

**Der Effekt von Lipopolysaccharid
auf die Chemo- und Radiotherapiesensibilität
des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms in vitro**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Dorothea Lampey

aus Duisburg

Gießen (2025)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Medizinische Klinik und Poliklinik II

Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Grandel
Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Klaudia Giehl

Tag der Disputation: 19.05.2026

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
I.1 Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)	1
I.1.1 Epidemiologie	1
I.1.2 Ätiologie	2
I.1.3 Klinik	2
I.1.4 Diagnostik, Klassifikation und Stadieneinteilung	3
I.1.5 Therapie und Prognose	7
I.2 Chemotherapie des Lungenkarzinoms	9
I.2.1 Grundlagen der Chemotherapie	9
I.2.2 Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin	9
I.2.3 Therapieresistenz bei Chemotherapie mit Cisplatin	10
I.3 Radiotherapie des Lungenkarzinoms	12
I.3.1 Grundlagen der Radiotherapie	12
I.3.2 Wirkung der Radiotherapie auf zellulärer Ebene	13
I.3.3 Dosis-Effekt-Beziehung	14
I.3.4 Grundlagen der Radiotherapiesensibilität und –resistenz	15
I.4 Infektion, Inflammation und Krebsgeschehen	17
I.5 Lipopolysaccharid und Toll-like Rezeptor 4	18
I.6 Interleukin-8	21
I.7 Zielsetzung	22
II Material und Methoden	23
II.1 Materialien	23
II.1.1 Verwendete NSCLC-Zelllinie	23
II.1.2 Verwendete Substanzen	23
II.1.3 Verwendete Materialien	25
II.1.4 Verwendete Geräte	25
II.1.5 Verwendete Software	27
II.2 Methoden	27
II.2.1 Kultivierung der Zellen	27
II.2.2 Passagierung der Zellen	27
II.2.3 Koloniebildungstest	28
II.2.3.1 Koloniebildungstest der Zelllinie A549 unter Cisplatin	29

II.2.3.2 Koloniebildungstest der Zelllinie A549 unter Radiotherapie.....	30
II.2.3.3 Koloniebildungstest der Zelllinie A549 unter Radiotherapie und Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984.....	31
II.2.4 MTS-Assay der Zelllinie A549.....	33
II.2.5 BCA Protein Assay	34
II.2.6 Humaner Phospho-Kinase Array	35
II.2.7 Western Blot für pERK-1/2	37
II.2.8 IL-6- und IL-8-ELISA	39
II.2.9 Statistische Auswertung.....	41
III Ergebnisse.....	42
III.1 LPS hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zelllinie A549.....	42
III.2 Cisplatin sensibilität der Zelllinie A549 im Koloniebildungstest und deren Beeinflussung durch LPS.....	43
III.3 Cisplatin sensibilität der Zelllinie A549 im MTS-Assay und deren Beeinflussung durch LPS.....	44
III.4 LPS führt zu einer Zunahme des relativen Überlebens der Zelllinie A549 unter Bestrahlung	46
III.5 Phosphorylierungslevel verschiedener Proteine und Kinasen der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition und Bestrahlung	48
III.6 Die Inhibition von ERK führt zu einer Wiederherstellung der Strahlensensibilität der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition	52
III.7 IL-8-Synthese der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition, Radiotherapie und Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984.....	55
IV Diskussion	57
IV.1 LPS-Effekt auf die Zelllinie A549 im Koloniebildungstest	57
IV.2 LPS-Effekt auf die Cisplatin sensibilität der Zelllinie A549.....	58
IV.3 LPS-Effekt auf die Strahlensensibilität der Zelllinie A549.....	60
IV.4 LPS-induzierte Mechanismen der Strahlenresistenz in der Zelllinie A549 mit dem Schwerpunkt der ERK1/2-Aktivierung und IL-8-Synthese.....	61
IV.4.1 ERK1/2-Aktivierung als Mediator der LPS-induzierten Strahlenresistenz	61
IV.4.2 Downstream von ERK1/2 liegende Signalkaskade.....	64
IV.4.3 Rolle ERK1/2-abhängiger Genprodukte bei der Strahlenresistenz – Fokus Interleukin-8	65
IV.5 Ausblick.....	68

V Zusammenfassung	70
VI Summary	71
VII Abkürzungsverzeichnis	72
VIII Abbildungsverzeichnis	75
IX Tabellenverzeichnis	77
X Literaturverzeichnis	78
XI Publikationen	90
XII Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	91
XIII Danksagung	92

I Einleitung

I.1 Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)

I.1.1 Epidemiologie

Krebserkrankungen stellen nach Herz-Kreislauf-erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. In Deutschland ist das Lungenkarzinom die häufigste Krebstodesursache bei Männern. Es ist das zweithäufigste Karzinom des Mannes nach dem Prostatakarzinom und das dritthäufigste Karzinom der Frau nach dem Mamma- und dem Kolonkarzinom. Im Jahr 2020 wird die Anzahl der Neuerkrankungen auf 22600 bei Frauen und auf 34100 bei Männern geschätzt. Während bei der männlichen Bevölkerung seit 1990 ein Rückgang der Erkrankungs- und Sterberaten feststellbar ist, stiegen diese bei der weiblichen Bevölkerung insbesondere aufgrund von zunehmenden Rauchgewohnheiten an (Robert Koch-Institut 2023). 85 % aller Lungenkarzinome sind den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC), darunter als Hauptvertreter das Adeno- und Plattenepithelkarzinom, zuzuordnen. Dabei stellt das Adenokarzinom in Deutschland mit 44 % aller Lungenkarzinome den größten Anteil dar. Dem gegenüber stehen die kleinzelligen Lungenkarzinome (SCLC), ein aggressiver, den neuroendokrinen Tumoren zuzuordnender Subtyp (Dela Cruz et al. 2011; Robert Koch-Institut 2023).

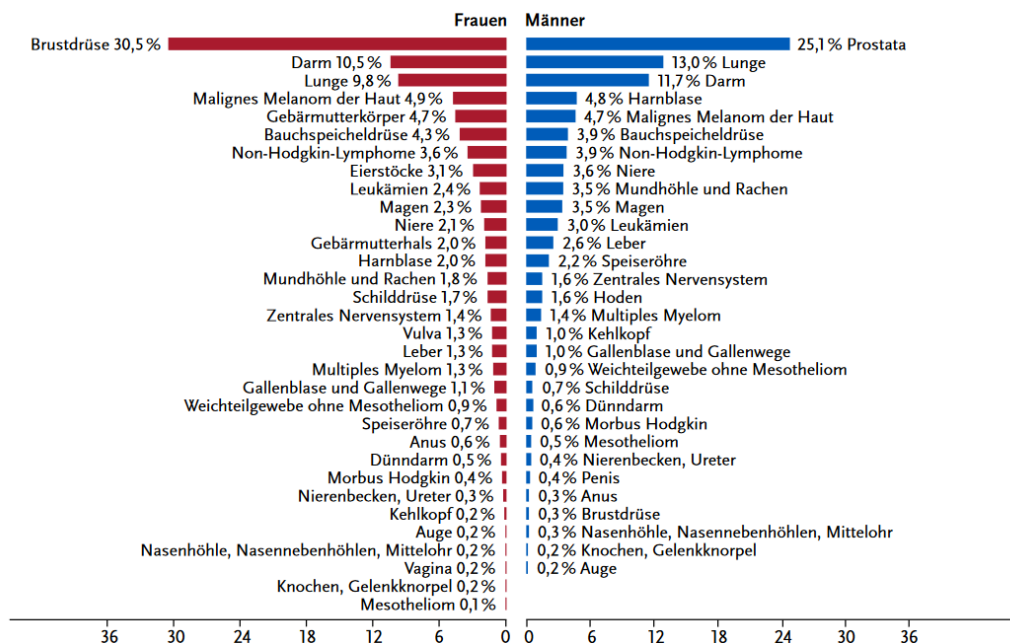


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2020 Robert Koch-Institut 2023; https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile [abgerufen am 12.08.2024]

I.1.2 Ätiologie

Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms ist das Inhalieren von Tabakrauch, wobei das Risiko mit der im Laufe des Lebens konsumierten Menge ansteigt. Von den diagnostizierten Lungenkarzinomen sind in Deutschland etwa 90 % bei Männern und 80 % bei Frauen auf aktives Rauchen zurückzuführen (Robert Koch-Institut 2023). Auch Passivrauchen erhöht das Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken und erklärt 1,6 % aller Erkrankungsfälle (Molina et al. 2008). Weitere exogene Faktoren, die das Erkrankungsrisiko erhöhen, sind hohe Radonbelastungen und die Einwirkung ionisierender Strahlung, die Exposition mit Feinstaub, Dieselmotorabgasen, Asbest, Quarzstäuben, die berufliche Belastung durch Arsen, Beryllium, Cadmium, Chrom, Kokerei-Rohgase, Nickel, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Siliziumdioxid sowie andere karzinogene Substanzen (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 2021, Robert Koch-Institut 2023). Zudem sind auch endogene beziehungsweise genetische Faktoren wie Varianten des Tumor Protein p53 codierenden Gens oder des EGFR-Gens von Bedeutung (Molina et al. 2008).

Lungenkarzinome entstehen schließlich in einem vielstufigen Prozess durch die Ansammlung genetischer Aberrationen verschiedener Moleküle und Signalwege, die durch das Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren bedingt sind.

I.1.3 Klinik

Im Frühstadium sind Lungenkarzinome meist asymptomatisch, was häufig eine erst späte Diagnostizierung der Erkrankung nach sich zieht. Zu unterscheiden sind allgemeine, lokal tumorbedingte und durch Metastasen hervorgerufene Symptome. Allgemeinsymptome wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Schwäche und paraneoplastische Syndrome können hinweisend für ein malignes Geschehen sein, sind jedoch unspezifisch. Lokal durch den Tumor hervorgerufene Symptome stellen Husten, Auswurf, später Dyspnoe, Thoraxschmerzen, Stridor, Dysphagie und Hämoptysen dar. Durch Kompression der Vena cava superior kann eine obere Einflusstauung auftreten, bei Infiltration anatomisch benachbarter neurologischer Strukturen können Heiserkeit, eine Armschwäche und ein Horner-Syndrom die Folge sein. Metastasierungsbedingte Symptome sind Lymphknotenschwellungen sowie in Abhängigkeit von den

bevorzugten Metastasierungsorten Gehirn, Leber, Nebennieren und Skelett Kopfschmerzen, neurologische Ausfälle, Schwindel, Verwirrtheit, Krampfanfälle, Ikterus und Knochenschmerzen (Pfeifer und Schmidt 2018; Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

I.1.4 Diagnostik, Klassifikation und Stadieneinteilung

Entsprechend der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft (Leitlinienprogramm Onkologie 2024) erfolgt eine stufenweise Diagnostik des Lungenkarzinoms. Die Röntgenuntersuchung der Thoraxorgane stellt dabei meist das initiale radiologische Verfahren dar. Bei Verdacht auf ein Lungenkarzinom und absehbarer Therapieoption soll eine Computertomografie der Thoraxorgane erfolgen. Bei einem auffälligen Befund muss zur Diagnosesicherung eine Gewebeprobe der Raumforderung je nach Größe und Lage des Tumors per Bronchoskopie oder per transthorakaler Nadelaspiration gewonnen und pathologisch untersucht werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2024). Nach Sicherung der Diagnose eines primären Lungenkarzinoms erfolgt das Staging, bei dem die lokale Tumorausdehnung (T), der Lymphknotenstatus (N) und eine Fernmetastasierung (M) abgeklärt werden. Zur Beurteilung der Ausdehnung des Primärtumors wird in erster Linie eine Computertomografie des Thorax und Abdomens mit Kontrastmittel, gegebenenfalls im Rahmen einer Fluordesoxyglucose-Positronenemissionstomografie/Computertomografie (FDG-PET/CT), durchgeführt. Wenn eine kurative Therapie angestrebt wird, sollte zur Untersuchung des Lymphknotenstatus zunächst eine FDG-PET/CT erfolgen. Liegt ein Verdacht auf mediastinalen Lymphknotenbefall vor, sollte dieser nach Probenentnahme mittels endobronchialen und/oder endoösophagealen Ultraschalls mit Feinnadelbiopsie pathologisch untersucht werden. Die Abklärung einer Fernmetastasierung erfolgt, wenn möglich, mittels MRT Schädel und Ganzkörper-FDG-PET/CT. Eine Pleurapunktion ist bei einem vorliegenden Pleuraerguss indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

Die Stadieneinteilung erfolgt seit dem 1. Januar 2025 anhand der IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer)/UICC 9 auf Basis der TNM und der UICC 9 Kriterien des American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control (UICC).

Tabelle 1: TNM-Stadien nach IASLC Lung Cancer Staging Project modifiziert nach Detterbeck et al. 2024 und Leitlinienprogramm Onkologie 2024

Kategorie	Stadium	Beschreibung
Primärtumor (T)	Tis	Carcinoma in situ
	T1	größter Durchmesser < oder = 3 cm, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, Hauptbronchus nicht beteiligt
	T1a(mi)	Minimal invasives Adenokarzinom
	T1a	größter Durchmesser < oder = 1cm
	T1b	größter Durchmesser > 1 und < oder = 2 cm
	T1c	größter Durchmesser > 2 und < oder = 3 cm
	T2	größter Durchmesser > 3, aber < oder = 5 cm <i>oder</i> Infiltration des Hauptbronchus unabhängig vom Abstand von der Carina, aber ohne direkte Invasion der Carina <i>oder</i> Infiltration der viszeralen Pleura <i>oder</i> tumorbedingte partielle Atelektase oder obstruktive Pneumonie, die bis in den Hilus reichen und Teile der Lunge oder die gesamte Lunge umfassen
	T2a	größter Durchmesser > 3 und < oder = 4 cm
	T2b	größter Durchmesser > 4 und < oder = 5 cm
	T3	größter Durchmesser > 5, aber < oder = 7 cm <i>oder</i> Infiltration von Thoraxwand (inklusive parietale Pleura und Sulcus superior), N. phrenicus oder parietalem Perikard <i>oder</i> zusätzlicher Tumorknoten im selben Lungenlappen wie der Primärtumor
	T4	größter Durchmesser > 7 cm <i>oder</i> direkte Infiltration von Diaphragma, Mediastinum, Herz, großen Gefäßen, Trachea, N. laryngeus recurrens, Ösophagus, Wirbelkörper oder Karina <i>oder</i> zusätzlicher Tumorknoten in einem anderen ipsilateralen Lungenlappen
Lymphknoten (N)	N0	keine Lymphknotenmetastasen
	N1	Metastase in ipsilateralen, peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder

		intrapulmonalen Lymphknoten oder direkte Invasion dieser Lymphknoten
	N2	Metastase in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
	N2a	Singuläre Metastase in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
	N2b	Multiple Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
	N3	Metastase in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateral tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten
Fernmetastase (M)	M0	keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen
	M1a	separater Tumorknoten in einem kontralateralen Lungenlappen <i>oder</i> Pleura mit knotigem Befall <i>oder</i> maligner Pleuraerguss <i>oder</i> maligner Perikarderguss
	M1b	isolierte Fernmetastase in einem extrathorakalen Organ
	M1c1	mehrere Fernmetastasen in einem extrathorakalen Organ
	M1c2	mehrere Fernmetastasen in mehreren extrathorakalen Organen

Tabelle 2: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC 9 modifiziert nach Detterbeck et al. 2024 und Leitlinienprogramm Onkologie 2024

UICC-Stadium	Primärtumor	Lymphknotenbefall	Fernmetastasen
0	Tis	N0	M0
IA1	T1a(mi)-a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T1a-c	N1	M0
IIB	T1a-c	N2a	M0

	T2a-b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a-c	N2b	M0
	T2a-b	N2a	M0
	T3	N1-N2a	M0
	T4	N0-N1	M0
IIIB	T1a-c	N3	M0
	T2a-b	N2b-N3	M0
	T3	N2b	M0
	T4	N2a-b	M0
IIIC	T3-4	N3	M0
IVA	T1a-T4	N0-3	M1a-b
IVB	T1a-T4	N0-3	M1c1-c2

Zudem ist die histologische Einteilung anhand der WHO-Klassifikation der Lungentumore 2015 von großer Bedeutung, da sich die einzelnen Entitäten in Wachstums-, Metastasierungsverhalten, Prognose und Therapieansprache unterscheiden. Dabei wird die bedeutende Gruppe der epithelialen Lungentumore, zu denen unter anderem Adeno- und Plattenepithelkarzinome gehören, von neuroendokrinen Neoplasien, zu denen die kleinzelligen Lungenkarzinome zählen, und weiteren Gruppen, die wiederum weitere Untergruppen und Varianten subsumieren, unterschieden (Travis et al. 2015). Nach einer genauen Einteilung anhand herkömmlicher histologischer Verfahren und wenn nötig immunhistochemischer Marker sollte aufgrund neuer, individueller Therapieoptionen bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen eine molekularpathologische Untersuchung hinsichtlich der therapeutisch relevanten molekularen Veränderungen erfolgen. Dabei sollten nach zuletzt erfolgter Aktualisierung der Leitlinie vor Erstlinientherapie die EGFR-Mutationen in den Exonen 18-21, BRAF V600 Mutationen, ALK-, ROS1-, RET- und NTRK1-3-Fusionen sowie KRas-Mutationen, MET-Amplifikationen und MET-Exon 14-Skipping-Mutationen, NRG1-Fusionen, HER2-Amplifikation und HER2-Exon 20-Mutationen untersucht werden. Zudem soll neben den empfohlenen molekularpathologischen Untersuchungen eine immunhistochemische Untersuchung auf die Expression von PD-L1 durchgeführt werden. Mittlerweile werden sowohl die immunhistochemische Untersuchung auf den PD-L1 Expressionsstatus als auch die

molekularpathologischen Untersuchungen auf ALK-Fusionen und EGFR-Mutationen in den Exonen 19 und 21 ebenfalls für Patienten in früheren Stadien der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2024). Die am häufigsten nachgewiesene Mutation in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen ist eine Mutation im KRas-Gen, die insbesondere in Adenokarzinomen vorkommt. Aktivierende Mutationen im EGFR-Gen treten in westlichen Ländern bei circa 15 % aller NSCLC auf. Gehäuft sind diese in Adenokarzinomen, bei Frauen, Nichtrauchern und Asiaten nachweisbar. In 3 bis 7 % der Fälle findet sich eine durch eine Translokation entstandene Fusion des Gens ALK meist mit dem Gen EML4, die gehäuft in Adenokarzinomen, jüngeren Patienten und Nichtrauchern vorkommt. Des Weiteren sind mittlerweile therapierelevante Aberrationen in vielen anderen Genen wie ROS1, BRAF, MET, RET, HER2, NTRK und NRG1 bekannt (Chevallier et al. 2021; Cooper et al. 2013; Reinmuth et al. 2016; Rodriguez-Canales et al. 2016).

I.1.5 Therapie und Prognose

Laut der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft (Leitlinienprogramm Onkologie 2024) erfolgt die Therapieentscheidung für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom primär anhand des Stadiums und unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes, der Lungenfunktion, der Komorbiditäten und des Wunsches des Patienten. Die individuelle Therapieempfehlung sollte im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz getroffen werden. Im Stadium I wird eine alleinige operative Therapie in Form einer radikalen chirurgischen Resektion, wenn möglich mittels Lobektomie, und eine systematische Lymphknotendisektion empfohlen. Im Stadium II und den operablen Stadien IIIA/B wird neben der Operation eine (neo)adjuvante Therapie durchgeführt. Dabei werden in Abhängigkeit des molekulpathologischen Nachweises von ALK-Fusionen und EGFR-Mutationen sowie des PD-L1 Expressionsstatus eine klassische, vorzugsweise cisplatinhaltige Chemotherapie, Tyrosinkinaseinhibitoren und/oder Immuncheckpoint-Inhibitoren eingesetzt. In den inoperablen Stadien IIIA/B/C erfolgt eine definitive, möglichst simultane Radiochemotherapie, wobei neben der Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 60 bis 70 Gray bei konventioneller Fraktionierung zwei Zyklen einer volldosierte cisplatinhaltigen Kombinationschemotherapie zum Einsatz kommen. Abhängig vom PD-L1 Expressionsstatus sollte darauf eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren

folgen. Allerdings ist auch in den primär inoperablen Stadien III in begründeten Fällen eine in ein multimodales Konzept eingebettete Resektion zu überdenken (Leitlinienprogramm Onkologie 2024). Während die Therapie in den Stadien I, II und III prinzipiell kurativ intendiert ist, sollte im Stadium IV hingegen, mit Ausnahme einer sogenannten oligometastatischen Situation, ein palliatives Therapiekonzept Anwendung finden. Dieses wird zum einen anhand von Symptomatik, Allgemeinzustand, Komorbiditäten und Wunsch des Patienten sowie zum anderen anhand von histologischen, immunhistochemischen und molekularpathologischen Markern ausgerichtet (Leitlinienprogramm Onkologie 2024). So stehen bei Nachweis einer der in Kapitel I.1.4 beschriebenen genetischen Aberrationen zahlreiche zielgerichtete Therapieoptionen wie Tyrosinkinaseinhibitoren zur Verfügung, die teilweise alleine oder in Kombination mit Immun- und/oder Chemotherapie zum Einsatz kommen. Fehlen entsprechende therapierbare genetische Alterationen sollte abhängig vom PD-L1 Expressionsstatus eine reine Immuntherapie oder eine platinbasierte Immunchemotherapie Anwendung finden. Dabei sollte sich die palliative Therapie immer an Zustand und Wunsch des Patienten orientieren. So können neben der platinhaltigen Immunchemotherapie auch besser verträgliche Kombinationen, eine Monotherapie oder eine rein symptomorientierte Therapie in Erwägung gezogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

Durch intensive Forschung unterliegen insbesondere die zielgerichteten Therapiestrategien einem anhaltenden Wandel, sodass deren Einsatz einer stetigen Anpassung an den neusten Erkenntnisstand bedarf. Insbesondere die Etablierung der Immuntherapie stellt ein neueres Therapieprinzip dar und gewinnt zunehmend an Stellenwert in der Therapie des NSCLC (Mamdani et al. 2022). Dennoch bleiben die zentralen Säulen der Therapie des Lungenkarzinoms in den inoperablen Stadien die Strahlen- und die Chemotherapie, wobei Cisplatin hierbei weiterhin den therapeutischen Standard darstellt (Leitlinienprogramm Onkologie 2024).

Trotz der genannten Fortschritte in der Therapie geht das Lungenkarzinom weiterhin mit einer schlechten Prognose einher. Es stellt in Deutschland die häufigste Krebstodesursache bei Männern und die zweit häufigste Krebstodesursache bei Frauen dar. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten des Lungenkarzinoms liegen in Deutschland bei 25 % für Frauen beziehungsweise 19 % für Männer, wobei die Prognose stark abhängig vom jeweiligen Stadium ist (Robert Koch-Institut 2023).

I.2 Chemotherapie des Lungenkarzinoms

I.2.1 Grundlagen der Chemotherapie

Chemotherapie bezeichnet im ursprünglichen Sinne die medikamentöse Behandlung von Tumoren oder Infektionen. Als medikamentöse Antitumorthérapie stellt die Chemotherapie neben der operativen Therapie und der Strahlentherapie die dritte wichtige Säule in der Behandlung von Krebserkrankungen dar. Die Besonderheit der medikamentösen Antitumorthérapie liegt in ihrer systemischen Wirkung nach Verabreichung in den Blutstrom, so dass neben der lokalen Tumorkontrolle auch Effekte auf lymphogene und hämatogene Metastasierung erzielt werden können. Zielpunkte zytostatischer Chemotherapie sind hierbei Tumorzellproliferation, -überleben und -migration. Diese Zielpunkte können durch Störung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese sowie durch die Interaktion mit zellulären Signalkaskaden über verschiedenste Wirkmechanismen, nach denen die Einteilung der antitumoralen Substanzen erfolgt, erreicht werden. Zudem können die meist weniger tumorselektiv wirksamen, klassischen Zytostatika von den sogenannten selektiv wirksamen Therapieformen wie beispielsweise antihormonelle Therapien, Antikörpertherapien und Kinaseinhibitoren abgegrenzt werden (Schütte und Barth 2010).

I.2.2 Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin

Als Vertreter der klassischen Zytostatika gehören Platinderivate zu den wirksamsten Einzelsubstanzen in der medikamentösen Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Kombiniert mit anderen Zytostatika stellt Cisplatin den medikamentösen Standard in der kurativen und in der palliativen Therapie dar (Leitlinienprogramm Onkologie 2024). Cisplatin wird aufgrund des Wirkmechanismus zur Gruppe der Alkylanzien gezählt. Seine Hauptwirkung entfaltet Cisplatin als sogenannter „cross-linker“ durch die Quervernetzung von DNA-Doppelsträngen (Schütte und Barth 2010; Siddik 2003).

Die antikanzerogene Wirkung platinhaltiger Substanzen konnte erstmals 1969 durch Rosenberg und Van Camp nachgewiesen werden (Rosenberg et al. 1969), nachdem Rosenberg bereits 1965 erkannt hatte, dass die Elektrolyseprodukte von Platinelektroden die Zellteilung von *Escherichia coli* hemmen (Rosenberg et al. 1965).

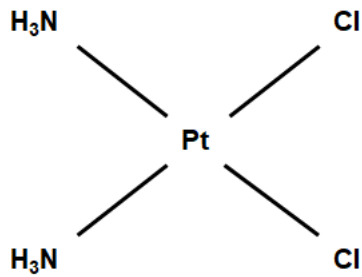


Abbildung 2: Struktur von Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin)

Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin) liegt extrazellulär als inaktives Prodrug vor. Nach Aufnahme durch passive Diffusion sowie durch den Transport mittels Membranproteinen wie beispielsweise dem Kupfertransporter Ctr1 wird Cisplatin intrazellulär zunächst durch den Austausch einer oder beider Chlorionen gegen Wassermoleküle aktiviert (Gately und Howell 1993; Ishida und Lee 2002; Siddik 2003; Voigt et al. 2006). Dabei entsteht ein positiv geladenes Elektrophil. Diese aktivierte Cisplatinform bildet Addukte mit endogenen Nucleophilen. So bindet sie über Purinbasen an die DNA, über Cystein an Proteine sowie an andere Moleküle wie Glutathion und Methionin. Dies führt zu oxidativem Stress, zur Bildung von Protein-DNA-Komplexen und zur Quervernetzung der beiden Einzelstränge der DNA, die Doppelstrangbrüche zur Folge haben kann, sowie zu Vernetzungen innerhalb eines Einzelstranges der DNA. Die Störung der helikalen Struktur der DNA führt zu einer Hemmung von Replikation und Transkription sowie zur Aktivierung der auf die DNA-Schädigung folgenden Mechanismen (Siddik 2003; Voigt et al. 2006). Zum einen wird insbesondere durch die Nucleotid-Exzisions-Reparatur (NER) die Entfernung der Cisplatin-Addukte angestrebt. Bei der NER werden defekte Nucleotide erkannt und durch Inzisionen an beiden Seiten der Schädigung aus dem DNA-Einzelstrang entfernt. Anschließend wird die entstandene Lücke durch die Synthese eines DNA-Stückes anhand der bestehenden Matrize geschlossen (Furuta et al. 2002). Zum anderen erfolgt bei einer ausgedehnten DNA-Schädigung die Einleitung der Apoptose über verschiedene Signalwege, wobei unter anderem Proteine der Mismatch-Reparatur (MMR) involviert sind (Galluzzi et al. 2012; Sawant et al. 2015; Siddik 2003).

I.2.3 Therapieresistenz bei Chemotherapie mit Cisplatin

Eine Beschränkung des klinischen Einsatzes von Cisplatin liegt in der häufig vorkommenden Chemotherapieresistenz. So zeigen nicht-kleinzellige Lungenkarzinome bei der alleinigen Therapie mit Cisplatin Ansprechraten von unter 20 % (Jassem 1999).

Die Chemotherapieresistenz kann bereits intrinsisch gegeben sein oder unter der Behandlung mit Cisplatin erworben werden. Sie wird über verschiedenste Wege vermittelt. Nach Galluzzi et al. können die entsprechenden Mechanismen in pre-target, on-target, post-target und off-target Resistenz eingeteilt werden (Galluzzi et al. 2012).

