

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Th17-Zellen und Interleukin-17A in der Pathogenese der chronischen Graft-versus-
Host Disease im Vergleich zu Lichen ruber planus, Leukoplakie und
Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Yvonne Anneli Martha Gutsche
aus Fürth

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Widmung

Gelöscht für Online-Version

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	11
1. Einleitung und Zielsetzung	14
2. Theoretische Grundlagen	15
2.1. Allogene Stammzelltransplantation.....	15
2.1.1. Definition, Wirkmechanismus und Ziele	15
2.1.2. Konditionierung.....	15
2.1.3. Indikationen	16
2.2. Graft-versus-Host Disease (GVHD).....	17
2.2.1. Akute GVHD.....	18
2.2.2. Chronische GVHD	18
2.2.3. cGVHD an der Mundschleimhaut.....	20
2.2.4. Diagnostik der cGVHD	20
2.2.5. Prophylaxe und Therapie der cGVHD.....	21
2.3. Lichen ruber planus.....	22
2.3.1. Definition.....	22
2.3.2. Klinische Zeichen des oralen Lichen ruber planus (OLP).....	22
2.3.3. Diagnostik und Therapie	23
2.4. Leukoplakie	24
2.4.1. Definition und Risikofaktoren	24
2.4.2. Einteilung.....	24
2.4.3. Diagnostik und Therapie	24
2.5. Orales Plattenepithelkarzinom (SCC).....	25
2.5.1. Definition und Risikofaktoren	25
2.5.2. Einteilung.....	26
2.5.3. Diagnostik und Therapie	27
2.6. T-Lymphozyten.....	28
2.6.1. T-Helferzellen Typ 17 (Th17-Zellen).....	28
2.6.2. Th17/Treg-Ratio – Gleichgewicht zwischen Immuntoleranz und Entzündung.....	31
3. Material und Methoden	33
3.1. Materialien.....	33
3.2. Humane Proben	35
3.2.1. Patientenblut.....	35

3.2.2.	Gesunde Kontrollen.....	38
3.3.	Materialgewinnung und Aufbewahrung	39
3.3.1.	Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).....	39
3.3.2.	Blutserum	41
3.4.	Durchflusszytometrie	41
3.4.1.	Prinzip.....	41
3.4.2.	Antikörper	42
3.4.3.	Oberflächenfärbungen	43
3.4.4.	Foxp3-Färbung	43
3.4.5.	Zellstimulation und intrazelluläre Zytokin-Färbung.....	44
3.5.	Multiplex Zytokinanalyse im Blutserum.....	44
3.6.	Statistische Auswertung	45
3.7.	Eigenständigkeitserklärung	46
4.	Ergebnisse.....	47
4.1.	T-Zellpopulationen in den Erkrankungsgruppen und bei gesunden Probanden	47
4.1.1.	Anteil an CD4-positiven T-Effektorzellen	47
4.1.2.	Anteil an CD4-negativen T-Effektorzellen (CD8-positive T-Zellen)	48
4.1.3.	CD4/CD8-T-Zell-Ratio	51
4.1.4.	Anteil regulatorischer T-Zellen (Treg)	52
4.2.	IL-17A-exprimierende Zellpopulationen	54
4.2.1.	Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an den Lymphozyten	54
4.2.2.	Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an CD3-positiven Lymphozyten	58
4.2.3.	Anteil von Th17-Zellen an CD3-/CD4-positiven Lymphozyten	61
4.2.4.	Anteil von Th17/Th1-Zellen an CD3-/CD4-positiven Lymphozyten	63
4.2.5.	Anteil von Tc17-Zellen an CD4-negativen Lymphozyten.....	66
4.2.6.	Th17/Treg-Ratio	68
4.3.	Zytokin-Konzentrationen im Blutserum	69
4.3.1.	Zytokine verschiedener T-Helferzellpopulationen (IL-2).....	69
4.3.2.	Th1-Zytokine (IFN- γ).....	70
4.3.3.	Th2-Zytokine (IL-5, IL-13, IL-4).....	70
4.3.4.	Th17-Zytokine (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22).....	72
4.3.5.	Pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, TNF- α , IFN- γ).....	76
4.3.6.	Anti-inflammatorische Zytokine (IL-10)	79
5.	Diskussion.....	81
5.1.	Methodisches Vorgehen	81

5.1.1.	Nachweis der Lymphozyten-Populationen und der Zytokin-Expression	81
5.1.2.	Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen im Blutserum	81
5.2.	Bedeutung von Th17-Zellen und IL-17A bei den Erkrankungen	82
5.2.1.	Th17-Zellen – OLP versus cGVHD.....	83
5.2.2.	Th17/Th1-Population – OLP versus cGVHD.....	86
5.2.3.	Th17-Zellen und IL-17A bei Leukoplakie	88
5.2.4.	Th17-Zellen und IL-17A beim oralen Plattenepithelkarzinom	89
5.2.5.	Alternative IL-17A-Produzenten beim oralen SCC und Th17/Th1-Zellen.....	90
5.3.	Ausblick	92
6.	Zusammenfassung	94
7.	Literatur.....	95
8.	Anhang	106
9.	Danksagung	116
10.	Lebenslauf	117

Abkürzungsverzeichnis

aGVHD	akute graft-versus-host disease
CD	cluster of differentiation
cGVHD	chronische graft-versus-host disease
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBMT	European Society of Blood and Marrow Transplantation
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3 (Marker für Treg)
FSC	forward scatter
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GVHD	Graft-versus-host disease
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	major histocompatibility complex
MW	Mittelwert
NIH	National Institutes of Health
OLP	oraler Lichen ruber planus
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
rpm	Runden pro Minute
SCC	squamous cell carcinoma
SD	Standardabweichung
SSC	Sideward scatter
TGF- β	transforming growth factor beta
Th1-Zellen	T-Helferzellen Typ 1
Th17-Zellen	T-Helferzellen Typ 17

Th2-Zellen

TNF- α

TNM

Treg

WHO

T-Helferzellen Typ 2

Tumornekrosefaktor alpha

Primärtumor, Lymphknoten, Metastasen

regulatorische T-Zellen

World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Indikationen zur allogenen HSCT in Europa 2018 (1).....	17
Abbildung 2: Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD3- und CD4-positiven T-Effektorzellen aus der Gesamtlymphozytenpopulation.	47
Abbildung 3: Anteil (%) an CD3- und CD4-positiven T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	48
Abbildung 4: Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD3- positiven und CD4-negativen T-Effektorzellen aus der Gesamtlymphozytenpopulation.	49
Abbildung 5: Anteil (%) an CD3-positiven und CD4-negativen T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	49
Abbildung 6: CD4/CD8-T-Zell-Ratio bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinom (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	51
Abbildung 7: Repräsentatives Beispiel des Gatings der regulatorischen T-Zellen (Treg)	52
Abbildung 8: Anteil (%) an Treg-Zellen (CD25-positiv / Foxp3-positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	53
Abbildung 9: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Gesamtlymphozyten und deren intrazelluläre IL-17A Expression ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts).	54
Abbildung 10: Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an der Lymphozyten-Gesamtpopulation bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	56
Abbildung 11: Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD3-positiven Lymphozyten und deren intrazelluläre IL-17A Expression ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts).....	58
Abbildung 12: Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an den CD3-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	60
Abbildung 13: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Th17-Zellen und deren intrazelluläre IL-17A Expression ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts)	62
Abbildung 14: Anteil von Th17-Zellen (CD4-positiv / IL-17A-positiv / IFN- γ -negativ) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	63
Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Th17/Th1-Zellen ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts)	64
Abbildung 16: Anteil von Th17/Th1-Zellen (CD4-positiv/IL-17A-positiv/IFN- γ -positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	65
Abbildung 17: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Tc17-Zellen ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts).....	66

Abbildung 18: Anteil von Tc17-Zellen (CD8-positiv/IL-17A-positiv) an CD4-negativen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	67
Abbildung 19: Th17/Treg-Ratio in CD3- und CD4-positiven T-Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	68
Abbildung 20: IL-2-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	69
Abbildung 21: IL-5-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	70
Abbildung 22: IL-13-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	71
Abbildung 23: IL-4-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	72
Abbildung 24: IL-17A-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	73
Abbildung 25: IL-17F-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	74
Abbildung 26: IL-21-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	75
Abbildung 27: IL-22-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	76
Abbildung 28: IL-6-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	77
Abbildung 29: TNF- α -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	78
Abbildung 30: IFN- γ -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	79
Abbildung 31: IL-10-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnostische Symptome der chronischen graft-versus-host disease (cGVHD) nach den Konsensus-Kriterien des National Institute of Health (13).....	19
Tabelle 2: Gesamtschweregrad der chronischen graft-versus-host disease (cGVHD) nach den Konsensus-Kriterien des National Institute of Health (35)	21
Tabelle 3: Klinische TNM-Klassifikation für Karzinome der Mundhöhle (90).....	26
Tabelle 4: Union for International Cancer Control (UICC) Stadien für Karzinome der Mundhöhle (90).....	27
Tabelle 5: Liste der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien	33
Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	33
Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte.....	34
Tabelle 8: Liste der verwendeten Gebrauchswaren	34
Tabelle 9: Liste der verwendeten Kits	35
Tabelle 10: Liste der verwendeten Software.....	35
Tabelle 11: Patientenliste von Patienten mit chronischer graft-versus-host disease cGVHD an der Mundschleimhaut (MSH)	36
Tabelle 12: Patientenliste von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (SCC)	38
Tabelle 13: Patientenliste der Patienten mit Lichen ruber planus an der Mundschleimhaut..	38
Tabelle 14: Patientenliste der Patienten mit Leukoplakie	38
Tabelle 15: Verwendete Buffy-Coats (BC) mit interner Kennzeichnung.....	39
Tabelle 16: Antikörper mit Spezies, Fluorochrom, Klon und Firma	42
Tabelle 17: Antikörperpanel für die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten-Populationen	43
Tabelle 18: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) an CD3- und CD4-positiven T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	48
Tabelle 19: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) an CD3-positiven und CD4-negativen T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	50
Tabelle 20: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) an Treg-Zellen (CD25-positiv / Foxp3-positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC).....	53
Tabelle 21: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) IL-17A-exprimierender Zellen an der Lymphozyten-Gesamtpopulation bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunde Kontrollen (BC)	57
Tabelle 22: Statistische Kennzahlen des Anteils IL-17A-exprimierender Zellen an den CD3-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	61
Tabelle 23: Statistische Kennzahlen des Anteils von Th17-Zellen (CD4-positiv / IL-17A-positiv / IFN- γ -negativ) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	63

