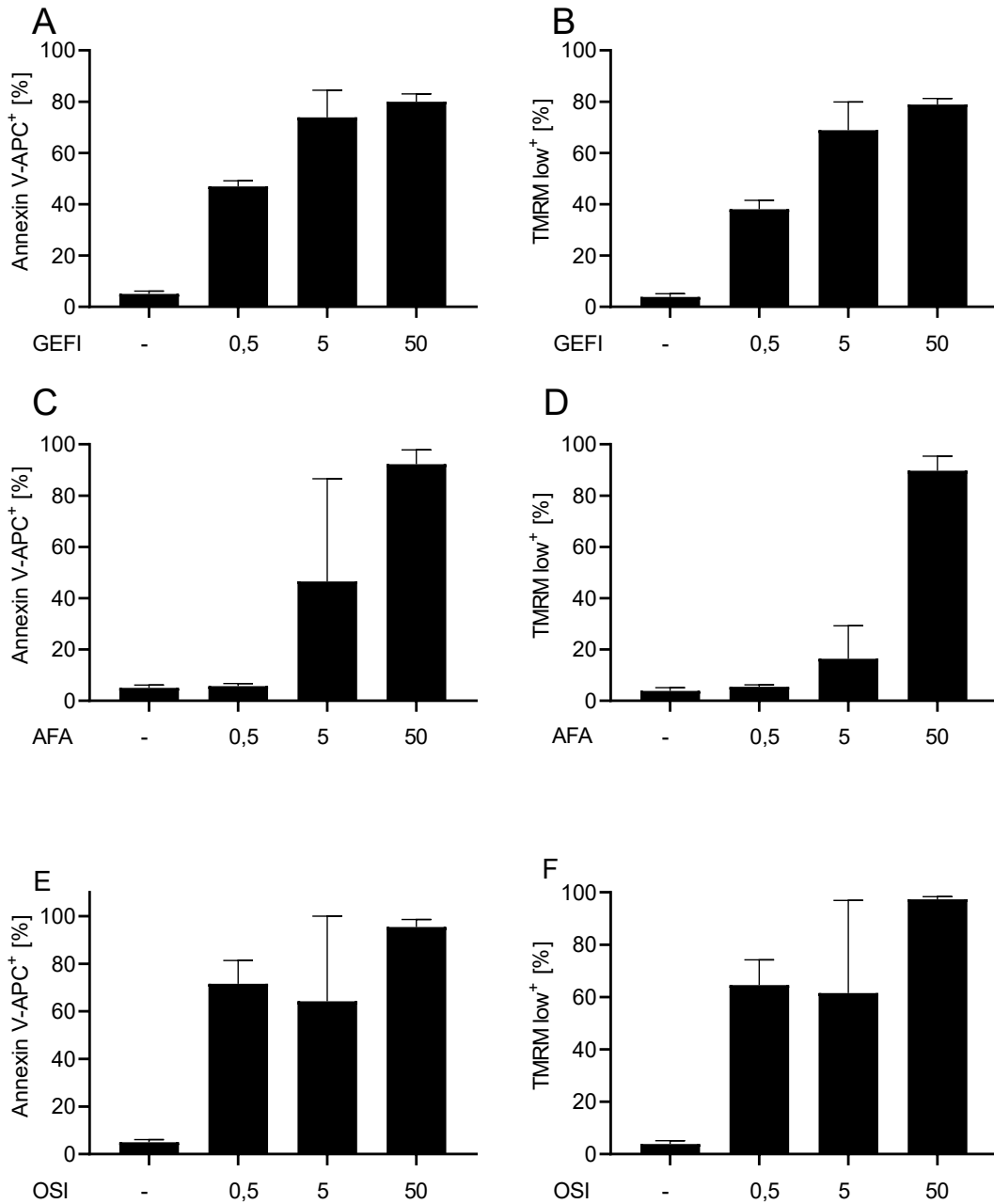


Abbildung 48 H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=3.

4.10.3 H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss von PI auf Annexin V und TMRM

Es findet sich eine deutliche konzentrationsabhängige Induktion der Annexin V-APC positiven und TMRM low positiven Zellen (Abbildung 49).

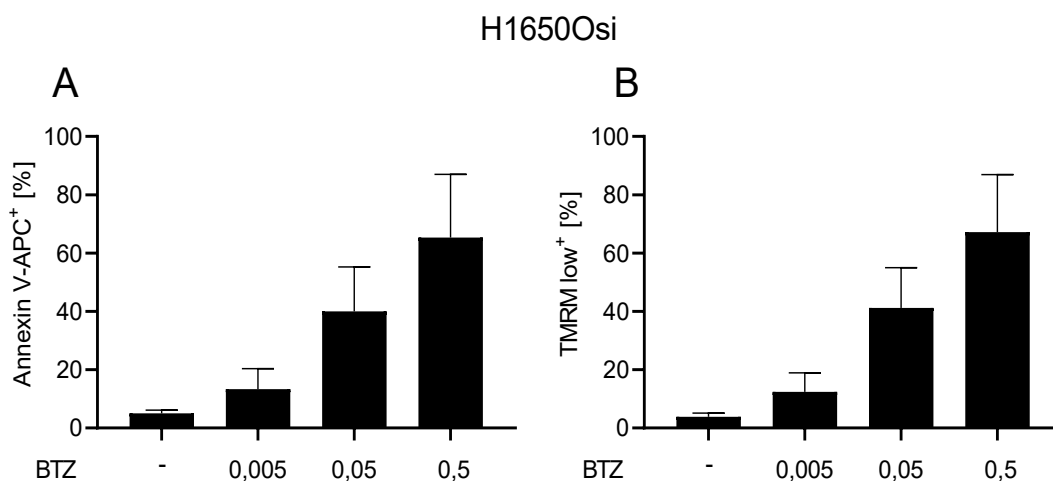


Abbildung 49 H1650Osi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.10.4 H1650Osi: Kombination von PI und EGFR-TKI

Nach 24 h zeigt sich kein signifikant erhöhter Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen oder TMRM low positiven Zellen in der kombinierten Behandlung mit EGFR-TKI+BTZ im Vergleich zu den Einzelinkubationen OSI bzw. BTZ (Abbildung 50).

In der Kombinationsbehandlung von OSI+BTZ werden im Vergleich zu Erst- (~15 %) und Zweitgenerations EGFR-TKI (~25 %) am meisten Annexin V-APC positive Zellen nachgewiesen (~45 %). Die Einzelbehandlung mit EGFR-TKI induziert bei allen 3 EGFR-TKI jedoch mehr Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen als in der Kombination mit BTZ.

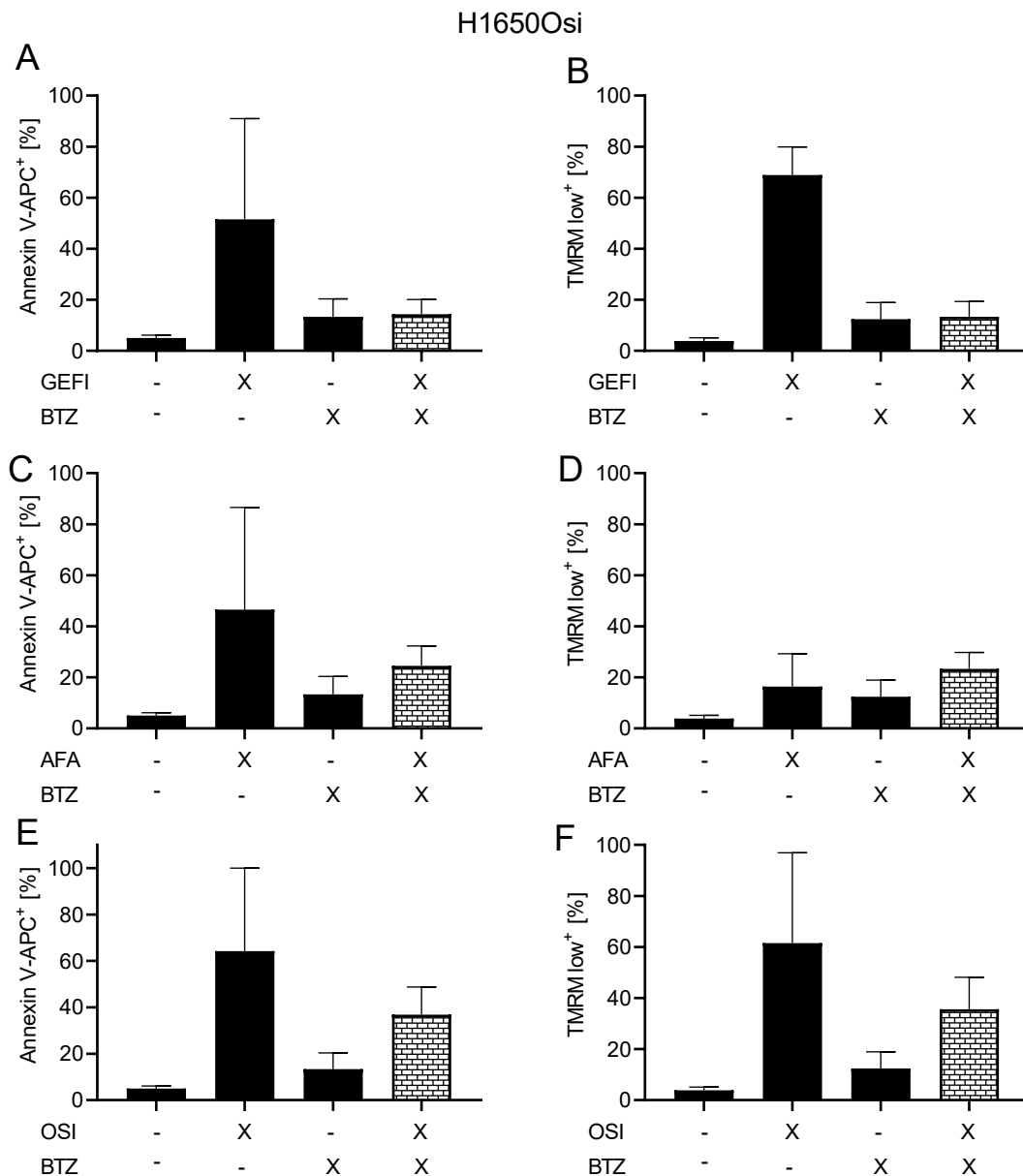


Abbildung 50 H1650Osi: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.10.5 Vergleich der Erlotinib- und Gefitinibresistenz in H1650WT und H1650Osi

Die OSI-Zelllinie zeigt bei der Inkubation mit GEF1 einen größeren Anteil an Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen (Abbildung 51). Bei der Inkubation mit ERLO zeigt die WT-Zelllinie in allen Konzentrationen einen ähnlichen Anteil

an Annexin V-positiven Zellen wie die Kontrolle. Bei der OSI-Zelllinie sind die Annexin V-APC Raten niedriger als in der WT-Zelllinie, jedoch steigt der Anteil von Annexin V-APC positiven Zelllinien bei einer Konzentration von 50 μM deutlich an.

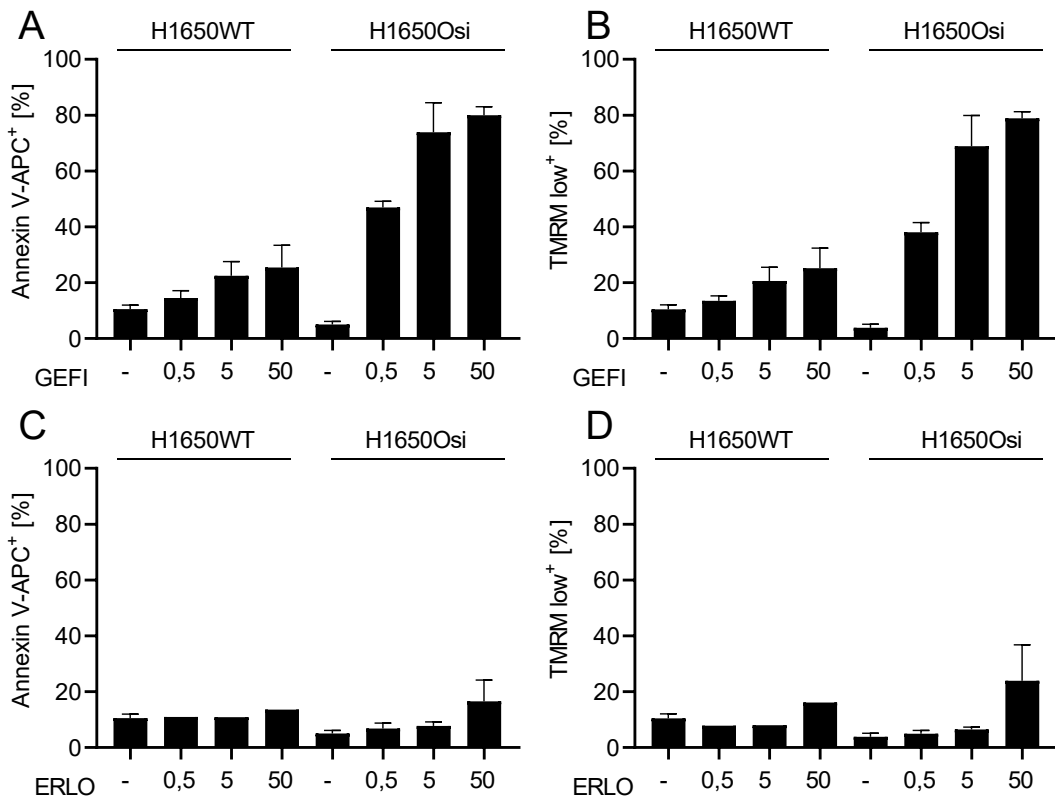


Abbildung 51 H1650WT und H1650Osi: Vergleich des dosisabhängigen Einflusses der isolierten Gabe von EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-D). Konzentration in μM , Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3., außer Erlo n=1.

4.10.6 Vergleich: Ursprungszelllinie mit OSI-Zelllinie

Bei der Inkubation mit OSI zeigt sich bei der OSI-Zelllinie ein größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen, eine Resistenz gegenüber OSI besteht nicht.

BTZ zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Annexin V positiven Zellen in der OSI-Zelllinie. Die WT-Zelllinie zeigt dagegen bereits bei einer Konzentration von 5 nM einen Anteil von >40 % Annexin V-APC positiven Zellen, dagegen zeigt die OSI-Zelllinie lediglich einen Anteil von ~10 %.

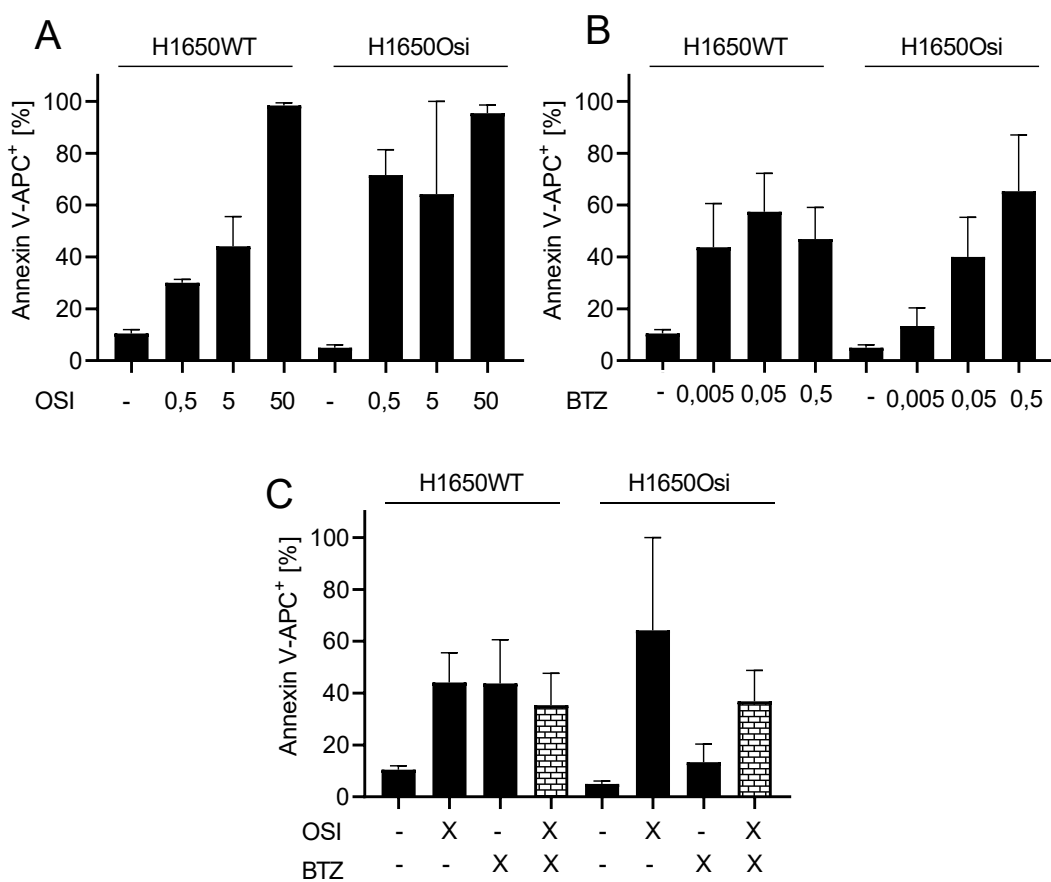


Abbildung 52 H1650WT und H1650Osi: Vergleich des dosisabhängigen Einflusses der isolierten Gabe von OSI und BTZ und der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-C). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.11 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC4006WT)

4.11.1 Lichtmikroskopische Aufnahme HCC4006WT

Die Zellen zeigen sich eher kleiner und rundlich, bis dreieckig. Sie bilden untereinander spindelförmige Fortsätze aus und wachsen verzweigt.

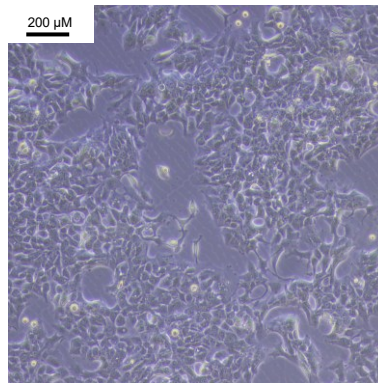
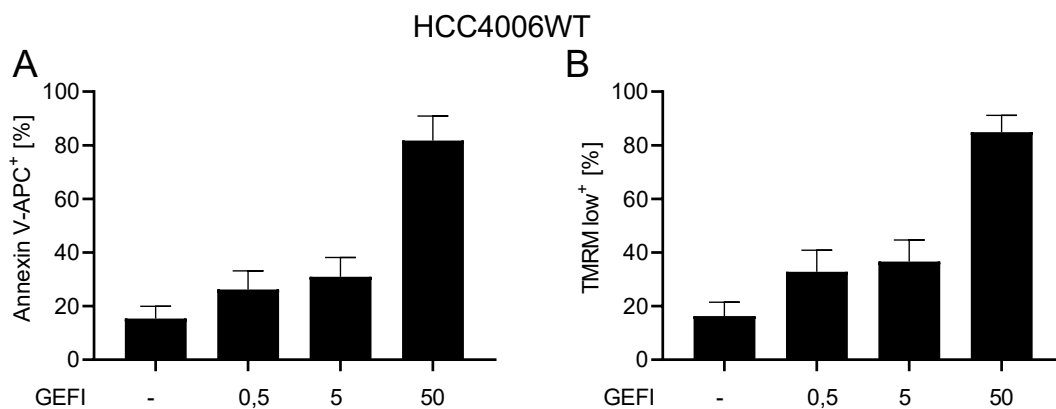


Abbildung 53 Zelllinie HCC4006WT in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~80 %.

4.11.2 HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Es kommt zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der Annexin V-APC positiven und TMRM low positiven Zellen. Dabei werden in allen EGFR-TKI bei der höchsten Konzentration von 50 μM >75 % Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen induziert. Bereits in den beiden niedrigeren Konzentrationen von 0,5 μM und 5 μM zeigt GEF1 und OSI höhere Anteile von Annexin V APC und TMRM low positiven Zellen als AFA im Vergleich.



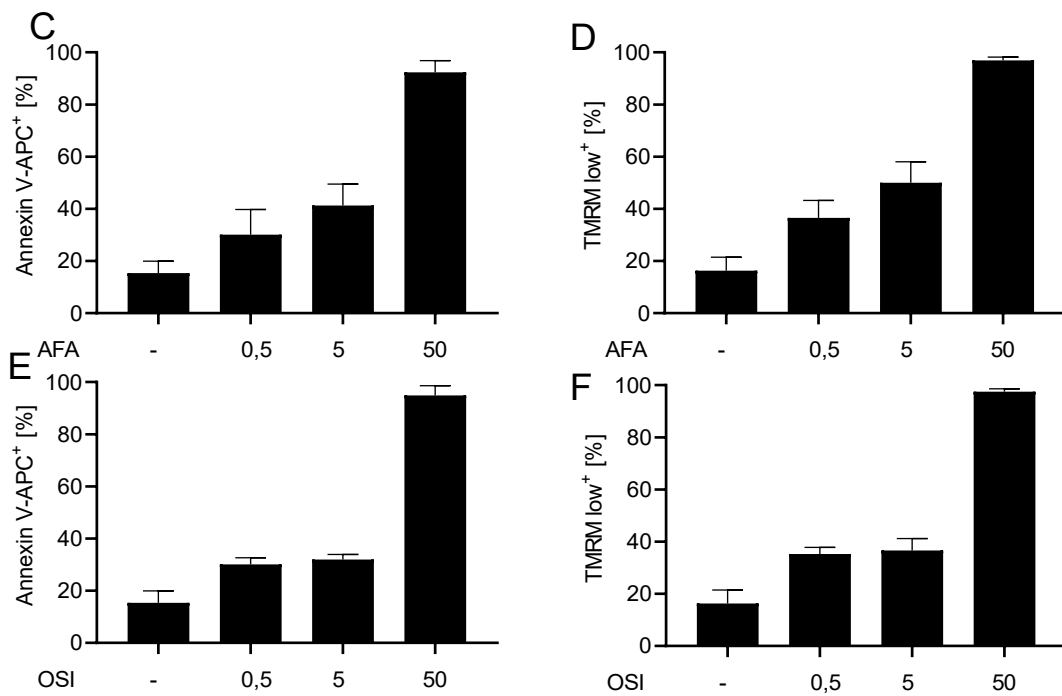


Abbildung 54 HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.11.3 HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI

Es findet sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen (Abbildung 55).

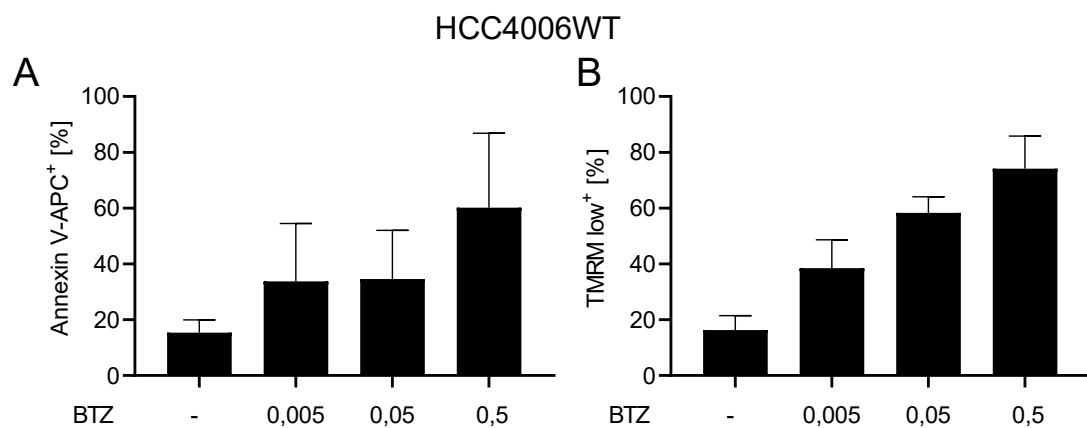
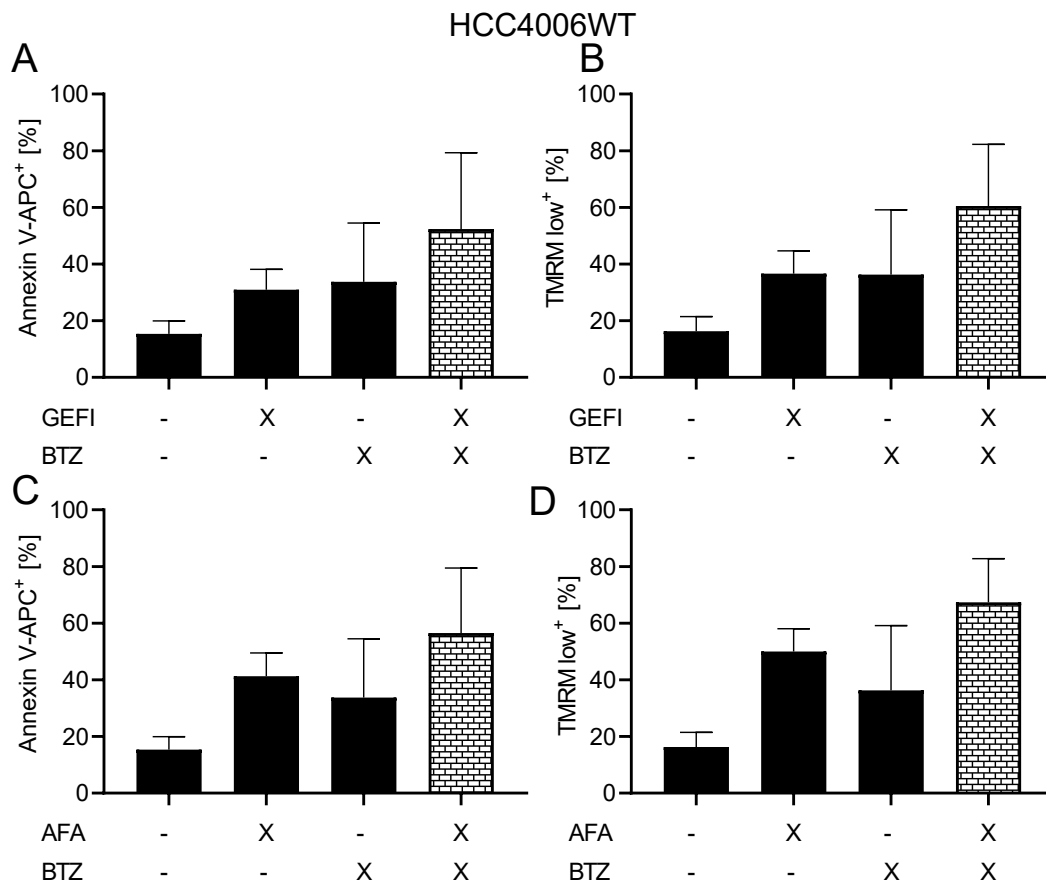


Abbildung 55 HCC4006WT: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.11.4 HCC4006WT: Kombination von PI und EGFR-TKI in EGFR-mutierten-Zelllinien

Bei der HCC4006WT Zelllinie kann bei der kombinierten Inkubation mit AFA und BTZ ein größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen gemessen werden (~60 %) als bei der Einzelbehandlung von AFA (~40 %) und BTZ für 24 h (~35 %). Bei der kombinierten Inkubation von OSI mit BTZ kann ein größerer Anteil von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen im Vergleich zu der OSI-Einzelbehandlung gemessen werden (Abbildung 56). Bei GEFI und AFA mit BTZ zeigt sich keine additive Induktion von Apoptose. Bei der Inkubation von OSI+BTZ zeigt sich sowohl bei Annexin als auch bei TMRM low eine additive Induktion des Zelltods.



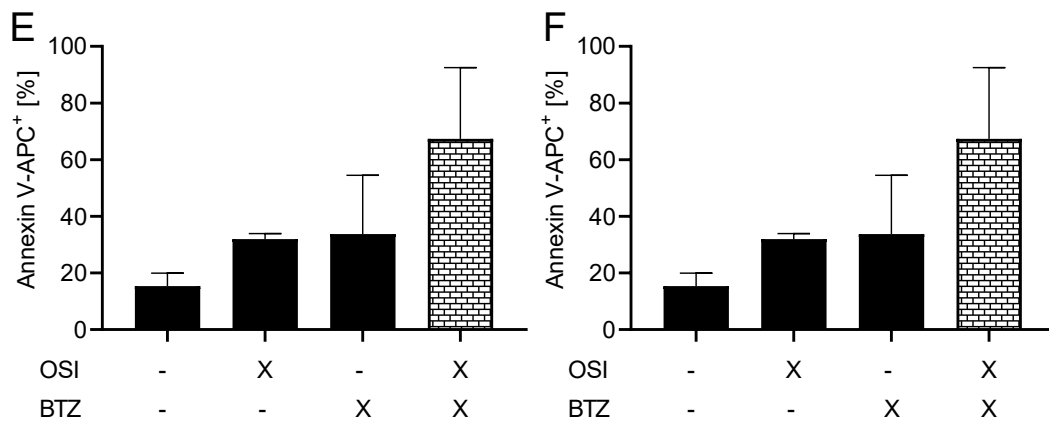


Abbildung 56 HCC4006WT: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.12 Etablierung einer Osimertinib resistenter Zelllinie aus HCC4006WT – Lichtmikroskopische Darstellung

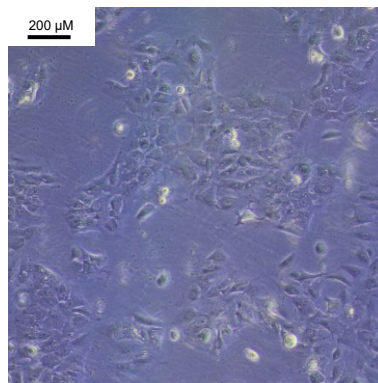


Abbildung 57 Lichtmikroskopische Darstellung der Zelllinie HCC4006WT bei der Etablierung einer OSI resistenten Zelllinie. Konfluenz ~30 %.

Der Versuch der Etablierung einer Osimertinib-resistenten Zelllinie durch eine Konzentration von 1 μ M OSI in der Dauerkultur verlief frustan. *Abbildung 57* zeigt einen repräsentativen Ausschnitt bei der Etablierung dieser Zelllinie. Man sieht bereits sehr viele abgelöste Zellen und Zellfragmente, nach einem etwas längeren Zeitraum haben sich alle Zellen abgelöst. In den Zellen sieht man vermehrte rundliche Aufhellungen, diese Vakuolen zeigen sich typischerweise bei Zellen, die in Seneszenz und Apoptose gehen. Dieses Verhalten der Zellen zeigt sich auch stets bei erneuten Ansätzen.

4.13 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC4006Erl)

4.13.1 Lichtmikroskopische Aufnahme HCC4006Erl

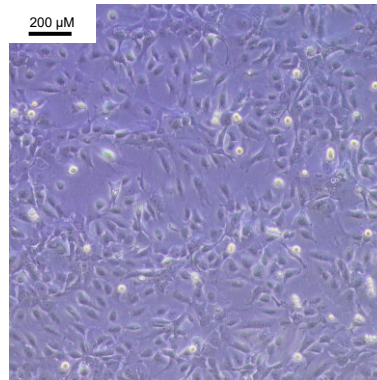


Abbildung 58 Zelllinie HCC4006Erl in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~70 %.

Die Zellen in der Dauerkultur mit dauerhafter Gabe von 1 µM ERLO sind länglicher und spindelförmiger im Vergleich zu HCC4006WT und bilden mehr Fortsätze untereinander aus.

4.13.2 HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

GEFI induziert nach 24 h Inkubation auch bei einer Konzentration von 50 µM <40 % Annexin V-APC positive Zellen. Bei der Inkubation mit AFA und OSI zeigen die Konzentrationen 0,5 µM und 5 µM ungefähr einen gleichen Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen (~15 %). Ausschließlich in der höchsten getesteten Konzentration von 50 µM wird jeweils ein Anteil von annähernd 100 % erreicht (*Abbildung 59*).

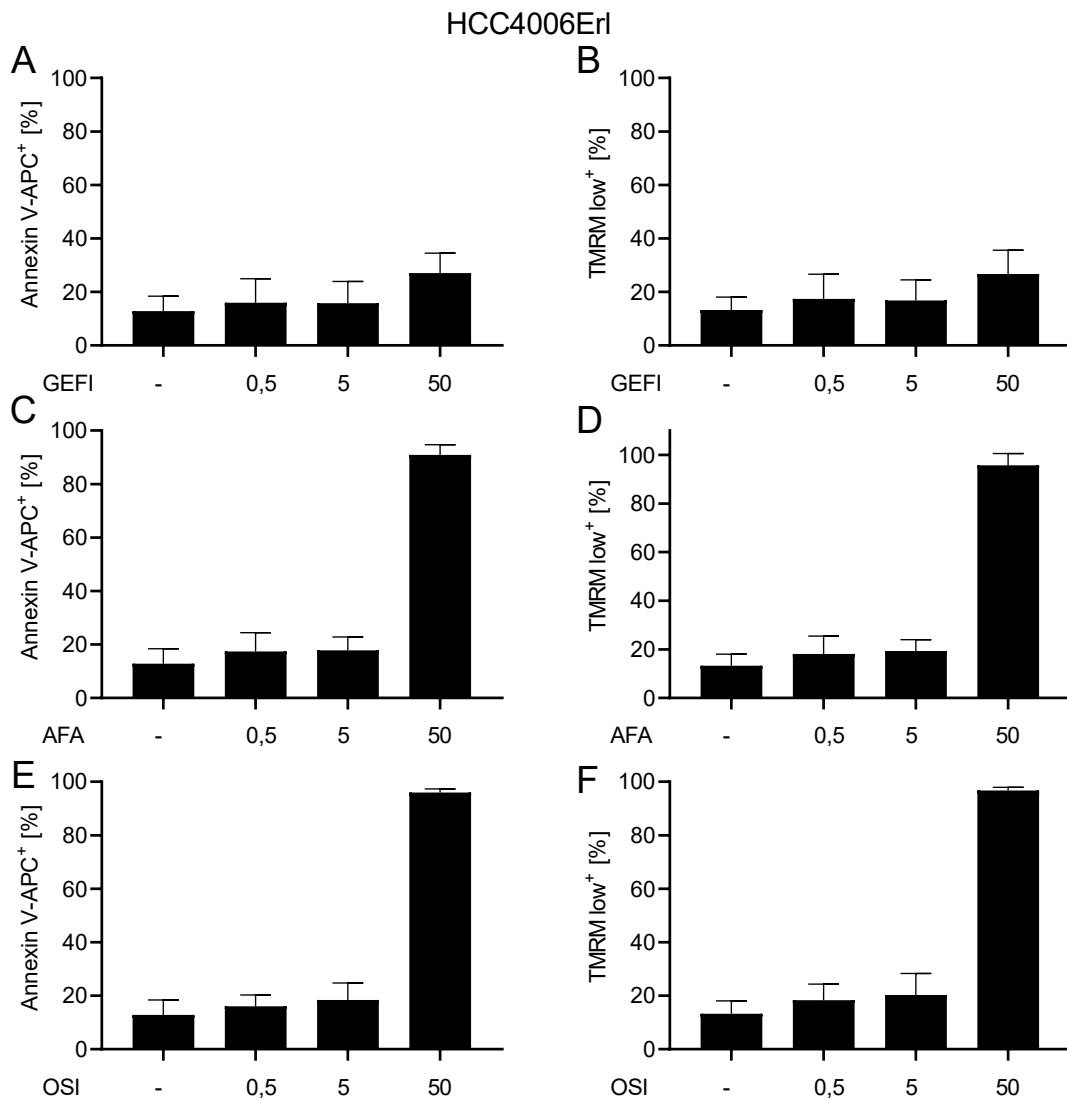


Abbildung 59 HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=3.

4.13.3 HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI

Im Gegensatz zu den vorherigen Zelllinien zeigt sich bei den HCC4006Erl. Bei einer 24 h Inkubation mit BTZ in verschiedenen Konzentrationen kein signifikant größerer Anteil von Annexin V-APC positiven und TMRM low positiven Zellen in allen getesteten Konzentrationen (Abbildung 63).