Die pre-target Resistenz umfasst alle Mechanismen, die zur Absenkung der intrazellulär verfügbaren Cisplatinkonzentration beitragen. Dazu zählen eine reduzierte Aufnahme durch bestimmte Membranproteine, eine erhöhte Ausschleusung durch verschiedene ATPasen sowie eine verstärkte Inaktivierung von Cisplatin durch Glutathion und andere nukleophile Proteine (Ishida et al. 2010; Katano et al. 2003; Kool et al. 1997; Samimi et al. 2004). Die on-target Resistenz beschreibt eine verringerte Wirkung von Cisplatin nach erfolgter Bindung an seine Zielstrukturen. Hier spielen Störungen der DNA-Reparatursysteme eine entscheidende Rolle. Zum einen kann die Erkennung der DNA-Schädigung und damit die Einleitung der Apoptose gestört sein, zum anderen kann jedoch auch die Reparatur der DNA-Schäden beschleunigt oder die Toleranz gegenüber bestehenden DNA-Schäden erhöht werden. Dabei sind beispielsweise Veränderungen der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) als Hauptreparaturmechanismus der Cisplatin-induzierten DNA-Schäden von wesentlicher Bedeutung (Galluzzi et al. 2012). In Cisplatin-resistenten Zelllinien ist ERCC1, die als Einzelstrang-Endonuklease einen wichtigen Bestandteil der NER darstellt, häufig überexprimiert und die DNA-Reparatur damit deutlich gesteigert (Rosell et al. 2003). Die post-target Resistenz schließt sämtliche Mechanismen ein, die nach erfolgter Cisplatinbindung an der Weiterleitung der durch die Cisplatin-induzierten Schäden ausgelösten Signalkaskaden beteiligt sind. Dabei spielen besonders Defekte der daraufhin eingeleiteten Apoptose eine wesentliche Rolle (Galluzzi et al. 2012). Beispielsweise sind Veränderungen im Tumorsuppressorprotein p53 von Bedeutung, welches bei vorliegenden DNA-Schäden durch Phosphorylierung stabilisiert wird, zur Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der proapoptotischen Faktoren der Bcl-2-Proteinfamilie und damit zur Apoptose der geschädigten Zellen führt. So tritt eine Cisplatinresistenz bevorzugt unter inaktivierenden Mutationen von p53 auf (Buttitta et al. 1997; Perego et al. 1996). Die off-target Resistenz bezieht sich auf Signalwege, in die Cisplatin nicht direkt eingreift. Diese können jedoch durch eine Kompensation der durch Cisplatin initiierten Mechanismen zur Chemotherapieresistenz beitragen. So erhöht beispielsweise die in vielen soliden Tumoren hochregulierte Kinase DYRK1B (MIRK) die Expression

antioxidativer Enzyme, die dem durch Cisplatin initiierten oxidativen Stress entgegenwirken (Galluzzi et al. 2012; Hu und Friedman 2010).

I.3 Radiotherapie des Lungenkarzinoms

I.3.1 Grundlagen der Radiotherapie

Strahlung bezeichnet im Allgemeinen die freie Ausbreitung von Energie im Raum. Unterschieden wird dabei zwischen Teilchenstrahlung und Wellenstrahlung. Die Teilchenstrahlung transportiert Masse und kann aus verschiedenen geladenen oder ungeladenen Teilchen wie beispielsweise Elektronen, Protonen oder Neutronen bestehen. Die Wellenstrahlung beziehungsweise elektromagnetische Strahlung hingegen besteht aus Photonen, die keine Masse besitzen und stets ungeladen sind. Zur elektromagnetischen Strahlung gehören verschiedene Strahlungsarten, die sich lediglich anhand ihrer Frequenz, die wiederum die Energie der Strahlung bestimmt, unterscheiden (Jäkel und Karger 2017).

Die in der Radiotherapie etablierte Messgröße für Photonenstrahlung stellt die Energiedosis D dar. Sie lässt sich aus dem Quotienten aus der in einem Volumen absorbierten Energie (E) und der Masse dieses Volumens (M) berechnen und wird in der SI-Einheit Gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$) angegeben (Jäkel und Karger 2017).

Die Röntgenstrahlung, die bei der Behandlung des Lungenkarzinoms Anwendung findet, und die γ -Strahlung zählen zu den höher energetischen elektromagnetischen Strahlungen und haben eine ionisierende Wirkung (Jäkel und Karger 2017). Dabei handelt es sich um eine indirekt ionisierende Wirkung, da Photonen als ungeladene Teilchen über verschiedene Wechselwirkungen mit Materie erst geladene Teilchen erzeugen, die dann wiederum eine ionisierende Wirkung haben. Diese Vorgänge, die zur Übertragung der Energie auf Materie führen, werden als Primärprozesse bezeichnet. Die sich daran anschließenden chemischen und biochemischen Reaktionen, die zur Veränderung von Biomolekülen führen, werden Sekundärprozesse genannt (Münter und Weber 2017).

Die Strahlenwirkung kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Strahlenwirkung erfolgen Energieübertragung und die biochemischen Folgereaktionen am gleichen Molekül. Davon zu unterscheiden ist die indirekte Strahlenwirkung, der in der Radiotherapie mit Röntgenstrahlung die größere Bedeutung zukommt. Hierbei unterscheiden sich der Ort der Energieübertragung und der Ort der biochemischen

Wirkung. Wichtigster Mechanismus ist dabei die Radiolyse des Wassers. Durch Ionisation werden Wasserradikale erzeugt, die dann untereinander, mit anderen Biomolekülen oder Sauerstoff reagieren. Die Reaktion der Wasserradikale mit Sauerstoff führt wiederum zur Bildung von reaktiven Peroxidradikalen (Münter und Weber 2017).

Welche Art der Strahlenwirkung überwiegt, ist abhängig von der sogenannten Ionisationsdichte, die die deponierte Energiemenge pro Wegstrecke der Strahlung angibt. Der lineare Energietransfer (LET [keV/μM]) stellt das Maß der Ionisationsdichte dar und ergibt sich aus dem Quotienten aus abgegebener Energiemenge und zurückgelegter Flugstrecke (Münter und Weber 2017). Photonenstrahlung hat einen niedrigen linearen Energietransfer und wird auch als locker ionisierende Strahlung bezeichnet, wobei die indirekte Strahlenwirkung überwiegt. Es kommt zu zahlreichen Einzelanregungen- und -ionisationen und dadurch zu einer Vielzahl geringgradiger zellulärer Schädigungen (Münter und Weber 2017).

I.3.2 Wirkung der Radiotherapie auf zellulärer Ebene

Die bedeutendste zelluläre Zielstruktur der Radiotherapie stellt die DNA dar. Zu den durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen Veränderungen der DNA zählen Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, DNA-Quervernetzungen und Läsionen der Basen. Diese Schäden können einzeln oder gruppiert in benachbarten Windungen der DNA-Helix auftreten (Münter und Weber 2017). Die durch die Bestrahlung entstehenden DNA-Veränderungen können durch verschiedene Reparatursysteme erkannt und gegebenenfalls behoben werden. Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen kann durch die homologe Rekombination (HR) und das nicht-homologe End-zu-End-Joining (NHEJ) erfolgen (Lieber et al. 2003). Letzterer ist der Haupt-, wenn auch der ungenauere Mechanismus zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, bei dem in der G1- und zu geringerem Anteil in der S/G2-Phase des Zellzyklus die Strangenden ohne Vorlage einer Matrize verlängert und miteinander verbunden werden (Dobbs et al. 2008; Lieber et al. 2003). Bei der in der S- und G2-Phase stattfindenden homologen Rekombination hingegen wird mittels eines Einzelstrangaustausches mit der Schwesterchromatide eine genaue Wiederherstellung der Erbinformation ermöglicht (Lieber et al. 2003; Willers et al. 2013). Die Effektivität der Reparaturmechanismen ist bei gruppierten DNA-Läsionen („Bulky Lesion“) wie beispielsweise komplexen Doppelstrangbrüchen, deren Bruchenden Basenverluste,

Basenveränderungen oder Einzelstrangbrüche aufweisen, stark eingeschränkt, sodass diese Schäden meist irreparabel sind (Dobbs et al. 2008; Lomax et al. 2013; Münter und Weber 2017).

Die nicht oder nur fehlerhaft reparierten Doppelstrangbrüche stellen den wesentlichen Aspekt der strahlenbiologischen Wirkung dar. Es werden drei Formen des auf die Bestrahlung folgenden Zelltods unterschieden: Die Apoptose, also der programmierte Zelltod, die Nekrose, bei der es zu einem sofortigen Untergang der Zelle mit begleitender Entzündungsreaktion kommt, und der klonogene Zelltod. Die sogenannte Klonogenität ist dabei definiert als das Vermögen einer einzelnen Zelle, eine Kolonie bestehend aus mindestens 50 Tochterzellen zu generieren. Der klonogene Zelltod ist der häufigste Zelltod nach Radiotherapie, dabei bleibt die betroffene Zelle zunächst morphologisch und metabolisch intakt, verliert jedoch im Folgenden die Fähigkeit zur Zellteilung und geht zugrunde (Münter und Weber 2017).

I.3.3 Dosis-Effekt-Beziehung

Nach Ermittlung des relativen Überlebens klonogener Zellen bei verschiedenen Strahlendosen kann mittels des linear quadratischen Modells, welches unter anderem auf Kellerer und Rossi zurückgeht, eine zelltypspezifische Überlebenskurve erstellt werden. Das linear quadratische Modell beruht auf strahlenbiologischen Überlegungen und hat sich insbesondere für Strahlendosen bis 10 Gray bewährt (Brenner 2008; Kellerer und Rossi 1978).

Folgende Formel liegt dem linear quadratischen Modell zugrunde:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2}$$

Dabei wird das Zellüberleben (S) in eine exponentielle Beziehung zur verwendeten Strahlendosis (D [Gy]) gestellt, wobei α und β zelltypspezifische Konstanten sind. Während die lineare Komponente αD die letale Schädigung der DNA durch ein Teilchen darstellt („single hit“), wird durch βD^2 ein letaler DNA-Schaden in Folge der Kombination zweier sublethaler DNA-Schäden durch zwei unabhängige Teilchen repräsentiert („multi hit“). Zur graphischen Darstellung einer solchen Überlebenskurve wird das klonogene Überleben halblogarithmisch gegen die Strahlendosis aufgetragen (Brenner 2008).

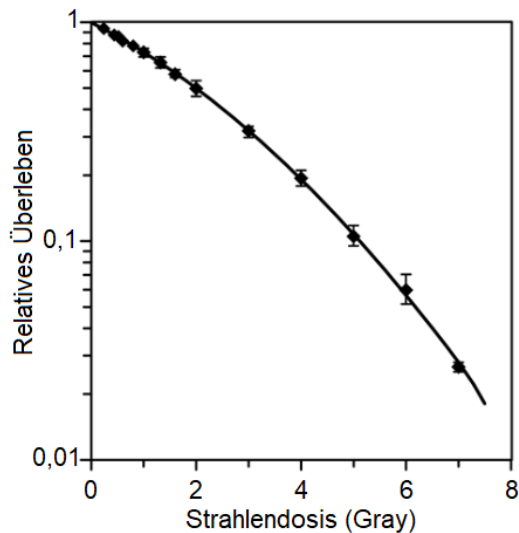


Abbildung 3: Überlebenskurve anhand des linear-quadratischen Modells modifiziert nach Brenner 2008

Es ergibt sich eine zelltypspezifische Kurve mit schulterförmigem Anfangsbereich und einem sich daran anschließenden exponentiellen Kurvenabfall. Die „Schulter“ wird dabei von der linearen Komponente αD bestimmt, da die durch ein Teilchen ausgelösten DNA-Schäden linear zur Strahlendosis ansteigen. Der exponentielle Teil wird durch die quadratische Komponente βD^2 bestimmt. Während das Auftreten eines einzelnen subletalen DNA-Schadens hier ebenfalls linear zur Strahlendosis ansteigt, nimmt die Wahrscheinlichkeit der Kombination zweier subletaler DNA-Schäden mit dem Quadrat der Strahlendosis zu (Brenner 2008; Fowler 1989; McMahon 2018; Münter und Weber 2017).

I.3.4 Grundlagen der Radiotherapiesensibilität und -resistenz

Die Wahrscheinlichkeit einer finalen Schädigung aller Tumorstammzellen, die für das Überleben des Tumors verantwortlich sind, nimmt mit steigender Strahlendosis zu. Daher kann keine absolute Resistenz der Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung bestehen. Da die maximal anwendbare Strahlendosis jedoch durch die Strahlentoleranz gesunder Gewebe beschränkt ist, kommt der Strahlenresistenz im klinischen Alltag eine entscheidende Bedeutung zu (Lomax et al. 2013; Willers et al. 2013).

Grundlegende Mechanismen, die die strahlenbiologische Wirkung fraktionierter Radiotherapie auf Normal- und Tumorgewebe beeinflussen, sind als die „vier Rs der Strahlenbiologie“ nach Withers beziehungsweise, ergänzt durch Steel, als die „fünf Rs

der Strahlenbiologie“ bekannt. Dazu zählen die Reparatur von DNA-Schäden, die Redistribution, die Repopulation, die Reoxygenierung sowie die intrinsische Radiosensibilität des Gewebes (Steel et al. 1989; Withers 1975). Während Reparatur und Repopulation zur Strahlenresistenz beitragen, steigern Redistribution und Reoxygenierung die Strahlensensibilität der Gewebe (Münter und Weber 2017).

Die Entstehung von nicht behebbaren DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüchen ist der Hauptwirkmechanismus der Radiotherapie (Lomax et al. 2013, Münter und Weber 2017). Daher fördern eine beschleunigte Reparatur von DNA-Schäden durch NHEJ und HR oder eine Toleranz gegenüber solchen Schäden das Überleben der Tumorzellen und verringern die Ansprache auf die Bestrahlung (Willers et al. 2013). Defekte der Reparaturmechanismen hingegen führen zu einer Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber ionisierender Strahlung (Helleday et al. 2008; Willers et al. 2013).

Die Zeit zwischen den Fraktionen gibt dem Normalgewebe die Möglichkeit zur Erholung, führt allerdings auch zur sogenannten Repopulation des Tumorgewebes. Eine erhöhte Proliferationsrate und eine Rekrutierung von Tumorstammzellen führen zur Regeneration des Tumorgewebes. Es entstehen zusätzliche Zellen, die eine höhere Strahlendosis nötig machen (Kim und Tannock 2005; Münter und Weber 2017). Diese verstärkte Repopulation nimmt mit der Behandlungsdauer zu und kann vermindert werden, wenn die Strahlendosis akzeleriert, also in kürzeren Zeitabständen, verabreicht wird (Kim und Tannock 2005; Saunders et al. 1999).

Die Redistribution hängt mit der unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen zusammen. Durch die Bestrahlung kommt es zu einer Synchronisierung des Zellzyklus und einer vorübergehenden Abnahme der Mitoserate, da vor allem die Zellen, die sich in der strahlensensiblen M- oder G2-Phase befinden, zu Grunde gehen, während die Zellen in den strahlenresistenteren Phasen überleben. Nach und nach treten die verbliebenen Zellen wieder in die strahlensensiblen Zellzyklusphasen ein. Diese Neuverteilung der Zellen auf verschiedene Phasen des Zellzyklus im bestrahlungsfreien Intervall wird als Redistribution bezeichnet und führt zu einer gesteigerten Radiosensibilität (Münter und Weber 2017).

Dass die Sauerstoffversorgung einen Einfluss auf die Strahlensensibilität von Geweben hat, wurde bereits 1936 durch Mottram gezeigt, der an Tumorschnitten eine Abhängigkeit der Strahlenschäden von der Entfernung zu den Tumorkapillaren und somit von der Oxygenierung beobachtete (Mottram 1936). Hypoxische Areale zeigen im Tumor ähnlich wie im Normalgewebe eine dreifach schlechtere Ansprache auf

Radiotherapie als normoxische Areale. Begründet werden kann dies mit dem sogenannten Sauerstoffeffekt. In Folge der ionisierenden Strahlen entstehen Radikale, die in Anwesenheit von Sauerstoff mit diesem reagieren und so hochreaktive Peroxide bilden, die die DNA weiter schädigen (Münter und Weber 2017; Rockwell et al. 2009). Diese zusätzliche Schädigung durch Peroxidradikale ist in hypoxischen Gebieten vermindert, so dass zunächst insbesondere die normoxischen Tumoreareale zu Grunde gehen. Die im bestrahlungsfreien Intervall folgende Reoxygenierung hypoxischer Tumoreareale führt somit zu einer verbesserten Wirkung der nächsten Strahlenfraktion auf das verbliebene Tumorgewebe. Als mögliche Mechanismen der Reoxygenierung gelten dabei eine verkürzte Diffusionsstrecke bei geringerer Zellzahl, eine Öffnung temporär verschlossener Gefäße und eine Verbesserung der Mikrozirkulation durch veränderte Druckverhältnisse (Münter und Weber 2017).

Neben den „fünf Rs der Strahlenbiologie“ spielen noch weitere Faktoren wie beispielsweise das Tumervolumen und die Umgebungsbedingungen des Tumors eine Rolle bei der Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung (Münter und Weber 2017; Willers et al. 2013).

I.4 Infektion, Inflammation und Krebsgeschehen

Zwischen chronischer Inflammation und Krebs sind bereits diverse Zusammenhänge beschrieben worden. Zum einen können Infektionen durch bestimmte Pathogene wie beispielsweise *Helicobacter pylori* oder humane Papillomviren kausal mit der Entstehung von Malignomen in Verbindung gebracht werden (Crowe 2005; Karin et al. 2006; Parsonnet et al. 1991). So konnten bereits im Jahr 1990 weltweit über 15 % aller Malignome Infektionen zugeschrieben werden (Pisani et al. 1997).

Zum anderen produzieren Tumore selbst zahlreiche Mediatoren, die verschiedene Leukozytenpopulationen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten anlocken. Die körpereigenen inflammatorischen Zellen setzen eine Vielzahl von Substanzen wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies frei. Damit schaffen sie Umgebungsbedingungen, die zur DNA-Schädigung und damit zu genomischer Instabilität, zur Angiogenese, zur Apoptoseresistenz sowie zur Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen beitragen können (Coussens und Werb 2002). Auch für Lungenkarzinome sind diese Zusammenhänge beschrieben worden (Gomes et al. 2014).

Infektionen sind eine der Haupttodesursachen von Krebspatienten (Inagaki et al. 1974). Bei der Mehrheit aller Patienten mit Lungenkarzinomen treten im Laufe der Erkrankung pulmonale Infektionen auf, die das mittlere Überleben der Betroffenen signifikant reduzieren (Berghmans et al. 2003; Nagy et al. 2019; Perlin et al. 1990; Sarihan et al. 2005). Die Ursache solcher Infektionen sind am häufigsten gramnegative Bakterien wie *Haemophilus influenza*, *Escherichia coli* und *Moraxella catarrhalis* gefolgt von grampositiven Bakterien und Pilzen (Berghmans et al. 2003; Putinati et al. 1994; Sarihan et al. 2005).

I.5 Lipopolysaccharid und Toll-like Rezeptor 4

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran und ein wichtiger Pathogenitätsfaktor eben solcher gramnegativer Bakterien, die häufig die Ursache von pulmonalen Infektionen bei Patienten mit Lungenkarzinom sind (Berghmans et al. 2003). Lipopolysaccharide bestehen aus einem Lipid- und einem Polysaccharidanteil. Letzterer setzt sich wiederum aus einer O-spezifischen-Kette, die stark antigene Eigenschaften aufweist und zwischen den verschiedenen bakteriellen Serotypen divergiert, und einem weniger variablen Kern zusammen. Das in der äußeren Bakterienmembran verankerte Lipid A hingegen, welches den toxisch wirkenden Bestandteil des Endotoxins darstellt, ist hoch konserviert und in den Lipopolysacchariden aller gramnegativen Bakterien enthalten (Alexander und Rietschel 2001; Schletter et al. 1995).

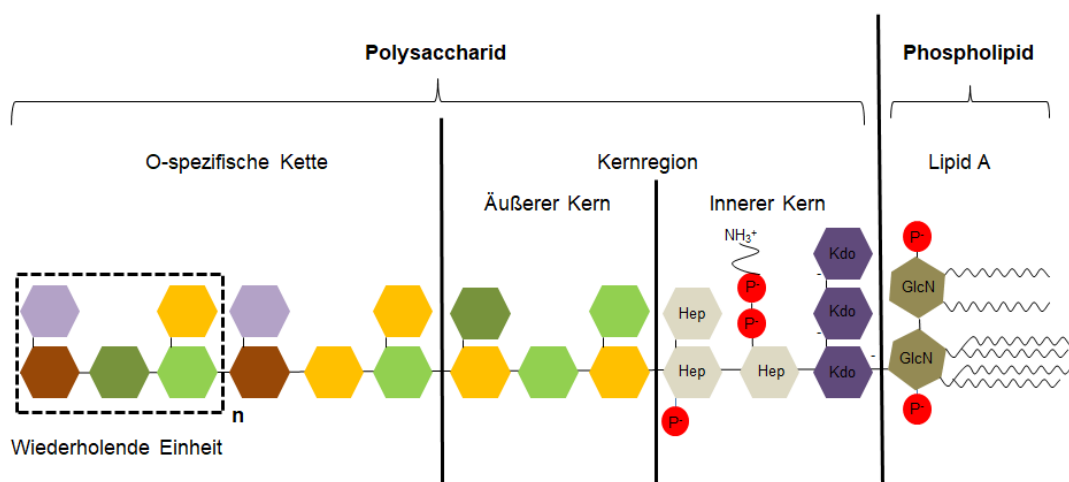


Abbildung 4: LPS-Struktur gramnegativer Bakterien modifiziert nach Alexander und Rietschel 2001

Toll-like Rezeptoren (TLR) dienen als Gruppe von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems der Erkennung von Pathogenen über sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) wie Lipopolysaccharide, Peptidoglykane oder nicht methylierte CpG-DNA, welche hochkonservierte Strukturen in Pathogenen darstellen. Toll-like Rezeptoren sind Typ-I-Transmembranproteine, die von Zellen des Immunsystems, jedoch auch von nicht-immunogenen Zellen exprimiert werden. Die sowohl auf der Zelloberfläche als auch in intrazellulären Kompartimenten wie Endosomen vorliegenden Rezeptoren bestehen aus einem zytoplasmatischen Anteil, der so genannten Toll/IL-1-Rezeptor (TIR) Domäne und einem extrazellulären beziehungsweise in intrazellulären Kompartimenten befindlichen Anteil, der Leucinreiche Regionen enthält und für die Ligandenbindung zuständig ist (Mogensen 2009; Takeda und Akira 2005). Im Menschen sind zehn verschiedene Toll-like Rezeptoren bekannt, die jeweils spezifische Strukturen erkennen. Dabei ist der Toll-like Rezeptor 4 für die Erkennung der Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien verantwortlich, während Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane grampositiver Bakterien durch Toll-like Rezeptor 2 erkannt werden. Auf Grund der stark antigenen Eigenschaften des Endotoxins genügen bereits geringe Mengen um den TLR4 zu aktivieren (Takeda und Akira 2005). LPS wird dabei über das lösliche LPS-Bindeprotein (LPB) an den Rezeptor CD14 vermittelt, der die Bindung von LPS an den TLR4 ermöglicht. Da neben der insbesondere auf myeloischen Zellen vorkommenden membrangebundenen Form von CD14 auch eine lösliche Form existiert, kann LPS auch den TLR4 nicht-myeloischer Zellen aktivieren, die CD14 selbst nicht exprimieren (Pugin et al. 1994; Guha und Mackman 2001). Nach der Aktivierung des TLR4-MD2-Komplexes durch LPS, bei der MD2 die LPS-Bindung erleichtert, kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors, die verschiedene teils MyD88-abhängige und teils MyD88-unabhängige Signalwege ausgehend von der TIR Domäne anstößt (Abb. 5). Dabei führt der MyD88-abhängige Signalweg zu einer schnellen Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nucleus, wo dieser die Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 induziert. Zudem wird der Transkriptionsfaktor AP-1 über MAP-Kinasen aktiviert. Der MyD88-unabhängige Signalweg bewirkt zum einen ebenfalls eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der MAP-Kinasen, wenn auch mit deutlich verzögerter Dynamik. Zum anderen führt er zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors IRF-3 in den Nucleus, wo dieser die Genexpression von Typ-I-

Interferonen und der durch Interferone induzierbaren Gene verstärkt (Lu et al. 2008; Takeda und Akira 2005).

Die „Mitogen-activated protein kinases“ (MAP-Kinasen) sind Teil eines komplexen Netzwerks, welches aus einem dreistufigen Kinaseweg aufgebaut ist, durch verschiedene Stimuli aktiviert wird und Einfluss auf wesentliche Zellfunktionen nimmt (Abb. 6). Die „Extracellular signal-related kinases“ (ERK), die „Jun aminoterminal kinases“ (JNK) und die „p38 kinases“ (p38) gehören dabei als MAP-Kinasen der untersten Stufe an. Diese werden durch verschiedene MAP-Kinase-Kinasen (MKK) aktiviert. Dabei ist MKK1/2 beziehungsweise MEK1/2 für die Aktivierung von ERK1/2 zuständig, MKK3/6 für die von p38 Kinasen und MKK4/7 für die von JNK1/2/3. Diese werden wiederum von oberhalb liegenden MAP-Kinase-Kinase-Kinasen wie den Raf-Proteinkinasen aktiviert (Chang und Karin 2001; Dent 2003). Die aktivierten MAP-Kinasen ERK1/2, JNK1/2/3 und p38 bewirken direkt oder indirekt die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, c-Jun, c-Fos, ATF-1, ATF-2, SRF und CREB und nehmen Einfluss auf wesentliche Aspekte wie Zellproliferation, -überleben und -tod (Chang und Karin 2001). Daneben wird auch der PI3K-AKT-Signalweg angestoßen, der unter anderem ebenfalls zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B beiträgt (Guha und Mackman 2001).

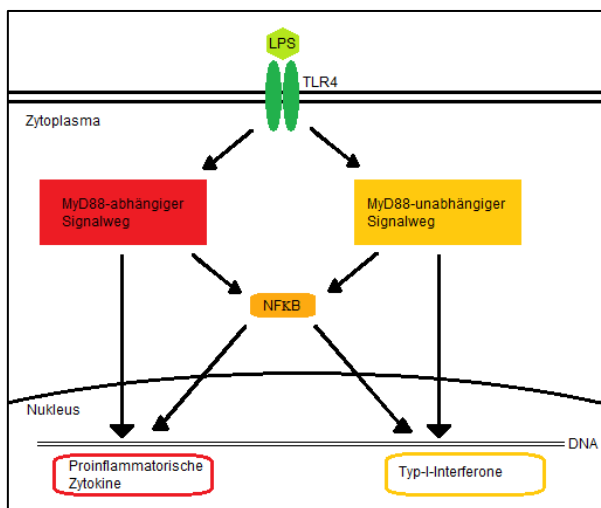


Abbildung 5: LPS-TLR4-Signalweg
modifiziert nach Lu et al. 2008

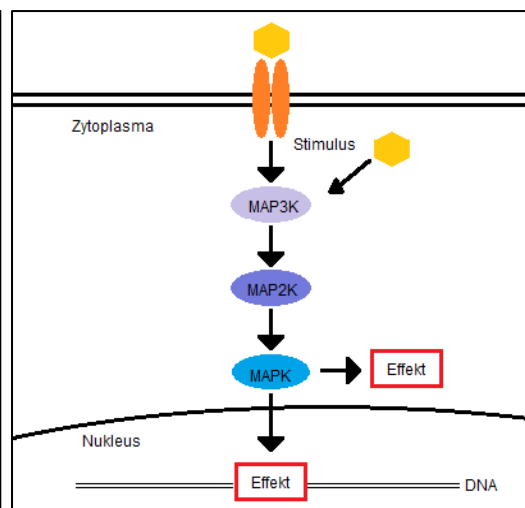


Abbildung 6: MAP-Kinase-Signalweg
modifiziert nach Chang und Karin 2001

TLR4 und TLR9 werden im Gewebe von Lungenkarzinomen stärker exprimiert als in dem gesunden Lungen, wobei eine hohe Expression von TLR4 mit einer vermehrten Malignität der Karzinome korreliert (Zhang et al. 2009). Zudem weisen

Lungenkarzinom-Patienten, bei denen gleichzeitig eine Infektion mit gramnegativen Bakterien vorliegt, höhere Expressionslevel von TLR4 und TLR9 im Tumorgewebe auf als Lungenkarzinom-Patienten ohne Infektion (Ye et al. 2016). Die Aktivierung des TLR4 auf Lungenkarzinomzellen, Stromazellen und in den Tumor einwandernder Immunzellen stößt zahlreiche Signalwege an, die für die Differenzierung und Proliferation von Lungenkarzinomzellen essentiell sind (He et al. 2007; Pinto et al. 2011). Zudem konnte in vitro und in vivo bereits ein proproliferativer Effekt von LPS auf NSCLC-Zellen gezeigt werden (Hattar et al. 2013).

