

Die Rolle von IL-17 in Patienten und im Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ildikó Boross

Geb. am 03.02.1974 in Mátészalka, Ungarn

Mainz, 09 September 2009

1. Gutachter: Prof.
2. Gutachter: Prof.
Tag der mündlichen Prüfung: 16.12.2009

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Thesis selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze einer guten wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.

Mainz den, 09 Sept. 2009

Ildikó Boross

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für **Zelluläre und molekulare Immunologie der Lunge** an der I. Medizinischen Klinik der Johannes-Gutenberg Universität Mainz in der Zeit von 15.07.2006 bis 01.09.2009 angefertigt.

Publikationen

1. Control of lung tumor-associated FOXP3⁺ T regulatory cells by IL-17A blockade requires T-bet (submitted)
Boross I, Schuster P, Koslowski M, Karwot R, Maxeiner JH, Tepe M, Soó-Becker K, Hausding M, Türeci Ö, Lehr HA and Finotto S
2. Local blockade of IL-6 R signaling induces lung CD4⁺ T cell apoptosis in a murine model of asthma via regulatory T cells.
Finotto S, Eigenbrod T, Karwot R, Boross I, Doganci A, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Galle PR, Neurath MF
Int Immunol. 2007 Jun;19(6):685-93. Epub 2007 May 11
3. A key regulatory role of the Transcription Factor NFATc2 in Bronchial Adenokarzinom via CD8⁺ T Lymphocytes
Maxeiner JH, Karwot R, Sauer K, Scholtes P, Boross I, Koslowski M, Türeci Ö, Wiewrodt R, Neurath MF, Lehr HA, Finotto S
Cancer Res. 2009 Mar 24.

Kongressbeiträge:

1. Ildikó Boross, Hans A. Lehr, Michael Koslowski, Özlem Türeci and Susetta Finotto
Differential expression of IL-17F and IL-17A in the lung of patients affected by lung Adenocarcinoma. Annual Meeting of the German Society for Immunology Heidelberg 5-8 September 2007
2. Ildikó Boross, Roman Karwot, Joachim Maxeiner, Petra Scholtes, Hans A. Lehr, Michael Koslowski, Özlem Türeci and Susetta Finotto
Differential expression of IL-17F and IL-17A in the lung of patients affected by lung Adenocarcinoma. Annual Meeting of Cancer Immuno Therapy (CIMT) 6th international CIMT meeting 2008 Mainz
3. Ildikó Boross, Roman Karwot, Michael Koslowski, Joachim H Maxeiner, Petra Schuster, Kinga Soó-Becker, Marcus Tepe, Michael Hausding, Hans A. Lehr, Özlem Türeci and Susetta Finotto
The role of IL-17A in lung Adenocarcinoma in human and murine model. American Association of Immunologists 96th Annual

Meeting May 8-12, 2009 Seattle, Washington (Poster wurde dargestellt von Prof. Dr. Dr. S. Finotto)

4. Ildikó Boross, Roman Karwot, Michael Koslowski, Joachim H Maxeiner, Petra Schuster, Kinga Soó-Becker, Marcus Tepe, Michael Hausding, Hans A. Lehr, Özlem Türeci and Susetta Finotto The role of IL-17A in lung Adenocarcinoma in human and murine model Annual Meeting of Cancer Immuno Therapy (CIMT) 7th international CIMT meeting 2009 Mainz

Danksagung

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	12
1.1	Lunge.....	12
1.2	Lungenkrebs.....	14
1.3	Klinische Symptome.....	15
1.4	Stadieneinteilung des Tumors.....	16
1.5	Tumorgraduierung (Grading).....	18
1.6	Klassifikation der Lungentumoren.....	18
1.6.1	Small Cell Lung Cancer.....	18
1.6.2	Non-Small Cell Lung Cancer.....	19
1.7	Therapie des Nicht-Kleinzelligem Lungenkarzinoms.....	21
1.8	Interleukin-17.....	26
1.8.1	Interleukin-17 Zytokin Familie.....	26
1.8.2	Biochemische Struktur.....	26
1.8.3	Interleukin-17 Rezeptor.....	29
1.8.4	Zelluläre Herkunft.....	29
1.8.5	Th17- eine selbständige T Effektor Linie.....	30
1.8.6	Differenzierung der IL-17 produzierenden T-Zellen.....	33
1.8.7	Die Rolle von IL-17im Immunsystem.....	34
2	Material und Methoden.....	38
2.1	Material.....	38
2.1.1	Chemikalien.....	38
2.1.2	Geräte, Hilfsmittel.....	41
2.1.3	Gebrauchsmaterial.....	42
2.1.4	Puffer.....	43
2.1.5	FACS Lösungen.....	44
2.1.6	Weitere Puffer und Lösungen.....	44
2.1.7	Gebrauchsfertige Kits.....	45
2.1.8	Antikörper.....	45
2.1.9	Rekombinante Proteine.....	47
2.2	Methoden.....	47
2.2.1	Humane Population.....	47
2.2.2	Mäuse (Mus musculus).....	50

2.2.2.1	Behandlung der Mäuse.....	51
2.2.2.2	Organentnahme.....	54
2.2.2.3	Bestimmung der Tumormasse.....	54
2.2.3	Tumor-Zelllinie.....	55
2.2.4	Gesamtzellisolation.....	55
2.2.5	CD4+ T-Zellisolation.....	56
2.2.6	Zellkultivierung.....	57
2.2.7	Th17 Differenzierung.....	58
2.2.8	Nukleofektion mit siRNA.....	58
2.2.9	In vitro Neutralisierung von IL-17A.....	59
2.2.10	Immunohistochemischer Nachweis.....	60
2.2.11	FACS.....	62
2.2.12	ELISA.....	65
2.2.13	RNA Isolation.....	67
2.2.14	cDNA Synthese und quantitative PCR.....	68
2.2.15	Proteinextraktion, Western Blot.....	70
3	Ergebnisse.....	71
3.1	Charakterisierung des Lungen-Adenokarzinoms des Menschen.....	71
3.1.1	Erhöhte Expression von IL-17A, RORC2 und RORA mRNA in den Lungengewebe aus Patienten mit Adenkarzinom.....	71
3.1.2	Erhöhte Menge von IL-17A Protein in den Lungen der Patienten im Vergleich zu Kontroll-Lungen.....	75
3.1.3	Unveränderte Expression der IL-17F mRNA in den Patienten mit Lungen-Adenokarzinom.....	77
3.1.4	Der IL-17 Rezeptor wird in den Lungen des Menschen exprimiert.....	78
3.1.5	Erhöhte FOXP3 mRNA ist in der Lunge mit Adenokarzinom.....	81
3.1.6	Erhöhte TGF β Level in der Lungewebe von Patienten mit Adenokarzinom.....	84
3.2	Interleukin-17 in der Maus.....	85
3.2.1	Im Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom sind IL-17A, IL-6, FOXP3 und ROR γ t erhöht.....	85
3.2.2	Interleukin 17F Zytokin im Mausmodell des Lungen-Adenokarzinoms	88
3.2.3	Die Rolle des Interleukin-17A in einem Mausmodell von Lungen- Adenokarzinom.....	90

3.2.3.1	Lokale Verabreichung des IL-17A Zytokins inhibiert die Proliferation der CD4 positiven T-Zellen.....	90
3.2.3.2	Lokale Blockade des Anti-IL-17A Antikörper reduziert den Tumorbefall in der Lunge.....	91
3.2.3.3	Lokale Anti-IL-17A Antikörper Behandlung erhöht die Anzahl der T-Effektorzellen und reduziert die Anzahl der CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatorischen T-Zellen.....	92
3.2.3.4	Bestimmung der Th1-Zytokine in der Lunge der Anti-IL-17A behandelten Mäuse.....	95
3.2.3.5	Hyperproliferation der CD4+ T-Lymphozyten in der Lunge nach lokaler Blockade mit Anti-IL-17A Antikörper.....	99
3.2.4	Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors <i>T Box Expressed in T Cells</i> (T-bet) in der IL-17A Blockade-Therapie.....	101
3.2.5	IL-17 Rezeptor als Target der IL-17 Blockade-Behandlung.....	107
3.2.6	IFN γ Rezeptor in regulatorischen T-Zellen.....	110
3.3	Zusammenfassung.....	113
4	Diskussion.....	115
4.1	Charakterisierung der Lunge von Patienten mit Adenokarzinom.....	115
4.2	Was ist mit IL-17F?.....	117
4.3	Die Charakteristika des Mausmodells entsprechen dem durch die Zelllinie verursachten Lungen-Adenokarzinom des Menschen.....	118
4.4	IL-17A Blockade reduziert das Tumorstadium durch die Reduktion der Anzahl der regulatorischen T-Zellen und durch die Induktion von IFN γ Sekretion in der Lunge.....	120
4.5	IL-17 produzierende CD4+ T-Zellen lassen sich durch die Blockade von IL-17A zu IFN γ produzierende T-Zellen umprogrammieren.....	121
4.6	T-bet kontrolliert die Expression von regulatorischen T-Zellen und IL-17 produzierenden T-Zellen.....	124
4.7	Auf dem Spur der Bedeutung des IL-17's anhand der IL-17 Rezeptor-Expression.....	124
5	Zusammenfassung.....	126
6	Glossar.....	129
7	Literatur.....	131
8	Lebenslauf.....	145

1 Einleitung

1.1 Die Lunge

Der Mensch braucht die Lunge zum Atmen, also für den lebenswichtigen Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxyd zwischen Blut und Außenwelt. Die Lunge besteht aus dem rechten und dem linken Lungenflügel und liegt zusammen mit dem Herzen und den großen Blutgefäßen im Brustkorb (1) (**Abbildung 1.1.**).



Abbildung 1.1. Schematische Darstellung der Atmungsorgane (1).

Wenn man einatmet, strömt die Luft durch die Nase, Rachen und Kehlkopf in die Luftröhre, ein zirka zehn bis zwölf Zentimeter langes Rohr, das sich im weiteren Verlauf in zwei „Hauptbronchien“ aufteilt. Jeder *Hauptbronchus* versorgt einen Lungenflügel und teilt sich immer weiter auf. Dadurch entstehen die so genannten Lungensegmente. Innerhalb der Segmente verzweigen sich die Bronchien weiter, bis sie dann in kleine Lungenbläschen (*Alveolen*) münden (2) (**Abbildung 1.2.**). In den Alveolen findet der lebenswichtige Gasaustausch statt: Das Blut nimmt den Sauerstoff, der in der eingeatmeten Luft enthalten ist auf und gibt dafür Kohlendioxyd ab, das anschließend mit der Luft ausgeatmet wird.

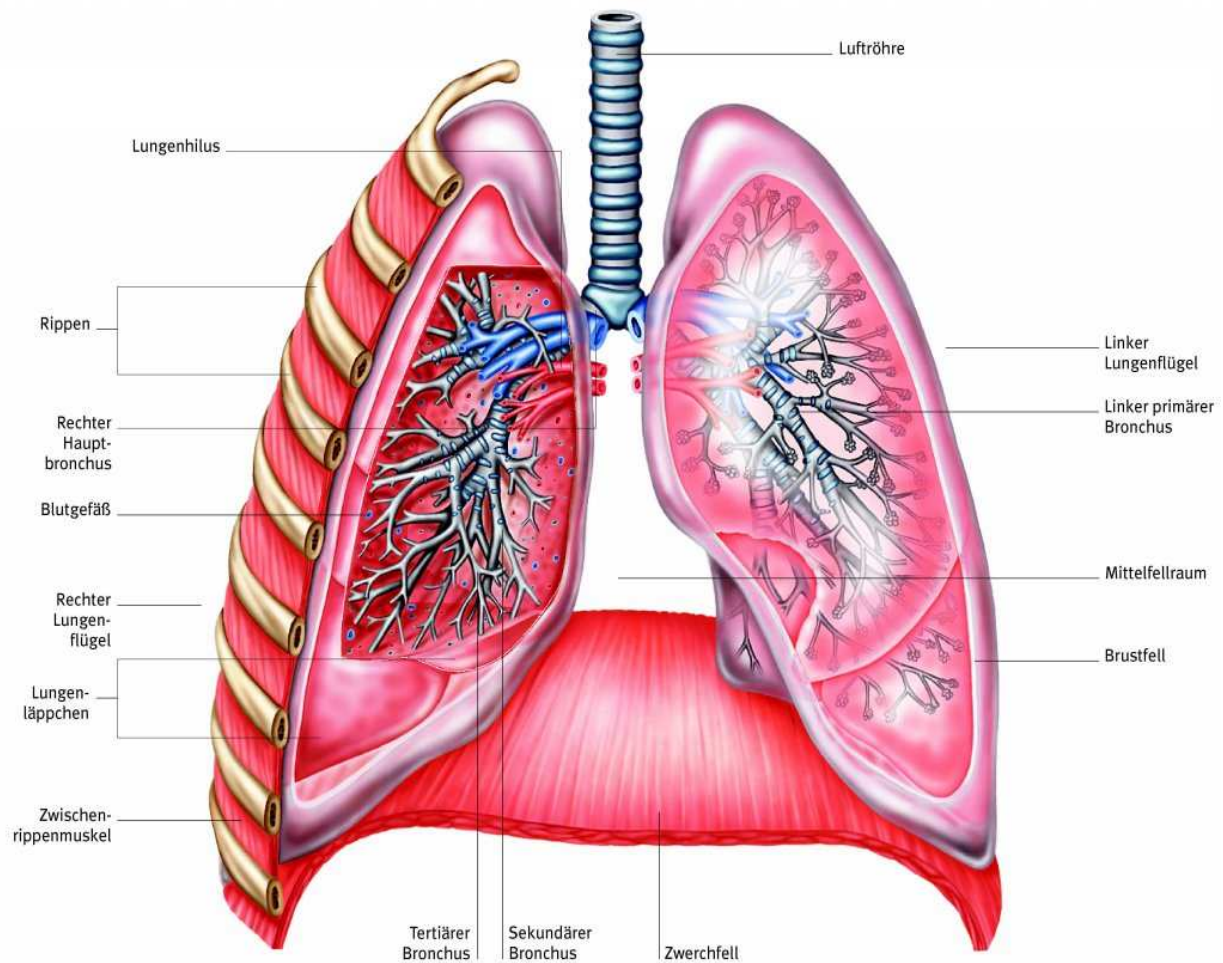


Abbildung 1.2. Bronchialsystem und Feinbau der Lunge Quelle: (2).

Damit der Körper mit genügend Sauerstoff versorgt wird, braucht ein Erwachsener in Ruhe zirka 12 bis 15 Atemzüge pro Minute. Bei jedem Atemzug atmet er etwa einen halben Liter Luft ein. Strengt ein Mensch sich an - zum Beispiel beim Sport -, atmet er schneller und auch tiefer ein, nimmt also auch mehr Sauerstoff auf. Die körperliche Leistungsfähigkeit hängt von der so genannten Lungenfunktion ab. Kann die Lunge nicht mehr genügend Sauerstoff liefern, empfindet der Betroffene Atemnot (3).

Die Funktion der Lunge lässt sich durch verschiedene Atemtests überprüfen, welche die Leistungsfähigkeit der Lunge unter Belastung messen.

Wie groß die Reserveleistung der Lunge ist, hängt von zahlreichen Faktoren ab: zum Beispiel davon, wie körperlich fit der Mensch ist oder welche Lebensgewohnheiten er hat. Besonders negativ kann sich dabei das Rauchen auswirken, denn Tabakrauch kann nicht nur Lungenkrebs verursachen, sondern auch die Lungenfunktion ganz erheblich einschränken. Ist ein Mensch an Lungenkrebs erkrankt und hat zusätzlich noch eine eingeschränkte Lungenfunktion, besteht die Gefahr, dass der Arzt ihn nicht operieren kann, danach dem Eingriff nicht mehr genügend Lungenleistung vorhanden wäre (4).

1.2 Lungenkrebs

Weltweit sterben pro Jahr mehr als vier Millionen Menschen an den Folgen des Rauchens, etwa eine Million davon an Lungenkarzinom (5). Das Lungenkarzinom ist die häufigste Todesursache bei Tumoren weltweit. Lungen-Adenokarzinom ist die am häufigsten diagnostizierte histologische Untergruppe vom Lungenkarzinom (6, 7). Das Lungenkarzinom ist in den USA bei den Männern mit 35% und bei den Frauen 22% der häufigste zum Tod führende Tumor. In Deutschland starben 2006 knapp 29.000 Männer und fast 12.000 Frauen an dieser Krebsart. Damit ist dieser Tumor die häufigste Krebstodesursache bei Männern und bei Frauen nach Brustkrebs und Darmkrebs die dritthäufigste (8).

Keine andere Krebserkrankung hat im Verlauf der letzten Jahrzehnte so stark zugenommen. Noch ist Lungenkrebs in Deutschland mehr als doppelt so oft bei Männern anzutreffen als bei Frauen, aber bei Frauen nimmt die Anzahl der Erkrankungen rasant zu.

Je älter die Menschen sind, desto mehr erkranken an dieser Krebsart, am häufigsten die 60- bis 70-Jährigen. Das Durchschnittsalter liegt bei 68 Jahren. Für die Betroffenen ist dies insofern von Bedeutung, da ältere Menschen häufig zusätzlich unter anderen Krankheiten leiden, welche die Möglichkeiten, den Lungenkrebs zu behandeln, erheblich einschränken können.

Weltweite wissenschaftliche Untersuchungen haben einwandfrei bewiesen, dass der Zigarettenkonsum die wichtigste Ursache für Lungenkrebs ist. **Jeder 10.** Raucher entwickelt ein Lungenkarzinom (9). Zigarettenrauch enthält zahlreiche krebserregende (kanzerogene) Substanzen, die sich teilweise erst nach der Verbrennung bilden. In der Tat sind etwa 85 Prozent aller Menschen, die an dieser Krankheit sterben, Raucher. Andere Faktoren spielen dagegen nur eine untergeordnete Rolle. Tabakrauch ist außerdem auch für einen erheblichen Teil anderer Krebserkrankungen verantwortlich, zum Beispiel der Bauchspeicheldrüse, der Blase und der Nieren. Etwa zehn Prozent aller Leukämiefälle bei Erwachsenen werden mit dem Rauchen in Zusammenhang gebracht, und es ist auch ein Risikofaktor für Gebärmutterhalskrebs.

Das Inhalieren von Tabakrauch schädigt aber auch andere Organe: 80 bis 90 Prozent der chronischen Atemwegserkrankungen und 25 bis 45 Prozent aller Erkrankungen der Herzkranzgefäße hängen damit zusammen.

1.3 Klinische Symptome

Es gibt keine für das Lungenkarzinom spezifische Symptomatik, was eine frühzeitige Diagnose zusätzlich erschwert. Häufig sind die Symptome so allgemein und uncharakteristisch, dass sie auch ganz andere Ursache haben können (10).

- Husten, insbesondere ein lang bestehender Raucherhusten, der sich plötzlich ändert
- Bronchitis oder eine so genannte Erkältung, die sich trotz Behandlung mit Antibiotika nicht bessert
- Atemnot
- Schmerzen im Brustkorb
- Allgemeiner Kräfteverfall, starker Gewichtsverlust
- Bluthusten
- Lähmungen oder starke Schmerzen

1.4 Stadieneinteilung des Tumors

Nach den Ergebnissen der Diagnostik und der Befunde ermittelt der Arzt das genaue Krankheitsstadium (Staging). Daraus ergibt sich wiederum, welche Behandlung sich am Besten eignet. Die TNM – Klassifikation ist eine international einheitliche „Schemata“ Krankheitsstandartisierung (Staging) für die Beschreibung der Krankheitsausdehnung nach den Ergebnissen der Diagnostik und der Befunde (11).

T bezeichnet die Ausdehnung des Primärtumors.

- **T0:** keine Anzeichen eines Primärtumors (z.B. Nach einer Chemotherapie)
 - **Tis/Ta:** Tumore, die noch nicht infiltriert haben.
 - **T1, 2, 3 oder 4:** zunehmende Größe des Primärtumors oder Befall weiterer Gewebe, z.B. bei Brustkrebs:
 - **T1:** größte Tumorausdehnung höchstens 2 cm
 - **T2:** größte Tumorausdehnung mehr als 2 cm, aber höchstens 5 cm
 - **T3:** größte Tumorausdehnung mehr als 5 cm
 - **T4:** Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut
 - **Tx:** keine Aussage über den Primärtumor möglich.
- Ta** gibt es nur bei bestimmten Organen (Nierenbecken und Harnleiter, Harnblase, Harnröhre, Penis). Dort können **Ta**-Tumoren mit einer besseren Prognose als **Tis** Tumoren verbunden werden.

N beschreibt das Vorhandensein bzw. das Fehlen von regionalen Lymphknotenmetastasen.

- **N0:** keine Anzeichen für Lymphknotenbefall
- **N1,2 oder 3:** zunehmender Lymphknotenbefall
- **Nx:** keine Aussage über Lymphknotenbefall

M (Metastasen) bezeichnet das Vorhandensein bzw. das Fehlen von hämatogenen Fernmetastasen. In der Regel ist die Klassifikation nur nach einem Staging möglich.

- **M0**: keine Anzeichen für Fernmetastasen
- **M1**: Fernmetastasen vorhanden
- **Mx**: keine Aussage über Fernmetastasen möglich.

Zusätzlich kann die Lokalisation der Metastasen angegeben werden und dadurch die Lage der Tumormetastase spezifiziert werden (**Tab. 1.1.**).

Tabelle 1.1. TNM – Klassifikation des Lungentumors (UICC 1997)

Kleines/ verstecktes Karzinom	Tx	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N1	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	N0
Stadium IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	Jedes T	N3	M0
	T4	jedes N	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

1.5 Tumorgraduierung (Grading)

Die Graduierung eines Tumors beinhaltet die Einstufung des Malignitätsgrades aufgrund histologischer und zytologischer Kriterien. Die wichtigsten Kriterien zur Bestimmung des Malignitätsgrades sind:

- Kernatypien (Hyperchromasie, Kernpolymorphie, Anisonukleose u.a.)
- Mitosezahl pro 10 definierte Gesichtsfelder (40er-Objektiv)
- Differenzierung (d.h. Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe).

Für die meisten Organ- und Weichgewebetumoren sind Gradingssysteme erstellt worden, die eine Korrelation zur Prognose aufweisen. Die gängigste Einteilung ist: Grad 1 (G1)= gut differenziert, Grad 2 (G2) = mäßig differenziert, Grad 3 (G3) = schlecht differenziert; gegebenenfalls kann Grad 4 (G4) für undifferenzierte anaplastische Tumoren angewandt werden (12).

1.6 Klassifikation der Lungentumoren

Bei der histologischen Einteilung der Lungentumore unterscheidet man zwischen den Kleinzelligen (SCLC= Small cell lung cancer) und den Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC= Non-small cell lung cancer). Diese Einteilung leitet sich tatsächlich von der Größe der verschiedenen vorgefundenen Tumorzellen ab (13).

1.6.1 Small Cell Lung Cancer

Das kleinzellige Lungenkarzinom (**Abbildung 1.3.**) (14) beträgt ungefähr 20% aller Lungenkarzinome, 3-4% aller malignen Tumore. Es ist eine besonders aggressive Krebsart. Der Tumor wächst sehr rasch, und es bilden sich sehr frühzeitig Metastasen (Tochtergeschwülste). Daher haben Betroffene, die an dieser Form von

Lungenkarzinom leiden, entsprechend schlechte Heilungschancen. Allerdings, und darin besteht eine gewisse Chance auf eine erfolgreiche Therapie, teilen sich diese Tumorzellen besonders oft und lassen sich daher durch eine Chemo- und Strahlentherapie gut angreifen.

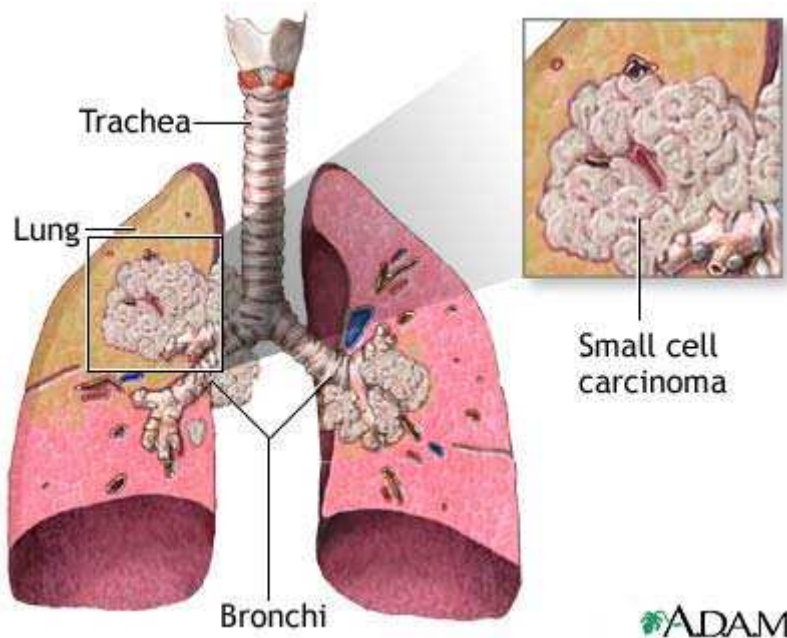


Abbildung 1.3. Schematische Darstellung des Kleinzelligen Lungenkarzinoms (14).

1.6.2 Non-Small Cell Lung Cancer

Der Anteil des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beträgt ca. 80% aller Lungenkarzinome. Die aktuelle WHO-Klassifikation umfasst ca. 30 verschiedene Typen, Subtypen und Varianten der Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinome, von denen folgende am häufigsten vorkommen:

1. Plattenepithelkarzinom (**Abbildung 1.4.**) („Squamous cell carcinoma“ oder Epidermoid Karzinom)
2. Adenokarzinom (**Abbildung 1.5.**)
3. Großzelliges Karzinom
4. Adenosquamöse Karzinom

Das Plattenepithelkarzinom entspringt aus den Plattenepithelzellen. Diese runden Zellen ersetzen das entzündete oder verletzte Epithelium der Bronchi. Tumore bilden

sich von den Epithelzellen am häufigsten im zentralen Lungenteil (15) oder in den Lungenlappen. Sie können eine beträchtliche Größe zwischen den zwei Lungenflügeln erreichen.

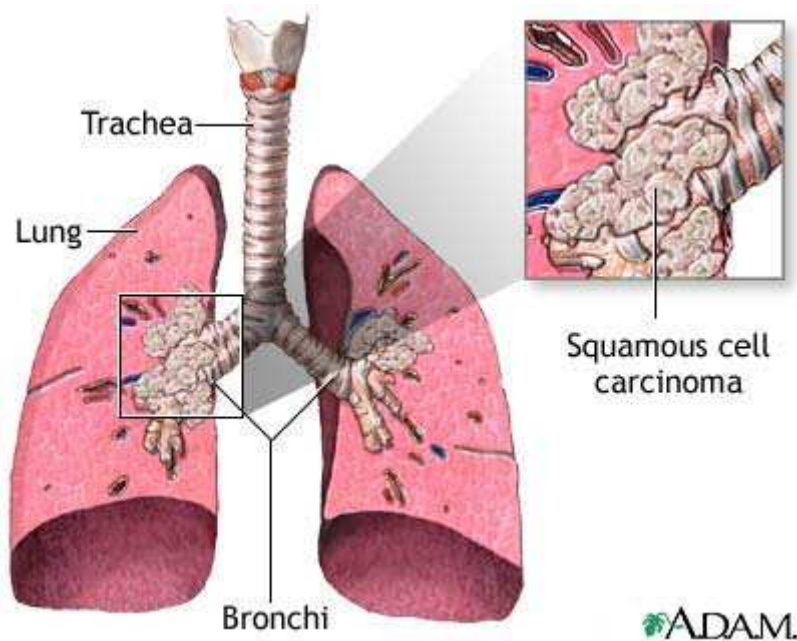


Abbildung 1.4. Schematische Darstellung des Plattenepithel (Squamous) Lungenkarzinoms (15).

Das Adenokarzinom geht gewöhnlich aus Mucus- produzierenden Zellen in der Lunge hervor. Über 2/3 des Adenokarzinoms entwickeln sich nicht zentral in der Lunge.

32-40% der Lungenkarzinomfälle werden als Adenokarzinom (16) eingestuft. Am häufigsten entwickeln sie sich langsam ohne besondere Symptome zu verursachen. In 50% der Fälle bilden sich Metastasen im Gehirn, aber auch zur Lunge, Leber, und Knochen werden von den Metastasen befallen.

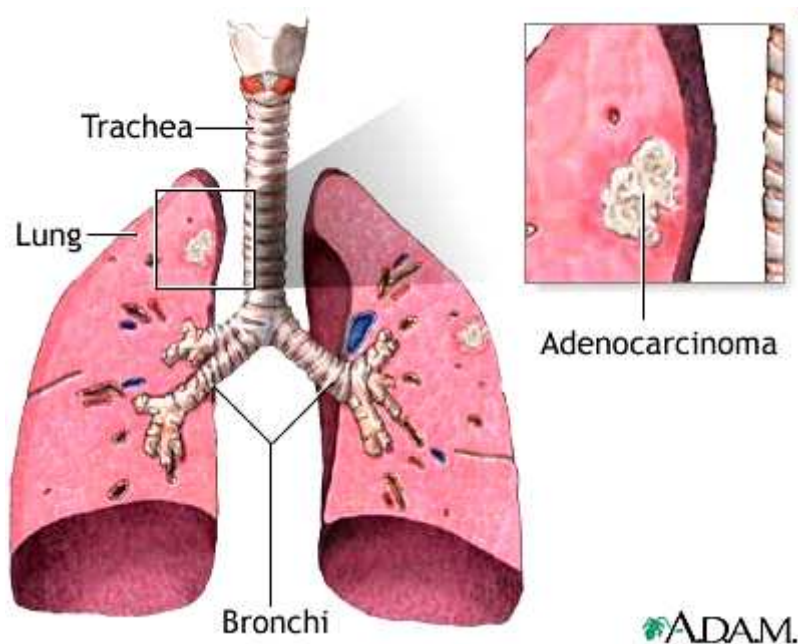


Abbildung 1.5. Schematische Darstellung des Adenokarzinoms.

Das Großzellige Karzinom macht 10-15% der Lungenkarzinomfälle aus. Die nicht als Adeno- oder Plattenepithelkarzinom definierten Fälle werden oft als das Großzellige Karzinom eingestuft.

1.7 Therapie des Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinom

Die Behandlung des Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinom hängt von dem Stadium ab, in dem die Erkrankung festgestellt wird: bei 25 bis 30% aller Betroffenen ist eine Operation die Therapie der ersten Wahl. In den fortgeschrittenen Stadien IIIA und IIIB kommt bevorzugt die Strahlenbehandlung zum Einsatz. Im weit fortgeschrittenen Stadium IV mit Fernmetastasen wird die Chemotherapie, zum Teil ergänzt durch eine Strahlenbehandlung, eingesetzt.

Chirurgische Behandlung

Die operative Entfernung des Tumors bietet die höchste Heilungschance und gilt daher beim operablen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom bis hin zum Stadium T3

N1 M0 als Therapie der ersten Wahl. Je nach Ausbreitung der Erkrankung unterscheidet man *Lobektomie*- Entfernung eines Lappens, *Bilobektomie*- Entfernung zweier Lappen der Lunge, *Pneumonektomie*- Entfernung eines ganzen Lungeflügels und *Lappenteilresektion*- die teilweise Entfernung eines Lungenlappens.

Der Nachteil der chirurgischen Behandlung besteht darin, dass sie nur bei denjenigen durchführbar ist, die entsprechend fit sind und eine ausreichende Lungenfunktion aufweisen können.

Eine abgewandte Form der Operation stellt die **Cryochirurgie** dar, wobei Tumore tiefgefroren und somit zerstört werden (17).

Strahlentherapie

Die Bestrahlung (Radiotherapie) spielt in der Behandlung der Nicht-Kleinzelligen Lungenkarzinome eine wichtige Rolle. Sie kommt zum Einsatz, wenn selbst in frühen Stadien der Erkrankung nicht operiert werden kann (primäre Radiotherapie), wenn nach der Operation eventuell verbliebene Tumorzellen zerstört werden sollen (sekundäre Radiotherapie) oder wenn in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung einzelne Metastasen behandelt werden (18).

Klinische Studien der letzten Jahre ergaben, dass die Kombination von Strahlen- und Chemotherapie (Chemoradiotherapy) die lokale Wirkung verbessert, es dadurch weniger Rückfälle gibt und dass die Betroffenen länger leben (19, 20).

Die Strahlen erfüllen den Zweck, dass die Tumorzellen abgetötet werden und den Betroffenen heilen. Ionisierende Strahlen verändern das Erbgut der Zellen. Normale gesunde Zellen können solche Schäden meistens reparieren. Bei Tumorzellen funktioniert dieses Reparatursystem nicht so gut. Deshalb können sie die Schäden, welche die Bestrahlung verursacht hat, nicht beheben, die Tumorzellen sterben ab. Die Strahlentherapie setzt hochenergetische Röntgenstrahlen zum Abtöten von Krebszellen und zur Tumorverkleinerung ein. Die Strahlen können von einer Maschine außerhalb des Körpers (externe Strahlentherapie) kommen oder von radioaktiv strahlendem Material (Radioisotope), das durch kleine Plastikröhrchen in

den Bereich eingeführt wird (innere Bestrahlungstherapie), in dem Krebszellen gefunden wurden.

Eine neue Form der Strahlentherapie wird "Radiochirurgie" genannt. Bei der Radiochirurgie wird die Strahlung direkt auf den Tumor zentriert und die Beeinträchtigung des gesunden Gewebes ist sehr gering. Radiochirurgie wird gewöhnlich als Behandlung für Tumore gewählt, die das Gehirn betreffen.

Chemotherapie

Das Ziel der antineoplastischen Chemotherapie ist es, die Karzinomzellen möglichst selektiv mit Medikamenten am Wachstum zu verhindern. Da die malignen Tumorzellen eine schnelle Zellteilung aufweisen, lässt sich der Zellzyklus in unterschiedlichen Phasen mit Hilfe von Substanzen unterbrechen. Diese unterschiedlichen Phasen im Zellzyklus können beispielsweise die DNA-Synthese, die Tubuli-Bildung und die Verhinderung der Reparatur der *DNA-single-strand*-Brüche sein. Leider wirken die Medikamente (Zytostatika) nicht nur auf die Tumorzellen, sondern auch auf die gesunden Zellen, die ebenfalls schnell proliferieren. Auch die Schleimhautzellen werden von den Zytostatika in Mitleidenschaft gezogen. Mögliche Nebenwirkungen sind Schleimhautprobleme (Diarrhoe), Müdigkeit, Haarverlust, Beeinträchtigung der Keimzellproduktion, Nervosität und Übelkeit. Die Substanzen lassen sich nach Wirkmechanismus in unterschiedliche Gruppen einteilen. Die Alkylantien können zwei DNA-Stränge vernetzen und dadurch verhindern, dass die Zellteilung korrekt stattfindet. Die Antimetabolite werden als falsche Bausteine in die DNA oder RNA eingebaut und stören somit die S-Phase des Zellzyklus. Natürliche Substanzen wie Vinca-Alkaloide stören die Bindung der Chromatiden an Tubuli, und verhindern somit deren Verteilung in der Mitose. Andere natürliche Substanzen, die Epipodophyllotoxine, blockieren die Interaktion mit der Topoisomerase II, die die Mitose durch Entspiralisierung der DNA-Helix initialisiert. Als Zytostatika muss man auch die Antibiotika erwähnen. Diese können mit Topoisomerase I interagieren und die Reparatur von *DNA-single-strand*-Brüchen verhindern oder den Aufbau der Mikrotubuli zerstören (21).

Die **präventive (vorbeugende) Chemotherapie** benutzt Medikamente, um dem Auftreten einer zweiten Krebserkrankung vorzubeugen.

Kombination von Radio- und Chemotherapie

Patienten, die wegen anderer medizinischer Probleme nicht operiert werden können, erhalten eine Bestrahlung. Ähnlich wie die Operation wird die Bestrahlung als lokale Therapie bezeichnet, da sie nur auf die Zellen in der behandelten Region einwirkt. Patienten mit Lungenkrebs, der sich in umliegendes Gewebe oder Lymphknoten ausgebreitet hat, können mit alleiniger Bestrahlung, mit Operation und Bestrahlung, Chemotherapie und Bestrahlung oder Chemotherapie allein behandelt werden. Bei Patienten, deren Lungenkrebs auf andere Körperregionen übergreifen hat kann Bestrahlung eingesetzt werden, um die Tumormasse zu verringern und die Schmerzen zu lindern. Die Chemotherapie kann zur Behandlung bei einigen Patienten in dieser Gruppe zur Anwendung kommen (22).

Die chirurgische Behandlung, die Bestrahlung und die Chemotherapie werden zur Behandlung des Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinoms eingesetzt. Dennoch heilen diese Behandlungen den Patienten häufig nicht.

Zusätzliche Therapiemöglichkeiten

Die **photodynamische Therapie** nutzt eine besondere Art von Licht und spezielle Chemikalien, um Krebszellen abzutöten (23).

Die **Lasertherapie** (24, 25) nutzt einen schmalen Lichtstrahl, um Krebszellen abzutöten.

Immuntherapie

Die Bedeutung der Immuntherapie hat in der letzten Zeit an Bedeutung gewonnen. Das ist darauf zurückzuführen, dass die Nebenwirkungen der Strahlung- bzw. der Chemotherapie oft unerwartete Schäden an den Patienten auslösen und dadurch den Gesundheitszustand stark beeinträchtigen und in manchen Fällen das Leben der Patienten gefährden kann. Man muss zwar bei diesen neuen Therapieansätzen auch mit Nebenwirkungen rechnen aber diese sind immer noch unbedeutender im

Vergleich zu denen der konventionellen Chemotherapie (26). Ein Vorteil bei der Immunotherapie ist, dass die gezielte Therapie nur den malignen Zellen schadet und die gesunden Zellen intakt läßt.

Die Immunotherapie kann man in die passive und die aktive Therapie einteilen. Die Passive Immunotherapie beinhaltet jegliche immunologisch aktive Moleküle, die außerhalb des Körpers hergestellt werden und Ihre Funktion nicht auf körpereigenen Mechanismen stützen. Die meist verbreitete passive Immunotherapie ist die Applikation von monoklonalen Antikörpern, welche die Bindung bestimmter Hormonen oder Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren verhindert. An dieser Stelle sind **Cetuximab** (Erbix) und **Trastuzumab** (Herceptin) zu erwähnen, die den *Epidermal Growth Factor* (EGF) Rezeptor (human epidermal growth factor receptor) - 1 und -2 (HER-1 und HER-2) außer Kraft setzen. Des Weiteren ist **Bevacizumab** (Avastin) erwähnenswert, der die Tumorangio-genese durch die Bindung zu *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) verhindert (26-29).

Der **adoptive Transfer** ist ein typisches Beispiel der passiven Immunotherapie, der einen *ex vivo*-Vermehrungs- und Infusionsschritt von dem Patienten stammender tumor-infiltrierenden T-Zellen oder Killer-Zellen beinhaltet (30).

Im Gegensatz zu der passiven Immunotherapie benutzt die aktive Immunotherapie die körpereigenen Immunzellen und setzt ein intaktes Immunsystem voraus. Das Prinzip der aktiven Immunotherapie beruht auf dem Charakter, dass das Immunsystem zwischen Tumor- und normalen Zellen durch die Tumorantigenerkennung unterscheiden kann (31-34). Mit wenigen Ausnahmen ist das Ziel der aktiven Immunotherapie die Induktion von antigen-spezifischen T-Zellantworten (35). Andere Studien berichten über einen mäßigen Erfolg des adoptiven Transfers autologer (vom Patienten stammenden) dendritischen Zellen, die mit p53 (siehe Glossar) transfiziert waren (36).

In der Grundlagenforschung wird unter anderem nach neuen Agenzien oder Substanzen geforscht, welche in der Tumor-Immuntherapie eingesetzt werden könnten. IL-17 ist auch ein Kandidat für diese Ansätze.

1.8 Interleukin-17

1.8.1 Interleukin-17 Zytokin Familie

Zytokine sind sekretierte Proteine, die viele verschiedene biologische Aktivitäten regulieren, inklusive die Hematopoese und Immunität (37).

Die Interleukin-17 (IL-17) Zytokin- Familie ist eine neu entdeckte Zytokin- Familie. IL-17A, das ursprüngliche Mitglied der Familie, wurde 1995 (38, 39) zum ersten Mal identifiziert (40, 41). IL-17A weist eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem *Herpesvirus saimiri* auf. IL-17 ist ein phylogenetisch betrachtet altes Zytokin, welches auch in Nicht-Säugetier-Wirbeltieren gefunden wurde (42). Funktionsanalysen haben demonstriert, dass IL-17 bei einem breitem Spektrum verschiedener Zelltypen (43-45) die Fähigkeit besitzt andere Zytokine und Chemokine zu induzieren wie IL-6, IL-8 und Granulozyten Colony-Stimulation Faktor (G-CSF).

1.8.2 Biochemische Struktur

IL-17A ist als ein Disulfid- verbundenes homodimerisches Glykoprotein mit einem Dimeren-Molekulargewicht von 30–35 kDa (46). Was seine Struktur betrifft, hat es keine Sequenzähnlichkeit mit anderen Zytokinen oder anderen Säugerproteinen (38). Auch sein Rezeptor IL-17R ähnelt keinem der anderen Zytokinrezeptoren und zeigt keine Erkennungsdomänen (38), so scheint die IL-17 / IL-17R eine neuartige Ligand-Rezeptor Signaling zu vertreten.

Zwischen 2000 und 2002 wurden die anderen Mitglieder der IL-17 Zytokinfamilie entdeckt: IL-17B, C, D, E (IL-25) und F (47-52)

Diese Moleküle der IL-17 Zytokinfamilie weisen eine strukturelle Überlappung auf, sie unterscheiden sich aber trotzdem in ihren biologischen Funktionen. Die höchste Aminosäuren-Sequenzübereinstimmung (58%) wurde zwischen IL-17A und IL-17F

gefunden, während nur 10-30% Sequenzübereinstimmung zwischen IL-17A und den anderen Familienmitgliedern gefunden wurde. Sie zeigen die größte Ähnlichkeit innerhalb der C-Terminalen 70 Aminosäuren und haben 4 gut konservierte Zystine (siehe auch Glossar) (53).

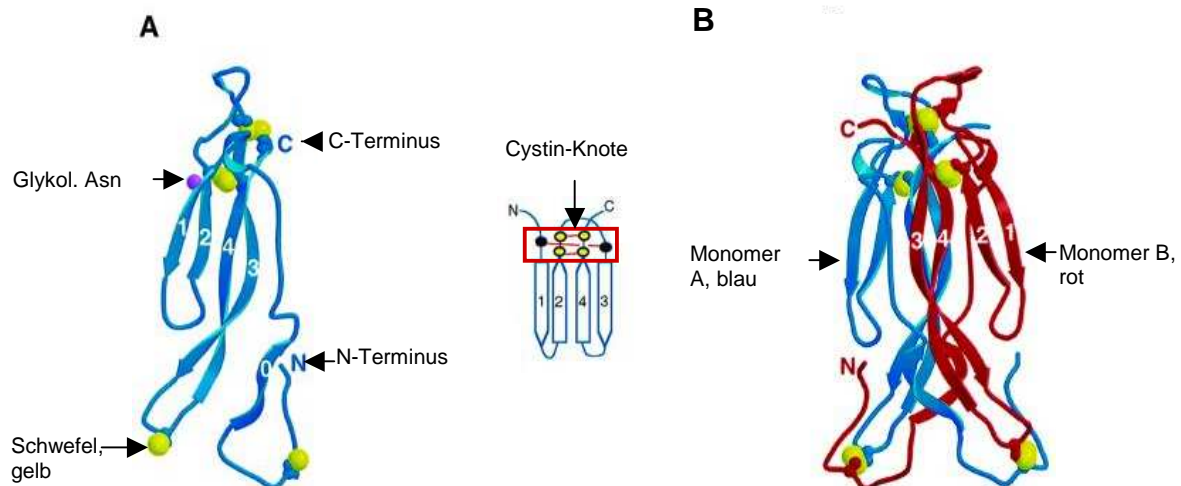


Abbildung 1.6. Die Struktur von IL-17F.

