

Aus dem Bereich Innere Medizin V - Pneumologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Einfluss der pulmonalen Entzündung auf die Entstehung von Lungenkarzinomen

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2016

vorgelegt von: Christopher Jungnickel

geb. am: 16.08.1988 in Bad Saarow-Pieskow

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität des Saarlandes als Dissertation
am

Erstgutachter: PD Dr. Christoph Beisswenger

Zweitgutachter:

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich/entgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. Prof. Dr. Rainer Wiewrodt: Auswertung des NSCLC-Studienkollektivs
3. PD Dr. Christoph Beisswenger: Betreuung der Doktorarbeit, Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
4. Dr. Lars Henning Schmidt: Auswertung des NSCLC-Studienkollektivs
5. Dr. Christian Herr: Hilfestellung bei Präparationen, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
6. Dr. Meike Voss: Hilfestellung bei Präparationen, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
7. Anja Honecker: Tierhaltung, FACS-Analyse, technische Assistenz
8. Andreas Kamyschnikow: Tierhaltung, Immunhistochemische Färbungen, technische Assistenz

9. Lisa Wolf: Hilfestellung bei Präparationen, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
10. Bodo Wonnenberg: Hilfestellung bei Präparationen, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
11. Alexander Wolf: Wiederholungsexperimente in der Zellkultur
12. Lina Bittigkoffer: Wiederholungsexperimente in der Zellkultur
13. Osman Karabiber: Immunhistochemische Färbungen

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin
bzw. des aufnehmenden Beamten

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Cigarette smoke induced disruption of pulmonary barrier and bacterial translocation drive tumor associated inflammation and growth

Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Wolf A, Voss M, Wolf L, Honecker A, Kamyschnikow A, Herr C, Bals R, Beisswenger C

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015 Sep 15;309(6):L605-13

IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth

Jungnickel C, Schmidt L, Bittigkoffer L, Wolf L, Kamyschnikow A, Herr C, Menger M, Wiewrodt R, Bals R, Beisswenger C

zur Publikation eingereicht

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Zusammenfassung.....	XI
Summary	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Lungenkrebs und COPD	1
1.2 Infektionen in der COPD	2
1.3 Entzündung und Tumorgenese	6
1.3.1 Entzündung und Tumorinitiation.....	7
1.3.2 Entzündung und Tumorpromotion	9
1.3.3 Entzündung und Tumorprogression	11
1.3.4 Immunzellen in der Tumorgenese	13
1.4 Die Interleukin-17 Familie.....	16
1.4.1 IL-17A vermittelte Immunantwort und Pathogenese	16
1.4.2 IL-17C vermittelte Immunantwort und Pathogenese	17
1.5 Zielsetzung.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Software.....	21
2.1.3 Lösungen	22
2.2 Mikrobiologische Methoden	23

2.2.1	Bakterienstämme.....	23
2.2.2	Kultivierung von Bakterien.....	23
2.2.3	Abtötung von Bakterien.....	24
2.2.4	Anlegen eines Bakterienstocks.....	24
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.3.1	RNA Isolation aus Zellkulturproben.....	25
2.3.2	RNA Isolation aus Lungen.....	25
2.3.3	cDNA Synthese.....	26
2.3.4	RT-PCR.....	27
2.4	Zellbiologische Methoden.....	30
2.4.1	<i>In vitro</i> Methoden.....	30
2.4.2	<i>In vivo</i> Methoden.....	32
2.5	Analytische Methoden.....	39
2.5.1	ELISA.....	39
2.5.2	Cytometric Bead Assay.....	39
2.5.3	LDH-Assay.....	39
2.5.4	Proliferationsassay.....	40
2.5.5	Proteinquantifizierung.....	40
2.6	Analyse humaner Daten.....	41
2.6.1	Auswertung des NSCLC-Studienkollektivs.....	41
2.6.2	Auswertung der Lungenkrebs Meta-Analyse.....	43
2.7	Statistische Analyse.....	44
3	Ergebnisse.....	45

3.1	Bakterien fördern das Wachstum von Lungenmetastasen bei einer Zigarettenrauch induzierten Entzündung	45
3.1.1	Die Kombination aus Zigarettenrauch und NTHi führt zu einem vermehrten Wachstum von Lungenmetastasen.....	45
3.1.2	Das Tumorwachstum ist unabhängig von der Entzündung im Alveolarraum	50
3.1.3	Zigarettenrauch führt zur Translokation von bakteriellen Komponenten in das Tumorgewebe	52
3.1.4	Zigarettenrauch und NTHi führen zu einer erhöhten Entzündung und Proliferation im Tumorgewebe.....	56
3.1.5	Bakterien führen zu einer erhöhten Proliferation von Tumorzellen	59
3.2	In IL-17A ^{-/-} Tieren ist das Wachstum von Lungenmetastasen vermindert.....	62
3.3	TLR und IL-17C vermitteln die Rekrutierung von tumorassoziierten neutrophilen Granulozyten und das Wachstum von Lungentumoren	67
3.3.1	Die NTHi-induzierte pulmonale Entzündung und das Tumorwachstum werden durch TLR-2/4 vermittelt	67
3.3.2	Die NTHi-induzierte Rekrutierung tumorassoziiertes neutrophiler Granulozyten und das Tumorwachstum werden durch IL-17C reguliert.....	74
3.3.3	IL-17C reguliert die tumorassoziierte Entzündung und Tumorproliferation in CS/NTHi behandelten Tieren	82
3.3.4	IL-17C steigert die Expression von neutrophilen Granulozyten rekrutierenden Zytokinen.....	86

3.3.5	IL-17C hat keinen Einfluss auf die Proliferation und die Apoptose	89
3.3.6	IL-17C hat einen prognostischen Einfluss in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen	92
4	Diskussion	99
4.1	Bakterielle Bestandteile fördern das Tumorwachstum während einer Zigarettenrauch induzierten pulmonalen Entzündung	100
4.1.1	Zigarettenrauch schädigt die pulmonale Barriere und ermöglicht eine Translokation von bakteriellen Faktoren in das Tumorgewebe.....	101
4.1.2	Bakterielle Bestandteile fördern das Tumorwachstum durch die direkte Induktion von Proliferation.....	103
4.1.3	Bakterien induzierte tumorassoziierte Entzündung fördert die Tumorproliferation und das Tumorwachstum	104
4.2	IL-17C vermittelt das Tumorwachstum bei einer pulmonalen Entzündung.....	107
4.2.1	IL-17C ist ein negativer prognostischer Faktor für Lungenkrebspatienten	107
4.2.2	TLR-reguliertes IL-17C vermittelt den tumorfördernden Effekt von Bakterien.....	109
4.2.3	IL-17C beeinflusst die Expression zellzyklusregulierender Gene nicht.....	110
4.2.4	IL-17C vermittelt die Rekrutierung von tumorassoziierten neutrophilen Granulozyten	111
5	Literaturverzeichnis.....	114
6	Abbildungsverzeichnis	132

7	Tabellenverzeichnis	137
8	Publikationsverzeichnis.....	138
9	Konferenzbeiträge.....	140
9.1	Vorträge.....	140
9.2	Poster	143
10	Danksagung	145

Abkürzungsverzeichnis

A

ANOVA Analysis of variance

B

BAL(F) Bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)

Bcl-2 B-cell lymphoma 2

Bclxl B-cell lymphoma-extra large

C

CCR2 C-C Chemokinrezeptor Typ 2

cDNA Complementary desoxyribonucleic acid

CFU Colony forming unit

COPD Chronic obstructive pulmonary disease

CS Zigarettenrauch

CX3CR1 CX3C Chemokinrezeptor 1

D

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DANN Desoxyribonukleinsäure

dNTP Nukleosidtriphosphate

Dtl. Deutschland

E

ECOG Eastern Cooperative Oncology Group

EGF Epidermal growth factor

ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F	
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G	
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
H	
HBECs	Human bronchial epithelial cells
I	
IgG	Immunglobulin
IKK- β	Inhibitor der NF- κ B Untereinheit beta
IL-	Interleukin
IL-17R	Interleukin-17 Rezeptor
INF- γ	Interferon-gamma
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRS	Immunreaktiver Score
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat-1
K	
KC	Keratinocyten abgeleitetes Chemokin
kDa	Kilodalton
Ki-67	Kiel-67
KM	Kaplan-Meier

L

LB	Lysogeny broth
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LLC	Lewis Lung Carcinoma
LPS	Lipopolysaccharide

M

Min	Minuten
MIP	Macrophage inflammatory protein
mRNA	Messenger RNA

N

NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	Nukleärer Faktor-kappaB
NOS	Not otherwise specified
NSCLC	Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom
NTHi	Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>

P

PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate buffered saline
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PP	Score der prozentual positiven Zellen
PRR	Pattern Recognition Receptor

R

RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
--------	---

RNA	Ribonucleic acid
RNS/RNI	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Rotations per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	
SD	Standardabweichung
SI	Score der Intensität der Färbung
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	
TGF β	Transforming Growth Factor beta
Th17	T-Helferzellen 17
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNM	Tumour-Node-Metastasis
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TSP-1	Thrombospondin 1
U	
UV	Ultraviolettstrahlung
V	
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
W	
WHO	Weltgesundheitsorganisation

WST-1 Water soluble tetrazolium-1

WT Wildtyp

Z

Zo-1 Zona occludens Protein-1

Zusammenfassung

Die Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist mit einem veränderten Mikrobiom der Lunge und einem erhöhten Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, assoziiert. Die Infektion der Lunge mit COPD-typischen gram-negativen Bakterien wie nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) trägt zur chronischen Entzündung und zu Exazerbationen bei COPD-Patienten bei. In dieser Arbeit wurde in einem metastatischen Lungenkrebsmodell mit Lewis Lung Carcinoma Zellen (LLC) untersucht, auf welche Weise bakterielle Lungenpathogene bei einer COPD-artigen Entzündung das Tumormikromilieu regulieren und das Tumorwachstum fördern.

Es wurde beobachtet, dass die Exposition von Mäusen mit Zigarettenrauch (CS) und NTHi zu einem synergistischen Wachstum von Lungentumoren führt. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass CS einen pulmonalen Barrierschaden hervorruft, der es bakteriellen Faktoren erlaubt, in das Tumorgewebe zu translozieren. Eine Zigarettenrauchexposition hatte *in vitro* eine erhöhte Permeabilität von Atemwegsepithelzellen und *in vivo* eine verminderte Expression von Tight Junction Proteinen zur Folge. Weiterhin führte die Exposition mit CS und NTHi zu einer Beeinträchtigung der pulmonalen Integrität. Dies konnte anhand höherer Albumin- und Laktat-Dehydrogenase-Konzentrationen in der Bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit nachgewiesen werden. In Tieren, die der Kombination von CS und NTHi exponiert waren, ging eine vermehrte Translokation bakterieller Bestandteile mit einer erhöhten tumorassoziierten Entzündung und Tumorproliferation einher. *In vitro* wurde beobachtet, dass Bakterien und Toll-like-Rezeptor (TLR) Liganden die Tumorproliferation in Lungenkrebszellen direkt induzieren können.

Mit Hilfe von IL-17A-defizienten Mäusen konnte dargelegt werden, dass IL-17A die tumorassoziierte Entzündung und Tumorproliferation bei pulmonaler Entzündung fördert.

Das Zytokin IL-17C wird im Gegensatz zum Zytokin IL-17A, das von Immunzellen exprimiert wird, von Strukturzellen wie Epithelzellen gebildet. IL-17C vermittelt die Entzündung in Epithelzellen autokrin und fördert die Rekrutierung von Entzündungszellen in das Gewebe. In einer Kaplan-Meier Analyse von frei verfügbaren Affymetrix-Daten wurde ein ungünstiger Einfluss einer hohen IL-17C Expression und seines Rezeptors IL-17RE auf das Gesamtüberleben von Lungenkrebspatienten festgestellt. In humanen Lungenkrebsproben konnte IL-17C mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen werden. Hierbei wurde IL-17C als negativer prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen identifiziert. *In vivo* und *in vitro* Studien zeigten, dass bei COPD-typischer Entzündung NTHi die Expression von IL-17C über TLR reguliert. Versuche mit IL-17C-defizienten Tieren belegten, dass IL-17C bei einer pulmonalen Entzündung die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenparenchym und in die Tumormikroumgebung vermittelt. Tumorassoziierte Entzündung, Tumorproliferation und Tumorwachstum waren bei TLR-2/4- und IL-17C-defizienten Mäusen signifikant vermindert. IL-17C verstärkte *in vitro* und *in vivo* die Bildung von neutrophilen Chemokinen in Lungenkrebszellen. *In vitro* und *in vivo* hatte IL-17C jedoch keinen Einfluss auf zellzyklusregulierende Gene und die Apoptose. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das epitheliale Zytokin IL-17C die neutrophile Entzündung in der Tumormikroumgebung fördert und die Verbindung zwischen pathologischem Mikrobiom und gesteigertem Tumorwachstum herstellt.

Summary

The chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with an aberrant microbiome of the lung and with an increased risk of developing lung cancer. Infections of the lung with typical COPD bacteria, like nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi), contribute to the inflammation and exacerbations in COPD patients. In this thesis it was investigated how bacterial lung pathogens regulate the tumor microenvironment and promote tumor growth during a COPD-like inflammation in a metastatic lung cancer model with Lewis lung carcinoma cells (LLC).

It was shown that the exposition to cigarette smoke (CS) and NTHi led to a synergistical growth of lung tumors. Mechanistically, CS led to a loss of pulmonary barrier, which allowed bacterial factors to translocate into the tumor tissue. CS increased the permeability of respiratory epithelial cells *in vitro* and decreased the expression of tight junction proteins *in vivo*. Further the integrity of the pulmonary barrier was impaired by the exposition to the combination of CS and NTHi. This was shown with increased concentrations of albumin and lactate dehydrogenase in the bronchoalveolar lavage. An increased translocation of bacterial factors was associated with tumor proliferation in animals exposed to the combination of CS and NTHi. *In vitro* it was demonstrated that bacteria and toll-like-receptors (TLR) induce tumor proliferation directly. It was shown with IL-17A deficient mice that IL-17A promotes the tumor associated inflammation and tumor proliferation during pulmonary inflammation.

In contrast to IL-17A, which is expressed by immune cells, IL-17C is only expressed by epithelial cells. IL-17C mediates inflammation in epithelial cells in an autokrin manner und promotes the recruitment of inflammatory cells into the tissue. A high IL-17C expression was identified as a negative

prognostic factor for the overall survival of lung cancer patients in a Kaplan-Meier survival analysis of unrestricted Affymetrix-data. IL-17C was detected by immunohistochemical staining in human lung cancer samples. Here IL-17C was identified as a negative prognostic factor for patients with lymph node metastasis. In a COPD-like inflammation in *in vitro* and *in vivo* studies, NTHi regulates the expression of IL-17C TLR-dependent. Studies with IL-17C-deficient mice showed that IL-17C mediates the recruitment of neutrophil granulocytes in the lung parenchyma and tumor microenvironment during pulmonary inflammation. Tumor associated inflammation, tumor proliferation and tumor growth were significantly decreased in TLR-2/4- and IL-17C-deficient mice. IL-17C increased the expression of neutrophil chemokines in lung cancer cell lines *in vitro*. Further IL-17C did not affect cell cycle regulating genes *in vitro* and *in vivo*. The data of the present work show that the epithelial cytokine IL-17C promotes the neutrophilic inflammation in the tumor microenvironment and links a pathological microbiome with increased tumor growth.

1 Einleitung

1.1 Lungenkrebs und COPD

Weltweit führt Lungenkrebs zu mehr als einer Million Todesfälle pro Jahr und ist damit eine der tödlichsten Krebsformen überhaupt [1]. Man unterscheidet die Lungenkarzinome in nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLC) und in kleinzellige Lungenkarzinome. Ca. 85 % aller Lungenkrebserkrankungen werden als NSCLC mit einer 5-Jahres-Überlebenserwartung von 15.9 % diagnostiziert [2;3]. Bislang existieren für Patienten mit Lungenkarzinom nur ungenügende Therapiemöglichkeiten. Zigarettenrauch ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Lungenkrebs und der Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Bis zu 70% der Patienten mit Lungenkrebs haben eine koexistierende COPD. Die COPD wiederum ist einer der größten Risikofaktoren für die Entstehung von Lungenkrebs [4-6]. Das Risiko von COPD Patienten an Lungenkrebs zu erkranken, ist 2- bis 5-mal höher als das von Rauchern ohne COPD [7-10]. Weiterhin ist die Gesamtüberlebensprognose von Lungenkrebspatienten mit COPD schlechter als von Lungenkrebspatienten ohne COPD [10-12]. Zigarettenrauch induzierte und chronische Entzündungen in COPD Patienten spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Lungenkrebs [10]. So konnten präklinische Studien bereits zeigen, dass die Zigarettenrauch induzierte und COPD-assoziierte Entzündung das Wachstum von Lungenkrebs fördert [13-18].

1.2 Infektionen in der COPD

Unter normalen Bedingungen sind das gesunde Tracheobronchialsystem und das Lungenparenchym frei von Pathogenen. Bei der COPD ist der angeborene Abwehrmechanismus der Lunge beeinträchtigt und vor allem durch Zigarettenrauch oder andere Umweltgifte geschwächt [19]. Durch den geschädigten Abwehrmechanismus der Lunge, wie etwa die mukoziliäre Klärung, können sich mikrobielle Pathogene im unteren respiratorischen Trakt ansiedeln. Mikrobielle Infektionen der Lunge verstärken ihrerseits den Verlust an mukoziliärer Klärung und tragen zu einer gesteigerten Mukussektion bei [19-21]. Neben einer leichteren Besiedelung der Lunge führen Umweltgifte und Zigarettenrauch ebenfalls zu einer schnelleren Kolonialisierung der Mundhöhle und der oberen Atemwege, was mit einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen der Lunge einhergeht [19;22] (Abbildung 1).

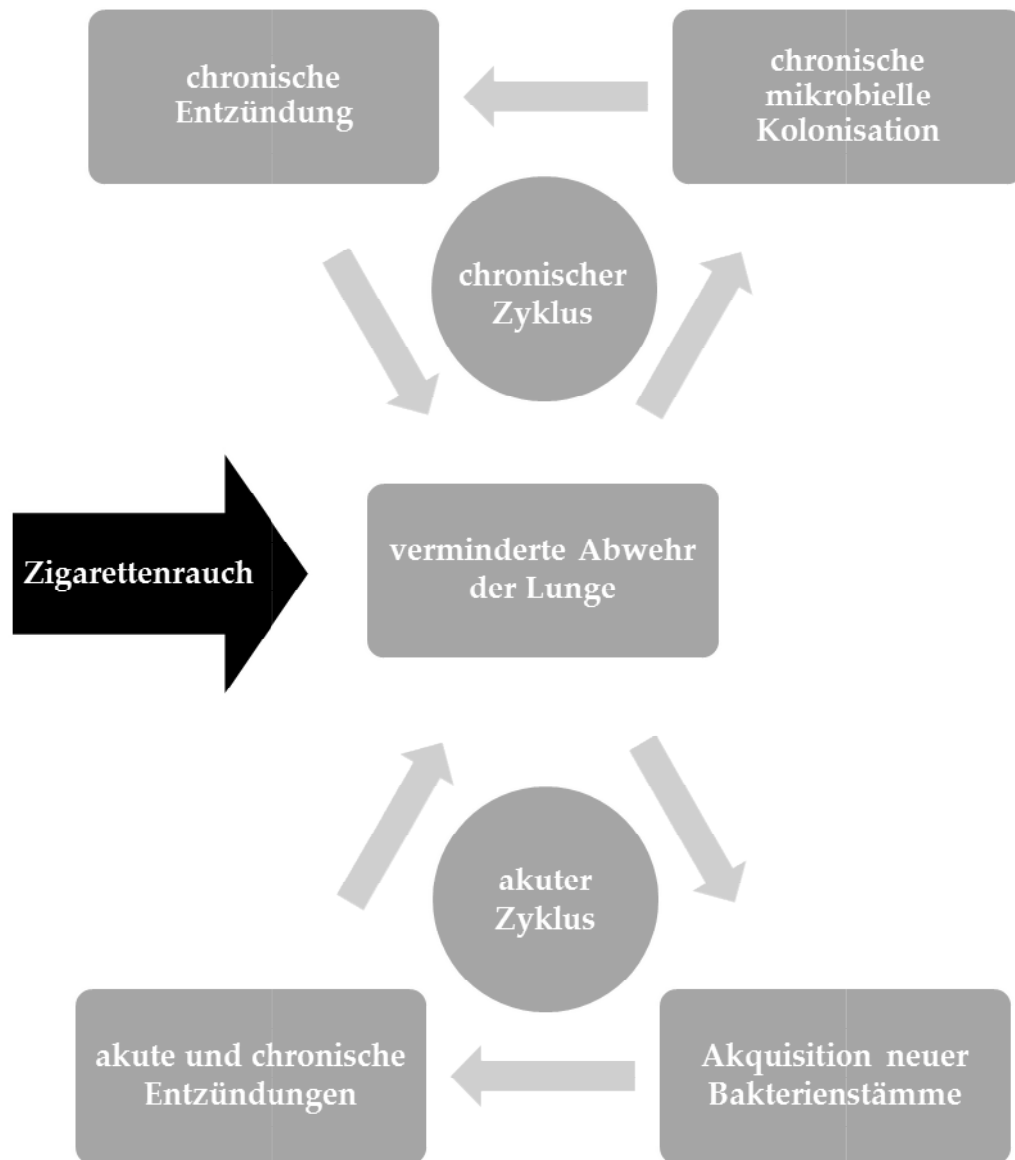


Abbildung 1: Der akute und chronische Zyklus der COPD, modifiziert nach [19].

Bakterielle Erreger tragen häufig zu Exazerbationen und zu chronischen pulmonalen Entzündungen bei, die für COPD charakteristisch sind [19;21]. So können eine Vielzahl unterschiedlicher mikrobieller Pathogene in einer COPD vorkommen (Tabelle 1). Zu den häufigsten Bakterien zählen nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) und *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) sowie *Chlamydomphila pneumoniae* und *Mycoplasma pneumoniae* [19].

Tabelle 1: Bakterielle Pathogene und deren Rolle in Exazerbation und stabiler COPD, modifiziert nach [19].

Bakterium	Rolle in Exazerbation	Rolle in stabiler COPD
<i>Haemophilus influenzae</i>	20 – 30 %	Hauptpathogen
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10 – 15 %	geringe Rolle
<i>Moraxella catarrhalis</i>	10 – 15 %	geringe Rolle
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 – 10 %, häufig in fortgeschrittener Krankheit	bei fortgeschrittener Krankheit
<i>Entero-bacteriaceae</i>	isoliert in fortgeschrittener Krankheit	unbekannt
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	häufig isoliert, selten Ursache	unwahrscheinlich
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	häufig isoliert, selten Ursache	unwahrscheinlich
<i>Staphylococcus aureus</i>	selten isoliert, selten Ursache	Unwahrscheinlich
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	3 – 5 %	häufig detektiert
<i>Mycoplasma pneumonia</i>	1 – 2 %	Unwahrscheinlich

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Kolonisation und Infektion des Tracheobronchialsystems als entzündlicher Stimulus zur Progression der COPD beitragen kann [19;23]. So geht eine stark erhöhte bakterielle Last in den Lungen der COPD Patienten mit einer stärkeren neutrophilen

Entzündung einher [24;25]. Darüber hinaus führt die Besiedelung der Lunge mit neuen bakteriellen Stämmen während einer Exazerbationsphase zu einer schwereren neutrophilen und systemischen Entzündung. Dies geht mit erhöhten Konzentrationen von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und neutrophiler Elastase im Sputum einher [21;26]. Eine andere Studie zeigte ebenfalls, dass kolonisierte COPD Patienten eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten und das Chemokin Interleukin-8 (IL-8) in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) Flüssigkeit aufwiesen. Dies verdeutlicht, dass die bakterielle Kolonisation die Entzündung in den distalen Atemwegen von COPD Patienten fördert [19;23].

1.3 Entzündung und Tumorgenese

Charakteristisch für Krebs ist vor allem ein unkontrolliertes Wachstum eines bestimmten Zelltyps und das Eindringen und Ausbreiten dieses Zelltyps in das umgebende Gewebe [27]. Hierbei kennzeichnen verschiedene Veränderungen der Zellphysiologie eine Tumorzelle. Dazu zählen unter anderen eine verringerte Sensitivität gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, die molekulare Umgehung des programmierten Zelltods beziehungsweise der Apoptose, ein unlimitedes Replikationspotential, eine gute Angiogenese, eine Gewebeinvasion und eine Metastasierung [27;28]. Die Tumorgenese von einer gesunden Zelle zur Krebszelle kann allgemein in drei Phasen unterteilt werden: Tumorinitiation, Tumorpromotion und Tumorprogression (Abbildung 2).

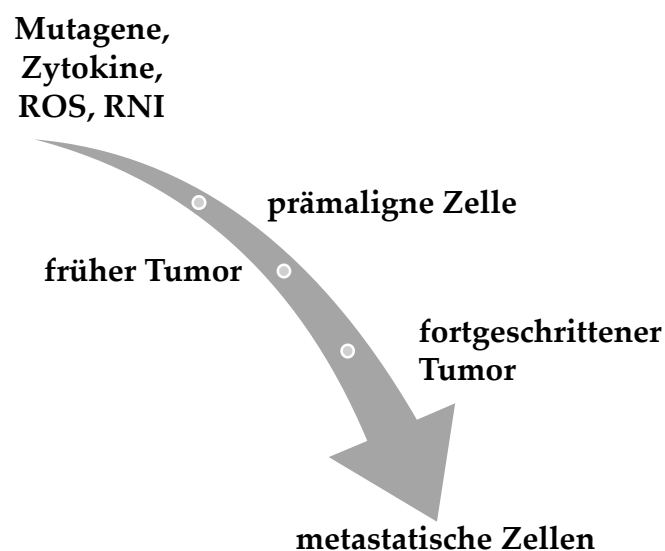


Abbildung 2: Die Tumorgenese von gesunden Zellen zu metastatischen Zellen, modifiziert nach [29].

Entzündungsprozesse spielen in allen drei Phasen eine entscheidende Rolle. Bereits im 19. Jahrhundert wies Rudolf Virchow das Vorhandensein von Leukozyten im Tumorgewebe nach und stellte einen ersten Zusammenhang zwischen Entzündung und Krebs her [29;30]. Präklinische und klinische Studien zeigten in den letzten Jahrzehnten eine Verbindung zwischen Entzündungen und der Entstehung von Lungenkrebs [4;5;16-18;31;32]. So konnte in metastatischen und K-ras-induzierten murinen Lungenkrebsmodellen gezeigt werden, dass Entzündungs- und Immunzellen in die Tumormikroumgebung rekrutiert werden und dort die Tumor-assoziierte Entzündung und Tumorproliferation durch die Abgabe von Entzündungsmediatoren fördern [4;16-18;31;33].

1.3.1 Entzündung und Tumorinitiation

Die Tumorinitiation beinhaltet vor allem genomische Alterationen, wobei die Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Zelle durch chemische oder physikalische Karzinogene mutiert. Durch diese Mutation kommt es zur Aktivierung eines Onkogens oder zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens (z.B. K-ras) [27]. Infolgedessen erwirbt die Zelle einen Wachstums- und Überlebensvorteil gegenüber ihrer Nachbarzelle [29].

Es wird angenommen, dass chronische Entzündungen zur Tumorinitiation führen. Eine chronische Entzündung kann durch Schadstoffe aus der Umwelt aber auch durch Pathogene ausgelöst werden. Von den Krebsfällen gehen bis zu 20 % mit einer chronischen Infektion einher, 30 % sind auf Zigarettenrauch und inhalierte Schadstoffe (z.B. Asbest) und 35 % auf die Ernährung zurückzuführen [29;34]. Neben Zigarettenrauch gibt es zahlreiche weitere Risikofaktoren und Umwelteinflüsse, die Krebs auslösen

können und häufig mit einer Form der chronischen Entzündung in Verbindung stehen. Beispiele für chronische Entzündungen und damit assoziierte Erkrankungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Beispiele für Entzündungen und die mit ihnen assoziierte Malignität, modifiziert nach [35].

Entzündung	Assoziierte Erkrankung
Asbestose, Staublunge	Lungenkarzinom
UV Strahlung	Melanom
Asbestose	Mesotheliom
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	Darmkarzinom
Gallenstein assoziierte Cholezystitis	Gallenblasenkarzinom
<i>TRYP1</i> Mutation assoziierte Pankreatitis und Alkoholismus assoziierte Pankreatitis	Pankreaskarzinom
Sialadenitis	Sialadenitiskarzinom

Ein Mechanismus, bei dem die Entzündung zur Tumorinitiation beiträgt, ist beispielsweise die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) durch aktivierte Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Die ROS und RNS interagieren dann mit der genomischen DNA in Epithelzellen und führen dort zu Mutationen und genomischer Instabilität [27;36].

Die für eine chronische Entzündung und nachfolgende Tumorentwicklung am stärksten anfälligen Organe sind neben der Lunge die Blase, der Ösophagus, der Pankreas und am häufigsten der Gastrointestinaltrakt [37].

In den meisten Fällen ist jedoch unklar, was die Entzündung ausgelöst hat. Im letzten Jahrzehnt gab es Hinweise darauf, dass auch eine abnormale pathogene mikrobielle Kolonisation dazu beitragen kann. In etwa einem Fünftel aller Krebsfälle gibt es eine direkte Verbindung zu einer pathogenen Besiedlung. Die Krebs fördernden Eigenschaften verschiedener Mikroorganismen wie Bakterien und Parasiten, aber auch Viren, sind hier mit der Tumorentwicklung assoziiert [35] und erhöhen das Risiko für die Entstehung von Krebsläsionen [29;38]. Vor allem Infektionen mit Hepatitis B und C erhöhen das Risiko für die Entstehung eines Leberzellkarzinoms [29;39;40].

Bereits in den 1890er Jahren wurden Bakterien im Tumorgewebe nachgewiesen [41]. Ein Zusammenspiel zwischen einer Infektion und der Tumorgenese wird seit langem diskutiert. Eines der prominentesten Beispiele für die Beteiligung von Bakterien bei einer entzündungsinduzierten Tumorinitiation ist eine Infektion mit *Helicobacter pylori*. Die Infektion mit *H. pylori* ist der größte Risikofaktor für die Entstehung des Magenkarzinoms [42] und weltweit der zweithäufigste Auslöser des Magenkarzinoms [27;43]. Darüber hinaus bestehen auch Zusammenhänge zwischen Blasen- und Darmkrebs und Infektionen mit *Schistosoma* oder *Bacteroides* [29;39;40] sowie der Entstehung des Gallenblasenkarzinom und der Infektion mit *Salmonella enterica* [35;44].

1.3.2 Entzündung und Tumorpromotion

Die Tumorpromotion ist ein Prozess, in dem eine einzelne mutierte Zelle zu einem vollständig entwickelten Primärtumor heranwächst. Die Tumorpromotion ist gekennzeichnet durch die weitere Proliferation der genetisch veränderten Zelle. Das initiale Tumorwachstum hängt vor allem

von einer erhöhten Proliferationsrate und einem reduzierten Zelltod ab. Beide Faktoren können durch Entzündungen stimuliert werden. Die meisten Tumor fördernden Effekte von Entzündungsprozessen gibt es auf der Ebene der Tumorpromotion [29;39]. Erste Beweise für eine entzündungsvermittelte Tumorpromotion wurden in Mausmodellen für Haut-, Darm- und Leberkrebs gesammelt [29;45].

Der Nukleäre Faktor-kappaB (NF- κ B) Signalweg ist an akuten Entzündungen und Zellüberlebensmechanismen beteiligt. Viele pro-entzündliche Zytokine und Chemokine wie TNF- α , IL-6 oder IL-8 werden über einen NF- κ B abhängigen Signalweg aktiviert und mit der Tumorentwicklung und Tumorprogression in Menschen und Mäusen assoziiert [37]. In den meisten Tumoren kommt es zu einer Aktivierung des zentralen Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dies kann durch Mutationen in Faktoren geschehen, die die Aktivität von NF- κ B regulieren. In der Tumormikroumgebung kommt es meist auch zu einer erhöhten Bildung von inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen, die ihrerseits über NF- κ B zu einer erhöhten Expression von pro-entzündlichen, proliferativen und überlebensfördernden Genen führen [27;29;46]. Dieser molekulare Zusammenhang zwischen Entzündung und Krebs wurde erstmals in der Leber und im Darm gezeigt [47;48]. Hier ist TNF- α aus Endothel- und Entzündungszellen ein Mediator der Aktivierung von NF- κ B in Hepatozyten. Dies ist für die Progression des Leberzellkarzinoms notwendig [27;47]. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung des NF- κ B Signalwegs in verschiedensten Malignitäten beschrieben [27;49]. Neueste Mausstudien zeigten, dass es sich bei dem Inhibitor der NF- κ B Untereinheit β (IKK- β) um die Verbindung zwischen Entzündung und Karzinogenese handelt [49] und dieser die Tumorpromotion vermittelt [27;47;48]. In einem murinen Modell für Lungenkrebs gilt die durch

myeloide Zellen vermittelte pulmonale Entzündung als ein wichtiger Antrieb für das Wachstum des Lungenkarzinoms. Das Rauchen induziert hierbei eine Entzündung in myeloiden Zellen, welche über die NF- κ B Untereinheit IKK- β vermittelt wird [18]. In präklinischen Studien zeigte sich auch, dass die RelA/p65 Untereinheit von NF- κ B für das Wachstum von Lungenkarzinomen eine wichtige Rolle spielt [16;17]. NF- κ B reguliert hier die Expression von Entzündungsmediatoren, welche die Tumorpheriferation fördern [16-18]. Außerdem aktivieren viele Onkogene und Karzinogene den Transkriptionsfaktor NF- κ B [27;50].