I.6 Interleukin-8

LPS führt über den TLR4-Signalweg zur verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (Guha und Mackman 2001). Die Expression von IL-8 wird dabei sowohl durch NF- κ B als auch durch den Einfluss der MAP-Kinasen ERK und p38 gesteigert (He et al. 2013). Grandel et al. konnten in vitro eine basale Produktion von IL-8 durch die NSCLC-Zelllinie A549 sowie eine dosis- und zeitabhängige Steigerung der Expression unter LPS-Exposition zeigen (Grandel et al. 2009). IL-8 ist ein Mitglied der CXC-Chemokin-Familie und entfaltet seine Wirkung über die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, indem es über verschiedenste Mechanismen, darunter MAP-Kinase-, JAK-STAT- und PI3K-AKT-Signalweg, Einfluss auf wesentliche Zellfunktionen nimmt (Waugh und Wilson 2008). In verschiedenen Untersuchungen wurde eine proproliferative Wirkung von IL-8 auf NSCLC-Zelllinien festgestellt, die sich als dosisabhängig erwies (Arenberg et al. 1996; Luppi et al. 2007; Zhu et al. 2004). IL-8 rekrutiert Neutrophile und führt in Lungenkarzinomen neben einer Proliferation zur Angiogenese und Metastasierung (Luppi et al. 2007). Yuan et al. zeigten, dass IL-8 stärker in NSCLC-Zellen exprimiert wird als in vergleichbarem, gesundem Lungengewebe. Zudem korrelieren hohe Expressionslevel von IL-8 mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, entfernten Lymphknotenmetastasen, früheren Rezidiven und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit. Hohe IL-8 Spiegel sind daher klinisch mit einem Tumorprogress und einer schlechteren Prognose für NSCLC-Patienten assoziiert (Yuan et al. 2000).

I.7 Zielsetzung

Das Lungenkarzinom ist eines der häufigsten Malignome und eine der führenden Krebstodesursachen in Deutschland (Robert Koch-Institut 2023). Pulmonale Infektionen - insbesondere durch gramnegative Bakterien - treten bei diesen Patienten gehäuft auf und können das Überleben der Betroffenen signifikant reduzieren (Berghmans et al. 2003; Nagy et al. 2019; Perlin et al. 1990; Sarihan et al. 2005). Daher ist das Ziel dieser Arbeit anhand von in vitro durchgeführten Experimenten an der NSCLC-Zelllinie A549 zu untersuchen, ob pulmonale Infektionen – simuliert durch den Einsatz von LPS – einen Einfluss auf die Sensibilität gegenüber Chemo- oder Radiotherapie haben.

In einem ersten Schritt wird mittels der Quantifizierung des klonogenen Überlebens überprüft, ob LPS zu einer Veränderung der Ansprache auf Cisplatin oder ionisierende Strahlung führt. Kann ein entsprechender Effekt nachgewiesen werden, soll untersucht werden, welche Proteine beziehungsweise Signalwege hier involviert sein könnten. Abschließend soll die funktionelle Rolle des potentiell beteiligten Signalwegs bei der Vermittlung des entsprechenden Effektes anhand von Inhibitionsversuchen in vitro überprüft werden. Zudem wird die Produktion von IL-6 und IL-8 als wichtige proinflammatorische Zytokine des LPS-TLR4-Signalwegs untersucht.

II Material und Methoden

II.1 Materialien

II.1.1 Verwendete NSCLC-Zelllinie

A549

(Katalognr. CCL-185, ATCC, Manassas, VA, USA)

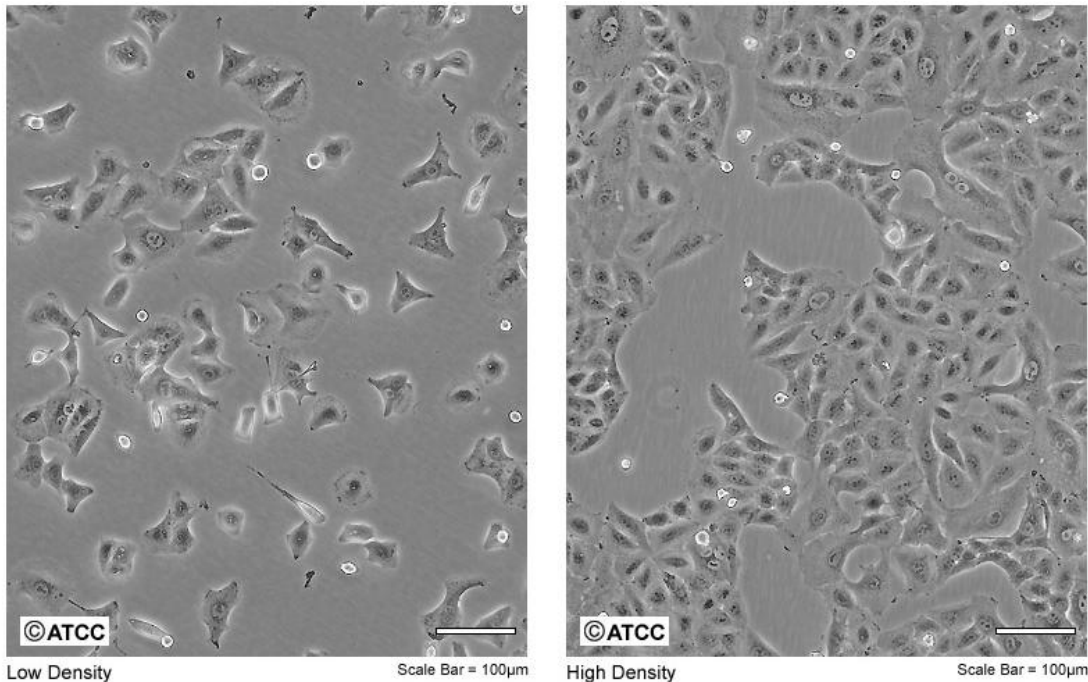


Abbildung 7: A549-Zellen in Kultur American Type Culture Collection <https://www.atcc.org/products/ccl-185#detailed-product-images> [abgerufen am 11.02.2025]

Die epitheliale NSCLC-Zelllinie A549 wurde aus dem Adenokarzinom eines männlichen Spenders isoliert und wächst adhärent. Die Zelllinie ist hypotriploid mit um die 66 Chromosomen pro Zelle, wobei eine zytogenetische Instabilität beschrieben ist (American Type Culture Collection). A549-Zellen weisen den genetischen Wildtyp für EGFR (Tracy et al. 2004) und p53 (Lehman et al. 1991) sowie eine KRas-Mutation in Position 12 (Valenzuela und Groffen 1986) auf.

II.1.2 Verwendete Substanzen

Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody Cell Signaling Technology, Danvers, MA,
#7074 USA

Aqua Spüllösung (Ecotainer® PP Flasche B. Braun Melsungen AG, Melsungen
1000 ml)

Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Capture-Antikörper IL-6 MAB 206	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Capture-Antikörper IL-8 MAB 208	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Cisplatin cis-Diammineplatinum(II) dichloride	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ELISA Substrat Reagent Pack	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Fetal Bovine Serum Research Grade (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GAPDH (14C10) Rabbit Monoclonal Antibody #2118	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
IL-6 Standard (human) 206-IL-010	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
IL-8 Standard (human) 208-IL-010	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
LPS (E. coli 0111:B4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Medium RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin-Streptomycin, 1000 U/ml Pen, 10 mg/ml Strep	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit Monoclonal Antibody #4695	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phosphate-Buffered Saline Tabletten	TH. Geyer GmbH, Renningen
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) Rabbit Monoclonal Antibody #4370	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Proteome Profiler Array Human Phospho-Kinase Array Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
SCH772984 ERK1/2-Inhibitor	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
SignalFire™ ECL Reagent #6883	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Streptavidin-HRP	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Trypsin from bovine pancreas Type 1	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

II.1.3 Verwendete Materialien

Cryo-Röhrchen 2 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen
Deckgläser Neubauer-Zählkammer	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
ELISA-Folien Optical Adhesive Film	VWR International, Radnor, PA, USA
Polyesterfolie, unsteril	
ELISA-Platten, F96 Maxisorp-Nunc- ImmunoPlate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten-Spitzen 200 µl gelb	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten-Spitzen 1000 µl blau	Sarstedt, Nümbrecht
Protein Low Binding Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen steril 15/50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock Tube 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
96-Well-Zellkultur Platte	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25 ml, 12,5 cm ²	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Zellkulturflaschen 50 ml, 25 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 250 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen 60 mm rund	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

II.1.4 Verwendete Geräte

Absaugpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

CO2-Inkubator HeraCell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Elektronenlinearbeschleuniger Elekta Synergy	Elekta, Stockholm, Schweden
ELx808 Absorptions-Reader für Mikroplatten	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Gefrierschrank Vip Series -86 °C	Sanyo Corporation, Panasonic, Kadoma City, Japan
Kühlschrank Öko_Santo	AEG, Nürnberg
Labor-pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3002	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikroskop Leica DMI1	Leica Camera AG, Wetzlar
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Kalensee, Gießen
Pipettierhilfe Pipetboy accu	Integra Biosciences, Zizers, Schweiz
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Plattformschüttler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IKA Vibrax VXR Shaker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Reinluftbank MSC-Advantage	Stuart Cole-Parmer, Staffordshire, UK
Rotator SB3	LAP GmbH Laser Applikationen, Lüneburg
10 mm RW3-Platten (RW3: 1,045 g/cm ³ , Wasser: 1,0 g/cm ³)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
VersaDoc, Bio Rad ChemiDoc XRS+	Heidolph Instruments, Schwabach
Vortexer REAX 2000	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge MC 6	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Mikro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotana V38 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotina 380 R	Hettich, Tuttlingen

II.1.5 Verwendete Software

BioDocAnalyze Software 2.1	Analytik Jena AG, Jena
Citavi, Version 6.1	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Gen5™ Datenanalyse-Software	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
GraphPad PRISM, Version 9	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Paint 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft PowerPoint 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Mozilla Firefox 59.0.3	Mozilla Foundation, Mountain View, CA, USA

II.2 Methoden

II.2.1 Kultivierung der Zellen

Die verwendete NSCLC-Zelllinie A549 wurde in RPMI-Medium, welches mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt wurde, (im Folgenden als „Medium“ bezeichnet) in 75-cm²-Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen bei 37 °C in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ im CO₂-Inkubator HeraCell 150 für drei bis vier Tage kultiviert.

II.2.2 Passagierung der Zellen

Nach optischer Kontrolle des Zellrasens unter dem Mikroskop Leica DMI1 erfolgte die ebenfalls sterile Passagierung der Zellen unter der Reinluftbank MSC-Advantage mit laminarem Flow. Das verbliebene Medium wurde mit der Absaugpumpe Vacusafe comfort abgesaugt, die Zellen mit 6 ml DPBS gewaschen, um tote, aus dem Zellverband gelöste Zellen zu entfernen, und das DPBS anschließend wieder abgesaugt. Um die

adhärenten Zellen vom Flaschenboden sowie um Zell-Zell-Kontakte zu lösen, erfolgte die Zugabe von 3 ml Trypsin in die Zellkulturflasche. Dann wurden die Zellen für vier Minuten inkubiert, so dass diese in abgekugelter Form vereinzelt vorlagen. Die Zell-Trypsin-Suspension wurde in der Zellkulturflasche mehrfach resuspendiert und anschließend in ein 50-ml-Röhrchen, das 1 ml vorgelegtes FCS enthielt, überführt, um die Trypsin-vermittelte Reaktion zu stoppen und eine weitere Proteolyse zu verhindern. Die Zellkulturflasche wurde nochmals mit 6 ml DPBS ausgewaschen und auch dies in das 50-ml-Falconröhrchen überführt. Nach weiterer Resuspension im Falcon wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert, um die Zellzahl zu bestimmen. Das 50-ml-Röhrchen wurde bei Raumtemperatur fünf Minuten lang bei 248 g zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde je nach ermittelter Zellzahl in einer entsprechenden Menge Medium gelöst, so dass sich eine Zellkonzentration von einer Millionen Zellen pro Milliliter ergab. Davon wurden 500 µl, also 500000 Zellen, in eine neue 75-cm²-Zellkulturflasche mit 12 ml vorgelegtem Medium überführt. Die restliche Zellsuspension wurde für anschließende Versuche eingesetzt oder verworfen.

II.2.3 Koloniebildungstest

Grundprinzip

Der Koloniebildungstest, der erstmals 1956 durch Puck und Marcus beschrieben wurde, stellt den Goldstandard zur Ermittlung des klonogenen Überlebens dar und ist weit verbreitet zur Untersuchung der Wirkung von Radio- sowie Chemotherapie in vitro. Durch Aussaat geringer Zellzahlen liegen die Zellen vereinzelt vor und nur diejenigen Zellen, die überleben und zur Zellteilung fähig sind, erreichen nach einer gewissen Inkubationszeit eine Koloniegröße von über 50 Zellen. Durch Zählung dieser Kolonien, die aus den sogenannten klonogenen Zellen hervorgehen, und Vergleich der gezählten Kolonien mit der ausgesäten Zellzahl lässt sich das Zellüberleben mittels Plattierungseffizienz (plating efficiency; $PE = \text{gezählte Kolonien} / \text{ausgesäte Zellen}$) beschreiben. Wird die Plattierungseffizienz der behandelten Zellen in das Verhältnis zur Plattierungseffizienz der unbehandelten Kontrolle gestellt, ergibt sich das relative Überleben (surviving fraction; $SF = PE \text{ behandelte Zellen} / PE \text{ Kontrolle}$) (Rafehi et al. 2011).

Allgemeiner Ablauf

Da verschiedene Varianten des Koloniebildungstestes durchgeführt wurden, wird zunächst der generelle Ablauf geschildert und im Anschluss werden die einzelnen Versuchsansätze dargestellt. Nach Aussaat der Zellen in 12,5-cm²- oder 25-cm²-Zellkulturflaschen mit 2 ml oder 4 ml Medium und erfolgter Adhärenz nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel gegen Medium mit der jeweiligen LPS-Konzentration durchgeführt. Nach weiteren 16 Stunden erfolgte die Behandlung mit Cisplatin beziehungsweise die Bestrahlung. Die Zellen wurden wie in Punkt II.2.2 beschrieben passagiert. Die Zellzählung erfolgte hier zwecks höherer Genauigkeit als Doppelwert nach Lösung des Zellpellets im jeweiligen LPS-Medium. Für jeden Ansatz wurde eine Zellsuspension mit 10000 Zellen pro Milliliter hergestellt. Anschließend wurde Medium mit der entsprechenden LPS-Konzentration in 50-ml-Röhrchen vorgelegt und das benötigte Volumen an Zellsuspension und gegebenenfalls die benötigte Menge Cisplatin hinzugegeben. Nach erneuter Resuspension wurden je 4 ml der vorbereiteten Suspensionen in jeweils drei 6-cm-Schalen ausplattiert. Nach einer von der Koloniegröße der Kontrolle abhängigen Inkubationszeit von acht bis neun Tagen wurde der Versuch unter unsterilen Bedingungen gestoppt, indem das Medium entfernt, die 6-cm-Schalen mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 70-prozentigem Alkohol bedeckt wurde, um die Zellen zu fixieren. Nach Entfernung des Alkohols wurden die Kolonien für 20 bis 30 Minuten mit Kristallviolett gefärbt, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Anschließend erfolgte die Zählung der Kolonien.

II.2.3.1 Koloniebildungstest der Zelllinie A549 unter Cisplatin

Bei den Koloniebildungstests unter Cisplatin wurde 16 Stunden nach der LPS-Behandlung vor der Passagierung der Zellen eine entsprechende Menge 50 mikromolarer Cisplatin-Lösung in die Zellkulturflaschen zugegeben, so dass die Zellen für eine Stunde mit 5 μ M Cisplatin vorinkubiert wurden. Die Behandlung der Zellen mit der endgültigen Cisplatin-Konzentration erfolgte durch Zugabe von einer entsprechenden Menge der 50 mikromolaren Cisplatin-Lösung in die wie bereits beschrieben vorbereiteten 50-ml-Röhrchen. Nach 24 Stunden erfolgte ein LPS-konformer Mediumwechsel, um das Cisplatin zu entfernen.

Zunächst wurde der Koloniebildungstest als Cisplatin-Konzentrationsreihe ohne Zugabe von LPS zur Bestätigung des toxischen Effektes von Cisplatin auf Zellen der NSCLC-

Zelllinie A549 und zur Ermittlung des richtigen Verhältnisses ausgesäter Zellen zur Cisplatin-Dosis durchgeführt. 24 Stunden nach der Aussaat in die Zellkulturflaschen wurde ein Teil der Zellen für eine Stunde mit 5 μM Cisplatin vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in 6-cm-Schalen, wobei mit steigender Cisplatinkonzentration (0 – 0,25 – 0,5 – 0,75 – 1 – 2 – 2,5 – 5 – 10 μM für 24 Stunden) mehr Zellen pro 6-cm-Schale ausgesät wurden. Nach 24 Stunden wurde das Cisplatin durch einen Mediumwechsel entfernt. Der Versuch wurde nach acht weiteren Tagen zur Zählung der Kolonien gestoppt.

Die Vorinkubation der Zellen für eine Stunde mit Cisplatin in einer Konzentration von 5 μM , die zur späteren Resistenzentwicklung beziehungsweise Sensibilisierung unter LPS beitragen sollte, verringerte das Zellüberleben nur gering. Daher wurde diese Vorinkubation in den folgenden Versuchen unter LPS übernommen. Zunächst erfolgte die Aussaat in Zellkulturflaschen und nach 24 Stunden die Behandlung der Zellen mit den LPS-Konzentrationen 0 – 1 – 10 $\mu\text{g/ml}$. Weitere 16 Stunden später wurden die Zellen für eine Stunde mit 5 μM Cisplatin vorinkubiert. Schließlich erfolgte die LPS-konforme Aussaat der Zellen in 6-cm-Schalen unter Verwendung der Cisplatinkonzentrationen 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 μM für 24 Stunden, wobei mit steigender Konzentration mehr Zellen (bis 0,5 μM 100, bei 1 μM 200, bei 2 μM 1000 pro 6-cm-Schale) ausgesät wurden. Die Entfernung des Cisplatins nach 24 Stunden wurde durch einen erneuten LPS-konformen Mediumwechsel bewerkstelligt. Auch diese Versuche wurden acht Tage nach der Aussaat in die 6-cm-Schalen gestoppt.

Tabelle 3: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Cisplatin des Koloniebildungstests mit A549

LPS-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Cisplatin für 1 h [μM]	Cisplatin für 24 h [μM]
0 – 1 – 10	5	0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2

II.2.3.2 Koloniebildungstest der Zelllinie A549 unter Radiotherapie

Bei den Koloniebildungstests unter ionisierender Strahlung wurden die Zellen ausschließlich mit einer LPS-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert.

24 Stunden nach der Aussaat in die Zellkulturflaschen erfolgte ein Mediumwechsel bei sechs der Zellkulturflaschen gegen Medium mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS und bei den übrigen sechs Zellkulturflaschen gegen Medium ohne LPS. 15 Stunden später wurde ein

erneuter, LPS-konformer Mediumwechsel gegen 2 % FCS-haltiges Medium durchgeführt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurden alle Zellkulturflaschen in einer gepolsterten Styroporbox in die Abteilung Strahlentherapie des UKGM Standort Gießen transportiert. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte dort mit dem Elektronenlinearbeschleuniger Elekta Synergy, der in der Klinik zur Bestrahlung von Patienten eingesetzt wird und 6 MeV ultraharte Röntgenstrahlung emittiert. Die zu bestrahlenden Zellen wurden in Zellkulturflaschen auf fünf 1 cm hohe RW3-Platten mit wasser-äquivalenter Dichte positioniert und es wurde eine weitere RW3-Platte für die Rückstreuung oben aufgelegt, um ein Dosismaximum in der Zellschicht zu erreichen. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einer Gesamtdosis von 1, 2, 4, 6 und 8 Gy mit 6 MeV ultraharten Röntgenstrahlen. Dabei wurden ein Fokus-Haut-Abstand von 1 m und eine Feldgröße von 20 cm x 20 cm gewählt. Die Dosistiefe lag bei 5 cm, wobei die Verschiebung des Dosismaximums in die Tiefe beim Versuchsaufbau berücksichtigt wurde. Nach Drehung der Gantry des Elektronenlinearbeschleunigers um 180 Grad unter den Bestrahlungstisch erfolgte die Bestrahlung der Zellen von unten. Nach dem Rücktransport der Zellkulturflaschen erfolgte die erneute Aussaat in Medium mit der entsprechenden LPS-Konzentration, wobei mit ansteigender Strahlendosis (0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 Gy) mehr Zellen (100 - 100 - 200 - 550 - 1600 - 6000 pro 6-cm-Schale) ausplattiert wurden. Der Versuch wurde nach acht bis neun Tagen zur Zählung der Kolonien gestoppt.

Tabelle 4: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Strahlendosis des Koloniebildungstests mit A549

LPS-Konzentration [µg/ml]	Strahlendosis [Gy]
0 - 10	0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8

II.2.3.3 Koloniebildungstest der Zelllinie A549 unter Radiotherapie und Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984

SCH772984 ist ein hochselektiver, gegen ERK1 und ERK2 gerichteter Inhibitor. Die halbmaximale Hemmung (IC_{50}) der Kinase-Aktivität in vitro wird in zellfreien Assays bereits bei Konzentrationen von 4 nM für ERK1 beziehungsweise 1 nM für ERK2 erreicht (Morris et al. 2013). Die Versuche wurden ebenfalls ausschließlich mit einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml durchgeführt. Zunächst wurde der

Koloniebildungstest als Konzentrationsreihe des Inhibitors SCH772984 ohne LPS und Bestrahlung durchgeführt, um den alleinigen Effekt von SCH772984 auf das Zellüberleben zu überprüfen und die geeignete Konzentration für die anschließenden Versuche auszuwählen. In Anlehnung an die später geplanten Versuche erfolgte 24 Stunden nach der Aussaat in die Zellkulturflaschen ein Mediumwechsel und weitere acht Stunden später ein erneuter Austausch gegen Medium mit 2 % FCS sowie die Zugabe des Inhibitors in den Konzentrationen 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 μM jeweils in eine der Zellkulturflaschen. Nach 16 Stunden wurden die Zellen in Medium mit der entsprechenden Inhibitor-Konzentration ausgesät, wobei jeweils 100 Zellen pro 6-cm-Schale ausplattiert wurden. Weitere 24 Stunden später wurde der Inhibitor durch einen Mediumwechsel entfernt. Der Versuch wurde acht bis neun Tage nach der Aussaat in die 6-cm-Schalen zur Zählung der Kolonien gestoppt.

In den anschließenden Versuchen erfolgte ebenfalls 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen ein Mediumwechsel bei zwölf Flaschen gegen LPS-freies Medium und bei den übrigen zwölf Flaschen gegen Medium mit einer LPS-Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$. Weitere acht Stunden später erfolgte ein erneuter LPS-konformer Mediumwechsel gegen 2 %-haltiges FCS-Medium mit und ohne SCH772984 in einer Konzentration von 0,25 μM jeweils in sechs der Zellkulturflaschen mit und ohne LPS. Nach 16 Stunden wurden die Zellen wie in Punkt II.2.3.2 beschrieben mit 0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 Gy bestrahlt und erneut in Medium mit der entsprechenden LPS- und Inhibitor-Konzentration ausgesät, wobei mit ansteigender Dosis (0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 Gy) mehr Zellen (100 - 100 - 200 - 550 - 1600 - 6000 pro 6-cm-Schale) ausplattiert wurden. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte ein erneuter LPS-konformer Mediumwechsel um den Inhibitor zu entfernen. Der Versuch wurde acht bis neun Tage nach der Aussaat in die 6-cm-Schalen zur Zählung der Kolonien gestoppt.

Tabelle 5: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS, Strahlendosis und ERK1/2-Inhibitor SCH772984 des Koloniebildungstests mit A549

LPS-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Strahlendosis [Gy]	SCH772984 für 40 h [μM]
0 - 10	0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8	0 - 0,25

II.2.4 MTS-Assay der Zelllinie A549

Grundprinzip

Der MTS-Assay ist eine kolorimetrische Methode zur indirekten Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen. Das verwendete CellTiter 96® AQueous One Solution Reagenz enthält ein Tetrazolium-Präparat sowie Phenazine-Ethosulfat, ein elektronenkoppelndes Mittel. Untersucht wird die quantitative Reduktion des gelbfarbenen 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) in das entsprechende lilafarbene Formazan-Produkt. Diese Umwandlung wird durch NADPH und NADH der stoffwechselaktiven Zellen vermittelt. Daher korreliert die Intensität der Färbung, deren Absorption bei 490 nm Wellenlänge gemessen wird, direkt mit der Stoffwechselaktivität, die maßgeblich durch die Anzahl vorhandener, vitaler Zellen determiniert wird (Promega Corporation).

MTS-Assay der Zelllinie A549 unter Cisplatin

Auch hier wurde den Versuchen zur Untersuchung des Effektes von LPS auf die Cisplatin-Sensibilität der NSCLC-Zelllinie A549 eine Cisplatin-Konzentrationsreihe vorangestellt. Zunächst wurde in die Vertiefungen einer 96-Well-Zellkulturplatte 200 µl einer Zellsuspension von 25000 Zellen pro Milliliter, also 5000 Zellen pro Well ausgesät sowie in vier Vertiefungen ausschließlich 200 µl Medium als Kontrollwert („blank“) pipettiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch Medium mit der entsprechenden Cisplatin-Konzentration ersetzt. Weitere 24 Stunden später, zwei Stunden nach der Zugabe von 20 µl MTS pro Vertiefung erfolgte die Messung der Absorption mit dem ELx808 Absorptions-Reader für Mikroplatten bei 490 nm Wellenlänge. Anschließend wurden die Daten mit Hilfe der Gen5™ Datenanalyse-Software analysiert.

In den sich anschließenden Versuchen unter LPS erfolgte die Aussaat entsprechend der für die Konzentrationsreihe. Nach 24 Stunden andauernder Adhärenz wurde das Medium abgesaugt und durch Medium mit der entsprechenden LPS-Konzentration (0 - 1 - 10 µg/ml) und der entsprechenden Cisplatin-Konzentration (0 - 1 - 10 - 50 - 100 - 250 µM) ersetzt. In drei verschiedenen Versuchsansätzen wurden nach sechs, 14 und 22 Stunden 20 µl MTS pro Vertiefung hinzu pipettiert. Weitere zwei Stunden später wurde die Absorption bei 490 nm Wellenlänge gemessen und die Daten analysiert. Die

Ergebnisse wurden als relative Stoffwechselaktivität normiert anhand der Kontrollgruppe dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Cisplatin des MTS-Assays mit A549

LPS-Konzentration [µg/ml]	Cisplatin für 8/16/24 h [µM]
0 - 1 - 10	0 - 1 - 10 - 50 - 100 - 250

II.2.5 BCA Protein Assay

Grundprinzip

Der BCA Protein Assay ist eine kolorimetrische Methode zur Quantifizierung der Proteine in einer Probe. Die Bestimmung der Proteinkonzentration war Voraussetzung für die Durchführung des humanen Phospho-Kinase Arrays und des Western Blots sowie die Verrechnung der mittels ELISA erhobenen Interleukin-Konzentrationen. Grundlage des Nachweises ist die sogenannte Biuret-Reaktion, die Reduktion von Kupfer(II)- zu Kupfer(I)-Ionen durch Proteine in alkalischer Umgebung sowie der Nachweis der so entstandenen Kupfer(I)-Ionen durch Bildung eines violettfarbenen Komplexes je eines Kupfer(I)-Ions mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA). Dieser wasserlösliche Komplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm Wellenlänge, die in Konzentrationsbereichen von 20 - 2000 µg/ml nahezu linear mit der Proteinkonzentration ansteigt. Die Auswertung erfolgt durch den Vergleich der gemessenen Absorption mit denen einer Standardkurve, die anhand der Messung von Proben mit Bovinem Serum Albumin in bekannter Konzentration erstellt wird. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte hier mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Anleitung des Herstellers (Thermo Fisher Scientific).

Probengewinnung

Nach Aussaat und Behandlung der Zellen in einer 25-cm²-Zellkulturflasche erfolgte die Probengewinnung. Dabei wurden die Zellen stets auf Eis gekühlt, um eine Schädigung der Proteine zu verhindern. Zunächst wurde die Zellzahl anhand einer unbehandelten Kontrolle bestimmt, um die später benötigte Menge Lysepuffer zu ermitteln. Die Überstände wurden aus den einzelnen Zellkulturflaschen abgenommen. Anschließend

wurden die Zellen zweimal mit kaltem DPBS gewaschen, das DPBS sehr gründlich vom Zellrasen abgesaugt und die benötigte Menge Lysepuffer (100 µl pro einer Millionen Zellen) in die Zellkulturflaschen gegeben. Verwendet wurde der Lysepuffer 6 aus dem Proteome Profiler Array Human Phospho-Kinase Array Kit von R & D Systems. Nach einer Einwirkzeit von zehn Minuten wurden die Zellen mit dem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und mechanisch zerstört. Die Zellsuspension wurde anschließend mit einer 100 µl Pipettenspitze mehrfach resuspendiert und in ein 1,5-ml-safe-lock-Reagiergefäß überführt. Anschließend wurden die Suspensionen bei 4 °C auf einem Rotator bei 14 Umdrehungen pro Minute für weitere 30 Minuten durchmischt. Dann wurden die Reagiergefäße bei 4 °C für zehn Minuten bei 40080 g zentrifugiert. Die Überstände wurden zu je 30 µl für den BCA Protein Assay und je 200 µl für weitere Versuche in 1,5-ml-safe-lock-Reagiergefäße überführt und bei -80 °C tiefgefroren.