(A) Banddarstellung von IL-17F Monomer. Die Stränge sind von 0 bis 4 beschriftet. Die Disulfide sind als gelbe Bälle, die glykolysierte Form von (Asparagin) (Asn) als lila gekennzeichnet. Im Kern ist eine vollständige Cystin-Knoten-Faltenstruktur dargestellt (mitte, roter Bereich). Die Cysteinreste sind mit gefüllten Kreisen gekennzeichnet. (B) Die Banddarstellung des IL-17F-Dimers ist gezeigt. Das Monomer A (blau) bindet sich an Monomer B (rot) über eine Disulfidbrücke. Quelle: (53)

Wie bereits erwähnt, ist IL-17A ein Disulfid-verbundenes homodimerisches Glykoprotein mit einem Dimeren-Molekulargewicht von 30–35 kDa (46). Eine Disulfidbrücke kann die Tertiärstruktur eines extrazellulären Proteins stabilisieren, wobei dieser Verbindungstyp unter den zytosolischen Proteinen extrem selten vorkommt. Eine andere Besonderheit in dem Aufbau des IL-17 Zytokins ist die *Cystin-Knoten-Faltenstruktur*. Die 4 konservierten Cysteine der C-Terminalhälfte von dem IL-17F Sequenz formen einen Cystin-Knoten in der Kristallstruktur (53) (**Abbildung 1.6.A.**), welches deswegen so interessant ist, weil diese Cystin-Knoten-Faltenstruktur ein weit verbreiteter Bestandteil von mehreren Wachstumsfaktoren (Growth factors) wie *Bone Morphogenic Protein* (BMPs), *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β), *Nerve Growth Faktor* (NGF) und (**Abbildung 1.6.C.**) *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) ist. Das IL-17F Zytokin kommt in dicht assoziierten Dimeren vor (53) (**Abbildung 1.6.B.**).

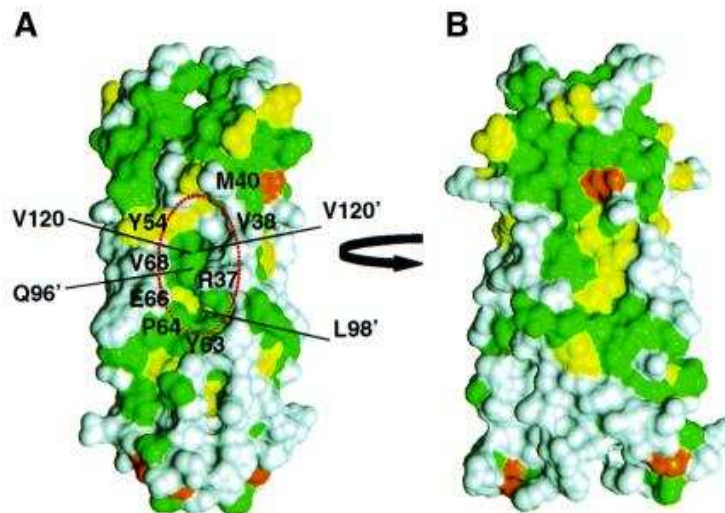


Abbildung 1.7. Vergleich zwischen IL-17F und IL-17A.

Zwei orthogonale Darstellungen, „Seiten-“ (A) und „Frontal-“ (B) Ansichten von der Molekularoberfläche von dem IL-17F Molekül. Grüne Flächen entsprechen den sequenzidentischen und gelbe Flächen den sequenzähnlichen Regionen zwischen IL-17A und IL-17F. Regionen, welche sich signifikant voneinander unterscheiden, sind weiß gekennzeichnet. Die Zystein- Reste sind orange markiert. Quelle: (53).

Die grüne Oberfläche in der Abbildung 1.7. zeigt die sequenzidentischen und die gelbe Oberfläche der sequenzähnlichen Regionen zwischen IL-17A und IL-17F. Wie oben bereits geschildert, sind 58% der Aminosäuren sequenzidentisch zwischen IL-17A und IL-17 F.

IL-17F wird auch von Th17 Zellen produziert so wie IL-17A (54, 55). IL-17A und IL-17F haben ähnliche Funktionen. Sie induzieren inflammatorische Zytokine, Chemokine und Metalloprotease (siehe auch Glossar) in verschiedenen Geweben und Zelltypen. Obwohl eine koordinierte Expression von IL-17A und IL-17F in Th17 oder anderen Zelltypen existiert, wurde gezeigt, dass es Th17 Zellen gibt, die ausschließlich IL-17A, IL-17F oder ein IL-17A-IL-17F Heterodimer exprimieren (56, 57).

1.8.3 Interleukin- 17 Rezeptor

IL-17Rezeptor A (IL-17A) ist der dazugehörige Rezeptor des IL-17A, welches in hoher Menge in hematopoietischen Zellen exprimiert wird. Dagegen wird nur eine geringe Menge auf Osteoblasten, Fibroblasten, Endothelial-Zellen und Epithelial – Zellen (38) exprimiert. Humanes IL-17RC bindet das humane IL-17A mit hoher Affinität. Dagegen bindet das murine IL-17RC das murine IL-17A nicht. Das humane IL-17RA kann mit IL-17RC ein Heterodimer formen und humanes IL-17A binden (58).

IL-17Rezeptor C (IL-17RC) ist der urverwandte Rezeptor für IL-17F. Dieser wird in geringem Maße auf hematopoetischen Zellen und in hohen Maßen auf nicht-hematopoetischen Zellen exprimiert. IL-17F bindet an dem Heterodimer von IL-17RA und IL-17RC (59).

Evi27 wurde als Rezeptor für IL-17B und IL-17E entdeckt. Der Rezeptor wurde als den *Rezeptor IL-17 homolog 1* (IL-17Rh1) von Lee *et. al.* 2001 bezeichneten (60). Das Evi27 Protein zeigt eine deutliche Homologie mit dem IL-17RA. Einige Isoformen sind höchstwahrscheinlich sezernierte Formen von IL-17 Rezeptor (61).

1.8.4 Zelluläre Herkunft

Die zelluläre Herkunft der Mitglieder der IL-17-Familie ist verschieden. IL-17A und IL-17F sind ursprünglich mit den Memory CD4 T-Zellen assoziiert worden und haben eine Verbindung zu der Th17 Linie (58, 62). Aber die Produktion von IL-17A und F ist nicht beschränkt auf die CD4+ T Effektorzellen. CD8+ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, NK Zellen, Neutrophile und Monozyten wurden als zellulärer Ursprung bereits identifiziert (63-67) (**Abbildung 1.8.**). IL-17D wird von CD4+ T und B Zellen, IL-17B und IL-17C von Lymphozyten produziert. Sie können aber von IL-17A und F indirekt rekrutiert

werden (47, 48, 58, 68). IL-17E (IL-25) tritt häufig in Verbindung mit einer Th2 Immunantwort auf und wird dem entsprechend auch von Th2 Zellen produziert (69).

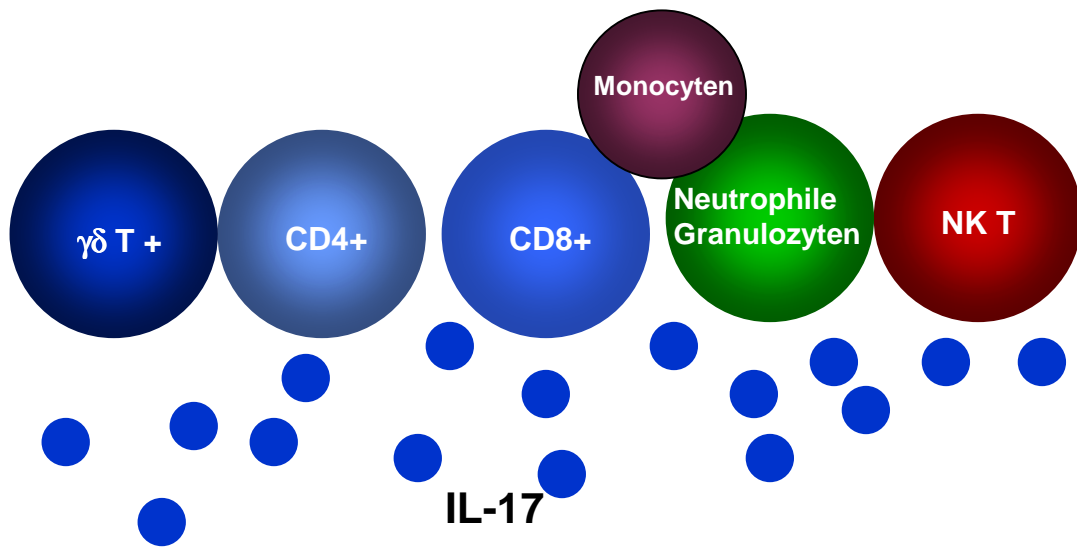


Abbildung 1.8. Quellen der IL-17A und F produzierende Zellen.

Die $\gamma\delta$, $CD4+$, $CD8+$, NK T-Zellen, Neutrophile Granulozyten und Monozyten wurden als produzierende Zelltypen bis jetzt identifiziert.

Die Sekretion von IL-17 beschränkt sich nicht auf einen Zelltyp, es wurden bereits die $\gamma\delta$, $CD4+$, $CD8+$, NK T-Zellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten als produzierende Zellen identifiziert.

1.8.5 Th17 - eine selbstständige T Effektor Linie

Klassisch betrachtet werden die Effektor $CD4+$ T-Zellen in Th 1 und Th2 Zellen unterteilt (70, 71). Th1 Zellen haben die Aufgabe intrazelluläre Pathogene zu vernichten und sie sind definiert durch die Produktion des Leitzytokines $IFN\gamma$. Th2 Zellen kontrollieren bestimmte parasitische Infektionen durch die Produktion von Interleukin 4 (IL-4), IL-5 und IL-13. Die Dysfunktion der Th1 Zellen ist mit zahlreichen chronischen autoinflammatorischen Krankheiten verbunden, während der Th2 Phänotyp mit Atopie (siehe Glossar) und allergischem Asthma verbunden ist. Viele Studien haben sich mit der Funktion und den unterschiedlichen Aufgaben des Th1

und Th2 Phenotypes beschäftigt (72-75). Die Differenzierung der Th1 Linie ist wird von den Transkriptionsfaktoren: „*Signal Transducer and Transcription Activator*“ 1 (STAT1), „*T-box expressed in T cells*“ (Tbet), STAT 4 und dem Zytokin IL-12 (76-78) beeinflusst, während die Entwicklung von Th2 mit IL-4, STAT6 und GATA-3 verbunden ist (79, 80).

Harrington L. E *et al* (2005 und 2006) (62, 72) zeigten, dass die Th17-Zelldifferenzierung unabhängig von T-bet, STAT1, GATA-3, STAT4 oder STAT6 Transkriptionsfaktoren stattfindet und die typischen Th1 und Th2 Zytokine wie IFN γ und IL-4 die Differenzierung von Th17 sogar inhibieren (**Abbildung 1.6**. Quelle (81)).

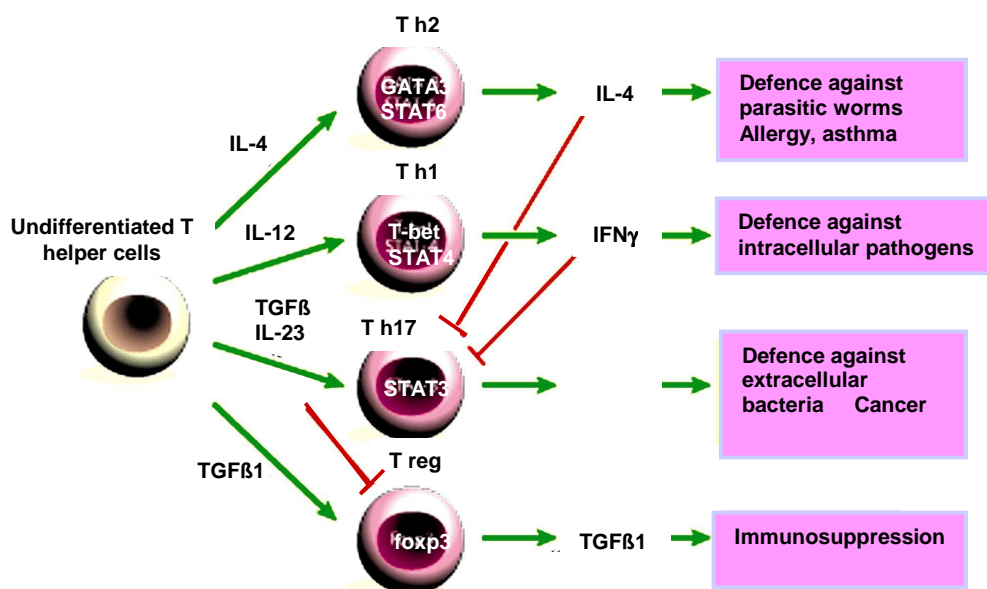


Abbildung 1.6. T Helfer Zell Differenzierung.

Die Produktion unterschiedlicher Interleukine, welche von dendritischen und anderen Zellen sezerniert werden, beeinflussen die Entwicklung der naiven T Zellen in einen entweder Th1 oder Th2 Phenotyp der CD4+ T Zellen. In einer inflammatorischen Immunantwort, TGF β_1 und IL-6 induziert die Entwicklung von den Th17-Zellen, die IL-17 produziert. Dagegen inhibieren IFN γ und IL-4 die Differenzierung der Th17-Zellen. TGF β_1 erhöht die Expression des IL-23 Rezeptors. IL-23 unterstützt die Expansion der Th17-Zellen. Aber TGF β_1 induziert ebenfalls die regulatorischen T-Zellen durch die Induktion des Foxp3 Transkriptionsfaktors. Andererseits die T reg-Population wird von IL-6 inhibiert. Die Entwicklung der Th1- und Th2-Zellen hängt von –den Transkriptionsfaktoren T-bet bzw. GATA-3. STAT-3 ist wahrscheinlich in Th17 Differenzierung einbezogen aber andere Th17-linienspezifische Faktoren könnten sich wohl noch ergeben. Quelle (81).

In 2006 haben Ivanov I.I. *et al.* (82) die bis jetzt als Haupt-Transkriptionsfaktor geltende Orphan Nuclear Rezeptor **ROR γ t** zur Differenzierung von IL-17+ T-Helferzellen identifiziert (**Abbildung 1.7.**). In 2007 haben Yang X.O. *et al* gefunden (83), dass nicht alleine ROR γ t sondern auch **ROR α 4** zusammen für eine optimale Differenzierung der Th17 Zellen verantwortlich sind. Noch im selben Jahr wurde **STAT3** als Regulator von ROR γ t identifiziert (84).

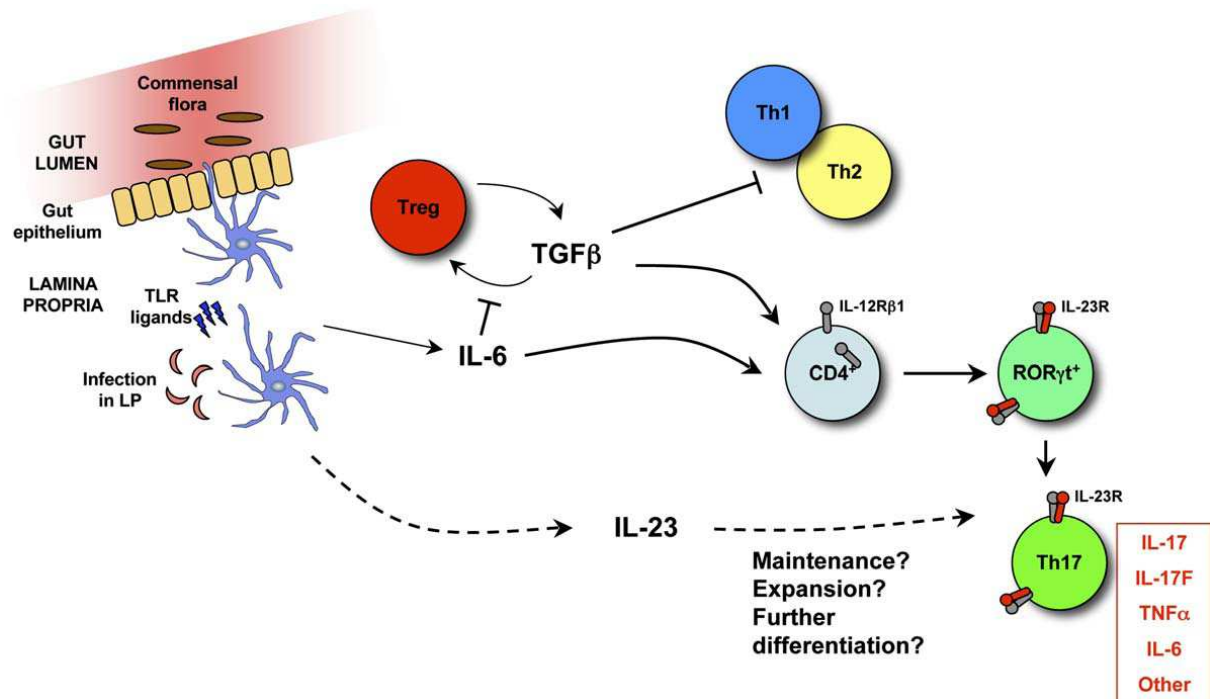


Abbildung 1.7. Model der Th17 Entwicklung in der intestinalen Lamina Propria.

Die Th17 Differenzierung im Darm benötigt die ROR γ t Expression in CD4+ T-Zellen. Die ROR γ t Expression wird durch IL-6 und TGF β (aber kein IL-23), welche von den aktivierten Dendritischen Zellen (DCs) und andere Zellen der Lamina Propria produziert, induziert und gesteuert werden. DCs können von dem der luminalen Flora, infektiösen Agenzien oder dem Toll Like Rezeptor (TLR) Liganden aktiviert werden. Es ist derzeit nicht bekannt, ob IL-6, TGF β oder IL-23 von verschiedenen Typen DCs oder von denselben DCs produziert werden. TGF β kann auch von T regulatorischen (Tregs) produziert werden, welche die Th1- und Th2-Antwort unterdrücken. Durch IL-6 kann die TGF β induzierte T reg-Differenzierung inhibiert werden, welche die Th17 Entwicklung weiter anregt. ROR γ t+ T-Zellen regulieren den IL-23R hoch und steigern somit die Sensitivität zu IL-23. IL-23 stimuliert den Th17-Phänotyp durch Aufrechterhaltung, Expansion und zusätzliche Differenzierung der Th-17-Population. (Quelle Ivanov September, 2006).

1.8.6 Differenzierung der IL-17 produzierenden T-Zellen

Es gibt zahlreiche Studien über die Differenzierung von IL-17 produzierenden T-Zellen. Die klassische Ansicht der unterschiedlichen Studien behauptet, dass *Transforming Growth Factor β* (TGF β) und IL-6 für die Differenzierung Th17-Phänotyp der murinen naiven T-Zellen zu einer Th17-Population verantwortlich sind. IL-23 trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung der Th17-Zellpopulation (85-87) bei (**Abbildung 1.8.A.**). Der zweite Weg, der die Differenzierung von murinen Th17-Zellen ermöglicht, ist die Kombination von TGF β und IL-21 ohne die Anwesenheit von IL-6 (88-90) (**Abbildung 1.8.B.**).

Dagegen beweisen einige Untersuchungen, dass TGF β und IL-6 keine Th17-Zellen in Menschen differenzieren können (91, 92) (**Abbildung 1.8.C.**). Außerdem deuten Evans H.G. *et al.* darauf hin (93), dass TGF β die Generierung der humanen Th17-Zellen supprimiert.

Laurence, A. & O'Shea in 2007 haben gezeigt, dass die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-23 in der Lage sind, die IL-17 Sekretion in T-Zellen in humanen Blut (**Abbildung 1.8.D.**) zu induzieren (94). Trotzdem bleibt ungeklärt, welche Faktoren zu der Differenzierung der naiven CD4⁺ T-Zellen zu humane Th17 Zellen beitragen.

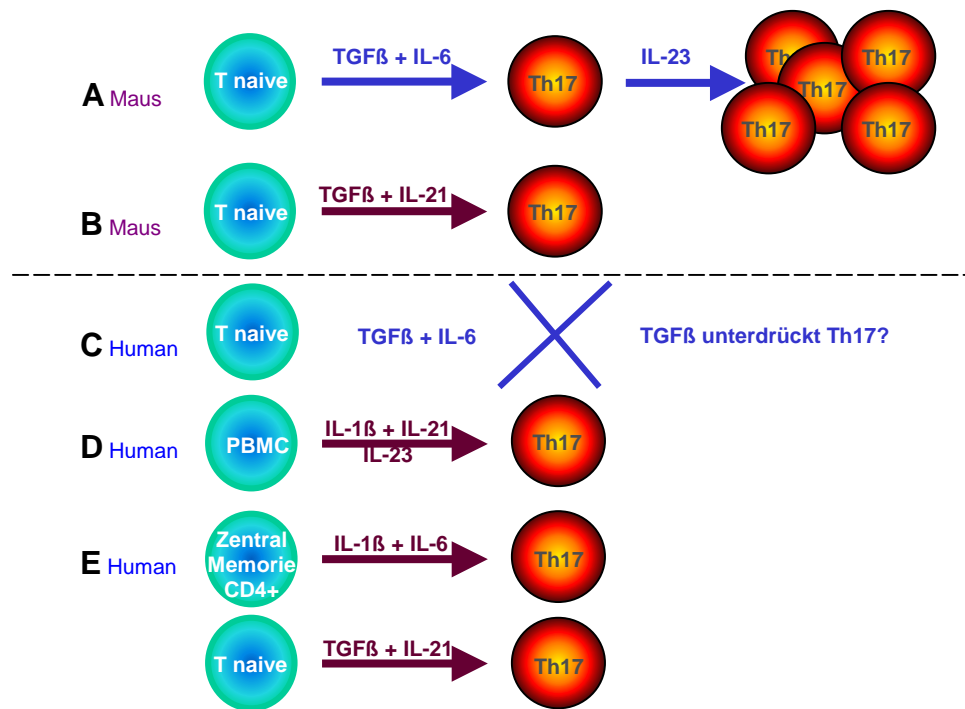


Abbildung 1.8. Theorien über die Differenzierung von IL-17 produzierenden Zellen.

(A) TGFβ und IL-6 induzieren die Differenzierung von Th17 im murinen Modell, wobei IL-23 zur Aufrechterhaltung der Th17 benötigt wird. (B) TGFβ und IL-21 induzieren murine Th17 Zellen. (C) TGFβ und IL-6 können keine Th17-Population ausbilden, TGFβ supprimiert sogar die Th17 Differenzierung. (D) Die Th17 Differenzierung benötigt IL-1β, IL-21 und IL-23 im humanen Blut. (E) IL-1β und IL-6 induzieren die Th17 Differenzierung in CD4+ Zentralen-Memory-Zellen und TGFβ und IL-21 induzieren Th17-Zellen in naiven T Zellen in im Menschen.

Die Arbeitsgruppe von Li Yang veröffentlichte 2008 was man hier zusammenfassend festhalten kann. Die Sekretion von IL-1β und IL-6 induziert die Sekretion von IL-17A in humanen Zentral Memory CD4+ T-Zellen, wogegen die Sekretion von TGFβ und IL-21 die einzigen Faktoren sind (**Abbildung 1.8.E.**), welche die Differenzierung von naiven humanen CD4+ T-Zellen in Th17-Zellen hervorrufen. Dies wird mit der Expression des Transkriptionsfaktors RORC2 begleitet (95):

1.8.7 Die Rolle von IL-17 im Immunsystem

Bis zum heutigen Tage ist es unklar, welche Klasse von Pathogenen die Th17 Antwort bevorzugt induziert, da sowohl Gram-positive wie *Propionibacterium acnes*, als auch die Gram-negativen *Citrobacter rodentium*, *Klebsiella pneumoniae*,

Bacteroides spp. und *Borrelia* spp., *Mycobacterium tuberculosis* sowie auch Pilze wie *Candida albicans* eine Th17 Antwort induzieren können (86, 96-100). Sowohl die von Pilzen abstammenden Wirkstoffe Zymosan und Dectin-1 Liganden als auch Muramyl-dipeptide (ein Derivat von bakteriellem Peptidoglykan) sind fähig eine IL-17 Produktion von T-Zellen hervor zu rufen (101). Demzufolge entsteht die Th17-Antwort als eine frühere Immunantwort auf bestimmte Pathogenen, welche von der Th1- und Th2-Immunität nicht abgedeckt werden. Tatsächlich scheinen die Th17-Zellen eine schnellere Kinetik durch die potentielle Induktion von Chemokinen (siehe Glossar) zu haben. Th17 Zellen könnten eine Brücke zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität bilden. Sie ziehen andere T-Effektorzellen an den Ort der Entzündung und ermöglichen so einen verbesserten späteren inflammatorischen Prozess. Khader *et. al.* 2007 (99) veröffentlichten, dass der frühen Th17-Antwort in *Mycobacterium tuberculosis* eine anschließende Th1 Antwort folgt.

Th17 Zellen in autoimmunen Krankheiten

Organ-spezifische Autoimmunkrankheiten resultieren aus einer fehlregulierten auto Antigen-spezifischen Th1 Antwort (102). Es wurde in vielen Tiermodellen humaner autoimmuner Krankheiten demonstriert, dass die Th1 Zellen eine pathogene Rolle spielen. Die These, dass autoimmune Krankheiten alleine durch Th1 Zellen vermittelt werden, hat sich geändert. Die Idee, dass Th17 Zellen eine wichtige Rolle in der autoimmunen Reaktion besitzen, hat sich bestätigt:

- Mäuse, welche Mangel an dem Th1 Effektor Zytokin IFN γ haben, entwickeln eine erhöhte Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (103)
- IL-12p35 (spezifisch für IL-12) defiziente Mäuse haben keine Änderung in dem Verlauf von EAE, gegenüber p19 (spezifisch für IL-23) Knock Out Mäuse, welche eine reduzierte Anzahl von TH17 Zellen haben und gegen EAE und Kollagen-induzierte Arthritis geschützt sind (104, 105)
- der Transfer von Myelin-reaktiven IL-17 produzierende T-Zellen, welche *in vitro* mit IL-23 expandiert wurden, verursachte eine Verschlechterung von EAE (54)

- IL-17 verstärkt den pro-inflammatorischen Effekt und induziert Gewebeschäden während der Entwicklung verschiedener Autoimmunerkrankungen. In der Tat kann IL-17 direkt und indirekt Knorpel- und Knochenabbau hervorrufen (106).
- Im Gegensatz dazu entwickeln IL-17 defiziente Mäuse eine abgeschwächte Form von EAE (107) und eine Kollagen-induzierte Arthritis (108). Darüber hinaus wurde ein erhöhter Level von IL-17 in Patienten mit Rheumatoider Arthritis (45), Multiple Sklerose (109), Inflammatory Bowel Disease (110) und Psoriasis gefunden (91).

Diese Daten deuten auf eine pathogene Rolle von den Th17 assoziierten Zytokinen und den Th17 Zellen in autoimmunen Krankheiten, sowohl in experimentellen Tiermodellen, als auch im Menschen hin.

Es ist wahrscheinlich, dass ein Co-Effekt der Th17 und Th1 Zellpopulationen zur Entwicklung von autoimmunen Krankheiten beiträgt und weniger der Einfluß einer einzelnen Zellpopulation (Th1 oder Th17) diesen Effekt auslöst. (111). In diesem Zusammenhang könnten Th17 Zellen die Migration anderer T-Zellen (z.B. Th1 Zellen) ins Zielgewebe erleichtern, wodurch die Inflammation moduliert und die Gewebeschäden verstärkt werden.

Diese Studien deuten darauf hin, dass Th17 Zellen ein potenzieller Auslöser von autoimmunen Erkrankungen durch die Induktion von Gewebeentzündung und Mobilisierung des angeborenen Immunsystems sind. Trotz allem haben Th17 Zellen in manchen Geweben, wie z.B. Darm und Leber (112) eine modulierende und schützende Rolle als potentielles Mitglied des adaptiven Immunsystems.

Th-17 Zellen in neoplastischen Krankheiten

Unter Neoplasia versteht man ein abnormales und desorganisiertes Wachstum in einem Gewebe oder Organ. Bösartige Neoplasmen werden als Krebs (Cancer) bezeichnet. Krebs ist nicht eine einzige Krankheit, eher sind es Hunderte von komplexen Krankheiten, in denen die Proliferation, die Differenzierung und der

Zelltod der betreffenden Zellen verändert sind. Krebs entsteht, wenn mehrere bestimmte Gene ihre Expression ändern (113). Die Karzinogenese der Lunge ist ein komplexer Prozess inbegriffen die genetische Mutationen, welche die Karzinomentwicklung und de bösartigen Phänotyp begünstigen. Darüber hinaus ist die Karzinogenese mit einer Apoptose-Resistenz, mit einer unkontrollierten Proliferation, mit Metastasen und mit Angiogenese verbunden. (114)

Es gibt mittlerweile mehrere Studien über die Rolle von IL-17 in verschiedenen Tumortypen, wobei eine allgemeingültige Aussage über das Pro oder Kontra von IL-17 nicht möglich ist.

Durch die Literatur ist bekannt, das die Th-17 Population und das Zytokin IL-17 in der Entstehung von Tumoren und Karzinomen eine wichtige Rolle spielt (47). Es wurde gezeigt, dass IL-17A die Angiogenese in Tumormodellen vorantreibt und mit der Anzahl der Blutgefäßen in humanen Ovarialkarzinom korreliert (115). IL-17A fördert außerdem die Tumorgenizität in einem murinen Model eines humanem Gebärmutterhalskrebs in Nacktmäusen (nude mice) und geht mit einem erhöhten IL-6 Level auf der Tumorseite einher (116). Die erhöhte IL-6 Produktion korreliert mit einer stärkerer Tumorentwicklung im Gebärmutterhalskrebs (117). Numasaki *et al* zeigt 2005, dass IL-17 die Angiogenese-Aktivität im nicht-kleinzelligen Lungen Karzinom (NSCLC) in SCID¹ Mäusen über den CXCR-2 (siehe Glossar)-abhängigem Angiogeneseweg erhöht (118). Diese Untersuchungen machen deutlich, dass IL-17 im Tumor eine Erhöhung von Tumorgenizität, die Stimulation von Angiogenese und eventuell eine erhöhte IL-6 Sekretion hervorruft. Andererseits gibt es Studien, welche über den positiven Effekt des IL-17 in der Tumorummunität berichten. Hirahara *et al* 2001 verwendeten eine Sarkoma Zelllinie, welche humane IL-17A überexprimierte. Sie fanden, dass die mit IL-17 transfizierten Zellen eine Tumor spezifische antitumorale Immunität durch die Erhöhung von MHC I und II in den Nacktmäusen induzierten (119). Hirahara et al. 2000 zeigten, dass die IL-17 transfizierte Ovarkarzinom-Zelllinie die Metastasierung in der Lunge in chinesischen Hamster signifikant reduzierte im Vergleich zur Kontrollzelllinie (120). Benchetrit *et al.* 2002 haben herausgefunden, dass IL-17 das Wachstum in 2 hematopoetischen Tumoren in immunkompetenten Mäusen inhibiert (121). In einer neueren Studie haben Kryczek *et al.* 2009 gezeigt, dass endogenes IL-17 eine schützende Rolle (im Vergleich zu IL-17 defizienten Mäusen) in der Entwicklung von Tumoren hat, welche

¹ SCID = severe combined immunodeficiency. Quelle: Wikipedia

von der subkutan verabreichten Kolon Karzinom Zelllinie induziert wurden. Des weiteren wiesen die IL-17 defizienten Mäuse mehr Metastasierung in der Lunge im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen auf (122). Die Rolle von IL-17 in der Tumorgenese wurde untersucht, allerdings sind die Ergebnisse widersprüchlich.

Die Rolle von IL-17 im Lungen-Adenokarzinom wurde bisher noch nicht untersucht und man kann daher nicht vorhersagen, ob eine IL-17 Blockade das Tumorwachstum verhindern kann oder nicht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

3,3,5,5-Tetramethylbenzidin (TMB)	Fluka, Buchs, Schweiz
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumchloride (NH ₄ Cl)	Riedel-de Haen, Seelze
Ammoniumperoxidsulphate (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aprotinin aus der Rinderlunge	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Assay diluent für ELISA	BD biosciences, Heidelberg
Biotin-Avidin Blocking Lösung	VECTOR Laboratory, Linaris Wertheim-Bettingen
Casy Clean	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Casy Ton	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Dest. Wasser	Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	E. Merck AG, Darmstadt
Dinatrium-EDTA	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Di-Natriumhydrogenphosphate (Na ₂ HPO)	E. Merck AG, Darmstadt
Dnase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco´s modified eagle medium (DMEM)	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
ECL Western Blot Detectionssystem	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Essigsäure	E. Merck AG, Darmstadt

Ethanol (EtOH)	E. Merck AG, Darmstadt
Ethidiumbromide (EtBr)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetate (EDTA)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Farblösung für Proteinassay nach Bradford	Biorad, München
Formaldehyde	E. Merck AG, Darmstadt
Fötale Kälber Serum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Gelatine	E. Merck AG, Darmstadt
Gene Ruler™ 1kb DNA Leiter	MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon Rot
Glycerin	E. Merck AG, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HRP Streptavidin	Dako, Glostrup, Dänemark
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kaliumhydroxide (KHO)	E. Merck AG, Darmstadt
Kollagenase Type II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
LPS (E. coli 0111:B4 LPS)	Invivo Gen, San Diego, USA
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium Azide (NaN ₃)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphate (NaH ₂ PO ₄)	E. Merck AG, Darmstadt
Natrium-dodecylsulfate (SDS) ultra pure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	E. Merck AG, Darmstadt
Natriumhydroxide	E. Merck AG, Darmstadt
Nonidet P 40	Fluka, Buchs, Schweiz
OCT Einbettmedium	Sakura Finetek, Zoeterwonde, NL
Paraformaldehyd (PFA)	SERVA Elektrophorese GmbH, Heidelberg
PBS EDTA pH 7.5	Cambrex Bio Science, Verviers
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY

Pentobarbital (Narcoren)	Merial, Rohrdorf
Peroxidase Blockierungslösung	DAKO, Hamburg
Phosphate gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom KG, Berlin
Polyacralamid 40%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pufferlösung, pH 4.00	E. Merck AG, Darmstadt
Pufferlösung, pH 7.00	E. Merck AG, Darmstadt
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Roti®-ImmunoBlock	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
Salzsäure (HCL) 25%	E. Merck AG, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	E. Merck AG, Darmstadt
Sterofundin	Braun, Meisungen
Streptavidin-Cy2	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Cy3	Dianova, Hamburg
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-hydrochloride (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypan blue stain 0.4%	Gibco, Invitrogen Corp, Grand Island, NY
Trypsi - Inhibitor	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin / EDTA 0.05%	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Tween 20	E. Merck AG, Darmstadt
Vorgefärbte Kaleidoskope Standards	Biorad, München
Wasserstoffperoxyd	E. Merck AG, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrate	E. Merck AG, Darmstadt

2.1.2 Geräte, Hilfsmittel

Arpege 70, Stickstofftank	Air Liquide Deutschland, Düsseldorf
AxioCam MRc	Carl Zeiss GmbH, Jena
Biometra DOC Gelanalysierer	Biometra GmbH, Göttingen
Brutschrank 1, Binder CB210	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank 2, Cellstar	Nunc, Wiesbaden
Dispergiergerät Micra D1	ART Labortechnik, Müllheim
Elektrophorese System Mini-Protean	Biorad, München
ELISA- Lesegerät	Dynex Technologies, ChAntilly, VA
FACS Calibur	BD PharMingen, Heidelberg
Glasgeräte	Schott, Mainz
Kompaktschüttler KS 15A	Johanna Otto GmbH, Hechingen
Kühlschränke	Liebherr, Bosch
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwalbach
Mikroskop Axioskop 2 mot plus	Carl Zeiss GmbH, Jena
Mikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
Mikroskop Nikon TMS S3	Cambridge Scientific Products
OctoMACS Trenneinheit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PH-Meter	InoLab, Weilheim
Photometer	Biochrom, Berlin
Pipetten Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipettus	Hirschmann Laborgeräte
QuadroMACS Trenneinheit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Schweißgerät Futura Jr.	Audion Elektro, Weesp, NL
Stereo Mikroskop Stemi 200-C	Carl Zeiss GmbH, Jena
Stereo Mikroskop Stemi 200-C	Carl Zeiss GmbH, Jena
Strilbank 1 Holten Laminair 1.5	Thermo Fisher Scientific
Strilbank 2 Topsafe 1.5	Nunc GmbH Wiesbaden
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, gekühlt Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Transferkammer Trans Blot Cell	Biorad, München

Ultraschallbad Sonorex RK 510S
Vakumpumpe MINI VAC E1
Vortexer Reax Control
Waagen AE50, PM300
Wasserbad
Zellzähler CASY TT
Zentrifuge Megafuge 1.0R Sorvall
Zentrifuge Minifuge T

Bandelin Electronic, Berlin
PEQLAB Biotech, GmbH, Erlangen
Heidolph, Schwalbach
Mettler, Basel
Köttermann Uetze/Hänsingen
Schärfe System GmbH, Reutlingen
Heraeus Instruments, Hanau
Heraeus Instruments, Hanau

2.1.3 Gebrauchsmaterialien

Cellstar PP- Röhrchen 50ml, 15ml
ELISA- Plate PS Microplate 96 wells
FACS Röhrchen
Filme Biomax ML
Gefrier-Röhrchen
Glasplatten für Mini- Protean
Kamm für Elektrophorese
Kanülen, Sterican 0,45x12mm
Kapillarspitzen 200 µl
MACS LS Trennsäule
MACS MS Trennsäule
Magnetstäbchen
Mikroküvette Nr.1201
Mikroskopdeckgläschen
Nitocellulosemembran Protran
Parafilm
Petri Schale
Pinzette
Pipetten mit Spitze, steril
Pipettenspitzen, standard
Polysin beschichtete Objektträger

Greiner, Frickenhausen
Nunc, Wiesbaden
Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Kodak, Rochester, NY
Nunc, Wiesbaden
Biorad, München
Biorad, München
Braun, Melsungen
Biozym, Oldendorf
Miltenyi, Bergisch Gladbach
Miltenyi, Bergisch Gladbach
Roth, Karlsruhe
Ratiolab, Dreieich
Menzel Gläser, Braunschweig
Schleicher + Schuell, Dassel
American National Can, Chicago, IL
Nunc, Wiesbaden
FST, Heidelberg
Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf, Hamburg
Menzel, Braunschweig

Positiv geladene Objektträger	Menzel, Braunschweig
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenkassette Röntgen	Bender, Baden-Baden
Schere	FST, Heidelberg
Skalpelle, stril	Feather Safety Razor Co, Köln
Spatel	Merck, Darmstadt
Spritze, Injekta F 1ml	Braun, Melsungen
Spritze, Injekta F 10ml	Braun, Melsungen
Spritze, Omnican 1 ml	Braun, Melsungen
Sterilisationsfilter 22 µm	Millipore, Bedford, MA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, UK
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 24 wells	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 48 wells	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatte Cellstar TC-Plate 96 wells	Nunc, Wiesbaden
Zellsieb 40 µm Nylon	BD Falcon, Bedford, MA

2.1.4 Puffer

ELISA Lösungen und Puffer

Karbonat -Beschichtungs-Puffer	0.356 g Na ₂ CO ₃ + 0.84 g NaHCO ₃ ad 100ml Dest. Wasser. auf pH 9.5 einstellen
Phosphat -Beschichtungs-Puffer	1.18 g Na ₂ HPO ₄ + 1.61 g NaH ₂ PO ₄ ad 100ml Aqua dest. auf pH 6.5 einstellen
Stop Lösung	28ml H ₂ SO ₄ (97%) ad 500ml Dest. Wasser
Substratpuffer	6.3g Citronensäure-Monohydrat ad 1000ml Dest. Wasser, pH 4,1 mit 4N KOH einstellen
TMB-Lösung	120 mg drei,3'5,5'- Tetramethylbenzidin in 2.5ml Aceton gelöst 22.5ml Ethanol abs. + 150µl

Waschpuffer
H₂O₂ 30%
0.05% Tween 20 in PBS

2.1.5 FACS Lösungen

FACS-Puffer
PFA 4%
1x PBS, 5% FCS, 0.1% NaN₃
40 g Paraformaldehyd ad 800ml PBS,
pH 7.0-7.4 einstellen über Nacht bei
60°C lösen, auf RT abkühlen lassen
und ad 1l PBS auffüllen

Saponin-Puffer
0.5% Saponin, 0.5% FCS 0.1% NaN₃
in PBS

2.1.6 Weitere Puffer und Lösungen

ACK-Lyse Puffer
8.29 g NH₄Cl, 1.0 g KHCO₃, 0.367 g
Na₂EDTA an 1l H₂O, einstellen mit
NaOH auf 7 pH 2-7.4

Avertin
1 g 2-2-2 Tribromoethanol in 1ml tetra-
amyl Alkohol lösen, ad 40ml steriles
PBS

Beschichtungspuffer für CD4+ T-Zellen
NaHCO₃, pH 8.2

Blockierungslösung für Western blot
5 % Magermilchpulver in PBS/0.05%
Tween 20

MACS-Puffer
2 % FCS in PBS 4mM EDTA entgasen

Narcoren[®] Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium
Firma: Merial, Hallbergmoos,
1 Teil mit 3 Teil PBS vermischen

TAE Puffer (50X):
eine Lösung von 2 M Tris-Base und
0.05 M EDTA wird mit Essigsäure auf
pH 8.0 eingestellt, erhitzen zum

Willi Puffer (Ohrbiopsie)	Auflösen 100 mM Tris pH 8.5; 200 mM NaCl; 10 mM EDTA, 0.2% SDS
Zellkulturmedium:	5 % bzw. 10% FCS in RPMI- Medium, 1 % Penicillin/Streptomycin
Zitrat-Puffer	2,941 g Tri-Na-Zitrat-dihydrat ad 1000ml Dest. Wasser pH 6.0

2.1.7 Gebrauchsfertige Kits

CD25 Microbeads Kit:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD4 Microbeads Kit:	Miltenyi, Bergisch Gladbach
GolgiStop Protein Transport Inhibitor Kit	BD Biosciences Pharmingen
IL-17 ELISA mouse Kit (DuoSet®)	R&D Systems, Wiesbaden
Maus IFN γ ELISA Set (BD OptEIA TM)	BD Biosciences Pharmingen
Maus TNF α ELISA Set (BD OptEIA TM)	BD Biosciences Pharmingen
Rnasy Micro und Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden
TSA [®] Thyramid Signal Amplification konjugiert mit Cy3 oder FITC	Elmer&Perkin, Rodgau-Jügesheim

2.1.8 Antikörper

CD28	BD Biosciences Pharmingen
CD3 ϵ (Zellkultur)	BD Biosciences Pharmingen
CD3 (IHC)	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
CD4 (H129.9)	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) FITC	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD4 (L3T4) APC	BD Biosciences Pharmingen

CD8 (Ly-2) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD8 (Ly-2) APC	BD Biosciences Pharmingen
CD25 PE-Cy5.5	Caltag Invitrogen GmbH
CD44 (Pgp-1, Ly-24) PE-Cy5.5	BD Biosciences Pharmingen
CD49b (DX5) FITC	BD Biosciences Pharmingen
CD 62L (MEL-14) PE Cy 5.5	eBioscience
CD69 (H1.2F3) FITC	BD Biosciences Pharmingen
CD69 (H1.2F3) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD122 (TB b1) PE	BD Biosciences Pharmingen
CD127 (A7R34) PE Cy 5.5	eBioscience
FOXP3 (FJK-16a) APC	eBioscience
FOXP3	eBioscience
GITR (DTA-1)	Prof. S. Sakaguchi, Prof. E. Schmitt
ISO IgG2a (KLH) FITC	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2b (eB149/10H5) FITC	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2a (KLH) PE	BD Biosciences Pharmingen
ISO IgG2b (eB149/10H5) PE	BD Biosciences Pharmingen
IFN γ (XMG1.2) FITC, PE	BD Biosciences Pharmingen
IFN γ (XMG1.2)	Prof. E. Schmitt
IL-17A (in vivo)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-17A (IHC)	Santa Cruz Biotechnology
IL-17A (WB)	eBioscience
IL-17RA PE, FITC	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-17RA	Santa Cruz Biotechnology
IL-4 (11B11)	Prof. E. Schmitt
ROR γ t (poly6362)	Biolegend
TTF1 (Thyroid Transcription factor 1)	Santa Cruz Biotechnology

2.1.9 Rekombinante Proteine und siRNA

IL-17F (<i>in vivo</i>) Carrier free	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-17A (<i>in vivo</i>) Carrier free	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
TGF β ₁ , human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
siRNA IL-17A	Qiagen, Hilden Kat.Nr.1648327 HP GenomeWide siRNA 1027400, Targe Sequenz: CAA GAT AGC TTT GAA GCG TAA

2.2 Methoden

2.2.1 Humane Population

Lungenstücke wurden von den routinemäßig operativen pathologischen Entnahmen in einer anonymen Art

1. aus der Tumorbank der Pathologie der Johannes Gutenberg Universitätsklinikum Mainz im Rahmen des SFB 432 Programms – unterstützt von der Deutschen Forschung Gesellschaft - und
2. aus der Tumorbank der Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne in der Schweiz – in enger Zusammenarbeit mit Professor H.A. Lehr zur Verfügung gestellt.