In der Mehrzahl der Malignome ist der Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert. Er kontrolliert das Zellüberleben, die Proliferation, das Wachstum, die Angiogenese, die Invasivität, die Motilität sowie die Zytokin- und Chemokinproduktion [29;51;52]. Der Transkriptionsfaktor STAT3 fördert die Zellproliferation, indem er die Expression der den Zellzyklus regulierenden Gene *cyclin* D1, D2, B sowie *MYC* hochreguliert. STAT3 führt weiterhin zu einem erhöhten Zellüberleben durch die Hochregulation der Expression der anti-apoptotischen Gene *BCL2* und *BCL-X_L* [35;53-55]. Studien zeigten, dass STAT3 bei der Progression, nicht aber bei der Initiation von intra-epithelialen Neoplasien zu Adenokarzinomen im Pankreas, eine wichtige Rolle spielt [35;56].

1.3.3 Entzündung und Tumorprogression

Kennzeichnend für die Tumorprogression ist vor allem eine Invasion und Metastasierung sowie Zunahme der Tumorgröße. In dieser Phase kommen häufig zusätzliche genetische Veränderungen hinzu, die zu einem weiteren Wachstumsvorteil führen und die Malignität weiter erhöhen [27]. Die Tumorprogression ist ein Prozess, in dem der Primärtumor häufig in

umliegendes Gewebe oder andere Organe metastasiert. Vom klinischen Standpunkt gesehen ist die Metastasierung der kritischste Aspekt der Tumorgenese, da 90 % der Krebsmortalität durch Metastasen verursacht wird [29;35]. In diesem Zusammenhang wurde bereits festgestellt, dass entzündliche Mediatoren einen erheblichen Beitrag zur Metastasierung leisten [35;57]. Auch hinsichtlich der Tumorprogression bei verschiedenen Tumorarten spielen Mikroorganismen und bakterielle Produkte durch einen direkten Einfluss auf die Tumorzellen oder die Induktion einer Entzündung eine wichtige Rolle [58].

Der Prozess der Metastasierung kann allgemein in vier Hauptschritte unterteilt werden.

Den ersten Schritt stellt dabei die epithelial-mesenchymale Transition dar, in welcher die Krebszelle einen fibroblastoiden Charakter bekommt. Die Krebszelle gewinnt an Motilität, die es ihr erlaubt, in umgebendes Epithel einzudringen und efferente Blut- und Lymphgefäße zu erreichen. Ein Schlüsselereignis der epithelial-mesenchymalen Transition ist der Verlust der Expression von E-Cadherin, das Zell-Zell-Kontakte vermittelt [29;59].

Ein wichtiger Regulator der epithelial-mesenchymalen Transition und Metastasierung ist der Transforming growth factor β (TGF β). Erhöhte TGF β -Werte werden häufig mit einer schlechteren Überlebensprognose assoziiert [60]. Ein weiterer kritischer Regulator ist der Transkriptionsfaktor Snail, der die Transkription von E-Cadherin in Epithelzellen reprimiert. Hierbei zeigen Studien, dass Snail als Antwort auf TNF- α stabilisiert wird, was einen wichtigen Vorgang für die Zellmigration und Metastasierung darstellt [29;61]. Des Weiteren fördert eine Aktivierung von NF- κ B und STAT3, welche durch TNF, IL-6 und IL-1 β vermittelt ist, die epithelial-mesenchymale Transition durch die Herunterregulation von E-Cadherin [35;61;62].

Nach der epithelial-mesenchymalen Transition dringt die Krebszelle im zweiten Schritt in ein Blut- oder Lymphgefäß ein. Die Entzündung begünstigt diesen Prozess durch die Produktion von verschiedenen Mediatoren, welche die vaskuläre Permeabilität erhöhen. Vor allem eine TNF-basierte Entzündung erhöht hierbei die vaskuläre Permeabilität [63].

Im dritten Schritt wird die überlebende Krebszelle durch die Zirkulation des Blutes oder der Lymphgefäße transportiert. Allerdings ist belegt worden, dass lediglich 0.01 % der Krebszellen, welche in die Zirkulation eintreten, überleben und zu einer Mikrometastase heranwachsen [29;64].

Im letzten Schritt kommt es zu einem integrinvermittelten Arrest der Zelle, der den Ausbruch der Zelle aus der Zirkulation ermöglicht. Schließlich interagiert die metastatische Zelle mit Immun-, Entzündungs- und Stromazellen und beginnt zu proliferieren [29;65].

1.3.4 Immunzellen in der Tumorgenese

In der Tumormikroumgebung verschiedenster Tumorentitäten befinden sich unterschiedliche Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, myeloide Suppressorzellen) und des adaptiven Immunsystems (T- und B-Lymphozyten). Tumorassoziierte Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen und T-Zellen werden durch die Interaktion zwischen Stromazellen und malignen Zellen in die Tumormikroumgebung rekrutiert. Dabei produzieren Leukozyten Wachstumsfaktoren, Angiogenesefaktoren, Zytokine und Proteasen. Diese Proteine erlauben es dem Tumor zu proliferieren, zu metastasieren und das umgebene Gewebe zu infiltrieren [27;37;66].

Die am häufigsten in der Tumormikroumgebung vorkommenden Immunzellen sind tumorassoziierte Makrophagen und T-Zellen. Tumorassoziierte Makrophagen fördern das Tumorwachstum und können für die Angiogenese, die Invasion und Metastasierung notwendig sein [67]. In der Lunge gehen hohe Zahlen tumorassoziierter Makrophagen mit einer schlechteren Überlebensprognose einher [27;68;69]. Die Zahl der tumorassozierten Makrophagen korreliert auch mit dem Tumorstadium und der Metastasierung [70]. Anhand von Mausmodellen konnte eine Beteiligung von myeloiden Zellen, wie etwa Makrophagen, am Wachstum von Lungenkrebs nachgewiesen werden. Myeloide Zellen erwiesen sich dabei als essentiell beim rauchinduziertem Wachstum von Lungentumoren [16;17;31]. Darüber hinaus sind Tumorzellen in der Lage, Faktoren zu sezernieren, die über den Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2) myeloide Zellen aktivieren. Aktivierte myeloide Zellen vermitteln über Zytokine die Tumorproliferation [31]. Ein wichtiger Faktor ist hierbei $\text{TNF-}\alpha$ [16;17;31].

Es wurde beschrieben, dass Makrophagen als Antwort auf solche Stimuli wie Interferon- γ ($\text{INF-}\gamma$) und IL-4 verschiedene Aktivierungsprogramme durchlaufen [71]. Dabei können Makrophagen in M1 und M2 unterteilt werden. M1 Makrophagen exprimieren proentzündliche Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 und den Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), wenn sie mit $\text{INF-}\gamma$ aktiviert werden [71;72]. M2 Makrophagen hingegen exprimieren vor allem das antientzündliche IL-10 sowie Arginase, den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), wenn sie *in vitro* durch IL-4, IL-10 und IL-13 stimuliert wurden [71;72]. M1 Makrophagen gelten als antitumoral und M2 Makrophagen als Tumor fördernd [27;73]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass tumorassoziierte Makrophagen über eine bidirektionale Wechselwirkung

mit Krebszellen durch die Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 beim Krebswachstum und der Metastasierung eine zentrale Rolle spielen [70].

Neuere Studien legen auch eine Rolle von neutrophilen Granulozyten beim Wachstum von Lungentumoren nahe. Eine Studie von Bellocq zeigt, dass neutrophile Granulozyten im Alveolarraum der Lungen von Patienten mit Bronchialkarzinom vorhanden sind. Die neutrophilen Granulozyten werden über das aus Tumorzellen stammende neutrophile Chemokin Il-8 rekrutiert und aktiviert. Hierbei korrelierte die Anzahl an neutrophilen Granulozyten mit einem verschlechterten Outcome [74]. Überdies sind erhöhte systemische Level von neutrophilen Granulozyten ein unabhängiger prognostischer Faktor für Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC [75]. Verschiedene Mausstudien zeigten, dass neutrophile Granulozyten und Faktoren, die von neutrophilen Granulozyten abgegeben werden, das Tumorwachstum fördern [76-79].

Studien deuten auch auf eine Rolle von IL-17-sekretierenden Immunzellen beim Wachstum von Lungenkrebs hin. So konnte in einem K-ras basierten Modell für Lungenkrebs gezeigt werden, dass bei einer COPD-ähnlichen Entzündung das Lungenkrebswachstum IL-17A- und Th17-abhängig reguliert ist [13;14].

1.4 Die Interleukin-17 Familie

Die Familie der IL-17-Zytokine besteht aus den Zytokinen IL-17A bis IL-17F [80;81]. Die Zytokine binden an verschiedene Interleukin-17-Rezeptoren (IL-17R), um ihre Effektorantwort zu vermitteln [80-83]. Zur IL-17-Rezeptorfamilie gehören IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD und IL-17RE [84;85].

1.4.1 IL-17A vermittelte Immunantwort und Pathogenese

T-Zellen, hierbei vor allem die Subgruppe der T-Helferzellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und innate lymphoid cells, übernehmen wichtige regulatorische Funktionen bei Infektionen [86;87]. Diese T-Zellen produzieren vor allem IL-17A, IL-17F und IL-22, welche die Mechanismen der angeborenen Immunantwort von Epithelzellen und Fibroblasten steigern [83;88;89]. IL-17A induziert die Expression pro-entzündlicher Chemokine, Zytokine und antimikrobieller Peptide und die Akute-Phase-Antwort von Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen über die IL-17A Rezeptoren IL-17RA und IL-17RC [80;81;83]. Während IL-17RA fast überall exprimiert ist, wird der Rezeptor IL-17RC lediglich auf nicht-hämatopoetischen Zellen gebildet [90;91]. IL-17RA und IL-17RC bilden zusammen einen heterodimeren Komplex, der für die Effektorantwort von IL-17A notwendig ist [85;92-94]. Verschiedene Studien zeigten, dass IL-17A zusammen mit Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β eine synergistische Induktion der pro-entzündlichen Antwort in Strukturzellen bewirkt [83;95]. IL-17A-vermittelte Entzündungen spielen auch in der Pathogenese verschiedenster Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis, Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose und der Chronisch-entzündlichen

Darmerkrankung eine Rolle [83;96-100]. Studien belegten, dass IL-17A eine ebenso wichtige Rolle bei der Entstehung von COPD zukommt. Hier zeigte sich, dass in der Bronchialschleimhaut von COPD Patienten vermehrt Th17-Zellen und Zellen, die positiv für IL-17A waren, vorkommen [101]. Darüber hinaus wurden erhöhte Konzentrationen von IL-17A im Sputum bei NTHi-assoziierten Exazerbationen nachgewiesen. Im murinen Exazerbationsmodell konnte eine Beteiligung von IL-17A an der NTHi-induzierten Neutrophilie dargelegt werden [102].

1.4.2 IL-17C vermittelte Immunantwort und Pathogenese

IL-17C bindet wie IL-17A an einen heterodimeren Rezeptorkomplex. Dieser Rezeptorkomplex besteht aus IL-17RA und IL-17RE [83]. IL-17RE ist hierbei der spezifische funktionelle Rezeptor von IL-17C, während IL-17RA auch IL-17A bindet [84;85].

Im Gegensatz zu IL-17A, welches vorrangig von Lymphozyten exprimiert ist, wird IL-17C von Epithelzellen und Keratinozyten gebildet [83;85]. Die Expression von IL-17C wird vor allem durch die Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) und Entzündungsmediatoren wie TNF- α vermittelt [83;85;103;104]. Es wurde bereits gezeigt, dass IL-17C durch TLR Agonisten reguliert wird [83]. So konnte in Darmepithelzellen dargestellt werden, dass spezifische Liganden für TLR-2 und TLR-5 (Peptidoglycan, Flagellin) die Produktion von IL-17C induzieren [83;105]. Damit einhergehend ist bei Infektionen mit *Mycoplasma pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* im Haut- und Lungengewebe IL-17C detektiert worden [83;98;103;106;107]. Außerdem kann die Expression von IL-17C in humanen Keratinozyten und Darmepithelzellen durch eine Stimulation mit TNF- α , IL-1 β oder Bakterien induziert werden [83;85;103;105]. Es wurde auch nachgewiesen, dass

Lungenpathogene wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Haemophilus influenzae* sowie Liganden für TLR-3 und TLR-5 in respiratorischen Epithelzellen die Produktion von IL-17C induzieren [104;105]. Darüber hinaus verstärkt IL-17C über IL-17RE die Aktivität von Th17-Zellen [91].

IL-17C reguliert die Entzündung in Epithelzellen (z.B. Atemwegsepithelzellen) autokrin [83;104]. Präklinische Studien ergaben, dass Mäuse, denen der Rezeptor IL-17RE fehlt, eine geringere Expression antibakterieller Moleküle sowie eine höhere bakterielle Last und Mortalität bei einer Infektion aufwiesen [85]. *In vivo* und *in vitro* Experimente belegten, dass IL-17RE für die von IL-17C vermittelte Induktion von Genen für die Synthese antimikrobieller Peptide, pro-entzündlicher Zytokine und Chemokine notwendig ist [85]. IL-17C fördert die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Tumorgewebe [83;104;105;108]. Damit geht einher, dass IL-17C, welches mittels Adenoviren in die Lunge eingebracht wurde, zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten führt [91;108]. Neben der autokrinen Vermittlung der Entzündung in Epithelzellen, wie denen der Lunge, zeigte eine Studie auch, dass IL-17C aus epithelialen Zellen die Tumorgenese im Darm fördert [109].

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, mechanistische Einblicke in das bakterieninduzierte Tumorwachstum bei einer COPD-typischen Entzündung der Lunge zu erlangen. Hierfür sollte im metastatischen Lungenkrebsmodell das Zusammenwirken von rauchinduzierter und bakterieller Entzündung auf die tumorassoziierte Entzündung, die Tumorproliferation und das Tumorwachstum untersucht werden. Diese *in vivo* Studien sollten durch *in vitro* Studien mit Lungenkrebszellen ergänzt werden. Mit Hilfe von humanen Patientendaten sollte der prognostische Wert von IL-17A und IL-17C in Bezug auf das Gesamtüberleben ermittelt werden. Weitere Zielsetzung war es, die Funktion von IL-17A und IL-17C beim Tumorwachstum mit TLR-2/4-, IL-17A- und IL-17C-defizienten Mäusen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die folgenden in Tabelle 3 aufgeführten Geräte wurden verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.

Gerät	Hersteller
Brutschrank Hera cell	Heraeus (Dtl., Hanau)
Facscanto II.	Becton Dickinson (USA, Franklin)
Hera Cell	Thermo Scientific (Dtl., Schwerte)
Inkubator Minitron	Infors HT (Dtl., Einsbach)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss (Dtl., Oberkochen)
Lichtmikroskop DM750	Leica (Dtl., Wetzlar)
Mikroplattenleser Magellan	Tecan (Dtl., Mainz)
Mikroplattenleser FLUOstar Omega	BMG Labtech (Dtl., Ortenberg)
Nano Drop 8000	Thermo Scientific (Dtl., Schwerte)
CFX96 Touch Real Time System	Bio-Rad (USA, Hercules)
MyCycler	Bio-Rad (USA, Hercules)
Pari MASTER nebulizer	Pari (Dtl., Starnberg)
Photometer Ultrospec 2100 pro	Biochrom (Dtl., Berlin)
Rauchmaschine TE-10	Teague Enterprises (USA, Woodland)
Sterilbank Hera safe	Heraeus (Dtl., Hanau)
Venenkanüle Vasofix Braunüle; 18 G	Braun (Dtl., Melsungen)
Zählkammer Neubauer improved	Hartenstein (Dtl., Würzburg)

Gerät	Hersteller
CASY Cell Counter	Innovatis (Dtl., Durmersheim)
Zentrifuge Cellspin II	Tharmac (Dtl., Waldsolms)
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific (Dtl., Schwerte)
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific (Dtl., Schwerte)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Scientific (Dtl., Schwerte)

Kunststoffmaterialien für zellbiologische Versuche (Zellkulturgefäße, Spritzen, Kanülen, Venenkanülen u.a.) wurden von den folgenden Firmen bezogen: B. Braun, Sartorius, Eppendorf und Greiner Bio-One.

2.1.2 Software

Die Programme Excel, PowerPoint und Word der Firma Microsoft wurden für Texte und Kalkulationen verwendet. GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software Inc. ist für die Erarbeitung von Graphiken und zur statistischen Auswertungen von Daten eingesetzt worden.

Zur Auswertung von immunhistochemischen Färbungen wurden die Software ImageJ und GIMP verwendet. Berechnungen von Tumorflächen und anderen Gewebeflächen erfolgten mit Hilfe von ImageJ. Histologische Bilder wurden mit der Software Visiomorph der Firma Visiopharm und der Software Cellsens Dimension der Firma Olympus Life Science aufgenommen und bearbeitet.

2.1.3 Lösungen

Die nachfolgenden in Tabelle 4 aufgeführten Lösungen wurden verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Lösungen.

Natriumacetat 3 M	246 g/l Natriumacetat, pH 5,2
PBS	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCL, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Agaroselösung 1,5 %	15 g/l Agarose in PBS
Formalinlösung 4 %	40 ml/l in PBS

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme

Die folgenden Bakterienstämme sind für Versuche herangezogen worden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft.

Bakterienstamm	Herkunft
Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>	Patientenisolat
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patientenisolat

2.2.2 Kultivierung von Bakterien

2.2.2.1 Nontypeable *Haemophilus influenzae*

NTHi wurde auf Schokoladenagar-Platten (BD, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h kultiviert. Hiernach ist eine einzelne Bakterienkolonie in Brain-Heart-Infusion Broth (BD, Deutschland) mit 3.5 µg/ml NAD⁺ (Sigma Aldrich, USA) und 2 % Supplement B (BD, Deutschland) überführt und bei 37 °C kultiviert worden.

2.2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

PAO wurde auf LB-Platten bei 37 °C, 5 % CO₂ für 24 h kultiviert. Danach ist eine einzelne Bakterienkolonie in LB-Medium überführt und bei 37 °C kultiviert worden.

2.2.3 Abtötung von Bakterien

2.2.3.1 Hitzeinaktivierung von Bakterien

Zur Hitzeinaktivierung wurden Bakterien (PAO, NTHi) auf eine Temperatur von 70 °C über eine Zeit von 45 min erhitzt. Nachfolgend ist die Bakteriensuspension aliquotiert worden. Zur Kontrolle der Hitzeinaktivierung erfolgten Kontrollausstriche der Suspension auf dem jeweils geeigneten Nährboden.

2.2.3.2 Herstellung von bakteriellen Nontypeable *Haemophilus influenzae*-Lysaten

Eine NTHi-Flüssigkultur wurde nach einer 24 h Kultivierung bei 2500 g für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpallet in 1 %igem PBS wieder aufgenommen und resuspendiert. Diese Bakteriensuspension ist zunächst hitzeinaktiviert (2.2.3.1), nachfolgend für 30 Sekunden sonifiziert und auf eine Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml eingestellt worden. Die Lysate wurden in 7 ml Aliquots bei -80 °C gelagert. Die erfolgreiche Inaktivierung wurde mittels eines Kontrollausstrichs des Lysates auf Schokoladenagarplatten überprüft.

2.2.4 Anlegen eines Bakterienstocks

Zum Anlegen eines Bakterienstocks sind die Bakterien zunächst über Nacht kultiviert worden. Anschließend wurden 250 µl dieser Übernachtskultur mit 750 µl einer 100 %igen Glycerinlösung überschichtet, gevortext und bei -80 °C konserviert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA Isolation aus Zellkulturproben

Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus Proben der Zellkultur wurde mit Hilfe des NucleoSpin RNA Isolationskits von Macherey-Nagel nach Protokoll durchgeführt. Nach der Isolation erfolgte eine weitere Dnase-Behandlung. Hierzu ist Dnase im Verhältnis 1:10 mit dem entsprechenden Puffer verdünnt und zu der zuvor isolierten RNA-Suspension gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert worden. Darauf folgend wurde eine 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) im Verhältnis 1:10 und eine 100 %ige Ethanollösung im Verhältnis 1:2,5 hinzugegeben und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zentrifugation der Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min und 4 °C. Der Überstand wurde sodann verworfen und das entstandene Pellet mit 1 ml 75 %igem Ethanol gevortext. Anschließend wurde erneut für 10 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand ist verworfen und das Pellet in 30 µl Wasser aufgenommen worden.

2.3.2 RNA Isolation aus Lungen

Die RNA Isolation aus Lungen erfolgte mittels Trizol von der Firma Invitrogen. Hierzu wurden zunächst 2 ml Trizol mit einer halben Lunge (1 ml Trizol pro 100 mg Gewebe) zusammen homogenisiert. Nachfolgend ist die Suspension für 4 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert worden. Der Überstand wurde abgenommen und im Verhältnis 1:4 mit Chloroform der Firma Roth versetzt, geschüttelt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4 °C für 10 min

bei 12000 g. Anschließend ist lediglich die wässrige Phase mit 1 ml Isopropanol gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert worden. Nach der Inkubation erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 10 min und 12000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml reinem Ethanol gevortext und erneut bei 4 °C für 5 min und 7500 g zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Trocknung und Aufnahme des Pellets in 100 – 200 µl Wasser.

2.3.3 cDNA Synthese

Zur Synthese von cDNA aus isolierter und aufgearbeiteter RNA wurden die Kits First Strand cDNA Synthesis Kit und RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Fermentas verwendet.

Für die Synthese der cDNA sind jeweils 1 µg RNA in 10 µl Nuklease-freiem Wasser und 1 µl Oligo(dt)₁₈ Primer für 5 min bei 65 °C erhitzt worden. Nachfolgend wurde bei 4 °C der Master Mix (Tabelle 6) pro Ansatz hinzugefügt:

Tabelle 6: Master Mix cDNA Synthese.

4 µl	5x Reaction buffer
1 µl	RiboLock Rnase inhibitor (20 u/µl)
2 µl	dNTP (10 mM)
2 µl	M-MuLV reverse Transcriptase (20 u/µl)

Zur weiteren Synthese ist der Reaktionsansatz für 60 min auf 42 °C und nachfolgend für 5 min auf 70 °C erwärmt worden. Die synthetisierte cDNA

wurde mit 180 μl Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.3.4 RT-PCR

Für Expressionsanalysen mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist das SensiMix SYBR & Flourescein KIT von Bioline verwendet worden. Hierbei wurde folgender Reaktionsansatz (Tabelle 7) pro Well gewählt:

Tabelle 7: Reaktionsansatz RT-PCR.

12,5 μl	2x SensiMix SYBR & Flourescein
0,1 μl	Forward Primer
0,1 μl	Reverse Primer
7,3 μl	Nuklease-freies Wasser
5,0 μl	cDNA (2.3.3)

Die folgenden humanen (Tabelle 8) und murinen (Tabelle 9) Forward und Reverse Primer fanden im Reaktionsansatz (Tabelle 7) Verwendung:

Tabelle 8: Humane Forward und Reverse Primer für die RT-PCR.

Primer	Sequenz Forward Primer 5'-3'	Sequenz Reverse Primer 5'-3'
Bcl-2	CTGCACCTGACGCCCTTCACC	CACATGACCCACCGAACTCAAAGA
Bclxl	GATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAAG	CCCCATCCCGGAAGAGTTCATTCACT
CyclinD	GCATGTTTCGTGGCCTCTAAG	CGTGTTTGC GGATGATCTGT
IL-17C	ATCTCACCTGGAGATAC	ATACAGCCTCTGCACAGGCA
IL-17RA	TTCTGTCCAAACTGAGGCATCA	AGGGTCAACCACAAAGTGGC
IL-17RE	CTGCTGTCAGGTGGCTCA	GGAAGACTTTTTGGATTTCTG C
β-Aktin	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
TLR-2	GAGAGTGGGAAATATGGACACCTT	GCAGTTCCAAACATTCCACG
TLR-4	ACCTGGAGTGGGAGGACAGT	AGATAGATGTTGCTTCCTGCCAA

Tabelle 9: Murine Forward und Reverse Primer für die RT-PCR.

Primer	Sequenz Forward Primer 5'-3'	Sequenz Reverse Primer 5'-3'
Bcl-2	TGAGTACCTGAACCGGCATCT	GCATCCCAGCCTCCGTTAT
Bclxl	GCTGGGACACTTTTGTGGAT	TGTCTGGTCACTCCGACTG
CyclinD	CCAACAACCTCCTCTCCTGCT	GACTCCAGAAGGGCTTCAATC
IL-17C	GAGACAGCTGCCCTGAACTC	GAGGTGCCTGGAATGTCTGT
IL-17RA	GTGGCGGTTTTCTTCAGCCACTTTGTG	GATGCTGTGTGTCCAAGGTCTCCACAGT
IL-17RE	CCCTCTCTGGTGAGGAA ATC	GCCTAGCAGCTTCCTCTGG
Occludin	CCCTGAAATACAAAGGCA	GAGTTAACGTCGTGGACC
TLR-2	ACCACTGCCCCTAGATGAAG	CAGCTCGCTCACTAGGTCTG
TLR-4	TCTGAGCTTCAACCCCTTG	TGCCATGCCTTGTCTTCA
Zo-1	GGCATTCTGCTGGTTAC	AGGACACCAAAGCATGTG

Die RT-PCR wurde mit verschiedenen Reaktionsansätzen mit dem folgenden Temperaturprogramm (Tabelle 10) durchgeführt:

Tabelle 10: Temperaturprogramm der RT-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit (min)
1	95 °C	10:00
2	95 °C	0:15
3	60 °C	0:30
4	Messung	
5	Wiederholung ab Schritt 2, 40 x	
6	65 °C	0:31
7	65 °C + 0,5 °C / Zyklus (0,5 °C / 0:05 Sekunde)	
8	Messung	
9	Wiederholung ab Schritt 7, 60 x	
10	5 °C	

Die Spezifität der Amplifikation ist mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese überprüft worden. Die RT-PCR Ergebnisse wurden mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode ausgewertet [110].

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 *In vitro* Methoden

2.4.1.1 Zelllinien

Die in Tabelle 11 aufgeführten Zelllinien mit den dazugehörigen Kulturmedien fanden Verwendung. Das DMEM-Grundmedium, Glutamin, Trypsin, FCS und Pen/Strep wurden von der Firma Gibco ThermoFisher Scientific bezogen. Das Airway Epithelial Cell Growth Medium ist von der Firma Promocell gestellt worden.

Tabelle 11: Verwendete Zelllinien und Kulturmedien.

Zelllinie	Kulturmedium
Lewis Lung Carcinoma	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1x Glutamin, 1x Pen/Strep
A549	DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1x Glutamin, 1x Pen/Strep
Primäre HBECs	Airway Epithelial Cell Growth Medium

2.4.1.2 Kultivierung von Zellen

Die aufgelisteten Zelllinien (Tabelle 11) wurden in Zellkulturgefäßen im Brutschrank (37 °C, 0,2 % O₂, 98 % relative Luftfeuchte, 5 % CO₂) kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS sind die Zellen trypsinisiert und nach Ablösen in warmes, frisches Kulturmedium

wieder aufgenommen und resuspendiert worden. Die entstandene Suspension wurde verdünnt und auf neue Kulturgefäße verteilt.

Für die Stimulation von Zellen *in vitro* wurden murines EGF, murines TNF- α , murines IL-17C, humanes IL-17C, humanes EGF sowie murines und humanes IL-17A von der Firma R&D Systems bezogen. Der TLR-2 Ligand Pam2CSK4 ist von der Firma InvivoGen gestellt worden.

2.4.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen im exponentiellen Wachstum wurden mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die gelösten Zellen sind in frisches Medium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert worden. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpallet in FCS mit 5 % DMSO aufgenommen, resuspendiert und in Kryo-Röhrchen verteilt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen der Kryo-Röhrchen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden in vorgewärmtes Medium aufgenommen und auf entsprechende Kulturgefäße verteilt und, wie unter Punkt 2.4.1.2 beschrieben, kultiviert.

2.4.1.4 Kultivierung humaner bronchialer Epithelzellen

Primäre humane bronchiale Epithelzellen (HBECs) sind in einem Air-Liquid Interface im Transwell kultiviert und polarisiert worden [111;112]. In regelmäßigen Abständen wurde der transepitheliale Widerstand gemessen, um die Ausbildung der epithelialen Barriere zu verfolgen. Nach

dem Erreichen eines Widerstands über 450 Ohm wurden die Zellen für Versuche herangezogen.

2.4.1.5 Rauchexposition von HBECs

HBECs sind, wie unter Punkt 2.4.1.4 beschrieben, im Transwell kultiviert worden. Die polarisierten HBECs wurden dann für 10 min (2 Zigaretten) Rauch ausgesetzt [111]. Hierbei lag der transepitheliale Widerstand über 450 Ohm vor Rauchexposition. Direkt nach der Exposition mit Raumluft oder Zigarettenrauch wurde das Medium im basolateralen Kompartiment gewechselt (1 ml Airway Epithelial Cell Growth Medium) und eine Lösung mit 10 mg/ml FITC-konjugiertem Dextran (70 kDa) in 1 x PBS mit oder ohne hitzeinaktivierten Bakterien apikal hinzugegeben. Alle 2 h sind 100 µl Probe aus dem basolateralen Medium entnommen worden. Aus den Proben wurde die Fluoreszenzintensität mit Hilfe einer Standardkurve ermittelt. Die Zytotoxizitätsbestimmung erfolgte wie unter Punkt 2.5.3 dargelegt.

2.4.2 *In vivo* Methoden

Alle Tierversuche sind vom Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Bundeslandes Saarland genehmigt und den nationalen Richtlinien entsprechend durchgeführt worden. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter Pathogen-freien Bedingungen.

2.4.2.1 Verwendete Mausstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden neben 7 bis 9 Wochen alten weiblichen WT C57BL/6 ebenfalls IL-17C^{-/-} C57BL/6, IL-17A^{-/-} C57BL/6 und TLR-2/4^{-/-} C57BL/6 Tiere verwendet. Die IL-17C^{-/-} C57BL/6 Tiere sind vom Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC, USA) bezogen worden. Die TLR-2/4^{-/-} C57BL/6 Tiere waren ein Geschenk von Prof. Dr. Markus Schnare (Institut für Immunologie, Philipps-Universität Marburg). Die Tiere wurden für mindestens 8 Generationen in den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt.

2.4.2.2 Schwanzveneninjektion von Lewis Lung Carcinoma Zellen

Die verwendeten Lewis Lung Carcinoma (LLC) Zellen sind zunächst in Zellkulturflaschen mit 10 % FCS haltigem Medium herangezogen worden. Am Vortag der Injektion wurde der FCS-Gehalt auf 1 % reduziert. Am Tag der Injektion sind die Zellen gewaschen und trypsinisiert worden. Die Suspension wurde bei 800 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpallet ist in FCS freiem und Pen/Strep freiem DMEM-Grundmedium aufgenommen und resuspendiert worden. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und mit DMEM-Grundmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Bis zur Schwanzveneninjektion erfolgte die Lagerung der Zellsuspension auf Eis.

Für die Schwanzveneninjektion der LLC Zellen sind die entsprechenden Mäuse narkotisiert und auf einer Wärmematte gewärmt worden. Zur Dilatation wurde die Schwanzvene vor der Injektion mit Hilfe einer

Rotlichtlampe erwärmt. Nach erfolgreicher Venendilatation sind 200 µl der Zellsuspension in die Schwanzvene injiziert worden.

2.4.2.3 Verneblung mit NTHi-Lysaten

Die zu vernebelnden Mäuse wurden in eine Plexiglasbox, welche an den Pari MASTER nebulizer der Firma Pari angeschlossen war, gesetzt. Hier wurden die Mäuse den hergestellten Lysaten von NTHi (Punkt 2.2.3.2) für 40 min ausgesetzt. Die Gesamteproteinkonzentration betrug 2,5 mg/ml Protein in 1 x PBS, dreimal pro Woche.

2.4.2.4 Rauchexposition

Die Exposition der Mäuse mit Zigarettenrauch erfolgte in einer TE-10 Rauchmaschine der Firma Teague Enterprises für insgesamt 100 min pro Tag, 7 Tage die Woche und 7 Tage nach Injektion der LLC Zellen. Für die Rauchmaschine wurden 3R4F Zigaretten des College of Agriculture der University of Kentucky verwendet. Die Konzentration der gelösten Partikel betrug 120 mg/m³.

2.4.2.5 Gewinnung und Verarbeitung der Bronchoalveolären Lavage

Die Gewinnung der Bronchoalveolären Lavage erfolgte mit einer Vasofix Braunüle. Diese ist in die Trachea der Maus eingeführt worden. Die Lunge wurde so mit 1 ml 1 x PBS gespült und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Danach ist die BAL für 20 min bei 4 °C und 350 g zentrifugiert worden. Das Zellpallet wurde in 1 ml frischem PBS resuspendiert und für die nachfolgende Anfertigung der Cytospinpräparate verwendet. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.4.2.6 Cytospinpräparate

Für die Anfertigung der Cytospinpräparate sind 50 µl der BAL-Zellsuspension (Punkt 2.4.2.5) mit 150 µl 1 x PBS verdünnt worden. Diese Flüssigkeit von 200 µl wurde nachfolgend durch eine Cytospinzentrifuge für 5 min bei 200 g auf einen Objektträger aufgetragen, welcher dann für 10 min in -20 °C kaltem Methanol zur Zellfixierung gelagert wurde. Zur Anfärbung der Zellkerne und des Zellplasmas sind die Objektträger in Quick Diff Stain Lösung gefärbt, anschließend getrocknet und mit Deckgläschen eingedeckt worden. Die Zellen wurden im Fortgang mit einem Lichtmikroskop differenziert.

2.4.2.7 Bestimmung der Leukozytenanzahl

Die Bestimmung der Leukozytenanzahl der BAL erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Hierzu wurden 10 µl der BAL auf die Neubauer Zählkammer aufgetragen und jeweils 2 x 9 Großquadrate ausgezählt. Diese Werte sind im Anschluss gemittelt und auf 1 ml hochgerechnet worden.

2.4.2.8 Präparation der Lunge

Die Lunge wurde vorsichtig aus der Maus präpariert. Nachfolgend ist die Lunge an einen Scheidetrichter mit einer 4 %igen Formalinlösung angeschlossen und an der Formalinsäule 15 min fixiert worden. Dann wurde die Lunge an der Trachea abgebunden und in 4 %ige Formalinlösung überführt. Nach 24 h ist das Formalin gewechselt worden.