Tabelle 24: Statistische Kennzahlen des Anteils von Th17/Th1-Zellen (CD4-positiv/IL-17A-positiv/IFN- γ -positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	65
Tabelle 25: Statistische Kennzahlen des Anteils von Tc17-Zellen (CD8-positiv/IL-17A-positiv) an CD4-negativen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC).....	67
Tabelle 26: Statistische Kennzahlen der Th17/Treg-Ratio in CD3- und CD4-positiven T-Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)	68
Tabelle 27: Statistische Kennzahlen der IL-2-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	70
Tabelle 28: Statistische Kennzahlen der IL-2-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	71
Tabelle 29: Statistische Kennzahlen der IL-13-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	71
Tabelle 30: Statistische Kennzahlen der IL-4-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	72
Tabelle 31: Statistische Kennzahlen der IL-17A-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	73
Tabelle 32: Statistische Kennzahlen der IL-17R-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	74
Tabelle 33: Statistische Kennzahlen der IL-21-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	75
Tabelle 34: Statistische Kennzahlen der IL-22-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	76
Tabelle 35: Statistische Kennzahlen der IL-6-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	77
Tabelle 36: Statistische Kennzahlen der TNF- α -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	78
Tabelle 37: Statistische Kennzahlen der IFN- γ -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	79
Tabelle 38: Statistische Kennzahlen der IL-10-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten	80

1. Einleitung und Zielsetzung

T-Helferzellen Typ 17 (Th17-Zellen) stellen neben den klassischen T-Helferzellen Typ 1 / Typ 2 (Th1-/Th2-Zellen) einen weiteren Subtyp der cluster of differentiation (CD) 4 positiven T-Effektorzellen dar (1). Neben protektiven Funktionen im Rahmen der Infektionsabwehr werden Th17-Zellen in Zusammenhang mit chronisch inflammatorischen Prozessen und der Genese von Autoimmunerkrankungen gebracht (2-4). Weiterhin weisen Befunde auf eine potenzielle Rolle der Th17-Zellen bei der Kanzerogenese hin (5).

Die chronische graft-versus-host disease (cGVHD) ist eine unerwünschte Nebenwirkung nach der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT), die mit einer beträchtlichen Morbidität und Mortalität einhergeht (6). Hierbei richtet sich das Spenderimmunsystem gegen gesundes Patientengewebe. Die potenziell bei einer cGVHD auftretenden Abstoßungssyndrome ähneln bestimmten Autoimmunerkrankungen. Bisherige Studien zur Bedeutung von Th17-Zellen bei der cGVHD ergaben kontroverse Resultate (7, 8).

Ziel des vorliegenden Forschungsprojektes ist es, die Bedeutung von Th17-Zellen für die Pathogenese der cGVHD der Mundschleimhaut zu analysieren und diese Rolle mit der in phänotypisch ähnlichen Krankheitsbildern (Leukoplakie, Lichen ruber planus) und beim oralen Plattenepithelkarzinom (engl. squamous cell carcinoma, SCC) zu vergleichen. Das Fernziel ist es, Interleukin-(IL)-17A als potenziellen Biomarker oder therapeutisches Target für die cGVHD der Mundschleimhaut zu etablieren.

Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit spezifische Oberflächenmarker von T-Zellpopulationen sowie IL-17A- bzw. Interferon-gamma-(IFN- γ)-positive Zellpopulationen in den Erkrankungsgruppen und bei gesunden Kontrollen mittels Durchflusszytometrie verglichen. Für die IL-17A- und IFN- γ -Expressionsanalyse wurden Zellen im Vorfeld mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert und anschließend mit den nicht-stimulierten Zellen verglichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Zytokin-Messungen im Blutserum der Patientengruppen und der gesunden Kontrollen durchgeführt. Hierbei sollten potenzielle Unterschiede in den Serumkonzentrationen und im Besonderen des Schlüsselzytokins IL-17A evaluiert werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Allogene Stammzelltransplantation

2.1.1. Definition, Wirkmechanismus und Ziele

Die allogene HSCT stellt für viele hämatologische Neoplasien die einzige kurative Therapieoption dar. Seit 1990 steigen nach Angaben der European Society of Blood and Marrow Transplantation (EBMT) in Europa die Transplantationsraten für die allogene und die autologe HSCT. In ihrem Aktivitätssurvey für das Jahr 2018 veröffentlichte die EBMT aktuelle Transplantationszahlen für 50 europäische Länder und Mitgliedsstaaten. Demnach wurden 47.468 HSCT an knapp 43.000 Patienten durchgeführt, davon 27.838 autolog und 19.630 allogen. Besonders die Zahl der allogenen HSCT war im Vergleich zu den Vorjahren gestiegen (9).

Bei der allogenen HSCT werden Blutstammzellen eines gesunden Spenders in einen Empfängerorganismus übertragen, dessen Immunsystem zuvor durch eine Konditionierung vollständig oder teilweise depletiert wurde. Für die Gewinnung von hämatopoietischen Stammzellen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Durch Punktion des Beckenkamms können Stammzellen aus dem Knochenmark entnommen werden (Knochenmark-Stammzellen). Zudem ist eine Gewinnung aus dem peripheren Blut mittels Leukapherese nach Stammzellmobilisation durch die Vorbehandlung mit granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) möglich (Blutstammzellen) (10). Als alternative Stammzellquelle kann auch Nabelschnurblut genutzt werden (11, 12). Das Ziel der allogenen HSCT ist immer potenziell kurativ. Mit dem Anwachsen (engraftment) der infundierten Spenderstammzellen im Knochenmark des Empfängers bildet sich ein neues blutbildendes System aus, dessen Immunzellen potenziell in der Lage sind, maligne entartete Zellen im Empfängerorganismus zu erkennen und zu bekämpfen. Dieser graft-versus-malignancy (GvM) Effekt gleicht einer lebenslangen Immuntherapie (13).

2.1.2. Konditionierung

Konditionierungsregime werden vor der Durchführung der HSCT eingesetzt, um die Tumorlast zu reduzieren, das Immunsystem des Empfängers teilweise oder vollständig zu depletieren und somit den Empfänger auf die Transplantation vorzubereiten. Diese

Maßnahme soll eine Abstoßung der Spenderzellen verhindern und das Anwachsen der neuen Stammzellen (engraftment) im Empfängerorganismus ermöglichen. Unterschieden werden eine konventionelle (myeloablative) Konditionierung und dosisreduzierte (reduced intensity conditioning = RIC) Regime, die sich durch eine deutlich geringere Dosisintensität bei der Chemo- und Strahlentherapie auszeichnen. Grundlage für die Entwicklung solcher dosisreduzierten Regime waren Versuche an Hunden, in denen Storb et al. 1997 zeigen konnten, dass für das Anwachsen des Transplantats keine vollständige Depletion der Hämatopoese erforderlich war. Bereits eine Ganzkörperbestrahlung von 2 Gray gefolgt von einer medikamentösen Immunsuppression erwies sich als ausreichend (14). Besonders ältere und komorbide Patienten profitieren von dosisreduzierten Konditionierungsregimen (15). Im Vergleich zur konventionellen Konditionierung zeichnen sie sich durch eine geringere Akuttoxizität und Bakteriämiehäufigkeit aus, die auf eine erhaltene Schleimhautintegrität und kürzere Neutropeniedauer zurückzuführen sind. Anwendungslimitierend sind erhöhte Rezidivraten, die bei Erkrankungen mit hoher Proliferationsrate, wie der akut lymphatischen Leukämie (ALL) oder aggressiven Lymphomen, auftreten. In diesen Fällen scheint das geringere zytotoxische Potenzial der dosisreduzierten Regime in Kombination mit der erforderlichen Zeitdauer, bis ein ausreichender graft-versus-malignancy (GvM) Effekt ausgebildet ist, der hohen Proliferationsdynamik der malignen Grunderkrankung nicht gerecht zu werden (16). Die vollständig myeloablativ wirkende konventionelle Konditionierung besteht aus einem hochdosierten Chemotherapeutikum, wie Cyclophosphamid, in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation) oder Busulfan. Zudem können weitere Chemotherapeutika und zusätzlich T-Zell-depletierende Antikörper (z.B. Antithymozytenglobulin (ATG)) zum Einsatz kommen. Myeloablative Regime weisen im Vergleich zu dosisreduzierten Regimen ein geringeres Rezidivrisiko bei erhöhter Toxizität auf (17). Die Wahl des passenden Konditionierungsregimes ist eine individuelle Entscheidung auf der Basis der Art und des Stadiums der Erkrankung, des Alters und des Rezidivrisikos des Patienten sowie der zumutbaren Toxizität (10).