Die Demographie der Patienten, inbegriffen der TNM Klassifikation und die Diagnose wurden in der **Tabelle 2.1.** und **Tabelle 2.2.** dargestellt. Die Studie wurde mit der

Genehmigung der Ethik Komitee Rheinland-Pfalz, CHUV und Richtlinien der SAMW (Swiss Academy of Medical Research) durchgeführt.

Tabelle 2.1. Humane Subjekte für RNA-Expressionsanalyse

N	Patient	Zelltyp	Grad^A	T^B	N^C	M^D
1	13 B ^F	Gesund	-	-	-	-
2	15 B ^F	Gesund	-	-	-	-
3	20 B ^F	Gesund	-	-	-	-
4	21 B ^F	Gesund	-	-	-	-
5	24 B ^F	Gesund	-	-	-	-
6	Kontroll 1 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
7	Kontroll 2 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
8	Kontroll 3 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
9	Kontroll 4 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
10	Kontroll 5 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
11	Kontroll 6 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
12	Kontroll 7 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
13	Kontroll 8 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
14	Kontroll 9 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
15	Kontroll 10 ^E	Normale Lungengewebe	-	-	-	-
16	Lungenkarzinom 3 ^E	Adenokarzinom	G II	1	0	X
17	Lungenkarzinom 4 ^E	Adenokarzinom	G II	2	2	X
18	Lungenkarzinom 8 ^E	Adenokarzinom	G II	1	2	X
19	Lungenkarzinom 11 ^E	Adenokarzinom	G II	2	0	X
20	Lungenkarzinom 18 ^E	Adenokarzinom	G II	1	0	X
21	Lungenkarzinom 20 ^E	Adenokarzinom	G II	2	2	X
22	Lungenkarzinom 21 ^E	Adenokarzinom	G II	1	1	X
23	10 B ^F	Adenokarzinom	G II			
24	11 B ^F	Adenokarzinom	G II			
225	Lungenkarzinom 1 ^E	Adenokarzinom	G II-III	3	2	X
26	Lungenkarzinom 7 ^E	Adenokarzinom	G II-III	3	2	X
27	Lungenkarzinom 15 ^E	Adenokarzinom	G II-III	2	0	X
28	Lungenkarzinom 16 ^E	Adenokarzinom	G II-III	1	2	X
29	Lungenkarzinom 17 ^E	Adenokarzinom	G II-III	2	1	X
30	Lungenkarzinom 22 ^E	Adenokarzinom	G II-III	2	1	X
31	Lungenkarzinom 23 ^E	Adenokarzinom	G II-III	2	2	X

A = G ; Grad; Pathologisches System, welches zur Klassifizierung neoplastischer Gewebe dient, welches mikroskopisch von fachkundigem Pathologen aufgestellt wird

B = T ; (1-4): Größe des primären Tumors

C = N ; (0-3): Grad der Streuung zum Lymphknoten

D = M ; (0/1): Vorhandensein von Metastasen

E = Tumorbank (SFB432) Dr. Michael Koslowski: Institut Onkologie und Hämatologie, III. Medizinische Klinik, Universität Mainz

F = Tumorbank Prof. Hans-Anton Lehr: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Schweiz

Tabelle 2.2. Humane Subjekte für Proteinexpressionsanalyse mittels Immunohistochemischer Färbung und Western Blot Analyse

N	Patient	Zelltyp	Grad^A
1	1 A ^B	Gesund	-
2	3 A ^B	Gesund	-
3	4 A ^B	Gesund	-
4	5 A ^B	Gesund	-
5	6 A ^B	Gesund	-
6	7 A ^B	Gesund	-
7	8 A ^B	Gesund	-
8	70116-01 no ^B	Normales Lungengewebe	-
9	70534-01 no ^B	Normales Lungengewebe	-
10	1 B ^B	Adenokarzinom	G I
11	11 B ^B	Adenokarzinom	G II
12	70279-01 tu ^B	Bronchial Adenokarzinom	G II
13	70555-01 tu ^B	Bronchio-alveolar Adenokarzinom	G II
14	5 B ^B	Adenokarzinom	G II-III
15	15 A ^B	Adenokarzinom	G II-III
16	21 A ^B	Adenokarzinom	G II-III
17	4 B ^B	Adenokarzinom	G III
18	8 B ^B	Adenokarzinom	G III
19	13 A ^B	Adenokarzinom	G III
20	23 A ^B	Adenokarzinom	G III
21	71870-01 tu ^B	Bronchial Adenokarzinom	G III

A = Grad; Pathologisches System, welches zur Klassifizierung neoplastischer Gewebe dient, welches mikroskopisch von fachkundigen Pathologen erstellt wurde.

B = Tumorbank Prof. Hans-Anton Lehr: Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Schweiz

2.2.2 Mäuse (*Mus musculus*)

BALB/cJ Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen in der Tierhaltung der Johannes Gutenberg Universitätsklinik Mainz gehalten. Die T-bet^(-/-) Mäuse stammen von Professor L.H. Glimcher, (Harvard Medical School, Boston). Die Mäuse wurden nach den Tierhaltungsgesetzen gepflegt und gehalten. Die Tiere verblieben bis zum Tag des Experimentes in der Tierhaltung, dort wurde ihnen die Tumor-Zelllinie und der Antikörper bzw. das rekombinantes Protein verabreicht.

Alle Tierexperimente wurden von dem Ethischen Komitee Rheinland-Pfalz (Mainz) genehmigt.

2.2.2.1 Behandlung der Mäuse

Intraperitoneale Applikation in Mäuse: intraperitoneal bedeutet „in die Bauchhöhle“.

Diese Applikationsform wurde verwendet, um das Narkotikum in die Mäuse zu verabreichen. Dafür wurde die Maus am Nacken und an den Hinterläufen in einer Hand fixiert und in die Bauchhöhle 200µl Narkotikum (Narcoren) gespritzt.

Intranasale Applikation in Mäuse: *intranasal* bedeutet wortwörtlich „in die Nase“.

Intranasale Applikation ist eine oft verwendete Methode bei der Antikörperverabreichung, wenn der Antikörper lokal in der Lunge wirken sollte. Da sich die Mäuse freiwillig nicht dieser Applikation hingeben, ist es notwendig, sie vorher zu narkotisieren. Die Narkotisierung wurde mit intraperitonealer Applikation von Pentobarbital (Narcoren) durchgeführt. Nach der erfolgreichen Narkotisierung bekamen die Mäuse 50µl in PBS gelösten Antikörper mithilfe von einer Pipette auf die Nase getropft. Die Flüssigkeit wurde während der Atmung eingeatmet.

Intravenöse Applikation in Mäuse: *intravenös* bedeutet in die Vene. Die Schwanzvene einer Maus eignet sich am besten für diese Applikationstechnik. Die Maus wird in einen Injektionskäfig gezogen und die Tumor-Zelllinie (in 200µl RPMI Medium aufgenommen) in die Schwanzvene injiziert.

Um die Rolle von IL-17A und F zu untersuchen wurden verschiedene experimentelle Designs durchgeführt.

Experimentelles Design 1: Grundmodell für Lungen-Adenokarzinom in Maus

Gruppe 1: BALB/cJ Mäuse ohne jegliche Behandlung

Gruppe 2: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom

Der Tumor wird in der Lunge mittels Injektion von 2×10^5 Line ein alveolar cell carcinoma (L1C2) Zellen in die Mausschwanzvene (intravenously oder deutsch intravenös = i.v.) verabreicht (**Abbildung 2.1.**), dieser Tag zählt als Tag 0. Die Tiere wurden am Tag 21 getötet und Lungen wurden analysiert.



Abbildung 2.1. Experimentelles Design von dem Grundmodell für Lungen-Adenokarzinom in Maus.

BALB/cJ Mäuse wurden am Tag 0 intravenöse mit 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen injiziert. Am Tag 21 wurden die Lungen der Mäuse entnommen und analysiert.

Experimentelles Design 2: Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom mit lokaler Applikation von IL-17F und A Zytokin

Gruppe 1: BALB/cJ Mäuse ohne jegliche Behandlung

Gruppe 2: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom

Gruppe 3: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom mit intranasaler (= lokale) Applikation von 250 ng IL-17F Zytokin (siehe 2.1.9.) am Tag minus ein und Tag 4 / oder Applikation von 250 ng IL-17A Zytokin am Tag 5 und 8.

Gruppe 4: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom mit intranasaler (= lokale) Applikation von 250 ng IL-17F Zytokin am Tag 8 und Tag 11.

Gruppen 2-4 wurden i.v. mit 2×10^5 L1C2 Zellen am Tag 0 injiziert. IL-17F wurde Herstelleranweisungen gemäß rekonstituiert und in -80 °C gelagert. IL-17F Zytokin wurde in $50\mu\text{l}$ sterilem PBS intranasal (= i.n.) in unter Betäubung befindenden Tieren mithilfe von einer $100\mu\text{l}$ Pipette langsam auf die Nase getropft. Gruppe 3 bekam am Tag minus ein und 4 und Gruppe 4 am Tag 8 und 11 die IL-17F Zytokine. Am Tag 21 endet das Protokoll (**Abbildung 2.2.**) und die Tiere wurden mit i.p. verabreichte $200\mu\text{l}$ Narcoren Lösung (1:4 in PBS) abgetötet und die Lungen wurden entfernt.

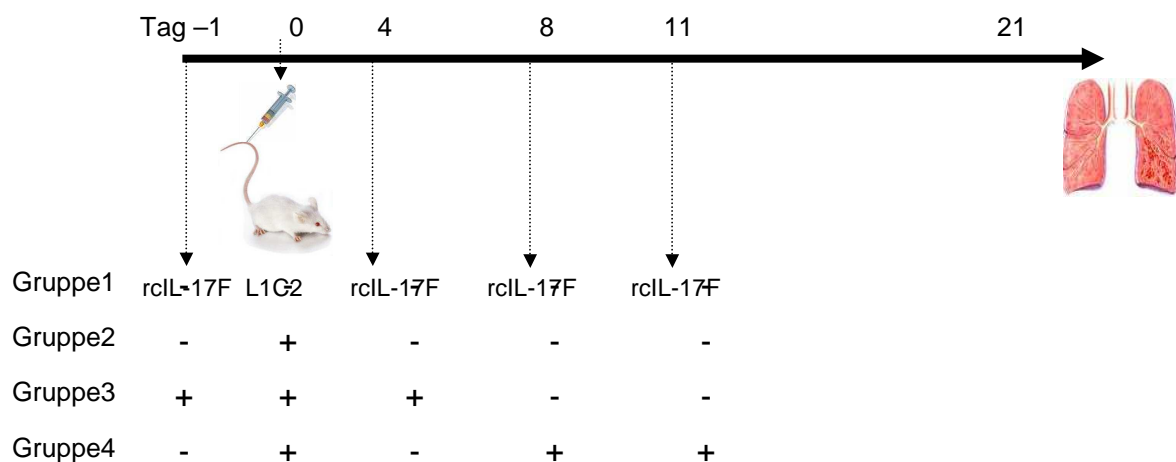


Abbildung 2.2. Experimentelles Design 2: Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom mit lokaler Applikation von IL-17F Zytokin.

In BALB/cJ Mäuse wurden am Tag 0 intravenös 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen injiziert. Gruppe1: unbehandelte Mäuse, Gruppe2: L1C2 gespritzte Mäuse, Gruppe3: L1C2 gespritzte Mäuse + rekombinantes IL-17F Zytokin intranasal verabreicht am Tag minus ein und vier, Gruppe4: L1C2 gespritzte Mäuse + rekombinantes IL-17F Zytokin intranasal appliziert am Tag 8 und 11. Am Tag 21 wurden die Lungen der Mäuse entnommen und analysiert.

Experimentelles Design 3: Maus Modell für Lungen-Adenokarzinom mit lokaler Verabreichung von Anti-IL-17A Antikörper

Gruppe 1: BALB/cJ Mäuse ohne jegliche Behandlung

Gruppe 2: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom

Gruppe 3: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom mit intranasaler (= lokale) Applikation von $3\mu\text{g}$ je Behandlung IL-17A Antikörper am Tag 5 und Tag 8.

Gruppe 4: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom mit intranasaler (= lokale) Applikation von 3µg je Behandlung IL-17A Antikörper / 6 µg IL-17 A Antikörper / 3 µg IgG / 6 µg IgG am Tag 8 und Tag 11.

Gruppe 5: BALB/cJ Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom mit intravenöse (= systemisch) Applikation von 500µg Anti-Glucocorticoid-induced tumor necrosisfactor family-related protein (GITR) Antikörper am Tag 8.

Der Verlauf des Experimentes entspricht dem experimentellen Design 2.

Anti-IL-17A Antikörper wurden nach dem Erhalten Herstellervorschriften gemäß rekonstituiert, aliquotiert und in $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor Gebrauch wurde entsprechende Menge Antikörper in sterilem PBS aufgenommen und 3 µg (in 50µl) intranasal in die Tiere verabreicht. Gruppe 3 erhielt am Tag 5 und 8 und die Gruppe 4 am Tag 8 und 11 je 3 µg Antikörper per Behandlung oder entsprechende Menge IgG. Die Gruppe 5 wurde nicht in allen Versuchen durchgeführt. Dieses experimentelle Modell wurde mit T-bet defizienten Mäusen auch wiederholt, d.h. mit Wildtyp BALB/cJ und T-bet KO Mäusen.

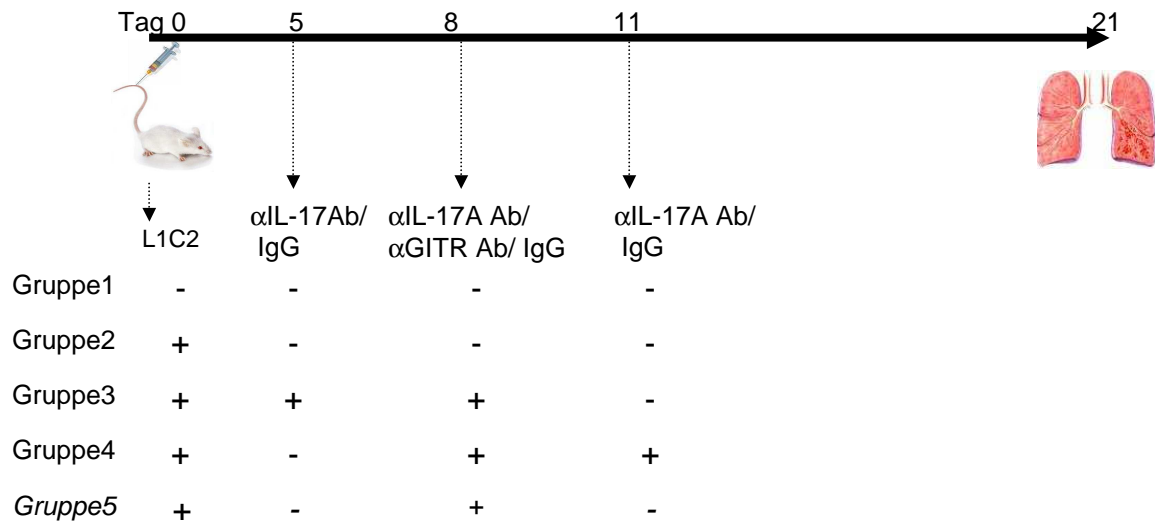


Abbildung 2.3. Experimentelles Design3: Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom mit lokaler Applikation von Anti-IL-17A Antikörper.

In BALB/cJ Mäuse wurden am Tag 0 intravenös 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen injiziert. Gruppe 1: unbehandelte Mäuse, Gruppe 2: L1C2 gespritzte Mäuse, Gruppe3: L1C2 gespritzte Mäuse + Anti-IL-17A Ab intranasal appliziert am Tag 5 und 8, Gruppe4: L1C2 gespritzte Mäuse + Anti-IL-17A Ab intranasal appliziert am Tag 8 und 11. Gruppe5: L1C2 gespritzte Mäuse + Anti-GITR Ab (500 μ g) intravenös appliziert am Tag 8. Am Tag 21 wurden die Lungen der Mäuse entnommen und analysiert.

2.2.2.2 Organentnahme

Die Versuchstiere wurden entweder durch zervikale Dislokation oder durch eine Überdosis von Narcoren (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium, siehe 2.1.6) getötet. Vor dem Öffnen des Thoraxes wurde der Brustkorb mit 70% EtOH benetzt. Die Eröffnung wurde mit einer sterilen chirurgischen Schere und Pinzette durchgeführt. Die Flügel der Lunge wurden je nach Vorhaben des Versuches aufgeteilt: ein Teil wurde in 10% -iger Formalinlösung gelegt, ein kleineres Teil in ein Cryotube und direkt anschließend in Flüssigstickstoff und die restlichen Lungenflügel ins 4 °C kühle Medium (versehen mit ein % Penicillin/Streptomycin) transferiert.

Für die Entnahme der Milz wurde ein seitlicher Schnitt versehen und mit einer Pinzette herauspräpariert. Diese wurde auch ins vorgekühlte Medium transferiert.

2.2.2.3 Bestimmung der Tumormasse

Zur Bestimmung der Tumormasse ist eine Hematoxilin-Eosin-Färbung notwendig. Eine Zusammenarbeit mit Professor H.A. Lehr (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Schweiz) hat es ermöglicht, die für Histologie bestimmten Lungen aufzubereiten. Die Lungen wurden mindestens 16 Stunden lang in Formalinlösung fixiert, anschließend in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden in ca. 3-5 µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden anschließend gemäß Standardverfahren gefärbt. Zur Bestimmung der Tumormasse in der Lunge ist die Hematoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) geeignet, um die Übersichtsfärbung für basophile Zell- und Gewebestrukturen und um Zellwucherungen sichtbar zu machen.

Zur Auswertung der Tumormasse wurden von jeder Lunge ein 300 Mikrometer dickes Stück in 3-5µm Scheiben geschnitten und die Scheiben mit dem maximalen Tumor Areal wurden quantifiziert. Hierfür wurde Photoshop-assisted image analysis (Adobe systems Inc. version 7.0) verwendet.

2.2.3 Tumor Zelllinie

L1C2 (Line one alveolar cell carcinoma) Adenokarzinom Zelllinie wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit von Dr. R. Wiewrodt (Pulmonary Division, III. Med. Klinik, Mainz) aber ursprünglich von Prof. SM. Dubinett (Center for Health Sciences, Los Angeles) bezogen. Die Zellen wurden in mit 5-10%igem FCS und 1%-igen Penicillin/Streptavidin angereichertem RPMI 1640 Zellkulturmedium kultiviert (123). Diese Zellen wurden auf Mycoplasmen und andere infektiöse Agenten getestet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ Luftgehalt. Da die Zellen adherent sind, die Zellen wurden die Zellen mithilfe von Accutase von dem Zellkulturflaschenboden gelöst und in RPMI 1640 Medium ohne Zusatzstoffe so aufgenommen, dass es eine Dichte von einer Million per Milliliter hat.

2.2.4 Gesamtzellisolation

Nach der Organentnahme wurden die Lungen (124) unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale mit Skalpell zerkleinert und in die Kollagenaselösung überführt plus bei 37°C unter leichten Schüttelbewegungen inkubiert. Da die Zellen in dem Lungengewebe durch Kollagenfaser zusammengehalten wurden ist ein Kollagenaseverdau notwendig. Die Verdauung setzt sich aus 300 U/ml Kollagenase Typ2 (siehe 2.1.1) und 150µl Dnase I (10mg/ml, 0.01(w/v)%) in 10ml PBS zusammen. Nach der Kollagenaseverdau wurden die Gewebestücke auf ein Zellsieb (40 µm Porengröße) transferiert und mit dem Stempel einer 1ml-Spritze durchgedrückt. Hierbei wird das Sieb mit ca. 5ml RPMI Medium gespült, um restliche Zellen von dem Sieb zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C 1500 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in einer ACK-Lyse Lösung für 1-5 Minuten aufgenommen, um die Erythrozyten aufzuplatzen. Die Zellen wurden mit 10ml PBS gewaschen und anschließend in 10ml MACS-Puffer aufgenommen und mit einem CASY-Zellzählgerät die Zellzahl bestimmt.

Die Isolation der Gesamtzellen aus der Milz unterscheidet sich von der Lungenzellisolation nur dadurch, dass es kein Kollagenaseverdau durchgeführt wurde. Die Milz wurde nach der Entnahme sofort auf Zellsieb transferiert und durchgedrückt.

Nach der Gesamtzellisolation ergaben sich weitere Analysemöglichkeiten:

- FACS Messung wurde durchgeführt
- CD4+ T-Zellen wurden isoliert
- Lungenzellen wurden für Zytokinproduktion ausplattiert.

2.2.5 Lungen CD4+ T-Zellisolation

Die Isolation der CD4+ T-Zellen (124) erfolgte mittels magnetischer Zellseparierung der Firma Miltenyi (**Abbildung 2.4.**). Im Prinzip werden die CD4+ T-Zellen mit einer gegen CD4 gerichteten Eisenpartikel gekoppeltem Partikel (Bead) selektiert und anschließend durch ein magnetisches Feld separiert. Zellen, an welche keine

magnetische Partikeln angehängt wurden, können ohne Hinderung durch das magnetische Feld gespült werden im Gegensatz zu den CD4+ T-Zellen, welche in dem Feld festgehalten wurden und nach dem Entfernen von dem Magnet eluiert wurden. Das ist eine positive Zellseparation.

Die Zellen wurden in MACS- Puffer in einer Konzentration von 10^7 Zellen pro 900 μ l MACS- Puffer aufgenommen. Die Beads wurden in der Konzentration von 10 μ l pro 1×10^7 Zellen zugesetzt. Die Inkubationszeit beträgt 15 Minuten bei 4 °C, und wurde mit 1-2ml MACS- Puffer abgestoppt. In der Zwischenzeit wurden die MACS- Säulen mit MACS- Puffer (MS- Säulen 500 μ l, LS- Säulen 3 ml; MS- Säulen wurden für Lungenzellen verwendet und LS- Säulen für Milzzellen verwendet) in einem MACS- Separator (Magnetständer) äquilibriert. Nach dem Abzentrifugieren der mit Beads beladenen Zellen (10 Minuten bei 1200 rpm) wurden diese in entsprechender Menge in MACS- Puffer resuspendiert und auf die Säulen pipettiert. Anschließend wurden sie dreimal mit MACS- Puffer (MS- Säulen 1ml, LS- Säulen 3 ml) gewaschen und nach Entnahme von dem Magnetfeld mit 1 oder 3ml MACS- Puffer durch schnelles und kraftvolles Herunterdrücken des Kolbens herausgespült. Das hier entstandene Eluat beinhaltet die Positivfraktion.

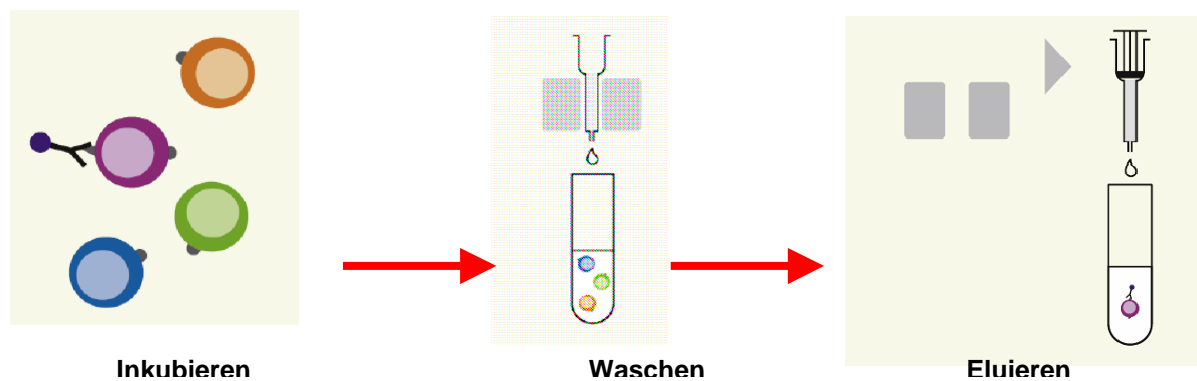


Abbildung 2.4. Schematischer Aufbau der Zellisolation mit MACS® System

Die isolierten Zellen wurden mit magnetischen Beads inkubiert und mit Hilfe eines MACS- Separators in der mit Eisenpartikel beladenen Säule zurückgehalten. Nach wiederholtem Waschen der gebundenen Zellen, wurden diese durch kraftvolles Herausspülen mit Hilfe eines Kolbens aus der Säule eluiert Quelle: (125).

2.2.6 Zellkultivierung

Die isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden in angereichertem RPMI 1640 Medium bei 37°C bei 5 % CO₂ Gehalt für 24 Stunden inkubiert und Zellüberstände wurden anschließend gesammelt und für Zytokinbestimmung mittels ELISA verwendet.

Da die CD4⁺ T-Zellen *ex vivo* kaum Zytokine sekretieren, die Zellkulturplatten wurden vorher mit Anti-CD3 Antikörper beschichtet (2-5µg/ml verdünnt in coating Puffer, 1 h 37°C). Die Anti-CD3 Antikörper aktivieren den T-Zell-Rezeptor, die zum Weiterleben der Zellen benötigt wird. Zur Erzielung einer verbesserten Aktivierung der T-Zellen wurden noch zusätzlich Anti-CD28 Antikörper in Zellkulturmedium in 1-2 µg/ml zugesetzt. Hierbei handelte es sich um eine Vortäuschung für die Oberflächenglykoproteine B7-1/B7-2, welche wiederum eine zusätzliche Zellstimulation hervorruft.

2.2.7 Th17 Differenzierung

Für die Th17 Differenzierung wurden Milz CD4⁺ T-Zellen verwendet. Wie schon geschildert, die Zellkulturplatte wurde mit 2µg/ml Anti-CD3 Antikörper beschichtet und in ein spezielles Th17 Differenzierungsmedium für 5 Tage kultiviert. Dieses Medium enthält 2µg/ml Anti-CD28, 3ng TGF-β, 20ng/ml IL-6, 10µg/ml Anti-IL-4 Antikörper und 10µg/ml Anti-IFNγ versehenes RPMI 1640 Vollmedium. Am dritten Tag wurden die Zellen gesplittet und mit 25 Units IL-2 Zytokin und 1µg Anti-CD28 Antikörper /ml Medium für weitere 2 Tage kultiviert. Am Ende des Protokolls wurden Überstände gesammelt und mittels ELISA gemessen und die Zellen eventuell in einer Neutralisationsverfahren mittels siRNA zu IL-17A weiterverwendet.

2.2.8 Nukleofektion mit siRNA

Synthetische siRNA (siehe 2.1.9) zu IL-17A wurde von Qiagen käuflich erworben und Herstellervorschriften gemäß vorbereitet. Von der Milz isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden am Tag 5 der Th17 Differenzierungsprotokoll (siehe oben) mit der siRNA transferiert und am Tag 6 RNA von den Zellen extrahiert (**Abbildung 2.5.**). Überstände wurden zur Bestimmung der Zytokinproduktion (IFN γ und IL-17) mittels ELISA verwendet.

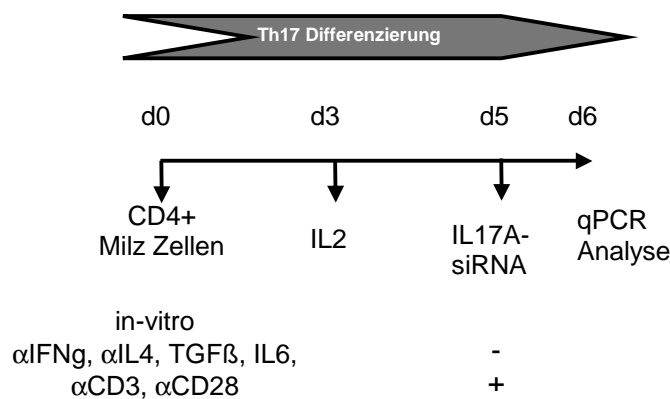


Abbildung 2.5. Protokoll für Th17 Differenzierung mit anschließender Nukleofektion mit IL-17A-siRNA.

CD4⁺ T-Zellen wurden aus Milz isoliert und mit anti-IFN γ , anti-IL-4, anti-CD3, anti-CD28 Antikörpern und TGF β 1, IL-6 5 Tage lang stimuliert. Am dritten Tag wurden die Zellen geteilt und IL-2 plus Anti-CD28 Ab dazugegeben. Am fünften Tag werden die bereits differenzierten Th17-Zellen mit IL-17A-siRNA behandelt und am sechsten Tag die IFN γ - und IL17A- mRNA-Expression analysiert.

2.2.9 *In vitro* Neutralisierung des IL-17A

CD4⁺ T-Zellen wurden aus der Lunge der 4 Gruppen Mäuse isoliert. Gruppe (1) und (2) unbehandelte Mäuse, Gruppe (3) und (4) wurden am Tag 6 L1C2 intravenös gespritzt (**Abbildung 2.6.**). Anschließend wurden die CD4⁺ T-Zellen in dem

Vollmedium, welches mit 5µg/ml Anti-IL-17A Antikörper (Gruppe (1) und (3)) oder IgG (Gruppe (2) und (4)) und mit 25 Unit IL-2 angesetzt wurde, für 3 Tage *in vitro* kultiviert. Am Tag 9 wurden Überstände gesammelt und IFN γ Produktion mittels ELISA bestimmt.

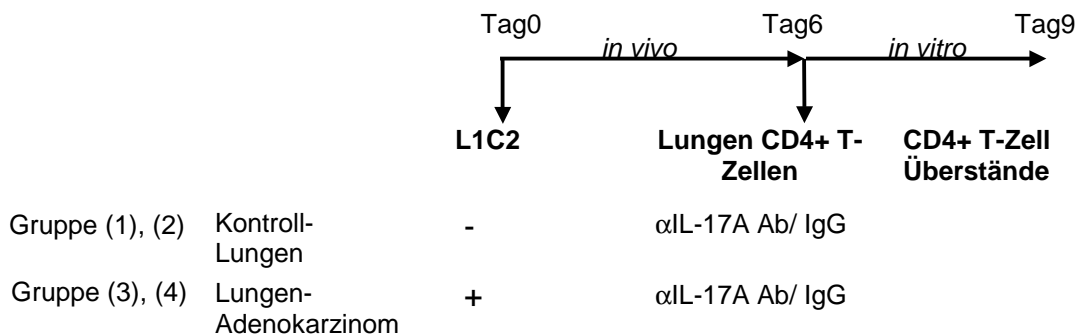


Abbildung 2.6. Experimentelles Design von der IL-17A-Neutralisation mit Anti-IL-17A Antikörper in Lungenzellen.

CD4+ Lungenzellen wurden aus BALB/cJ Mäusen (mit oder ohne L1C2 injiziert für 6 Tage) isoliert und am Tag 6 mit 5µg/ml Anti-IL-17A Antikörper *in vitro* für 3 Tage kultiviert. Am Tag 9 wurden die Zellüberstände bei ELISA für IFN γ analysiert.

2.2.10 Immunohistochemischer Nachweis

Die humanen Lungenschnitte wurden von der Pathologie der Johannes Gutenberg-Universitätskliniken zur Verfügung gestellt (Formalin fixiert und 4µm dick geschnitten und auf positiv geladene Objektträger aufgezogen). Die Schnitte wurden nach der Entparaffinierung (3x10 Minuten Xylol, 5 Minuten 100% Ethanol, 2x5 Minuten 96% Ethanol, 5 Minuten 70% Ethanol, 5 Minuten H₂O) für 30 bis 40 Minuten in Citratpuffer (pH 6.0) auf 95-100°C bearbeitet. Dieser Schritt di ente der Antigendemaskierung. Anschließend wurden die folgenden Blocking-Schritte durchgeführt:

- 20 Minuten Peroxidase Blocking
- Biotin / Avidin Blocking je 15 Minuten
- Protein Blocking 15 Minuten mit Roti-Bock®

Die Erst-Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht auf 4°C. Die **Tabelle 2.3.** fasst die Verdünnung sowie die Art des Wirtes der Erst-Antikörper zusammen.

Tabelle 2.3. Zur immunhistochemischen Färbung verwendete Antikörper.

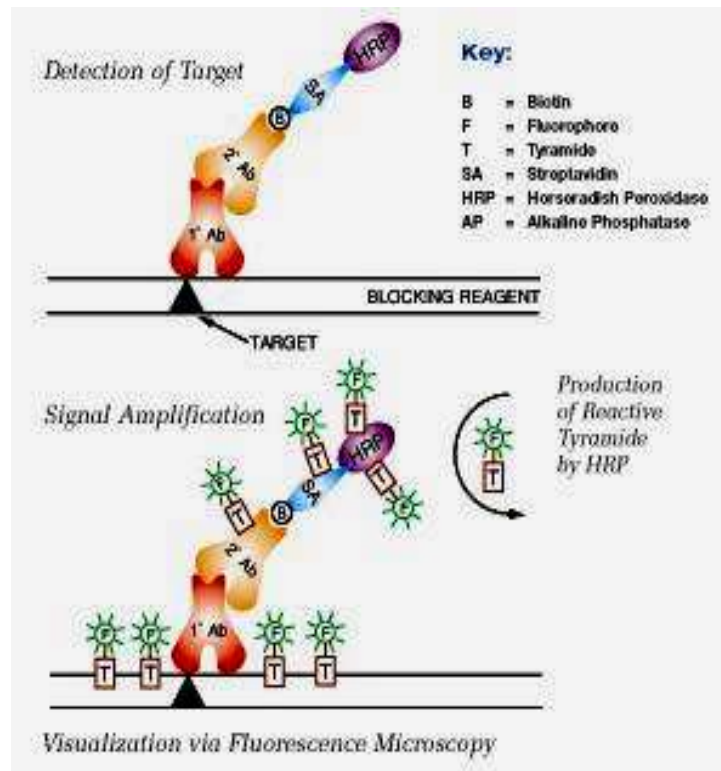
Nr.	Name	Verdünnung	Hostspezies
1.	Anti-IL-17A	1:300	Kaninchen
2.	Anti-IL-17RA	1:300	Kaninchen
3.	Anti-TTF1	1:250	Maus
4.	Anti-FOXP3	1:40	Maus

TTF1= Thyroid Transkriptionsfaktor 1

Am nächsten Tag wurden die Objektträger nach dreimaligem Waschen mit Tris-Puffer-Tween 20 (0.5% TBST) mit den biotinylierten sekundären Antikörper für 30-45 Minuten inkubiert. Danach wurden Thyramid Signal Amplifikation Kit zwecks Signalverstärkung verwendet (**Abbildung 2.7.**). Die Antigengebundenen Signale wurden mit Fluoreszenz Mikroskop (Axioscop mot plus, Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland) mit 100 oder 400 Vergrößerung visualisiert

Abbildung 2.7. Thyramid Signal Amplifikation (TSA) von Perkin&Elmer.

Das TSA System besteht aus diversen Schritten: Erst-AK-Inkubation über Nacht bei 4 °C; folgt die Zweit-AK-Biotinyliert Inkubation; Streptavidin- HRP Inkubation danach die Zugabe vom Thyramid-Cy3 Molekül. Das HRP-Enzym reagiert mit dem Thyramid. Die Signale werden dadurch verstärkt.



2.2.11 FACS

FACS (=fluorescence activated cell sorting) wird häufig als Synonym zu Durchflusszytometrie verwendet. Die Durchflusszytometrie (FACS) ist eine der bedeutendsten Arbeitstechniken in der immunologischen Arbeit.

Das Prinzip der FACS Methode beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese von einem Laserstrahl getroffen werden. Hierbei werden die Zellen in einer Lösung durch eine Kapillare gesaugt und im Sensormodul einzeln durch ein Laserstrahl bestrahlt. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, das mittels Detektoren nachgewiesen werden kann. Die zurückgestrahlte Lichtmenge korreliert mit der Größe der Zelle und mit der Oberflächenbeschaffenheit. Zum Beispiel streuen Granulozyten, die eine raue Oberfläche haben deutlich mehr Licht als eine sehr glatte T-Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird.

Oberflächenfärbung

Für eine Oberflächenfärbung wurden ca. 750'000 Gesamtzellen benötigt. Die Zellen wurden in 2ml PBS gewaschen und abzentrifugiert bei 1500 rpm 5 Minuten und in der Farblösung aufgenommen. Hierbei handelt es sich um einen Mix mit den erwünschten FACS- Antikörper in PBS gelöst. Die Inkubation wird 30 Minuten bei 4 °C durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 200-700µl PBS gewaschen und die Zellen wurden in 200µl PBS aufgenommen. Da die Fluorophore gekoppelte Antikörper ihre Erregbarkeit nach gewisse Lichteinfall verlieren, wurden die Zellen bis zur Messung in Dunkeln und kühl aufbewahrt.

Intrazelluläre Färbung

Für eine intrazelluläre Färbung wurden ein bis 2 Millionen Gesamtzellen verwendet. Für intrazelluläre Zytokinfärbung (z.B. IL-17) wurden die Zellen vorher über Nacht mit Anti-CD3 Antikörper (5µg/ml) und Anti-CD28 Antikörper (2µg/ml) bei 37°C inkubiert und anschließend mit PMA (Phorbol Myristate Acetate), Ionomycin und Golgistop für 4 Stunden bei 37°C restimuliert. Die Zellen wurden aus den Vertiefungen (Wells) gewaschen. Transkriptionsfaktoren wurden nicht vor der intrazellulären Färbung stimuliert. Vor der intrazellulären Färbung wurde erst mal die Oberflächenfärbung durchgeführt. Dann wurden die Zellen in 2%iger PFA-Lösung für 30-45 Minuten fixiert und die Zellmembran mit einem 0.5%igem Saponin- Puffer permeabilisiert. Schließlich wurden die Zellen mit dem intrazellulären Antikörper in einer 0.1%igen Saponinlösung für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit der 0,1%igen Saponinlösung wurden die Zellen in PBS aufgenommen. Die ungefärbten Zellen sollten alle Prozedurschritte durchlaufen, um eine einwandfreie Einstellung zu erreichen.

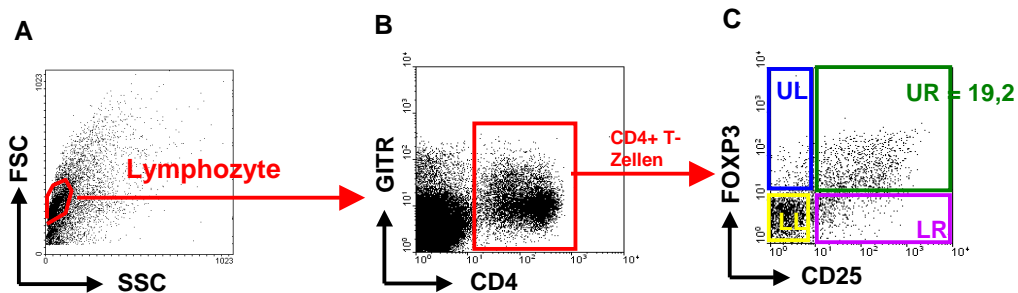


Abbildung 2.8. Vorgehensweise zur Auswertung der FACS-Rohdaten für die CD4+CD25+FOXP3+ dreifachpositiven regulatorischen T-Zellpopulation in der Lunge.

(A) Als Erstes werden die Lymphozyten in dem FSC/SSC Plot ausgewählt (roter Kreis). **(B)** So erscheinen im Plot B nur noch die CD4+ T-Zellen. Die CD4+ T-Zellen erscheinen im Plot nach ihrer Färbung nach CD4 und/oder GITR. Hier werden die CD4+ T-Zellen ausgewählt (roter Quadrant). **(C)** Im Plot C erscheinen so nur noch die CD4+ T-Zellen und werden nach ihrer Färbung folgendermaßen platziert: im Lower Left (=LL, gelb)-Feld sind CD4+ T-Zellen, die weder FOXP3 noch CD25 exprimieren; im Upper Left (=UL, blau)-Feld sind die CD4+ FOXP3+ aber CD25 negativen T-Zellen; im Lower Right (=LR, lila)-Feld erscheinen die CD4+ CD25+ aber FOXP3 negativen T-Zellen; im Upper Right (=UR, grün)-Feld erscheinen die CD4+CD25+FOXP3+ T-Zellen. Die letzteren Zellen bilden die gesuchte regulatorische T-Zellpopulation.

Am häufigsten wurden die regulatorischen T-Zellen in dieser Arbeit analysiert. Die Auswertung der Rohdaten geschieht in mehreren Etappen. Wie in **Abbildung 2.8.A.** dargestellt, werden die Lymphozyten zuerst in dem FSC/SSC Plot ausgewählt. So erscheinen im Plot B nur noch die CD4+ T-Zellen (**Abbildung 2.8.B**). Die CD4+ T-Zellen erscheinen im Plot nach ihrer Färbung nach CD4 und/oder GITR. Hier werden nur die CD4+ T-Zellen ausgewählt (roter Quadrant). Im Plot C (**Abbildung 2.8.C.**) erscheinen nur noch die CD4+ T-Zellen und werden nach ihrer Färbung folgendermaßen platziert: im Lower Left (=LL, gelb)-Feld sind CD4+ T-Zellen, die weder FOXP3 noch CD25 exprimieren; im Upper Left (=UL, blau)-Feld sind die CD4+ FOXP3+ aber CD25 **negativen** T-Zellen; im Lower Right (=LR, lila)-Feld erscheinen die CD4+ CD25+ aber FOXP3 **negativen** T-Zellen; im Upper Right (=UR, grün)-Feld erscheinen die CD4+CD25+FOXP3+ T-Zellen. Die letzteren Zellen bilden die gesuchte regulatorischen T-Zellpopulation, diese wird in Prozent angegeben und es muss auch angegeben werden, worauf sich die Prozente beziehen. Zum Beispiel die

regulatorischen T-Zellen wurden immer (in dieser Arbeit) auf die CD4+ T-Zellen bezogen. Dass heißt in dem Fall des obigen Beispiels, dass die Tregs von den CD4+ T-Zellen 19,2% ausmachen.