Durchführung

Zunächst erfolgte die Herstellung der BSA-Verdünnungen für die Standardreihe. Dafür wurde der Stock mit 2 mg/ml BSA mit dem bei der Probengewinnung verwendeten Lysepuffer so verdünnt, dass die Konzentrationen 0 - 25 - 125 - 250 - 500 - 750 - 1000 - 1500 - 2000 µg/ml vorlagen. Die 30 µl umfassenden Proteinproben wurden mit 30 µl des Lysepuffers verdünnt. Je 25 µl der BSA-Standardwerte und der zu messenden, verdünnten Proteinproben wurden als Doppelwert auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Daraufhin wurden je 200 µl des BCA-Reagenz pro Vertiefung hinzugegeben. Die mit einer Folie abgedeckte 96-Well-Platte wurde für 30 Sekunden auf dem Rüttler und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Absorption im ELx808 Absorptions-Reader für Mikroplatten bei 630 nm Wellenlänge gemessen und die Daten mit der Gen5™ Datenanalyse-Software analysiert.

II.2.6 Humaner Phospho-Kinase Array

Grundprinzip

Der humane Phospho-Kinase Array ist ein schnelles und sensitives Verfahren zum parallelen Nachweis der Phosphorylierungs-Level von mehreren Kinasen und deren Proteinsubstraten. Verwendet wurde das Proteome Profiler Array Human Phospho-

Kinase Array Kit von R & D Systems. Nitrocellulosemembranen dienen als Träger für Fänger- und Kontroll-Antikörper, die jeweils doppelt auf der Membran vorliegen. Die Membranen werden mit den Proteinproben inkubiert, so dass die jeweiligen phosphorylierten Proteine an die Fänger-Antikörper binden können. Anschließend adhären verschiedene, spezifische, mit Biotin gelabelte Detektions-Antikörper an ein anderes Epitop der phosphorylierten Proteine. Das Biotin geht eine starke Bindung mit dem Streptavidin, an das die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, ein. Durch Zugabe eines chemilumineszenten Reagenz wird ein Signal erzeugt, das mit der Menge des gebundenen, phosphorylierten Proteins korreliert und über ein densitometrisches Verfahren quantifiziert werden kann (R & D Systems 2014).

Probengewinnung

Parallel zur Aussaat des Koloniebildungstestes in Punkt II.2.3.2 erfolgte die Aussaat von je 300000 Zellen in 25-cm²-Zellkulturflaschen. Nach 24 Stunden Adhärenz wurde ein Mediumwechsel gegen Medium mit der entsprechenden LPS-Konzentration (0 – 10 µg/ml) durchgeführt. In Anlehnung an Punkt II.2.3.2 erfolgte eine Stunde nach dem Mediumwechsel gegen 2 % FCS-haltiges Medium die Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 6 Gy. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Proteinproben analog zur Probengewinnung beim BCA Protein Assay (s. II.2.5) hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Protein Assay bestimmt.

Tabelle 7: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Strahlendosis für die Proteinproben von A549

LPS-Konzentration [µg/ml]	Strahlendosis [Gy]
0 - 10	0 - 6

Durchführung

Der humane Phospho-Kinase Array wurde anhand der Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden die acht Nitrocellulosemembranen vorsichtig aus den Schutzfolien gelöst und zum Blocken der unspezifischen Bindungen in die je mit 1 ml Array Puffer 1 versehenen Vertiefungen der 8-Well-Platte gelegt. Während der anschließenden einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler wurden die entsprechenden Mengen der Proteinproben mit dem

Array Puffer 1 auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt, so dass für jede der vier Proben die identische Proteinkonzentration vorlag. Nach einer Stunde wurde der Array Puffer 1 aus den Vertiefungen entfernt und je 1 ml der verdünnten Proteinproben in die jeweiligen Fächer mit der Membran A und B gegeben. Die Membranen wurden mit den Proben über Nacht bei 4 °C auf einem Plattformschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen vorsichtig aus der 8-Well-Platte entnommen und je die Membranen A und B einer Proteinprobe in einer Schale mit 20 ml Waschpuffer insgesamt dreimal für zehn Minuten auf einem Plattformschüttler gewaschen. Anschließend wurden je 1 ml der zuvor verdünnten Lösungen der Detektions-Antikörper A beziehungsweise B in die 8-Well-Platte vorgelegt und die Membranen A und B mit dem jeweils passenden Detektions-Antikörper-Cocktail A beziehungsweise B für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler inkubiert. Es schloss sich ein Waschvorgang an, bei dem jede Membran in einer einzelnen Schale wie bereits beschrieben für zehn Minuten dreimal gewaschen wurde. Anschließend wurden die Membranen in die Vertiefungen der 8-Well-Platte, die die zuvor verdünnte Streptavidin-HRP-Lösung enthielten, gelegt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Plattformschüttler wurden die Membranen A und B jeder Proteinprobe in einer Schale mit Waschpuffer erneut dreimal für zehn Minuten gewaschen. Daraufhin wurden die Membranen aus den Schalen entnommen und vorsichtig getrocknet. Nach dem Einlegen in den VersaDoc Bio Rad ChemiDoc XRS+ wurden die Membranen A und B jeder Proteinprobe mit 1 ml des Chemilumineszenz-Reagenz bedeckt. Über zehn Minuten wurden die entsprechenden Signale in 60 Messungen durch die Chemilumineszenzmethode mit dem VersaDoc Bio Rad ChemiDoc XRS+ detektiert und als Bilder gespeichert. Anhand der letzten Signaldetektion vor Sättigung der Referenz-Spots erfolgten die Bestimmung der Densitometrie und die Auswertung des Arrays mittels der BioDocAnalyze Software. Die Expressionslevel wurden normiert auf die Kontrolle dargestellt.

II.2.7 Western Blot für pERK-1/2

Grundprinzip

Der Western Blot bezeichnet eine Methode zur Auftrennung und zum Nachweis von Proteinen in einer Probe. Mittels Gelelektrophorese werden die Proteine je nach Methode anhand ihrer Ladungseigenschaften oder Größe aufgetrennt. Anschließend erfolgt das eigentliche „Blotting“, bei dem die im Gel entstandenen Banden auf eine

Membran übertragen werden. Der Transfer erfolgt in der Regel durch das Anlegen eines elektrischen Feldes, wobei die negativ geladenen Proteine zur Anode wandern und sich auf die zwischen Gel und Anode eingelegte Membran ablagern. Dann können die gesuchten Proteine durch spezifische Antikörperbindung und eine Farbreaktion, Chemilumineszenz oder Radioaktivität nachgewiesen werden. Die Stärke des entsprechenden Signals korreliert dabei mit der Menge des gesuchten Proteins einer Bande, so dass bei Vergleich mit einer standardisierten Kontrollprobe eine semiquantitative Aussage getroffen werden kann (Mahmood und Yang 2012).

Probengewinnung

Parallel zur Aussaat des Koloniebildungstestes in Punkt II.2.3.3 erfolgte die Aussaat von je 300000 Zellen in 25-cm²-Zellkulturflaschen. Nach 24 Stunden Adhärenz wurde ein Mediumwechsel gegen Medium mit der entsprechenden LPS-Konzentration (0 – 10 µg/ml) durchgeführt. Weitere acht Stunden später erfolgte ein erneuter LPS-konformer Mediumwechsel gegen 2 %-haltiges FCS-Medium mit und ohne SCH772984 in einer Konzentration von 0,25 µM. Nach 16 Stunden wurden die Zellen mit 6 Gy bestrahlt und erneut in Medium mit der entsprechenden LPS- und Inhibitor-Konzentration ausgesät. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Proteinproben analog zur Probengewinnung beim BCA Protein Assay (s. II.2.5) hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA Protein Assay bestimmt.

Tabelle 8: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS, Strahlendosis und ERK1/2-Inhibitor SCH772984 für die Proteinproben von A549

LPS-Konzentration [µg/ml]	Strahlendosis [Gy]	SCH772984 für 40 h [µM]
0 - 10	0 – 6	0 - 0,25

Durchführung

Die Durchführung des Western Blot zum Nachweis von pERK-1/2 erfolgte durch die Arbeitsgruppe von PD Dr. Florentine Subtil des strahlenbiologischen Labors der Klinik für Strahlentherapie im UKGM Standort Marburg.

Nach der Gelelektrophorese und dem Blotting wurden GADPH als Kontrolle sowie pERK-1/2 und ERK-1/2 mittels Enhanced Chemilumineszenz (ECL) nachgewiesen.

II.2.8 IL-6- und IL-8-ELISA

Grundprinzip

Der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ist ein biochemischer Assay zum qualitativen und quantitativen Nachweis bereits geringer Mengen verschiedener Antigene wie Proteine, Peptide, Hormone und Antikörper in einer flüssigen Probe. Der Nachweis dieser Antigene beruht auf der immunologischen Grundlage der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Sandwich-ELISA erfolgt zunächst die Immobilisierung des zu untersuchenden Antigens mit einem adhärenzten spezifischen Fänger-Antikörper. Ein spezifischer Detektions-Antikörper bindet an ein anderes Epitop des immobilisierten Antigens und wird wiederum durch ein weiteres Reagenz gebunden, das mit einem Enzym konjugiert ist, welches das anschließend zugegebene Substrat in einer Reaktion umsetzt, bei der ein Farbumschlag oder Fluoreszenz entsteht. Diese Reaktion muss nach einer gewissen Zeit gestoppt werden, damit nicht die komplette Menge des zugegebenen Substrates umgesetzt wird, sondern nur ein Teil abhängig von der vorhandenen Enzymmenge. Die Farbintensität korreliert daher mit der Menge des in der Probe enthaltenen Antigens, so dass der Vergleich der gemessenen Absorption der Probe mit der einer anhand einer Standardreihe erstellten Eichkurve die quantitative Bestimmung des Antigens erlaubt (Gan und Patel 2013).

Probengewinnung

Parallel zur Aussaat der Koloniebildungstests in Punkt II.2.3.2 und II.2.3.3 erfolgte die Aussaat von je 300000 Zellen in 25-cm²-Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden analog zu den Zellen des jeweiligen Koloniebildungstests behandelt. 24 Stunden nach der Bestrahlung erfolgte die Probengewinnung. Dafür wurde der Überstand aus den 25-cm²-Zellkulturflaschen in 15-ml-Falcons überführt und bei 4 °C für zehn Minuten bei 248 g zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend zu je dreimal 1 ml in 1,5-ml-Eppendorfcups aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C tiefgefroren.

Tabelle 9: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Strahlendosis (entsprechend II.2.3.2) für die ELISA-Proben von A549

LPS-Konzentration [µg/ml]	Dosis [Gy]
0 - 10	0 - 6

Tabelle 10: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS, Strahlendosis und ERK1/2-Inhibitor SCH772984 (entsprechend II.2.3.3) für die ELISA-Proben von A549

LPS-Konzentration [µg/ml]	Strahlendosis [Gy]	SCH772984 für 40 h [µM]
0 - 10	0 - 6	0 - 0,25

Durchführung

Zunächst wurde die ELISA-Platte unter sterilen Bedingungen mit dem entsprechenden Fänger-Antikörper (Anti-IL-6- beziehungsweise Anti-IL-8-Antikörper) beschichtet. Dafür wurden 100 µl der mit DPBS hergestellten Verdünnung des Fänger-Antikörpers in einer Konzentration von 4 µg/ml pro Vertiefung in die 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde die ELISA-Platte mit einer Folie verschlossen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die am darauf folgenden Tag durchgeführten Schritte erfolgten unsteril. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgekippt und die Wells zweimal mit 200 µl PBS gewaschen, um nicht adhären Fänger-Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurden 200 µl einer Lösung von einprozentigem BSA in PBS (Diluent) in die Vertiefungen pipettiert und bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde auf dem Rüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Währenddessen wurden die Verdünnungsreihen des IL-6- und IL-8-Standards mit den Konzentrationen 0 - 15,6 - 31,25 - 62,5 - 125 - 250 - 500 - 1000 - 2000 pg/ml durch die Zugabe von Diluent hergestellt. Nach der Entfernung der überschüssigen Lösung aus der ELISA-Platte wurden je 100 µl der Standardkonzentrationen und der Proben als Doppelwert in die Vertiefungen pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Rütteln wurden die Vertiefungen erneut zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Dann wurden 100 µl des an Biotin gekoppelten Detektions-Antikörpers (Anti-IL-6- beziehungsweise Anti-IL-8-Antikörper) in einer Konzentration von 4 ng

(für IL-8) beziehungsweise 5 ng (für IL-6) pro 100 µl in jede Vertiefung pipettiert und die 96-Well-Platte eine weitere Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Erneut wurden die Vertiefungen zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Als nächstes schlossen sich die Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP pro Vertiefung und die Inkubation für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur an. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit PBS wurden anschließend 100 µl des Substrat-Reagenz pro Vertiefung hinzu pipettiert. Dieses wurde in der folgenden Inkubationszeit im Dunklen bei Raumtemperatur durch die Meerrettich-Peroxidase in ein blaufarbenes Produkt umgesetzt. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure pro Vertiefung gestoppt, was zu einer Gelbfärbung führte. Anschließend wurde die Absorption im ELx808 Absorptions-Reader für Mikroplatten bei 450 nm Wellenlänge gemessen und die Daten mit der Gen5™ Datenanalyse-Software analysiert. Die ermittelten Werte wurden mit der Proteinkonzentration der jeweiligen Probe verrechnet und normiert auf die Kontrollgruppe dargestellt.

II.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Darstellung der Versuchsdaten erfolgte mit der Software GraphPad PRISM Version 9. Alle erhobenen Daten sind, wenn nicht anders angegeben, dargestellt als Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) für mindestens drei unabhängige Experimente. Die Zellüberlebenskurven wurden anhand des linear-quadratischen Modells erstellt.

Die Stichproben wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Die Prüfung auf statistische Signifikanz wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Bonferroni-korrigierter post-hoc Testung durchgeführt. Bei Vorliegen zweier unabhängiger Stichproben wurde ein unabhängiger t-Test angewandt. Dabei wurden jeweils p-Werte unter 0,05 als signifikant angesehen und mit einem Sternchensymbol markiert.

III Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde mittels der Quantifizierung des klonogenen Überlebens im Koloniebildungstest sowie der relativen Stoffwechselaktivität im MTS-Assay überprüft, ob LPS zu einer Veränderung der Cisplatinempfindlichkeit in der NSCLC-Zelllinie A549 führt.

Im zweiten Teil wurde die Änderung der Strahlenempfindlichkeit der Zelllinie A549 unter Einfluss von LPS anhand des klonogenen Überlebens im Koloniebildungstest untersucht. Um die möglicherweise involvierten Signalwege der beobachteten LPS-induzierten Strahlenresistenz auf Proteinebene zu untersuchen, wurden ein Proteom Profiler Array und ein Western Blot durchgeführt. Anschließend wurde ein mögliches Zielprotein inhibiert und die Auswirkung der Inhibition auf die Strahlensensibilität erneut anhand von Koloniebildungstests untersucht. Zudem wurde der Einfluss auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 untersucht.

III.1 LPS hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zelllinie A549

Um den Einfluss von LPS auf das relative Überleben der Zelllinie A549 im Koloniebildungstest zu überprüfen, erfolgte zunächst eine Behandlung mit LPS in unterschiedlichen Konzentrationen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Inkubation mit 0,1, 1 und 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS zu keiner Veränderung des klonogenen Überlebens führt (Abb. 8 a-b).

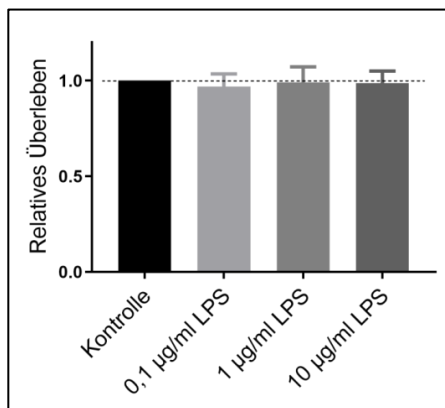
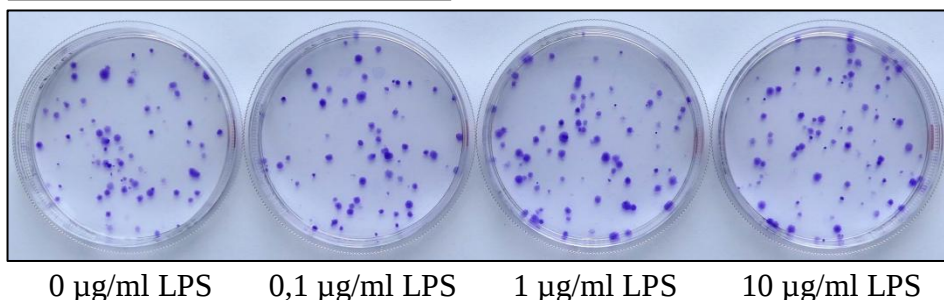


Abbildung 8 a-b: LPS hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zelllinie A549.

Messung durch Koloniebildungstest.

a) Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$.

b) Repräsentative Abbildung der von A549-Zellen gebildeten Kolonien unter Behandlung mit LPS in von links nach rechts steigender Konzentration.



III.2 Cisplatinsensibilität der Zelllinie A549 im Koloniebildungstest und deren Beeinflussung durch LPS

Um die Zelllinie A549 hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber Cisplatin zu charakterisieren, wurde zunächst das Überleben der Zellen in einer Cisplatin-Konzentrationsreihe mittels Koloniebildungstest untersucht. Hierbei war ein kontinuierlicher Abfall des klonogenen Überlebens mit steigender Cisplatinkonzentration zu verzeichnen. Abbildung 9 zeigt das relative Überleben der Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Cisplatinkonzentration jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Reduktion des Überlebens auf weniger als die Hälfte (42 %) wurde bereits bei der Behandlung mit 1 μM Cisplatin erreicht, während bei den höheren Konzentrationen ein sehr starker Abfall des Überlebens und bei den Konzentrationen von 5 und 10 μM Cisplatin trotz hoher Aussaatzahlen keine Bildung von Kolonien mehr zu verzeichnen war.

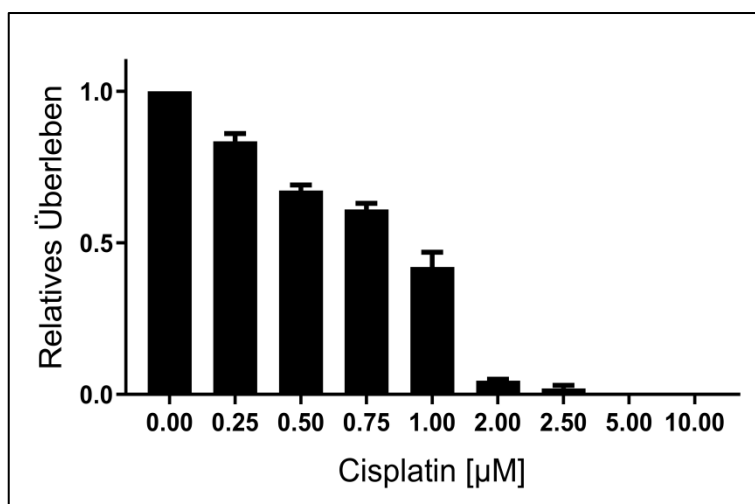


Abbildung 9:
Kontinuierlicher Abfall
des relativen Überlebens
der Zelllinie A549 unter
steigender
Cisplatinkonzentration.

Messung durch
Koloniebildungstest.
Dargestellt sind
Mittelwerte, Streuung der
Werte dargestellt als SEM;
 $n \geq 2$.

Zur Untersuchung einer möglichen Veränderung der Cisplatinempfindlichkeit unter LPS wurde in den folgenden Versuchen, angesichts der in der Konzentrationsreihe dargestellten Cisplatinsensibilität der Zelllinie A549, Cisplatin in Konzentrationen bis maximal 2 μM verwendet. Abbildung 10 a und b zeigen das relative Überleben unter 0,5 und 1 μM Cisplatin bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Dabei war keine wesentliche Änderung des relativen Überlebens unter LPS sichtbar. Signifikante Unterschiede im Überleben zwischen den einzelnen LPS-Gruppen, insbesondere eine Überlebenssteigerung unter LPS im Sinne einer Cisplatinresistenz, konnten nicht nachgewiesen werden.

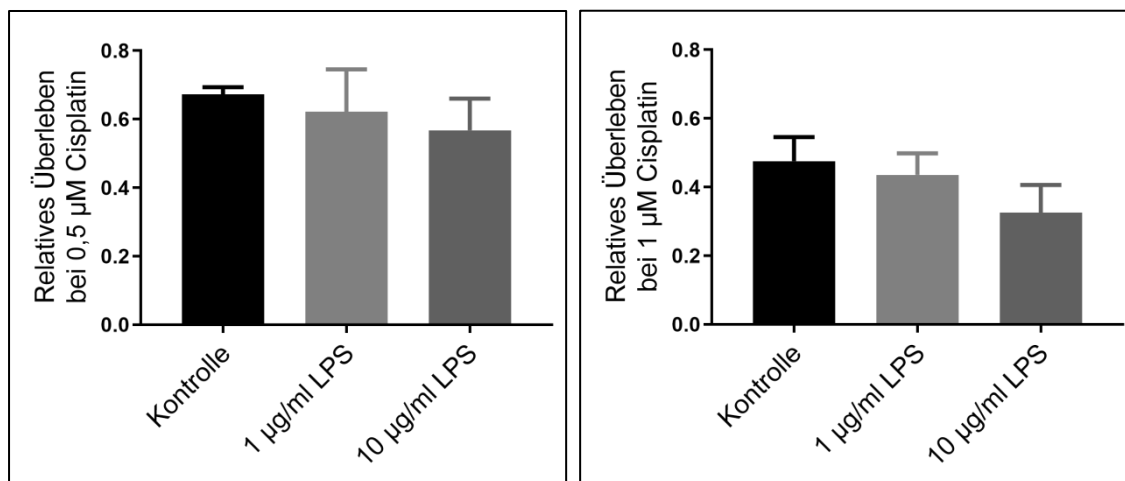


Abbildung 10 a-b: LPS hat keinen Einfluss auf das relative Überleben der Zelllinie A549 unter Cisplatin-Behandlung. Messung durch Koloniebildungstest. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. Relatives Überleben a) bei 0,5 µM Cisplatin und b) bei 1 µM Cisplatin.

III.3 Cisplatinsensibilität der Zelllinie A549 im MTS-Assay und deren Beeinflussung durch LPS

Um die Ergebnisse des Koloniebildungstests zu ergänzen, wurde ein MTS-Assay verwendet, anhand dessen über die Stoffwechselaktivität auf die vorhandene Zellzahl und damit auf das Zellüberleben rückgeschlossen werden konnte. Abbildung 11 zeigt in der zunächst durchgeführten Konzentrationsreihe den stetigen Abfall der Stoffwechselaktivität mit steigender Cisplatinkonzentration (0 - 1 - 10 - 50 - 100 - 250 µM für 24 Stunden). Die Reduktion der Stoffwechselaktivität auf die Hälfte wurde bei der Behandlung mit 50 µM Cisplatin erreicht.

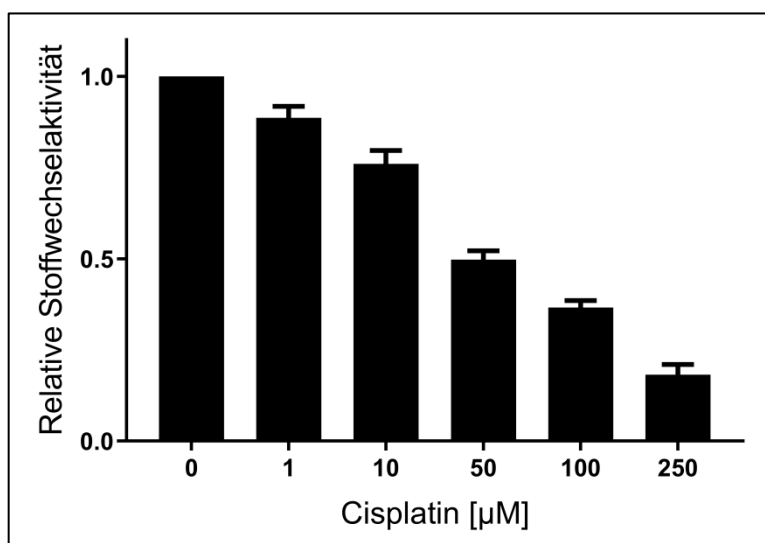


Abbildung 11: Kontinuierlicher Abfall der relativen Stoffwechselaktivität der Zelllinie A549 unter steigender Cisplatinkonzentration für 24 Stunden. Messung durch MTS-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$.

Da unter sämtlichen in der Konzentrationsreihe verwendeten Cisplatinkonzentrationen noch eine ausreichende Stoffwechselaktivität nachweisbar war, wurden zur Untersuchung einer möglichen Änderung der Cisplatinempfindlichkeit unter LPS in den folgenden Versuchen die Konzentrationen eingesetzt, bei denen eine Reduktion der Stoffwechselaktivität um etwa die Hälfte zu verzeichnen war. Abbildung 12 a und b zeigen die relative Stoffwechselaktivität unter 50 und 100 μM Cisplatin bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe. Analog zu den Ergebnissen des Koloniebildungstests ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der relativen Stoffwechselaktivität und damit der Anzahl vitaler Zellen zwischen den einzelnen LPS-Gruppen.

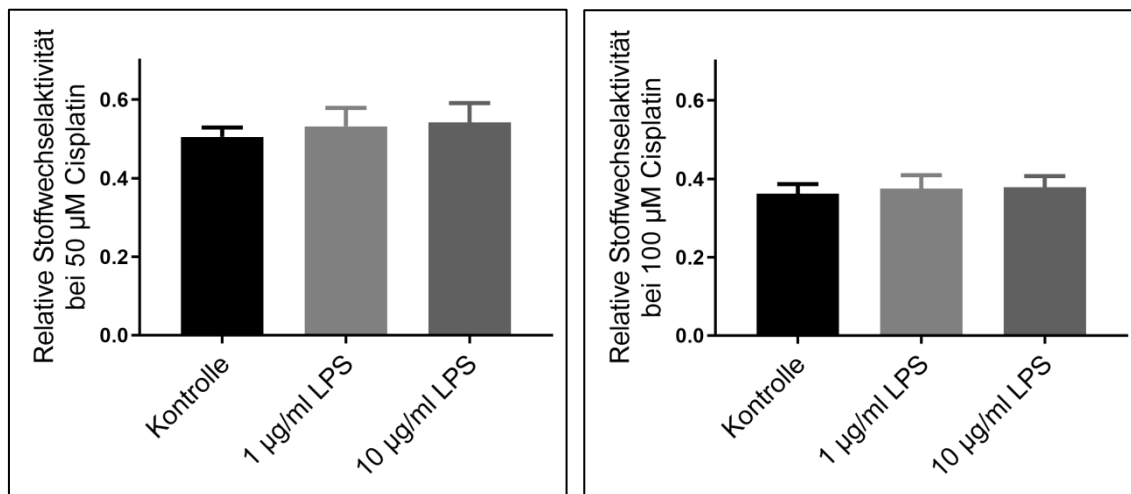


Abbildung 12 a-b: LPS hat keinen Einfluss auf die relative Stoffwechselaktivität der Zelllinie A549 unter 24 stündiger Cisplatin-Behandlung. Messung durch MTS-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. Relative Stoffwechselaktivität a) bei 50 μM Cisplatin und b) bei 100 μM Cisplatin.

Bei einer Behandlungszeit von 16 Stunden konnte ebenfalls ein kontinuierlicher Abfall der relativen Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden, hier wurde die Reduktion auf die Hälfte (51 %) allerdings erst bei der Behandlung mit 250 μM Cisplatin erreicht. Signifikante Unterschiede der Stoffwechselaktivität zwischen den einzelnen LPS-Gruppen ergaben sich auch hier entsprechend der 24 stündigen Cisplatin-Inkubation nicht. Bei der kurzen Behandlungszeit mit Cisplatin für acht Stunden konnte in der Kontrollgruppe kein eindeutiger Effekt auf die Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden. Daher wurden hier nur die 24-Stunden-Werte dargestellt.

Orientierende Versuche an einer zweiten Adenokarzinomzelllinie (H1975) konnten ebenfalls keinen Effekt von LPS auf die Cisplatinsensibilität zeigen.