2.4.2.9 Einbettung der Lunge in Agarose

Die, wie unter Punkt 2.4.2.8 beschrieben, präparierte Lunge wurde vor der Einbettung und nach der Entfernung der Trachea über Nacht in 1 x PBS gewaschen. Am nächsten Tag wurde das 1 x PBS ausgetauscht und die Lunge auf 60 °C vorgewärmt. Nach 6 h ist das PBS verworfen und die Lunge mit 1,5 %iger Agaroselösung überflutet und über Nacht bei 60 °C inkubiert worden. Am folgenden Tag wurden Lunge und Agarose abgekühlt, sodass die Lunge in der festen Agarose eingeschlossen war. Aus den Agaroseblöcken sind 5 mm dicke Schnitte angefertigt und in kleine Waage-Schälchen überführt worden. Die Orientierung der Gewebeschnitte erfolgte so, dass jeweils nicht die gleichen Schnittebenen oben lagen. Die Gewebeschnitte wurden sodann mit 1,5 %iger Agaroselösung überschichtet und zur Aushärtung belassen. Die ausgehärteten Blöcke sind in 4 %iger Formalinlösung bei Raumtemperatur bis zur Paraffineinbettung aufbewahrt worden. Die Paraffineinbettung erfolgte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar.

2.4.2.10 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Färbungen sind von Herrn Andreas Kamyschnikow nach dem Protokoll des Antikörperherstellers durchgeführt worden. Für die immunhistochemischen Färbungen fanden Gewebeschnitte aus Paraffinblöcken Verwendung. Im Einzelnen wurden für die Färbung von murinen Neutrophilen der Anti-Ly6B2 Antikörper der Firma BioRad verwendet, für die Färbung von murinen IL-17C der Antikörper der Firma Biozol und für die Färbung von Kiel-67 (Ki-67) positiven Zellen, TNF- α und NTHi in der Maus die Antikörper der Firma Abcam. Die Färbung apoptotischer Zellen erfolgte mit dem TACS[®] 2 TdT-DAB *In Situ* Apoptosis Detection Kit der Firma Trevigen.

2.4.2.11 Auswertung immunhistochemischer Färbungen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde mit den Programmen GIMP und ImageJ durchgeführt. Zunächst wurden wahllos und zufällig Bilder am Lichtmikroskop aufgenommen, die dann in das Programm GIMP eingespeist wurden. Hier ist folgend die Hintergrundfärbung ausgeblendet worden, sodass nur noch die immunhistochemische spezifische Färbung für das Antigen sichtbar war. Die daraus entstandene Datei ist in das Programm ImageJ eingespeist worden. Hier wurde mit Hilfe eines Schwellenwertes die Färbung auf einen Schwarzwert umgewandelt. Die anschließende Analyse des Programms bezog sich dann auf den bedeckten Flächenanteil und die Intensität der Färbung.

2.4.2.12 Bestimmung der Tumorlast

Die Tumorlast wurde 14 und 21 Tage nach LLC Injektion berechnet. Hierfür sind Gewebeschnitte aus Paraffinblöcken verwendet und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt worden. Danach wurde der prozentuale Anteil der von Tumor bedeckten Fläche im Verhältnis zur Gesamtlungenfläche berechnet.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 ELISA

Folgende ELISA der Firma R&D sind nach Herstellerprotokoll verwendet worden: mouse KC, mouse RANTES, mouse IL-17A, mouse Galectin-1, mouse MIP-2, mouse IL-6. Zur Bestimmung von Albuminkonzentrationen wurde das Mouse Albumin ELISA Quantification Set der Firma Bethyl verwendet. Proben und Standards wurden in Doppelbestimmung aufgetragen und Konzentrationen über die Replikate gemittelt.

2.5.2 Cytometric Bead Assay

Der Cytometric Bead Assay zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen ist nach Herstellprotokoll der Firma BD durchgeführt worden. Die Vermessung der Proben erfolgte hierbei am BD FacsCanto II.

2.5.3 LDH-Assay

Zur Bestimmung der Zytotoxizität in Zellkulturversuchen und zur relativen Bestimmung der Laktat-Dehydrogenase (LDH) Anteile in Serum und BALF fand das LDH-Cytotoxicity Assay Kit II der Firma Abcam nach Herstellerprotokoll Verwendung.

2.5.4 Proliferationsassay

Zur Proliferationsanalyse ist der Quick Cell Proliferation Assay der Firma Abcam angewandt worden. Hierbei wurde nach Herstellangaben gearbeitet und eine FCS Konzentration von 1 % im Medium verwendet. Die Inkubation mit dem zu analysierenden Reagenz erfolgte über Nacht für 24 h. Der Assay wurde 2 h nach WST-1 Zugabe vermessen.

2.5.5 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6 Analyse humaner Daten

2.6.1 Auswertung des NSCLC-Studienkollektivs

Die immunhistochemische Auswertung ist in der Hämatologie, Onkologie und Pulmologie des Universitätsklinikums Münster von Prof. Dr. Wiewrodt und Dr. Schmidt vorgenommen worden.

In einem NSCLC-Studienkollektiv mit 103 kurativ resezierten Patienten (mittleres Alter: 68 Jahre) wurde der prognostische Wert von IL-17C untersucht. Patienten mit Stage IV, R1/R2 Resektionsstatus oder neoadjuvanter Therapie wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Für die Tumor-Node-Metastasis (TNM) Klassifikation fanden die Leitlinien der IUCC/AJCC Anwendung. Mit Hinblick auf die Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 2004 sind die primären pulmonalen Läsionen pathologisch klassifiziert worden. Um das Gesamtüberleben zu berechnen, wurde die Zeit zwischen histologischer Diagnose und Tod oder dem Zeitpunkt des letzten Kontakts gewählt. Die Grundinformationen der in der NSCLC-Studie eingeschlossenen Patienten befinden sich in Tabelle 14.

Für die immunhistochemische Färbung auf IL-17C sind Gewebeproben des NSCLC-Studienkollektivs verwendet worden. Jeder Patient wurde mit 3 Tumorstanzen auf einem Gewebemikroarray analysiert. IL-17C ist mit einem primären Antikörper (Bioss, USA) detektiert worden. Anschließend wurde ein biotinylierter sekundärer Antikörper sowie eine Avidin-horseradish Peroxidase (DAKO, Dänemark) hinzugegeben. Die Gewebemikroarrays sind mit Hämatoxylin gegengefärbt worden. Die Auswertung der immunhistochemischen Expression basierte auf dem Remmele's Immunoreactive Score (IRS range, 1-12) [113]. Dieser berechnet

sich als Produkt des Scores der prozentual IL-17C positiven Zellen (PP, Tabelle 12) und des Scores der Intensität der Färbung (SI, Tabelle 13).

Tabelle 12: Umrechnung der prozentual IL-17C positiven Zellen in den PP Score.

PP	Score (PP)
0	0
< 10%	1
< 50%	2
< 80%	3
≥ 80%	4

Tabelle 13: Umrechnung der Intensität der IL-17C Färbung in den SI Score.

SI	Score (SI)
keine Färbung	0
schwache Färbung	1
moderate Färbung	2
starke Färbung	3

Bei der Auswertung sind Fälle mit einem IRS-Wert größer oder gleich 3 als positiv gewertet worden. Nachfolgend finden sich repräsentative Beispiele für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf IL-17C (Abbildung 3).

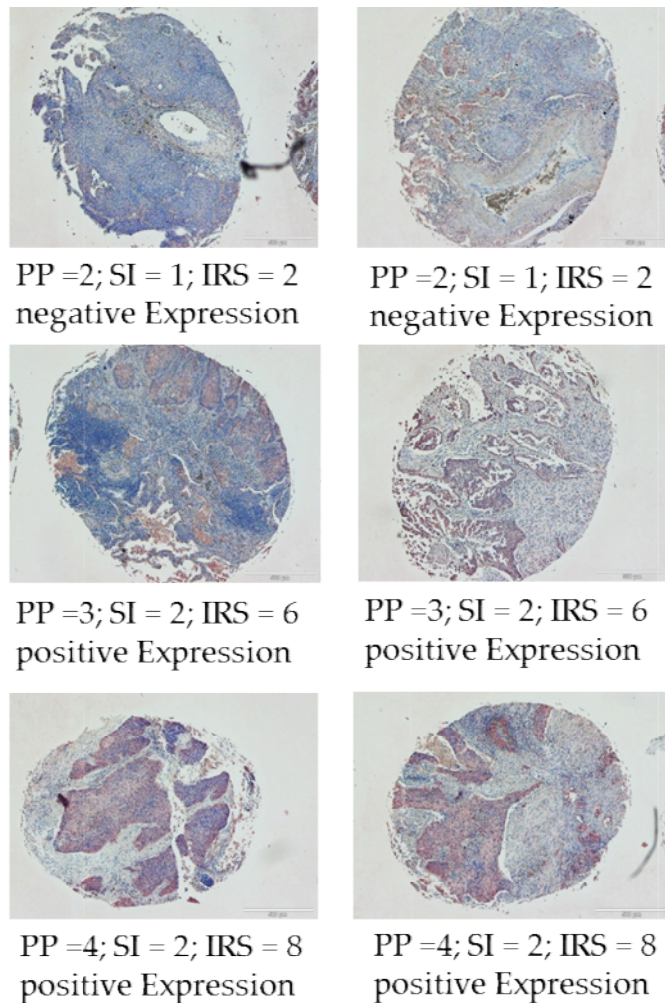


Abbildung 3: Repräsentative Beispiele für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf IL-17C und für die Berechnung des IRS-Wertes.

2.6.2 Auswertung der Lungenkrebs Meta-Analyse

Mit Hilfe der „Kaplan-Meier plotter“ (KM plotter) Datenbank (www.kmplot.com) wurde der prognostische Wert von IL-17C (224079_at) unter 2437 Lungenkrebspatienten untersucht [114]. Die online verfügbare Meta-Analyse basiert auf Daten der Genexpressions Omnibus Datenbank (GEO – www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/).

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz von Experimenten ist bei 2 Subgruppen und statistischer Normalverteilung mittels parametrischem T-Test und bei keiner statistischen Normalverteilung mittels nicht-parametrischem T-Test (Mann-Whitney-Test) berechnet worden. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz von Experimenten mit mehr als 2 Subgruppen und bei statistischer Normalverteilung fanden der ANOVA und post-hoc Turkey Test Anwendung. Bei keiner statistischen Normalverteilung und mehr als 2 Subgruppen wurde der Kruskal-Wallis Test mit post-hoc Dunns Test eingesetzt. Für alle statistischen Tests wurde die Software Prism (GraphPad, USA) verwendet.

Die NSCLC-Studie ist mittels SPSS Statistics Version 22.0 (IBM Corp., USA) ausgewertet worden. Die prognostischen Analysen wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode und des log rank Tests durchgeführt. Dabei sind Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant angesehen worden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Signifikanzen in den Abbildungen wie folgt gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$ und *** $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Bakterien fördern das Wachstum von Lungenmetastasen bei einer Zigarettenrauch induzierten Entzündung

Raucher und COPD Patienten haben ein erhöhtes Risiko, an Lungenkrebs und Infektionen der Lunge zu erkranken [4-6;19]. Bakterielle Pathogene wie NTHi infizieren häufig die Lungen von COPD Patienten und tragen zur pulmonalen Entzündung und zu Exazerbationen im Rahmen der COPD bei [19]. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern die durch Bakterien verursachte pulmonale Entzündung zum verstärkten Wachstum von Lungentumoren führt.

3.1.1 Die Kombination aus Zigarettenrauch und NTHi führt zu einem vermehrten Wachstum von Lungenmetastasen

Um den Effekt von bakteriellen Pathogenen während einer rauchinduzierten Entzündung auf das Wachstum von Lungenmetastasen zu untersuchen, wurden weiblichen WT Mäusen LLC Zellen in die Schwanzvene injiziert. Nach 7 Tagen Ruhephase wurden die Mäuse für weitere 7 Tage Luft oder Zigarettenrauch (CS) und/oder an den Tagen 7, 10 und 13 NTHi ausgesetzt. Die Tiere sind nach 14 und 21 Tagen analysiert worden (Abbildung 4).

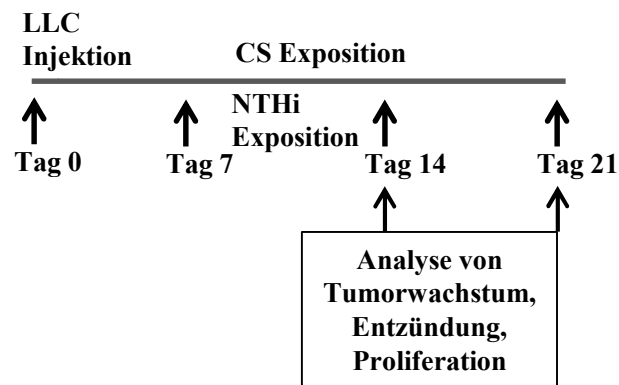


Abbildung 4: Schema des experimentellen Versuchsablaufes.

Hierbei zeigten NTHi exponierte Mäuse nach 19 Tagen und Mäuse, die der Kombination von CS und NTHi ausgesetzt waren, nach 19 und 21 Tagen ein im Vergleich zu Raumluft exponierten Mäusen signifikant geringeres Überleben (Abbildung 5). Mäuse, die lediglich CS exponiert waren, zeigten kein signifikant verringertes Gesamtüberleben.

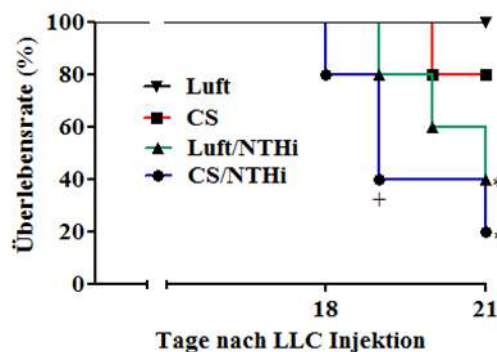


Abbildung 5: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einem verringerten Gesamtüberleben der Mäuse. Überlebensraten nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). + $P < 0.05$ nach 19 Tagen, * $P < 0.05$ nach 21 Tagen verglichen mit Raumluft exponierten Mäusen (log-rank (Mantel-Cox) test).

Bei der Analyse der überlebenden Tiere wiesen CS und NTHi exponierte Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine erhöhte Tumorlast auf.

Dies konnte anhand einer höheren Anzahl makroskopischer Tumorknoten auf der Lungenoberfläche (Abbildung 6 A) und einem erhöhten prozentualen Anteil der von Tumor bedeckten Gesamtlungenfläche festgestellt werden (Abbildung 6 B). Abbildung 6 C zeigt repräsentative Lungen und Hämatoxylin & Eosin Färbungen.

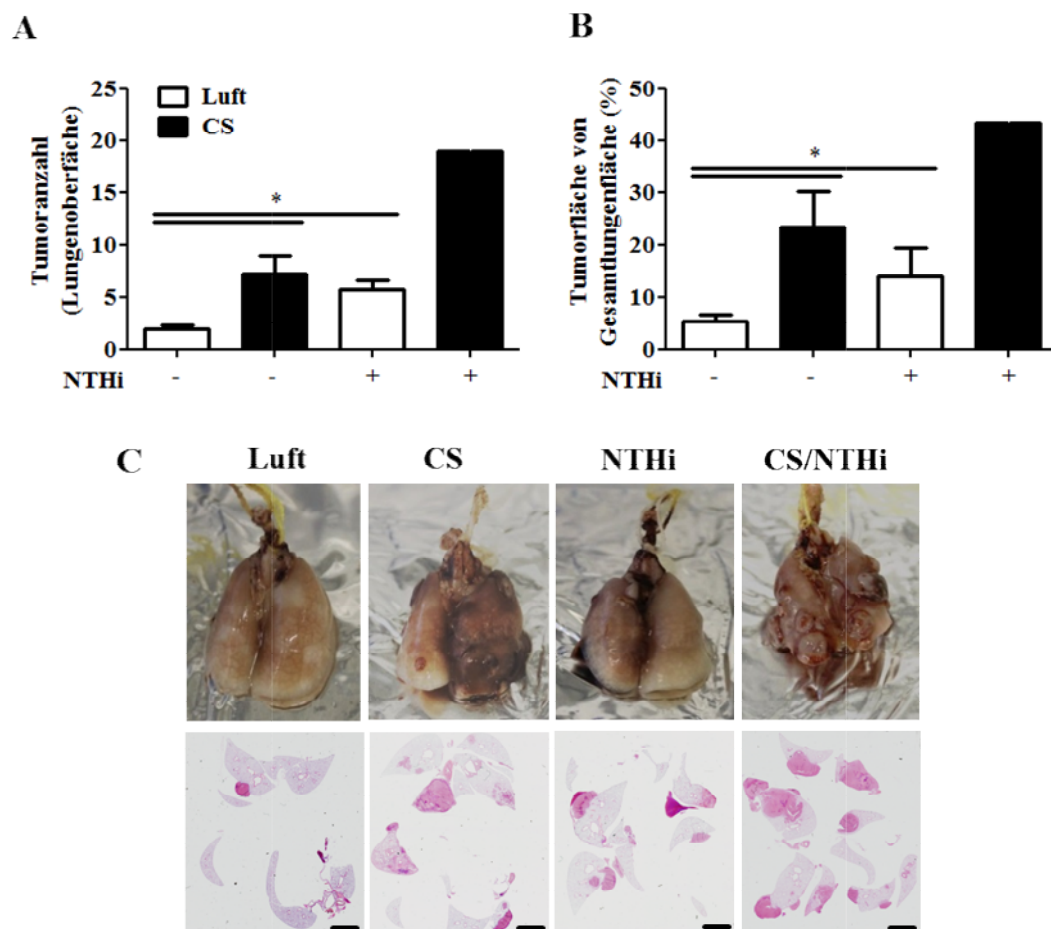


Abbildung 6: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einem erhöhten Wachstum von Lungentumoren. (A) Anzahl der makroskopischen Tumore auf der Lungenoberfläche. (B) Tumorfäche in Abhängigkeit der Lungengesamtfläche. * $P < 0.05$, $n \geq 3$ pro Gruppe (Mann-Whitney test). (C) Makroskopische und Mikroskopische Pathologie (Hämatoxylin & Eosin Färbung) 21 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen), Maßstab = 250 μm .

Da die Tumorlast in Tieren, die der Kombination aus CS und NTHi ausgesetzt waren, so stark erhöht war, dass diese bereits nach 18 Tagen zu sterben begannen, wurden die nachfolgenden Tiere 14 Tage nach LLC Injektion analysiert. Bei diesem Versuchsaufbau erlagen aus den einzelnen Gruppen während der Versuchszeit keine Mäuse der Tumorlast.

Bei der Analyse der Versuchstiere wiesen CS/NTHi exponierte Tiere jeweils signifikant mehr makroskopische Tumorknoten auf als Raumlufte, CS oder NTHi exponierte Tiere (Abbildung 7 A). Hingegen führten die Einzelexpositionen mit CS und NTHi, verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren, zu keiner erhöhten Tumorlast. Dies ließ sich ebenfalls durch die mikroskopische Ermittlung der prozentual von Tumor bedeckten Lungenfläche bestätigen (Abbildung 7 B, Abbildung 7 C). Auch hier führte nur die Kombination von CS und NTHi zu einer signifikant höheren Tumorlast.

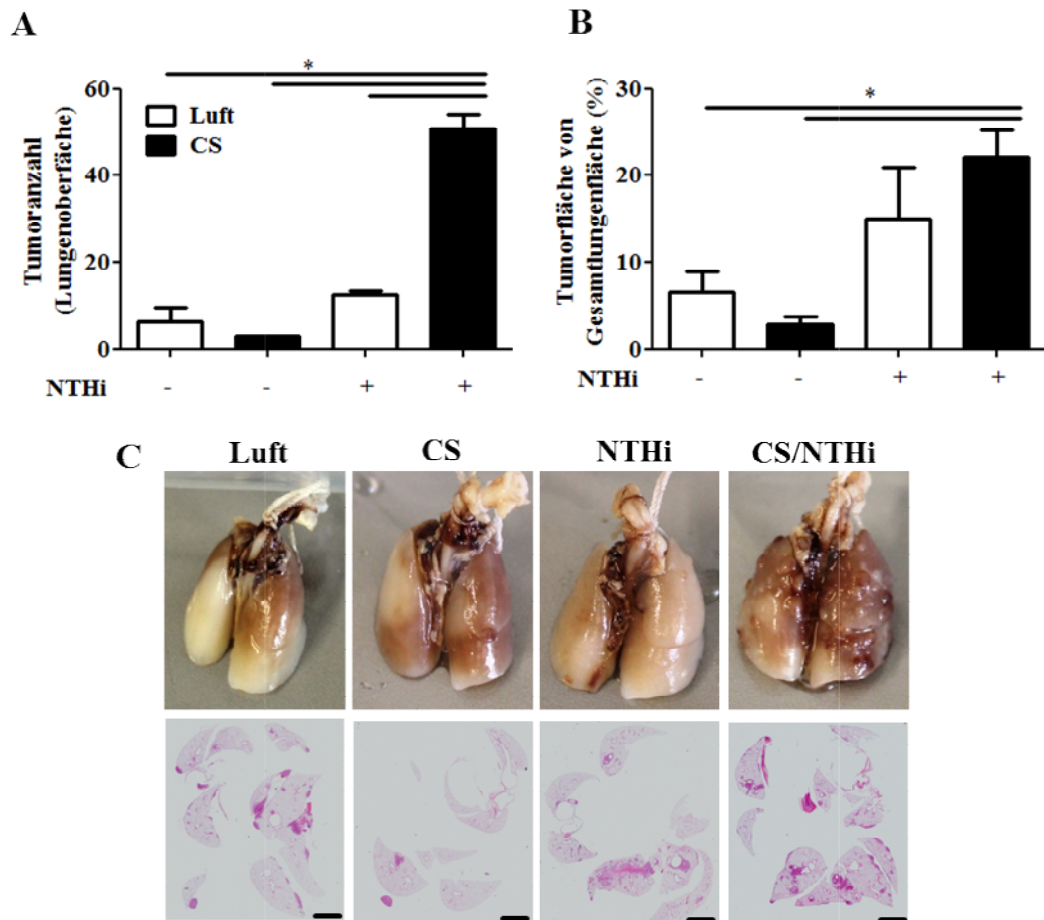


Abbildung 7: Eine rauchinduzierte Entzündung und Exposition mit NTHi fördert synergistisch das Wachstum von Lungenmetastasen. (A) Anzahl der makroskopischen Tumore auf der Lungenoberfläche. (B) Tumorfläche in Abhängigkeit von der Lungengesamtfläche. * $P < 0.05$ und *** $P < 0.001$, $n = 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA). (C) Makroskopische und Mikroskopische Pathologie (Hämatoxylin & Eosin Färbung) 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen), Maßstab = $250 \mu\text{m}$.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von CS und NTHi zu einem synergistischen Wachstum von Lungenmetastasen und zu einem geringeren Gesamtüberleben der Mäuse führt.

3.1.2 Das Tumorwachstum ist unabhängig von der Entzündung im Alveolarraum

Nach der zuvor beschriebenen mikroskopischen und makroskopischen Analyse der Tumorlast wurde im Folgenden die durch CS und NTHi entstandene Entzündung im Alveolarraum charakterisiert. Hierfür ist 14 Tage nach LLC Injektion die Entzündung im Alveolarraum analysiert worden. Zur Charakterisierung der alveolaren Entzündung wurden neben der Gesamtzellzahl und der Zellzahlen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ebenfalls verschiedene Zytokine bestimmt.

Tiere, die NTHi oder der Kombination aus NTHi und CS ausgesetzt waren, wiesen im Vergleich zu nur CS behandelten und unbehandelten Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Gesamtzellzahl in der BAL Flüssigkeit auf (Abbildung 8). Das Differentialzellbild der BAL Zellen zeigte, dass die Behandlung mit NTHi zu einem signifikanten Einstrom von neutrophilen Granulozyten führte (Abbildung 8 B). Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL Flüssigkeit wurde durch Exposition mit CS jedoch nicht beeinflusst. Es ergab sich auch kein Unterschied in der Anzahl an Makrophagen im Alveolarraum (Abbildung 8 C).

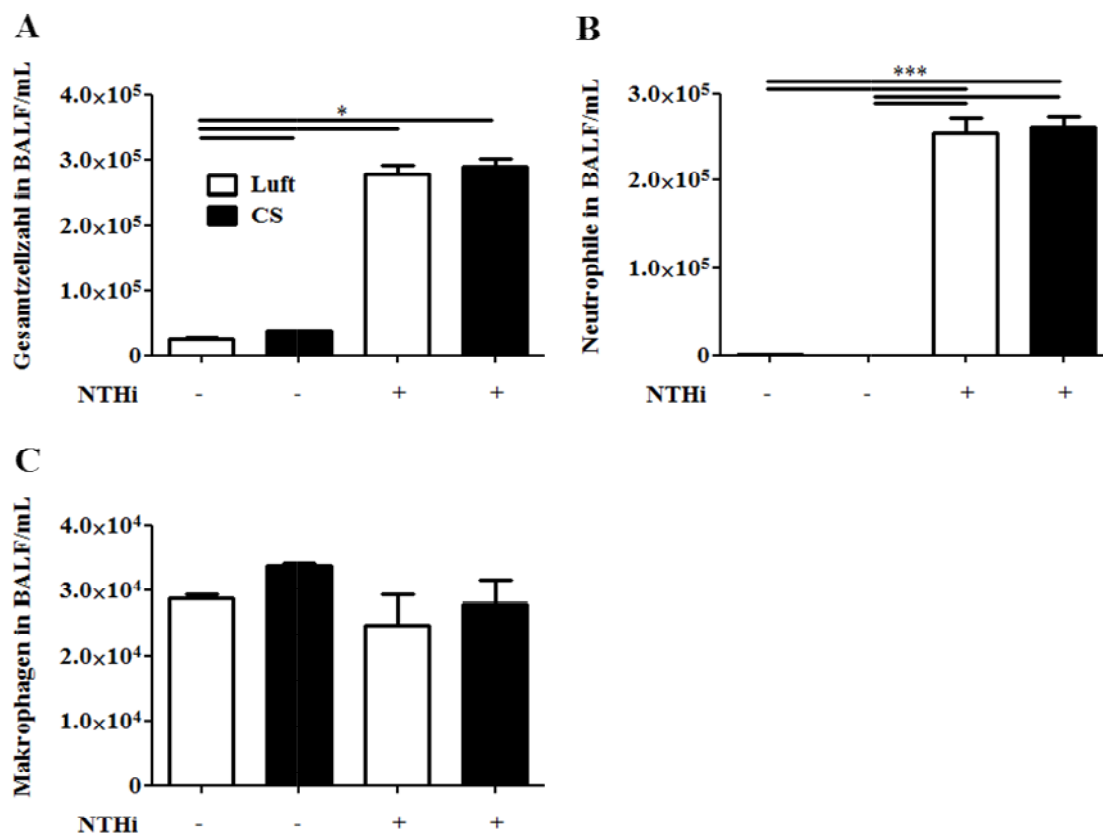


Abbildung 8: Die CS-Exposition hat keinen Effekt auf die NTHi-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum. Gesamtzellzahl (A), Anzahl der Makrophagen (B) und neutrophilen Granulozyten (C) in der BAL Flüssigkeit von Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). *** $p < 0.001$, $n = 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Die Behandlung mit NTHi führte neben dem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum auch zu signifikant höheren Konzentrationen von IL-17A, RANTES, MIP-1 β und KC (Abbildung 9).

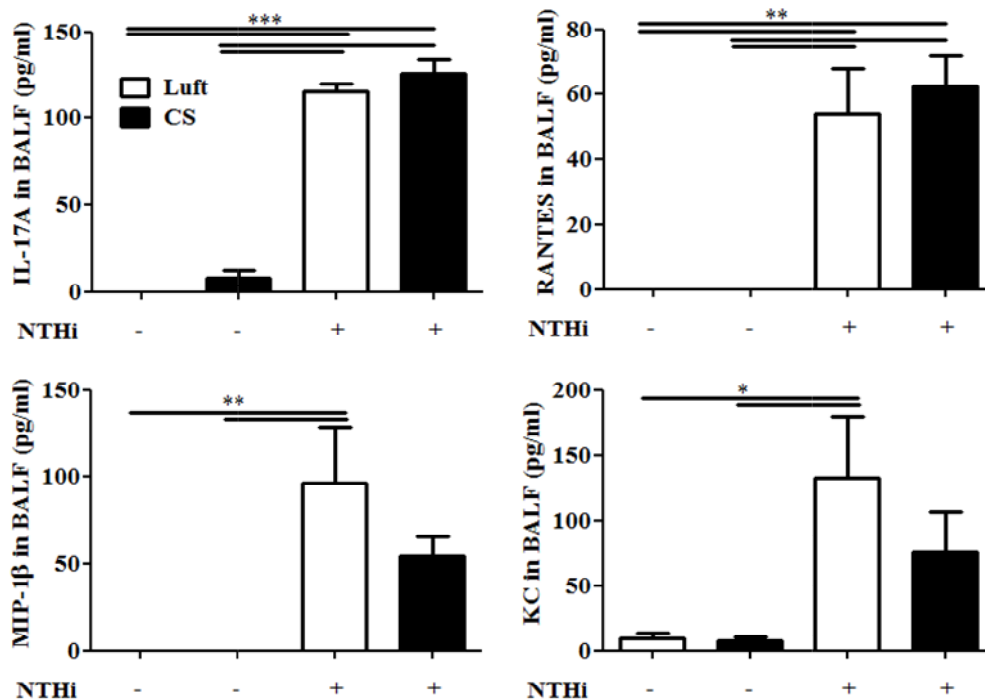


Abbildung 9: Die CS-Exposition hat keinen Effekt auf die NTHi-induzierte Entzündung im Alveolarraum. Konzentrationen von Entzündungsmediatoren in der BAL Flüssigkeit von Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, $n = 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Die Ergebnisse zeigen, dass die signifikant höhere Tumorlast von CS/NTHi behandelten Tieren 14 Tage nach LLC Injektion nicht an die Entzündung im Alveolarraum gekoppelt ist. Die Entzündung im Alveolarraum ist CS unabhängig und weicht zwischen den Gruppen NTHi und CS/NTHi nicht signifikant voneinander ab.

3.1.3 Zigarettenrauch führt zur Translokation von bakteriellen Komponenten in das Tumorgewebe

Um die zu Grunde liegenden Mechanismen für die erhöhte Tumorlast von CS/NTHi behandelten Tieren näher zu charakterisieren, wurden erneut Versuchstiere 14 Tage nach LLC Injektion untersucht. Hierbei sollte ein

möglicher Lungenschaden der Versuchstiere durch eine Behandlung mit CS, NTHi oder der Kombination von CS und NTHi analysiert werden.

Für die Charakterisierung eines pulmonalen Barriereverlusts und eines damit einhergehenden Lungenschadens wurde zum einen die Albuminkonzentration in der BALF und zum anderen das Verhältnis von LDH in der BALF und LDH im Serum bestimmt. Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die Albuminkonzentrationen in der BAL Flüssigkeit von Tieren, die der Kombination von CS und NTHi ausgesetzt waren, gegenüber unbehandelten Kontrolltieren, CS oder NTHi exponierten Tieren signifikant erhöht war (Abbildung 10 A). Darüber hinaus war das Verhältnis von LDH in der BALF zu LDH im Serum nur in Tieren, die der Kombination aus CS und NTHi ausgesetzt waren, signifikant erhöht (Abbildung 10 B).

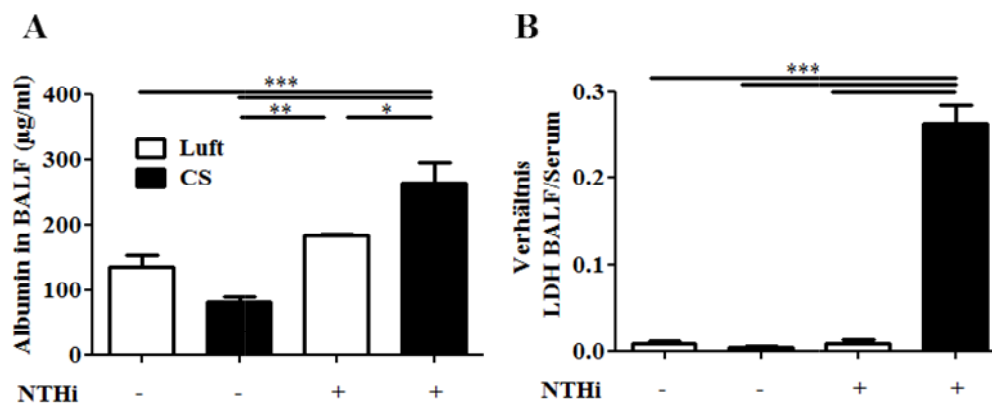


Abbildung 10: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einem Verlust der pulmonalen Barriereintegrität und zu einem Lungenschaden. Konzentration von Mausalbumin (A) und Verhältnis von LDH (BALF) und LDH (Serum) (B) 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, $n = 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Zellkulturstudien ergaben, dass Zigarettenrauch die Expression von Tight Junction Proteinen vermindert und zu einer durchlässigen epithelialen

Barriere führt [115]. Um den Verlust der pulmonalen Barriereintegrität und den durch CS ausgelösten Lungenschaden weiter zu charakterisieren, ist zunächst der Einfluss von CS auf die Expression von Tight Junction Proteinen untersucht worden. Hierfür wurden LLC freie Mäuse für 3 Tage Raumlucht oder CS exponiert. Nach der RNA Isolation aus den Lungen wurde die Expression der Tight Junction Proteine Occludin und Zo-1 mittels RT-PCR untersucht. Hierbei wiesen CS exponierte Tiere im Vergleich zu Raumlucht exponierten Tiere verringerte mRNA-Level von Occludin und Zo-1 in ihren Lungen auf (Abbildung 11).

