

Der Effekt von Lipopolysaccharid auf die Strahlensensibilität in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Zelllinien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften des
Fachbereichs Biologie und Chemie (FB 08)
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Mira Yasemin Gökyildirim

Gießen, Oktober 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik V des Universitätsklinikums der Justus-Liebig-Universität in Gießen in der Zeit von November 2013 bis Oktober 2019 unter Leitung von Prof. Dr. med. Ulrich Grandel angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek
Physikalisch-Chemisches Institut
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 38, 35392 Gießen

Erstgutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann
Institut für Genetik
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Grandel
Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik IV/V
Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinikstrasse 33

und
Klinik für Innere Medizin
Asklepios Klinik Lich GmbH
Goethestraße 4, 35423 Lich

Datum der Dissertation: 11.02.2020

“The universe doesn't allow perfection”

Stephen William Hawking
(1942-2018)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das Lungenkarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie, Pathogenese, Klinik und Prognose	1
1.1.2. Therapie	3
1.2. Bestrahlung.....	4
1.2.1. Fraktionierung	5
1.2.2. DNA-Schäden	5
1.2.3. DNA-Reparatur	6
1.3. Klonogener Zelltod.....	6
1.4. Das Lungenkarzinom und pulmonale Infektionen.....	8
1.5. Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Material.....	14
2.1.1. Chemikalien.....	14
2.1.2. Gebrauchswaren	15
2.1.3. Antikörper	16
2.1.4. Vorgefertigte Systeme und Lösungen.....	17
2.1.5. Geräte	17
2.1.6. Humane Zelllinien.....	19
2.1.7. Zellkultur.....	19
2.1.8. Lösungen Zellkultur	20
2.1.9. Inhibitoren.....	20
2.1.10. ELISA Substanzen und Lösungen	20
2.1.11. Primer.....	21
2.1.12. Western Blot.....	21
2.1.13. Verwendete Software	22
2.1.14. Sterilisation von Lösungen und Gebrauchswaren	23
2.2. Methoden.....	24
2.2.1. Zellkultur.....	24
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	28
2.2.3. Berechnungen und statistische Analysen	36
3. Ergebnisse.....	38

3.1. Screening und Auswahl der verwendeten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien	38
3.1.1. Die verwendeten LPS-Konzentrationen bewirkten keine Toxizität an H1975 Zellen	39
3.2. Eine LPS-Behandlung zeigte keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion der untersuchten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien	40
3.3. LPS induzierte eine Veränderung der Strahlenansprache in H1975 und A549, aber nicht in H520 Zellen	43
3.3.1. Auswahl der geeigneten Proben für ein Phospho-Kinase Antibody Array	46
3.4. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte mit einer Hochregulation der Phosphorylierung des cAMP response element-binding protein und einigen Mitgliedern der Src family kinases	48
3.4.1. Veränderung der Phosphorylierung von für die Strahlentherapie relevanten Proteinen nach LPS-Behandlung und Bestrahlung.....	48
3.4.2. Hochregulation der Src- und cAMP response element-binding protein -abhängigen Signalwege nach der kombinierten Behandlung von LPS und Bestrahlung.....	52
3.5. Die Inhibition des CREB-binding protein bewirkte eine Veränderung der Strahlensensibilität nach der LPS-Behandlung	55
3.6. Die CREB-binding protein Inhibition korrelierte in H1975 Zellen mit keiner Änderung in der Freisetzung von Interleukin-6.....	58
3.7. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte in H1975 Zellen mit einer Reduktion von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen, während die CREB-binding protein Inhibition zu einem Anstieg der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche im Vergleich zur Kontrolle führte	60
4. Diskussion	63
4.1. Screening und Auswahl der verwendeten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien	63
4.2. Eine LPS-Behandlung zeigte keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion der untersuchten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien	65
4.3. LPS induzierte eine Veränderung der Strahlenansprache in H1975 und A549, aber nicht in H520 Zellen	66
4.4. Identifikation von Proteinen, deren Phosphorylierungslevel nach LPS-Behandlung und Bestrahlung hochreguliert sind.....	68
4.4.1. Veränderung der Phosphorylierung von für die Strahlentherapie relevanten Proteinen nach LPS-Behandlung und Bestrahlung.....	69
4.4.2. Hochregulation des Src- und cAMP response element-binding protein-abhängigen Signalweges nach der kombinierten Behandlung von LPS und Bestrahlung	71
4.5. Die Inhibition des CREB-binding protein bewirkte eine Veränderung der Strahlensensibilität nach der LPS-Behandlung	74
4.6. Die CREB-binding protein Inhibition spielte keine Rolle bei der Interleukin-6 Freisetzung in H1975 Zellen und Interleukin-6 scheint kein Effektor der cAMP response element-binding protein-induzierten Strahlentherapieresistenz zu sein	76

4.7. Die Kombination von LPS und Bestrahlung korrelierte in H1975 Zellen mit einer Reduktion von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen, während die CREB-binding protein Inhibition zu einem Anstieg der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche im Vergleich zur Kontrolle führt	78
4.8. Schlussfolgerung	81
5. Zusammenfassung	82
6. Summary	84
7. Abbildungsverzeichnis	86
8. Tabellenverzeichnis	87
10. Literaturverzeichnis	88
9. Anhang	101
Publikationen.....	102
Posterpräsentationen und Vorträge auf Fachkonferenzen	103
Danksagung	105
Erklärung.....	106

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AP-1	Activator protein 1
ATF-1	Cyclic AMP-dependent transcription factor 1
ATF-2	Cyclic AMP-dependent transcription factor 2
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)
ATR	ATM- and Rad3-Related (ATR)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-binding protein
CBPi	CREB-binding protein Inhibitor
cDNA	Komplementäre DNA
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (englisch: chronic obstructive pulmonary disease)
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
Ct	Threshold cycle
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
d	Tag
D	Komponente
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DDR	DNA-Schadensantwort (englisch: DNA- damage response)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: Deoxyribonucleic acid)

DNA-PK	DNA-abhängigen Kinase
DSB	Doppelstrangbruch
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor Receptor
EGFRi	Epidermal growth factor receptor Inhibitor
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
Elk-1	ETS domain-containing protein 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
EtOH	Ethanol
FAK	Focal adhesion kinase
FCS	Fötales Kälber Serum
Fgr	Tyrosine-protein Kinase Fgr
Fyn	Tyrosine-protein Kinase Fyn
g	Gramm
Gy	Gray (1 Gy = 1 J/kg)
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAT	Histonacetyltransferase
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HR	homologe Rekombination
HRP	Horse Radish-Peroxidase
IFN	Interferone
IKK	I κ B kinase
IL-1	Intereukin-1
IL-6	Interleukin-6

IL-8	Interleukin-8
IP	Immunopräzipitation
IPF	Idiopathische pulmonale Fibrose
J	Joule
JAK/STAT	Janus kinase / signal transducer and activator of transcription
JNK	Jun N-terminal kinases
kDa	Kilodalton
Kit	Experiment Set
Kont.	Kontrolle
l	Liter
L	Leucin
LB	Lysogeny broth
Lck	Tyrosine-protein Kinase Lck
LD50	Letale Dosis 50%
LTA	Lipoteichonsäuren
LPS	Lipopolysaccharid
Lyn	Tyrosine-protein Kinase Lyn
m	Milli
M	Methionin
M	mol/l
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSK1/2	Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 and 2
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
n	Nano
NaCl	Natrium Chlorid

NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (englisch: non-homologous end joining)
nm	Nanometer
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer (Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinome)
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PARP-EJ	PARP-abhängigen Endverknüpfung
p38	P38 mitogen-activated protein kinases
PBS	Phosphate buffered saline
PBGD	Porphobilinogen-Deaminase
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death Ligand 1
PE	Plattierungseffizienz (englisch: Plating efficiency)
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	Pondus Hydrogenii (neg. dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PK	Proteinkinase
PVDF	Polyvinyl difluoride
R	Arginin
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR
s	Sekunde

S	Serin
SCLC	Small Cell Lung Cancer (Kleinzelliges Lungenkarzinom)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (englisch: <i>standard errors of the mean</i>)
SF	Überlebensfraktion (englisch: Surviving fraction)
SFK	Src family kinases
SRF	Serum response factor
SHP-2	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
SSA	Single-strand-annealing
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered saline
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TLR	Toll-like receptor
TLR-4	Toll-like receptor 4
TOR	Target of Rapamycin
TP53	Tumor protein p53
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	Vergleiche
WNK1	Lysine deficient protein kinase 1
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
z.B.	Zum Beispiel

α	Alpha
β	Beta
Δ	Delta
κ	Kappa
λ	Lambda (Wellenlänge)
μ	Mikro

1. Einleitung

1.1. Das Lungenkarzinom

1.1.1. Epidemiologie, Pathogenese, Klinik und Prognose

Krebserkrankungen zählen, nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und der westlichen Hemisphäre (1). Bei Männern stellt das Lungenkarzinom die häufigste durch Krebs verursachte Todesursache dar und auch bei Frauen wurde in den letzten Jahren ein Anstieg an Neuerkrankungen und dadurch verursachten Todesfällen beobachtet (Abb. 1) (1-3).

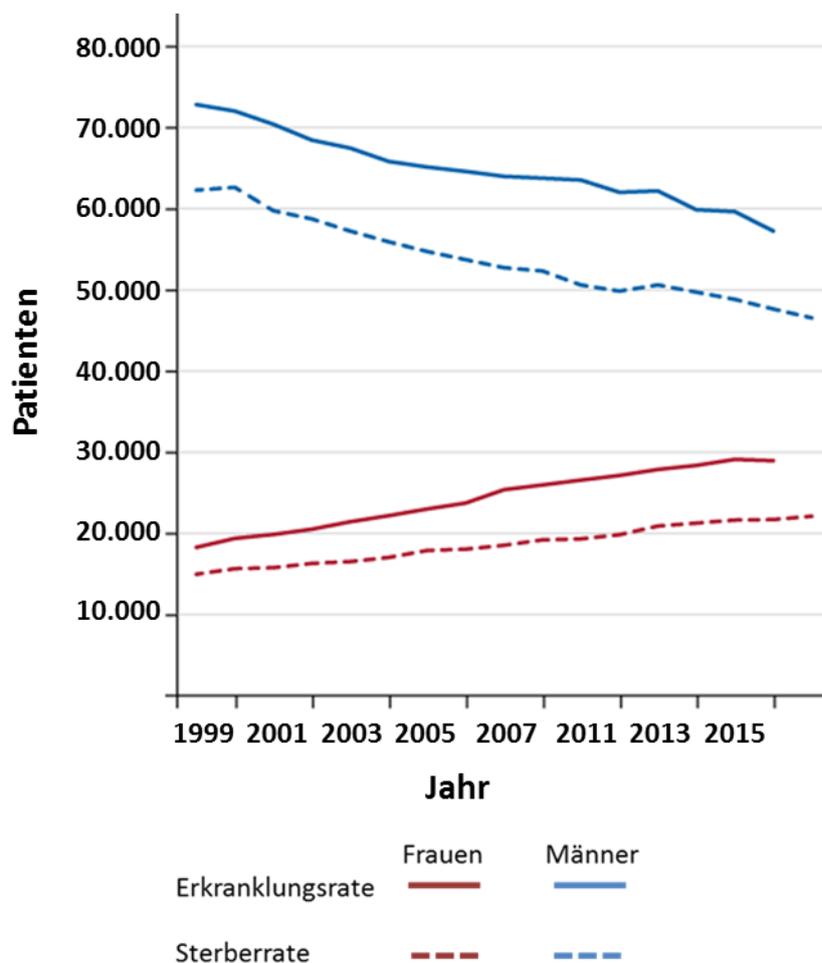


Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungsrate und Sterberate beim Lungenkarzinom bei Frauen und Männern, je 100.000 (Europastandard). (verändert nach Robert Koch Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten).

Lungenkarzinome werden in zwei Gruppen unterteilt, das kleinzellige Lungenkarzinom (englisch: *small cell lung cancer*, SCLC) und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (englisch: *non-small cell lung cancer*, NSCLC) (2). Dabei ist das NSCLC mit 80–85% aller Lungenkarzinomfälle am stärksten vertreten (4). Die NSCLCs werden in folgende histologische Subtypen unterteilt: Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, großzelliges Karzinom und andere nicht spezifizierte und nicht häufige auftretende Typen (5).

Das Rauchen von Tabak ist der bedeutendste Risikofaktor um an einem Lungenkarzinom zu erkranken. (6). Neben dem Rauchen von Tabak gibt es auch andere exogene Risikofaktoren. So stellen zum Beispiel die Exposition von bestimmten Berufsgruppen für verschiedene Stoffe wie Arsen, Chrom, Nickel und Asbest oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe weitere Risikofaktoren dar. Auch umweltbedingte Faktoren wie Passivrauchen, die Inhalation von Feinstaub, Industrie- und Verkehrsgasen und Radonexposition können zur Entstehung eines Lungenkarzinom beitragen (7, 8). Außer diesen exogenen Risikofaktoren sind auch endogene Risikofaktoren von Bedeutung, insbesondere bei der Entwicklung eines Adenokarzinoms (8). Zu den endogenen Risikofaktoren werden genetische Dispositionen, wie das Tragen von Keimbahnveränderungen des Gens *TP53* (*Tumor protein p53*), die Keimbahnveränderung T790M des Epidermal growth factor receptor (EGFR), Prädispositionen im Locus 6q23–25p und Genmutationen auf dem Chromosom 15, die für das Protein Nicotinic acetylcholine receptor codieren, gezählt (3, 8). Das Vorhandensein von Lungenerkrankungen, wie eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (englisch *chronic obstructive pulmonary disease*; COPD), sowie infektiöse Lungenerkrankungen wie die Tuberkulose (9) stellen weitere endogene Risikofaktoren dar.

Die Diagnose Lungenkarzinom wird häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt. Aufgrund unspezifischer Symptome, wie Husten, Thoraxschmerz oder Dyspnoe wird eine Lungenkarzinomerkrankung im frühen Stadium nur selten erkannt (10). Dies führt dazu, dass ca. 56% aller neu diagnostizierten Lungenkarzinome sich schon in Stadium III oder höher befinden. Dadurch ist die Prognose für an Lungenkarzinom erkrankte Patienten mit einer 5-Jahres-Überlebensrate über alle Stadien von nur 15% sehr schlecht (1). Die 5-Jahre-Überlebensrate sinkt dabei auf unter 5%, wenn der Tumor lokal fortgeschritten (Stadium IIIb) oder metastasiert ist (Stadium IV) (11).

1.1.2. Therapie

NSCLCs werden abhängig vom Stadium mit einer multimodalen Therapie aus Operationen, Bestrahlung und Chemotherapie, sowie mit einer gezielte Krebstherapie, der sogenannten *targeted therapy* behandelt (12-14). Auch stellt seit wenigen Jahren die Immuntherapie bei der Therapie von NSCLC einen innovativen Ansatz dar (15). Doch trotz des großen Fortschrittes, der bezüglich dieser Therapieformen erzielt wurde ist die 5-Jahres-Überlebensrate der am Lungenkarzinom erkrankten Patienten immer noch sehr gering (16). Dies ist darauf zurückzuführen, dass es häufig zu Metastasierung und zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung kommt (17).

Bei der Therapie von NSCLCs werden ein palliativer und ein kurativer Therapieansatz unterschieden. Ein kurativer Ansatz wird in den frühen Stadien durchgeführt. So wird in den Stadien I, II und IIIA häufig ein operativer Eingriff durchgeführt und in Stadium II und IIIA zusätzlich mit einer Cisplatin-basierenden Chemotherapie in Kombination mit einer Strahlentherapie behandelt (18). Die Durchführung einer palliativen Chemotherapie kommt auch im metastasiertem Stadium IV zum Einsatz (19).

Im Rahmen einer gezielten Krebstherapie, der sogenannte *targeted therapy* werden die Patienten häufig mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) behandelt (14). Dazu zählen TKIs gegen Mutationen des EGFR (19-21) oder Veränderungen in der Anaplastic lymphoma kinase (ALK) (22). Auch können Veränderungen im Protoonkogen ROS1 und der Rezeptor-Tyrosinkinase RET, sowie Amplifikationen im Protoonkogen MET oder aktivierende Mutationen in dem Protoonkogen BRAF, Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) und dem Protoonkogen KRAS potentielle Therapieansätze darstellen (15).

Für die personalisierten Therapie von Lungenkarzinompatienten zum Beispiel mit aktivierenden Mutationen des EGFR werden momentan schon klinisch zugelassene, spezifische TKIs verwendet (23, 24). Weist der Lungentumor einen positiven Mutationsstatus von EGFR auf, stellen Erlotinib, Gefitinib und Afatinib eine geeignete Behandlungsoption dar (23, 25). Drei klinische Studien zeigten, dass Adenokarzinome der Lunge mit mutiertem EGFR-Status signifikant auf Gefitinib und Erlotinib ansprechen (19-21, 26). Die Ansprache auf TKIs in Adenokarzinomen mit EGFR-Mutation liegt bei 65-90% (27).

Neben der personalisierten *targeted therapy* und den drei klassischen Säulen Operation, Chemotherapie und Bestrahlung wird auch immer häufiger eine Immuntherapie zur Behandlung des NSCLC eingesetzt (15). Diese Therapiemethode zielt auf die Kontrollpunkte des Immunsystems ab. Dabei kann das Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) oder der Rezeptor Programmed cell death-1 (PD-1) und sein Ligand PD-L1 blockiert werden (28) und somit die sogenannte *immune escape* umgangen werden (29).

Trotz diesen vielseitigen und innovativen Therapiemethoden stellt die Bestrahlung im Rahmen der Strahlentherapie noch immer eine wichtige Therapieform dar. Daher werden ca. 50% aller Krebspatienten mit ionisierter Strahlung behandelt (30).

1.2. Bestrahlung

Ionisierende Strahlung wird in Wellen- und Teilchenstrahlung unterteilt (31). Dabei werden Röntgen- und Gammastrahlung zur Wellenstrahlung gezählt und Neutronen, Elektronen, Protonen und Schwerionen werden der Teilchenstrahlung zugeordnet (32). Unter ionisierender Strahlung versteht man energiereiche Strahlung, bei deren Auftreffen Energie abgegeben wird. Das bedeutet, dass durch das Auftreffen der Strahlung Moleküle oder Atome angeregt und ionisiert werden. Dabei wird ein Elektron aus dem Molekül oder Atom entfernt. Die Energie, die durch ionisierende Strahlung hergestellt und von einer durchdrungenen Masse absorbiert wird, bezeichnet man als Energiedosis. Ihre Einheit wird in Gray (Gy; $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$) angegeben (33). Durch die Ionisierung der Atome kann es über Zerstörung chemischer Bindungen zur Schädigung der Biomoleküle kommen. Dabei kommt es zu einstufigen, direkten Ionisationsprozessen an organischen Molekülen und mehrstufigen, indirekten Ionisationsprozessen über chemische Sekundärprozesse, wie die Radiolyse von Wasser (33). Bei der Radiolyse von Wasser entstehen Ionen, Radikale und Peroxide (34-36). Dies ist bei der Bestrahlung von humanen Gewebe und Zellen von großer Bedeutung, da die Zellen aus ca. 80% Wasser bestehen (37).

Bei der Bestrahlung mit Photonen liegt aufgrund der exponentiell abfallenden Absorption sowie des Beitrags der Sekundärelektronen das Dosismaximum im Gewebe. Dieses kann abhängig von der Energie wenige Millimeter bis Zentimeter unter der Haut liegen. Bei der Strahlentherapie wird daher in der Regel mit einer Mehrfeldertechnik, Bestrahlung aus mehreren Richtungen, gearbeitet. Auf diese Weise wird eine maximale Dosis auch in tiefer gelegenen Tumoren erreicht und gleichzeitig wird das Normalgewebe geschont (38-40).

Typische Nebenwirkungen der Bestrahlung sind abhängig von der Lokalisation und der eingesetzter Strahlendosis: Hautabschuppung (41), Dermatitis und die radiogene Mukositis der Schleimhäute, sowie die Strahlen-induzierte Lungenfibrose (31).

1.2.1. Fraktionierung

Bei der Behandlung von Tumoren wird die erforderliche Strahlendosis in der Regel nicht durch eine einzige Bestrahlung appliziert, sondern durch eine Fraktionierung in mehrere kleinen Einzeldosen. Im Zuge der Strahlentherapie beim Lungenkarzinom kommt eine Gesamtdosis von > 60 Gy zum Einsatz (10). Diese wird in der Regel in 30 Fraktionen über 6 Wochen verabreicht. Dadurch wird erreicht, dass sich vor allem das gesunde Gewebe bereits während der Therapie erholen kann. Dieser Effekt wird als Erholung/Reparatur von subletalen Schäden bezeichnet (31). Die Fraktionierung bewirkt auch, dass die Tumorzellen sich immer wieder über alle Zellzyklusphasen verteilen (Redistribution) und vor allem strahlenresistente hypoxische Zellen wieder mit Sauerstoff versorgt und damit empfindlicher werden (Reoxygenierung) (38, 42). Jedoch führt die fraktioniert verabreichte Strahlung auch dazu, dass sich Tumorzellen in den Bestrahlungspausen wieder vermehren können (Repopulierung) (42). Durch die Erholung und die Repopulierung wird damit das bestrahlte Gewebe strahlenresistenter, während die Redistribution und die Reoxygenierung für eine erhöhte Strahlensensibilität des Tumors sorgen (31, 38, 42).

1.2.2. DNA-Schäden

Krebszellen reagieren auf Bestrahlung in einer heterogenen Weise, abhängig von ihrer intrinsischen Eigenschaften, wie zum Beispiel DNA-Reparatur Fähigkeiten oder ihrer extrinsische Umgebung, wie zum Beispiel Hypoxie (10) (12).

Ionisierende Strahlung bewirkt über eine Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) eine Abtötung der Tumorzellen (43, 44). Die Schädigung der DNA kann hierbei direkt oder indirekt erfolgen. Ein direkter Effekt liegt vor, wenn die DNA direkt durch die Strahlung ionisiert wird, während bei einem indirekten Effekt diese Schädigung über freie Radikale erfolgt, die bei der Interaktion von ionisierender Strahlung mit Wasser entstehen (45) (36) .

Ist in den Zellen kein oder nur wenig Sauerstoff vorhanden, Anoxie oder Hypoxie, werden viele dieser Ionisationen durch chemische Restitution wieder aufgehoben, während durch eine Reaktion mit Sauerstoff diese DNA-Schäden fixiert werden. Auf Grund dieses Sauerstoffeffektes sind anoxische und hypoxische Tumorareale gegenüber Photonenstrahlung besonders strahlenresistent (46-48).

1.2.3. DNA-Reparatur

Als Folge der Ionisation der DNA werden zahlreiche DNA-Schäden erzeugt wie Basenschäden, Vernetzungen, DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) (49, 50). Der größte Teil dieser Schäden kann durch sehr effiziente zelluläre DNA-Reparaturmechanismen erkannt und beseitigt werden. Für die Abtötung der Zellen durch ionisierende Strahlen ist vor allem die Erzeugung von DNA-DSB entscheidend. Die Reparatur von DSB wird durch eine komplexe DNA-Schadensantwort (DDR) initiiert. Dabei stellen die Proteinkinasen Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) und ATM- und Rad3-Related (ATR) die entscheidenden Faktoren dar (51).

Es gibt zwei separate und komplementäre Wege der DSB-Reparatur: zum einen die homologe Rekombination (HR) und das sogenannte *non-homologous end joining* (NHEJ).

Bei der HR handelt es sich um eine akkurate Form der Reparatur. Dabei wird ein unbeschädigtes Schwesterchromatid benötigt, welches als DNA-Template agiert. Diese Form der Reparatur ist nur nach der DNA-Replikation in der S- und G2-Phase möglich (52, 53).

Im Gegensatz dazu ist das NHEJ durch den ganzen Zellzyklus aktiv (54) und mit ca. 70% der Hauptreparaturweg zur Reparatur von Strahlen induzierten DNA-DSB im Menschen (53). Dabei werden durch Reparaturenzyme die DNA-Enden nach der Entfernung des geschädigten Nukleotides verknüpft. Dabei erkennen und markieren die Ku-Proteine die Enden der DNA-DSB. Die NHEJ benötigt keine homologe Matrize und daher kommt es nicht immer zur Wiederherstellung der ursprünglichen DNA-Sequenz (31).

Zellen verfügen zudem über sogenannte Ersatzwege (*back-up pathways*) wie dem *single-strand-annealing* (SSA) und dem PARP-abhängigen *endjoining* (PARP-EJ). In Tumorzellen kann ein defektes NHEJ vorliegen, wodurch DSB vermehrt mittels des zum Teil fehlerhaften PARP-EJ bzw. SSA prozessiert werden (31). Jedoch wird ein sehr großer Anteil der DSB erfolgreich und korrekt von den Zellen repariert (55).

1.3. Klonogener Zelltod

Ionisierende Strahlen führen über die Erzeugung von DNA-Schäden zum Zelltod. Diese auch als klonogener Zelltod bezeichnete Inaktivierung bedeutet, dass eine Tumorzelle ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit verliert. Dabei ist die durch Strahlung induzierte Zellinaktivierung willkürlich (12).

Die Zellabtötung kann über drei verschiedene Mechanismen geschehen: der Interphasetod, der Mitosetod und die vorzeitige Seneszenz (31). Der Interphasetod wird durch Apoptose ausgelöst. Dagegen wird der als Mitosetod bezeichnete Zelltod durch letale

Chromosomenaberrationen veranlasst, die aus nicht bzw. fehlerhaft reparierten DSB entstehen. In Folge dieser letalen Chromosomenaberrationen verlieren Zellen bei der Teilung DNA-Fragmente, was langfristig zum Verlust essentieller Proteine führt, weshalb die Zellen nach drei bis fünf Zellteilungen ihre Teilungsfähigkeit irreversibel verlieren. Die dritte Form der Zellabtötung, die vorzeitige Seneszenz, wird vor allem durch eine vorzeitige Ausdifferenzierung in Folge eines permanenten strahleninduzierten G1-Arrests ausgelöst (56).

Der Anteil der durch Bestrahlung absterbenden Zellen ist von vielen Faktoren wie dem Tumorumfang, Proliferationseigenschaften, DNA-Reparatur Mechanismen, der Tumorumgebung und der Strahlendosis abhängig (31). Der Verlust der Teilungsfähigkeit und damit der Zellinaktivierung wird *in vitro* mittels des Koloniebildungsassays bestimmt (31). Das Koloniebildungsassay wurde 1956 in der Publikation „Action of x-rays on mammalian cells“ von Theodore T. Puck und Philip I. Marcus zum ersten Mal beschrieben (57). Dieses Assay ermöglicht Unterschiede in der Reproduktion von unbehandelten und behandelten bzw. bestrahlten Zellen zu untersuchen. Somit ist das Koloniebildungsassay die akzeptierteste Technik in der Strahlenbiologie und wird zur Untersuchung der Strahlensensitivität verwendet. (31, 57) (vgl. Material und Methoden: Koloniebildungsassay). Durch ein Koloniebildungsassay lassen sich Überlebenskurven mit Hilfe des linear-quadratischen Modells berechnen, die dann über den Alpha-/Beta-Wert Aussagen zur Erholungsfähigkeit der Zellen bzw. des Gewebes ermöglichen und die Strahlenempfindlichkeit anzeigen. Dadurch eignet sich das linear-quadratische Modell zur Untersuchung der Strahlenauswirkung *in vitro* (31, 57, 58). In dem linear-quadratischen Modell wird der dekadische Logarithmus des zellulären Überlebens gegen verschiedene Strahlendosen dargestellt. Die direkte Schädigung der DNA durch ein Teilchen stellt die lineare Komponente ($-\alpha D$) des Modells dar. Dabei steigen die DNA-Schäden und die dadurch absterbenden Zellen linear zu der verabreichten Strahlendosis (58, 59). Schäden, die durch zwei Teilchen unabhängig voneinander verursacht wurden, aber alleine nicht zum Tod der Zelle geführt hätten, werden durch die quadratische Komponente ($-\beta D^2$) beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit des einzelnen DNA-Schadens nimmt auch hier linear zur Dosis zu. Dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit, dass beide Schäden eintreten und somit zum Zelltod führen, proportional zum Quadrat der Dosis (31, 59).

1.4. Das Lungenkarzinom und pulmonale Infektionen

Eine häufige Komplikation bei Patienten mit einem Lungenkarzinom stellen pulmonale Infektionen dar. Diese sind bei ca. 70% der Lungenkarzinompatienten zu beobachten (60). In Untersuchungen von Perlin et al., die Lungenkarzinompatienten früher Stadien einschließen, liegt das Überleben 28 Monate nach der Behandlung bei Patienten ohne pulmonale Infektionen bei über 30%. Dahingegen sinkt das Überleben der Patienten mit einem Lungenkarzinom und einer pulmonalen Infektion auf nur 10% (61). Zu den am häufigsten in Patienten gefundenen Pathogenen gehören die gram-negativen Bakterien *Haemophilus influenza* und *Escherichia coli* (60, 62). Den Hauptpathogenitätsfaktor dieser gram-negativen Bakterien stellt das Lipopolysaccharid (LPS) dar. Dieses sogenannte Endotoxin ist Bestandteil der Zellwand der gram-negativen Bakterien (63, 64).

LPS steht für den Prototypen eines mikrobiellen Triggers und stimuliert die angeborene Immunantwort durch CD14-vermittelte Ligandierung des Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) (65). Dies führt zu einer Entzündungsantwort durch die Aktivierung des Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Nuclear factor kappa B; NF- κ B) (65). Entzündungen sind eine physiologische Antwort auf Zell- und Gewebeschädigungen und auch auf Strahleninduzierte Schäden. Die Antwort auf diese Schädigungen ist reguliert durch die Balance zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen und Signalmolekülen (66, 67). Genetische Variationen können zu einer Verschiebung der Balance und dadurch zu einer gestörten Regulation der Entzündungsantwort führen. Dies kann durch genetische Defekte in Apoptose- und/oder Wundheilungssignalwegen verursacht werden und zu einem "immunologischen Chaos" beitragen (68). Chronische Entzündungen können dabei die Entwicklung von Krebs begünstigen (68-70), indem sie die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen triggern (71).

Es ist bekannt, dass nach dem Binden von LPS an CD14 (72) die zelluläre Aktivierung induziert wird, indem dieser Komplex an TLR-4 bindet (73-76). Des Weiteren ist beschrieben, dass eine verstärkte Expression von TLR-4 in NSCLCs mit einer verschlechterten Prognose für die Patienten korreliert (77, 78).

Die Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu einer Familie der Typ 1 Membran-Glykoproteine und werden auf Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Außerdem sind sie auch auf nicht-immunogenen Zellen wie Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten exprimiert. Sie erlauben dem angeborenen Immunsystem durch das Aktivieren von spezifischen Signalwegen sogenannte Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) zu erkennen (79). Dadurch kommt es zu

einer Aktivierung einer *downstream* Signalkaskade, die zu einer Aktivierung von NF- κ B führt. Dies führt zu Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (79, 80).

Nach der Ligation von LPS oligomerisiert TLR-4, rekrutiert Adaptoren und triggert die *downstream* Signalwirkung (81). TLR-4 kann sowohl über Myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88)-abhängige und MYD88-unabhängige oder TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF)-abhängige Signalwege wirken (81) (Abb. 2). Der MYD88-abhängige Signalweg führt zu einer schnellen Aktivierung von NF- κ B und zu einer Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (82). Der MYD88-unabhängige Signalweg führt zu einer langsameren Aktivierung von NF- κ B und zu einer Aktivierung von IFN Regulationsfaktor 3 (IRF3). Dies führt zu einer Produktion von Typ I Interferone (IFN α/β), IFN-induzierbaren Genprodukten und der Aktivierung der unspezifischen Immunantwort (82) (Abb. 2).

Somit führt das Binden von LPS an den Co-Faktor CD14 und TLR-4 zur Aktivierung von verschiedenen Signalwegen (83). Zu den so aktivierten Signalwegen und Proteinen gehören: Mitogen-activated protein kinase (MAPK), Extracellular signal-regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK), P38 mitogen-activated protein kinases (p38) und I κ B kinase (IKK). Die MAPK-Signalwege phosphorylieren direkt oder indirekt und aktivieren dadurch eine große Anzahl verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel ETS domain-containing protein (Elk-1) oder die Protoonkogene c-Jun und c-Fos, cyclic AMP-dependent transcription factor (ATF-1), Activating transcription factor 2 (ATF-2), Serum response factor (SRF) und cyclic AMP response element-binding protein (CREB) (Abb. 2). Bei einigen dieser Signalwege ist bekannt, dass sie einen starken Effekt auf Zellproliferation, Überleben, Inflammation, Regulation des Immunsystems, DNA-Reparaturmechanismen und Reparatur von DNA-DSB haben (84, 85).