Proliferationsmessung

Die Proliferationsmessung mit CD4+ T-Zellen ist eine indirekte und einfache Methode, um die funktionelle Fähigkeiten der T-Zellen nachzuweisen.

CFSE besteht aus einem fluoreszierenden Molekül, dieses wiederum aus einer succinimydyl-Ester Funktionalgruppe und zwei Diacetat Gruppen. CFSE wandert ohne Hinderung in die Zelle hinein und spaltet intrazellulär die Diacetat Gruppe ab und fluoresziert, wobei es ein Membran undurchlässiger Farbstoff wird. Während der Zellteilung wird der Farbstoff auf die zwei Tochterzelle weitergegeben, wobei sich die CFSE- Menge und somit die Fluoreszenzintensität auf die Hälfte reduziert. CFSE wird bei 488 nm durch einen Neon-Argon-Laser im FACS angeregt und die Fluoreszenz bei 515 nm gemessen. Nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C in einer 5µMol CFSE- Lösung wurde die Reaktion mit 2ml eiskaltem Medium gestoppt und schließlich dreimal mit je 5ml eiskaltem Medium gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden in Medium mit 2µg/ml Anti-CD28 Antikörper in einer Anti-CD3 gecoateten (beschichtet) 96-er Wellplatte ausplattiert. Nach 20 Stunden wurden die sogenannte Nullwerte mit FACS gemessen - wo noch keine Zellteilung stattgefunden hat - und am Tag 4 wurde die Zellproliferation wieder bei FACS gemessen.

2.2.12 ELISA

IFN γ , IL-10, IL-17 und TNF α Zytokine werden mithilfe von ELISA nachgewiesen.

In der **Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Technik (Abbildung 2.9)** werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende

Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) wurde an eine feste Phase (meist spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte) gebunden. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C oder Raumtemperatur durchgeführt. Die Proben mit dem nachzuweisenden Antigen wurden dann in die *wells* gegeben und 2 Stunden lang inkubiert. Auf jeder Platte wurde gleichzeitig mit den Proben auch eine Standardverdünnungsreihe aufgetragen, die für die Kalibrierung des Auslesegerätes notwendig war. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde die Platte gewaschen, wodurch die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt und blieb nur das am (*coating*-) Antikörper gebundene Antigen zurück. Im nächsten Schritt wurde ein biotinylierter Detektions-Antikörper zugegeben, wonach ein Enzym (Meerrettich- Peroxidase = HRP = engl. *horseradish*), gebundene Streptavidin Zugabe erfolgte. Der Detektionsantikörper bindet an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (deshalb der Name Sandwich-ELISA - das Antigen ist zwischen den beiden Antikörpern wie in einem Sandwich gepackt). An Biotin bindet sich das Streptavidin-HRP Komplex. Durch Zugabe von einem chromogenen Substrat: Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung entsteht ein umgesetztes Reaktionsprodukt mit blauer Farbe. Durch Zugabe von 50µl/well Stop-Lösung (30% H₂SO₄) wird die instabile blaue Lösung zu einem stabilen gelben Farbkomplex umgewandelt. Die nun „fixierte“ Platte kann mit dem entsprechenden Programm am ELISA- Reader bei 450 nm ausgelesen werden.

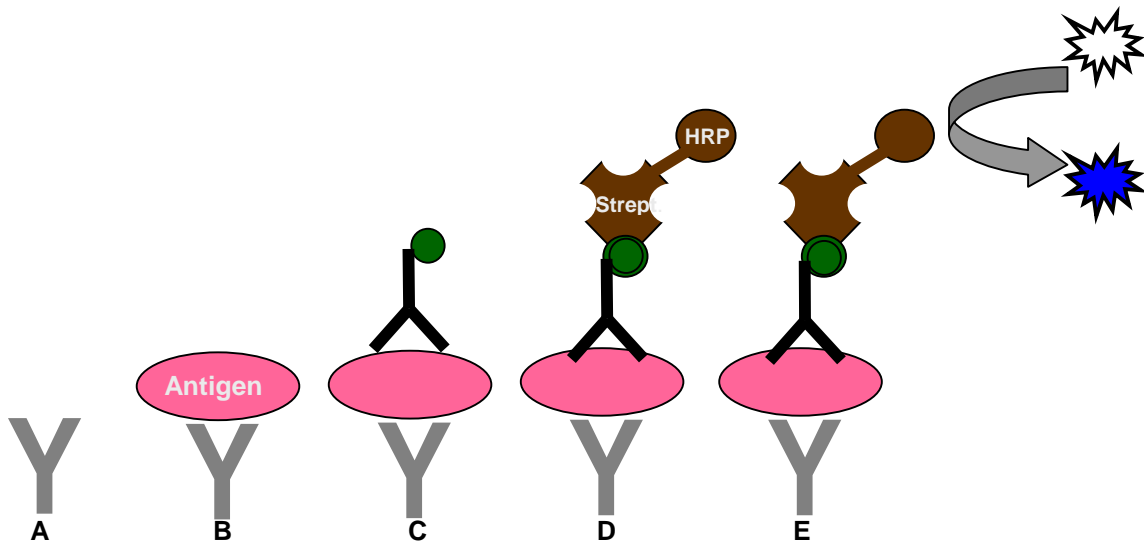


Abbildung 2.9. Sandwich ELISA. (A) Mit coating-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte; (B) Zugabe der Proben und Inkubation; (C) Zugabe des biotinylierten Detektions-Antikörpers; (D) Zugabe und Komplexbildung des Enzym-gebundene Streptavidin-Detektions Antikörper- Antigen – coating Antikörper; (E) Zugabe von Substrat (TMB), das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

2.2.13 RNA Isolation

Über die Kollaboration mit Professor H.A. Lehr (Centre Hospitalier Lousanne, Schweiz) und Dr. Koslowski (Onkologie und Hämatologie III. Med. Klinik Universitätsmedizin Mainz, SFB 432) gelang es unserer Arbeitsgruppe menschliche Lungenbiopsien zu bekommen und so die Forschungsarbeiten mit humanen Ergebnissen zu vervollständigen.

Totale zelluläre RNA wurde von gefrorenen Lungengeweben mit RNasy Mini Kit (Qiagen) extrahiert.

2.2.14 cDNA Synthese und Quantitative PCR

5 Mikrogramm gesamt RNA wurde mit dT₁₈ Oligonukleotiden (Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin) und Reverse-Transkriptase Enzym mit Superscript II (Invitrogen) laut Herstelleranweisungen in cDNA umgeschrieben. Die Integrität der erhaltenen cDNA wurde durch Amplifikation von p53 Transkript eine 30-Zyklen PCR überprüft. Nur Proben, die eine 740 Basenpaar PCR-Produkt p53 ergaben, wurden zur Expressionsanalyse weiterverarbeitet. In dieser Studie wurden mittels quantitative PCR 16 Lungengewebe von Patienten mit Adenokarzinom (**Tabelle 2.1.**) und 5 Lungen von gesunden Menschen (**Tabelle 2.1.**) und 10 normale Lungengewebe aus Patienten (**Tabelle 2.1.**) mit Lungenkarzinom, von dem Teil der Lunge, die sich von der Tumorregion entfernt befindet, als Kontrollgewebe benutzt. Zusätzlich wurden von 11 Patienten mit Lungen-Adenokarzinom und 7 Lungen aus gesunden Menschen und 2 normale Lungengewebe Proteine (**Tabelle 2.2.**) analysiert. Außerdem wurden isolierte CD4+ T-Zellen aus Mäusen mittels PCR analysiert.

Tabelle 2.4. PCR Primer und ihre Sequenzen mit Annealingtemperatur.

Nr.	Gene	Sense	Antisense	Annealing-Temperatur
1.	P53	5'-CCT AAC CAG CTG CCC AAC TGT AG -3'	5'-CCT AAC CAG CTG CCC AAC TGT AG -3'	67 °C
2.	HPRT	5'-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA -3'	5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT -3'	62 °C
3.	RORA	5'-TGT ACT GAT GTC AGC AGA TCG -3'	5'-ATG AAG TCG CAC AAT GTC TGG -3'	60 °C
4.	RORC2	5'-AAA GCA TCC TGG CAA AGC TGC -3'	5'-TCT TCC AGG TCA CTT GGA CAG -3'	60 °C
5.	IL-17A	5'-TCA CCT TGG AAT CTC CAC CGC A -3'	5'-GGC AGT GTG GAG GCT CCC TG -3'	60 °C
6.	IL-17F	5'-CTC CCC CTG GAA TTA CAC TGT C-3'	5'-AAC AGA GCA GCC TTG GTG CTT C-3'	60 °C
7.	CD3δ	5'-CTG GAC CTG GGA AAA CGC	5'-GTA CTG AGC ATC ATC	60 °C

		ATC-3'	TCG ATC-3'	
8.	FOXP3	5'-CAA GGC TTC ATC TGT GGC ATC-3'	5'-CGT GTG AAC CAG TGG TAG ATC -3'	60 °C
9.	T-bet	5'-CCC TTG GTG TGG ACT GAG AT-3'	5'-GTC GGT GTC CTC CAA CCT AA -3'	60 °C
10.	Maus IL-17A	5'-TCC AGA AGG CCC TCA GAC TA-3'	5'-ACA CCC ACC ACA TCT TCT C -3'	60 °C
11.	Maus IFN γ	5'-GCT TTG CAG CTC TTC CTC AT -3'	5'-GTC ACC ATC CTT TTG CCA GT -3'	60 °C
12.	Maus HPRT	5'-TTG CGC TCA TCT TAG GCT TT -3'	5'-GCC CCA AAA TGG TTA AGG TT -3'	60 °C

Die PCR Primer wurden konstruiert und verwendet für die spezifische Amplifikation von „first-strand“ Komplementär DNA (cDNA) Bestände. Um falsch-positive PCR-Produkte wegen einer eventuellen Kontamination mit genomischer DNA in der RNA-Extraktion oder wegen Vorhandensein von Pseudogenen auszuschließen, wurden die Primer so konstruiert, dass sie eine Exon/Intron Grenze überschreiten. Für die jeweiligen PCR Analysen wurde 0.5 μ l cDNA mit Transkript-spezifischen Oligonukleotiden (Operon, Huntsville, AL) und ein U Hot Taq DNA Polymerase in einer 30 μ l Reaktionsmix den Herstellervorschriften gemäß eingesetzt. Die Primersequenzen und die zugehörigen Annealingtemperaturen sind in der **Tabelle 2.4.** zusammengefasst. Diese Oligos binden in der Sequenz kodierenden Ligand bindenden Domain. Die quantitative RT-PCR Analyse wurde mit ABI PRISM 3700 Sequence Detection System Gerät und Software (Applied Biosystems) mit QuAntiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) durchgeführt.

Die Schema für die PCR Reaktionen ist das Folgende:

- 40 Zyklen
- Triplikaten
- spezifischen Primer (300nM je)
- anfängliche Denaturierung/ Aktivierung für 15 Minuten auf 95 °C
- 30 Sekunden Denaturierung auf 95 °C
- 30 Sekunden Annealing
- 30 Sekunden Amplifikation auf 72 °C

Die relative Expression der spezifischen Transkripten wurde auf den internen Standard (housekeeping Gene) bezogen ausgerechnet. Die Expression wurde auf

normale Lungengewebe bei der Verwendung von $\Delta\Delta\text{CT}$ Formel normalisiert. In jedem Reaktionsablauf wurde eine templatfreie negative Kontrolle mitgeführt.

2.2.15 Proteinextraktion, Western Blot

Lungenstücke wurden während dem Experimenttag entnommen und in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zum Proteinextraktion bei minus 20 oder minus 80 °C gelagert. Der Extraktionspuffer enthält: 10µg/ml Aprotinin (Proteinaseinhibitor), Trypsinhibitor, 5 % Nonidet-P 40, PBS und H₂O. Nach der Gewebehomogenisierung wurden die Proben ins Ultraschallbad transferiert und anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der 30-minütigen Zentrifugation bei 4 °C bei 12'000 rpm wurden die Überstände ab pipettiert und bei minus 20 °C bis minus 80 °C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mittels Spektrophotometrie mit *Bio-Rad Protein Assay* bestimmt. 50µg Proteinlysate je Probe wurde in sieben-, zehn- oder fünfzehnprozentiger **Natrium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektrophorese** (SDS-PAGE) unter reduzierender Kondition aufgetrennt und auf positiv geladenes Nitrozellulosemembran über Nacht transferiert (bei 13-15 Volt). Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membrane eine Stunde lang in Blocking-Lösung inkubiert. Nach dem Blocken wurde die Membrane in der mit dem Erst-Antikörper angesetzten Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Schließlich erfolgte die Inkubation für 30-60 Minuten in Blocking-Lösung mit dem Zweit-Antikörper, welcher Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert war. Hierfür wurden Anti- Maus, Anti- Kaninchen (1:2000) und Anti-Ziege IgG (1:1000) verwendet.

Die spezifische Bindung wurde mit dem „*Enhanced Chemiluminescence*“ (ECL) Western Blot Detektionssystem den Herstellervorschriften gemäß detektiert.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des humanen Lungen-Adenokarzinoms

3.1.1 Erhöhte Expression von IL-17A, RORC2 und RORA mRNA in den Lungengewebe aus Patienten mit Adenokarzinom

In neueren Studien wurde über die Transkriptionsfaktoren für IL-17 veröffentlicht, dass der Orphan Nuclear Receptor ROR γ t eine bedeutende Rolle in dem Differenzierungsprogramm von IL-17+ T-Helferzellen (82) spielt. Kurz darauf hat Yang *et al.* (83) bewiesen, dass nicht nur ROR γ t sondern auch ROR α 4 gemeinsam (126) zu einer vollständigen Differenzierung der IL-17 produzierenden T-Helferzellen beitragen. Beide Studien wurden in Mäusen durchgeführt.

Um die Steuerung der Th17 Differenzierung upstream zu untersuchen, haben wir die humanen Äquivalenten für die murinen Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α 4: RORC2 und RORA auf der mRNA Ebene in der Lunge untersucht.

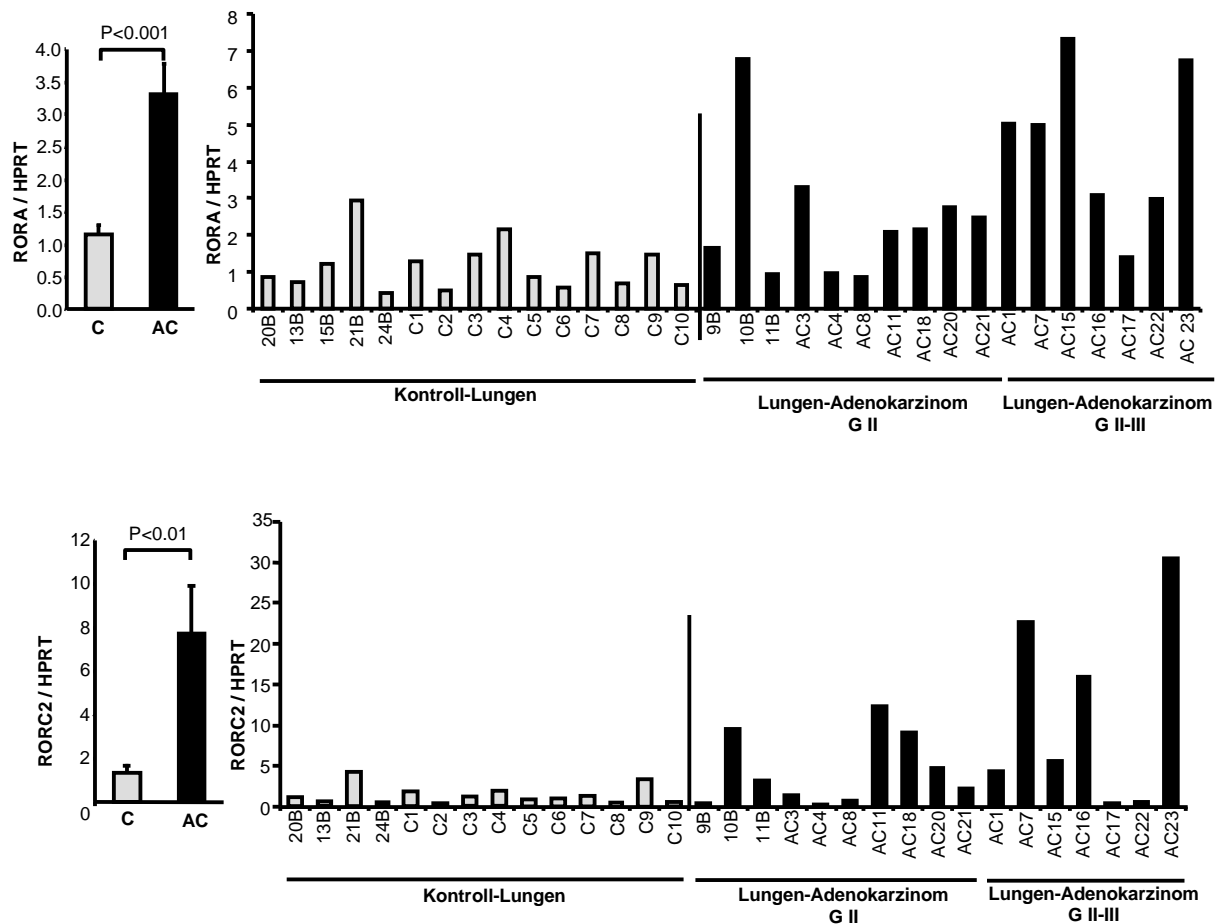


Abbildung 3.1. Hochregulation der RORA- und RORC2-Transkriptionsfaktoren in der Lunge der Patienten mit Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungengeweben.

Die RNA wurde aus dem Lungengewebe extrahiert und eine Real-time-PCR für RORA bzw. RORC2 mRNA und HPRT nach reverser Transkription durchgeführt. Die erhaltenen Werte für RORA bzw. RORC2 wurden auf die Expression des HPRTs bezogen. RORA wurde in 15 Kontroll-Lungengewebe und in 17 Lungen mit Adenokarzinom (10x GII, 7x GII-III) untersucht. RORC2 wurde in 14 Kontroll-Lungengewebe und 17 Lungen mit Adenokarzinom (10x GII, 7x GII-III) untersucht. C = Kontroll-Lunge, AC= Lungen-Adenokarzinom

Die Expression beider Transkriptionsfaktoren war in den Patienten mit Lungen-Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungengewebe hochreguliert (**Abbildung 3.1.**). Diese Ergebnisse weisen auf eine lokale Induktion von IL-17 in den Lungen mit Adenokarzinom hin.

Anschließend wurde die IL-17A mRNA analysiert. Wie nach den RORC2 und RORA Ergebnissen erwartet, wurde eine Hochregulierung von IL-17A in den Lungen von Patienten mit Adenokarzinom auf der mRNA Ebene gefunden (**Abbildung 3.2.**).

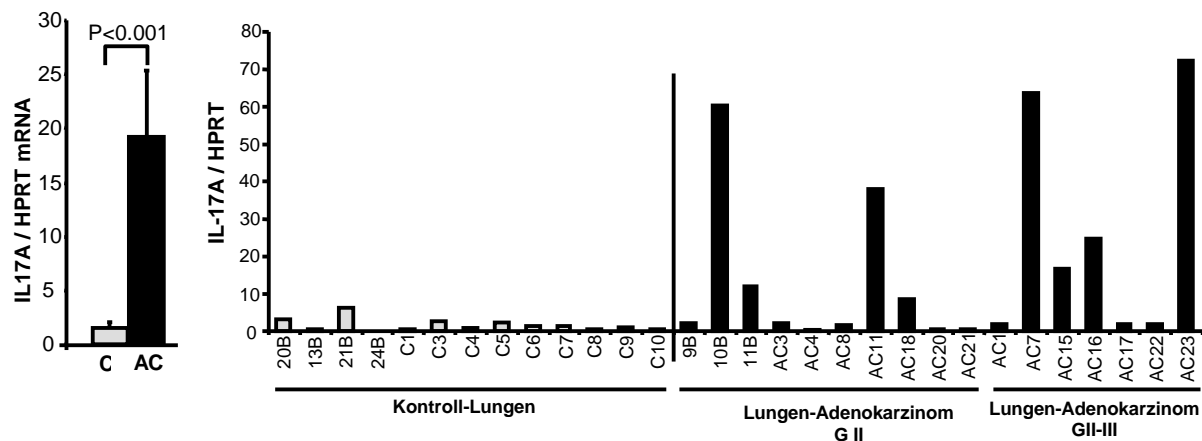


Abbildung 3.2. IL-17A ist in der Lunge von Patienten mit Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungengewebe hochreguliert.

RNA wurde aus Lungen extrahiert und nach reverser Transkription eine Real-time-PCR zum Nachweis von IL-17A mRNA und HPRT mRNA durchgeführt. Die erhaltenen Werte für IL-17A wurden auf die Expression des HPRTs relativiert. Es wurden 13 Kontroll-Lungengewebe und 17 Lungen mit Adenokarzinom (10x GII, 7x GII-III) untersucht. C = Kontroll-Lunge, AC= Lungen-Adenokarzinom.

Um die Zusammenhänge zwischen IL-17A und den beiden Transkriptionsfaktoren genauer zu untersuchen, wurde die Korrelation von IL-17A und den Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Wir fanden eine positive Korrelation zwischen IL-17A und RORA sowie zwischen IL-17A und RORC2, die am besten im Lungen-Adenokarzinom ausgeprägt ist (**Abbildung 3.3. rechts oben und unten**).

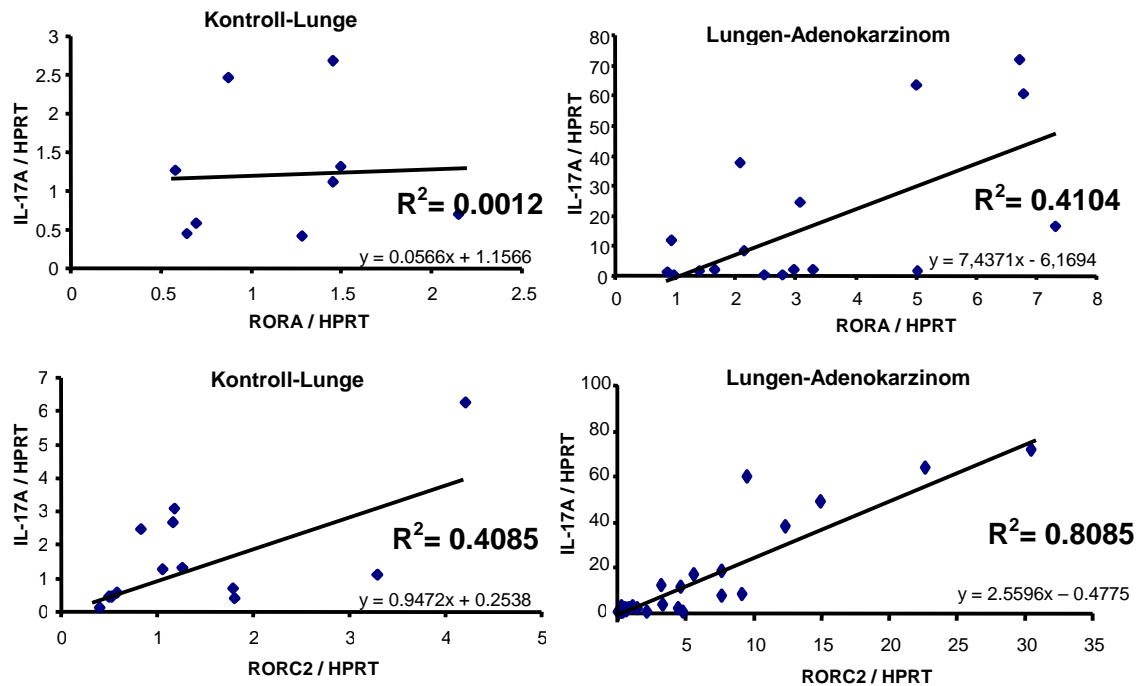


Abbildung 3.3. RORA korreliert positiv nur mit IL-17A in den Lungengewebe mit Adenokarzinom, während RORC2 sowohl in Kontroll-Lunge als auch in Lungen mit Adenokarzinom korreliert.

Die RNA aus der Lunge wurde extrahiert und mittels quantitativer PCR analysiert. Anschließend wurden die Daten mittels einer Korrelation zwischen IL-17A und RORA bzw. IL-17A und RORC2 mRNA untersucht. Keine Korrelation konnte zwischen den IL-17A und RORA mRNA Daten in Kontroll-Lungengewebe ($n=9$) gefunden werden wohingegen in den Lungen mit Adenokarzinom in GII, II-III Stadien ($n=17$) eine positive Korrelation gefunden wurde. IL-17A und RORC2 mRNA korrelierten stark miteinander in den Lungen mit Adenokarzinom in GII, II-III Stadien ($n=17$) aber auch in den Kontroll-Lungen ($n=11$).

IL-17A und RORC2 korrelieren positiv miteinander (**Abbildung 3.3. unten**), wobei die Korrelation in den Patienten mit Adenokarzinom höher ist: die Korrelationskoeffizient ist in der Kontroll-Lunge 0,4 und im Adenokarzinom 0,8. In dem Fall von RORA ist die Korrelation (**Abbildung 3.3. oben**) in beiden Konditionen niedriger. In der Kontroll-Lunge 0,0012 und im Adenokarzinom 0,41. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass vor allem RORC2, aber auch RORA, für das Differenzierungsprogramm von IL-17A produzierenden Zellen in der Lunge mit Adenokarzinom verantwortlich sind.

3.1.2 Erhöhte Menge von IL-17A Protein in den Lungen der Patienten im Vergleich zu Kontroll-Lungen

Die Expression des IL-17A-Proteins wurde in den Lungen von Patienten und in Kontroll-Lungengewebe mittels Western Blot Analyse untersucht. Diese Ergebnisse stimmen mit den mRNA-Ergebnissen überein. IL-17A ist in der Lunge der Patienten im Vergleich zu Kontrollgewebe (**Abbildung 3.4.**) hochreguliert.

Um die lokale Verteilung des IL-17A zu analysieren, wurde ein immunhistochemischer Proteinnachweis durchgeführt. Im **Abbildung 3.5. links** ist zu sehen, dass IL-17A im normalen Lungengewebe exprimiert wird und eine gleichmäßige Streuung zeigt. Dagegen sind IL-17A positive Zellen dicht um die Tumorregionen herum zu finden (**Abbildung 3.5. rechts**).

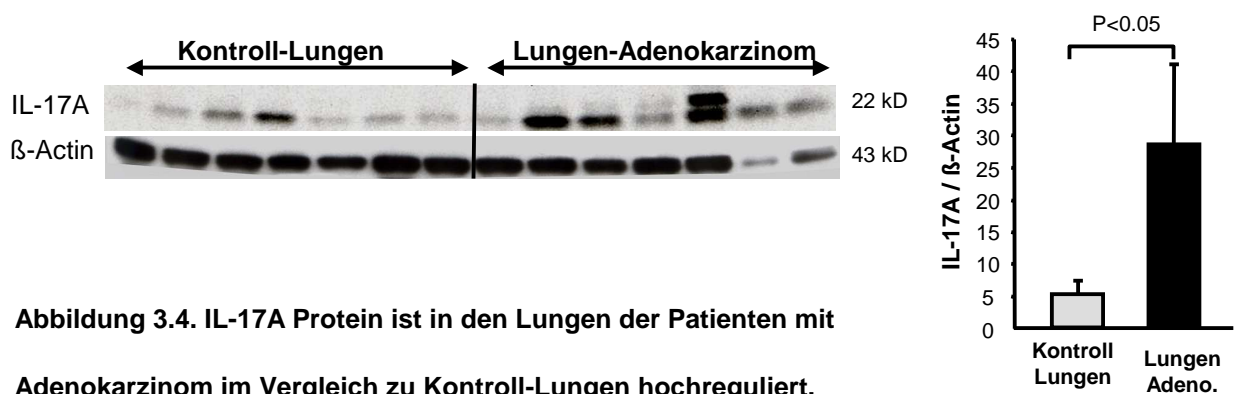
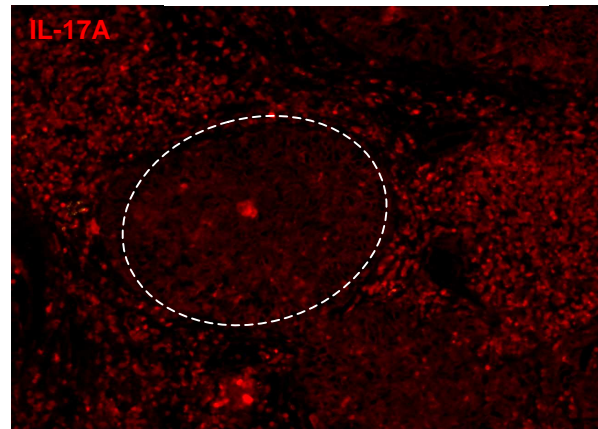


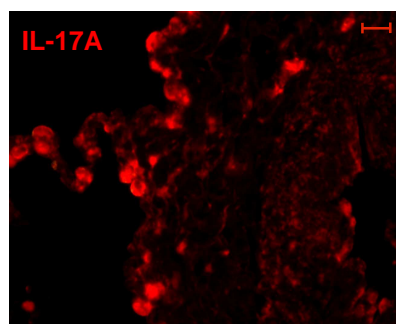
Abbildung 3.4. IL-17A Protein ist in den Lungen der Patienten mit Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungen hochreguliert.

Proteine wurden aus den Lungengewebe isoliert und durch Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Zellulosemembran wurde eine IL-17A Western Blot Analyse durchgeführt. Die quantitative Auswertung des Western Blots zeigt eine signifikante Erhöhung des IL-17A Zytokins in den Lungen von Patienten mit Adenokarzinom (n=7) im Vergleich zu Kontroll-Lungen (n=7).

Lungen Adenokarzinom



Kontroll-Lunge



Lungen-Adenokarzinom

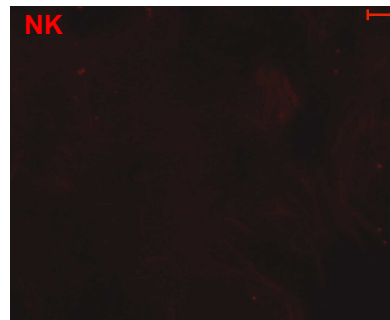
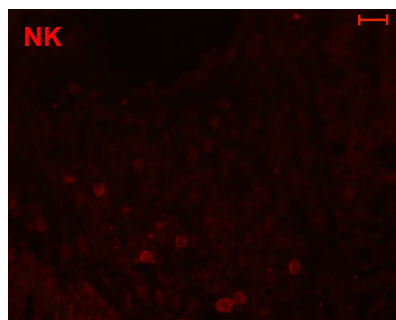
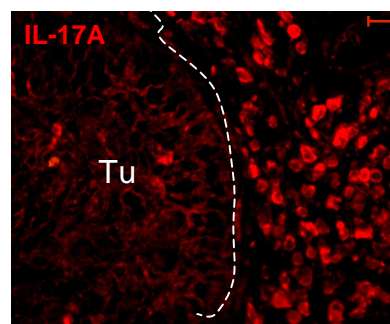


Abbildung 3.5. Die IL-17A produzierenden Zellen befinden sich hauptsächlich um den soliden Tumor herum in der Lunge der Patienten mit Adenokarzinom. In der Kontroll-Lunge findet man hingegen eine gleichmäßige Verteilung dieser Zellen.

IL-17A wurde in Paraffin eingebetteten Lungen mittels immunohistochemischer Proteinfärbung mit fluoreszierendem Cy3-Farbstoff sichtbar gemacht. IL-17 hat eine gleichmäßige Verteilung in der Kontroll-Lunge (oben links im Quadrant). Die Lunge eines Adenokarzinom-Patienten zeigt dagegen ein typisches Muster in der Verteilung von IL-17A: die IL-17 produzierenden-Zellen konzentrieren sich auf die nähere Umgebung des Tumors (großes Bild oben und oben rechts im Quadrant). Unten links und rechts sind die Negativ-Kontrollen zu sehen, wo die immunohistochemische Färbung ohne Erst-Antikörper durchgeführt wurde. NK= Negativ-Kontrolle. Die Größe des Maßstabs beträgt 10µm. Großes Bild oben wurde mit hundertfache-, die vier Bilder im Quadrant mit vierhundertfache Vergrößerung gemacht.

3.1.3 Unveränderte Expression der IL-17F mRNA in den Patienten mit Lungen-Adenokarzinom

IL-17F ist das Mitglied der IL-17 Zytokinfamilie, das die engste Homologie (58%) mit IL-17A aufweist (127). Die IL-17F mRNA Expression (**Abbildung 3.6.**) wurde bei denselben Patienten untersucht. Überraschender Weise stellte sich heraus, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der IL-17F mRNA-Expression in der Lunge mit Adenokarzinom und in der normalen Lunge gibt.

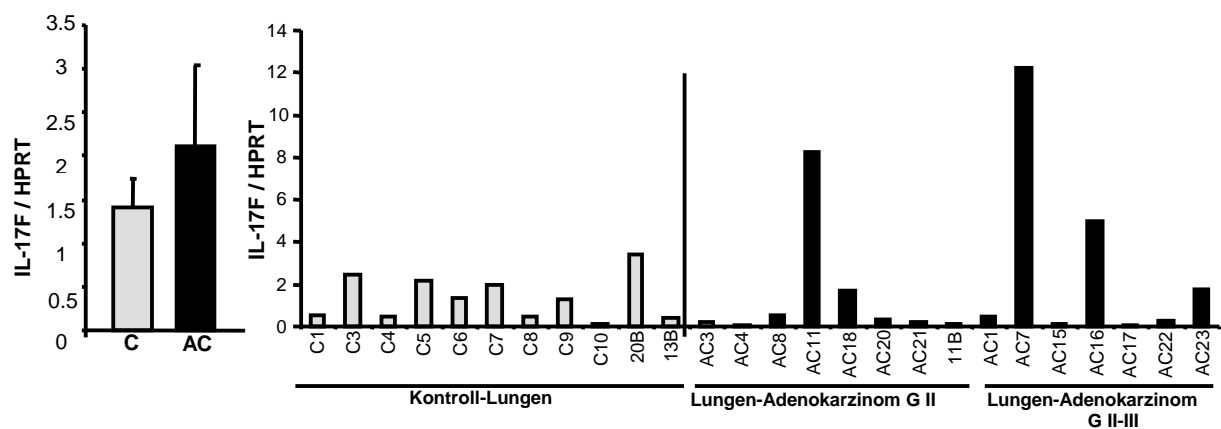


Abbildung 3.6. IL-17F ist in der Lunge von Patienten mit Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungengewebe nicht signifikant hochreguliert.

RNA wurde aus den Lungengeweben extrahiert und nach reverser Transkription eine Real-time-PCR zum Nachweis von IL-17F mRNA und HPRT mRNA durchgeführt. Die erhaltenen Werte für IL-17F wurden auf die Expression des HPRT relativiert. Es wurden 11 Kontroll-Lungengewebe und 15 Lungen mit Adenokarzinom (8x GII, 7x GII-III) untersucht. C= Kontroll-Lunge, AC= Lungen-Adenokarzinom.

Des Weiteren wurde die Korrelation zwischen RORA bzw. RORC2 mRNA zu IL-17F mRNA analysiert. IL-17F mRNA korreliert nicht mit RORA und RORC2 mRNA in der Kontroll-Lunge (**Abbildung 3.7. links oben, unten**). RORC2 korreliert positiv mit IL-17F aber nicht mit RORA in den Patienten mit Adenokarzinom.

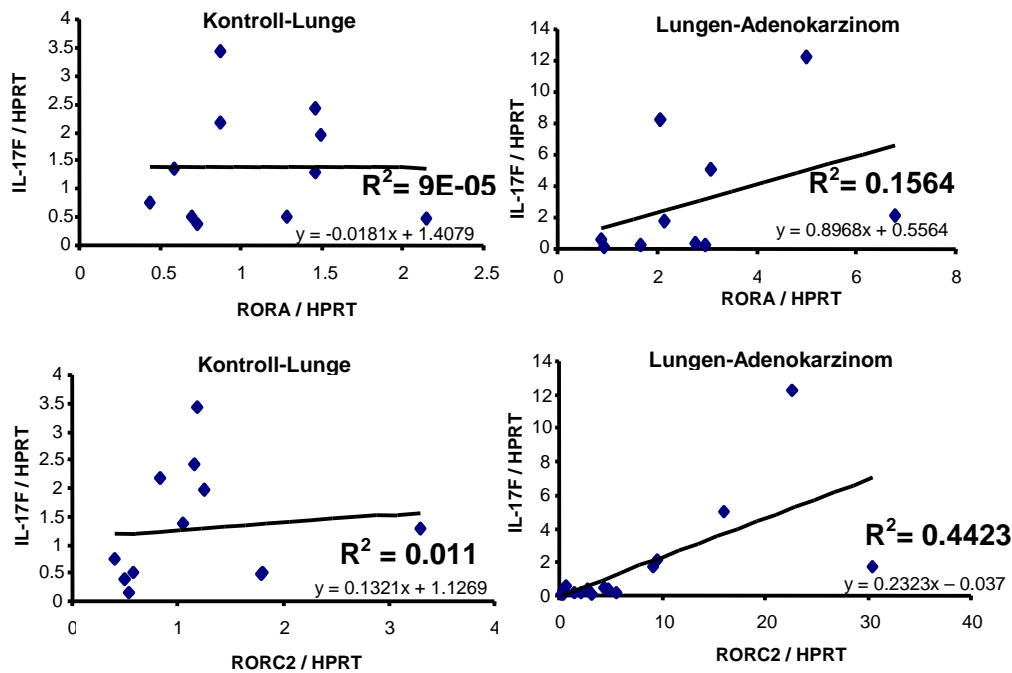


Abbildung 3.7. Die mRNA von IL-17F und RORA bzw. RORC2 Transkriptionsfaktoren korrelieren nicht in den Kontroll-Lungen. RORC2 mRNA korreliert mit IL-17 mRNA nur in den Lungen mit Adenokarzinom.

RNA wurde aus den Lungengewebe extrahiert und mittels quantitativer PCR analysiert. Anschließend wurden die IL-17F, RORA und RORC2 mRNA Daten auf Korrelation untersucht. IL-17F und RORA mRNA korrelieren nicht in den Kontroll-Lungen (n=11) und nur in geringem Maße in den Lungen mit Lungen-Adenokarzinom in G II und G II-III (n=10). IL-17F und RORC2 mRNA korrelieren nicht miteinander in Kontroll-Lungen (n=12) aber in Lungen-Adenokarzinom (n=17).

3.1.4 Der IL-17 Rezeptor wird in den Lungen des Menschen exprimiert

Die Aminosäuresequenzen des humanen IL-17 Rezeptors (hIL-17R) sind zu 69% identisch mit dem murinen IL-17R (mIL-17R) und sie sind anderen Zytokinrezeptorfamilien nicht ähnlich. Der humane IL-17R wird von einer weiten Palette von Zelltypen exprimiert (128).

IL-17A bindet an den IL-17 Rezeptor und löst die Signaltransduktion aus. Zellen, die IL-17 Rezeptor exprimieren sind die Zielzellen von IL-17 und auch die möglichen Ziele einer IL-17-Therapie und stehen somit im Interesse dieser Studie.

Eine Frage war, ob die Adenokarzinom Zellen selber IL-17R exprimieren, daher wurde eine immunhistochemische Proteinfärbung (IHC) für IL-17R und Thyroid

Transkriptionsfaktor ein (TTF1) durchgeführt. TTF1 ist ein in der Diagnostik routinemäßig verwendeter Marker für das Lungen-Adenokarzinom (129, 130).

Die IHC zeigt eine gleichmäßige Verteilung des IL-17 Rezeptors (**Abbildung 3.8. oben links**) in den Kontroll-Lungengeweben. Der IL-17 Rezeptor hat eine ähnliche Verteilung in den Lungen mit Adenokarzinom wie das IL-17A Zytokin, d.h. er beschränkt sich auf die direkte Umgebung von den soliden Tumoren (**Abbildung 3.8. oben rechts**). Die Antwort auf die Frage, ob Karzinomzellen IL-17 Rezeptor zugleich exprimieren, beantwortet die **Abbildung 3.8. oben rechts** und **Mitte rechts**: die Tumorzellen exprimieren keinen IL-17 Rezeptor. Eine zusätzliche Information liefert noch die IHC Färbung, bei der ein Draining – Lymphknoten angefärbt wurde: die Mehrheit der Zellen in dem Lymphknoten zeigen den IL-17 Rezeptor, d.h. die Lymphozyten exprimieren IL-17R. Die nähere Charakterisierung der CD4+ T-Zellen Subpopulationen wurde in der murinen Lunge mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

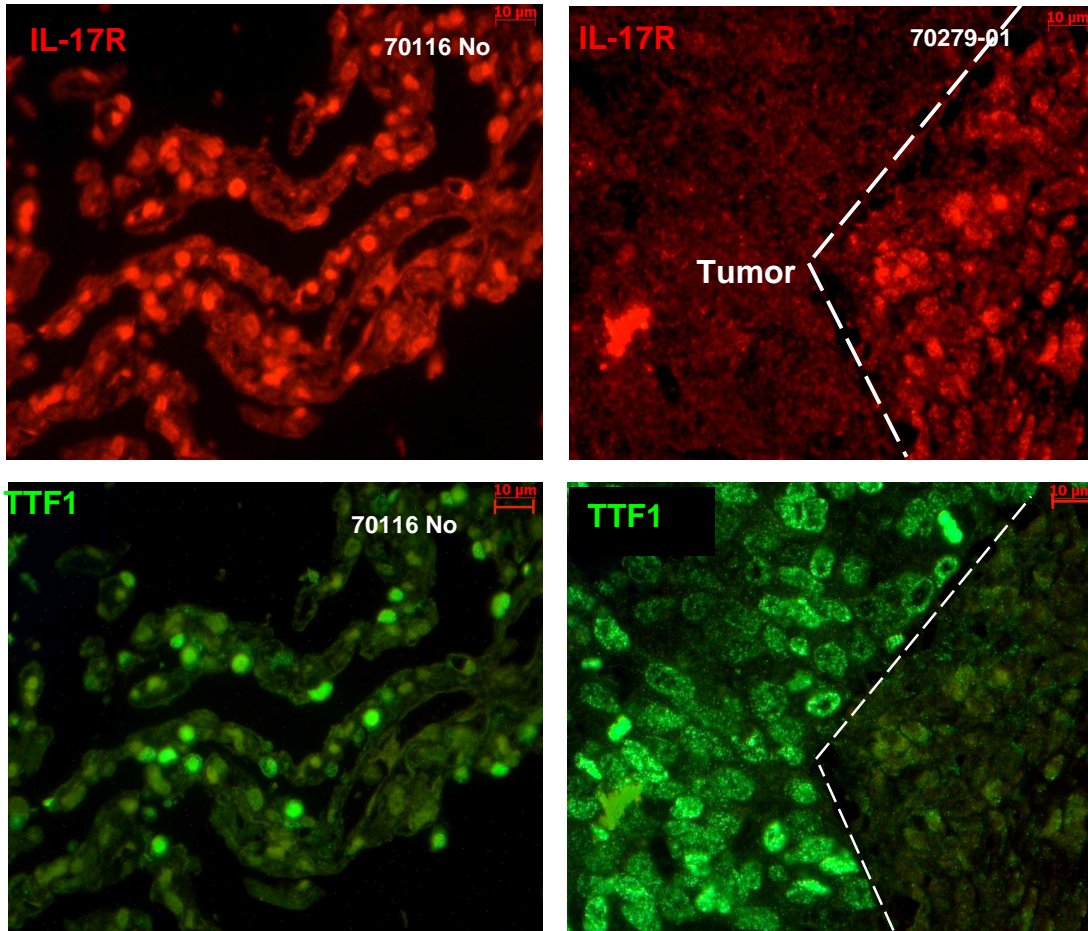
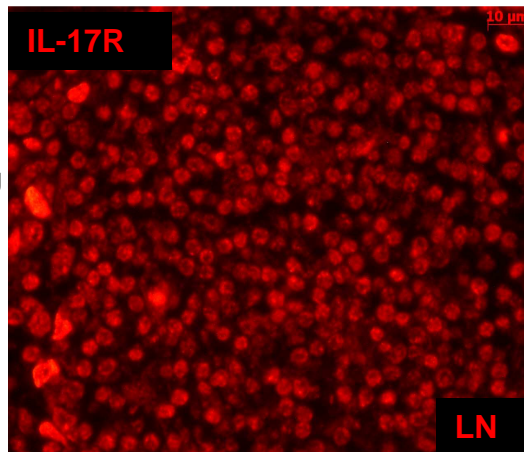


Abbildung 3.8. Die IL-17 Rezeptor-Verteilung ist ähnlich wie die von IL-17A. IL-17R positive Zellen haben in der Kontroll-Lunge eine gleichmäßige Verteilung außerdem konzentrieren sich diese Zellen in der Lunge mit Adenokarzinom auf die Umgebung des Tumors. Die Tumorzellen exprimieren kein IL-17 Rezeptor.