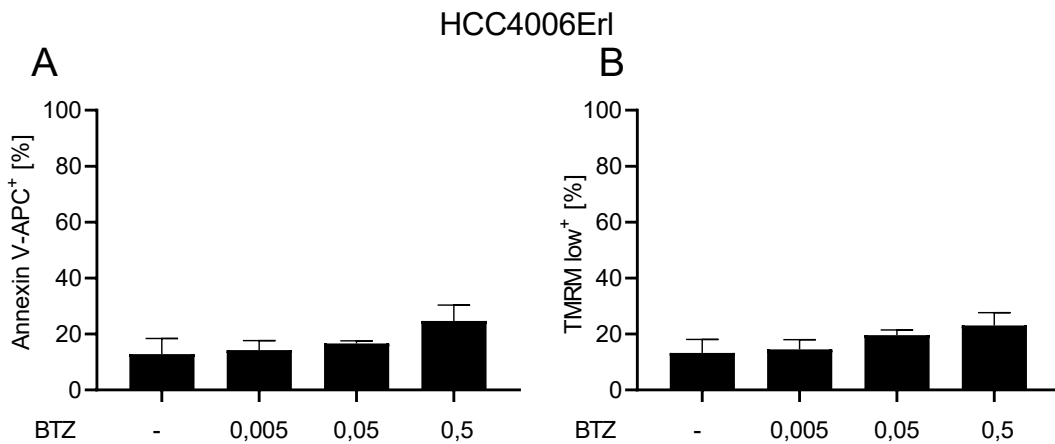
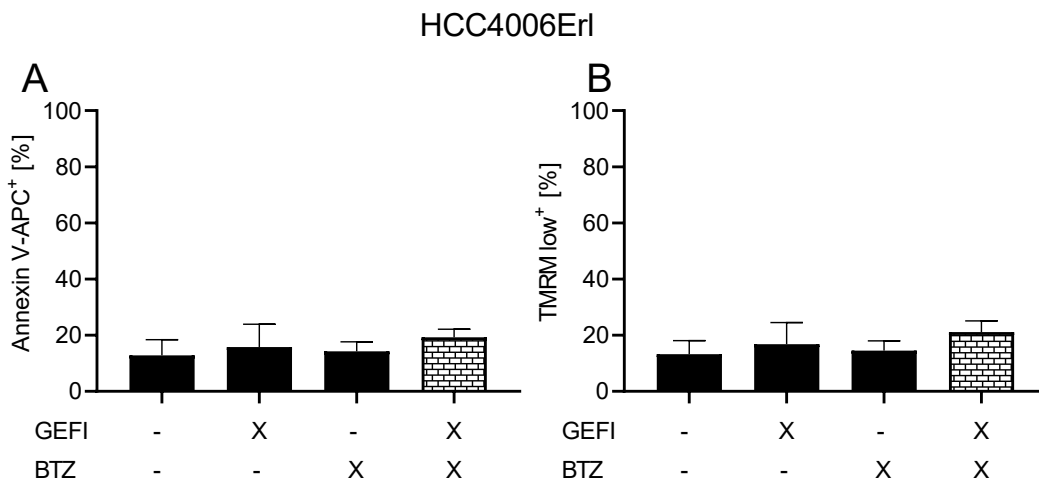


Abbildung 60 HCC4006Erl: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=3.

4.13.4 HCC4006Erl: Kombination von PI und EGFR-TKI

In der Kombinationsbehandlung zeigt sich bei der Inkubation von Gefitinib, AFA oder OSI mit BTZ jeweils ein nur gering größerer Anteil von Annexin und TMRM low positiven Zellen (~20 %) als bei den Einzelbehandlungen (~15-20 %) und der Kontrolle (~15 %) (Abbildung 61).



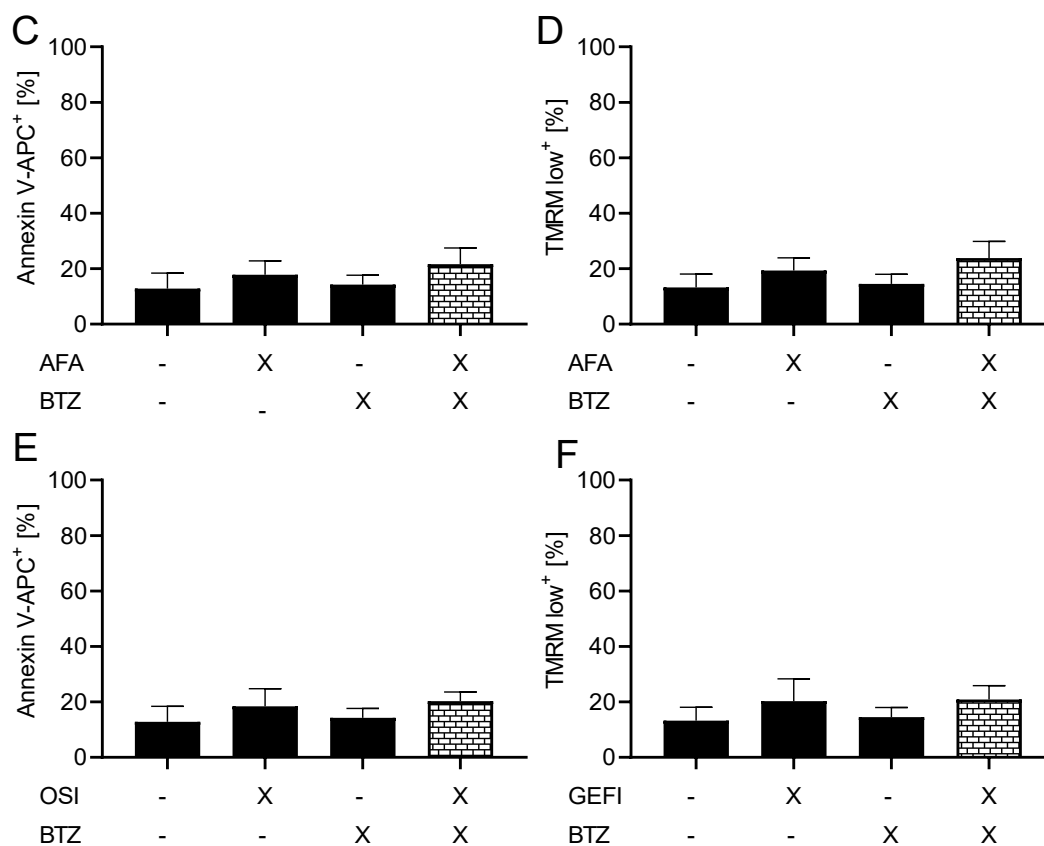


Abbildung 61 HCC4006Erl: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.14 Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI und in Kombination mit BTZ in EGFR-mutierten-NSCLC-Zelllinien (HCC4006ErlOsi)

4.14.1 Lichtmikroskopische Aufnahme HCC4006ErlOsi

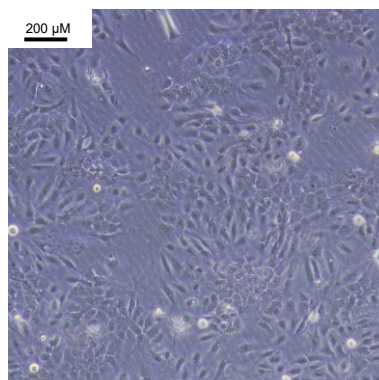


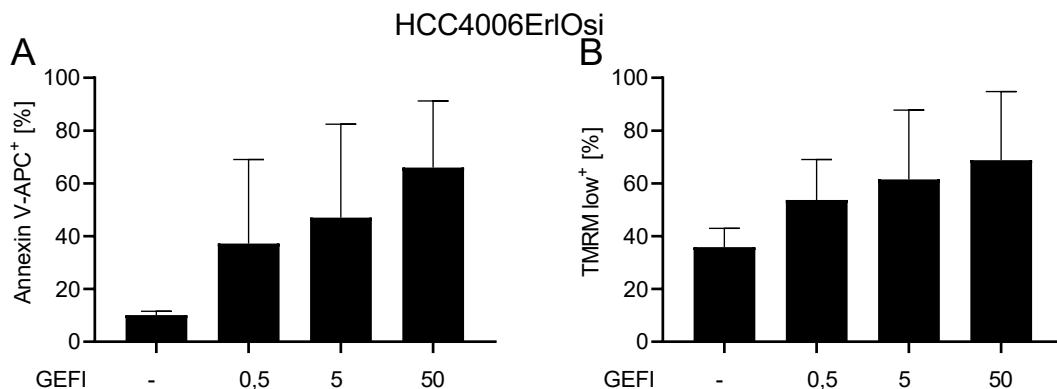
Abbildung 62 Zelllinie HCC4006ErlOsi in der Lichtmikroskopie. Konfluenz ~90 %.

Die Zellen zeigen sich in der Dauerkultur unter dauerhafter Exposition von 1 μM ERLO und 1 μM OSI eher als groß, flächig und lang, mit weniger Fortsätzen als ihre Ursprungszelllinie, die HCC4006Erl.

4.14.2 HCC4006ErlOsi: Dosisabhängiger Einfluss von EGFR-TKI auf die Expression von Annexin V und TMRM

Im Vergleich zur Ursprungszelllinie HCC4006Erl werden bei der konzentrationsabhängigen Inkubation mit GEFI mehr Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen induziert (Abbildung 63).

GEFI induziert nach 24 h Inkubation bei einer Konzentration von 50 μM >50 % Annexin V-APC positive Zellen. Bei der Inkubation mit AFA zeigt sich in den Konzentrationen 0,5 μM und 5 μM nur ein gering erhöhter Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen. OSI dagegen zeigt bei den gleichen Konzentrationen einen Anteil von >40 % Annexin V-APC positiven Zellen. Die Anteile bei TMRM low positiven Zellen verhalten sich ähnlich steigend wie die Anteile der Annexin positiven Zellen. TMRM low ist jedoch auf einem höheren Niveau: bereits in der Kontrolle zeigt die Zelllinie >30 % TMRM low positive Zellen. In der Kontrolle sind bereits mehr als 30 % der Zellen in Apoptose gegangen.



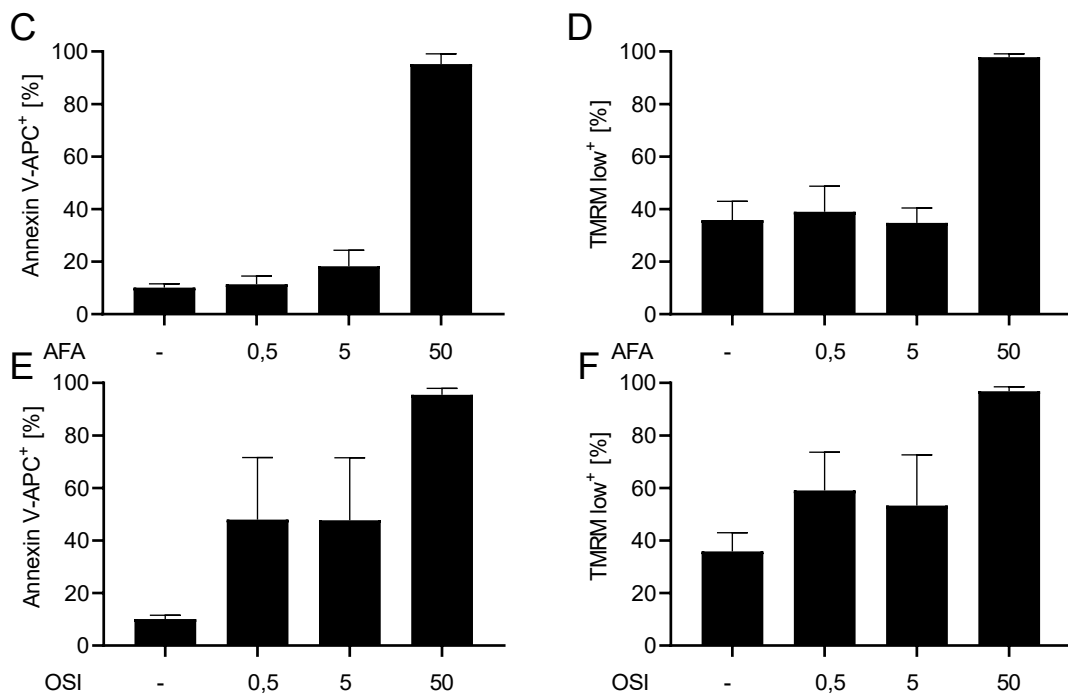


Abbildung 63 HCC4006ErIosi: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von EGFR-TKI (A-F). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μM], Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert ± SD; n=4.

4.14.3 HCC4006ErIosi: Dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von Annexin V und TMRM von PI

Im Gegensatz zu ihrer Ursprungszelllinie, der HCC4006Erl, zeigt die Zelllinie HCC4006ErIosi einen konzentrationsabhängigen Effekt auf den Anteil von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen (Abbildung 64).

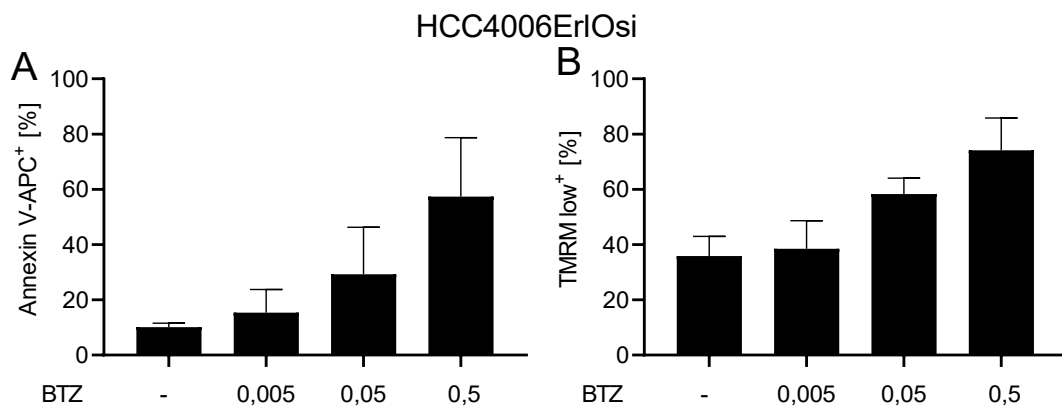
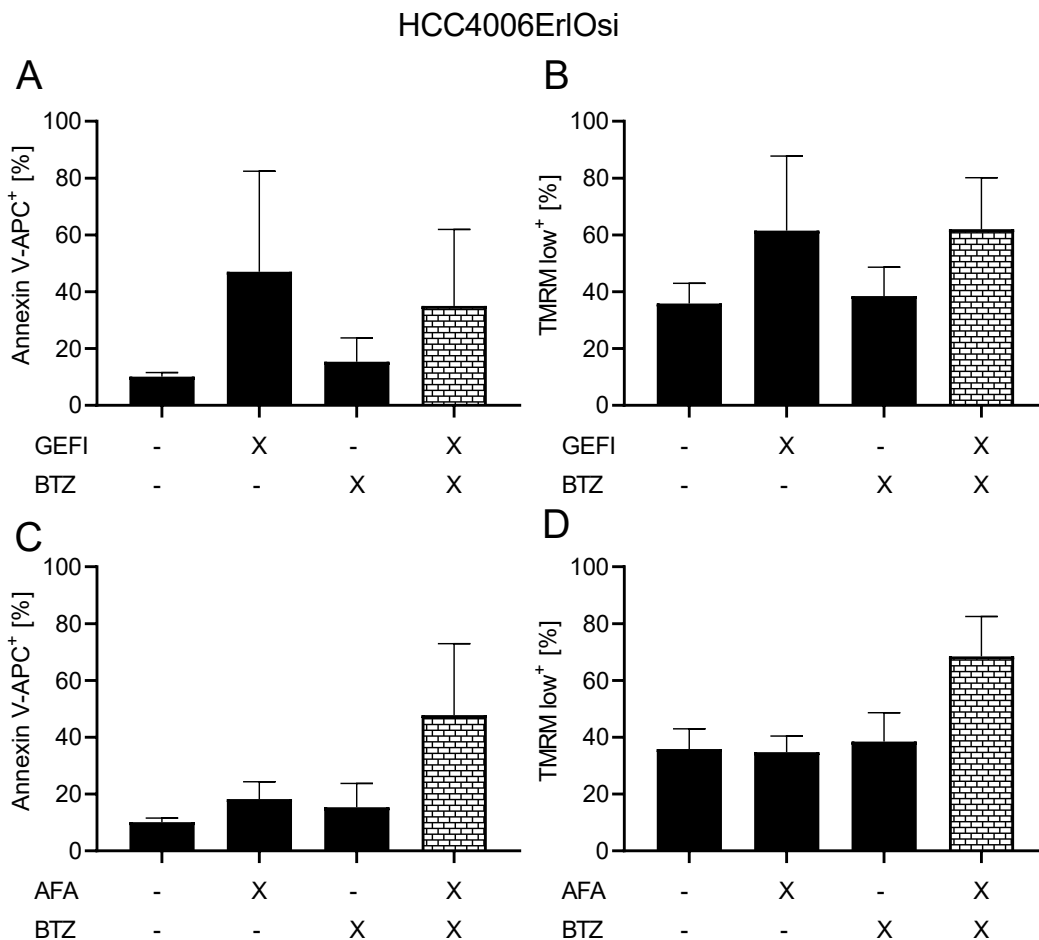


Abbildung 64 HCC4006Er/Osi: Einfluss der dosisabhängigen isolierten Gabe von BTZ (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in $[\mu\text{M}]$, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4.

4.14.4 HCC4006Er/Osi: Kombination von PI und EGFR-TKI

Bei der Inkubation mit GEF1 werden etwas größere Anteile an Annexin V-APC positiven Zellen gemessen (~40 %) als bei der Kombination GEF1+BTZ (~ 35%). Dagegen werden bei der Kombination BTZ+AFA mehr Annexin V-APC und TMRM low positive Zellen detektiert als in den beiden Einzelbehandlungen. Die Kombination OSI+BTZ zeigt einen etwas geringeren Anteil von Annexin V-APC positive Zellen (~35 %) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit OSI (~45 %) (Abbildung 65).



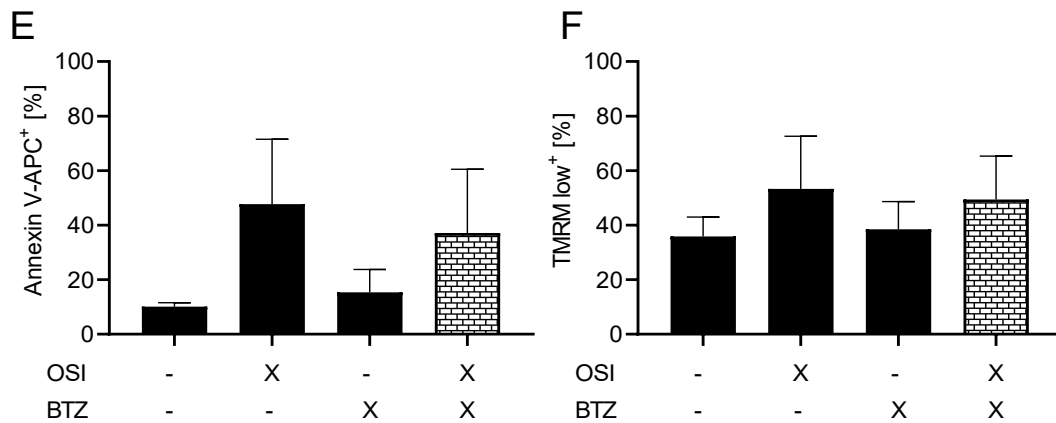
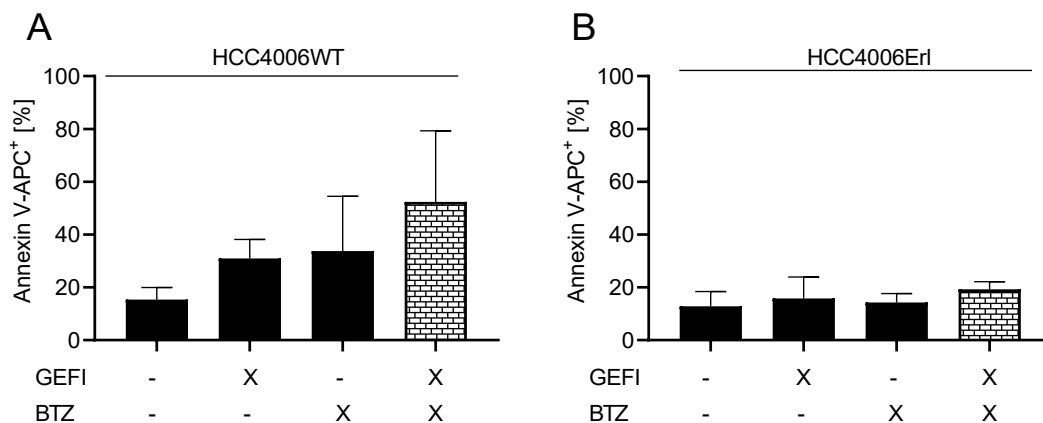


Abbildung 65 HCC4006ErlOsi: Kombiniertes Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-F). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4.

4.15 Vergleich: Kombinationsbehandlungen in HCC4006-Zelllinien

Der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen ist in der ERLO-resistenten Zelllinie sowohl in den Einzelbehandlungen mit GEFI und BTZ als auch in der Kombinationsbehandlung am geringsten. In der Kombination mit GEFI+BTZ zeigt die WT-Zelllinie als auch die ErlOsi-Zelllinie ähnliche Anteile von Annexin V-APC positiven Zellen (Abbildung 66).



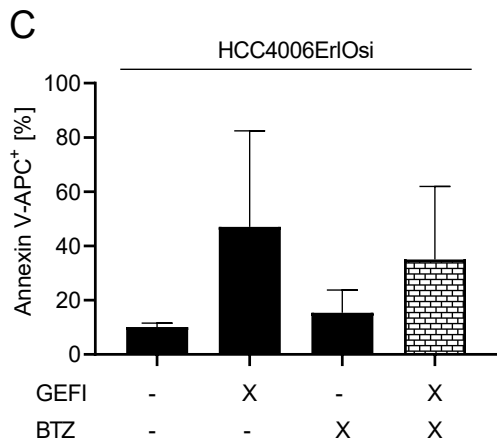
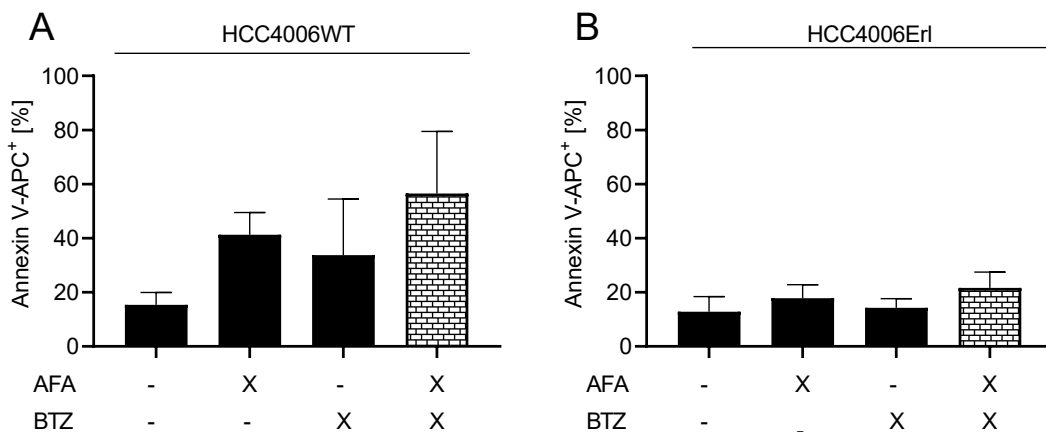


Abbildung 66 HCC4006 im Vergleich: Kombinerter Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M GEFI (A-C). Inkubation über 24 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3; n =4 in ErlOsi.

In allen 3 Zelllinien ist in der Kombination AFA+BTZ der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen am größten. Der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen ist in HCC4006Erl sowohl in den Einzelbehandlungen mit AFA und BTZ als auch in der Kombinationsbehandlung am geringsten. In der Kombination aus AFA+BTZ zeigt die WT-Zelllinie als auch die ErlOsi-Zelllinie ähnliche Anteile von Annexin V-APC positiven Zellen (**Abbildung 67**).



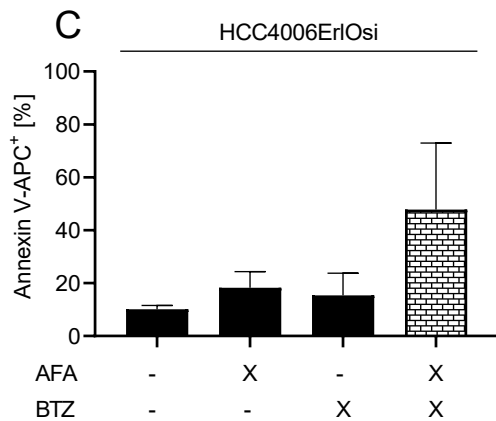
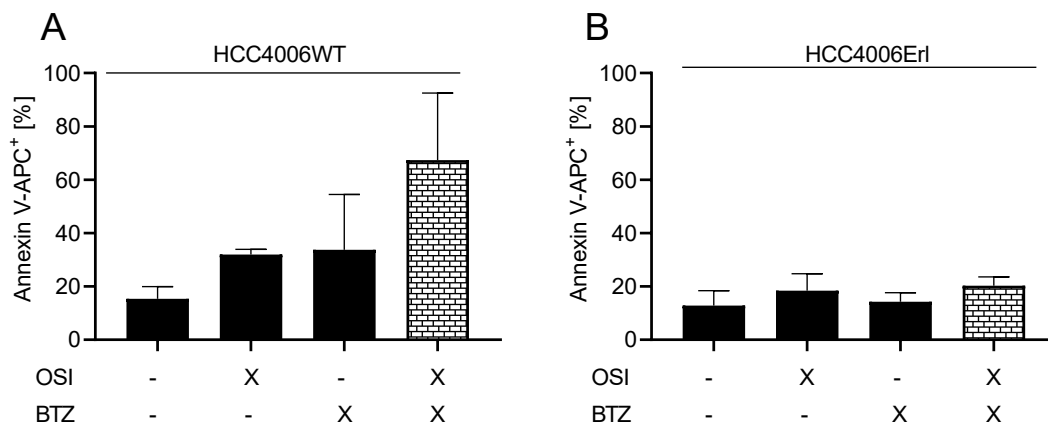


Abbildung 67 HCC4006 im Vergleich: Kombiniertes Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M AFA (A-C). Inkubation über 24 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.; n=4 in Osi

In HCC4006WT und HCC4006Erl ist in der Kombination OSI+BTZ der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen am größten. In der Kombination aus OSI+BTZ zeigt die WT-Zelllinie >60 % Zelltod, in der Erl-Zelllinie <20 % und in ErlOsi ~35 % Annexin V-APC positiven Zellen. Bei der ErlOsi-Zelllinie findet sich bei der Einzelinkubation mit 5 μ M OSI ein Anteil >40 % Annexin V-APC positiven Zellen, im Gegensatz zu <20 % positiven Zellen bei HCC4006Erl (*Abbildung 68*).



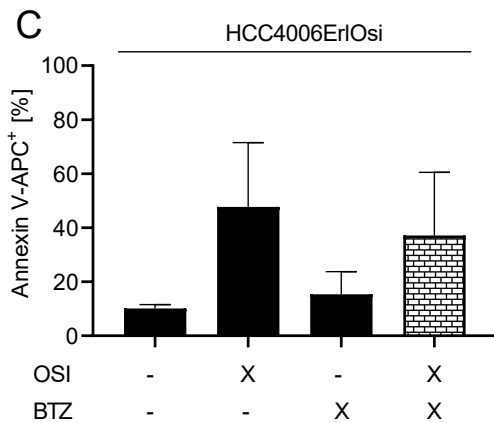


Abbildung 68 HCC4006 im Vergleich: Kombiniertes Einfluss der Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M OSI (A-C). Inkubation über 24 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3; n=4 in ErlOsi.

4.16 Erlotinib resistente Zelllinien mit Erlotinibbehandlung im Vergleich

In der ERLO-resistenten Zelllinie HCC4006Erl kommt es in allen Konzentrationen zu einem niedrigeren Anteil von Annexin V-APC und TMRM low positiven (< 20 %) Zellen im Vergleich zur Wildtyp HCC4006 Zelllinie (~30 %). Die Annexin positiven Zellen sind in den HCC4006WT und in den HCC4006ErlOsi ERLO-Inkubation vergleichbar (<35 %). Der Anteil der TMRM low positiven Zellen ist in den ErlOsi-Zellen dagegen höher (bis fast 60 %) als in den WT-Zellen unter den entsprechenden ERLO-Behandlungen (bis 50 %) (Abbildung 69).

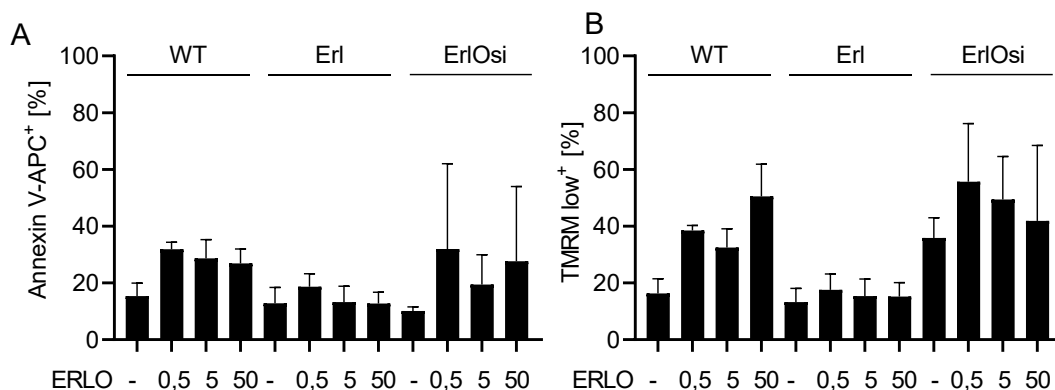


Abbildung 69 HCC4006 im Vergleich: Dosisabhängiger Einfluss der isolierten Gabe von ERLO (A-B). Inkubation über 24 h, Konzentration in [μ M], Detektion der Anteile

von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3, in ErlOsi n =4.

4.17 Morphologische Untersuchungen mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die folgenden Zelllinien untersucht (*Abbildung 70*), um morphologische Hinweise auf ihre Resistenz und Escape Mechanismen zu finden, für die sich bereits in der Lichtmikroskopie Hinweise ergeben haben (vgl. HCC827ErlOsi).

Der Zelldurchmesser der HCC4006ErlOsi und H1650Osi hat im Vergleich zu ihrer Ursprungszelllinie zugenommen.

Die HCC827 Zellen zeigen viele dichtgelagerte Zellkerne. Die Zellkerne sind in der Abbildung blau dargestellt und wurden mit DAPI gefärbt.

Mittels TOM20 Färbung wird die Verteilung und Lage der Mitochondrien (in den Abbildungen rot dargestellt) untersucht. Die Morphologie der Mitochondrien unterscheidet sich in allen Zelllinien: In den HCC4006WT liegen die Mitochondrien eher benachbart zum Zellkern, während sie bei den HCC4006ErlOsi sich eher über die gesamte Zelle verteilt haben. In der HCC4006Erl liegen die Mitochondrien in Clustern vor.

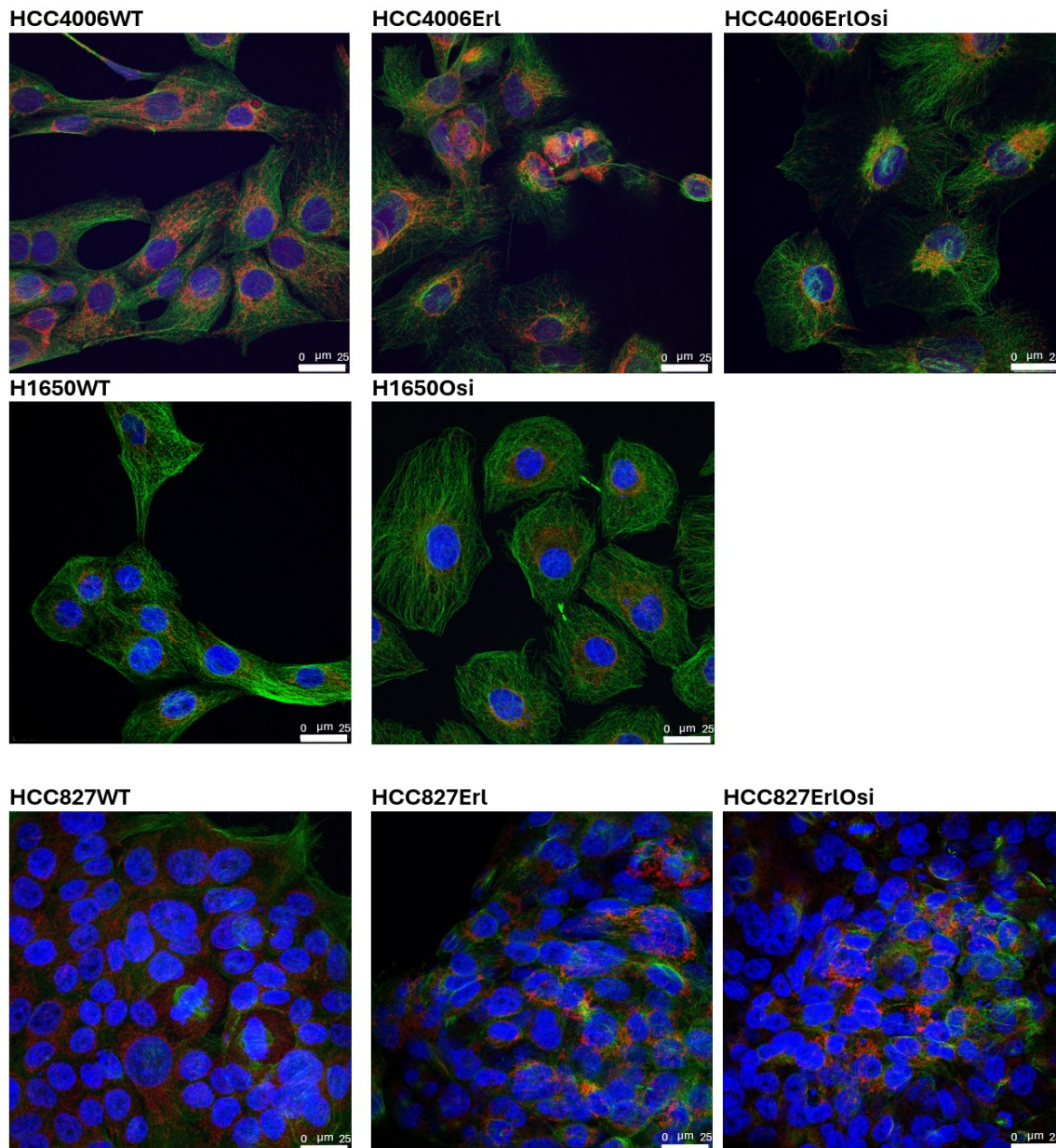


Abbildung 70 Darstellung der Zelllinien in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Blau DAPI, rot TOM20, grün alpha-Tubulin.

4.18 Verhalten der Zelllinien bei längerer Inkubationszeit

Bei Vorversuchen stellte sich heraus, dass es nach 24 h Inkubation noch keinen deutlichen Effekt auf den Anteil von Annexin V-APC positiven und TMRM low positiven Zellen in der Kombinationsbehandlung und der Behandlung mit 5 nM BTZ und/oder 5 µM OSI gibt. Dies zeigt sich insbesondere bei den Zelllinien HCC827Erl, HCC827ErIosi, HCC4006Erl, HCC4006ErIosi und H1650WT und H1650Osi. Deswegen wurde die Inkubation auf 48 h und 72 h verlängert. Für die

folgenden Untersuchungen wurde sich auf die Zelllinien HCC4006 und die Zelllinien H1650 konzentriert.

OSI wird in der deutschen Leitlinie als Erstlinientherapie verwendet (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024)). Darüber hinaus zeigen sich in den Versuchsreihen mit OSI über alle Zelllinien hinweg am zuverlässigsten die größten Anteile von Annexin V-APC und TMRM low positiven Zellen in der Konzentration 5 μ M. Deswegen werden die weiteren Inkubationen mit der Kombination von OSI und BTZ durchgeführt.

Aufgrund der Vorarbeiten mit den HCC4006WT und HCC4006Erl werden auch für die HCC4006ErlOsi in den FACS-Untersuchungen das Konzept mit einem *Gating* nach TMRM und Annexin für die Bestimmung des Zelltods verwendet. Unerwarteterweise findet sich in HCC4006ErlOsi nur eine Population in Bezug auf die TMRM-Expression, sodass ein zuverlässiges *Gating* nicht durchgeführt werden kann. Daher wird in HCC4006ErlOsi ausschließlich die Annexin V-APC Expression zur Zelltodbestimmung herangezogen.

4.18.1 HCC4006: Inkubation über 24 Stunden

In der HCC4006WT Zelllinie zeigt sich bereits nach 24 h in der kombinierten Inkubation von OSI+BTZ ein größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen als die bei den beiden Einzelbehandlungen (*Abbildung 71*). Die Zelllinie zeigt jedoch bereits in der Kontrolle einen hohen Prozentsatz von Annexin V-APC positiven Zellen.

Insbesondere zeigt die HCC4006ErlOsi-Zelllinie einen deutlich größeren Anteil an TMRM low positiven Zellen im Vergleich zum Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen bei der Inkubation mit BTZ (*Abbildung 72*). Zu beachten ist jedoch, dass es bei der Expression von TMRM low in den HCC4006ErlOsi nur eine Population gibt, sodass ein *Gating* nach TMRM low und high nicht möglich ist.