III.4 LPS führt zu einer Zunahme des relativen Überlebens der Zelllinie A549 unter Bestrahlung

Zur Untersuchung einer möglichen Änderung der Strahlensensibilität der Zelllinie A549 unter LPS wurden weitere Koloniebildungstests durchgeführt. Abbildung 13 zeigt das relative Überleben halblogarithmisch aufgetragen für die Kontrollgruppe und für die Gruppe unter 10 µg/ml LPS in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis (0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 Gy). Wie zu erwarten, war dabei ein starker Abfall des Überlebens mit steigender Strahlendosis zu verzeichnen. Die Reduktion des Überlebens auf weniger als die Hälfte (40 %) wurde bereits bei 2 Gy erreicht. Zudem zeigte sich unter der Behandlung mit 10 µg/ml LPS insbesondere für die höheren Strahlendosen eine Steigerung des Überlebens im Vergleich zur Kontrollgruppe.

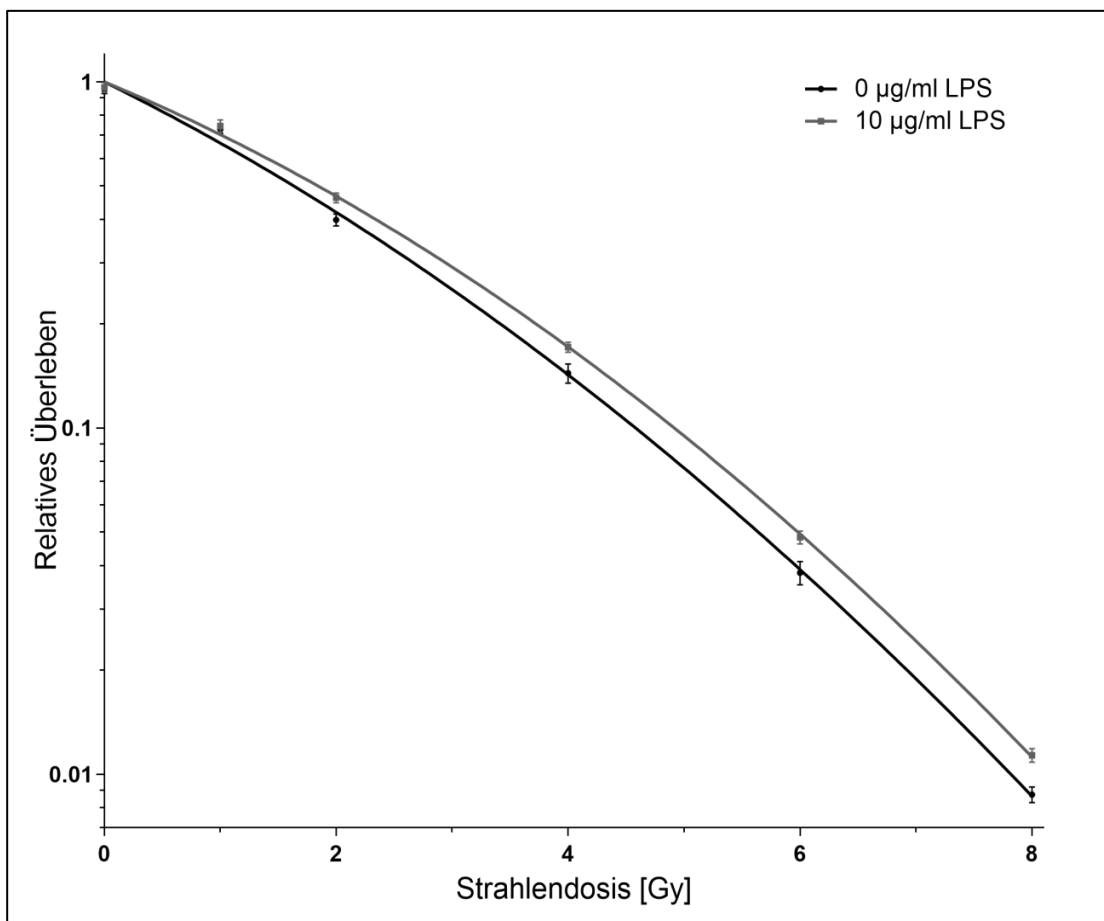


Abbildung 13: Relatives Überleben der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS und Bestrahlung. Messung durch Koloniebildungstest. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$.

Die Steigerung des relativen Überlebens nach Stimulation mit 10 µg/ml LPS erwies sich bei den Strahlendosen von 2, 4, 6 und 8 Gy als signifikant (Abb. 14 a-d). Dabei war unter 2 Gy eine Steigerung des relativen Überlebens von 0,4 auf 0,46, bei 4 Gy eine Überlebenssteigerung von 0,14 auf 0,17 bei 6 Gy eine Überlebenssteigerung von 0,038 auf 0,048 sowie bei 8 Gy eine Überlebenssteigerung von 0,0087 auf 0,011 nachweisbar. Die LPS-Behandlung führte bei der Bestrahlung mit 1 Gy hingegen zu keiner signifikanten Zunahme des klonogenen Überlebens.

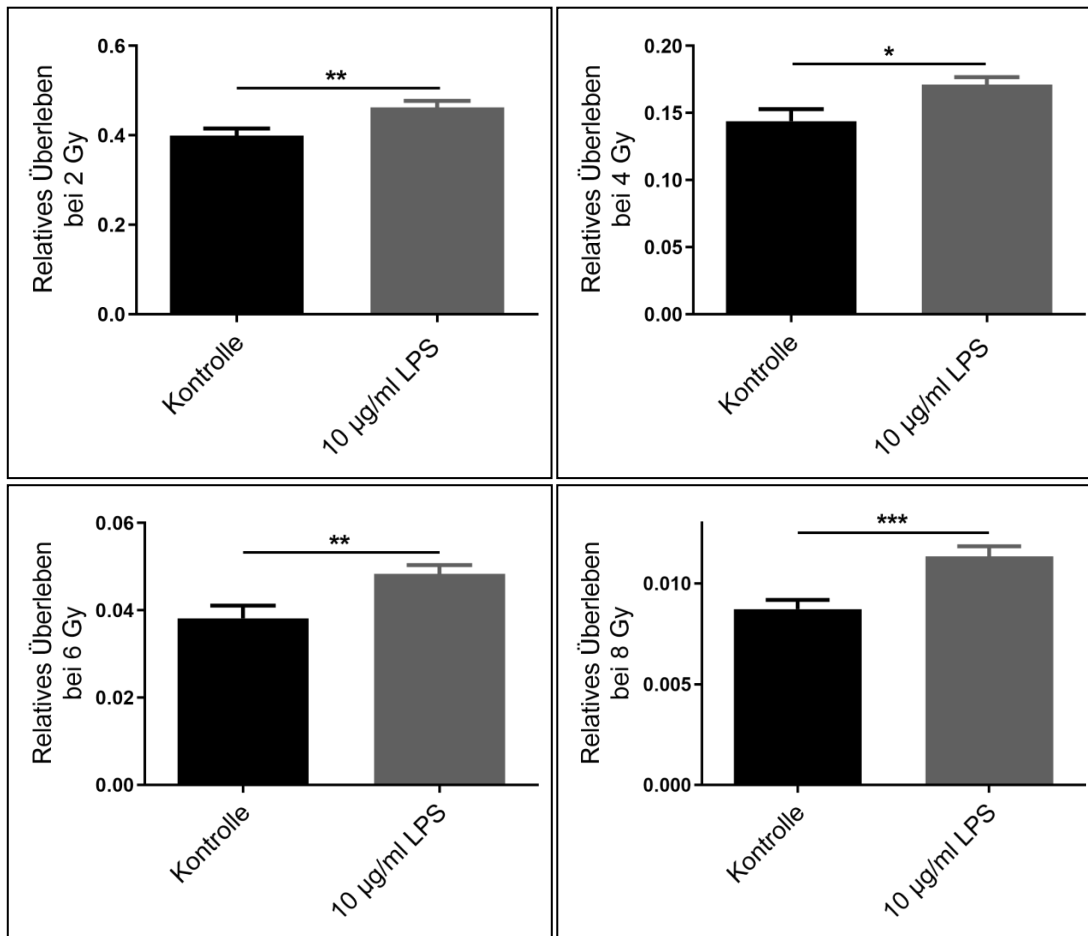


Abbildung 14 a-d: LPS führt zu einer Steigerung des relativen Überlebens der Zelllinie A549 unter Bestrahlung. Messung durch Koloniebildungstest. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$. Die Werte wurden mittels unabhängigem t-Test getestet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Relatives Überleben a) bei 2 Gy, b) bei 4 Gy, c) bei 6 Gy und d) bei 8 Gy.

III.5 Phosphorylierungslevel verschiedener Proteine und Kinasen der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition und Bestrahlung

Zur weiteren Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen der LPS-induzierten Strahlenresistenz der Zelllinie A549 wurde ein humaner Phospho-Kinase Array durchgeführt. Dafür wurden die Proteinproben nicht bestrahlter und mit 6 Gray bestrahlter Zellen, die jeweils LPS-naiv und mit 10 µg/ml LPS behandelt waren, 24 Stunden nach der Bestrahlung gewonnen und später untersucht. Abbildung 15 a und 15 b zeigen die relativen Phosphorylierungslevel der einzelnen Proteine und Kinasen jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe.

Gesucht wurde dabei nach Zielproteinen, welche unter LPS und insbesondere unter der Kombination von LPS und Bestrahlung gesteigerte Phosphorylierungslevel aufwiesen ohne zugleich eine Zunahme der Phosphorylierung unter alleiniger Bestrahlung zu zeigen.

Ein solcher Anstieg war tendenziell (> 10 %) bei beta-Caterin, Chk-2, ERK1/2, GSK-3 α/β, JNK1/2/3, Lck, MSK1/2, p38α, p53 (S15), p53 (S392), PDGF Rβ, STAT5b sowie STAT6 sichtbar. Für einen Großteil dieser Proteine und Kinasen fiel die Steigerung des Phosphorylierungslevels sehr gering aus, zudem zeigte sich bei beta-Caterin, Chk-2, GSK-3 α/β, MSK1/2, p38 α, p53 (S15), p53 (S392), PDGF Rβ und STAT5b bereits eine Zunahme des Phosphorylierungslevels (> 10 %) bei alleiniger Bestrahlung. Für ERK1/2, JNK1/2/3, Lck und STAT6 war diese hingegen nicht bedeutend nachweisbar.

Die Extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2 zeigten nach alleiniger Bestrahlung eine Abnahme des relativen Phosphorylierungslevels an T202/Y204 und T185/Y187 um 10 %. Eine alleinige LPS-Behandlung führte zu einer Verdopplung des relativen Phosphorylierungslevels. Die Kombination von Bestrahlung und LPS bewirkte einen deutlichen Anstieg des Phosphorylierungslevels von ERK1/2 um 85 % (Abb. 15 a).

Bei den c-Jun N-terminal kinases (JNK)1/2/3 war unter Bestrahlung eine Reduktion des relativen Phosphorylierungslevels an T183/Y185 und T331/Y223 um 5 % zu beobachten. Die LPS-Behandlung und die Kombinationsbehandlung steigerten den relativen Phosphorylierungslevel um 15 % beziehungsweise 85 % (Abb. 15 a).

Die Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck) zeigte unter Bestrahlung eine geringe Zunahme des Phosphorylierungslevels an Y394 um 5 %. Die alleinige LPS-Behandlung führte zu einer Verringerung des relativen Phosphorylierungslevels um

10 %. Die Kombinationsbehandlung hingegen korrelierte mit einer Steigerung des Phosphorylierungslevels um 40 % (Abb. 15 a).

Bei der Kinase Signal transducer and activator of transcription (STAT)6 bewirkte die alleinige Bestrahlung eine Abnahme des Phosphorylierungslevels an Y641 um 15 %, während die LPS- beziehungsweise die Kombinationsbehandlung mit einer Zunahme um 15 % beziehungsweise 35 % einhergingen (Abb. 15 b).

Somit waren ERK1/2 die Zielproteine, welche sich zum einen als durch LPS regulierbar erwiesen und zum anderen eine der deutlichsten Steigerungen des relativen Phosphorylierungslevels unter der Kombination von LPS und Bestrahlung aufwiesen. Dieses Phosphorylierungsverhalten von ERK1/2 konnte unter den genannten Bedingungen mittels Western Blot reproduziert werden (siehe III.6 Abb. 19). Unter Berücksichtigung entsprechender Literatur (siehe IV.4) und der beschriebenen Ergebnisse wurde die Rolle von ERK1/2 im Rahmen der LPS-induzierten Strahlenresistenz im Folgenden mit dem Ziel einer pharmakologischen Intervention näher charakterisiert.

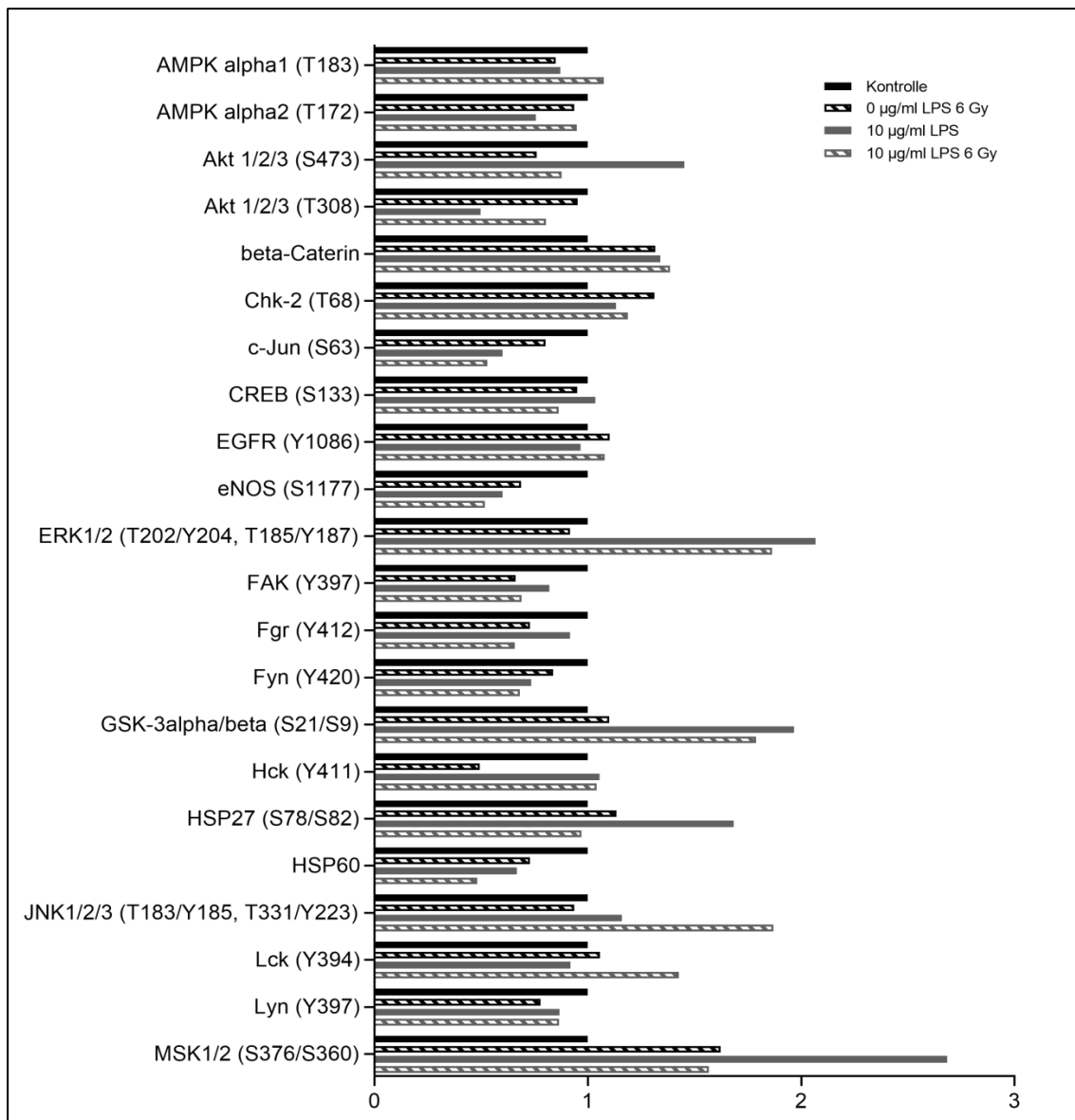


Abbildung 15 a: Quantitative Analyse der Phosphorylierungslevel von Proteinen und Kinasen (A-M) der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS und Bestrahlung. Messung durch humanen Phospho-Kinase Array.

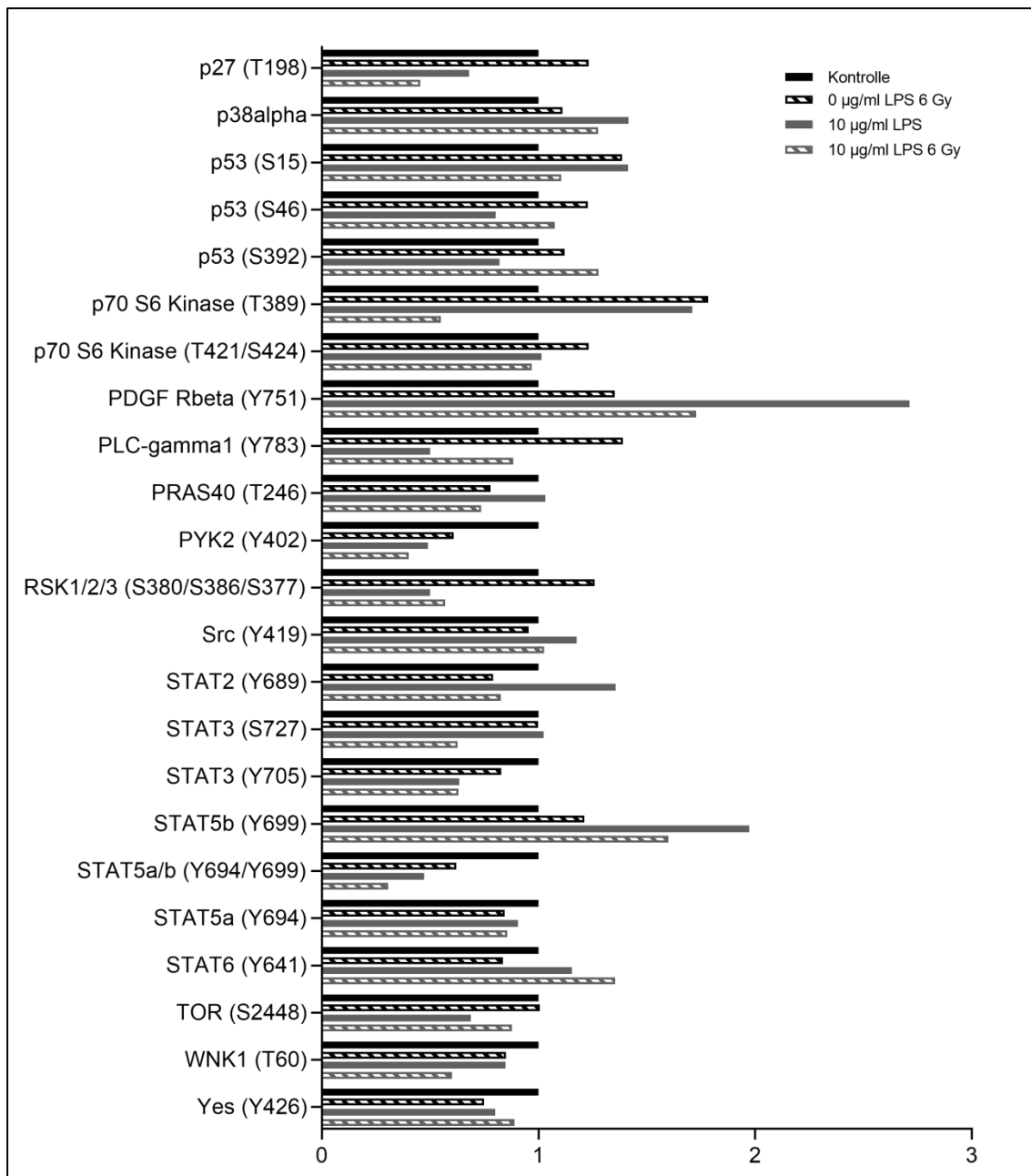


Abbildung 15 b: Quantitative Analyse der Phosphorylierungslevel von Proteinen und Kinasen (P-Y) der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS und Bestrahlung. Messung durch humanen Phospho-Kinase Array.

III.6 Die Inhibition von ERK führt zu einer Wiederherstellung der Strahlensensibilität der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition

Zur Überprüfung der Bedeutung der Extracellular signal-regulated kinases (ERK)1/2 für die beobachtete, LPS-induzierte Strahlenresistenz der Zelllinie A549 wurden nochmals Koloniebildungstests unter LPS und Bestrahlung durchgeführt, diesmal jedoch kombiniert mit dem spezifischen, gegen ERK1/2 gerichteten Inhibitor SCH772984.

Um die LPS-spezifische und potentiell über eine zunehmende Phosphorylierung von ERK1/2 vermittelte Steigerung des klonogenen Überlebens gezielt inhibieren zu können, musste eine Konzentration von SCH772984 gefunden werden, die per se keinen Einfluss auf das klonogene Überleben hatte. In der zunächst durchgeführten Konzentrationsreihe (Abb. 16) ließ sich feststellen, dass der Inhibitor alleine bei nahezu allen eingesetzten Konzentrationen das klonogene Überleben negativ beeinflusste. Einzig bei der Konzentration von 0,25 μM SCH772984 wurde die Überlebensrate verglichen zur unbehandelten Kontrolle nicht eingeschränkt, während sich bei den höheren Konzentrationen des Inhibitors eine deutliche Reduktion des Überlebens zeigte.

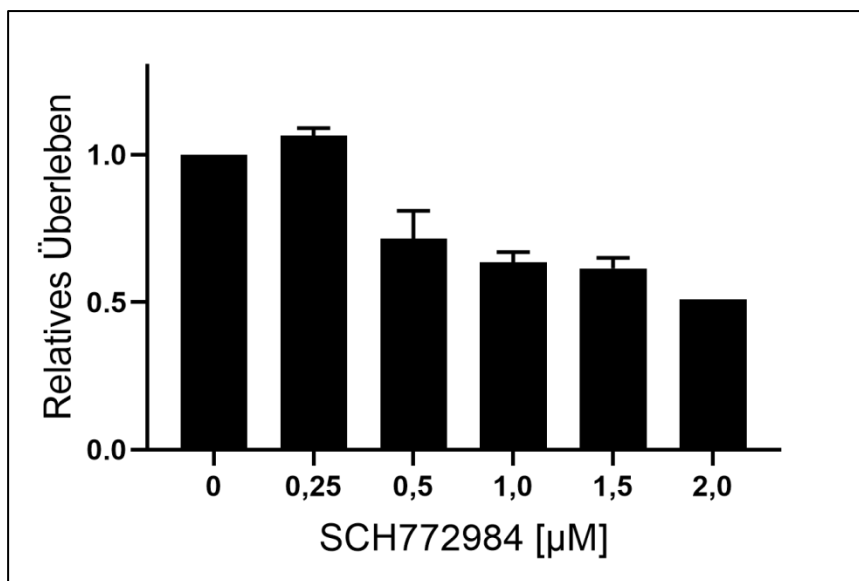


Abbildung 16: Relatives Überleben der Zelllinie A549 unter Exposition mit SCH772984 in steigender Konzentration. Messung durch Koloniebildungstest. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n = 2$.

In den anschließend durchgeführten Koloniebildungstests unter LPS und Bestrahlung kombiniert mit dem spezifischen, gegen ERK1/2 gerichteten Inhibitor SCH772984 wurde dieser daher in einer Konzentration von 0,25 μM eingesetzt.

Abbildung 17 zeigt das relative Überleben halblogarithmisch aufgetragen in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis (0 - 1 - 2 - 4 - 6 - 8 Gy) für die Kontrollgruppe und für die Gruppe unter 10 µg/ml LPS jeweils mit und ohne Einsatz des Inhibitors. Die alleinige Behandlung der Zellen mit 0,25 µM SCH772984 reduzierte hier auch kombiniert mit der Bestrahlung das Überleben gegenüber der Kontrolle nicht. Unter der Behandlung mit 10 µg/ml LPS konnte bei den Strahlendosen 4, 6 und 8 Gy erneut eine signifikante Steigerung des Überlebens im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Dabei konnte unter 4 Gy eine Steigerung des relativen Überlebens von 0,13 auf 0,17, bei 6 Gy eine Überlebenssteigerung von 0,041 auf 0,053 sowie bei 8 Gy eine Überlebenssteigerung von 0,011 auf 0,016 beobachtet werden. In Kombination mit dem Inhibitor war dieser Effekt hingegen bei keiner der verwendeten Strahlendosen unter LPS-Stimulation mehr nachweisbar.

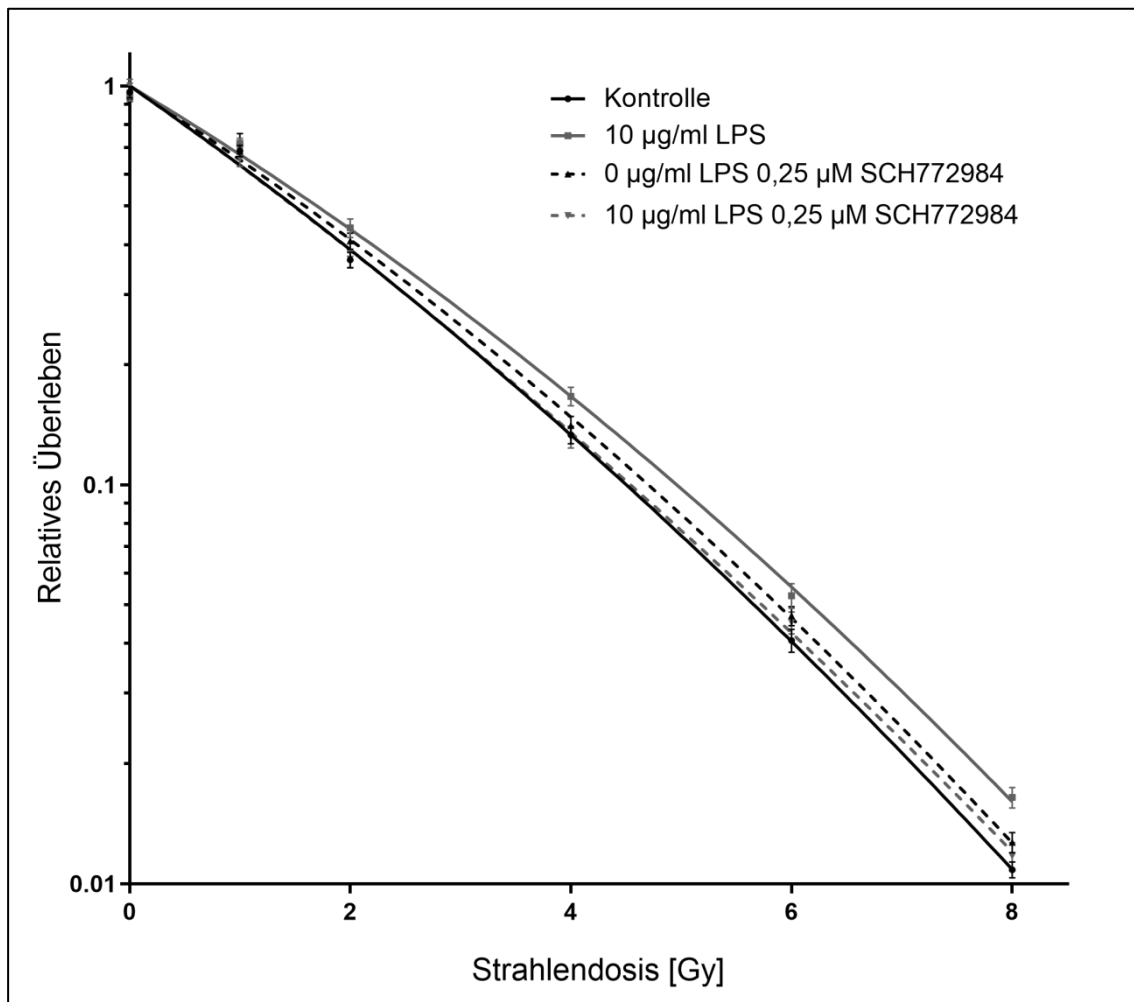


Abbildung 17: Relatives Überleben der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS, mit SCH772984 und Bestrahlung. Messung durch Koloniebildungstest. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$.