IL-17 Rezeptor (rot) und Thyrosin Transkriptionsfaktor 1 (TTF1) (grün)

wurden in Paraffin eingebetteten Lungen mittels Immunohistochemische Proteinfärbung mit fluoreszierenden Farbstoffen Cy3 (rot) und FITC (grün) sichtbar gemacht. IL-17R hat eine gleichmäßige Verteilung in der Kontroll-Lunge (oben links). Dagegen erkennt man in der Lunge von einem Adenokarzinom Patienten ein typisches Muster: die IL-17R exprimierenden Zellen konzentrieren sich auf die direkte Umgebung des Tumors (oben rechts). TTF1 (Tumormarker für Adenokarzinom) positive Zellen sind per se nicht positiv für den IL-17 Rezeptor. Im Bild unten rechts ist ein Lymphknoten mit Zellen dargestellt, die für IL-17 Rezeptor ein positives „Signal“ zeigen.



Die Western Blot Analyse zeigt keine IL-17 Rezeptor-Regulation in der Lunge von Patienten mit Adenokarzinom (**Abbildung 3.9.**).

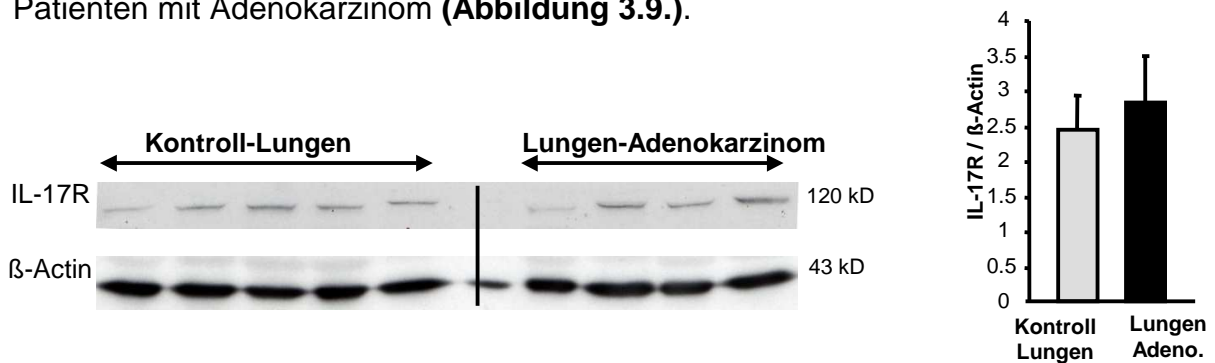


Abbildung 3.9. Die relative Expression des IL-17 Rezeptors zeigt keinen Unterschied in den Kontroll-Lungen im Vergleich zu den Lungen mit Adenokarzinom.

Proteine wurden aus den Lungengeweben isoliert und durch Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde eine IL-17R Western Blot Analyse durchgeführt. Die quantitative Auswertung des Western Blots zeigt keine signifikante Erhöhung von IL-17R Protein in den Lungen von Patienten mit Adenokarzinom (n=4) im Vergleich zu Kontroll-Lungen (n=5).

3.1.5 Erhöhte FOXP3 mRNA ist in der Lunge mit Adenokarzinom

FOXP3 ist der Haupt-Transkriptionsfaktor für CD4+ regulatorische T-Zellen in Mensch und in der Maus (131). Die Rolle von regulatorischen T-Zellen in Tumoren ist gut erforscht. Es ist bekannt, dass in der nächsten Umgebung des Tumors ein erhöhter Level von regulatorischen T-Zellen (132) gefunden wird. Die regulatorischen T-Zellen üben eine supprimierende Wirkung auf die anti-Tumor T-Effektorzellen aus. In der Anti-Tumor-Immuntherapie werden daher neue Möglichkeiten gesucht, mit der die Aktivität der regulatorischen T-Zellen in Tumoren unterbunden werden kann.

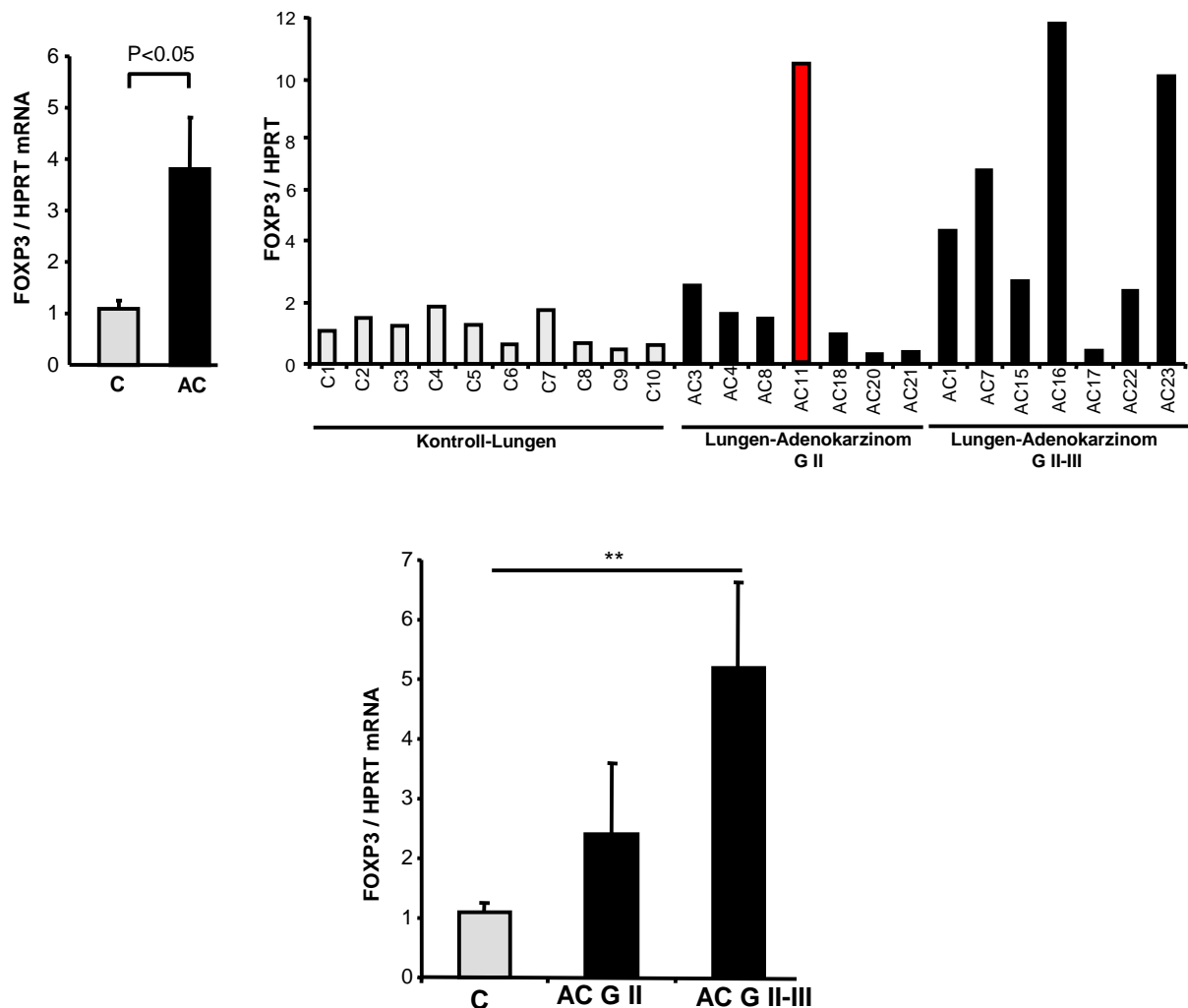


Abbildung 3.10. Erhöhter FOXP3 Transkriptionsfaktor in dem Lungengewebe von Patienten mit Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungengewebe.

RNA wurde aus den Lungengeweben extrahiert und nach reverser Transkription eine Real-time-PCR zum Nachweis von FOXP3 mRNA und HPRT mRNA durchgeführt. Die erhaltenen Werte für FOXP3 wurden auf die Expression des HPRT relativiert. Es wurden 10 Kontroll-Lungengewebe und 14 Lungen mit Adenokarzinom (7x GII, 7x GII-III) untersucht. C= Kontroll-Lungengewebe, AC = Lungen-Adenokarzinom. ** = p<0.01

FOXP3 wurde in den Patienten mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht. Analog zu den publizierten Daten veranschaulicht die **Abbildung 3.10.**, dass FOXP3 mRNA in den Lungengeweben mit Adenokarzinom im Grade II und II-III signifikant erhöht im Vergleich zu Kontroll-Lungen ist. In dem Diagramm mit den Einzelwerten kann man beobachten, dass das Lungen-Adenokarzinom im G II Stadium einen relativ niedrigen Level aufwies. Nur in einem Wert (Patient 11) scheint eine größere Menge FOXP3 vorzuliegen. Das untere Diagramm veranschaulicht die FOXP3 mRNA Werte in getrennten G II und G II-III Gruppen. Im Lungen-Adenokarzinom

zeigte sich die Expression von FOXP3 mRNA in den Patienten mit G II-III signifikant erhöht ($p < 0.001$), jedoch nicht in Patienten mit G II Stadium.

Um sich ein genaueres Bild von der Lokalisierung von FOXP3 im Lungengewebe zu machen, wurde im Folgenden eine immunhistochemische Färbung durchgeführt.

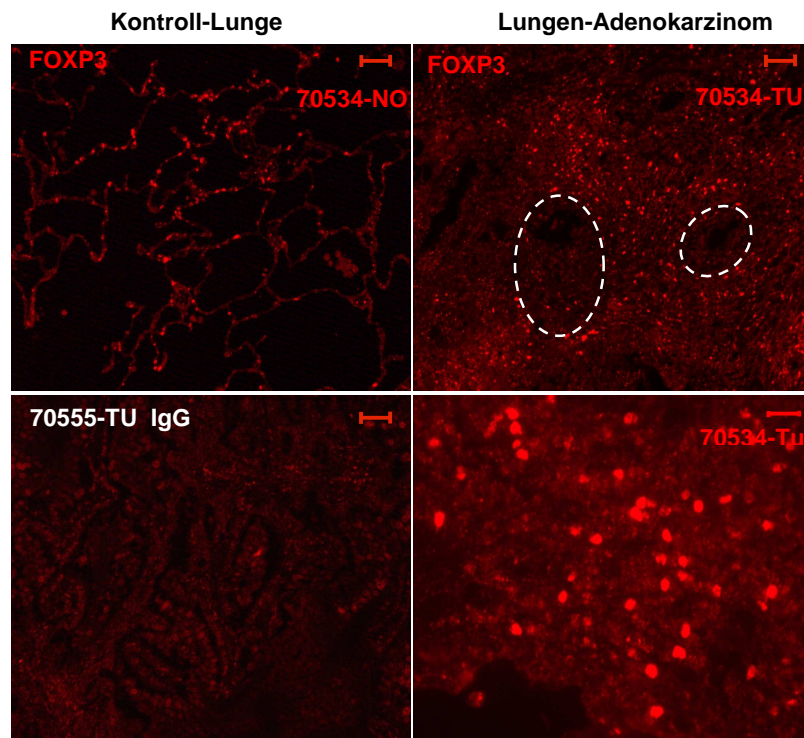


Abbildung 3.11. Die FOXP3 positiven Zellen befinden sich hauptsächlich um den Tumor herum in der Lunge der Patienten mit Adenokarzinom. In der Kontroll-Lunge findet man eine gleichmäßige Verteilung der FOXP3 positiven Zellen in der Kontroll-Lunge.

FOXP3 wurde in Paraffin eingebetteten Lungen mittels immunhistochemische Proteinfärbung (IHC) mit fluoreszierendem Cy3 Farbstoff sichtbar gemacht. FOXP3 hat eine gleichmäßige Verteilung in der Kontroll-Lunge (oben links), 100-fache Vergrößerung. Dagegen erkennt man eine typische Verteilung von FOXP3 in der Lunge von einem Adenokarzinom Patienten: die FOXP3 positiven Zellen befinden sich in der direkten Umgebung der Tumorregionen (oben rechts, 100-fache Vergrößerung). Unten rechts ist eine 400-fache Vergrößerung von der Lunge eines Patienten zu sehen. Unten links ist die Negativ-Kontrolle zu sehen, wo die Immunhistochemische Färbung ohne ersten Antikörper durchgeführt wurde.

Die immunhistochemische Färbung wurde in Paraffin eingebetteten humanen Lungen durchgeführt. Die 5µm dicken Schnitte wurden nach sämtlichen Vorbehandlungen (siehe „Methoden“) mit Anti-FOXP3 Antikörper über Nacht

inkubiert. Nach der Thyramidverstärkung wurden die Signale mithilfe eines computergesteuerten Fluoreszenzmikroskops Aufnahmen gemacht. Die roten Signale zeigen FOXP3 positive Zellen. FOXP3 wird sowohl in Kontroll-Lungengewebe als auch in Lungen mit Adenokarzinom (**Abbildung 3.11.**) exprimiert. Dennoch wird es deutlich, dass mehr FOXP3+ Zellen in dem karzinogenen Gewebe als in dem Kontrollgewebe vorhanden sind. Diese sind in der Umgebung der Tumore lokalisiert. Die Anwesenheit der regulatorischen T-Zellen wirkt supprimierend auf die T Effektorzellen, dadurch ermöglichen sie das Tumorwachstum.

3.1.6 Erhöhte TGF β Level im Lungengewebe von Patienten mit Adenokarzinom

Es gibt kontroverse Studien über die Rolle von TGF β_1 in der Induktion von IL-17 produzierenden CD4+ T-Zellen im Menschen. Einige bestätigen, dass TGF β_1 gemeinsam mit IL-6 in einer dosisabhängigen Art die Sekretion von IL-17 in CD4 positiven T-Zellen stimulieren kann (95). Andererseits behaupten andere Studien, dass TGF β_1 die Th17-Zellen im Menschen nicht stimuliert (92). Eine neuere Untersuchung zeigt, dass TGF β_1 nicht direkt, sondern indirekt dazu beiträgt, dass die Th17 Population, und nicht die Th1 Subpopulation der CD4 positiven T Zellen, gefördert wird (133).

TGF β_1 steht immer noch im Mittelpunkt der Th17 Forschung aber auch auf dem Feld der Autoimmunitätsforschung, da TGF β_1 auch zu der Differenzierung von regulatorischen T-Zellen beiträgt (**Abbildung 1.6**).

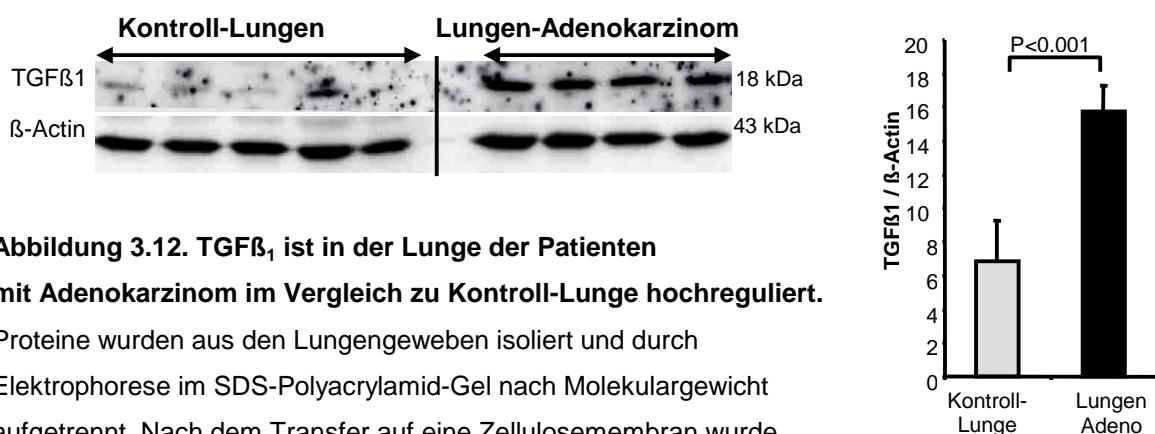


Abbildung 3.12. TGF β_1 ist in der Lunge der Patienten mit Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lunge hochreguliert.

Proteine wurden aus den Lungengeweben isoliert und durch Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Zellulosemembran wurde

eine TGF β 1 Western Blot Analyse durchgeführt. Die quantitative Auswertung des Western Blots zeigt eine signifikante Erhöhung von TGF β 1 in den Lungen von Patienten mit Adenokarzinom (n=4) im Vergleich zu Kontroll-Lungen (n=5).

Bei der Auswertung von 5 Kontroll-Lungen und 4 Lungen mit Adenokarzinom in Western Blot Analyse konnte festgestellt werden (**Abbildung 3.12.**), dass TGF β 1 in der Lunge von Patienten mit Adenokarzinom signifikant hochreguliert ist.

3.2 Interleukin-17 in der Maus

In den Lungen der Patienten mit Adenokarzinom waren das Zytokin IL-17A und die mRNA des Transkriptionsfaktors RORC2 im Vergleich zum Kontroll-Lungengewebe erhöht. Des Weiteren wurde in den humanen Studien gefunden, dass der IL-17 Rezeptor in den Lymphknoten exprimiert wird.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass IL-17A eine Rolle in der Immunantwort während der Pathogenese des Adenokarzinoms spielen könnte. Studien zeigen, dass IL-17 in Gebärmutterhalskrebs in erhöhter Konzentration vorliegt (134). Aber was für eine Rolle spielt IL-17A im Lungen-Adenokarzinom? Begünstigt oder bekämpft IL-17A das Adenokarzinom in der Lunge? Um diese Fragen zu beantworten, wurde IL-17A lokal durch intranasale Applikation zugegeben (IL-17F) oder mit IL-17A-Antikörper neutralisiert.

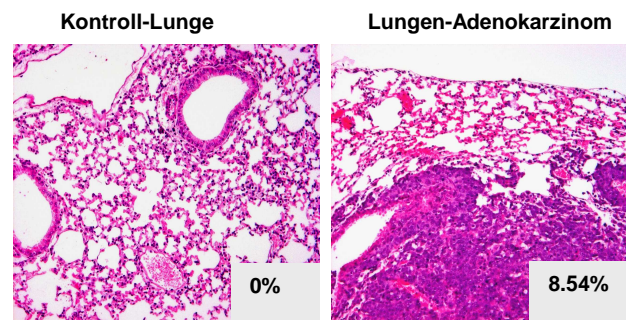
3.2.1 Im Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom sind IL-17A, IL-6, FOXP3 und ROR γ t erhöht

Das experimentelle Vorhaben wurde in einem murinen Lungen-Adenokarzinom Modell umgesetzt. Das Adenokarzinom wurde in den Mäusen mittels intravenöser Injektion der L1C2 Zelllinie (*Line one alveolar cell carcinoma*) induziert.

L1C2 ist ein schwach immunogener, Natural Killer Zellen (NK) resistenter und stark bösartiger Tumor von moderatem metastatischem Potential (135, 136). Diese Zelllinie ruft in Mäusen Lungen-Adenokarzinom hervor.

21 Tage nach der Injektion wurden die Lungen analysiert, um festzustellen, ob dieses Modell geeignet ist, die pathologische Situation im Lungen-Adenokarzinom des Menschen zu reproduzieren.

(A)



(B)

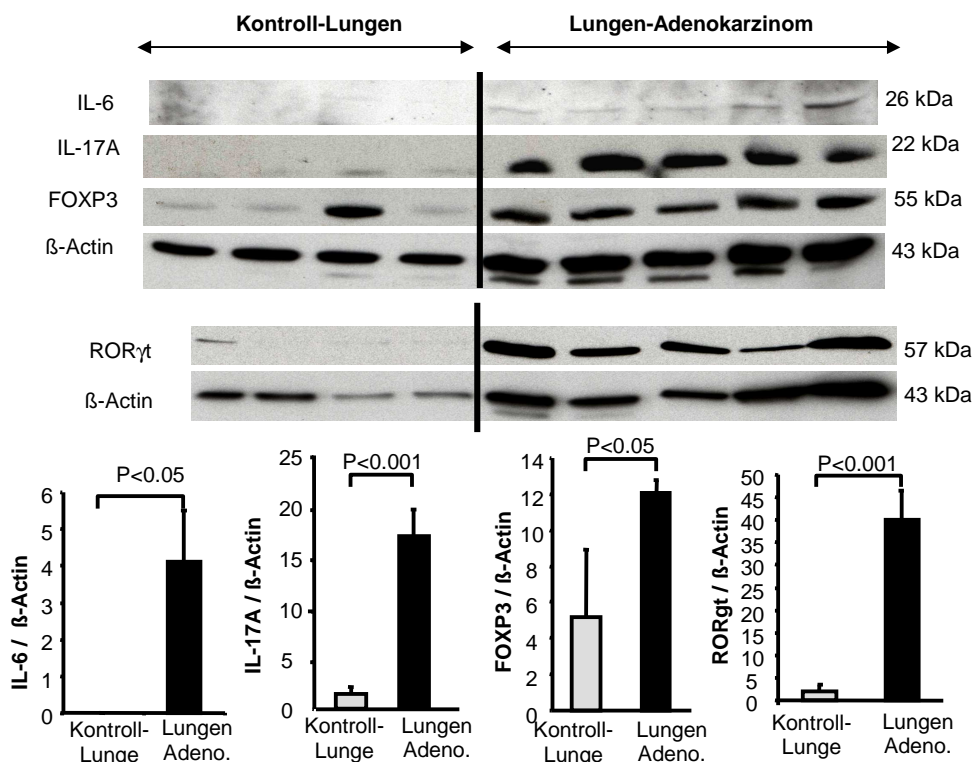


Abbildung 3.14. Analyse des Adenokarzinoms der Lunge im Mausmodell: IL-6, IL-17A, FOXP3 und ROR γ sind im Adenokarzinomgewebe im Vergleich zum unbehandelten Lungengewebe hochreguliert.

In BALB/cJ Mäusen wurden 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen intravenös injiziert und nach 21 Tagen die Lungen analysiert. (A) Stückchen von den Lungen wurden nach der Fixierung in Paraffin eingebettet und eine Hämatoxylin-Eosin Färbung durchgeführt. Die histopathologische Auswertung wird in 100-facher Vergrößerung angezeigt. (B) Proteine wurden aus den Lungen isoliert und durch Elektrophorese im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Zellulosemembran wurde für IL-6, IL-17A, FOXP3 und ROR γ eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die relativen Verhältnisse der obigen Faktoren beziehen sich auf β -Actin. IL-6, IL-17A, FOXP3 und ROR γ waren signifikant in den Lungen von den Mäusen mit Adenokarzinom (n=5) im Vergleich zu Kontroll-Lungen (n=4) erhöht.

Nach der Entnahme der Lungen wurde ein Lungenflügel abgetrennt und für die histologische Analyse in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (**Abbildung 3.14.A**). Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist geeignet, um die Übersichtsfärbung für basophile Zell- und Gewebestrukturen und Zellwucherungen sichtbar zu machen. Die Schnitte wurden fotografiert und mit Photoshop Adobe quantifiziert.

Die Proteine wurden aus den Lungen isoliert und 50µg Protein pro Maus im SDS-Polyacrylamid-Gel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Nach dem Transfer wurden IL-6-, IL-17-, FOXP3- und RORγt- Proteine nachgewiesen.

Die Analyse des Western Blots ergab, dass die Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom eine erhöhte Expression des IL-17A Zytokins hatten und eine Hochregulation von RORγt und FOXP3 Transkriptionsfaktoren (**Abbildung 3.14.**) zeigten.

Nachträglich wurde die T-bet-Expression in der Lunge mithilfe von Western Blot in mehreren Experimenten untersucht (**Abbildung 3.15**).

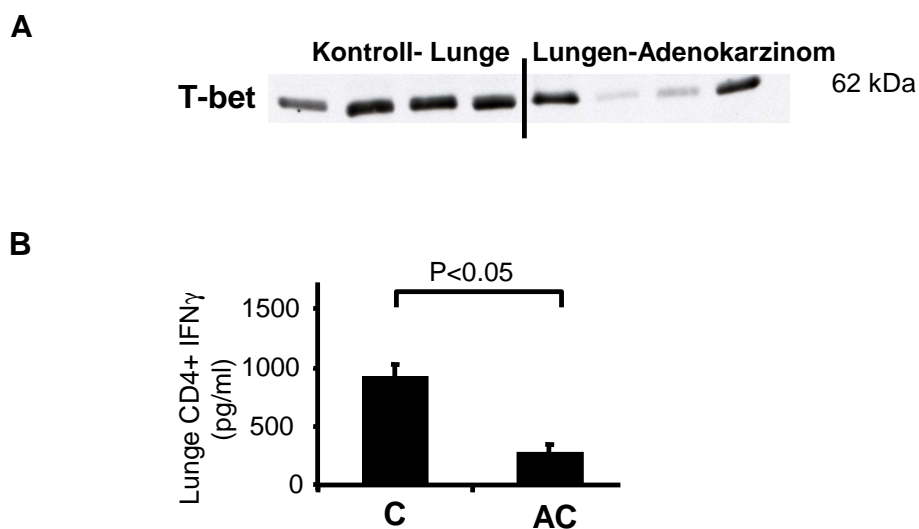


Abbildung 3.15. T-bet und IFN γ Expression in Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom.

(A) Proteine wurden aus der Lunge von naiven BALB/cJ Mäusen und solchen die mit L1C2 Zellen infiziert wurden isoliert. 50µg Protein wurde pro Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach Molekulargewicht getrennt. (B) Aus den Lungen naiver und 21 Tage lang L1C2 inokulierten BALB/cJ Mäusen wurden CD4+ T-Zellen isoliert und 24 Stunden mit AntiCD3/28 kultiviert, und die Überstände mittels ELISA analysiert. C = Kontroll Lunge AC= Lungen-Adenokarzinom.

Es konnte keine konstante Abnahme in der T-bet-Expression festgestellt werden. Dennoch stimmen die wichtigen Kriterien des Adenokarzinoms beim Mausmodell und beim Menschen überein.

3.2.2 Das Interleukin-17F Zytokin im Mausmodell des Lungen-Adenokarzinoms

Um die Rolle von IL-17F in der Pathogenese von Lungen-Adenokarzinom zu untersuchen, wurde das IL-17F Zytokin in 2 Konditionen, entweder zu einem früheren (am Tag -1 und Tag 4) oder an einem späteren Zeitpunkt (am Tag 5 und 8), intranasal in die Mäuse appliziert. Die histopathologische Analyse der Lungen nach 21 Tagen zeigt (**Abbildung 3.16.**), dass die IL-17F Gabe zum früheren Zeitpunkt die Entwicklung des Tumors fördert, im Gegensatz dazu die spätere Verabreichung das Tumorstadium in der Lunge reduziert. Da die Standardabweichungen innerhalb den Gruppen äußerst hoch waren, ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumorguppen mit oder ohne IL-17F.

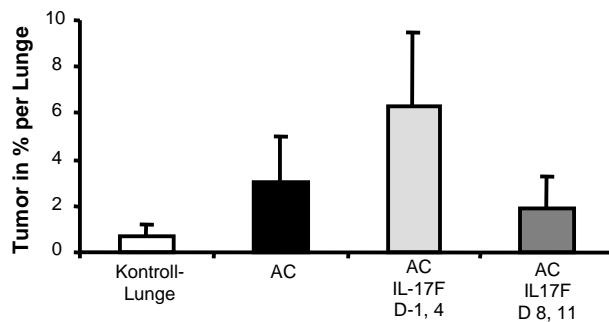
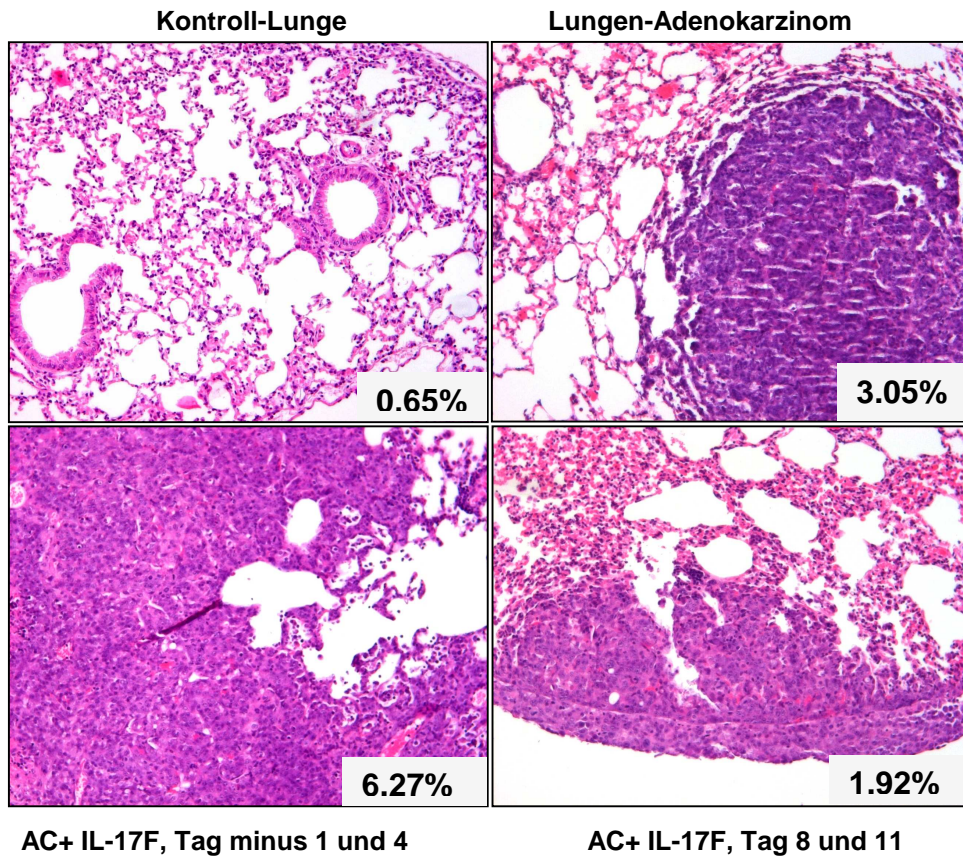


Abbildung 3.16. Histopathologische Analyse der Lungen nach der Behandlung mit rekombinantem IL-17F in Mäusen mit Lungen-Adenokarzinom.

In BALB/cJ Mäuse wurden 2×10^5 Zellen der L1C2 Adenokarzinom (AC) Zelllinie intravenös injiziert. Rekombinantes IL-17F wurde zweimal intranasal verabreicht, jedoch in 2 Gruppen zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten: in der Gruppe mit der früheren Behandlung am Tag -1 und am Tag 4, in der Gruppe mit der späteren Behandlung am Tag 8 und Tag 11. Am Tag 21 wurden die Lungen histopathologisch mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung analysiert. Es wurden die Mittelwerte der prozentuellen Anteile des Tumorbefalls per Lungenschnitt berechnet und graphisch dargestellt. Wegen der hohen Standardabweichung ergab sich kein signifikanter Einfluss von den Behandlungen mit IL-17F Zytokin.

3.2.3 Die Rolle des Interleukin-17A im murinen Lungen-Adenokarzinom Modell

Um die Rolle von IL-17A in dem Krankheitsverlauf des Lungen-Adenokarzinoms zu untersuchen, wurden entweder 3-6µg Anti-IL-17A Antikörper oder 250 ng rekombinantes IL-17A zu einem früheren und einem späteren Zeitpunkt während des Verlaufs der Tumorentwicklung appliziert. Um Adenokarzinom in der Lunge zu induzieren, wurden L1C2 Tumorzellen am Tag 0 in BALB/cJ Mäuse intravenös injiziert. Den Mäusen wurde Anti-IL-17A Antikörper intranasal am Tag 5 und 8 bzw. am Tag 8 und 11 oder rekombinantes IL-17A Zytokin am Tag 5 und 8 verabreicht.

3.2.3.1 Lokale Behandlung mit IL-17A inhibiert die Proliferation der CD4 positiven T-Zellen im murinen Lungen-Adenokarzinom Modell

Regulatorische T-Zellen (Treg) gehören zu den CD4-positiven T-Zellen. Sie nehmen aufgrund ihrer spezifischen Funktion eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz ein. Sie limitieren die Autoimmunität und Immunpathologie, indem sie suppressorisch auf T-Zell-Effektorantworten wirken. Ein supprimierender Effekt wurde auch für die Immunreaktionen gegen Tumorantigene beschrieben. Regulatorische T-Zellen konnten in großer Zahl in Tumorgewebe nachgewiesen werden, wo sie Effektorfunktionen von zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen und anderen Immunzellen gegen Tumorantigene hemmen. Bei T-Lymphozyten unterdrücken sie sowohl die Proliferation als auch die zytotoxische Aktivität. Somit unterstützen sie das Tumorwachstum (137). Zur Untersuchung der suppressorischen Fähigkeit der regulatorischen T-Zellen wurde in dieser Arbeit die Proliferationsassay mit CFSE-Färbung durchgeführt.

BALB/cJ Mäusen wurden 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen intravenös injiziert und das IL-17A Zytokin zweimal intranasal am fünften und am achten Tag verabreicht. Die CD4-positiven T-Zellen wurden aus der Lunge isoliert und mit CFSE gefärbt. Ein Tag nach der CFSE-Färbung wurde die Intensität der CD4-positiven T-Zellen mittels FACS gemessen. Die CD4-positiven T-Zellen haben bereits ihre erste mitotische Zellteilung

(M1) hinter sich. Die meisten Zellen befinden sich im M1. Am vierten Tag wurde die zweite Messung durchgeführt. In den vergangenen 4 Tagen proliferierten die CD4-positiven T-Zellen unter der Kontrolle der regulatorischen T-Zellen. Mithilfe der M1, wurden die weiteren mitotischen Zyklen ausgewertet. Die angegebenen Zahlen in M1 bis M6 sagen wie viele Zellen am vierten Tag in der angegebenen mitotischen Phasen befinden (**Abbildung 3.17.**).

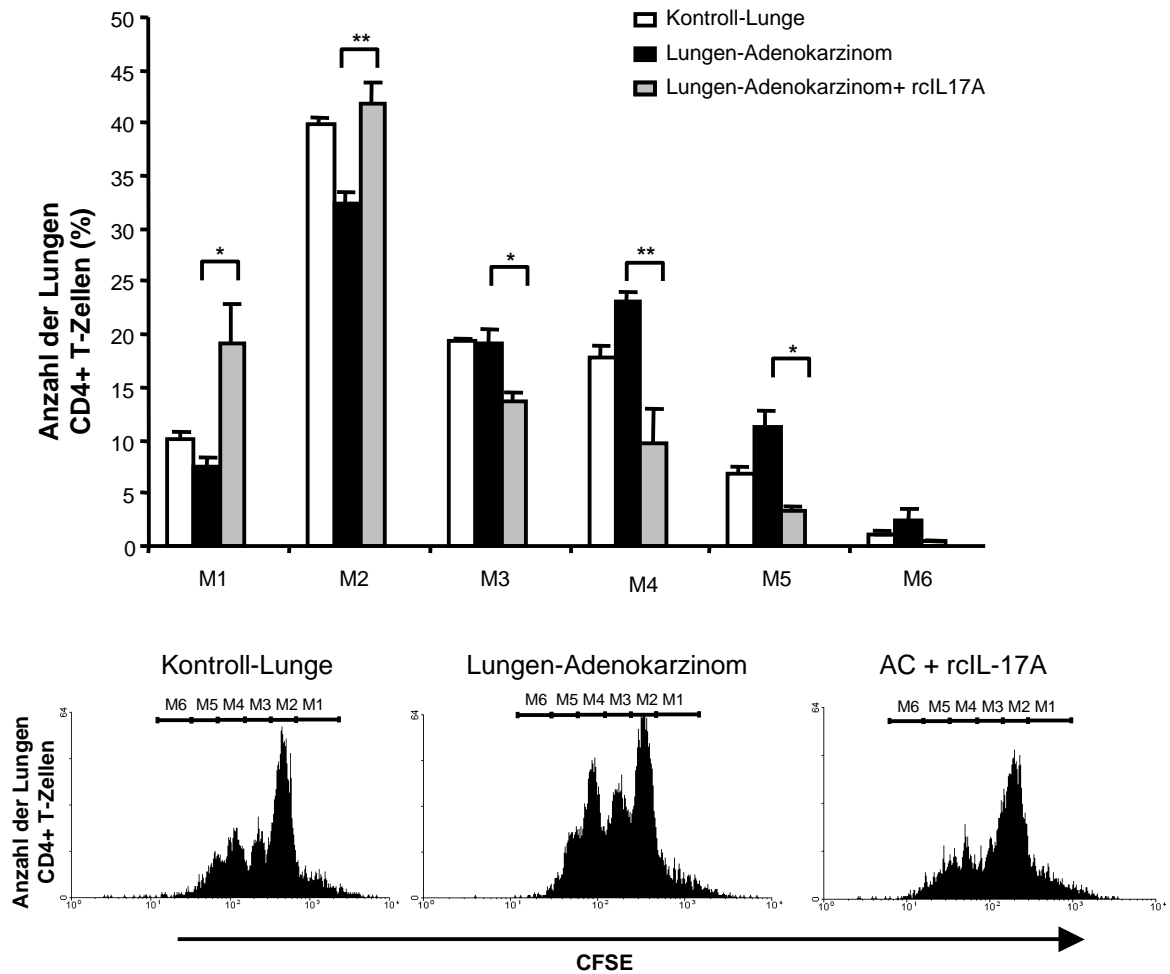


Abbildung 3.17. IL-17A hemmt die Proliferation der CD4+ T-Zellen in einem *in vivo* Lungentumormodell.

Um die Proliferation der CD4+ T-Zellen zu untersuchen, wurden die CD4+ T-Zellen aus der Lunge isoliert und mit CFSE gefärbt. 4 Tage nach dem Ausplattieren der Zellen wurde die Intensität der CFSE-Färbung mittels FACS analysiert. Das Balkendiagramm zeigt eine gehemmte Proliferation der Lungen CD4+ T-Zellen nach der Behandlung mit rekombinanten (r) IL-17A- im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe. (* = P < 0.05, ** = P < 0.01).

3.2.3.2 Lokale Blockade des Anti-IL-17A Antikörper reduziert den Tumorbefall in der Lunge

Die **Abbildung 3.18.** zeigt, dass die frühere Blockade von IL-17A das Tumorstadium in der Lunge im Vergleich zu unbehandelten Mäusen, reduziert. Auch die spätere Verabreichung von Antikörpern scheint ebenfalls eine tumorreduzierende Wirkung zu haben, jedoch nicht signifikant im Vergleich mit der Tumorkontrollgruppe.

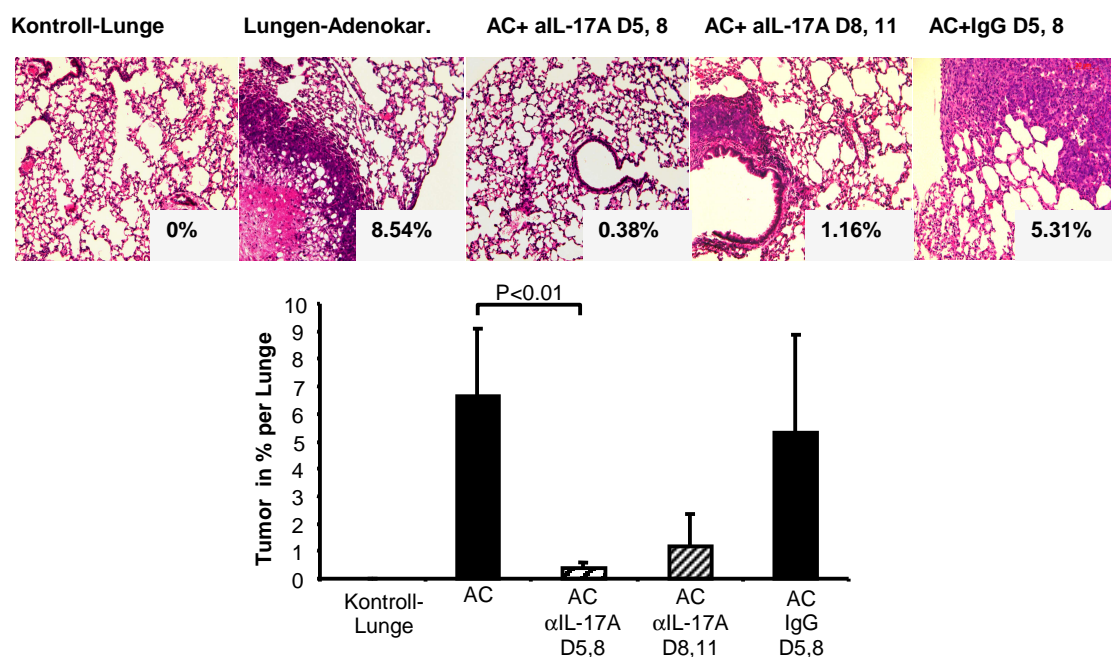


Abbildung 3.18. Lokale Blockade von IL-17A durch therapeutische Verabreichung von Anti-IL-17A Antikörper erzielte eine Verbesserung im Krankheitsverlauf des Lungen-Adenokarzinoms in Mäusen.

In BALB/cJ Mäusen wurden 2×10^5 L1C2 Tumorzellen intravenös injiziert. Anti-IL-17A Antikörper wurde zweimal und zu unterschiedlichen Zeitpunkten intranasal verabreicht. In der Gruppe mit der früheren Behandlung wurde am Tag 5 und am Tag 8 und in der Gruppe mit der späteren Behandlung am Tag 8 und Tag 11 mit Antikörper intranasal behandelt. Am Tag 21 wurden die Lungen histopathologisch mittels Hämatoxylin-Eosin Färbung analysiert. Es wurden die Mittelwerte der prozentuellen Anteile des Tumorbefalls per Lungenschnitt berechnet und graphisch dargestellt. Die therapeutische Verabreichung von Anti-IL-17A Antikörper zeigte eine signifikante Reduzierung des Tumorgewebes in den behandelten Lungen. Adenokarzinom=AC

3.2.3.3 Lokale Anti-IL-17A Antikörper Behandlung erhöht die Anzahl der T-Effektorzellen und reduziert gleichzeitig die Anzahl der CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatorischen T-Zellen

Neben der Beurteilung des Tumorbefalls im Lungengewebe wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle mittels Durchflusszytometrie analysiert, um sowohl die *in vivo* stimulierten Zellen als auch ihren Maturierungs- bzw. Differenzierungszustand besser bestimmen zu können. Hierfür wurde eine Oberflächenfärbung für CD25 (IL-2 Rezeptor α -Kette) und die CD4-Kette vorgenommen und nach deren Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran die intrazelluläre Färbung für FOXP3 durchgeführt. CD4+ und CD25+ Doppelpositive Zellen sind aktivierte T-Zellen. Die CD4+ CD25+ FOXP3+ dreifachpositive Zellen definieren die regulatorischen T-Zellen. Anschließend wurden die Proben mit dem Durchflußzytometer gemessen und ausgewertet.