2.1.3. Indikationen

Für die allogene HSCT besteht ein breites Indikationsspektrum. Sie ist immer dann eine therapeutische Option, wenn sie mit einer potenziell besseren Prognose

einhergeht als alternative Behandlungsmethoden, keine andere kurative Behandlungsstrategie zur Verfügung steht oder alternative Therapieoptionen ausgeschöpft sind (18). Im EBMT-Aktivitätssurvey sind die Transplantationsindikationen in Europa für das Jahr 2018 gelistet (s. Abb. 1). Myeloische Leukämien (akute myeloische Leukämie (AML), chronisch myeloische Leukämie (CML)) sowie deren Vorläuferformen (myelodysplastisches Syndrom (MDS)) stellten die Hauptindikationen dar. Daneben profitierten auch Patienten mit lymphatischen Neoplasien und Patienten mit Knochenmarksinsuffizienz nicht-maligner Genese von einer allogenen HSCT (9).

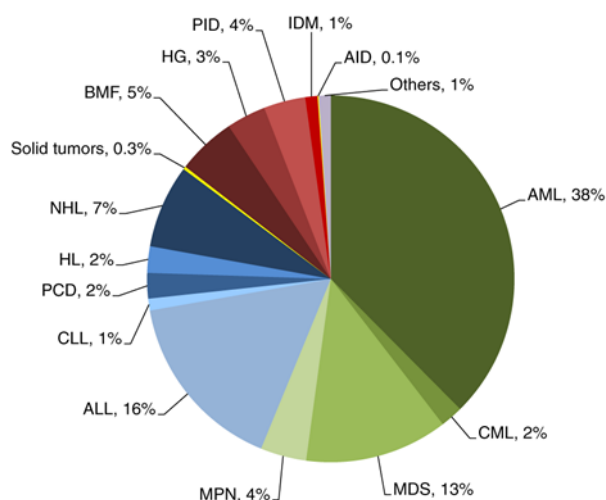


Abbildung 1: Indikationen zur allogenen HSCT in Europa 2018 (9)

AML: akute myeloische Leukämie; CML: chronische myeloische Leukämie; MDS: myelodysplastisches Syndrom; MPN: myeloproliferative Neoplasie; ALL: akute lymphatische Leukämie; CLL: chronische lymphatische Leukämie; PCD: Plasmazellerkrankungen; HL: Hodgkin-Lymphom; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; BMF: Knochenmarksversagen; HG: Sichelzellanämie; PID: Primärer Immundefekt; IDM: vererbte Stoffwechselerkrankungen; AID: Autoimmunerkrankungen

(Mit freundlicher Genehmigung von nature journal und Herrn J.R. Passweg. Abbildung übernommen aus <https://www.nature.com/articles/s41409-020-0826-4/figures/1> (Datum: 10.04.2020)

2.2. Graft-versus-Host Disease (GVHD)

Die GVHD stellt eine der Hauptkomplikationen nach allogener HSCT dar und geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Die auftretende Abstoßungsreaktion gegenüber gesunden Zellen des Empfängers wird durch immunkompetente T-Lymphozyten aus dem Transplantat verursacht. Je nach klinischem Erscheinungsbild und dem zeitlichen Auftreten der Symptome nach der allogenen HSCT werden akute und chronische Formen unterschieden (19). Obwohl die akute GVHD (aGVHD) nicht Gegenstand dieser Forschungsarbeit ist, soll sie im Folgenden kurz Erwähnung finden.

2.2.1. Akute GVHD

Die aGVHD tritt mit einer Inzidenz von 30–60 % nach einer allogenen HSCT auf und manifestiert sich vorwiegend in der Haut, der Leber und dem Darm. Die Pathophysiologie folgt dem erstmals von Ferrara et al. postulierten 3-Phasen-Modell. Hiernach verursacht die Chemo- und Strahlentherapie im Rahmen der Konditionierung einen Gewebeschaden im Empfängerorganismus, der die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen zur Folge hat. In der zweiten Phase kommt es zur Aktivierung und Expansion von Spender-T-Zellen, die Moleküle auf den Antigen-präsentierenden Zellen erkennen. Die Folge ist eine komplexe Aktivierung weiterer Entzündungszellen und Mediatoren, die schließlich zur Apoptose der Zielgewebe führt (6).

Die strenge Trennung der aGVHD und der cGVHD nach dem zeitlichen Auftreten vor bzw. nach Tag 100 post transplantationem wurde inzwischen verlassen. Nach der neuen National Institute of Health-(NIH)-Consensus-Klassifikation kann eine persistierende, rekurrende oder spät beginnende aGVHD auch nach Tag 100 vorliegen. Umgekehrt ist bei typischer Klinik die Diagnose einer cGVHD unabhängig vom zeitlichen Auftreten möglich (20). Zudem wird zwischen der klassischen cGVHD, bei der ausschließlich Zeichen der cGVHD vorliegen, und dem overlap-Syndrom, bei dem Manifestationen der aGVHD und der cGVHD parallel auftreten, unterschieden. Das overlap-Syndrom ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (21).

2.2.2. Chronische GVHD

Die cGVHD stellt den Transplanteur vor eine große Herausforderung, da sie für den Patienten oftmals mit großen Einschränkungen der Lebensqualität, der Notwendigkeit einer längerfristigen immunsuppressiven Therapie und nicht selten mit einem letalen Ausgang einhergeht (22, 23). Die cGVHD kann sich de novo ohne vorangegangene aGVHD ausbilden, sich progressiv aus einer aGVHD entwickeln oder nach erfolgreicher Therapie einer aGVHD (quiescent) entstehen. Bis zu 70 % aller Patienten entwickeln nach einer allogenen HSCT eine cGVHD (24), wobei die Inzidenz moderater und schwerer Verlaufsformen in den vergangenen Jahren deutlich zugenommen hat (25). Ein Grund hierfür ist die zunehmende Nutzung von mit granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) mobilisierten peripheren

Blutstammzellen, da hier ein schnelleres Engraftment und geringere Abstoßungsraten zu beobachten sind (26, 27). Zudem werden, infolge der Einführung der dosisreduzierten Konditionierung, ältere Patienten transplantiert, wodurch das Risiko für eine cGVHD ansteigt. Als weitere Risikofaktoren sind eine vorausgehende aGVHD, ein human-leucocyte-antigen-(HLA)-mismatch, ein nicht verwandter Spender, ein weiblicher Spender für einen männlichen Empfänger und die Konditionierung ohne Antithymozytenglobulin (ATG) in der Literatur beschrieben (28, 29).

Im Vergleich zur Pathophysiologie der aGVHD, die primär durch alloreaktive T-Zellen des Transplantats ausgelöst wird, ist die Entstehung der cGVHD weitaus schlechter verstanden. Nach aktuellem Kenntnisstand stehen Beeinträchtigungen der zentralen und peripheren Toleranzmechanismen sowie eine chronische Entzündung und Fibrose im Vordergrund (6, 30). Neben alloreaktiven Immunzellen sind auch autoreaktive T- und B-Lymphozyten involviert (31, 32).

Die potenziellen klinischen Zeichen der cGVHD sind vielfältig, da prinzipiell jedes Organ betroffen sein kann (s. Tab. 1). Häufig präsentiert sich das Bild einer Autoimmunerkrankung ähnlich einer Sklerodermie, eines systemischen Lupus erythematodes, eines Sjögren-Syndroms oder eines Lichen ruber planus (20, 33). Erste klinische Zeichen der cGVHD manifestieren sich meist an der Haut und der Mundschleimhaut (6). Weiter sind häufig die Genitalien, der Gastrointestinaltrakt (Schluckstörungen, Erbrechen, Durchfälle), die Leber, die Lunge sowie Muskeln und Gelenke (Fasziitis, Sklerose, Kontraktionen) betroffen.