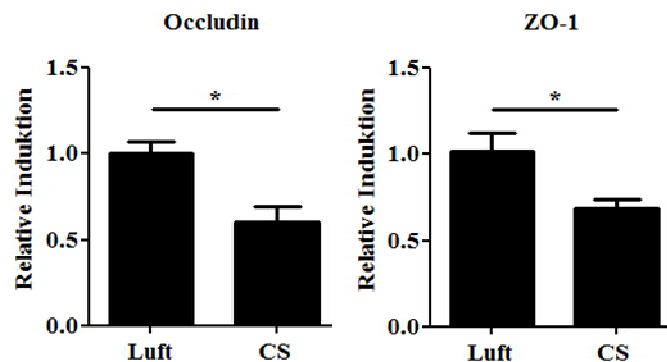


Abbildung 11: Die Exposition mit CS führt zu einer reduzierten Expression von Tight Junction Proteinen im Lungengewebe. mRNA Expression (RT-PCR) von den Tight Junction Proteinen Occludin und Zo-1 im Lungengewebe von Raumlucht und CS exponierten Tieren. * $p < 0.05$, $n = 5$ pro Gruppe (Student's t-test).

Da CS die Expression von Tight Junction Proteinen reprimiert und CS/NTHi behandelte Tiere einen größeren pulmonalen Barrierschaden sowie Lungenschaden als unbehandelte und CS oder NTHi behandelte Tiere aufwiesen, wurde nachfolgend untersucht, ob NTHi Fragmente im Tumorgewebe vorzufinden waren. Für den Nachweis von NTHi Fragmenten im Tumorgewebe wurden histologische Lungenschnitte mittels immunhistochemischer Färbung auf NTHi angefärbt (Abbildung 12 A). Bei

dieser Färbung und der nachfolgenden quantitativen Auswertung konnte festgestellt werden, dass die NTHi Färbung im Tumorgewebe von CS/NTHi behandelten Tieren gegenüber nur NTHi behandelten Tieren signifikant erhöht war (Abbildung 12 B).

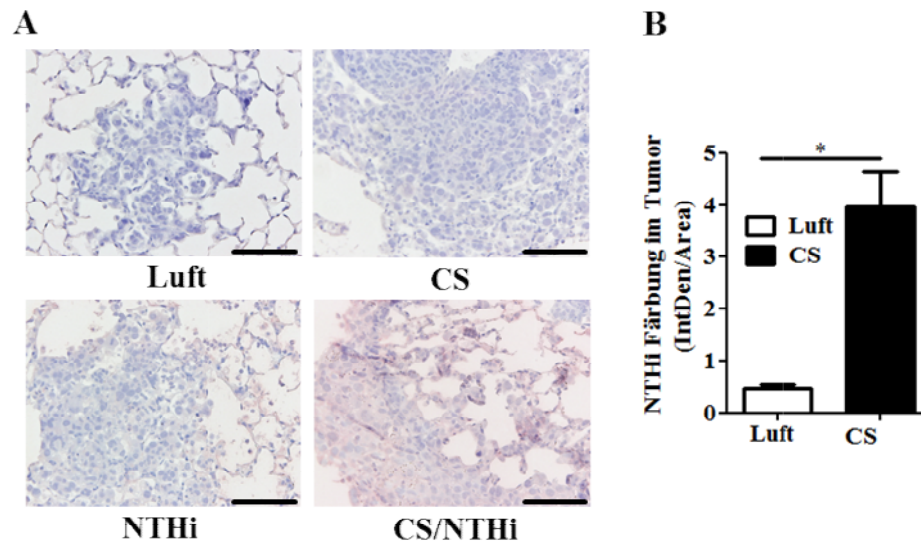


Abbildung 12: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer vermehrten Translokation bakterieller Faktoren in das Tumorgewebe. (A) Immunhistochemische Färbung mit anti-*H. influenzae* Antikörper in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der NTHi Färbung in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μm . *** $P < 0.001$, $n = 5$ pro Gruppe (Student's t-test).

Nachfolgend wurde der Effekt von CS auf die Permeabilität und Barriere von primären, polarisierten, kultivierten, humanen bronchialen Epithelzellen (HBECs) charakterisiert. Die HBECs sind in einem Air-Liquid Interface Expositionssystem kultiviert worden [111;112]. In regelmäßigen Abständen wurde der transepitheliale Widerstand gemessen, um die Ausbildung der epithelialen Barriere zu verfolgen. Nach dem Erreichen eines Widerstands von über 450 Ohm wurden die Zellen für Versuche herangezogen und für 10 min CS exponiert. Hierbei führte die CS

Exposition zu einer erhöhten Permeabilität der HBECs für FITC-Dextran (70kDa) (Abbildung 13).

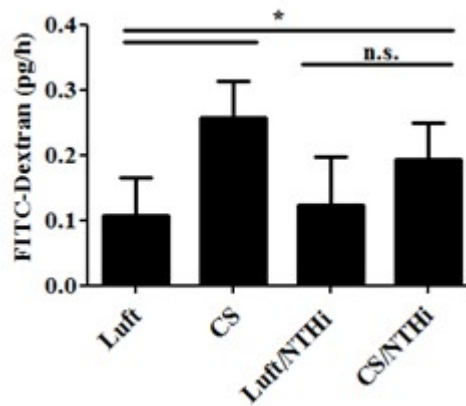


Abbildung 13: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer verminderten Barriereintegrität. HBECs wurden in einem Air-Liquid Interface Expositionssystem kultiviert. Die Zellen sind für 10 min CS exponiert worden. 200 µl PBS mit 10 mg/ml FITC-Dextran (70kDa) mit und ohne hitzeinaktivierten NTHi (10^7 (CFU)/ml) wurden apikal hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität im basolateralen Kompartiment wurde 2 h nach CS Exposition bestimmt. Die Daten sind repräsentative Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten. * $P < 0.05$ (one-way ANOVA).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der CS induzierte Verlust der pulmonalen Barriereintegrität und der mit CS einhergehende Lungenschaden die Translokation bakterieller Bestandteile in das Tumorgewebe begünstigt.

3.1.4 Zigarettenrauch und NTHi führen zu einer erhöhten Entzündung und Proliferation im Tumorgewebe

Versuchstiere, die mit der Kombination von CS und NTHi behandelt wurden, wiesen 14 Tage nach LLC Injektion einen größeren Barrierschaden auf als unbehandelte Luft exponierte Tiere und CS oder

NTHi behandelte Tiere. Außerdem wiesen diese Tiere eine vermehrte Translokation mikrobieller Bestandteile von NTHi in das Tumorgewebe auf. Deshalb wurde nachfolgend untersucht, inwieweit die kombinierte Exposition mit CS und NTHi die tumorassoziierte Entzündung beeinflusst. Die im Tumorgewebe vorliegende Entzündung wurde zu diesem Zweck mit einer immunhistochemischen Färbung von TNF- α untersucht (Abbildung 14 A). Hierbei war festzustellen, dass Tiere, die mit der Kombination von CS und NTHi behandelt wurden, eine signifikant höhere Expression von TNF- α aufwiesen als unbehandelte Kontrolltiere sowie nur CS oder NTHi behandelte Tiere (Abbildung 14 B). Die alleinige Exposition mit CS oder NTHi hingegen führte zu keiner signifikant erhöhten Expression von TNF- α im Tumorgewebe.

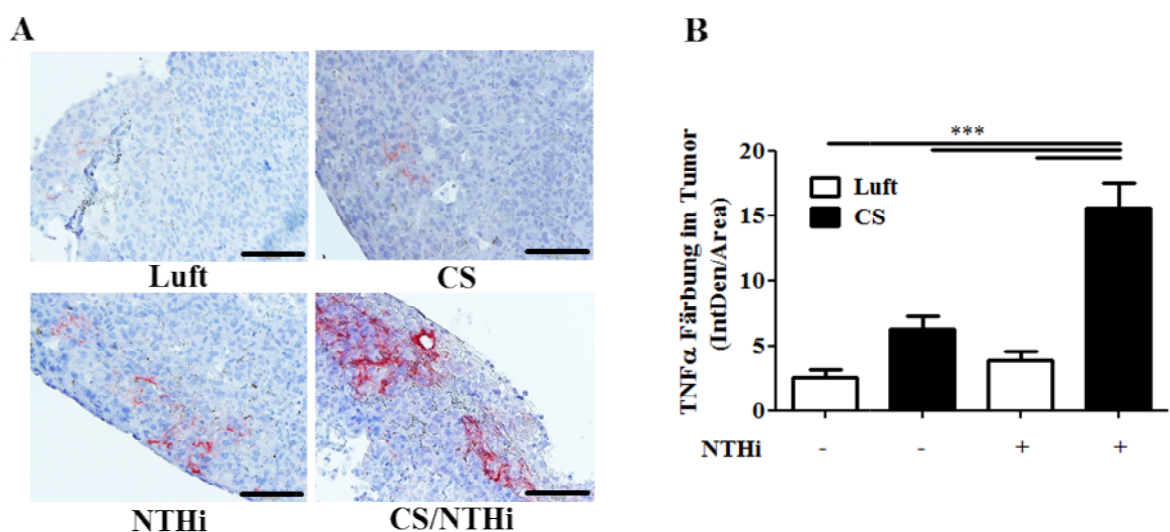


Abbildung 14: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer erhöhten Entzündung im Tumorgewebe. (A) Immunhistochemische Färbung von TNF- α in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der TNF- α Färbungen 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. *** $P < 0.001$, $n = 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Da TNF- α eine zentrale Rolle in der Regulation von Krebszellen und des Tumorwachstums besitzt [17;18;31], wurde sodann die Proliferation der Tumorzellen mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 im Tumorgewebe mittels immunhistochemischer Färbung analysiert (Abbildung 15 A). Bei der immunhistochemischen Färbung wiesen Tumore von CS/NTHi behandelten Tieren eine signifikant höhere Anzahl Ki-67 positiver Zellen auf als unbehandelte Kontrolltiere sowie nur CS behandelte oder nur NTHi behandelte Tiere. Die alleinigen Expositionen von CS oder NTHi führten ebenfalls zu einer vermehrten Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 15 B).

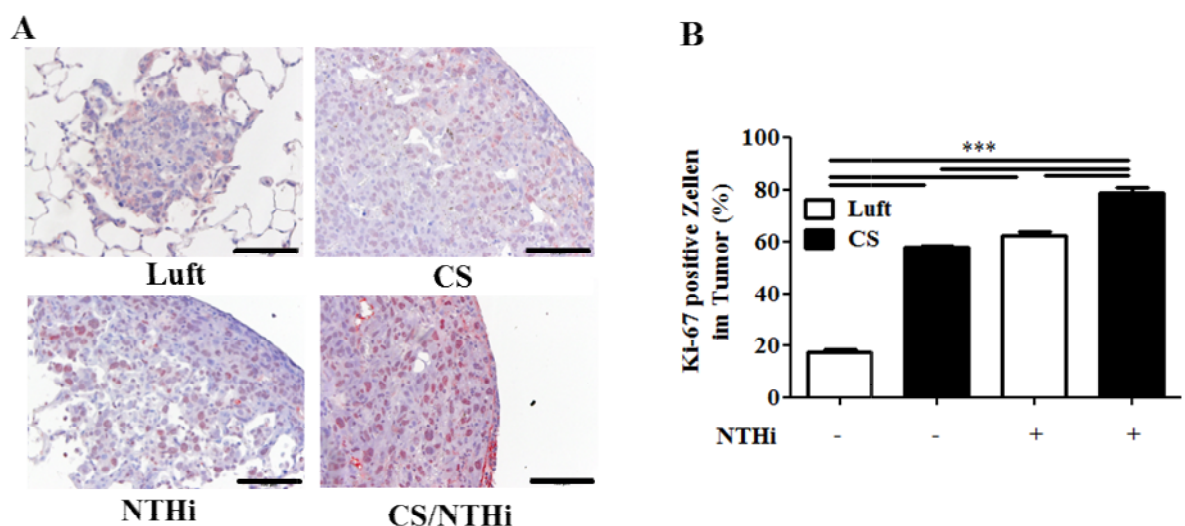


Abbildung 15: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer erhöhten Proliferation im Tumorgewebe. (A) Immunhistochemische Färbung Ki-67 positiver Zellen in Lungentumoren. (B) Quantifizierung der Ki-67 Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. *** P < 0.001, n = 5 pro Gruppe (one-way ANOVA).

Diese Ergebnisse legen dar, dass die Exposition von Tieren mit der Kombination aus CS und NTHi zu einer erhöhten Entzündung im Tumorgewebe und zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen führt.

3.1.5 Bakterien führen zu einer erhöhten Proliferation von Tumorzellen

Vorstehende Ergebnisse ergaben, dass CS die Translokation bakterieller Bestandteile in das Tumorgewebe begünstigt. In Folge dessen kommen bakterielle Komponenten in direkten Kontakt mit Tumorzellen. Deshalb wurde untersucht, inwieweit bakterielle Lungenpathogene die Proliferation in Tumorzellen direkt induzieren. Hierfür sind murine LLC und humane A549 Zellen jeweils mit einer hohen und niedrigen Dosis hitzeinaktivierter NTHi und PAO1 stimuliert und mittels WST-1 Proliferationsassay untersucht worden. Sowohl NTHi als auch PAO1 führten dosisabhängig zu einer gesteigerten Proliferation von LLC (Abbildung 16 A) und A549 (Abbildung 16 B) Zellen.

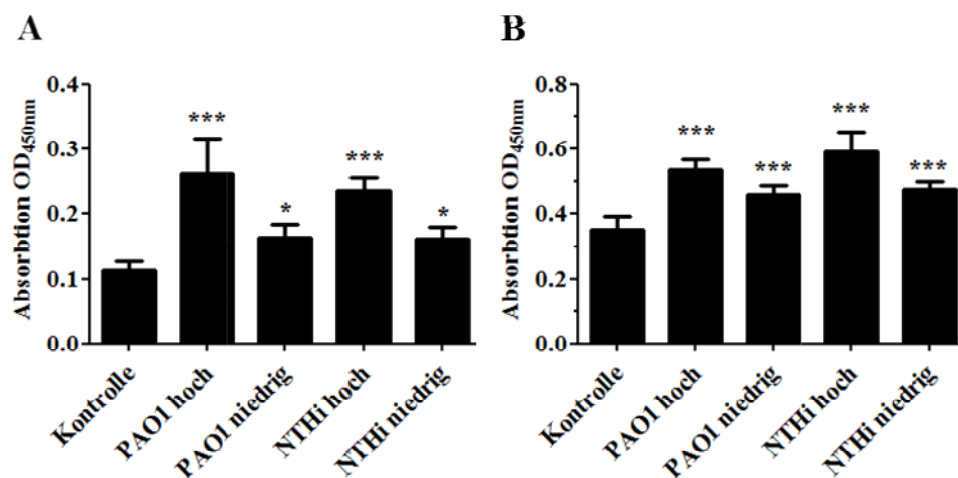


Abbildung 16: Die Proliferation von Lungenkrebszellen wird durch Stimulation mit Lungenpathogenen dosisabhängig gesteigert. (A) LLC und (B) A549 Zellen wurden mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 (Dosis hoch: 10^8 CFU/ml, Dosis niedrig: 10^7 CFU/ml) und NTHi (Dosis hoch: 10^7 CFU/ml, Dosis niedrig: 10^6 CFU/ml) in Medium mit 1% FCS für 24h stimuliert. Die Proliferation wurde mit Hilfe eines WST-1 Proliferationsassays untersucht. Die Daten sind mit SD und $n = 8$ pro Gruppe dargestellt und repräsentieren 3 unabhängige Experimente. * $P < 0.05$ und *** $P < 0.001$ (Student's t-test).

Neben der indirekten Messung der Proliferation über die mitochondriale Aktivität im WST-Proliferationsassay wurde auch die Erhöhung der tatsächlichen Zellzahl über 24 h ermittelt. Hierfür sind murine LLC und humane A549 Zellen mit NTHi und PAO1 stimuliert und nach 24 h ausgezählt worden. Die Stimulation mit hitzeinaktivierten NTHi führte im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen zu einer Erhöhung der LLC-Zellzahl um 14.1 % (SD \pm 2.9, $p = 0.004$) und zu einer Erhöhung der A549-Zellzahl um 4.6 % (SD \pm 1.6, $p = 0.005$).

Um den Mechanismus der Proliferationsinduktion durch bakterielle Lungenpathogene weiteren Untersuchungen zuzuführen, wurden die LLC und A549 Zellen auch mit TLR-2 Liganden stimuliert. Dabei war zu analysieren, ob TLR-2 Liganden allein eine verstärkte Proliferation von LLC und A549 Zellen bewirken können. Bei LLC Zellen und auch bei A549 Zellen führten TLR-2 Liganden Pam3CSK4, gemessen in einem WST-Proliferationsassay über 24h, im Ergebnis zu einer signifikant höheren Proliferationsrate (Abbildung 17).

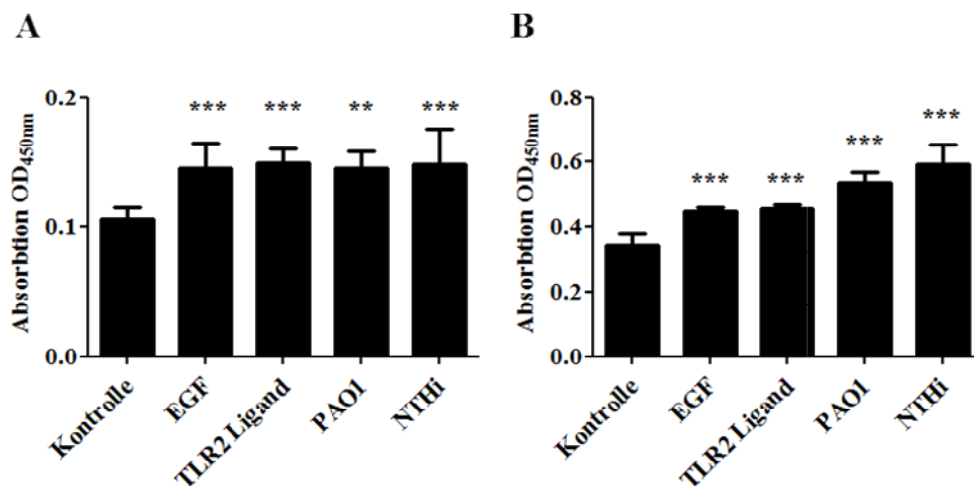


Abbildung 17: Die Proliferation von Lungenkrebszellen wird durch Stimulation mit Lungenpathogenen und TLR-2 Liganden erhöht. (A) LLC und (B) A549 wurden mit EGF (50 µg/ml) als Positivkontrolle, TLR-2 Liganden (Pam3CSK4, 10 µg/ml) hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* PAO1 (10⁸ CFU/ml) und NTHi (10⁷ CFU/ml) in Medium mit 1% FCS für 24h stimuliert. Die Proliferation wurde mit Hilfe eines WST-1 Proliferationsassays untersucht. Die Daten sind mit SD und n = 8 pro Gruppe dargestellt und repräsentieren 3 unabhängige Experimente. **P < 0.005 und ***P < 0.001 (Student's t-test).

Die obigen Ergebnisse zeigen, dass Lungenpathogene *in vitro* die Proliferationsrate beeinflussen und somit zu einem beschleunigten Tumorwachstum beitragen können. Diese direkte Induktion der Proliferation konnte durch eine erhöhte Proliferationsrate mit TLR-2 Liganden in LLC und A549 Lungenkrebszellen bestätigt werden.

3.2 In IL-17A^{-/-} Tieren ist das Wachstum von Lungenmetastasen vermindert

Mehrere Studien konnte bereits darlegen, dass Tumorproliferation und Tumorwachstum vor allem durch die tumorassoziierte Entzündung vermittelt und beeinflusst wird [16;17;31]. So wurde bereits in einem Kras-induzierten murinen Lungenkrebsmodell festgestellt, dass eine COPD-ähnliche Entzündung durch NTHi-Verneblung zu einem IL-17A-abhängigen Anstieg der Tumorlast führte. [13;14].

Nachfolgend wurde daher untersucht, ob IL-17A das Tumorwachstum in dem hier verwendeten Modell beeinflusst. Dafür sind IL-17A^{-/-} und WT Kontrolltieren LLC Zellen in die Schwanzvene injiziert worden. Nach einer 7-tägigen Ruhephase wurden die Versuchstiere für weitere 7 Tage CS und der Kombination CS und NTHi exponiert und anschließend analysiert. Neben der Tumorlast ist vor allem die tumorassoziierte Entzündung und die Proliferation im Tumorgewebe untersucht worden.

Um ein Überleben aller Mäuse sicher zu stellen, wurde den Mäusen eine geringe Anzahl LLC Zellen (2×10^5 Zellen) in die Schwanzvene appliziert, da bei einer höheren Zellzahl CS/NTHi behandelte WT ein signifikant geringeres Überleben aufwiesen. Bei der makroskopischen Analyse der Tumorknoten zeigten die CS/NTHi exponierten IL-17A^{-/-} Tiere eine tendenziell verringerte Anzahl von Tumorknoten auf der Lungenoberfläche (Abbildung 18 A). Die mikroskopische Analyse der von Tumor bedeckten Gesamtlungenfläche wies eine signifikante Reduktion der Tumorlast auf (Abbildung 18 B). Die Versuchsergebnisse der CS exponierten IL-17A^{-/-} und WT Kontrolltiere ergaben hingegen keinen Unterschied in der Tumorlast (Daten nicht gezeigt).

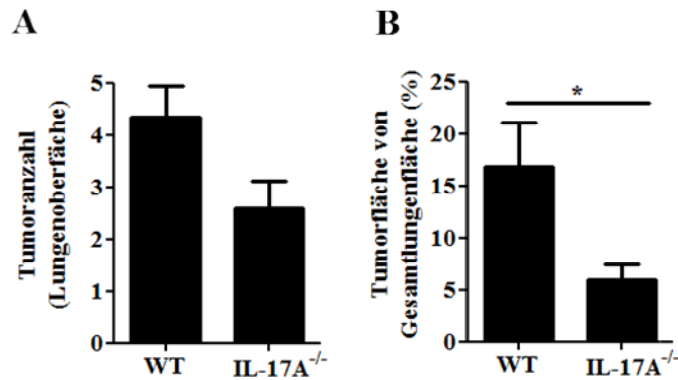


Abbildung 18: Das Wachstum von Lungenmetastasen ist in IL-17A^{-/-} Tieren reduziert. (A) Anzahl der makroskopischen Tumore auf der Lungenoberfläche und (B) Tumorfläche in Abhängigkeit von der Lungengesamtfläche in CS/NTHi-exponierten Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2×10^5 Zellen) * $P < 0.05$, $n = 5$ pro Gruppe (Mann-Whitney test).

Weil IL-17A^{-/-} Tiere eine reduzierte Tumorlast im Vergleich zu WT aufwiesen, wurde im Folgenden die tumorassoziierte Entzündung charakterisiert. Hierbei sollten Rückschlüsse auf die Rolle von IL-17A in der im Tumorgewebe vorliegenden Entzündung gezogen werden. Deshalb wurde die Expression von TNF- α im Tumorgewebe durch eine immunhistochemische Färbung untersucht (Abbildung 19 A). Im Ergebnis wiesen CS und NTHi exponierte IL-17A^{-/-} Tiere eine signifikant verringerte TNF- α Expression im Tumor gegenüber WT Kontrolltieren auf (Abbildung 19 B).

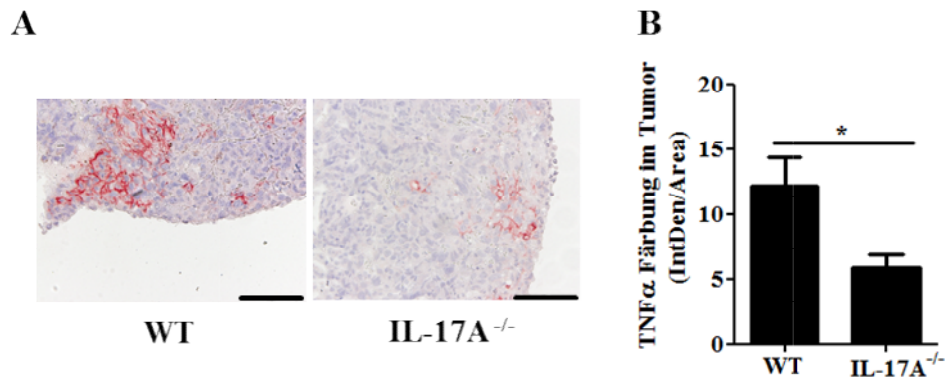


Abbildung 19: Die Entzündung im Tumorgewebe ist in IL-17A^{-/-} Tieren reduziert. (A) Immunhistochemische Färbung von TNF- α in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der TNF- α Färbungen in CS/NTHi-exponierten Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. * $P < 0.05$, $n = 5$ pro Gruppe (Mann-Whitney test).

Neben der signifikant verringerten Tumorlast und der verringerten TNF- α Expression im Tumor wiesen IL-17A^{-/-} Tiere bei einer immunhistochemischen Färbung auf den Proliferationsmarker Ki-67 (Abbildung 20 A) eine signifikant verringerte Anzahl Ki-67 positiver Zellen auf (Abbildung 20 B).

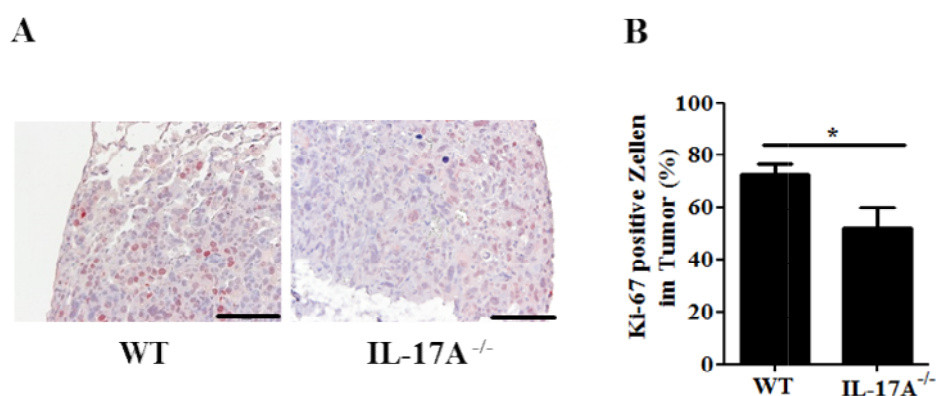


Abbildung 20: IL-17A^{-/-} Tiere weisen eine reduzierte Proliferation im Tumorgewebe auf. (A) Immunhistochemische Färbung Ki-67 positiver Zellen in Lungentumoren. (B) Quantifizierung der Ki-67 Färbungen in CS/NTHi-exponierten Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. * $P < 0.05$, $n = 5$ pro Gruppe (Mann-Whitney test).

Es ist bereits festgestellt worden, dass IL-17A keinen direkten Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit humaner Krebszelllinien, wie zum Beispiel A549, *in vitro* besitzt [116]. Demzufolge wurde untersucht, ob IL-17A den Effekt von Bakterien auf die Proliferation von LLC und A549 *in vitro* beeinflusst.

Dafür wurden die LLC und A549 Zellen mit hitzeinaktivierten NTHi und / oder IL-17A stimuliert. Bei dieser Untersuchung ergab sich, dass IL-17A die Proliferation der mit hitzeinaktivierten NTHi stimulierten und unstimulierten LLC Zellen *in vitro* nicht beeinflusst (Abbildung 21).

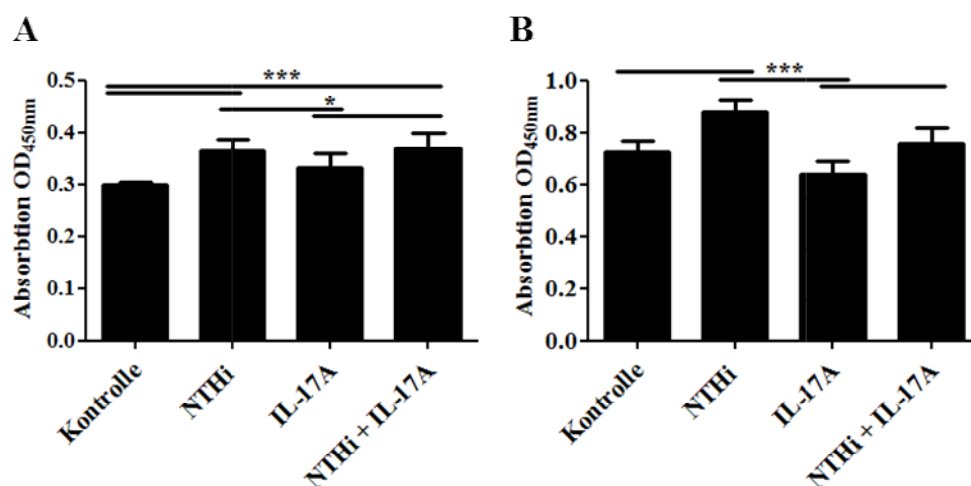


Abbildung 21: IL-17A beeinflusst nicht die Proliferation von LLC und A549 Zellen *in vitro*. (A) LLC und (B) A549 Zellen wurden mit hitzeinaktivierten NTHi (10^7 CFU/ml), IL-17A (50 ng/ml) oder der Kombination von NTHi und IL-17A für 24 h stimuliert. Die Proliferation wurde mit Hilfe eines WST-1 Proliferationsassays untersucht. Die Daten sind mit SD und $n = 8$ pro Gruppe dargestellt und repräsentieren 2 unabhängige Experimente. * $P < 0.05$ und *** $P < 0.001$ (one-way ANOVA).

Die vorstehenden Ergebnisse zeigen, dass CS/NTHi exponierte IL-17A^{-/-} Tiere eine reduzierte Tumoralast im Vergleich zu WT Tieren aufweisen. Die verringerte Gesamttumoralast der Tiere geht mit einer verringerten

tumorassoziierten Entzündung und einer verminderten Tumorproliferation einher. IL-17A moduliert den direkten wachstumsfördernden Effekt von Lungenpathogenen nicht.

3.3 TLR und IL-17C vermitteln die Rekrutierung von tumorassoziierten neutrophilen Granulozyten und das Wachstum von Lungentumoren

Das Zytokin IL-17C gehört zur IL-17 Zytokinfamilie und wird im Gegensatz zu IL-17A, welches von Immunzellen exprimiert wird, von Strukturzellen wie Epithelzellen gebildet [83;85;104;105]. Studien zeigten, dass die Expression von IL-17C über TLR reguliert wird. IL-17C vermittelt zum einen die Entzündung in Epithelzellen autokrin und zum anderen die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Gewebe [83;104;105;108]. Die durch Bakterien ausgelösten akuten Exazerbationen von COPD Patienten gehen mit einer erhöhten neutrophilen Entzündung einher [19;102;117]. Daher sollte im Fortgang die Funktion von TLR und IL-17C in der pulmonalen Tumormikroumgebung untersucht werden.

3.3.1 Die NTHi-induzierte pulmonale Entzündung und das Tumorstadium werden durch TLR-2/4 vermittelt

Um den Einfluss von TLR auf die tumorassoziierte Entzündung und das Tumorstadium zu charakterisieren, wurde WT Mäusen und TLR-2/4^{-/-} Versuchstieren LLC über die Schwanzvene injiziert. Nach einer Ruhephase von 7 Tagen nach der LLC Injektion sind die Versuchstiere für weitere 7 Tage NTHi und Raumluft exponiert und analysiert worden. Im Gegensatz zu WT Mäusen führte die Exposition bei TLR-2/4^{-/-} Mäusen zu keiner erhöhten Tumorstadium in der Lunge. Dies konnte durch die makroskopische Analyse der Tumorknoten auf der Lungenoberfläche und durch die mikroskopische Analyse der prozentual von Tumor bedeckten Gesamtlungenfläche nachgewiesen werden (Abbildung 22 A-C). Lediglich NTHi behandelte WT Mäuse zeigten, verglichen mit raumluftbehandelten

Kontrollen, eine signifikant erhöhte makroskopische Tumorknotenanzahl auf der Lungenoberfläche (Abbildung 22 A).