Abbildung 18 a und b zeigen das relative Überleben bei den Strahlendosen von 4 und 8 Gy, bei denen die LPS-vermittelte Überlebenssteigerung am deutlichsten ausgeprägt war. Während unter 10 µg/ml LPS das Überleben gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigert war, unterschied sich das Überleben beim zusätzlichen Einsatz des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 zur LPS-Exposition nicht von dem der Kontrollgruppe, jedoch wiederum signifikant von dem der mit 10 µg/ml LPS behandelten Gruppe.

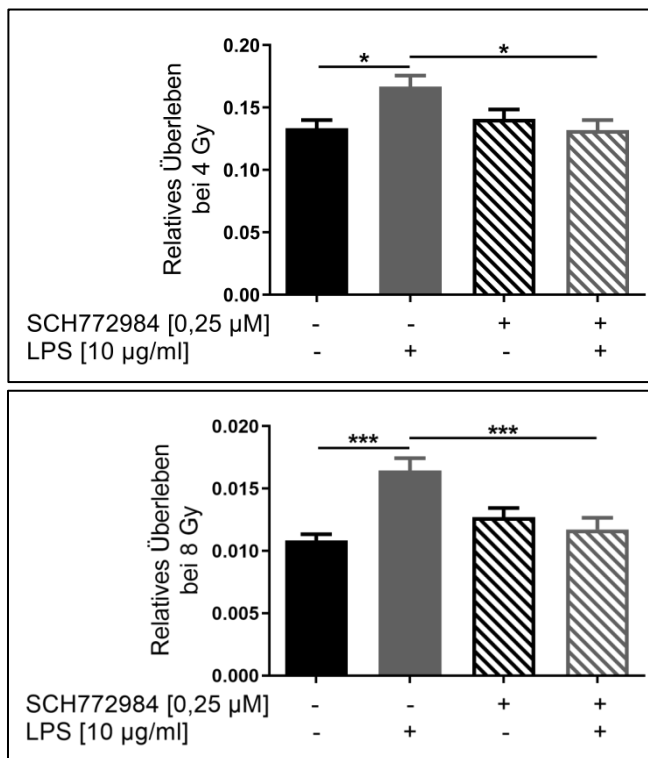


Abbildung 18 a-b: Die Inhibition von ERK1/2 führt zur Wiederherstellung der Strahlensensibilität der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition. Messung durch Koloniebildungstest. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$. Relatives Überleben a) bei 4 Gy, b) bei 8 Gy.

Mittels Western Blot wurde das Phosphorylierungsverhalten von ERK1/2 der Zelllinie A549 unter Inkubation mit LPS und Bestrahlung sowie unter Einsatz des Inhibitors SCH772984 ergänzend untersucht. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Florentine Subtil des strahlenbiologischen Labors der Klinik für Strahlentherapie im UKGM Standort Marburg durchgeführt.

Hierbei konnten wie in III.5 bereits erwähnt zum einen die Ergebnisse des humanen Phospho-Kinase Arrays validiert werden, da eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 nach kombinierter Inkubation mit LPS und Bestrahlung der Zellen reproduziert werden konnte.

Zum anderen war dieser Effekt in Gegenwart des spezifischen Inhibitors SCH772984 in der verwendeten Konzentration von 0,25 µM nicht mehr zu beobachten, so dass die

vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 unter kombinierter Behandlung mit LPS und Bestrahlung bei gleichzeitigem Einsatz des Inhibitors ausblieb.

So zeigt Abbildung 19 anhand eines repräsentativen Western Blots eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung von ERK1/2 in der mit LPS behandelten und zugleich bestrahlten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die bei zusätzlichem Einsatz des ERK1/2-Inhibitors SCH772984 nicht mehr nachweisbar war.

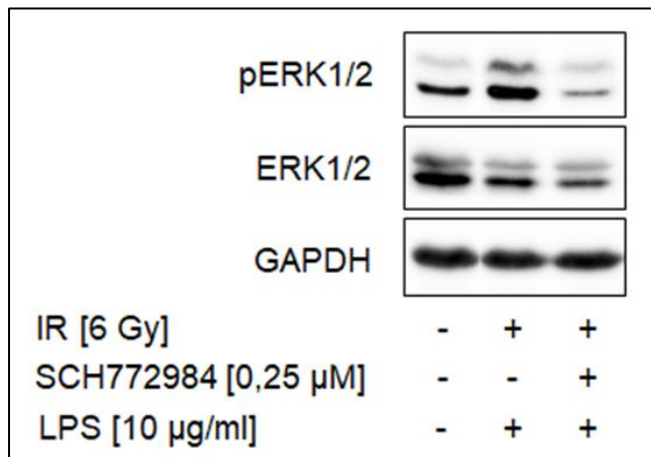


Abbildung 19:
Phosphorylierungsverhalten
von ERK1/2 der Zelllinie A549
unter Exposition mit LPS, mit
SCH772984 und Bestrahlung.
Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von ERK1/2 und pERK1/2. GAPDH wurde als Ladekontrolle mitgeführt. n = 2.

III.7 IL-8-Synthese der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition, Radiotherapie und Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984

Aufgrund der bedeutenden Rolle von IL-6 und IL-8 im Rahmen des LPS-TLR4-Signalings wurden die Überstände der Zellen, die analog zu den Koloniebildungstests unter Radiotherapie sowie unter Radiotherapie kombiniert mit der Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 gewonnen wurden, mittels ELISA auf die entsprechenden Interleukine hin untersucht. Während die basalen Level für IL-6 die Nachweisgrenze mehrfach nicht erreichten und die Messungen somit nicht verwertbar waren, lagen die basalen Level für IL-8 bei 45,8 +/- 5,1 pg/ml. Die gemessenen Interleukin-Konzentrationen wurden mit der Proteinkonzentration der jeweiligen Probe verrechnet, um Schwankungen der Anzahl der jeweils vorhandenen, IL-8-produzierenden Zellen auszugleichen.

Abbildung 20 zeigt die relative IL-8-Konzentration normiert anhand der Proteinkonzentration und bezogen auf die LPS-naive, nicht bestrahlte Kontrolle.

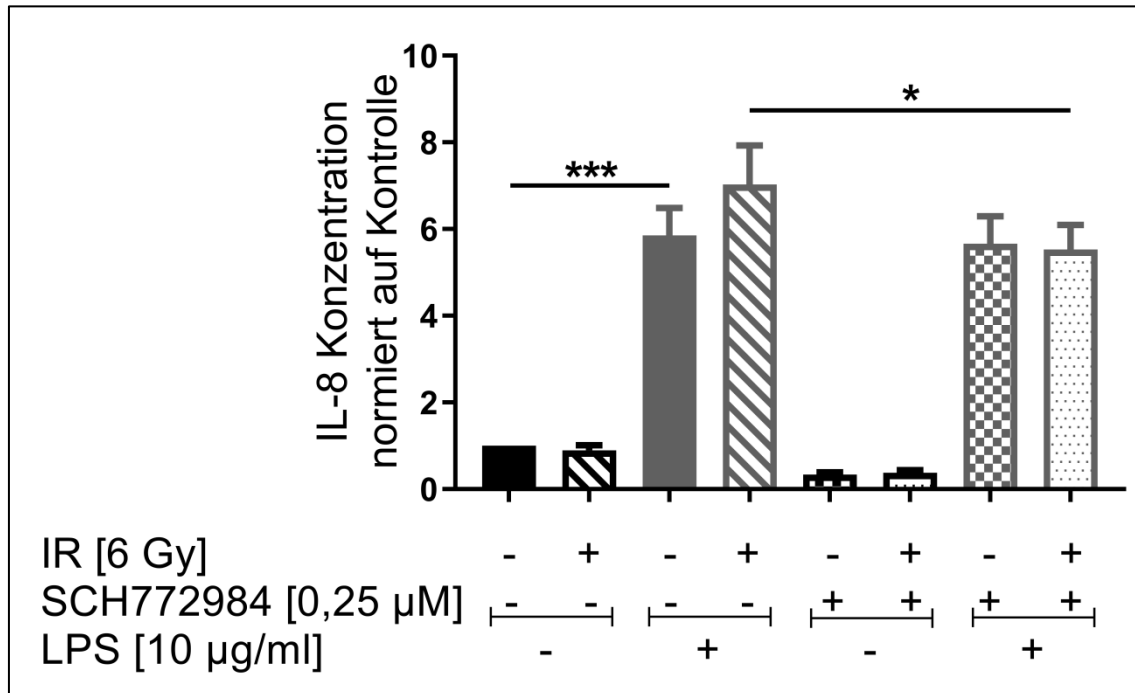


Abbildung 20: Relative IL-8-Konzentration der Überstände der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS, mit SCH772984 und Bestrahlung. Messung durch Sandwich-ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte, Streuung der Werte dargestellt als SEM; $n \geq 3$. Die Werte wurden mittels ANOVA gefolgt von einem Bonferroni's Multiple Comparison Test getestet. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$.

Es war jeweils ein deutlicher Anstieg der IL-8-Freisetzung unter LPS im Vergleich zu den LPS-naiven Gruppen zu verzeichnen. Die höchste IL-8-Konzentration wurde dabei in der Gruppe der mit 6 Gy bestrahlten und LPS-behandelten Zellen gemessen. Beim zusätzlichen Einsatz des Inhibitors hingegen, nahm die IL-8-Synthese der bestrahlten und LPS-behandelten Zellen wiederum signifikant ab.

IV Diskussion

Ziel dieser Arbeit war anhand von in vitro durchgeführten Experimenten zu untersuchen, ob das Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* als bakterieller Pathogenitätsfaktor einen Einfluss auf die Sensibilität der NSCLC-Zelllinie A549 gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin oder einer Bestrahlung hat. Die klinische Relevanz dieser Fragestellung besteht darin, dass pulmonale Infektionen mit gramnegativen Bakterien, die bei Patienten mit Lungenkarzinom gehäuft vorkommen (Berghmans et al. 2003; Sarihan et al. 2005), das Überleben der Betroffenen reduzieren können (Nagy et al. 2019, Perlin et al. 1990). Fraglich ist, ob die Induktion einer Resistenz gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung für diesen Effekt mit verantwortlich sein könnte. Weiterhin wurde untersucht, welche Signalwege hinter der LPS-induzierten Strahlenresistenz stehen könnten und ob die Synthese der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 dabei eine Rolle spielt.

IV.1 LPS-Effekt auf die Zelllinie A549 im Koloniebildungstest

Zwar konnte in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar gezeigt werden, dass eine Behandlung mit LPS in der Zelllinie A549 die Proliferation stimuliert (Hattar et al. 2013), jedoch konnte in den darauf folgenden Arbeiten keine Auswirkung der LPS-Behandlung auf das klonogene Überleben verschiedener NSCLC-Zelllinien im Koloniebildungstest nachgewiesen werden. So führte die alleinige LPS-Inkubation weder zu einer signifikanten Änderung der Anzahl noch der Größe der Kolonien (Gökyildirim et al. 2018). Im Einklang mit diesen Ergebnissen war auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit kein Einfluss einer Behandlung mit LPS in verschiedenen Konzentrationen (0,1, 1 und 10 µg/ml) auf das klonogene Überleben der Zelllinie A549 zu beobachten. Dies steht jedoch in keinem Widerspruch zu den erhobenen Daten zum proproliferativen Effekt von Endotoxin, da eine kurz- bis mittelfristige Änderung des Proliferationsverhaltens, die in Tierversuchen über zehn Tage beobachtet werden konnte, sich nicht zwangsläufig in einer Änderung der Klonogenität niederschlagen muss.

Die Klonogenität ist definiert als das Vermögen einer einzelnen Zelle, eine Kolonie bestehend aus mindestens 50 Tochterzellen zu generieren. Diese Definition beinhaltet dementsprechend die Voraussetzung, dass eine klonogene Zelle mindestens sechs Zellteilungen durchlaufen kann. Die Klonogenität stellt auch eine Eigenschaft von

Krebsstammzellen dar, wobei diesen ein unbegrenztes Teilungspotential zugesprochen wird (Buick und Pollak 1984; Kummermehr 2001). Krebsstammzellen werden mit dem Wachstum, der Metastasierung und dem Rezidivieren von Malignomen nach Therapie in Verbindung gebracht (Kummermehr 2001). Auch wenn klonogene Zellen nicht gleichzusetzen sind mit Krebsstammzellen (Buick und Pollak 1984; Kummermehr 2001), konnten Malaise et al. an mehreren Tumorzelllinien unterschiedlicher Histologie zeigen, dass die Klonogenität in vitro mit der Stammzeleigenschaft in vivo korreliert (Malaise et al. 1986).

IV.2 LPS-Effekt auf die Cisplatinsensibilität der Zelllinie A549

Zunächst wurde die NSCLC-Zelllinie A549 hinsichtlich ihrer Cisplatinsensibilität charakterisiert. Eine 50 prozentige Reduktion der Stoffwechselaktivität im MTS-Assay beziehungsweise des klonogenen Überlebens im Koloniebildungstest wurde bei 24 stündiger Inkubation mit 50 μM beziehungsweise mit 1 μM Cisplatin erreicht. Diese deutlich voneinander abweichenden Werte sind durch die Unterschiede der beiden Methoden erklärbar. So sind die Zellen beim MTS-Assay eng benachbart, es bilden sich Zell-Zell-Kontakte aus und kurzfristige Effekte auf die Stoffwechselaktivität werden erhoben, während die Zellen beim Koloniebildungstest vereinzelt vorliegen und langfristige Effekte auf das klonogene Überleben, wie in IV.1 definiert, beobachtet werden. Entsprechend der hier erhobenen Ergebnisse gilt die NSCLC-Zelllinie A549 als vergleichsweise cisplatinresistent (Chen et al. 2019; Zhang et al. 2003). Auch im klinischen Alltag ist die Cisplatinsensibilität der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome in der Monotherapie mit Ansprechraten von unter 20 % eingeschränkt (Jassem 1999).

Der Effekt von LPS (1 und 10 $\mu\text{g/ml}$) auf die Cisplatinsensibilität der A549-Zellen wurde sowohl mittels der Quantifizierung des klonogenen Überlebens im Koloniebildungstest als auch mittels der relativen Stoffwechselaktivität im MTS-Assay untersucht. Hierbei konnte nicht gezeigt werden, dass LPS zu einer signifikanten Zunahme der relativen Stoffwechselaktivität nach einer 24 stündigen Behandlung mit Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 50, 100, 250 μM) im Vergleich zur nur mit Cisplatin behandelten Gruppe führt. Im Koloniebildungstest konnte unter LPS-Exposition ebenfalls keine signifikante Änderung des klonogenen Überlebens im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Behandlung mit verschiedenen Cisplatinkonzentrationen (0,25, 0,5, 1, 2 μM) für 24 Stunden festgestellt werden. Orientierende Versuche an der NSCLC-Zelllinie H1975 zeigten ebenfalls keine

Änderung der Cisplatinsempfindlichkeit nach einer Endotoxin-Behandlung. Dennoch existieren bei der theoretischen Betrachtung der durch den LPS-TLR4-Signalweg induzierten zellulären Vorgänge Anhaltspunkte für eine mögliche Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin unter dem Einfluss von Lipopolysaccharid. So stellten O'Byrne et al. fest, dass in cisplatinresistenten NSCLC-Zellen eine TNF-vermittelte, gesteigerte Expression proinflammatorischer Mediatoren wie der CCL-Chemokine zu verzeichnen war und dass vormals cisplatinempfindliche Zellen durch die Gabe rekombinanter CCL-Chemokine eine verminderte Ansprechbarkeit auf Cisplatin zeigten. Zudem konnte eine Sensibilisierung der resistenten Zellen gegenüber Cisplatin durch den Einsatz eines NF- κ B-Inhibitors erreicht werden (O'Byrne et al. 2016). Da LPS bekanntermaßen zu einer NF- κ B-Aktivierung führt (Lu et al. 2008; Takeda und Akira 2005), war in den hier durchgeführten Untersuchungen an A549-Zellen ebenfalls eine Resistenzentwicklung vermutet worden. Die abweichenden Resultate könnten unter anderem darauf beruhen, dass den Ergebnissen von O'Byrne andere Methoden mit dem Fokus auf Zellproliferation und -viabilität zugrunde lagen. Wang et al. stellten in den Ovarialkarzinomzelllinien SKOV-3 und CAOV-3, die sich im MTS-Assay als relativ cisplatinresistent erwiesen, eine im Vergleich zu cisplatinempfindlichen Zellen (A2780) erhöhte Expression von IL-8 fest. Sowohl die exogene Zugabe von IL-8 als auch die endogene Produktion von IL-8 konnten mit einer Cisplatinresistenz in Verbindung gebracht werden. IL-8 schien dabei direkten Einfluss auf die Genexpression von P-Glykoprotein (MDR-1), welches den Efflux verschiedener Chemotherapeutika aus der Zelle steigert und damit deren Akkumulation verhindert, sowie der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL und XIAP zu nehmen (Wang et al. 2011). Da LPS für eine Steigerung der IL-8 Expression sorgt (Guha und Mackmann 2001) und dies auch für A549-Zellen gezeigt werden konnte (Grandel et al. 2009), wurde vermutet, dass LPS in A549-Zellen über eine gesteigerte IL-8-Expression ebenfalls eine Resistenzbildung gegen Cisplatin induzieren könnte. Da Wang et al. Untersuchungen an Ovarialkarzinomzelllinien durchführten, ist die Übertragbarkeit auf NSCLC-Zelllinien jedoch verständlicherweise eingeschränkt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit kein Effekt von Lipopolysaccharid auf die Cisplatinsempfindlichkeit der A549-Zellen beobachtet werden. Die vermutete Resistenzinduktion konnte weder mittels Koloniebildungstest noch mittels MTS-Assay nachgewiesen werden. Daher wurde an dieser Stelle auf weiterführende Untersuchungen verzichtet.

IV.3 LPS-Effekt auf die Strahlensensibilität der Zelllinie A549

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt von LPS (10 µg/ml) auf die Strahlensensibilität der A549-Zellen mittels der Quantifizierung des klonogenen Überlebens im Koloniebildungstest untersucht. Auf die Durchführung von MTS-Assays wurde hier verzichtet, da sich diese Methode in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich der Quantifizierung der Bestrahlungseffekte als ungeeignet erwiesen hatte (Schütz 2020).

In den hier durchgeführten Koloniebildungstests wurde eine Reduktion des klonogenen Überlebens der Zelllinie A549 um mehr als die Hälfte bereits bei einer Strahlendosis von 2 Gy erreicht. Es konnte gezeigt werden, dass LPS zu einer signifikanten Zunahme des klonogenen Überlebens der A549-Zellen bei der Bestrahlung mit 2, 4, 6 und 8 Gray führt. Dies spricht für die Induktion einer Strahlenresistenz in A549-Zellen durch Lipopolysaccharid, da LPS alleine wie bereits beschrieben nicht zu einer Zunahme des klonogenen Überlebens führte. Dies steht im Einklang mit früheren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar, in denen die Induktion einer Strahlenresistenz durch LPS sowohl für die NSCLC-Zelllinien A549 und H1975 (Gökyildirim et al. 2018) als auch teilweise für die Zelllinien H23 und H226 (Schütz 2020) gezeigt werden konnte. Die Induktion der Strahlenresistenz in A549-Zellen war in früheren Publikationen bei höheren LPS-Konzentrationen tendenziell stärker ausgeprägt (Gökyildirim et al. 2018), so dass in der vorliegenden Arbeit lediglich die Konzentration von 10 µg/ml LPS eingesetzt wurde. Zu den genannten Ergebnissen liegen jedoch auch widersprüchliche Daten vor. So konnten Kim et al. eine Resistenzentwicklung nach der Exposition der Zellen mit 100 ng/ml LPS für 24 Stunden und anschließender Bestrahlung zwar für die NSCLC-Zelllinie NCI-H460, jedoch nicht für A549 beobachten (Kim et al. 2015). Da Kim et al. eine hundertfach geringere LPS-Konzentration (0,1 µg/ml vs. 10 µg/ml) für eine wesentlich kürzere Expositionszeit (24 h vs. 9 d) einsetzten als in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, könnte die abweichende Methodik Ursache der konträren Ergebnisse sein.

Dass bakterielle Pathogenitätsfaktoren wie Lipopolysaccharide einen Überlebensvorteil unter ionisierender Strahlung darstellen können, wurde bereits vor Jahrzehnten in verschiedenen Tiermodellen beobachtet (Ainsworth et al. 1959; Neta et al. 1991; Smith et al. 1957). Liu et al. konnten zeigen, dass der radioprotektive Effekt von LPS dabei

abhängig von TLR4 ist. Zum einen zeigten TLR4-defiziente Mäuse bereits basal eine verstärkte Strahlensensibilität. Zum anderen führte die Injektion von LPS in TLR4 defizienten Mäusen nicht zu gesteigerten Überlebensraten, während bei den TLR4 exprimierenden Mäusen ein strahlenprotektiver Effekt nachgewiesen werden konnte (Liu et al. 2013). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass TLR4 im Gewebe von Lungenkarzinomen - insbesondere in Adenokarzinomen - stärker exprimiert wird als in gesundem Lungengewebe, wobei eine hohe Expression von TLR4 mit einer vermehrten Malignität der Karzinome korrelierte (Wang et al. 2017; Zhang et al. 2009). Auch die hier verwendeten A549-Zellen exprimieren bekanntermaßen TLR4 auf ihrer Oberfläche (MacRedmond et al. 2005). In vorangehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar konnte die Zelllinie A549 im Vergleich mit sieben anderen NSCLC-Zelllinien sogar als eine der am stärksten TLR4 exprimierenden Zelllinien identifiziert werden (Goekyildirim et al. 2018).

Zusammenfassend konnte hier erneut gezeigt werden, dass Lipopolysaccharid zu einer Strahlenresistenz in A549-Zellen führt. Auf der Basis dieses Ergebnisses sollten in einem weiteren Schritt potentielle LPS-induzierte Mechanismen, die der Strahlenresistenz in A549-Zellen zugrunde liegen könnten, untersucht werden.

IV.4 LPS-induzierte Mechanismen der Strahlenresistenz in der Zelllinie A549 mit dem Schwerpunkt der ERK1/2-Aktivierung und IL-8-Synthese

IV.4.1 ERK1/2-Aktivierung als Mediator der LPS-induzierten Strahlenresistenz

Um zu untersuchen, welche Mechanismen der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten LPS-induzierten Strahlenresistenz in A549-Zellen zugrunde liegen könnten, wurde ein humaner Phospho-Kinase Array durchgeführt. Dabei zeigten sich für den Großteil der untersuchten Proteine und Kinasen nur geringe Änderungen der Phosphorylierungslevel. Von besonderem Interesse waren die Zielproteine, welche unter LPS und insbesondere unter der Kombination von LPS und Bestrahlung gesteigerte Phosphorylierungslevel aufwiesen ohne zugleich eine Zunahme der Phosphorylierung unter alleiniger Bestrahlung zu zeigen.

Die Zielproteine, die zum einen das gesuchte Phosphorylierungsprofil erfüllten und zum anderen die deutlichste Regulation zeigten, waren die MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK1/2/3. Obwohl eine Aktivierung der MAP-Kinasen durch ionisierende Strahlung beschrieben ist (Dent et al. 2003), konnte eine Zunahme des Phosphorylierungslevels

hier unter alleiniger Bestrahlung unter den gegebenen Bedingungen an A549-Zellen mit einer Strahlendosis von 6 Gray weder für JNK1/2/3 noch für ERK1/2 nachgewiesen werden. Die alleinige LPS-Behandlung ergab nahezu eine Verdopplung des relativen Phosphorylierungslevels von ERK1/2. Dies konnte auch unter Kombination von Bestrahlung und LPS beobachtet werden und mittels Western Blot bestätigt werden. Dass LPS zu einer ERK1/2-Aktivierung in Monozyten führt, ist bereits mehrfach beschrieben worden (van der Bruggen et al. 1999; Guha und Mackmann 2001; Li et al. 2015). Eine LPS-abhängige Aktivierung von ERK1/2 konnte auch in Zelllinien verschiedener solider Tumore wie dem kolorektalen Karzinom und dem Mammakarzinom nachgewiesen werden (Lin et al. 2015; Liu et al. 2017; Park et al. 2015). Dies konnte zudem analog zu den hier vorliegenden Ergebnissen ebenfalls für die NSCLC-Zelllinie A549 gezeigt werden (Jiang et al. 2019; Kang et al. 2020).

Da ERK1/2 von allen untersuchten Proteinen und Kinasen die passendste und deutlichste Regulierung zeigten, die auch im Western Blot bestätigt werden konnte, sowie laut Literatur in enger Verbindung zu Tumorprogress und Therapieresistenz stehen (Munshi und Ramesh et al. 2013), entschieden wir uns deren funktionelle Rolle bei der Vermittlung der Strahlenresistenz mittels Inhibitionsversuchen zu überprüfen.

Im Rahmen der folgenden Versuche konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von ERK1/2 durch den *in vitro*, *in vivo* und in weiterentwickelter Form sogar in klinischen Studien eingesetzten spezifischen Inhibitor SCH772984 (Caiola et al. 2020; Jiang et al. 2019; Kim et al. 2016; Kopczynski et al. 2021; Moschos et al. 2018) zu einer Wiederherstellung der Strahlensensibilität in A549-Zellen führte. So konnte die LPS-induzierte Steigerung des klonogenen Überlebens unter Bestrahlung durch die Inhibition von ERK1/2 wieder annähernd auf das Überlebensniveau der Kontrollgruppe gesenkt werden.

Während SCH772984 in zellfreien Assays eine halbmaximale Hemmung (IC_{50}) der Aktivität von ERK1 beziehungsweise ERK2 bereits bei Konzentrationen von 4 nM beziehungsweise 1 nM erreicht (Morris et al. 2013), ist der Einsatz des Inhibitors in zellbasierten Systemen in einer 10- bis 1000-fach höheren Konzentration etabliert (Caiola et al. 2020; Chaikuad et al. 2014; Davis et al. 2019). Auch an der Zelllinie A549 konnte eine effektive Inhibition von ERK1/2 durch SCH772984 bei einer circa 100-fach erhöhten Konzentration gezeigt werden (Caiola et al. 2020). In der hier durchgeführten Konzentrationsreihe wurde der Inhibitor daher ebenfalls in bekanntermaßen wirksamen Konzentrationen von 0,25 μ M bis 2 μ M an unbehandelten Zellen eingesetzt, wobei sich

die niedrigste Konzentration dabei per se nicht negativ auf das klonogene Überleben auswirkte.

Auch an Zellen, die zusätzlich bestrahlt wurden, war keine Reduktion des Überlebens durch den Einsatz des Inhibitors in der genannten Konzentration feststellbar. Dies spricht dafür, dass der Inhibitor spezifisch durch das Eingreifen in die LPS-vermittelte Strahlenresistenz für eine Normalisierung der Strahlensensibilität der Zellen sorgt. Die Wirksamkeit des ERK-Inhibitors SCH772984 konnte unter diesen experimentellen Bedingungen in der gewählten Konzentration vom 0,25µM im Western Blot bestätigt werden. Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen konnten Tsolou et al. eine verstärkte Radiosensibilität der NSCLC-Zelllinien A549 und H1299 durch die direkte Inhibition von pERK nachweisen, die vor allem mit der folglich verminderten Aktivierung von NF-κB in Verbindung gebracht wurde (Tsolou et al. 2017). Affolter et al. konnten sowohl für eine Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie als auch für die NSCLC-Zelllinie A549 eine Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung durch den kombinierten Einsatz von Inhibitoren des MEK-ERK- und des PI3K-AKT-Signalweges zeigen. Für die Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie konnte dies ebenfalls bei alleiniger Behandlung mit einem MEK-Inhibitor nachgewiesen werden (Affolter et al. 2011; Affolter et al. 2013). Dies unterstützt ebenfalls die Ergebnisse dieser Arbeit. Die Involvierung des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs in die Mechanismen der Strahlenresistenz ist auch für andere Malignome beschrieben worden. Xie et al. beobachteten beim Einsatz von Selenadiazol-Derivaten in Kombination mit Bestrahlung in vitro eine verstärkte Radiosensibilität von Melanomzellen, die mit der Inaktivierung von ERK und AKT in Verbindung gebracht werden konnte (Xie et al. 2014). Huang et al. beschrieben eine durch Galectin-1 induzierte Radioresistenz von Zervixkarzinomzellen in vitro, die durch die andauernde Aktivierung von HRas und der HRas-abhängigen Signalmoleküle Raf-1 und ERK bedingt wurde (Huang et al. 2012). Choi et al. konnten durch die Inhibition von KRas in der Zelllinie A549 ebenfalls eine Sensibilisierung gegenüber ionisierender Strahlung erreichen (Choi et al. 2010). Da die Zelllinie A549 eine aktivierende Mutation für KRas aufweist (Valenzuela und Groffen 1986), liegt eine generell gesteigerte Aktivität des Ras-Raf-MEK-ERK-Signalwegs vor. Warum die alleinige Behandlung mit dem ERK1/2-Inhibitor in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nicht per se zu einer Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung führte, kann nicht abschließend geklärt werden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass sich die Inhibition von ERK1/2 besonders unter der durch LPS gesteigerten Aktivierung

auswirkte, während unabhängig von dieser LPS-vermittelten Aktivierung auch andere Mechanismen wie beispielsweise der PI3K-AKT-Signalweg zur intrinsischen Strahlenresistenz der Zelllinie A549 beitragen und die Inhibition von ERK1/2 auf dem basal aktivierten Niveau damit ausgleichen könnten. Diese Hypothese wird wiederum durch die Ergebnisse von Affolter et al. untermauert, bei denen erst die kombinierte Inhibition des MEK-ERK- und des PI3K-AKT-Signalwegs zu einer Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung führte, während die alleinige Inhibition von MEK dies nicht erreichen konnte (Affolter et al. 2013).