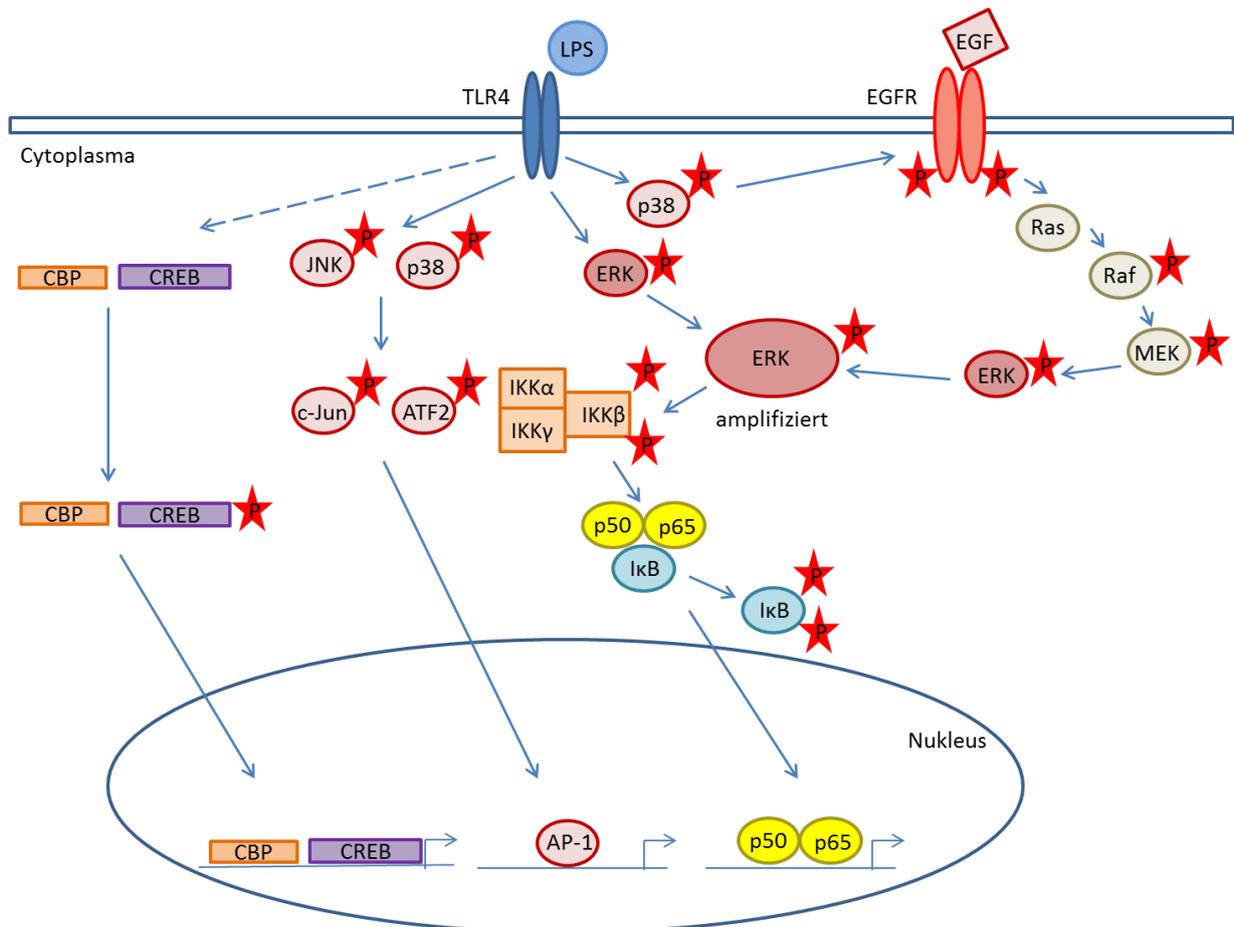


Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung des Toll-like Rezeptor 4 (TLR)-Signalweges. LPS bindet an TLR-4. Dadurch wird mittels verschiedener Adaptermoleküle das TLR-4 Signal ausgelöst. Der Signalweg wirkt über die Aktivierung der IκB kinase (IKK) und der Mitogen activated protein kinase (MAPK) Signalwege, welches zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren p50/p65 (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells; NF-κB) und Activator protein (AP)-1 und cAMP response element-binding protein (CREB) führen. Dies führt zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und anderen Immunsystem zugehörigen Genen. Zusätzlich kommt es zu einer Transaktivierung von Epidermal growth factor receptor (EGFR), welches zur einer Amplifizierung der ERK Phosphorylierung führt. Dies korreliert mit einem Anstieg von NF-κB. ATF-2, activating transcription factor-2; CBP, CREB-binding protein; P, Phosphorylierung (Verändert nach BL Slomiany, A Slomiany, 2013).

Des Weiteren bewirkt die Bindung von LPS an TLR-4, über die Aktivierung von NF-κB, unter anderem die Expression von Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) (86, 87).

Das Binden von IL-6 an den IL-6-Rezeptor führt zu keinem Signal. Erst durch das Binden dieses Komplexes an das Protein gp130 kommt es zu einem intrazellulären Signal via des Janus kinase / Signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) Signalweges (88). Zusätzlich zur Aktivierung des JAK/STAT Signalweges kann über die Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (SHP-2) auch der Rat sarcoma / Rapidly accelerated fibrosarcoma (Ras/Raf)/MAPK Signalweg aktiviert werden (89, 90).

Es wird vermutet, dass IL-6 eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung von chronischen Inflammationen bis hin zur Krebsentstehung spielt, da IL-6 zur Tumorentstehung, Wachstum und Metastasierung beiträgt (91-96). Auch spielt dieses Zytokin eine wichtige Rolle bei der erworbenen Strahlenresistenz (97). Diese wird durch die Inhibition des Anstiegs von reaktiven Sauerstoffspezies (englisch: *reactive oxygen species*; ROS) vermittelt (98).

Hohe IL-6 Konzentrationen im Serum von Krebspatienten stellen einen Indikator für eine verschlechterte Prognose in gastrischen Tumoren, Pankreastumoren, Melanomen, Mamatumoren, kolorektale Tumoren und Lungentumoren dar (23, 99). Im Mausmodell steht IL-6 in Verbindung zur Krebsentwicklung und scheint der Genese der durch Inflammation induzierten Kolorektal- und Pankreastumoren beizutragen (24, 25, 27, 94). Die Regulation der IL-6 Expression ist dabei von NF- κ B abhängig (100).

Weiter ist beschrieben, dass der LPS induzierte Signalweg via TLR-4 von einer Interaktion mit der Tyrosinkinase EGFR abhängig ist (101). EGFR ist ein Transmembranprotein und besteht aus einer extrazellulären Domäne, an die die Liganden binden können, einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Domäne, welche eine Tyrosinkinase beinhaltet. Bei der Aktivierung kommt es zu einer Phosphorylierung an den Tyrosinresten (102) und dies führt zu einer Aktivierung *downstream* gelegener Signalwege. EGFR ist in vielen Tumoren stark exprimiert und eine konstitutive oder Ligand-induzierte EGFR-abhängige Signalwirkung wird mit einem verstärkten zellulären Überleben, Proliferation und Metastasierung in Tumoren in Verbindung gebracht (103). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EGFR eine Rolle in der konstitutiven Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Krebszelllinien spielt (104). Auch ist bekannt, dass EGFR in die DNA-DSB Reparatur involviert ist (105, 106). EGFR kontrolliert die DNA-DSB Reparatur nach der Bestrahlung durch das Binden der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK). So kann EGFR aufgrund eines Anstiegs des nuklearen Gehalts von DNA-PK-Untereinheiten die DSB-Reparatur stimulieren. Diese Untereinheiten sind Schlüsselkomponenten des NHEJ (107).

Diese Daten lassen vermuten, dass LPS einen Einfluss auf die DSB-Reparatur hat, entweder durch einen der zuvor genannten Transkriptionsfaktoren oder indirekt über den EGFR.

Auch wurde in verschiedenen *in vitro* Zellmodellen und auch *in vivo* beschrieben, dass der TLR-4 Ligand LPS EGFR aktivieren kann (108-112).

EGFR wird in Verbindung mit einer Strahlenresistenz gebracht, da EGFR für die Proliferation der Tumorzellen, DNA-Reparatur, Hypoxie und der Bildung von Metastasen verantwortlich ist (113). Zusätzlich zeigen Tumoren mit einer erhöhten EGFR Expression eine verschlechterte Ansprache auf die Strahlentherapie (113). Dabei ist zu bemerken, dass EGFR durch die Bestrahlung aktiviert wird (114, 115). Die Sauerstoffversorgung des Tumors spielt auch bei einer durch EGFR verursachten Radioresistenz eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass

die EGFR-abhängige Aktivierung von der Proteinkinase B (AKT) vorzugsweise in hypoxischen Regionen des Tumors auftritt (116, 117).

In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar konnte gezeigt werden, dass LPS das Tumorwachstum im NSCLC *in vitro* und *in vivo* stimuliert (108). Dieser proliferative Effekt von LPS wurde ebenfalls für Leber-, Ovar-, Magen- und Brustkrebs beschrieben (108, 118-122). Dies könnte zum Teil den negativen Einfluss von pulmonalen Infektionen auf das Überleben der NSCLC Patienten erklären. Des Weiteren wird vermutet, dass LPS einen Einfluss auf die Therapieansprache der betroffenen Patienten hat. Doch bis jetzt gibt es keine Informationen über eine Interaktion von LPS und Strahlen- oder Chemotherapie. Somit ist noch nicht geklärt, inwiefern bakterielle Pathogenitätsfaktoren wie LPS eine Auswirkung auf die Therapierbarkeit von NSCLCs haben und ob LPS eine mögliche Strahlenresistenz induzieren kann.

1.5. Zielsetzung

Pulmonale Infektionen verschlechtern die Überlebensrate (61) und sind eine der häufigsten Komplikationen bei Patienten mit NSCLCs (91).

Daher war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob bakterielle pulmonale Infektionen eine Auswirkung auf die Strahlensensibilität haben.

Da schon bekannt ist, dass LPS über TLR-4 wirkt (73-76) und dies von einer Interaktion mit EGFR abhängig ist (101), sollen NSCLC Zelllinien untersucht werden, die sich in ihrem *TLR-4* und *EGFR* Status auf mRNA Ebene unterscheiden. Anhand dieser Zelllinien wird untersucht, ob das bakterielle Endotoxin LPS, als mikrobieller Trigger, die Ansprache der NSCLC Zellen auf die Bestrahlung beeinflussen kann.

Wenn gezeigt werden kann, dass LPS die Strahlensensibilität verändert und dadurch Auswirkungen auf das klonogene Überleben hat, soll geklärt werden welche Signalwege und Proteine dafür verantwortlich sein können. Dazu sollen zunächst orientierend Proteom-Arrays (Human Phospho-Kinase Antibody Array Kit) durchgeführt werden. Zeigen diese eine veränderte Phosphorylierung von Proteinen nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung an sollen ein oder mehrere, möglicherweise in die Strahlenresistenz involvierten Protein ausgewählt werden und die Ergebnisse mittels Western Blot bestätigt werden. Um eine funktionelle Rolle des/der heraufregulierten Proteine bei der Strahlenresistenz zu belegen, werden diese in Inhibitionsversuche *in vitro* inhibiert. Somit soll untersucht werden, ob die Inhibition des gefundenen Signalweges die Strahlensensibilität verbessert, und damit auch den klonogenen Zelltod und die DNA-DSB Reparatur beeinflussen kann.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Substanzen	Hersteller/Firmensitz
2-Propanol (Isopropanol)	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Adenosinphosphosulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Aqua dest.	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham
Aqua, RNase-, DNase-free	Gibco, Qiagen GmbH, Hilden
Bovines Serumalbumin (BSA) 98%, fatty acid free	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol absolut	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natrium Chlorid (NaCl), 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Temed)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LPS 0111:B4 von <i>Escherichia coli</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS)	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach
Prestained Protein Ladder	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Primer	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS 10% in H ₂ O	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Slim Milk Powder	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Streptavidin Horese Radish- Peroxidase (HRP)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Thermo Scientific™ Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham

Substanzen	Hersteller/Firmensitz
Syber-Orange	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton-X-100	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US

2.1.2. Gebrauchswaren

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
Deckgläschen 15 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Dispenser-Tips steril 1,25 ml (25 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
Dispenser-Tips steril 5 ml (100 µl)	VWR International GmbH, Darmstadt
ELISA-Folien / Polyesterfolie	VWR International GmbH, Darmstadt
ELISA-Platten, F96 Maxisorp-Nunc-ImmunoPlate	Fisher Scientific ,Hampton, NA, USA
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Handschuhe	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Low-Profile 0,2 ml 8-Tube Strips without caps	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Optical Flat 8-Cap Strips	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, Wi, USA
Pipetten 5 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten 10 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten 25 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen Gel Saver II	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Protein Low Binding Micro Tubes, 1,5 ml	Sarsted, AG & Co, Nürnberg
PVDF-Membran	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Reaktionsgefäß 15 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäß 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße safe-lock 2 ml	Sarsted, AG & Co, Nürnberg
Reaktionsgefäße safe-lock 1,5 ml	Sarsted, AG & Co, Nürnberg

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
Whatman Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Whatman Paper	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturflasche T12,5	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflasche T25	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflasche T75er	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten 6-well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen 60 mm	Sarsted AG & Co, Nürnberg
Zellschaber	Sarsted, AG & Co, Nürnberg

2.1.3. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Katalognummer
53BP1 anti-rabbit	Bio-Techne-Novus Biologicals Minneapolis, MN, USA	NB100-304
anti-beta-actin	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK	4967 S
anti-CREB	Abcam, Cambridge, UK	ab32515
anti-CREB (phosphor S133)	Abcam, Cambridge, UK	ab32096
anti-KAT3A/CBP - ChIP Grade	Abcam, Cambridge, UK	ab2832
anti-mouse Alexa-fluor 594	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	# A-11005
anti-phospho-Histone γ H2A.X (Ser139) clone JBW301/ mouse	Merck Millipore, Billerica, MA, USA	05-636
anti-rabbit Alexa-fluor 488	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	# A-11034
Human/Primate IL-6 Antikörper (Capture)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	MAB 207
Human/Primate IL-6 Biotinylated Antikörper (Detection)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	BAF206
Recombinant Human IL-6 Protein (Standard)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	206-IL-010

2.1.4. Vorgefertigte Systeme und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA	#1725122
Phospho-Kinase Kit Antikörper Array	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	#ARY003B
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	#23225
Pierce™ ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	#32106
ProLong Gold antifade reagent mit DAPI	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	P36931
Protein A/G Plus-agarose beads	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	sc-2003
QIAxcel RNA QC Kit v2.0	QIAGEN N.V., Hilden	929104
RNeasy Mini Kit	QIAGEN N.V., Hilden	#74104
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 7,5%	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA	#1610181
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10%	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA	#1610183

2.1.5. Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
10 mm RW ₃ -Platten (RW ₃ : 1,045 g/cm ³ , Wasser: 1,0 g/cm ³)	LAP GmbH Laser Applikationen, Lüneburg
Absaugpumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Elektrophoresis Module Assembly Mini-Protean 3 , 4-Gel-System	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
ELISA Reader Bio-TEK, ELx808	BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA
Elektronenlinearbeschleuniger Elekta Synergy	ELEKTA, Stockholm, Schweden
Heizrührer, MR3002	Heidolph Instruments, Schwabach
Inkubator Hera Cell 150	Heraeus Medical GmbH, Wehrheim

Bezeichnung	Hersteller/Firmensitz
IX81 Mikroskops (objeCtive: 60x)	Olympus, Shinjuku, Tokio, Präfektur Tokio, Japan
Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop, Leica DMI1	Leica Microsystems, Wetzlar
MilliQ Anlage Advantage A10 Millipore	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
NanoDrop	PeqLab, Erlangen, Germany
Neubauer-Zählkammer	VWR International GmbH, Darmstadt
PCR-Thermo-Cycler T100	Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, USA
pH-Meter, pH-Meter 766 Calimatic KG, Berlin	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.
Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Pipettierhilfe	Fisher Scientific, Hampton, NA, USA
QIAxcel Advanced System	QIAGEN N.V., Hilden
Real-time PCR Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Schwenk-Inkubatoren	Desaga Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Schwenk-Inkubatoren	Roto-Shake Scientific Industries Inc., NY, USA
Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Sterilbank, Hera safe	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham
VersaDoc, Bio Rad ChemiDoc XRS+	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt
Waagen	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad	PD Industriegesellschaft GmbH, Dresden
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich, Kirchlengern
Zentrifuge Typ Rotanta/AP	Hettich, Kirchlengern
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Kirchlengern

2.1.6. Humane Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen.

Tabelle 1: Verwendete humane NSCLC Zelllinien

Zelllinie	ATCC-Nummer	KRAS-Status	p53-Status	EGFR-Status	NSCLC
A549	CCL-185	mutiert	wildtyp	wildtyp	Adenokarzinom
H23	CRL-5800	mutiert	mutiert	wildtyp	Adenokarzinom
H226	CRL-5826	wildtyp	mutiert	wildtyp	Plattenepithelkarzinom
H460	HTB-177	mutiert	wildtyp	wildtyp	großzelliges Karzinom
H520	HTB-182	wildtyp	mutiert	defizient	Plattenepithelkarzinom
H1299	CRL-5803	wildtyp	defizient	wildtyp	Adenokarzinom
H1975	CRL-5908	wildtyp	wildtyp	mutiert (L858R/T790M Doppelmutation)	Adenokarzinom
HCC827	CRL-2868	wildtyp	wildtyp	Mutiert (E746-A750 Deletion)	Adenokarzinom

2.1.7. Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Aqua Spüllösung (Ecotainer® PP Flasche 1.000 ml)B.	Braun Melsungen AG, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LPS (E.Coli 0111:B4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Medium RPMI 1640 (E15-840)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Natrium Chlorid (NaCl) 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml Pen. / 10mg/ml Strep.)	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA 10x	PAN - Biotech GmbH, Aidenbach

2.1.8. Lösungen Zellkultur

Kristallviolett		1:5 mit ddH ₂ O verdünnt
LPS (<i>E.Coli</i> 0111:B4)		Stocklösung verdünnt mit 0,9% NaCl auf 1 mg/ml
RPMI-Vollmedium	Zugabe von:	105 U/l Penicillin, und 100 mg/l Streptomycin 10% Fetales Kälberserum (FCS)
Trypsin-Lösung		12 ml Trypsin/EDTA 10x 108 ml Aqua Spüllösung

2.1.9. Inhibitoren

Bezeichnung	Verwendung	Artikelnummer	Hersteller
AG1478	EGFR-Inhibition	658552	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Complete™ Mini Protease	Inhibitor Cocktail	11836153001	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
ICG-001	CBP Inhibition	4505	Tocris Bioscience, Bristol, UK

2.1.10. ELISA Substanzen und Lösungen

Name	Hersteller
ELISA Substrat Reagent Pack	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA R&D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 1 M	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Streptavidin Horse Radish-Peroxidase Enzym (HRP)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Diluent; 1% BSA in PBS	Selbst hergestellt

Laemmli Puffer/Protein-Ladepuffer (10x)	625 mM Tris (pH 6,8) 20% SDS 50% Glycerol 0,3% Bromphenolblau 9% β -Mercaptoethanol Auf 10 ml mit ddH ₂ O auffüllen
SDS-PAGE Laufpuffer (10x; 1 l)	250 mM Tris 1900 mM Glycin 1% SDS 10% in H ₂ O Auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
Stripping Puffer	Thermo Scientific™ Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer
10x TBS-Puffer	20 mM Tris 150 mM Natriumchlorid pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen Auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
Waschpuffer für Western-Blot (TBS-T)	10 % Tween20 in 1 l 1x TBS

2.1.13. Verwendete Software

Verwendete Software	Hersteller
BioDocAnalyzer Software 2.1	Analytik Jena AG, Jena, Germany
CFX Maestro Software	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Gen5™ Datenanalyse-Software	PAN – Biotech GmbH, Aidenbach
GraphPad Prism, Version 6	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
ImageLab 4.0.1	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

Verwendete Software	Hersteller
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham
QIAxcel ScreenGel Software	QIAGEN N.V., Hilden
Xcellence Software	Olympus, Shinjuku, Tokio, Präfektur Tokio, Japan

2.1.14. Sterilisation von Lösungen und Gebrauchswaren

Hitzebeständige Gebrauchswaren und Lösungen wurden, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu verhindern, 20 min bei feuchter Hitze, 121 °C und 105 Pascal autoklaviert.

Nicht hitzebeständige Lösungen wurden steril filtriert, die Porengröße des Filters beträgt 0,22 µm.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung der nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien

Die Versuche wurden mit der humanen NSCLC Adenokarzinomzelllinien H1975 (CRL-5908), die eine L858R/T790M Doppelmutation (EGFR Mutation) trägt, A549 (CCL-185) die EGFR Wildtyp ist und der humanen NSCLC Plattenepithelkarzinom Zelllinie H520 (HTB-182), welche EGFR-negativ ist durchgeführt. Zusätzlich zu diesen Zelllinien wurden in einem Screening folgende humane NSCLC Zelllinien eingesetzt: A549, H1975, H520, H226, H23, H1299, H1650 und HCC827.

Alle verwendeten Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 100 U/l Penicillin, und 100 mg/l Streptomycin (Pen/Strep), bei 37 °C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Diese besteht aus neun (3 x 3) Großquadraten mit je einer Fläche von 1 mm². Das Volumen beträgt 0,1 µl bei einer Tiefe von 0,1 mm. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die vier Eckquadrate ausgezählt und gemittelt. Somit lässt sich anhand des definierten Volumens die Zellzahl in der Zellsuspension berechnen.

2.2.1.3. LPS-Behandlung

Für die LPS-Behandlung wurden die Zellen auf Zellkulturflaschen ausgesät (Tab. 2) und für 24 h zu einer Konfluenz von 50-60% wachsen gelassen. Danach wurden die Zellen mit 0,1, 1 und 10 µg/ml hochaufgereinigtem LPS 0111:B4 von *Escherichia coli* 16 h vor der Bestrahlung stimuliert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle (0 µg/ml LPS) mitgeführt. Im Anschluss folgten Koloniebildungsassays, ELISAs und Western Blots.

Tabelle 2: Anzahl der ausgesäten Zellen für die LPS-Behandlung

Größe	Anzahl der ausgesäten Zellen je Zelllinie		
	H1975	A549	H520
Zellkulturflasche T12	300.000	150.000	300.000
Zellkulturflasche T25	600.000	300.000	600.000

2.2.1.4. Untersuchung der Toxizität von LPS an H1975

Zur Untersuchung der Toxizität der verschiedenen LPS-Konzentrationen wurden in je 2 6-well-Platten 250.000 (16 h), 125.000 (16 h + 24 h) und 100 (16 h + 12 Tage [d]) H1975 Zellen ausgesät und nach 24 h mit 0, 0,1, 1 und 10 µg/ml LPS für 16 h behandelt.

Die hierfür verwendeten Zeitwerte wurden nach den Versuchszeiten des Koloniebildungsassays (16 h + 12 d) und des Western Blots oder ELISAs (16 h + 24 h) ausgewählt. Um dem experimentellen Aufbau des Koloniebildungsassays und der molekularbiologischen Untersuchungen nahe zu kommen wurde nach 16 h die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und ein Mediumwechsel auf RPMI mit 10% FCS und 1% Pen/Strep mit 0, 0,1, 1 und 10 µg/ml LPS durchgeführt. Die Zellen wurden dann ohne weiteren Mediumwechsel für 24 h oder 12 d inkubiert. Zusätzlich wurde die Toxizität von LPS nach 16 h bestimmt.

Zum Stoppen, nach den zuvor bestimmten Zeitpunkten, wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin abgelöst. Die so abgelösten Zellen wurden zum Stoppen der Trypsinreaktion in 0,5 ml FCS gegeben. Von dieser Zelllösung wurden 10 µl mit 10 µl Trypanblau gemischt und im Folgenden als Doppelwert, mit Hilfe von Neubauerzählkammern, ausgezählt um die Gesamtzellzahl und die Anzahl der lebenden und toten Zellen zu ermitteln. Jedes unabhängige Experiment besteht aus drei technischen Replikaten. Die Gesamtzahl der toten Zellen aller drei Triplets sind als Prozentsatz dargestellt.

2.2.1.5. Bestrahlung

Zur Bestrahlung der humanen NSCLC Zelllinien ist der Elektronenlinearbeschleuniger Elekta Synergy verwendet worden. Dieser in der Klinik zur Bestrahlung von Patienten eingesetzter Elektronenlinearbeschleuniger emittiert 6 MeV ultraharte Röntgenstrahlung.

Die zu bestrahlenden NSCLC Zellen wurden in Zellkulturflaschen auf fünf 10 mm hohen RW₃-Platten mit wasser-äquivalenter Dichte (RW₃: 1,045 g/cm³, Wasser: 1,0 g/cm³) positioniert, um ein Dosismaximum in der Zellschicht zu gewährleisten. Daher wurde auch eine RW₃ Platte auf die Zellkulturflaschen gelegt, die für die Rückstreuung benötigt wird. Zur besseren Positionierung wurden hierbei zusätzlich Holzschaber zwischengelegt. Die Zellen befinden sich 1 m entfernt von der Strahlenquelle. Die Bestrahlung erfolgte mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy mit 6 MeV ultraharten Röntgenstrahlen. Neben dem Fokus-Haut-Abstand von 1 m ist eine Feldgröße von 20 cm x 20 cm gewählt worden. Die Dositiefe liegt bei 50 mm. Bei dem Aufbau wurde die Verschiebung des Dosismaximums in die Tiefe bedacht. Die Strahlenquelle befand sich zum Bestrahlen unter dem Behandlungstisch, sodass die NSCLC Zellen von unten bestrahlt wurden (Abb. 5). Die Bestrahlung der Zellen ist bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt worden.



Abbildung 3: Elektronenlinearbeschleuniger Elektra Synergy und Aufbau der Bestrahlungsversuche. Die Zellkulturflaschen T12,5 wurden auf fünf 10 mm hohen RW₃-Platten mit wasser-äquivalenter Dichte (RW₃: 1,045 g/cm³, Wasser: 1,0 g/cm³) positioniert. Die Holzschaber dienen dabei nur der besseren Stabilität und der richtigen Höhe auf der die sechste RW₃-Platte positioniert wurde.

2.2.1.6. Koloniebildungsassay

Zur Untersuchung der Strahlensensibilität und der dadurch beeinträchtigten Fähigkeit zur Koloniebildung wurden Koloniebildungsassays durchgeführt. Diese stellen den Goldstandard zur Beurteilung des klonogenen Überlebens nach der Bestrahlung dar (56).

Für die Koloniebildungsassays wurden zunächst je 300.000 Zellen der Zelllinie H1975 oder H520 und 150.000 Zellen der Zelllinie A549 in T12,5er Zellkulturflaschen ausgesät. Diese Zellen wurden 24 h später mit 0,1, 1 oder 10 µg/ml LPS stimuliert. 15 h später, 1 h vor der Bestrahlung, wurde ein Mediumwechsel auf RPMI-Medium mit 2% FCS und 1% P/S und je

nach Versuchsansatz eine zusätzliche Inhibition oder LPS-Behandlung durchgeführt. Dann wurden die Zellen mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt. Zusätzlich sind unbestrahlte und unbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt worden (Tab. 4).

Tabelle 3: Verwendete Zellzahlen und durchgeführte Behandlungen der Koloniebildungsassays.

Zellzahl H1975 und H520	Zellzahl A549	LPS [$\mu\text{g/ml}$]	ICG-001 [μM] nur bei H1975	AG1478 [μM] nur bei H1975	Bestrahlung [Gy]
200	100	0	2	1	0
200	100	0	Siehe Anhang		1
400	200	0	Siehe Anhang		2
800	550	0	Siehe Anhang		4
2000	1600	0	Siehe Anhang		6
7000	6000	0	Siehe Anhang		8
200	100	0,1	nicht durchgeführt		0
200	100	0,1	nicht durchgeführt		1
400	200	0,1	nicht durchgeführt		2
800	550	0,1	nicht durchgeführt		4
2000	1600	0,1	nicht durchgeführt		6
7000	6000	0,1	nicht durchgeführt		8
200	100	1	nicht durchgeführt		0
200	100	1	nicht durchgeführt		1
400	200	1	nicht durchgeführt		2
800	550	1	nicht durchgeführt		4
2000	1600	1	nicht durchgeführt		6
7000	6000	1	nicht durchgeführt		8
200	100	10	2	1	0
200	100	10	2	1	1
400	200	10	2	1	2
800	550	10	2	1	4
2000	1600	10	2	1	6
7000	6000	10	2	1	8

Direkt nach der Bestrahlung wurde eine zuvor definierte Zellzahl auf 6 cm Schalen ausgesät, erneut mit LPS und/oder einen Inhibitor behandelt und für 10-14 Tage inkubiert (Tab. 4). Nach der Inkubation wurden die Kolonien zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und mit 70% Ethanol fixiert. Die gebildeten Kolonien wurden mit 0,1% Kristallviolett angefärbt. Jedes unabhängige Experiment besteht aus drei technischen Replikaten.

Nur Kolonien mit ≥ 50 Zellen wurden gezählt.

Die Fähigkeit zur Koloniebildung der drei verwendeten Zelllinien wurde anhand der *plating efficiency* (PE) und dem daraus berechneten relativen Überleben (Überlebensfraktion; englisch: *surviving fraction*; SF) ermittelt.

Die PE stellt dabei den Quotienten der Anzahl der Kolonien und der ausgesäten Zellzahl dar:

$PE = \text{Anzahl der Kolonien} / \text{ausgesäten Zellzahl}$

Mittels der PE kann die SF berechnet werden. Dazu wird der Quotient aus der PE der bestrahlten Zellen und der PE der unbestrahlten Zellen (Kontrolle) berechnet.

$SF = PE \text{ behandelte Zellen} / PE \text{ Kontrolle}$

Dadurch konnte mit Hilfe des linear-quadratischen Modelles (vgl. Einleitung) eine Überlebenskurve berechnet werden.

2.2.1.7. Behandlungen mit dem CREB binding protein Inhibitor ICG-001 und dem Epidermal growth factor Receptor Inhibitor AG1478

Der CBP-Inhibitor ICG-001 und der EGFR-Inhibitor AG1478 sind, wie vom Hersteller empfohlen, in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und verdünnt worden. Die Zellen wurden mit 2 μM ICG-001 oder 1 μM AG1478 1 h vor der Bestrahlung und nach der Bestrahlung im experimentellen Versuchsablauf behandelt. Zur Behandlung der Kontrollgruppen wurden nur die entsprechenden Mengen DMSO, ohne Inhibitor, verwendet.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. RNA-Isolation und real-time quantitative reverse transcription PCR

Zum Screening der Zellen und zur Quantifizierung der *TLR4* und *EGFR* mRNA wurde RNA isoliert und mittels real-time quantitative reverse Transkriptase PCR (RT-qPCR) untersucht.

Die RNA der Zellen wurde mittels des RNeasy Mini Kit nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mit einem NanoDrop gemessen. Die Reinheit der Probe konnte anhand der Ratio von 260/280 nm und 260/230 nm ermittelt werden.

Die cDNA wurde mit dem Reverser Transkriptase (RT) PCR-Kits von Bio-Rad, nach Angaben des Herstellers, synthetisiert. Nach der Herstellung der cDNA wurde diese 1:5 mit 80 µl DNase/RNase-freiem Wasser verdünnt.

Für die RT-qPCR wurden 1 µg cDNA, SYBR PCR Master Mix (BioRad) und 0,05 M forward/reverse Primer verwendet. Der hierfür verwendete Primermix wurde aus 10 µl forward Primer, 10 µl reverse Primer und 80 µl DNase/RNase-freiem Wasser hergestellt.

Die RT-qPCR ist wie in Hattar et al. (123) beschrieben durchgeführt worden. Jedes unabhängige Experiment besteht aus zwei technischen Replikaten.

Die RT-qPCR wurde mit dem CFX Connect Real-Time PCR Detection System unter folgenden Bedingungen ausgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 3 min; anschließend 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 10 s, Annealing bei 59°C für 10 s und Extension bei 72°C für 10 s. Um sicher zu stellen das Einzelprodukte gebildet wurden, wurde die Schmelzkurve generiert und der *Threshold cycle* (Ct-Wert) für jedes Expressionsprodukt ermittelt. Die relative mRNA Expression wurde als $-\Delta Ct$ Wert (Ct Wert gene of interest – Ct Wert Referenzgen [PBGD]) dargestellt.

2.2.2.2. Bestimmung der Primereffizienz

Zur Bestimmung der Primereffizienz wurden die Primer zunächst wie von Hersteller angegeben auf 100 pmol/µl verdünnt.

Die Primereffizienz der verwendeten Primer wurde mittels einer Verdünnungsreihe von 1 µg cDNA bis 1:1024 verdünnte cDNA bestimmt (Abb. 3). Die so verdünnte cDNA wurde in der RT-qPCR eingesetzt. Diese wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Zur Ermittlung der Primereffizienz wurden die Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der jeweiligen Konzentrationen aufgetragen. Die Steigung der sich ergebenden Geraden konnte durch lineare Regression berechnet werden. Über diese Steigung konnte die Primereffizienz ermittelt werden.

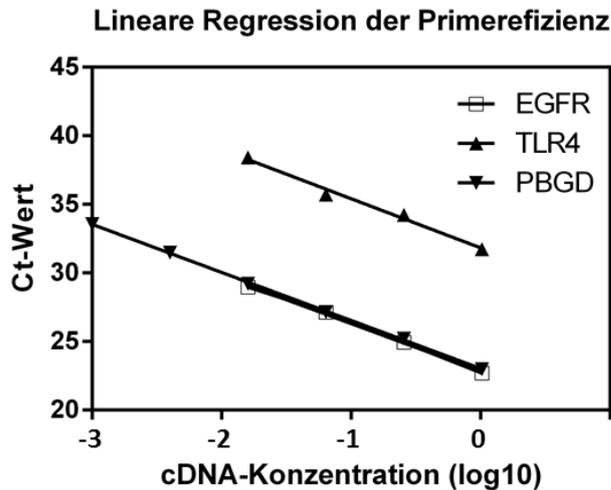


Abbildung 4: Lineare Regression der Primereffizienz der verwendeten Primer

Die lineare Regression der Primereffizienz wurde anhand einer Verdünnungsreihe mittels folgender Formel ermittelt:

$$E=10^{(-1/m)}$$

E = Effizienz

m = Steigung der Regressionsgraden

Die Primereffizienz liegt bei allen getesteten Primern bei ca. 2 (Tab. 2), somit erweisen sich alle verwendeten Primer als geeignet.

Tabelle 4: Primereffizienz der verwendeten Primer:

Genname	Abkürzung	Primereffizienz E
Toll-like receptor 4	TLR-4	1,9
Epidermal Growth Factor Receptor	EGFR	1,94
Porphobilinogen-Deaminase	PBGD	2,02

Die Länge der Basenpaare (bp) des Primerproduktes wurden mittels des QIAxcel Advanced System ermittelt (Abb. 4). Es wurde nach dem Protokoll von QIAGEN gearbeitet. Dazu wurde das QIAxcel Advanced System und das QIAxcel RNA QC Kit v2.0 verwendet. Zunächst wurden die Gelpatrone beladen und der Puffertank befüllt. Dann wurden die PCR-Produkte in eine 96-well Platte pipettiert.

