

## Summary

*KRAS* is one of the most frequently mutant oncogenes in human cancer. Despite multiple and intensive research approaches in the past years, no targeted systemic therapy has become clinically available for *KRAS*-mutant tumors, yet. In this thesis, we report a novel dual combination therapy of targeted Chk1- and MK2 inhibitors, which specifically targets *KRAS*-mutant tumors. For this purpose, we first performed a high-throughput screen that profiled synergistic interactions of Chk1- and MK2 inhibitors across 96 distinct cell lines.

Although the biological activity of several single agent inhibitors has been profiled in several previous publications, combination therapies of targeted inhibitors have not been systematically investigated, thus far. In order to distill combination effects from high-throughput screens, we developed a new software, which quantifies synergistic interactions between specific inhibitors and automatically associates them with genomic mutations / alterations. Using this software, we were able to show that cell cycle checkpoint-abrogating Chk1- and MK2 inhibitors display strong synergistic interactions, particularly in *KRAS*- and *BRAF*-driven tumor cells.

Mechanistically we could show that *KRAS*-mutant cancer cells display an elevated level of genotoxic stress, so that their basal activity of Chk1 and MK2 kinases is permanently increased. Therefore, dual inhibition of Chk1 and MK2 kinase activity in *KRAS*-mutant tumor cells leads to the induction of mitotic catastrophe, as *KRAS*-mutant tumor cells enter into mitosis under dual inhibition, without having cleared their genotoxic lesions before.

We validated the synergistic effect between Chk1- and MK2-inhibitors in multiple murine cancer models. Using almost 200 xenograft-transplanted tumors, we were able to show that the synergistic interaction between Chk1- and MK2 inhibitors is preserved *in vivo*. Further, we used multiple autochthonous tumor models – including a *Kras*-driven lung cancer model, a *Kras*-driven sarcoma model, as well as a *Braf*-driven colon cancer model – to demonstrate that both compounds display synergistic effects *in vivo*.

Last but not least, we isolated tumor cells from malignant pleural effusions of lung cancer patients, as well as from surgery specimens of *KRAS*-mutant pancreas cancer patients. We observed that the dual Chk1/MK2 inhibitor combination analogously induces a substantial level of apoptosis in tumor cells, directly isolated from patients.

As we found that synergy effects can be reliably predicted based on mutations, we next investigated, whether further tumor characteristics, e.g. tumor histology, could be similarly predicted based on mutation spectra. For this purpose, we systematically investigated the mutation status in 1651 genes of 905 cell lines, derived from 23 different cancer entities, using publically available datasets. We investigated which of these mutations can be associated with a particular histotype and were able to validate several previously described associations between genotypes and tumor histology.

Vice versa, we developed the ICOMS (inferring cancer origins from mutation spectra) algorithm, which predicts tumor histotypes based on their mutation spectra. We tested this algorithm on sequencing data of 905 cell lines and 431 primary tumors. This analysis revealed that the predictive power of ICOMS strongly varies between different cancer entities, as the spectrum of tumor-specific mutations strongly differs between different entities.

## Zusammenfassung

*KRAS* ist eines der am häufigsten mutierten Onkogene in humanen Tumoren. Trotz multipler und intensiver Forschungsansätze in den vergangenen Jahren, ist bislang keine zielgerichtete systemische Therapie für *KRAS*-mutierte Tumoren klinisch verfügbar. In dieser Arbeit beschreiben wir eine neue duale Kombinationstherapie von spezifischen Chk1- und MK2 Inhibitoren, welche spezifisch auf *KRAS*-mutierte Tumoren wirkt. Hierzu profilierten wir zunächst im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screens die synergistische Interaktion von Chk1- und MK2 Inhibitoren auf 96 verschiedenen Zelllinien.

In vorherigen Arbeiten wurde zwar die biologische Aktivität vieler Einzelinhibitoren in Hochdurchsatz-Screens profiliert, allerdings wurden bislang Kombinationstherapien zielgerichteter Inhibitoren nicht systematisch untersucht. Um Kombinationseffekte im Hochdurchsatzformat testen zu können, entwickelten wir eine neue Software, welche synergistische Interaktionen zwischen spezifischen Inhibitoren quantifiziert und automatisch zu genomischen Mutationen / Alterationen assoziiert. Hierdurch konnten wir zeigen, dass starke synergistische Interaktionen zwischen Zellzyklus Checkpoint blockierenden Chk1- und MK2 Inhibitoren bestehen, v.a. in *KRAS*- und *BRAF*-getriebenen Tumorzellen.

Mechanistisch konnten wir zeigen, dass *KRAS*-mutierte Krebszellen ein erhöhtes basales Level an genotoxischem Stress aufweisen, so dass die Aktivität der Chk1 und MK2 Kinasen basal in diesen Zellen dauerhaft erhöht ist. Die duale Inhibition der Chk1 und MK2 Kinaseaktivität in *KRAS*-mutierten Zellen führt daher zu einer mitotischen Katastrophe, da *KRAS*-mutierte Tumorzellen unter dualer Inhibition in die Mitose eintreten, ohne zuvor ihre DNA Schäden repariert zu haben.

Den synergistischen Effekt zwischen Chk1- und MK2- Inhibitoren validierten wir anhand von mehreren Tiermodellen. Anhand von fast 200 Xenograft transplantierten Tumoren wiesen wir nach, dass die synergistische Interaktion zwischen Chk1- und MK2 Inhibitoren *in vivo* erhalten bleibt. Zudem zeigten wir anhand von mehreren autochthonen Tumormodellen - u.a. einem *Kras*-getriebenen Lungenkarzinommodell, einem *Kras*-getriebenen Sarkommodell

sowie einem Braf-getriebenen Kolonkarzinommodell - dass beide Compounds synergistisch miteinander *in vivo* interagieren.

Nicht zuletzt isolierten wir Tumorzellen aus malignen Pleuraergüssen von Lungenkarzinompatienten sowie aus OP-Material von *KRAS*-mutierten Pankreaskarzinompatienten. Hier beobachteten wir, dass die duale Chk1/MK2 Inhibitorkombination analog ein deutliches Apoptoselevel in Tumorzellen induziert, die direkt aus Patienten isoliert wurden.

Da wir gefunden haben, dass sich Synergien gut anhand von Mutationen vorhersagen lassen, haben wir in einem nächsten Schritt untersucht, ob sich weitere Merkmale, z.B. die Histologie von Tumoren, ähnlich erfolgreich anhand des Mutationsspektrums vorhersagen lassen. Hierzu untersuchten wir in öffentlich zugänglichen Datensätzen den Mutationsstatus von 1651 Genen in 905 Zelllinien, die aus 23 verschiedenen Krebsentitäten stammen. Wir analysierten, welche dieser Mutationen sich zu einem gewissen Histotypen zuordnen lassen und konnten zahlreiche vorbeschriebene Assoziationen zwischen Genotypen und Tumorphistologie validieren.

Umgekehrt entwickelten wir den ICOMS (inferring cancer origins from mutation spectra) Algorithmus, der anhand von Mutationsspektren den zugehörigen Histotypen vorhersagt. Wir testeten diesen Algorithmus auf Sequenzierungsdaten von 905 Zelllinien sowie 431 primären Tumoren. Dies zeigte, dass die Vorhersagekraft von ICOMS stark zwischen verschiedenen Krebsentitäten variiert, da sich das Spektrum an tumorspezifischen Mutationen zwischen verschiedenen Entitäten stark unterscheidet.