Da in der Lunge mehrere Zellpopulationen mit unterschiedlicher Größe und Granularität vorkommen, musste die zu untersuchende Population von den restlichen Zellpopulationen abgegrenzt werden. Hierzu wertet das FACS-Gerät die Daten der Streuung von ausgesendetem Laserlicht aus, wobei die Vorwärts- (Größe = FSC) und Seitwärtsstreuung (Granularität = SSC) gemessen wurden. Somit konnte die Lymphozytenpopulation durch ihre Lage im Dotplot identifiziert werden (138). Damit entspricht die (links) eingegrenzte Population der Größe und der Beschaffenheit der Lymphozyten (**Abbildung 3.19.**) Anschließend wurden die Lymphozyten gegen CD4 und CD25 dargestellt. Der Upper Right (UR) Quadrant entspricht der CD4+ CD25+ Zellpopulation. Diese sind die aktivierten CD4+ T-Zellen. Die Untersuchung zeigt, dass die CD4+ CD25+ T-Effektorzellen in der Lunge der frühen Behandlung mit Anti-IL-17A Antikörper behandelten Mäuse im Vergleich mit der Tumor Kontroll-Gruppe hochreguliert sind.

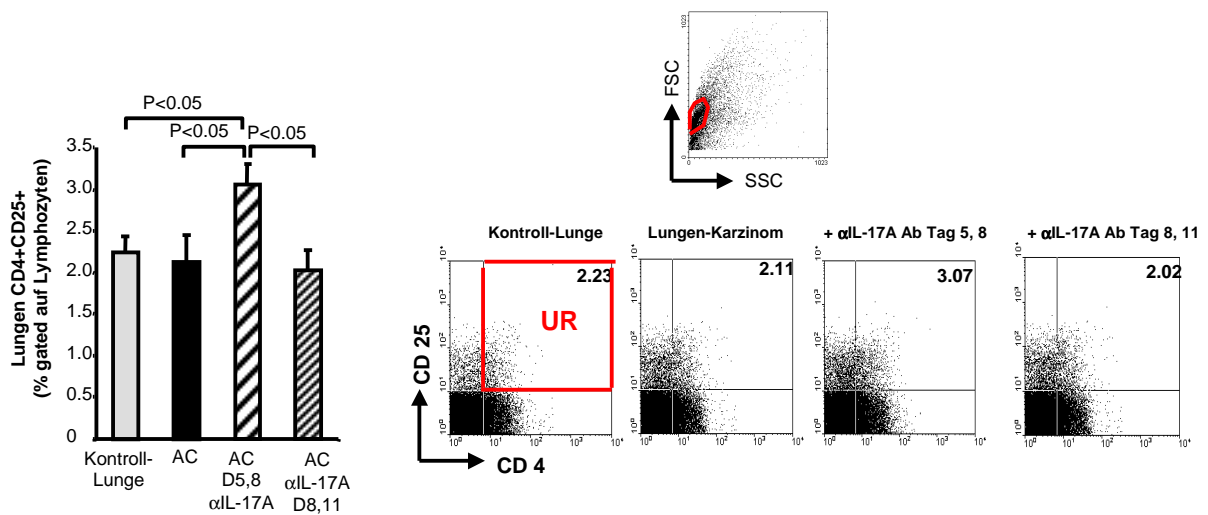


Abbildung 3.19. CD4+CD25+ T-Effektorzellen sind nach der lokalen IL-17A Blockade in der Lunge erhöht.

In BALB/cJ Mäuse wurden 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen intravenös injiziert. Anti-IL-17A Antikörper oder IgG wurde zweimal, an den Tagen 5 und 8, intranasal verabreicht. Am Tag 21 wurden die Lungen mit Hilfe der Durchflußcytometrie-Methode analysiert. Die Zellen in dem Quadrant sind auf die Lymphozyten gegatet und zeigen nach der therapeutischen Verabreichung von IL-17A Antikörper eine signifikante Erhöhung der CD4+CD25+ T-Effektorzellen.

Die Bedeutsamkeit der regulatorischen T-Zellen im Tumor ist bekannt (139). Regulatorische T-Zellen haben eine supprimierende Wirkung auf die Immunantwort gegen Tumoren.

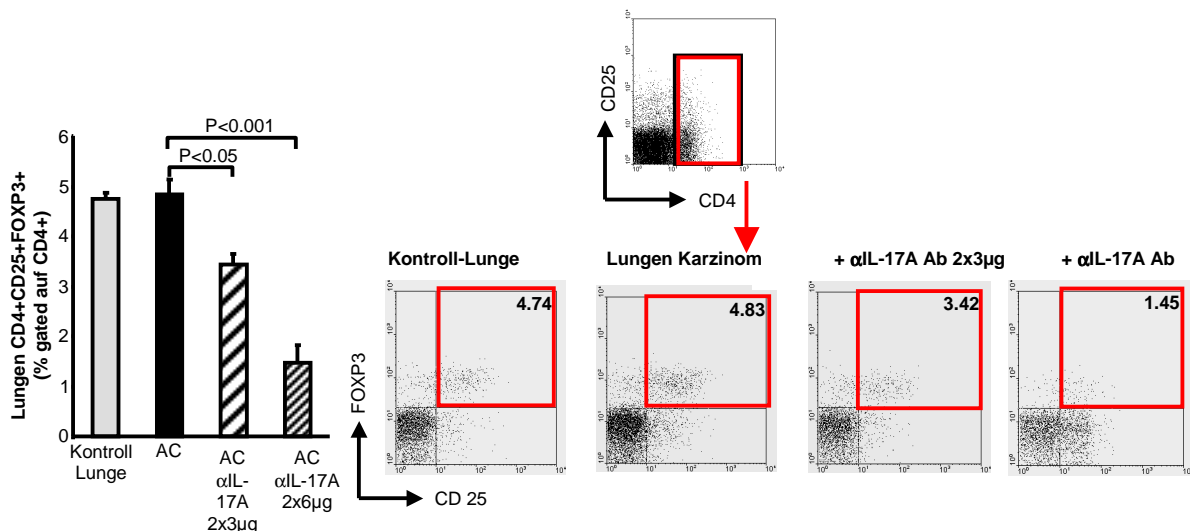


Abbildung 3.20. Lokale IL-17A Blockade reduziert die Expression der CD4+CD25+FOXP3+ T regulatorischen Zellen.

In BALB/cJ Mäuse wurden 2×10^5 L1C2 Tumorzellen intravenös injiziert. Anti-IL-17A Antikörper oder IgG wurde zweimal, an den Tagen 5 und 8, intranasal verabreicht. Am Tag 21 wurden die Lungen mit FACS analysiert. Die Zellen in den Dotplots sind auf die CD4+ T-Zellen gegatet und zeigen eine signifikante Dosis-abhängige Reduktion von CD4+CD25+FOXP3 T regulatorischen Zellen nach der therapeutischen Verabreichung von IL-17A Antikörpern. AC = Lungen-Adenokarzinom.

In der Auswertung wurden zuerst die Lymphozyten im FSC/SSC Dot Blot eingegrenzt und anschließend die CD4⁺ T-Zellen von den Lymphozyten isoliert. Die Zellen, die in den Dot Blots zu sehen sind, sind CD4⁺ T-Zellen. Die CD4⁺ T-Zellen wurden gegen CD25 und FOXP3 dargestellt. Das Upper Right Panel enthält also die CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ dreifachpositive Zellen. Die Anti-IL-17A Antikörper Behandlung verursachte eine Erniedrigung von regulatorischen T-Zellen in einer dosisabhängigen Weise (**Abbildung 3.20.**) im Vergleich zu der Tumorkontrollgruppe.

Es ist anzunehmen, dass die Reduktion der regulatorischen T-Zellen zum Teil dafür verantwortlich ist, dass das Tumorwachstum verlangsamt wurde.

3.2.3.4 Bestimmung der Th1-Zytokine in der Lunge der Anti-IL-17A behandelten Mäuse

Um die Immunantwort im Lungen-Adenokarzinom besser zu erforschen, wurden CD4⁺ T-Lymphozyten von den Lungenzellen mit Hilfe positiver magnetischer Separation isoliert. Nach der Bestimmung der CD4⁺ T-Zellzahl wurden die Zellen in einer Konzentration von einer 1×10^6 Zellen pro Milliliter in Zellkulturplatten ausplattiert. Die Zellen wurden mit Anti-CD3 und Anti-CD28 Antikörper-Stimulation für 24 Stunden kultiviert. Die Stimulation sorgt dafür, dass die CD4⁺ T-Zellen nicht absterben und Zytokine absondern. Die Zytokine wurden in den CD4⁺ T-Zellüberständen mittels ELISA quantifiziert.

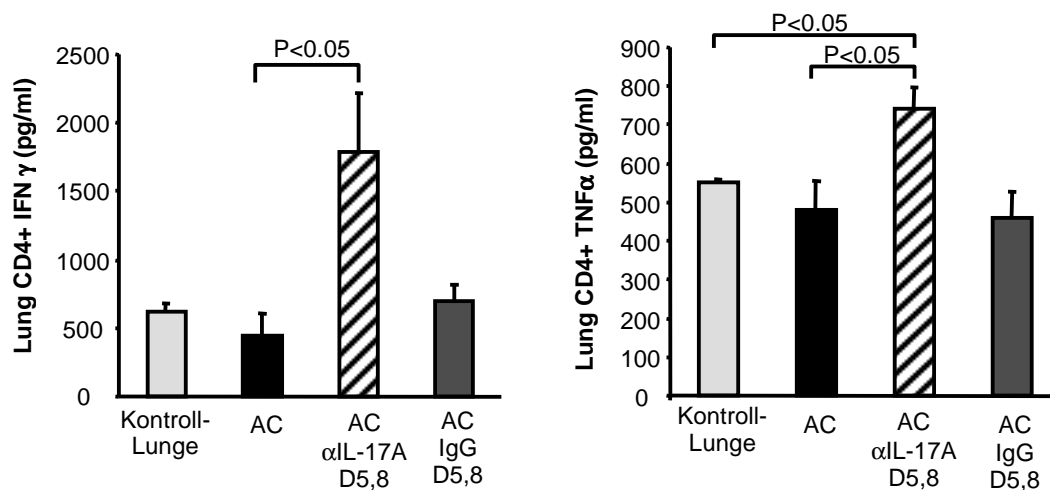


Abbildung 3.21. Lungen CD4+ T-Zellen nach der lokalen Blockade von IL-17 produzieren erhöhte IFN γ und TNF α Zytokine als die unbehandelten Lungen mit Adenokarzinom.

In BALB/cJ Mäuse wurden 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen intravenös injiziert. Anti-IL-17A Antikörper oder IgG wurde zweimal, an den Tagen 5 und 8, intranasal verabreicht. Am Tag 21 wurden die Lungen CD4+ T-Lymphozyten mit positiver Selektion separiert und 24 Stunden lang mit Anti-CD3 und Anti-CD28 Antikörper in der Zellkultur stimuliert. Die antitumoral wirkenden Zytokine IFN γ und TNF α wurden in den CD4+ Überständen mittels ELISA analysiert.

Wie an der Auswertung des ELISA in **Abbildung 3.21.** erkennbar ist, sezernieren die CD4+ T-Lymphozyten aus den mit Anti-IL-17A Antikörper behandelten Mäuse die dreifache Menge an IFN γ und die eineinhalbfache Menge an TNF α im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe.

IFN γ und **TNF α** sind Zytokine, die von Th1 T-Effektorzellen produziert werden und eine antitumorale Wirkung haben (140). IFN γ wird bereits in der klinischen Behandlung von Patienten eingesetzt.

Zusammenfassend: eine frühe Verabreichung von Anti-IL-17A Antikörper (lokal appliziert) mindert den Tumorbefall in der Lunge. Dieser Effekt wird von den ausgeschütteten Zytokinen IFN γ und TNF α bewirkt. Zusätzlich dazu gibt es eine weitere nennenswerte Wirkung: die Zahl der T regulatorischen Zellen geht signifikant zurück, so dass sich der Wirkmechanismus der T-Effektorzellen besser entfalten kann.

Um die *in vivo*-Situation nachzuahmen und den Wirkmechanismus der Antikörperbehandlung zu verstehen, wurde ein *in vitro*-Experiment durchgeführt: Den BALB/cJ Mäuse wurden L1C2 Tumorzellen injiziert und nach 6 Tagen die Lunge entnommen. Aus den Lungen von injizierten und nicht injizierten Mäusen wurden CD4+ T Lymphozyten isoliert und für 3 Tage mit Anti-CD3/28 Antikörpern und IL-2 kultiviert. Die CD4+ T-Zellen wurden mit 3µg/ml Anti-IL-17A Antikörpern (oder Kontroll-IgG) behandelt. Nach 3 Tagen wurden die CD4+ Überstände gesammelt und IFN γ mittels ELISA quantifiziert.

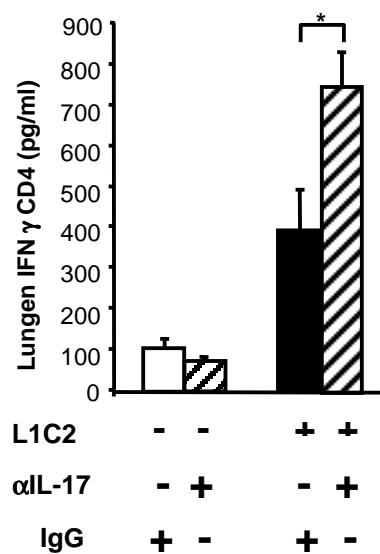


Abbildung 3.22. CD4+ T-Lymphozyten aus der Lunge mit Adenokarzinom produzieren mehr IFN γ *in vitro* nach Blockade mit Anti-IL-17A Antikörper als die CD4+ T Lymphozyten, welche mit Kontroll-IgG behandelt wurden.

In BALB/cJ Mäuse wurden 2×10^5 L1C2 Karzinomzellen intravenös injiziert und am Tag 6 CD4+ T-Zellen aus der Lunge isoliert. Die CD4+ T-Zellen wurden für weitere 3 Tage unter Zugabe von Anti-IL-17A Antikörper (3µg/ml oder Kontroll-IgG), Anti-CD28, Anti-CD3 und IL-2 (25U / ml) stimuliert. IFN γ wurde in CD4+ Überständen mittels ELISA quantifiziert.

Die CD4+ T-Zellen, die mit Anti-IL-17A Antikörper neutralisiert wurden, produzierten signifikant mehr IFN γ (**Abbildung 3.22.**), als die Kontroll-Gruppe mit IgG. Allerdings hatte die IL-17A-Neutralisierung nur in den Lungen CD4+ T-Zellen von L1C2 Tumorzellen injizierten Mäusen einen Effekt.

Aber wie funktioniert eine Neutralisation mit Antikörpern? Das Immunglobulin hat eine spezifische Region: das variable Segment des Immunglobulins. Diese Sequenzen erkennen das Target auf dem IL-17A Zytokin und binden sich daran.

Durch die Bindung von Immunglobulin und IL-17A, wird das Zytokin daran gehindert, sich an den Rezeptor zu binden.

Jedoch gibt es noch andere Alternativen für eine Neutralisation von Zytokinen z.B. mit *small interfering RNA*-s (siRNA). Die Sequenzen der siRNA sind komplementär zur Target-mRNA – in diesem Fall zu IL-17A. Die siRNA landet nach der Nukleofektion in dem Zellkern und verknüpft sich mit der mRNA für IL-17A. So kann die Proteinproduktion nicht stattfinden. Im Prinzip ist die Neutralisierung mit siRNA zu IL-17A eine upstream Blockierung.

Von naiven BALB/cJ Mäusen wurden CD4⁺ T-Milzzellen isoliert und ein fünftägiges Th17 Differenzierungsprotokoll angefangen. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit Anti-CD3/28, Anti-IL4, Anti-IFN γ Antikörpern und rekombinatem TGF β sowie IL-6 inkubiert. Am dritten Tag wurden die Zellen in 2 Wells aufgeteilt und IL-2 dem Medium zugegeben. Am fünften Tag sind die CD4⁺ T-Zellen zu Th17 Zellen differenziert und produzieren erwartungsgemäß IL-17A. Eine Gruppe wurde mit siRNA behandelt (nukleofiziert), und am nächsten Tag wurde die RNA aus den CD4⁺ T-Zellen extrahiert und die Überstände weggefroren. cDNA wurde mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert. IL-17A und IFN γ wurden in der cDNA mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert.

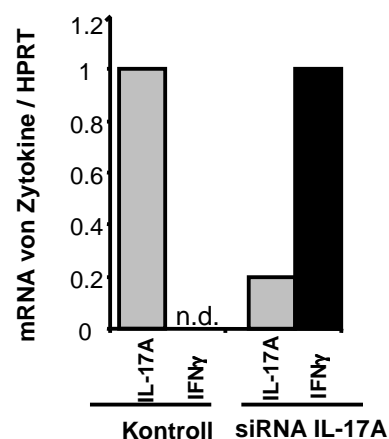


Abbildung 3.23. Blockade von IL-17A mit Hilfe von siRNA programmiert die IL-17A produzierenden T-Zellen zu IFN γ -produzierenden T-Zellen um.

CD4⁺ T-Lymphozyten wurden aus der Milz unbehandelter BALB/cJ Mäuse isoliert und 5 Tage lang mit Anti-CD3, Anti-CD28, TGF β , IL-6, Anti-IL-4 und Anti-IFN γ (Konzentration siehe 2.2.7) stimuliert. Folglich entstand eine IL-17A produzierende Population (Th17). Am fünften Tag wurden die CD4⁺ T-Zellen mit IL-17A -siRNA behandelt und am sechsten Tag RNA aus den CD4⁺ T-Lymphozyten extrahiert. IL-17A und IFN γ wurden mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert. Kontroll-CD4⁺ T-Lymphozyten exprimieren IL-17A. Die siRNA behandelten CD4⁺ T-Zellen produzieren dagegen IFN γ . n.d. = nicht detektierbar.

Die Kontroll-CD4⁺ T-Zellen, die keine siRNA Behandlung bekommen haben, produzierten nur IL-17 mRNA und keine IFN γ -mRNA (**Abbildung 3.23. links**). Dagegen produzierten die mit siRNA behandelten CD4⁺ T-Zellen größtenteils IFN γ und wenig IL-17A mRNA. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, weil sie beweisen, dass die bereits differenzierte CD4⁺Th17 Zellen fähig sind, nach der Neutralisation von IL-17A zu CD4⁺ Th1 Zellen umprogrammiert werden können.

3.2.3.5 Hyperproliferation der CD4⁺ T-Lymphozyten in der Lunge nach lokaler Blockade mit Anti-IL-17A Antikörper

Wie bereits erwähnt, haben die regulatorischen T-Zellen eine supprimierende Wirkung auf die T-Effektorzellen. Um die Funktionsfähigkeit der regulatorischen T-Zellen nachzuweisen, wurden CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge mit intrazytoplasmatischem Vitalfarbstoff CFSE gefärbt und über 4 Tage mit Anti-CD3/28 Antikörpern kultiviert.

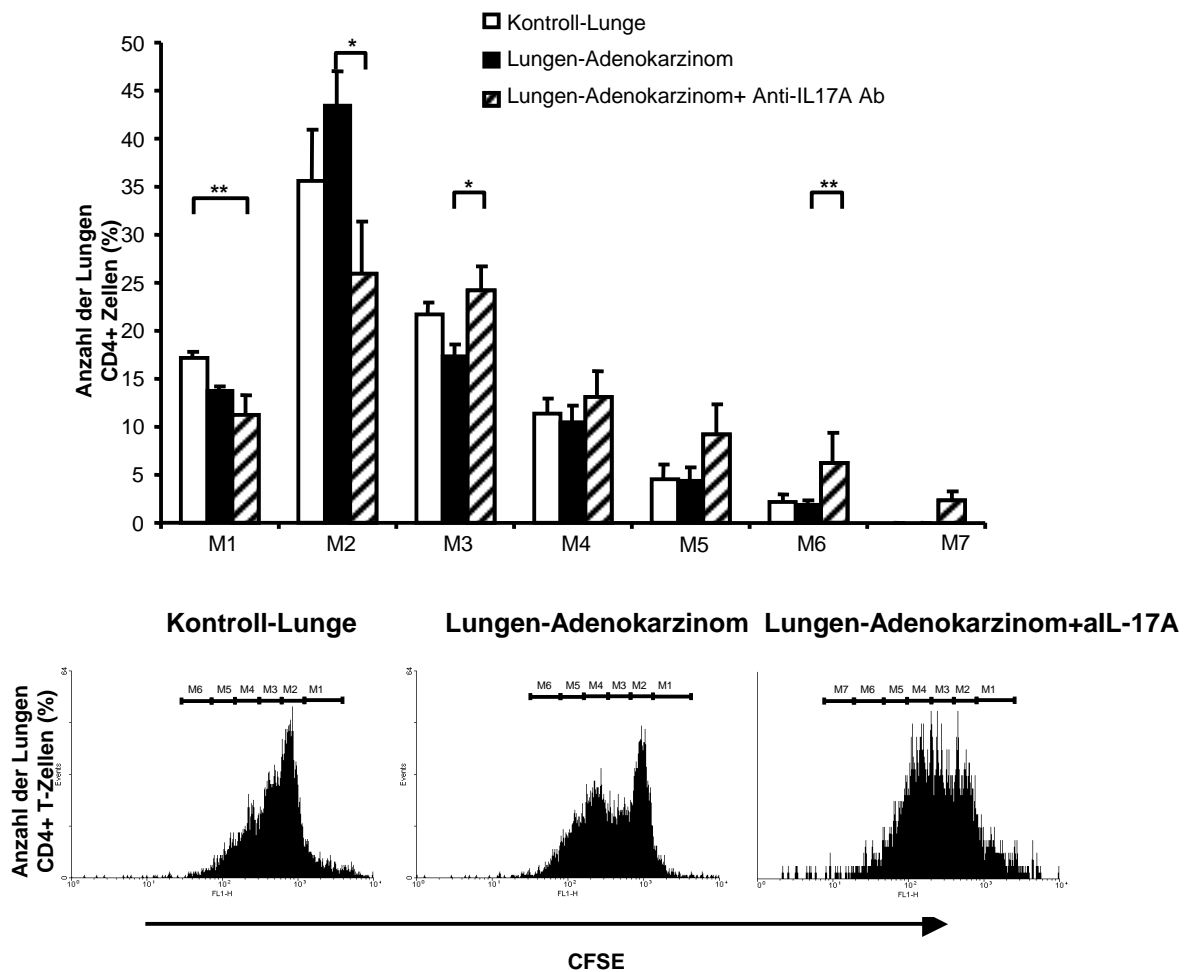


Abbildung 3.24. Lungen CD4+ T-Zellen zeigen eine erhöhte Proliferation nach *in vivo* Blockade mit Anti-IL-17A Antikörpern.

Für die Untersuchung der Proliferation wurden die CD4+ T-Zellen aus der Lunge isoliert und mit CFSE gefärbt. 4 Tage nach dem Ausplattieren der Zellen wurde die Intensität und Anzahl der CFSE markierten Zellen mittels FACS gemessen. Das Balkendiagramm zeigt eine Hyperproliferation der Anti-IL-17A Antikörper behandelten CD4+ T-Zellen im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe. (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$)

4 Tage nach der Isolation wurde die Intensität und die Anzahl der CFSE markierten Zellen mittels FACS gemessen. Wie in **Abbildung 3.24.** dargestellt, zeigten die CD4-positiven T-Zellen aus den Anti-IL-17A behandelten Mäusen eine höhere Teilungsrate im Vergleich zur Tumorkontrollgruppe. Dieses Phänomen kann durch die verminderte Anzahl der regulatorischen T-Zellen verursacht werden.

3.2.4 Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors *T Box Expressed in T Cells* (T-bet) in der IL-17A Blockade-Therapie

Nachdem die Ergebnisse darauf hinwiesen, dass es nach einer Neutralisation von Interleukin 17 in der Lunge zu einem Wechsel von Th17 zu Th1 CD4+ T-Zellen kam, musste bewiesen werden, dass die Th1–Antwort tatsächlich eine essenzielle Rolle in der Immunantwort gegen Tumor spielt. Dafür wurde dasselbe murine experimentelle Modell mit T-bet defizienten Mäusen durchgeführt. Bereits in der Einleitung wurde erwähnt, dass T-bet der Haupt-Transkriptionsfaktor für Th1 T-Effektorzellen ist, die die zelluläre Quelle von IFN γ darstellen.

Um sich einen Überblick über die T-bet-Expression im Menschen zu verschaffen, wurde eine T-bet Realtime PCR mit mRNA aus humanem Lungengewebe mit Adenokarzinom durchgeführt. Die RNA wurde aus 4 Kontroll-Geweben und 8 Lungen mit Adenokarzinom extrahiert und nach der reversen Transkriptase-Reaktion die quantitative real time PCR mit HPRT und T-bet durchgeführt. Die Analyse zeigt deutlich, dass die relative Expression von T-bet mRNA in den Lungen der Patienten mit Adenokarzinom herunterreguliert (**Abbildung 3.25**) ist.

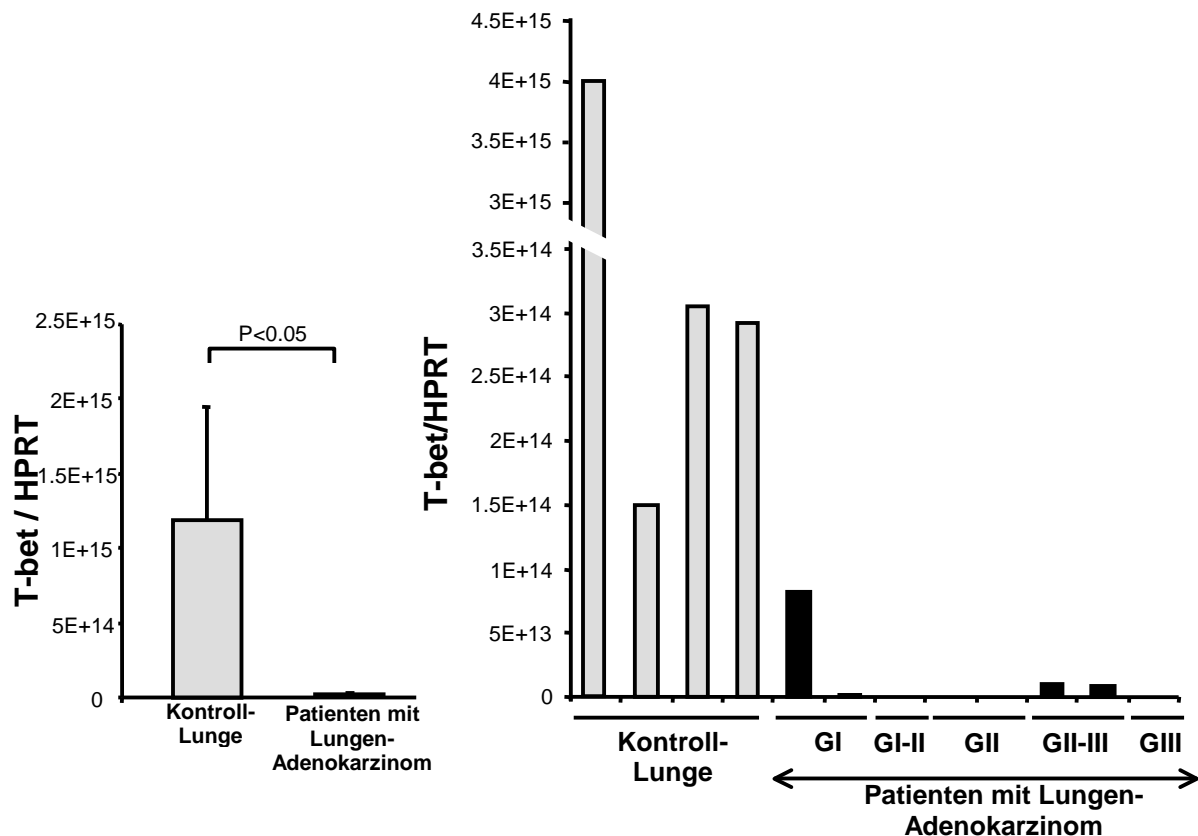


Abbildung 3.25. Die mRNA des Transkriptionsfaktors T-bet ist unterreguliert in den Patienten mit Lungen-Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungen.

mRNA wurde aus den Lungengeweben der Patienten extrahiert und nach reverser Transkription eine Real-time-PCR zum Nachweis von T-bet mRNA und HPRT mRNA durchgeführt. Die erhaltenen Werte für T-bet wurden auf die Expression des HPRT relativiert. Es wurden 4 Kontroll-Lungengewebe und 8 Lungen mit Adenokarzinom (2xG I, 1xG I-II, 2xG II, 2xGII-III, 1xGIII) untersucht.

Da die T-bet defizienten Mäuse während des 21 tägigen Experiments vorzeitig starben, musste der Versuch mit 14 tägiger Versuchsdauer wiederholt werden. Das vorzeitige Verenden der Versuchstiere ist ein weiterer Beweis dafür, dass T-bet eine essenzielle Rolle in der Immunantwort gegen den Tumor spielt.

Zu den bisher beschriebenen Gruppen wurden zusätzlich zwei weitere Versuchstiergruppen hinzugefügt. Am 8. Tag wurden die Mäuse intravenös mit Anti-GITR agonistischem Antikörper behandelt. Am Tag 14 wurde auch bei diesen Gruppen die Lungen entnommen und je ein Lungenflügel in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und die Schnitte histologisch untersucht.

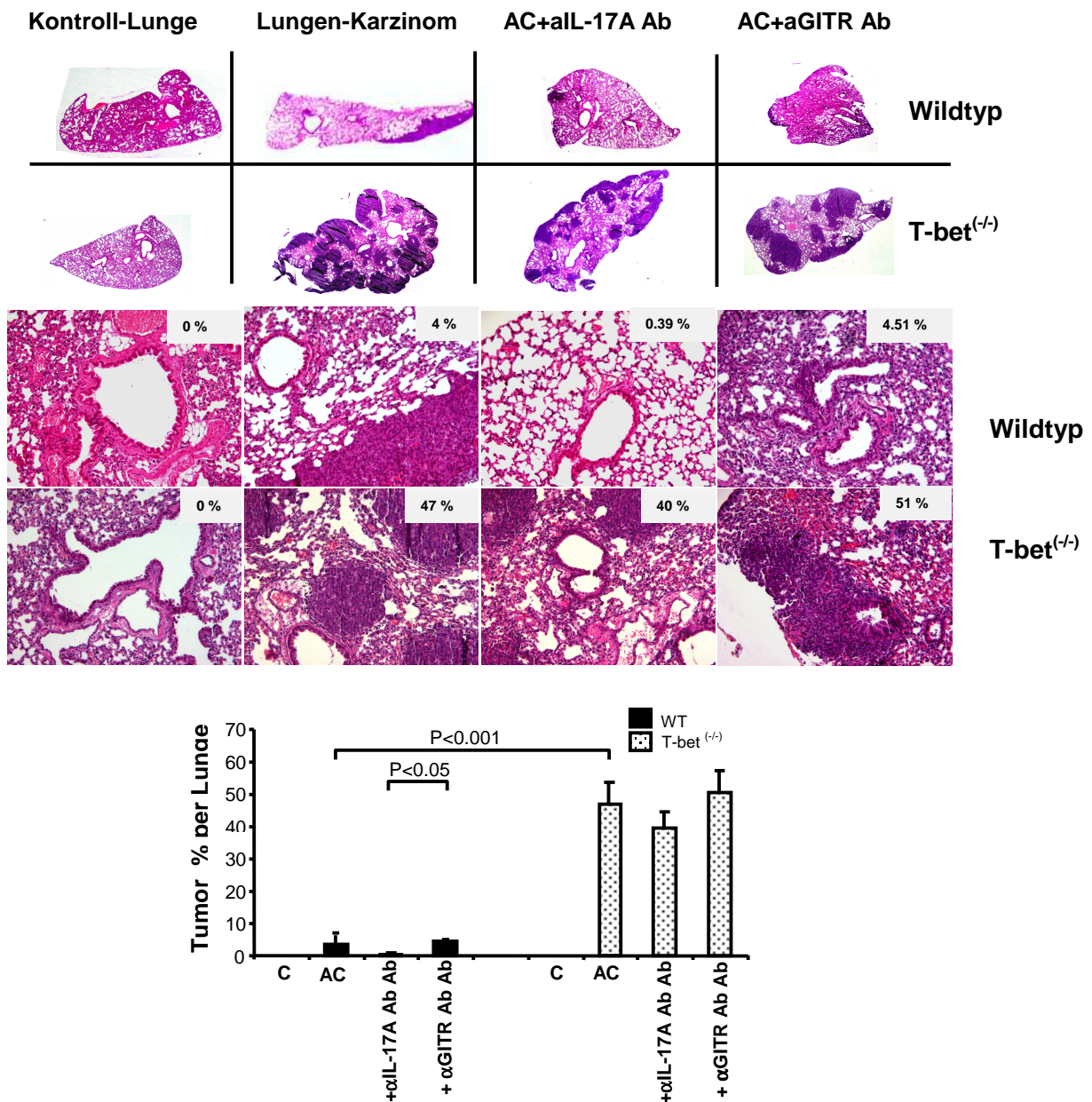


Abbildung 3.26. Der Transkriptionsfaktor T-bet spielt eine essenzielle Rolle in der Immunantwort gegen Adenokarzinom.

Wildtyp BALB/cJ und T-bet^(-/-) Mäuse wurden mit Karzinomzellen i.v. injiziert und am Tag 5 und 8 mit Anti-IL-17A Antikörper (i.n.) oder an Tag 8 mit Anti-GITR Antikörper (i.v.) behandelt. Die Lungen wurden am Tag 14 analysiert, da die T-bet^(-/-) Mäuse bis Tag 21 größtenteils gestorben waren (Versuch nicht gezeigt).

Je ein Teil der Lunge wurde in Paraffin eingebettet, die restlichen Teile mittels FACS und ELISA analysiert. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung zeigt, dass die T-bet KO Mäuse einen höheren Tumorbefall in der Lunge im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen haben. Die Bilder oben zeigen eine ca. fünffache Vergrößerung einzelner Lungen, die unteren eine ca. 100fache Vergrößerung.

Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und mit dem Stereo Mikroskop bei fünffacher Vergrößerung Aufnahmen gemacht. Die Tumorregionen färben sich dunkel-lila und lassen sich deutlich von dem normalen Gewebe der Lunge unterscheiden (**Abbildung 3.26. oben**). Die histologische Analyse wurde mit dem Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung vorgenommen. Bei der Auswertung der HE Schnitte konnte festgestellt werden, dass die Lungen der T-bet defizienten Mäuse einen zehn bis zwölfmal stärkeren Tumorbefall aufwiesen als die der Wildtyp-Mäuse. Der Unterschied innerhalb der Wildtyp-Gruppen konnte sich wegen der kurzen Inokulation der Tumorzellen (14 statt 21 Tage) nicht vollständig ausprägen. Dennoch ist ein Tendenz zu erkennen: die Tumor-Gruppe (4%) und die Anti-GITR (4.51%) Gruppe liegen in der gleichen Größenordnung im Vergleich zu Anti-IL-17A Antikörper behandelten Lungen mit 0.39% Tumorbefall. Das gleiche Muster ist bei den T-bet defizienten Mäusen zu erkennen, nur bedingt durch die relativ hohe Standardabweichung der Ergebnisse ist der Unterschied zwischen der Tumor-Gruppe und der Anti-GITR-Gruppe nicht signifikant ($p > 0,05$). Der zehn- bis zwölfmalige Befall der Lungen in den T-bet defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ist dagegen hoch signifikant ($p < 0,001$).

Die unerwarteten Ergebnisse der Anti-GITR Gruppen sind auf den ersten Blick schwer zu verstehen.

Glucocorticoid-induced Tumor necrosis factor (TNF) receptor family-Related gene (GITR) ist ein kostimulatorischer Rezeptor, der eine wichtige Rolle in der Funktion der regulatorischen T-Zellen spielt. Die regulatorischen T-Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche GITR in großer Menge und die Stimulation von GITR inhibiert die supprimierende Funktion der regulatorischen T-Zellen (141). Die Verabreichung des Anti-GITR Antikörpers verursacht einerseits autoimmune Krankheiten (142) in naiven Mäuse, andererseits eine effektive tumorspezifische Immunität, die bereits bestehende Tumore bekämpft (142). In diesem experimentellen Setting löste die Anti-GITR-Behandlung tatsächlich ein gesteigertes Tumorstadium sowohl in naiven als auch T-bet KO Mäusen aus.

Als Nächstes wurden die regulatorischen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

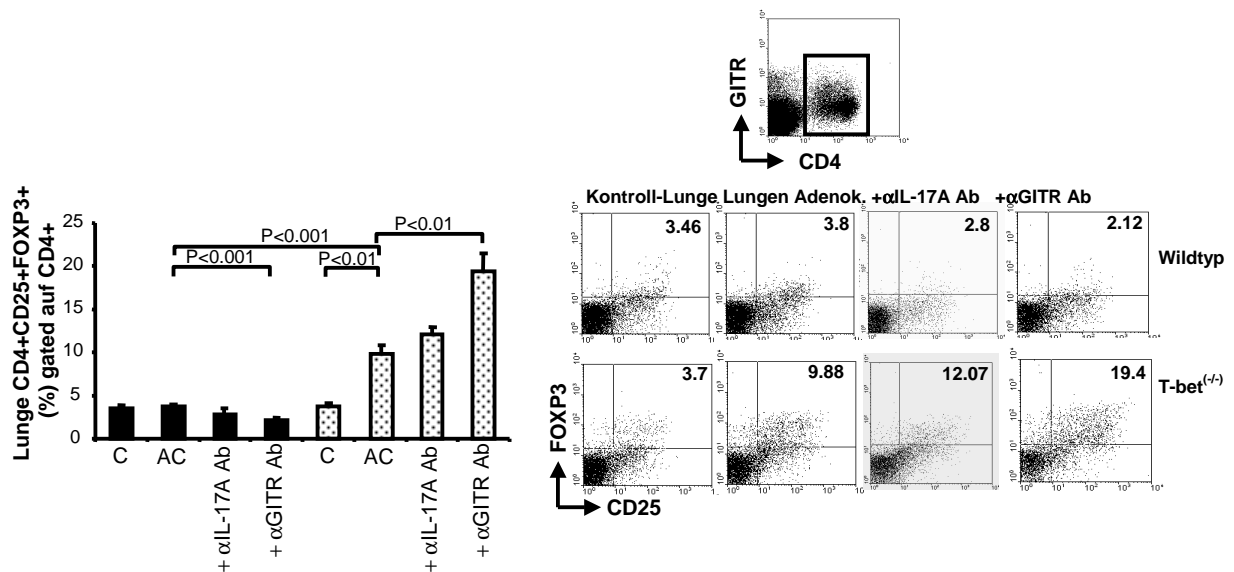


Abbildung 3.27. Lungen CD4+CD25+FOXP3+ regulatorische T-Zellen sind in den L1C2 Tumorzellen injizierten T-bet^(-/-) Mäusen hochreguliert.

Wildtyp BALB/cJ und T-bet^(-/-) Mäuse wurden mit 2x10⁵ L1C2 Karzinomzellen i.v. injiziert und am Tag 5 und 8 mit je 3µg Anti-IL-17A Antikörper (intranasal) oder 500µg Anti-GITR Antikörper (intravenös) behandelt. Die Lungen wurden am Tag 14 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Besonders sind die regulatorischen T-Zellen in den Anti-GITR behandelten T-bet^(-/-) Mäusen hochreguliert. C = Kontroll-Lunge, AC = Adenokarzinom, + = Adenokarzinom plus die deklarierte Behandlung.

Anhand der durchflusszytometrischen Dot Plots lässt sich feststellen, dass die T-bet defizienten Mäuse, in die L1C2-Zellen injiziert wurden, eine signifikant höhere Treg Population aufwiesen (**Abbildung 3.27.**)

- Im Durchschnitt 3.8% der CD4+ T-Zellen waren CD25+FOXP3+ in den Wildtyp-Mäusen mit Adenokarzinom.
- Dagegen hatten die T-bet defizienten Mäuse 9.88 % - das rund zweieinhalbfache der Wildtyp-Mäuse – an regulatorischen T-Zellen.
- Die T-bet^(-/-) Mäuse, welche mit Anti-IL-17A Antikörper behandelt wurden, wiesen 12.07% regulatorische T-Zellen auf, was keinen signifikanten Unterschied zu der T-bet^(-/-) Tumorkontrolle darstellt.
- Die T-bet^(-/-) Mäuse, welche mit Anti-GITR behandelt wurden, hatten den höchsten Anteil der CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen mit 19.40%. Hier konnte eine signifikante Erhöhung zur T-bet^(-/-) Tumorkontrollgruppe festgestellt werden (P<0.01).

Dieses Experiment lieferte noch eine weitere wichtige Information. Es wurde bestätigt, dass die nicht gespritzten T-bet^(-/-) Mäuse nicht mehr regulatorische T Zellen als die Wildtyp-Mäuse (3.46 % zu 3.70% der CD4+ T-Zellen) hatten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die signifikante Hochregulation der CD4+CD25+FOXP3+regulatorischen T-Zellen in T-bet^(-/-) Mäusen nur in den L1C2 gespritzten Mäusen auftrat.

Da man über die Zytokinfreisetzung der CD4+ T-Zellen wichtige Schlüsse über den Phenotyp der CD4+ T-Zellen ziehen kann, wurden die CD4+ T-Zellen aus den Lungen isoliert und für 24 Stunden mit Anti-CD3/28 Antikörpern in der Konzentration von 1x10⁶ Zellen pro ml Medium kultiviert. Anschließend wurden die Überstände der Zellen gesammelt und mittels ELISA die Zytokinfreisetzung analysiert.

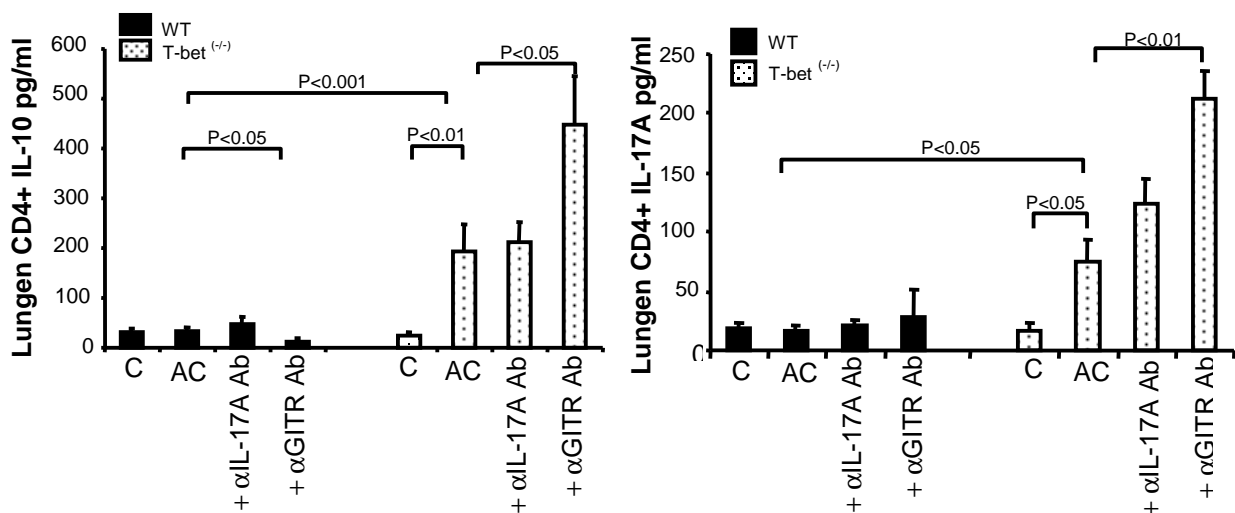


Abbildung 3.28. Lungen CD4+ T-Lymphozyten aus T-bet^(-/-) Mäusen mit Adenokarzinom produzieren eine erhöhte Menge an IL-10 und IL-17A im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

In Wildtyp BALB/cJ und T-bet^(-/-) Mäusen wurden 2x10⁵ L1C2 Karzinomzellen i.v. injiziert und am Tag 5 und 8 mit Anti-IL-17A oder Anti-GITR Antikörper behandelt. Am Tag 14 wurden die CD4+ T-Lymphozyten isoliert, ausplattiert und 24 Stunden mit Anti-CD3 und Anti-CD28 Antikörpern stimuliert. In den CD4+ Überständen wurden IL-10 und IL-17A mittels ELISA gemessen. Die CD4+ T-Zellen produzierten signifikant mehr IL-10 und IL-17A Zytokine in den T-bet^(-/-) Mäusen mit Adenokarzinom im Vergleich zu Wildtyp CD4+ T-Zellen. C = Kontroll-Lunge, AC = Adenokarzinom, + = Adenokarzinom plus deklarierte Behandlung.