Tabelle 1: Diagnostische Symptome der chronischen graft-versus-host disease (cGVHD) nach den Konsensus-Kriterien des National Institute of Health (20)

Organ	Diagnostische klinische Zeichen
Haut	Poikilodermie Lichen planus-artige Veränderungen Sklerotische/Morphea-artige Veränderungen Lichen sclerosus-artige Veränderungen
Mundschleimhaut	Lichen planus-artige Veränderungen
Genitalien	Lichen planus / Lichen sclerosus-artige Veränderungen Frauen: vaginale Vernarbungen Männer: Phimose, Uretherstenose
Gastrointestinaltrakt	Stenosen und Strikturen im oberen und mittleren Drittel des Ösophagus
Lunge	Bronchiolitis obliterans
Muskeln, Faszien und Gelenke	Fasziitis Gelenksteifigkeit und -kontraktionen infolge der Fasziitis oder Sklerose

2.2.3. cGVHD an der Mundschleimhaut

Die Mundschleimhaut gehört mit einer Prävalenz von bis zu 80 % zu den am häufigsten betroffenen Organen bei einer cGVHD (32). Charakteristisch sind Veränderungen im Sinne eines oralen Lichen ruber planus (OLP) mit weißlich retikulären Zeichnungen der oralen Mukosa. Prädilektionsstellen sind die Wangenschleimhaut und die Zunge. Weiter treten hyperkeratotische Plaques ähnlich der Leukoplakie und Pseudomembranen bis hin zur mukosalen Atrophie auf. Erythematöse und ulzeröse Veränderungen können starke Schmerzen hervorrufen und die Nahrungsaufnahme des Patienten erheblich einschränken (34). Zusätzlich steigt die Gefahr für orale Infektionen. Bei Befall der Speicheldrüsen kann sich eine Sicca-Symptomatik ausbilden (35). Die Patienten leiden unter Geschmacksveränderungen und haben Probleme beim Kauen, Schlucken sowie Sprechen. Durch ausgeprägte sklerotische Veränderungen kann zudem die Mundöffnung beeinträchtigt sein. Eine langandauernde cGVHD der Mundschleimhaut kann zu Karies und Parodontose führen sowie das Risiko für Sekundärmalignome der Mundschleimhaut erhöhen (36, 37). Das SCC stellt hierbei eine der häufigsten Tumorentitäten dar (38, 39). Neben diesen negativen Effekten ist das Auftreten der cGVHD aber mit einer geringeren Rezidivrate der malignen Grunderkrankung assoziiert (40).

2.2.4. Diagnostik der cGVHD

Die Diagnosestellung erfolgt in erster Linie anhand der Anamnese und der klinischen Symptome (s. Tab. 1), ggf. abgesichert durch histologische oder radiologische Befunde entsprechend der NIH-Konsensus-Kriterien. Der Gesamtschweregrad („mild“, „moderat“, „schwer“) lässt sich nach den NIH-Konsensus-Kriterien von 2005 und 2014 aus der Anzahl der betroffenen Organe sowie der Schwere des jeweiligen Organbefalls bestimmen (20, 41) (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Gesamtschweregrad der chronischen graft-versus-host disease (cGVHD) nach den Konsensus-Kriterien des National Institute of Health (42)

Gesamt-Schweregrad	mild	moderat	schwer
Zahl der betroffenen Organe	1-2	> 2	> 2
Schweregrad der Organmanifestation	mild (außer Lunge)	mild-moderat Lunge: nur mild	schwer Lunge: moderat-schwer

2.2.5. Prophylaxe und Therapie der cGVHD

Um dem Auftreten einer GVHD vorzubeugen, erhalten Patienten im Rahmen der Konditionierung eine immunsuppressive Behandlung. Zum Einsatz kommen Calcineurin-Inhibitoren wie Tacrolimus oder Cyclosporin A in Kombination mit dem Folsäure-Antagonisten Methotrexat oder Mycophenolat-Mofetil (MMF) (43-46). Weiterhin können mammalian target of rapamycin (mTOR) Inhibitoren, wie Sirolimus, prophylaktisch verabreicht werden. Welche Medikamente miteinander kombiniert werden, hängt von verschiedenen Faktoren, wie dem human-leucocyte antigen-(HLA)-Mismatch zwischen Spender und Empfänger und der Art des Stammzellproduktes (verwandter oder nicht verwandter Spender), ab (47-49).

Neben der medikamentösen Immunsuppression werden zur Prophylaxe der GVHD T-Zell-depletierende Verfahren eingesetzt, bei denen Spender-T-Lymphozyten in vitro oder in vivo inaktiviert werden. Zur Anwendung kommen der monoklonale CD52-Antikörper Alemtuzumab und Anti-T-Lymphozyten-Globuline (am vorliegenden Transplantationszentrum: Antithymozytenglobulin (ATG) Fresenius). Laut Studien lässt sich hierdurch das Risiko insbesondere für die Entstehung einer schweren cGVHD deutlich verringern (50-53).

Entwickelt sich trotz der prophylaktischen Maßnahmen eine cGVHD, richtet sich die Therapie nach dem Schweregrad. Sind die Kriterien der moderaten cGVHD erfüllt (> 2 Organe betroffen oder Organschweregrad ≥ 2), ist eine systemische immunsuppressive Therapie indiziert. In erster Linie werden Corticosteroide (Prednison/Methylprednisolon) eingesetzt, die je nach Manifestationsort mit topisch wirksamen Immunsuppressiva (topische Steroide, Calcineurin-Inhibitoren) kombiniert werden können (54). Kommt es unter dieser Therapie zu keiner Besserung der Symptomatik oder zu einer Progression, spricht man von einer Steroid-refraktären cGVHD (55). Etwa 50 % der Patienten sprechen nur unzureichend auf die initiale

Behandlung mit Corticosteroiden an. Für die Zweitlinientherapie fehlt bislang ein allgemeingültiger Standard. Häufig werden Immunsuppressiva wie Mycophenolat-Mofetil, Sirolimus oder eine extrakorporale Photopherese eingesetzt (56). Mögliche neue Therapiestrategien, die auf die Modulation des Zytokin-Netzwerks im Rahmen der GVHD abzielen, sind Gegenstand der aktuellen Forschung (57).

2.3. Lichen ruber planus

2.3.1. Definition

Der Lichen ruber planus beschreibt eine nicht-infektiöse, chronisch-entzündliche Erkrankung, die die Haut und die Schleimhäute befällt (58). Während die Manifestationen an der Haut meist selbstlimitierend sind, verläuft der orale Lichen ruber planus (OLP) in der Regel chronisch und ist für Betroffene mit Einschränkungen der Lebensqualität assoziiert. Mit einer Prävalenz von 0,5–2 % handelt es sich um eine eher seltene Erkrankung, die bevorzugt Frauen im Alter zwischen 30–60 Jahren betrifft (59-61). Obwohl manche Autoren dem OLP eine durch T-Lymphozyten vermittelte autoimmune Genese zuschreiben, ist die genaue Ursache bisher nicht geklärt. Verschiedene prädisponierende Faktoren wie Polymorphismen in Genen für Zytokine (IFN- γ ; Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)), Systemerkrankungen wie Hepatitis C oder Medikamente wie Antihypertensiva werden diskutiert (62-64).

2.3.2. Klinische Zeichen des oralen Lichen ruber planus (OLP)

Typischerweise zeigt sich der OLP an der Wangenschleimhaut und imponiert durch sein meist bilaterales, symmetrisches Erscheinungsbild (65). Daneben sind die Zunge, das Zahnfleisch oder die lippennahe Schleimhaut betroffen. Klinisch werden sechs morphologische Subtypen, die auch kombiniert auftreten können, unterschieden: die retikuläre, die Plaque-artige, die atrophe, die erosive, die papulöse und die bullöse Form (66). Die häufigste, retikuläre Form ist durch multiple Papeln, die zu einem typischen netzartigen grau-weißlichen Muster (Wickham-Streifung) konfluieren, gekennzeichnet (67). Während die Patienten bei der retikulären Form oft beschwerdefrei sind, geht die erosive Form durch ihre Ulzera und Pseudomembranen

mit starken Schmerzen einher (68). Die Plaque-artige Form des OLP ist klinisch nicht von der Leukoplakie zu differenzieren. Hier zeigen sich homogene, weiße, leicht erhabene und multifokal auftretende Läsionen der Mundschleimhaut (66). Papulöse und bullöse Formen des OLP sind eher selten.

2.3.3. Diagnostik und Therapie

Nach den modifizierten diagnostischen Kriterien der world health organization (WHO) von 2003 erfolgt die Diagnosestellung des OLP in der Regel auf der Basis klinischer und histopathologischer (bandförmiges lymphozytäres Infiltrat, Degeneration basaler Keratinozyten) Befunde (69). Differenzialdiagnostisch ist eine Vielzahl von Erkrankungen zu berücksichtigen, die mit lichenoiden Läsionen vergesellschaftet sein können. Dazu zählen systemische Autoimmunerkrankungen wie der Lupus erythematodes oder auch lichenoiden Schleimhautläsionen im Rahmen der cGVHD. Klinische und histopathologische Gemeinsamkeiten (z. B. bandförmige T-Zell-Infiltrate, Apoptose basaler Keratinozyten, Zerstörung der epithelialen Basalmembran) lassen ähnliche immunologische Effektormechanismen vermuten (70).

Sofern die oralen Läsionen keine Beschwerden verursachen, ist keine Therapie notwendig und eine regelmäßige Kontrolle auf eine maligne Transformation ausreichend. Ulzeröse und atrophe Formen können mit topisch wirksamen Corticosteroiden (Triamcinolon, Fluocinolon) oder topischen Calcineurin-Inhibitoren, wie Tacrolimus oder Cyclosporin A, behandelt werden (71-73). Bei schweren Verläufen werden systemische Steroide oder andere Immunsuppressiva eingesetzt. Obwohl maligne Veränderungen infolge eines OLP dokumentiert wurden, ist die Frage nach dem Entartungsrisiko weiterhin umstritten. Die Angaben variieren zwischen 0–5 % (74, 75). Im Falle einer Tumorentwicklung trat das SCC am häufigsten auf (76, 77).

2.4. Leukoplakie

2.4.1. Definition und Risikofaktoren

Gemäß der WHO-Definition von 1978 beschreibt die Leukoplakie einen weißen, nicht abwischbaren Fleck der Mundschleimhaut, der weder klinisch noch histopathologisch einer anderen Erkrankung zugeordnet werden kann (78). Somit ist die Leukoplakie eine Ausschlussdiagnose. Die Leukoplakie gilt als die häufigste epitheliale Vorläuferläsion eines oralen SCC. 16–60 % aller SCC der Mundschleimhaut entstehen auf dem Boden einer Leukoplakie.