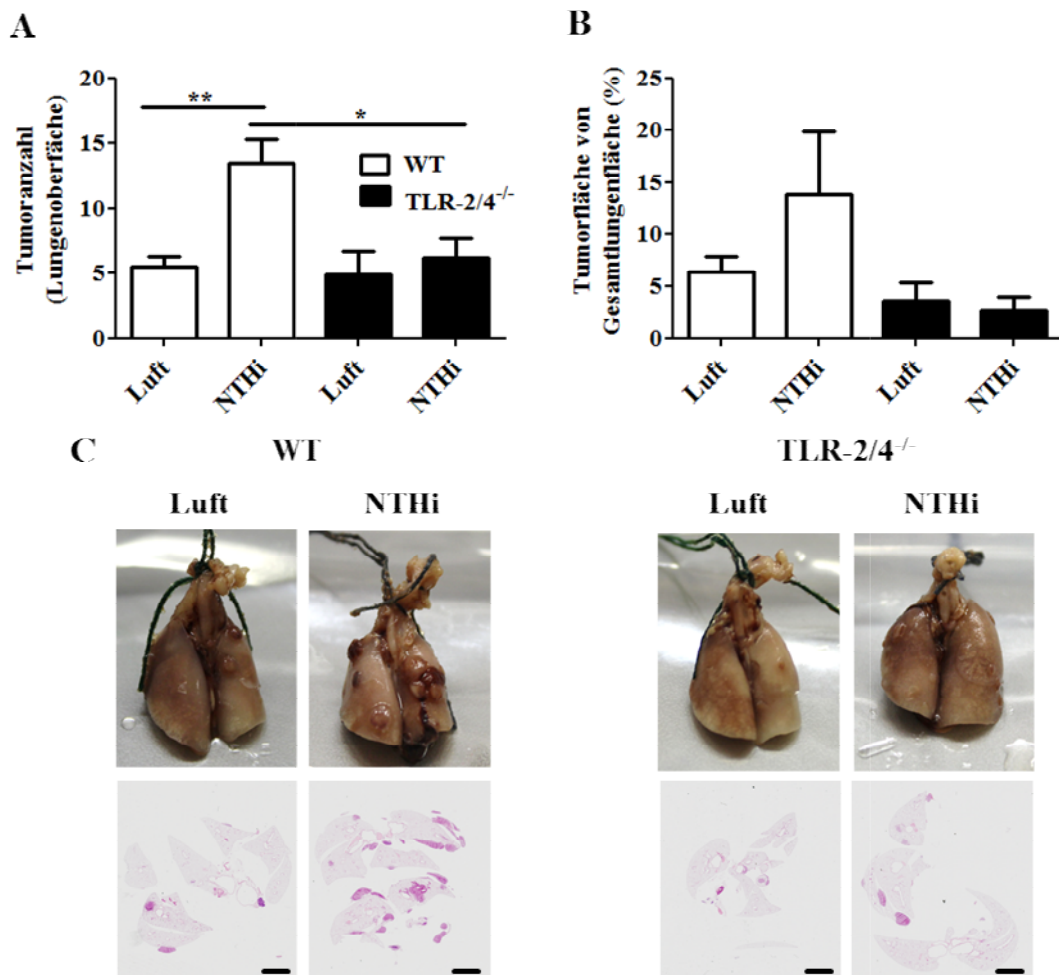


Abbildung 22: Das NTHi-vermittelte Wachstum von Lungenmetastasen ist TLR-2/4 abhängig. (A) Anzahl der makroskopischen Tumore auf der Lungenoberfläche. (B) Tumorfläche in Abhängigkeit von der Lungengesamtfläche. (C) Makroskopische und Mikroskopische Pathologie (Hämatoxylin & Eosin Färbung) 14 Tage nach LLC Injektion (2.5×10^5 Zellen), Maßstab = 250 μm . * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, $n \geq 6$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Um Rückschlüsse auf die Proliferation der Tumorzellen zu erhalten, wurde mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 die Proliferation im Tumorgewebe durch immunhistochemische Färbung analysiert (Abbildung

23 A). Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung ergab, dass lediglich NTHi behandelte WT Tiere eine signifikant erhöhte Anzahl Ki-67 positiver Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren aufwiesen. Außerdem wiesen NTHi behandelte TLR-2/4^{-/-} Tiere eine signifikant geringere Anzahl Ki-67 positiver Zellen als NTHi behandelte WT Tiere im Tumorgewebe auf (Abbildung 23 B).

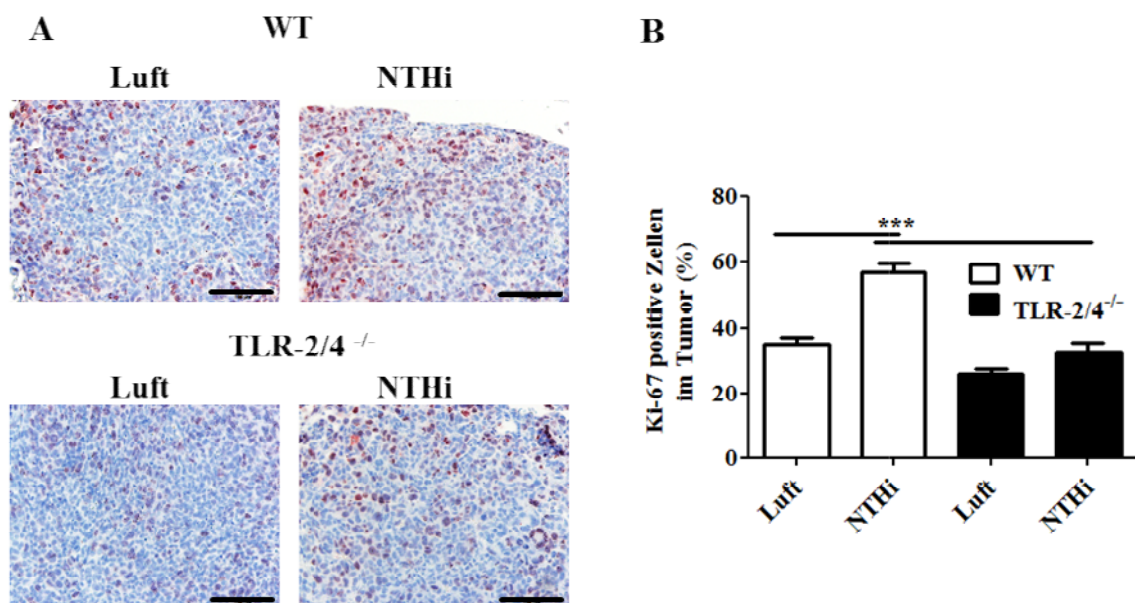


Abbildung 23: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Proliferation im Tumorgewebe von TLR-2/4^{-/-} Tieren. (A) Immunhistochemische Färbung von Ki-67 positiven Zellen in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der Ki-67 Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. *** $P < 0.001$, $n \geq 6$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Da die Entzündung in der Tumormikroumgebung die Tumorphroliferation fördert [16;17;31] und TLR-2/4^{-/-} Tiere neben einer verminderten Gesamtumorlast auch eine verminderte Proliferation im Tumorgewebe hatten, wurde nachfolgend die tumorassoziierte Entzündung näher charakterisiert. Hierzu ist die Anzahl der Ly6B⁺ Zellen (Abbildung 24 A

und B) sowie die Expression von TNF- α im Tumorgewebe (Abbildung 25 A und B) mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht worden.

Die Exposition mit NTHi führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl an Ly6B⁺ Zellen im Tumorgewebe von WT Tieren. Die Rekrutierung von Ly6B⁺ Zellen zeigte sich komplett TLR-2/4-abhängig. Es kam zu keiner gesteigerten Rekrutierung von Ly6B⁺ Zellen in das Tumorgewebe von TLR-2/4^{-/-} Tieren nach NTHi-Exposition. Die Anzahl von Ly6B⁺ Zellen in Lungentumoren war in NTHi behandelten TLR-2/4^{-/-} Tieren signifikant geringer als in NTHi behandelten WT Tieren (Abbildung 24 A und B).

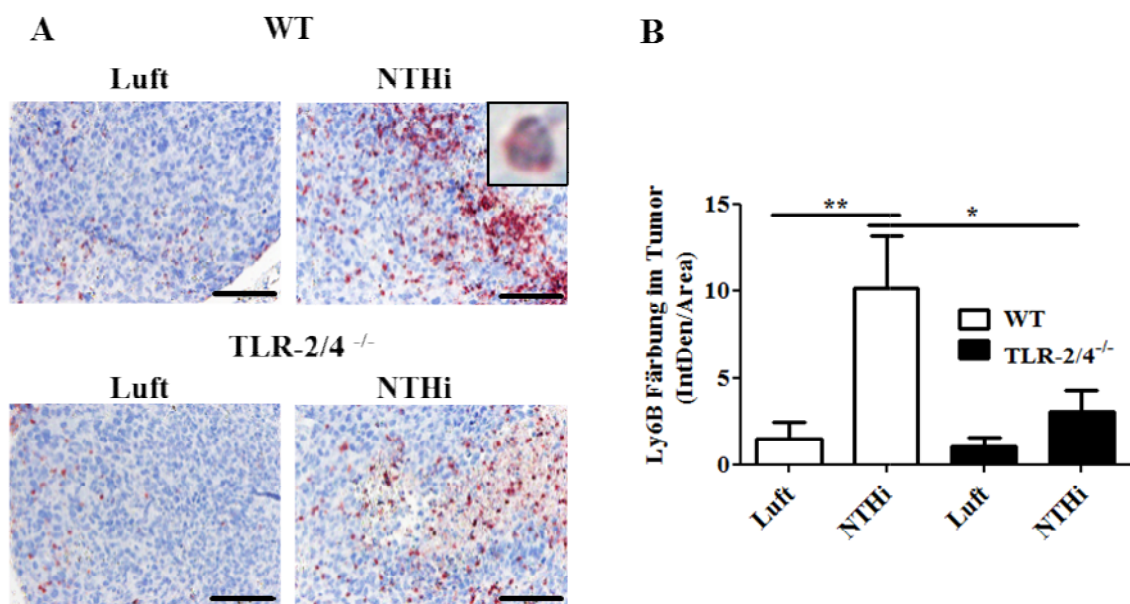


Abbildung 24: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Anzahl von Ly6B⁺ Zellen im Tumorgewebe von TLR-2/4^{-/-} Tieren. (A) Immunhistochemische Färbung von Ly6B⁺ Zellen in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der Ly6B Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, $n \geq 6$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Die Exposition mit NTHi führte zu einer signifikant gesteigerten Expression von TNF- α im Tumorgewebe von WT Tieren. Die Expression

von TNF- α war hier komplett TLR-2/4-abhängig. Es kam zu keiner gesteigerten Expression von TNF- α im Tumorgewebe von TLR-2/4^{-/-} Tieren nach der NTHi-Exposition. Die Expression von TNF- α in Lungentumoren war in NTHi behandelten TLR-2/4^{-/-} Tieren signifikant geringer als in NTHi behandelten WT Tieren (Abbildung 25 B).

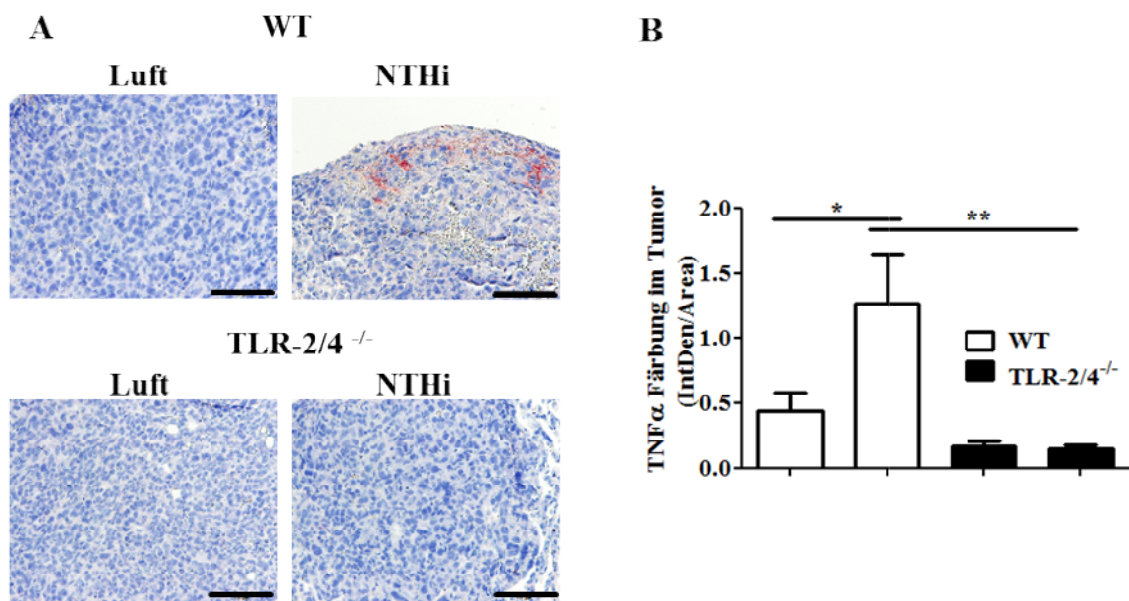


Abbildung 25: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Entzündung im Tumorgewebe von TLR-2/4^{-/-} Tieren. (A) Immunhistochemische Färbung von TNF- α in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der TNF- α Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, $n \geq 6$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Tumorwachstum, Tumorproliferation, tumorassoziierte Entzündung und Rekrutierung tumorassoziiertes neutrophiler Granulozyten TLR-2/4 abhängig ist.

Um im Weiteren den Einfluss von TLR-2/4 auf die pulmonale Entzündung zu charakterisieren, wurde die Anzahl an Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym untersucht. Dabei wiesen TLR-2/4^{-/-} Tiere eine

signifikant geringere Anzahl an Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym als NTHi behandelte WT Tiere auf (Abbildung 26 A und B). NTHi behandelte WT Tiere, nicht aber TLR-2/4^{-/-} Tiere, hatten eine signifikant erhöhte Anzahl Ly6B⁺ Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren im Lungenparenchym (Abbildung 26 B).

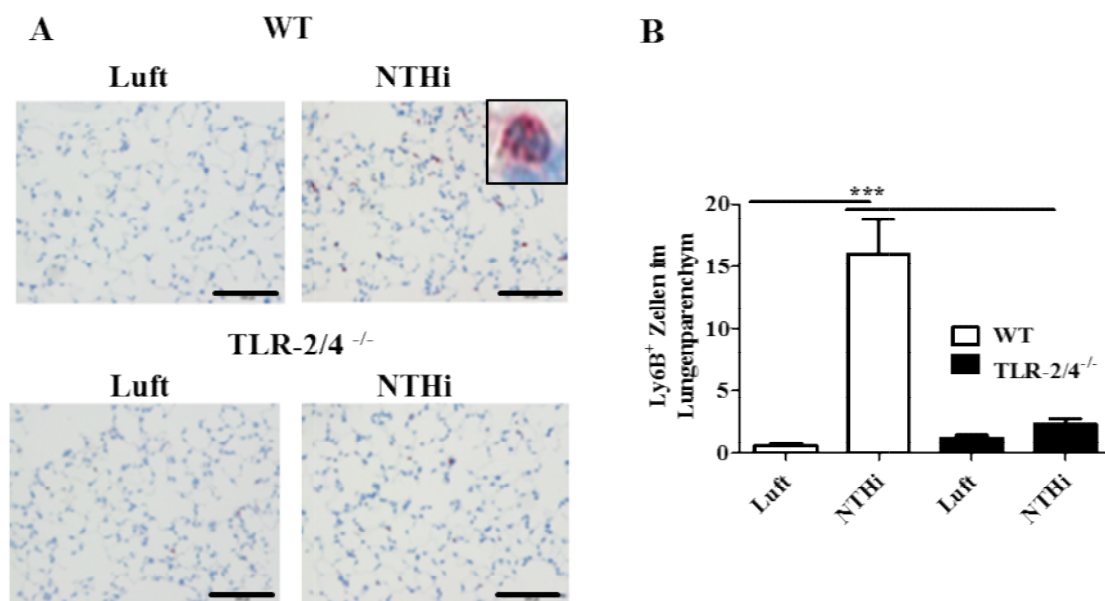


Abbildung 26: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Anzahl von Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym von TLR-2/4^{-/-} Tieren. (A) Immunhistochemische Färbung von Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym und (B) Quantifizierung der Ly6B⁺ Zellen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. *** $P < 0.001$, $n \geq 6$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Weil TLR-2/4^{-/-} Tiere eine signifikant geringere Anzahl neutrophiler Granulozyten im Parenchym aufwiesen als WT Tiere, wurde weitergehend der Einfluss von TLR-2/4 auf die Konzentrationen der Neutrophilen-rekrutierenden Zytokine KC und MIP-2 in der BAL Flüssigkeit untersucht. Dafür sind krebsfreie WT und TLR-2/4^{-/-} Tiere einmalig NTHi oder Raumluft exponiert und nach 24 h analysiert worden. TLR-2/4^{-/-} Tiere

hatten in diesem Versuchsaufbau nach NTHi Exposition signifikant geringere Konzentrationen der Zytokine KC und MIP-2 in der BAL Flüssigkeit als WT Tiere. Darüber hinaus wiesen NTHi behandelte IL-17C^{-/-} Tiere signifikant verringerte KC und MIP-2 Konzentrationen in der BAL Flüssigkeit auf als NTHi behandelte WT Tiere (Abbildung 27).

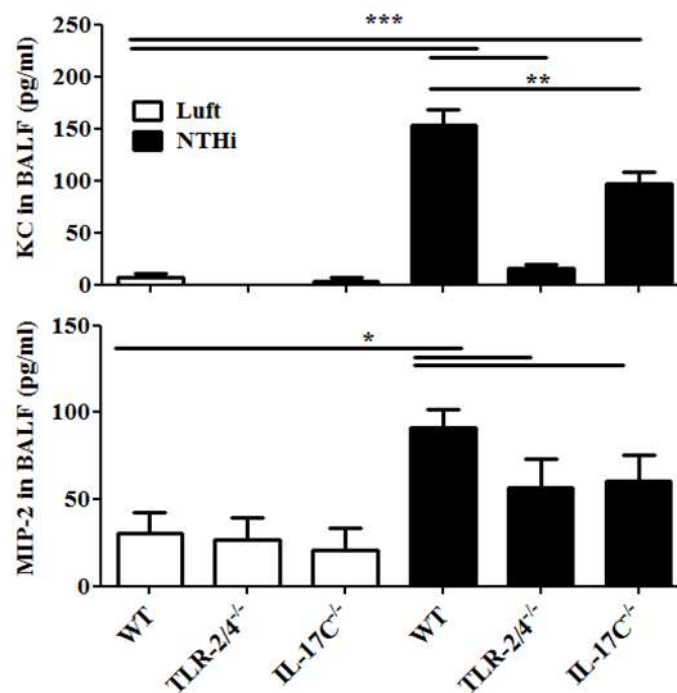


Abbildung 27: TLR-2/4 und IL-17C vermitteln die NTHi-induzierte Entzündung im Alveolarraum. Konzentrationen von Entzündungsmediatoren in der BAL Flüssigkeit von krebsfreien Mäusen 24 Stunden nach der NTHi Exposition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Die obigen Ergebnisse legen dar, dass die durch NTHi induzierte pulmonale Entzündung im Alveolarraum durch TLR-2/4 und IL-17C vermittelt wird.

3.3.2 Die NTHi-induzierte Rekrutierung tumorassoziierter neutrophiler Granulozyten und das Tumorstadium werden durch IL-17C reguliert

Zur Analyse der TLR-abhängigen Regulation von IL-17C wurde nachfolgend die Expression von IL-17C im Lungengewebe kreisfreier WT, TLR-2/4^{-/-} und IL-17C^{-/-} Mäuse bestimmt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass NTHi zu einem signifikanten Anstieg der Expression von IL-17C im Lungengewebe von WT Mäusen führt (Abbildung 28). Im Gegensatz dazu war die Expression von IL-17C in TLR-2/4^{-/-} Mäusen nicht signifikant erhöht. IL-17C^{-/-} Mäuse zeigten keine IL-17C Expression.

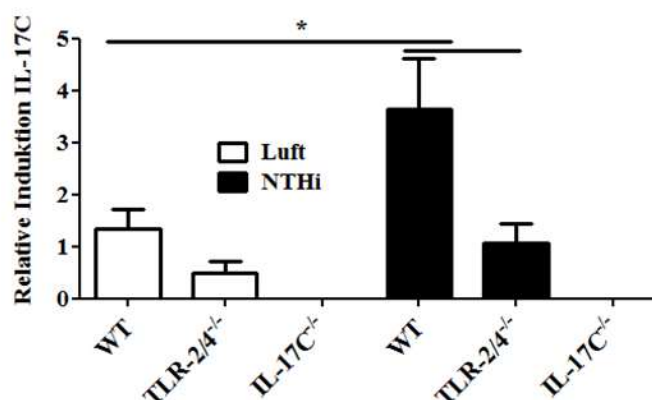


Abbildung 28: NTHi führt zu einer TLR-2/4 abhängigen Expression von IL-17C. Relative mRNA Expression (GAPDH) von IL-17C im Lungengewebe kreisfreier Raumlufte und NTHi exponierter Tiere nach 24 Stunden. * $p < 0.05$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Danach ist die Funktion von IL-17C in Bezug auf das durch die pulmonale Entzündung induzierte Tumorstadium untersucht worden. Hierfür wurden LLC Zellen in WT und IL-17C^{-/-} Tiere injiziert. Für die Charakterisierung der Entzündung im Tumorgewebe sind die Ly6B⁺ Zellen im Tumorgewebe quantifiziert und ausgewertet worden (Abbildung 29 A). Dabei führte die NTHi-induzierte Entzündung zu einer signifikant

erhöhten Rekrutierung von Ly6B⁺ Zellen in das Tumorgewebe von WT Mäusen. Im Gegensatz hierzu wiesen IL-17C^{-/-} Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen keine erhöhte oder veränderte Rekrutierung von Ly6B⁺ Zellen in das Tumorgewebe auf (Abbildung 29 A und B).

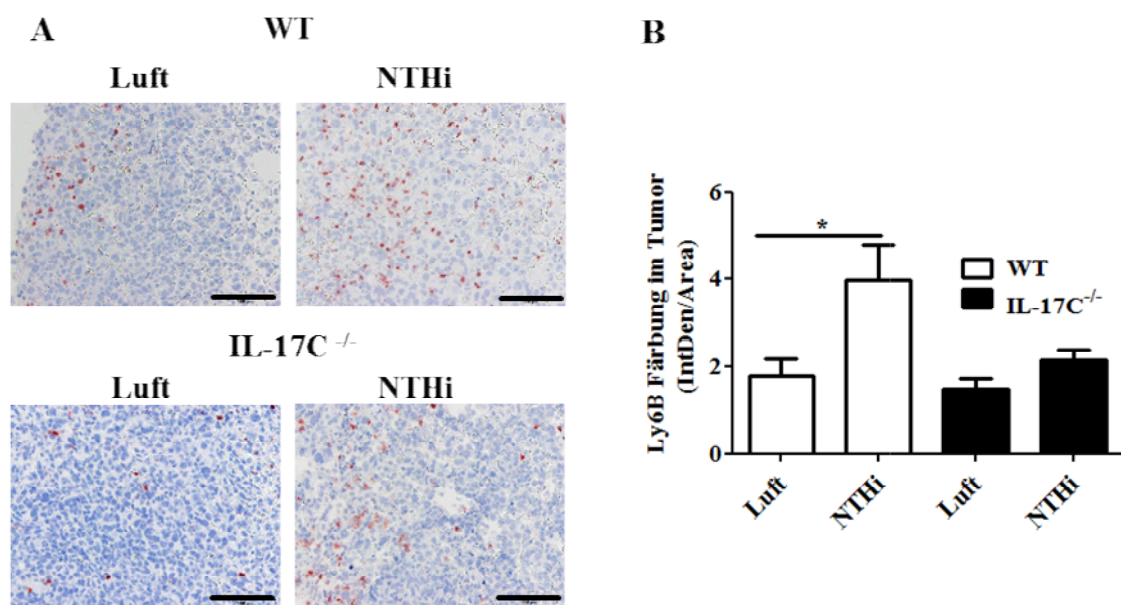


Abbildung 29: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Anzahl von Ly6B⁺ Zellen im Tumorgewebe von WT Tieren. IL-17C^{-/-} Mäuse weisen keine erhöhte oder veränderte Rekrutierung von Ly6B⁺ Zellen in das Tumorgewebe auf (A) Immunhistochemische Färbung von Ly6B⁺ Zellen in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der Ly6B Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μm . * $P < 0.05$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Um die tumorassoziierte Entzündung eingehender zu untersuchen, wurde die TNF- α Expression im Tumorgewebe mittels immunhistochemischer Färbung analysiert (Abbildung 30). Dabei zeigten NTHi exponierte IL-17C^{-/-} Mäuse, verglichen mit unbehandelten Kontrollmäusen, keine erhöhte Expression von TNF- α im Tumorgewebe. NTHi exponierte WT Mäuse

hatten, verglichen mit unbehandelten Kontrollmäusen und gleichbehandelten IL-17C^{-/-} Mäusen, jedoch eine signifikant erhöhte Expression von TNF- α im Tumorgewebe (Abbildung 30 A und B).

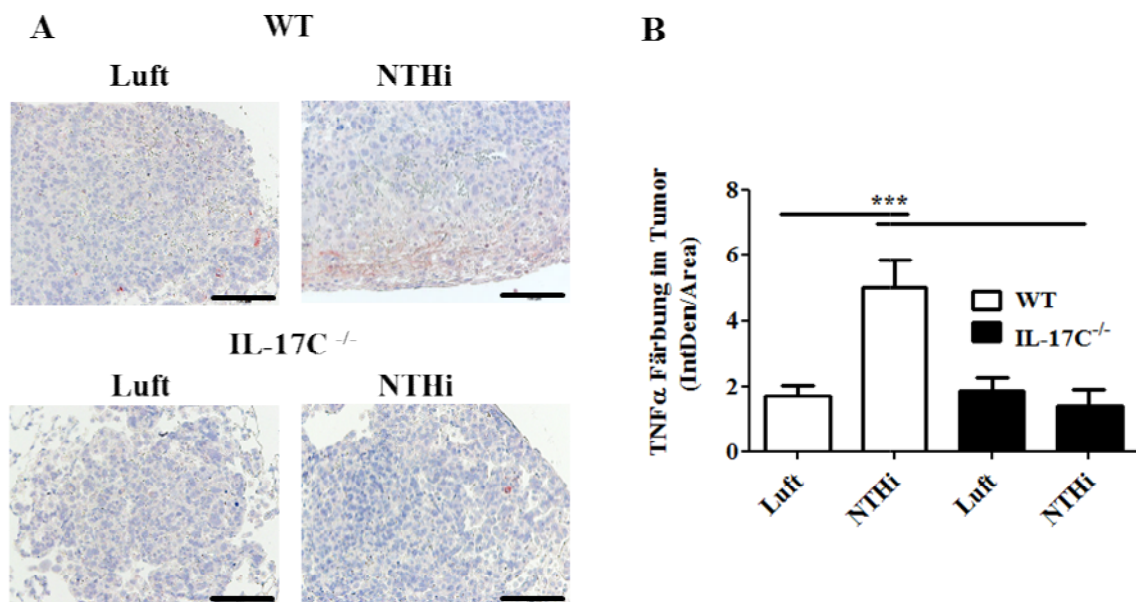


Abbildung 30: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Entzündung im Tumorgewebe von WT Tieren. IL-17C^{-/-} Mäuse weisen keine erhöhte oder veränderte TNF- α Expression im Tumorgewebe auf. (A) Immunhistochemische Färbung von TNF- α in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der TNF- α Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. ***P < 0.001, n \geq 5 pro Gruppe (one-way ANOVA).

Weil die IL-17C-Defizienz zu einer verminderten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und zu einer verminderten tumorassoziierten Entzündung führte, ist sodann der Einfluss von IL-17C auf die Entzündung im Lungengewebe untersucht worden. Dafür wurde die Anzahl an Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym analysiert (Abbildung 31). NTHi behandelte WT und IL-17C^{-/-} Mäuse wiesen eine signifikant erhöhte Anzahl an Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym auf. Die Anzahl an Ly6B⁺ Zellen war in

IL-17C^{-/-} Mäusen im Vergleich zu gleichbehandelten WT Mäusen signifikant niedriger (Abbildung 31 A und B).

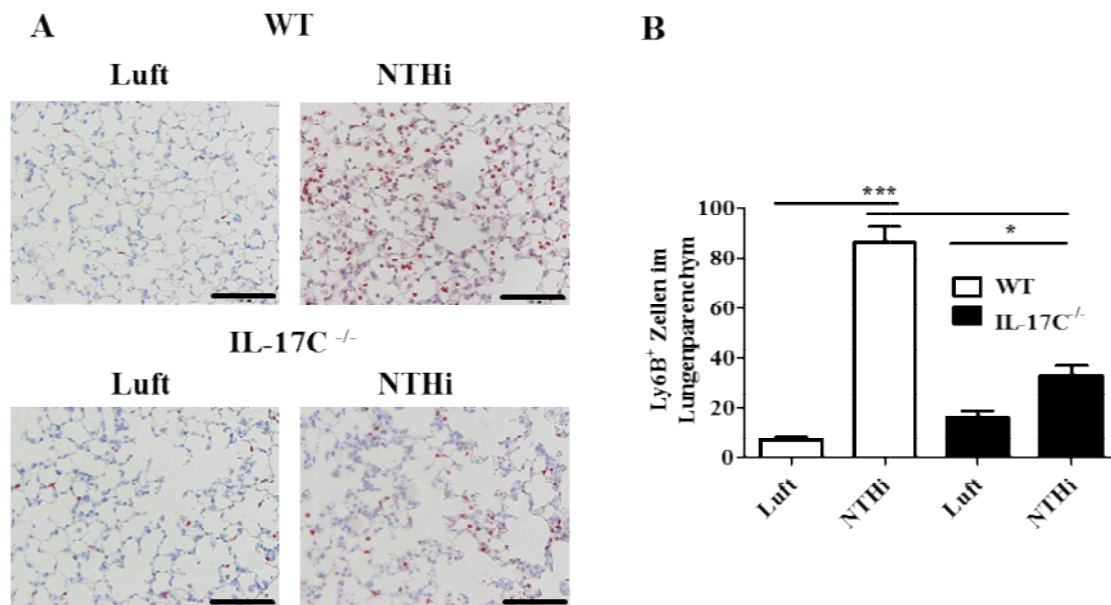


Abbildung 31: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Anzahl von Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym von WT und IL-17C^{-/-} Tieren. WT Mäuse weisen mehr Ly6B⁺ Zellen als IL-17C^{-/-} Mäuse auf. (A) Immunhistochemische Färbung von Ly6B⁺ Zellen im Lungenparenchym und (B) Quantifizierung der Ly6B⁺ Zellen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Zur Charakterisierung der Entzündung des Alveolarraums wurde die Anzahl an neutrophilen Granulozyten (Abbildung 32 A) und Makrophagen (Abbildung 32 B) in der BAL Flüssigkeit bestimmt. Die NTHi-Exposition führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL Flüssigkeit von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen. Die IL-17C^{-/-} Mäuse wiesen im Vergleich zu den WT Mäusen eine signifikant geringere Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL Flüssigkeit auf (Abbildung 32 A). Die Gesamtzahl der Makrophagen wurde weder durch die NTHi-

Exposition noch durch den Knockout von IL-17C signifikant beeinflusst (Abbildung 32 B).

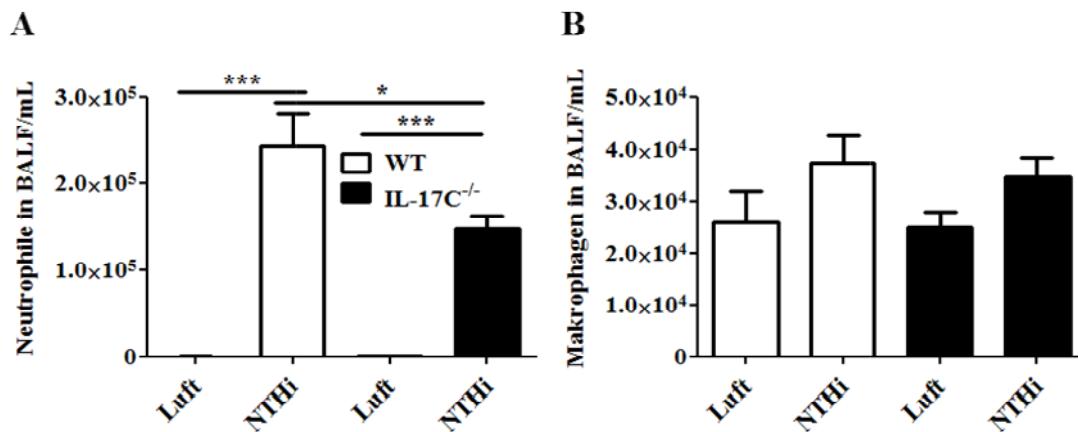


Abbildung 32: Die NTHi-Exposition führt zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum. Anzahl der neutrophilen Granulozyten (A) und Makrophagen (B) in der BAL Flüssigkeit von WT und IL-17C^{-/-} Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Somit konnte gezeigt werden, dass die IL-17C-Defizienz zu einer geringeren Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowohl in das Lungenparenchym als auch in den Alveolarraum und in das Tumorgewebe führt. Damit einher ging auch eine Reduktion der tumorassoziierten Entzündung.

Die makroskopische (Abbildung 33 A) und mikroskopische Analyse (Abbildung 33 B) ergab, dass die NTHi-Exposition von WT Mäusen 14 Tage nach der LLC Injektion zu einer tendenziellen Erhöhung der Gesamttumorlast führte.