Dabei ist erkennbar, dass die CD4+ T-Zellen der T-bet KO Mäuse eine erhöhte Menge an IL-10 und IL-17A Zytokine im Vergleich zu den der Wildtyp Mäuse freisetzen (**Abbildung 3.28**). Dieses Phänomen betraf nur die Mäuse mit L1C2

induziertem Lungen-Adenokarzinom . Die Anti-GITR Antikörper-Behandlung wirkte auf die IL-17 und IL-10 Produktion in den T-bet defizienten Mäusen stimulierend.

3.2.5 IL-17 Rezeptor als Target der IL-17 Blockade-Behandlung

Der IL-17 Rezeptor (IL-17R) spielt in dieser Studie eine wichtige Rolle. Die Bindung des IL-17 Zytokins an den IL-17 Rezeptor, löst eine Signaltransduktion aus. Um zu verstehen, wie die IL-17-Therapie funktioniert, ist grundlegend zu klären, welche Zellen den IL-17 Rezeptor exprimieren.

Anhand der humanen Ergebnisse lässt sich bereits vermuten, dass CD4+ T-Zellen den IL-17 Rezeptor haben, weil:

- in der Lunge der Patienten die Lymphozyten in der immunhistochemischen Färbung IL-17R positive Zellen gezeigt haben,
- die IL-17-Blockade eine Wirkung in T Effektor- und regulatorischen T-Zellen hervorgerufen hat.

Um diese Frage zu klären, wurden die Lungen von BALB/cJ naiven Mäusen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

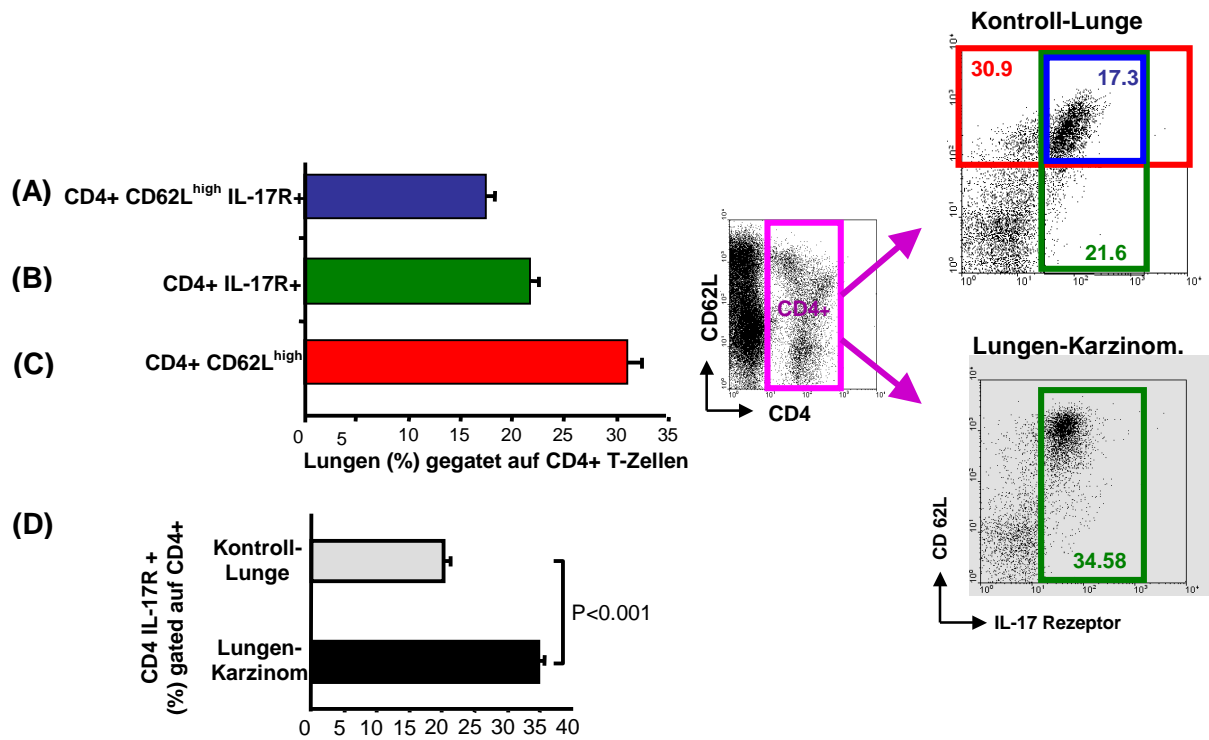


Abbildung 3.29. CD4+ T-Zellen, die IL-17 Rezeptor exprimieren, sind CD62L^{high}.

Die Lungenzellen wurden aus naiven BALB/cJ Mäusen mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** 17.3% der CD4+ T-Zellen exprimieren gleichzeitig CD62L^{high} und IL-17Rezeptor, upper right Panel (UR). **(B)** 21.6% der CD4+ T-Zellen exprimieren den IL-17 Rezeptor, UR und Lower right (LR) Panels. **(C)** 30.9% der CD4+ T-Zellen sind CD62L^{high} naive T-Zellen, upper left (UL) und UR Panels. **(D)** CD4+ IL-17 Rezeptor+ T-Zellen sind in der Lunge mit Adenokarzinom erhöht im Vergleich zur Kontroll-Lunge exprimiert.

Die FACS-Färbung zeigt, dass die naiven Mäuse ca. 20% der CD4+ T-Zellen IL-17 Rezeptor hatten (**Abbildung 3.29.B. grüne Markierung im Dot Plot**).

In diesem experimentellen Ansatz zeigten die CD4 positiven Zellen eine 30%-ige CD4 positiv, CD62L^{high} Population (**Abbildung 3.29.C. rote Markierung im Dot Plot**). Die CD4 und CD62Ligand^{high} doppelpositiven Zellen sind die naiven T-Zellen. Diese Zellen haben ein hohes Potenzial in eine bestimmte Subpopulation der CD4 positiven T-Zellen umgewandelt zu werden, zum Beispiel in Th1, Th2 oder Th17. Die Daten der durchflusszytometrischen Analyse genauer betrachtend erkennt man, dass ein hoher Anteil (56,3%) der naiven T-Zellen IL-17 Rezeptor exprimieren. Hierbei wurden die Quadranten Upper Right (UR) und Upper Left (UL) als 100% genommen und davon der prozentuelle Anteil des UR ausgerechnet. Das macht 17,3% der gesamten CD4 positiven Population aus (**Abbildung 3.29.A. blaue Markierung im Dot Plot**).

Da die IL-17-Blockade in den T Effektorzellen eine Wirkung hervorgerufen hat (**Abbildung 3.18.**), wurde der IL-17 Rezeptor in den aktivierten T-Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. CD69 ist ein Marker der aktivierten T-Zellen.

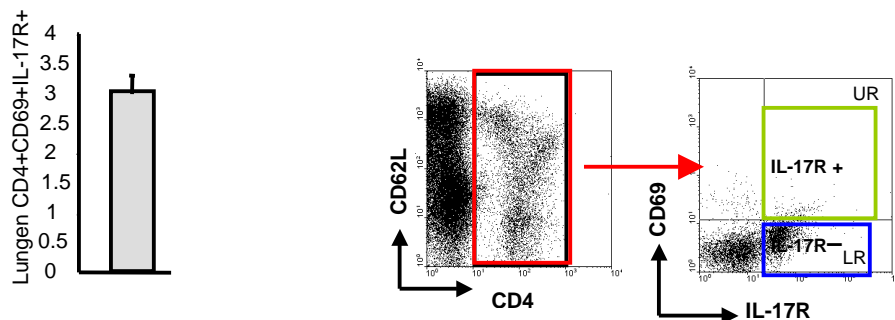


Abbildung 3.30. Nur ein geringer Anteil der CD4+ T-Zellen exprimiert CD69 und IL-17 Rezeptor gleichzeitig.

Die Lungenzellen wurden aus naiven BALB/cJ Mäusen isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Charakterisierung der Oberflächenmarker der CD4+ T-Zellen zeigte eindeutig, dass nur ein geringer Anteil der CD4, CD69 doppelpositiven T-Zellen den IL-17 Rezeptor exprimieren. UR Panel zeigt die CD4+CD69+IL-17 Rezeptor dreifachpositiven Zellen. LR Panel zeigt die CD4, IL-17 Rezeptor doppelpositiven Zellen.

Th1 oder Th17 Effektor Zellen sind im Allgemeinen auch aktivierte Zellen und exprimieren den CD69 Frühaktivierungsmarker. 2-4 % der CD4+ T-Zellen exprimieren CD69 (**Abbildung 3.30. Upper right panel**).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die naiven T-Zellen den IL-17 Rezeptor anfänglich exprimieren aber im Laufe der Differenzierung den Rezeptor verlieren.

Da die IL-17A Therapie die regulatorischen T-Zellen reduzieren konnte, war es von Bedeutung, die IL-17 Rezeptor-Expression auf den regulatorischen T-Zellen zu untersuchen. Die durchflusszytometrische Analyse der Lungenzellen hat ergeben, dass 0.60-1.20% der CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen den IL-17 Rezeptor exprimieren (**Abbildung 3.31**).

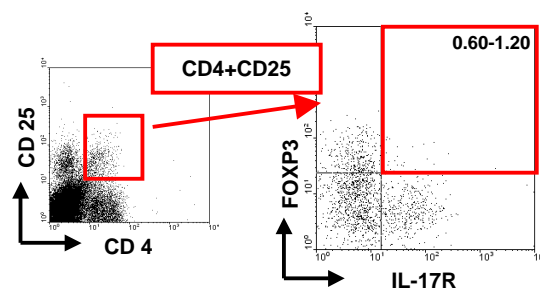


Abbildung 3.31. 0.60-1.20% der CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen exprimieren den IL-17 Rezeptor.

Die Lungenzellen wurden aus naiven BALB/cJ Mäusen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die regulatorischen T-Zellen haben überwiegend keinen IL-17 Rezeptor (bis zu 1.2%), was darauf deutet, dass IL-17 keine direkte Wirkung auf die regulatorischen T-Zellen hat.

Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die regulatorischen T-Zellen mit größter Wahrscheinlichkeit nicht unter dem **direkten** Einfluss von IL-17 stehen.

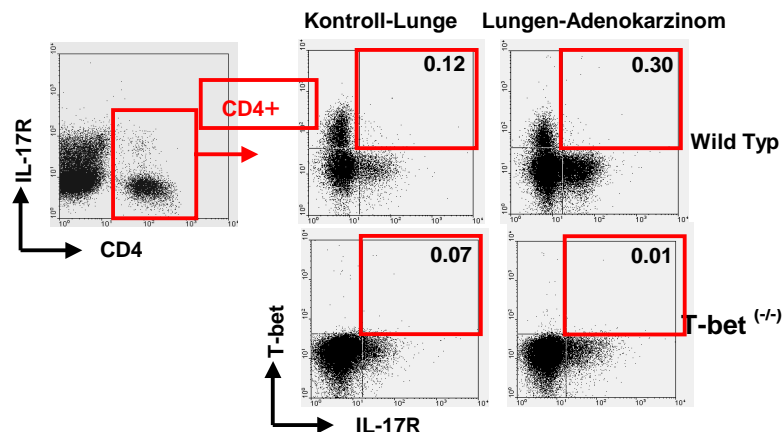


Abbildung 3.32. CD4+ T-bet+ Zellen (Th1) exprimieren keinen IL-17 Rezeptor in der Lunge.

In BALB/cJ - und T-bet defizienten Mäusen wurden 2×10^5 L1C2 Adenokarzinom Zellen intravenös injiziert. 21 Tage nach der Injektion wurden die Lungen mit FACS analysiert. CD4+ T-bet+ Zellen exprimieren bis zu 0.3% IL-17 Rezeptor. Die Zahlen in den Dot Plots verstehen sich als Prozente von den CD4+ T-Zellen.

Um die regulierenden Mechanismen von IL-17 auf CD4+ T-bet+ Zellen zu verstehen, wurden Lungenzellen in Wildtyp und T-bet defizienten Mäusen mittels FACS untersucht. Wie in der Einleitung bereits erklärt, T-bet ist der Haupt-Transkriptionsfaktor für Th1 Zellen und somit verantwortlich für die Produktion des antitumoral wirkenden IFN γ Zytokins.

Die **Abbildung 3.32.** zeigt, dass IL-17 Rezeptor von CD4+T-bet+ Th1 Zellen nicht exprimiert wird. Das deutet darauf hin, dass Th1 Zellen nicht unter der direkten Kontrolle von IL-17A stehen.

3.2.6 IFN γ Rezeptor in regulatorischen T-Zellen

Ein geringer Anteil der regulatorischen T-Zellen (0.6-1.20%) exprimiert IL-17 Rezeptor, was darauf deutet, dass sie nicht unter dem direkten Einfluss von IL-17 stehen (**Abbildung 3.31.**). Dennoch hat die IL-17 Blockade eine reduzierende

Wirkung auf die regulatorischen T-Zellen ausgeübt. Es ist schon bekannt, dass die regulatorischen T-Zellen von IFN γ kontrolliert (**Abbildung 3.30.**) werden (143).

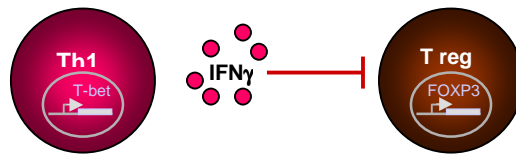


Abbildung 3.33. IFN γ -Th1 Zytokin- inhibiert FOXP3+ regulatorische T-Zellen.

In den T-bet defizienten Mäusen, die kein IFN γ produzieren können, wurde ein erhöhter Level von regulatorischen T-Zellen in den Tumor-Mäusen gemessen (**Abbildung 3.27.**). Obwohl die regulatorischen T-Zellen von IFN γ kontrolliert werden, können sie sich in den T-bet defizienten Mäusen (in Abwesenheit von IFN γ) unkontrolliert vermehren.

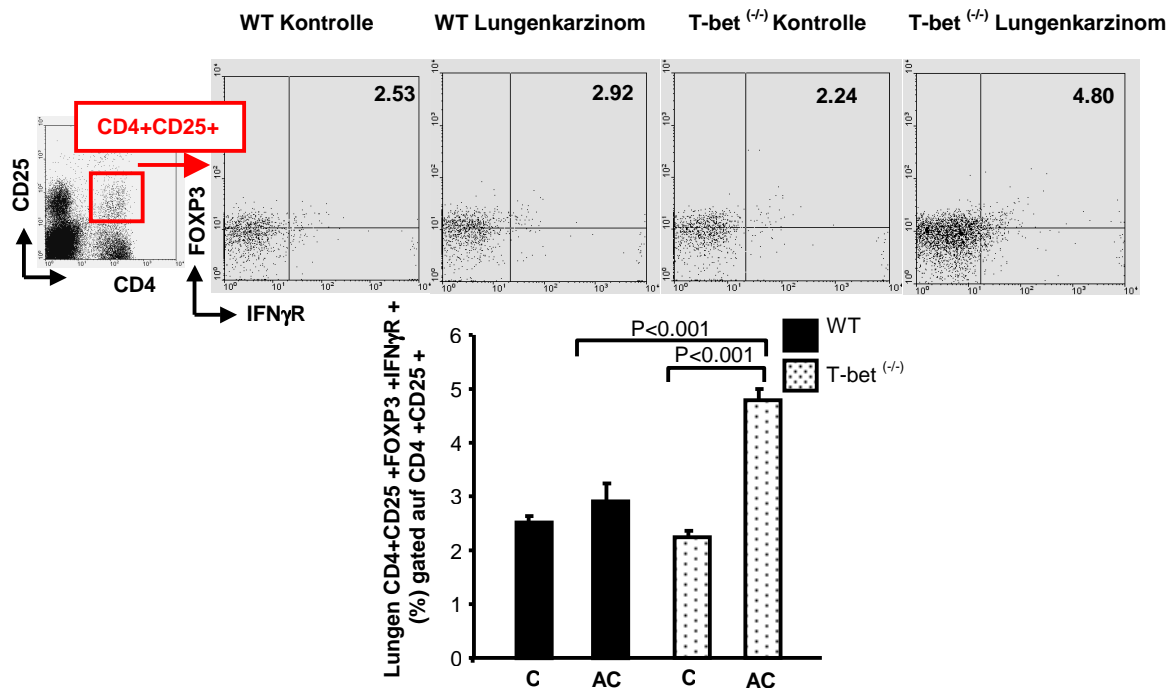


Abbildung 3.34. Der IFN γ Rezeptor ist in den T-bet defizienten Mäusen mit Lungen-Adenokarzinom hochreguliert.

In BALB/cJ und T-bet defizienten Mäusen wurden 2×10^5 L1C2 Adenokarzinom Zellen intravenös injiziert. Am Tag 21 wurden die Lungen mit Durchflusszytometrie analysiert. Die regulatorischen T-Zellen exprimieren IFN γ Rezeptor, der in den T-bet KO Mäusen mit Tumor signifikant erhöht exprimiert wird. C = Kontroll-Lunge, AC = Lungen-Adenokarzinom, WT= Wildtyp-Mäuse

Nach der Injektion von L1C2 Adenokarzinom-Zellen in T-bet KO und Wildtyp-Mäuse wurden die Lungenzellen separiert. Die Lungenzellen wurden mit den Marker für regulatorischen T-Zellen (CD4, CD25 und FOXP3) plus IFN γ -Rezeptor1 gefärbt und anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die **Abbildung 3.34.** zeigt, dass der IFN γ Rezeptor in den regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und die Expression steigt in den T-bet defizienten Mäusen mit Lungen-Adenokarzinom. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die regulatorischen T-Zellen nicht unter der direkten Kontrolle des IL-17A sondern unter der Kontrolle des IFN γ Zytokins stehen.

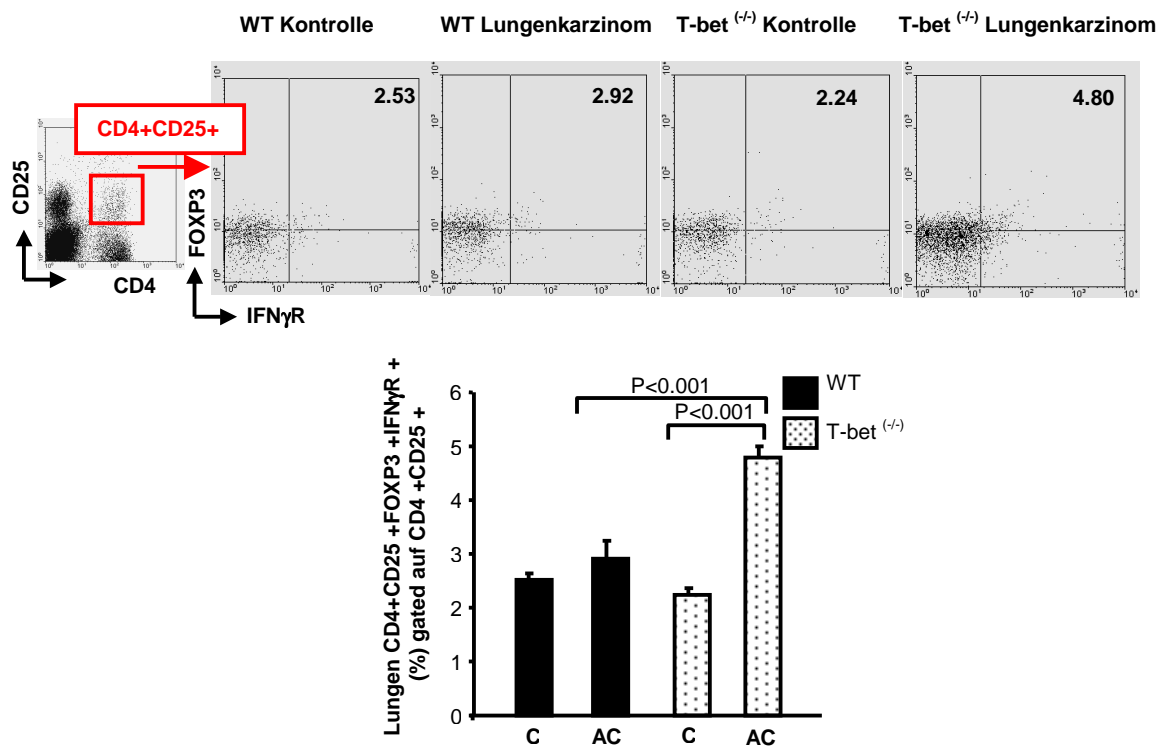


Abbildung 3.35. IFN γ Rezeptor ist in den T-bet defizienten Mäusen mit Lungen-Adenokarzinom hochreguliert.

In BALB/cJ und T-bet defizienten Mäusen wurden 2×10^5 L1C2 Adenokarzinom Zellen intravenös injiziert. Am Tag 21 wurden die Lungen mit Durchflusszytometrie analysiert. Die regulatorischen T-Zellen exprimieren IFN γ Rezeptor, der in den T-bet KO Mäusen mit Tumor signifikant erhöht exprimiert wird. C = Kontroll-Lunge, AC = Lungen-Adenokarzinom, WT= Wildtyp-Mäuse

Nach der Injektion von L1C2 Adenokarzinom Zellen in T-bet KO und Wildtyp-Mäuse wurde nach 21 Tagen die Lunge entnommen und eine Gesamtzellsuspension hergestellt. Die Lungenzellen wurden mit den Treg-Markern (CD4, CD25 und FOXP3) und Anti-IFN γ Rezeptor1 gefärbt und anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die **Abbildung 3.35.** zeigt, dass der IFN γ Rezeptor in den regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und eine signifikant erhöhte Expression in den T-bet defizienten Mäusen mit Lungen-Adenokarzinom haben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die regulatorischen T-Zellen nicht unter der direkten Kontrolle des IL-17A sondern unter der Kontrolle des IFN γ Zytokins stehen.

3.3 Zusammenfassung

Nachfolgend sind die Ergebnisse dieser Arbeit in Stichpunkten zusammengefasst:

Ergebnisse von murinen Lungen:

- 3.3.3.1 Interleukin 17A mRNA ist in den Lungen von Patienten mit Adenokarzinom im Gegensatz zu IL-17F hochreguliert .
- 3.3.3.2 RORA, RORC2, FOXP3, IL-6 und TGF β sind ebenfalls hochreguliert in den Lungen von Patienten mit Adenokarzinom.
- 3.3.3.3 Humane Lungen exprimieren IL-17 Rezeptor.

Ergebnisse aus dem murinen Lungen-Adenokarzinom Modell

1. In dem Mausmodell waren IL-17A, FOXP3, ROR γ t und IL-6 Proteine in der Lunge hochreguliert.
2. Die Zugabe von IL-17F konnte keine signifikante Veränderung in dem Tumorwachstum in der Lunge hervorrufen.
3. Lokale Blockade von IL-17A durch intranasale Gabe von Anti-IL-17A Antikörpern reduzierte das Tumorwachstum in der Lunge.
4. CD4+CD25+FOXP3+ T regulatorische Zellen waren runterreguliert in der Lunge der Mäuse mit lokaler Blockade von IL-17A.
5. CD4+ T-Zellen produzierten signifikant höhere Menge an IFN γ in der Lunge nach lokaler Blockade von IL-17A.
6. T-bet defiziente Mäuse wiesen bis zu zwölffach mehr Tumorbefall in der Lunge im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf.
7. T-bet defiziente Mäuse mit L1C2 Tumor-Zellen haben eine 2,5x größere regulatorische T-Zell-Population als die Wildtyp-Mäuse.

8. T-bet defiziente Mäuse mit L1C2 Tumor-Zellen sezernieren das vier- bis fünffache an IL-17A und IL-10 als Wildtyp-Mäuse.
9. Bis zu ca. 20% der CD4+ T-Zellen exprimieren IL-17 Rezeptor auf der Zelloberfläche.
10. Nur ein geringer Anteil der regulatorischen T-Zellen (0.6-1.20%) exprimiert IL-17 Rezeptor.
11. Th1 (T-bet+) Zellen exprimieren keinen IL-17 Rezeptor.
12. Regulatorische T-Zellen exprimieren IFN γ Rezeptor.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung des Interleukin-17 (IL-17) Zytokins, von dem es 6 verschiedene Arten gibt und dessen Bedeutung im Lungen-Adenokarzinom noch nicht erforscht wurde. Dabei wurden vor allem das zuerst entdeckte IL-17A und das dem IL-17A ähnlichste IL-17F untersucht. Die Proben der menschlichen Lungen für diese Arbeit wurden im Rahmen des Sonder-Forschungsbereichs 432 (SFB 432) von der Pathologie der Johannes Gutenberg - Universitätsklinik Mainz und von der Schweizer Tumorbank bezogen. Die für die Experimente verwendeten T-bet defizienten Mäuse wurden mit freundlicher Unterstützung von L. Glimcher von der Harvard Medical School zur Verfügung gestellt. Die zur Generierung des Adenokarzinoms verwendete Zelllinie wurde ab den 70er Jahren für maligne Tumormodelle etabliert (144). Der von L1C2 ausgelöste Lungentumor wurde histologisch als „Alveolar Cell Carcinoma“ identifiziert. „Alveolar Cell Carcinoma“ gehört zum Adenokarzinom (135, 145, 146). Das verwendete Mausmodell wurde vor einigen Jahren von Dr. J. Maxeiner, Dr. K. Sauer und P. Scholtes in der Arbeitsgruppe erfolgreich etabliert (123). Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit war neben der Charakterisierung des Lungen-Adenokarzinoms des Menschen die Funktion des IL-17 Zytokins in der Tumorphagenese zu untersuchen.

4.1 Charakterisierung der Lunge von Patienten mit Adenokarzinom

Das Lungen-Adenokarzinom ist die am häufigsten vorkommende Lungenkrebsart. Sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern, als auch bei Menschen unter 45 Jahren tritt diese Form des Lungenkarzinoms auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei nur 10% (147).

RORC2 und RORA sind beim Menschen die Äquivalente für die murinen Transkriptionsfaktoren ROR γ t und ROR α 4. Diese wurden als verantwortliche Transkriptionsfaktoren für Th17 identifiziert (82, 83). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RORC2 und RORA sowie IL-17A in den Patienten mit Lungen-

Adenokarzinom hochreguliert waren (**Abbildung 3.1.** und **3.2.**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-17A in der näheren Umgebung des Tumors induziert wird. Kryczek *et al.* haben in ihrer Publikation über das Ovarialkarzinom nachgewiesen, dass IL-17A im Tumor hochreguliert ist (134). Die Korrelation zwischen den Transkriptionsfaktoren und IL-17A (**Abbildung 3.3.**) vermittelt, dass diese Korrelation im Fall eines Lungen-Adenokarzinoms zunimmt im Vergleich mit den Kontroll-Lungengeweben. Der Korrelationskoeffizient zwischen RORC2 und IL-17A ist 0,8. Um eine sichere Aussage treffen zu können, muss jedoch das genaue Zusammenspiel von RORC2 und IL-17 untersucht werden, da die Korrelation nur beschreibt, wie die Beziehung zwischen zwei (oder mehreren) Variablen ist (148). Die Korrelation drückt nicht aus, ob sich diese zwei Varianten gegenseitig beeinflussen.

Dennoch ist anzunehmen, dass sich IL-17A und die Transkriptionsfaktoren tatsächlich beeinflussen. Doch um zu beweisen, dass sich RORC2 oder RORA IL-17A direkt beeinflussen sind weitere Experimente notwendig, die die funktionellen Zusammenhänge direkt veranschaulichen; zum Beispiel der direkte Nachweis einer Bindung von RORC2 Transkriptionsfaktor am IL-17A Promotor.

Des Weiteren hat die quantitative Real-Time PCR ergeben, dass der FOXP3 Transkriptionsfaktor in der Lunge der Patienten mit Adenokarzinom erhöht war (**Abbildung 3.10**). FOXP3 ist der Transkriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen. Die regulatorischen T-Zellen erfüllen im Immunsystem eine sehr wichtige Rolle. Sie kontrollieren die Aktivität sowohl des angeborenen als auch des adoptiven Immunsystems. In der Erforschung von Autoimmunkrankheiten und in der Tumorummunologie beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen mit regulatorischen T-Zellen. Im Fall des Lungen-Adenokarzinoms waren die FOXP3+ Zellen hochreguliert, so dass eine Immunantwort gegen den Tumor gehemmt wird. Das kann durchaus die negative Wirkung haben, dass das Tumorwachstum außer Kontrolle gerät. In der direkten Umgebung der Tumorregionen akkumulierten sich die FOXP3+ Zellen (**Abbildung 3.11.**). Auch die IL-17 (**Abbildung 3.5.**) und IL-17 Rezeptor positive Zellen (**Abbildung 3.8.**) waren hauptsächlich um die Tumorregionen herum verteilt. So ist es nicht auszuschließen, dass die T regulatorischen und die IL-17 positiven Zellen gemeinsam eine Wechselwirkung haben, die die Pathogenität des Tumors beeinflusst. Bettelli *et al.* beschreiben, dass die regulatorischen T-Zellen und Th17-

Zellen in einem reziproken Verhältnis zueinander stehen. Die pathologische Situation in dem Lungen-Adenokarzinom widerspricht jedoch diesen Aussagen.

4.2 Was ist mit IL-17F?

Interleukin-17F (IL-17F) und IL-17A sind Marker für Th17-Zellen, eine neue Linie der CD4+ T-Effektorzellen. Die Beteiligung von Interleukin-17 in Autoimmun- und Inflammatorischen Krankheiten ist bereits bewiesen (siehe Einleitung).

IL-17F stimmt zu 58% der Aminosäuresequenz mit IL-17A überein. Das ist die höchste Homologie innerhalb der IL-17 Familie (47). IL-17 Rezeptor ist essentiell für die IL-17A und die IL-17F Signaltransduktion in den Zellkern (59, 96). IL-17F und A scheinen auf ähnliche Art und Weise zu funktionieren. Beide induzieren IL-6, IL-8 und G-CSF Expression in Fibroblasten (53) und tragen so zu der Entzündung der Atemwege bei der Mukoviszidose bei (149).

Obwohl Veröffentlichungen belegen, dass IL-17F den selben zellulären Ursprung wie IL-17A hat (102), war die Expression von IL-17F nicht hochreguliert (**Abbildung 3.6.**). Das deutet darauf hin, dass IL-17A und IL-17F im Lungen-Adenokarzinom nicht die gleiche zelluläre Herkunft haben oder eine zeitliche Verzögerung der IL-17F Produktion bei diesen Zellen besteht. Die Beantwortung dieser Frage hätte jedoch den Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Den Mäusen wurde rekombinantes IL-17F an zwei verschiedenen Zeitpunkten verabreicht. Das Tumorwachstum war in den Lungen dieser Mäuse ausgeprägter als in den Lungen der Kontrolltiere (**Abbildung 3.16.**). Dennoch konnte eine deutliche Tendenz zur Verschlechterung der Pathogenese bei der früheren Applikation nachgewiesen werden.

4.3 Die Charakteristika des Mausmodells entsprechen dem durch die Zelllinie verursachten Lungen-Adenokarzinom des Menschen

Dieses Mausmodell wurde in der Arbeitsgruppe bei *Nuclear Factor of Activated T cells 2* (NFATc2)-Studien verwendet, aber die Parameter, die in der IL-17-Studie von Bedeutung sind, wurden noch nicht untersucht. Mit dieser Begründung wurden die Transkriptionsfaktoren FOXP3, ROR γ t und T-bet und bestimmte Zytokine wie die IL-17, IL-6 und TGF β 1-Expression analysiert. Die Analyse zeigt, dass IL-17A, ROR γ t, IL-6, FOXP3 und TGF β in den Mäusen mit L1C2 Applikation - genau wie in den Patienten mit Adenokarzinom, hochreguliert waren. Wie die **Abbildung 3.25.** zeigt, ist der Transkriptionsfaktor T-bet in den Patienten mit Lungen Adenokarzinom runterreguliert war. Im Gegensatz dazu kann beim Mausmodell keine konstante signifikante Reduktion des Transkriptionsfaktors T-bet und dem Zytokin IFN γ festgestellt werden (**Abbildung 4.1.**).

In vielen Fällen ist IFN γ im Lungen-Adenokarzinom verglichen mit Kontrolltieren reduziert, dennoch zeigt die Reduktion nicht immer eine Signifikanz.

RORA,- ROR α 4- und IL-17F wurden im Mausmodell nicht untersucht, da keine geeigneten Antikörper für Western Blot erhältlich waren.

Die IL-17 Rezeptor-Expression zeigte in der Lunge der Patienten keinen Unterschied verglichen mit Kontrollgewebe (**Abbildung 3.9.**). Im Mausmodell wurde IL-17 Rezeptor-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert, welche einen signifikant erhöhten Level zeigte (**Abbildung 3.29.D**). Das bedeutet, dass die IL-17 Rezeptor-Expression in Patienten und in der Maus im Lungen-Adenokarzinom einen Unterschied aufwiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Mausmodell dem Lungen-Adenokarzinom des Menschen entspricht, jedoch die T-bet und IL-17 Rezeptor-Expression Unterschiede erkennen lassen (**Abbildung 4.2**).

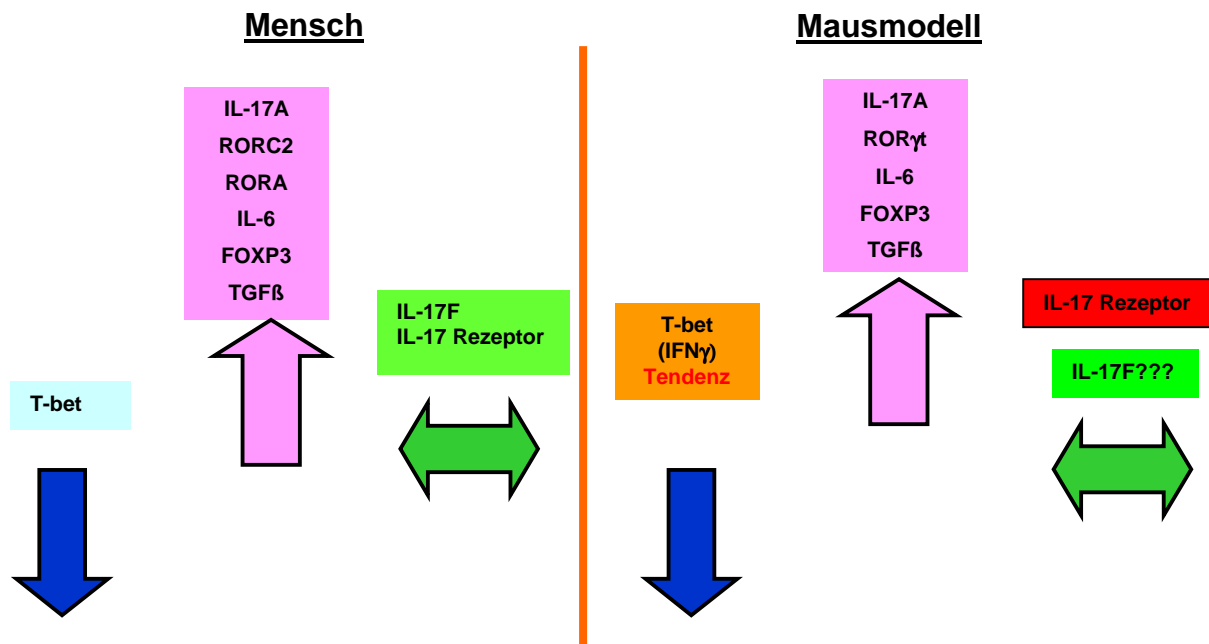


Abbildung 4.2. Schematische Darstellung der Änderung der Expression bestimmter Zytokine und Transkriptionsfaktoren im humanen und murinen Lungen-Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungen.

Vergleichbare Expression in Menschen und in der Maus: IL-17A, RORC2, RORA, IL-6, FOXP3, TGFβ. Ähnliche Expression von T-bet Transkriptionsfaktor. Diskrepanz in der Expression von IL-17 Rezeptor.

Im Krankheitsverlauf wurden auch Parallelen beobachtet, wie die langsame Entwicklung der Tumore in der Lunge, so dass die Tumore an den peripheren Bereichen der Lunge ansetzten. Das Lungen-Adenokarzinom des Menschen beschränkt sich hauptsächlich auf die Lungen (147). Erst nach jahrelanger langsamer Wucherung im fortgeschrittenen Stadium tritt die Metastasierung bei anderen Organen auf. Genau diese Eigenschaften wurden beim Mausmodell während der Etablierungsphase beobachtet. Die Mäuse weisen ca. ab dem 17./18.ten Tag nach der Injektion der Zelllinie makroskopisch definierbare Tumore, überwiegend in der Peripherie der Lunge, auf. Die Metastasierung tritt erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf, die bevorzugt die Nacken-, Flanken- und Thorax-Regionen betrifft.

Das murine Adenokarzinom-Modell, welches durch die Zelllinie L1C2 induziert wird, entspricht somit weitgehend, aber nicht vollständig, dem Lungen-Adenokarzinom des Menschen.

4.4 IL-17A Blockade reduziert das Tumorwachstum durch die Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen und durch die Induktion der IFN γ Sekretion in der Lunge

Um die Rolle des IL-17 Zytokins im Lungen-Adenokarzinom zu untersuchen, wurden die Mäuse zu Beginn und zu einem späteren Zeitpunkt während der Entwicklung des Lungen-Adenokarzinoms mit Anti-IL-17A Antikörper behandelt. Der Antikörper wurde intranasal verabreicht, somit entfaltete er seine Wirkung nur in der Lunge. Die **Abbildung 3.18.** veranschaulicht, dass die früher behandelten Mäuse weniger Tumorkolonien in der Lunge aufwiesen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Zwei immunologisch bedeutende Faktoren änderten sich nach der lokalen Blockade von IL-17A in der Lunge:

- Zunächst fällt eine Reduktion der CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen in der Lunge auf. Dieser Vorteil trägt dazu bei, dass sich die körpereigene Immunantwort gegen Tumor entfalten kann, wodurch das Tumorwachstum verlangsamt wird.
- Als Zweites fällt die vermehrte Produktion von IFN γ in CD4+ T-Zellen auf, die durch lokale Blockade von IL-17A ausgelöst wurde.

Obwohl die regulatorischen T-Zellen keinen IL-17 Rezeptor exprimieren, muss ein anderer Weg existieren, wie die IL-17 Blockade auf die regulatorischen T-Zellen wirkt. Die durchflusszytometrische Untersuchung brachte eine mögliche Erklärung dafür: Die CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen exprimieren den IFN γ Rezeptor vermehrt. Das durch die IL-17-Blockade in vermehrter Menge produzierte IFN γ unterdrückt die regulatorischen T-Zellen (143).

4.5 IL-17 produzierende CD4+ T-Zellen lassen sich durch die Blockade von IL-17A zu IFN γ produzierende T-Zellen umprogrammieren

In den *in vivo*-Experimenten löste die lokale Blockade des IL-17A eine Stimulation der IFN γ -Produktion in den CD4+ T-Zellen aus der Lunge aus. Um zu beweisen, dass dieser Effekt tatsächlich durch die IL-17-Blockade verursacht wurde, wurde im

in vitro Modell die *in vivo* Situation nachgestellt. In die Mäuse wurden L1C2 Tumorzellen gespritzt und nach 6 Tagen die CD4⁺ T-Zellen aus der Lunge isoliert. Die CD4⁺ T-Zellen wurden für weitere 3 Tage mit Anti-IL-17A Antikörper behandelt und anschließend die IFN γ -Produktion in den CD4⁺ T-Zellüberständen gemessen (**Abbildung 3.22.**). Die IL-17-Blockade förderte die IFN γ -Sekretion in den CD4⁺ T-Zellen verglichen mit CD4⁺ T-Zellen, die mit Kontroll-IgG behandelt wurden. Allerdings konnte die Wirkung in den unbehandelten naiven Mäusen nicht festgestellt werden.

Daraus ist zu schließen, dass es in den CD4⁺ T-Zellen eine Änderung (Challenge) durch die L1C2 Tumorzellen ausgelöst wurde (**Abbildung 4.3.B.**). Die CD4⁺ T-Zellen begannen sich in eine bestimmte T-Effektor-Linie zu differenzieren. Die Th1 T-Linie wird durch die IFN γ -, die Th17 Linie durch die IL-17A-Produktion charakterisiert. Entweder beeinflusst die Anti-IL-17 Antikörper-Zugabe die Differenzierung der naiven T-Zellen zu Th1-Zellen (**Abbildung 4.3.C.**) oder aber die Th17 T-Zellen (in den Tumormäusen) wandeln sich in Th1 T-Zellen um (**Abbildung 4.3.D.**).

In diesem experimentellen Ansatz ist zu bedenken, dass die isolierten CD4⁺ T-Zellen nicht näher charakterisiert wurden. So kann man nur annehmen, dass die CD4⁺ T-Zellen aus den unbehandelten Mäusen größtenteils naive T-Zellen waren und dass sich die CD4⁺ T-Zellen aus den L1C2 behandelten Mäusen in einem Prozess befanden, wo sie sich in Th17 differenzieren oder differenzierten.

Ein anderer Kritikpunkt zu diesem Experiment ist, dass die IL-17A-Expression in den CD4⁺ T-Zellen nicht bestimmt wurde, woraus man direkte Hinweise auf die Umprogrammierung von IL-17A produzierenden Zellen zu IFN γ produzierenden Zellen ablesen könnte.

Um dieses Problem zu korrigieren, wurden CD4⁺ T-Zellen aus naiven Mäusen isoliert und ein Th17 Differenzierungsprotokoll durchgeführt (**Abbildung 2.5.**). Nach 5 Tagen lagen differenzierte IL-17-produzierende Th17 Zellen vor. Die Zellen wurden mit siRNA behandelt, die sich an die IL-17-Messenger-RNA bindet, wodurch die Translation verhindert wird. Die IFN γ und IL-17A mRNA Analyse (**Abbildung 3.21.**) spiegelte die angenommene Situation wieder, nämlich dass sich die IL-17-produzierenden T-Zellen durch die IL-17 Blockade in IFN γ -produzierende T-Zellen umprogrammieren lassen (**Abbildung 4.3.D.**).