IV.4.2 Downstream von ERK1/2 liegende Signalkaskade

Über welche Mechanismen die LPS-induzierte, ERK-abhängige Strahlenresistenz erfolgen könnte, soll im Folgenden diskutiert werden. ERK1/2 nehmen Einfluss auf zahlreiche Substrate. Zum einen werden weitere Kinasen wie p90 Ribosomal S6 kinases (RSK) und Mitogen- and stress-activated protein kinases (MSK) phosphoryliert, die wiederum andere Substrate aktivieren. So kann MSK1/2 nach der Phosphorylierung durch ERK1/2 verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AFT1 und CREB aktivieren (Arthur 2008; Deak et al. 1998; Wiggin et al. 2002). Im hier durchgeführten Proteom Array konnte die Aktivierung von MSK1/2 durch LPS und die Kombinationsbehandlung nachgewiesen werden. Zudem ist eine Beteiligung von ERK1/2 an der Induktion der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das nicht-homologe End-zu-End-Joining (NHEJ) beschrieben worden. So konnten Kriegs et al. an NSCLC-Zelllinien zeigen, dass die Ausschaltung von ERK1/2 im Rahmen des EGFR-Signalwegs im gleichen Maße wie die Inhibition von EGFR selbst eine Abnahme der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Folge hat (Kriegs et al. 2010). Auch Wang et al. konnten unter anderem an A549-Zellen feststellen, dass die Inhibition von MEK als upstream Kinase von ERK zu einer Zunahme der Doppelstrangbrüche nach Radiotherapie und zu einer Sensibilisierung gegenüber Bestrahlung führt (Wang et al. 2011). Da residuale Doppelstrangbrüche hauptverantwortlich für die strahlenbiologische Wirkung sind (Münter und Weber 2017), könnte dies einen Aspekt in der LPS-induzierten, ERK-vermittelten Strahlenresistenz darstellen.

Zum anderen interagiert ERK1/2 selbst mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren verschiedener Familien, unter anderem mit CREB, der von unserer Arbeitsgruppe als essentiell für die LPS-induzierte Strahlentherapieresistenz in der NSCLC-Zelllinie

H1975 identifiziert werden konnte (Gökyildirim et al. 2018). Durch Phosphorylierung können Stabilität, Aktivität und DNA-Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden und so zur vermehrten Expression weiterer Transkriptionsfaktoren und verschiedener anderer Genprodukte führen (Turjanski et al. 2007; Yang et al. 2003). Als durch ERK1/2 induzierbare Genprodukte sind unter anderem VEGF, COX-2, IL-8 und PD-L1 beschrieben worden (Chi et al. 2016; Guo et al. 2020; Kang et al. 2020; Shi et al. 2014). Diese beeinflussen zum einen die Tumorzellen direkt, zum anderen jedoch auch die Tumorumgebung und die Interaktion der malignen Zellen mit dieser.

IV.4.3 Rolle ERK1/2-abhängiger Genprodukte bei der Strahlenresistenz – Fokus Interleukin-8

Zudem konnten bereits Einflüsse einiger durch ERK-induzierbarer Genprodukte auf die Strahlensensibilität von verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. So konnten Shi et al. durch die Inhibition des VEGF-VEGFR2-Signalwegs eine Sensibilisierung der Zelllinie A549 gegenüber Bestrahlung erreichen (Shi et al. 2013). Zhang et al. konnten durch den Einsatz von Celecoxib, einem selektiven COX-2-Inhibitor, die Wirkung ionisierender Strahlung auf A549-Zellen sowohl in vitro als auch in einem Mausmodell in vivo verstärken (Zhang et al. 2019).

Die Sekretion von IL-8 als wichtiges proinflammatorisches Interleukin des LPS-TLR4-Signalwegs und als durch ERK-induzierbares Genprodukt wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Erwartungsgemäß steigerten die Zellen ihre IL-8-Synthese unter LPS-Exposition, wie Grandel et al. bereits in einer dosis- und zeitabhängigen Weise für die Zelllinie A549 gezeigt haben (Grandel et al. 2009). In der Gruppe der LPS-behandelten und bestrahlten Zellen war dabei die maximale IL-8-Konzentration nachweisbar, während die zusätzliche Behandlung mit dem ERK-Inhibitor wiederum zu einer signifikanten Abnahme der IL-8-Synthese führte. Dies lässt vermuten, dass die LPS-induzierte IL-8-Sekretion zumindest teilweise von der Aktivierung von ERK1/2 abhängig und eventuell sogar an der Vermittlung der Radiotherapieresistenz beteiligt sein könnte.

He et al. hingegen beobachteten, dass die LPS-induzierte IL-8 Sekretion der Zelllinie A549 abhängig von der Aktivierung der Kinase p38 ist (He et al. 2007). Dies konnte hier nicht bestätigt werden, da das Phosphorylierungslevel der Kinase p38 im Gegensatz zu dem von ERK1/2 unter Endotoxin-Einfluss nicht zunahm, die IL-8 Sekretion jedoch

trotzdem gesteigert war. Auch Zhang et al. konnten die in Folge einer EGFR-Aktivierung gesteigerte IL-8 Expression in der NSCLC-Zelllinie SPC-A1 durch die Inhibition von ERK1/2 reduzieren (Zhang et al. 2012). Shi et al. konnten Entsprechendes ebenfalls für die NSCLC-Zelllinie A549 zeigen (Shi et al. 2014). Dies untermauert die vermutete Beteiligung von ERK1/2 an der IL-8-Sekretion. Dabei ist bereits bekannt, dass die IL-8-Expression durch verschiedenste Faktoren wie proinflammatorische Signale, chemischen Stress, Hypoxie, Steroidhormone und viele weitere Faktoren beeinflusst wird (Waugh und Wilson 2008). In Zusammenschau der Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten lässt sich daher eine Beteiligung von ERK1/2 an der Endotoxin-stimulierten Freisetzung von IL-8 aus den Lungenkarzinomzellen vermuten. Andererseits wurde ebenfalls eine Transaktivierung von EGFR durch das in Folge der LPS-Exposition verstärkt exprimierte Interleukin-8 beschrieben (Luppi et al. 2007).

Yuan et al. zeigten, dass IL-8 stärker in NSCLC-Zellen exprimiert wird als in vergleichbarem gesundem Lungengewebe. Zudem korrelierten hohe Expressionslevel von IL-8-mRNA mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, entfernten Lymphknotenmetastasen, früheren Rezidiven und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit (Yuan et al. 2000).

Inwieweit IL-8 in die die Strahlenresistenz vermittelnden Mechanismen involviert ist, konnte in dieser Arbeit noch nicht abschließend geklärt werden. Interessanterweise zeigen bislang unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Hattar jedoch, dass exogen zugefügtes IL-8 eine Radioresistenz der Zelllinie A549 zumindest im Niedrigdosisbereich bewirkt.

Qu et al. konnten dies anhand von Nasopharynxkarzinom-Zelllinien ebenfalls feststellen. So führte die Behandlung mit exogenem IL-8 zu einer Zunahme der Strahlenresistenz der untersuchten Zelllinien (Qu et al. 2015). Auch für Zelllinien anderer solider Tumore ist eine Beteiligung von IL-8 an der Strahlenresistenz bereits beschrieben worden (Efimova et al. 2009; Hua et al. 2019).

Um das Ausmaß der Beteiligung von IL-8 an der LPS-initiierten Radiotherapieresistenz der NSCLC-Zelllinie A549 zu überprüfen, ist zunächst die Durchführung von weiteren Experimenten in vitro erstrebenswert.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse des humanen Phospho-Kinase Arrays, des Western Blots sowie der pharmakologischen Inhibitionsversuche mit SCH772984 und die aus der Literatur bekannte strahlenprotektive Wirkung von ERK1/2 für eine entscheidende Rolle von ERK1/2 bei der LPS-induzierten Strahlenresistenz der NSCLC-Zelllinie A549. Es sind verschiedene Wege bekannt, über die ERK1/2 radioprotektiv wirken könnte. Wie die LPS-induzierte, ERK1/2-abhängige Strahlenresistenz in den hier untersuchten A549-Zellen vermittelt wird, kann im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht abschließend geklärt werden. Eine Aktivierung der IL-8-Synthese könnte kausal involviert sein.

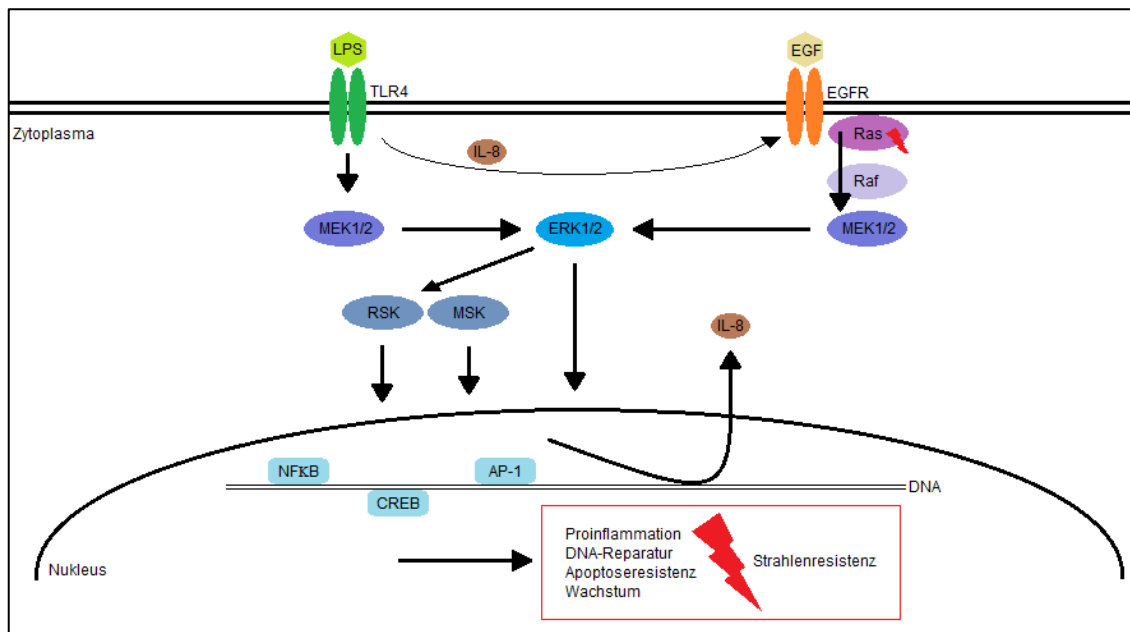


Abbildung 21: Mögliche Mechanismen der LPS-induzierten Strahlenresistenz – Rollen von pERK1/2 und IL-8

pERK1/2 führt zu einer Strahlenresistenz.

pERK1/2 bewirkt eine vermehrte Expression von Mediatoren wie IL-8, die Überleben, Wachstum, Angiogenese und Immunabwehr beeinflussen.

IL-8 kann zu einer Transaktivierung von EGFR führen, die wiederum eine Aktivierung von ERK1/2 zur Folge hat.

IV.5 Ausblick

Bekanntermaßen verschlechtern pulmonale Infektionen die Prognose von Lungenkarzinompatienten (Nagy et al. 2019; Perlin et al. 1990). Im Rahmen des hier zugrunde liegenden in vitro Modells mit A549-Zellen konnte eine LPS-induzierte Strahlenresistenz gezeigt werden. Somit ergibt sich die Annahme, dass die Induktion einer Strahlenresistenz mitverantwortlich für die Prognoseverschlechterung der NSCLC-Patienten durch pulmonale bakterielle Infektionen ist. Um diese zu verbessern, sind verschiedene Therapieansätze denkbar. Zum einen gilt es, Infektionen vorzubeugen und vorliegende Infektionen wenn möglich kausal durch den Einsatz von Antibiotika zu behandeln. Eine weitere Strategie wäre die folgende Inflammationsreaktion zu supprimieren. Durch den Einsatz von COX-Inhibitoren konnten bereits positive Effekte auf die Kontrolle der Proliferation und Strahlenresistenz von A549-Zellen in vitro und in vivo erzielt werden (Hattar et al. 2013; Zhang et al. 2019).

Zum anderen wäre eine Etablierung spezifischer Medikamente, die die zugrundeliegenden Mechanismen einer infekt- beziehungsweise inflammationsassoziierten Strahlenresistenz durchbrechen können, denkbar. Im Rahmen des hier zugrunde liegenden in vitro Strahlenmodells mit A549-Zellen konnte die Involvierung von ERK1/2 in die LPS-induzierte Strahlenresistenz gezeigt werden. Wie dieser Effekt im Detail vermittelt wird und inwieweit andere Signalwege beteiligt sind, bleibt an dieser Stelle offen. Insgesamt stellt die Strahlenresistenz ein komplexes Themengebiet dar. Zahlreiche Signalwege, die zum Großteil miteinander interagieren, konnten bereits mit einer Radioresistenz in Verbindung gebracht werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können dennoch erste Anhalte dafür geben, dass NSCLC-Patienten, die an pulmonalen bakteriellen Infektionen erkrankt sind, vom zusätzlichen Einsatz eines ERK1/2-Inhibitors zur Bestrahlung profitieren könnten. Dabei ist die Übertragung der Ergebnisse aus in vitro Arbeiten auf den menschlichen Organismus selbstverständlich eingeschränkt. Um die Relevanz dieser Ergebnisse für Lungenkarzinompatienten besser einschätzen zu können, wären in einem nächsten Schritt Experimente in vivo am Tiermodell hilfreich. Interessanterweise wird der Einsatz von ERK-Inhibitoren bei verschiedenen soliden Tumoren bereits in ersten klinischen Studien untersucht (Chin et al. 2019; Moschos et al. 2018). Untersuchungen zum kombinierten Einsatz von ERK-Inhibitoren und Radiotherapie sind dabei nach der hier zugrunde liegenden Recherche noch nicht initiiert worden. Generell problematisch

beim Einsatz dieser zielgerichteten Therapiestrategien sind sogenannte „back up Mechanismen“, die auf der Interaktion der verschiedenen involvierten Signalwege beruhen. Wird ein Signalweg blockiert, kommt es häufig zur vermehrten Aktivierung eines anderen Signalwegs oder zum Auftreten von Resistenzmutationen. Somit sind eine stetige Evaluierung der ausgewählten Therapiestrategie und gegebenenfalls der kombinierte Einsatz verschiedener Inhibitoren sinnvoll.

Zusammenfassend geben die vorliegenden Daten Hinweise, dass eine Kombination von Bestrahlung mit ERK1/2-Inhibitoren eine potentielle Behandlungsstrategie für NSCLC-Patienten darstellen könnte, die zusätzlich unter pulmonalen bakteriellen Infektionen leiden. Um die tatsächliche Relevanz der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse und Überlegungen für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei NSCLC-Patienten beurteilen zu können, sind zunächst weitere verifizierende Experimente in vivo notwendig.

V Zusammenfassung

Das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom stellt eine der häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland dar. Die Therapie erfolgt stadienabhängig. Eine chirurgische Resektion, eine cisplatinbasierte Chemo- und/oder Strahlentherapie sowie eine Immuntherapie sind hierbei etabliert. Pulmonale Infektionen mit gramnegativen Bakterien, die Lipopolysaccharide als wichtigen Pathogenitätsfaktor in der äußeren Membran enthalten, führen zu einem Überlebensnachteil der betroffenen Patienten. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern LPS die Ansprache der NSCLC-Zelllinie A549 in vitro auf das Chemotherapeutikum Cisplatin sowie auf Bestrahlung beeinflusst. Das relative Überleben unter Cisplatin wurde im Koloniebildungstest und im MTS-Assay untersucht, wobei die Behandlung mit LPS keinen Einfluss auf die Cisplatinempfindlichkeit der Zelllinie A549 zeigte. Das klonogene Überleben unter Bestrahlung wurde im Koloniebildungstest untersucht, wobei LPS zu einer Steigerung des klonogenen Überlebens und somit zu einer Strahlenresistenz der Zelllinie A549 führte. In einer Untersuchung der in die LPS-induzierte Strahlenresistenz involvierten Mechanismen durchgeführten humanen Phospho-Kinase Array nahm die Phosphorylierung von ERK1/2 unter LPS sowie unter LPS und Bestrahlung zu, was mittels Western Blot bestätigt werden konnte. Die funktionelle Rolle von ERK1/2 in der LPS-induzierten Strahlenresistenz konnte im Folgenden nachgewiesen werden, da der Überlebensvorteil der mit LPS-behandelten Zellen unter Bestrahlung im Koloniebildungstest durch die Inhibition von ERK1/2 wieder aufgehoben war. Die Wirksamkeit des Inhibitors konnte mittels Western Blot bestätigt werden. Das mittels ELISA quantifizierte proinflammatorische Interleukin-8 erwies sich dabei als durch LPS induzierbares Genprodukt, dessen vermehrte Synthese unter gleichzeitiger Bestrahlung eine partielle Abhängigkeit von ERK1/2 unterstellt werden konnte.

Zusammenfassend induzierte LPS in der NSCLC-Zelllinie A549 keine Cisplatinresistenz, jedoch eine Strahlenresistenz. Als mögliche involvierte Mechanismen wurden die gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 und eventuell die damit verbundene, vermehrte Synthese von IL-8 identifiziert. Die Inhibition von ERK1/2 führte zu einer Aufhebung der LPS-induzierten Strahlenresistenz. Somit könnte eine Kombination von Bestrahlung mit ERK1/2-Inhibitoren eine potentielle Behandlungsstrategie für Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom darstellen, die zusätzlich unter pulmonalen bakteriellen Infektionen leiden.

VI Summary

Non small cell lung cancer is one of the leading causes of cancer death in Germany. Choice of therapy depends on disease stage. Therapeutic options are surgery, cisplatin-based chemotherapy, immunotherapy and radiotherapy. A common complication of lung cancer is a pulmonary infection caused by Gram-negative bacteria. These infections impair prognosis of NSCLC patients. Bacterial lipopolysaccharides are the major outer surface membrane components and an important pathogenicity factor present in Gram-negative bacteria. The aim of this work was to investigate the effect of LPS on the response to chemotherapy and radiotherapy in vitro using the human adenocarcinoma cell line A549. In a first step cells were incubated with different concentrations of LPS and treated with cisplatin. Survival was determined by MTS assay and by clonogenic assay. No influence of LPS on survival and thereby on response to cisplatin became apparent. In a second step cells were incubated with LPS and treated with radiotherapy. To determine survival of irradiated cells clonogenic assay was performed. A549 cells exposed to LPS showed a significant decrease of response to radiotherapy. To investigate the mechanisms behind the LPS induced radiation resistance proteomic profiling array was performed. The LPS treatment and the combination treatment of LPS and irradiation showed an increased phosphorylation level of ERK1/2, which could be confirmed by immunoblotting. Functional role of ERK1/2 in LPS induced radiation resistance was determined by inhibition of ERK1/2 in clonogenic assay. Inhibition of ERK1/2 resulted in a normal response of A549 cells incubated with LPS to ionizing radiation. Efficacy of the currently used ERK1/2 inhibitor was proven by immunoblotting. IL-8 level measured by ELISA increased after LPS treatment, especially when combined with irradiation. Thereby a dependence on ERK1/2 activation became apparent.

In conclusion, while LPS had no effect on cisplatin response of A549 cells, LPS induced radiation resistance in A549 cells. The phosphorylation of ERK1/2 and the associated IL-8 synthesis were identified as possible mechanisms involved in LPS induced radiation resistance. Inhibition of ERK1/2 could restore radiosensitivity in A549 cells that had been exposed to LPS. Thus, a combination of radiation with ERK1/2 inhibitors could represent a potential treatment strategy for patients with non-small cell lung cancer who also suffer from pulmonary bacterial infections.

VII Abkürzungsverzeichnis

AKT:	Proteinkinase B
ALK:	Anaplastische Lymphomkinase
AP-1:	Aktivator-Protein-1
ATCC:	American Type Culture Collection
ATF:	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATPasen:	Adenosintriphosphatasen
BCA:	Bicinchoninsäure
Bcl-2:	B-cell lymphoma-2
Bcl-xL:	Bcl-2-Like Protein 1
BSA:	Bovines Serumalbumin
CD:	Cluster of differentiation
Chk-2:	Checkpoint kinase 2
COX:	Cyclooxygenase
CpG:	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
CREB:	cAMP response element-binding protein
CT:	Computertomografie
Ctr1:	Cooper Transporter 1
CXCR:	CXC chemokine receptor
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DPBS:	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DYRK1B:	Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 1B
eNOS:	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EGF:	Epidermal growth factor
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EML4-ALK:	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase
ERCC:	Excision repair cross-complementing
ERK:	Extracellular-signal-regulated kinase
FAK:	Focal adhesion kinase
FCS:	Fetal calf serum
FDG-PET/CT:	Fluordesoxyglucose-Positronenemissionstomografie/Computertomografie
Fgr:	Tyrosine-protein Kinase Fgr
Fyn:	Tyrosine-protein Kinase Fyn
GlcN:	Glucosamin
GSK-3 α/β	Glycogen synthase kinase 3
Hck:	Tyrosine-protein Kinase Hck
Hep:	Heptosen
HR:	Homologe Rekombination
HRas:	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
HRP:	Horseradish peroxidase

HSP:	Heat Shock Protein
IASLC:	International Association for the Study of Lung Cancer
IL:	Interleukin
IRF-3:	Interferon regulatory factor-3
JAK:	Januskinase
JNK:	c-Jun-N-terminale Kinase
Kdo:	2-Keto-3-desoxy-octonsäure
KRas:	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
LBP:	LPS-Bindeprotein
Lck:	Tyrosine-protein Kinase Lck
LET:	Linearer Energietransfer
LPS:	Lipopolysaccharid
Lyn:	Tyrosine-protein Kinase Lyn
MAB:	Monoclonal Antibody
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK:	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK:	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MD-2:	Myeloid differentiation factor-2
MDR-1:	Multidrug-Resistance-Protein 1 (P-Glykoprotein)
MEK:	MAPK-Kinase/ERK-Kinase
MIRK:	Minibrain-related kinase
MKK:	MAPK-Kinase-Kinase
MMR:	Mismatch repair
mRNA:	Messenger Ribonukleinsäure
MRT:	Magnetresonanztomografie
MSK:	Mitogen- and stress-activated protein kinase
MTS:	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium
MyD88:	Myeloid differentiation primary response 88
NADH:	Nicotinamadenindinukleotid
NADPH:	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NER:	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB:	Nuclear factor kappa-B
NHEJ:	Non-homologous end joining
NSCLC:	Non-small cell lung cancer
NTRK1:	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1
p:	Protein
P ⁻ :	Phosphat
PAMPs:	Pathogen-associated molecular patterns
PBS:	Phosphate buffered saline
PD-L1:	Programmed cell death Ligand 1
PDGFR:	Platelet-derived growth factor receptor
PLC-γ1	Phospholipase C
PRAS40:	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa

PYK2:	Proline-rich Tyrosine Kinase 2
Raf:	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras:	Rat sarcoma
ROS:	Reactive oxygen species
RSK:	Ribosomale S6 Kinase
SCLC:	Small cell lung cancer
SEM:	Standard error of the mean
Src:	Akronym aus „cellular“ und „sarcoma“
SRF:	Serum response factor
STAT:	Signal transducers and activators of transcription
TIR:	Toll-interleukin-1-receptor domain
TOR:	Target of Rapamycin
TLR:	Toll-like receptor
TNF- α :	Tumor necrosis factor alpha
UICC:	Union internationale contre le cancer
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
WHO:	World Health Organization
WNK1:	Lysine deficient protein kinase 1
XIAP:	X-linked inhibitor of apoptosis protein
Yes:	Tyrosine-protein Kinase Yes

VIII Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2020	1
Abb. 2: Struktur von Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin)	10
Abb. 3: Überlebenskurve anhand des linear-quadratischen Modells.....	15
Abb. 4: LPS-Struktur gramnegativer Bakterien.....	18
Abb. 5: LPS-TLR4-Signalweg.....	20
Abb. 6: MAP-Kinase-Signalweg.....	20
Abb. 7: A549-Zellen in Kultur.....	23
Abb. 8 a-b: LPS hat keinen Einfluss auf das klonogene Überleben der Zelllinie A549..	42
Abb. 9: Kontinuierlicher Abfall des relativen Überlebens der Zelllinie A549 unter steigender Cisplatinkonzentration	43
Abb. 10 a-b: LPS hat keinen Einfluss auf das relative Überleben der Zelllinie A549 unter Cisplatin-Behandlung.....	44
Abb. 11: Kontinuierlicher Abfall der relativen Stoffwechselaktivität der Zelllinie A549 unter steigender Cisplatinkonzentration für 24 Stunden	44
Abb. 12 a-b: LPS hat keinen Einfluss auf die relative Stoffwechselaktivität der Zelllinie A549 unter 24 stündiger Cisplatin-Behandlung.....	45
Abb. 13: Relatives Überleben der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS und Bestrahlung.....	46
Abb. 14 a-d: LPS führt zu einer Steigerung des relativen Überlebens der Zelllinie A549 unter Bestrahlung	47
Abb. 15 a: Quantitative Analyse der Phosphorylierungslevel von Proteinen und Kinasen (A-M) der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS und Bestrahlung.....	50
Abb. 15 b: Quantitative Analyse der Phosphorylierungslevel von Proteinen und Kinasen (P-Y) der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS und Bestrahlung	51
Abb. 16: Relatives Überleben der Zelllinie A549 unter Exposition mit SCH772984 in steigender Konzentration.....	52
Abb. 17: Relatives Überleben der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS, mit SCH772984 und Bestrahlung.....	53
Abb. 18 a-b: Die Inhibition von ERK1/2 führt zur Wiederherstellung der Strahlensensibilität der Zelllinie A549 unter LPS-Exposition.....	54

Abb. 19: Phosphorylierungsverhalten von ERK1/2 der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS, mit SCH772984 und Bestrahlung	55
Abb. 20: Relative IL-8-Konzentration der Überstände der Zelllinie A549 unter Exposition mit LPS, mit SCH772984 und Bestrahlung	56
Abb. 21: Mögliche Mechanismen der LPS-induzierten Strahlenresistenz – Rollen von pERK1/2 und IL-8.....	67

IX Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Stadien nach IASLC Lung Cancer Staging Project	4
Tab. 2: Klassifikation der Tumorstadien nach UICC 9.....	5
Tab. 3: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Cisplatin des Koloniebildungstests mit A549.....	30
Tab. 4: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Strahlendosis des Koloniebildungstests mit A549.....	31
Tab. 5: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS, Strahlendosis und ERK1/2-Inhibitor SCH772984 des Koloniebildungstests mit A549	32
Tab. 6: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Cisplatin des MTS-Assays mit A549	34
Tab. 7: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Strahlendosis für die Proteinproben von A549	36
Tab. 8: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS, Strahlendosis und ERK1/2-Inhibitor SCH772984 für die Proteinproben von A549.....	38
Tab. 9: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS und Strahlendosis (entsprechend II.2.3.2) für die ELISA-Proben von A549	40
Tab. 10: Übersicht der verschiedenen Kombinationen aus LPS, Strahlendosis und ERK1/2-Inhibitor SCH772984 (entsprechend II.2.3.3) für die ELISA-Proben von A549	40

X Literaturverzeichnis

Affolter A, Drigotas M, Fruth K, Schmidtmann I, Brochhausen C, Mann WJ, Brieger J (2013): Increased radioresistance via G12S K-Ras by compensatory upregulation of MAPK and PI3K pathways in epithelial cancer. In: Head Neck 35 (2), S. 220–228.

Affolter A, Fruth K, Brochhausen C, Schmidtmann I, Mann WJ, Brieger J (2011): Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism. In: Head Neck 33 (10), S. 1448–1457.

Ainsworth EJ, Chase HB (1959): Effect of microbial antigens on irradiation mortality in mice. In: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 102, S. 483–485.

Alexander C, Rietschel ET (2001): Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. In: Journal of Endotoxin Research 7 (3), S. 167–202.