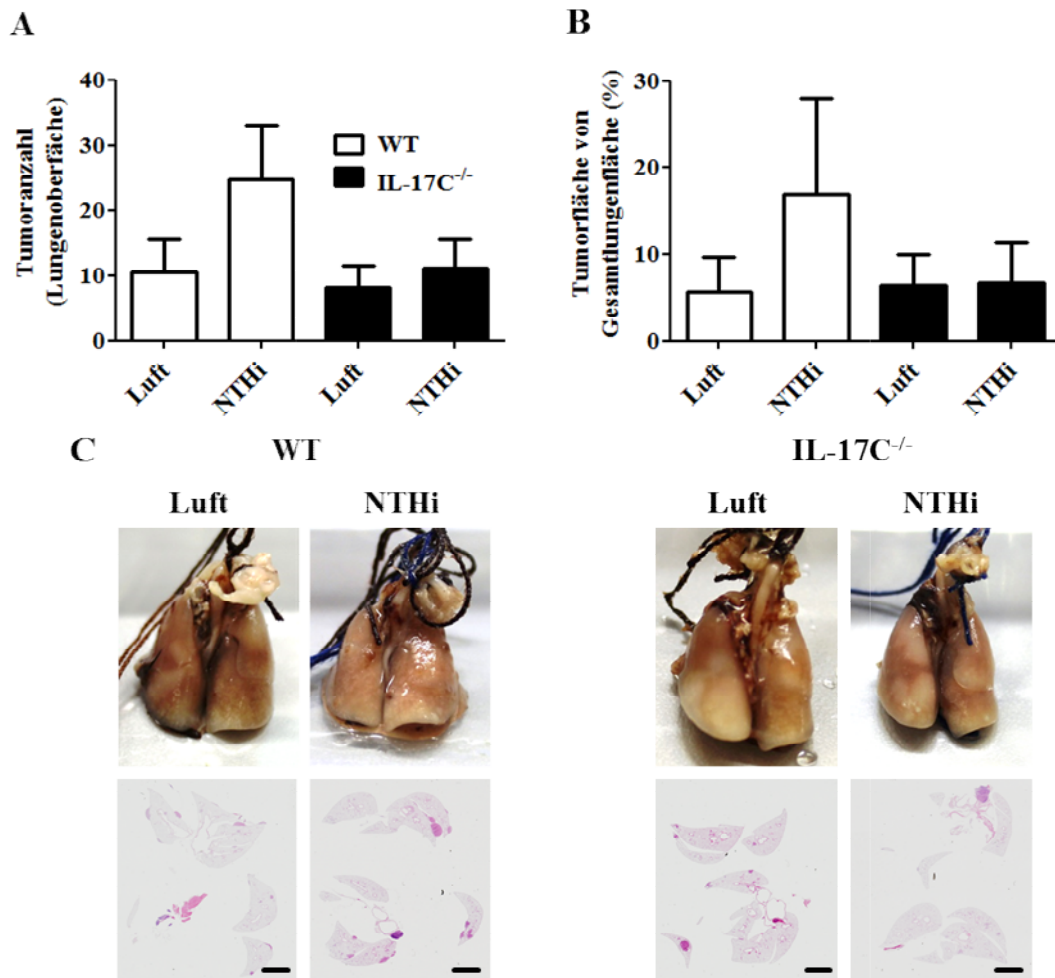


Abbildung 33: Die NTHi-Exposition führt zu einer tendenziellen Erhöhung der Gesamttumorlast in WT Mäusen. (A) Anzahl der makroskopischen Tumore auf der Lungenoberfläche. (B) Tumorfäche in Abhängigkeit von der Lungengesamtfläche. (C) Makroskopische und mikroskopische Pathologie (Hämatoxylin & Eosin Färbung) 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen), Maßstab = 250 μm . $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Um Rückschlüsse auf die Proliferation der Tumorzellen zu erhalten, wurde mit Hilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 die Proliferation im Tumorgewebe durch immunhistochemische Färbung analysiert (Abbildung 34 A). Hierbei wiesen NTHi behandelte Tiere eine signifikant erhöhte Anzahl Ki-67 positiver Zellen im Tumor auf (Abbildung 34 B). Überdies war die Anzahl Ki-67 positiver Zellen in IL-17C^{-/-} Tieren im Vergleich zu

NTHi behandelten WT Tieren signifikant erniedrigt. Unbehandelte WT und IL-17C^{-/-} Tiere hatten keine unterschiedliche Anzahl Ki-67 positiver Zellen.

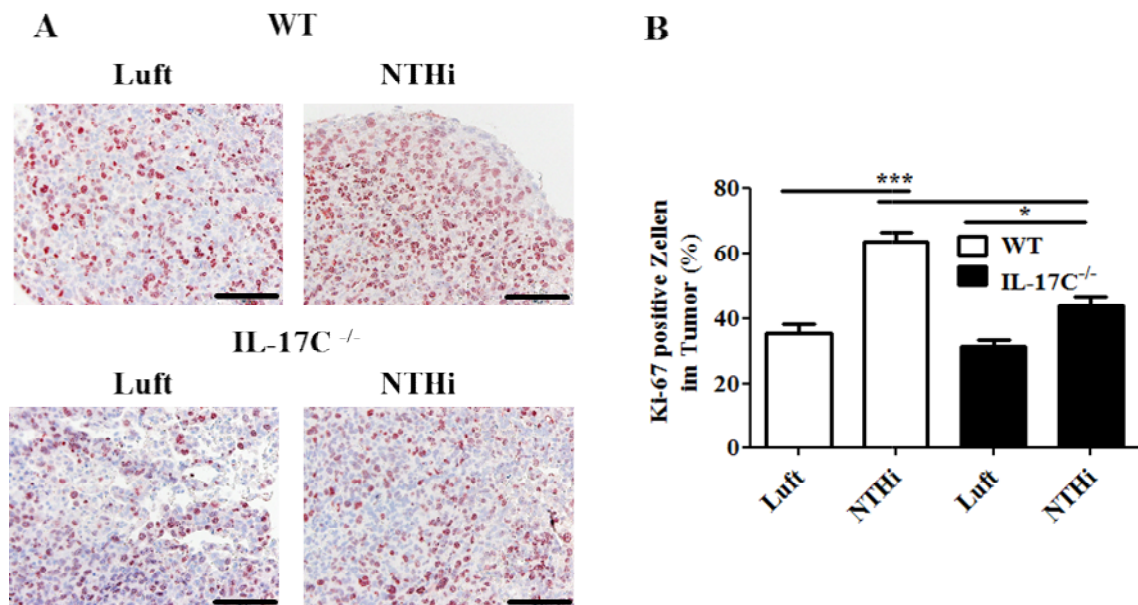


Abbildung 34: Die Exposition mit NTHi führt zu einer erhöhten Proliferation im Tumorgewebe. Die Anzahl Ki-67 positiver Zellen ist in NTHi behandelten IL-17C^{-/-} Tieren erniedrigt. (A) Immunhistochemische Färbung von Ki-67 positiven Zellen in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der Ki-67 positiven Zellen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (2.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μ m. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Zur weiteren Charakterisierung des Tumorwachstums sind sodann Mäuse 19 Tage nach der Injektion von LLC Zellen analysiert worden. Die makroskopische (Abbildung 35 A) und mikroskopische Analyse (Abbildung 35 B) der Tumore zeigte, dass das NTHi-induzierte Tumorwachstum bei IL-17C^{-/-} Mäusen signifikant vermindert war. Bei IL-17C^{-/-} Mäusen konnte lediglich in der makroskopischen Betrachtung der Tumorknoten auf der Lungenoberfläche eine signifikante Erhöhung durch die NTHi Behandlung festgestellt werden (Abbildung 35 A-C).

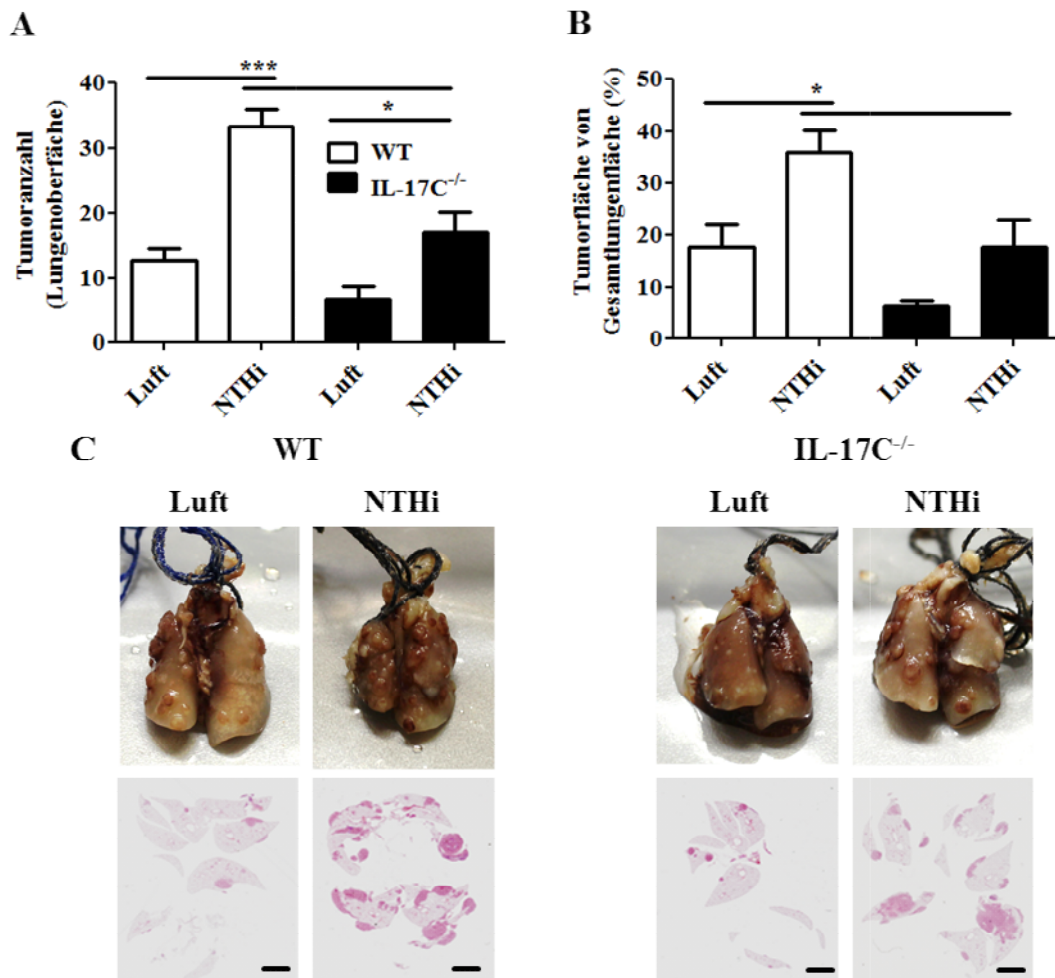


Abbildung 35: IL-17C^{-/-} Mäuse weisen eine geringere Tumorlast auf als WT Mäuse nach NTHi-Exposition. (A) Anzahl der makroskopischen Tumore auf der Lungenoberfläche. (B) Tumorfläche in Abhängigkeit von der Lungengesamtfläche. (C) Makroskopische und mikroskopische Pathologie (Hämatoxylin & Eosin Färbung) 19 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen), Maßstab = 250 μm . * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Die vorstehenden Ergebnisse legen dar, dass die IL-17C-Defizienz eine verminderte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Lungen- und Tumorgewebe zur Folge hat. Im Zusammenhang hiermit war eine Reduktion der tumorassoziierten Entzündung zu beobachten, die zu einer geringeren Tumorproliferation und einer damit verbundenen Reduktion der Gesamttumorlast führte.

3.3.3 IL-17C reguliert die tumorassoziierte Entzündung und Tumorproliferation in CS/NTHi behandelten Tieren

Neben der NTHi-Exposition wurden WT und IL-17C^{-/-} Mäuse ebenfalls mit CS und der Kombination von CS und NTHi exponiert und 14 Tage nach LLC Injektion analysiert. Die CS-Exposition führte dabei weder bei WT noch bei IL-17C^{-/-} Mäusen zu einer signifikant erhöhten Gesamttumorlast (Daten nicht gezeigt). Die Kombination von CS und NTHi führte dagegen in IL-17C^{-/-} Mäusen zu einer signifikant geringeren Tumorlast als in gleich behandelten WT Mäusen (Abbildung 36 A). Dies ließ sich sowohl in der makroskopischen Auswertung der Tumoranzahl (Abbildung 36 B) als auch in der mikroskopischen Auswertung der Hämatoxylin & Eosin Färbung zeigen (Abbildung 36 C).

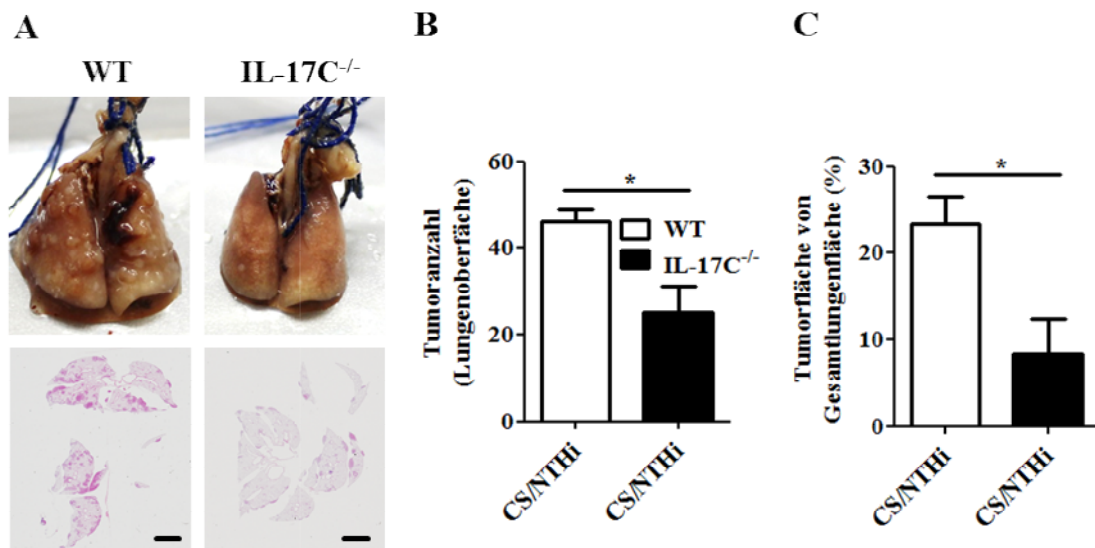


Abbildung 36: Die Exposition aus der Kombination von CS und NTHi führt, verglichen mit IL-17C^{-/-} Mäusen, zu einer signifikant größeren Gesamttumorlast in WT Mäusen. (A) Makroskopische und mikroskopische Pathologie (Hämatoxylin & Eosin Färbung). (B) Anzahl der makroskopischen Tumore auf der Lungenoberfläche. (C) Tumorfläche in Abhängigkeit von der Lungengesamtfläche 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen), Maßstab = 250 μm . * $P < 0.05$, $n \geq 5$ pro Gruppe (Mann-Whitney Test).

Zur nachfolgenden Untersuchung der durch die Kombination von CS und NTHi ausgelösten tumorassoziierten Entzündung und des Einflusses von IL-17C darauf, sind die Ly6B⁺ Zellen im Tumorgewebe gefärbt und ausgewertet worden (Abbildung 37 A). Die Kombination von CS und NTHi in IL-17C^{-/-} Mäusen führte hierbei zu einer signifikant geringeren Rekrutierung von Ly6B⁺ Zellen in das Tumorgewebe als bei WT Mäusen (Abbildung 37 B).

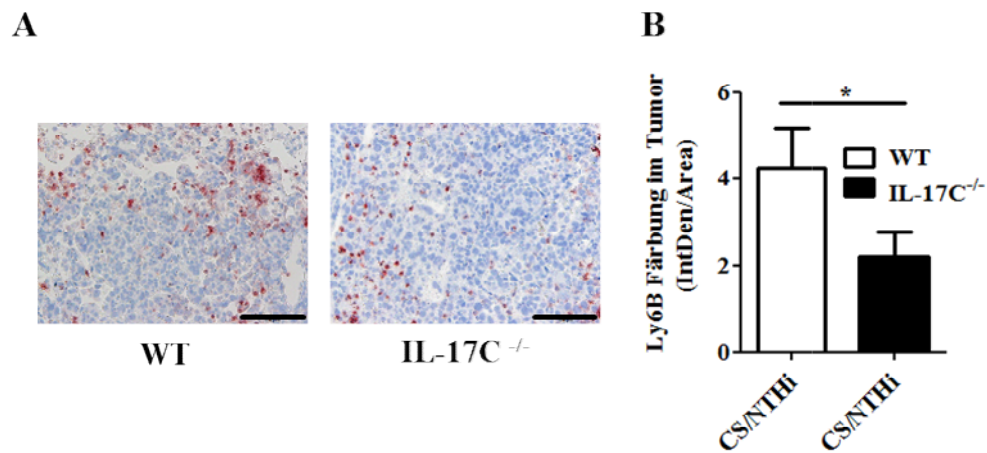


Abbildung 37: Die Exposition mit CS und NTHi führt im Vergleich zu WT Tieren zu einer geringeren Anzahl von Ly6B⁺ Zellen im Tumorgewebe von IL-17C^{-/-} Mäusen. (A) Immunhistochemische Färbung von Ly6B⁺ Zellen in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der Ly6B Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μm . * $P < 0.05$, $n \geq 5$ pro Gruppe (Mann-Whitney Test).

Anschließend wurde die Expression von TNF- α im Tumorgewebe durch eine immunhistochemische Färbung untersucht (Abbildung 38 A). Dabei konnte festgestellt werden, dass CS und NTHi exponierte IL-17C^{-/-} Tiere gegenüber WT Tieren eine signifikant verringerte TNF- α Expression im Tumor aufweisen (Abbildung 38 B).

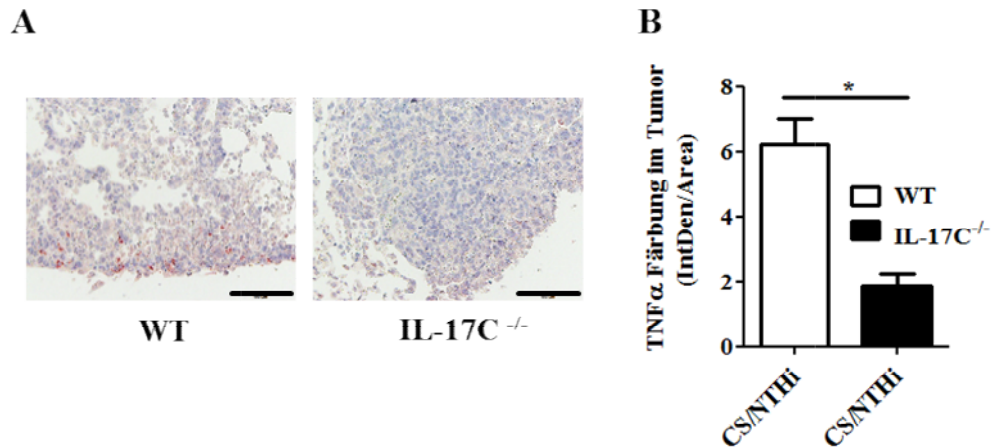


Abbildung 38: Die Entzündung im Tumorgewebe ist in IL-17C^{-/-} Tieren reduziert. (A) Immunhistochemische Färbung von TNF- α in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der TNF- α Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion ($5,5 \times 10^5$ Zellen). Maßstab = 100 μ m. * $P < 0.05$, $n \geq 5$ pro Gruppe (Mann-Whitney Test).

CS/NTHi behandelte IL-17C^{-/-} Tiere wiesen bei einer immunhistochemischen Färbung auf den Proliferationsmarker Ki-67 (Abbildung 39 A) eine signifikant verringerte Anzahl Ki-67 positiver Zellen auf als WT Tiere (Abbildung 39 B).

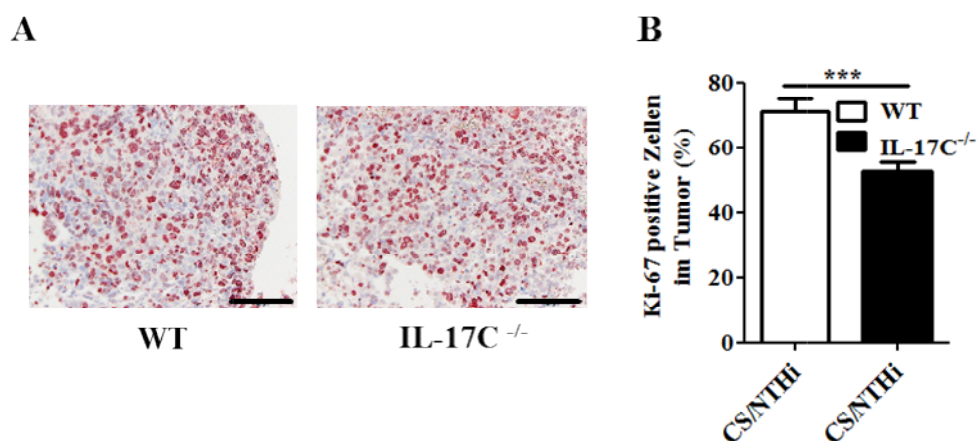


Abbildung 39: IL-17C^{-/-} Tiere weisen eine reduzierte Proliferation des Tumorgewebes auf. (A) Immunhistochemische Färbung von Ki-67 positiven Zellen in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der Ki-67 Färbungen in Tieren 14 Tage nach LLC Injektion ($5,5 \times 10^5$ Zellen). Maßstab = 100 μ m, *** $P < 0.001$, $n \geq 5$ pro Gruppe (Mann-Whitney Test).

Es konnte gezeigt werden, dass in CS/NTHi behandelten Tieren die Defizienz von IL-17C zu einer geringeren Tumorphiliferation und geringeren Gesamttumorlast führt. Des Weiteren wiesen diese Tiere eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Tumorgewebe und eine verminderte Tumor-assoziierte Entzündung auf.

3.3.4 IL-17C steigert die Expression von neutrophilen Granulozyten rekrutierenden Zytokinen

Da die Anzahl der Ly6B⁺ Zellen im Tumorgewebe von IL-17C^{-/-} Mäusen reduziert war und IL-17C die Zytokinexpression in Atemwegsepithelzellen fördert [104;105], wurde nachfolgend die durch IL-17C induzierte Expression von neutrophilen Chemokinen wie KC und MIP-2 in LLC *in vitro* untersucht. Hierfür sind LLC Zellen mit NTHi, IL-17C, TNF- α , IL-17C/TNF- α und IL-17C/NTHi stimuliert worden, um anschließend die Ausschüttung der Chemokine KC und MIP-2 zu analysieren. Die Stimulation von LLC Zellen mit NTHi (Abbildung 40 A) und TNF- α (Abbildung 40 B) ergab einen signifikanten Anstieg der Ausschüttung von KC und MIP-2. Die alleinige Stimulation mit IL-17C hingegen führte zu keiner erhöhten Ausschüttung dieser Chemokine im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Kombination von NTHi und IL-17C (Abbildung 40 A) sowie die Kombination von TNF- α und IL-17C (Abbildung 40 B) führte zu einer signifikanten weiteren Steigung der Ausschüttung von KC und MIP-2 im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit NTHi oder TNF- α .

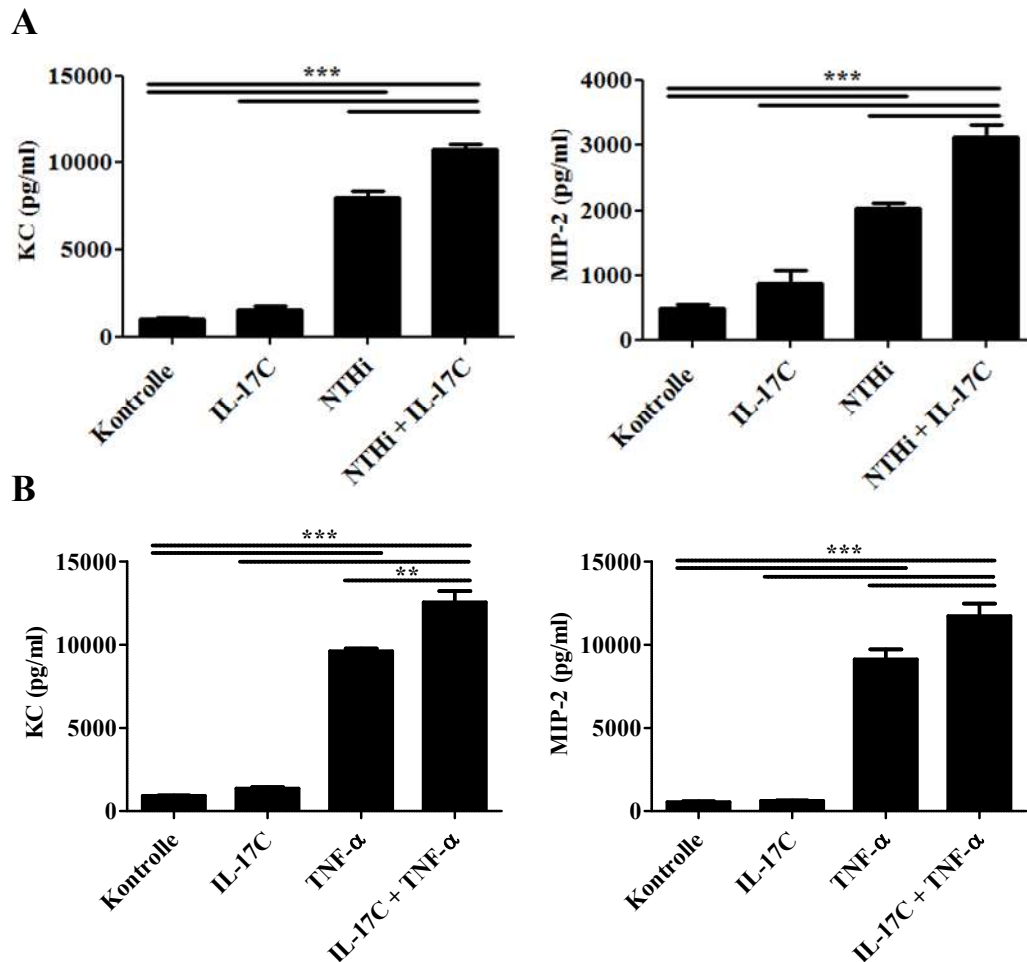


Abbildung 40: IL-17C erhöht die Ausschüttung der neutrophilen Granulozyten rekrutierenden Chemokine von Tumorzellen. LLC Zellen wurden *in vitro* mit (A) IL-17C (40 ng/ml), NTHi (10^2 CFU) und der Kombination von IL-17C und NTHi oder (B) IL-17C (40 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) und der Kombination von IL-17C und TNF- α stimuliert. Die Konzentrationen von KC und MIP-2 wurden 24 h nach der Stimulation bestimmt. Die Daten sind mit SD und $n = 3$ pro Gruppe dargestellt und repräsentieren 4 unabhängige Experimente. ** $P < 0.005$ und *** $P < 0.001$ (one-way ANOVA).

Um den *in vitro* beobachteten verstärkenden Effekt von IL-17C auf die Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten rekrutierenden Chemokinen von Tumorzellen *in vivo* zu verifizieren, wurde die Expression des neutrophilen Granulozyten rekrutierenden Chemokins KC mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Dabei zeigten NTHi

exponierte IL-17C^{-/-} Mäuse, verglichen mit unbehandelten Kontrollmäusen, keine erhöhte Expression von KC im Tumorgewebe. NTHi exponierte WT Mäuse hatten, verglichen mit unbehandelten Kontrollmäusen und gleichbehandelten IL-17C^{-/-} Mäusen, jedoch eine signifikant erhöhte Expression von KC im Tumorgewebe (Abbildung 41 A und B).

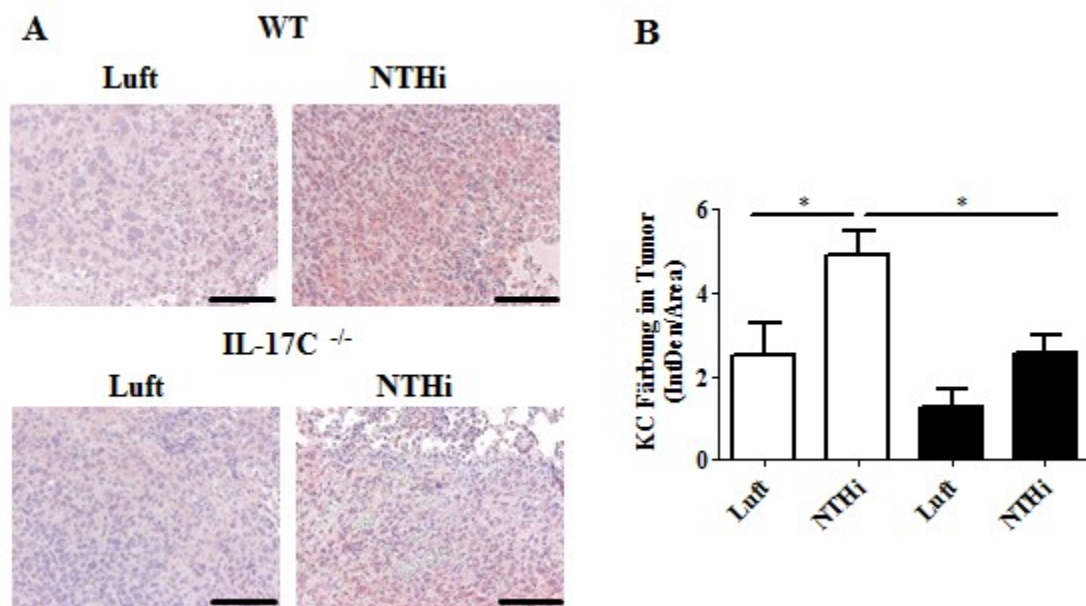


Abbildung 41: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Expression von KC im Tumorgewebe von WT Tieren. IL-17C^{-/-} Mäuse weisen keine erhöhte KC Expression im Tumorgewebe auf. (A) Immunhistochemische Färbung von KC in Lungentumoren und (B) Quantifizierung der KC Färbungen in Tieren 19 Tage nach LLC Injektion (5.5×10^5 Zellen). Maßstab = 100 μm . * $P < 0.05$, $n \geq 5$ pro Gruppe (one-way ANOVA).

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass IL-17C die Expression von neutrophilen Granulozyten rekrutierenden Zytokinen bei zeitgleichem Stimulus mit NTHi oder TNF- α weiter steigert. *In vivo* konnte in NTHi exponierten IL-17C^{-/-} Tieren kein Anstieg der KC Expression im Tumorgewebe verzeichnet werden. Lediglich NTHi exponierte WT Tiere zeigten eine signifikant erhöhte KC Expression im Tumorgewebe.

3.3.5 IL-17C hat keinen Einfluss auf die Proliferation und die Apoptose

Anschließend wurde untersucht, ob IL-17C und TNF- α neben der Regulation der tumorassoziierten Entzündung auch die Proliferation von LLC direkt induzieren können. Hierfür sind LLC Zellen mit IL-17C, TNF- α und der Kombination aus beiden für 24 h stimuliert und mit einem WST-1 Proliferationsassay vermessen worden. Dabei war festzustellen, dass TNF- α zu einer signifikant gesteigerten Proliferationsrate führt. IL-17C jedoch hatte keine erhöhte Proliferation zur Folge und konnte die durch TNF- α bedingte Proliferation auch nicht weiter steigern (Abbildung 42).

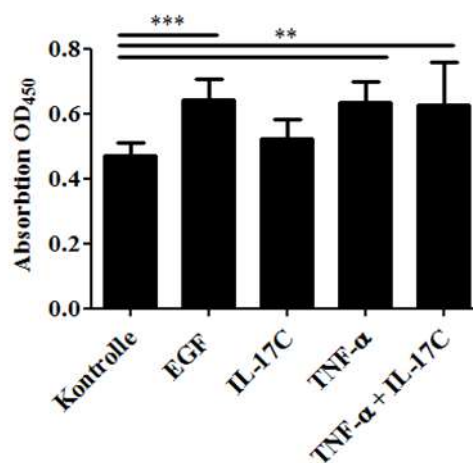


Abbildung 42: TNF- α erhöht die Proliferation von LLC Zellen, während IL-17C keinen Einfluss auf die Proliferation von LLC Zellen nimmt. LLC Zellen wurden mit EGF (100 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-17C (40 ng/ml) und der Kombination von IL-17C und TNF- α für 24 h stimuliert. Die Proliferation wurde mit Hilfe eines WST-1 Proliferationsassays bestimmt. Die Daten sind mit SD und n = 8 pro Gruppe dargestellt und repräsentieren 4 unabhängige Experimente. **P < 0.005 und ***P < 0.001 (one-way ANOVA).

Weil IL-17C keinen Einfluss auf die Proliferation von LLC Zellen nimmt, wurde untersucht, ob IL-17C die Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl *in vitro* reguliert. Hierfür sind LLC Zellen mit IL-17C, NTHi

oder der Kombination von IL-17C und NTHi für 24h stimuliert worden. Im Ergebnis konnte kein Einfluss von IL-17C auf die antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl *in vitro* festgestellt werden (Abbildung 43).

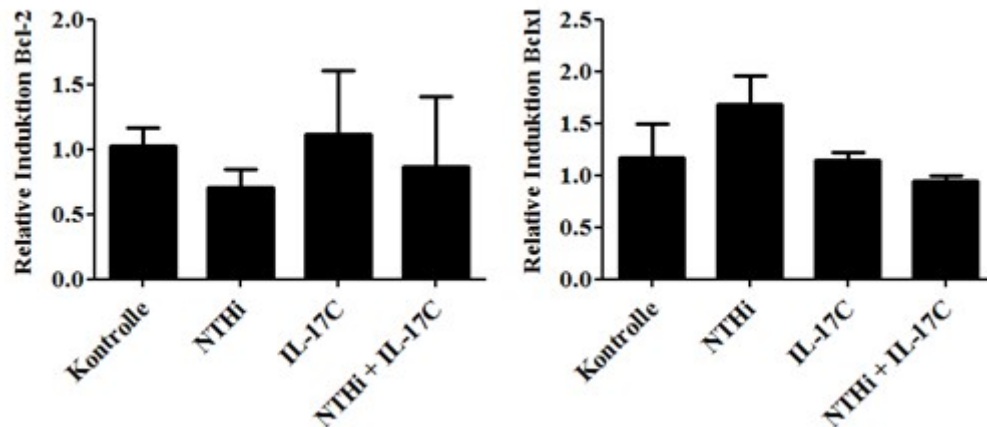


Abbildung 43: IL-17C beeinflusst die Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl in LLC Zellen *in vitro* nicht. LLC Zellen wurden mit hitzeinaktivierten NTHi (10^7 CFU/ml), IL-17C (50 ng/ml) oder der Kombination von NTHi und IL-17C für 24 h stimuliert. Die Expression von Bcl-2 und Bclxl wurde als relative mRNA Expression (GAPDH) gezeigt. Die Daten sind mit SD und $n = 3$ pro Gruppe dargestellt und repräsentieren 4 unabhängige Experimente. (one-way ANOVA).

Krebsfreie WT, TLR-2/4^{-/-} und IL-17C^{-/-} Mäuse wiesen sowohl im Grundzustand als auch nach einer NTHi-Exposition keine veränderte Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl im Lungengewebe auf (Abbildung 44).