Der Lauf der Proben wurde mittels der QIAxcel ScreenGel Software ausgewertet und die Nukleotidlängen sind bestimmt worden.

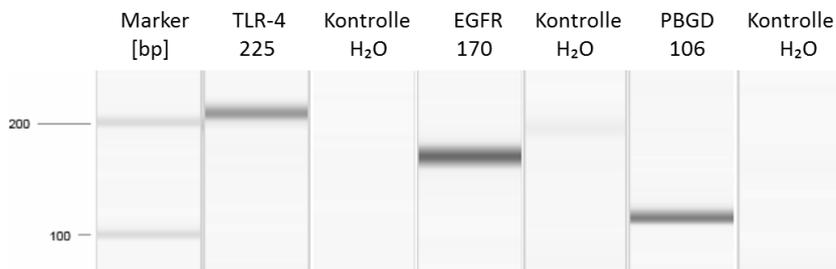


Abbildung 5: Bestimmung der Nukleotidlänge der Primerprodukte. Toll-like Receptor (TLR-4), Epidermal growth factor receptor (EGFR), Porphobilinogen deaminase (PBGD), Basenpaare (bp).

2.2.2.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration war für die Durchführung der Western Blots und zur Verrechnung der gemessenen Ergebnisse des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) von Bedeutung.

Die Proteinkonzentration ist mittels BCA Assay nach Protokoll des Herstellers bestimmt worden. Dazu wurden 25 µl des zuvor verdünnten Standards (2000-25 µg/ml und Blank 0 µg/ml) und 25 µl der zu messenden Proben auf eine 96-well-Platte aufgetragen, mit 200 µl der BCA Working Reagent (50:1 Reagenz A und B) gemischt und 30 s geschüttelt. Die abgedeckte Platte wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur (RT) konnte die Absorption bei 562 nm im ELx808 Absorptions-Reader gemessen und die Daten mittels Gen5™ Datenanalyse-Software analysiert. Dadurch konnte die einzusetzende Proteinkonzentration für die weiteren Versuche berechnet werden.

2.2.2.4. Messung der Interleukin-6 Freisetzung

Als Positivkontrolle der erfolgreichen LPS-Behandlung wurde in H1975 die Expression von IL-6 im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Nur wenn eine positive Expression von IL-6 nachgewiesen ist, wurden die Proben für die weitere Analyse verwendet. Zusätzlich wurde auch der Einfluss des CBP-Inhibitors (CBPi; ICG-001) auf die IL-6 Freisetzung untersucht.

Zur Analyse des freigesetzten IL-6 Gehaltes in den Überständen wurde 600.000 H1975 Zellen pro T25er ausgesät. Nach 24 h wurden sie mit 10 µg/ml LPS behandelt und nach 15 h, 1 h vor der Bestrahlung, ist ein Mediumwechsel auf 2% FCS mit und ohne 10 µg/ml LPS durchgeführt worden. Je nach Versuchsansatz wurde eine Behandlung mit 2 µM des CBPi durchgeführt. Nach 1 h wurden die Zellen mit 6 Gy bestrahlt.

24 h nach der Bestrahlung wurden die Überstände abgenommen und bei 250 x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration der ausgesäten Zellen mittels BCA, nach Angaben des Herstellers, gemessen.

Die Freisetzung des IL-6 der Zellen ist mittels eines direkten Sandwich ELISAs gemessen worden (124). Dazu wurde eine Immunoassayplatte mit mouse monoclonal anti-human IL-6 Antikörper in einer Konzentration von 4 µg/ml verdünnt in Diluent über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Morgen wurde die Platte zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und 1 h bei RT mit je 200 µl Diluent geblockt. Der Standard wurde mit Diluent verdünnt und in den Konzentrationen 2000 pg/ml bis 0 pg/ml (nur Diluent) aufgetragen. Die Proben wurden 1:5 verdünnt mit Diluent aufgetragen. Es sind je 100 µl Recombinant Human IL-6 Protein (Standard) oder verdünnte Probe eingesetzt worden. Nach 2 h wurde die Platte erneut zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 100 µl des Human/Primate IL-6 Biotinylated Antikörper (50 ng/ml) aufgetragen und 1 h bei RT inkubiert. Nach dem zweimaligen Waschen der Platte mit PBS wurde die Platte mit 100 µl HRP-konjugierten Streptavidin für 30 min inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 100 µl des ELISA Substrats. Nach ca. 10 min konnte die Reaktion mit 50 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt werden. Die Absorption wird bei 450 nm in einem ELx808 Absorptions-Reader gemessen und die Daten mittels Gen5™ Datenanalyse-Software analysiert. Der IL-6 ELISA ist sensitiv bis zu 15 pg/ml.

Das relative Expressionslevel wurde normalisiert zur Kontrolle dargestellt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse des ELISA mit der mittels BCA Protein Assay Reagent gemessenen Proteinkonzentration verrechnet, da es durch die Bestrahlung zu einem Absterben der Zellen kommen kann und dann die IL-6 Freisetzung nicht mehr der Anzahl der Zellen entsprechen würde.

2.2.2.5. Proteom Profiling - Untersuchung der durch LPS und Bestrahlung phosphorylierten Proteine

Zur Untersuchung der durch LPS und Bestrahlung phosphorylierten und aktivierten Proteine und zur Analyse möglicher Signalwege sind Proteom Profiling Arrays durchgeführt worden.

Die Proteom Profiling Arrays wurden mittels des Human Phospho-Kinase Antibody Array Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Dazu sind 600.000 H1975 Zellen in T25er Zellkulturflaschen ausgesät und 24 h später mit 10 µg/ml LPS behandelt worden. Wie zuvor beschriebene wurde 1 h vor Bestrahlung ein Mediumwechsel (RPMI mit 2% FCS und 1% P/S) durchgeführt und anschließend mit 6 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Protein Assay Reagent bestimmt. Es wurden 2000 µg je Zelllysate zu der zuvor geblockten Membran gegeben. Die Membran wurde mit einem Detektions-Antikörper und dann mit Streptavidin-HRP inkubiert. Das Signal wurde durch die Chemilumineszenzmethode mit dem VersaDoc Bio Rad ChemiDoc XRS+ detektiert. Zur Bestimmung der Densitometrie und zur Auswertung der Arrays ist die BioDocAnalyse Software verwendet worden. Das relative Expressionslevel wurde normalisiert zur Kontrolle dargestellt.

2.2.2.6. Western Blots

Western Blots sind zur Validierung des Ergebnisses des Proteom Arrays und im Rahmen der Immunoprecipitation verwendet worden.

Dazu wurden die SDS-PAGE mit dem TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 7.5% (für die Validierung des Proteom Arrays) und TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 10% (für die IP) von Bio-Rad verwendet. Die Gele wurden nach dem Protokoll des Herstellers gegossen und es wurden 2 µl TEMED und 10 µl APS pro 2 ml Sammelgel dazugegeben, sowie 3 µl TEMED und 30 µl APS pro 6 ml Trenngel. Es wurden je 30 ng Probe (außer bei der IP) und 7 µl Proteinmarker geladen. Das Gel lief anschließend bei 120 V für ca. 90 min.

Nach der SDS-PAGE wurde der Transfer der Proteine zu einer polyvinyl difluoride (PVDF) Membran durchgeführt. Das Nassblotten erfolgt bei 350 mA für 90 min auf Eis. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockierungslösung 1 h bei RT geblockt. Der jeweilige spezifische primäre Antikörper wurde bei 4°C schwenkend über Nacht inkubiert. Die Membran wurde dreimal für je 15 min mit Waschpuffer (TBS-T) gewaschen. Der

sekundäre Antikörper wurde für 1 h bei RT schwenkend inkubiert. Anschließend wurde die membran wieder dreimal mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurde ein ECL-System verwendet. Detektiert wurde das Chemolumineszenz Signal mittels VersaDoc, Bio Rad ChemiDoc XRS+. Zur Bestimmung der Densitometrie und die Auswertung des Western Blots wurde die BioDocAnalyze Software verwendet. Das relative Expressionslevel wurde normalisiert zur Kontrolle dargestellt.

2.2.2.6.1. Untersuchung und Validierung der Proteinexpression mittels Western Blot

Zur näheren Untersuchung und Validierung der durch den Proteom Profiling Arrays gefundenen Proteine wurden Western Blots durchgeführt. Dazu wurden 600.000 H1975 Zellen auf T25er Zellkulturflaschen ausgesät. Diese wurden mit 10 µg/ml LPS behandelt und mit 6 Gy bestrahlt (vgl. Proteom Profiling Array). Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Puffer 6 (aus dem Human Phospho-Kinase Antibody Array Kit) nach Angaben des Herstellers lysiert. Die Proteinkonzentration ist mittels BCA Protein Assay Reagent bestimmt worden. Es wurden 30 ng Protein in 30 µl ddH₂O verdünnt und mit 3 µl 10x Laemmlipuffer für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden auf ein 7,5%iges Gel aufgetragen und bei 120 V laufen gelassen. Der Western Blot ist wie zuvor beschrieben durchgeführt worden.

Der Nachweis der Proteine wurde über Nacht bei 4°C mit folgenden primären Antikörpern durchgeführt: anti-phospho-CREB phospho S311 (verdünnt 1:500), anti-CREB (verdünnt 1:500) und anti-beta-Actin rabbit mAb (verdünnt 1:2000). Dann wurde für 1 h bei RT mit einem HRP-Konjugierten sekundären Antikörper goat anti-rabbit IgG (verdünnt 1:2000) inkubiert. Die Immunodetektion ist mittels des ECL Systems durchgeführt worden. Das Signal wurde mittels Densitometrie quantifiziert. Das relative Expressionslevel ist normalisiert zur Kontrolle dargestellt.

Vor Detektion der Ladekontrolle (beta-Actin) wurde die Membran mittels Stripping Puffer 20 min lang „gestrippt“, dreimal mit TBS-T gewaschen, 1 h mit der Blockierungslösung inkubiert. Anschließend konnte wie zuvor beschrieben mit dem primäre Antikörper anti-beta-Actin rabbit mAb (verdünnt 1:2000) über Nacht bei 4°C inkubiert werden.

2.2.2.6.2. Immunoprecipitation

Die Immunoprecipitation (IP) dient dem Nachweis der Inhibitoraktivität. Es sollte nachgewiesen werden, dass die CBP Inhibition die Bindung zwischen pCREB und CBP verhindert und somit pCREB indirekt inhibiert wird.

Für die IP wurden 600.000 H1975 Zellen ausgesät und wie zuvor beschrieben mit 10 µg/ml LPS behandelt und mit 6 Gy bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl IP-Puffer mit 4 µl Complete™ (Mini Protease Inhibitor Cocktail) lysiert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 20 min bei 4°C rotierend Inkubation. Die Proben (>500 µg Protein) wurden auf 500 µl mit IP-Puffer aufgefüllt und mit 30 µl Protein A/G Plus-Agarose beads über Nacht bei 4°C rotierend vorgereinigt. Am nächsten Tag sind die Proben für 5 min bei 14.000 g zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt worden. Die Proben wurden mit 10 µl der Antikörper gegen Anti-KAT3A/CBP über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Zusätzlich ist noch eine Probe ohne Antikörper (blank) als Negativkontrolle mitgeführt worden. Nach der Inkubation mit dem Antikörper wurden 50 µl der Protein A/G Plus-agarose beads zu den Proben gegeben erneut und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Zur Reinigung wurden die Beads fünfmal für je 5 min bei 14.000 g und 4°C mit 1 ml IP-Puffer gewaschen. Die Proben wurden dann in 2x Laemmlipuffer mit 10% β-Mercaptoethanol und 20 mM DTT resuspendiert und für 10 min bei 95°C denaturiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot wie zuvor beschrieben nachgewiesen. Für die SDS-PAGE ist ein 10%iges Agarosegel verwendet worden.

Für den Western Blot wurde die Membran mit dem primären Antikörper anti-phospho-CREB (phosphoryliert S311) (verdünnt 1:500) oder Anti-KAT3A / CBP antibody - ChIP Grade (verdünnt 1:500) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Vor dem Einsatz des Anti-KAT3A / CBP antibody - ChIP Grade Antikörpers wurde die Membran mit Stripping Puffer für 30 min bei Raumtemperatur „gestrippt“, sodass die zuvor verwendeten Antikörper abgelöst wurden. Danach wurde die Membran erneut für 1 h mit Blockierungslösung geblockt. Der sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper goat anti-rabbit IgG (verdünnt 1:2000) wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Detektion der Proteine ist wie zuvor beschrieben durchgeführt worden. Das Signal wurde mittels Densitometrie ausgewertet. Das relative Expressionslevel wurde normalisiert zur Kontrolle dargestellt.

2.2.2.7. Immunfluoreszenzmikroskopie und Quantifikation der γ H2AX/53BP-1 Foci

Zur Untersuchung der durch Bestrahlung verursachten DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) wurden die residuelle γ H2AX/53BP-1 Foci mittels Immunofluoreszenz angefärbt und mikroskopisch ausgezählt.

Dafür sind die H1975 Zellen für 24 h auf Deckgläschen in 12-well-Platten ausgesät und anschließend mit 10 μ g/ml LPS behandelt worden. Bei den Zellen wurden, 15 h nach der LPS-Behandlung, 1 h vor der Bestrahlung, ein Mediumwechsel auf RPMI-Medium mit 2% FCS und 1% P/S mit oder ohne 10 μ g/ml LPS und mit oder ohne 2 mM ICG-001 durchgeführt. 16 h nach der initialen LPS-Behandlung der H1975 Zellen erfolgte die Bestrahlung mit 4 Gy.

Zur Analyse der residuelle γ H2AX/53BP-1 Foci wurden die Zellen 24 h nach der Bestrahlung zweimal mit PBS gewaschen und anschließen mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS für 10 min schwenkend bei RT gewaschen und bei 4°C bis zur eigentlichen Färbung gelagert.

Die fixierten Zellen wurden mit 0,2% Triton-X-100 in 1% BSA für 10 min permeabilisiert und mit 3% BSA 1 h geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 1 h bei RT. Es wurden folgende primäre Antikörper verwendet: Anti-phospho-Histone γ H2A.X (Ser139) clone JBW301/mouse (verdünnt 1:500) und 53BP1 anti-rabbit (verdünnt 1:500).

Die Zellen wurden dreimal mit 0,5% Tween-20/PBS für 10 min gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörpern anti-mouse Alexa-fluor 594 (verdünnt 1:800) und anti-rabbit Alexa-fluor 488 (verdünnt 1:1200) für 1 h inkubiert. Es wurden erneut dreimal gewaschen und mit ProLong Gold antifade reagent, welches DAPI zur Kernfärbung beinhaltet, eingedeckt.

Die Immunofluoreszenz wurde mit dem IX81 Mikroskops (Objektiv: 60x) und der Xcellence Software analysiert. Zur Analyse wurden z-stacked Bilder aufgenommen und die Foci wurden manuell am Mikroskop ausgezählt. Die Anzahl der residuellen DNA-DSB in den bestrahlten Gruppen wurde durch die Subtraktion des Hintergrundes der nicht-bestrahlten Kontrolle berechnet. Dieses Experiment ist dreimal durchgeführt worden und es wurden pro Probe mindestens 200 Nuklei ausgezählt.

2.2.3. Berechnungen und statistische Analysen

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (englisch: *standard errors of the mean*; SEM) für mindestens drei unabhängige Experimente, wenn nicht anders

angegeben, dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels einer one-way ANOVA, gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test berechnet. Unterschiede im p-Wert $< 0,05$ oder $\leq 0,01$ wurden als statistisch signifikant angesehen und im Graphen als Stern (*) dargestellt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Zugabe von verschiedenen LPS-Konzentrationen zu einer Veränderung der Ansprache auf die Bestrahlung in NSCLC Zelllinien führt. Des Weiteren wurde auf Proteinebene untersucht, welche Signalwege dabei involviert sein könnten. Dazu wurden Proteom Profiling Arrays (Phospho-Kinase Antibody Arrays) durchgeführt. Nach Bestätigung der Ergebnisse im Western Blot wurden mögliche Zielproteine inhibiert und die Auswirkung der Inhibition auf die Strahlensensibilität mit Hilfe von Koloniebildungsassays analysiert. Außerdem wurde die Anzahl und Veränderungen der durch Bestrahlung verursachten DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) nach der LPS-Behandlung und Inhibition untersucht.

3.1. Screening und Auswahl der verwendeten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien

Zunächst sollten geeignete NSCLC Zelllinien für die weiteren Versuche aufgrund ihres *TLR-4* und *EGFR* mRNA Status ausgewählt werden. Es ist bekannt, dass die LPS induzierten *TLR-4* Signalwege von einer Interaktion mit *EGFR* abhängig sind (101). Auf dieser Grundlage beruhend wurden die verwendeten Zelllinien ausgesucht.

Eine Auswahl von acht verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien (H226, A549, HCC827, H23, H1975, H460, H1299 und H520), die zu den NSCLC Zelllinien gezählt werden, wurden auf ihre *TLR-4* und *EGFR* Expression mittels RT-qPCR untersucht. Die mRNA Expression wurde als $-\Delta\text{Ct}$ -Wert dargestellt.

Zu Beginn wurde die *TLR-4* mRNA Expression untersucht. Die Zelllinien H226 und A549 hatten mit $-\Delta\text{Ct}$ -Werten von -7,21 und -7,25 die höchste *TLR-4* Expression, gefolgt von HCC827, H23 und H1975 mit $-\Delta\text{Ct}$ -Werten von -7,29, -7,55 und -7,69. Die Zelllinien H460, H1299 und H520 wiesen mit den $-\Delta\text{Ct}$ -Werten von -9,56, -9,61 und 10,20 die niedrigste *TLR-4* Expression auf (Tab. 5).

Neben der *TLR-4* mRNA Expression wurde auch die *EGFR* mRNA Expression untersucht. Die Zelllinie HCC827 wiesen mit einem $-\Delta\text{Ct}$ -Wert von 5,37 die höchste *EGFR* mRNA Expression auf, gefolgt von H226 mit einem $-\Delta\text{Ct}$ -Wert von 3,94. Die Zelllinie H1975 hatte einen $-\Delta\text{CT}$ -Wert von 2,63 und die Zelllinie H23 hatte einen $-\Delta\text{Ct}$ -Wert von 2,28. Die Zelllinie H1299 hatte einem $-\Delta\text{Ct}$ -Wert von 1,19 und die $-\Delta\text{Ct}$ -Werte der Zelllinien A549 und H460

lagen bei 0,60 und 0,49. Die Zelllinie H520 wies mit einem $-\Delta\text{Ct}$ -Wert von -8,20 die niedrigsten *EGFR* Expression auf (Tab. 5). Verglichen wurden dabei die verschiedenen NSCLC Zelllinien untereinander.

Anhand dieser Daten wurde folgende Zelllinien ausgewählt: A549 ist *EGFR* Wildtyp (125) und wies eine hohe *TLR-4* und mittlere *EGFR* mRNA Expression auf (Tab. 5). Bei H1975 handelt es sich um eine Zelllinie mit einer aktivierenden Doppelmutation in *EGFR* (L858R/T790M) (126). H1975 wies eine mittlere *TLR-4* und mittlere *EGFR* mRNA Expression auf (Tab. 5). Zusätzlich wurde noch H520 als Negativkontrolle ausgewählt. Diese Zelllinie wies nur eine geringe *EGFR* Expression auf und ist laut Literatur *EGFR* defizient (127) und besitzt eine kaum messbare schwache *EGFR* und auch eine schwache *TLR-4* mRNA Expression.

Tabelle 5: Basale mRNA Expression von *TLR-4* und *EGFR*, dargestellt als $-\Delta\text{Ct}$ -Wert (n = 3).

NSCLC Zelllinie	<i>TLR-4</i> $-\Delta\text{Ct}$ -Wert \pm SEM	<i>EGFR</i> $-\Delta\text{Ct}$ -Wert \pm SEM
H226	$-7,2 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,3$
A549	$-7,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$
HCC827	$-7,3 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,8$
H23	$-7,6 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,0$
H1975	$-7,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$
H460	$-9,6 \pm 1,3$	$0,5 \pm 0,1$
H1299	$-9,6 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$
H520	$-10,2 \pm 0,6$	$-8,2 \pm 0,6$

Somit sind für die folgenden Versuche drei NSCLC Zelllinien mit unterschiedlichem *EGFR* und *TLR-4* mRNA Status zur weiteren Untersuchung ausgewählt worden.

3.1.1. Die verwendeten LPS-Konzentrationen bewirkten keine Toxizität an H1975 Zellen

Um zu untersuchen, ob die verwendeten LPS-Konzentrationen toxisch auf die NSCLC Zelllinien wirken, wurde exemplarisch die H1975 Zellen mit 0, 0,1, 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS über 16 h, 16 h + 24 h und 16 h + 12 d inkubiert und mittels Trypanblaufärbung die Anzahl der toten Zellen am Mikroskop ausgezählt.

Die LPS-Behandlung über 16 h bewirkte bei keiner der verwendeten LPS-Konzentrationen den Tod der Zellen. Bei 16 h + 24 h LPS kam es nach der Behandlung mit 0 µg/ml LPS (Kontrolle) zu 1,28% toten Zellen (Tab. 6). Auch 0,1 µg/ml LPS bewirkte dass 1,23% der Zellen sterben, während unter höheren LPS-Konzentrationen keine toten Zellen quantifiziert werden konnten. Nach einer Inkubation von 16 h + 12 Tagen konnten nach der Behandlung mit 10 µg/ml LPS 1,15% tote Zellen gezählt werden. Keines der Ergebnisse ist statistisch signifikant (Tab. 6).

Tabelle 6: LPS Toxizität-Tests bei H1975 Zellen (n=3).

Zeit	Behandlung [µg/ml]	tote Zellen [%] mit SEM
16 h	0 LPS	0,0
	0,1 LPS	0,0
	1 LPS	0,0
	10 LPS	0,0
16 h + 24 h	0 LPS / 24 h	1,3 ± 1,8
	0,1 LPS / 24 h	1,2 ± 1,8
	1 LPS / 24 h	0,0
	10 LPS / 24 h	0,0
12 d	0 LPS / 12 d	0,0
	0,1 LPS / 12 d	0,0
	1 LPS / 12 d	0,0
	10 LPS / 12 d	1,2 ± 1,6

Anhand der Testung der Toxizität von LPS konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit 0,1, 1 und 10 µg/ml LPS mit keinem signifikant erhöhten Anstieg der toten H1975 Zellen korreliert. In den folgenden Versuchen konnte mit den ausgewählten LPS-Konzentrationen bei allen NSCLC Zelllinien weitergearbeitet werden.

3.2. Eine LPS-Behandlung zeigte keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion der untersuchten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem bakteriellen Endotoxin LPS aus dem gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) in der Zelllinie A549 die Proliferation stimuliert (108).

Daher war es zunächst wichtig zu kontrollieren, ob eine LPS-Behandlung zu einer gesteigerten Überlebensfraktion im Koloniebildungsassay führt. Dafür wurden die humanen Lungenkarzinomzelllinien A549, H1975 und H520 mit drei verschiedenen LPS-Konzentrationen (0,1, 1 oder 10 µg/ml) behandelt (Abb. 6).

Es konnte gezeigt werden, dass eine alleinige LPS-Behandlung mit 0,1, 1 und 10 µg/ml LPS mit keinem Anstieg der Überlebensfraktion bei den Zelllinien H1975, A549 und H520 korrelierte (Abb. 6B, 6C und 6D). Somit ist in keiner der drei Zelllinien ein Anstieg in der Anzahl der Kolonien beobachtet worden. Auch konnte kein Unterschied in der Größe der Kolonien zwischen der Kontrolle (0 µg/ml LPS) und der Gruppe mit der höchsten LPS-Konzentration (10 µg/ml) gezeigt werden (Abb. 6A).

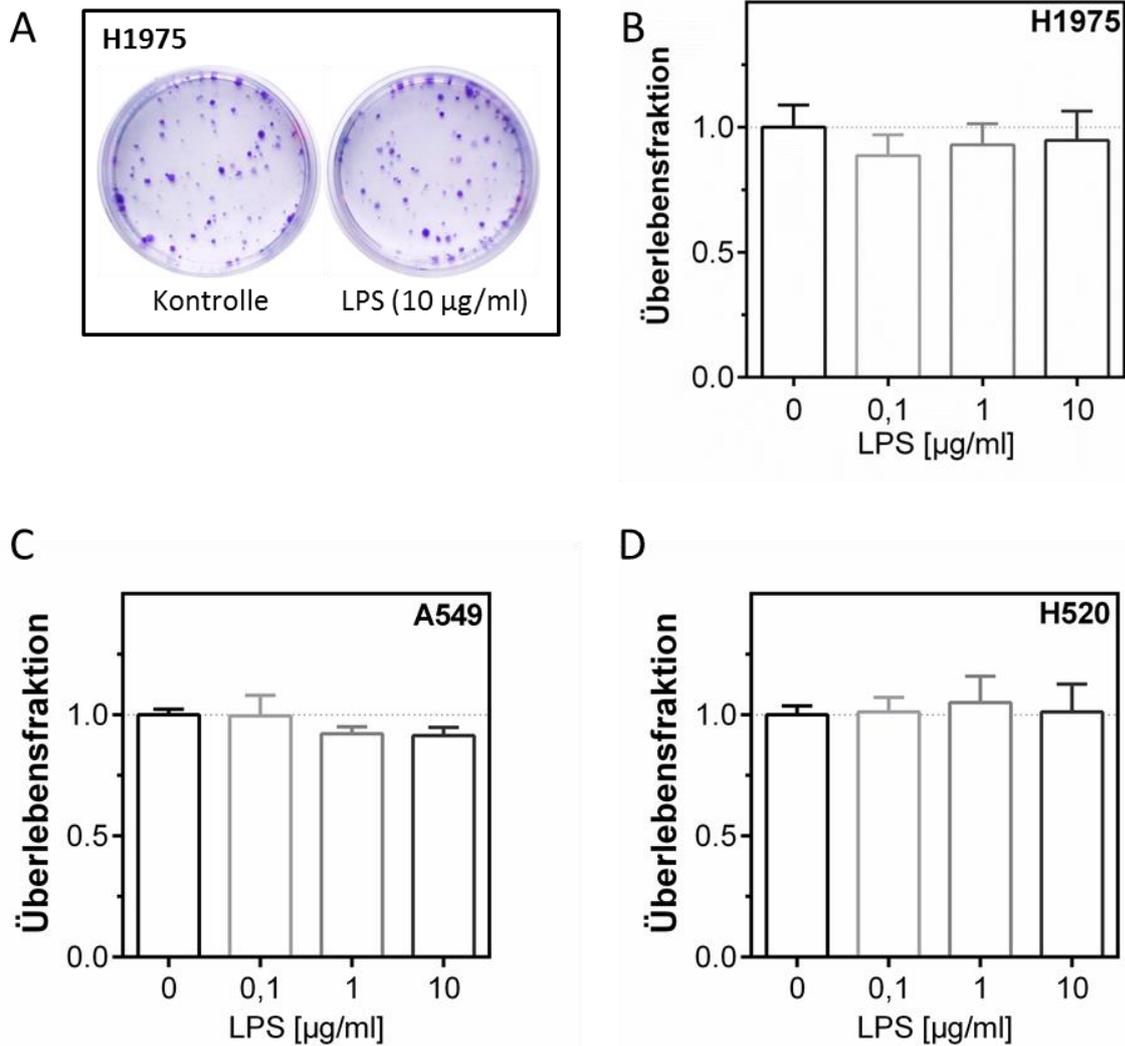


Abbildung 6: Eine LPS-Behandlung hatte keine Auswirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit. A) Repräsentative Abbildung der von H1975 Zellen gebildeten Kolonien, Kontrolle (0 µg/ml LPS) und nach LPS-Behandlung (10 µg/ml). B) Überlebensfraktion der H1975 Zellen, Kontrolle (0 µg/ml LPS) und nach LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml). C) Überlebensfraktion der A549 Zellen, Kontrolle (0 µg/ml LPS) und nach LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml). D) Überlebensfraktion der H520 Zellen, Kontrolle (0 µg/ml LPS) und nach LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet.

In diesen Versuchen konnte somit gezeigt werden, dass eine LPS-Behandlung keinen Einfluss auf die Überlebensfraktion der beiden humanen Adenokarzinomzelllinien A549 und H1975 und der humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie H520 hatte.

3.3. LPS induzierte eine Veränderung der Strahlenansprache in H1975 und A549, aber nicht in H520 Zellen

Nachdem zunächst gezeigt wurde, dass eine Behandlung mit dem bakteriellen Endotoxin LPS keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion der beiden humanen Adenokarzinomzelllinien A549 und H1975 und der Plattenepithelkarzinomzelllinie H520 hatte, sollte im Folgenden der Effekt von LPS auf die zelluläre Strahlensensitivität untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen LPS (0,1, 1 und 10 µg/ml) für 16 h inkubiert und anschließend bestrahlt (1, 2, 4, 6 und 8 Gy). Die so behandelten Zellen wurden zur Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit und der Strahlensensibilität für Koloniebildungsassays verwendet.

Eine Behandlung mit 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS korrelierte in der Zelllinie H1975 mit einer gesteigerten Überlebensfraktion nach der Bestrahlung mit 2, 4, 6 und 8 Gy. Die Bestrahlung mit 1 Gy hatte keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion nach der LPS-Behandlung. Eine erhöhte Überlebensfraktion konnte bei 1 µg/ml LPS und 10 µg/ml LPS beobachtet werden. Die Behandlung mit 0,1 µg/ml LPS bewirkte in H1975 keine Steigerung der Überlebensfraktion (Abb. 7A).

Ein Anstieg der Überlebensfraktion nach der LPS-Behandlung mit 1 µg/ml und 10 µg/ml wurde bei 6 Gy berechnet (Abb. 7B). Nach der LPS-Behandlung mit 0,1 µg/ml und Bestrahlung mit 6 Gy kam es zu einem nicht statistisch signifikanten Anstieg der Überlebensfraktion von 0,018 auf 0,027 (Abb. 7B, zweite Säule). Die Behandlungen mit 1 µg/ml LPS und 10 µg/ml LPS waren assoziiert mit einem signifikanten Anstieg von 0,018 auf 0,036 (Abb. 7B, dritte Säule) und von 0,018 auf 0,038 (Abb. 7B, vierte Säule). Tendenziell lag die Überlebensfraktion bei 6 Gy von 10 µg/ml LPS etwas höher als 1 µg/ml LPS, dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 7B, dritte und vierte Säule).

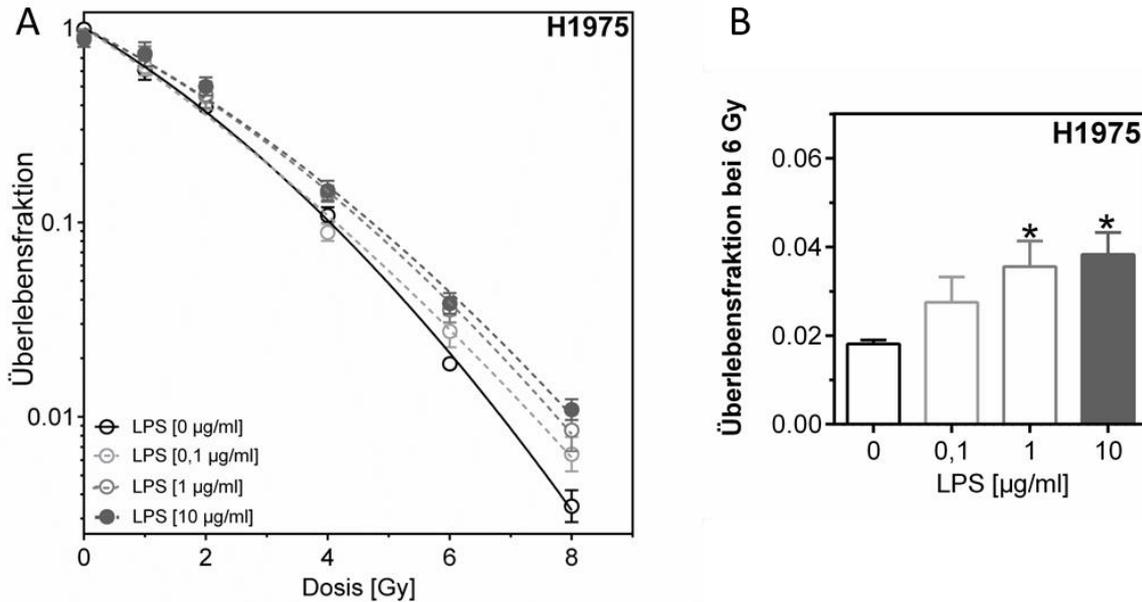


Abbildung 7: LPS induzierte eine Veränderung der Strahlensensibilität in H1975 Zellen. A) Überlebenskurve von H1975 Zellen nach der LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml) und Kontrolle (0 µg/ml LPS) nach Bestrahlung mit 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy. B) Überlebensfraktion der H1975 Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy und LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml) und Kontrolle (0 µg/ml LPS). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet.

Bei der Zelllinie A549 korrelierte eine LPS-Behandlung mit 0,1, 1 und 10 µg/ml nach der Bestrahlung 4, 6 und 8 Gy mit einer gesteigerten Überlebensfraktion (Abb. 8A). Die Bestrahlungen mit 1 Gy und 2 Gy hatten nach der LPS-Behandlung keine Auswirkungen auf die Überlebensfraktion. Eine Veränderung der Strahlenansprache war nach einer Behandlung mit 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS und 4, 6 und 8 Gy zu sehen (Abb. 8A). Dies konnte auch bei der Überlebensfraktion bei 6 Gy gezeigt werden (Abb. 8B). Bei einer Behandlung mit 0,1 µg/ml LPS kam es zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Überlebensfraktion bei 6 Gy von 0,042 auf 0,05 (Abb. 8B, zweite Säule). Auch war der Effekt von 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS auf die Überlebensfraktion bei 6 Gy tendenziell stärker ausgeprägt als bei 0,1 µg/ml LPS. Bei 1 µg/ml LPS konnte ein signifikanter Anstieg von 0,042 auf 0,078 und bei 10 µg/ml LPS von 0,042 auf 0,077 berechnet werden (Abb. 8B, dritte und vierte Säule). Die Überlebensfraktionen bei 6 Gy von 1 µg/ml und 10 µg/ml LPS lagen bei A549 auf dem gleichen Niveau (Abb. 8A und 8B).