Bei einer Gesamtprävalenz von 0,5–4 % betrifft die Leukoplakie öfter Männer als Frauen (79). Zu den bedeutenden Risikofaktoren zählen Rauchen und Alkoholkonsum. Raucher zeigen im Vergleich zu Nichtrauchern ein 6-fach höheres Risiko und Personen, die zusätzlich Alkohol konsumieren ein bis zu 15-fach höheres Risiko (80). Daneben sind humane Papillomaviren (HPV) vom high-risk Typ, eine mangelnde Mundhygiene und eine mechanische Reizung durch Zahnprothesen als Risikofaktoren beschrieben (81).

2.4.2. Einteilung

Morphologisch werden zwei Hauptformen unterschieden: die homogene Leukoplakie (Leukoplakia simplex), gekennzeichnet durch ein flaches, dünnes und einheitlich weißes Erscheinungsbild und die inhomogene Leukoplakie, die eher unregelmäßig, nodulär oder als gemischt weiß-rote Plaques (Erythroleukoplakie) imponiert (82, 83). Verglichen mit der homogenen Leukoplakie ist die inhomogene Form mit einem höheren Entartungsrisiko assoziiert (0,6–5 % vs. 25 %). Die multifokal auftretende proliferative verruköse Leukoplakie (PVL) gilt mit einer Transformationsrate von bis zu 100 % als aggressivster Subtyp der inhomogenen Leukoplakie (84, 85).

2.4.3. Diagnostik und Therapie

Die Ausschlussdiagnose einer Leukoplakie wird in Zusammenschau der Patientenanamnese, dem klinischen Erscheinungsbild und der histopathologischen

Befunde gestellt. Histologisch zeigt sich eine Hyperkeratose oder Parakeratose mit möglicherweise vorliegenden dysplastischen oder karzinomatösen Veränderungen. Nicht selten wird infolge der histopathologischen Untersuchung die klinische Diagnose revidiert, da weiße Schleimhautflecken im Rahmen zahlreicher anderer Erkrankungen der Mundschleimhaut (z. B. OLP) vorkommen können (85).

Die Therapie der Leukoplakie stellt aufgrund der ausgeprägten Rezidivneigung eine Herausforderung dar. Derzeitige Behandlungsstrategien umfassen die Ausschaltung potenzieller Risikofaktoren (Alkohol-, Nikotinkarenz), beobachtendes Abwarten (watchful waiting) und chirurgische Interventionen (85, 86). Zur Verringerung des Rezidivrisikos wurden in den vergangenen Jahren verschiedene topische Therapeutika getestet. Die Ansprechraten lagen bei 32 % für Retinoide und 40 % für Bleomycin. Allerdings kam es auch unter dieser Therapie zu Rezidiven (87).

2.5. Orales Plattenepithelkarzinom (SCC)

2.5.1. Definition und Risikofaktoren

Das SCC ist die häufigste Tumorentität im Kopf-Hals-Bereich und steht bei malignen Tumoren weltweit an sechster Stelle (88). Der epitheliale Tumor entwickelt sich im Bereich der Mundschleimhaut häufig aus Vorläuferläsionen wie der Leukoplakie, Erythroplakie oder dem OLP (89). Als Prädilektionsstellen gelten der Mundboden, der Alveolarfortsatz und der Zungenrand. Ebenso können Pharynx, Larynx und Speicheldrüsen betroffen sein. Trotz multimodaler Therapieansätze (s. Kap. 2.5.3) geht das orale SCC mit einer schlechten Prognose einher (5-Jahres Überleben ca. 50 %) (90). Gründe hierfür sind eine meist späte Diagnosestellung, ein schnelles und aggressives Tumorwachstum, eine frühzeitige Metastasierung in die zervikalen Lymphknoten-Regionen und eine hohe lokoregionäre Rezidivrate (91, 92).

Die Genese des oralen SCC ist multifaktoriell. Neben genetischen Faktoren und dem Alter des Patienten zählen exogene Noxen wie Alkohol-, Tabak- und Betelnuss-Konsum zu den Hauptrisikofaktoren (93-95). Oropharyngeale SCC bei jüngeren Patienten sind oft auf eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) Typ 16 und 18 zurückzuführen (96).

2.5.2. Einteilung

Die Einteilung der oralen SCC erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC). Hierbei wird die Ausdehnung des Primärtumors (T), das Vorliegen von Lymphknoten-Metastasen (N) sowie eine Fernmetastasierung (M) erfasst (s. Tab. 3, 4) (97). Dieses Tumorstaging dient als Grundlage für die Therapieplanung (90). Daneben ist der Resektionsstatus (R-Klassifikation) und der Differenzierungsgrad (Grading) für die Behandlung und die Prognose relevant (98).

Tabelle 3: Klinische TNM-Klassifikation für Karzinome der Mundhöhle (97)

Ausdehnung des Primärtumors (T)	
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorausdehnung \leq 2 cm und Invasionsstiefe \leq 5 mm
T2	<ul style="list-style-type: none"> • Tumorausdehnung \leq 2 cm und Invasionsstiefe $>$ 5 mm bis maximal 10 mm • Tumorausdehnung $>$ 2 cm bis maximal 4 cm und Invasionsstiefe \leq 10 mm
T3	Tumorausdehnung $>$ 4 cm oder Invasionsstiefe $>$ 10 mm
T4a	Infiltration durch kortikalen Knochen der Maxilla oder Mandibula, Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Infiltration des Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder Umschließen der Arteria carotis interna
Lymphknoten-(LK)-Metastasen	
N0	keine regionären LK-Metastasen
N1	Metastasen in solitärem ipsilateralen LK, Ausdehnung \leq 3 cm ohne extranodale Ausbreitung
N2a	wie N1 aber Ausdehnung $>$ 3 cm bis maximal 6 cm
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen LK, Ausdehnung jeweils max. 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen LK, Ausdehnung jeweils max. 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung
N3a	LK-Metastase(n), Ausdehnung $>$ 6 cm, ohne extranodale Ausbreitung
N3b	Metastase(n) in einem einzelnen oder mehreren LK, klinisch extranodale Ausbreitung
Fernmetastasen (M)	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 4: Union for International Cancer Control (UICC) Stadien für Karzinome der Mundhöhle (97)

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3 T1, T2, T3	N0 N1	M0
Stadium IVA	T4a T1, T2, T3, T4a	N0 oder N1 N2	M0
Stadium IVB	Jedes T T4b	N3 Jedes N	M0
Stadium IVC	Jedes T	Jedes N	M1

2.5.3. Diagnostik und Therapie

Diagnostischer Goldstandard ist die Biopsie suspekter Schleimhautbefunde (exophytisches Wachstum, Ulzerationen, Indurationen mit erhabenem Rand) und die histopathologische Beurteilung. Zum Ausschluss synchroner Zweittumoren empfiehlt die aktuelle Leitlinie zudem eine Hals-Nasen-Ohren-ärztliche Abklärung im Rahmen der Primärdiagnostik. Bildgebende Verfahren (Sonografie, Computertomografie, Magnetresonanztomografie) finden insbesondere im Rahmen der Tumorausbreitungsdiagnostik Anwendung (99).

Die Therapieplanung erfolgt in der Regel interdisziplinär im Rahmen eines Tumorboards. Die Therapieform richtet sich nach der Lage und dem Stadium des SCC sowie nach dem Allgemeinzustand des Patienten. In kurativer Absicht kann eine chirurgische Entfernung mit oder ohne (neo-)adjuvante Radiochemotherapie erfolgen (100). Aufgrund einer okkulten Metastasierung in die zervikalen Lymphknoten in 20–40 % der Fälle geht die chirurgische Exzision des Primärtumors oft mit einer selektiven oder radikalen Neck-Dissection einher (100). Bei Inoperabilität oder Fernmetastasierung wird in der Regel eine palliative (Radio-)Chemotherapie eventuell kombiniert mit Cetuximab, einem Antikörper gegen den epidermal growth factor receptor (EGFR-Antikörper), eingeleitet (99). Trotz der multimodalen Therapieansätze sind die häufigen Rezidive und die Metastasierung mit einer hohen Mortalität assoziiert. Diese Situation verdeutlicht die Notwendigkeit der Identifizierung prognostischer Biomarker und der Etablierung neuer Therapiestrategien.

2.6. T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind Bestandteil der adaptiven Immunabwehr. Ihr gemeinsames Kennzeichen ist der Oberflächenmarker CD3, der gemeinsam mit dem T-Zellrezeptor der Antigen-Erkennung dient. In Abhängigkeit von der Expression weiterer Oberflächenmarker werden sie in zytotoxische T-Zellen (CD8-positiv) und T-Helferzellen (CD4-positiv) unterteilt (101).