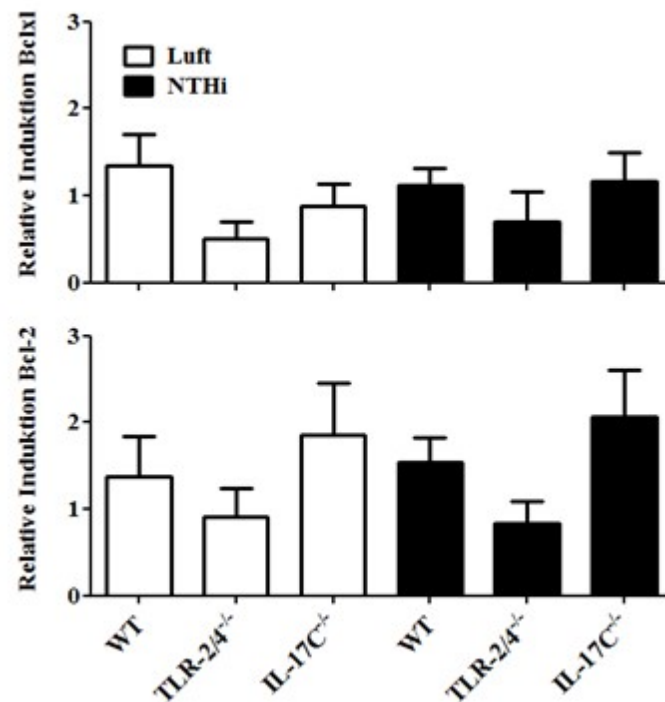


Abbildung 44: TLR-2/4^{-/-} und IL-17C^{-/-} Mäuse weisen im Grundzustand und nach NTHi-Exposition keine veränderte Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl auf. Relative mRNA Expression (GAPDH) von Bcl-2 und Bclxl im Lungengewebe krebsfreier Raumluft exponierter und NTHi exponierter Tiere nach 24 Stunden. (one-way ANOVA).

Da weder *in vitro* noch *in vivo* im Lungenparenchym eine Regulation der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl auf mRNA Ebene festgestellt wurde, sind mittels TUNEL-Assays apoptotische Zellen im Tumorgewebe von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen nach der Exposition mit Luft oder NTHi angefärbt worden. Hierbei zeigte sich nur eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen im Tumorgewebe. Darüber hinaus konnte kein Unterschied zwischen WT und IL-17C^{-/-} Tieren mit oder ohne NTHi Exposition festgestellt werden (Abbildung 45).

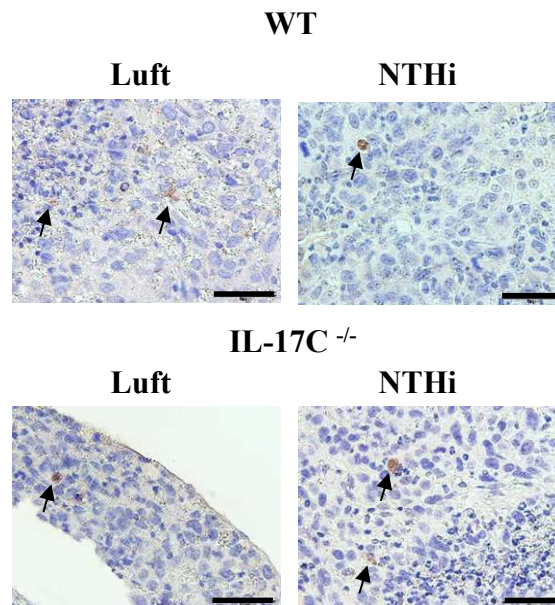


Abbildung 45: IL-17C^{-/-} und WT Tiere weisen im Grundzustand und nach NTHi-Exposition nur eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen auf. TUNEL-Assay in Lungentumoren von Tieren 21 Tage nach LLC Injektion (2.5×10^5 Zellen). Maßstab = 50 μm .

Ein Einfluss von IL-17C auf die Regulation antiapoptotischer Gene konnte nicht belegt werden. Darüber hinaus zeigte sich im Tumorgewebe von IL-17C^{-/-} Mäusen keine veränderte Anzahl apoptotischer Zellen. IL-17C beeinflusst die Proliferation von LLC Zellen *in vitro* nicht.

3.3.6 IL-17C hat einen prognostischen Einfluss in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen

Der prognostische Effekt von IL-17C in humanen nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen wurde evaluiert. Die Untersuchung des prognostischen Effekts von IL-17C erfolgte in einem NSCLC-Studienkollektiv mit 103 kurativ resezierten Patienten. Hierbei waren Patienten mit Stage IV, R1/R2 Resektionsstatus oder neoadjuvanter Therapie nicht in die Studie eingeschlossen. Die Stammdaten der Patienten der NSCLC-Studie befinden sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Stammdaten des untersuchten NSCLC-Patientenkollektivs.

Parameter (n=321)	% nicht fehlender Werte
mittleres Alter (Jahre)	68
männliches Geschlecht	84 (82%)
Raucher oder Ex-Raucher	77 (76%)
Patientenstatus	
ECOG 0	6 (6%)
ECOG I	89 (92%)
ECOG >II	2 (2%)
Tumorstadium	
Stage I	76 (74%)
Stage II	22 (21%)
Stage III	5 (5%)
Lymphknotenstatus	
pN0	82 (80%)
pN1	17 (17%)
pN2	4 (4%)
Tumorhistologie	
Plattenepithelkarzinom	47 (46%)
Adenokarzinom	36 (35%)
Großzelliges Karzinom	17 (17%)
NSCLC NOS	3 (3%)
Tumorgrad	
G1-2	40 (39%)
G3-4	63 (61%)
IL-17C	
negative IL-17C Expression	48 (47%)
positive IL-17C Expression	55 (53%)

Zur Bestimmung der Expression von IL-17C in den humanen Proben des NSCLC-Studienkollektivs wurden die verwendeten Gewebeproben immunhistochemisch auf IL-17C angefärbt. Jeder Patient ging mit 3 Tumorstanzen auf einem Gewebemikroarray in die Analyse ein. In dem untersuchten Studienkollektiv wiesen 55 Fälle (53 %) eine positive immunhistochemische Expression von IL-17C auf. Dabei konnte vor allem eine zytoplasmatische Färbung festgestellt werden (Abbildung 46).

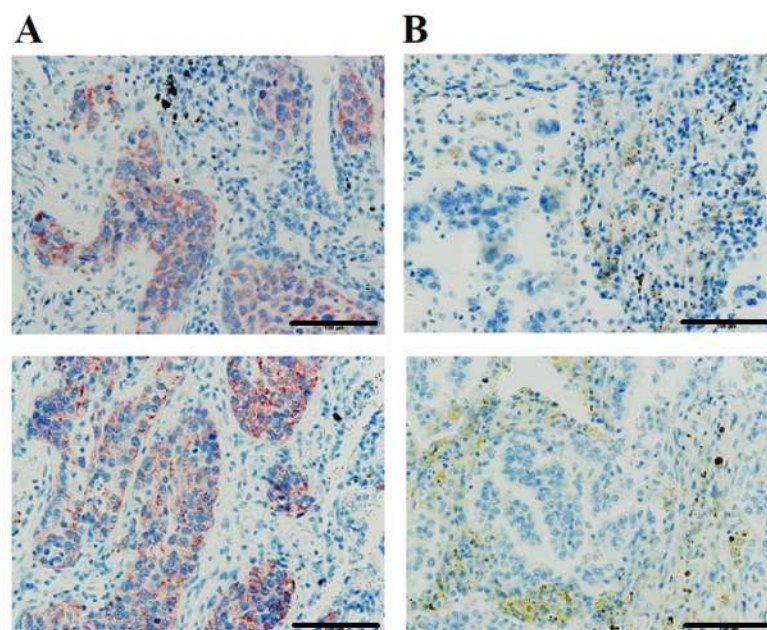


Abbildung 46: Repräsentative immunhistochemische Färbung von IL-17C in NSCLC Gewebeproben. (A) Immunhistochemische IL-17C Färbung und (B) Kontroll-IgG Färbung von NSCLC Gewebeproben.

Für das gesamte 103 NSCLC Patienten umfassende Studienkollektiv konnte mittels Kaplan-Meier Berechnung kein signifikanter prognostischer Wert von IL-17C in Bezug auf das Gesamtüberleben der NSCLC Patienten festgestellt werden ($p = 0,839$, Tabelle 15).

Tabelle 15: Prognostischer Wert von IL-17C. Alle NSCLC Patienten und klinischen Subgruppen wurden mittels Log-rank test analysiert.

Subgruppen	IL-17C (+) in NSCLC (p-Wert)
alle Patienten	0.839
Alter	
<70 Jahre	0.824
≥70 Jahre	0.559
Patientenstatus	
ECOG 0	0.343
ECOG >I	0.476
Tumorstadium	
Stadium I	0.678
Stadium II-IV	0.407
Lymphknotenstatus	
pN0	0.934
pN1-3	0.042
Tumorhistologie	
Nicht-Plattenepithelkarzinom	0.695
Plattenepithelkarzinom	0.918
Tumorgrad	
< G2	0.136
≥ G2	0.327
Immunhistochemie	
Bcl-2	0.546
Bclxl	0.538

Im Hinblick auf einzelne klinische Subgruppen ist IL-17C als negativer prognostischer Faktor für Patienten mit Lymphknotenmetastasen identifiziert worden (pN1-3, $p = 0.042$, Tabelle 15, Abbildung 47).

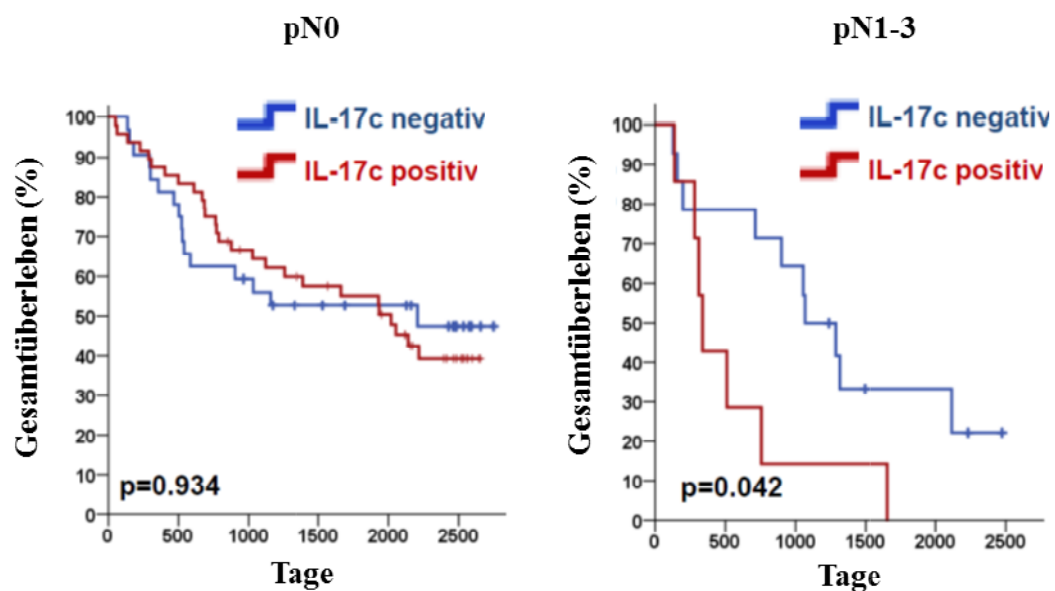


Abbildung 47: Prognostischer Wert von IL-17C in Patienten mit Lymphknotenmetastasen. Kein prognostischer Wert für Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (pN0), aber ein prognostischer Wert für Patienten mit Lymphknotenmetastasenstatus pN1-3 und positiver IL-17C immunhistochemischer Färbung.

Darüber hinaus wurde der prognostische Wert der Expression von IL-17C und dessen spezifischen Rezeptor IL-17RE mittels „Kaplan-Meier plotter“ Datenbank (www.kmplot.com) auf der Basis von Affymetrix Mikroarraydaten untersucht. Das gesamte Studienkollektiv von 2437 Lungenkrebspatienten und vor allem Patienten mit Adenokarzinom zeigten einen negativen prognostischen Wert für IL-17C und IL-17RE auf (Abbildung 48).

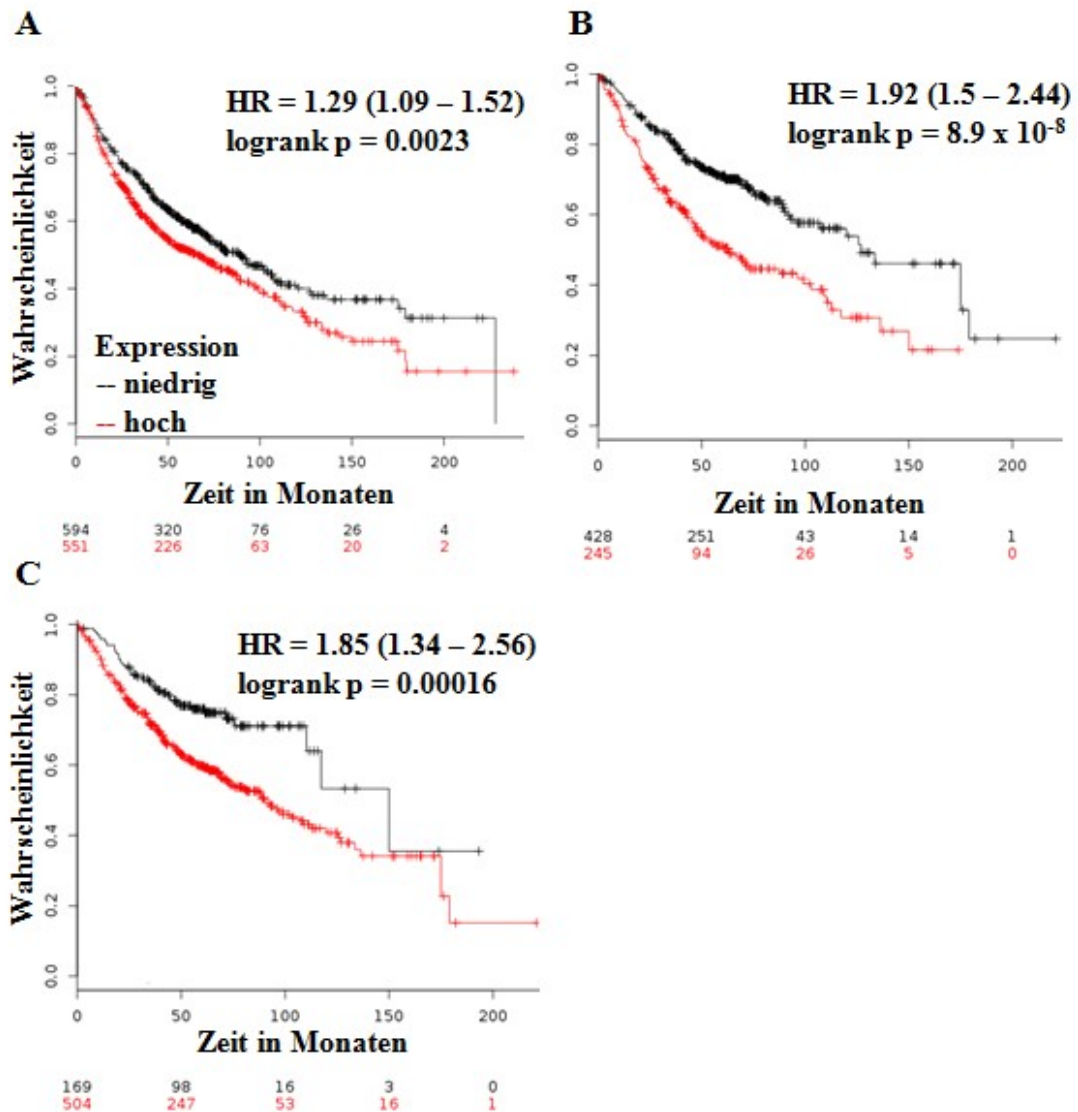


Abbildung 48: Prognostischer Wert der Expression von IL-17C und IL-17RE laut “Kaplan-Meier plotter” Analyse. (A) Prognostischer Wert der Expression von IL-17C für alle Lungenkrebspatienten. (B) Prognostischer Wert der Expression von IL-17C für die Subpopulation der Lungenkrebspatienten mit Adenokarzinom. (C) Prognostischer Wert der Expression von IL-17RE für die Subpopulation der Lungenkrebspatienten mit Adenokarzinom.

Es konnte sowohl mit Hilfe der Gewebeproben des humanen nichtkleinzelligen Lungenkrebsstudienkollektivs als auch mit Hilfe der Affymetrix Mikroarraydaten ein negativer prognostischer Effekt von IL-17C auf das Gesamtüberleben von Lungenkrebspatienten festgestellt

werden. Eine Expression von IL-17C und dessen Rezeptor führt vor allem bei der Subpopulation von lymphknotenmetastasierten Lungenkrebspatienten zu einer ungünstigen Prognose.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der pulmonalen Entzündung auf die Entstehung von Lungenkarzinomen im metastatischen Lungenkrebsmodell untersucht. Es zeigte sich, dass Zigarettenrauch die pulmonale Barriere schädigt und eine Translokation von bakteriellen Faktoren in das Tumorgewebe ermöglicht. *In vitro* Experimente belegen, dass COPD-typische Bakterien die Tumorproliferation direkt induzieren. Es zeigte sich auch, dass COPD-typische Bakterien die Entzündung in der Tumormikroumgebung fördern, was wiederum zu einem gesteigerten Tumorwachstum führt. Zwei Zytokine der IL-17 Zytokinfamilie konnten als tumorwachstumsfördernde Faktoren bei der pulmonalen Entzündung identifiziert werden und zwar IL-17A und IL-17C. IL-17A reguliert in der Tumormikroumgebung sowohl die tumorassoziierte Entzündung als auch die Tumorproliferation und das Tumorwachstum. Die Expression des epithelialen Zytokins IL-17C zeigte sich TLR-abhängig. Von Strukturzellen gebildetes IL-17C fördert bei einer pulmonalen Entzündung die Tumorproliferation und das Tumorwachstum. IL-17C vermittelt über neutrophile Chemokine die Rekrutierung von tumorassoziierten neutrophilen Granulozyten. Dies ging mit einer verminderten Expression von TNF- α in der Tumormikroumgebung einher. Weder IL-17A noch IL-17C förderten direkt die Proliferation von Lungenkrebszellen *in vitro*. Die Analyse humaner Lungenkrebsbiopsien mittels Mikroarray-Analysen zeigte eine Korrelation der IL-17C Expression mit einem verschlechterten Überleben von Patienten mit Adenokarzinom. Immunhistochemische Färbungen von NSCLC Lungenkrebsbiopsien ergaben einen negativen prognostischen Wert für Lungenkrebspatienten mit Lymphknotenmetastasen.

4.1 Bakterielle Bestandteile fördern das Tumorwachstum während einer Zigarettenrauch induzierten pulmonalen Entzündung

Lungenkrebs ist eine der weltweit häufigsten Todesursachen mit nur ungenügenden Therapiemöglichkeiten für die Patienten [1] und einer 5-Jahres-Überlebenserwartung von unter 16 % [2;3]. Neben verschiedenen Umweltgiften wie Asbest ist Rauchen einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von Lungenkrebs und der COPD [4;19;118]. Bis zu 70 % der Lungenkrebspatienten haben eine co-existierende COPD, die wiederum einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von Lungenkrebs ist [4-6]. COPD ist vor allem durch eine chronische pulmonale Entzündung charakterisiert, wobei Zigaretten als Hauptauslöser gelten [119]. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die pulmonale Entzündung den tumorfördernden Effekt von Zigarettenrauch vermittelt [4;16-18]. Es besteht eine mechanistische Verbindung zwischen rauchinduzierter pulmonaler und tumorassoziierter Entzündung sowie dem Wachstum von Lungentumoren. Hierbei zeigte sich vor allem, dass myeloide Zellen die rauchinduzierte tumorassozierte Entzündung regulieren und dies im Mausmodell zu einer gesteigerten Proliferation von Tumorzellen und einem verstärkten Tumorwachstum führt [16-18]. Darüber hinaus ergaben auch Studien in Mausmodellen für Haut-, Darm- und Leberkrebs Belege für eine entzündungsvermittelte Tumorpromotion [29;45].

Die pulmonale Entzündung bei COPD Patienten ist mit einer chronischen bakteriellen Kolonialisierung und mit einer Infektion der Lunge assoziiert [19]. Dabei sind stabile COPD Patienten hauptsächlich mit bakteriellen Pathogenen wie NTHi kolonialisiert. Diese bakteriellen Infektionen der Lunge spielen vor allem bei der Initiation von akuten Exazerbationen bei COPD eine wichtige Rolle [15;19]. Die bakterielle Kolonialisierung und

Infektionen der Lunge tragen zur Entwicklung von COPD bei [15;21;120]. Außerdem führt eine durch NTHi ausgelöste pulmonale Entzündung zu einem verstärkten Wachstum von Lungentumoren in einem K-ras-induzierten murinen Tumormodell [14]. Präklinische Studien stellten überdies ebenfalls einen fördernden Effekt der COPD-ähnlichen Entzündung auf das Wachstum von Lungenkrebs fest [13-15].

Einhergehend mit den obigen Studien wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass eine COPD-ähnliche Entzündung das Wachstum von Lungenkrebs fördert und dass Bakterien im verwendeten Lungenkrebsmodell hierbei eine zentrale Rolle einnehmen. Es konnte aufgezeigt werden, dass Bakterien bei einer COPD-ähnlichen Entzündung das Tumorstark fördern. Mechanistisch wurde dargelegt, dass eine COPD-typische Entzündung zu einem Verlust an pulmonaler/epithelialer Barriere führt. Dies erlaubt es bakteriellen Faktoren, in das Tumorgewebe zu translozieren. Im Tumorgewebe verstärken Bakterien die tumorassoziierte Entzündung. Darüber hinaus regen Bakterien direkt die Proliferation von Tumorzellen an. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bakterielle Pathogene signifikant zur Pathogenese von Lungenkrebs bei Rauchern und bei COPD Patienten beitragen.

4.1.1 Zigarettenrauch schädigt die pulmonale Barriere und ermöglicht eine Translokation von bakteriellen Faktoren in das Tumorgewebe

Eine essentielle Voraussetzung für den direkten Einfluss von Mikroorganismen auf das Wachstum von Lungentumoren ist deren Zugang zur Tumormikroumgebung. Es wurde bereits *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass Zigarettenrauch die epitheliale Barriere der Lunge zerstört und die alveolare Permeabilität erhöht [115;121-123]. Schamberger et al. stellten

fest, dass Zigarettenrauchextrakt die Expression verschiedener Tight-Junction-Proteine wie Zo-1 in bronchialen Epithelzellen *in vitro* supprimiert [115]. Im Einklang damit konnte mit den vorliegenden Ergebnissen *in vivo* gezeigt werden, dass Zigarettenrauch die Expression von Zo-1 und Occludin auf mRNA Ebene supprimiert. Schamberger et al. beschrieben darüber hinaus, dass Zigarettenrauchextrakt die Barriere humaner bronchialer Epithelzellen schwächt und dies zu einem verringerten transepithelialen elektrischen Widerstand führt [115]. Übereinstimmend damit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass gasförmiger Zigarettenrauch die Permeabilität für FITC-Dextran in humanen bronchialen Epithelzellen erhöht. Es ist somit naheliegend, dass Zigarettenrauch über eine erhöhte Durchlässigkeit der epithelialen Barriere die Voraussetzungen für bakterielle Faktoren schafft, in subepitheliale Kompartimente zu translozieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese waren im Mausmodell bei rauchexponierten Tieren bakterielle Bestandteile vermehrt im Tumorgewebe nachweisbar.

Im Mausmodell ergab sich darüber hinaus, dass die Exposition mit der Kombination aus Zigarettenrauch und NTHi zu einem Verlust der pulmonalen Barriereintegrität führt. So kam es zu einem Übertritt von Serumalbumin in den Alveolarraum. Eine erhöhte Konzentration von Albumin in der BAL Flüssigkeit findet man ebenso häufig bei Menschen mit pathologischen Lungenerkrankungen, welche einen Einfluss auf die pulmonale Barriereintegrität haben [124]. Zudem war LDH in der BAL Flüssigkeit erhöht, was ebenfalls auf einen Verlust an pulmonaler Barriere hinweist. Durch diesen Verlust pulmonaler Barriereintegrität wiederum können nachfolgend bakterielle Bestandteile in das Tumorgewebe translozieren.

Krebs und vor allem das metastatische Wachstumsstadium sind durch ein Ausbreiten und Eindringen des Tumors in umgebenes Gewebe charakterisiert [27]. Die in der BAL Flüssigkeit gemessenen LDH Level und auch die Albuminkonzentrationen zeigten sich zum Zeitpunkt der Messung in Korrelation mit dem Tumorwachstum. Es ist daher vorstellbar, dass das voranschreitende Tumorwachstum auch zu einem erhöhten Barrierschaden in Mäusen, die der Kombination von Zigarettenrauch und NTHi ausgesetzt waren, beiträgt. Das erhöhte Tumorwachstum könnte somit ebenfalls die Translokation bakterieller Faktoren in die Tumormikroumgebung verstärken.

4.1.2 Bakterielle Bestandteile fördern das Tumorwachstum durch die direkte Induktion von Proliferation

Es stellte sich die Frage, auf welche Weise Bakterien das Wachstum von Lungenkrebszellen bzw. Lungentumoren fördern. Studien belegten bereits, dass bakterielle Produkte das Wachstum von Lungenkrebs durch die direkte Induktion von Proliferation fördern. Hattar et al. zeigten in einem MTS-Assay und durch Zellzählung, dass die von *Escherichia coli* stammenden Endotoxine die Proliferation von nicht-kleinzelligen Lungenkrebs induzieren [125]. Hierbei führte das Endotoxin LPS TLR-abhängig zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion der Proliferation in A549 Lungenkrebszellen.

Einhergehend mit den Ergebnissen von Hattar et al. konnte in der vorliegenden Arbeit in einem WST-1 Proliferationsassay mit Hilfe der metabolischen Rate gezeigt werden, dass sowohl der TLR-2 Ligand Pam3CSK4 als auch NTHi und PAO1 dosisabhängig direkt die Proliferation von kultivierten LLC und A549 Zellen erhöhen. Aus vorangegangen

Studien ist bekannt, dass die metabolische Rate mit der zellulären Proliferation korreliert [125;126]. Auch die direkte Zellzählung ergab einen proliferationsfördernden Effekt von Bakterien. Die direkte Induktion von Tumorzellproliferation scheint ein Mechanismus zu sein, durch den bakterielle Faktoren das Wachstum von Lungenkrebs fördern, sobald sie das Tumorgewebe infiltriert haben.

4.1.3 Bakterien induzierte tumorassoziierte Entzündung fördert die Tumorproliferation und das Tumorwachstum

Neben der direkten Induktion der Tumorproliferation legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass bei einer COPD-typischen Entzündung bakterielle Faktoren die Entzündung in der Tumormikroumgebung bzw. im Tumorgewebe fördern. In dem in dieser Arbeit verwendeten Tumormodell dissoziierte die allgemeine durch Bakterien hervorgerufene pulmonale Entzündung von der Entzündung in der Tumormikroumgebung. So führte die kombinierte Exposition aus Zigarettenrauch und NTHi zu einer erhöhten Expression von TNF- α , während die durch NTHi hervorgerufene Entzündung im Alveolarraum durch Zigarettenrauch unbeeinflusst blieb. Bei der tumorassoziierten Entzündung kommt TNF- α eine zentrale Rolle bei der Tumorproliferation und dem Tumorwachstum zu [17;18;31]. In diesem Zusammenhang konnten bereits verschiedene Studien in Menschen und Mäusen einen über NF- κ B vermittelten fördernden Effekt auf das Tumorwachstum von TNF- α aufzeigen [27;37;47]. Die verstärkte Expression von TNF- α im Tumorgewebe ging auch in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen mit einer erhöhten Tumorproliferation und einem gesteigerten Tumorwachstum einher.

In der vorliegenden Arbeit konnte überdies dargelegt werden, dass IL-17A die Tumorproliferation und das Tumorstadium bei einer COPD-typischen Entzündung fördert. Während sich eine Defizienz von IL-17A bei Luft und Zigarettenrauch exponierten Mäusen nicht auf das Tumorstadium auswirkte, waren die Tumorproliferation, das Tumorstadium und die tumorassoziierte Entzündung bei IL-17A^{-/-} Tieren vermindert. Daraus ist zu schlussfolgern, dass Bakterien Entzündungsprozesse im Tumorgewebe fördern.

Tumorfördernde Eigenschaften von IL-17A und IL-17-exprimierenden Zellen wurden schon in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen [13;14;33]. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie im K-ras basierten Tumormodell, die zeigen konnte, dass eine IL-17A Defizienz zu einer verringerten Gesamttumorlast führt [13]. Dies ließ sich im K-ras Modell sowohl bei raumluftexponierten Tieren als auch nach NTHi Exposition bestätigen. Da Th17-Zellen im Tumorgewebe von K-ras Mäusen gehäuft vorkamen, führten die zuvor genannten Autoren den IL-17A fördernden Effekt auf das Tumorstadium auf Th17-Zellen zurück.

Die Rolle von IL-17A und Th17-Zellen bei der Entstehung und Förderung von Lungenkrebs ist nach wie vor umstritten und bleibt kontrovers diskutiert. Unter anderem wurde auch gezeigt, dass das Wachstum der murinen Darmkrebszellen MC38 bei subkutaner und intravenöser Applikation in IL-17A^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen erhöht war [127]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zur Rolle von IL-17A und Th17-Zellen liegen wahrscheinlich darin begründet, dass in der vorerwähnten Studie die Mäuse keine pulmonale Entzündung aufwiesen. Der Entzündungsreiz ist jedoch notwendig, um einen IL-17A abhängigen Immunmechanismus im Metastasenmodell auszulösen.

Weil IL-17A die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine durch eine direkte Interaktion mit Epithelzellen und Fibroblasten über seinen Rezeptorkomplex induziert [80;81;83;88;89], wurde in dieser Arbeit auch eine direkte Wirkung von IL-17A auf die Proliferation von Lungenkrebszellen untersucht. Diese Untersuchungsergebnisse zeigen, dass IL-17A *in vitro* das NTHi-induzierte Wachstum von LLC Zellen nicht beeinflusste. Es konnte allerdings aufgezeigt werden, dass IL-17A die Angiogenese bei Lungenkrebs fördert [128].

4.2 IL-17C vermittelt das Tumorwachstum bei einer pulmonalen Entzündung

COPD ist häufig mit einem veränderten Mikrobiom der Lunge verbunden [129;130]. Dabei verursacht die mikrobielle Kolonisierung oftmals eine chronisch neutrophile Entzündung, die nachfolgend zur Zerstörung des Lungengewebes führt [19;102] [24;25]. In der vorliegenden Arbeit und in anderen Studien wurde bestätigt, dass eine COPD-typische Entzündung ein verstärktes Tumorwachstum bedingt [10;13-18]. Es besteht also ein enger Zusammenhang zwischen pulmonaler Entzündung und dem Tumorwachstum in der Lunge. Das epitheliale Zytokin IL-17C vermittelt die Rekrutierung von Entzündungszellen in entzündetes Gewebe [83;105;108]. Es wurde daher untersucht, inwiefern IL-17C bei einer pulmonalen Entzündung das Tumorwachstum fördert.

4.2.1 IL-17C ist ein negativer prognostischer Faktor für Lungenkrebspatienten

Die Mehrzahl aller Lungenkrebserkrankungen wird als NSCLC diagnostiziert. Hierbei beträgt die 5-Jahres-Überlebenserwartung 15.9 % [2;3] mit bisher nur ungenügenden Therapiemöglichkeiten. Aufgrund der Heterogenität von Lungenkrebs und einer unzureichenden Aussagekraft der TNM Klassifikation gibt es einen hohen Bedarf an prognostischen Markern [4]. Prognostische Marker würden das zügige Erstellen eines individuellen Therapieschemas ermöglichen und somit der Heterogenität der Lungentumore gerecht werden und möglicherweise die Gesamtüberlebensdauer der Patienten steigern.

Durch eine Kaplan-Meier Analyse von frei verfügbaren Affymetrix-Daten ist der ungünstige Einfluss einer hohen Expression von IL-17C und dessen Rezeptor auf das Gesamtüberleben von Lungenkrebspatienten festgestellt worden. In der Subpopulation der Lungenkrebspatienten mit Adenokarzinom lag der p-Wert für eine hohe IL-17C Expression bei $8,9 \times 10^{-8}$ und für eine hohe IL-17RE Expression bei 0.00016. Ein negativer Einfluss für die IL-17 Zytokine IL-17A, IL-17B, IL-17D, IL-17E und IL-17F auf das Überleben der Patienten konnte in dieser Analyse hingegen nicht nachgewiesen werden.

Immunhistochemische Färbungen humaner Lungenkrebsproben für IL-17C zeigten eine zytoplasmatische Färbung für IL-17C bei 53 % aller Lungenkrebspatienten. In dem dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studienkollektiv konnte kein reduziertes Gesamtüberleben in Bezug auf die IL-17C Expression in der Gesamtheit der NSCLC Proben als auch bei Adenokarzinomen festgestellt werden. Bei der Analyse der verschiedenen im Gesamtkollektiv der Studie eingeschlossenen Patientensubgruppen ergab sich jedoch ein negativer prognostischer Wert für Patienten mit Lymphknotenmetastasen und einer positiven Immunhistochemie für IL-17C.

Die Daten aus dem NSCLC-Studienkollektiv stehen im Gegensatz zu den Daten aus dem Affymetrix-Kollektiv, in dem ein reduziertes Gesamtüberleben für das Gesamtkollektiv sowie für Patienten mit Adenokarzinom bei hoher IL-17C Expression festgestellt wurde. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Zusammensetzung des Studienkollektivs sein. So sind in den verwendeten Affymetrix-Daten mit einer Anzahl von 1145 wesentlich mehr Patienten eingeschlossen als im NSCLC-Studienkollektiv mit nur 103 Patienten. Darüber hinaus wurden im NSCLC-Studienkollektiv Patienten mit Tumorstadium Stage IV, R1/R2

Resektionsstatus und einer neoadjuvanten Therapie ausgeschlossen, welche in den Affymetrix-Daten enthalten sind.