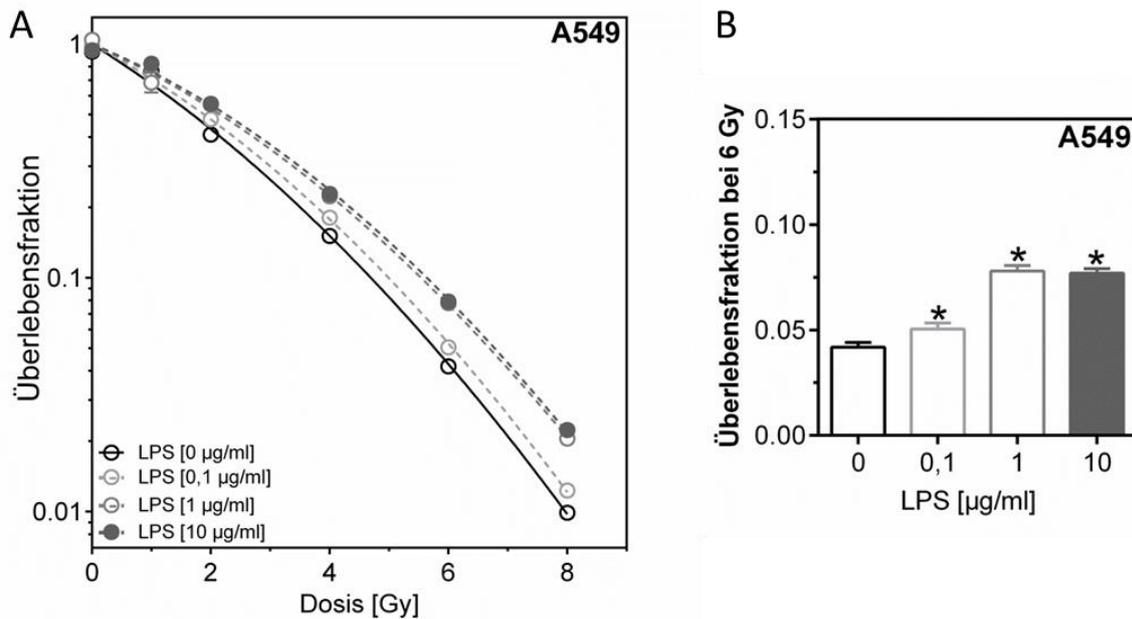


Abbildung 8: LPS induzierte eine Veränderung der Strahlensensibilität in A549 Zellen. A) Überlebenskurve von A549 Zellen nach der LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml) und Kontrolle (0 µg/ml LPS) nach der Bestrahlung mit 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy. B) Überlebensfraktion der A549 Zellen nach der Bestrahlung mit 6 Gy und LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml) und Kontrolle (0 µg/ml LPS). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet.

Im Gegensatz zu den beiden untersuchten Adenokarzinomzelllinien H1975 und A549 zeigte die Plattenepithelkarzinomzelllinie H520 keinen Anstieg der Überlebensfraktion nach der LPS-Behandlung mit 0,1, 1 und 10 µg/ml und Bestrahlung mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy (Abb. 7, 8 und 9). Die errechneten Überlebenskurven nach LPS-Behandlung und Bestrahlung liegen auf dem Niveau der Kontrolle (0 µg/ml LPS) (Abb. 9A). Auch die Überlebensfraktion bei 6 Gy zeigte keinen Unterschied in den einzelnen Behandlungen und im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9B). Die Anzahl der Kolonien und die dadurch berechnete Überlebensfraktion sind vom Niveau her niedriger als bei A549 (Abb. 9B und 8B) und mit 0,019 auf dem Niveau von H1975, das heißt die Zelllinie H520 bildet so viele Kolonien wie H1975, aber weniger als A549 (Abb. 9B und 7B).

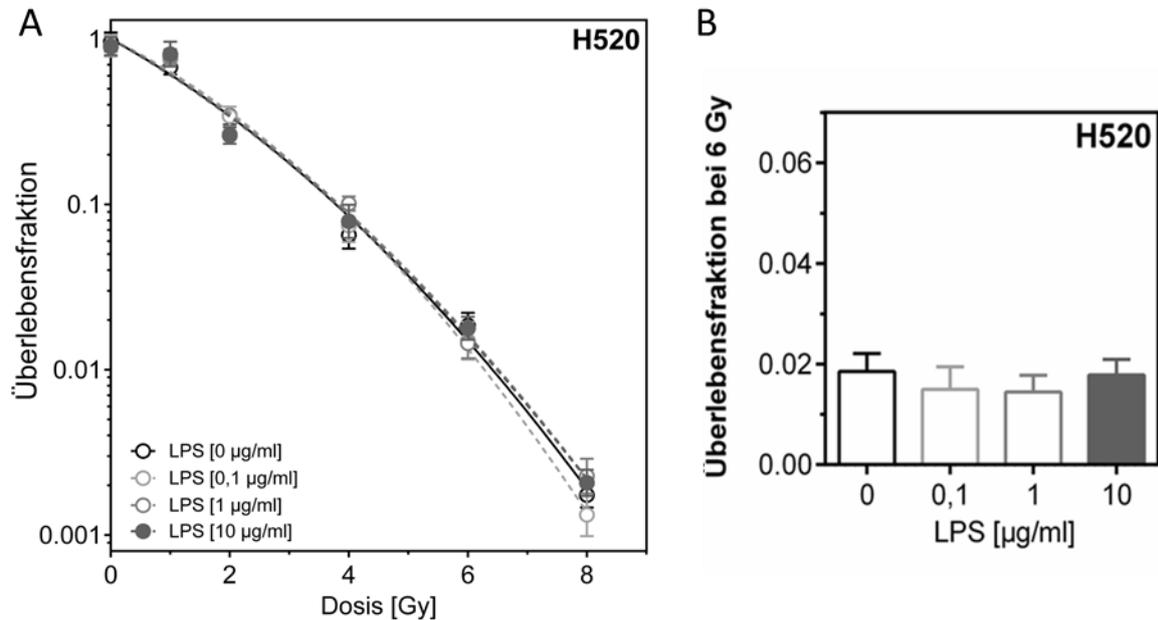


Abbildung 9: LPS induzierte keine Veränderung der Strahlensensibilität in H520 Zellen. A) Überlebenskurve von H520 Zellen nach der LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml) und Kontrolle (0 µg/ml LPS) nach der Bestrahlung mit 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy. B) Überlebensfraktion der H520 Zellen nach der Bestrahlung mit 6 Gy und LPS-Behandlung (0,1, 1 und 10 µg/ml) und Kontrolle (0 µg/ml LPS). Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei H1975 als auch in A549 eine Behandlung mit 1 µg/ml und 10 µg/ml mit einer erhöhten Überlebensfraktion bei 6 Gy assoziiert ist (Abb. 7 und 8). Dabei ist die Ansprache auf die LPS-Behandlung am stärksten ausgeprägt bei den höheren LPS-Konzentrationen (1 und 10 µg/ml) und höheren Bestrahlungsdosen (2, 4, 6 und 8 Gy) (Abb. 7 und 8). Dieser Effekt konnte nicht für die Zelllinie H520 nachgewiesen werden. Diese Zelllinie zeigte keine Veränderung der Ansprache auf Bestrahlung nach der LPS-Behandlung (Abb. 9).

3.3.1. Auswahl der geeigneten Proben für ein Phospho-Kinase Antibody Array

Um die der modulierten Strahlenansprache zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen, wurden in den folgenden Experimenten nur mit der Zelllinie H1975 gearbeitet, da diese bei 6 Gy und 10 µg/ml LPS eine Verdoppelung der Überlebensfraktion von 0,018 auf 0,036 zeigte (Abb. 2B). Somit wurde in den folgenden Versuchen (Ausnahme DNA-DSB Untersuchungen) auch nur noch mit 6 Gy und 10 µg/ml LPS gearbeitet. Um mögliche involvierte Signalwege zu finden und diese näher zu untersuchen, sind Proteom Profiling

Arrays (Phospho-Kinase Antibody Arrays) durchgeführt worden. Diese erlauben die Quantifizierung der Phosphorylierung der verschiedenen untersuchten Proteine.

Zusätzlich dazu wurde als Positivkontrolle die Reaktion auf die LPS-Behandlung durch Quantifizierung von IL-6 mittels eines IL-6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) untersucht.

Die Untersuchung der IL-6 Freisetzungen zeigte, dass es nach einer Bestrahlung mit 6 Gy zu keinem statistisch signifikanten Anstieg der IL-6 Freisetzung kommt (Abb. 10, zweite Säule). Die Behandlung mit 10 µg/ml LPS bewirkt einem fünffachen Anstieg der relativen IL-6 Freisetzung in H1975 Zellen (Abb. 10, dritte Säule). Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte mit einem weiteren signifikanten Anstieg der IL-6 Freisetzung im Vergleich zu alleinigen LPS-Behandlung (Abb. 10, dritte und vierte Säule).

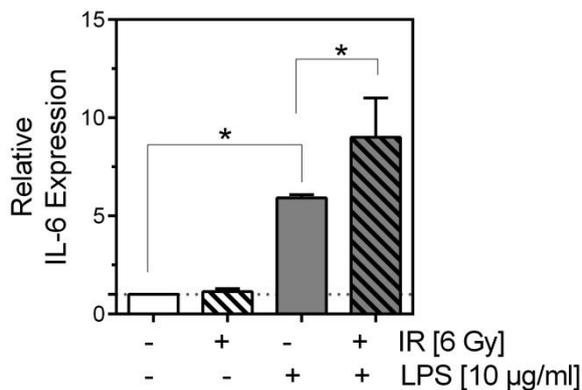


Abbildung 10: Die LPS-Behandlung korrelierte mit einer verstärkten Freisetzung von IL-6 in H1975 Zellen. Mittels ELISA gemessene IL-6 Freisetzung von H1975 Zellen Kontrolle (0 µg/ml LPS) und nach LPS-Behandlung (10 µg/ml) mit und ohne Bestrahlung (6 Gy) normalisiert auf Kontrolle. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,01$. IR = Irradiation (Bestrahlung). Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet.

Im ELISA konnte bestätigt werden, dass alle Proben auf die LPS-Stimulation mit einem signifikanten Anstieg von freigesetztem IL-6 reagierten und sich somit für den Einsatz im Human Phospho-Kinase Antibody Array eignen.

3.4. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte mit einer Hochregulation der Phosphorylierung des cAMP response element-binding protein und einigen Mitgliedern der Src family kinases

Mit dem Human Phospho-Kinase Antibody Array Kit sollten im Folgenden Proteine gefunden werden, deren Phosphorylierung durch LPS und Bestrahlung reguliert werden. Alle Behandlungen wurden im Folgenden mit der unbehandelten Kontrolle verglichen.

Die Proteom Profiling Arrays zeigten, dass eine Änderung der Phosphorylierung bei vielen Proteinen schon durch eine Bestrahlung oder einer LPS-Behandlung alleine zu beobachten ist. Nachfolgend werden die am stärksten ausgeprägten Änderungen des relativen Phosphorylierungslevels von für die Strahlentherapie relevanten Proteinen gezeigt:

3.4.1. Veränderung der Phosphorylierung von für die Strahlentherapie relevanten Proteinen nach LPS-Behandlung und Bestrahlung

Die Extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2 zeigten nach der Bestrahlung einen Anstieg des relativen Phosphorylierungslevels an T202/Y204 und T185/Y187 um 70%. Eine alleinige LPS-Behandlung führte in H1975 Zellen zu einer Runterregulation des Phosphorylierungslevels von ERK1/2 um 30%. Die Kombination von Bestrahlung und LPS bewirkte keiner Änderung der Phosphorylierung (Abb. 11A).

Bei dem Protein Focal adhesion kinase (FAK), der Serin/Threonine-Protein Kinase Chk-2, dem Proto-Onkogen Yes, dem Protein Target of rapamycin (TOR), den Kinasen Signal transducer and activator of transcription (STAT)-2 und -5a, sowie der Tyrosin Kinase Src wurden nach der alleinigen Bestrahlung eine Erhöhung des Phosphorylierungslevels gemessen. Die alleinige LPS-Behandlung korrelierte bei diesen Proteinen mit einer Reduktion der Phosphorylierung (Abb. 11A und B).

Dabei kam es nach der Bestrahlung zu einem Anstieg des Phosphorylierungslevels von FAK an Y397 um 30%. Im Gegensatz dazu verringerte die alleinige LPS-Behandlung das Phosphorylierungslevel um 30%. Die Kombination aus LPS und Bestrahlung korrelierte mit einem Anstieg des Phosphorylierungslevels um 70% (Abb. 11A).

Bei Chk-2 kam es nach der Bestrahlung zu einem Anstieg des Phosphorylierungslevels an T68 um 140%. Die LPS-Behandlung alleine reduzierte das Phosphorylierungslevel um 35%. Die Kombinationsbehandlung korrelierte mit einem Anstieg um 140%.

Bei TOR kam es nach der Bestrahlung alleine und auch nach der Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung zu einem Anstieg des Phosphorylierungslevels an S2448 um je 50%. Die LPS-Behandlung reduzierte das Phosphorylierungslevel um 20% (Abb. 11A).

Bei STAT2 korreliert die Bestrahlung mit einem Anstieg des Phosphorylierungslevels an Y689 um 80%. Die LPS-Behandlung alleine führte zu einem Anstieg um 10%. Die Kombinationsbehandlung korrelierte mit einem Anstieg um 20% (Abb. 11 B).

Bei STAT5a bewirkte die Bestrahlung alleine und die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung einen Anstieg des Phosphorylierungslevels an Y694 um 20% und 15%. Die LPS-Behandlung reduzierte das Phosphorylierungslevel um 40% (Abb. 11 B).

Bei dem Proteinkinase Src korrelierten sowohl die alleinige Bestrahlung als auch die Kombination aus LPS und Bestrahlung mit einem Anstieg des Phosphorylierungslevels an Y419 um 55% und 40%. Die LPS-Behandlung alleine reduzierte das Phosphorylierungslevel um 30% (Abb. 11B).

Bei Yes kam es nach der alleinigen Bestrahlung zu einer Zunahme des Phosphorylierungslevels an Y426 um 40%. Eine alleinige LPS-Behandlung bewirkte eine Abnahme um 40%. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung führte zu keiner Änderung des Phosphorylierungslevels (Abb. 11 B).

Bei der Proteinkinase p38alpha und Kinase Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 und 2 (MSK1/2) kam es sowohl durch die alleinige Bestrahlung als auch die Kombination von LPS-Behandlung und Bestrahlung zu einer Zunahme der Phosphorylierung. Jedoch führte die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung hier zu einer Abnahme des relativen Phosphorylierungslevels.

Bei p38alpha korrelierte eine alleinige Bestrahlung mit einer Zunahme um 70% und die Kombinationsbehandlung mit einer Zunahme des Phosphorylierungslevels an T180/Y182 um 90%. Die LPS-Behandlung bewirkte bei p38alpha eine Abnahme des Phosphorylierungslevels um 10% (Abb. 11A).

Bei MSK1/2 korrelierten die alleinige Bestrahlung mit einer Zunahme um 95% und die Kombinationsbehandlung mit einer Zunahme des Phosphorylierungslevels an S376/S360 um 160%. Die LPS-Behandlung alleine steigerte das Phosphorylierungslevel um 20% (Abb. 11 A).

Ebenfalls führte eine alleinige LPS-Behandlung zu einer erhöhten Phosphorylierung von c-Jun an der Stelle S63. Auch Lysine deficient protein kinase 1 (WNK1) und p53 wiesen nach der LPS-Behandlung eine verstärkte Phosphorylierung auf (Abb. 11A und B).

Bei c-Jun konnte nach der Bestrahlung keine Änderung des Phosphorylierungslevels an S63 gemessen werden. Die LPS-Behandlung alleine verstärkte das Phosphorylierungslevel um 60%. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung verringerte das Phosphorylierungslevel um 65% (Abb. 11A).

Bei WNK1 verringerte die alleinige Bestrahlung das Phosphorylierungslevel an T60 um 20%. Dahingegen bewirkte die LPS-Behandlung eine Zunahme um 20%. Die Kombinationsbehandlung korrelierte mit einer Reduktion des Phosphorylierungslevels um 80% (Abb. 11B).

Bei p53 wurden die drei verschiedene Phosphorylierungsstellen S15, S392 und S46 untersucht. Bei p53 S15 bewirkte die alleinige Bestrahlung einen Anstieg des Phosphorylierungslevels um 15%. Nach der LPS-Behandlung kommt es zu einer Zunahme um 30%. Die Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung korrelierte mit einer Reduktion des Phosphorylierungslevels um 50%.

Bei p53 S392 bewirkte die Bestrahlung eine Änderung des Phosphorylierungslevels um 25%. Die LPS Behandlung bewirkte eine Zunahme um 60%. Nach der Kombination aus LPS und Bestrahlung kam es zu einer Abnahme des Phosphorylierungslevels um 20%.

Bei p53 S46 bewirkte die Bestrahlung alleine keine Änderung des Phosphorylierungslevels. Nach der alleinigen LPS-Behandlung kam es zu einer Steigerung um 20%. Die Kombinationsbehandlung korrelierte mit einer Reduktion des Phosphorylierungslevels um 40% (Abb. 11B).

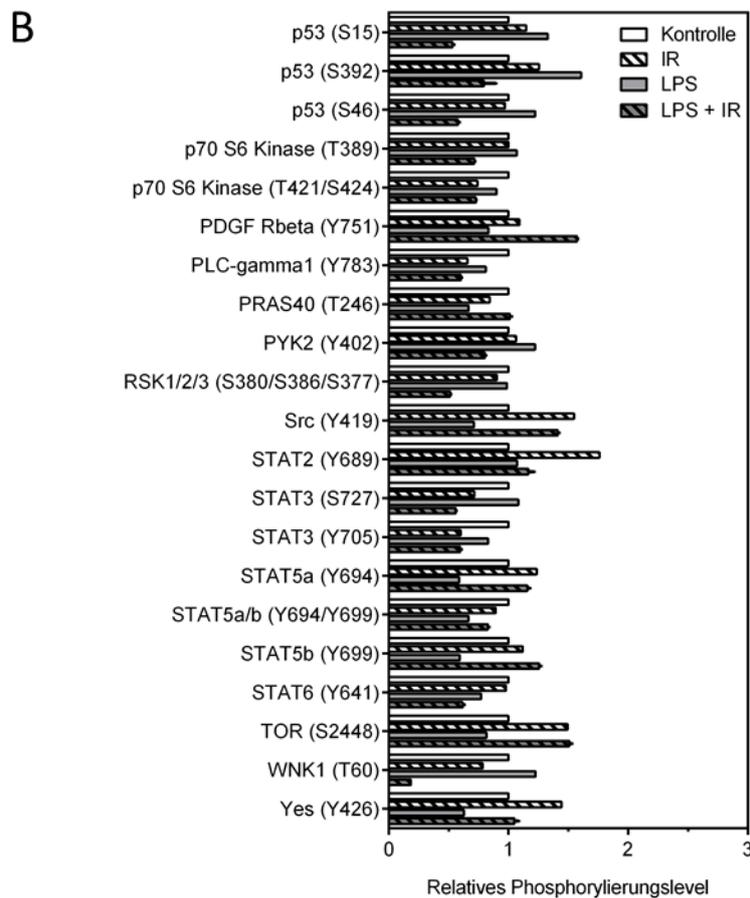
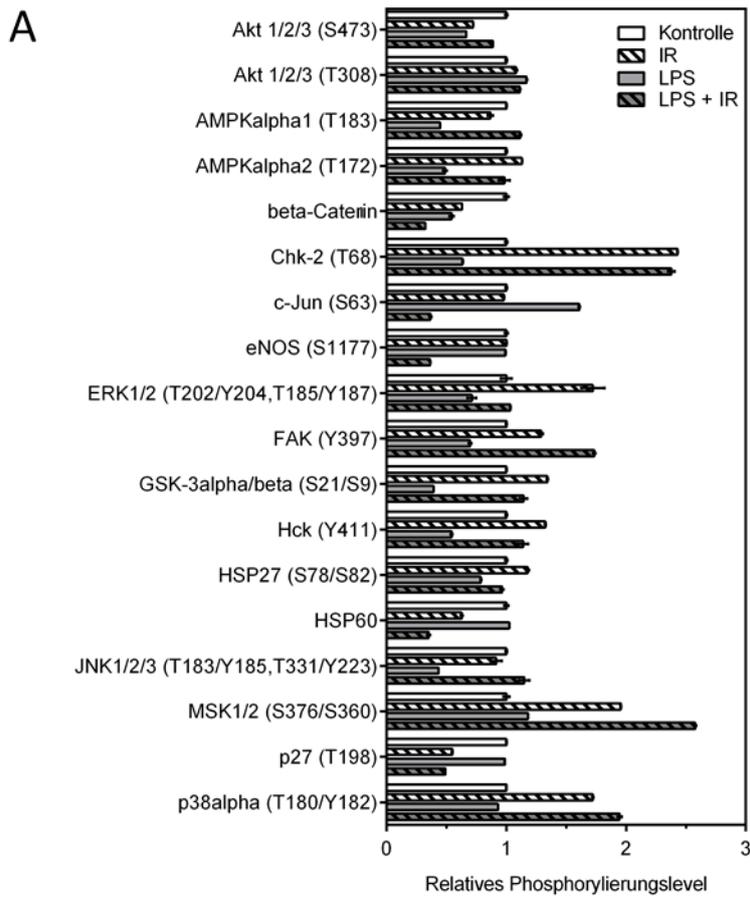


Abbildung 11: Quantitative Analyse des Phosphorylierungslevels der untersuchten Proteine des Proteom Profiling Arrays von H1975 Zellen 24 h nach der Behandlung mit 10 µg/ml LPS und Bestrahlung (IR) mit 6 Gy. A) Phosphorylierte Proteinkinasen alphabetisch angeordnet von A bis P. B) Phosphorylierte Proteinkinasen alphabetisch angeordnet von P bis Y. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, n = 2.

3.4.2. Hochregulation der Src- und cAMP response element-binding protein-abhängigen Signalwege nach der kombinierten Behandlung von LPS und Bestrahlung

Nach der Kombinationsbehandlung in H1975 Zellen zeigten nur wenige Proteine, im Vergleich zu den Einzelbehandlungen, eine Verdopplung des Phosphorylierungslevels. Eine Verdopplung des Phosphorylierungslevels, nach der Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung, konnte bei den folgenden Proteinen gezeigt werden: cAMP response element-binding protein (CREB) an S133, Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck) an Y394, Tyrosinekinase Fyn (Fyn) an Y420 and Tyrosinekinase Fgr (Fgr) an der Stelle Y412 (Abb.12 A und B).

Bei Lck bewirkte die alleinige Bestrahlung eine Zunahme des Phosphorylierungslevels um 30%. Die LPS-Behandlung reduzierte das Phosphorylierungslevel um 30%. Die Kombinationsbehandlung hingegen korrelierte mit einer Steigerung des relativen Phosphorylierungslevels um 150% (Abb. 12A und B).

Fyn zeigte nach der alleinigen Bestrahlung eine Zunahme des Phosphorylierungslevels um 30%. Die LPS-Behandlung resultierte in einer Reduktion um 60%. Die Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung korrelierte mit einer Zunahme des Phosphorylierungslevels um 170% (Abb. 12 A und B).

Bei Fgr bewirkte die Bestrahlung eine Zunahme um 50%. Die LPS-Behandlung reduzierte das Phosphorylierungslevel um 20%. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung ist assoziiert mit einer Zunahme des Phosphorylierungslevels um 270% (Abb. 12A und B).

CREB zeigte nach der alleinigen Bestrahlung eine Zunahme des Phosphorylierungslevels um 50%. Die LPS-Behandlung bewirkte eine Reduktion des Phosphorylierungslevels um 10%. Die Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung korrelierte mit einer Zunahme des Phosphorylierungslevels um 200%, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 12A und B).

Die Tyrosine-protein Kinase Lyn zeigte nach der Bestrahlung eine Abnahme des Phosphorylierungslevels an Y397 um 20%. Nach der LPS-Behandlung konnte eine Zunahme des Phosphorylierungslevels um 25% gemessen werden. Die Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung korrelierte mit einem Anstieg des Phosphorylierungslevels um 40% (Abb. 12A und B).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass nach der Bestrahlung mit 6 Gy eine Zunahme des Phosphorylierungslevels von EGFR an Y1086 um 50% zu verzeichnen war. Die LPS-Behandlung bewirkte eine Steigerung des Phosphorylierungslevels um 10%. Die Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung korrelierten mit einer Zunahme des Phosphorylierungslevels um 70% (Abb. 12A und B). Da bekannt ist, dass eine Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen zu einer Phosphorylierung von EGFR führt (117) wurde die Hemmung von EGFR als Kontrolle in Inhibitionsversuchen eingesetzt.

Für alle anderen untersuchten Proteine konnte keine Verdopplung oder Verdreifachung des relativen Phosphorylierungslevels nach der Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung, im Vergleich zur Kontrolle, beobachtet werden (Abb. 11A und B).

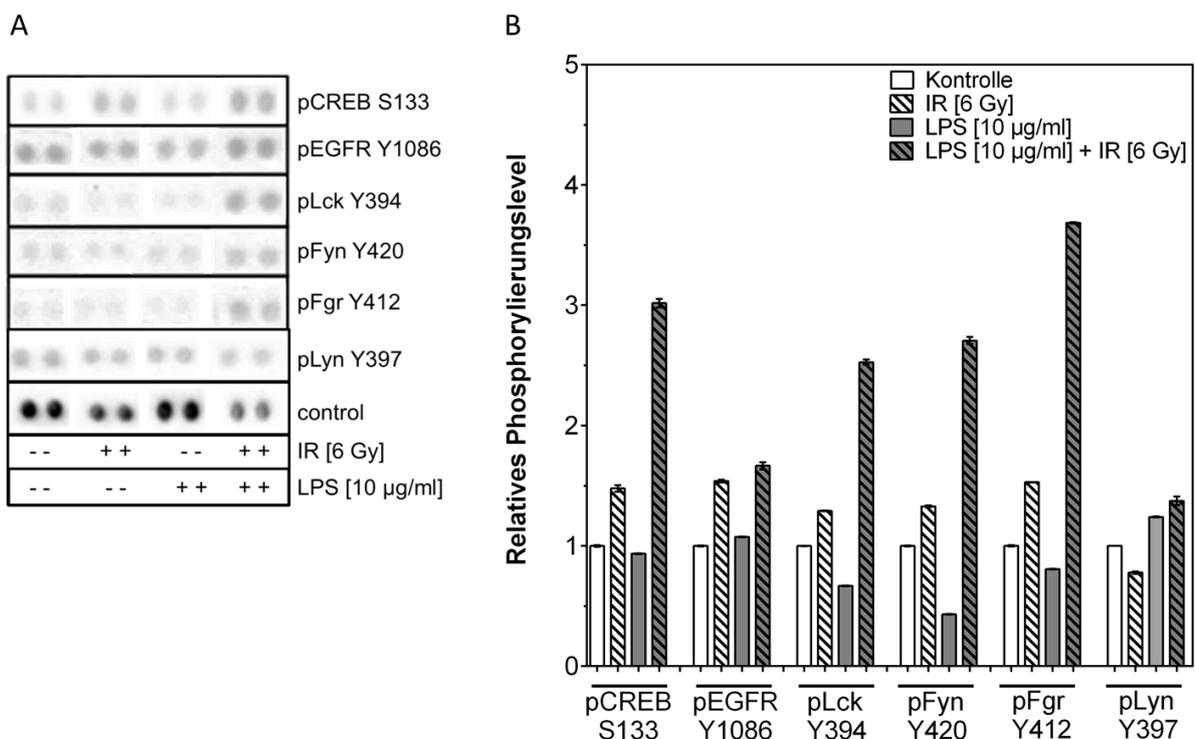


Abbildung 12: Die Kombination von LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte mit einem Anstieg des Phosphorylierungslevels von CREB (pCREB) in H1975 Zellen. A) Repräsentative Abbildung der phosphorylierten Formen von CREB (pCREB), EGFR (pEGFR), Lck (pLck), Fyn (pFyn), Fgr (pFgr), Lyn (pLyn) und der Kontrolle eines Proteom Arrays von H1975 Zellen nach der Verwendung des Human Phospho-Kinase Antibody Array Kits (Proteom Profiling Array) 24 h nach der Behandlung mit oder ohne 10 µg/ml LPS und Bestrahlung mit 0 oder 6 Gy. B) Quantitative Analyse des Human Proteom Profiling Arrays. Dargestellt als Mittelwert ± SEM, n = 2. IR = Irradiation (Bestrahlung).

Bei den Kinasen Lck, Fyn und Fgr handelt es sich um Mitglieder der Src family kinases (SFK) (128). Diese liegen alle *upstream* von CREB. Daher und weil CREB einen Anstieg der

Phosphorylierung um 200% nach der Kombination aus LPS und Bestrahlung zeigte wurde der Fokus der folgenden Versuche auf CREB gelegt.

Zur Verifizierung der Daten wurde in Western Blots die Phosphorylierung von CREB an S133 bestätigt (Abb. 13A und B). Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit LPS alleine oder mit Bestrahlung alleine zu keiner signifikanten Änderung der Phosphorylierung von CREB führte. Die kombinierte Behandlung aus LPS und Bestrahlung korrelierte mit einem signifikanten Anstieg der Phosphorylierung an S133 von CREB in H1975 Zellen (Abb. 13A und B).

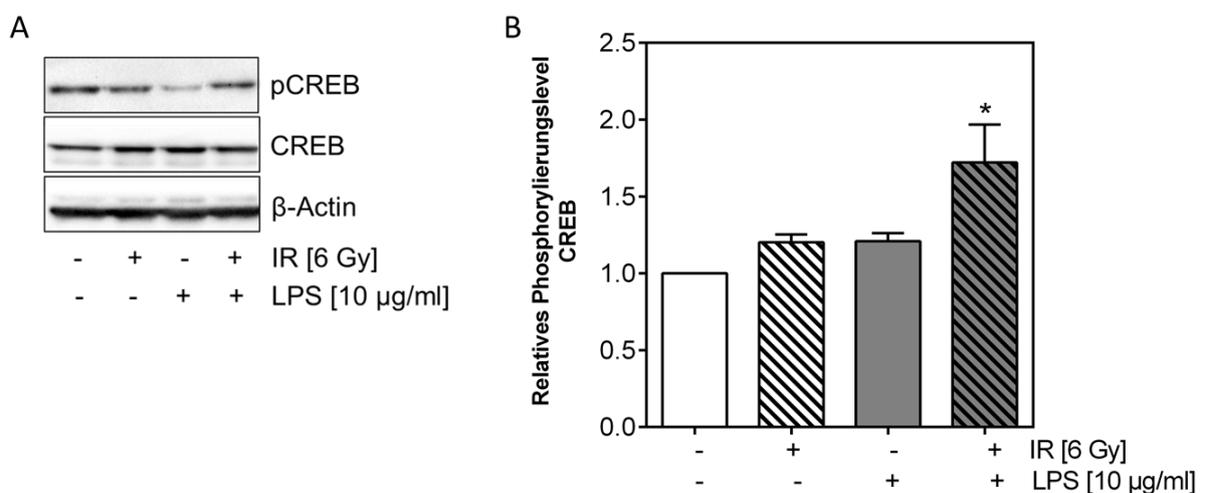


Abbildung 13: Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte mit einer Hochregulation von phosphoryliertem CREB (pCREB). A) Repräsentativer Western Blot von pCREB und CREB von LPS behandelten (10 µg/ml) und unbehandelten H1975 Zellen nach der Bestrahlung mit 0 und 6 Gy, 24 h nach der Behandlung. β-Actin wurde als Ladekontrolle mitgeführt. B) Densitometrische Auswertung der pCREB Banden nach der Normalisierung zur Kontrolle. H1975 Zellen nach der LPS-Behandlung und/oder Bestrahlung sind dargestellt als +/- . Densitometrische Daten wurden auf die Kontrolle normalisiert und als Mittelwert ± SEM, n≥3, * p<0,05 im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. IR = Irradiation (Bestrahlung).

Da es zu einer signifikant verstärkten Phosphorylierung von CREB nach der Kombinationsbehandlung mit LPS und Bestrahlung kam, eignet sich CREB als mögliches Zielprotein zur Untersuchung des LPS-Einflusses auf die Strahlensensitivität der H1975 Zellen.

3.5. Die Inhibition des CREB-binding protein bewirkte eine Veränderung der Strahlensensibilität nach der LPS-Behandlung

Um zu untersuchen, ob pCREB unter LPS die Strahlensensitivität beeinflusst, wurde der spezifische CREB-binding protein (CBP)-Inhibitor ICG-001 (CBPi) verwendet (129), um somit pCREB indirekt zu inhibieren.

Zur Untersuchung der Inhibitoren wurden H1975 Zellen zunächst mit 10 µg/ml LPS behandelt, die entsprechende Inhibitoren zugegeben und bestrahlt.

Um den Effekt des CBPi zur indirekten Inhibierung von pCREB zu validieren, wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Mittels dieser sollte die Wirkung des CBPi auf pCREB nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass der CBPi bewirkt, dass pCREB und CBP nicht mehr binden können und es somit zu einer indirekten Inhibition von pCREB nach der LPS-Behandlung mit 10 µg/ml und Bestrahlung bei 6 Gy kommt (Abb. 14).