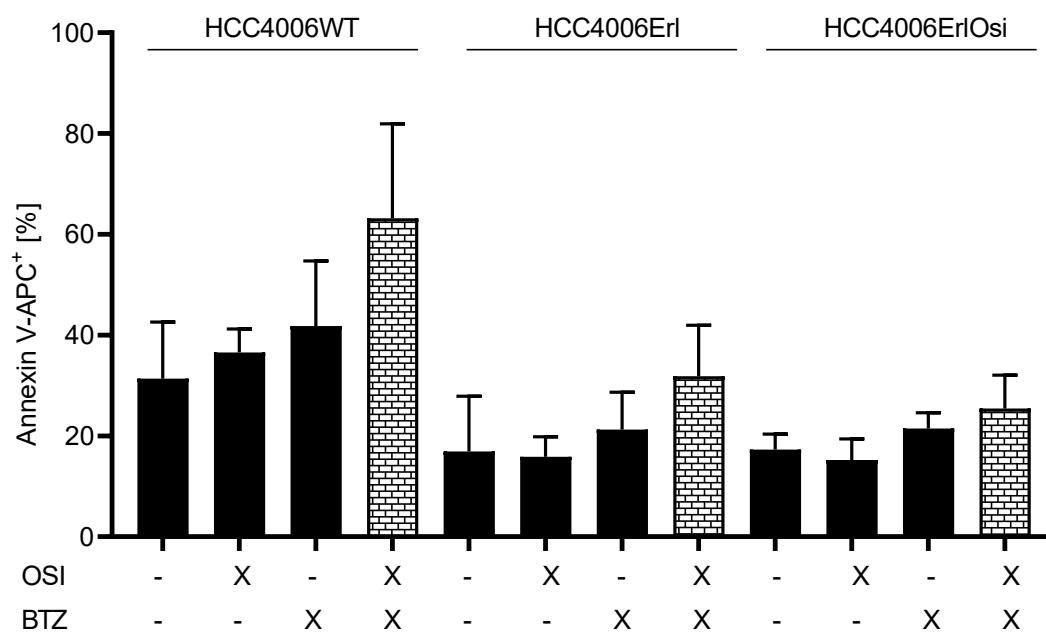


Abbildung 71 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h. Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4.

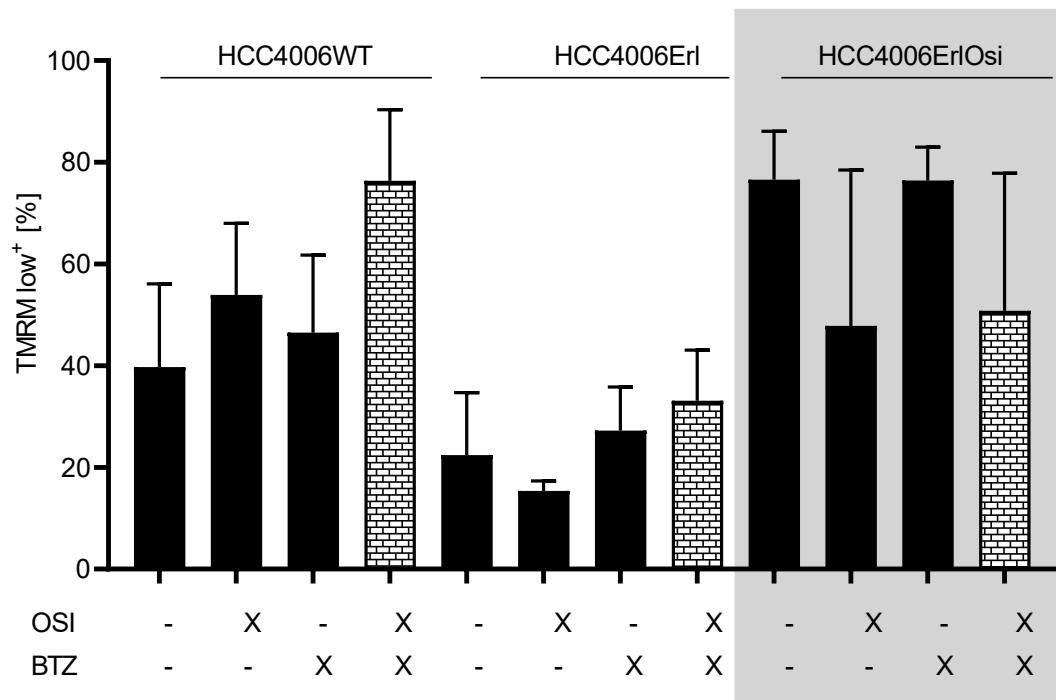


Abbildung 72 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h. Mittelwert \pm SD; n=4, grau unterlegt HCC4006ErIosi siehe Anmerkung in 4.18.

4.18.2 HCC4006: Inkubation über 48 Stunden

Der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen ist in allen 3 Zelllinien im Vergleich zur 24 h Inkubation sowohl in den Einzelbehandlungen wie auch in der Kombinationsbehandlung angestiegen (Abbildung 73). Der Anteil der TMRM low positiven Zellen in der HCC4006ErIosi-Zelllinie ist weiterhin deutlich höher als der entsprechende Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen (Abbildung 74). Zu beachten ist jedoch, dass es bei der Expression von TMRM low in den HCC4006ErIosi nur eine Population gibt, sodass ein *Gating* nach TMRM low und high nicht möglich ist.

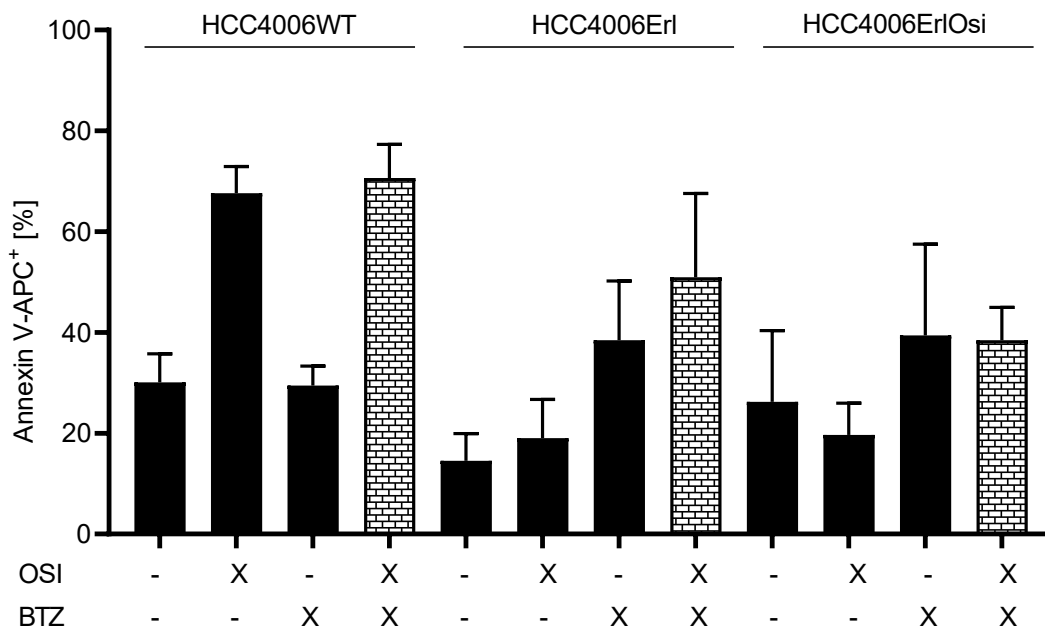


Abbildung 73 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 48 h. Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4.

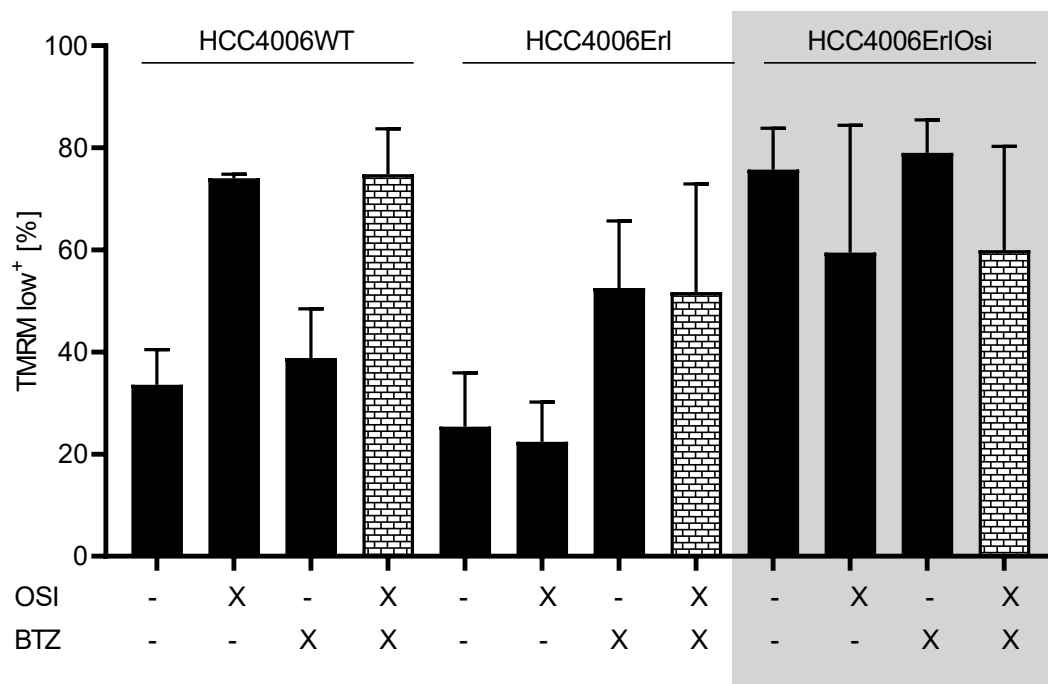


Abbildung 74 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 48 h. Detektion der Anteile von TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, grau unterlegt HCC4006ErlOsi siehe Anmerkung in 4.18.

4.18.3 HCC4006: Inkubation über 72 Stunden

Bei der EGRF Wildtyp Ziellinie zeigt sich bei der alleinigen 72-stündigen Inkubation mit OSI ein Anteil von >80 % Annexin V-APC positiven Zellen, bei der Kombinationsbehandlung im Durchschnitt ein Anteil von >75 % Annexin V-APC positiven Zellen (Abbildung 75).

HCC827Erl zeigt einen signifikant höheren Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit BTZ und OSI.

Bei HCC4006ErlOsi zeigt sich ein tendenziell größerer Anteil an Annexin V-APC positiven Zellen in der Kombinationsbehandlung mit OSI+BTZ als bei den Einzelinkubationen. Darüber hinaus zeigen sich bei allen Behandlungen als auch in der Kontrolle >70 % der Zellen in der HCC4006ErlOsi Zelllinie TMRM low positiv (Abbildung 76). Zu beachten ist jedoch, dass es bei der Expression von TMRM low in den HCC4006ErlOsi nur eine Population gibt, sodass ein Gating nach TMRM low und high nicht möglich ist.

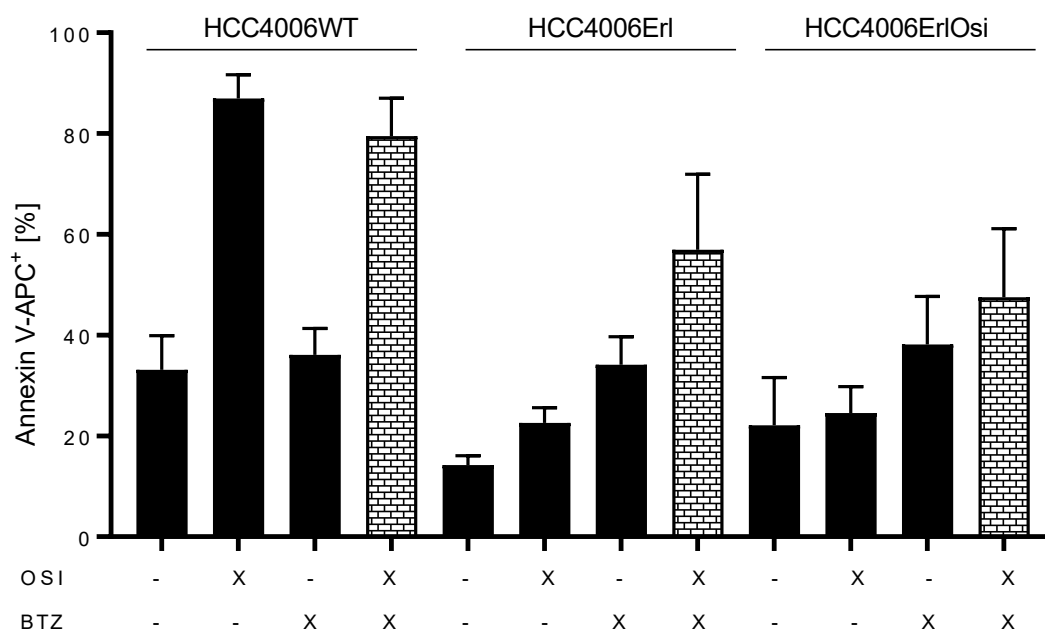


Abbildung 75 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 72 h. Detektion der Anteile von TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4.

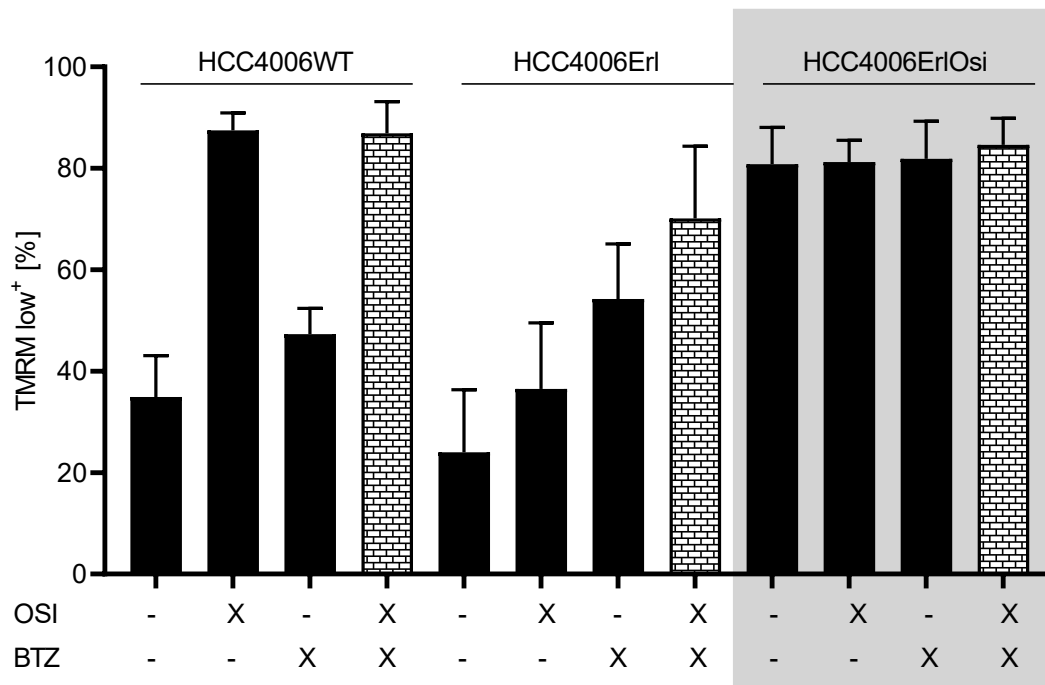


Abbildung 76 HCC4006: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 72 h. Detektion der Anteile TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, grau unterlegt HCC4006ErIOsi siehe Anmerkung in 4.18.

4.18.4 Einfluss der Dauerinkubation mit Osimertinib über unterschiedliche Zeiträume auf Annexin V Expression

Ziel dieser Experimente war die Frage, ob eine Verlängerung der Dauerinkubation mit OSI eine Veränderung der Annexin V-APC positiven Zellen beeinflusst. Zum früheren Zeitpunkt zeigen die HCC4006Er/Osi einen höheren Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen bei der Inkubation mit 5 μ M OSI im Vergleich zum zweiten Zeitpunkt, bei dem der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen vergleichbar mit der Kontrolle ist. Außerdem ist der Anteil der apoptotischen Zellen nach der Inkubation von OSI+BTZ in den HCC4006Er/Osi in der 2. Messung geringer (~20 %) als in der 1. Messung (~40 %). Eine verlängerte Dauerinkubation mit OSI führt zu einer Zunahme der Resistenz gegenüber Osimertinib.

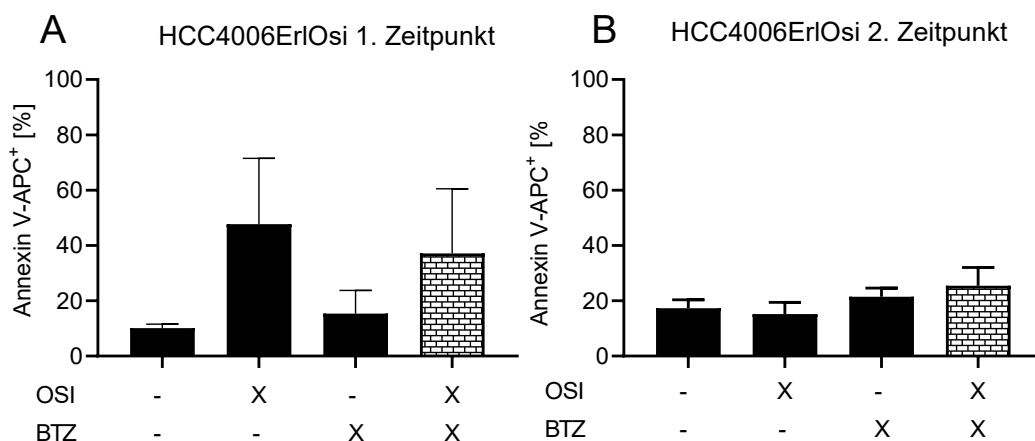


Abbildung 77 HCC4006: Einfluss der Dauerinkubation mit OSI auf die kombinierte Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-B). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; 1. Zeitpunkt n=4, 2. Zeitpunkt n=3.

Um eine Zunahme der Resistenz gegenüber OSI auch in anderen Zellen über die Zeit zu untersuchen, wurde die Annexin V-APC Expression der H1650Osi an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Zum späteren Zeitpunkt zeigt sich bei der Inkubation ~15 % Annexin V-APC positive Zellen, während zum ersten Zeitpunkt noch ~60 % der Zellen Annexin V-APC exprimieren. In der Kombination OSI+BTZ zeigen sich zum 2. Messzeitpunkt auch geringere

Anteile von apoptotischen Zellen (~20 %), als im Vergleich zum 1. Messzeitpunkt (~35 %). Die Resistenz hat somit zugenommen.

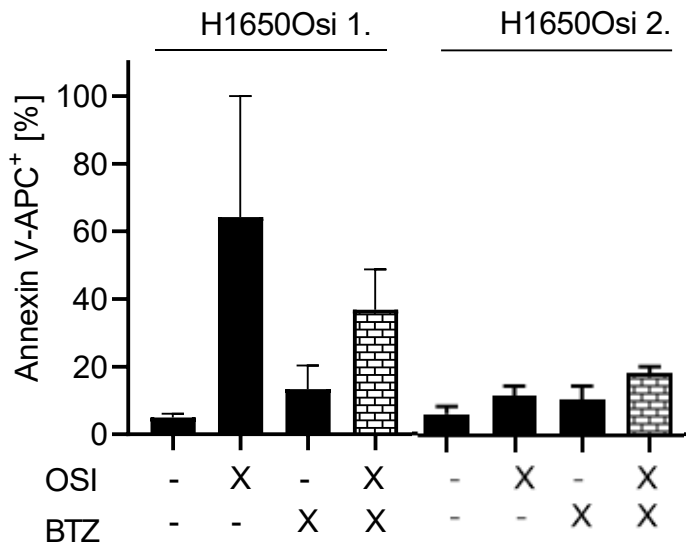
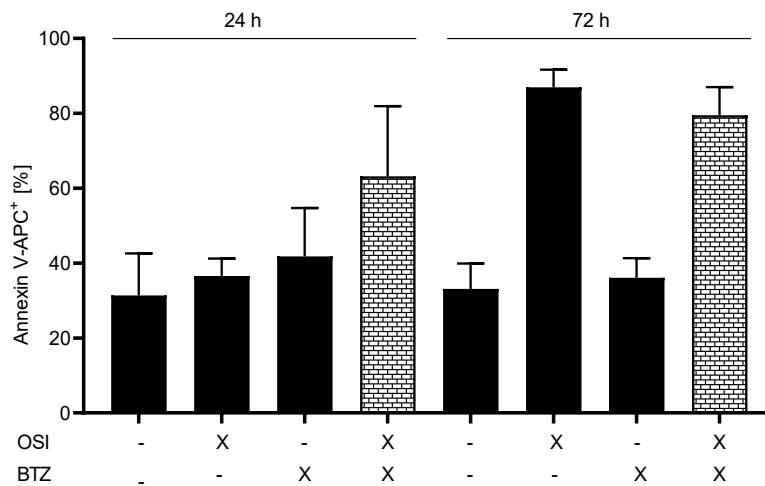


Abbildung 78 H1650: Einfluss der Dauerinkubation mit OSI auf die kombinierte Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h. Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.19 Unterschiede in der p53 Expression in den HCC4006

P53 ist ein Tumorsuppressorgen, eine p53-Mutation findet sich in vielen malignen Tumoren und fördert die Pathogenität. In dieser Arbeit wurde die Expression von p53 in verschiedenen mutierten HCC4006 Zelllinien untersucht, um dadurch Rückschlüsse auf eine mögliche Resistenzdurchbrechung finden zu können.

HCC4006WT zeigt nach 72 h bei der Inkubation mit 5 μ M OSI eine schwächer exprimierte Bande. Die stärkste Bande wird in der Kontrolle nach 72 h und bei BTZ 5 nM nach 72 h exprimiert. Die Bande von der Doppelkombination zeigt eine schwächere Bande nach 72 h (Abbildung 79). Zum Vergleich werden bei allen Western Blot Ergebnissen die entsprechenden durchflusszytometrischen Ergebnisse der HCC4006 Zelllinie (vgl. 4.18) nach 24 und 72 h gezeigt.



HCC4006WT

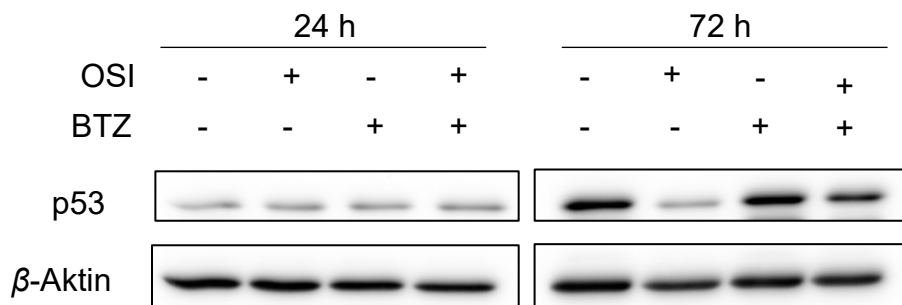
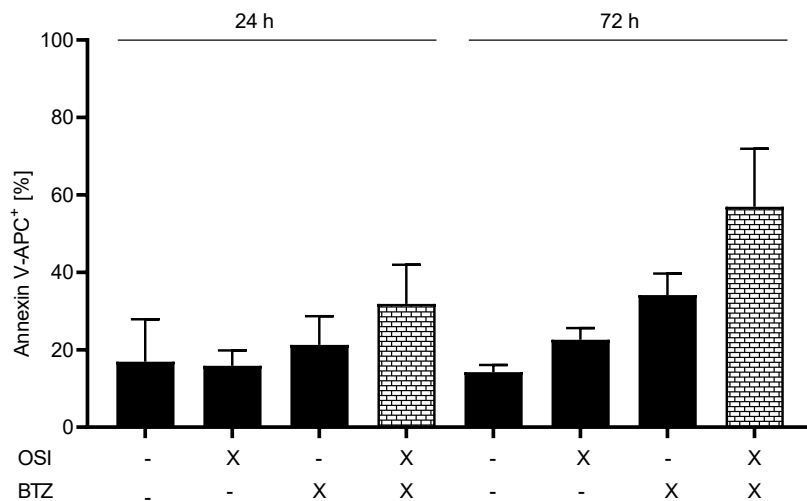


Abbildung 79 Proteinexpression von p53 in HCC4006WT nach Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

In HCC4006Erl zeigt sich die niedrigste Proteinexpression Bande von p53 in der kombinierten Inkubation von 5 μ M OSI und 5 nM BTZ nach 72 h (Abbildung 80).



HCC4006Erl

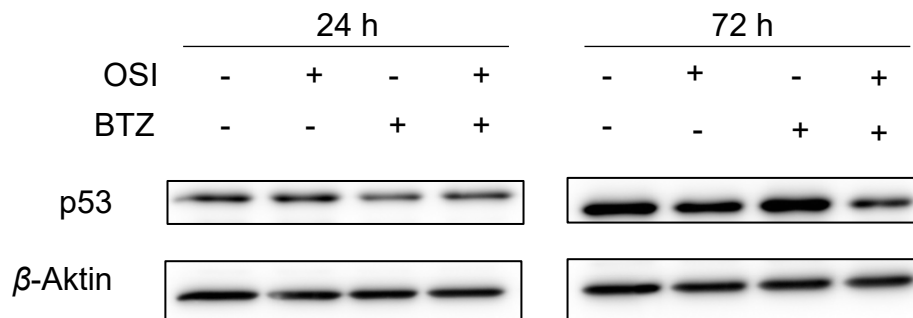
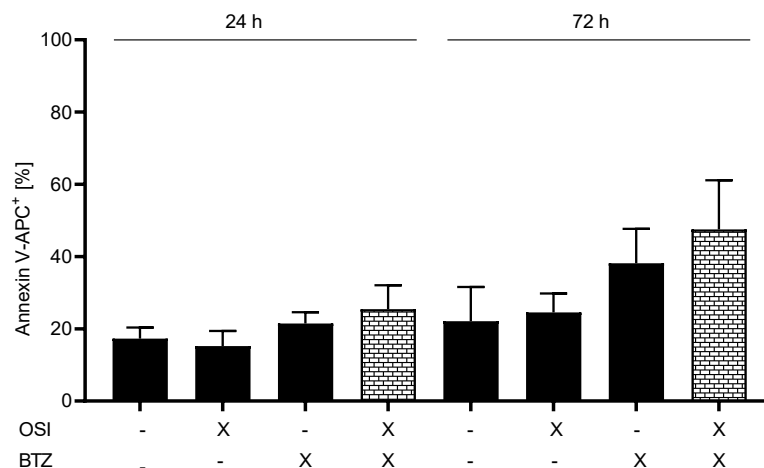


Abbildung 80 Proteinexpression von p53 in HCC4006Erl nach Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

In HCC4006ErlOsi zeigt sich bereits nach 24 h kombinierte Inkubation bei der Proteinexpression von p53 die schwächste Expression. Nach 72 h Inkubation kommt es zur schwächsten Expression in der Einzelbehandlung von OSI 5 μ M und in der Doppelkombination.

In allen drei HCC4006-Zelllinien scheint es in der OSI+BTZ-Inkubation zu den geringsten Intensitäten von p53 Expression zu kommen.



HCC4006ErlOsi

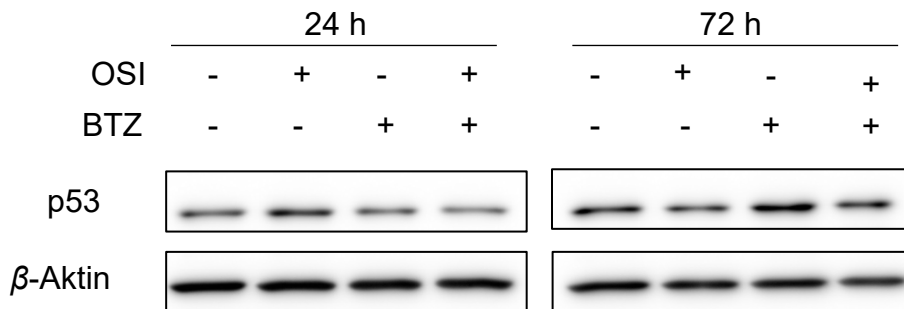


Abbildung 81 Proteinexpression von p53 in HCC4006ErlOsi nach Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln oder in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

4.20 Einfluss der BCL-2-Proteine auf die Apoptose in HCC4006

Neben den durchflusszytometrischen Untersuchungen wird das apoptotische Verhalten der Zellen auch auf Proteinebene im Western Blot und auf Genebene in der qPCR analysiert.

Bei der intrinsischen Apoptose spielt die BCL-2-Proteinfamilie eine große Rolle.

HCC4006WT, HCC4006Erl, HCC4006ErlOsi exprimieren kein BCL-2. Die Spezifität des Antikörpers für BCL-2 wurde in der Zelllinie MCF7.3.28 bestätigt. BAK ist nach 72 h in der BTZ und der Kombinationsbehandlung am stärksten exprimiert. Darüber hinaus zeigt sich bei BAX die kräftigste Bande bei der Inkubation

mit BTZ, bei BOK zeigt sich die Bande nochmal stärker bei der Einzelbehandlung mit BTZ nach 72 h im Vergleich zu den anderen Inkubationsbedingungen. BCL-xL wird am stärksten nach 72 h in der Einzelbehandlung mit BTZ exprimiert.

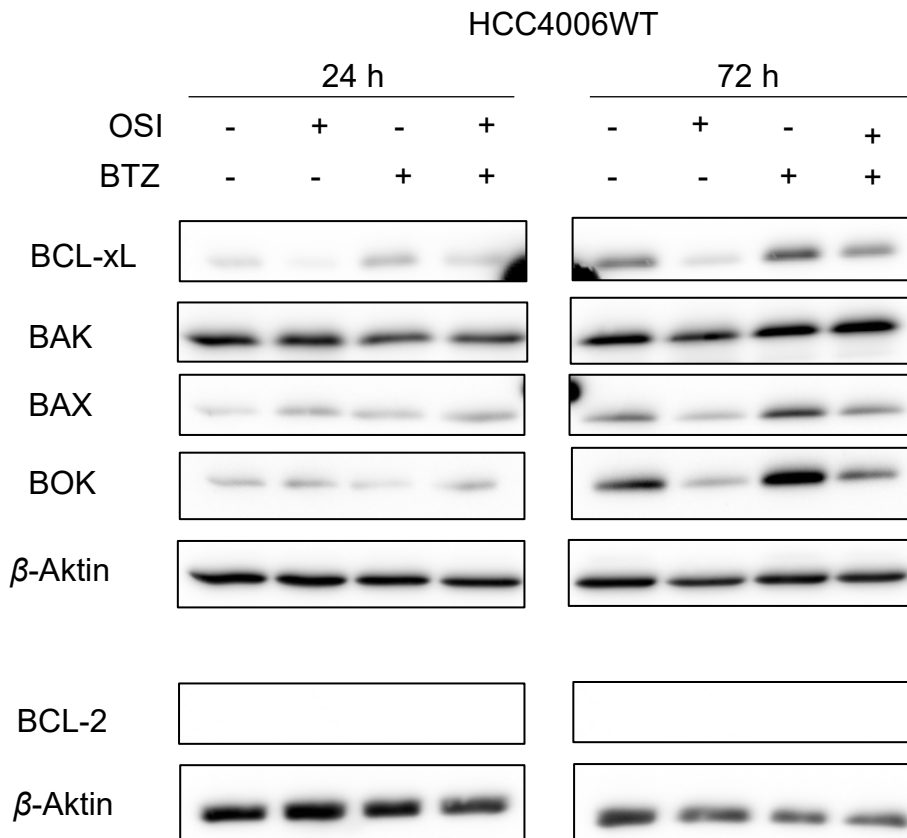
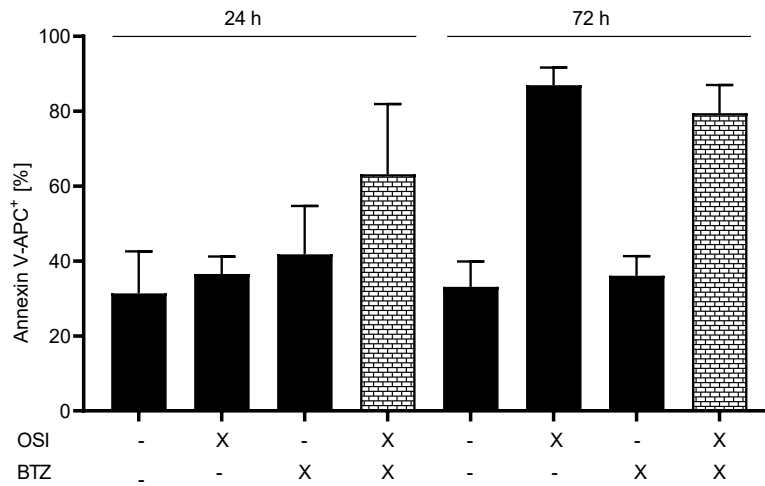
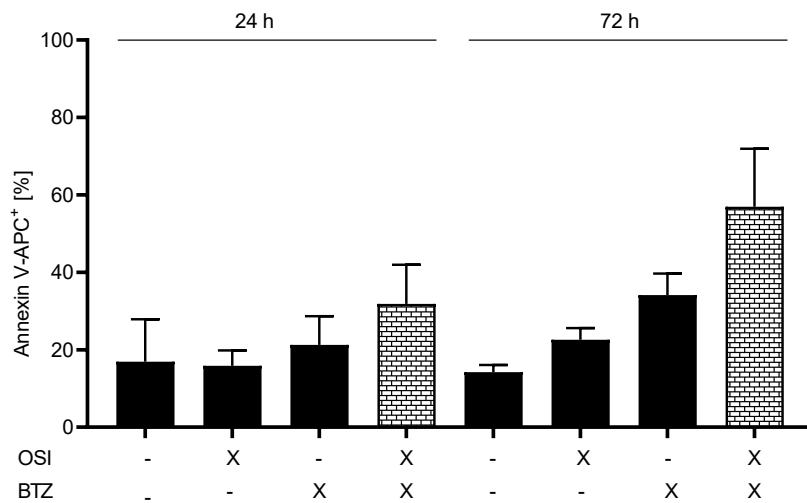


Abbildung 82 Proteinexpression von BCL-2-Proteinen in HCC4006WT. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5

nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

Die Zelllinie HCC4006Erl zeigt die stärkste BAK-Expression bei der 72 h stündigen Inkubation mit Osimertinib. BAX und BOK zeigen nach 72 h in den beiden Einzelbehandlungen eine ähnliche Expression, in der Kombinationsbehandlung aus 5 μ M OSI und 5 nM BTZ eine etwas schwächere Expression, vor allem auch im Vergleich mit BAX. BCL-xL wird am stärksten nach 24 h Inkubation mit 5 nM BTZ exprimiert.



HCC4006Erl

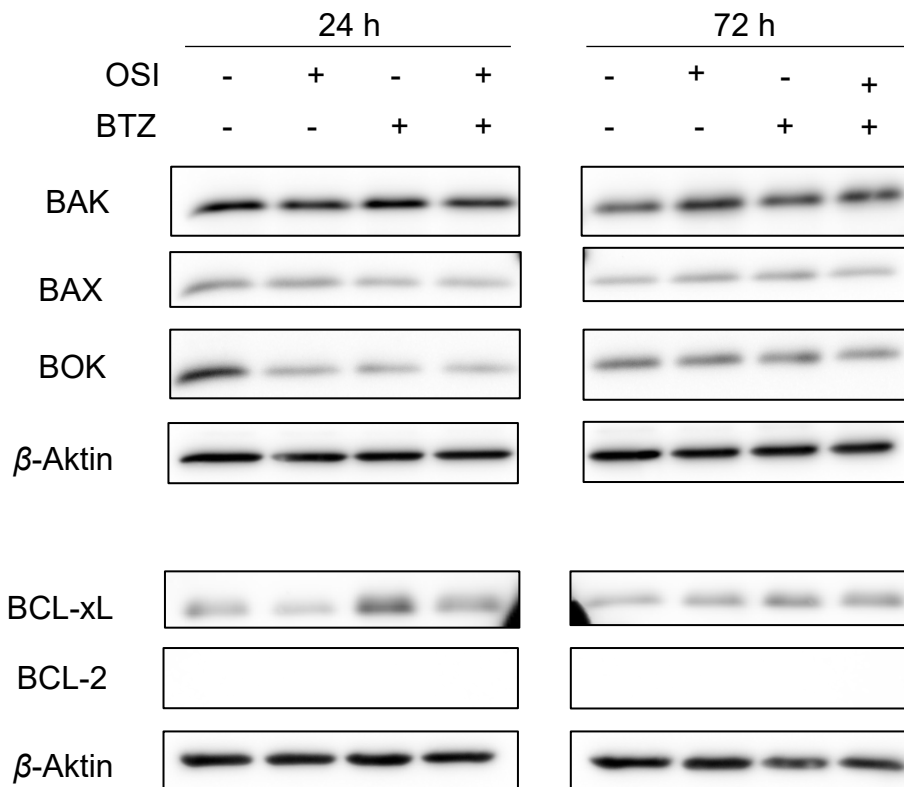


Abbildung 83 Proteinexpression von BCL-2-Proteinfamilie in HCC4006Erl Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

Die Zelllinie HCC4006Er/Osi zeigt nach 72 h Inkubation eine deutlich höhere Expression von BOK als nach 24 h Inkubation. Außerdem wird BAK in den Einzelbehandlungen induziert, am stärksten ist die BAK-Induktion in der Doppelbehandlung. BAK wird nach 72 h am kräftigsten in der Einzelbehandlung mit BTZ und in der Kombinationsbehandlung induziert. Die kräftigste Bande bei BCL-xL findet sich in der Einzelbehandlung mit 5 μ M OSI für 72 h.