American Type Culture Collection: Product Sheet A549 (ATCC® CCL185™).
[online] <https://www.atcc.org/products/ccl-185#detailed-product-images> [zuletzt abgerufen am 11.02.2025].

Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, Burdick MD, Strieter RM (1996): Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. In: The Journal of Clinical Investigation 97 (12), S. 2792–2802.

Arthur, JSC (2008): MSK activation and physiological roles. In: Frontiers in Bioscience 13, S. 5866–5879

Balmano K, Cook SJ (2009): Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. In: Cell Death and Differentiation 16, S. 368–377.

Berghmans T, Sculier J-P, Klastersky, J (2003): A Prospective Study of Infections in Lung Cancer Patients Admitted to the Hospital. In: Chest 124 (1), S. 114–120.

Brenner D (2008): The Linear-Quadratic Model Is an Appropriate Methodology for Determining Isoeffective Doses at Large Doses Per Fraction. In: Seminars in Radiation Oncology 18 (4), S. 234–239.

Buick RN, Pollak MN (1984): Perspectives on clonogenic tumor cells, stem cells and oncogenes. In: Cancer Research 44, S. 4909–4918

Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (2021): Liste der Berufskrankheiten Anlage 1 zur Berufskrankheiten-Verordnung (BKV) in der Fassung der Fünften Verordnung zur Änderung der Berufskrankheiten-Verordnung vom 29. Juni 2021.

Buttitta F, Marchetti A, Gadducci A, Pellegrini S, Morganti M, Carnicelli V (1997): p53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study. In: British Journal of Cancer 75 (2), S. 230–235.

- Caiola E, Iezzi A, Tomanelli M, Bonaldi E, Scagliotti A, Colombo M, Guffanti F, Micotti E, Garassino MC, Minoli L, Scanziani E, Broggin M, Marabese M (2020): LKB1 Deficiency Renders NSCLC Cells Sensitive to ERK Inhibitors. In: *Journal of thoracic oncology* 15 (3), S. 360-370.
- Chaikuad A, Tacconi EM, Zimmer J, Liang Y, Gray NS, Tarsounas M, Knapp S (2014): A unique inhibitor binding site in ERK1/2 is associated with slow binding kinetics. In: *Nature Chemical Biology* 10 (10), S. 853-860.
- Chang L, Karin M (2001): Mammalian MAP kinase signalling cascades. In: *Nature* 410 (6824), S. 37–40.
- Chen B, Shen Z, Wu D, Xie X, Xu X, Lv L, Dai H, Chen J, Gan X (2019): Glutathione Peroxidase 1 Promotes NSCLC Resistance to Cisplatin via ROS-Induced Activation of PI3K/AKT Pathway. In: *BioMed research international*, 2019:7640547.
- Chevallier M, Borgeaud M, Addeo A, Friedlaender A (2021): Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. In: *World Journal of Clinical Oncology*, 12 (4), S. 217-237.
- Chi F, Wu R, Jin X, Jiang M, Zhu X: (2016). HER2 induces cell proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer by upregulating COX-2 expression via MEK/ERK signaling pathway. In: *OncoTargets and therapy* 9, S. 2709–2716.
- Chin HM, Lai DK, Falchook GS (2019): Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitors in oncology clinical trials. In: *Journal of Immunotherapy and Precision Oncology* 2 (1), S. 10-16.
- Choi EJ, Ryu YK, Kim SY, Wu HG, Kim JS, Kim IH (2010): Targeting epidermal growth factor receptor-associated signaling pathways in non-small cell lung cancer cells: implication in radiation response. In: *Molecular Cancer Research* 8, S. 1027–1036
- Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD (2013): Molecular biology of lung cancer. In: *Journal of Thoracic Disease* 5 (5), S. 479–490.
- Coussens LM, Werb Z (2002): Inflammation and cancer. In: *Nature* 420 (19), S. 860–867.
- Crowe SE (2005): Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. In: *Current Opinion in Gastroenterology* 21, S. 32–38.
- D'Addario G, Pintilie M, Leighl NB, Feld R, Cerny T, Shepherd FA (2005): Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (13), S. 2926–2936.
- Davis TB, Yang M, Wang H, Lee C, Yeatman TJ, Pledger WJ (2019): PTPRS drives adaptive resistance to MEK/ERK inhibitors through SRC. In: *Oncotarget* 10 (63), S. 6768-6780.

- Deak M, Clifton AD, Lucocq JM, Alessi DR (1998): Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. In: *EMBO Journal* 17, S. 4426–4441.
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA (2011): Lung cancer. Epidemiology, etiology, and prevention. In: *Clinics in chest medicine* 32 (4), S. 605–644.
- Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagan MP, Grant S, Schmidt-Ullrich R (2003): Stress and Radiation-Induced Activation of Multiple Intracellular Signaling Pathways. In: *Radiation Research* 159 (3), S. 283-300.
- De Ruyscher D, Wanders R, van Baardwijk A, Dingemans AM, Reymen B, Houben R, Bootsma G, Pitz C, van Eijssden L, Geraedts W, Baumert BG, Lambin P (2012): Radical treatment of non-small-cell lung cancer patients with synchronous oligometastases: long-term results of a prospective phase II trial (Nct01282450). In: *Journal of Thoracic Oncology* 7(10), S. 1547-1555.
- Detterbeck FC, Woodard GA, Bader AS, Dacic S, Grant MJ, Park HS, Tanoue LT (2024): The Proposed Ninth Edition TNM Classification of Lung Cancer. In: *CHEST* 166 (4), S. 882 - 895.
- Dobbs TA, Palmer P, Maniou Z, Lomax ME, O'Neill P (2008): Interplay of two major repair pathways in the processing of complex double-strand DNA breaks. In: *DNA repair* 7 (8), S. 1372–1383.
- Efimova EV, Liang H, Pitroda SP, Labay E, Darga TE, Levina V, Lokshin A, Roizman B, Weichselbaum RR, Khodarev NN (2009): Radioresistance of Stat1 over-expressing tumour cells is associated with suppressed apoptotic response to cytotoxic agents and increased IL6-IL8 signalling. In: *International journal of radiation biology* 85 (5), S. 421-431.
- Fowler JF (1989): The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. In: *The British journal of radiology* 62 (740), S. 679-694.
- Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH, Pommier Y (2002): Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair as a Determinant of Cisplatin Sensitivity of Human Cells. In: *Cancer research* 62 (17), S. 4899–4902.
- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O (2012): Molecular mechanisms of cisplatin resistance. In: *Oncogene* 31 (15), S. 1869–1883.
- Gan SD, Patel KR (2013): Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. In: *The Journal of investigative dermatology* 133 (9), S. 1-3.
- Gately D, Howell S (1993): Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. In: *British Journal of Cancer* 67 (6), S. 1171–1176.
- Gökyildirim MY, Grandel U, Hattar K, Dahlem G, Schuetz E, Leinberger FH (2018): Targeting CREB-binding protein overrides LPS induced radioresistance in non-small cell lung cancer cell lines. In: *Oncotarget* 9 (48), S. 28976–28988.

- Gökyildirim MY (2020): Der Effekt von Lipopolysaccharid auf die Strahlensensibilität in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom Zelllinien. [Unveröffentlichte Dissertation], Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Gomes M, Teixeira AL, Coelho A, Araújo A, Medeiros R (2014): The role of inflammation in lung cancer. In: *Advances in experimental medicine and biology* 816, S. 1–23.
- Grandel U, Heygster D, Sibelius U, Fink L, Sigel S, Seeger W (2009): Amplification of lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis in non-small cell lung cancer/neutrophil cocultures. In: *Molecular cancer research* 7 (10), S. 1729–1735.
- Guha M, Mackman N (2001): LPS induction of gene expression in human monocytes. In: *Cellular Signalling* 13 (2), S. 85–94.
- Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL (2020): ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). In: *Experimental and Therapeutic Medicine* 19, S. 1997–2007.
- Hattar K, Savai R, Subtil FSB, Wilhelm J, Schmall A, Lang DS (2013): Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo. Role of COX-2 and EGFR activation. In: *Cancer immunology, immunotherapy* 62 (2), S. 309–320.
- He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X (2007): TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. In: *Molecular immunology* 44 (11), S. 2850–2859.
- He T, Qu Q, Yu Z, Wang H, Lv J, Zhang X, Zhao P (2013): LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. In: *International Endodontic Journal* 46, S. 128–136.
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA (2008): DNA repair pathways as targets for cancer therapy. In: *Nature Reviews Cancer* 8 (3), S. 193–204.
- Hu J, Friedman E (2010): Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. In: *Genes and cancer* 1 (8), S. 803–811.
- Hua Q, Gu X, Chen X, Song W, Wang A, Chu J (2019): IL-8 is involved in radiation therapy resistance of esophageal squamous cell carcinoma via regulation of PCNA. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 676:108158.
- Huang E-Y, Chen Y-F, Chen Y-M, Lin I-H, Wang C-C, Su W-H (2012): A novel radioresistant mechanism of galectin-1 mediated by H-Ras-dependent pathways in cervical cancer cells. In: *Cell Death and Disease* 3 (1):e251.
- Inagaki J, Rodriguez V, Bodey GP (1974): Causes of death in cancer patients. In: *Cancer* 33, S. 568–573.
- Ishida S, Lee J (2002): Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22), S. 14298–14302.

- Ishida S, McCormick F, Smith-McCune K, Hanahan D (2010): Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. In: *Cancer cell* 17 (6), S. 574–583.
- Jäkel O, Karger C (2017): *Physikalische Grundlagen*. In: Reiser M, Kuhn F, Debus J, Hrsg. *Duale Reihe Radiologie*. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017.
- Jassem J (1999): Chemotherapy of advanced non-small cell lung cancer. In: *Annals of Oncology* 10 (6), S. 77-82.
- Jiang M, Zhou L-Y, Xu N, An Q (2019): Hydroxysafflor yellow A inhibited lipopolysaccharide-induced non-small cell lung cancer cell proliferation, migration, and invasion by suppressing the PI3K/AKT/mTOR and ERK/MAPK signaling pathways. In: *Thoracic cancer* 10 (6), S. 1319-1333.
- Kang X, Li P, Zhang C, Zhao Y, Hu H, Wen G (2020): The TLR4/ERK/PD-L1 axis may contribute to NSCLC initiation. In: *International journal of oncology* 57 (2), S. 456–465.
- Karin M, Lawrence T, Nizet V (2006): Innate immunity gone awry. Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. In: *Cell* 124 (4), S. 823–835.
- Katano K, Safaei R, Samimi G, Holzer A, Rochdi M, Howell SB (2003): The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells. In: *Molecular pharmacology* 64 (2), S. 466–473.
- Kellerer AM, Rossi HH (1978): A Generalized Formulation of Dual Radiation Action. In: *Radiation Research*, S. 471-488.
- Kim JJ, Tannock IF (2005): Repopulation of cancer cells during therapy. An important cause of treatment failure. In: *Nature Reviews Cancer* 5 (7), S. 516–525.
- Kim JY, Welsh EA, Fang B, Bai Y, Kinose F, Eschrich SA, Koomen JM, Haura EB (2016): Phosphoproteomics Reveals MAPK Inhibitors Enhance MET- and EGFR-Driven AKT Signaling in KRAS-Mutant Lung Cancer. In: *Molecular Cancer Research* 14 (10), S. 1019-1029.
- Kim W, Youn HS, Kang CH, Youn BH (2015): Inflammation-induced radioresistance is mediated by ROS-dependent inactivation of protein phosphatase 1 in non-small cell lung cancer cells. In: *Apoptosis* 20 (9), S. 1242–1252.
- Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJT, Juijn JA (1997): Analysis of Expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, Homologues of the Multidrug Resistance-associated Protein Gene (MRP1), in Human Cancer Cell Lines. In: *Cancer research* 57, S. 3537–3547.
- Kopczynski M, Rumieniczuk I, Kulecka M, Statkiewicz M, Pysniak K, Sandowska-Markiewicz Z, Wojcik-Trechcinska U, Goryca K, Pyziak K, Majewska E, Masiejczyk M, Wojcik-Jaszczynska K, Rzymyski T, Bomsztyk K, Ostrowski J, Mikula M (2021): Selective Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) Inhibition by the

SCH772984 Compound Attenuates In Vitro and In Vivo Inflammatory Responses and Prolongs Survival in Murine Sepsis Models. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (19):10204.

Kriegs M, Kasten-Pisula U, Rieckmann T (2010): The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. In: *DNA Repair* 9 (8), S. 889-897.

Kummermehr JC. (2001): Tumour Stem Cells & The Evidence and the Ambiguity. In: *Acta Oncologica* 40 (8), S. 981-988.

Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, Welsh JA, Ecker J, Modali RV (1991): p53 Mutations, ras Mutations, and p53-Heat Shock 70 Protein Complexes in Human Lung Carcinoma Cell Lines. In: *Cancer research* 51, S. 4090–4096.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms, Leitlinienreport Version 3.0, 2024, AWMF-Registernummer 020-007 OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/lungenkarzinom/>, [zuletzt abgerufen am 27.01.2025].

Li P, Wu Y, Li M, Qiu X, Bai X, Zhao X (2015): AS-703026 Inhibits LPS-Induced TNF α Production through MEK/ERK Dependent and Independent Mechanisms. In: *PLoS One* 10 (9):e0137107.

Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003): Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (9), S. 712–720.

Lin TY, Fan CW, Maa MC (2015): Lipopolysaccharide-promoted proliferation of Caco-2 cells is mediated by c-Src induction and ERK activation. In: *BioMedicine* 5.

Liu C, Zhang C, Mitchel R (2013): A critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) and its' in vivo ligands in basal radio-resistance. In: *Cell Death and Disease* 4 (5):e649.

Liu X, Zhao W, Wang W, Lin S, Yang L (2017): Puerarin suppresses LPS-induced breast cancer cell migration, invasion and adhesion by blockage NF- κ B and Erk pathway. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 92, S. 429-436.

Lomax ME, Folkes LK, O'Neill P (2013): Biological consequences of radiation-induced DNA damage. Relevance to radiotherapy. In: *Clinical Oncology* 25 (10), S. 578–585.

Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS (2008): LPS/TLR4 signal transduction pathway. In: *Cytokine* 42 (2), S. 145–151.

Luppi F, Longo AM, de Boer WI, Rabe KF, Hiemstra PS (2007): Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. In: *Lung cancer* 56 (1), S. 25–33.

MacRedmond R, Greene C, Taggart CC, McElvaney N, O'Neill S (2005): Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. In: *Respiratory Research* 6 (1), 116.

Mahmood T, Yang PC (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. In: North American Journal of Medical Sciences. 4 (9), S. 429-434.

Malaise EP, Fertil B, Chavaudra N, Guichard M (1986): Distribution of radiation sensitivities for human tumor cells of specific histological types: comparison of in vitro to in vivo data. In: International journal of radiation oncology, biology, physics 12 (4), S. 617-624.

Mamdani H, Matosevic S, Khalid AB, Durm G, Jalal SI (2022): Immunotherapy in Lung Cancer: Current Landscape and Future Directions. In: Frontiers in Immunology, 13:823618.

McMahon SJ (2018): The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. In: Physics in Medicine and Biology 64 (1):01TR01.

Mogensen TH (2009): Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. In: Clinical microbiology reviews 22 (2), S. 240-273.

Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008): Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. In: Mayo Clinic Proceedings 83 (5), S. 584–594.

Morris EJ, Jha S, Restaino CR, Dayananth P, Zhu H, Cooper A, Carr D, Deng Y, Jin W, Black S, Long B, Liu J, Dinunzio E, Windsor W, Zhang R, Zhao S, Angagaw MH, Pinheiro EM, Desai J, Xiao L, Shipps G, Hruza A, Wang J, Kelly J, Paliwal S, Gao X, Babu BS, Zhu L, Daublain P, Zhang L, Lutterbach BA, Pelletier MR, Philippar U, Siliphaivanh P, Witter D, Kirschmeier P, Bishop WR, Hicklin D, Gilliland DG, Jayaraman L, Zawel L, Fawell S, Samatar AA (2013): Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. In: Cancer discovery 3 (7), S. 742–750.

Moschos SJ, Sullivan RJ, Hwu WJ, Ramanathan RK, Adjei AA, Fong PC, Shapira-Frommer R, Tawbi HA, Rubino J, Rush TS 3rd, Zhang D, Miselis NR, Samatar AA, Chun P, Rubin EH, Schiller J, Long BJ, Dayananth P, Carr D, Kirschmeier P, Bishop WR, Deng Y, Cooper A, Shipps GW, Moreno BH, Robert L, Ribas A, Flaherty KT (2018): Development of MK-8353, an orally administered ERK1/2 inhibitor, in patients with advanced solid tumors. In: JCI Insight 3 (4):e92352.

Mottram JC (1936): A Factor of Importance in the Radio Sensitivity of Tumours. In: The British Journal of Radiology 9, S. 606-614.

Münter M, Weber K (2017): Strahlenbiologie. In: Reiser M, Kuhn F, Debus J, Hrsg. Duale Reihe Radiologie. 4., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017.

Munshi A, Ramesh R (2013): Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. In: Genes & Cancer 4 (9-10), S. 401-408.

Nagy A, Müller V, Kolonics-Farkas AM, Eszes N, Vincze K, Horvath G (2019): Worse lung cancer outcome in patients with lower respiratory tract infection confirmed at time of diagnosis. In: Thorac Cancer 10 (9), S. 1819-1826.

- Neta R, Oppenheim JJ, Schreiber RD, Chizzonite R, Ledney GD, MacVittie TJ (1991): Role of cytokines (interleukin 1, tumor necrosis factor, and transforming growth factor beta) in natural and lipopolysaccharide-enhanced radioresistance. In: *The Journal of experimental medicine* 173 (5), S. 1177–1182.
- O'Byrne K, Ryan S-L, Heavey S, Umezawa K, Barr MP, Gray SG (2016): Inflammatory mediated mechanisms of cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. In: *Journal of Thoracic Oncology* 11 (4), S. 84.
- Park GS, Kim JH (2015): LPS Up-Regulates ICAM-1 Expression in Breast Cancer Cells by Stimulating a MyD88-BLT2-ERK-Linked Cascade, Which Promotes Adhesion to Monocytes. In: *Molecules and Cells* 38 (9), S. 821-828.
- Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK (1991): *Helicobacter pylori* Infection and the Risk of Gastric Carcinoma. In: *The New England Journal of Medicine* 325, S. 1127-1131.
- Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D (1996): Association between Cisplatin Resistance and Mutation of p53 Gene and Reduced Bax Expression in Ovarian Carcinoma Cell Systems. In: *Cancer research* 56, S. 556–562.
- Perlin E, Bang KM, Shah A, Hursey PD, Whittingham WL, Hashmi K (1990): The impact of pulmonary infections on the survival of lung cancer patients. In: *Cancer* 66 (3), S. 593–596.
- Pfeifer M, Schmidt M (2018): Bronchialkarzinom. In: Arastéh K, Baenkler H, Bieber C et al., (Hrsg.) *Duale Reihe Innere Medizin*. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018.
- Pinto A, Morello S, Sorrentino R (2011): Lung cancer and Toll-like receptors. In: *Cancer immunology, immunotherapy* 60 (9), S. 1211–1220.
- Pisani P, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J (1997): Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. In: *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention: a publication of the American Association of Cancer Research* 6 (6), S. 387-400.
- Promega Corporation: CellTiter 96(R) AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin TB245.
- Puck TT, Marcus PI (1956): Action of x-rays on mammalian cells. In: *The Journal of experimental medicine* 103 (5), S. 653-666.
- Pugin J, Heumann D, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M (1994): CD14 is a pattern recognition receptor. In: *Immunity* 1 (6), S. 509–516.
- Putinati S, Trevisani L, Gualandi M, Guerra G, Rossi MR, Sartori S (1994): Pulmonary infections in lung cancer patients at diagnosis. In: *Lung Cancer* 11, S. 243-249.
- Qu J-Q, Yi H-M, Ye X, Zhu J-F, Yi H, Li L-N, Xiao T, Yuan L, Li J-Y, Wang Y-Y, Feng J, He Q-Y, Lu S-S, Xiao Z-Q (2015): MiRNA-203 Reduces Nasopharyngeal Carcinoma Radioresistance by Targeting IL8/AKT Signaling. In: *Molecular Cancer Therapy* 14 (11), S. 2653-2664.

- R & D Systems (2014): Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit.
- Rafehi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC (2011): Clonogenic assay. Adherent cells. In: Journal of visualized experiments 49:e2573.
- Reinmuth N, Gröschel A, Schumann C, Sebastian M, Wiewrodt R, Reck M (2016): Therapieempfehlung für das metastasierte nicht-kleinzellige Lungenkarzinom. In: Pneumologie (Stuttgart, Germany) 70 (9), S. 567–578.
- Robert Koch-Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten (Hrsg.): Krebs in Deutschland für 2019/2020. Berlin, 2023. [online] https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_2023.pdf?__blob=publicationFile [zuletzt abgerufen am 12.08.2024]
- Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, van Vu T (2009): Hypoxia and radiation therapy: Past history, ongoing research, and future promise. In: Current Molecular Medicine 9 (4), S. 442–458.
- Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II (2016): Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. In: Cancer treatment and research 170, S. 25–46.
- Rosell R, Taron M, Barnadas A, Scagliotti G, Sarries C, Roig B (2003): Nucleotide excision repair pathways involved in Cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. In: Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center 10 (4), S. 297–305.
- Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T (1965): Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. In: Nature 205 (4972), S. 698–699.
- Rosenberg B, Van Camp L (1969): Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. In: Nature 222 (5191), S. 385–386.
- Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M (2004): Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin in Ovarian Cancer Cells. In: Clinical cancer research 10, S. 4661–4669.
- Sarihan S, Ercan I, Saran A, Çetintas SK, Akalin H, Engin K (2005): Evaluation of infections in non-small cell lung cancer patients treated with radiotherapy. In: Cancer detection and prevention 29 (2), S. 181-188.
- Saunders M, Dische S, Barrett A, Harvey A, Griffiths G, Parmar M (1999): Continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small cell lung cancer: mature data from the randomised multicentre trial. In: Radiotherapy and Oncology 52 (2), S. 137-148.
- Sawant A, Kothandapani A, Zhitkovich A, Sobol RW, Patrick SM (2015): Role of mismatch repair proteins in the processing of cisplatin interstrand cross-links. In: DNA repair 35, S. 126–136.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET (1995): Molecular mechanisms of endotoxin activity. In: Archives of Microbiology 164 (6), S. 383–389.

- Schütte J, Barth J (2010): Zytostatische Chemotherapie. In: Hiddemann W, Bartram C (eds) Die Onkologie. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schütz E (2020): Die Wirkung von Endotoxin auf die Ansprache auf Strahlentherapie im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. [Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen], Gießen: VVB Lauferweiler Verlag.
- Shi L, Zhang S, Wu H, Zhang L, Dai X, Hu J (2013): MiR-200c Increases the Radiosensitivity of Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line A549 by Targeting VEGF-VEGFR2 Pathway. In: PloS One 8 (10):e78344.
- Shi L, Wang L, Wang B, Cretoiu SM, Wang Q, Wang X, Chen C (2014): Regulatory mechanisms of betacellulin in CXCL8 production from lung cancer cells. In: Journal of translational medicine 12, S. 70.
- Siddik ZH (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. In: Oncogene 22 (47), S. 7265–7279.
- Smith WW, Alderman IM, Gillespie RI (1957): Increased survival in irradiated animals treated with bacterial endotoxins. In: American Journal of Physiology 191 (1), S.124-130.
- Steel GG, McMillan TJ, Peacock JH (1989): The 5 Rs of Radiobiology. In: International Journal of Radiation Biology 56 (6), S. 1045-1048.
- Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P (2011): Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. In: Aging 3 (3), S. 192–222.
- Takeda K, Akira S (2005): Toll-like receptors in innate immunity. In: International immunology 17 (1), S. 1–14.
- Thermo Fisher Scientific: User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit.
- Tracy S, Mukohara T, Hansen M, Meyerson M, Johnson BE, Pasi AJ (2004): Gefitinib Induces Apoptosis in the EGFR L858R Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line H3255. In: Cancer research 64 (20), S. 7241–7244.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB (2015): The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. In: Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 10 (9), S. 1243–1260.
- Tsolou A, Liouisia M, Kalamida D, Pouliliou S, Giatromanolaki A, Koukourakis M (2017): Inhibition of IKK-NFκB pathway sensitizes lung cancer cell lines to radiation. In: Cancer biology and medicine 14 (3), S. 293–301.
- Turjanski A, Vaqué J, Gutkind J (2007): MAP kinases and the control of nuclear events. In: Oncogene 26, S. 3240–3253.

Valenzuela DM, Groffen J (1986): Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. In: *Nucleic Acids Research* 14 (2), S. 843–852.

van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, Verhoef J, van Asbeck BS (1999): Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. In: *Infection and Immunity* 67 (8), S. 3824–3829.

Voigt W, Dietrich A, Schmoll H-J (2006): Cisplatin und seine Analoga: Übersicht über den Entwicklungsstatus und klinischen Einsatz. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 35 (2), S. 134–143.

Wang K, Wang J, Wei F, Zhao N, Yang F, Ren X (2017): Expression of TLR4 in Non-Small Cell Lung Cancer Is Associated with PD-L1 and Poor Prognosis in Patients Receiving Pneumectomy. In: *Frontiers in immunology* 8 (4):456.

Wang Y, Qu Y, Niu XL, Sun WJ, Zhang XL, Li LZ (2011): Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. In: *Cytokine* 56 (2), S. 365–375.

Waugh DJJ, Wilson C (2008): The interleukin-8 pathway in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14 (21), S. 6735–6741.

Wiggin GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P, Arthur JS (2002): MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. In: *Molecular Cell Biology* 22, S. 2871–2881.

Willers H, Azzoli CG, Santivasi WL, Xia F (2013): Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. In: *Cancer Journal* 19 (3), S. 200–207.

Withers HR (1975): The four R's of radiotherapy. In: Lett JT AH (editor) *Advances in Radiation Biology*, Vol 5, Academic Press, New York 1975, S. 241–271.

Xie Q, Zhou Y, Lan G, Yang L, Zheng W, Liang Y, Chen T (2014): Sensitization of cancer cells to radiation by selenadiazole derivatives by regulation of ROS-mediated DNA damage and ERK and AKT pathways. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449 (1), S. 88–93.

Yang S-H, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ (2003): Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. In: *Gene* 320, S. 3–21.

Ye M, Gu X, Han Y, Jin M, Ren T (2016): Gram-negative bacteria facilitate tumor outgrowth and metastasis by promoting lipid synthesis in lung cancer patients. In: *Journal of thoracic disease* 8 (8), S. 1943–1955.

Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT (2000): Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor

angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. In: American journal of respiratory and critical care medicine 162 (5), S. 1957–1963.

Zhang P, Gao WY, Turner S, Ducatman BS (2003): Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. In: Molecular cancer 2 (1).

Zhang P, He D, Song E, Jiang M, Song Y (2019): Celecoxib enhances the sensitivity of non-small-cell lung cancer cells to radiation-induced apoptosis through downregulation of the Akt/mTOR signaling pathway and COX-2 expression. In: PLoS One 14 (10):e0224843.

Zhang Y-B, He F-L, Fang M, Hua T-F, Hu B-D, Zhang Z-H (2009): Increased expression of Toll-like receptors 4 and 9 in human lung cancer. In: Molecular biology reports 36 (6), S. 1475–1481.

Zhang Y, Wang L, Zhang M, Jin M, Bai C, Wang X (2012): Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: an involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway. In: Journal of Cellular Physiology 227 (1), S. 35–43.

Zhu YM, Webster SJ, Flower D, Woll PJ (2004): Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. In: British Journal of Cancer 91 (11), S. 1970-1976.

XI Publikationen

Posterpräsentation DGIM Kongress (Schwerpunkt Pneumologie) 2019 in Wiesbaden

Julia D. Lampey; Ulrich Grandel; Mira Y. Goekyildirim; Gabriele Dahlem; Friedrich Grimminger; Ulf Sibelius; Katja Hattar: Effect Of Endotoxin On The Response To Chemotherapy And Radiotherapy In NSCLC Cell Lines. Der Internist 2019; 60: Supplement 1, PS083.

XII Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

XIII Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Grandel sowie bei Frau PD Dr. Hattar für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas sowie die hervorragende Betreuung über die vielen Jahre bedanken.

Ein besonderer Dank gilt zudem Frau Dr. Gökyildirim und Frau Dahlem für die große Unterstützung meiner praktischen Arbeit im Labor, der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Subtil in Marburg für die Hilfe bei der Durchführung der Western Blots sowie dem Team der Strahlentherapie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Engenhardt-Cabillic für die Ermöglichung der Bestrahlung der Lungenkarzinomzellen.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Grimminger und Herrn Prof. Dr. Sibelius für die Bereitstellung der Mittel und Räumlichkeiten bedanken.

Ein großes Dankeschön geht zudem an meine Familie und Freunde, die mich in allen Belangen unterstützt und motiviert haben und den Glauben an mich und die Fertigstellung meiner Dissertation nie verloren haben.