Ein in den menschlichen Körper eindringendes Pathogen wird von Immunzellen der unspezifischen Abwehr erkannt, phagozytiert, prozessiert und gebunden an major histocompatibility complex (MHC) Moleküle auf der Zelloberfläche der Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert. Zytotoxische, CD8-positive T-Zellen erkennen an MHC-I-Moleküle gebundene Antigenfragmente, beispielsweise virale Proteine, und sind in der Lage bei den infizierten Zellen die Apoptose einzuleiten. Naive CD4-positive T-Zellen interagieren hingegen mit an MHC-II-Molekülen gebundenen Antigenen und differenzieren in verschiedene T-Effektorzelltypen. Für diese Differenzierung benötigen die naiven CD4-positiven T-Zellen neben der Aktivierung des T-Zellrezeptors durch die Bindung an den MHC-II/Antigen-Komplex ein kostimulatorisches Signal. Das durch die Zellen des angeborenen Immunsystems generierte Zytokin-Milieu entscheidet über die Richtung der Differenzierung. In Gegenwart von IFN- γ und IL-12 entstehen Th1-Zellen, die selbst IFN- γ , TNF- α und IL-2 exprimieren. In Anwesenheit von IL-4 bilden sich hingegen Th2-Zellen aus, die IL-4, IL-5 und IL-13 sezernieren. Th1-Zellen bekämpfen intrazelluläre Erreger und aktivieren über die von ihnen gebildeten Zytokine Makrophagen und zytotoxische T-Zellen. Th2-Zellen spielen eine Rolle bei der Immunabwehr extrazellulärer Erreger (Bakterien, Parasiten) und regen B-Zellen zur Antikörper-Produktion an (101).

2.6.1. T-Helferzellen Typ 17 (Th17-Zellen)

Laut zwischen 2003 und 2005 erschienenen Studien existiert neben den klassischen Th1/Th2-Zellen eine weitere Subpopulation an CD4-positiven T-Effektorzellen. Diese Th17-Zellen (1, 102-104) sind nach ihrem Effektorzytokin IL-17A benannt. Das 1993 entdeckte pro-inflammatorische Zytokin wurde bei chronisch entzündlichen Prozessen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen (105-108). Th17-Zellen sezernieren darüber hinaus weitere Botenstoffe wie IL-17F, IL-21, IL-22, granulocyte

macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) sowie die Chemokine C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand (CXCL)1, 2 und 8 (109). Th17-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze, werden aber auch mit chronisch-entzündlichen Prozessen sowie der Entstehung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht.

Differenzierung von Th17-Zellen

Die Differenzierung naiver CD4-positiver T-Zellen in Th17-Zellen erfolgt in Gegenwart von transforming growth factor beta (TGF- β) und IL-6 bzw. TGF- β und IL-21. Durch diese Zytokin-Kombination wird die Expression des linienspezifischen Transkriptionsfaktors ROR-c (humane Variante des Transkriptionsfaktors ROR γ t = retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma) induziert (110). Die Expansion der Th17-Zellen wird durch IL-1 β und IL-6 gesteuert, während für die Stabilisierung des Th17-Phänotyps IL-23 eine wesentliche Rolle spielt. Laut Studien ist IL-23 für die Pathogenität von Th17-Zellen von Bedeutung. Genetische Polymorphismen des IL-23-Rezeptors sind mit Autoimmunerkrankungen (z. B. Psoriasis, ankylosierende Spondylitis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen) assoziiert (111, 112). IL-23-Rezeptor-defiziente Mäuse sind resistent gegenüber Autoimmunerkrankungen, was auf die eingeschränkte GM-CSF-Produktion der Th17-Zellen zurückzuführen ist (113-115).

Effektorfunktionen der Th17-Zellen

Th17-Zellen gelten als Hauptproduzenten von IL-17A. Die IL-17-Zytokinfamilie umfasst neben IL-17A fünf weitere Zytokine (IL-17B–F) (116). IL-17F wird ebenfalls von Th17-Zellen sezerniert und weist homologe Sequenzen zu IL-17A auf (116). Beide Zytokine vermitteln ihre Signale über einen heterodimeren Oberflächenrezeptor (IL-17R), der von einer Vielzahl von Immunzellen (z. B. neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen), aber auch von nicht-hämatopoetischen Zellen (z. B. Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten) exprimiert wird (116-118). Bei Bindung der Liganden an den Rezeptor werden pro-inflammatorische Zytokine (z. B. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α), Chemokine und antimikrobielle Peptide (B-Defensin, S100 Protein) freigesetzt (119, 120). IL-17A stimuliert zudem die Granulopoese im Knochenmark, vermittelt die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und erhält die Integrität von Epithel- und Schleimhautbarrieren (2).

Studien belegen, dass Th17-Zellen über ihre Effektormechanismen entscheidend an der Immunabwehr spezifischer Krankheitserreger an mukosalen und epithelialen Grenzflächen (z. B. Haut, Lunge, Darm, Mundschleimhaut) beteiligt sind (2). Laut Kolls et al. ist IL-17A für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Rahmen der Abwehr des extrazellulären Erregers *Klebsiella pneumoniae* essenziell (121). Andere Studien bestätigen die protektive Funktion bei Pathogenen wie *Streptococcus pneumoniae* bzw. *Mycoplasma pneumoniae* (122, 123).

Die Bedeutung der Th17-Antwort wird auch bei Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom (HIES, Job's Syndrom) deutlich. Aufgrund einer inaktivierenden Mutation im IL-17-Signalweg sind diese Patienten nicht in der Lage, eine adäquate Th17-Antwort zu generieren. Die Patienten leiden an rekurrierenden bakteriellen Infektionen der Haut, vor allem mit *Staphylococcus aureus*, und an mukokutanen Mykosen (124, 125).

Rolle von Th17-Zellen bei chronischen Entzündungen und der Autoimmunität

Verschiedene Studien thematisieren die Rolle von Th17-Zellen und IL-17A bei chronischen Entzündungen und für die Pathogenese diverser Autoimmunerkrankungen. Eine dysregulierte IL-17A-Aktivität führt zu einer verstärkten Expression pro-inflammatorischer Mediatoren und daraus resultierend zur Gewebedestruktion. Patienten mit systemischem Lupus erythematoses, Rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus Typ 1, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Multipler Sklerose und Psoriasis zeigen erhöhte Th17-Zellzahlen bzw. erhöhte IL-17A-Konzentrationen im peripheren Blut (3, 4, 126-129).

Th17-Zellen und solide Tumoren

Bereits im 19. Jahrhundert beschrieb Rudolph Virchow den Zusammenhang zwischen chronischen Entzündungen und der Tumorphagenese (109). Zahlreiche Tumorentitäten sind mit chronisch entzündlichen Erkrankungen, chronischen Infektionen oder Autoimmunerkrankungen assoziiert (130). Das kolorektale Karzinom entwickelt sich auf dem Boden chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (z. B. Colitis ulcerosa). Zigarettenrauch induziert durch die Freisetzung freier Radikale und pro-inflammatorischer Mediatoren eine chronische Inflammation und gilt als wichtiger Risikofaktor für Lungenkrebs, Kehlkopfkrebs, Mundbodenkrebs und andere Tumorformen. Chronische Infektionen mit *Helicobacter pylori* oder dem Hepatitis-B-Virus verursachen Magenkrebs bzw. hepatozelluläre Karzinome. Daher finden sich in

der Umgebung solider Tumoren zahlreiche Entzündungszellen und pro-inflammatorische Botenstoffe, wie IL-1, IL-6, IL-21, IL-23 (130, 131) .

Auch Th17-Zellen wurden in präkanzerösen Läsionen und im Gewebe solider Tumoren (colorektales Karzinom, Ovarialkarzinom, Melanom) nachgewiesen (5). Die Rolle von Th17-Zellen in der Pathogenese solider Tumoren ist aber umstritten. Laut einiger Studien induzieren Th17-Zellen über ihr Effektorzytokin IL-17A die Angiogenese sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus rekrutierten Immunzellen und fördern so das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren (132-134). Andere Studien sprechen Th17-Zellen hingegen aufgrund ihrer IFN- γ -Sekretion (135) bzw. Stimulation zytotoxischer CD8-positiver T-Zellen und Rekrutierung dendritischer Zellen ins Tumorgewebe (136) eine tumorsuppressive Funktion zu. Die Bedeutung von Th17-Zellen scheint somit von der Tumorart und dem Kontext abzuhängen.

2.6.2. Th17/Treg-Ratio – Gleichgewicht zwischen Immuntoleranz und Entzündung

Regulatorische T-Zellen (Treg) sind eine weitere Subpopulation der CD4-positiven T-Lymphozyten. Es handelt sich um CD25-positive und CD127-negative Zellen. Der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3 (Foxp3) ist der spezifischste Marker für Treg (137). Für die Differenzierung naiver CD4-positiver T-Zellen in Th17-Zellen werden TGF- β und IL-6 benötigt, in Gegenwart von TGF- β allein entstehen Treg-Zellen (138, 139).

Th17- und Treg-Zellen besitzen entgegengesetzte Funktionen im adaptiven Immunsystem. Th17-Zellen lösen Entzündungen und Gewebedestruktionen aus. Dagegen inhibieren Treg-Zellen über die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , Immunreaktionen und halten die Immuntoleranz aufrecht (140, 141). Die Balance zwischen den beiden Zellpopulation (Th17/Treg-Ratio) ist für die Entwicklung bzw. Prävention chronisch entzündlicher und autoimmuner Prozesse bedeutsam (142). Laut Niu et al. zeigen Patienten mit Rheumatoider Arthritis ein dysreguliertes Th17/Treg-Verhältnis im peripheren Blut (143). Die Rheumatoide Arthritis kennzeichnet sich durch eine chronische Synovitis mit der Folge der Zerstörung von umgebendem Knorpel und Knochen. Die Dominanz der Th17-Antwort trägt dabei durch die Aktivierung und Rekrutierung zahlreicher Entzündungszellen zur

Pathogenese bei (143). Eine erhöhte Th17/Treg-Ratio kommt auch bei Patienten mit Multipler Sklerose, Psoriasis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vor (144). Therapieversuche mit dem Ziel der Wiederherstellung des Th17/Treg-Gleichgewichts wurden bereits erfolgreich bei diesen Erkrankungen erprobt (145).