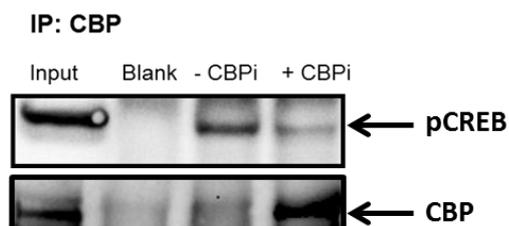


Abbildung 14: Die Inhibition des CREB-binding protein (CBP). Repräsentative Abbildung der Immunpräzipitation (IP) gegen CBP gefolgt von einem Western Blot gegen pCREB und CBP in H1975 Zellen 24 h nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung mit 6 Gy mit oder ohne ICG-001 (CBPi) (2 µM), dargestellt als +/- . CREB, cAMP response element-binding protein; CBP, CREB binding protein.

Zum Ausschluss einer alleinigen Aktivität der eingesetzten Inhibitoren auf unbehandelte H1975 Zellen, wurden unbestrahlte H1975 Zellen jeweils mit CBPi und EGFRi behandelt. Dabei diente der EGFR Inhibitor AG1478 (EGFRi) (130) als interne Kontrolle. Beide Inhibitoren wurden zusätzlich unter LPS Einfluss getestet. Durch Quantifizierung der Überlebensfraktion sollte der Einfluss der beiden Inhibitoren auf LPS behandelte und unbehandelte H1975 Zellen untersucht werden. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen nur mit LPS behandelt. Die alleinige LPS-Behandlung hat keinen Einfluss auf die Überlebensfraktion (Abb. 15, zweite Säule).

Weiter haben weder der CBPi noch der EGFRi eine Auswirkungen auf die Überlebensfraktion von unbestrahlten H1975 Zellen (Abb. 15, dritte und fünfte Säule). Auch haben die Inhibitoren keinen Einfluss auf das klonogene Überleben nach alleiniger LPS-

Behandlung (Abb.15, vierte und sechste Säule) und konnten in den vorliegenden Konzentrationen als spezifische Inhibitoren eingesetzt werden.

Beide Inhibitoren hatten auch keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion unter der Bestrahlung mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy (Anhang, Abb. 19).

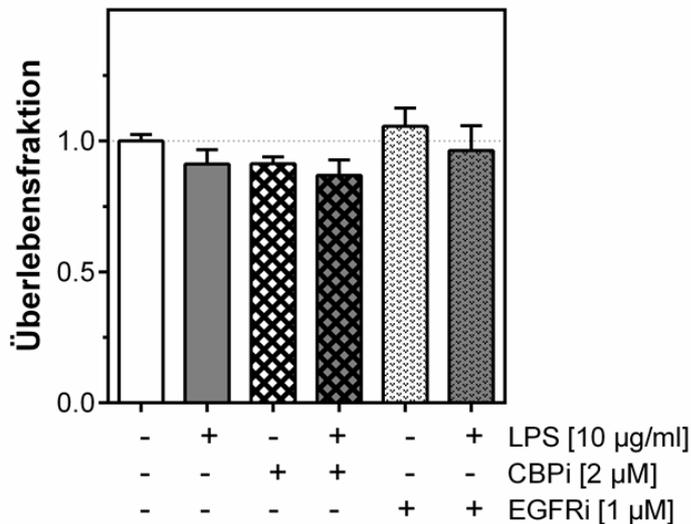


Abbildung 15: Inhibition von des CREB-binding protein (CBP) und Epidermal growth factor receptor (EGFR). Überlebensfraktion der H1975 Zellen nach LPS-Behandlung (10 µg/ml) oder Kontrolle (0 µg/ml LPS) mit oder ohne CBPi oder EGFRi, dargestellt als +/- . Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$, * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test ausgewertet. CBPi = ICG-001, EGFRi = AG1478.

Für die folgenden Inhibitionsversuche wurden die H1975 Zellen mit 10 µg/ml LPS behandelt und mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt. Die LPS-Behandlung führte erneut, in Kombination mit Bestrahlung, zu einem Anstieg der Überlebensfraktionen (Abb. 16A, graugefüllter Kreis). Auch die statistische Auswertung der Überlebensfraktion bei 6 Gy zeigt nach der LPS-Behandlung eine signifikante Verdopplung von 0,022 auf 0,045 (Abb. 16B, erste und zweite Säule).

Zur Untersuchung des Einflusses von pCREB auf die durch LPS veränderte Strahlensensitivität wurde indirekt pCREB mit CBPi inhibiert. Die Inhibition des CBP führte in den LPS behandelten H1975 Zellen zu einer Abnahme der Überlebensfraktionen. Die CBP Inhibition in Kombination mit einer LPS-Behandlung und Bestrahlung führte nicht nur zu einer Wiederherstellung der Strahlensensitivität auf das Niveau der Kontrolle (0 µg/ml LPS), sondern zu einer Abnahme unter das Niveau der Kontrolle (Abb. 16A, Dreieck). Die Überlebensfraktion bei 6 Gy zeigte eine statistisch signifikante Reduktion von 0,045 auf 0,013 nach der LPS-Behandlung und der CBP Inhibition im Vergleich zu einer alleinigen LPS-Behandlung (Abb. 16B, zweite und fünfte Säule). Der Einsatz des CBPi ohne

vorhergehende LPS-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Überlebensfraktion, im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 16A und 16B, erste und sechste Säule).

Neben der indirekten Inhibition von pCREB, sollte auch der Effekt einer Inhibition des EGFR untersucht werden, da EGFR sowohl für die Bestrahlung (117) als auch für den LPS induzierten TLR-4 Signalweg von Bedeutung ist (101). Die Inhibition von EGFR diene als eine interne Kontrolle des experimentellen Systems.

Die Inhibition von EGFR führte in LPS-behandelten und bestrahlten Zellen zu einer wieder hergestellten Strahlensensibilität auf das Level der unbehandelten Kontrolle (0 µg/ml LPS) (Abb. 16A, Rauten). Dies zeigt auch die Überlebensfraktion bei 6 Gy. Hier führt die EGFR Inhibition nach der LPS-Behandlung zu einer signifikanten Abnahme von 0,045 auf 0,026, im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung (Abb. 16B, zweite und dritte Säule). Der Einsatz des EGFRi ohne LPS bewirkt keiner Veränderung der Überlebensfraktion bei 6 Gy (Abb. 16A und 16B, vierte Säule).

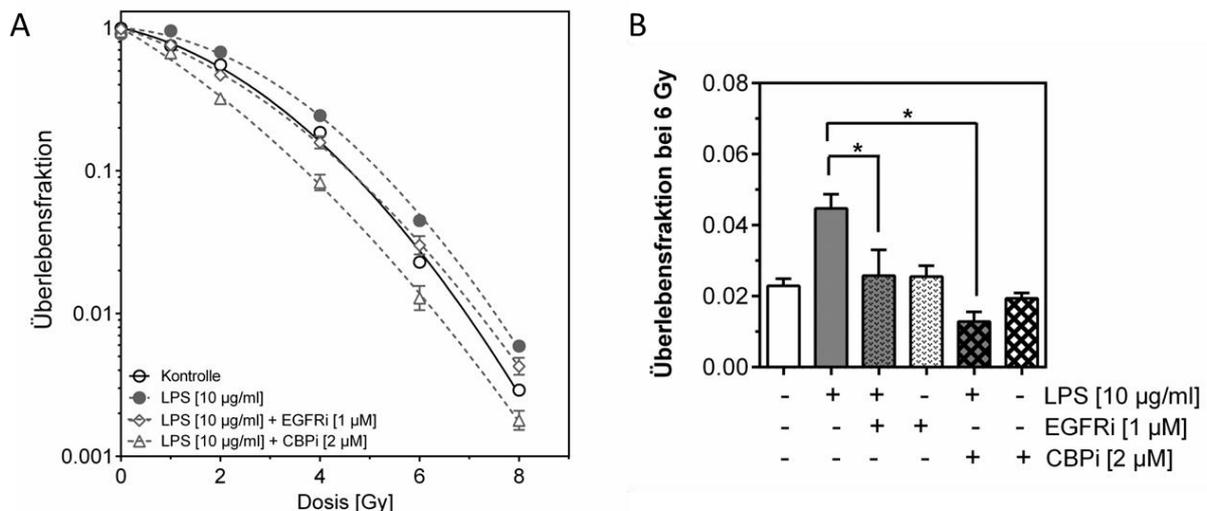


Abbildung 16: Die Inhibition des CREB-binding protein (CBPi) korrelierte mit einer LPS induzierte Strahlensensibilisierung. A) Überlebensfraktionen der H1975 Zellen nach LPS-Behandlung (10 µg/ml) oder Kontrolle (0 µg/ml LPS) und Bestrahlung mit 1, 2, 4, 6 und 8 Gy mit oder ohne CBPi (Dreieck) oder EGFRi (Rauten). B) Überlebensfraktionen bei 6 Gy, H1975 Zellen nach LPS-Behandlung (10 µg/ml) oder Kontrolle (0 µg/ml LPS) mit oder ohne CBPi oder EGFRi, dargestellt als +/- . Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$, * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle. IR = Irradiation (Bestrahlung). Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. CBPi = ICG-001, EGFRi = AG1478.

Mittels der Inhibitionsversuche konnte in H1975 Zellen gezeigt werden, dass die Inhibition von CBP zu einer Verringerung der Überlebensfraktion führt. Die berechnete Überlebenskurve liegt dabei unter dem Niveau der unbehandelten Kontrolle.

3.6. Die CREB-binding protein Inhibition korrelierte in H1975 Zellen mit keiner Änderung in der Freisetzung von Interleukin-6

IL-6 wurde in meinen Versuchen als interne Kontrolle eines positiven LPS-Effektes quantifiziert.

Des Weiteren spielt dieses Zytokin auch eine wichtige Rolle bei der erworbenen Strahlenresistenz (97). Deswegen war der Effekt einer LPS-Behandlung in Kombination mit Bestrahlung auf die Freisetzung von IL-6 Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Zudem sollte eine mögliche Rolle des Transkriptionsfaktors CREB bei der IL-6 Freisetzung geklärt werden.

Es konnte schon in den Vorversuchen für die Proteom Profiling Arrays eine fünffach verstärkte Freisetzung von IL-6 nach der LPS-Behandlung gemessen werden. Diese war durch die Kombination von LPS und Bestrahlung, im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung, um 30% erhöht (Abb. 10, dritte und vierte Säule).

Des Weiteren war von Interesse, ob die indirekte pCREB Inhibition mittels CBPi zu einer veränderten IL-6 Freisetzung führt. Dazu wurde die IL-6 Freisetzung nach der CBPi Behandlung mit oder ohne 10 µg/ml LPS und Bestrahlung im ELISA gemessen.

Im Vergleich zur Kontrolle konnte nach der CBP Inhibition keine Veränderung gemessen werden (Abb. 17, erste und fünfte Säule). Außerdem bewirkte eine alleinige Bestrahlung oder die Kombination aus Bestrahlung und CBPi keine verstärkten IL-6 Freisetzung (Abb. 17, erste und zweite Säule; und fünfte und sechste Säule). Auch in Anwesenheit des indirekten pCREB Inhibitors CBPi induzierte die Behandlung mit 10 µg/ml LPS einen fünffachen Anstieg der IL-6 Freisetzung, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 17, erste und siebte Säule). Dies ist durch die zusätzliche Bestrahlung mit 6 Gy nochmals um 30% verstärkt (Abb. 17, vierte Säule). Eine zusätzliche CBP Inhibition veränderte nicht die IL-6 Freisetzung, nach der LPS-Behandlung mit und ohne Bestrahlung, im Vergleich zu den nicht mit CBPi behandelten Proben (Abb. 17, siebte und achte Säule).

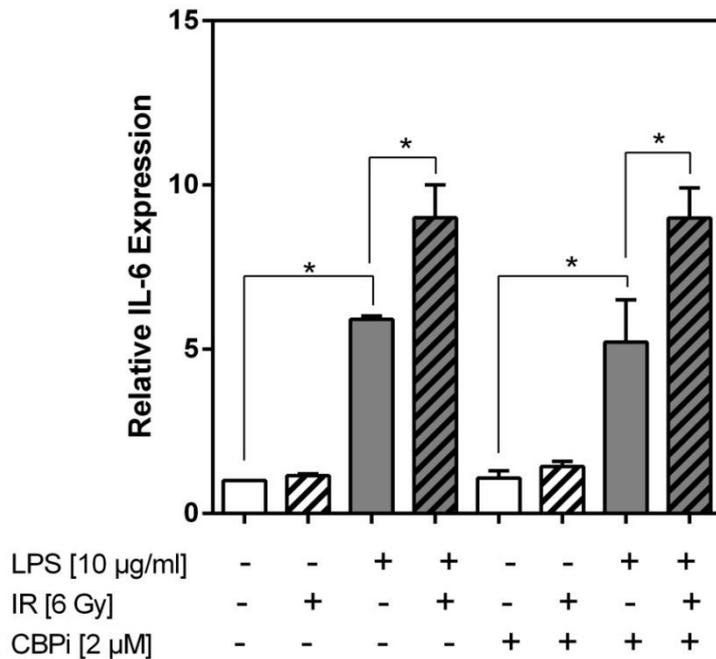


Abbildung 17: Die CBP Inhibition veränderte nicht die IL-6 Freisetzung von H1975 Zellen, im Vergleich zu den nicht mit CBPi behandelten Proben. IL-6 Freisetzung von H1975 Zellen nach LPS-Behandlung (10 µg/ml) und Kontrolle (0 µg/ml LPS) mit und ohne Bestrahlung (6 Gy) und CBPi (2M). Normalisiert auf Kontrolle. Dargestellt als Mittelwert \pm SEM, $n > 3$, * $p < 0,01$. IR = Irradiation (Bestrahlung). Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. IR = Irradiation (Bestrahlung), CBPi = ICG-001.

Da CREB die IL-6 Freisetzung, obschon von Bedeutung für die Strahlentherapieresistenz (97), nicht beeinflusst, sollten andere der Strahlentherapieresistenz zugrundeliegende Mechanismen untersucht werden.

Da der klonogene Zelltod nach der Bestrahlung hauptsächlich durch die nicht oder fehlerhaft reparierten DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) ausgelöst wird (131, 132), wurde im Folgenden untersucht, ob die LPS-Behandlung und die CBP Inhibition einen direkten Einfluss auf die DNA-Reparatur haben. Dazu wurden die Anzahl der residuellen DNA-DSB nach 24 h untersucht.

3.7. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte in H1975 Zellen mit einer Reduktion von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen, während die CREB-binding protein Inhibition zu einem Anstieg der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche im Vergleich zur Kontrolle führte

Das Überleben der Zellen nach der Bestrahlung ist in erster Linie von den nicht oder fehlerhaft reparierten DNA-DSB abhängig (131, 132). Es sollte daher untersucht werden, ob eine LPS-Behandlung mit oder ohne Inhibition von CBP eine Veränderung der Fähigkeit der Zelle DNA-DSB zu reparieren bewirkt. Zur Untersuchung der durch Bestrahlung verursachten DNA-DSB wurde die Anzahl der co-lokalisierten γ H2AX/53BP1 Foci 24 h nach der Bestrahlung mit 4 Gy gezählt. Die Anzahl diese γ H2AX/53BP1 Foci stellt die Anzahl der residuellen DNA-DSB dar, die im reziproken Verhältnis zur DNA-Reparatur Kapazität der Zellen stehen (133).

Die nicht bestrahlten Zellen (Kontrolle, LPS, CBPi, und LPS + CBPi) zeigten im Durchschnitt 1 γ H2AX/53BP1 Focus pro Nukleus. Die bestrahlten H1975 Zellen zeigten 24 h nach der Bestrahlung noch im Schnitt vier γ H2AX/53BP1 Foci pro Nukleus. Im Gegensatz dazu bewirkte die Kombination von LPS und Bestrahlung eine signifikante Abnahme der γ H2AX/53BP1 Foci in H1975, von vier γ H2AX/53BP1 Foci auf drei Foci pro Nukleus (Abb. 18A und B).

Zur Untersuchung der Auswirkung der CBP Inhibition auf eine durch LPS in Kombination mit Bestrahlung veränderte DNA-Reparatur von H1975 wurden die γ H2AX/53BP1 Foci nach CBP Inhibition, LPS-Behandlung und Bestrahlung untersucht. Die Behandlung mit dem CBPi korrelierte mit einem statistisch signifikanten Anstieg der γ H2AX/53BP1 Foci von drei (LPS und Bestrahlung alleine) auf insgesamt fünf γ H2AX/53BP1 Foci pro Nukleus (Abb. 18A und B). Diese Veränderungen waren signifikant mit den jeweiligen Überlebensfraktionen des klonogenen Überlebens nach der Bestrahlung mit 4 Gy assoziiert (Abb. 18C).

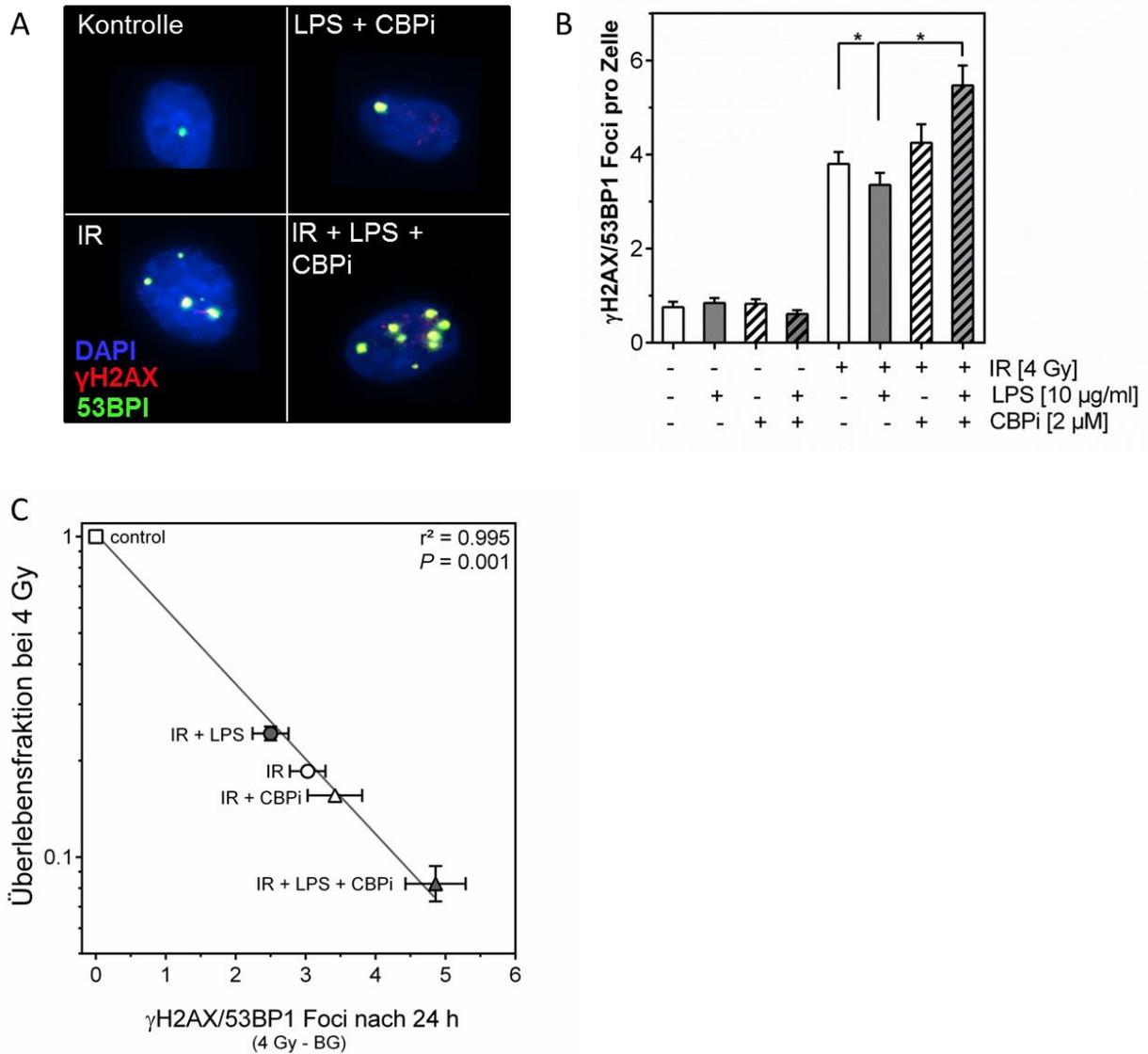


Abbildung 18: Die Inhibition von CBP (CBPi) beeinträchtigte die DNA-Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung. A) Repräsentative Abbildung der residuellen γ H2AX/53BP1 Foci von H1975 Zellen nach der LPS-Behandlung (10 μ g/ml) oder Kontrolle (0 μ g/ml LPS) 24 h nach der Bestrahlung (IR) mit 4 Gy oder 0 Gy und mit oder ohne CBPi (2 μ M); Objektiv 60er. B) Quantifizierung der Anzahl der verbleibenden γ H2AX/53BP1 Foci in H1975 Zellen nach LPS-Behandlung (10 μ g/ml) 24 h nach der Bestrahlung (IR) mit 4 Gy oder 0 Gy und mit oder ohne CBP-Inhibitor (CBPi) (2 μ M) oder Kontrolle (0 μ g/ml LPS), dargestellt als +/- . Zur Quantifizierung wurden mindestens 200 Nuklei pro Probe ausgezählt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM, n=3, * p<0,05 im Vergleich von IR und IR + LPS bzw. IR + LPS + CBPi ausgewertet. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. C) Lineare Regression zwischen der Überlebensfraktionen im Mittel bei 4 Gy und der Anzahl der residuellen γ H2AX/53BP1 Foci detektiert nach 24 h im Mittel nach der Bestrahlung mit 4 Gy (die Anzahl der Foci von den dazugehörigen unbestrahlten Zellen wurde als Hintergrund (BG) abgezogen) in LPS behandelten (10 μ g/ml) und unbehandelten (Kontrolle) mit und ohne CBPi (2 μ M) H1975 Zellen. IR = Irradiation (Bestrahlung).

Die DNA-DSB Untersuchung zeigte, dass eine LPS-Behandlung mit einer Abnahme der residuellen DNA-DSB korrelierte. Durch CBPi wurde bei der Kombination von LPS und

Bestrahlung die Anzahl der residuellen γ H2AX/53BP1 Foci signifikant erhöht, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung und der Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LPS mit einer Veränderung der Strahlenansprache in den humanen NSCLC Zelllinien H1975 und A549, aber nicht in H520 korreliert. In H1975 induzieren die LPS-Behandlung und Bestrahlung eine verstärkte Phosphorylierung von CREB und den SFKs Lck, Fyn und Fgr.

Weiter konnte gezeigt werden, dass eine alleinige LPS-Behandlung die Anzahl der residuellen γ H2AX/53BP1 Foci nach der Bestrahlung mit 4 Gy reduziert. Die indirekte Inhibition von pCREB via CBP Inhibition korreliert mit einer Strahlensensibilisierung und einer erhöhten Anzahl an residuellen γ H2AX/53BP1 Foci, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung und der Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war den Effekt des bakteriellen Pathogenitätsfaktors LPS auf die Strahlensensibilität *in vitro* zu untersuchen. Der klinische Hintergrund zeigt, dass pulmonale bakterielle Infektionen die Prognose der an Lungenkarzinom erkrankten Patienten verschlechtern (61). Dabei ist es unklar, ob es sich dabei nur um eine Begleiterscheinung handelt, oder ob bakterielle Pathogene an einer Veränderung der Strahlensensibilität in NSCLCs beteiligt sind. Dies zu untersuchen ist von Bedeutung, da die Strahlentherapie ein wichtiger Bestandteil der kurativen und der palliativen Therapie bei Patienten mit NSCLCs darstellt (134, 135) und sich ca. 50% der an Krebs erkrankten Patienten einer Strahlentherapie unterziehen müssen (39). Außerdem sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche Zielproteine, die in einer veränderten Strahlensensibilität involviert sein können, identifiziert werden.

4.1. Screening und Auswahl der verwendeten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien

LPS stellt den Hauptpathogenitätsfaktor bei gram-negativen Bakterien dar. Diese können häufig bei Lungenkarzinompatienten mit bakteriellen pulmonalen Infektionen nachgewiesen werden (60, 62-64). Des Weiteren ist bekannt, dass LPS TLR-4 abhängige Signalwege aktiviert, welche auch die Proteinkinase Aktivität von EGFR benötigen (101, 136). Wird EGFR durch Erlotinib inhibiert, kommt es auch zur Inhibition der Signalkaskade nach der LPS-Behandlung im *in vivo* Mausmodell (101). Somit ist die Kinaseaktivität von EGFR für die LPS induzierte Aktivierung von NF- κ B notwendig (101). Für diese Interaktion zwischen TLR-4 und EGFR ist Lyn, ein Mitglied der Src family kinases (SFK), von Bedeutung. Denn eine Runterregulation von Lyn führt zu einer verringerten NF- κ B Aktivierung (101).

Wegen ihrer großen Bedeutung und Notwendigkeit im LPS induzierten Signalweg wurde daher zunächst die *TLR-4* und *EGFR* mRNA Expression untersucht.

Für diese Arbeit wurden nach der Untersuchung der mRNA Expression drei Zelllinien mit unterschiedlicher *TLR-4* und *EGFR* Expression ausgewählt. Die ausgewählten NSCLC Zelllinien waren: H1975 (EGFR L858R/T790M) und A549 (EGFR Wildtyp) die eine mittlere bis starke *TLR-4* und *EGFR* Expression zeigen (Tab. 5) und H520 mit einer sehr geringen *TLR-4* und *EGFR* Expression (Tab. 5). Verglichen wurden dabei die verschiedenen NSCLC Zelllinien untereinander. Mit Hilfe dieser NSCLC Zelllinien sollte in Koloniebildungsassays

untersucht werden ob der *TLR-4*- und *EGFR* mRNA Status die Strahlensensibilität nach der LPS-Behandlung beeinflussen.

4.1.2. Die verwendete LPS-Konzentration bewirkten keine Toxizität bei H1975 Zellen

Vor dem Einsetzen der NSCLC Zelllinien in das *in vitro* Modell musste zunächst geklärt werden, ob die eingesetzten LPS-Konzentrationen letal auf die Zellen wirken. Dazu wurde exemplarisch die NSCLC Zelllinie H1975 ausgewählt und mit verschiedenen LPS-Konzentrationen über verschiedene Zeitwerte behandelt. Diese NSCLC Zelllinie wurde ausgewählt, da sie im Vergleich zu A549 und H520 eine mittlere *TLR-4* Expression aufweist. Die Zeitwerte wurden so gewählt, dass sie die Zeitwerte der im Folgenden geplanten Versuche widerspiegeln.

Die hier verwendeten Konzentrationen von 0,1, 1 und 10 µg/ml LPS zeigten bei keiner der kontrollierten Zeitwerten eine Toxizität auf die NSCLC Zelllinie H1975 (Tab. 6). Jedoch ist auffällig, dass in dem hier dargestellten *in vitro* Modell nicht Dosen, die *in vivo* zum Einsatz kommen, verwendet wurden. Im Mausmodell liegt die LD50 (Letale Dosis 50%) bei 601 µg/Maus bei 6-7 Wochen alten Mäusen (25,6 mg/kg Körpergewicht der Maus) und bei 93 µg/Maus bei 98-102 Wochen alten Mäusen (1,6 mg/kg Körpergewicht der Maus). Somit ist die Dosis im *in vivo* Mausmodell stark von dem Alter der Maus abhängig (137). Geht man von ca. 19 g pro Maus aus, kommen ca. 30 µg pro g Maus (6-7 Wochen alt) zum Einsatz. Dies ist höher als in dem hier gezeigten *in vitro* Modell, wenn man von 1 g Zellen ausgeht. Bei 98-102 Wochen alten Mäusen liegt die verwendete Konzentration bei ca. 5 µg pro g Maus und ist somit niedriger als in dem hier gezeigten *in vitro* Modell, wenn man von 1 g Zellen ausgeht. Die unterschiedlichen Angaben zur LD50 sind nicht der einzige Grund der die Auswahl der geeigneten LPS-Dosis im *in vitro* Modell erschwert. So benötigt eine Maus um 1.000 pg IL-6 pro ml Blut zu erreichen eine 250fach höhere LPS-Dosis als der Mensch. Das heißt, ein Mensch reagiert sensitiver und mit einer stärkeren IL-6 Freisetzung auf eine intravenöse LPS-Gabe als eine Maus (138). Insgesamt ist es daher sehr schwer möglich, die *in vivo* Daten von murinen und humanen Modellen auf humane Zelllinien zu übertragen. Daher war es von großer Bedeutung, zunächst den Einsatz verschiedener LPS-Konzentrationen zu testen. Da in noch nicht veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar bekannt ist, dass hohe LPS Dosen ab 25 µg/ml zytotoxisch auf NSCLC Zellen wirken, wurden zur Testung 0,1, 1 und 10 µg/ml LPS verwendet. Diese LPS-Konzentrationen zeigen keine Toxizität auf das Überleben der H1975 Zellen (Tab. 6). Daher konnten diese getesteten LPS-Konzentrationen auch in den weiteren Versuchen bedenkenlos eingesetzt werden.

4.2. Eine LPS-Behandlung zeigte keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion der untersuchten nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom Zelllinien

Das Auftreten von bakteriellen pulmonalen Infektionen korreliert bei Lungenkarzinompatienten mit einer verschlechterten Prognose (61). Jedoch ist der Einfluss von LPS auf die Strahlentherapieansprache noch nicht näher untersucht worden. Es ist auch noch nicht bekannt, ob LPS einen direkten Einfluss auf die Strahlensensibilität hat oder ob die bakterielle pulmonale Infektion indirekt, durch den Einfluss auf das Immunsystem des Patienten, die Strahlentherapieansprache beeinflusst.

In vorigen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar konnte gezeigt werden, dass LPS effektiv das Tumorstadium in verschiedenen NSCLC Modellen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* unter Verwendung der Zelllinie A549 stimuliert (108). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass LPS alleine keine Auswirkung auf die Überlebensfraktion und somit auch keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Koloniebildung bei H1975, A549 und H520 hat (Abb. 6B-D). Auch die Größe der Kolonien ist nach einer LPS-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle, exemplarisch für H1975 dargestellt, gleich (Abb. 6A). Dieses Ergebnis illustriert einen neuen Aspekt von LPS in der Tumorbilogie des NSCLCs. LPS ist in der Lage in NSCLCs die Proliferation zu induzieren (108, 139) (140) (141) aber LPS hat keine Auswirkung auf die Klonogenität der Tumorzellen.

Die Klonogenität der Tumorzellen ist ein wichtiger Faktor in der Tumorentwicklung, Prognose und Rezidiv des Tumors nach einer Behandlung (142). Es wird von einer Korrelation zwischen Krebsstammzellen *in vivo* und der Klonogenität des Tumors *in vitro* ausgegangen (143-145). Dies zeigt die Relevanz der intrinsischen Strahlensensitivität der Krebsstammzellen für die Strahlensensitivität von Tumoren verschiedener Histologien (143-147). Unter Krebsstammzellen versteht man Zellen, die eine essentielle Rolle in der Tumorentwicklung, Progression und dem Rezidiv nach der Behandlung spielen. Krebsstammzellen werden als Zellen definiert, die ein unlimitiertes Teilungspotential zur Repopulation des Tumors haben (148). Wenn andere Faktoren konstant sind, dann korreliert die verabreichte Strahlendosis invers mit dem Logarithmus der Krebsstammzellen. Dies bedeutet, dass die gleiche Strahlendosis bei einer geringen Anzahl von Krebsstammzellen zu einer größeren lokalen Kontrolle führt als bei Tumoren mit einer höheren Anzahl an Krebsstammzellen. Klinische Daten belegten zudem, dass die Größe des Tumors eine wichtige Rolle in der Therapierbarkeit spielt, da die Anzahl der Krebsstammzellen mit dem Tumolvolumen zunimmt (149-153). Jedoch kann die Dichte der Krebsstammzellen in Tumoren variieren, welches dann eine Auswirkung auf die lokale Tumorkontrolle hat (153, 154).

In den folgenden *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine alleinige LPS-Behandlung nicht mit einer erhöhten Klonogenität korreliert, das heißt die LPS-Behandlung alleine hat keine Auswirkung auf die die Fähigkeit Kolonien zu bilden. Dies konnte für A549, H1975 und H520 bei allen eingesetzten LPS-Konzentrationen gezeigt werden (Abb. 6 B-D).

Des Weiteren ist es von Bedeutung zu bemerken, dass es sich bei der Klonogenität der Zellen nicht um Proliferation handelt. Proliferation beschreibt den Prozess des Zellwachstums und der Zellteilung. Im langlebigen Vertebraten findet eine genau regulierte Proliferation zur Erhaltung, Entwicklung und Reparatur des Organismus ein Leben lang statt. Ist diese gestört, kann es zu einer Tumorentwicklung kommen (155). Dabei spielen sogenannte Wachstumsfaktoren wie Epidermal growth factor (EGF) eine wichtige Rolle (156). EGF ist einer der sechs Hauptliganden von EGFR und kann dessen Tyrosin Kinase Aktivität aktivieren. Die Signalkaskade läuft über den RAS/RAF/MAPK Signalweg. Dieser reguliert die Zellproliferation, Migration und Differenzierung oder kontrolliert über den PI3K/AKT Signalweg das Überleben und die anti-apoptotischen Signale (157). Auch sind durch EGFR aktivierte Signalwege in der Entwicklung der Malignität durch die Modulation des Zellzyklus, Inhibition der Apoptose, Induktion der Angiogenese und Förderung der Modalität der Tumorzellen und Metastasierung von Bedeutung (158). Eine verstärkte EGFR Expression wird mit einer erhöhten Malignität assoziiert und EGFR wird in 43-89% der NSCLC exprimiert (159). In den letzten Jahren wurde in mehreren klinischen Studien herausgearbeitet, dass sich ein mutierter EGF-Rezeptorstatus als geeignetes Zielprotein für die sogenannten *targeted therapy*, zum Beispiel mit Erlotinib oder Gefitinib, eignet (26) (160). Die Rolle von EGFR und auch die Inhibition von EGFR wird im Nachfolgenden noch näher diskutiert.