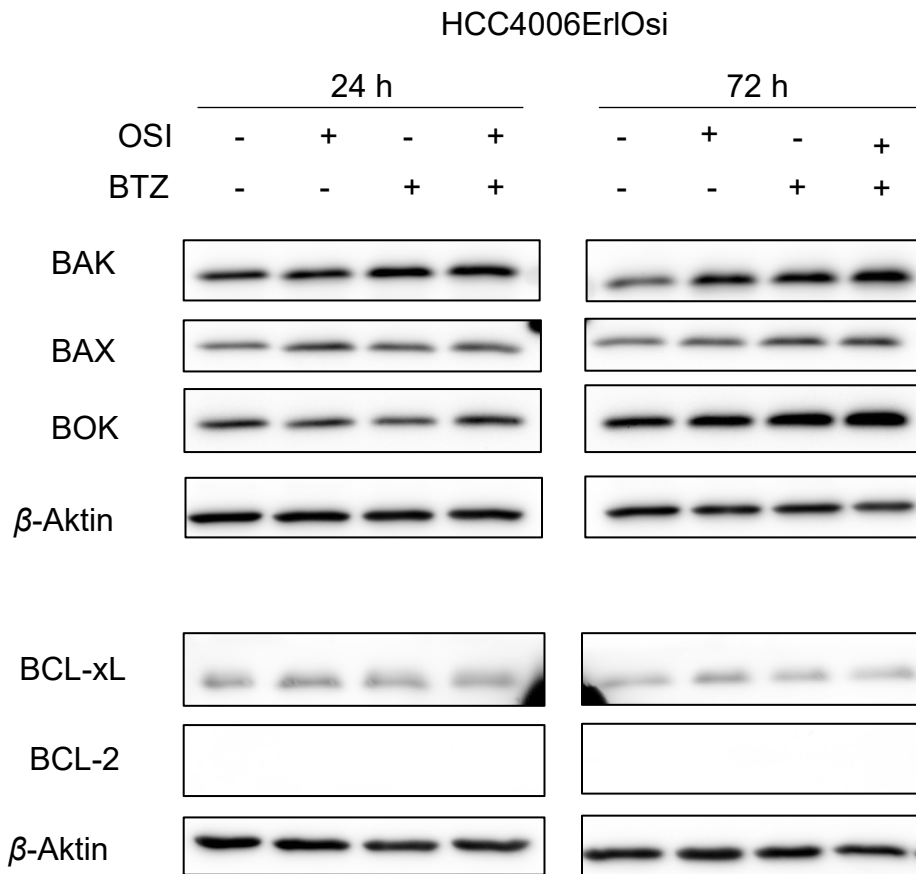
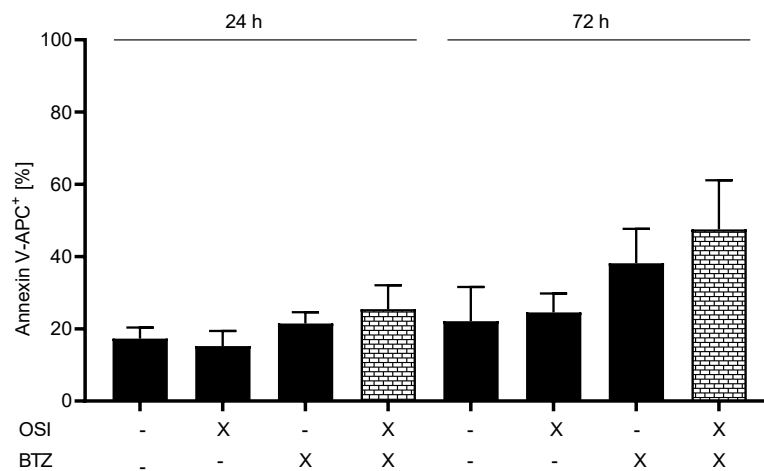


Abbildung 84 Proteinexpression von BCL-2-Proteinfamilie in HCC4006ErlOsi Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

4.20.1 NOXA

In HCC4006WT zeigt sich bei der kombinierten Behandlung eine Induktion von NOXA. Bei der Inkubation mit BTZ findet sich eine deutlich schwächere Expression. MCL-1, was von NOXA gebunden wird, zeigt in der Kombinationsbehandlung die kräftigste Bande.

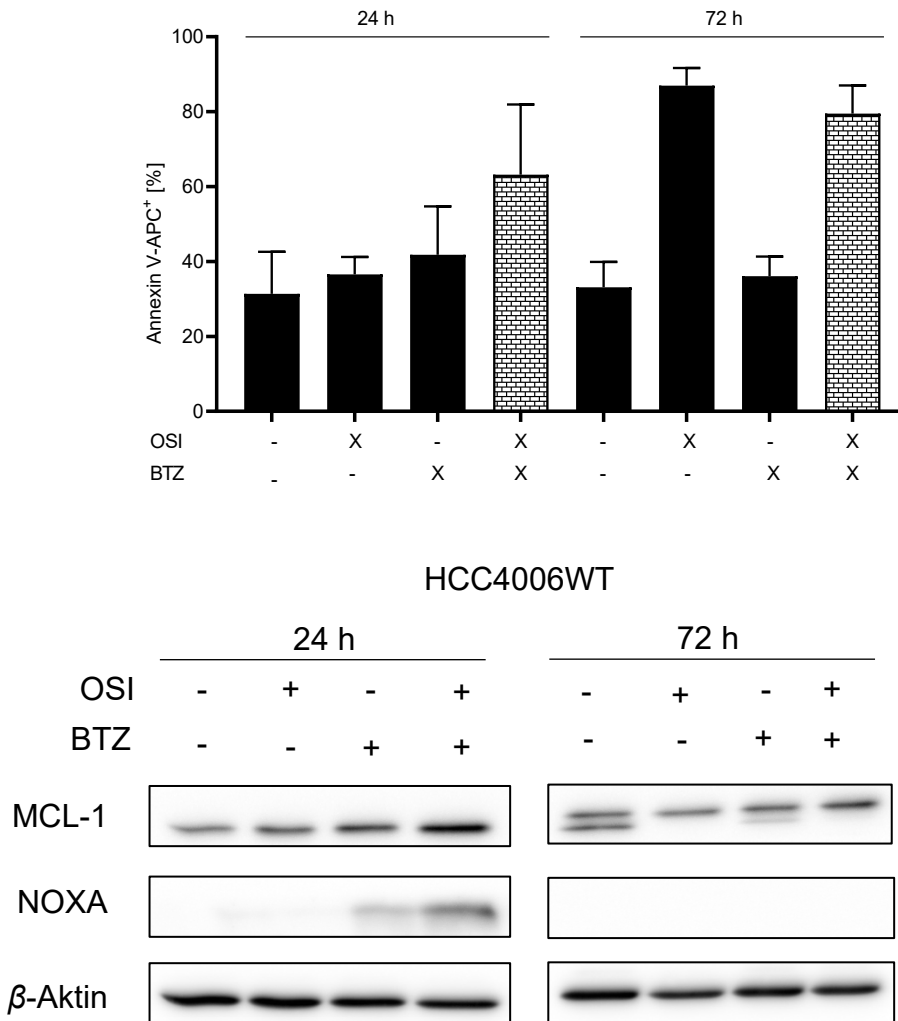


Abbildung 85 Proteinexpression von BH3-only-protein NOXA in HCC4006WT. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

Bei der Detektion der MCL-1-Bande nach einer Inkubation mit 72 h zeigt sich eine Doppelbande in der Kontrolle und eine schwächere 2. Bande in der Einzelinkubation mit BTZ. Hier wird auch MCL-1 in der Kombinationsbehandlung am stärksten exprimiert.

Die qPCR-Analyse der Genexpression in der WT-Zelllinie nach 24-stündiger Inkubation ergibt eine vermehrte Expression des PMAIP1 Genes, welches für NOXA codiert, in der Einzelbehandlung von 5 nM BTZ und in der Kombinationsinkubation von OSI+BTZ.

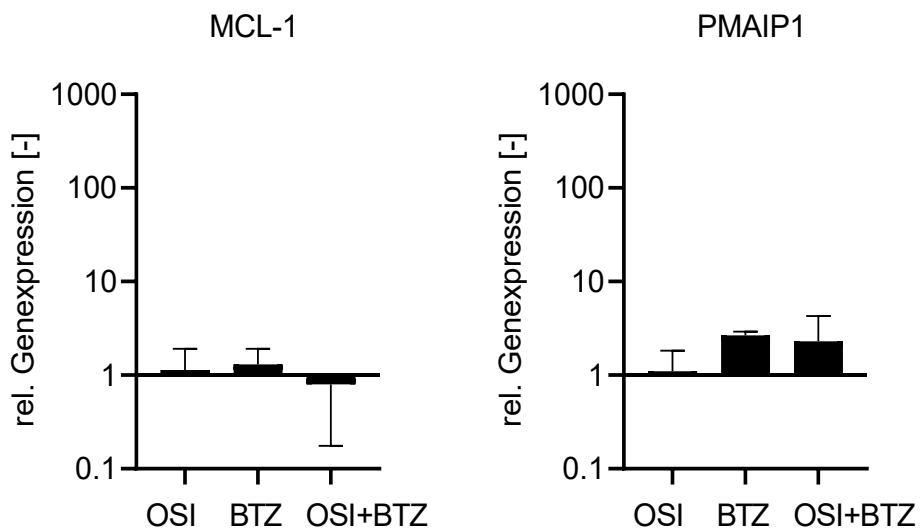
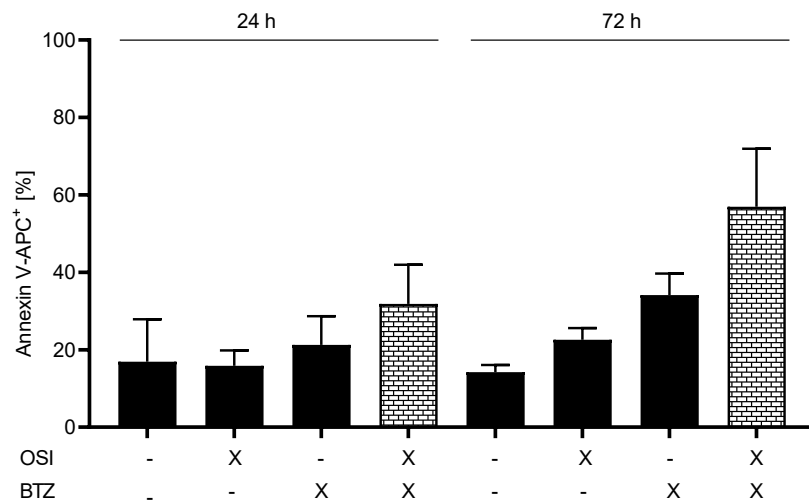


Abbildung 86 mRNA-Genexpression von BH3-only-protein NOXA und MCL-1 in HCC4006WT. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h.

In HCC4006Erl zeigt sich im Western Blot bei der Kombinationsbehandlung die höchste Expression von NOXA und MCL-1. Auch die Inkubation mit BTZ induziert eine hohe NOXA und MCL-1 Expression, jedoch nicht so hoch wie in der Kombinationsbehandlung.



HCC4006Erl

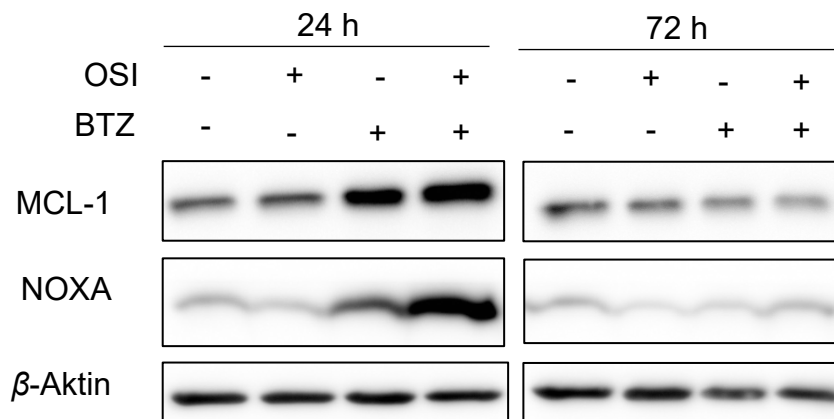


Abbildung 87 Proteinexpression von BH3-only-protein NOXA in HCC4006Erl Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

Nach 72 h Inkubation findet sich in HCC4006Erl keine Doppelbande. Während sich in der Kontrolle und in der Kombinationsbehandlung die kräftigsten NOXA-Expressionen zeigen, findet sich die höchste MCL-1 Expression in der Kontrolle und der alleinigen Inkubation mit Osimertinib.

Auch eine qPCR-Analyse der Genexpression der HCC4006WT nach 24-stündiger Inkubation zeigt eine vermehrte Expression des MCL-1 Genes bei der

Einzelbehandlung mit BTZ und in der kombinierten Inkubation von 5 μ M OSI und 5 nM BTZ.

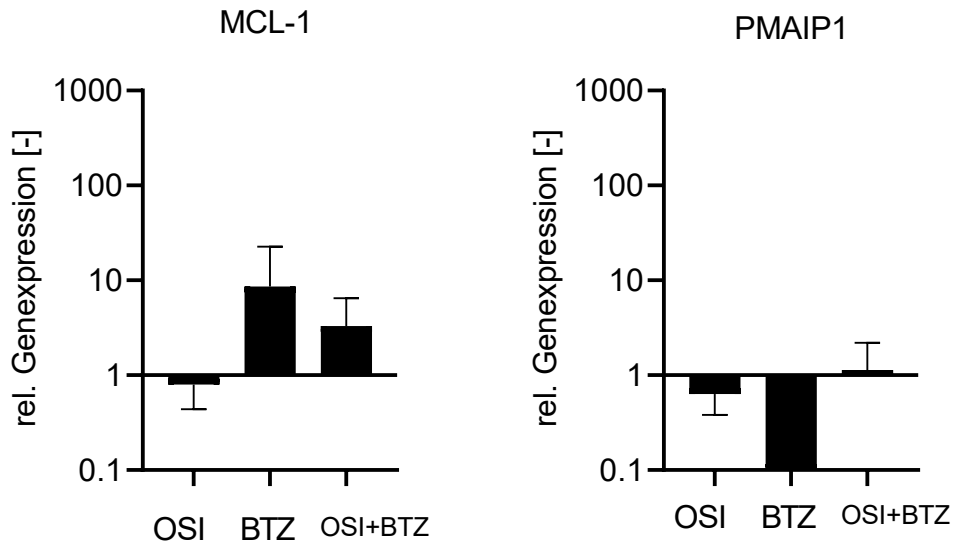
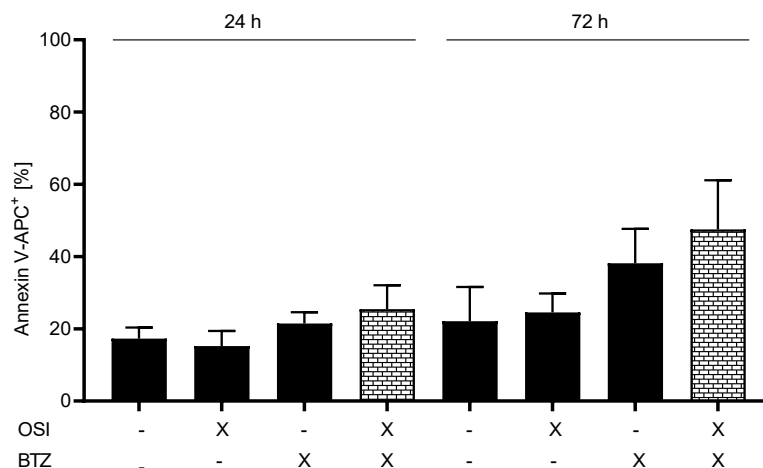


Abbildung 88 mRNA-Genexpression von BH3-only-protein NOXA und MCL-1 in HCC4006Erl. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h.

Nach Inkubation von OSI+BTZ für 24 h in HCC4006ErlOs zeigt sich auch hier eine deutliche Expression von NOXA, analog dazu zeigt sich die höchste MCL-1 Expression auch in der Kombinationsbehandlung.



HCC4006ErlOsi

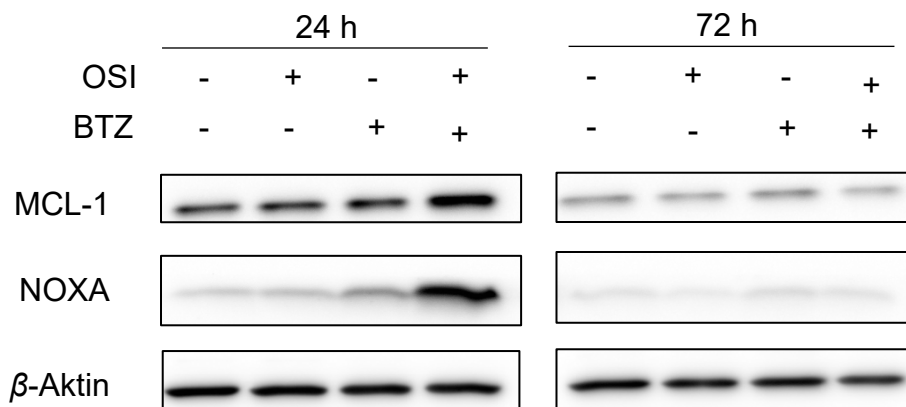


Abbildung 89 Proteinexpression von BH3-only-protein NOXA in HCC4006ErlOsi Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

Nach 72 h Inkubation zeigt sich weiterhin in der Kombinationsbehandlung die höchste NOXA-Expression.

MCL-1 zeigt die höchste Expression bei der isolierten Inkubation mit BTZ. NOXA zeigt auch in der BTZ-Einzelbehandlung die höchste Expression. Es zeigt sich keine Doppelbande bei MCL-1 in der Kontrolle.

4.21 Mitochondriale Beteiligung in HCC4006

Die Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle in der intrinsischen Apoptose. In den vorangegangenen Experimenten haben sich Unterschiede der EGFR mutierten WT-Zelllinien (HCC4006, HCC827, H1650) in Bezug auf die Einzelinkubationen mit EGFR-TKI und BTZ, als auch der Kombinationsbehandlung gezeigt. Darüber hinaus zeigen sich weitere Unterschiede der EGFR mutierten Zelllinien, die resistent gegen mindestens ein Erstgeneration EGFR-TKI sind, insbesondere bei der kombinierten Inkubation eines EGFR-TKI+BTZ, wie eine Apoptoseinduktion.

Deswegen wird mit Hilfe der Mito Stress Test Analyse die Reaktion der Mitochondrien unter Inkubation für 24 h mit 5 μ M OSI im Vergleich zur Kontrolle untersucht.

4.21.1 HCC4006: Sauerstoffverbrauchsrate

In HCC4006WT zeigt sich beim Mito Stress Test eine eingeschränkte mitochondriale Antwort nach der Inkubation mit OSI 5 μ M für 24 h.

Die basale Respiration ist bei den Kontroll-Zellen höher als bei den für 24 h mit 5 μ M OSI inkubierten Zellen. Bei der Untersuchung der ATP-gebundenen Atmung, bei der die Menge an Sauerstoff gemessen wird, die für die ATP-Produktion verbraucht wird, zeigt sich keine Abweichungen. Bei der unbehandelten Zelllinie besteht ein größerer Protonenverlust. Die maximale Respiration ist bei den mit OSI behandelten Zellen eingeschränkt. Die Reservekapazität ist bei den behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle eingeschränkt. Die behandelten Zellen zeigen einen erhöhten nichtmitochondrialen Sauerstoffverbrauch.

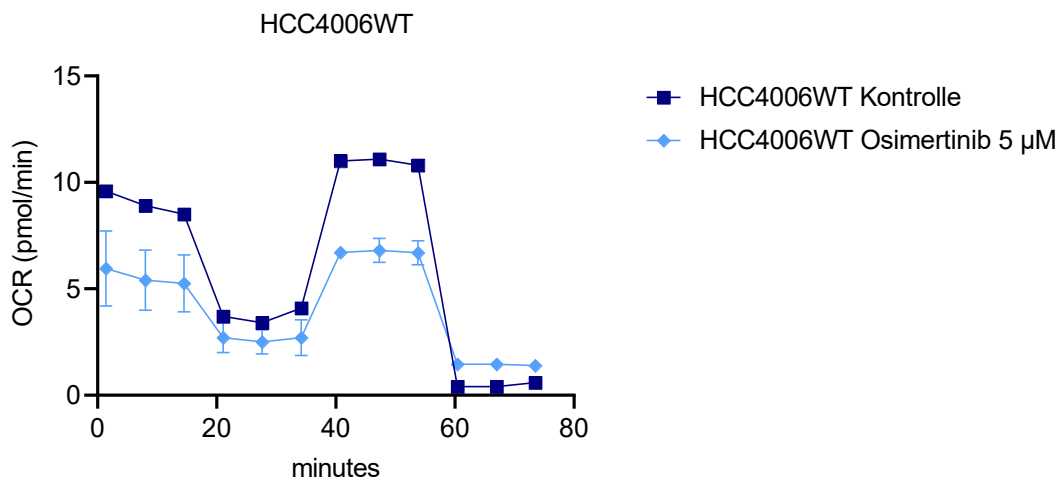


Abbildung 90 HCC4006WT: Sauerstoffverbrauchsrate in der Mito Stress Test Analyse. Inkubation mit 5 μ M OSI für 24 h. OCR [pmol/min]. n=2.

Bei HCC4006Erl zeigt sich in der Mito Stress Test Analyse eine unveränderte mitochondriale Antwort nach der Inkubation mit OSI 5 μ M für 24 h im Vergleich zur Kontrolle. Die basale Respiration unterscheidet sich zwischen der unbehandelten und der mit OSI inkubierten Zelllinie nicht. Auch die Menge an Sauerstoff, die für die ATP-Produktion verbraucht wird, unterscheidet sich nicht. Das Protonenleck sowie die maximale Respiration sind in etwa gleich groß. Die Reserveatmungskapazität ist dagegen nahezu gleich groß. Die nicht-mitochondriale Atmung verläuft ungefähr auf dem gleichen Niveau.

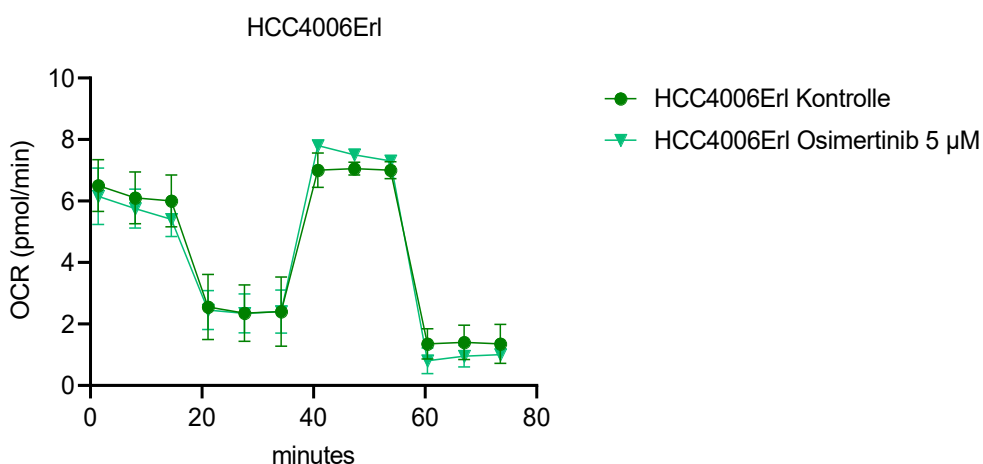


Abbildung 91 HCC4006Erl Sauerstoffverbrauchsrate in der Mito Stress Test Analyse. Inkubation mit 5 μ M OSI für 24 h. OCR [pmol/min]. n=2.

Bei HCC4006ErIosi zeigt sich in der Mito Stress Test Analyse eine ähnliche mitochondriale Antwort nach der Inkubation mit OSI 5 μM für 24 h wie ohne Inkubation. Bei dieser Zelllinie zeigt sich eine erhöhte maximale Respiration der mit OSI inkubierten Zellen, im Vergleich zu ihrer Kontrolle, die ebenso eine größere Reserve-Atmungskapazität tragen.

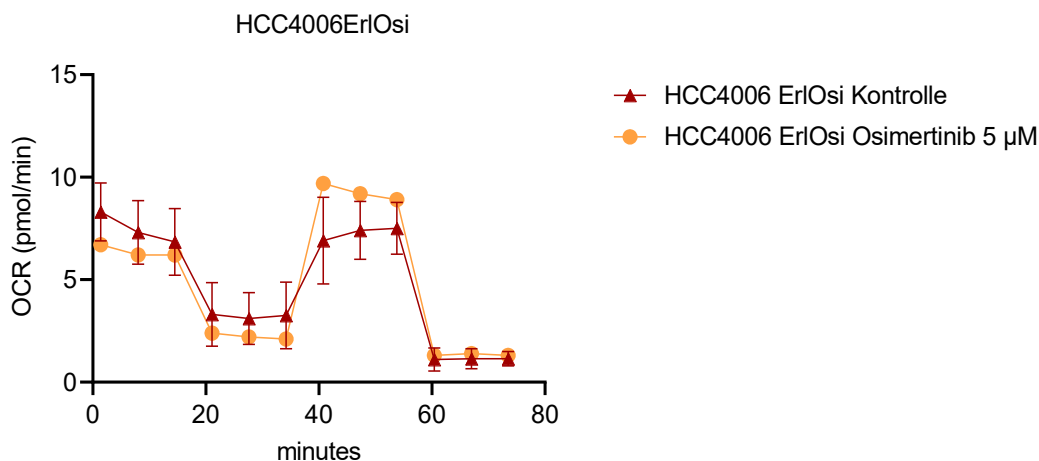


Abbildung 92 HCC4006ErIosi: Sauerstoffverbrauchsrate in der Mito Stress Test Analyse. Inkubation mit 5 μM OSI für 24 h. OCR [pmol/min]. n=2

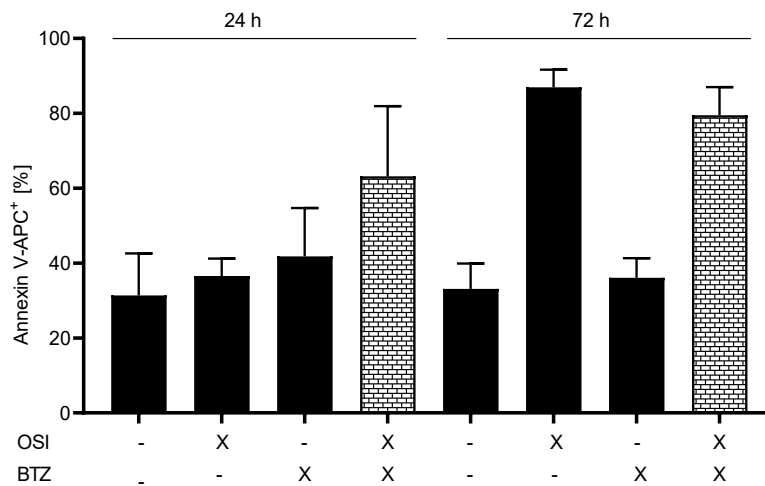
4.22 Einfluss der Inkubation mit EGFR-TKI und BTZ in HCC4006 auf integrierte Stressantwort

Bei der intrinsischen Apoptose spielt die integrierte Stress-Antwort eine große Rolle. Die ISR ist ein zentraler Kontrollmechanismus der Zelle, um sich anzupassen und zu überleben (Szaruga et al., 2023) und wird in malignen Tumoren unterschiedlich stark exprimiert.

Im Western Blot entspricht nur die obere Bande der ATF3 Expression.

Nach 72 h Inkubation finden sich die kräftigsten ATF3 Expressionen in der BTZ-Einzelbehandlung wie auch in der kombinierten Behandlung von 5 μM OSI und 5 nM BTZ für 72 h.

Nach 24 h Inkubation findet sich für ATF4 die höchste Expression in der kombinierten Behandlung in der WT-Zelllinie.



HCC4006WT

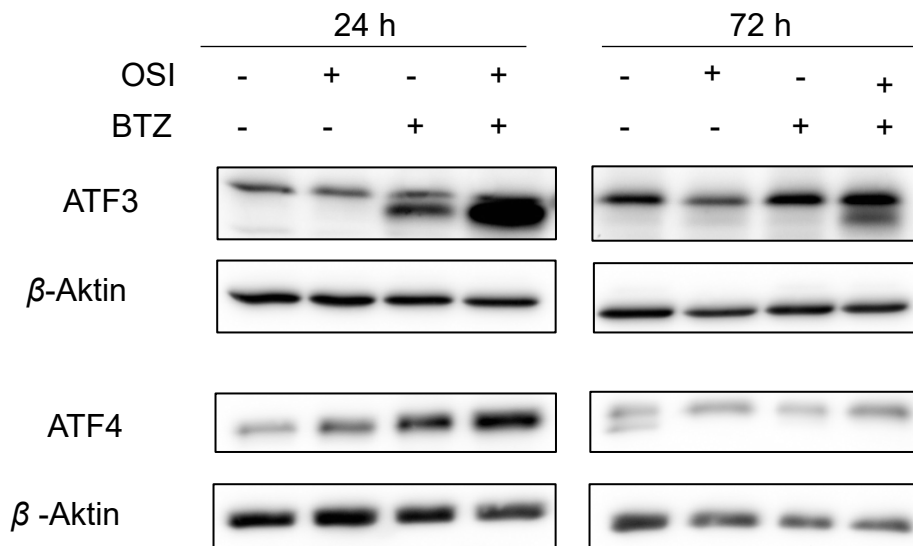


Abbildung 93 Proteinexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006WT. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

Auch eine qPCR-Analyse der Genexpression in HCC4006WT nach 24-stündiger Inkubation ergibt eine vermehrte Expression des ATF4 Genes über alle Behandlungen hinweg. Bei ATF3 kommt es zu einer verminderten Expression bei allen Behandlungen.

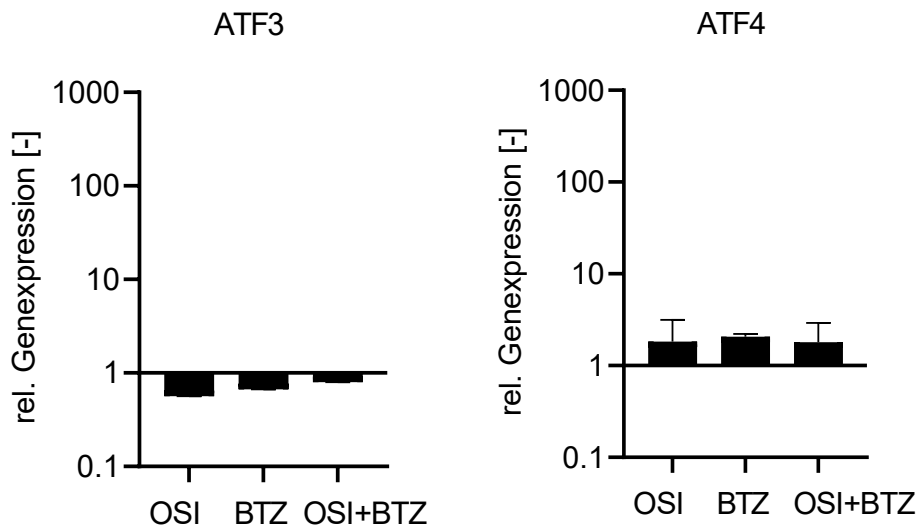


Abbildung 94 mRNA-Genexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006WT. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h.

Bei HCC4006Erl zeigt sich nach 24 h die höchste Proteinexpression bei der Einzelbehandlung mit BTZ, danach folgt die Expression der kombinierten Inkubation. Nach 72 h zeigt sich in der kombinierten Inkubation und der Osimertinib-Einzelbehandlung die höchste Expression.

ATF4 zeigt die höchsten Proteinexpressionen bei 24 h Inkubation mit BTZ und der Kombination aus OSI+BTZ.

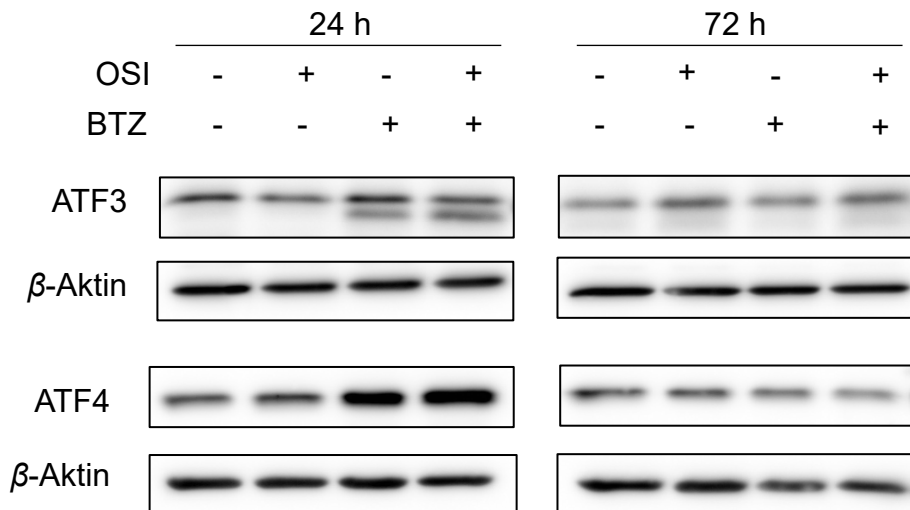
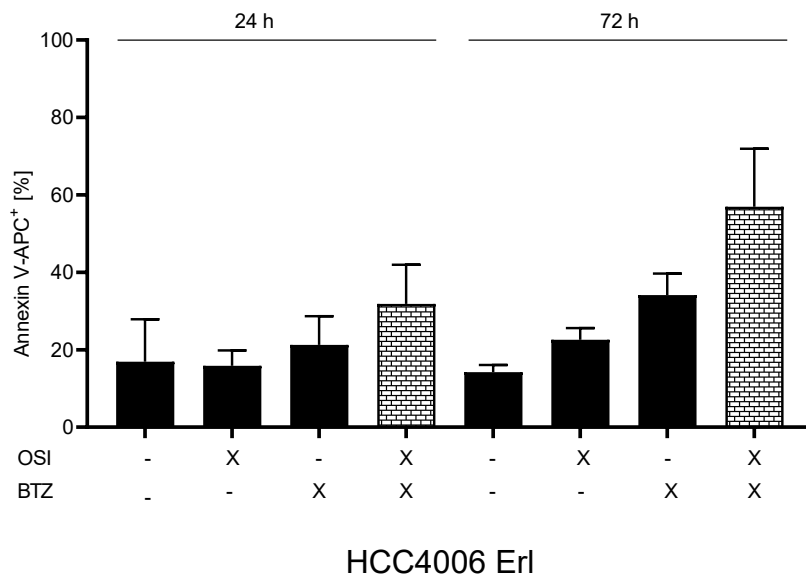


Abbildung 95 Proteinexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006Erl Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

Auch eine qPCR-Analyse der Genexpression in der HCC4006Erl nach 24-stündiger Inkubation ergibt eine vermehrte Expression des ATF3- als auch des ATF4- Genes bei der Einzelbehandlung mit BTZ und in der kombinierten Inkubation von 5 μ M OSI und 5 nM BTZ.

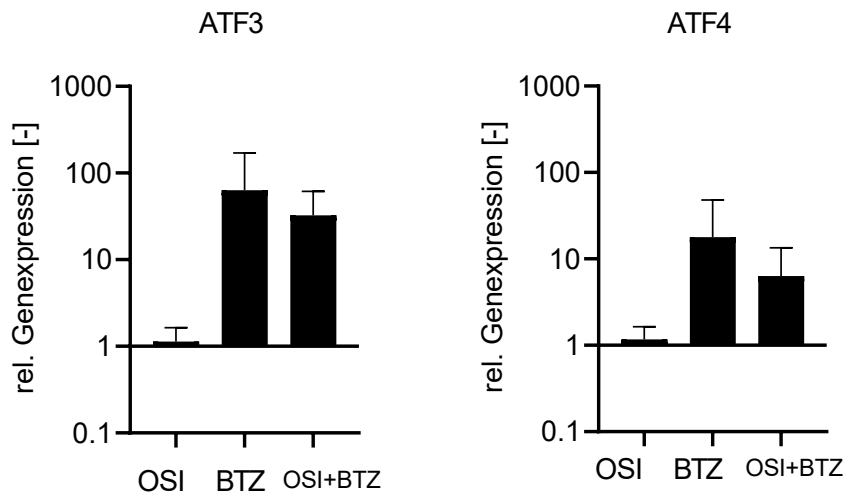
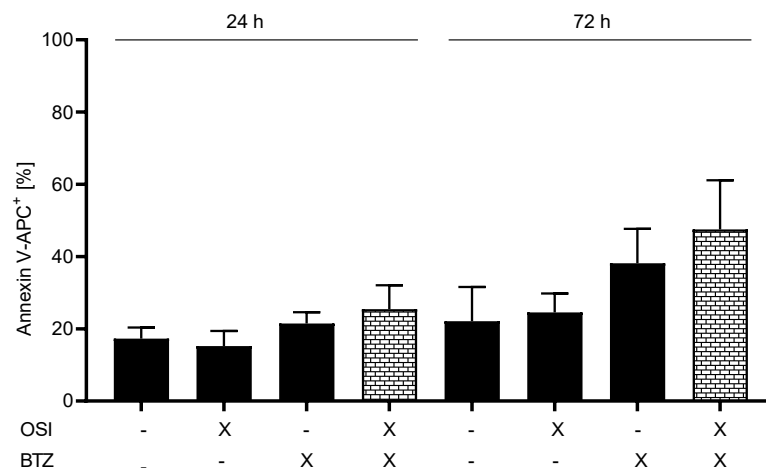


Abbildung 96 mRNA-Genexpression der ATF3 und ATF4 in HCC4006Erl. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h.