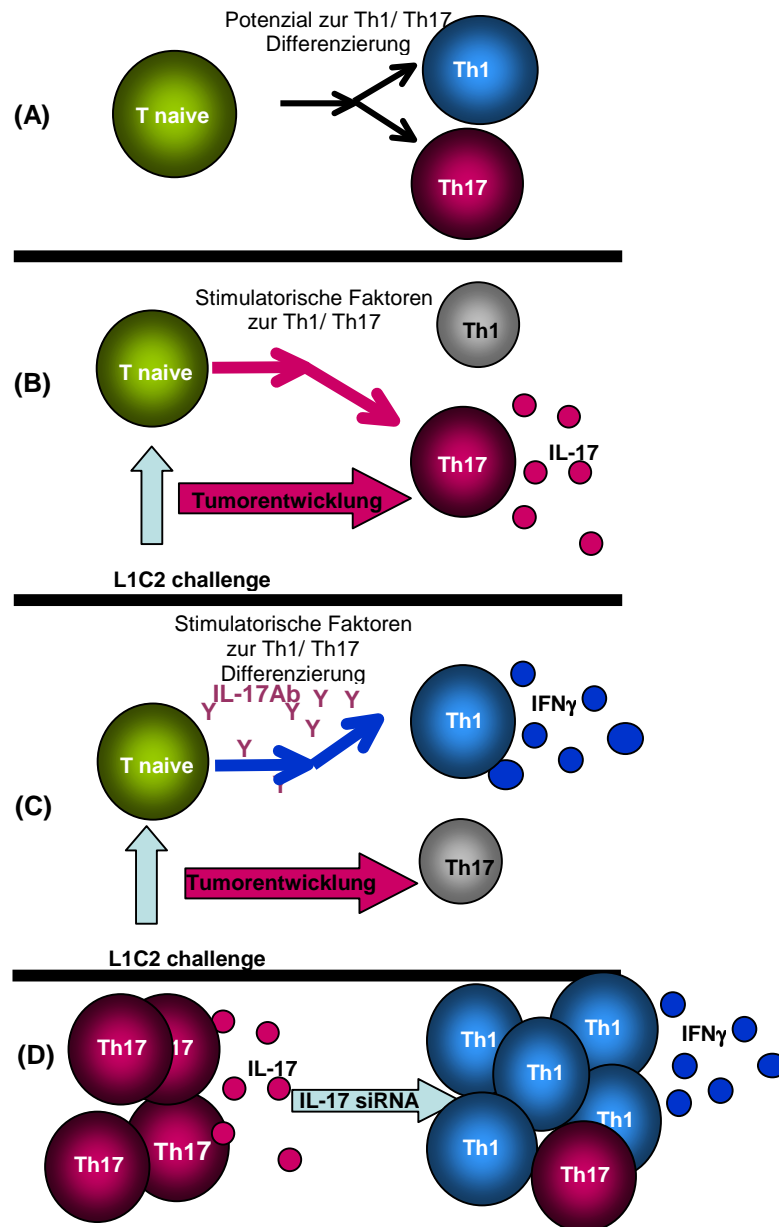


Abbildung 4.3. Hypothese über den Wirkmechanismus der IL-17A-Blockade

(A) Die naiven CD4⁺ T-Zellen verfügen über die Fähigkeit entweder zur Th1- oder Th17-Zellen zu differenzieren. **(B)** Die Injektion mit L1C2 Tumorzellen stellt eine Forderung (challenge) für diese Zellen dar. Die naiven T-Zellen differenzieren sich während der Tumorentwicklung zu Th17-Zellen, die IL-17A produzieren. **(C)** Die Anti-IL-17 Antikörper-Behandlung fördert die Differenzierung zu Th1-Effektor T-Zellen. Die Th1-Zellen sekretieren das Zytokin IFN γ . **(D)** Die Th17-Zellen werden durch die siRNA-Behandlung zu IFN γ -produzierenden Th1-Zellen differenziert.

4.6 T-bet kontrolliert die Expression von regulatorischen T-Zellen und IL-17 produzierenden T-Zellen

Der Faden, den wir im Laufe der Zeit zum Verstehen des Wirkmechanismus der IL-17-Blockade verfolgt haben, führte zum Th1-Zytokin IFN γ . Interferon gamma scheint das Schlüsselzytokin zu sein, das die regulatorischen T-Zellen kontrolliert und den Tumorwachstum verlangsamt. Dieses Zytokin wird in großer Menge von Th1 T-Zellen produziert. Da IFN γ von dem T-bet Transkriptionsfaktor reguliert wird, überprüften wir die Richtigkeit der Hypothese in T-bet defizienten Mäusen.

Nach der Auswertung aller Daten, konnte festgestellt werden, dass die CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen im Tumor signifikant erhöht waren (**Abbildung 3.27.**). Die Induktion der regulatorischen T-Zellen lässt sich mit der Abwesenheit von IFN γ erklären.

Wie in der Einleitung bereits erklärt wurde, ist IFN γ ein Hemmfaktor in dem Th17 Differenzierungsprozess. Erwartungsgemäß war die Sekretion von IL-17 in den T-bet defizienten Mäusen hochreguliert im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (**Abbildung 3.28.**).

Auch nach dem Abschluss dieser Arbeit sind weitere Untersuchungen im Gange, die nicht mehr berücksichtigt werden konnten. Wir, die Arbeitsgruppe Finotto, werden in Kürze weitere Ergebnisse zum Thema veröffentlichen.

4.7 Auf der Spur der Bedeutung von IL-17 anhand der IL-17 Rezeptor-Expression

Die Blockade des IL-17-Zytokins wirkte auf die regulatorischen und auf die aktivierten T-Zellen. Um den Weg von IL-17A zu verfolgen, wurde die IL-17 Rezeptor-Expression auf den T-Zelltypen per Durchflusszytometrie untersucht. Dafür wurden Lungen naiver BALB/cJ-Mäuse entnommen und die Einzelzellsuspension mit Markern der regulatorischen, aktivierter, naiver T-Zellen und der Th1-Zellen gefärbt. Nachdem festgestellt wurde, dass der IL-17 Rezeptor nur in geringem Maße auf den

regulatorischen T-Zellen (**Abbildung 3.31.**) und auf dem Th 1-Zellen (**Abbildung 3.32.**) gar nicht exprimiert wird, stellte sich die Frage, auf welchem Weg die Blockade die regulatorischen T- und die T Helfer 1-Zellen beeinflusst. Man muss in Erinnerung rufen, dass der Zeitpunkt der IL-17A Blockade eine entscheidende Rolle in dem Krankheitsverlauf gespielt hat. Nur die Applikation zu einem früheren Zeitpunkt hat während der Pathogenese die signifikante Verminderung des Tumorwachstums herbeigeführt (**Abbildung 3.18.**), die spätere Applikation dagegen nicht. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen der IL-17A-Signaltransduktion für die Differenzierung der verschiedenen T-Zellpopulationen am Anfang eines Tumor-Challenges eine ausschlaggebende Wirkung hat. Wegen der Annahme, dass IL-17A in der T-Zelldifferenzierung eine Rolle spielt, wurde die IL-17 Rezeptor-Expression in naiven T-Zellen untersucht. In der Tat wurde der IL-17 Rezeptor in großer Menge auf den naiven T-Zellen vorgefunden (**Abbildung 3.29.**). Dagegen konnte der IL 17 Rezeptor auf den aktivierten T-Zellen nur in geringem Maße gefunden werden (**Abbildung 3.30.**).

Diese Tatsachen erklären, dass IL-17A in der frühen Phase der T-Zell Differenzierung eine Rolle spielt, und die Anwesenheit des IL-17 Zytokins in dem Fall von Lungen-Adenokarzinom die Differenzierung der Th 17-Linie begünstigt. Dagegen verursacht die Blockade von IL-17 eine Förderung der Differenzierung der Th1-Population. Da der IL-17 Rezeptor weder auf Th1 noch auf regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden konnten, lässt dies den Schluß zu, dass IL-17 nur auf naive T-Zellen eine Wirkung ausübt.

In dieser Studie erwies sich IFN γ als das Schlüsselzytokin in der Immunantwort gegen Tumor, da es einen supprimierenden Effekt auf regulatorische T-Zellen hat. Der IFN γ -Rezeptor konnte auf den regulatorischen T-Zellen (**Abbildung 3.34.**) identifiziert werden. Dies unterstützt die Theorie, dass die unterdrückende Wirkung durch die IL-17 R Blockade wohl darin besteht, auf einer indirekten Art und Weise die Sekretion des Schlüsselzytokines IFN γ beeinflusst.

5 Zusammenfassung

Die Behandlungsmöglichkeiten für Lungenkrebs in unserer Zeit sind limitiert und die Identifizierung von neuen Targets für die Therapie ist von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden die tumorinfiltrierten T-Lymphozyten in Patienten mit Lungen-Adenokarzinom und in einem murinen Lungen-Adenokarzinom Modell analysiert, um die Bedeutung der Rolle des *T-box Transkriptionsfaktors* (T-bet) durch die von *Interleukin 17 A* (IL-17A)-Blockade ausgelöste Kontrolle der regulatorischen T-Zellen zu untersuchen. Es wurden Beweise vorgelegt, dass die Blockade von IL-17A von Vorteil im Lungen-Adenokarzinom ist. Es modifiziert die regulatorischen T-Zellen und die T-bet-Aktivität. Ebenfalls wird gezeigt, dass die Blockade des IL-17A Zytokins breite Möglichkeiten in der klinischen Anwendung gegen Lungen-Adenokarzinome darstellt, indem die Aktivität der lokalen *Interferon-Gamma* (IFN γ)-produzierenden T-Zellen stimuliert und die regulatorischen T-Zellen unterdrückt wird.

Es wurde gezeigt, dass die Th17 T-Linie in einem reziproken Verhältnis zu den CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen steht (85). In der Tat begünstigen IL-6 und TGF β Zytokine die Entwicklung von Th17-Zellen, während das IL-6 Zytokin alleine die Entwicklung der regulatorischen T-Zellen *in vitro* und *in vivo* inhibiert. Zudem ist bekannt, dass die regulatorischen T-Zellen eine immununterdrückende Eigenschaft gegen Tumor besitzen. Hingegen ist die Rolle von Th17-Zellen in Lungentumoren noch nicht vollständig verstanden. Es stellte sich heraus, dass die Haupt-Transkriptionsfaktoren der Th17-Zellen RORC2 und RORA, sowie der Haupt-Transkriptionsfaktor der regulatorischen T-Zellen FOXP3 im menschlichen Tumorgewebe im Vergleich zu Kontrollgeweben erhöht waren. Dieses wiederum weist auf eine Vermehrung der Th17- und regulatorischen T-Zellen hin. Diese Resultate deuten auf eine mögliche direkte Wechselwirkung zwischen diesen T-Zelllinien im Lungen-Karzinom hin. In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die Anti-IL-17A Behandlung die Zellzahl der CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen in der Anwesenheit von T-bet unterdrückt und eine Verbesserung im Krankheitsverlauf hervorruft. Dieses positive Ergebnis war von der erhöhten IFN γ -Produktion in den CD4 positiven tumorinfiltrierenden T-Zellen in Wildtyp-Mäusen begleitet. Dagegen konnten die regulatorischen T-Zellen in T-bet defizienten

Mäusen mit Anti-IL-17A Behandlung nicht unterdrückt werden. Was darauf deutet, dass die Regulation zwischen regulatorischen- und Th17 T-Zellen den T-bet Transkriptionsfaktor benötigen.

Die regulatorischen T-Zellen spielen eine pathogene Rolle in der Tumorentwicklung, indem sie die Immunantwort der T-Effektorzellen gegen den Tumor unterdrücken (150). Zum Beispiel werden die tumorinfiltrierten regulatorischen T-Zellen auf verschiedenen Art und Weise unterdrückt (151, 152) oder die Effektor T-Zellen durch agonistischer Anti-GITR-Behandlung T reg-resistent gemacht (142).

Seit wir entdeckt haben, dass die T-bet defizienten Mäuse mit Lungen-Adenokarzinom mit Anti-IL-17A Antikörper nicht erfolgreich behandelt werden konnten, weil sie erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen hatten, versuchten wir die Lungen CD4 positiven T-Zellen T reg-resistent durch Anti-GITR Behandlung stimulieren. Anstatt die T regs zu unterdrücken hat die Anti-GITR Behandlung eine Erhöhung der regulatorischen T-Zellen in der Lunge in der Abwesenheit von T-bet herbeigeführt. Das deutet darauf hin, dass eine T reg Blockade mittels GITR Ligation vom Transkriptionsfaktor T-bet abhängig ist. Finotto (153) und Szabo *et al.* (73) haben bereits bewiesen, dass T-bet positive Th1-Zellen das allergische Asthma und die Autoimmunität kontrollieren. Des Weiteren reguliert T-bet die Aktivität der *Nature Killer*-Zellen (NK-Zellen) in Melanoma (154, 155). In der vorliegenden Arbeit deuten die Untersuchungen darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor T-bet der Schlüsselregulator in der Anti-Tumor-Immunantwort mit Anti-IL-17 Antikörper Verabreichung darstellt. Außerdem wurde demonstriert, dass die intra-tumoralen CD4+CD25+FOXP3+T-Zellen nicht unmittelbar von IL-17A kontrolliert werden können, da sie keinen IL-17 Rezeptor tragen.

Des Weiteren wird gezeigt, dass T-bet-mRNA in der Lunge der Patienten mit Lungen-Adenokarzinom signifikant herunterreguliert war. Zusätzlich dazu war der T reg-Marker FOXP3 und die IL-17A-Marker RORC2 und RORA erhöht im Vergleich zu dem Kontroll-Lungengewebe. Diese Zusammenhängen zeigen, dass ein niedriges T-bet-Niveau von erhöhten IL-17A- und FOXP3-Levels in Lungen-Adenokarzinom begleitet ist. Die IL-17 Rezeptor-Studie zeigt, dass der IL-17 Rezeptor auf T-bet positiven CD4 positiven T Helfer 1-Zellen nicht exprimiert wird (**Abbildung 3.29.**). Diese Zellen exprimieren dagegen IFN γ Rezeptor, so besitzen die Th1-Zellen einen autokrinen Verstärkungsmechanismus, der während der Blockade des IL-17A Zytokins zur Geltung kommen kann. Des Weiteren unterdrücken Th1 (T-bet+)-Zellen

die regulatorischen T-Zellen mittels IFN γ Rezeptor (**Abbildung 3.31.**). Ohne T-bet gibt es keine Expansion von Th1 Zellen und dadurch fehlt der Suppressor für die regulatorischen T-Zellen, infolgedessen expandieren die Tregs.

Zusammengefasst wird in dieser Studie gezeigt, dass die durch RORC2, RORA und IL-17A charakterisierten Zellen in den Lungen der Patienten mit Lungen-Adenokarzinom im Vergleich zu Kontroll-Lungen hochreguliert waren. Weiterhin war die FOXP3-mRNA in der Lunge der Lungen-Adenokarzinom-Patienten hochreguliert und zusätzlich dazu positiv mit RORC2 und IL-17A in diesen Patienten korreliert. In dem Mausmodell für Lungen-Adenokarzinom konnte gezeigt werden, dass die lokale Blockade des IL-17A-Zytokins zur Verbesserung des Krankheitsverlaufs führte, indem die CD4+CD25+FOXP3+ regulatorischen T-Zellen reduziert wurden, die schon erwähnt IFN γ Rezeptor exprimieren und somit unter der Kontrolle von IFN γ stehen.

Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass regulatorische T-Zellen keine IL-17 Rezeptoren exprimieren, dennoch die CD4+CD62L^{high}+ naive T-Zellen, und dass IL-17A einen indirekten Effekt in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom hat (118), drängt sich die Erkenntnis auf, dass IL-17A das Wachstum der Tumorzellen mittels modulierender Aktivität der Zellen in der Tumorumgebung durch die Unterdrückung der CD4+CD25+FOXP3+ T-Zellen und durch die Umprogrammierung der Th17 Zellen beeinflusst.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor T-bet eine schützende Rolle in diesem Zusammenhang hat: erstens war T-bet in den Patienten mit Lungen-Adenokarzinom herunterreguliert und zweitens hatten die T-bet defizienten Mäuse signifikant erhöhte Tumorbildung in der Lunge selbst nach der Anti-IL-17A Antikörper Behandlung. Außerdem konnte die Anti-GITR-Behandlung in den T-bet defizienten Mäusen die regulatorischen T-Zellen nicht herunterregulieren, die die Th17-Entwicklung hemmen könnten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Th17 und die regulatorischen T-Zellen im Lungen-Adenokarzinom einander nicht inhibieren, sondern einander verstärkend zu der Verschlechterung des Lungen-Adenokarzinoms führen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-17A ein potenzielles Molekül in der Bekämpfung von Lungen-Adenokarzinom darstellt.

6 Glossar

Adenokarzinome sind bösartige Neubildungen (Krebs) des Drüsenepithels (z.B. der Lunge) (156)

Atopie beschreibt eine Neigung dazu, mit Überempfindlichkeitsreaktionen, nämlich mit allergischen Reaktionen, auf den Kontakt mit ansonsten harmlosen Substanzen aus der Umwelt zu reagieren. Atopie bezeichnet also eine körperliche Bereitschaft zu einer krankhaft erhöhten Bildung von IgE-Antikörper.

[http://de.wikipedia.org/wiki/Atopie_\(Medizin\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Atopie_(Medizin))

Chemokine (Name abgeleitet aus **chemotaktische Zytokine**), sind eine Gruppe der Zytokine also kleine Signalproteine, die bei Zellen eine Wanderungsbewegung (Chemotaxis) auslösen. Die Zellen bewegen sich dabei entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Chemokine spielen eine zentrale Rolle bei der Migration von Immunzellen im Gewebe und bei deren Auswanderung aus dem Blut. Manche Chemokine wirken zusätzlich aktivierend auf Immunzellen, und einige sind an der Organentwicklung und der Angiogenese beteiligt. Die ungefähr 50 unterschiedlichen Chemokine werden von Immunzellen und vielen Gewebezellen produziert (157).

CXCR2 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2, auch IL-8RB, GRO/MGSA-Rezeptor, CDw128b, CD182) ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren. CXCR2 kommt insbesondere an der Oberfläche von Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten, vor. Dieser Rezeptor kann durch die Chemokine CXCL1 (GRO- α), CXCL2 (GRO- β), CXCL3 (GRO- γ), CXCL5, CXCL7 und CXCL8 (IL-8) stimuliert werden und vermittelt seine Effekte durch Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade an der G-Proteine beteiligt sind. CXCR2 hat eine wichtige Rolle bei der Entstehung entzündlicher Erkrankungen und dem Tumorwachstum (158).

p53 – das zugehörige Gen, TP53, liegt in der Genomposition 17p13. In dieser Region kartiert auch das Li-Fraumeni-Syndrom. In den betroffenen Familien treten bereits in einem niedrigen Lebensalter mehrfache primäre Tumoren auf, so unter anderem Brustkrebs, Gehirntumoren, Osteosarkoma und Leukämie. p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Homotetramer an DNA bindet und die Transkription von einem weiter downstream gelegenen Promoter induzieren kann. p53 spielt eine Schlüsselrolle in der Zellzykluskontrolle am Übergang von der G1 zur S-Phase. Eine der vermuteten Funktionen des p53-Proteins liegt in der Aufgabe, die DNA-Replikation zu verhindern, wenn die DNA Schäden aufweist. Die Replikation wird erst nach Reparatur dieser Schäden freigegeben. Bei Deletion des TP53-Gens wird die DNA unverhindert repliziert. Als Folge davon kommt es zu Mutationen, die unter anderem oncogenen Charakter haben können (159).

L-Zystin (auch Cystin) ist ein Disulfid, das durch Oxidation von zwei Molekülen des Thioalkohols L-Cystein entsteht. Die natürliche proteinogene α -Aminosäure L-Cystin wurde 1810 durch William Hyde entdeckt und findet sich in hoher Konzentration peptidisch gebunden in den Zellen des Immunsystems, der Haut und den Haaren (160).

Metalloproteasen (auch **Metallopeptidasen**) sind Enzyme, die die Peptidbindungen eines Proteins (*Eiweiß*) spalten können (Proteolyse), wobei ein Molekül Wasser verbraucht wird (Hydrolyse) und das Wassermolekül von einem oder zwei Metallkationen in Position gehalten wird. Das Metallion ist an zum Enzym gehörenden Aminosäuren-Seitenresten gebunden (161).

Die **Hämatopoese** ist die Bildung der Zellen des Bluts (Blutkörperchen) aus blutbildenden Stammzellen und wird daher auch als **Blutbildung** bezeichnet (162).

7 Literatur

1. science.com. 3D Bilder über die Atmungsorgane.
2. BKK, B. Bronchialsystem.
3. Pocock, G., and C. D. Richards. 2006. *Human physiology : the basis of medicine*. Oxford University Press, Oxford [U.K.] ; New York.
4. Vogler, N. 2006. Lung im Dauerstress. In <http://www.lungenklinikamsee.de/lib/media.php?id=232>.
5. Bruske-Hohlfeld, I. 2009. Environmental and occupational risk factors for lung cancer. *Methods Mol Biol* 472:3-23.
6. Greenlee, R. T., M. B. Hill-Harmon, T. Murray, and M. Thun. 2001. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 51:15-36.
7. Travis, W. D., L. B. Travis, and S. S. Devesa. 1995. Lung cancer. *Cancer* 75:191-202.
8. Thomas, M. *Therapiekonzepte Onkologie*.
9. Seeber, S., Wolf, Thomas, Stuschke, Stamatis. *Therapiekonzepte Onkologie*. Springer Verlag.
10. <http://www.krebshilfe.de/lungenkrebs.html>.
11. Huang, G. J., D. C. Zhang, Y. S. Mao, J. Li, Y. G. Wang, D. L. Wang, Q. Xue, S. G. Gao, L. Z. Zhang, W. D. Lei, Y. S. Gao, J. Zhao, J. F. Huang, K. Yang, K. Su, S. Y. Zhu, S. Wei, and F. Y. Feng. 2005. [Comparison of clinical and surgico-pathological TNM stage of 2007 lung cancer patients]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 27:551-553.
12. Böcker, W. H., HK; Lax, S; . 2008. *Pathologie*.
13. Müller, K. W. T. 2004. Klassifikation und Stadieneinteilung bösartiger Lungentumoren. *Der Radiologe* Volume 44, Number 5 / Mai 2004:415-544.
14. University of Maryland Medical Center www.umm.edu/.../what_lung_cancer_000072_1.htm.
15. University of Maryland Medical Center www.umm.edu/.../what_lung_cancer_000072_1.htm.
16. University of Maryland Medical Center www.umm.edu/.../what_lung_cancer_000072_1.htm.
17. Forest, V., M. Peoc'h, L. Campos, D. Guyotat, and J. M. Vergnon. 2006. Benefit of a combined treatment of cryotherapy and chemotherapy on tumour growth and late cryo-induced angiogenesis in a non-small-cell lung cancer model. *Lung Cancer* 54:79-86.
18. Sato, N., T. Watanabe, A. Miyamoto, T. Imai, A. Ebina, K. Katto, and S. Watanabe. 2008. [The role of postoperative radiotherapy in non-small cell lung cancer; a retrospective analysis of our experience]. *Kyobu Geka* 61:19-23.
19. Armata, J. 1979. [Is it necessary to combine radiotherapy with chemotherapy in the treatment of children and adults with non-advanced Hodgkin's disease]. *Poľ Tyg Lek* 34:349-351.
20. Wilkowski, R., M. Thoma, H. Weingandt, E. Duhmke, and V. Heinemann. 2005. Chemoradiation for ductal pancreatic carcinoma: principles of combining chemotherapy with radiation, definition of target volume and radiation dose. *Jop* 6:216-230.
21. 2005. Chemotherapy.
22. Auszug von MedNews Universitätsklinikum Bonn.
23. Lisnjak, I. O., V. V. Kutsenok, L. Z. Polyschuk, O. B. Gorobets, and N. F. Gamaleia. 2005. Effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis and metastasis in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Exp Oncol* 27:333-335.
24. Inzeo, D., and A. Haughney. 2004. Laser therapy in the management of lung cancer. *Clin J Oncol Nurs* 8:94-95.
25. Knappe, V., and A. Mols. 2004. [Laser therapy of the lung: biophysical background]. *Radiologe* 44:677-683.
26. Isobe, T., R. S. Herbst, and A. Onn. 2005. Current management of advanced non-small cell lung cancer: targeted therapy. *Semin Oncol* 32:315-328.
27. Giaccone, G. 2005. EGFR point mutation confers resistance to gefitinib in a patient with non-small-cell lung cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2:296-297.
28. Baselga, J., and C. L. Arteaga. 2005. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 23:2445-2459.

29. Sandler, A. B., D. H. Johnson, and R. S. Herbst. 2004. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:4258s-4262s.
30. Dudley, M. E., and S. A. Rosenberg. 2007. Adoptive cell transfer therapy. *Semin Oncol* 34:524-531.
31. Raez, L. E., S. Fein, and E. R. Podack. 2005. Lung cancer immunotherapy. *Clin Med Res* 3:221-228.
32. Raez, L. E., E. S. Santos, R. Mudad, and E. R. Podack. 2005. Clinical trials targeting lung cancer with active immunotherapy: the scope of vaccines. *Expert Rev Anticancer Ther* 5:635-644.
33. Novellino, L., C. Castelli, and G. Parmiani. 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother* 54:187-207.
34. Pardoll, D. 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21:807-839.
35. Hirschowitz, E. A., D. M. Hiestand, and J. R. Yannelli. 2006. Vaccines for lung cancer. *J Thorac Oncol* 1:93-104.
36. Gabrilovich, D. I. 2002. Dendritic cell vaccines for cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther* 4:452-458.
37. Abbas, A. K., and A. H. Lichtman. 2005. *Cellular and molecular immunology*. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA.
38. Yao, Z., W. C. Fanslow, M. F. Seldin, A. M. Rousseau, S. L. Painter, M. R. Comeau, J. I. Cohen, and M. K. Spriggs. 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 3:811-821.
39. Yao, Z., S. L. Painter, W. C. Fanslow, D. Ulrich, B. M. Macduff, M. K. Spriggs, and R. J. Armitage. 1995. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155:5483-5486.
40. Spriggs, M. K. 1997. Interleukin-17 and its receptor. *J Clin Immunol* 17:366-369.
41. Lebecque, S. 2001. A new job for dendritic cells. *Nat Immunol* 2:830-831.
42. Gunimaladevi, I., R. Savan, and M. Sakai. 2006. Identification, cloning and characterization of interleukin-17 and its family from zebrafish. *Fish Shellfish Immunol* 21:393-403.
43. Chabaud, M., F. Fossiez, J. L. Taupin, and P. Miossec. 1998. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 161:409-414.
44. Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F. C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, and J. P. Pelletier. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160:3513-3521.
45. Chabaud, M., J. M. Durand, N. Buchs, F. Fossiez, G. Page, L. Frappart, and P. Miossec. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42:963-970.
46. Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau, and S. Lebecque. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183:2593-2603.
47. Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, L. Rose, and A. H. Reddi. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:155-174.
48. Li, H., J. Chen, A. Huang, J. Stinson, S. Heldens, J. Foster, P. Dowd, A. L. Gurney, and W. I. Wood. 2000. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:773-778.
49. Starnes, T., M. J. Robertson, G. Sledge, S. Kelich, H. Nakshatri, H. E. Broxmeyer, and R. Hromas. 2001. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 167:4137-4140.
50. Starnes, T., H. E. Broxmeyer, M. J. Robertson, and R. Hromas. 2002. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol* 169:642-646.
51. Hurst, S. D., T. Muchamuel, D. M. Gorman, J. M. Gilbert, T. Clifford, S. Kwan, S. Menon, B. Seymour, C. Jackson, T. T. Kung, J. K. Brieland, S. M. Zurawski, R. W. Chapman, G. Zurawski, and R. L. Coffman. 2002. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 169:443-453.

52. Aggarwal, S., and A. L. Gurney. 2002. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 71:1-8.
53. Hymowitz, S. G., E. H. Filvaroff, J. P. Yin, J. Lee, L. Cai, P. Risser, M. Maruoka, W. Mao, J. Foster, R. F. Kelley, G. Pan, A. L. Gurney, A. M. de Vos, and M. A. Starovasnik. 2001. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *Embo J* 20:5332-5341.
54. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
55. Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins, and L. A. Fouser. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203:2271-2279.
56. Chang, S. H., and C. Dong. 2007. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* 17:435-440.
57. Liang, S. C., A. J. Long, F. Bennett, M. J. Whitters, R. Karim, M. Collins, S. J. Goldman, K. Dunussi-Joannopoulos, C. M. Williams, J. F. Wright, and L. A. Fouser. 2007. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol* 179:7791-7799.
58. Kuestner, R. E., D. W. Taft, A. Haran, C. S. Brandt, T. Brender, K. Lum, B. Harder, S. Okada, C. D. Ostrander, J. L. Kreindler, S. J. Aujla, B. Reardon, M. Moore, P. Shea, R. Schreckhise, T. R. Bukowski, S. Presnell, P. Guerra-Lewis, J. Parrish-Novak, J. L. Ellsworth, S. Jaspers, K. E. Lewis, M. Appleby, J. K. Kolls, M. Rixon, J. W. West, Z. Gao, and S. D. Levin. 2007. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* 179:5462-5473.
59. Toy, D., D. Kugler, M. Wolfson, T. Vanden Bos, J. Gurgel, J. Derry, J. Tocker, and J. Peschon. 2006. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* 177:36-39.
60. Lee, J., W. H. Ho, M. Maruoka, R. T. Corpuz, D. T. Baldwin, J. S. Foster, A. D. Goddard, D. G. Yansura, R. L. Vandlen, W. I. Wood, and A. L. Gurney. 2001. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem* 276:1660-1664.
61. Evi27 <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Evi27>.
62. Harrington, L. E., P. R. Mangan, and C. T. Weaver. 2006. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18:349-356.
63. Happel, K. I., M. Zheng, E. Young, L. J. Quinton, E. Lockhart, A. J. Ramsay, J. E. Shellito, J. R. Schurr, G. J. Bagby, S. Nelson, and J. K. Kolls. 2003. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Immunol* 170:4432-4436.
64. Ferretti, S., O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones, and A. Trifilieff. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol* 170:2106-2112.
65. Stark, M. A., Y. Huo, T. L. Burcin, M. A. Morris, T. S. Olson, and K. Ley. 2005. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* 22:285-294.
66. O'Brien, R. L., C. L. Roark, and W. K. Born. 2009. IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 39:662-666.
67. Lockhart, E., A. M. Green, and J. L. Flynn. 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 177:4662-4669.
68. Riou, C., B. Yassine-Diab, J. Van grevenynghe, R. Somogyi, L. D. Greller, D. Gagnon, S. Gimmig, P. Wilkinson, Y. Shi, M. J. Cameron, R. Campos-Gonzalez, R. S. Balderas, D. Kelvin, R. P. Sekaly, and E. K. Haddad. 2007. Convergence of TCR and cytokine signaling leads to FOXO3a phosphorylation and drives the survival of CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 204:79-91.
69. Fort, M. M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S. M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S. D. Hurst, G. Zurawski, M. W. Leach, D. M. Gorman, and D. M. Rennick. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15:985-995.
70. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.

71. Bottomly, K. 1988. A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes. *Immunol Today* 9:268-274.
72. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
73. Szabo, S. J., B. M. Sullivan, S. L. Peng, and L. H. Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21:713-758.
74. Robinson, D. S., and A. O'Garra. 2002. Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* 16:755-758.
75. Ansel, K. M., D. U. Lee, and A. Rao. 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* 4:616-623.
76. Szabo, S. J., A. S. Dighe, U. Gubler, and K. M. Murphy. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185:817-824.
77. Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick, and R. A. Kastelein. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁽⁺⁾ T cells. *Immunity* 16:779-790.
78. Ouyang, W., S. H. Ranganath, K. Weindel, D. Bhattacharya, T. L. Murphy, W. C. Sha, and K. M. Murphy. 1998. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9:745-755.
79. Zheng, W., and R. A. Flavell. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596.
80. Ouyang, W., M. Lohning, Z. Gao, M. Assenmacher, S. Ranganath, A. Radbruch, and K. M. Murphy. 2000. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12:27-37.
81. Tato, C. M., and J. J. O'Shea. 2006. Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 441:166-168.
82. Ivanov, I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
83. Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten, and C. Dong. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 28:29-39.
84. Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich, and C. Dong. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282:9358-9363.
85. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
86. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
87. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
88. Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487.
89. Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten, and C. Dong. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480-483.
90. Zhou, L., Ivanov, I., R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard, and D. R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8:967-974.
91. Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman, and R. de Waal Malefyt. 2007. Development, cytokine

- profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957.
92. Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.
 93. Evans, H. G., T. Suddason, I. Jackson, L. S. Taams, and G. M. Lord. 2007. Optimal induction of T helper 17 cells in humans requires T cell receptor ligation in the context of Toll-like receptor-activated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17034-17039.
 94. Laurence, A., and J. J. O'Shea. 2007. T(H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol* 8:903-905.
 95. Yang, L., D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, and D. A. Hafler. 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454:350-352.
 96. Ye, P., F. H. Rodriguez, S. Kanaly, K. L. Stocking, J. Schurr, P. Schwarzenberger, P. Oliver, W. Huang, P. Zhang, J. Zhang, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson, K. Charrier, J. J. Peschon, and J. K. Kolls. 2001. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194:519-527.
 97. Chung, D. R., D. L. Kasper, R. J. Panzo, T. Chitnis, M. J. Grusby, M. H. Sayegh, and A. O. Tzianabos. 2003. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* 170:1958-1963.
 98. Infante-Duarte, C., H. F. Horton, M. C. Byrne, and T. Kamradt. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165:6107-6115.
 99. Khader, S. A., G. K. Bell, J. E. Pearl, J. J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G. E. Cilley, F. Shen, S. M. Eaton, S. L. Gaffen, S. L. Swain, R. M. Locksley, L. Haynes, T. D. Randall, and A. M. Cooper. 2007. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol* 8:369-377.
 100. Huang, W., L. Na, P. L. Fidel, and P. Schwarzenberger. 2004. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. *J Infect Dis* 190:624-631.
 101. van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter, F. J. Muller, D. W. Hommes, S. A. Zaat, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* 27:660-669.
 102. Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051-1057.
 103. Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton, and C. G. Fathman. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156:5-7.
 104. Becher, B., B. G. Durell, and R. J. Noelle. 2002. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110:493-497.
 105. Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein, and J. D. Sedgwick. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
 106. Sato, K., A. Suematsu, K. Okamoto, A. Yamaguchi, Y. Morishita, Y. Kadono, S. Tanaka, T. Kodama, S. Akira, Y. Iwakura, D. J. Cua, and H. Takayanagi. 2006. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203:2673-2682.
 107. Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177:566-573.
 108. Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171:6173-6177.
 109. Lock, C., G. Hermans, R. Pedotti, A. Brendolan, E. Schadt, H. Garren, A. Langer-Gould, S. Strober, B. Cannella, J. Allard, P. Klonowski, A. Austin, N. Lad, N. Kaminski, S. J. Galli, J. R. Oksenberg, C. S. Raine, R. Heller, and L. Steinman. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500-508.

110. Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba, and Y. Fujiyama. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52:65-70.
111. Lohr, J., B. Knoechel, J. J. Wang, A. V. Villarino, and A. K. Abbas. 2006. Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med* 203:2785-2791.
112. Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, M. Karow, and R. A. Flavell. 2007. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 27:647-659.
113. 2008. www.biomol.de Cancer Research Tools.
114. Lee, J. M., J. Yanagawa, K. A. Peebles, S. Sharma, J. T. Mao, and S. M. Dubinett. 2008. Inflammation in lung carcinogenesis: new targets for lung cancer chemoprevention and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:208-217.
115. Kato, T., H. Furumoto, T. Ogura, Y. Onishi, M. Irahara, S. Yamano, M. Kamada, and T. Aono. 2001. Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 282:735-738.
116. Tartour, E., F. Fossiez, I. Joyeux, A. Galinha, A. Gey, E. Claret, X. Sastre-Garau, J. Couturier, V. Mosseri, V. Vives, J. Banchereau, W. H. Fridman, J. Wijdenes, S. Lebecque, and C. Sautes-Fridman. 1999. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 59:3698-3704.
117. Pages, F., V. Vives, C. Sautes-Fridman, F. Fossiez, A. Berger, P. H. Cugnenc, E. Tartour, and W. H. Fridman. 1999. Control of tumor development by intratumoral cytokines. *Immunol Lett* 68:135-139.
118. Numasaki, M., M. Watanabe, T. Suzuki, H. Takahashi, A. Nakamura, F. McAllister, T. Hishinuma, J. Goto, M. T. Lotze, J. K. Kolls, and H. Sasaki. 2005. 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* 175:6177-6189.
119. Hirahara, N., Y. Nio, S. Sasaki, Y. Minari, M. Takamura, C. Iguchi, M. Dong, K. Yamasawa, and K. Tamura. 2001. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncology* 61:79-89.
120. Hirahara, N., Y. Nio, S. Sasaki, M. Takamura, C. Iguchi, M. Dong, K. Yamasawa, M. Itakura, and K. Tamura. 2000. Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. *Anticancer Res* 20:3137-3142.
121. Benchetrit, F., A. Ciree, V. Vives, G. Warnier, A. Gey, C. Sautes-Fridman, F. Fossiez, N. Haicheur, W. H. Fridman, and E. Tartour. 2002. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 99:2114-2121.
122. Kryczek, I., S. Wei, W. Szeliga, L. Vatan, and W. Zou. 2009. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood*.
123. Maxeiner, J. H., R. Karwot, K. Sauer, P. Scholtes, I. Boross, M. Koslowski, O. Tureci, R. Wiewrodt, M. F. Neurath, H. A. Lehr, and S. Finotto. 2009. A key regulatory role of the transcription factor NFATc2 in bronchial adenocarcinoma via CD8+ T lymphocytes. *Cancer Res* 69:3069-3076.
124. Sauer, K. A., P. Scholtes, R. Karwot, and S. Finotto. 2006. Isolation of CD4+ T cells from murine lungs: a method to analyze ongoing immune responses in the lung. *Nat Protoc* 1:2870-2875.
125. Miltenybiotec. 2008. MACS Cell Separation.
126. Sundrud, M. S., and A. Rao. 2008. Regulation of T helper 17 differentiation by orphan nuclear receptors: it's not just ROR gamma t anymore. *Immunity* 28:5-7.
127. Kawaguchi, M., M. Adachi, N. Oda, F. Kokubu, and S. K. Huang. 2004. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol* 114:1265-1273; quiz 1274.
128. Yao, Z., M. K. Spriggs, J. M. Derry, L. Strockbine, L. S. Park, T. VandenBos, J. D. Zappone, S. L. Painter, and R. J. Armitage. 1997. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine* 9:794-800.
129. Anagnostou, V. K., K. N. Syrigos, G. Bepler, R. J. Homer, and D. L. Rimm. 2009. Thyroid transcription factor 1 is an independent prognostic factor for patients with stage I lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 27:271-278.
130. Perner, S., P. L. Wagner, A. Soltermann, C. LaFargue, V. Tischler, B. A. Weir, W. Weder, M. Meyerson, T. J. Giordano, H. Moch, and M. A. Rubin. 2009. TTF1 expression in non-

- small cell lung carcinoma: association with TTF1 gene amplification and improved survival. *J Pathol* 217:65-72.
131. Feuerer, M., J. A. Hill, D. Mathis, and C. Benoist. 2009. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 10:689-695.
 132. Kosmaczewska, A., L. Ciszak, S. Potoczek, and I. Frydecka. 2008. The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56:181-191.
 133. Santarlasci, V., L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, V. Querci, R. De Palma, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 39:207-215.
 134. Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T. H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu, and W. Zou. 2009. Phenotype, distribution, generation, functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*.
 135. Dubinett, S. M., L. Patrone, J. Tobias, A. J. Cochran, D. R. Wen, and W. H. McBride. 1993. Intratumoral interleukin-2 immunotherapy: activation of tumor-infiltrating and splenic lymphocytes in vivo. *Cancer Immunol Immunother* 36:156-162.
 136. Yuhas, J. M., R. E. Toya, and E. Wagner. 1975. Specific and nonspecific stimulation of resistance to the growth and metastasis of the line 1 lung carcinoma. *Cancer Res* 35:242-244.
 137. Gallimore, A. M., and A. K. Simon. 2008. Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene* 27:5886-5893.
 138. Karwot, R. 2007. Rolle von NFATc2 in einem murinen Asthmamodell. In *Fachbereich Biologie* Johannes Gutenberg-Universität Mainz Mainz. 69.
 139. Wang, R. F. 2006. Functional control of regulatory T cells and cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 16:106-114.
 140. Rodrigues, E. G., A. S. Garofalo, and L. R. Travassos. 2002. Endogenous accumulation of IFN-gamma in IFN-gamma-R(-/-) mice increases resistance to B16F10-Nex2 murine melanoma: a model for direct IFN-gamma anti-tumor cytotoxicity in vitro and in vivo. *Cytokines Cell Mol Ther* 7:107-116.
 141. Stephens, G. L., R. S. McHugh, M. J. Whitters, D. A. Young, D. Luxenberg, B. M. Carreno, M. Collins, and E. M. Shevach. 2004. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173:5008-5020.
 142. Ko, K., S. Yamazaki, K. Nakamura, T. Nishioka, K. Hirota, T. Yamaguchi, J. Shimizu, T. Nomura, T. Chiba, and S. Sakaguchi. 2005. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 202:885-891.
 143. Nishikawa, H., T. Kato, I. Tawara, H. Ikeda, K. Kuribayashi, P. M. Allen, R. D. Schreiber, L. J. Old, and H. Shiku. 2005. IFN-gamma controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response. *J Immunol* 175:4433-4440.
 144. Yuhas, J. M., N. H. Pazmino, J. O. Proctor, and R. E. Toya. 1974. A direct relationship between immune competence and the subcutaneous growth rate of a malignant murine lung tumor. *Cancer Res* 34:722-728.
 145. Yuhas, J. M., and N. H. Pazmino. 1974. Inhibition of subcutaneously growing line 1 carcinomas due to metastatic spread. *Cancer Res* 34:2005-2010.
 146. Sharma, S., P. W. Miller, M. Stolina, L. Zhu, M. Huang, R. W. Paul, and S. M. Dubinett. 1997. Multicomponent gene therapy vaccines for lung cancer: effective eradication of established murine tumors in vivo with interleukin-7/herpes simplex thymidine kinase-transduced autologous tumor and ex vivo activated dendritic cells. *Gene Ther* 4:1361-1370.
 147. 2006. Lung Cancer, Lung Adenocarcinoma. In *College of American pathologists*. College of American pathologists.
 148. 2009. Definition der Korrelation.
 149. McAllister, F., A. Henry, J. L. Kreindler, P. J. Dubin, L. Ulrich, C. Steele, J. D. Funder, J. M. Pilewski, B. M. Carreno, S. J. Goldman, J. Pirhonen, and J. K. Kolls. 2005. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 175:404-412.
 150. Wang, R. F. 2006. Immune suppression by tumor-specific CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Semin Cancer Biol* 16:73-79.

151. Piconese, S., B. Valzasina, and M. P. Colombo. 2008. OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J Exp Med* 205:825-839.
152. Colombo, M. P., and S. Piconese. 2007. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 7:880-887.
153. Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, J. M. Drazen, G. T. De Sanctis, and L. H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
154. Werneck, M. B., G. Lugo-Villarino, E. S. Hwang, H. Cantor, and L. H. Glimcher. 2008. T-bet plays a key role in NK-mediated control of melanoma metastatic disease. *J Immunol* 180:8004-8010.
155. Sauer, K. A., J. H. Maxeiner, R. Karwot, P. Scholtes, H. A. Lehr, M. Birkenbach, R. S. Blumberg, and S. Finotto. 2008. Immunosurveillance of lung melanoma metastasis in EBI-3-deficient mice mediated by CD8+ T cells. *J Immunol* 181:6148-6157.
156. Batzler WU, G. K., Hentschel S, Husmann G, Kaatsch P, Katalinik A, Kieschke J, Kraywinkel K, Meyer M, Stabenow R, Stegmaier Ch 2008. *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch-Institut, Berlin.
157. 2009. <http://de.wikipedia.org/wiki/Chemokin>.
158. 2009. <http://de.wikipedia.org/wiki/CXCR2>.
159. Hennig, W. 1998. *Genetik*. Springer, Berlin Heidelberg New York.
160. 2009. <http://de.wikipedia.org/wiki/Zystin>.
161. 2009. <http://de.wikipedia.org/wiki/Metalloproteasen>.
162. 2009. <http://de.wikipedia.org/wiki/H%C3%A4matopoese>

8 Lebenslauf