4.3. LPS induzierte eine Veränderung der Strahlenansprache in H1975 und A549, aber nicht in H520 Zellen

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal im Koloniebildungsassay gezeigt werden, dass LPS in der Lage ist, die Ansprache von *TLR-4* und *EGFR* exprimierenden NSCLC Zellen auf Bestrahlung zu modulieren. So korreliert eine LPS-Behandlung mit einer gesteigerten Überlebensfraktion in H1975 und A549, aber nicht in H520. Dies kann bedeuten, dass eine LPS induzierte Strahlenresistenz sowohl von der Expression des LPS-Rezeptors TLR-4 als auch von EGFR abhängig ist (Tab. 5, Abb. 7 und 8). Dies ist naheliegend, da LPS an TLR-4 bindet und dadurch eine zelluläre Entzündungsantwort auslöst (65). Auch ist beschrieben, dass der LPS induzierte Signalweg via TLR-4 von einer

Interaktion mit der Tyrosinkinase EGFR abhängig ist (101). Die LPS induzierte Strahlenresistenz konnte nur bei den Zelllinien H1975 und A549 nachgewiesen werden. Diese beiden NSCLC Zelllinien exprimieren den LPS-Rezeptor *TLR-4* und *EGFR*. Die Zelllinie H520 hingegen exprimiert nur eine geringe Menge *TLR-4* und *EGFR* (Tab. 5) und zeigt keine Veränderung der Strahlenansprache nach der LPS-Behandlung (Abb. 9). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Effekt von LPS auf die Ansprache von Bestrahlung abhängig von der Formation des aktiven LPS/TLR-4 Komplexes und EGFR ist. Dies wiederum zeigt, dass der zu beobachtende Effekt auf die Bestrahlung spezifisch durch LPS verursacht wurde. Um dies näher zu untersuchen könnten Versuche zur TLR-4 Inhibition durchgeführt werden. Dadurch könnte gezeigt werden, dass LPS ohne TLR-4 keine Strahlenresistenz induzieren kann. Jedoch ist die Inhibition von TLR-4 als eine Behandlungsoption nicht möglich, da TLR-4 eine Vielzahl von Signalkaskaden und Entzündungsantworten steuert (79, 82, 83). Daher wurde dies in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird jedoch noch die EGFR Inhibition und deren Auswirkung auf die Strahlenresistenz diskutiert.

Es wurde zuvor beschrieben, dass eine hohe Expression von TLR-4 bei NSCLCs mit der Malignität des Tumors korreliert (77). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Patienten mit erhöhter TLR-4 Expression des Tumors nach einer pulmonalen Infektion mit gram-negativen Bakterien eher eine Strahlentherapieresistenz entwickeln können, als Patienten die kein oder nur wenig TLR-4 exprimieren. Dies müsste jedoch in klinischen Studien näher untersucht werden. Auch ob die Interaktion von LPS mit TLR-4 positiven NSCLC Zellen in einer Strahlentherapieresistenz resultiert, müsste zusätzlich in weiteren Versuchen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Dies könnte aber eine Erklärung für die geminderte Prognose von Patienten mit Tumoren sein, die eine große Menge von TLR-4 exprimieren (60). Perlin et al. untersuchte die Auswirkung von bakteriellen pulmonalen Infektionen bei Patienten mit NSCLC (61). Die häufigsten Pathogene die bei Patienten mit einem Lungenkarzinom gefunden wurden sind mit 64% gram-negative Bakterien, mit 25% gram-positive Bakterien und mit 8% Pilze (60). Es wurde gezeigt, dass unter den fünf häufigsten Bakterien mit *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* und *Pseudomonas aeruginosa* drei gram-negative Bakterien vertreten sind. Deren Hauptpathogenitätsfaktor ist LPS (60). Die beiden gram-positiven Bakterien sind Streptokokken und *Staphylococcus aureus* (61). Diese exprimieren jedoch kein LPS sondern das gram-positive Äquivalent Lipoteichonsäuren (LTA), welches über TLR-2 wirkt (161).

Es konnte durch Perlin et al. auch gezeigt werden, dass 70% der Patienten mit NSCLC auch pulmonale Infektionen aufweisen und dass das Überleben dieser Patienten mit durchschnittlich 4,2 Monaten im Vergleich zu NSCLC-Patienten ohne pulmonale Infektion mit

12,9 Monaten signifikant niedriger ist (61). Ursachen für pulmonale Infektionen bei NSCLC Patienten können Behinderungen des Luftstroms in der Lunge, Aspiration, Immunsuppression und Myelosuppression in Folge von einer Chemo- oder Strahlentherapie, Störung der Abwehrmechanismen durch Tumorinvasion und Nekrose im Tumor- und Normalgewebe sein (61). Zusätzlich hat eine andere Studie gezeigt, dass SCLC-Patienten mit der Kombination von Chemo- und Radiotherapie häufiger an pulmonalen Infektionen erkranken als SCLC-Patienten die nur mit Chemotherapeutika behandelt werden (162). Neben der Darstellung einer pathogenetischen Rolle der LPS abhängigen Signaltransduktion bei der Induktion einer Strahlentherapieresistenz lag der Fokus bei den folgenden Untersuchungen, in der Charakterisierung der Mechanismen, die der Strahlenresistenz zugrunde liegen.

4.4. Identifikation von Proteinen, deren Phosphorylierungslevel nach LPS-Behandlung und Bestrahlung hochreguliert sind

Der LPS/TLR-4 Komplex ist in der Lage viele Signalwege zu stimulieren (85). Zur Untersuchung, welcher LPS/TLR-4-abhängige Signalweg für die gezeigte Strahlenresistenz verantwortlich ist, wurden Human Phospho-Kinase Antibody Arrays (Proteom Profiling Arrays) durchgeführt.

Im Folgenden wurde nur mit H1975 Zellen weitergearbeitet, da diese Zelllinie auf die LPS-Behandlung mit einer Verdopplung der Überlebensfraktion reagierte (Abb. 7B).

Es handelt sich bei H1975 um eine NSCLC Zelllinie, die die EGFR Doppelmutation L858R/T790M aufweist und an der sich daher auch der Einfluss einer EGFR Inhibition nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung untersuchen lässt. Die L858R Mutation und die Multinukleotid *in frame* Deletion in Exon 19 sind mit ca. 90% die häufigsten NSCLC-assoziierten Mutationen. Bei der L858R Mutation handelt es sich um eine einzelne Nukleotid Substitution in Exon 21, dies führt zu einer Substitution von Arginin zu Leucin an der Position 858 (L858R). Diese Mutation ist mit einer Sensitivität für Tyrosin Kinase Inhibitoren (TKI), wie zum Beispiel Gefitinib und Erlotinib, verbunden (19-21). Dahingegen führt die Threonin zu Methionin Substitution an der Aminosäureposition 790 (T790M) an Exon 20 in EGFR exprimierenden Tumoren zu einer erworbenen Resistenz gegen TKIs, nach einer vorhergehenden Behandlung (163, 164). Durch diese T790M Substitution können diese TKIs nicht mehr binden (163).

In der hier verwendeten Zelllinie H1975 mit der Doppelmutation L858R/T790M wurde zuvor eine erworbene Resistenz für Gefitinib und Erlotinib beschrieben (164). Daher wurde in den hier durchgeführten Inhibitionsversuchen auf AG1478 (130) als EGFR Inhibitor bei

Doppelmutation L858R/T790M tragenden Zellen (126) zurückgegriffen, der *in vitro* auch bei T790M-tragenden Zellen effektiv EGFR inhibiert.

In den folgenden Versuchen wurde nur noch die höchste LPS-Konzentration (10 µg/ml) und 6 Gy verwendet (außer bei der Untersuchung der residuellen γ H2AX/53BP1 Foci), da hierbei der stärkste radioprotektiver Effekt bei H1975 beobachtet wurde (Abb. 7).

4.4.1. Veränderung der Phosphorylierung von für die Strahlentherapie relevanten Proteinen nach LPS-Behandlung und Bestrahlung

In Proteom Profiling Arrays konnten die Phosphorylierungslevel nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung von Proteinen in H1975 Zellen untersucht werden. Dadurch sollten mögliche Zielproteine, die zu einer LPS induzierten Strahlenresistenz beitragen, identifiziert werden. Deshalb galt besonderes Interesse den Proteinen, die nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung eine Verdopplung oder Verdreifachung der Hochregulation der Phosphorylierung aufweisen. Der Zeitpunkt 24 h nach der Bestrahlung wurde gewählt, um Proteine zu identifizieren, die einen möglichen Einfluss auf die DNA-Reparatur haben.

Ein durch LPS-Behandlung aktivierter Transkriptionsfaktor ist c-Jun. Dies unterstützt auch die These, dass die Phosphorylierung von c-Jun durch LPS stattfindet und in Epithelzellen sogar zu einer verstärkten Proliferation führen kann (165). Die Bestrahlung alleine ist mit keiner Veränderung der Phosphorylierung bei c-Jun assoziiert. Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung hingegen führt zu einer Abnahme der Phosphorylierung (Abb. 11A). In der Literatur ist für c-Jun beschrieben, dass es zu einer sehr frühen Aktivierung nach der Bestrahlung kommt (166). Dies muss allerdings keinen Widerspruch zu den hier gezeigten Daten darstellen, da in dem hier verwendeten *in vitro* Modell die c-Jun Phosphorylierung 24 h nach der Bestrahlung gemessen wurde. Somit kann die Phosphorylierung bis zur der hier durchgeführten Messung wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle abgenommen haben. Interessant ist jedoch, dass die Kombinationsbehandlung aus LPS und Bestrahlung nach 24 h mit einer deutlichen Runterregulation des Phosphorylierungslevels korreliert. Es konnte in Untersuchungen an Kleinhirn-Granulazellen gezeigt werden, dass eine Inhibition der c-Jun Aktivität, in c-Jun dominant-negativen Mutanten, die Apoptose hemmt (167). So kann es auch hier möglich sein, dass das verringerte Phosphorylierungslevel zu einer Reduzierung der Apoptose und somit zu einem gesteigerten Überleben nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung beiträgt.

Eine Regulation der Phosphorylierung nach der Kombinationsbehandlung mit LPS und Bestrahlung konnte bei dem Tumorsuppressorgen p53 gemessen werden.

In der Literatur wird für p53 eine Runterregulation der Phosphorylierung nach der LPS-Behandlung beschrieben. Dies konnte in dem hier gewählten *in vitro* Modell mit H1975 Zellen nicht bestätigt werden (Abb. 11B). Die Abnahme der Phosphorylierung soll 4 bis 24 h nach der Behandlung zu messen sein (168). In dem hier gewählten Modell wurden jedoch die Zellen 24 h nach der Bestrahlung untersucht. Dies könnte erklären, dass keine Reduktion mehr zu messen war, erklärt aber nicht eine Zunahme der Phosphorylierung nach der LPS-Behandlung. Interessanter ist jedoch, dass die Kombination von LPS-Behandlung und Bestrahlung mit einer Abnahme des Phosphorylierungslevels von p53 korreliert (Abb. 11B). Bei p53 handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen. Mutationen, die eine p53 Expression verringern, reduzieren die zelluläre Reparaturfähigkeit und stimulieren die Tumorgenese (169). Das Phosphorylierungslevel von p35 hat an allen drei untersuchten Serinresten abgenommen, dadurch kann eine verringerte Aktivität von p53 als Tumorsuppressor angenommen werden. Dies könnte auch in diesem Modell zum Überleben der H1975 Zellen beitragen.

Einige andere Proteine wurden nur durch die Bestrahlung verstärkt phosphoryliert. Dazu gehört das Protein Focal adhesion kinase (FAK) (Abb. 11A). Bei dieser Kinase wurde auch schon eine Verbindung zur Strahlenresistenz bei Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich berichtet (170).

Des Weiteren konnte eine verstärkte Phosphorylierung von mammalian Target of rapamycin (TOR) nach der Bestrahlung gemessen werden (Abb. 11B). Im Einklang zu meinen Daten wurde beschrieben, dass eine verstärkte Phosphorylierung zu einer Strahlenresistenz im Zervixkarzinom beiträgt (171). Weiter ist bekannt, dass eine Inhibition von TOR zu einer Strahlensensitivität im Prostatakarzinom führt (172).

In den hier durchgeführten Versuchen wurde außerdem eine Hochregulation der Phosphorylierung von STAT5a, sowie auch für die SFKs Src und Yes, gezeigt (Abb. 11B). Die Relevanz dieser Proteine, für die Strahlentherapie, ist schon durch Studien belegt. So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition dieser Proteine zu einer Reduktion des Überlebens von Kopf- und Halskarzinomzelllinien führt (173).

Es ist weiter bekannt, dass Mitogen-activated protein kinase (MAPK) durch verschiedene Stimuli, wie durch Bestrahlung ausgelösten Stress, aktiviert werden. Diese Signale spielen eine bedeutende Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus und der Repopulation der Zellen (174). Daher wurde ein Anstieg der Phosphorylierung der Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) nach der Bestrahlung erwartet. Dies konnte in meinem Modell an bestrahlten Zellen bestätigt werden (Abb 11A). ERK1/2 gehört zu der MAPK-Familie (174). Diese

ERK1/2 Aktivierung spielt eine wichtige Rolle im Zellüberleben nach der Bestrahlung. So wird ein DNA-Schaden mit der ERK1/2 Aktivierung assoziiert. Dadurch führt eine Inhibition von ERK1/2 zu einer verstärkten Strahlensensitivität (175, 176). Jedoch hat die LPS-Behandlung in dem hier gezeigten *in vitro* Modell mit H1975 Zellen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2. Die LPS-Behandlung alleine führt zu einer Runterregulation der Phosphorylierung von ERK1/2. Dies widerspricht der Annahme, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 durch LPS hochreguliert wird, wie es zuvor in Makrophagen beschrieben wurde (177). Jedoch könnte dies die Abnahme der Phosphorylierung nach der Kombination aus LPS und Bestrahlung in dem hier verwendeten *in vitro* Modell erklären (Abb. 11A), da der inhibierende Effekt von LPS die strahleninduzierte Aktivierung von ERK1/2 entgegenwirken könnte. So führt die Kombination von LPS-Behandlung und ionisierender Strahlung zu einer Reduktion der Phosphorylierung, auf das Level der unbehandelten Kontrolle. Somit scheint der Strahlenprotektive Effekt von LPS in H1975 Zellen nicht direkt von ERK1/2 abhängig zu sein.

Auch in den beiden MAPK p38alpha und MSK1/2 führt die Bestrahlung in den hier durchgeführten Versuchen, wie in der Literatur beschrieben, zu einer verstärkten Phosphorylierung (Abb. 11A) (174). Bei p38alpha korreliert die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung mit einem geringen Anstieg, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (Abb. 11A). Bei MSK1/2 kommt es nach der Kombinationsbehandlung zu einem stärkeren Anstieg des Phosphorylierungslevels, im Vergleich zur Bestrahlung alleine (Abb. 11A). Die LPS-Behandlung erhöht das Phosphorylierungslevel beider MAPK im Vergleich zur Bestrahlung oder Kombinationsbehandlung nicht. Es ist beschrieben, dass die LPS induzierte Phosphorylierung von CREB von ERK1/2 p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalwegen abhängig ist (178-181). ERK1/2 oder p38 phosphorylieren CREB jedoch nicht direkt, aktivieren jedoch MSK1 und MSK2. MSK1/2 phosphoryliert CREB direkt an S133. Die erhöhten Phosphorylierungslevel von p38alpha und CREB könnten über Aktivierung von MSK1/2 erklärt werden (182).

4.4.2. Hochregulation des Src- und cAMP response element-binding protein-abhängigen Signalweges nach der kombinierten Behandlung von LPS und Bestrahlung

Eine weitere Proteinfamilie die durch Bestrahlung reguliert wird, ist die der Src family kinases (SFK). Bei deren Mitgliedern handelt es sich um sogenannte *non-receptor tyrosine kinases*. Deren Aktivierung wird oft mit einer Therapieresistenz assoziiert. Außerdem sind sie von Bedeutung für das zelluläre Überleben und Proliferation (183). Wie erwartet konnte gezeigt werden, dass Src und Yes durch die Bestrahlung aktiviert werden. Für Src ist beschrieben,

dass Bestrahlung zu einer Aktivierung führt. Die Aktivierung von Src korreliert mit einem malignen Phänotypen, Invasion, einem Anstieg von stammzellähnlichen Zellpopulationen und Behandlungsresistenzen in Brustkarzinomzellen (184). Die Kombinationsbehandlung von LPS und Bestrahlung führt bei diesen beiden Tyrosinkinase zu keiner weiteren Erhöhung des Phosphorylierungslevels, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (Abb. 11B). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass in H1975 die LPS-Behandlung alleine mit einer Verringerung des Phosphorylierungslevels von Src und Yes korreliert (Abb. 11B).

Jedoch konnte nach der Kombinationsbehandlung gemessen werden, dass LPS und Bestrahlung zu einer Verdopplung des Phosphorylierungslevels anderer SFKs führen. Es wurde eine Hochregulation der Phosphorylierung der SFKs Lck, Fyn und Fgr nachgewiesen (Abb. 12A und B). Diese SFKs liegen alle *upstream* von dem Transkriptionsfaktor CREB (185). SFKs regulieren die Zellteilung, Motilität, Adhäsion, Angiogenese und das Überleben (186). Eine Aktivierung der SFKs wird bei Kolorektal- und Brustkrebs, sowie auch bei Melanomen, Ovarialkarzinomen, Magenkrebs, Kopf- und Halskrebs, Pankreaskarzinomen, Hirntumoren, Blutkrebs und Lungenkarzinomen beschrieben (186).

Auch ist bekannt, dass die SFKs durch LPS aktiviert werden und diese Aktivierung zur TLR-4 Tyrosin Phosphorylierung führt. Dies führt zu einer Dissoziation von MyD88 und Mal/Tirap von TLR-4. Dies korreliert mit einer reduzierten LPS induzierten Entzündungsantwort (187). Weiter wurde beschrieben, dass LPS in Makrophagen und Dendritischen Zellen die SFK Expression induziert (188, 189). Interessanterweise führt die LPS Behandlung alleine in dem hier gewählten Modell bei den SFKs Lck, Fyn und Fgr zu einer Reduktion des Phosphorylierungslevels. Somit ist es möglich, dass bei mehr als 24 h nach der LPS-Behandlung es zu keiner verstärkten Phosphorylierung von TLR-4 durch die SFKs kommt. Jedoch führt die Bestrahlung alleine zu einer Aktivierung von Lck, Fyn und Fgr. In Glioblastomzellen beeinflusst Fyn und Src die onkogene EGFR-Signalübertragung, was zur Tumordinvasion und zum Überleben der Krebszellen führt (190, 191). Somit ist es möglich, dass die Aktivierung von Fyn und/oder Src durch die Bestrahlung, auch hier im Modell mit H1975 Zellen, zur Aktivierung von EGFR führt. Die Verdopplung des Phosphorylierungslevels der SFKs nach der Kombinationsbehandlung lässt vermuten, dass durch LPS die Aktivierung durch die Bestrahlung noch verstärkt wird und dadurch TLR-4 aktiviert wird, was in einer final erhöhten Phosphorylierung von CREB resultieren könnte. Die Bedeutung von CREB wird im Folgenden diskutiert.

CREB ist ein Mitglied der CREB/ATF Familie von Transkriptionsfaktoren und spielt eine Schlüsselrolle in der nuklearen Antwort auf externe Signale, welche zum Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Überleben beitragen (192-194). CREB ist

phosphoryliert an den Serin/Threonin Resten, abhängig vom Stimulus extrazellulären Komponenten und *upstream* liegenden Kinasen (195). Es ist beschrieben, dass neben MSK1/2 (182) auch andere Kinasen wie die cAMP-dependent protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), calmodulin kinasen (CaMKs) oder pp90 ribosomal S6 kinase (pp90 RSK) CREB an der Transkriptionsaktivierungsstelle Serin 133 (S133) phosphorylieren können (196-201). Aktiviertes/Phosphorliertes CREB benötigt den Transkriptions Co-Aktivatoren CREB binding Protein (CBP) oder p300 an einer cAMP response element (CRE) Region des Zielgens (202). Die Rekrutierung von CBP ist ein kritischer Schritt für die transkriptionelle Aktivierung von CREB (203). Es ist bekannt, dass CREB in vielen NSCLCs stark hochreguliert und hyperphosphoryliert vorliegt. Diese Hochregulation ist signifikant mit einer verschlechterten Überlebensrate assoziiert (204-206). Vor diesem Hintergrund könnte die hier gezeigten *in vitro* Beobachtungen von großer Relevanz *in vivo* sein.

Obwohl in den hier gezeigten Daten an der Zelllinie H1975 keine Phosphorylierung von CREB durch LPS nachweisbar war, gibt es einige Untersuchungen die zeigen, dass LPS die Phosphorylierung von CREB zum Beispiel in humanen Monozyten, normalem Lungengewebe und A549 Zellen induziert (85, 207-209). Dies weist auf eine Interaktion zwischen LPS und CREB hin. So spielt CREB auch eine wichtige Rolle im LPS/TLR-4 Signalweg in Makrophagen. Dort vermittelt CREB eine NFκB vermittelte anti-apoptotische Antwort (180). Auch wird vermutet, dass CREB in Konkurrenz um die Bindungspartner CBP/p300 mit NFκB steht, da auch NFκB CBP binden kann. Dies könnte zum einen zu einer Hemmung von NFκB durch CREB und zum anderen zu einer Aktivierung durch CBP/p300 führen (210-212). In dem hier gewählten Modell mit H1975 Zellen konnte ein Anstieg der Phosphorylierung von CREB an S133 nach der Kombinationsbehandlung nachgewiesen werden (Abb. 12A und B). Da eine Aktivierung von CREB im Zusammenhang mit einer verschlechterten Prognose im NSCLC steht (204-206) und CREB *downstream* der SFKs liegt ist dieses Ergebnis von besonderem Interesse. Daher wurde CREB als Zielprotein für die Inhibitionsversuche ausgewählt.

Zur Validierung des Phosphorylierungslevels von CREB in LPS-behandelten und bestrahlten H1975 Zellen wurden Western Blots durchgeführt.

Die hier gezeigten Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass Bestrahlung alleine zu einer verstärkten Phosphorylierung von CREB in H1975 Zellen führt (Abb. 12 und 13). Nach der Kombination von LPS-Behandlung und Bestrahlung wurde ein signifikanter Anstieg des Phosphorylierungslevels von pCREB gemessen (Abb. 13A und B). Dies unterstreicht die Ergebnisse des Proteom Profiling Arrays. Auch steht dies im Einklang mit Studien, die zeigen konnten, dass Bestrahlung den CREB Signalweg in verschiedenen hämatologischen und gastrointestinalen Neoplasien sowie in Lungen- und Prostatakarzinomen aktiviert (194).

Die durch LPS induzierte Strahlenresistenz über einen CREB involvierten Signalweg könnte durch die SFKs Fyn, Fgr und/oder Lck vermittelt werden. Vielleicht spielen diese auch bei der Interaktion mit EGFR eine Rolle. EGFR wird laut Literatur und im Einklang mit meinen Daten nur durch Bestrahlung phosphoryliert (114, 115). Wie zuvor in der Einleitung beschrieben ist bekannt, dass pLyn eine Rolle in der Interaktion von TLR-4 mit EGFR spielt (101). Jedoch konnte im Proteom Profiling Array nur eine leichte Erhöhung der Phosphorylierung von Lyn durch LPS gezeigt werden. Auch die Kombinationsbehandlung von LPS und Bestrahlung führt nur zu einer geringen Erhöhung der Phosphorylierung von Lyn. Somit könnte in dem hier dargestellten Modell pLyn oder auch ein weiteres SFK von Bedeutung für die Interaktion von TLR-4 und EGFR sein. Um dies näher zu untersuchen, müssten Western Blots die Phosphorylierung der SFKs verifizieren. Zusätzlich wäre es interessant, eine Proteinexpressionsanalyse zur Untersuchung der SFKs und auch der anderen im Proteom Profiling Array untersuchten Proteine durchzuführen. Dadurch könnte untersucht werden, ob nicht nur das Phosphorylierungslevel der Proteine durch die einzelnen Behandlungen reguliert ist, sondern auch ob die Behandlungen einen direkten Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine haben. Da jedoch zunächst die LPS induzierte Strahlenresistenz und den Einfluss von CREB untersucht werden sollten wurden CREB über CBP inhibiert.

4.5. Die Inhibition des CREB-binding protein bewirkte eine Veränderung der Strahlensensibilität nach der LPS-Behandlung

Die Bedeutung von CREB für die LPS induzierte Strahlenresistenz wurde durch die indirekte Inhibition des CREB-Binding Proteins (CBP) mittels des spezifischen CBP-Inhibitors (CBPi) ICG-001 (213, 214) demonstriert. CBP ist ein 265-kDa großes Protein, welches an die phosphorylierte Form von CREB bindet (215). Es bindet an S133 und ist wichtig für die Signalantwort auf cAMP (202). Daher eignet sich die Inhibition des CBP zur indirekten Inhibition der phosphorylierten Form von CREB, da CREB im Proteom Profiling Array und im Western Blot signifikant hochreguliert war (Abb. 12 und 13).

Außerdem ist CBP als Histonacetyltransferase (HAT) in der Lage, Chromatin zu modulieren (216) und somit zu DNA-Reparatur beizutragen (217-220). Die Acetylierung von Histonen durch HATs ist eine wichtige Chromatinmodifikation und für die Transkription und DNA-Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur von Bedeutung. Es ist bekannt, dass CBP und die homologe HAT p300 zur DSB Reparatur beitragen, indem sie H3 und H4 an der DSB Stelle acetylieren (216-219). Dies stützt die Erkenntnis, dass die Modifikation der Histone H3 und H4 wichtig für die DSB Reparatur sind (216, 220). CBP und p300 werden benötigt, um

KU70/80 an die DSB Stelle zu rekrutieren. KU70/80 sind wichtige Proteine, welche in das *non-homologous end joining* (NHEJ) involviert sind. Wie zuvor erwähnt handelt es sich beim NHEJ um den prominentesten Reparaturweg bei DNA-DSB (221). Es konnte nicht gezeigt werden, dass das Expressionslevel von in das NHEJ involvierten Gene durch CBP oder p300 betroffen ist (216-218). Jedoch aktivieren CBP und p300 die Transkription von BRCA1 und RAD51, welche eine Schlüsselrolle in der Homologen Rekombination (HR), dem zweiten wichtigen Weg der DNA-DSB Reparatur, spielen (219).

Weiter wird eine Auswirkung des CBPi auf andere Proteine wie β -catenin und die Funktion als Co-Aktivatoren der Wnt/ β -catenin-vermittelten Transkription (222) diskutiert. Der CBPi ICG-001 soll in Magenkarzinomzellen das Wachstum unterdrücken und eine Chemotherapieresistenz reduzieren (222). Außerdem ist beschrieben, dass ICG-001 eine Leberfibrose im *in vivo* Mausmodell reduziert (223) und vor einer Bleomycin induzierten idiopathischen pulmonalen Fibrose (IPF) schützt, diese rückgängig macht und das Überleben verbessert (224).

Um CREB zu Inhibieren, wurde ein indirekter Weg der Hemmung durch den Einsatz von ICG-001 (CBPi) gewählt. Mittels dieses Inhibitors sollte die Bindung zwischen pCREB (S133) und CBP gestört werden und so der Einfluss einer indirekten pCREB Inhibition auf die LPS induzierte Strahlenresistenz untersucht werden.

Um die Spezifität des verwendeten Inhibitors ICG-001 zu testen wurde eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt. Diese zeigt eine Reduktion der Bindung zwischen pCREB und dem CBP nach der CBP Inhibition mittels ICG-001, im hier gezeigten H1975 *in vitro* Modell (Abb. 14). Daher konnte der CBPi in den weiteren Versuchen verwendet werden. Im Inhibitionsversuch mit CBPi konnte gezeigt werden, dass interessanterweise die indirekte Inhibition von pCREB via CBP nicht nur zu einer Aufhebung der Strahlenresistenz auf das Kontrolllevel, sondern zu einer Strahlensensibilisierung, deutlich unter das Niveau der Kontrolle führt (Abb. 16). Diese verstärkte Strahlensensibilisierung nach der CBP Inhibition soll im Folgenden diskutiert werden, da dieser Effekt mit einer veränderten DNA-DSB Reparatur in Verbindung stehen könnte.

Neben CBP wurde auch EGFR inhibiert. Im Gegensatz zu pCREB wurde bei pEGFR kein verstärkter Anstieg des Phosphorylierungslevels nach der Kombinationsbehandlung mit LPS und Bestrahlung, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung, beobachtet (Abb. 12 A und B). Jedoch führte die Bestrahlung zu einer Phosphorylierung von EGFR. Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlung die Translokation von EGFR in den Nukleus bewirken kann (221). Dort führt der Anstieg von EGFR zu einem Anstieg von DNA-Reparaturproteinen. Während dieses Prozesses werden Ku70/80 und die Proteinphosphatase 1 in den Nukleus

transportiert. In der Folge kommt es zu einer Erhöhung der nukleären Kinaseaktivität der DNA-abhängigen Kinase (DNA-PK) und zu einer verstärkten Bildung der DNA-PK-haltigen Enden bindenden Proteinkomplexe, die für die Reparatur von DNA-Strangbrüchen essentiell sind (221). Somit führt die EGFR Zunahme zu einer Radioresistenz, die durch EGFR-Inhibitoren aufgehoben werden kann (221). Dies beschreiben auch meine Ergebnisse der EGFR-Inhibitionsversuche. Die Inhibition von EGFR mittels des Inhibitors AG1478 führt zu einer Aufhebung der Strahlenresistenz in den LPS behandelten und Bestrahlten H1975 Zellen. Jedoch führt die Behandlung mit dem EGFR Inhibitor (EGFRi) zu keiner Strahlensensibilisierung wie bei der CBP Inhibition beobachtet wurde (Abb. 16 A und 16 B). Da die LPS-Behandlung alleine zu keinem Anstieg des Phosphorylierungslevels von EGFR beiträgt und auch die Kombinationsbehandlung keine Steigerung des Phosphorylierungslevels im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung zeigt, belegen die Ergebnisse, dass EGFR zwar zu einer Strahlenresistenz beiträgt (Abb.16 A und 16 B), aber nicht direkt in eine LPS induzierte Strahlenresistenz involviert ist (Abb. 12 A und B).

De S. et al. zeigte zwar, dass der durch LPS induzierte Signalweg via TLR-4 abhängig von einer Interaktion mit EGFR durch pLyn ist (101). Diese Abhängigkeit konnte in dem hier gezeigten *in vitro* Modell mit H1975 nicht gezeigt werden. Auch konnte hier nicht geklärt werden, ob pLyn, trotz der geringen Ansprache auf die Kombinationsbehandlung mit LPS und Bestrahlung, zu der Interaktion zwischen EGFR und TLR-4 beiträgt. Es wäre daher auch möglich, dass eine andere SFK wie Lck, Fyn oder Fgr für die Interaktion zwischen EGFR und TLR-4 nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung verantwortlich ist (Abb. 12 A und B). Daher sind weitere Untersuchungen nötig um die Interaktion von TLR-4 und EGFR und eine mögliche Rolle der SFKs in dem hier dargestellten *in vitro* Modell mit H1975 zu klären. Dazu könnten die verschiedenen SFKs, die im Proteom Profiling Array einen Anstieg des Phosphorylierungslevels zeigten, spezifisch durch RNA Interferenz (RNAi) gehemmt werden und die Auswirkung auf die Koloniebildung nach LPS-Behandlung mit Bestrahlung und EGFR Inhibition untersucht werden.

4.6. Die CREB-binding protein Inhibition spielte keine Rolle bei der Interleukin-6 Freisetzung in H1975 Zellen und Interleukin-6 scheint kein Effektor der cAMP response element-binding protein-induzierten Strahlentherapieresistenz zu sein

Wie schon zuvor beschrieben stellt die Untersuchung der IL-6 Freisetzung mittels IL-6 ELISAs eine Positivkontrolle der effektiven LPS-Behandlung dar (Abb. 10), da die IL-6 Expression durch die Gabe von LPS ansteigt (225). Dies ist nicht nur in der Lunge zu beobachten, sondern auch im Gehirn (226), in Blutproben (227) oder in der Co-Kultur von

A549 Zellen und neutrophile Granulozyten (124). Daher wurden eine erhöhte IL-6 Freisetzung nach der LPS-Behandlung als Auswahlkriterium für den Einsatz im Proteom Profiling Array vorausgesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung alleine nicht mit einer verstärkten IL-6 Freisetzung korreliert. Jedoch kommt es durch LPS zu einer signifikant erhöhten IL-6 Freisetzung, die in Kombination mit Bestrahlung weiter verstärkt wird (Abb. 10 und Abb. 17). Andere Studien zeigen, dass IL-6 in Kombination mit weiteren Zytokinen wie IL-1 und TNF das Überleben von Mäusen nach einer Bestrahlung mit einer letalen Strahlendosis erhöht und sie resistent gegen diese macht (228, 229). Auch ist bekannt, dass CREB und NF κ B die Transkription von IL-6 über dessen cAMP response element (CRE) regulieren (230).

Dies lässt vermuten, dass die verstärkte LPS induzierte IL-6 Freisetzung nach der Bestrahlung auch in diesem *in vitro* Strahlenmodell mit H1975 zu einer Strahlenresistenz beitragen kann. Ob dies ein eigenständiger oder zusätzlicher Effekt ist und ob dieser über CREB vermittelt wird, soll im Folgenden diskutiert werden.