ATF3 wird nach 24 h in der BTZ-Einzel- und in der kombinierten Behandlung am stärksten induziert. Nach 72 h zeigt sich bei ATF3 die höchste Expression in der Kombinationsbehandlung von OSI+BTZ. ATF4 zeigt die höchste Proteinexpression nach 24 h Inkubation mit der Kombination OSI+BTZ. Diese Expression ist deutlich höher als die Expression bei der isolierten Inkubation mit BTZ für 24 h.



HCC4006Er/Osi

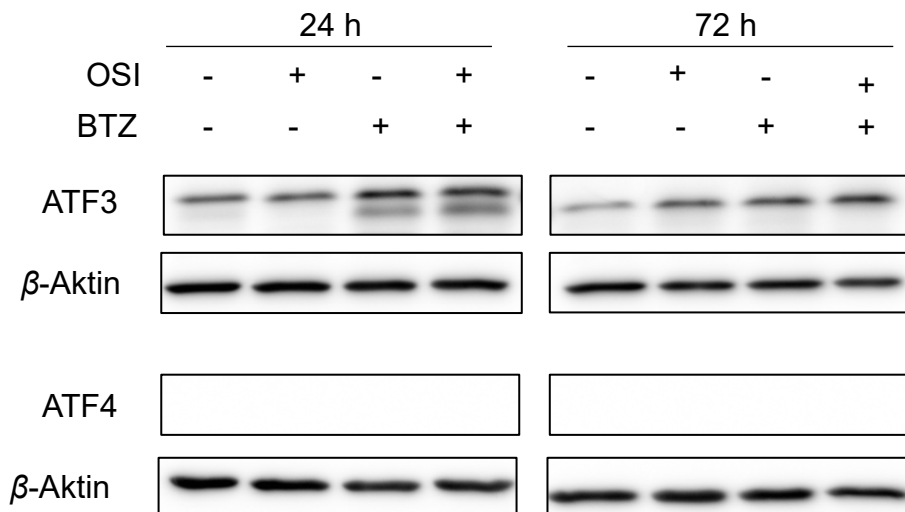


Abbildung 97 Proteinexpression von ATF3 und ATF4 in HCC4006Er/Osi. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h. Zum Vergleich entsprechende durchflusszytometrische Ergebnisse der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h und 72 h, Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=4, Beschreibung der durchflusszytometrischen Ergebnisse siehe Abbildung 71 und Abbildung 75.

4.23 Unterschiede und Wirkungen in anderen NSCLC Zelllinien

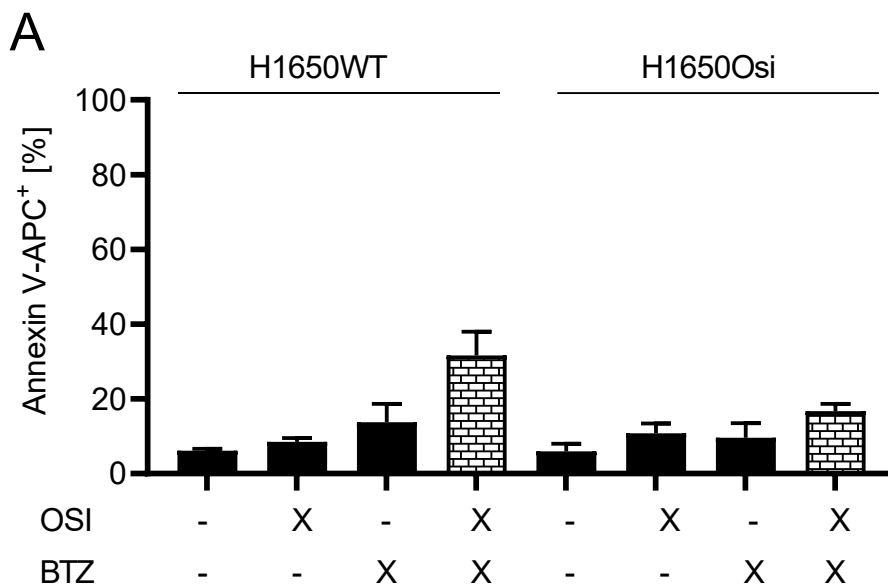
Um zu überprüfen, ob eine Inkubationsdauer von 48 h und 72 h in anderen NSCLC-Zelllinien in der Kombinationsbehandlung Zelltod induzieren kann, werden die beiden H1650WT und H1650Osi durchflusszytometrisch untersucht. Die H1650 besitzen bereits eine beschriebene Resistenz gegen EGFR-TKI der

ersten Generation (Sos et al., 2009). Damit lässt sich auch die Hypothese untersuchen, ob eine kombinierte Anwendung von OSI+BTZ insbesondere in NSCLC Zelllinien effektiv ist, welche bereits eine Mutation gegen ein EGFR-TKI entwickelt haben.

4.23.1 H1650: Inkubation über 24 Stunden

In der H1650WT Zelllinie zeigt sich bereits nach 24 h in der kombinierten Inkubation von OSI+BTZ ein größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen als bei den beiden Einzelbehandlungen (~35 % zu ~15 %).

Die H1650Osi Zelllinie zeigt in der kombinierten Behandlung von OSI+BTZ einen größeren Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen als bei den beiden Einzelbehandlungen. Jedoch liegt der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen <20 %. Bei H1650WT liegt der Anteil der apoptotischen Zellen in der Kombination OSI+BTZ bei >25 %. Der Anteil der TMRM low Zellen verläuft parallel zum Anteil der Annexin V positiven Zellen.



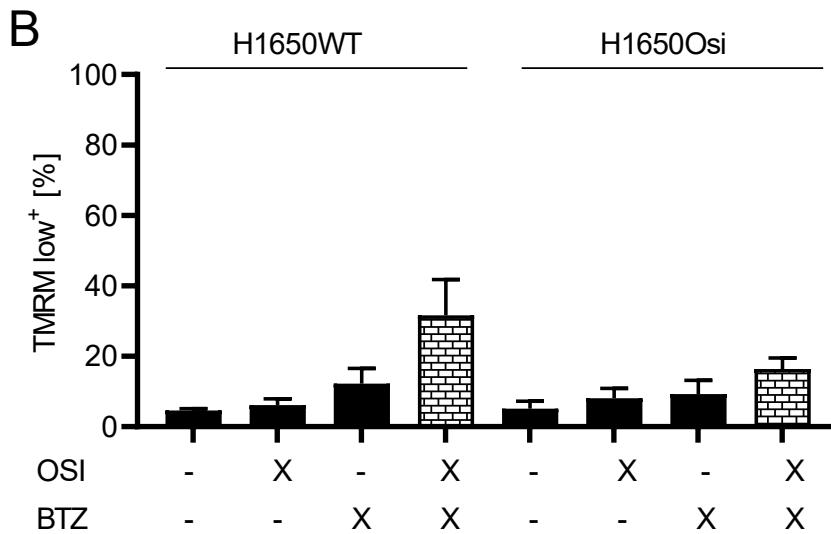


Abbildung 98 H1650: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 24 h (A-B). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.23.2 H1650: Inkubation über 48 Stunden

Der bei der 24 h beobachtete Effekt setzt sich bei der längeren Inkubation fort: In H1650WT zeigt sich weiterhin in der kombinierten Inkubation von OSI+BTZ ein signifikant größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen, als dies bei den beiden Einzelbehandlungen der Fall ist (~50 %, im Gegensatz bei BTZ ~40 %, OSI ~20 %).

Die H1650Osi zeigt gleich zu ihrer parentalen Zelllinie in der kombinierten Behandlung von OSI+BTZ einen größeren Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen (~35 %) als bei den beiden Einzelbehandlungen (~15-20 %). Der Anteil der Annexin V-APC positiven Zellen ist jedoch weiterhin niedriger als bei der WT-Zelllinie.

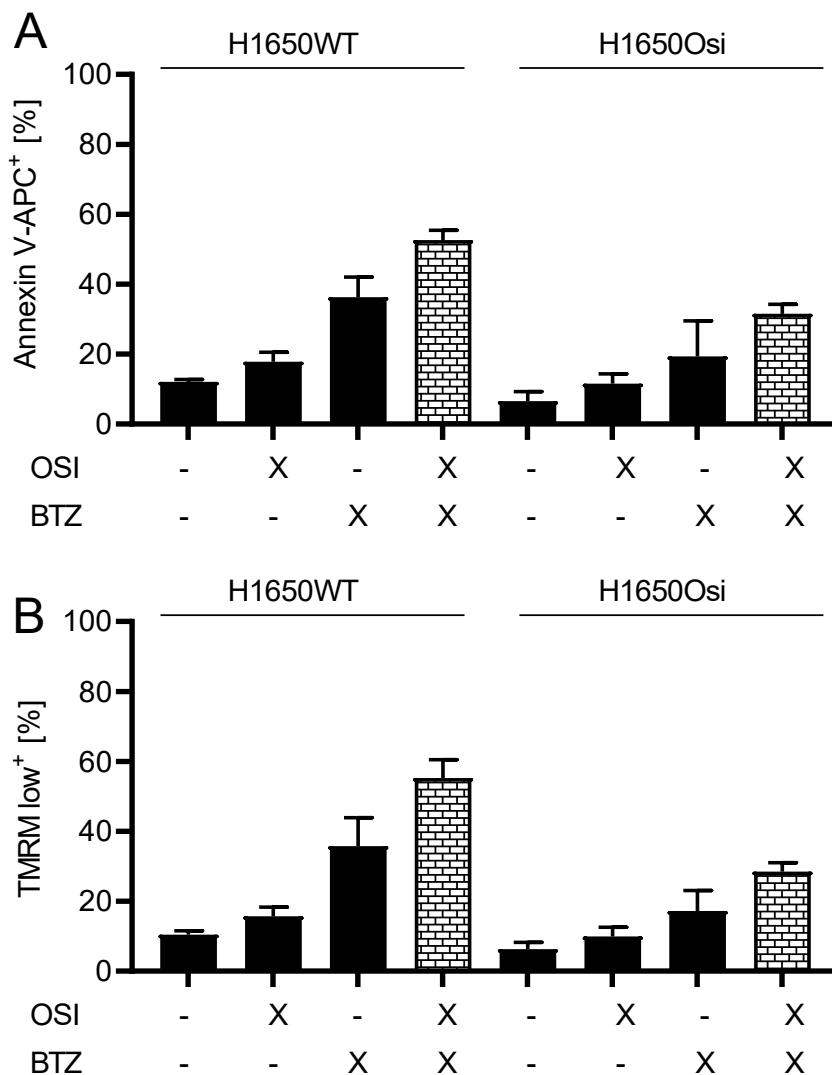


Abbildung 99 H1650: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 48 h (A-B). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.23.3 H1650: Inkubation über 72 Stunden

Bei H1650WT zeigt sich bei der alleinigen 72-stündigen Inkubation mit OSI ein Anteil von <25 % Annexin V-APC positiven Zellen, bei der Inkubation mit BTZ ~40 % und in der Kombinationsbehandlung ein signifikant größerer Anteil von ~60 % Annexin V-APC positiven Zellen (Abbildung 100).

Bei H1650Osi zeigt sich ein größerer Anteil von Annexin V-APC positiven Zellen (~35 %) im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit BTZ (~20 %) und OSI (~15

%). Die Anteile von TMRM low positiven Zellen verlaufen in der Tendenz wie die Annexin V-APC Anteile.

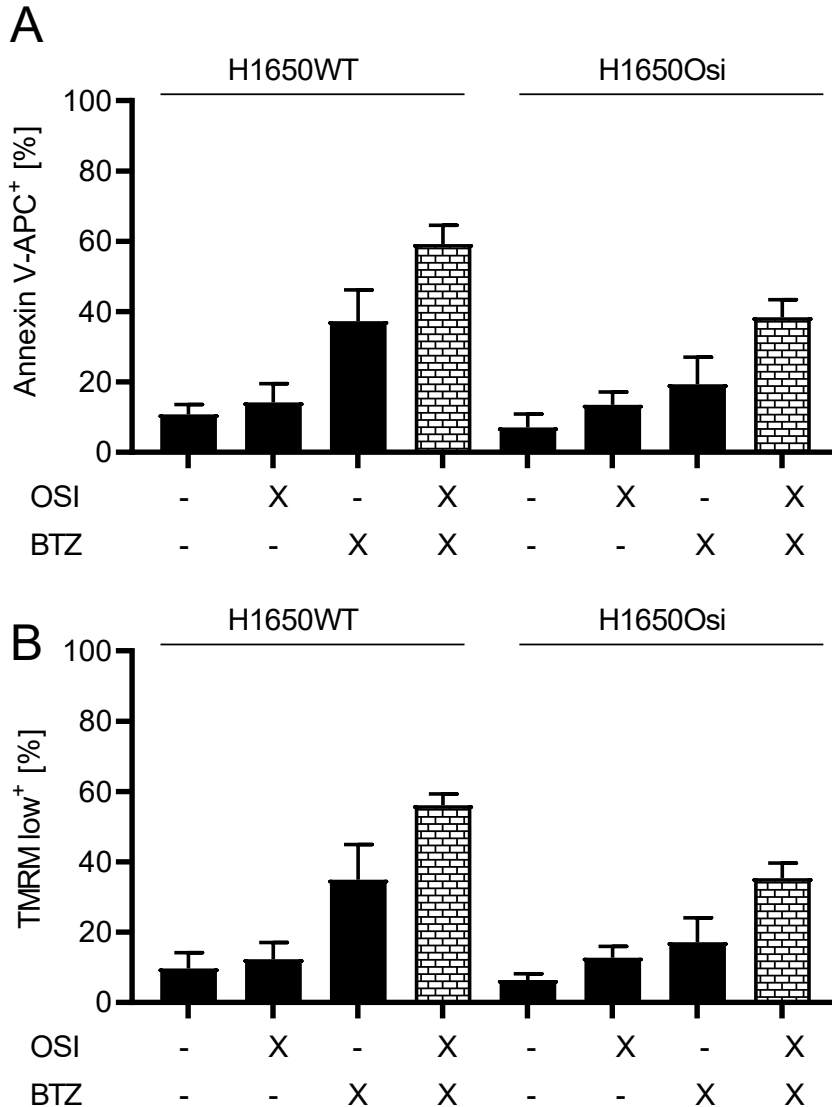


Abbildung 100 H1650: Einfluss der kombinierten Gabe von 5 nM BTZ + 5 μ M EGFR-TKI nach Inkubation über 72 h (A-B). Detektion der Anteile von Annexin V-APC⁺ und TMRM low⁺ Zellen mit Durchflusszytometrie; Mittelwert \pm SD; n=3.

4.24 Mitochondriale Beteiligung in H1650

Wie bei den HCC4006 wurde mit Hilfe der Mito Stress Test Analyse die Reaktion der Mitochondrien unter Inkubation für 24 h mit 5 μ M OSI im Vergleich zur

Kontrolle untersucht, sodass die Reaktion der Zellen auf mitochondrialer Ebene besser verstanden werden kann.

4.24.1 H1650 Sauerstoffverbrauchsrate

Bei der H1650 WT zeigt sich ein nichtplausibles Ergebnis des Mito Stress Tests. Bei der H1650 OSI resistent Zelllinie zeigt sich im Mito Stress Test eine eingeschränkte mitochondriale Antwort, wenn die Inkubation mit OSI für 24 h ausgesetzt wird.

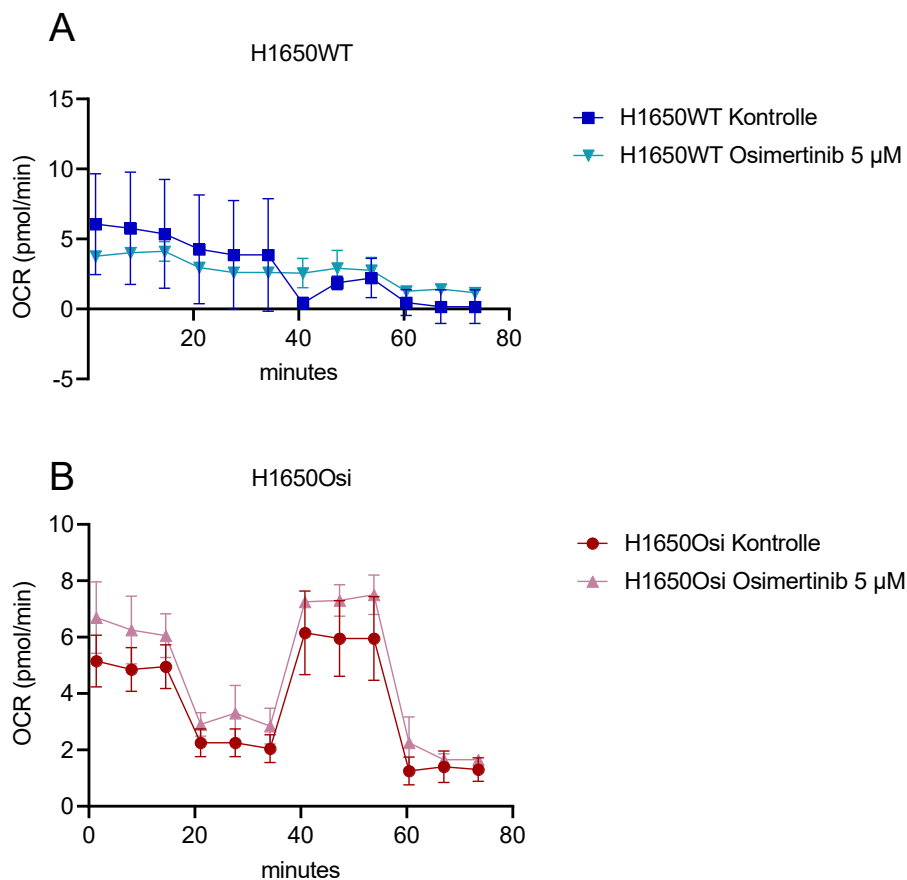


Abbildung 101 Zelllinie H1650WT und H1650Osi: Sauerstoffverbrauchsrate in der Mito Stress Test Analyse (A-B). Inkubation mit 5 µM OSI für 24 h. OCR [pmol/min]. n=2.

4.25 Unterschiede in der EGF-Rezeptor Expression und der EGFR-Aktivierung in HCC4006 abhängig vom Mutationsstatus

Die HCC4006WT Zelllinie besitzt eine aktivierende EGFR-Mutation, die spezifisch mit OSI adressiert werden kann. Um den Resistenzmechanismus in den

HCC4006Erl und HCC4006ErlOsi besser zu verstehen und ob dieser auf eine Änderung der Aktivierung des EGF-Rezeptors zurückzuführen ist, wird die Expression von EGFR und seiner aktivierten Form, das phosphorylierte EGFR, untersucht.

HCC4006WT zeigt nach 24 h Inkubation eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors in der Kontrolle und bei der Inkubation mit Bortezomib. Bei der Inkubation mit OSI wird die Phosphorylierung unterbunden, auch wenn dort der EGF-Rezeptor exprimiert wird. Nach 72 h zeigt sich die Proteinbande bei der Inkubation mit BTZ sehr schwach.

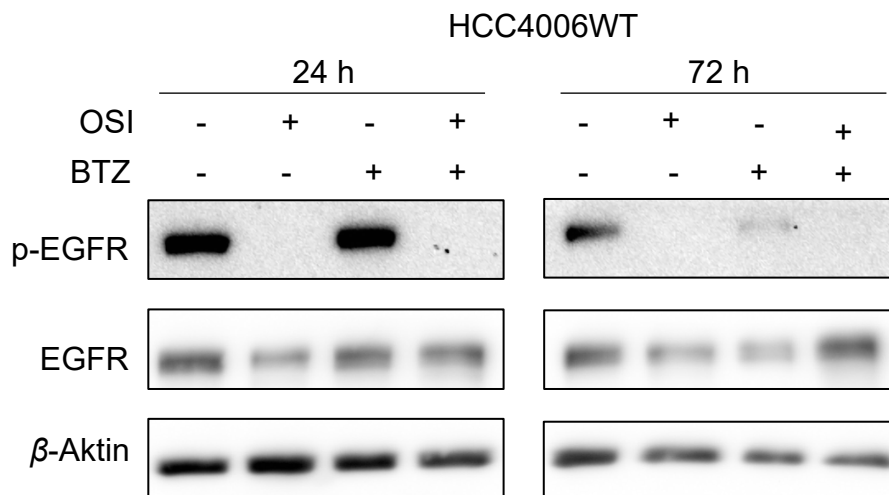


Abbildung 102 Proteinexpression des EGF-Rezeptors in HCC4006WT. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h.

Bei HCC4006Erl-Zelllinie ist weiterhin bei der Inkubation mit BTZ eine Phosphorylierung vom EGF-Rezeptor zu beobachten, auch wenn die Bande sich schwächer abzeichnet als bei der WT-Zelllinie. Nach 72 h zeigt sich keine Proteinexpression mehr.

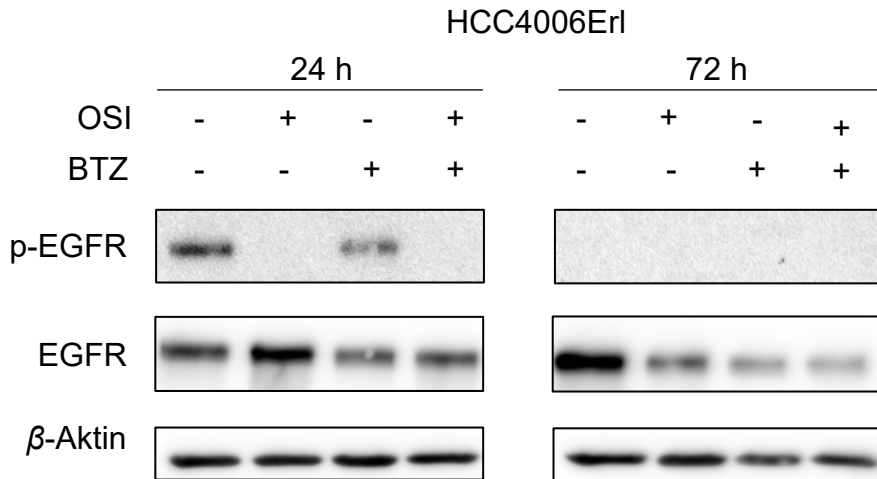


Abbildung 103 Proteinexpression des EGF-Rezeptors in HCC4006Erl. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h.

Die HCC4006ErlOsi Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, dass auch in der Kontrolle und in der Bortezomibinkubation nach 24 h im Gegensatz zu ihrer parentalen Zelllinie trotz Vorhandensein des EGFR, keine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors stattfindet.

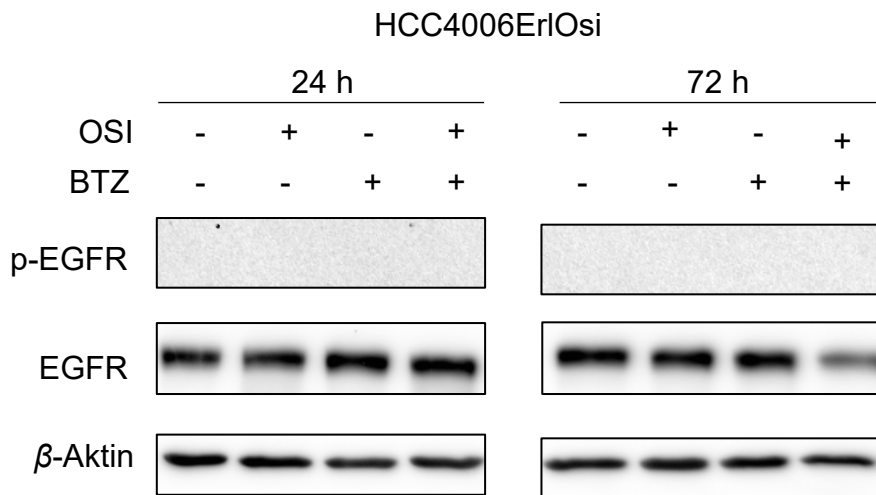


Abbildung 104 Proteinexpression des EGF-Rezeptors in HCC4006ErlOsi. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h.

4.26 Aktivierung weiterer Signalwege

Neben dem EGF-Signalweg, der den Angriffspunkt der EGFR-TKI darstellt, können Krebszellen in weitere Signalwege Mutationen aufzeigen und eine vermehrte

Aktivierung oder Deaktivierung eines Signalweges zur Folge haben. Außerdem aktiviert der EGF-Signalweg über die nachgeschalteten Prozesse auch den Akt-Signalweg.

In NSCLC ist der Akt-Signalweg häufig mutiert. Es sollte überprüft werden, wie Akt, insbesondere in den mutierten NSCLC Zelllinien, exprimiert wird und ob die Inkubation mit den verschiedenen Therapeutika den Akt-Signalwege genauso wie den EGF-Signalweg beeinflusst. Phosphoryliertes Akt setzt den PI3K-Signalweg in Gang.

In HCC4006WT zeigt sich nach 72 h Inkubation mit OSI und in der Kombinationsbehandlung mit OSI+BTZ eine schwächere Akt-Proteinbande. Bereits nach 24 h zeigt sich die schwächste Akt-Expression bei der Kombinationsinkubation mit 5 μ M OSI + 5 nM BTZ. Eine sehr schwache Expression beim phosphorylierten und somit aktivierten Akt lässt sich nach 72 h in der Kontrolle feststellen.

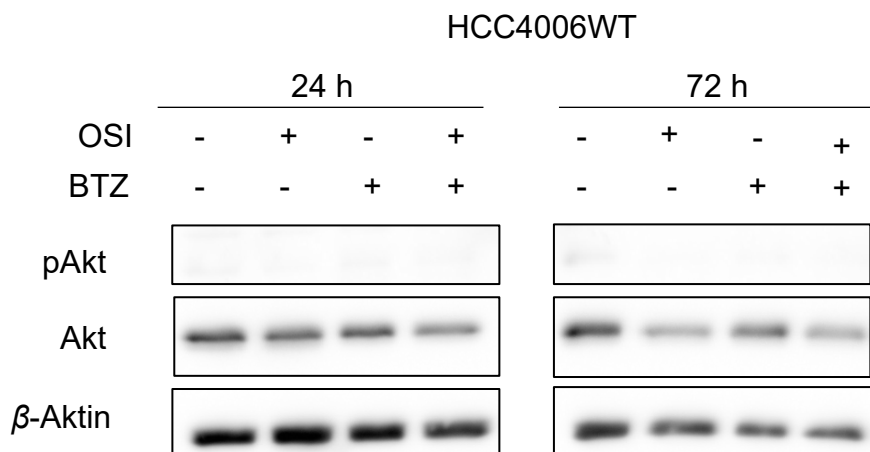


Abbildung 105 Proteinexpression des Akt-Signalwegs in HCC4006WT. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h.

Die Zelllinie HCC4006Erl zeigt nach 72 h in der Kontrolle bei Akt die schwächste Proteinexpression, die stärkste Expression findet sich bei der 72-stündigen Inkubation mit Osimertinib. Beim phosphorylierten Akt zeigt sich die schwächste

Expression bei der Einzelinkubation mit OSI nach 24 h. Die stärkste Expression zeigt sich bei der alleinigen Inkubation mit BTZ für 72 h.

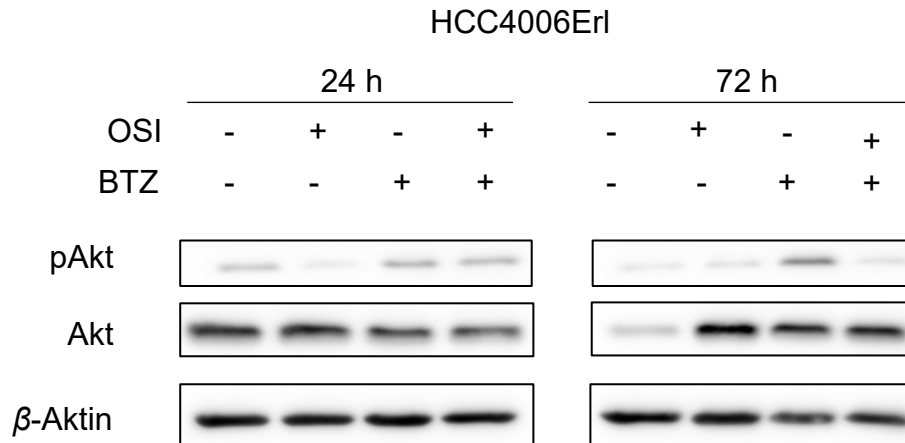


Abbildung 106 Proteinexpression des Akt-Signalwegs in HCC4006Erl. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h.

Die HCC4006ErlOsi Zelllinie zeigt über alle Behandlungen eine hohe Akt-Expression, am stärksten nach der Inkubation mit OSI für 72 h und am schwächsten nach der Kombinationsbehandlung für 72 h. Nach 24 h zeigt sich in der Einzelkombination mit OSI die schwächste pAkt-Proteinbande, während nach 72 h sich bei der Osimertinib-Einzelinkubation die kräftigste p-Akt-Proteinexpression zeigt.

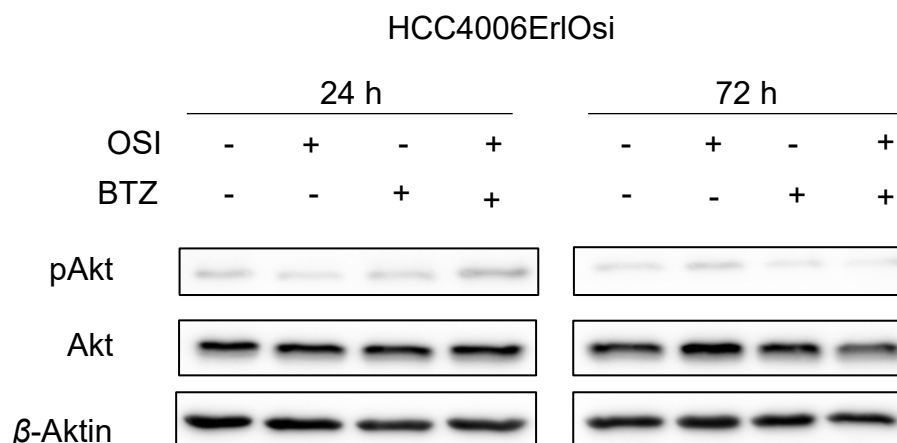


Abbildung 107 Proteinexpression des Akt-Signalwegs in HCC4006ErlOsi. Inkubation mit 5 μ M OSI, 5 nM BTZ einzeln und in der Kombination für 24 h und 72 h.

5 Diskussion

Die zielgerichtete Tumorthherapie spielt in der Behandlung von NSCLC eine große Rolle. Tumoren mit bestimmten molekulargenetischen Mutationen (sogenannte Treibermutationen) können mit spezifischen Medikamenten gezielt therapiert werden. Darunter fallen Treibermutationen im EGFR, für die EGFR-TKI therapeutisch verwendet werden. Dieses Therapieregime ist einer reinen Chemotherapie überlegen (Maemondo et al., 2010, Ballard et al., 2016). Jedoch kommt es bei der EGFR-Inhibition unweigerlich nach einer gewissen Behandlungszeit zu Mutationen im Tumor, die die Wirkung der EGFR-TKI einschränken und Resistenz vermitteln (Soria et al., 2018, König et al., 2021, Wu et al., 2020, Ballard et al., 2016). Tritt eine Resistenz früher in der Therapie auf, liegt meistens eine *off-target* Resistenz (vorwiegend MET-Amplifikation) vor, tritt eine EGFR-TKI Resistenz später auf, liegt meist eine *on-target* Mutation (vorwiegend C797S) vor. Darüber hinaus können eine Vielzahl weiterer Mutationen auftreten (Soria et al., 2018, König et al., 2021).

Diese durch die Therapie induzierten sekundären Mutationen limitieren den therapeutischen Einsatz von EGFR-TKI und sind daher ein großes Problem bei der Behandlung von NSCLC Patienten. Es werden daher Strategien gesucht, die die Resistenzentstehung weiter hinauszuzögern, sie überwinden oder sogar ganz vermeiden können.

Tanimoto et al. konnten die Resistenz gegenüber zielgerichteter Therapie mit einem ALK-Tyrosinkinaseinhibitor durch die kombinierte Anwendung von Proteasominhibitor (BTZ) und ALK-Inhibitor *in vitro* überwinden (Tanimoto et al., 2021). Der Mechanismus beruht auf der Expression des pro-apoptotischen BH3-only Proteins NOXA. In Sarkomzelllinien konnte mithilfe einer Kombination aus BCL-2-Inhibitor und Proteasominhibitor in Vorarbeiten ein vermehrter Zelltod induziert werden (Muenchow et al., 2020, Weller et al., 2022). Es wurden erhöhte Level von NOXA detektiert und dabei die ISR-Faktoren ATF3 und ATF4 hochreguliert. Diese Ergebnisse weisen auf einen möglichen Nutzen der Kombination eines EGFR-TKI mit BTZ in NSCLC-Zelllinien hin.

Da die Tumoren von NSCLC-Patienten heterogene Mutationen aufweisen, haben wir in dieser Arbeit 11 NSCLC-Zelllinien verwendet, die sich in ihrem EGFR-Mutationsstaus unterscheiden.

Vorrangig wurden in dieser Arbeit Zelllinien mit Deletion L747 (HCC4006) beziehungsweise Deletion E746 (H1650, HCC827) im EGFR-Gen untersucht. Aus diesen Zelllinien heraus wurden Zelllinien etabliert, die mutmaßlich alle eine off-target Mutation gegenüber EGFR-TKI aufweisen.

5.1 Zelltodinduktion in EGFR-WT-Zelllinien mit EGFR-TKI

In den beiden EGFR-Wildtypzelllinien (H1299 und A549) konnte kein erhöhter Zelltod durch die EGFR-TKI Behandlung induziert werden. Auffällig war, dass in der höchsten getesteten Konzentration von 50 μ M, im Gegensatz zu den anderen EGFR-TKI, GEFI als Erstgenerationen-EGFR-TKI <50 % Zelltod induzierte.

Wie zu erwarten, induziert GEFI als EGFR-TKI der ersten Generation in niedrigen Konzentrationen keinen vermehrten Zelltod in den EGFR-WT-Zellen im Vergleich zu der Kontrolle. Laut der Ergebnisse von Ko et al. hätte bei der Anwendung eines 2. Generations-TKI die größte Wirkung auf den Zelltod in EGFR-WT-Tumoren gefunden werden sollen (Ko et al., 2017). In dieser Arbeit zeigte sich bei der Inkubation mit EGFR-TKI der 2. Generation in den niedrigen Konzentrationen eine ähnliche Induktion von Zelltod wie bei dem EGFR-TKI der ersten Generation. Bei der Inkubation mit OSI zeigt sich in unseren Experimenten keine Wirkung auf die Zelltodinduktion, dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein (Ko et al., 2017).

Die EGFR-TKI wurden entwickelt, um spezifisch an EGF-Rezeptoren mit aktivierender Mutation, über Bindung an der ATP-Bindungsstelle, zu wirken (de Wit et al., 2020, Wang et al., 2021). Der EGFR-TKI wirkt spezifisch an EGFR-mutierte Zellen, sodass wie hier beobachtet in den WT-Zellen (d.h. ohne aktivierende EGFR-Mutation), kein Zelltod induziert wird.

Bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 μ M zeigt der EGFR-TKI der ersten Generation, GEFI, die geringste Zelltodinduktion, der EGFR-TKI der 3. Generation, OSI, die größte Zelltodinduktion (~50 % vs. ~90 % in den H1299,

~20 % vs. ~90 % in A549). Das steht im Gegensatz zum beschriebenen Effekt, den die EGFR-TKI auf Wildtyp-EGFR haben sollten. Die verwendete Konzentration von 50 μ M EGFR-TKI war jedoch so hoch, dass davon auszugehen ist, dass diese Konzentration zytotoxisch war, denn auch bei den nicht EGFR-mutierten Zelllinien gingen hier fast alle Zellen nach 24 h Inkubation in Zelltod. Erstaunlich ist, dass in der hohen Konzentration GEFI nicht so zytotoxisch ist wie AFA und OSI. Möglicherweise liegt dies an der Bindungsart: GEFI bindet kompetitiv und die Bindung ist somit reversibel, ab der 2. Generation binden die EGFR-TKI irreversibel (Zhao et al., 2019, Lin et al., 2014, Amelia et al., 2022). ERLO ist wie GEFI ein EGFR-TKI der 1. Generation. Bis Anfang 2016 war ERLO, auch als Erhaltungstherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), deren Tumoren keine aktivierende EGFR-Mutation aufweisen, zugelassen (Neal, 2010, Cicenas et al., 2016). Dies steht im Gegensatz zu der geringen Zelltodinduktion mit GEFI im Zelllinienmodell. Inzwischen wird ERLO nicht mehr in NSCLC ohne aktivierende EGFR-Mutation eingesetzt (Ramalingam et al., 2020).

Die beiden getesteten EGFR-WT-Zelllinien (H1299, A549) reagierten unterschiedlich auf die EGFR-TKI. Vor allem die Reaktion auf die Inkubation mit GEFI unterschied sich sehr zwischen H1299 und A549. Während die H1299 unter 24 h Inkubation mit 50 μ M GEFI zu 50 % in Apoptose gingen, zeigten die A549 in der Inkubation mit 50 μ M GEFI nur rund 20 % Apoptose.

Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass sich die beiden NSCLC-Zelllinien in ihrer Herkunft unterscheiden: Die A549 Zellen wurden aus einem Adenokarzinom gewonnen, H1299 Zellen aus einem großzelligen Lungenkarzinom. Von den NSCLC weisen 10-15 % der Tumoren Mutationen im EGFR auf (Leonetti et al., 2019). Die meisten der NSCLC mit EGFR-Mutation sind Adenokarzinome (Westover et al., 2018). Die A549 stammen von einem Adenokarzinom, weisen jedoch einen WT-EGFR auf. Das heißt, der EGFR-TKI kann nicht so spezifisch wirken, weil keine EGFR-Mutation vorliegt. Es wird vermutet, dass die EGFR-TKI in großzelligen Lungenkarzinomzellen an Strukturen binden, die in NSCLC-Adenokarzinomen nicht vorhanden sind. Aufgrund dieser stärkeren Bindung sind die EGFR-TKI in den H1299 wirksamer als in den A549.

5.2 Zelltodinduktion in EGFR-WT-Zelllinien mit PI

Beide EGFR-WT-Zelllinien zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Apoptose bei Inkubation mit Bortezomib. Das Ansprechen unterscheidet sich in beiden Zelllinien: A549 reagiert sensibler auf die Behandlung als H1299 (~80 % vs. ~40 % bei 500 nM BTZ).

p53 ist ein Tumorsuppressor, der in vielen Tumorentitäten, auch NSCLC, mutiert ist. Der p53-Status spielt somit auch bei der Wirkung von Tumorthérapien eine entscheidende Rolle und das mutierte Gen TP53 konnte als prognostisch ungünstig in NSCLC identifiziert werden (Saleh et al., 2022). Als Ziel für zielgerichtete Therapien erweist sich p53 herausfordernd, weil es nicht über die typischen Zielstrukturen für eine *targeted therapy* verfügt und somit lange als nicht einer zielgerichteten medikamentösen Therapie zugänglich galt (Hassin and Oren, 2023). Zelllinien mit mutiertem p53 zeigten eine sechsmal größere Resistenz gegenüber BTZ als Zellen mit nicht mutiertem p53 (Dubey and Schiller, 2005). A549 weist keine Mutation in p53 auf und zeigt eine größere Apoptoseinduktion bei einer Behandlung mit BTZ. Es wird bis zu doppelt so viel Zelltod bei gleichen Konzentrationen im Vergleich zu den H1299 induziert. H1299 weist eine Deletion im p53-Gen auf. NSCLC mit TP53-Mutationen sprachen schlechter auf eine Therapie mit EGFR-TKI an und zeigten eine schlechtere Prognose als die NSCLC-Tumoren, die TP53-WT waren (Bennett et al., 1999, Canale et al., 2017). Es gibt Ansätze, Mutationen von p53 sowohl mit RNA-Therapien (Hu et al., 2021) als auch mit Hilfe zielgerichteter Immuntherapien zu behandeln, die auf T-Zell-Rezeptor-ähnlichen Antikörpern basieren (Hsiue et al., 2021, Kim et al., 2022).

5.3 Zelltodinduktion in EGFR-WT-Zelllinien mit EGFR-TKI + PI in Kombination

In präklinischen Studien, also Zelllinienmodellen und Tiermodellen, zeigten 20S-Proteasominhibitoren in isolierter Anwendung eine Apoptoseinduktion (Schenkein, 2004). Piperdi et al. hatten bereits die Kombination des Erstgenerations-EGFR-TKI ERLO mit BTZ untersucht (Piperdi et al., 2007). Dabei wurden auch die Zelllinien H1299 und A549 verwendet. Bei einer Inkubation von 72 h zeigte sich in den A549 und den H1299 kein synergistischer oder additiver Effekt.

Dagegen zeigte sich eine Wirkung in H358. H358 ist eine Zelllinie mit EGFR-WT und KRAS-Mutation (Umelo et al., 2015), die aus einem bronchoalveolären Karzinom gewonnen wurde. In Piperdi et al. wurde mit BTZ vorinkubiert und erst nach 24 h wurde ERLO dazugegeben (Piperdi et al., 2007).

Da ERLO sich sowohl *in vitro* (Zelltod in Zellkultur) als auch *in vivo* (klinische Studien), geringer wirksam zeigte als die anderen EGFR-TKI, wurde in der vorliegenden Arbeit GEFI als potenterer EGFR-TKI der 1. Generation bzw. AFA als EGFR-TKI der 2. und OSI als EGFR-TKI der 3. Generation anstelle von ERLO verwendet. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine zeitgleiche Inkubation der Zellen mit BTZ und EGFR-TKI über 24 h. Auch mit den potenteren EGFR-TKI zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie in Piperdi et al., die die kombinierte Inkubation von ERLO+BTZ in H1299 und A549 untersucht haben (Piperdi et al., 2007). Das heißt, in der vorliegenden Arbeit konnte kein vermehrter Zelltod in der kombinierten Inkubation auch von potenteren EGFR-TKI mit BTZ in A549 und H1299, d.h. kein synergistischer oder additiver Effekt, nachgewiesen werden.

In der Kombination mit BTZ bestanden keine Unterschiede zwischen den EGFR-TKI der verschiedenen Generationen (GEFI, AFA, OSI). In allen Kombinationen GEFI+BTZ, AFA+BTZ und OSI+BTZ zeigte sich sogar ein geringerer Anteil an Zelltod im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (GEFI, AFA, OSI). Dies könnte ein Hinweis sein, dass sich BTZ und EGFR-TKI in ihrer Wirkung gegenseitig behindern, da sie bei der alleinigen Inkubation eine, wenn auch nur geringe Wirkung zeigten.

Mögliche Interaktionen von BTZ mit Zellmembranen wurde in abstrakten Modellen untersucht. Ramalho et al. untersuchte die Lipophilie von BTZ und die daraus resultierende Wechselwirkung mit der Membran (Ramalho et al., 2022). Die Wechselwirkung mit dieser Membran führte zu einer Veränderung der Fluidität. Die Autoren sehen hierin eine mögliche Resistenz begründet, da die Aktivität von Efflux-Transmembranproteinen von der Fluidität der Membran abhängig sei.

In anderen Krebszellmodellen, beispielweise dem Nierenzellkarzinom, zeigten sich Unterschiede auf den Zelltod abhängig von der Applikationsreihenfolge der Wirkstoffe (Ramalho et al., 2022). Eine synergistische Zytotoxizität zeigte sich,

wenn die Zellen mit einem EGFR-TKI vorbehandelt wurden. Wenn die Zellen mit BTZ vorbehandelt wurden, zeigte sich dagegen ein antagonistischer Effekt (Ramalho et al., 2022). Es wird diskutiert, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivität entscheidend bei der Reihenfolge der Medikamentenapplikation ist. Wird zuvor mit EGFR-TKI vorbehandelt, werde die NF- κ B-hemmende Wirkung von BTZ deutlich verstärkt. Wird mit BTZ vorbehandelt, führe dies zu einer unzureichenden NF- κ B-Blockade (An and Rettig, 2007).

Nachfolgende Experimente sind nötig, um eine Abhängigkeit der Applikationsreihenfolge besser zu verstehen. In diesen Experimenten sollte sich auf eine Vorinkubation mit EGFR-TKI konzentriert werden, an die sich danach eine Inkubation mit BTZ anschließt.

5.4 Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit EGFR-TKI

Die verschiedenen mutierten EGFR-Zelllinien, die keine weiteren beschriebenen Resistenzen gegen EGFR-TKI aufweisen (HCC827Mai, HCC827WT, HCC4006WT), zeigten einen ähnlichen Anteil von apoptotischen Zellen nach Inkubation mit EGFR-TKI. Der auffällig hohe Anteil von apoptotischen Zellen in der höchsten Konzentration (50 μ M) wird dadurch erklärt, dass die verwendete Konzentration zytotoxisch wirkte. Deswegen wurde in der Kombinationsbehandlung eine Konzentration von 5 μ M der jeweiligen EGFR-TKI verwendet.

In allen Zelllinien zeigte OSI die potenteste Wirkung auf die Zelltodinduktion. Eine Überlegenheit des Drittgenerations-EGFR-TKI OSI konnte auch in klinischen Studien gezeigt werden. OSI zeigte einen Vorteil im progressionsfreien Überleben gegenüber den 1. und 2. Generations-EGFR-TKI (Soria et al., 2018, Ramalingam et al., 2020). Dies hat dazu geführt, dass inzwischen OSI als Erstlinientherapie in der Leitlinie empfohlen wird (Ettinger et al., 2022, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Es besteht ein konzentrationsabhängiger Einfluss der EGFR-TKI auf den Anteil der Zellen, die in Apoptose gehen. Diesen Einfluss findet man in allen drei getesteten EGFR-TKI (GEFI, AFA, OSI). Eine Ausnahme bildet HCC827WT bei der Inkubation mit EGFR-TKI (0,5 μ M und 5 μ M), aber nicht bei den HCC827Mai. Bei der Inkubation mit allen drei EGFR-TKI in den HCC827WT wird kein vermehrter

Zelltod induziert, d.h. eine Resistenz gegen EGFR-TKI in niedrigen Konzentrationen ist anzunehmen und zeigt damit ein ähnliches Verhalten wie HCC827Erl. Die HCC827Mai zeigt dagegen eine Zunahme der Apoptoserate schon ab einer Konzentration von 0,5 μ M EGFR-TKI und ist damit sensibel für eine EGFR-TKI-Therapie (vgl. 4.2.2).

Die HCC827 Zelllinie weist eine Exon 19 Deletion (del E746-A750) auf (Zhang et al., 2020). In EGFR mutierten NSCLC ist eine Veränderung in Exon 19 die häufigste Mutation mit ~45 % aller EGFR-Mutationen in EGFR-TKI unbehandelten Tumoren (Truini et al., 2019, Brown et al., 2022, Levantini et al., 2022). Es ist eine „*Gain-of-Function*“-Mutation (Levantini et al., 2022). Dadurch kommt es zu einer Destabilisierung der inaktiven Konformation des EGF-Rezeptors. Dies führt zu einer verstärkten Dimerisierung und Aktivität des Rezeptors. Es ist anzunehmen, dass die HCC827WT-Zelllinie eine weitere Mutation erworben hat, die sie resistenter gegenüber einer Inkubation mit EGFR-TKI macht als die HCC827Mai. Die HCC4006 weisen auch eine Deletion in Exon 19 auf (del L747 - E749).

Neben der Ex19Del ist die L858R die zweithäufigste Treibermutation für eine Behandlung mit EGFR-TKI (~40 %). Dies ist eine Punktmutation in Exon 21, die wie die Exon 19 Deletion zu einer Destabilisierung der inaktiven Konformation des EGF-Rezeptors führt (Levantini et al., 2022).

Bereits die Erstgenerations-EGFR-TKI wurden entwickelt, um diese Mutationen spezifisch zu adressieren (Amelia et al., 2022). Eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien Überlebens zeigt sich bei dieser Mutation mit Erst-, Zweit- und Drittgenerations-EGFR-TKI (Mok et al., 2009, Mitsudomi et al., 2010, Maemondo et al., 2010, Zhou et al., 2011, Sequist et al., 2013, Soria et al., 2018).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich bei allen EGFR-TKI (GEFI, AFA und OSI) bereits in den geringeren Konzentrationen (0,5 μ M, 5 μ M) ein erhöhter Zelltod in den HCC827Mai und HCC4006WT, die Zelllinien, die besonders sensibel auf eine Inkubation mit EGFR-TKI reagieren sollten. Die einzelnen Anteile von apoptotischen Zellen unterscheiden sich nur gering. Jedoch zeigt sich vor allem ein Unterschied von GEFI zu OSI in der höchsten verwendeten Konzentration (50 μ M). Der Anteil der toten Zellen ist bei GEFI deutlich geringer als im Vergleich

zu AFA und OSI, Zelltod im Vergleich zur Kontrolle wird aber beobachtet. Zellen mit einer Exon 19 Deletion oder einer L858R Mutation sprechen bereits gut auf eine Inkubation mit GEFI an (Levantini et al., 2022). Jedoch zeigte sich, dass AFA und besonders OSI auch in diesen Zellen mehr Apoptose induzieren und deshalb ein 2. oder 3. Generations-EGFR-TKI eine bessere Wahl wäre. Bei der Behandlung von NSCLC-Tumoren in Patienten ist weiter zu beachten, dass OSI auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, ohne, dass sich dabei neue Sicherheitsbedenken zeigen und somit ein Einsatz von OSI bei ZNS-Metastasierung vorteilhaft ist (Ohe et al., 2019).

Bei Patienten tritt unter EGFR-TKI mit einem Erstgeneration-TKI in den meisten Fällen eine T790M-Mutation auf. AFA führte in HCC827WT in der Konzentration von 5 μ M auch zu einem vermehrten Zelltod. Es wird in der Literatur auch ein partieller Effekt von AFA auf die T790M Mutation beschrieben (Tanaka et al., 2017). Da OSI spezifisch für diese Mutation entwickelt wurde und somit sehr selektiv wirken müsste, hätten wir mehr Zelltod in unseren Zelllinien erwartet. Die Zelltodinduktion in den HCC827WT unterscheidet sich nicht zwischen einer Inkubation mit 5 μ M AFA und 5 μ M OSI. Insofern ist ein Vorliegen einer T790M Mutation in den getesteten Zelllinien unwahrscheinlich. Es ist wahrscheinlicher, dass es auch in der immortalisierten Zelllinie zu zusätzlichen Mutationen gekommen ist, die eine Resistenz gegenüber EGFR-TKI vermitteln. Um dies weiter zu untersuchen, sollte eine molekulargenetische Analyse bzw. Sequenzierung des Genoms der Zelllinie erfolgen.

5.5 Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit PI

In den EGFR-mutierten Zelllinien (HCC827Mai, HCC827WT, HCC4006WT) konnte mit BTZ konzentrationsabhängig Zelltod induziert werden.

In fast allen EGFR-mutierten Zelllinien zeigt sich konzentrationsabhängige Zelltodinduktion durch BTZ. Die einzige Ausnahme bildete die HCC4006Erl, bei der BTZ in allen getesteten Konzentrationen keinen vermehrten Zelltod induzierte. Diese Zelllinie weist zusätzlich auch eine p53-Mutation auf (p.Y205H). Zelllinien mit mutiertem p53 zeigten eine sechsmal größere Resistenz gegenüber BTZ als Zellen mit nicht-mutiertem p53 (Dubey and Schiller, 2005). Dies könnte eine

Resistenz gegenüber BTZ erklären. Jedoch weist die parentale Zelllinie HCC4006WT diese Mutation auch auf, reagiert jedoch sensibel auf eine Bortezomibinkubation. Eine p53-Mutation scheint somit die Resistenz gegen BTZ nicht ausreichend zu erklären.

5.6 Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit EGFR-TKI und PI

Nach der 24-stündigen Inkubation mit 5 nM BTZ + 5 µM EGFR-TKI (GEFI, AFA oder OSI) zeigte sich in den untersuchten Zelllinien (HCC827Mai, HCC827WT, HCC4006WT) kein synergistischer oder additiver Zelltod im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Im Gegensatz zu den EGFR-WT-Zelllinien zeigte sich jedoch auch kein verminderter Zelltod in der Kombinationsbehandlung (vgl. 5.3). Das heißt eine gegenseitige Behinderung der Wirkstoffe scheint unwahrscheinlich. Die Applikation der beiden Wirkstoffe erfolgte zeitgleich, wie auch in den EGFR-WT-Zelllinien. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass in den EGFR-WT-Zelllinien der EGFR-TKI keine Möglichkeit zur suffizienten Bindung hatte und die verstärkte Wechselwirkung der eingesetzten Inhibitoren (PI+EGFR-TKI) die Wirkstoffe in ihrer eigentlichen Wirkung hemmen.

In EGFR-mutierten Zelllinien führte eine alleinige Inkubation über 24 h mit einem EGFR-TKI zu einem etwa gleich großen Anteil von Zelltodinduktion wie in der kombinierten Inkubation. Die Kombination eines EGFR-TKI mit BTZ zeigt somit keine synergistische Zelltodinduktion und scheint für die Apoptoseinduktion nicht effektiver zu sein als eine Einzelbehandlung. Die verwendeten Zelllinien (HCC827Mai, HCC827WT, HCC4006WT) weisen neben der aktivierenden Mutation im EGFR keine Resistenzen gegenüber EGFR-TKI auf und diese können sehr effektiv wirken.

In der klinischen Praxis werden die EGFR-TKI sehr erfolgreich in EGFR-mutierten NSCLC eingesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024). Bei zufriedenstellender Verträglichkeit der Therapie ist das vorrangige Problem das Therapieversagen der EGFR-TKI durch die Resistenzentstehung des Tumors gegenüber den EGFR-TKI (Soria et al., 2018, König et al., 2021, Wu et al., 2020, Ballard et al., 2016).

In dieser Arbeit zeigt sich bei den Zelllinien mit Exon 19 Deletion (HCC827, HCC4006) kein vermehrter Zelltod bei der Behandlung im Vergleich von AFA mit GEFI. Der einzige Unterschied besteht bei der Konzentration von 50 μM EGFR-TKI, bei der jedoch von einer zytotoxischen Wirkung ausgegangen werden kann. Diese Konzentration von 50 μM EGFR-TKI kann als zytotoxisch angesehen werden. AFA kann EGFR, HER2 (ErbB2) und HER4 (ErbB4) der EGF-Rezeptorfamilie irreversibel hemmen (Yap et al., 2010, Miller et al., 2012, Yu and Pao, 2013, Bian et al., 2023). Bei Patienten mit einer Exon 19 Mutation zeigte AFA *in vivo* allerdings ein besseres Overall Survival im Vergleich mit Erstgenerations-EGFR-TKI (Nan et al., 2017).

Der Fokus dieser Arbeit war die Apoptoseinduktion. Das Design war nicht geeignet für die Untersuchung, ob die Kombinationsbehandlung die Resistenzentwicklung verzögern oder ganz vermeiden kann, so wie bereits in anderen Kombinationstherapien (z.B. Paclitaxel+GEFI) in NSCLC beobachtet (Papini et al., 2021). Es lässt sich schlussfolgern, dass durch eine vermehrte Apoptoseinduktion zwar eine Resistenzentwicklung nicht vermieden, aber wohl herausgezögert werden kann, da durch eine höhere Apoptoserate weniger Zellen die Möglichkeit zur Resistenzentwicklung haben.

Um diese Fragestellung der zusätzlichen Resistenzentwicklung bei bereits EGFR-mutierten Zellen zu untersuchen, wurden Zelllinien verwendet, die neben einer ersten EGFR-Mutation noch weitere Mutationen aufweisen, die die Resistenz gegen mindestens ein EGFR-TKI, meist ERLO oder GEFI, vermitteln.

Um neben den beiden bereits etablierten ERLO-resistenten Zelllinien weitere resistente Zelllinien untersuchen zu können, wurden Zelllinien etabliert, die in der Dauerkultur der Behandlung mit ERLO oder OSI in steigenden Konzentrationen ausgesetzt waren, um so eine Resistenz zu induzieren.

5.7 Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien mit Resistenz gegen EGFR-TKI

Es wurden ERLO-resistente Zelllinien verwendet, die von der Uni Kent etabliert wurden (HCC827Erl und HCC4006Erl) („*The Resistant Cancer Cell Line (RCCL) collection*“ der Universität Kent (UK)).

Alle Zelllinien (H1650, HCC4006, HCC827), unabhängig ob sie laut Literatur resistent oder sensibel gegenüber ERLO sein sollen, haben nur eine geringe Zelltodinduktion bei der Inkubation mit ERLO gezeigt. HCC827WT und HCC4006WT als auch die ERLO-resistenten Tochterlinien zeigten nach Inkubation mit ERLO vergleichbare, niedrige Zelltodraten. Somit ließ sich die Erlotinibresistenz in diesen Zelllinien nur eingeschränkt nachvollziehen.

Von allen getesteten EGFR-TKI induzierte ERLO die niedrigsten Raten an apoptotischen Zellen in allen untersuchten Zelllinien. In der klinischen Studie FLAURA (NCT02296125) zeigte sich ERLO auch weniger potent als andere EGFR-TKI (Ramalingam et al., 2020). Die beiden ERLO-resistenten Zelllinien (HCC4006Erl, HCC827Erl) zeigten sich jedoch im Gegensatz zu ihrer parentalen Zelllinie (HCC4006WT, HCC827WT) bei den Behandlungen mit den EGFR-TKI der zweiten und dritten Generation deutlich resistenter. Dies lässt eine Resistenz der HCC4006Erl und HCC827Erl gegen mehrere EGFR-TKI vermuten.

Eine weitere in dieser Arbeit verwendete Zelllinie ist die H1650. Die Zelllinie H1650 weist eine Deletion in Exon 19 auf (delE746-A750). Dies ist die gleiche Deletion, die die HCC827WT aufweisen. Jedoch erweist sich die H1650 als deutlich weniger sensibel gegenüber der EGFR-TKI-Behandlung als die HCC4006WT und HCC827WT. Dieses Ergebnis unserer Versuche wurde auch in weiteren Studien beschrieben (Choi et al., 2010, Ayestaran et al., 2020). Die H1650 sind homozygot für eine Deletion in der 3' Region von PTEN, was so zum PTEN-Verlust führt (Sos et al., 2009). Die PTEN-Deletion liegt auf Chromosom 10 und wurde als Mitverursacher einer ERLO-Resistenz in EGFR-mutierten NSCLC beschrieben (Sos et al., 2009). Deswegen wird diese Zelllinie auch zu den EGFR-TKI-resistenten Zelllinien gezählt. Mutation im PTEN-Gen als Resistenzmechanismus ist auch in weiteren Tumoren, wie dem Glioblastom (Mellinghoff et al., 2005), verbreitet.

Das *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) wirkt als Tumorsuppressor und beeinflusst den PI3K/AKT/mTOR Signalweg (Xun et al., 2021, Fischer et al., 2022, Huang and Fu, 2015). Der Resistenzmechanismus besteht darin, dass die Hemmung des EGF-Rezeptors von der Hemmung des eigentlich

nachgeschalteten PI3K-Signalwegs getrennt wird (Bianco et al., 2003). Eine Überwindung der Resistenz durch eine kombinierte Anwendung von EGFR-Inhibitor und AKT-TKI wird diskutiert (Bianco et al., 2003). NSCLC-Patienten mit einer EGFR-Mutation und einer PTEN-Deletion haben ein signifikant verkürztes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Patienten mit Tumoren ohne PTEN-Deletion (6 vs. 18 Monate) (Ferrara et al., 2021).

Ausgehend von den drei Zelllinien (H1650, HCC4006Erl, HCC827Erl) wurden OSI-resistente Zelllinien etabliert (H1650Osi, HCC4006ErlOsi, HCC827ErlOsi). Da die Etablierung mittels dauerhafter Exposition mit aufsteigenden Konzentrationen von OSI erfolgte, ist, im Gegensatz zu einem gezielten *Targeting*, der Resistenzmechanismus unbekannt. Die Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen zur Etablierung einer Resistenz wurde auch von der Universität Kent für ihre ERLO-resistenten Zelllinien verwendet (HCC4006Erl, HCC827Erl).

Bei der Therapie mit Erst- (ERLO, GEFI) oder Zweitgenerations-TKI (AFA) entwickelt sich häufig eine T790M Mutation unter der laufenden EGFR-TKI-Therapie. Gegen die T790M Mutation wurde ein spezifisch wirksamer EGFR-TKI entwickelt, OSI (Ramalingam et al., 2020, Kobayashi et al., 2005, Yu et al., 2013, Socinski et al., 2017).

Weil auch OSI keinen vermehrten Zelltod in HCC827Erl induziert, ist es unwahrscheinlich, dass die Resistenz der HCC827Erl gegen ERLO auf die Mutation T790M zurückzuführen ist. Auch HCC4006Erl zeigt bei der OSI-Behandlung ähnlich geringe Zelltodraten wie bei der Behandlung mit GEFI, so dass auch hier eine T790M Mutation als Resistenzmechanismus unwahrscheinlich ist.

Inzwischen wird in der Erstlinientherapie direkt auf OSI zurückgegriffen, da es sich in Studien auch den anderen beiden Generationen von EGFR-TKI als überlegen gezeigt hat (Ramalingam et al., 2020, Wu et al., 2020, Ballard et al., 2016, Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2024).

Beim Einsatz von OSI kommt es regelhaft zur Resistenzentstehung. Am häufigsten liegt als Resistenzmechanismus eine MET-Amplifikation (*off target*) oder C797S-Mutation im EGFR-Gen (*on target*) zugrunde (Chmielecki et al., 2023).

EGFR-Inhibitoren, wie BLU-945, die spezifisch bei einer C797S Mutation wirken, werden in klinischen Studien getestet (Schalm et al., 2020, Lim et al., 2024). Dies sind Viertgenerations EGFR-TKI, die sich in verschiedenen Studien als erfolgsversprechend zeigen. Jedoch gibt es neben dieser *on target* C797S-Mutation und der *off target* MET-Amplifikation, die man mit verschiedenen MET-Inhibitoren adressieren kann, eine ganze Reihe weiterer Mutationen, die eine Resistenzentstehung gegenüber den EGFR-TKI hervorrufen und somit das Gesamtüberleben des Patienten reduzieren.

Neben den bereits genannten Mutationen (T790M, MET-Amplifikation, C797S) gibt es weitere erworbene Mutationen in NSCLC-Tumoren mit aktivierender EGFR-Mutation unter Therapie mit EGFR-TKI. „Second-Site“ Mutationen des EGFR sind möglich, aber auch Amplifikationen, Verlust oder Aktivierung des nachgeschalteten Signalwegs oder der Umgehung der Aktivierung (Rotow and Bivona, 2017, Pao et al., 2005, Sequist et al., 2011, Liu et al., 2018). Es sind auch Resistenzmechanismen beschrieben, wie eine EMT und eine SCLC-Transformation (Tulchinsky et al., 2019, Chang et al., 2016). Bei der SCLC-Transformation werden Zahlen bis zu 15 % der EGFR-mutierten Adenokarzinome genannt, insbesondere getriggert durch erworbene EGFR-TKI-Resistenzen (Megyesfalvi et al., 2023, Offin et al., 2019b, Piper-Vallillo et al., 2020).

Morphologisch unterschieden sich die ERLO-resistente Zelllinien von ihrer Ursprungszelllinie. Sie zeigen länglichere und spindelförmigere Zellen als die Ursprungszelllinien (vgl. 4.13.1). Die lichtmikroskopischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der HCC4006WT, HCC4006Erl, HCC827WT und HCC827Erl geben Hinweise, dass in den HCC4006Erl und HCC827Erl eine EMT stattgefunden hat und so den Resistenzmechanismus vermitteln (Kalluri, 2009, Suda et al., 2011). Eine Änderung von epithelialem zu mesenchymalem Phänotyp während einer EGFR-TKI Behandlung ist selten (Sequist et al., 2011, Weng et al., 2019, Sun et al., 2023). Tritt jedoch eine EMT auf, ist dies gekennzeichnet von einer Zunahme der Tumoraggressivität und der Metastasenbildung und somit einer schlechten Prognose (Thompson and Newgreen, 2005, Hazan et al., 2004, Kang and Massagué, 2004).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in den HCC4006Erl Zellen EMT-Marker (als mRNA und Protein) nachweisen und die Hypothese einer EMT stützen (Annika Harsch, persönliche Mitteilung). Auch die Zelllinie HCC827Erl zeigt länglichere, spindel-förmigere Zellen und unterscheidet sich damit morphologisch von ihrer parentalen Zelllinie HCC827WT. Dies macht auch eine zugrundeliegende EMT bei der Resistenzentstehung wahrscheinlich. Da die Zellen durch eine Dauerexposition mit ERLO entstanden sind, könnten auch heterogene Mutationen für die Resistenz ursächlich sein.

Die Zelllinie HCC4006Erl zeigt nicht nur eine ERLO-Resistenz, sondern auch eine deutlich reduzierte Zelltodinduktion durch die anderen EGFR-TKI. Saafan et al. beschreibt darüber hinaus in den HCC4006Erl als einen Resistenzmechanismus eine Inhibition der Proteinphosphatase 2A (CIP2A) (Saafan et al., 2021). CIP2A reguliert die Zellproliferation und führt zur konstitutiven Aktivierung des Akt-Signalwegs (Lei et al., 2014). Akt ist eine Serin/Threoninkinase, auch als Proteinkinase B bezeichnet und hemmt die Apoptose. An der Innenseite der Plasmamembran bindet die PH-Domäne von Akt an PIP3, welches PDK1 rekrutiert. Dann kann PDK1 Akt phosphorylieren und so aktivieren. Akt phosphoryliert regulatorische Proteine, die das anti-apoptotische Protein BCL-2 binden und aktivieren, auch wird p53 vermehrt abgebaut (Chen et al., 2022). Die BH3-only Proteine werden dadurch gehemmt und die Apoptose wird gehemmt. Über die Wirkung von Akt via FOXO wird die Synthese der pro-apoptotischen BH3-only Proteine wie BIM verhindert (Zhang et al., 2011). p53 wiederum stimuliert die Synthese der BH3-only Proteine.

Der Resistenzmechanismus via Inhibition der CIP2A zeigt sich auch in HCC4006Erl. In den HCC4006Erl zeigte sich eine erhöhte Proteinexpression von pAkt und Akt, auch während der Behandlung mit OSI (vgl. 4.26). Saafan et al. konnte eine Reduktion des CIP2A Levels durch BTZ beobachten, welches zu einer Deaktivierung von Akt führte (Saafan et al., 2021). Deaktiviertes, also dephosphoryliertes, Akt hemmt die Zellteilung und fördert die Apoptose (Revathidevi and Munirajan, 2019). In HCC4006Erl insbesondere bei der Inkubation mit BTZ wurde eine erhöhte Proteinexpression von pAkt gefunden. Dazu steht allerdings im Widerspruch, dass bei Inkubation mit BTZ

durchflusszytometrisch ein vermehrter Zelltod gefunden wurde. In der Zelllinie HCC4006ErlOsi zeigte sich in der Kombinationsbehandlung OSI+BTZ auch eine vermehrte Phosphorylierung von Akt. Auch hier fand sich eine vermehrte Zelltodinduktion in der durchflusszytometrischen Analyse. Dies spricht dafür, dass die Zelltodinduktion bei der alleinigen Inkubation mit BTZ sowie in der kombinierten Inkubation von OSI+BTZ unabhängig von Akt vermittelt wird.

Die HCC827ErlOsi zeigten starke morphologische Unterschiede zu ihrer Ursprungszelllinie. Die Zellen wachsen sehr dicht in Inseln, die sich in der Immunfluoreszenz als eine Anhäufung von Zellkernen zeigten. Durch das kompakte Wachstum konnten die für die Immunfluoreszenz verwendeten Antikörper TOM20 und α -Tubulin nicht in das Innere des Zellhaufens vordringen. Dieses dichte, geclusterte Wachstum erschwert wahrscheinlich auch die Inkubation mit den Medikamenten in der Zellkultur. Die Zelllinie war auch sehr stoffwechselaktiv: Bei einer Konfluenz von weniger als 50 % war das Kulturmedium innerhalb eines Tages verbraucht. Die Zelllinie wuchs kugelig, sodass sie aus der 2D Ebene der Zellkultur auszubrechen drohte.

Die H1650Osi zeigen Charakteristika von EMT (Gloushankova et al., 2018, Navas et al., 2020). In der Ursprungszelllinie H1650 zeigen sich die Zellen mit intakten, engen Zell-Zell-Kontakten, die Zellen wachsen in Inseln. In H1650Osi zeigen die Zellen nur lange Ausläufer zwischen den Zellen und bilden neue Zell-Zell-Kontakte aus. Die Zellgröße nimmt auf etwa das Doppelte zu. Es zeigte sich kein spindelförmiges Aussehen, aber längliche Zellkontakte. Gosh et al. etablierte auf ähnliche Art eine ERLO-resistente H1650 Zelllinie und beschreibt dort eine EMT (Ghosh et al., 2012).

Dagegen erwies sich die Etablierung von Osimertinib resistenten Zelllinien aus den gegen Erstgenerations-TKI sensiblen Zelllinien (HCC4006WT, HCC827WT, HCC827Mai) als frustan: Die Zelllinien HCC4006WT und HCC827WT gingen bei allen Ansätzen in Apoptose, sodass keine ausreichende Zellmenge für eine Dauerkultur erhalten werden konnte. Die HCC827Mai stellten unter der Dauerbehandlung mit OSI ihre Zellteilung ein. Die Zellen wurden deutlich größer als in der Ursprungszelllinie und proliferierten nicht mehr. Das Medium musste immer

seltener gewechselt werden und schließlich lösten sich die Zellen von der Zellkulturflasche ab und gingen somit in Apoptose. Auch bei der Variation der Konzentration und einer Dauerinkubation mit geringeren Konzentrationen der EGFR-TKI stellten die Zellen immer ihr Wachstum ein. Dieses Resultat wurde in der Arbeitsgruppe unabhängig reproduziert. Dies wirft die interessante Frage auf, auf welchen molekularen Unterschied zwischen HCC827 und HCC4006 dieser Proliferationsstopp zurückzuführen ist. Beide Zelllinien weisen eine Mutation im TP53-Gen auf, die als onkogen einzustufen ist (Soussi and Wiman, 2015).

5.8 Osimertinib resistente Zelllinien

Es wurden mit den neu etablierten OSI resistenten Zelllinien (HCC4006ErlOsi, HCC827ErlOsi, H1650Osi) bereits 4-5 Wochen nach Start der dauerhaften Kultivierung erste durchflusszytometrische Versuche durchgeführt. Die Kultur war zu Beginn wahrscheinlich inhomogen, sodass im Vergleich zu späteren Experimenten (durchgeführt ~2 Monate nach Start der Dauerinkubation), die durchflusszytometrischen Zelltodanalysen nach 24 h Inkubation unterschiedliche Resultate ergaben.

Erstaunlicherweise zeigte die Zelllinie HCC4006ErlOsi auch eine vermehrte Induktion von Zelltod bei der Anwendung von GEFI. Dagegen zeigte sich ihre Ursprungszelllinie HCC4006Erl resistent gegenüber GEFI. Dies könnte möglicherweise einen Hinweis darauf geben, dass eine Kombinationsbehandlung von EGFR-TKI verschiedener Generation in NSCLC Tumoren mit aktivierter EGFR-Mutation therapeutisch sinnvoll sein könnte. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus über Bindungen an verschiedenen Stellen des Signalwegs vermittelt wird.

Die Kombination EGFR-TKI verschiedener Generationen wird in verschiedenen klinischen Studien aktuell getestet (Bertoli et al., 2022). Ein möglicher molekularer Mechanismus kann über die Position der Mutation in *cis* und *trans* erklärt werden (Niederst et al., 2015a, Arulananda et al., 2017, Wang et al., 2017).

Die Versuche zur Etablierung der OSI resistenten Zelllinien konnte nur aus Zelllinien durchgeführt werden, die bereits eine Resistenz gegenüber EGFR-TKI aufwiesen (HCC827Erl, HCC4006Erl, H1650). Um tatsächlich nachzuweisen, dass

die etablierte Zelllinie HCC4006ErlOsi OSI-resistent ist, wurde mittels Western Blot die Proteinexpression des EGFR untersucht. OSI unterbindet die Aktivierung, das heißt die Phosphorylierung von EGFR. pEGFR ist aktiv und setzt den weiteren Signalweg in Gang. Durch OSI wird diese Phosphorylierung unterbunden und der weitere Signalweg wird nicht in Gang gesetzt.

Der EGF-Rezeptor liegt in den HCC4006Osi vor, jedoch, nach Dauerinkubation mit OSI nicht mehr in seiner aktivierten (d.h. phosphorylierten) Form. Sowohl in der Kontrolle als auch nach der Inkubation mit OSI zeigt sich keine Phosphorylierung. HCC4006Erl als Ursprungszelllinie ohne OSI-Resistenz zeigte dagegen in der Kontrolle (Inkubation ohne OSI) und bei der BTZ-Inkubation eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors. Das heißt eine Veränderung der Zelllinie unter Dauerinkubation mit OSI hat stattgefunden, indem der EGF-Rezeptor auch in der Abwesenheit von OSI nicht mehr phosphoryliert vorliegt und OSI die Phosphorylierung auch nicht mehr unterbinden kann.

Auffallend ist, dass, trotz der Umgehung der Aktivierung von pEGFR, in HCC4006ErlOsi in der Kombinationsbehandlung OSI+BTZ mehr Zelltod induziert wird, jedoch in geringeren Anteilen als in den HCC4006Erl, wo eine Unterbindung der pEGFR Phosphorylierung durch die Hinzugabe von OSI stattfinden kann. Für ein Überleben kann die Zelllinie vermutlich den EGFR-nachgeschalteten Signalweg unabhängig von pEGFR aktivieren. Möglicherweise greift der EGFR-TKI nicht nur direkt in die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ein, sondern in Kombination mit einem PI weiter *downstream* im Signalweg. Es gilt in den nächsten Schritten die Interaktion von PI und EGFR-TKI zu untersuchen.

In Studienkollektiven besaßen 3-14 % der Patienten, die eine Resistenz zu EGFR-TKI zeigten, eine morphologische Umwandlung von NSCLC zu SCLC (Yu et al., 2013, Marcoux et al., 2019). Bei dieser Umwandlung kommt es zu einer persistierenden EGFR-Aktivierung bei einer verminderten EGFR-Expression (Niederst et al., 2015b). In der HCC4006ErlOsi kommt es wahrscheinlich nicht zu einer Umwandlung in SCLC. In unseren Western Blot Analysen wurde kein phosphoryliertes EGFR nachgewiesen, dafür aber eine deutliche EGFR-Expression. Ein anderer EGFR-Resistenzmechanismus liegt wahrscheinlich vor, der jedoch

in der Kombination von BTZ und EGFR-TKI in Teilen umgangen werden kann und so Zelltod induziert.