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Tabelle 5 listet die verwendeten Puffer, Lösungen und Medien.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien

Einfrier-Medium	X-Vivo-15	150 ml
	20 % HSA	100 ml
	Heparin	2500 U
FACS-Puffer	PBS	1000 ml
	BSA 0,1 %	5 ml
	EDTA 2 mM	2 ml
FACS-Fix	PBS	242 ml
	1 % Formaldehyd	6,8 ml
	EDTA 2 mM	1 ml
Trypanblau (Stammlösung)	Trypanblau	2,0 g
	H ₂ O	ad 1000 ml
Trypanblau (Gebrauchslösung)	Trypanblau Stammlösung	75 ml
	150 mM NaCl	25 ml

BSA: Rinderserumalbumin; EDTA: Ethylendiamin-Tetraacetat; HSA: Humanes Serumalbumin; PBS: phosphate-buffered saline

Tabelle 6 listet die verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Aqua B. Braun	Braun (Melsungen)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Sigma (Taufkirchen)
Essigsäure 6 %	Merck (Darmstadt)
Ficoll-Medium (Histopaque 1077)	Sigma-Aldrich
Normal Rat Serum	eBioscience (Frankfurt am Main)
PBS (phosphate-buffered saline)	Gibco BRL (Karlsruhe)
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) „Cell Activation Cocktail“	BioLegend (Koblenz)
Trypanblau	Merck (Darmstadt)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Schwerte)
X-VIVO-15	Lonza (Basel)

Tabelle 7 listet die verwendeten Geräte.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Geräte

Brutschrank Typ Heracell 150	Thermo (Schwerte)
Durchflusszytometer	FACS Canto/Aria™ mit Software FACS Diva™, BD Biosciences (Heidelberg)
Kühl- und Gefrierkombinationen 4 °C, -20 °C	Liebherr (Kirchdorf an der Iller)
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Zeiss (Jena)
Mikroliterpipetten Transferpipette 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl	Brand (Wertheim)
Pipettiergerät	PipetBoy, IBS Integra Biosciences, VWR (Darmstadt)
Pipette 1–10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Sterile Werkbank	HERAsafe Typ HS 18, Kendro (Hanau)
Stickstoff-Kryo-Bank XLC 1370, Air liquide Espace 331	MVE Europe (Solingen) Tec Lab (Königstein)
Stickstoff-Tank	Taylor-Wharton XL-180, Tec Lab (Taunusstein)
Schüttler Typ KS250 basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Tiefkühlschrank, -80°C Hera freeze	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Tiefkühlschrank, -30°C	Kirsch (Offenburg)
Vortex MS2	Minishaker IKA®, IKA (Staufen)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifugen	Hettich (Tuttlingen) Kendro-Heraeus (Hanau)

In Tabelle 8 sind die Gebrauchswaren gelistet.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Gebrauchswaren

Bechergläser 200, 500, 1000, 2000 ml	Schott (Mainz)
Deckgläser 24 x 32 mm	Menzel (Braunschweig)
Einfrierboxen	Nalge Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchen, Cryotube 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden)
Einfrier-Röhrchenständer	Roth (Karlsruhe)
Einmalpipetten, steril 1, 2, 5, 10, 25 und 50 ml	Greiner (Nürtingen)
FACS-Röhrchen	BD Falcon, BD Biosciences Europe (Erembodegem, B)
Falcon konische Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	ThermoFisher (Schwerte)
Handschuhe	Semperid (Österreich)
Objektträger, geputzt, 25 x 75 mm	Diagonal (Münster)
Pipettenspitzen 0,5–10 µl, 10–200 µl, 100–1000 µl	Starlab (Ahrensburg)
Reaktionsgefäße (Eppis) 500, 1500 und 2000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Einmalspritzen 10, 20 und 50 ml	Braun (Kronberg/ Taunus)
Zählkammern	Fuchs-Rosenthal Schreck (Hofheim)
Zellkulturplatten 12-Well (U-Form), 96-Well (V-Boden, Polypropylen)	Greiner (Frickhausen)

In Tabelle 9 sind die verwendeten Kits aufgeführt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Kits

BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit	eBioscience (Frankfurt am Main)
Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	ThermoFisher (Schwerte)
LEGENDplex Human Th-Cytokine Panel (13-Plex)	Biologend (Koblenz)

In Tabelle 10 ist die genutzte Software gelistet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Software

BD FACS Diva Software	BD (Heidelberg)
FlowJo_V10_CL	BD (Heidelberg)
GraphPadPrism Version 5	GraphPadPrism
Legendplex Software Version 8.0	Biologend (Koblenz)

3.2. Humane Proben

3.2.1. Patientenblut

Im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojektes wurden 25 Vollblutproben von Patienten mit cGVHD an der Mundschleimhaut nach allogener HSCT in der Universitätsmedizin Mainz analysiert. Pro Patient wurden 40 ml Vollblut und 10 ml Serum gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen des stationären Aufenthaltes der Patienten in der III. medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz oder bei ambulanten Nachsorgeterminen in der Stammzelltransplantation- Ambulanz.

Über eine Kooperation mit der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (MKG) der Universitätsmedizin Mainz wurden Blutproben (25 ml Vollblut und 10 ml Serum) von nicht-stammzelltransplantierten Patienten mit OLP (n=30) oder Leukoplakie (n=9) der Mundschleimhaut akquiriert. Weiter wurden Blutproben (25 ml Vollblut und 10 ml Serum) von nicht-stammzelltransplantierten Patienten mit SCC der Mundschleimhaut (n=6) über die Ambulanz des Universitären Zentrums für Tumorerkrankungen (UCT) der Universitätsmedizin Mainz in das Promotionsvorhaben eingeschlossen. Dabei handelte es sich um Patienten mit einem histologisch gesicherten SCC-Progress oder Rezidiv, die noch nicht operativ versorgt wurden und chemotherapeutisch entweder nicht oder nur für wenige Tage anbehandelt waren.

Alle Patienten gaben vor der Blutentnahme und nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung durch die Ärzte der III. medizinischen Klinik bzw. der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Mainz ihr Einverständnis für die Analyse ihres Blutes im Rahmen dieses Promotionsvorhabens. Der Studienplan wurde der

zuständigen Ethikkommission vorgelegt und bewilligt. Die folgenden Tabellen 11–14 listen die Daten der Patienten, wobei jedem Patienten eine interne Kennzeichnung zugeordnet ist.

Tabelle 11: Patientenliste von Patienten mit chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) an der Mundschleimhaut (MSH)

Patient	Alter (Jahre)	Erkrankung	Tag nach Tx	Kondi- tionierung	cGVHD: betroffene Organe
1	40	AML	4430	Bu/Cy	MSH, Haut, Augen, Genitalien
2	30	AML	1017	FLAMSA- Bu/Cy/ATG	MSH, Haut, vaginal, Gelenke
3	68	CLL	797	Campath/Flu/ Mel	MSH, Haut
4	31	extranodales NK/T-Zell Lymphom	220	Flu/Mel/Campa th	MSH, Haut
5	34	AML	182	Bu/Cy	MSH, Haut, Augen, Genitalien, Leber
6	66	AML	456	Campath/Flu/ Mel	MSH, Haut, Augen
7	22	AML	702	TBI/Cy	MSH, Augen, Leber, Haut
8	69	BPDCN	563	Flud/Bu/ATG	MSH, Haut, Augen
9	69	sekundäre MF	427	Campath/Flu/ Mel	MSH, Haut, Leber, Augen, beginnende Obstruktion der Lunge
10	50	MDS RAEB	203	Flu/BCNU/Mel	MSH, Haut, Genitalien, Muskeln, Gelenke, Leber, evtl. Augen
11	68	AML	205	Flu/Bu/ATG	MSH, Haut
12	74	MDS RAEB	210	Flu/Bu/ATG	MSH
13	45	Pro T-ALL	209	Flu/Bu/ATG	MSH, Bindehaut, Haut
14	55	NHL	223	Flu/Campath/ Mel	MSH, Haut
15	49	Multipl Myelom	1010	Campath/Flu/ Mel	MSH, Haut, Augen

16	30	AML	203	Bu/Cy	MSH, Augen, Haut
17	59	AML	2261	TBI/Cy	MSH, Gelenke
18	39	AML	485	TBI/Cy	MSH, GIT
19	42	AML	223	Treosulfan/Flu/Thiotepa/ATG	MSH, Haut, Leber, Augen
20	24	Prä B-ALL	201	Bu/Flu/ATG dosisreduziert	MSH, Haut, Gelenke
21	62	Common B-ALL	127	Flu/Bu/ATG	MSH, Haut, Augen
22	59	AML	196	Flu/Bu/ATG	MSH, Haut, Augen, Lunge, GIT
23	61	AML	201	Flu/BCNU/Mel/ATG	MSH
24	55	AML	196	Flu/Treo/ATG	MSH
25	50	Common B-ALL	257	Flu/Bu/ATG	overlap-Syndrom: MSH, Haut, Lunge