Die Literatur beschreibt, dass IL-6 nach einer LPS-Behandlung hochreguliert und verstärkt freigesetzt wird (124, 226, 227). Außerdem ist eine Korrelation zwischen IL-6 Expression und einer erworbenen Strahlenresistenz beschrieben worden (97). IL-6 inhibiert das mitochondriale ROS Level. Dies resultiert in einer Erniedrigung des intrazellulären ROS Levels und diese führt zu einer verstärkten Strahlenresistenz, da dadurch die DNA-DSB reduziert werden (98). Meine Untersuchungen zeigten, dass LPS zu einem Anstieg von IL-6 führt (Abb. 10). Dieser Effekt wird durch die Bestrahlung verstärkt (Abb. 10). Außerdem führen eine LPS-Behandlung und Bestrahlung zu einer verringerten Anzahl der residuellen DNA-DSB (Abb. 18B). Dies kann durch die zusätzliche Zugabe von CBPi aufgehoben werden, sprich es kommt zu mehr residuellen DNA-DSB. Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob pCREB, CBP und IL-6 in einer Interaktion zueinander stehen und die nach der LPS-Behandlung erworbene Strahlenresistenz dadurch hervorgerufen wird.

Deswegen wurde zunächst untersucht, ob eine CBP Inhibition mit einer verringerten IL-6 Freisetzung nach der LPS-Behandlung alleine oder in Kombination mit Bestrahlung korreliert. In denen von mir durchgeführten ELISAs konnte keinen Unterschied in der IL-6 Freisetzung, im Vergleich zu den Proben ohne CBPi, gemessen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass IL-6 nicht über CREB und CBP die Strahlensensitivität der Zellen moduliert

Dies ist zunächst nicht verwunderlich, da die Bindung von CBP und pCREB durch die Inhibition gestört ist. Ein Gleichbleiben der IL-6 Freisetzung ist durch NF κ B zu erklären. So ist beschrieben, dass der CBPi ICG-001 keine Auswirkung auf die IL-6 Produktion via NF κ B hat (231). Der CBPi ICG-001 inhibiert selektiv die β -catenin/CBP Interaktion, ohne Effekt auf die

β -catenin/p300 Interaktion zu haben (231). Auch konnten die Autoren zeigen, dass es zu einer verstärkten IL-6 Expression kommt, wenn zusätzlich IL-1 β zugegeben wird (231). Weiter zeigten sie, dass rekombinantes IL-1 β die Translokation von β -catenin parallel mit p65 in den Nukleus induziert. Im Nukleus bindet β -catenin mit den Co-Faktoren CBP oder p300. CBP und p300 steuern das p65 Signaling. Die Inhibition von β -catenin/CBP verstärkt die IL-1 β vermittelte *IL-6* mRNA Expression, wohingegen die Inhibition von β -catenin/p300 die *IL-6* Expression reduziert. Daher gehen die Autoren davon aus, dass CBP entweder als Inhibitor wirkt oder nicht in der IL-6 Expression involviert ist (231).

Dies erklärt, dass die IL-6 Freisetzung nach der CBP Inhibition nicht verändert ist. Auch zeigt es, dass CBP keinen Einfluss auf die LPS induzierte IL-6 Freisetzung hat und die indirekte Inhibition von pCREB für die IL-6 Expression nicht von Bedeutung ist. Außerdem wird belegt, dass die durch IL-6 induzierte Strahlenresistenz unabhängig von der CREB induzierten Strahlenresistenz ist.

Da der klonogene Zelltod nach Bestrahlung vorrangig durch die nicht und fehlerhaft reparierten DNA-DSB induziert wird (131, 132), wird im Folgenden diskutiert, ob die LPS-Behandlung und die CBP Inhibition einen direkten Einfluss auf die residuellen γ H2AX/53BP1 FOCI haben.

4.7. Die Kombination von LPS und Bestrahlung korrelierte in H1975 Zellen mit einer Reduktion von residuellen DNA-Doppelstrangbrüchen, während die CREB-binding protein Inhibition zu einem Anstieg der residuellen DNA-Doppelstrangbrüche im Vergleich zur Kontrolle führt

In dieser Arbeit konnte mittels der γ H2AX/53BP1 Foci Technik gezeigt werden, dass die erhöhte Überlebensfraktion in LPS-behandelten Zellen nach Bestrahlung mit einer veränderten Anzahl der residuellen DNS-DSB korreliert (Abb. 18). So zeigen die humanen H1975 Zellen nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung weniger residuelle DNA-DSB im Vergleich zu Zellen, die nur bestrahlt wurden (Abb. 18B und C). Dies lässt einen Einfluss von LPS auf die DNA-Reparaturkapazität vermuten. Die LPS induzierte Strahlenresistenz konnte durch die indirekte pCREB Inhibition mittels des CBP Inhibitors nicht nur aufgehoben werden, sondern die Anzahl der residuellen γ H2AX/53BP1 Foci war nach der CBP Inhibition signifikant höher als nach der alleinigen Bestrahlung mit 4 Gy. Dies korreliert mit der in der Überlebenskurve und der Überlebensfraktion gemessene Strahlensensibilität (Abb. 16A und B). Die Strahlensensibilität nach der indirekten CREB-Inhibition mit dem CBPi ist mit der Erhöhung der residuellen γ H2AX/53BP1 Foci zu erklären. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass LPS die zelluläre Strahlenresistenz über den CBP Signalweg durch die Auswirkung auf die DSB-Reparatur moduliert.

Es wurde schon zuvor in mehreren Studien beschrieben, dass CREB in einer Strahlenresistenz und dem Zellüberleben involviert ist (194). So konnte in CHO Zellen gezeigt werden, dass eine Runterregulation von CREB in einer dominant-negativen Mutanten zu einer verringerten DSB-Reparatur führt. Dies resultiert in einer verstärkten zellularen Strahlensensibilität (232). Weitere Untersuchungen zeigen, dass CREB von ATM und ATR an S121 als Antwort auf eine Bestrahlung phosphoryliert werden kann. Bei ATM und ATR handelt es sich um Kinasen die in der DDR aktiv sind. DNA Schäden und DNA-Replikationsstress aktivieren diese beiden Kinasen (51). Auch H₂O₂ ist in der Lage CREB in neuronalen Zellen nicht nur an S133, sondern auch an anderen Aminosäureresten, zu phosphorylieren. Dies scheint PKA unabhängig zu sein (233). In neuronalen Zellen induziert die CREB Überexpression DDR Gene. Das fördert die DNA-Reparatur und verringert die Apoptose (233). Dadurch ist zu vermuten, dass auch hier aktiviertes/phosphoryliertes CREB zu einer verstärkten DNA-Reparatur beiträgt und daher weniger residuelle DNA-DSB 24 h nach der Bestrahlung vorhanden sind (Abb. 18).

Es ist weiter beschrieben, dass die Reduktion der DSB-Reparatur die Folge einer Herunterregulation des NHEJ ist (219). Bei dem NHEJ handelt es sich um einen der beiden Hauptreparaturwege für DNA-DSB in Säugerzellen. Auch die Inhibition des CBP führt zu einer verminderten Acetylierung von Ku70, welches einen Hauptakteur des NHEJ darstellt (234). Die verstärkte Phosphorylierung von CREB könnte mit einer verstärkten NHEJ Aktivität nach der Kombinationsbehandlung mit LPS und Bestrahlung assoziiert sein, da nach der Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung mehr residuelle DNA-DSB zu beobachten waren (Abb. 18 A und B, achte Säule). Es kann daher vermutet werden, dass die mittels CBPi induzierte Strahlensensibilität von einer starken Reduktion des NHEJ auf ein Level unter der unbehandelten Kontrolle resultiert. Um diese Vermutung zu stützen wäre es notwendig, ein Comet-Assay durchzuführen und so die DNA-Schädigung in einzelnen Zellen zu untersuchen. Weiter müsste die Auswirkung der CBP Inhibition auf die in das NHEJ involvierte Proteine untersucht werden.

All die hier durchgeführten Experimente und im Proteom Profiling Array untersuchten Proteine zeigen, dass es sich bei einer Strahlenresistenz um einen sehr komplexen Prozess handelt. Es kann zwar hier im *in vitro* Strahlenmodell mit H1975 Zellen von einer LPS induzierten Strahlenresistenz ausgegangen werden, bei der CREB und sein Co-Faktor CBP involviert sind. Es ist jedoch nicht klar wie und welche andere Proteine dabei eine Rolle spielen. Auch die Literatur nennt immer wieder verschiedene Proteine und Signalwege, die bei einer Strahlenresistenz von Bedeutung sind. Ob es sich dabei jedoch immer um einen eigenständigen Signalweg handelt oder ob diese über verschiedene Proteine zu einem

großen Netzwerk verbunden sind, ist noch nicht näher geklärt. So kann auch in diesem Modell indirekt IL-6 eine Rolle spielen.

Für die Patienten mit einem NSCLC ist es somit sehr schwierig, ein geeignetes Zielprotein zur Hemmung und Behandlung zu identifizieren, da ein anderer Signalweg als *backup* Weg zu einer Resistenz führen könnte. Jedoch ist es sinnvoll mögliche Behandlungsstrategien bei einer Strahlentherapieresistenz zu entwickeln, da dies die Prognose der Patienten verbessern würde. Eine dieser Strategien könnte in einer durch pulmonale Infektionen induzierte Strahlentherapieresistenz über die Inhibition von CREB bzw. seines Co-Faktors CBP bestehen.

4.8. Schlussfolgerung

Patienten mit NSCLC weisen häufig als Komorbidität bakterielle pulmonale Infektionen auf, bei denen zirkulierendes LPS im Organismus präsent ist (117). Diese Infektionen verschlechtern die Prognose des NSCLCs (61). Daher sollte die Auswirkung von LPS auf die Strahlentherapieansprache in dieser Arbeit untersucht werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LPS keine Auswirkung auf das klonogene Überleben der untersuchten NSCLC Zellen hat. Jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LPS in der Lage ist, eine Strahlenresistenz in *TLR-4* und *EGFR*-positiven NSCLC Zelllinien wie H1975 und A549 zu induzieren. In H520, die nur wenig *TLR-4* und *EGFR* exprimieren (127), konnte LPS nicht die Strahlentherapieansprache modulieren.

Nach der Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung kommt es zu einem Anstieg des Phosphorylierungslevels von CREB an S133. Nach der Phosphorylierung von CREB an S133 kommt es zur Bindung von CBP (202, 223). Das hier dargestellte *in vitro* H1975 Strahlenmodell lässt vermuten, dass pCREB und CBP durch zu einer verminderten DNA-DSB Reparatur zu einer Strahlenresistenz beitragen. Diese Strahlenresistenz kann durch die CBP Inhibition aufgehoben werden. Die CBP Inhibition führt dabei nicht nur zu einer Aufhebung der Resistenz, sondern zu einer gesteigerten Strahlensensibilität in H1975 Zellen. Im Gegensatz dazu beeinflusst die CBP Inhibition nicht die LPS-induzierte Freisetzung von IL-6.

Die Inhibition des CBP oder des involvierten Signalweges in Kombination mit Bestrahlung könnte eine neue Möglichkeit für eine effektivere Therapie von NSCLC Patienten darstellen, welche bis jetzt nur eine schlechte Prognose und eine kurze Überlebensrate haben. Jedoch sind davor Untersuchungen in anderen NSCLC Zelllinien und *in vivo* Versuche nötig.

Die hier gezeigten Daten weisen darauf hin, dass eine Kombination aus Bestrahlung und CBPi eine mögliche Strategie für NSCLC Patienten darstellen könnte, die unter bakteriellen pulmonalen Infektionen leiden.

5. Zusammenfassung

Lungenkrebs stellt die häufigste durch Krebs verursachte Todesfolge in der westlichen Hemisphäre dar (1), wobei das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (englisch: non-small cell lung cancer; NSCLC) mit etwa 85% aller Fälle den dominierenden histologischen Subtyp darstellt (4).

Die Strahlentherapie stellt alleine oder in Kombination mit Chemotherapie und Operation, eine wichtige Komponente der Krebstherapie dar. Neben diesen Therapieformern kamen in den letzten Jahren die Immuntherapie und die sogenannte *targeted therapy* hinzu. Bei der *targeted therapy* werden zum Beispiel Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI) gegen aktivierende Mutationen des Epidermal growth factor receptor (EGFR) eingesetzt.

Bakterielle pulmonale Infektionen sind eine häufige Komplikation bei der Behandlung von Patienten mit NSCLCs und verschlechtern deren Prognose (61). Diese Infektionen werden vielfach von gram-negativen Bakterien verursacht (60), deren Hauptpathogenitätsfaktor Lipopolysaccharid (LPS) darstellt (60). LPS bindet in pulmonalen Epithelzellen an den Toll-like receptor 4 (TLR-4), sodass es zu einer Entzündungsantwort kommt (65) mit Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) (86, 87). Auch ist eine Interaktion zwischen TLR-4 und EGFR beschrieben (101).

Des Weiteren ist bekannt, dass LPS das Tumorwachstum *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* stimuliert (108). Ob LPS jedoch direkt oder indirekt die Strahlensensitivität von NSCLC Zelllinien beeinflusst und welche Proteine und Signalwege dabei eine Rolle spielen ist noch nicht näher geklärt und wurde in dieser Arbeit untersucht.

Zunächst wurden drei verschiedene NSCLC Zelllinien mit unterschiedlichem *TLR-4* und *EGFR* Status ausgewählt. Anhand dieser sollte der Effekt von LPS auf die zelluläre Überlebensfraktion mittels Koloniebildungsassays untersucht werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die beiden Adenokarzinomzelllinien H1975 und A549, die eine mittlere bis hohe *TLR-4* und *EGFR* mRNA Expression aufweisen, mit einer verringerten Strahlensensibilität reagieren. Die Plattenepithelkarzinom Zelllinie H520, die kaum *TLR-4* und *EGFR* exprimiert, reagiert mit keiner veränderten Strahlenansprache auf die LPS-Behandlung.

Zur Identifizierung involvierter Proteine, mittels eines Proteom Profiling Arrays, wurde die Zelllinie H1975 ausgewählt, da diese auf die LPS-Behandlung mit einer Verdopplung der Überlebensfraktion reagierte. Die Kombinationsbehandlung aus 10 µg/ml LPS und 6 Gy zeigte im Proteom Profiling Array eine verstärkte Hochregulation des Phosphorylierungslevels der Src family kinases (SFKs) Lck, Fyn und Fgr. Die SFK Lyn zeigte

dahingegen keinen so starken Anstieg des Phosphorylierungslevels im Vergleich zu Lck, Fyn und Fgr. EGFR wurde nur durch die Bestrahlung verstärkt phosphoryliert. Einen Anstieg des Phosphorylierungslevels um 200% wurde außerdem bei dem cAMP response element-binding protein (CREB) gemessen. Bei CREB handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der unter anderem, die DNA-Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur beeinflusst (51, 232, 233). Daher wurde pCREB in weiteren Versuchen indirekt durch die Inhibition des CREB binding protein (CBP) inhibiert. Zusätzlich wurde als interne Kontrolle EGFR inhibiert. Die Inhibition von CBP korreliert mit einer verstärkten Strahlensensibilität, wohingegen es nach der EGFR Inhibition nur zu einer Aufhebung der LPS-induzierten Strahlenresistenz kommt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte Strahlenresistenz in H1975 Zellen möglicherweise auf eine veränderte DNA-DSB Reparatur zurückzuführen ist. So korreliert eine LPS-Behandlung mit weniger residuellen γ H2AX/53BP1 Foci nach der Bestrahlung mit 4 Gy, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung. Dahingegen führt die CBP Inhibition zu einem signifikanten Anstieg von residuellen DNA-DSB, im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass LPS in der Lage ist, in den *TLR-4* und *EGFR* mRNA exprimierenden Zellen H1975 und A549 eine Strahlenresistenz zu induzieren. Als möglicher grundlegender Mechanismus wurde in der Zelllinie H1975 die verstärkte Phosphorylierung von CREB identifiziert. Nach der Inhibition des CBP als indirekter CREB-Inhibitor kommt es zu einer Aufhebung der Strahlenresistenz und weiter noch zu einer verstärkten Strahlensensibilität. Dieser Effekt kann auf eine verminderte Anzahl der residuellen DNA-DSB zurückzuführen sein.

Die Inhibition des CREB-abhängigen Signalwegs könnte eine zukünftige therapeutische Option bei Patienten mit strahlenresistentem NSCLC darstellen.

6. Summary

Lung cancer is the leading cause of cancer death in the western hemisphere (1), with non-small cell lung cancer (NSCLC) being the dominant histological subtype in about 85% of all cases (4).

Radiotherapy is a component of tumor therapy alone or in combination with surgery or chemotherapy. Treatments like the immune therapy or targeted therapy against activating mutations of epidermal growth factor receptor (EGFR) are new strategies.

NSCLC is often complicated by pulmonary infections, which appear to impair prognosis as well as therapy (61). Gram-negative bacteria are common pathogens in patients with lung cancer. Their virulence is caused by lipopolysaccharides (LPS) (60). LPS binds to Toll-like receptor 4 (TLR-4) in pulmonary epithelial cells, leading to an inflammatory response (65) with release of cytokines such as interleukin-6 (IL-6) (86, 87). Also an interaction between TLR-4 and EGFR is described (101).

Moreover, it is known that LPS stimulates the tumor growth *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* (108). However, it is unclear whether LPS directly or indirectly modulates the radiation sensitivity and which proteins and pathways are involved. This should be investigated in this work.

Three different NSCLC cell lines with different *TLR-4* and *EGFR* status were selected. Based on this, the effect of LPS on the cellular survival fraction was investigated by colony-formation assays. It was shown that the two adenocarcinoma cell lines H1975 and A549, which show a medium to high *TLR-4* and *EGFR* mRNA expression, react with a reduced sensitivity to radiation. The squamous cell carcinoma cell line H520, which expresses only small amounts of *TLR-4* and *EGFR*, does not respond to LPS treatment with any altered radiation response.

To identify involved proteins, using a proteomic profiling array, the H1975 cell line was selected, as it responded to LPS treatment with a doubling of the survival fraction. The combination treatment of 10 µg/ml LPS and 6 Gy showed an increased phosphorylation level of the Src family kinases (SFKs) Lck, Fyn and Fgr in the proteomic profiling array. In contrast, the SFK Lyn did not show as much increase in phosphorylation levels as Lck, Fyn and Fgr. EGFR was phosphorylated only by irradiation. An increase of the phosphorylation level by 200% was also measured in the cAMP response element-binding protein (CREB). CREB is a transcription factor that influences DNA double strand break (DSB) repair (51, 232, 233). pCREB was indirectly inhibited in further experiments by the CREB binding protein (CBP). In addition, EGFR was inhibited as an internal control. The inhibition of CBP resulted in

enhanced radiosensitivity, whereas EGFR inhibition only correlates with a reversal of LPS-induced radiation resistance.

Furthermore, it could be shown that LPS-induced radiation resistance in H1975 cells may be due to altered DNA-DSB repair. The LPS treatment correlates with less residual γ H2AX/53BP1 foci after irradiation with 4 Gy compared to the sole irradiation. In contrast, CBP inhibition leads to a significant increase of residual DNA-DSB, compared to the sole irradiation.

In conclusion, it has been shown that LPS is capable of inducing radiation resistance in *TLR-4* and *EGFR* mRNA expressing cells H1975 and A549. As a possible basic mechanism, the enhanced phosphorylation of CREB was identified in the cell line H1975. After inhibition of CBP as an indirect CREB inhibitor, the radiation resistance is abolished and further increased radiation sensitivity. This effect may be due to a decreased number of residual DNA-DSB.

Inhibition of the CREB-dependent signaling pathway could be a future therapeutic option in patients with radiation resistant NSCLC.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstandardisierte Erkrankungsrate und Sterberate beim Lungenkarzinom bei Frauen und Männern, je 100.000 (Europastandard).....	1
Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung des Toll-like Rezeptor 4 (TLR)-Signalweges.	10
Abbildung 3: Elektronenlinearbeschleuniger Elektra Synergy und Aufbau der Bestrahlungsversuche.	26
Abbildung 4: Lineare Regression der Primereffizienz der verwendeten Primer	30
Abbildung 5: Bestimmung der Nukleotidlänge der Primerprodukte.....	31
Abbildung 6: Eine LPS-Behandlung hatte keine Auswirkung auf die Koloniebildungsfähigkeit.	42
Abbildung 7: LPS induzierte eine Veränderung der Strahlensensibilität in H1975 Zellen.	44
Abbildung 8: LPS induzierte eine Veränderung der Strahlensensibilität in A549 Zellen.....	45
Abbildung 9: LPS induzierte keine Veränderung der Strahlensensibilität in H520 Zellen.....	46
Abbildung 10: Die LPS-Behandlung korrelierte mit einer verstärkten Freisetzung von IL-6 in H1975 Zellen.	47
Abbildung 11: Quantitative Analyse des Phosphorylierungslevels der untersuchten Proteine des Proteom Profiling Arrays von H1975 Zellen 24 h nach der Behandlung mit 10 µg/ml LPS und Bestrahlung (IR) mit 6 Gy.....	52
Abbildung 12: Die Kombination von LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte mit einem Anstieg des Phosphorylierungslevels von CREB (pCREB) in H1975 Zellen.....	53
Abbildung 13: Die Kombination aus LPS-Behandlung und Bestrahlung korrelierte mit einer Hochregulation von phosphoryliertem CREB (pCREB).....	54
Abbildung 14: Die Inhibition des CREB-binding protein (CBP).....	55
Abbildung 15: Inhibition von des CREB-binding protein (CBP) und Epidermal growth factor receptor (EGFR).	56
Abbildung 16: Die Inhibition des CREB-binding protein (CBPi) korrelierte mit einer LPS induzierte Strahlensensibilisierung.	57
Abbildung 17:Die CBP Inhibition veränderte nicht die IL-6 Freisetzung von H1975 Zellen, im Vergleich zu den nicht mit CBPi behandelten Proben.....	59
Abbildung 18: Die Inhibition von CBP (CBPi) beeinträchtigte die DNA-Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur nach der LPS-Behandlung und Bestrahlung.....	61

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete humane NSCLC Zelllinien.....	19
Tabelle 2: Anzahl der ausgesäten Zellen für die LPS-Behandlung.....	25
Tabelle 3: Verwendete Zellzahlen und durchgeführte Behandlungen der Koloniebildungsassays.	27
Tabelle 4: Primereffizienz der verwendeten Primer.	30
Tabelle 5: Basale mRNA Expression von <i>TLR-4</i> und <i>EGFR</i>	39
Tabelle 6: LPS Toxizität-Tests bei H1975 Zellen.	40

10. Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(1):7-30. Epub 2018/01/10.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(1):9-29. Epub 2014/01/09.
3. World Cancer Report 2014. 9789283204299 ed. Stewart BW, Wild C, editors. International Agency for Research on Cancer: International Agency for Research on Cancer; 2014.
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic proceedings*. 2008;83(5):584-94. Epub 2008/05/03.
5. Ho C, Tong KM, Ramsden K, Ionescu DN, Laskin J. Histologic classification of non-small-cell lung cancer over time: reducing the rates of not-otherwise-specified. *Curr Oncol*. 2015;22(3):e164-70. Epub 2015/06/20.
6. Furrukh M. Tobacco Smoking and Lung Cancer: Perception-changing facts. *Sultan Qaboos University medical journal*. 2013;13(3):345-58. Epub 2013/08/29.
7. Alberg AJ, Nonemaker J. Who is at high risk for lung cancer? Population-level and individual-level perspectives. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2008;29(3):223-32. Epub 2008/05/29.
8. Pallis AG, Syrigos KN. Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013;88(3):494-503. Epub 2013/08/08.
9. Liang HY, Li XL, Yu XS, Guan P, Yin ZH, He QC, et al. Facts and fiction of the relationship between preexisting tuberculosis and lung cancer risk: a systematic review. *International journal of cancer*. 2009;125(12):2936-44. Epub 2009/06/13.
10. Spiro SG, Gould MK, Colice GL. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007;132(3 Suppl):149S-60S. Epub 2007/10/06.
11. Ozkaya S, Findik S, Dirican A, Atici AG. Long-term survival rates of patients with stage IIIB and IV non-small cell lung cancer treated with cisplatin plus vinorelbine or gemcitabine. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;4(6):1035-8. Epub 2012/12/12.
12. Arruebo M, Vilaboa N, Saez-Gutierrez B, Lambea J, Tres A, Valladares M, et al. Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers*. 2011;3(3):3279-330. Epub 2011/01/01.
13. Anderson CS, Curran WJ. Combined modality therapy for stage III non-small-cell lung cancer. *Seminars in radiation oncology*. 2010;20(3):186-91. Epub 2010/08/06.
14. Chan BA, Hughes BG. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research*. 2015;4(1):36-54. Epub 2015/03/26.
15. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*. 2016;5(3):288-300. Epub 2016/07/15.
16. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015.
17. Brown JM, Wilson WR. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(6):437-47. Epub 2004/06/02.
18. Zarogoulidis K, Zarogoulidis P, Darwiche K, Boutsikou E, Machairiotis N, Tsakiridis K, et al. Treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of thoracic disease*. 2013;5 Suppl 4:S389-96. Epub 2013/10/09.
19. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*. 2004;350(21):2129-39. Epub 2004/05/01.

20. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-500. Epub 2004/05/01.
21. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(36):13306-11. Epub 2004/08/27.
22. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(23):2167-77. Epub 2014/12/04.
23. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):e218-28. Epub 2013/05/04.
24. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 2004;21(4):491-501. Epub 2004/10/16.
25. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Kloppel G, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer cell*. 2011;19(4):456-69. Epub 2011/04/13.
26. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*. 2009;361(10):947-57. Epub 2009/08/21.
27. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*. 2009;15(2):103-13. Epub 2009/02/03.
28. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64. Epub 2012/03/23.
29. Mu CY, Huang JA, Chen Y, Chen C, Zhang XG. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011;28(3):682-8. Epub 2010/04/08.
30. Seegenschmiedt MH, Zehe M. Qualitätsmanagement in der Radioonkologie. *Der Onkologe*. 2012(18(6)):485-500.
31. Herrmann T, Baumann M, Dörr W. *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig*. Elsevier: Elsevier GmbH & Fischer Verlag; 2006.
32. Hall EJ, Giaccia A. *Radiobiology for the radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins 2011.
33. Krieger H. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes*. Springer Verlag.
34. Glocker R, Risse O. Über die photochemische Wirkung von Röntgenstrahlen verschiedener Wellenlänge. *Zeitschrift für Physik* 1929.
35. Roots R, Okada S. Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiation research*. 1975;64(2):306-20. Epub 1975/11/01.
36. Schüßler H. *Einwirkung ionisierender Strahlung auf Proteine in wäßriger Lösung*. Biophysik 1973.
37. Baskar R, Dai J, Wenlong N, Yeo R, Yeoh KW. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences*. 2014;1:24. Epub 2014/01/01.
38. Willers H, Azzoli CG, Santivasi WL, Xia F. Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. *Cancer J*. 2013;19(3):200-7. Epub 2013/05/28.
39. Fitzgerald TJ, Jodoin MB, Tillman G, Aronowitz J, Pieters R, Balducci S, et al. Radiation therapy toxicity to the skin. *Dermatologic clinics*. 2008;26(1):161-72, ix. Epub 2007/11/21.
40. Richter J, Felentje M. *Strahlenphysik für die Radioonkologie*: Thieme; 1998.
41. Lee N, Chuang C, Quivey JM, Phillips TL, Akazawa P, Verhey LJ, et al. Skin toxicity due to intensity-modulated radiotherapy for head-and-neck carcinoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2002;53(3):630-7. Epub 2002/06/14.

42. Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells*. 2010;28(4):639-48. Epub 2010/02/06.
43. Teoule R. Radiation-induced DNA damage and its repair. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*. 1987;51(4):573-89. Epub 1987/04/01.
44. Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International journal of radiation biology*. 1994;65(1):7-17. Epub 1994/01/01.
45. Glocker R, Kaupp E, Widmann H. Über die Erregung von Fluoreszenzlicht durch Röntgenstrahlen verschiedener Wellenlänge. *annalen der physik*. 1928;Volume 390, Issue 3:313-32.
46. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1953;26(312):638-48. Epub 1953/12/01.
47. Churchill-Davidson I. The oxygen effect in radiotherapy. *Oncology*. 1966;20:Suppl:18-29. Epub 1966/01/01.
48. Ewing D. The oxygen fixation hypothesis: a reevaluation. *American journal of clinical oncology*. 1998;21(4):355-61. Epub 1998/08/26.
49. Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J. Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry*. 2000;39(27):8026-31. Epub 2000/07/13.
50. Powell S, McMillan TJ. DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 1990;19(2):95-108. Epub 1990/10/01.
51. Marechal A, Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(9). Epub 2013/09/05.
52. Dianov GL, Parsons JL. Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA repair*. 2007;6(4):454-60. Epub 2006/11/25.
53. Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(16):5706-15. Epub 2003/08/05.
54. Qiao GB, Wu YL, Yang XN, Zhong WZ, Xie D, Guan XY, et al. High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *British journal of cancer*. 2005;93(1):137-43. Epub 2005/06/16.
55. Kasten-Pisula U, Tastan H, Dikomey E. Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *International journal of radiation biology*. 2005;81(6):409-19. Epub 2005/10/27.
56. Herrmann T, Baumann M, Dörr W. *Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig* 2006.
57. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *The Journal of experimental medicine*. 1956;103(5):653-66. Epub 1956/05/01.
58. Rossi HH, Kellner AM. Radiation carcinogenesis at low doses. *Science*. 1972;175(4018):200-2. Epub 1972/01/14.
59. Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1989;62(740):679-94. Epub 1989/08/01.
60. Berghmans T, Sculier JP, Klastersky J. A prospective study of infections in lung cancer patients admitted to the hospital. *Chest*. 2003;124(1):114-20. Epub 2003/07/11.
61. Perlin E, Bang KM, Shah A, Hursey PD, Whittingham WL, Hashmi K, et al. The impact of pulmonary infections on the survival of lung cancer patients. *Cancer*. 1990;66(3):593-6. Epub 1990/08/01.
62. Putinati S, Trevisani L, Gualandi M, Guerra G, Rossi MR, Sartori S, et al. Pulmonary infections in lung cancer patients at diagnosis. *Lung Cancer*. 1994;11(3-4):243-9. Epub 1994/09/01.
63. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiological reviews*. 1996;60(2):316-41. Epub 1996/06/01.

64. Pietrocola G, Arciola CR, Rindi S, Di Poto A, Missineo A, Montanaro L, et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *The International journal of artificial organs*. 2011;34(9):799-810. Epub 2011/11/19.
65. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 1996;272(5258):50-3. Epub 1996/04/05.
66. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8. Epub 2000/08/11.
67. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72. Epub 2000/04/18.
68. Khatami M. 'Yin and Yang' in inflammation: duality in innate immune cell function and tumorigenesis. *Expert opinion on biological therapy*. 2008;8(10):1461-72. Epub 2008/09/09.
69. Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2008;19(1):93-107. Epub 2007/12/07.
70. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature immunology*. 2001;2(4):293-9. Epub 2001/03/29.
71. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):37-49. Epub 2009/12/04.
72. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3. Epub 1990/09/21.
73. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(4):615-25. Epub 1999/02/17.
74. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005;17(1):1-14. Epub 2004/12/09.
75. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *The New England journal of medicine*. 2000;343(5):338-44. Epub 2000/08/03.
76. Stoll LL, Denning GM, Weintraub NL. Endotoxin, TLR4 signaling and vascular inflammation: potential therapeutic targets in cardiovascular disease. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(32):4229-45. Epub 2006/11/15.
77. Zhang YB, He FL, Fang M, Hua TF, Hu BD, Zhang ZH, et al. Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. *Molecular biology reports*. 2009;36(6):1475-81. Epub 2008/09/03.
78. Fu HY, Li C, Yang W, Gai XD, Jia T, Lei YM, et al. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: implications for tumor progression and escape. *Acta histochemica*. 2013;115(2):151-7. Epub 2012/07/04.
79. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(11):460-9. Epub 2007/11/22.
80. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology*. 2007;7(5):353-64. Epub 2007/04/26.
81. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-51. Epub 2008/02/29.
82. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(7):499-511. Epub 2004/07/02.
83. Guo J, Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2010;3:21. Epub 2010/10/23.
84. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(1):20-33. Epub 2015/12/19.
85. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling*. 2001;13(2):85-94. Epub 2001/03/21.
86. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(2):135-45. Epub 2002/03/22.
87. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;413(6857):732-8. Epub 2001/10/19.

88. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*. 1990;63(6):1149-57. Epub 1990/12/21.
89. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*. 2003;374(Pt 1):1-20. Epub 2003/05/30.
90. Scheller J, Grötzinger J, Rose-John S. Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. *Signal Transduction*. 2006;6:(240-59).
91. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44. Epub 2008/07/25.
92. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(3):109-19. Epub 2008/02/12.
93. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99. Epub 2010/03/23.
94. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*. 2012;8(9):1237-47. Epub 2012/11/09.
95. Silver JS, Hunter CA. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(6):1145-56. Epub 2010/07/09.
96. Fisher DT, Chen Q, Skitzki JJ, Muhitch JB, Zhou L, Appenheimer MM, et al. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(10):3846-59. Epub 2011/09/20.
97. Dubost JJ, Rolhion C, Tchirkov A, Bertrand S, Chassagne J, Dosgilbert A, et al. Interleukin-6-producing cells in a human glioblastoma cell line are not affected by ionizing radiation. *J Neurooncol*. 2002;56(1):29-34. Epub 2002/04/13.
98. Tamari Y, Kashino G, Mori H. Acquisition of radioresistance by IL-6 treatment is caused by suppression of oxidative stress derived from mitochondria after gamma-irradiation. *Journal of radiation research*. 2017;58(4):412-20. Epub 2017/02/16.
99. Heikkila K, Ebrahim S, Lawlor DA. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer*. 2008;44(7):937-45. Epub 2008/04/05.
100. McFarland BC, Hong SW, Rajbhandari R, Twitty GB, Jr., Gray GK, Yu H, et al. NF-kappaB-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma. *PloS one*. 2013;8(11):e78728. Epub 2013/11/19.
101. De S, Zhou H, DeSantis D, Croniger CM, Li X, Stark GR. Erlotinib protects against LPS-induced endotoxicity because TLR4 needs EGFR to signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(31):9680-5. Epub 2015/07/22.
102. Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA. Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics*. 2008;8(21):4383-401. Epub 2008/10/11.
103. Okamoto I. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy. *The FEBS journal*. 2010;277(2):309-15. Epub 2009/11/20.
104. De S, Dermawan JK, Stark GR. EGF receptor uses SOS1 to drive constitutive activation of NFkappaB in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(32):11721-6. Epub 2014/07/30.
105. Liccardi G, Hartley JA, Hochhauser D. EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment. *Cancer research*. 2011;71(3):1103-14. Epub 2011/01/27.
106. Bai J, Guo XG, Bai XP. Epidermal growth factor receptor-related DNA repair and radiation-resistance regulatory mechanisms: a mini-review. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2012;13(10):4879-81. Epub 2012/12/19.
107. Szumiel I. Epidermal growth factor receptor and DNA double strand break repair: the cell's self-defence. *Cellular signalling*. 2006;18(10):1537-48. Epub 2006/05/23.