5.9 Mitochondrium und Apoptose

Das Mitochondrium und die MOMP spielen bei der BCL-2-Protein getriggerten Apoptose eine wichtige Rolle. In Krebszellen kommt es zu einer Umprogrammierung des Energiestoffwechsels (Hanahan and Weinberg, 2011, Hanahan, 2022).

Die aerobe Glykolyse wird in dreifach negativen Brustkrebszellen durch den EGFR-Signalweg gefördert (Lim et al., 2016). Wird EGFR in NSCLC-Zelllinien durch EGFR-TKI gehemmt, kehrt dies den Warburg-Effekt um und reaktiviert die oxidative Phosphorylierung (De Rosa et al., 2015). In dieser Arbeit wurde mit dem Mito Stress Test die Sauerstoffverbrauchrate und die mitochondriale Funktion der Zelllinien HCC4006WT, HCC4006Erl, HCC4006ErlOsi, H1650WT und H1650Osi unter Inkubation mit 5 μ M OSI und unter Kontrollbedingungen über 24 h untersucht.

Die Funktion der Mitochondrien scheint durch OSI auch in den resistenten Zelllinien beeinflusst zu werden: Durch die Behandlung mit 5 μ M OSI für 24 h kommt es in den EGFR-TKI resistenten Zelllinien (HCC4006Erl, HCC4006ErlOsi) zu einer ähnlich hohen Sauerstoffkapazität wie ohne die Inkubation mit OSI.

Die Marker einer mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, wie die von den Mitochondrien gesteuerten ATP-Produktion, das mitochondriale Membranpotential und die maximale OXPHOS-Kapazität, zeigten in den resistenten Zelllinien unter OSI ein ähnliches Verhalten (HCC4006Erl, HCC4006ErlOsi) oder sogar erhöht (H1650Osi) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Arbeitsgruppe um Keon Wook Kang konnte einen ähnlichen Effekt in einer GEF1-resistenten HCC827 Zelllinie finden und postulierte, dass eine langfristige Behandlung mit EGFR-TKI den mitochondrialen Stoffwechsel reaktiviert (Kim et al., 2021). In Zusammenschau der Daten und der von Kim et al. gilt es die Rolle des Mitochondriums bei der langfristigen Inkubation mit EGFR-TKI und ihre Rolle in der Resistenzentstehung genauer zu untersuchen (Kim et al., 2021).

5.10 Zelltodinduktion in EGFR-mutierten-Zelllinien durch eine kombinierte Inkubation von EGFR-TKI+BTZ

Nach 24-stündiger Inkubation von BTZ mit einem EGFR-TKI (GEFI, AFA, OSI) zeigt sich keine vermehrte synergistische Zelltodinduktion im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (BTZ, GEFI, AFA und OSI).

Bei Kombinationsbehandlungen mit BTZ und anderen Wirkstoffen als EGFR-TKI, wurden in NSCLC-Zelllinien Effekte beschrieben (Ando et al., 2014, Sooman et al., 2017): Ando et al. zeigte eine synergistische Wirkung der Kombination von Adenovirus vermittelten Gentransfer von C9-Suizidgenen und BTZ (Ando et al., 2014). Bei Sooman et al. konnten in einer Kombination von Proteasominhibition mit Cisplatin, Gemcitabin oder Vinorelbin eine synergistische Wirkung nachweisen (Sooman et al., 2017). Die verwendeten Zelllinien waren hoch resistent gegen eine GEFI-Behandlung. Gerade in der Zelllinie U-2020, die eine geringe GEFI-Resistenz hatte, zeigte sich ein sehr ausgeprägter Synergismus bei der Zelltodinduktion zwischen einer Kombination von b-AP15, einem PI, mit GEFI (Sooman et al., 2017).

Da nach 24 h Inkubationszeit der Einfluss zwischen den verschiedenen Behandlungen in unseren Versuchen kaum ausgeprägt war, wurden Experimente auch mit Inkubationszeiten von 48 h und 72 h durchgeführt.

Bei einer Verlängerung der Inkubationszeit zeigte sich in der sensiblen Zelllinie HCC4006WT keine signifikante Induktion von Zelltod in der Kombinationsbehandlung OSI+BTZ im Vergleich zu OSI (vgl. *Abbildung 76*). OSI wurde verwendet, da es insbesondere bei den häufigen EGFR-Mutationen in Exon 19 effektiv wirkt. Die Zelllinie besitzt eine Exon 19 Deletion und das beobachtete Ergebnis ist somit zu erwarten.

Bei HCC4006Erl konnte bereits nach 48 h ein Trend zur Erhöhung des Zelltodes in der Kombinationsbehandlung OSI+BTZ im Vergleich zur Einzelbehandlung festgestellt werden. In dieser Zelllinie ist der vermutete Resistenzmechanismus unter anderem eine EMT. Bei HCC4006ErlOsi konnte auch bereits nach 48 h eine deutlichere Induktion des Zelltodes festgestellt werden.

Die Behandlung mit OSI+BTZ zeigte auch in der Zelllinie H1650WT eine starke Zelltodinduktion. Diese Zelllinie zeigt Mutationen im nachgeschalteten Signalweg in PTEN. Dagegen zeigte H1650Osi einen verminderten Zelltod im Vergleich zur parentalen Zelllinie, aber auch hier zeigt sich ein signifikanter Zelltod in der Kombinationsbehandlung im Vergleich zu den Einzelbehandlungen (vgl. *Abbildung 100*).

5.11 BCL-2-Proteinfamilie

Die BCL-2-Proteinfamilie spielt eine entscheidende Rolle bei der Apoptose, aber auch bei der Resistenzentstehung von NSCLC unter EGFR-TKI-Therapie.

In HCC4006WT zeigte sich nach 72 h mit isolierter Inkubation mit BTZ eine Induktion von BCL-xL, einem anti-apoptotischen Protein. Bei der Inkubation mit BTZ lagen auch die proapoptotischen Proteine BAK, BAX und insbesondere BOK vermehrt vor. BAK wird auch in der Kombinationsbehandlung OSI+BTZ stärker exprimiert. BAK kann so die MOMP-Bildung fördern (Peña-Blanco and García-Sáez, 2018). Während BAX vor allem cytosolisch vorliegt, zeigt sich BAK im Mitochondrium (Griffiths et al., 1999, Peña-Blanco and García-Sáez, 2018). BH3-only Proteine interagieren mit aktivem BAX und BAK (Chipuk et al., 2010, Shamas-Din et al., 2011, Kaloni et al., 2023). Die Aktivierung von BAX, BAK und BOK führt zu einer Konformationsänderung und es kommt zu einer Homooligomerisierung der Proteine in der äußeren Mitochondrienmembran. Dieser Prozess führt zur Porenbildung (MOMP) und Cytochrom C wird freigesetzt. Dies aktiviert im Zytosol wiederum die Caspasen und die Apoptose schreitet voran.

Bei HCC4006Erl wird nach 24 h Inkubation mit BTZ BCL-xL als anti-apoptotisches Protein verstärkt exprimiert. Nach 72 h werden BAX und BOK vermindert in der Kombinationsbehandlung exprimiert, obwohl sich hier der größte Zelltod zeigt. Möglicherweise sind bereits so viele Zellen in Apoptose gegangen, sodass sich die Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle vermindert darstellt.

In den HCC4006ErlOsi zeigt sich über alle 3 Behandlungen (BTZ, OSI, OSI+BTZ) und die Kontrolle hinweg eine Expression von BOK. Das kann ein Zeichen dafür sein, dass die Zelllinie insgesamt noch nicht vollständig ihre Resistenz gegen OSI in der Dauerkultur ausgebildet hat und insgesamt vermehrt in Apoptose geht.

BCL-xL wird vermehrt in der OSI-Behandlung exprimiert, was darauf hinweisen kann, dass die Zelllinie bereits eine gewisse Resistenz etabliert hat.

5.12 NOXA und integrierte Stressantwort

In den Kombinationsbehandlungen zeigt sich in allen 3 HCC4006 Zelllinien (HCC4006WT, HCC4006Erl, HCC4006ErlOsi) bereits nach 24 h eine Induktion von NOXA. Die Kombinationsbehandlung konnte in HCC4006WT und HCC4006Erl auch die transkriptionelle Aktivierung von PMAIP1 nach 24 h Inkubation induzieren.

In der Inkubation mit BTZ wird auch NOXA induziert, jedoch schwächer als in der Doppelkombination von OSI+BTZ. Deswegen kann die verstärkte Expression in der Kombination OSI+BTZ nicht durch eine alleinige Akkumulation von NOXA durch den inhibierten Abbau des Proteasoms erklärt werden. Es ist bekannt, dass Proteasominhibitoren NOXA induzieren, was wiederum zu einer Inhibition von MCL-1 führt (Touzeau et al., 2018, Muenchow et al., 2020, Weller et al., 2022). Auch wurde eine NOXA-Induktion durch die kombinierte Anwendung von BTZ mit ALK-Inhibitoren, einem anderen Tyrosinkinaseinhibitor, in NSCLC beschrieben (Tanimoto et al., 2021). Die NOXA-Induktion durch eine kombinierte Anwendung von EGFR-TKI und PI ist von uns erstmalig beschrieben worden (Orth et al., 2023).

NOXA ist der einzige selektive Antagonist der BH3-only-Untergruppe: Es bindet nur das anti-apoptotisch wirkende MCL-1 und vermittelt so eine Induktion des Zelltodes (Haschka et al., 2015, Chen et al., 2005). MCL-1 wird analog zu NOXA induziert und dadurch gebunden und die Apoptose wird induziert. Das höchste Proteinlevel zeigt MCL-1 in der späten S-Phase oder frühen G2-Phase (Chen et al., 2018, Tantawy et al., 2023).

Der Nachweis von NOXA nach 72 h Inkubation wurde dadurch erschwert, dass nach 72 h in den Kombinationsbehandlungen fast alle Zellen in Apoptose gegangen sind. Andere BCL-2-Proteine, die auch in apoptotischen Zellen vorhanden sind, konnten dagegen eindeutig auch nach 72 h detektiert werden. So kann ausgeschlossen werden, dass die fehlende NOXA-Expression auf methodische

Gründe zurückzuführen ist. Die Auswertungen zur NOXA-Expression erfolgten daher nach einer Inkubation von 24 h.

Die integrierte Stressantwort (ISR) wird auch durch die Kombinationsbehandlung von OSI+BTZ getriggert. Die Transkriptionsfaktoren der ISR, ATF3 und ATF4, steigern die Expression von NOXA über das Gen PMAIP1 und führen somit zu einer Inhibition von MCL-1 (Weller et al., 2022). Eine Aktivierung der Stress-Kinasen kann angestrebt werden, um den Effekt der ISR zu nutzen. Erlotinib kann den proteasomabhängigen Abbau von MCL-1 schnell und deutlich verstärken und erhöht die Phosphorylierung von eIF2 α , was zu einer Aktivierung von ISR führt (Arai et al., 2020).

Das besondere an der ISR ist, dass bei Verlangsamung der Proteinsynthese die Level an spezifisch translatierter mRNA und die Synthese von ATF4 gleichzeitig erhöht werden können (Pakos-Zebrucka et al., 2016, Costa-Mattioli and Walter, 2020). Mutierter EGFR trägt zur ATF4-Induktion nach GCN2-Aktivierung in NSCLC-Zellen bei (Takahashi et al., 2023). Yan et al. konnte zeigen, dass das Zytostatikum Pemetrexed in NSCLC die NOXA-Expression erhöht und so Apoptose induziert (Yan et al., 2014). Die globale Proteinsynthese wird reduziert und die Translation spezifischer mRNAs oder von *open reading frames* (ORFs) beginnend von alternativen Startcodons gestartet. Dies führt zu einer erhöhten Expression von ATF3 und ATF4 (Weller et al., 2022).

In allen HCC4006 Zelllinien (HCC4006WT, HCC4006Erl, HCC4006ErlOsi) zeigt sich eine vermehrte Expression von ATF4 in der Kombinationsbehandlung OSI+BTZ, parallel zur Induktion von NOXA. Insbesondere in den HCC4006ErlOsi wird ATF4 in der Kombinationsbehandlung vermehrt exprimiert. In HCC4006WT und HCC4006Erl wird auch bei der isolierten BTZ-Inkubation ATF4 verstärkt exprimiert. In diesen beiden Zelllinien wurde auch die mRNA-Expression untersucht. ATF4 wird hier auch unter der BTZ-Inkubation und in der Kombinationsinkubation verstärkt exprimiert (vgl. *Abbildung 93*, *Abbildung 95*).

ATF3 zeigte dagegen in den HCC4006WT unter OSI+BTZ keine erhöhte mRNA- oder Proteinexpression. In den HCC4006Erl zeigte sich eine hohe mRNA-

Expression und eine erhöhte Proteinexpression in der BTZ-Inkubation sowie bei der kombinierten Inkubation mit OSI+BTZ.

Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, dass ATF3 und ATF4 wichtig für die Zell-todvermittlung in der Kombinationsbehandlung OSI+BTZ sind. Der genaue Mechanismus muss in weiterführenden Studien wie ATF3- und ATF4-*knockout* Zellen untersucht werden.

Viertgenerationen EGFR-TKI befinden sich bereits in klinischen Studien. Diese EGFR-TKI wurden vorrangig für eine C797S Mutation entwickelt und wirken spezifisch. Die C797S Mutation ist eine häufig unter Einsatz von OSI entstehende Mutation (Leonetti et al., 2019). Die Ergebnisse erster Studien (Schalm et al., 2020, Lim et al., 2024) sehen vielversprechend aus, müssen jedoch noch weiter vertieft werden. Auch gibt es neben der häufigen C797S Mutation sehr viele weitere Mutationen, die nicht elegant mit einem EGFR der 4. Generation adressiert werden können und in denen eine Kombination aus EGFR-TKI und BTZ ein möglicher Ansatz wäre. Darüber hinaus kann es auch beim Einsatz eines 4. Generations-EGFR-TKI zu einer Resistenzentstehung kommen. Deshalb sind Kombinationstherapien zur Überwindung möglicher Resistenzen bei der NSCLC Behandlung weiterhin ein sinnvolles Konzept.

5.13 Ausblick

Diese Arbeit untersucht *in vitro* in EGFR-mutierten NSCLC-Zelllinien die Kombinationstherapie mit bereits für andere Indikationen zugelassenen Wirkstoffen. Der gleichzeitige Einsatz verschiedener Medikamente ist ein etabliertes Verfahren *in vivo* in der Hämatologie und Onkologie. Die hier *in vitro* getestete Kombination von OSI+BTZ wurde bisher noch nicht in *in vivo* Studien untersucht.

In verschiedenen NSCLC-Zelllinien mit spezifischer EGFR-Mutation und zusätzlicher Resistenz gegen mindestens ein EGFR-TKI (HCC4006Erl, HCC4006ErlOsi, HCC827Erl, HCC827ErlOsi, H1650WT, H1650Osi) konnte durch die kombinierte Anwendung OSI+BTZ vermehrt Apoptose induziert werden.

Vor einer Anwendung in der Klinik müssten die Ergebnisse an weiteren NSCLC-Zelllinien bzw. an Zellen von Patienten, die unter EGFR-Therapie einen Progress

erlitten, *in vitro* bestätigt werden. Weiter müssten Studien zur Wirksamkeit und Verträglichkeit der Kombinationsbehandlung *in vivo* durchgeführt werden. So konnte Bai et al. bereits in subkutanen Xenograft-Modellen erfolgreich mit 6 verschiedenen NSCLC-Zelllinien (u.a. A549) mit BTZ eine signifikante Verringerung des Tumorzvolumens zeigen (Bai et al., 2023).

Bei alleiniger Anwendung sind BTZ und OSI gut wirksam und sicher verträglich. In der FLAURA Studie zeigten sich unerwünschte Arzneimittelwirkungen Grad 3 oder höher seltener im OSI-Arm als im Arm der anderen EGFR-TKI. Am häufigsten zeigte sich ein Ausschlag (58 %), Durchfall (58 %) und trockene Haut (37 %). OSI kann die QT-Zeit verlängern, die meisten Nebenwirkungen entsprachen Grad 1. Es wurde kein tödlicher Fall eines Torsade de Pointes oder eines verlängerten QT-Intervalls beschrieben. Eine weitere schwerwiegendere Nebenwirkung ist die interstitielle Lungenerkrankung (2 %). Insgesamt litten 22 % der OSI-Arm-Patienten unter schwerwiegenderen Nebenwirkungen (Soria et al., 2018, Ramalingam et al., 2020).

Bei einer Therapie mit BTZ kann es zu gastrointestinalen Beschwerden wie Diarrhö und Übelkeit kommen. Außerdem ist eine hämatologische Toxizität häufig, die zu einer Panzytopenie führen kann. Häufig treten auch eine periphere Neuropathie sowie eine orthostatische posturale Hypotonie und thromboembolische Ereignisse auf. Außerdem kann es zu einer Verschlechterung oder eines akuten Auftretens einer Herzinsuffizienz kommen.

In anderen Kombinationsstudien zeigte OSI eine sichere und klinische Wirksamkeit. In einer Phase IB-Studie stellte sich die kombinierte Anwendung von OSI und Navitoclax, einem BCL-2/BCL-xL-Inhibitor, als sicher und klinisch wirksam heraus (Bertino et al., 2021). Die Kombination von OSI und BTZ in *in vivo* Studien wurde noch nicht untersucht.

Die Kombinationstherapie OSI+BTZ wäre in der klinischen Praxis interessant, da zumindest der EGFR-TKI peroral verabreicht werden kann, BTZ wird dagegen parenteral verabreicht. Insofern ist der logistische Aufwand für den Patienten bei einer Kombinationsbehandlung, wenn man die beiden Medikamente nicht in

einer Sitzung geben kann, vergleichsweise gering, weil die Tabletteneinnahme in der häuslichen Umgebung durchgeführt werden kann.

Die Etablierung von resistenten NSCLC-Zelllinien gestaltete sich herausfordernd. Dies weist auf eine Heterogenität innerhalb der NSCLC-Zellen hin. Auch wenn sich Tumoren einer Subklasse, wie beispielsweise Adenokarzinome des NSCLC mit aktivierender EGFR-Mutation in vielen Aspekten ähneln, unterscheiden sich die Tumoren doch auch unter anderem in einem Ansprechen auf eine EGFR-TKI-Therapie. Dies zeigt die Wichtigkeit einer individuellen auf den Patienten und seinen Tumor zugeschnittenen Tumorthherapie. Da Mutationen unter Therapie auftreten, muss die Therapie ständig reevaluiert und angepasst werden. Insofern ist die Etablierung von frühzeitigen Markern von Resistenzentstehung in Tumoren wichtig. Dazu ist eine molekulargenetische Untersuchung der Tumoren anzustreben, um ein besseres Therapieregime für den Patienten zu identifizieren.

5.14 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Resistenz gegenüber EGFR-spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren in TP53-mutierten Lungenkarzinomzelllinien durch Proteasominhibition überwunden werden kann. In verschiedenen NSCLC-Zelllinien mit spezifischer EGFR-Mutation und zusätzlicher Resistenz gegen mindestens einen EGFR-TKI (HCC4006Erl, HCC4006ErIosi, HCC827Erl, HCC827ErIosi, H1650WT, H1650Osi) konnte durch die kombinierte Anwendung von EGFR-TKI (OSI) und PI (BTZ) vermehrt Apoptose induziert werden. Als Mechanismus haben wir eine Induktion des proapoptischen Proteins NOXA identifiziert. Diese Arbeit ergab weiter, dass eine langfristige Behandlung mit EGFR-TKI zu einer Reaktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels führt.

6 Zusammenfassung

Lungenkarzinome stellen die Krebsentität mit den meisten Todesfällen pro Jahr weltweit dar. Trotz zielgerichteter Therapiemöglichkeiten lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate im Zeitraum 2017-2019 bei NSCLC bei ~22 %. Verschiedene EGFR-Inhibitoren werden mit einer guten Verträglichkeit und einem guten Ansprechen in der Therapie eingesetzt und konnten das Gesamtüberleben verlängern. Jedoch entsteht nach einer gewissen Zeit Resistenz gegen die EGFR-TKI, was deren Einsatz und das Überleben des Patienten einschränkt. In diesen Fällen muss bislang meistens auf eine klassische Chemotherapie mit ihren Nebenwirkungen zurückgegriffen werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Resistenz gegenüber EGFR-spezifischen TKI in TP53-mutierten Lungenkarzinomzelllinien durch Proteasominhibition überwunden werden kann. Dazu wurden 11 verschiedene NSCLC-Zelllinien mit verschiedenen EGFR-TKI und BTZ über einen Zeitraum von 24-72 h inkubiert und in durchflusszytometrischen Analysen die Apoptoseraten bestimmt. Darüber hinaus wurden Western Blot Analysen und qPCR mit einem Fokus auf die BCL-2-Proteinfamilie durchgeführt. Ergänzt wurden die Untersuchungen durch Lichtmikroskopie, Immunfluoreszenzmikroskopie, sowie Mito Stress Test Analysen zur Mitochondrienfunktion.

Während EGFR-WT Zelllinien keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose durch eine Inkubation mit EGFR-TKI zeigten, zeigten sich die EGFR-mutierten Zelllinien sehr sensibel auf eine Inkubation mit den EGFR-TKI. Die kombinierte Inkubation von EGFR-TKI + BTZ zeigte in auf EGFR-sensiblen Zelllinien keinen Zusatznutzen hinsichtlich der Apoptoseraten. Dagegen zeigte die kombinierte Behandlung von EGFR-TKI + PI in den verschiedenen getesteten NSCLC-Zelllinien mit einer spezifischen EGFR-Mutation und zusätzlich einer Resistenz gegen mindestens einen EGFR-TKI durch die kombinierte Anwendung von EGFR-TKI und PI einen vermehrten Zelltod. Dieser vermehrte Zelltod wurde mutmaßlich über die Induktion des pro-apoptotischen Proteins NOXA vermittelt. Außerdem zeigte eine längerfristige Behandlung mit EGFR-TKI eine Reaktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels.

Trotz der vielversprechenden *in vitro* Resultate müssen die Ergebnisse vor einer klinischen Anwendung an weiteren NSCLC-Zelllinien bzw. an Zellen von Patienten, die unter EGFR-Therapie einen Progress erlitten, *in vitro* bestätigt werden. Weiter müssten Studien zur Wirksamkeit und Verträglichkeit der Kombinationsbehandlung *in vivo* (Tiermodell) durchgeführt werden.

Die Ergebnisse zeigen die Heterogenität der NSCLC-Zelllinien. Auch wenn sich Tumoren einer Subklasse, wie beispielsweise Adenokarzinome des NSCLC mit aktivierender EGFR-Mutation, in vielen Aspekten ähneln, unterscheiden sich die Tumoren doch auch unter anderem in einem Ansprechen auf eine EGFR-TKI-Therapie. Dies zeigt die Wichtigkeit einer individuellen auf den Patienten und seinen Tumor zugeschnittenen Tumorthherapie. Da Mutationen unter Therapie auftreten, muss die Therapie ständig reevaluiert und ggf. angepasst werden. Insofern ist die Etablierung früher Marker für die Resistenzentstehung in Tumoren wichtig. Dies kann durch molekulargenetische Untersuchung der Tumoren oder von aus Blut isolierten Tumorzellen oder zellfreier Tumor-DNA erreicht werden, um ein besseres Therapieregime für den Patienten zu identifizieren.

7 Literaturverzeichnis

- Ahn, M.-J., Cho, J. H., Sun, J.-M., Lee, S.-H., Ahn, J. S., Park, K., Park, K. U., *et al.* 2018. An open-label, multicenter, phase II single arm trial of osimertinib in non-small cell lung cancer patients with uncommon EGFR mutation (KCSG-LU15-09). *Journal of Clinical Oncology*, 36, 9050-.
- Albert, M. C., Brinkmann, K. & Kashkar, H. 2014. Noxa and cancer therapy: Tuning up the mitochondrial death machinery in response to chemotherapy. *Mol Cell Oncol*, 1, e29906.
- Alemaný, R., Ruan, S., Kataoka, M., Koch, P. E., Mukhopadhyay, T., Cristiano, R. J., Roth, J. A., *et al.* 1996. Growth inhibitory effect of anti-K-ras adenovirus on lung cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 3, 296-301.
- Amelia, T., Kartasasmita, R. E., Ohwada, T. & Tjahjono, D. H. 2022. Structural Insight and Development of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Molecules*, 27.
- An, J. & Rettig, M. B. 2007. Epidermal growth factor receptor inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to the cytotoxic effects of bortezomib. *Mol Cancer Ther*, 6, 61-9.
- Ando, M., Hoyos, V., Yagyu, S., Tao, W., Ramos, C. A., Dotti, G., Brenner, M. K., *et al.* 2014. Bortezomib sensitizes non-small cell lung cancer to mesenchymal stromal cell-delivered inducible caspase-9-mediated cytotoxicity. *Cancer Gene Ther*, 21, 472-82.
- Arai, S., Varkaris, A., Nouri, M., Chen, S., Xie, L. & Balk, S. P. 2020. MARCH5 mediates NOXA-dependent MCL1 degradation driven by kinase inhibitors and integrated stress response activation. *Elife*, 9.
- Arulananda, S., Do, H., Musafar, A., Mitchell, P., Dobrovic, A. & John, T. 2017. Combination Osimertinib and Gefitinib in C797S and T790M EGFR-Mutated Non Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 12, 1728-32.
- Ayestaran, I., Galhoz, A., Spiegel, E., Sidders, B., Dry, J. R., Dondelinger, F., Bender, A., *et al.* 2020. Identification of Intrinsic Drug Resistance and Its Biomarkers in High-Throughput Pharmacogenomic and CRISPR Screens. *Patterns (N Y)*, 1, 100065.
- Bai, Y., Zhou, L., Zhang, C., Guo, M., Xia, L., Tang, Z., Liu, Y., *et al.* 2023. Dual network analysis of transcriptome data for discovery of new therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Oncogene*.
- Balak, M. N., Gong, Y., Riely, G. J., Somwar, R., Li, A. R., Zakowski, M. F., Chiang, A., *et al.* 2006. Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, 12, 6494-501.
- Ballard, P., Yates, J. W. T., Yang, Z., Kim, D.-W., Yang, J. C.-H., Cantarini, M., Pickup, K., *et al.* 2016. Preclinical Comparison of Osimertinib with Other EGFR-TKIs in EGFR-Mutant NSCLC Brain Metastases Models, and Early Evidence of Clinical Brain Metastases Activity. *Clinical Cancer Research*, 22, 5130-40.

- Bean, J., Riely, G. J., Balak, M., Marks, J. L., Ladanyi, M., Miller, V. A. & Pao, W. 2008. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 14, 7519-25.
- Bennett, W. P., Alavanja, M. C., Blomeke, B., Vähäkangas, K. H., Castrén, K., Welsh, J. A., Bowman, E. D., *et al.* 1999. Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst*, 91, 2009-14.
- Bergström, J. D., Westermarck, B. & Heldin, N. E. 2000. Epidermal growth factor receptor signaling activates met in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 259, 293-9.
- Bertino, E. M., Gentzler, R. D., Clifford, S., Kolesar, J., Muzikansky, A., Haura, E. B., Piotrowska, Z., *et al.* 2021. Phase IB Study of Osimertinib in Combination with Navitoclax in EGFR-mutant NSCLC Following Resistance to Initial EGFR Therapy (ETCTN 9903). *Clin Cancer Res*, 27, 1604-11.
- Bertoli, E., De Carlo, E., Del Conte, A., Stanzione, B., Revelant, A., Fassetta, K., Spina, M., *et al.* 2022. Acquired Resistance to Osimertinib in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: How Do We Overcome It? *Int J Mol Sci*, 23.
- Bian, D., Sun, L., Hu, J., Duan, L., Xia, H., Zhu, X., Sun, F., *et al.* 2023. Neoadjuvant Afatinib for stage III EGFR-mutant non-small cell lung cancer: a phase II study. *Nature Communications*, 14, 4655.
- Bianco, R., Shin, I., Ritter, C. A., Yakes, F. M., Basso, A., Rosen, N., Tsurutani, J., *et al.* 2003. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 22, 2812-22.
- Bock, F. J. & Tait, S. W. G. 2020. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21, 85-100.
- Brown, B. P., Zhang, Y. K., Kim, S., Finneran, P., Yan, Y., Du, Z., Kim, J., *et al.* 2022. Allele-specific activation, enzyme kinetics, and inhibitor sensitivities of EGFR exon 19 deletion mutations in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119, e2206588119.
- Canale, M., Petracci, E., Delmonte, A., Chiadini, E., Dazzi, C., Papi, M., Capelli, L., *et al.* 2017. Impact of TP53 Mutations on Outcome in EGFR-Mutated Patients Treated with First-Line Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 23, 2195-202.
- Carneiro, B. A. & El-Deiry, W. S. 2020. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 17, 395-417.
- Chabon, J. J., Simmons, A. D., Lovejoy, A. F., Esfahani, M. S., Newman, A. M., Haringsma, H. J., Kurtz, D. M., *et al.* 2016. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun*, 7, 11815.
- Chang, Y. S., Choi, C. M. & Lee, J. C. 2016. Mechanisms of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance and Strategies to Overcome Resistance in Lung Adenocarcinoma. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 79, 248-56.

- Chen, G., Kronenberger, P., Teugels, E., Umelo, I. A. & De Grève, J. 2012. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells: the effect of combining RNA interference with tyrosine kinase inhibitors or cetuximab. *BMC Med*, 10, 28.
- Chen, G., Magis, A. T., Xu, K., Park, D., Yu, D. S., Owonikoko, T. K., Sica, G. L., *et al.* 2018. Targeting Mcl-1 enhances DNA replication stress sensitivity to cancer therapy. *J Clin Invest*, 128, 500-16.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., *et al.* 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, 17, 393-403.
- Chen, M., Choi, S., Wen, T., Chen, C., Thapa, N., Lee, J. H., Cryns, V. L., *et al.* 2022. A p53–phosphoinositide signalosome regulates nuclear AKT activation. *Nature Cell Biology*, 24, 1099-113.
- Chevallier, M., Borgeaud, M., Addeo, A. & Friedlaender, A. 2021. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World J Clin Oncol*, 12, 217-37.
- Chinnaiyan, A. M. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, 1, 5-15.
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J. & Green, D. R. 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*, 37, 299-310.
- Chmielecki, J., Mok, T., Wu, Y.-L., Han, J.-Y., Ahn, M.-J., Ramalingam, S. S., John, T., *et al.* 2023. Analysis of acquired resistance mechanisms to osimertinib in patients with EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer from the AURA3 trial. *Nature Communications*, 14, 1071.
- Cho, J. H., Lim, S. H., An, H. J., Kim, K. H., Park, K. U., Kang, E. J., Choi, Y. H., *et al.* 2020. Osimertinib for Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Uncommon EGFR Mutations: A Multicenter, Open-Label, Phase II Trial (KCSG-LU15-09). *J Clin Oncol*, 38, 488-95.
- Choi, Y. J., Rho, J. K., Jeon, B.-s., Choi, S. J., Park, S. C., Lee, S. S., Kim, H.-R., *et al.* 2010. Combined inhibition of IGFR enhances the effects of gefitinib in H1650: a lung cancer cell line with EGFR mutation and primary resistance to EGFR-TK inhibitors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 66, 381-8.
- Cicènas, S., Geater, S. L., Petrov, P., Hotko, Y., Hooper, G., Xia, F., Mudie, N., *et al.* 2016. Maintenance erlotinib versus erlotinib at disease progression in patients with advanced non-small-cell lung cancer who have not progressed following platinum-based chemotherapy (IUNO study). *Lung Cancer*, 102, 30-7.
- Collins, G. A. & Goldberg, A. L. 2017. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell*, 169, 792-806.
- Costa-Mattioli, M. & Walter, P. 2020. The integrated stress response: From mechanism to disease. *Science*, 368.
- Costa, D. B., Schumer, S. T., Tenen, D. G. & Kobayashi, S. 2008. Differential responses to erlotinib in epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated lung cancers with acquired resistance to gefitinib carrying the L747S or T790M secondary mutations. *J Clin Oncol*, 26, 1182-4; author reply 4-6.

- Criscione, S. W., Martin, M. J., Oien, D. B., Gorthi, A., Miragaia, R. J., Zhang, J., Chen, H., *et al.* 2022. The landscape of therapeutic vulnerabilities in EGFR inhibitor osimertinib drug tolerant persister cells. *NPJ Precis Oncol*, 6, 95.
- Czabotar, P. E. & Garcia-Saez, A. J. 2023. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24, 732-48.
- De Rosa, V., Iommelli, F., Monti, M., Fonti, R., Votta, G., Stoppelli, M. P. & Del Vecchio, S. 2015. Reversal of Warburg Effect and Reactivation of Oxidative Phosphorylation by Differential Inhibition of EGFR Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 21, 5110-20.
- de Wit, M., Gao, Y., Mercieca, D., de Heer, I., Valkenburg, B., van Royen, M. E., Aerts, J., *et al.* 2020. Mutation and drug-specific intracellular accumulation of EGFR predict clinical responses to tyrosine kinase inhibitors. *EBioMedicine*, 56, 102796.
- Dewson, G., Ma, S., Frederick, P., Hockings, C., Tan, I., Kratina, T. & Kluck, R. M. 2012. Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ*, 19, 661-70.
- Divakaruni, A. S., Paradyse, A., Ferrick, D. A., Murphy, A. N. & Jastroch, M. 2014. Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol*, 547, 309-54.
- Dokala, A. & Thakur, S. S. 2017. Extracellular region of epidermal growth factor receptor: a potential target for anti-EGFR drug discovery. *Oncogene*, 36, 2337-44.
- Dong, Y., Xu, J., Sun, B., Wang, J. & Wang, Z. 2022. MET-Targeted Therapies and Clinical Outcomes: A Systematic Literature Review. *Mol Diagn Ther*, 26, 203-27.
- Donnelly, N., Gorman, A. M., Gupta, S. & Samali, A. 2013. The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci*, 70, 3493-511.
- Dou, Q. P. & Li, B. 1999. Proteasome inhibitors as potential novel anticancer agents. *Drug Resist Updat*, 2, 215-23.
- Du, H., Wolf, J., Schafer, B., Moldoveanu, T., Chipuk, J. E. & Kuwana, T. 2011. BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem*, 286, 491-501.
- Dubey, S. & Schiller, J. H. 2005. Three Emerging New Drugs for NSCLC: Pemetrexed, Bortezomib, and Cetuximab. *The Oncologist*, 10, 282-91.
- Dubin, S. & Griffin, D. 2020. Lung Cancer in Non-Smokers. *Mo Med*, 117, 375-9.
- Duggirala, K. B., Lee, Y. & Lee, K. 2022. Chronicles of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors: Targeting EGFR C797S Containing Triple Mutations. *Biomol Ther (Seoul)*, 30, 19-27.
- Edlich, F., Banerjee, S., Suzuki, M., Cleland, M. M., Arnoult, D., Wang, C., Neutzner, A., *et al.* 2011. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell*, 145, 104-16.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.

- Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K. & Jänicke, R. U. 2005. Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J Biol Chem*, 280, 37169-77.
- Ettinger, D. S., Wood, D. E., Aisner, D. L., Akerley, W., Bauman, J. R., Bharat, A., Bruno, D. S., *et al.* 2022. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*, 20, 497-530.
- Ferrara, M. G., Martini, M., D'Argento, E., Forcella, C., Vita, E., Di Noia, V., Sperduti, I., *et al.* 2021. PTEN Loss as a Predictor of Tumor Heterogeneity and Poor Prognosis in Patients With EGFR-mutant Advanced Non-small-cell Lung Cancer Receiving Tyrosine Kinase Inhibitors. *Clin Lung Cancer*, 22, 351-60.
- Fischer, T., Hartmann, O., Reissland, M., Prieto-Garcia, C., Klann, K., Pahor, N., Schülein-Völk, C., *et al.* 2022. PTEN mutant non-small cell lung cancer require ATM to suppress pro-apoptotic signalling and evade radiotherapy. *Cell Biosci*, 12, 50.
- Flores-Romero, H., Dadsena, S. & García-Sáez, A. J. 2023. Mitochondrial pores at the crossroad between cell death and inflammatory signaling. *Mol Cell*, 83, 843-56.
- Fricker, L. D. 2020. Proteasome Inhibitor Drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 60, 457-76.
- Froesch, P., Mark, M., Rothschild, S. I., Li, Q., Godar, G., Rusterholz, C., Oppliger Leibundgut, E., *et al.* 2021. Binimetinib, pemetrexed and cisplatin, followed by maintenance of binimetinib and pemetrexed in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) and KRAS mutations. The phase 1B SAKK 19/16 trial. *Lung Cancer*, 156, 91-9.
- Fulda, S. & Debatin, K. M. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25, 4798-811.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death & Differentiation*, 14, 1237-43.
- Gazdar, A. F. 2009. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28 Suppl 1, S24-31.
- Ghosh, G., Lian, X., Kron, S. J. & Palecek, S. P. 2012. Properties of resistant cells generated from lung cancer cell lines treated with EGFR inhibitors. *BMC Cancer*, 12, 95.
- Gloushankova, N. A., Rubtsova, S. N. & Zhitnyak, I. Y. 2018. An In Vitro System to Study the Epithelial-Mesenchymal Transition In Vitro. *Methods Mol Biol*, 1749, 29-42.
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M. & Baradaran, B. 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16, 2129-44.
- Golding, B., Luu, A., Jones, R. & Vilorio-Petit, A. M. 2018. The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Mol Cancer*, 17, 52.