4.2.2 TLR-reguliertes IL-17C vermittelt den tumorfördernden Effekt von Bakterien

Da IL-17C in humanen Tumorzellen vorhanden ist und besonders die Affymetrix-Daten einen negativen prognostischen Wert für IL-17C aufwiesen, wurde im metastatischen Lungenkrebsmodell der Einfluss von IL-17C auf das Tumorwachstum bei einer pulmonalen Entzündung untersucht.

Experimente mit Mäusen, die gleichzeitig defizient für TLR-2 und TLR-4 waren, zeigten, dass die tumorfördernde Entzündung von NTHi in Gänze von TLR-2 und TLR-4 abhängt. In TLR-2/4^{-/-} Tieren kam es nach einer NTHi Exposition zu keinem gesteigerten Tumorwachstum. Dies steht im Einklang mit einer Studie, die zeigt, dass TLR-2 das Tumorwachstum im metastatischen Lungenkrebsmodell vermittelt [31]. Studien konnten darlegen, dass die Expression von IL-17C über PRR wie TLR in verschiedenen Epithelien vermittelt wird. Die durch Bakterien induzierte Expression von IL-17C ist in Keratinozyten und in Darmepithelzellen TLR abhängig [83;105]. Auch in respiratorischen Epithelzellen konnte beobachtet werden, dass *P. aeruginosa* und *H. influenzae* sowie TLR-3 und TLR-5 die Bildung von IL-17C induzieren [104;105]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich die NTHi-induzierte pulmonale Expression von IL-17C TLR-2/4-abhängig. Experimente mit IL-17C^{-/-} Tieren wiesen IL-17C als einen inflammatorischen Faktor nach, der das Tumorwachstum bei einer NTHi-induzierten Entzündung fördert. IL-17C gehört also zu den Zytokinen, die

über TLR-Signalkaskaden reguliert werden und fördernd auf das Tumorwachstum wirken.

4.2.3 IL-17C beeinflusst die Expression zellzyklusregulierender Gene nicht

Es ist fraglich, auf welche Weise IL-17C das Tumorwachstum reguliert. Song et al. beschrieben als Erste einen Zusammenhang zwischen IL-17C und einer Tumorerkrankung [85], indem sie nachwiesen, dass IL-17C auf mRNA Ebene in humanen Proben des kolorektalen Karzinoms verstärkt exprimiert ist. Im murinen Darmkrebsmodell wurde ergänzend gezeigt, dass das von intestinalen Epithelzellen produzierte IL-17C die Tumorgenese fördert [109]. Hierbei führten Veränderungen des Darmmikrobioms während der Tumorgenese zu einer TLR abhängigen spezifischen Hochregulation von IL-17C in Zellen der Darmschleimhaut [109]. Dies wiederum führt zu einer autokrinen Induktion antiapoptotischer Gene wie Bcl-2 und Bclxl in Epithelzellen, wodurch das Überleben von Tumorzellen und die Tumorgenese im Darm gefördert wird [85].

In der vorliegenden Arbeit hingegen ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine Wirkung von IL-17C auf die Regulation zellzyklusregulierender Gene. *In vitro* führte die Stimulation von Krebszellen mit IL-17C allein oder in Kombination mit NTHi zu keiner veränderten Expression von Bcl-2 und Bclxl. Auch *in vivo* zeigte sich auf mRNA-Ebene kein Einfluss einer TLR-2/4 oder IL-17C Defizienz auf die Expression von Bcl-2 und Bclxl im Grundzustand und bei pulmonaler Entzündung. Auch mittels TUNEL-Assay konnte keine veränderte Anzahl apoptotischer Zellen im Tumorgewebe von WT und IL-17C^{-/-} Mäusen mit oder ohne NTHi Exposition nachgewiesen werden. Dies geht auch mit einer nicht

feststellbaren Korrelation der IL-17C und BCL-2 bzw. Bclxl Expression des NSCLC Studienkollektivs einher. Es ergab sich somit kein Hinweis darauf, dass IL-17C über zellzyklusregulierte Gene das Tumorwachstum in der Lunge bei pulmonaler Entzündung reguliert.

4.2.4 IL-17C vermittelt die Rekrutierung von tumorassoziierten neutrophilen Granulozyten

Während einer Exazerbationsphase von COPD-Patienten kommt es häufig zu einer schweren neutrophilen und systemischen Entzündung. Diese ist mit einer erhöhten Konzentration von TNF- α und neutrophiler Elastase im Sputum verbunden [21;26]. Darüber hinaus weisen mit Bakterien kolonisierte COPD-Patienten eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BAL Flüssigkeit auf [19;23]. Da ca. 70 % der Lungenkrebspatienten eine coexistierende COPD haben [24;25], ist es naheliegend, dass neutrophilen Granulozyten beim Wachstum von Primärtumoren und Metastasen eine wichtige Rolle zukommt. Bellocq et al. zeigten bereits, dass neutrophile Granulozyten im alveolaren Lumen des humanen bronchioalveolaren Lungenkarzinoms vorkommen. Diese neutrophilen Granulozyten werden durch das von Tumorzellen stammende neutrophile Chemokin IL-8 rekrutiert und aktiviert [74]. Die Studie von Bellocq et al. legte auch dar, dass eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten in den Lungen mit einer schlechteren Überlebensrate von Patienten mit einem bronchioalveolaren Lungenkarzinom korreliert [74]. Außerdem ist eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten ein unabhängiger prognostischer Faktor in Patienten mit einem fortgeschrittenen nichtkleinzelligen Lungenkarzinom [75]. Hier wiesen Patienten mit einer geringen Anzahl neutrophiler Granulozyten eine

mittlere Überlebensdauer von 19.3 Monaten auf, während Patienten mit einer hohen Zahl neutrophiler Granulozyten nur eine mittlere Überlebensdauer von 10.2 Monaten hatten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass lediglich die Anzahl an neutrophilen Granulozyten mit dem Gesamtüberleben korrelierte, nicht jedoch die Anzahl an Monozyten [75].

In vitro Studien und Studien mit sowohl IL-17C^{-/-} Mäusen als auch mit Mäusen, die für den IL-17C-Rezeptor IL-17RE defizient waren, konnten gemeinsam zeigen, dass IL-17C die Expression von Chemokinen und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe vermittelt [83;85;131]. Die intranasale Gabe von IL-17C exprimierenden Adenoviren führte zu einer gesteigerten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge [108]. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden, dass IL-17C die Expression von neutrophilen Chemokinen wie KC (dem murinen Homolog von IL-8) und MIP-2 im Alveolarraum von Mäusen nach Exposition mit NTHi vermittelt. Im Einklang damit kam es bei TLR-2/4^{-/-} und IL-17C^{-/-} Mäusen nach NTHi Exposition zu einer verminderten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Lungenparenchym. Außerdem verstärkte IL-17C die Bildung von KC und MIP-2 in NTHi oder TNF- α stimulierten LLC Zellen *in vitro*. Dies konnte ebenfalls *in vivo* bestätigt werden. Hier wiesen lediglich NTHi exponierte WT Mäuse eine signifikant gesteigerte KC Expression im Tumorgewebe auf. Einhergehend damit war die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung, also in das Tumorgewebe, in TLR-2/4^{-/-} und IL-17C^{-/-} Mäusen stark vermindert. Diese Ergebnisse legen somit nahe, dass im verwendeten Metastasenmodell das aus Strukturzellen stammende IL-17C die Expression neutrophiler Chemokine in Tumorzellen induziert und auf diese Weise zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Tumorgewebe beiträgt.

Bemerkenswerterweise war die Expression von TNF- α im Tumorgewebe von TLR-2/4^{-/-} und IL-17C^{-/-} Tieren vermindert. Vorherige Studien zeigten eine tumorfördernde Funktion von TNF- α im metastatischen Lungenkrebsmodell mit LLC Zellen [31].

Neueste Studien belegen eine tumorfördernde Wirkung von neutrophilen Granulozyten. Zahlreiche Mausstudien zeigten ebenfalls, dass pulmonale neutrophile Granulozyten zum Tumorwachstum in Lungen beitragen [76-79]. Pulmonale neutrophile Granulozyten fördern die Metastasierung in der Lunge. Daher führt das Fehlen von neutrophilen Granulozyten zu reduzierten pulmonalen Metastasen und reduzierten Lymphknotenmetastasen [76;78;79]. In einem K-ras basierten murinen Lungenkrebsmodell konnte beobachtet werden, dass die neutrophile Elastase die Proliferation von Tumorzellen induziert [132]. Die neutrophile Elastase führt in den Tumorzellen zur Degradation des Insulin Rezeptor Substrates-1 und beschleunigt so das Wachstum von Lungenkrebs [132]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten das Wachstum von Metastasen in entzündeten Lungen begünstigen. Dies erfolgt durch die Abgabe von Proteasen und die Degradation des anti-tumorigenen Faktors Thrombospondin (Tsp-1) [77]. Hierbei erhöht die Degradation von Tsp-1 in der Tumormikroumgebung das metastatische Lungenkrebswachstum [77]. Darüber hinaus führt die Interaktion von Tumorzellen und neutrophilen Granulozyten zu einer Abgabe von Entzündungsmediatoren und fördert das Wachstum von Lungenkrebszelllinien *in vitro* [125]. Zusammen mit den aufgeführten Studien legen auch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse nahe, dass über TLR-IL-17C rekrutierte neutrophile Granulozyten das Tumorwachstum in der Lunge fördern.

5 Literaturverzeichnis

1. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le CT, Lim E, Nicholson AG et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet* 2011; 378(9804):1727-1740.
2. Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer* 2014; 14(8):535-546.
3. Ettinger DS, Akerley W, Borghaei H, Chang AC, Cheney RT, Chirieac LR et al. Non-small cell lung cancer, version 2.2013. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11(6):645-653.
4. Adcock IM, Caramori G, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights. *Respiration* 2011; 81(4):265-284.
5. Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur Respir J* 2009; 34(2):380-386.
6. Zulueta JJ, Wisnivesky JP, Henschke CI, Yip R, Farooqi AO, McCauley DI et al. Emphysema scores predict death from COPD and lung cancer. *Chest* 2012; 141(5):1216-1223.
7. Sherman CB. Health effects of cigarette smoking. *Clin Chest Med* 1991; 12(4):643-658.
8. Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT. Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 1999; 149(1):13-20.

9. de Torres JP, Bastarrika G, Wisnivesky JP, Alcaide AB, Campo A, Seijo LM et al. Assessing the relationship between lung cancer risk and emphysema detected on low-dose CT of the chest. *Chest* 2007; 132(6):1932-1938.
10. Raviv S, Hawkins KA, DeCamp MM, Jr., Kalhan R. Lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease: enhancing surgical options and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(9):1138-1146.
11. Kiri VA, Soriano J, Visick G, Fabbri L. Recent trends in lung cancer and its association with COPD: an analysis using the UK GP Research Database. *Prim Care Respir J* 2010; 19(1):57-61.
12. Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Impact of comorbidity on lung cancer survival. *Int J Cancer* 2003; 103(6):792-802.
13. Chang SH, Mirabolfathinejad SG, Katta H, Cumpian AM, Gong L, Caetano MS et al. T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(15):5664-5669.
14. Moghaddam SJ, Li H, Cho SN, Dishop MK, Wistuba II, Ji L et al. Promotion of lung carcinogenesis by chronic obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-induced mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40(4):443-453.
15. Moghaddam SJ, Ochoa CE, Sethi S, Dickey BF. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011; 6:113-123.

16. Li D, Beisswenger C, Herr C, Schmid RM, Gallo RL, Han G et al. Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth. *Oncogene* 2014; 33(21):2709-2716.
17. Li D, Beisswenger C, Herr C, Hellberg J, Han G, Zakharkina T et al. Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer proliferation through Wnt/beta-catenin signaling in murine and human tumor cells. *Oncogene* 2014; 33(10):1239-1248.
18. Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH, Karin M. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell* 2010; 17(1):89-97.
19. Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J* 2010; 35(6):1209-1215.
20. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2):336-363.
21. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2008; 359(22):2355-2365.
22. Kumar PS, Matthews CR, Joshi V, de Jager M, Aspiras M. Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms. *Infect Immun* 2011; 79(11):4730-4738.
23. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(9):991-998.

24. Sethi S, Muscarella K, Evans N, Klingman KL, Grant BJ, Murphy TF. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 2000; 118(6):1557-1565.
25. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 2000; 109(4):288-295.
26. Sethi S, Evans N, Grant BJ, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2002; 347(7):465-471.
27. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(10):749-759.
28. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
29. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6):883-899.
30. Virchow R. An Address on the Value of Pathological Experiments. *Br Med J* 1881; 2(1075):198-203.
31. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 2009; 457(7225):102-106.
32. Papi A, Casoni G, Caramori G, Guzzinati I, Boschetto P, Ravenna F et al. COPD increases the risk of squamous histological subtype in

- smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax* 2004; 59(8):679-681.
33. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 2012; 491(7423):254-258.
34. Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 2009; 15(2):425-430.
35. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(11):759-771.
36. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(1):71-78.
37. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357(9255):539-545.
38. de Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Crit Rev Oncol Hematol* 2009; 70(3):183-194.
39. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441(7092):431-436.
40. Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009; 15(9):1016-1022.

41. Russell W. An Address on a Characteristic Organism of Cancer. Br Med J 1890; 2(1563):1356-1360.
42. Polk DB, Peek RM. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. Nat Rev Cancer 2010; 10(6):403-414.
43. Roder DM. The epidemiology of gastric cancer. Gastric Cancer 2002; 5 Suppl 1:5-11.
44. Samaras V, Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Peppas G, Falagas ME. Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review. J Infect Dev Ctries 2010; 4(5):267-281.
45. Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. Nat Med 1999; 5(7):828-831.
46. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. Nat Immunol 2011; 12(8):715-723.
47. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. Nature 2004; 431(7007):461-466.
48. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. Cell 2004; 118(3):285-296.
49. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nat Rev Cancer 2002; 2(4):301-310.

50. Bharti AC, Aggarwal BB. Chemopreventive agents induce suppression of nuclear factor-kappaB leading to chemosensitization. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973:392-395.
51. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(1):11-19.
52. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11):798-809.
53. Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15(2):91-102.
54. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15(2):103-113.
55. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* 2012; 8(9):1248-1253.
56. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Kloppel G et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* 2011; 19(4):456-469.

57. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 2011; 21(2):139-146.
58. Schwabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(11):800-812.
59. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1420-1428.
60. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008; 14(6):818-829.
61. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 2009; 15(5):416-428.
62. Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene* 2009; 28(33):2940-2947.
63. Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG, Nedospasov SA. Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms. *Int Rev Cytol* 2006; 252:129-161.
64. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4):239-252.

65. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4):265-273.
66. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917):860-867.
67. Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006; 124(2):263-266.
68. Duncan LM, Richards LA, Mihm MC. Increased mast cell density in invasive melanoma. *J Cutan Pathol* 1998; 25(1):11-15.
69. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(8):618-631.
70. Schmall A, Al-Tamari HM, Herold S, Kampschulte M, Weigert A, Wietelmann A et al. Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(4):437-447.
71. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005; 7(3):211-217.
72. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 2008; 267(2):204-215.
73. Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol* 2001; 166(11):6847-6854.

74. Bellocq A, Antoine M, Flahault A, Philippe C, Crestani B, Bernaudin JF et al. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol* 1998; 152(1):83-92.
75. Teramukai S, Kitano T, Kishida Y, Kawahara M, Kubota K, Komuta K et al. Pretreatment neutrophil count as an independent prognostic factor in advanced non-small-cell lung cancer: an analysis of Japan Multinational Trial Organisation LC00-03. *Eur J Cancer* 2009; 45(11):1950-1958.
76. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 2015; 522(7556):345-348.
77. El RT, Catena R, Lee S, Stawowczyk M, Joshi N, Fischbach C et al. Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(52):16000-16005.
78. Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(50):21248-21255.
79. Wculek SK, Malanchi I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature* 2015; 528(7582):413-417.
80. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(6):449-453.

81. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 2011; 34(2):149-162.
82. Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol* 2009; 10(12):1245-1251.
83. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol* 2011; 12(12):1159-1166.
84. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8):556-567.
85. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD et al. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol* 2011; 12(12):1151-1158.
86. Jager A, Kuchroo VK. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol* 2010; 72(3):173-184.
87. Muir R, Osbourn M, Dubois AV, Doran E, Small DM, Monahan A et al. Innate Lymphoid Cells Are the Predominant Source of IL-17A during the Early Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(4):407-416.
88. Blaschitz C, Raffatellu M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J Clin Immunol* 2010; 30(2):196-203.
89. Kolls JK, Khader SA. The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(6):443-448.

90. Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K et al. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* 2007; 179(8):5462-5473.
91. Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ, Dong C. Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* 2011; 35(4):611-621.
92. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J et al. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* 2006; 177(1):36-39.
93. Ho AW, Shen F, Conti HR, Patel N, Childs EE, Peterson AC et al. IL-17RC is required for immune signaling via an extended SEF/IL-17R signaling domain in the cytoplasmic tail. *J Immunol* 2010; 185(2):1063-1070.
94. Hu Y, Ota N, Peng I, Refino CJ, Danilenko DM, Caplazi P et al. IL-17RC is required for IL-17A- and IL-17F-dependent signaling and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2010; 184(8):4307-4316.
95. Liu Y, Mei J, Gonzales L, Yang G, Dai N, Wang P et al. IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro. *J Immunol* 2011; 186(5):3197-3205.
96. Nestle FO, Di MP, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(10):679-691.

97. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52(1):65-70.
98. Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 2009; 160(2):319-324.
99. Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H et al. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(10):2876-2885.
100. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002; 8(5):500-508.
101. Doe C, Bafadhel M, Siddiqui S, Desai D, Mistry V, Rugman P et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD. *Chest* 2010; 138(5):1140-1147.
102. Roos AB, Sethi S, Nikota J, Wrona CT, Dorrington MG, Sanden C et al. IL-17A and the Promotion of Neutrophilia in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192(4):428-437.
103. Johansen C, Riis JL, Gedebjerg A, Kragballe K, Iversen L. Tumor necrosis factor alpha-mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 2011; 286(29):25487-25494.

104. Pfeifer P, Voss M, Wonnenberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM et al. IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48(4):415-421.
105. Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N et al. Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50(1):30-39.
106. Holland DB, Bojar RA, Farrar MD, Holland KT. Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 290(2):149-155.
107. Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect* 2007; 9(1):78-86.
108. Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S et al. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 2002; 169(1):443-453.
109. Song X, Gao H, Lin Y, Yao Y, Zhu S, Wang J et al. Alterations in the microbiota drive interleukin-17C production from intestinal epithelial cells to promote tumorigenesis. *Immunity* 2014; 40(1):140-152.
110. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9):e45.

111. Bals R, Beisswenger C, Blouquit S, Chinet T. Isolation and air-liquid interface culture of human large airway and bronchiolar epithelial cells. *J Cyst Fibros* 2004; 3 Suppl 2:49-51.
112. Platz J, Pinkenburg O, Beisswenger C, Puchner A, Damm T, Bals R. Application of small interfering RNA (siRNA) for modulation of airway epithelial gene expression. *Oligonucleotides* 2005; 15(2):132-138.
113. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8(3):138-140.
114. Gyorffy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2013; 8(12):e82241.
115. Schamberger AC, Mise N, Jia J, Genoyer E, Yildirim AO, Meiners S et al. Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor-beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014; 50(6):1040-1052.
116. Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F et al. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 2005; 175(9):6177-6189.
117. Hoenderdos K, Condliffe A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48(5):531-539.

118. Filaire E, Dupuis C, Galvaing G, Aubreton S, Laurent H, Richard R et al. Lung cancer: what are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition. *Lung Cancer* 2013; 82(3):383-389.
119. Punturieri A, Szabo E, Croxton TL, Shapiro SD, Dubinett SM. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101(8):554-559.
120. Voss M, Wonnemberg B, Honecker A, Kamyschnikow A, Herr C, Bischoff M et al. Cigarette smoke-promoted acquisition of bacterial pathogens in the upper respiratory tract leads to enhanced inflammation in mice. *Respir Res* 2015; 16:41.
121. Burns AR, Hosford SP, Dunn LA, Walker DC, Hogg JC. Respiratory epithelial permeability after cigarette smoke exposure in guinea pigs. *J Appl Physiol* (1985) 1989; 66(5):2109-2116.
122. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJ. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J* 2012; 39(2):419-428.
123. Jones JG, Minty BD, Lawler P, Hulands G, Crawley JC, Veall N. Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers. *Lancet* 1980; 1(8159):66-68.
124. Koyama S, Sato E, Haniuda M, Numanami H, Nagai S, Izumi T. Decreased level of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage fluid of normal smokers and patients with pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166(3):382-385.

125. Hattar K, Savai R, Subtil FS, Wilhelm J, Schmall A, Lang DS et al. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62(2):309-320.
126. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991; 3(7):207-212.
127. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 2009; 114(2):357-359.
128. Pan B, Shen J, Cao J, Zhou Y, Shang L, Jin S et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci Rep* 2015; 5:16053.
129. Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(12):827-835.
130. Yadava K, Pattaroni C, Sichelstiel AK, Trompette A, Gollwitzer ES, Salami O et al. Microbiota Promotes Chronic Pulmonary Inflammation by Enhancing IL-17A and Autoantibodies. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 193(9):975-987.
131. Friedrich M, Diegelmann J, Schauber J, Auernhammer CJ, Brand S. Intestinal neuroendocrine cells and goblet cells are mediators of IL-17A-amplified epithelial IL-17C production in human inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 2015; 8(4):943-958.

132. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med* 2010; 16(2):219-223.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der akute und chronische Zyklus der COPD	3
Abbildung 2: Die Tumorgenese von gesunden Zellen zu metastatischen Zellen	6
Abbildung 3: Repräsentative Beispiele für die Auswertung der immunhistochemischen Färbung auf IL-17C und für die Berechnung des IRS-Wertes.....	43
Abbildung 4: Schema des experimentellen Versuchsablaufes.....	46
Abbildung 5: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einem verringerten Gesamtüberleben der Mäuse	46
Abbildung 6: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einem erhöhten Wachstum von Lungentumoren.....	47
Abbildung 7: Eine rauchinduzierte Entzündung und Exposition mit NTHi fördert synergistisch das Wachstum von Lungenmetastasen.....	49
Abbildung 8: Die CS-Exposition hat keinen Effekt auf die NTHi- induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum	51
Abbildung 9: Die CS-Exposition hat keinen Effekt auf die NTHi- induzierte Entzündung im Alveolarraum	52
Abbildung 10: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einem Verlust der pulmonalen Barriereintegrität und zu einem Lungenschaden	53
Abbildung 11: Die Exposition mit CS führt zu einer reduzierten Expression von Tight Junction Proteinen im Lungengewebe	54

Abbildung 12: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer vermehrten Translokation bakterieller Faktoren in das Tumorgewebe	55
Abbildung 13: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer verminderten Barriereintegrität	56
Abbildung 14: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer erhöhten Entzündung im Tumorgewebe	57
Abbildung 15: Die Exposition mit CS und NTHi führt zu einer erhöhten Proliferation im Tumorgewebe	58
Abbildung 16: Die Proliferation von Lungenkrebszellen wird durch Stimulation mit Lungenpathogenen dosisabhängig gesteigert	59
Abbildung 17: Die Proliferation von Lungenkrebszellen wird durch Stimulation mit Lungenpathogenen und TLR-2 Liganden erhöht	61
Abbildung 18: Das Wachstum von Lungenmetastasen ist in IL-17A ^{-/-} Tieren reduziert.....	63
Abbildung 19: Die Entzündung im Tumorgewebe ist in IL-17A ^{-/-} Tieren reduziert.....	64
Abbildung 20: IL-17A ^{-/-} Tiere weisen eine reduzierte Proliferation im Tumorgewebe auf	64
Abbildung 21: IL-17A beeinflusst nicht die Proliferation von LLC und A549 Zellen <i>in vitro</i>	65
Abbildung 22: Das NTHi-vermittelte Wachstum von Lungenmetastasen ist TLR-2/4 abhängig	68
Abbildung 23: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Proliferation im Tumorgewebe von TLR-2/4 ^{-/-} Tieren.....	69

Abbildung 24: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Anzahl von Ly6B ⁺ Zellen im Tumorgewebe von TLR-2/4 ^{-/-} Tieren	70
Abbildung 25: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Entzündung im Tumorgewebe von TLR-2/4 ^{-/-} Tieren	71
Abbildung 26: Die Exposition mit NTHi führt zu keiner erhöhten Anzahl von Ly6B ⁺ Zellen im Lungenparenchym von TLR-2/4 ^{-/-} Tieren	72
Abbildung 27: TLR-2/4 und IL-17C vermitteln die NTHi-induzierte Entzündung im Alveolarraum	73
Abbildung 28: NTHi führt zu einer TLR-2/4 abhängigen Expression von IL-17C	74
Abbildung 29: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Anzahl von Ly6B ⁺ Zellen im Tumorgewebe von WT Tieren	75
Abbildung 30: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Entzündung im Tumorgewebe von WT Tieren.....	76
Abbildung 31: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Anzahl von Ly6B ⁺ Zellen im Lungenparenchym von WT und IL-17C ^{-/-} Tieren	77
Abbildung 32: Die NTHi-Exposition führt zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum	78
Abbildung 33: Die NTHi-Exposition führt zu einer tendenziellen Erhöhung der Gesamttumorlast in WT Mäusen	79
Abbildung 34: Die Exposition mit NTHi führt zu einer erhöhten Proliferation im Tumorgewebe	80
Abbildung 35: IL-17C ^{-/-} Mäuse weisen eine geringere Tumorlast auf als WT Mäuse nach NTHi-Exposition.....	81

Abbildung 36: Die Exposition aus der Kombination von CS und NTHi führt, verglichen mit IL-17C ^{-/-} Mäusen, zu einer signifikant größeren Gesamttumorlast in WT Mäusen.....	83
Abbildung 37: Die Exposition mit CS und NTHi führt im Vergleich zu WT Tieren zu einer geringeren Anzahl von Ly6B ⁺ Zellen im Tumorgewebe von IL-17C ^{-/-} Mäusen	84
Abbildung 38: Die Entzündung im Tumorgewebe ist in IL-17C ^{-/-} Tieren reduziert.....	85
Abbildung 39: IL-17C ^{-/-} Tiere weisen eine reduzierte Proliferation des Tumorgewebes auf.....	85
Abbildung 40: IL-17C erhöht die Ausschüttung der neutrophilen Granulozyten rekrutierenden Chemokine von Tumorzellen	87
Abbildung 41: Die NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Expression von KC im Tumorgewebe von WT Tieren.....	88
Abbildung 42: TNF- α erhöht die Proliferation von LLC Zellen, während IL-17C keinen Einfluss auf die Proliferation von LLC Zellen nimmt.....	89
Abbildung 43: IL-17C beeinflusst die Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl in LLC Zellen <i>in vitro</i> nicht	90
Abbildung 44: TLR-2/4 ^{-/-} und IL-17C ^{-/-} Mäuse weisen im Grundzustand und nach NTHi-Exposition keine veränderte Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bclxl auf	91
Abbildung 45: IL-17C ^{-/-} und WT Tiere weisen im Grundzustand und nach NTHi-Exposition nur eine geringe Anzahl apoptotischer Zellen auf.....	92
Abbildung 46: Repräsentative immunhistochemische Färbung von IL-17C in NSCLC Gewebeproben.....	94

Abbildung 47: Prognostischer Wert von IL-17C in Patienten mit
Lymphknotenmetastasen.....96

Abbildung 48: Prognostischer Wert der Expression von IL-17C und
IL-17RE laut "Kaplan-Meier plotter" Analyse97

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterielle Pathogene und deren Rolle in Exazerbation und stabiler COPD, modifiziert nach [19].	4
Tabelle 2: Beispiele für Entzündungen und die mit ihnen assoziierte Malignität, modifiziert nach [35].	8
Tabelle 3: Verwendete Geräte und ihre Hersteller.	20
Tabelle 4: Verwendete Lösungen.	22
Tabelle 5: Verwendete Bakterienstämme und ihre Herkunft.	23
Tabelle 6: Master Mix cDNA Synthese.	26
Tabelle 7: Reaktionsansatz RT-PCR.	27
Tabelle 8: Humane Forward und Reverse Primer für die RT-PCR.	28
Tabelle 9: Murine Forward und Reverse Primer für die RT-PCR.	28
Tabelle 10: Temperaturprogramm der RT-PCR.	29
Tabelle 11: Verwendete Zelllinien und Kulturmedien.	30
Tabelle 12: Umrechnung der prozentual IL-17C positiven Zellen in den PP Score.	42
Tabelle 13: Umrechnung der Intensität der IL-17C Färbung in den SI Score.	42
Tabelle 14: Stammdaten des untersuchten NSCLC-Patientenkollektivs.	93
Tabelle 15: Prognostischer Wert von IL-17C.	95

8 Publikationsverzeichnis

Cigarette smoke induced disruption of pulmonary barrier and bacterial translocation drive tumor associated inflammation and growth

Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Wolf A, Voss M, Wolf L, Honecker A, Kamyschnikow A, Herr C, Bals R, Beisswenger C

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015 Sep 15;309(6):L605-13

IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth

Jungnickel C, Schmidt L, Bittigkoffer L, Wolf L, Kamyschnikow A, Herr C, Menger M, Wiewrodt R, Bals R, Beisswenger C

zur Publikation eingereicht

NTHi-induced neutrophilic inflammation promoted growth and proliferation of K-ras induced early cancerous lesions is completely dependent on Toll-like receptor signaling

Jungnickel C, Schnabel PA, Bohle R, Wiewrodt R, Herr C, Bals R, Beisswenger C

zur Publikation eingereicht

IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia

Wolf L, Sapich S, Honecker A, **Jungnickel C**, Seiler F, Bischoff M, Wonnenberg B, Herr C, , Daum N, Lehr C, Bals R, Beisswenger C

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol - zur Publikation angenommen

IL-17A attracts inflammatory cells in murine lung infection with P. aeruginosa

Wonnenberg B, **Jungnickel C**, Honnecker A, Wolf L, Voss M, Bischoff M
Tschernig T, Herr C, Bals R, Beisswenger C

Innate Immun. 2016 Sep 15

9 Konferenzbeiträge

Die folgenden Beiträge wurden auf nationalen und internationalen Konferenzen als Vortrag oder Poster vorgestellt oder auf zukünftigen Konferenzen bereits angenommen.

9.1 Vorträge

IL-17C promotes tumor-associated inflammation and lung tumor growth

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

ERS International Congress, London (2016)

→ Reisestipendium der European Respiratory Society - Young Scientist Sponsorship

COPD-like inflammation drives the progression of K-ras induced early cancerous lesions

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

100. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin (2016)

Ein Zigarettenrauch-induzierter Barriereverlust führt zur Translokation von bakteriellen Faktoren ins Tumorgewebe, was mit einem erhöhten Wachstum von Lungentumoren einhergeht

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Leipzig (2016)

Ein durch Zigarettenrauch induzierter Verlust der pulmonalen Barriere führt zur Translokation von bakteriellen Faktoren ins Tumorgewebe und einem erhöhten Wachstum von Lungentumoren

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., München (2015)

IL-17C mediates inflammation in acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia

Wolf L, Honecker A, **Jungnickel C**, Bischoff M, Bals R, Beisswenger C

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., München (2015)

Molekulare und pathologische Aspekte in der Diagnostik des Bronchialkarzinoms – von Menschen und Mäusen

Schnabel PhA, Shouka D, Becker M, Beisswenger C, **Jungnickel C**, Wehler T, Bahls R, Bohle RM

56. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Berlin (2015)

Bakterielle Produkte führen bei rauchinduzierter Entzündung zum
Wachstum von Lungenkrebs

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/
Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen
Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Lübeck (2014)

9.2 Poster

COPD-like inflammation drives the progression of K-ras induced early cancerous lesions

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

ERS International Congress, London (2016)

→ Reisestipendium der European Respiratory Society - Young Scientist Sponsorship

IL-17C promotes tumor-associated inflammation and lung tumor growth

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Manchester (2016)

→ Reisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

The progression of K-ras induced early cancerous lesions is driven by a COPD-like inflammation

Jungnickel C, Bals R, Beisswenger C

24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Manchester (2016)

→ Reisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

Tobacco smoke induced loss of pulmonary integrity allows translocation of bacterial factors into tumor tissue resulting in increased growth of lung metastasis

Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Kamyschnikow A, Honecker A, Bals R, Beisswenger C

7th Mildred Scheel Cancer Conference, Königswinter (2015)

Tobacco smoke induced loss of pulmonary integrity allows translocation of bacterial factors into tumor tissue resulting in increased growth of lung metastasis

Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Kamyschnikow A, Honecker A, Bals R, Beisswenger C

Cell Symposia: Cancer, Inflammation & Immunity, Sitges, Spain (2015)

→ Reisestipendium der GlaxoSmithKline-Stiftung

10 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Christoph Beisswenger und Herrn Professor Dr. Dr. Robert Bals für die Vergabe des Themas und die hervorragenden Betreuung während der Promotion.

Weiterhin bedanke ich mich bei Anja Honecker, Dr. Christian Herr und Andreas Kamyschnikow für die Aufrechterhaltung der Mauszucht und der Maustypisierungen. Darüber hinaus gilt Andreas Kamyschnikow und Osman Karabiber ein ganz besonderer Dank für die aussagekräftigen immunhistochemischen Färbungen.

Lina Bittigkoffer und Alexander Wolf danke ich für die Unterstützung bei den verschiedensten Zellkulturexperimenten, die maßgeblich zu den gewonnen Erkenntnissen beigetragen haben.

Darüber hinaus danke ich Lisa Wolf, Julia Niederstaßer, Meike Voss und Bodo Wonnenberg für die gute Einarbeitung zu Beginn meiner Promotion und für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen bei der Durchführung von Experimenten.

Dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar danke ich für die Paraffineinbettung von Lungen für spätere histologische Schnitte.

Herrn Professor Dr. Rainer Wiewrodt und Herrn Dr. Lars Henning Schmidt vom Universitätsklinikum Münster danke ich für die Auswertung und Analyse der NSCLC-Studie.

Ein besonders herzlicher Dank geht an meine Mutter, meinen Bruder, Jürgen und Lina, die immer für mich da waren.