108. Hattar K, Savai R, Subtil FS, Wilhelm J, Schmall A, Lang DS, et al. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2013;62(2):309-20. Epub 2012/08/28.
109. Hsu D, Fukata M, Hernandez YG, Sotolongo JP, Goo T, Maki J, et al. Toll-like receptor 4 differentially regulates epidermal growth factor-related growth factors in response to intestinal mucosal injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010;90(9):1295-305. Epub 2010/05/26.
110. Shuyi Y, Feng W, Jing T, Hongzhang H, Haiyan W, Pingping M, et al. Human beta-defensin-3 (hBD-3) upregulated by LPS via epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways to enhance lymphatic invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;112(5):616-25. Epub 2011/11/01.
111. McElroy SJ, Hobbs S, Kallen M, Tejera N, Rosen MJ, Grishin A, et al. Transactivation of EGFR by LPS induces COX-2 expression in enterocytes. *PloS one*. 2012;7(5):e38373. Epub 2012/06/08.
112. Trussoni CE, Tabibian JH, Splinter PL, O'Hara SP. Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Biliary Epithelial Cell NRas Activation Requires Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *PloS one*. 2015;10(4):e0125793. Epub 2015/04/29.
113. Nijkamp MM, Span PN, Bussink J, Kaanders JH. Interaction of EGFR with the tumour microenvironment: implications for radiation treatment. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2013;108(1):17-23. Epub 2013/06/12.
114. Lee HC, An S, Lee H, Woo SH, Jin HO, Seo SK, et al. Activation of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling pathway by nitric oxide in response to ionizing radiation. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(6):996-1002. Epub 2008/06/24.
115. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD, et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene*. 1997;15(10):1191-7. Epub 1997/09/19.
116. Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. *The Lancet Oncology*. 2008;9(3):288-96. Epub 2008/03/01.
117. Nijkamp MM, Hoogsteen IJ, Span PN, Takes RP, Lok J, Rijken PF, et al. Spatial relationship of phosphorylated epidermal growth factor receptor and activated AKT in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2011;101(1):165-70. Epub 2011/07/22.
118. Melkamu T, Qian X, Upadhyaya P, O'Sullivan MG, Kassie F. Lipopolysaccharide enhances mouse lung tumorigenesis: a model for inflammation-driven lung cancer. *Veterinary pathology*. 2013;50(5):895-902. Epub 2013/02/06.
119. Wang Y, Tu Q, Yan W, Xiao D, Zeng Z, Ouyang Y, et al. CXCR195 suppresses proliferation and inflammatory response in LPS-induced human hepatocellular carcinoma cells via regulating TLR4-MyD88-TAK1-mediated NF-kappaB and MAPK pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;456(1):373-9. Epub 2014/12/06.
120. Szajnik M, Szczepanski MJ, Czystowska M, Elishaev E, Mandapathil M, Nowak-Markwitz E, et al. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*. 2009;28(49):4353-63. Epub 2009/10/15.
121. Yang H, Wang B, Wang T, Xu L, He C, Wen H, et al. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PloS one*. 2014;9(10):e109980. Epub 2014/10/10.
122. Li S, Xu X, Jiang M, Bi Y, Xu J, Han M. Lipopolysaccharide induces inflammation and facilitates lung metastasis in a breast cancer model via the prostaglandin E2-EP2 pathway. *Molecular medicine reports*. 2015;11(6):4454-62. Epub 2015/01/28.
123. Hattar K, Reinert CP, Sibelius U, Gokyildirim MY, Subtil FSB, Wilhelm J, et al. Lipoteichoic acids from *Staphylococcus aureus* stimulate proliferation of human non-small-cell lung cancer cells in vitro. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2017;66(6):799-809. Epub 2017/03/21.

124. Grandel U, Heygster D, Sibelius U, Fink L, Sigel S, Seeger W, et al. Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil cocultures. *Mol Cancer Res*. 2009;7(10):1729-35. Epub 2009/10/15.
125. Li N, Li H, Su F, Li J, Ma X, Gong P. Relationship between epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and serum cyclooxygenase-2 Level, and the synergistic effect of celecoxib and gefitinib on EGFR expression in non-small cell lung cancer cells. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(8):9010-20. Epub 2015/10/16.
126. Walter AO, Sjin RT, Haringsma HJ, Ohashi K, Sun J, Lee K, et al. Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC. *Cancer discovery*. 2013;3(12):1404-15. Epub 2013/09/26.
127. Ware KE, Marshall ME, Heasley LR, Marek L, Hinz TK, Hercule P, et al. Rapidly acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in NSCLC cell lines through de-repression of FGFR2 and FGFR3 expression. *PloS one*. 2010;5(11):e14117. Epub 2010/12/15.
128. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 2004;23(48):7906-9. Epub 2004/10/19.
129. Emami KH, Nguyen C, Ma H, Kim DH, Jeong KW, Eguchi M, et al. A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(34):12682-7. Epub 2004/08/18.
130. Han Y, Caday CG, Nanda A, Cavenee WK, Huang HJ. Tyrphostin AG 1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer research*. 1996;56(17):3859-61. Epub 1996/09/01.
131. Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B. Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International journal of radiation biology*. 1998;73(3):269-78. Epub 1998/04/03.
132. Borgmann K, Dede M, Wrona A, Brammer I, Overgaard J, Dikomey E. For X-irradiated normal human fibroblasts, only half of cell inactivation results from chromosomal damage. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004;58(2):445-52. Epub 2004/01/31.
133. Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2015;56(6):491-504. Epub 2015/03/17.
134. Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levrà MG, et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2016;27(suppl 5):v1-v27. Epub 2016/09/25.
135. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(suppl_4):iv1-iv21. Epub 2017/09/09.
136. Chattopadhyay S, Veleparambil M, Poddar D, Abdulkhalek S, Bandyopadhyay SK, Fensterl V, et al. EGFR kinase activity is required for TLR4 signaling and the septic shock response. *EMBO reports*. 2015;16(11):1535-47. Epub 2015/09/06.
137. Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infection and immunity*. 1996;64(3):769-74. Epub 1996/03/01.
138. Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2005;12(1):60-7. Epub 2005/01/12.
139. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer research*. 2006;66(7):3859-68. Epub 2006/04/06.
140. Harmey JH, Bucana CD, Lu W, Byrne AM, McDonnell S, Lynch C, et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *International journal of cancer*. 2002;101(5):415-22. Epub 2002/09/07.

141. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular immunology*. 2007;44(11):2850-9. Epub 2007/03/03.
142. Hamburger AW. The human tumor clonogenic assay as a model system in cell biology. *International journal of cell cloning*. 1987;5(2):89-107. Epub 1987/03/01.
143. Malaise EP, Fertil B, Chavaudra N, Guichard M. Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: comparison of in vitro to in vivo data. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1986;12(4):617-24. Epub 1986/04/01.
144. Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 1984;2(4):317-23. Epub 1984/12/01.
145. Ogawa K, Boucher Y, Kashiwagi S, Fukumura D, Chen D, Gerweck LE. Influence of tumor cell and stroma sensitivity on tumor response to radiation. *Cancer research*. 2007;67(9):4016-21. Epub 2007/05/08.
146. Gerweck LE, Vijayappa S, Kurimasa A, Ogawa K, Chen DJ. Tumor cell radiosensitivity is a major determinant of tumor response to radiation. *Cancer research*. 2006;66(17):8352-5. Epub 2006/09/05.
147. Krause M, Dubrovskaja A, Linge A, Baumann M. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;109:63-73. Epub 2016/02/16.
148. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research*. 2006;66(19):9339-44. Epub 2006/09/23.
149. Dubben HH, Thames HD, Beck-Bornholdt HP. Tumor volume: a basic and specific response predictor in radiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 1998;47(2):167-74. Epub 1998/07/31.
150. Baumann M, Krause M, Thames H, Trott K, Zips D. Cancer stem cells and radiotherapy. *International journal of radiation biology*. 2009;85(5):391-402. Epub 2009/04/22.
151. Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(7):545-54. Epub 2008/05/31.
152. Baumann M, Dubois W, Suit HD. Response of human squamous cell carcinoma xenografts of different sizes to irradiation: relationship of clonogenic cells, cellular radiation sensitivity in vivo, and tumor rescuing units. *Radiation research*. 1990;123(3):325-30. Epub 1990/09/01.
153. Yaromina A, Krause M, Thames H, Rosner A, Hessel F, Grenman R, et al. Pre-treatment number of clonogenic cells and their radiosensitivity are major determinants of local tumour control after fractionated irradiation. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2007;83(3):304-10. Epub 2007/05/23.
154. Baumann M, Krause M. CD44: a cancer stem cell-related biomarker with predictive potential for radiotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(21):5091-3. Epub 2010/09/24.
155. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-8. Epub 2001/05/18.
156. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth factors and cancer. *Cancer research*. 1986;46(3):1015-29. Epub 1986/03/01.
157. Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(12):527-34. Epub 2007/11/06.
158. Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer*. 2002;94(5):1593-611. Epub 2002/03/29.
159. Gupta R, Dastane AM, Forozan F, Riley-Portuguez A, Chung F, Lopategui J, et al. Evaluation of EGFR abnormalities in patients with pulmonary adenocarcinoma: the need to test neoplasms with more than one method. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2009;22(1):128-33. Epub 2008/11/11.

160. Bethune G, Bethune D, Ridgway N, Xu Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer: an overview and update. *Journal of thoracic disease*. 2010;2(1):48-51. Epub 2010/03/01.
161. Dessing MC, Schouten M, Draing C, Levi M, von Aulock S, van der Poll T. Role played by Toll-like receptors 2 and 4 in lipoteichoic acid-induced lung inflammation and coagulation. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(2):245-52. Epub 2008/01/09.
162. Lee JS, Umsawasdi T, Dhingra HM, Barkley HT, Jr., Murphy WK. Effects of brain irradiation and chemotherapy on myelosuppression in small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1986;4(11):1615-9. Epub 1986/11/01.
163. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*. 2005;352(8):786-92. Epub 2005/02/25.
164. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS medicine*. 2005;2(3):e73. Epub 2005/03/02.
165. Li Y, Kundu P, Seow SW, de Matos CT, Aronsson L, Chin KC, et al. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APCMin/+ mice. *Carcinogenesis*. 2012;33(6):1231-8. Epub 2012/03/31.
166. Sherman ML, Datta R, Hallahan DE, Weichselbaum RR, Kufe DW. Ionizing radiation regulates expression of the c-jun protooncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(15):5663-6. Epub 1990/08/01.
167. Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J. Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(2):751-62. Epub 1998/02/07.
168. Odkhuu E, Mendjargal A, Koide N, Naiki Y, Komatsu T, Yokochi T. Lipopolysaccharide downregulates the expression of p53 through activation of MDM2 and enhances activation of nuclear factor-kappa B. *Immunobiology*. 2015;220(1):136-41. Epub 2014/08/31.
169. Maclaine NJ, Hupp TR. The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging*. 2009;1(5):490-502. Epub 2010/02/17.
170. Skinner HD, Giri U, Yang L, Woo SH, Story MD, Pickering CR, et al. Proteomic Profiling Identifies PTK2/FAK as a Driver of Radioresistance in HPV-negative Head and Neck Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(18):4643-50. Epub 2016/04/03.
171. Kim MK, Kim TJ, Sung CO, Choi CH, Lee JW, Kim BG, et al. High expression of mTOR is associated with radiation resistance in cervical cancer. *Journal of gynecologic oncology*. 2010;21(3):181-5. Epub 2010/10/06.
172. Schiewer MJ, Den R, Hoang DT, Augello MA, Lawrence YR, Dicker AP, et al. mTOR is a selective effector of the radiation therapy response in androgen receptor-positive prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2012;19(1):1-12. Epub 2011/09/10.
173. Stegeman H, Kaanders JH, Verheijen MM, Peeters WJ, Wheeler DL, Iida M, et al. Combining radiotherapy with MEK1/2, STAT5 or STAT6 inhibition reduces survival of head and neck cancer lines. *Molecular cancer*. 2013;12(1):133. Epub 2013/11/07.
174. Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene*. 2003;22(37):5885-96. Epub 2003/08/30.
175. Abbott DW, Holt JT. Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(5):2732-42. Epub 1999/01/23.
176. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, et al. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(15):12710-7. Epub 2002/02/01.

177. Dong Z, Qi X, Fidler IJ. Tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases is necessary for activation of murine macrophages by natural and synthetic bacterial products. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(4):1071-7. Epub 1993/04/01.
178. MacKenzie KF, Van Den Bosch MW, Naqvi S, Elcombe SE, McGuire VA, Reith AD, et al. MSK1 and MSK2 inhibit lipopolysaccharide-induced prostaglandin production via an interleukin-10 feedback loop. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(7):1456-67. Epub 2013/02/06.
179. Caivano M, Cohen P. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol*. 2000;164(6):3018-25. Epub 2000/03/08.
180. Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JS, Otsu K, et al. Signaling pathways and genes that inhibit pathogen-induced macrophage apoptosis--CREB and NF-kappaB as key regulators. *Immunity*. 2005;23(3):319-29. Epub 2005/09/20.
181. Ananieva O, Darragh J, Johansen C, Carr JM, McIlrath J, Park JM, et al. The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nature immunology*. 2008;9(9):1028-36. Epub 2008/08/12.
182. Naqvi S, Martin KJ, Arthur JS. CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. *The Biochemical journal*. 2014;458(3):469-79. Epub 2014/01/21.
183. Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends in pharmacological sciences*. 2012;33(3):122-8. Epub 2011/12/14.
184. Kim RK, Cui YH, Yoo KC, Kim IG, Lee M, Choi YH, et al. Radiation promotes malignant phenotypes through SRC in breast cancer cells. *Cancer science*. 2015;106(1):78-85. Epub 2014/12/24.
185. Nijnik A, Pistolic J, Filewod NC, Hancock RE. Signaling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin LL-37 and flagellin. *Journal of innate immunity*. 2012;4(4):377-86. Epub 2012/04/21.
186. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2003;22(4):337-58. Epub 2003/07/30.
187. Mitchell J, Kim SJ, Seelmann A, Veit B, Shepard B, Im E, et al. Src family kinase tyrosine phosphorylates Toll-like receptor 4 to dissociate MyD88 and Mal/Tirap, suppressing LPS-induced inflammatory responses. *Biochemical pharmacology*. 2018;147:119-27. Epub 2017/11/28.
188. Fan H, Teti G, Ashton S, Guyton K, Tempel GE, Halushka PV, et al. Involvement of G(i) proteins and Src tyrosine kinase in TNFalpha production induced by lipopolysaccharide, group B Streptococci and Staphylococcus aureus. *Cytokine*. 2003;22(5):126-33. Epub 2003/07/05.
189. Napolitani G, Bortoletto N, Racioppi L, Lanzavecchia A, D'Oro U. Activation of src-family tyrosine kinases by LPS regulates cytokine production in dendritic cells by controlling AP-1 formation. *European journal of immunology*. 2003;33(10):2832-41. Epub 2003/09/30.
190. Liu R, Li W, Tao B, Wang X, Yang Z, Zhang Y, et al. Tyrosine phosphorylation activates 6-phosphogluconate dehydrogenase and promotes tumor growth and radiation resistance. *Nature communications*. 2019;10(1):991. Epub 2019/03/03.
191. Lu KV, Zhu S, Cvrljevic A, Huang TT, Sarkaria S, Ahkavan D, et al. Fyn and SRC are effectors of oncogenic epidermal growth factor receptor signaling in glioblastoma patients. *Cancer research*. 2009;69(17):6889-98. Epub 2009/08/20.
192. Di Pietro R, di Giacomo V, Caravatta L, Sancilio S, Rana RA, Cataldi A. Cyclic nucleotide response element binding (CREB) protein activation is involved in K562 erythroleukemia cells differentiation. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;100(4):1070-9. Epub 2006/10/26.
193. Caravatta L, Sancilio S, di Giacomo V, Rana R, Cataldi A, Di Pietro R. PI3-K/Akt-dependent activation of cAMP-response element-binding (CREB) protein in Jurkat T leukemia cells treated with TRAIL. *Journal of cellular physiology*. 2008;214(1):192-200. Epub 2007/06/21.
194. D'Auria F, Centurione L, Centurione MA, Angelini A, Di Pietro R. Regulation of Cancer Cell Responsiveness to Ionizing Radiation Treatment by Cyclic AMP Response Element Binding Nuclear Transcription Factor. *Frontiers in oncology*. 2017;7:76. Epub 2017/05/23.

195. Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. What turns CREB on? Cellular signalling. 2004;16(11):1211-27. Epub 2004/09/01.
196. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Annual review of biochemistry. 1999;68:821-61. Epub 2000/06/29.
197. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. Nature reviews Molecular cell biology. 2001;2(8):599-609. Epub 2001/08/03.
198. Sakamoto KM, Frank DA. CREB in the pathophysiology of cancer: implications for targeting transcription factors for cancer therapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(8):2583-7. Epub 2009/04/09.
199. Brindle P, Linke S, Montminy M. Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. Nature. 1993;364(6440):821-4. Epub 1993/08/26.
200. Enslen H, Tokumitsu H, Soderling TR. Phosphorylation of CREB by CaM-kinase IV activated by CaM-kinase IV kinase. Biochemical and biophysical research communications. 1995;207(3):1038-43. Epub 1995/02/27.
201. Gubina E, Luo X, Kwon E, Sakamoto K, Shi YF, Mufson RA. betac cytokine receptor-induced stimulation of cAMP response element binding protein phosphorylation requires protein kinase C in myeloid cells: a novel cytokine signal transduction cascade. J Immunol. 2001;167(8):4303-10. Epub 2001/10/10.
202. Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, et al. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. Molecular and cellular biology. 1996;16(2):694-703. Epub 1996/02/01.
203. Kasper LH, Lerach S, Wang J, Wu S, Jeevan T, Brindle PK. CBP/p300 double null cells reveal effect of coactivator level and diversity on CREB transactivation. The EMBO journal. 2010;29(21):3660-72. Epub 2010/09/23.
204. Sun H, Chung WC, Ryu SH, Ju Z, Tran HT, Kim E, et al. Cyclic AMP-responsive element binding protein- and nuclear factor-kappaB-regulated CXC chemokine gene expression in lung carcinogenesis. Cancer Prev Res (Phila). 2008;1(5):316-28. Epub 2009/01/14.
205. Seo HS, Liu DD, Bekele BN, Kim MK, Pistors K, Lippman SM, et al. Cyclic AMP response element-binding protein overexpression: a feature associated with negative prognosis in never smokers with non-small cell lung cancer. Cancer research. 2008;68(15):6065-73. Epub 2008/08/05.
206. Aggarwal S, Kim SW, Ryu SH, Chung WC, Koo JS. Growth suppression of lung cancer cells by targeting cyclic AMP response element-binding protein. Cancer research. 2008;68(4):981-8. Epub 2008/02/19.
207. Li W, Sun D, Lv Z, Wei Y, Zheng L, Zeng T, et al. Insulin-like growth factor binding protein-4 inhibits cell growth, migration and invasion, and downregulates COX-2 expression in A549 lung cancer cells. Cell biology international. 2017;41(4):384-91. Epub 2017/02/06.
208. Wang Y, Kong H, Zeng X, Liu W, Wang Z, Yan X, et al. Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. Oncology reports. 2016;35(4):2053-64. Epub 2016/01/20.
209. Lutay N, Hakansson G, Alaridah N, Hallgren O, Westergren-Thorsson G, Godaly G. Mycobacteria bypass mucosal NF-kB signalling to induce an epithelial anti-inflammatory IL-22 and IL-10 response. PloS one. 2014;9(1):e86466. Epub 2014/02/04.
210. Ollivier V, Parry GC, Cobb RR, de Prost D, Mackman N. Elevated cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated transcription in human monocytic cells and endothelial cells. The Journal of biological chemistry. 1996;271(34):20828-35. Epub 1996/08/23.
211. Parry GC, Mackman N. Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF-kappaB-mediated transcription. J Immunol. 1997;159(11):5450-6. Epub 1998/04/21.
212. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. J Immunol. 2010;185(11):6413-9. Epub 2010/11/19.

213. Emami A, Tishelman C. Reflections on cancer in the context of women's health: focus group discussions with Iranian immigrant women in Sweden. *Women Health*. 2004;39(4):75-96. Epub 2005/02/05.
214. Arensman MD, Telesca D, Lay AR, Kershaw KM, Wu N, Donahue TR, et al. The CREB-binding protein inhibitor ICG-001 suppresses pancreatic cancer growth. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(10):2303-14. Epub 2014/08/02.
215. Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*. 1993;365(6449):855-9. Epub 1993/10/28.
216. Ait-Si-Ali S, Ramirez S, Barre FX, Dkhissi F, Magnaghi-Jaulin L, Girault JA, et al. Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature*. 1998;396(6707):184-6. Epub 1998/11/21.
217. Bird AW, Yu DY, Pray-Grant MG, Qiu Q, Harmon KE, Megee PC, et al. Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. *Nature*. 2002;419(6905):411-5. Epub 2002/09/28.
218. Murr R, Loizou JI, Yang YG, Cuenin C, Li H, Wang ZQ, et al. Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nature cell biology*. 2006;8(1):91-9. Epub 2005/12/13.
219. Ogiwara H, Ui A, Otsuka A, Satoh H, Yokomi I, Nakajima S, et al. Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*. 2011;30(18):2135-46. Epub 2011/01/11.
220. Ogiwara H, Kohno T. CBP and p300 histone acetyltransferases contribute to homologous recombination by transcriptionally activating the BRCA1 and RAD51 genes. *PloS one*. 2012;7(12):e52810. Epub 2013/01/04.
221. Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, et al. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(35):31182-9. Epub 2005/07/08.
222. Liu Y, Chen H, Zheng P, Zheng Y, Luo Q, Xie G, et al. ICG-001 suppresses growth of gastric cancer cells and reduces chemoresistance of cancer stem cell-like population. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2017;36(1):125. Epub 2017/09/13.
223. Osawa Y, Oboki K, Imamura J, Kojika E, Hayashi Y, Hishima T, et al. Inhibition of Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)-response Element-binding Protein (CREB)-binding Protein (CBP)/beta-Catenin Reduces Liver Fibrosis in Mice. *EBioMedicine*. 2015;2(11):1751-8. Epub 2016/02/13.
224. Henderson WR, Jr., Chi EY, Ye X, Nguyen C, Tien YT, Zhou B, et al. Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(32):14309-14. Epub 2010/07/28.
225. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(2):311-20. Epub 1998/02/07.
226. Beurel E, Jope RS. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain. *Journal of neuroinflammation*. 2009;6:9. Epub 2009/03/17.
227. Koch L, Frommhold D, Buschmann K, Kuss N, Poeschl J, Ruef P. LPS- and LTA-induced expression of IL-6 and TNF-alpha in neonatal and adult blood: role of MAPKs and NF-kappaB. *Mediators of inflammation*. 2014;2014:283126. Epub 2014/12/23.
228. Neta R, Vogel SN, Sipe JD, Wong GG, Nordan RP. Comparison of in vivo effects of human recombinant IL 1 and human recombinant IL 6 in mice. *Lymphokine research*. 1988;7(4):403-12. Epub 1988/01/01.
229. Neta R, Perlstein R, Vogel SN, Ledney GD, Abrams J. Role of interleukin 6 (IL-6) in protection from lethal irradiation and in endocrine responses to IL-1 and tumor necrosis factor. *The Journal of experimental medicine*. 1992;175(3):689-94. Epub 1992/03/01.

230. Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(7):4443-54. Epub 1994/07/01.
231. Koopmans T, Eilers R, Menzen M, Halayko A, Gosens R. beta-Catenin Directs Nuclear Factor-kappaB p65 Output via CREB-Binding Protein/p300 in Human Airway Smooth Muscle. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1086. Epub 2017/09/26.
232. Amorino GP, Mikkelsen RB, Valerie K, Schmidt-Ullrich RK. Dominant-negative cAMP-responsive element-binding protein inhibits proliferating cell nuclear antigen and DNA repair, leading to increased cellular radiosensitivity. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(32):29394-9. Epub 2003/05/08.
233. Pregi N, Belluscio LM, Berardino BG, Castillo DS, Canepa ET. Oxidative stress-induced CREB upregulation promotes DNA damage repair prior to neuronal cell death protection. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017;425(1-2):9-24. Epub 2016/11/07.
234. Subramanian C, Hada M, Opipari AW, Jr., Castle VP, Kwok RP. CREB-binding protein regulates Ku70 acetylation in response to ionization radiation in neuroblastoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2013;11(2):173-81. Epub 2012/12/12.

9. Anhang

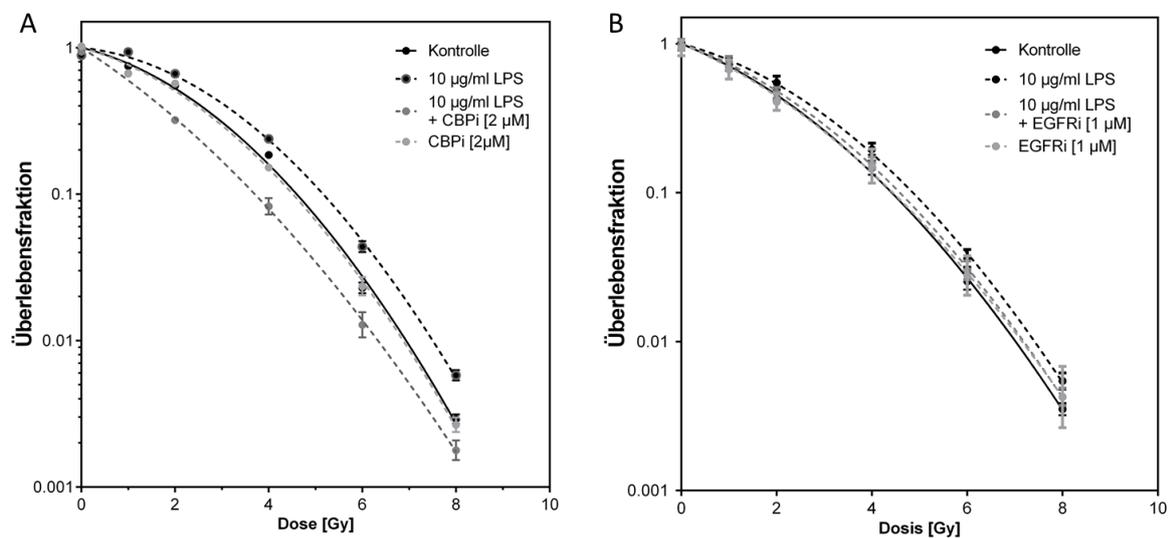


Abbildung 19: Die Inhibitionen des CREB-binding protein (CBPi) oder Epidermal growth factor Receptor (EGFRi) alleine haben keinen Einfluss auf die Überlebensfraktion von H1975 Zellen. A) Überlebensfraktionen der H1975 Zellen nach LPS-Behandlung (10 µg/ml) oder Kontrolle (0 µg/ml LPS) und Bestrahlung mit 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy mit oder ohne 2 µM CBPi. B) Überlebensfraktionen der H1975 Zellen nach LPS-Behandlung (10 µg/ml) oder Kontrolle (0 µg/ml LPS) und Bestrahlung mit 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Gy mit oder ohne 2 µM EGFRi. Daten sind als Mittelwert \pm SEM, $n \geq 3$, * $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. IR = Irradiation (Bestrahlung). CBPi = ICG-001, EGFRi = AG1478.

Publikationen

Richter A, Küster M, Woods M, Walesch S, Gökyildirim M, Krüger M, Dammann R. RASSF10 is a TGF β -target that regulates ASPP2 and E-cadherin expression and acts as tumor suppressor that is epigenetically downregulated in advanced cancer. Submitted

Hattar K, Gökyildirim MY, Normann S, Subtil FSB, Dahlem G, Sibelius U, Grimminger F, Engenhardt-Cabillic C, Grandel U. Lipoteichoic acids from *Staphylococcus aureus* induce radioresistance in non-small cell lung cancer cell lines. Submitted

Gökyildirim MY, Grandel U, Hattar K, Dahlem G, Schuetz E, Leinberger FH, Eberle F, Sibelius U, Grimminger F, Seeger W, Engenhardt-Cabillic R, Dikomey E, Subtil FS. Targeting CREB-binding protein overrides LPS induced radioresistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncotarget*. 2018 Jun 22;9(48):28976-28988.

Hattar K, Reinert CP, Sibelius U, Gökyildirim MY, Subtil FS, Wilhelm J, Eul B, Dahlem G, Grimminger F, Seeger W, Grandel U. Lipoteichoic acids from *S. aureus* stimulate proliferation of NSCLC cells in vitro. *Cancer Immunol Immunother*. 2017; 66 (6): 799-809.

Posterpräsentationen und Vorträge auf Fachkonferenzen

Mira Y. Gökyildirim, Julia Lampey, Florentine S.B. Subtil, Ulrich Grandel, Friedrich Grimminger, Rita Engenhardt-Cabillic, Werner Seeger, Ulf Sibelius, Katja Hattar (2019) Influence Of Lipopolysaccharides On The Response To Chemotherapy And Radiotherapy In Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines. DZL Annual Meeting 2019, Abstract Book

M. Gökyildirim, F. Subtil, U. Grandel, F. Grimminger, R. Engenhardt-Cabillic, W. Seeger, U. Sibelius, K. Hattar (2018) Strategies to Overcome Endotoxin Induced Radiotherapy Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells In Vitro. Am J Respir Crit Care Med 2018;197:A2682

Mira Yasemin Gökyildirim, Florentine Subtil, Ulrich Grandel, Ulf Sibelius, Rita Engenhardt-Cabillic, Werner Seeger, Friedrich Grimminger, and Katja Hattar (2018) Endotoxin induces resistance to radiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines in vitro – role of EGFR and CREB. DZL Annual Meeting 2018, Abstract Book

Gökyildirim MY, Subtil FSB, Grandel U, Seeger W, Engenhardt-Cabillic R, Sibelius U, Grimminger F, Hattar K (2018) Lipopolysaccharides Induce Radiotherapy Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines – the Role of Protein Kinase-Activation. Pneumologie 72(3). doi: 10.1055/s-0037-1615330

Mira Yasemin Gökyildirim (2017) Pulmonary vascular alterations in malignancy: like cancer is not enough? Vortrag, 2nd Annual PVRI Symposium & Retreat for Young Investigators

Mira Yasemin Gökyildirim, Florentine Subtil, Ulrich Grandel, Werner Seeger, Rita Engenhardt-Cabillic, Ulf Sibelius, Friedrich Grimminger, and Katja Hattar (2017) Lipopolysaccharides Induce Radiotherapy Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines - the Role of Protein Kinase-Activation. ECCPS Retreat

Gökyildirim MY, Subtil F, Grandel U, Dahlem G, Leinberger F, Engenhardt-Cabillic R, Seeger W, Sibelius U, Grimminger F, Hattar K (2017) Lipopolysaccharides Induce Survival in Lung Cell Lines – The Role of Protein-Kinases Activation. pvrinstitute.org

Gökyildirim MY, Subtil FSB, Grandel U, Seeger W, Engenhardt-Cabillic R, Sibelius U, Grimminger F, Hattar K (2017) Lipopolysaccharides Induce Radiotherapy Resistance In Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines - The Role Of Protein Kinase-Activation. DZL Annual Meeting 2017, Abstract Book

Mira Yasemin Gökyildirim, Katja Hattar, Rita Engenhardt-Cabillic, Ulrich Grandel, Gabriele Dahlem, Florian Leinberger, Werner Seeger, Ulf Sibelius, Friedrich Grimminger, Florentine Subtil (2016) Lipopolysaccharide induzierte Strahlentherapieresistenz in Nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinien – Die Rolle der Proteinkinase CREB. Strahlenther Onkol (2016) (Suppl) 192:1–161

Gökyildirim MY, Subtil FSB, Grandel U, Seeger W, Engenhardt-Cabillic R, Sibelius U, Grimminger F, Hattar K (2016) Lipopolysaccharides Induce Radiotherapy Resistance In Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines - The Role Of Protein Kinase-Activation. Am J Respir Crit Care Med 193; 2016: A2354

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei all denen bedanken, die mich bei meiner Promotion unterstützt und begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt...

Herrn Prof. Dr. Dammann für die externe Betreuung durch den Fachbereich Biologie und die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Grandel für die Bereitstellung des interessanten Themas, der nötigen Mittel, der Supervision und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Hattar und Frau Dr. Subtil für die engagierte Betreuung während der Forschungsarbeit und der Anfertigung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Schermuly und Herrn Prof. Dr. Dorresteijn für die Beteiligung als Prüfer an meiner Disputation.

allen Mitarbeitern der AG Hattar und AG Subtil für die große Hilfsbereitschaft und die schönen Mittagspausen. Ein ganz besonderer Dank gilt Susanna Ziegler, die mich moralisch und geistig unterstützt hat und Gabriele Dahlem, die mir im Labor immer zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Sibelius, Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic und Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey, die mich durch Bereitstellung von Mitteln und Räumlichkeiten sowie durch Supervision auf verschiedene Arten unterstützt haben.

den netten Physikern und MTAs aus der Strahlentherapie der Uniklinik Gießen, die mich technisch unterstützt haben.

den vielen lieben Freunden, die ich im Institut und durch das MBML gefunden habe.

insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, die immer an mich geglaubt haben.

und all den besonderen Menschen die mich auf meinem Weg ein Stück begleitet haben...

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den

Mira Yasemin Gökyildirim