- Green, D. R. & Kroemer, G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458, 1127-30.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C., *et al.* 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*, 144, 903-14.
- Grosse, C., Soltermann, A., Rechsteiner, M. & Grosse, A. 2019. Oncogenic driver mutations in Swiss never smoker patients with lung adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic characteristics and outcome. *PLoS One*, 14, e0220691.
- Gupta, V. A., Ackley, J., Kaufman, J. L. & Boise, L. H. 2021. BCL2 Family Inhibitors in the Biology and Treatment of Multiple Myeloma. *Blood Lymphat Cancer*, 11, 11-24.
- Hanahan, D. 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12, 31-46.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanahan, D. & Weinberg, Robert A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646-74.
- Haschka, M. D., Soratroi, C., Kirschnek, S., Häcker, G., Hilbe, R., Geley, S., Villunger, A., *et al.* 2015. The NOXA-MCL1-BIM axis defines lifespan on extended mitotic arrest. *Nat Commun*, 6, 6891.
- Hassin, O. & Oren, M. 2023. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22, 127-44.
- Hazan, R. B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I. & Suyama, K. 2004. Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*, 1014, 155-63.
- Herbst, R. S., Wu, Y. L., John, T., Grohe, C., Majem, M., Wang, J., Kato, T., *et al.* 2023. Adjuvant Osimertinib for Resected EGFR-Mutated Stage IB-IIIa Non-Small-Cell Lung Cancer: Updated Results From the Phase III Randomized ADAURA Trial. *J Clin Oncol*, 41, 1830-40.
- Hsiue, E. H., Wright, K. M., Douglass, J., Hwang, M. S., Mog, B. J., Pearlman, A. H., Paul, S., *et al.* 2021. Targeting a neoantigen derived from a common TP53 mutation. *Science*, 371.
- Hu, J., Cao, J., Topatana, W., Juengpanich, S., Li, S., Zhang, B., Shen, J., *et al.* 2021. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 157.
- Huang, D. C. S. & Strasser, A. 2000. BH3-Only Proteins; Essential Initiators of Apoptotic Cell Death. *Cell*, 103, 839-42.
- Huang, L. & Fu, L. 2015. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5, 390-401.
- Huang, L., Jiang, S. & Shi, Y. 2020. Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001–2020). *Journal of Hematology & Oncology*, 13, 143.
- Jiang, Y., Lin, Y., Fu, W., He, Q., Liang, H., Zhong, R., Cheng, R., *et al.* 2023. The impact of adjuvant EGFR-TKIs and 14-gene molecular assay on stage I non-small cell lung cancer with sensitive EGFR mutations. *eClinicalMedicine*, 64.

- Kalluri, R. 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*, 119, 1417-9.
- Kaloni, D., Diepstraten, S. T., Strasser, A. & Kelly, G. L. 2023. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis*, 28, 20-38.
- Kang, Y. & Massagué, J. 2004. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118, 277-9.
- Kehr, S. & Vogler, M. 2021. It's time to die: BH3 mimetics in solid tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868, 118987.
- Kim, S., Im, J. H., Kim, W. K., Choi, Y. J., Lee, J. Y., Kim, S. K., Kim, S. J., *et al.* 2021. Enhanced Sensitivity of Nonsmall Cell Lung Cancer with Acquired Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors to Phenformin: The Roles of a Metabolic Shift to Oxidative Phosphorylation and Redox Balance. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 5428364.
- Kim, S. P., Vale, N. R., Zacharakis, N., Krishna, S., Yu, Z., Gasmi, B., Gartner, J. J., *et al.* 2022. Adoptive Cellular Therapy with Autologous Tumor-Infiltrating Lymphocytes and T-cell Receptor-Engineered T Cells Targeting Common p53 Neoantigens in Human Solid Tumors. *Cancer Immunol Res*, 10, 932-46.
- King, L. E., Rodriguez-Enriquez, R., Pedley, R., Mellor, C. E. L., Wang, P., Zindy, E., White, M. R. H., *et al.* 2022. Apoptotic priming is defined by the dynamic exchange of Bcl-2 proteins between mitochondria and cytosol. *Cell Death Differ*, 29, 2262-74.
- Ko, B., Paucar, D. & Halmos, B. 2017. EGFR T790M: revealing the secrets of a gatekeeper. *Lung Cancer (Auckl)*, 8, 147-59.
- Kobayashi, K. & Tan, A. C. 2023. Unraveling the Impact of Intratumoral Heterogeneity on EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in EGFR-Mutated NSCLC. *Int J Mol Sci*, 24.
- Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B. E., *et al.* 2005. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 352, 786-92.
- Konig, D., Savic Prince, S. & Rothschild, S. I. 2021. Targeted Therapy in Advanced and Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. An Update on Treatment of the Most Important Actionable Oncogenic Driver Alterations. *Cancers (Basel)*, 13.
- Kroemer, G. & Reed, J. C. 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, 6, 513-9.
- Ku, H. C. & Cheng, C. F. 2020. Master Regulator Activating Transcription Factor 3 (ATF3) in Metabolic Homeostasis and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 556.
- Kusumoto, S., Sugiyama, T., Ando, K., Hosaka, T., Ishida, H., Shirai, T., Yamaoka, T., *et al.* 2009. Combination effect between bortezomib and tumor necrosis factor alpha on gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res*, 29, 2315-22.

- La Montagna, M., Ginn, L. & Garofalo, M. 2021. Mechanisms of drug resistance mediated by long non-coding RNAs in non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Therapy*, 28, 175-87.
- Lai, G. G. Y., Lim, T. H., Lim, J., Liew, P. J. R., Kwang, X. L., Nahar, R., Aung, Z. W., *et al.* 2019. Clonal MET Amplification as a Determinant of Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 37, 876-84.
- Lane, D. P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.
- Lawasut, P., Chauhan, D., Laubach, J., Hayes, C., Fabre, C., Maglio, M., Mitsiades, C., *et al.* 2012. New proteasome inhibitors in myeloma. *Curr Hematol Malig Rep*, 7, 258-66.
- Leber, B., Lin, J. & Andrews, D. W. 2007. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis*, 12, 897-911.
- Lee, Y. J., Kim, J. H., Kim, S. K., Ha, S. J., Mok, T. S., Mitsudomi, T. & Cho, B. C. 2011. Lung cancer in never smokers: change of a mindset in the molecular era. *Lung Cancer*, 72, 9-15.
- Lei, N., Peng, B. & Zhang, J. Y. 2014. CIP2A regulates cell proliferation via the AKT signaling pathway in human lung cancer. *Oncol Rep*, 32, 1689-94.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF) 2024. *S3-Leitlinie Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Langversion 3.0* [Online]. Available: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/lungenkarzinom/> [Accessed].
- Leonetti, A., Sharma, S., Minari, R., Perego, P., Giovannetti, E. & Tiseo, M. 2019. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 121, 725-37.
- Levantini, E., Maroni, G., Del Re, M. & Tenen, D. G. 2022. EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers. *Semin Cancer Biol*, 85, 253-75.
- Li, Y., Dong, S., Tamaskar, A., Wang, H., Zhao, J., Ma, H. & Zhao, Y. 2020. Proteasome Inhibitors Diminish c-Met Expression and Induce Cell Death in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Oncol Res*, 28, 497-507.
- Lim, S. M., Schalm, S. S., Lee, E. J., Park, S., Conti, C., Millet, Y. A., Woessner, R., *et al.* 2024. BLU-945, a potent and selective next-generation EGFR TKI, has antitumor activity in models of osimertinib-resistant non-small-cell lung cancer. *Ther Adv Med Oncol*, 16, 17588359241280689.
- Lim, S. M., Syn, N. L., Cho, B. C. & Soo, R. A. 2018. Acquired resistance to EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: Mechanisms and therapeutic strategies. *Cancer Treat Rev*, 65, 1-10.
- Lim, S. O., Li, C. W., Xia, W., Lee, H. H., Chang, S. S., Shen, J., Hsu, J. L., *et al.* 2016. EGFR Signaling Enhances Aerobic Glycolysis in Triple-Negative Breast Cancer Cells to Promote Tumor Growth and Immune Escape. *Cancer Res*, 76, 1284-96.
- Lin, Y., Wang, X. & Jin, H. 2014. EGFR-TKI resistance in NSCLC patients: mechanisms and strategies. *Am J Cancer Res*, 4, 411-35.

- Liu, G., Pei, F., Yang, F., Li, L., Amin, A. D., Liu, S., Buchan, J. R., *et al.* 2017. Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*, 18.
- Liu, Q., Yu, S., Zhao, W., Qin, S., Chu, Q. & Wu, K. 2018. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways. *Mol Cancer*, 17, 53.
- Llambi, F., Wang, Y. M., Victor, B., Yang, M., Schneider, D. M., Gingras, S., Parsons, M. J., *et al.* 2016. BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation. *Cell*, 165, 421-33.
- Lomonosova, E. & Chinnadurai, G. 2008. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27 Suppl 1, S2-19.
- Longva, K. E., Blystad, F. D., Stang, E., Larsen, A. M., Johannessen, L. E. & Madshus, I. H. 2002. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol*, 156, 843-54.
- Ma, C., Wei, S. & Song, Y. 2011. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: a literature review of clinical reports. *J Thorac Dis*, 3, 10-8.
- MacRosty, C. R. & Rivera, M. P. 2020. Lung Cancer in Women: A Modern Epidemic. *Clinics in Chest Medicine*, 41, 53-65.
- Maemondo, M., Inoue, A., Kobayashi, K., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., Gemma, A., *et al.* 2010. Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *New England Journal of Medicine*, 362, 2380-8.
- Marcoux, N., Gettinger, S. N., O'Kane, G., Arbour, K. C., Neal, J. W., Husain, H., Evans, T. L., *et al.* 2019. EGFR-Mutant Adenocarcinomas That Transform to Small-Cell Lung Cancer and Other Neuroendocrine Carcinomas: Clinical Outcomes. *J Clin Oncol*, 37, 278-85.
- Mazieres, J., Kowalski, D., Luft, A., Vicente, D., Tafreshi, A., Gümüş, M., Laktionov, K., *et al.* 2020. Health-Related Quality of Life With Carboplatin-Paclitaxel or nab-Paclitaxel With or Without Pembrolizumab in Patients With Metastatic Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, 38, 271-80.
- McConkey, D. J. 2017. The integrated stress response and proteotoxicity in cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun*, 482, 450-3.
- Megyesfalvi, Z., Gay, C. M., Popper, H., Pirker, R., Ostoros, G., Heeke, S., Lang, C., *et al.* 2023. Clinical insights into small cell lung cancer: Tumor heterogeneity, diagnosis, therapy, and future directions. *CA Cancer J Clin*, 73, 620-52.
- Mellinghoff, I. K., Wang, M. Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D. A., Zhu, S., Dia, E. Q., Lu, K. V., *et al.* 2005. Molecular Determinants of the Response of Glioblastomas to EGFR Kinase Inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 353, 2012-24.
- Midha, A., Dearden, S. & McCormack, R. 2015. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res*, 5, 2892-911.

- Miller, V. A., Hirsh, V., Cadranel, J., Chen, Y.-M., Park, K., Kim, S.-W., Zhou, C., *et al.* 2012. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *The Lancet Oncology*, 13, 528-38.
- Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I., Tsurutani, J., Seto, T., *et al.* 2010. 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*, 11, 121-8.
- Mok, T. S., Wu, Y.-L., Ahn, M.-J., Garassino, M. C., Kim, H. R., Ramalingam, S. S., Shepherd, F. A., *et al.* 2016. Osimertinib or Platinum–Pemetrexed in EGFR T790M–Positive Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 376, 629-40.
- Mok, T. S., Wu, Y.-L., Thongprasert, S., Yang, C.-H., Chu, D.-T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., *et al.* 2009. Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 361, 947-57.
- Moldoveanu, T. & Czabotar, P. E. 2020. BAX, BAK, and BOK: A Coming of Age for the BCL-2 Family Effector Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 12.
- Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., Orłowski, R. Z., San Miguel, J. F., Palumbo, A. & Harousseau, J. L. 2012. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*, 120, 947-59.
- Morsi, R. Z., Hage-Sleiman, R., Kobeissy, H. & Dbaibo, G. 2018. Noxa: Role in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Curr Cancer Drug Targets*, 18, 914-28.
- Muenchow, A., Weller, S., Hinterleitner, C., Malenke, E., Bugl, S., Wirths, S., Muller, M. R., *et al.* 2020. The BCL-2 selective inhibitor ABT-199 sensitizes soft tissue sarcomas to proteasome inhibition by a concerted mechanism requiring BAX and NOXA. *Cell Death Dis*, 11, 701.
- Nan, X., Xie, C., Yu, X. & Liu, J. 2017. EGFR TKI as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 8, 75712-26.
- Navas, T., Kinders, R. J., Lawrence, S. M., Ferry-Galow, K. V., Borgel, S., Hollingshead, M. G., Srivastava, A. K., *et al.* 2020. Clinical Evolution of Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Carcinomas. *Cancer Res*, 80, 304-18.
- Neal, J. W. 2010. The SATURN trial: the value of maintenance erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer. *Future Oncol*, 6, 1827-32.
- Niederst, M. J., Hu, H., Mulvey, H. E., Lockerman, E. L., Garcia, A. R., Piotrowska, Z., Sequist, L. V., *et al.* 2015a. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. *Clin Cancer Res*, 21, 3924-33.
- Niederst, M. J., Sequist, L. V., Poirier, J. T., Mermel, C. H., Lockerman, E. L., Garcia, A. R., Katayama, R., *et al.* 2015b. RB loss in resistant EGFR

- mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nat Commun*, 6, 6377.
- North, C. M. & Christiani, D. C. 2013. Women and lung cancer: what is new? *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 25, 87-94.
- Offin, M., Chan, J. M., Tenet, M., Rizvi, H. A., Shen, R., Riely, G. J., Rekhman, N., *et al.* 2019a. Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes. *J Thorac Oncol*, 14, 1784-93.
- Offin, M., Chan, J. M., Tenet, M., Rizvi, H. A., Shen, R., Riely, G. J., Rekhman, N., *et al.* 2019b. Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes. *Journal of Thoracic Oncology*, 14, 1784-93.
- Ohe, Y., Imamura, F., Nogami, N., Okamoto, I., Kurata, T., Kato, T., Sugawara, S., *et al.* 2019. Osimertinib versus standard-of-care EGFR-TKI as first-line treatment for EGFRm advanced NSCLC: FLAURA Japanese subset. *Jpn J Clin Oncol*, 49, 29-36.
- Okazaki, I., Ishikawa, S., Ando, W. & Sohara, Y. 2016. Lung Adenocarcinoma in Never Smokers: Problems of Primary Prevention from Aspects of Susceptible Genes and Carcinogens. *Anticancer Res*, 36, 6207-24.
- Organ, S. L. & Tsao, M. S. 2011. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*, 3, S7-s19.
- Orth, F., Schäfer, B., Harsch, A., Beigl, T., Barber, L., Kopp, H.-G. & Essmann, F. 2023. Abstract 2532: Disrupting resistance to EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors in TP53-mutated lung carcinoma cell lines by proteasome inhibition. *Cancer Research*, 83, 2532-.
- Ortiz-Cuaran, S., Scheffler, M., Plenker, D., Dahmen, L., Scheel, A. H., Fernandez-Cuesta, L., Meder, L., *et al.* 2016. Heterogeneous Mechanisms of Primary and Acquired Resistance to Third-Generation EGFR Inhibitors. *Clin Cancer Res*, 22, 4837-47.
- Oxnard, G. R., Binder, A. & Jänne, P. A. 2013. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 31, 1097-104.
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A. & Gorman, A. M. 2016. The integrated stress response. *EMBO Rep*, 17, 1374-95.
- Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G., *et al.* 2005. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2, e73.
- Papini, F., Sundaresan, J., Leonetti, A., Tiseo, M., Rolfo, C., Peters, G. J. & Giovannetti, E. 2021. Hype or hope – Can combination therapies with third-generation EGFR-TKIs help overcome acquired resistance and improve outcomes in EGFR-mutant advanced/metastatic NSCLC? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 166, 103454.
- Park, K., Tan, E. H., O'Byrne, K., Zhang, L., Boyer, M., Mok, T., Hirsh, V., *et al.* 2016. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 17, 577-89.

- Park, S., Shim, J. H., Lee, B., Cho, I., Park, W. Y., Kim, Y., Lee, S. H., *et al.* 2019. Paired genomic analysis of squamous cell carcinoma transformed from EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 134, 7-15.
- Passaro, A., Jänne, P. A., Mok, T. & Peters, S. 2021. Overcoming therapy resistance in EGFR-mutant lung cancer. *Nature Cancer*, 2, 377-91.
- Pedley, R. & Gilmore, A. P. 2016. Mitosis and mitochondrial priming for apoptosis. *Biological Chemistry*, 397, 595-605.
- Peña-Blanco, A. & García-Sáez, A. J. 2018. Bax, Bak and beyond — mitochondrial performance in apoptosis. *The FEBS Journal*, 285, 416-31.
- Piper-Vallillo, A. J., Sequist, L. V. & Piotrowska, Z. 2020. Emerging Treatment Paradigms for EGFR-Mutant Lung Cancers Progressing on Osimertinib: A Review. *Journal of Clinical Oncology*, 38, 2926-36.
- Piperdi, B., Ling, Y. H. & Perez-Soler, R. 2007. Schedule-dependent interaction between the proteasome inhibitor bortezomib and the EGFR-TK inhibitor erlotinib in human non-small cell lung cancer cell lines. *J Thorac Oncol*, 2, 715-21.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. & D'Orazi, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8, 603-19.
- Powell, S. F., Rodríguez-Abreu, D., Langer, C. J., Tafreshi, A., Paz-Ares, L., Kopp, H.-G., Rodríguez-Cid, J., *et al.* 2021. Outcomes With Pembrolizumab Plus Platinum-Based Chemotherapy for Patients With NSCLC and Stable Brain Metastases: Pooled Analysis of KEYNOTE-021, -189, and -407. *Journal of Thoracic Oncology*, 16, 1883-92.
- Qin, J. Z., Stennett, L., Bacon, P., Bodner, B., Hendrix, M. J., Seftor, R. E., Seftor, E. A., *et al.* 2004. p53-independent NOXA induction overcomes apoptotic resistance of malignant melanomas. *Mol Cancer Ther*, 3, 895-902.
- Ramalho, M. J., Andrade, S., Loureiro, J. A. & Pereira, M. C. 2022. Interaction of Bortezomib with Cell Membranes Regulates Its Toxicity and Resistance to Therapy. *Membranes (Basel)*, 12.
- Ramalingam, S. S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B. C., Gray, J. E., Ohe, Y., Zhou, C., *et al.* 2020. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med*, 382, 41-50.
- Ramirez, M., Rajaram, S., Steininger, R. J., Osipchuk, D., Roth, M. A., Morinishi, L. S., Evans, L., *et al.* 2016. Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells. *Nat Commun*, 7, 10690.
- Revathidevi, S. & Munirajan, A. K. 2019. Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol*, 59, 80-91.
- Riess, J. W., Gandara, D. R., Frampton, G. M., Madison, R., Peled, N., Bufill, J. A., Dy, G. K., *et al.* 2018. Diverse EGFR Exon 20 Insertions and Co-Occurring Molecular Alterations Identified by Comprehensive Genomic Profiling of NSCLC. *J Thorac Oncol*, 13, 1560-8.
- Robichaux, J. P., Le, X., Vijayan, R. S. K., Hicks, J. K., Heeke, S., Elamin, Y. Y., Lin, H. Y., *et al.* 2021. Structure-based classification predicts drug response in EGFR-mutant NSCLC. *Nature*, 597, 732-7.

- Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E. & Wistuba, II 2016. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res*, 170, 25-46.
- Rotow, J. & Bivona, T. G. 2017. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nat Rev Cancer*, 17, 637-58.
- Rotow, J. K., Lee, J. K., Madison, R. W., Oxnard, G. R., Jänne, P. A. & Schrock, A. B. 2023. Real-world genomic profile of EGFR second-site mutations and other osimertinib resistance mechanisms, and clinical landscape of non-small cell lung cancer (NSCLC) post-osimertinib. *J Thorac Oncol*.
- Russo, A., Franchina, T., Ricciardi, G., Battaglia, A., Picciotto, M. & Adamo, V. 2019. Heterogeneous Responses to Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Patients with Uncommon EGFR Mutations: New Insights and Future Perspectives in this Complex Clinical Scenario. *Int J Mol Sci*, 20.
- Saafan, H., Alahdab, A., Michelet, R., Gohlke, L., Ziemann, J., Holdenrieder, S., McLaughlin, K.-M., *et al.* 2021. Constitutive Cell Proliferation Regulating Inhibitor of Protein Phosphatase 2A (CIP2A) Mediates Drug Resistance to Erlotinib in an EGFR Activating Mutated NSCLC Cell Line. *Cells*, 10, 716.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23, 2861-74.
- Saito, H., Fukuhara, T., Furuya, N., Watanabe, K., Sugawara, S., Iwasawa, S., Tsunozuka, Y., *et al.* 2019. Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 20, 625-35.
- Saleh, M. M., Scheffler, M., Merkelbach-Bruse, S., Scheel, A. H., Ulmer, B., Wolf, J. & Buettner, R. 2022. Comprehensive Analysis of TP53 and KEAP1 Mutations and Their Impact on Survival in Localized- and Advanced-Stage NSCLC. *J Thorac Oncol*, 17, 76-88.
- Sankar, K., Gadgeel, S. M. & Qin, A. 2020. Molecular therapeutic targets in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 20, 647-61.
- Schalm, S. S., Dineen, T., Lim, S. M., Park, C. W., Hsieh, J., Woessner, R., Zhang, Z., *et al.* 2020. 384P BLU-945, a highly potent and selective 4th generation EGFR TKI for the treatment of EGFR T790M/C797S resistant NSCLC. *Annals of Oncology*, 31, S1391.
- Schenkein, D. P. 2004. Use of proteasome inhibition in the treatment of lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 6 Suppl 2, S89-96.
- Scott, K., Hayden, P. J., Will, A., Wheatley, K. & Coyne, I. 2016. Bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, Cd010816.
- Sequist, L. V., Waltman, B. A., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A. B., Fidias, P., Bergethon, K., *et al.* 2011. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med*, 3, 75ra26.
- Sequist, L. V., Yang, J. C., Yamamoto, N., O'Byrne, K., Hirsh, V., Mok, T., Geater, S. L., *et al.* 2013. Phase III study of afatinib or cisplatin plus

- pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol*, 31, 3327-34.
- Shamas-Din, A., Brahmabhatt, H., Leber, B. & Andrews, D. W. 2011. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813, 508-20.
- Sharma, K., Vu, T. T., Cook, W., Naseri, M., Zhan, K., Nakajima, W. & Harada, H. 2018. p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Oncol*, 12, 788-98.
- Shaurova, T., Zhang, L., Goodrich, D. W. & Hershberger, P. A. 2020. Understanding Lineage Plasticity as a Path to Targeted Therapy Failure in EGFR-Mutant Non-small Cell Lung Cancer. *Front Genet*, 11, 281.
- Shepherd, F. A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E. H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., *et al.* 2005. Erlotinib in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 353, 123-32.
- Shi, Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*, 9, 459-70.
- Socinski, M. A., Villaruz, L. C. & Ross, J. 2017. Understanding Mechanisms of Resistance in the Epithelial Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer and the Role of Biopsy at Progression. *Oncologist*, 22, 3-11.
- Sohn, D., Totzke, G., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Levkau, B. & Jänicke, R. U. 2006. The proteasome is required for rapid initiation of death receptor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, 26, 1967-78.
- Song, X., Lu, F., Liu, R. Y., Lei, Z., Zhao, J., Zhou, Q. & Zhang, H. T. 2012. Association between the ATF3 gene and non-small cell lung cancer. *Thorac Cancer*, 3, 217-23.
- Sooman, L., Gullbo, J., Bergqvist, M., Bergström, S., Lennartsson, J. & Ekman, S. 2017. Synergistic effects of combining proteasome inhibitors with chemotherapeutic drugs in lung cancer cells. *BMC Res Notes*, 10, 544.
- Sora, V. & Papaleo, E. 2022. Structural Details of BH3 Motifs and BH3-Mediated Interactions: an Updated Perspective. *Front Mol Biosci*, 9, 864874.
- Soria, J. C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., Dechaphunkul, A., *et al.* 2018. Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*, 378, 113-25.
- Sos, M. L., Koker, M., Weir, B. A., Heynck, S., Rabinovsky, R., Zander, T., Seeger, J. M., *et al.* 2009. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res*, 69, 3256-61.
- Soussi, T. & Wiman, K. G. 2015. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death & Differentiation*, 22, 1239-49.
- Stehle, D., Grimm, M., Einsele-Scholz, S., Ladwig, F., Johanning, J., Fischer, G., Gillissen, B., *et al.* 2018. Contribution of BH3-domain and Transmembrane-domain to the Activity and Interaction of the Pore-forming Bcl-2 Proteins Bok, Bak, and Bax. *Sci Rep*, 8, 12434.

- Su, K. Y., Chen, H. Y., Li, K. C., Kuo, M. L., Yang, J. C., Chan, W. K., Ho, B. C., *et al.* 2012. Pretreatment epidermal growth factor receptor (EGFR) T790M mutation predicts shorter EGFR tyrosine kinase inhibitor response duration in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 30, 433-40.
- Suda, K., Mizuuchi, H., Maehara, Y. & Mitsudomi, T. 2012. Acquired resistance mechanisms to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation--diversity, ductility, and destiny. *Cancer Metastasis Rev*, 31, 807-14.
- Suda, K., Tomizawa, K., Fujii, M., Murakami, H., Osada, H., Maehara, Y., Yatabe, Y., *et al.* 2011. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *J Thorac Oncol*, 6, 1152-61.
- Sun, D., Feng, F., Teng, F., Xie, T., Wang, J., Xing, P., Qian, H., *et al.* 2023. Multiomics analysis revealed the mechanisms related to the enhancement of proliferation, metastasis and EGFR-TKI resistance in EGFR-mutant LUAD with ARID1A deficiency. *Cell Communication and Signaling*, 21, 48.
- Sun, R., Hou, Z., Zhang, Y. & Jiang, B. 2022. Drug resistance mechanisms and progress in the treatment of EGFR-mutated lung adenocarcinoma. *Oncol Lett*, 24, 408.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-49.
- Szaruga, M., Janssen, D. A., de Miguel, C., Hodgson, G., Fatafska, A., Pitera, A. P., Andreeva, A., *et al.* 2023. Activation of the integrated stress response by inhibitors of its kinases. *Nature Communications*, 14, 5535.
- Takahashi, M., Okamoto, Y., Kato, Y., Shirahama, H., Tsukahara, S., Sugimoto, Y. & Tomida, A. 2023. Activating mutations in EGFR and PI3K promote ATF4 induction for NSCLC cell survival during amino acid deprivation. *Heliyon*, 9, e14799.
- Tan, C. R. C., Abdul-Majeed, S., Cael, B. & Barta, S. K. 2019. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bortezomib. *Clinical Pharmacokinetics*, 58, 157-68.
- Tanaka, K., Nosaki, K., Otsubo, K., Azuma, K., Sakata, S., Ouchi, H., Morinaga, R., *et al.* 2017. Acquisition of the T790M resistance mutation during afatinib treatment in EGFR tyrosine kinase inhibitor-naïve patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Oncotarget*, 8, 68123-30.
- Tang, A., Ahmad, U., Toth, A. J., Bourdakos, N., Raja, S., Raymond, D. P., Blackstone, E. H., *et al.* 2021. Non-small cell lung cancer in never- and ever-smokers: Is it the same disease? *J Thorac Cardiovasc Surg*, 161, 1903-17.e9.
- Tanimoto, A., Matsumoto, S., Takeuchi, S., Arai, S., Fukuda, K., Nishiyama, A., Yoh, K., *et al.* 2021. Proteasome Inhibition Overcomes ALK-TKI Resistance in ALK-Rearranged/TP53-Mutant NSCLC via Noxa Expression. *Clin Cancer Res*, 27, 1410-20.

- Tantawy, S. I., Timofeeva, N., Sarkar, A. & Gandhi, V. 2023. Targeting MCL-1 protein to treat cancer: opportunities and challenges. *Front Oncol*, 13, 1226289.
- Thompson, E. W. & Newgreen, D. F. 2005. Carcinoma Invasion and Metastasis: A Role for Epithelial-Mesenchymal Transition? *Cancer Research*, 65, 5991-5.
- Thomson, R. J., Moshirfar, M. & Ronquillo, Y. 2022. Tyrosine Kinase Inhibitors. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Touzeau, C., Maciag, P., Amiot, M. & Moreau, P. 2018. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*, 32, 1899-907.
- Truini, A., Starrett, J. H., Stewart, T., Ashtekar, K., Walther, Z., Wurtz, A., Lu, D., *et al.* 2019. The EGFR Exon 19 Mutant L747-A750>P Exhibits Distinct Sensitivity to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 25, 6382-91.
- Tulchinsky, E., Demidov, O., Kriajevska, M., Barlev, N. A. & Imyanitov, E. 2019. EMT: A mechanism for escape from EGFR-targeted therapy in lung cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1871, 29-39.
- Tumbrink, H. L., Heimsoeth, A. & Sos, M. L. 2021. The next tier of EGFR resistance mutations in lung cancer. *Oncogene*, 40, 1-11.
- Umelo, I. A., De Wever, O., Kronenberger, P., Van Deun, J., Noor, A., Singh, K., Teugels, E., *et al.* 2015. Combined targeting of EGFR/HER promotes anti-tumor efficacy in subsets of KRAS mutant lung cancer resistant to single EGFR blockade. *Oncotarget*, 6, 20132-44.
- Van Opdenbosch, N. & Lamkanfi, M. 2019. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50, 1352-64.
- Vaseva, A. V., Marchenko, N. D., Ji, K., Tsirka, S. E., Holzmann, S. & Moll, U. M. 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149, 1536-48.
- Vousden, K. H. & Lane, D. P. 2007. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 275-83.
- Wang, C. Y., Lee, M. H., Kao, Y. R., Hsiao, S. H., Hong, S. Y. & Wu, C. W. 2021. Alisertib inhibits migration and invasion of EGFR-TKI resistant cells by partially reversing the epithelial-mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1868, 119016.
- Wang, L., Yin, H., Huang, S., Huang, S., Huang, C., Zhang, Z. & Liu, H. 2022. Bortezomib induces cellular senescence in A549 lung cancer cells by stimulating telomere shortening. *Hum Exp Toxicol*, 41, 9603271221124094.
- Wang, Z., Yang, J.-J., Huang, J., Ye, J.-Y., Zhang, X.-C., Tu, H.-Y., Han-Zhang, H., *et al.* 2017. Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR T790M and In Trans C797S Responds to Combination Therapy of First- and Third-Generation EGFR TKIs and Shifts Allelic Configuration at Resistance *Journal of Thoracic Oncology*, 12, 1723-7.
- Weller, S., Toenneßen, A., Schaefer, B., Beigl, T., Muenchow, A., Böpple, K., Hofmann, U., *et al.* 2022. The BCL-2 inhibitor ABT-199/venetoclax synergizes with proteasome inhibition via transactivation of the MCL-1 antagonist NOXA. *Cell Death Discov*, 8, 215.

- Weng, C. H., Chen, L. Y., Lin, Y. C., Shih, J. Y., Lin, Y. C., Tseng, R. Y., Chiu, A. C., *et al.* 2019. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene*, 38, 455-68.
- Westover, D., Zugazagoitia, J., Cho, B. C., Lovly, C. M. & Paz-Ares, L. 2018. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Ann Oncol*, 29, i10-i9.
- Wu, Y.-L., Tsuboi, M., He, J., John, T., Grohe, C., Majem, M., Goldman, J. W., *et al.* 2020. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 383, 1711-23.
- Xu, M. J., Johnson, D. E. & Grandis, J. R. 2017. EGFR-targeted therapies in the post-genomic era. *Cancer Metastasis Rev*, 36, 463-73.
- Xu, X., Lai, Y. & Hua, Z. C. 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*, 39.
- Xun, G., Hu, W. & Li, B. 2021. PTEN loss promotes oncogenic function of STMN1 via PI3K/AKT pathway in lung cancer. *Sci Rep*, 11, 14318.
- Yan, J., Zhong, N., Liu, G., Chen, K., Liu, X., Su, L. & Singhal, S. 2014. Usp9x- and Noxa-mediated Mcl-1 downregulation contributes to pemetrexed-induced apoptosis in human non-small-cell lung cancer cells. *Cell Death & Disease*, 5, e1316-e.
- Yan, L., Gaddis, S., Coletta, L. D., Repass, J., Powell, K. L., Simper, M. S., Chen, Y., *et al.* 2021. ATF3-Induced Mammary Tumors Exhibit Molecular Features of Human Basal-Like Breast Cancer. *Int J Mol Sci*, 22.
- Yang, J. C., Sequist, L. V., Geater, S. L., Tsai, C. M., Mok, T. S., Schuler, M., Yamamoto, N., *et al.* 2015. Clinical activity of afatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring uncommon EGFR mutations: a combined post-hoc analysis of LUX-Lung 2, LUX-Lung 3, and LUX-Lung 6. *Lancet Oncol*, 16, 830-8.
- Yap, T. A., Vidal, L., Adam, J., Stephens, P., Spicer, J., Shaw, H., Ang, J., *et al.* 2010. Phase I Trial of the Irreversible EGFR and HER2 Kinase Inhibitor BIBW 2992 in Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 28, 3965-72.
- Yeh, C. T., Chen, T. T., Satriyo, P. B., Wang, C. H., Wu, A. T. H., Chao, T. Y., Lee, K. Y., *et al.* 2021. Bruton's tyrosine kinase (BTK) mediates resistance to EGFR inhibition in non-small-cell lung carcinoma. *Oncogenesis*, 10, 56.
- Yu, H. A., Arcila, M. E., Rekhtman, N., Sima, C. S., Zakowski, M. F., Pao, W., Kris, M. G., *et al.* 2013. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res*, 19, 2240-7.
- Yu, H. A. & Pao, W. 2013. Afatinib—new therapy option for EGFR-mutant lung cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 551-2.
- Zhang, T., Qu, R., Chan, S., Lai, M., Tong, L., Feng, F., Chen, H., *et al.* 2020. Discovery of a novel third-generation EGFR inhibitor and identification of a potential combination strategy to overcome resistance. *Mol Cancer*, 19, 90.

- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. & Rishi, A. K. 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813, 1978-86.
- Zhao, Z., Xie, L. & Bourne, P. E. 2019. Structural Insights into Characterizing Binding Sites in Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Mutants. *J Chem Inf Model*, 59, 453-62.
- Zhong, S. & Borlak, J. 2023. Sex disparities in non-small cell lung cancer: mechanistic insights from a cRaf transgenic disease model. *eBioMedicine*, 95.
- Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Feng, J., Liu, X. Q., Wang, C., Zhang, S., *et al.* 2011. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 12, 735-42.

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) und Robert Bosch Centrum für Tumorerkrankungen (RBCT) des Bosch Health Campus unter Betreuung von Professor Dr. med. Hans-Georg Kopp durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Professor Hans-Georg Kopp in Zusammenarbeit mit PD Dr. rer. nat. Frank Essmann, dem Gruppenleiter der Arbeitsgruppe.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder PD Dr. rer. nat. Frank Essmann, Benjamin Schäfer, Dr. rer. nat. Tobias Beigl und Dr. rer. nat. Sandra Weller von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

9 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits als Abstract veröffentlicht:

Orth, F., Schäfer, B., Harsch, A., Beigl, T., Barber, L., Kopp, H.-G. & Essmann, F. 2023. Abstract 2532: Disrupting resistance to EGFR-specific tyrosine kinase inhibitors in TP53-mutated lung carcinoma cell lines by proteasome inhibition. *Cancer Research*, 83, 2532.

10 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Hans-Georg Kopp danke ich sehr für die Überlassung des interessanten Themas sowie die stete Unterstützung und die konstruktiven Anregungen. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Kopp für die Unterstützung, die Arbeit an Kongressen vorstellen zu dürfen.

Herrn PD Dr. rer. nat. Frank Essmann danke ich sehr für seine intensive Betreuung, seine hilfreichen Ratschläge und seine jederzeitige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung.

Ich danke Herrn Professor Dr. rer. nat. Klaus Schulze-Osthoff für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Ein großes Dankeschön geht auch an Benjamin Schäfer, Dr. rer. nat. Sandra Weller, Dr. rer. nat. Tobias Beigl, Annika Harsch, Lynn Barber und Herrn Professor Dr. rer. nat. Steven Johnsen vom Robert Bosch Centrum für Tumorerkrankungen (RBCT) für ihre Hilfestellungen und tolle Zusammenarbeit im Labor. Bedanken möchte ich mich auch bei Julia Thiel, Kerstin Willecke, Dr. rer. nat. Kathrin Böppler, Dr. rer. nat. Meng Dong und Dr. rer. nat. Joana Efua Aggrey-Fynn für das sehr angenehme Miteinander.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitenden des Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie (IKP) und dem RBCT für das sehr kollegiale Miteinander.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. med. Matthias Schwab für die Möglichkeit, im IKP meine Dissertation anzufertigen.

Ich danke Frau Professor Dr. rer. nat. Monilola Olayioye für die freundliche Überlassung der NSCLC-Zelllinien.

Der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM) danke ich für die Förderung durch das Peter-Scriba-Promotionsstipendium.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung, die Geduld und die motivierenden Worte während der Erstellung dieser Arbeit bedanken.