AML: akute myeloische Leukämie; ALL: akute lymphatische Leukämie; ATG: Antithymozytenglobulin; BCNU: Bis- Chlorethyl- Nitroso- Urea; Bu: Busulfan; BPDCN: blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie; Campath: Alemtuzumab; CLL: chronische lymphatische Leukämie; Cy: Cytarabin; FLAMSA: Fludarabin, Cytosin-Arabinosid, Amsacrin; Flu: Fludarabin; GIT: Gastrointestinaltrakt; MDS: Myelodysplastisches Syndrom; Mel: Melphalan; MF: Myelofibrose; MSH: Mundschleimhaut; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; NK: Natürliche Killerzellen; RAEB: Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss; TBI: total body irradiation; Treo: Treosulfan; Tx = Transplantation

Tabelle 12: Patientenliste von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (SCC)

Patient	Alter	Erkrankung	Stadium	Risikofaktoren
UCT-001	65	supraglottisches Larynx-Ca, Progress	ycT4a cN3b cM1	Nikotin
UCT-002	52	CUP, histologisch mäßig differenziertes, verhornendes PE-Ca	unbekannt	Alkohol, Nikotin
UCT-003	52	Rezidiv Hypopharynx-Ca cervical + Gehörgang	cT4a cN3b cM0	Alkohol, Nikotin
UCT-004	79	PE-Ca der Parotis, LK-Rezidiv cervical	pT4a pN3b cM1	unbekannt
UCT-005	53	PE-Ca anteriorer Mundboden	cT4a cN2c cM0	Alkohol, Nikotin
UCT-006	77	Lokalrezidiv eines Larynx-Ca	T4 N2 M0	Nikotin

Ca: Karzinom, CUP: cancer of unknown primary; LK: Lymphknoten; PE: Plattenepithel

Tabelle 13: Patientenliste der Patienten mit Lichen ruber planus an der Mundschleimhaut

Patient	Alter (Jahre)	Patient	Alter (Jahre)	Patient	Alter (Jahre)
Li-025	63	Li-020	39	Li-035	61
Li-010	44	Li-016	72	Li-036	68
Li-011	63	Li-017	66	Li-019	59
Li-012	44	Li-037	60	Li-021	51
Li-027	77	Li-026	62	Li-032	24
Li-018	50	Li-022	71	Li-029	72
Li-038	79	Li-024	73	Li-030	75
Li-031	67	Li-028	81	Li-040	62
Li-023	59	Li-034	52	Li-013	54
Li-039	59	Li-015	49	Li-014	38

Tabelle 14: Patientenliste der Patienten mit Leukoplakie

Patient	Alter (Jahre)	Patient	Alter (Jahre)	Patient	Alter (Jahre)
Leu-004	75	Leu-009	62	Leu-010	77
Leu-003	58	Leu-011	42	Leu-007	67
Leu-001	79	Leu-006	66	Leu-012	56

3.2.2. Gesunde Kontrollen

Als Buffy-coat wird der Leukozytenfilm bezeichnet, der sich nach der Sedimentation oder Zentrifugation von antikoaguliertem Vollblut als Grenzschicht zwischen den sedimentierten Erythrozyten und dem Blutplasma ausbildet. Zur Etablierung des

methodischen Vorgehens und als gesunde Vergleichsgruppe wurden insgesamt zwölf Buffy-Coats von gesunden Blutspendern verwendet. Sieben gesunde Blutproben stammten von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz, die übrigen von gesunden Mitarbeitern der Arbeitsgruppe (s. Tab. 15). Die gesunden Kontrollen wiesen keine chronisch entzündlichen, infektiösen oder Autoimmunerkrankungen bzw. malignen Neoplasien in ihrer Vorgeschichte auf.

Tabelle 15: Verwendete Buffy-Coats (BC) mit interner Kennzeichnung

BC 1700384	BC 1825699
BC 1732536	BC B
BC 1703938	BC E
BC 1530828	BC D
BC 1501194	BC S
BC 1825524	BC Y

3.3. Materialgewinnung und Aufbewahrung

3.3.1. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

PBMCs sind mononukleäre Blutzellen des peripheren Blutes mit einem runden Zellkern. Erythrozyten und Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und Granulozyten multilobulierte Kerne. Zu den PBMCs zählen somit Lymphozyten und Monozyten. Mithilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation können PBMCs aus Vollblut separiert werden (146).

Dazu wurden 50 ml Leucosep-Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Separationsmedium befüllt. Die Blutproben wurden in phosphate-buffered saline PBS / 2 mM Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA) suspendiert. Anschließend wurden die Ficoll-Röhrchen mit bis zu 35 ml dieser Zellsuspension überschichtet, ohne dass sich die beiden Phasen vermischten. Die Zellpopulationen wurden durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 2300 Runden pro Minute (rpm) ohne Bremse und ohne Beschleunigung bei Raumtemperatur aufgetrennt. Während der Zentrifugation passieren Erythrozyten und Granulozyten das Separationsmedium und sammeln sich am Boden des Röhrchens an, während die PBMCs als Interphase zwischen dem Ficoll-Medium und dem Blutplasma verbleiben. Diese Interphase wurde mit einer Pipette in ein neues Leucosep-Röhrchen überführt und anschließend dreimal mit PBS / 2 mM EDTA gewaschen (s. Protokoll im Anhang: Ficoll-Separationen). Abschließend wurden die PBMCs in PBS / 2 mM EDTA resuspendiert und gezählt.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte mithilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer. Hierzu wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 gemischt. Unter dem Lichtmikroskop war so eine Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen möglich, da sich nur tote Zellen aufgrund ihrer erhöhten Membranpermeabilität blau anfärben. Die farblosen vitalen Zellen wurden gezählt (s. Protokoll und Formel zur Berechnung der Zellzahl im Anhang: Zellzählung).

Kryokonservierung von PBMCs

Um die isolierten PBMCs bis zur Weiterverarbeitung aufzubewahren, wurden sie nach den Waschsritten in Portionen von bis zu 50 Millionen Zellen eingefroren. Hierzu wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium (60 % X-Vivo, 40 % ml Humanes Serumalbumin (HSA), 2500 U Heparin, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) aufgenommen und in 2 ml Nunc-Röhrchen überführt. DMSO wirkt über die Verhinderung der Bildung von Eiskristallen kryoprotektiv. Die Nunc-Röhrchen wurden ohne Zeitverzögerung in vorgekühlte Isopropylbecher gestellt, die anschließend im Kühlschrank bei -80 °C für 3 Tage gelagert wurden. Danach wurden die Nunc-Röhrchen in den Stickstoff-Tank bei -196 °C überführt.

Auftauen von PBMCs

Zunächst wurde für jedes aufzutauende Kryoröhrchen ein Leucosep-Röhrchen mit 10 ml PBS / 2 mM EDTA vorbereitet. Zudem wurde ein Wasserbad bei 37°C bereitgestellt, in dem die Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen PBMCs platziert wurden. Nach dem Auftauen der Hälfte der Zellsuspension wurden die Zellen in die Leucosep-Röhrchen überführt, dort verflüssigt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme einer kleinen Menge der Zellsuspension für die Zellzählung erfolgte eine weitere Zentrifugation der übrigen Zellen (1500 rpm, 5 min) (s. Anhang: Protokoll zur Zellzählung, Auftauen kryokonservierter Zellen). Da DMSO zytotoxische Eigenschaften aufweist, mussten der Auftauvorgang und die Waschsritte schnell durchgeführt werden.

3.3.2. Blutserum

Als Blutserum wird der flüssige Anteil des Blutes nach abgeschlossener Blutgerinnung bezeichnet. Das Serum enthält demnach kein Fibrinogen und grenzt sich hierdurch vom Blutplasma ab. Hauptbestandteile des Blutserums sind Wasser und Proteine, insbesondere Albumin. Einen kleinen Anteil machen Elektrolyte, Hormone und weitere niedermolekulare Substanzen aus. Zur Gewinnung des Blutserums wurde Vollblut in Serumröhrchen abgenommen und anschließend bei 3500 rpm und 20°C für 10 min zentrifugiert. Der gelbliche Überstand entspricht dem Blutserum. Dieser wurde zur Aufbewahrung in 1 ml Portionen eingefroren oder unmittelbar weiterverarbeitet (s. Protokoll im Anhang: Gewinnung von Blutserum).

Einfrieren von Blutserum

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurde das abzentrifugierte Blutserum in 1 ml Portionen in Nunc-Röhrchen pipettiert und anschließend im Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

Auftauen von Blutserum

Zum Auftauen wurden die Serumproben aus dem -80 °C- Gefrierschrank geholt und bei Raumtemperatur für einige Minuten stehen gelassen.

3.4. Durchflusszytometrie

3.4.1. Prinzip

Die Ende der 1960er Jahre in Stanford entwickelte Methode der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) (147) dient der Quantifizierung und Analyse von Zellen. Bei dem Verfahren werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Messzylinder geschleust und passieren Laser unterschiedlicher Wellenlänge. Die Lichtstreuung ermöglicht Rückschlüsse auf die morphologischen Eigenschaften der Zellen. Das Streulicht entlang des einfallenden Lichtstrahls (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Größe der Zelle; das Streulicht im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl (sideward scatter, SSC) kennzeichnet die Granularität der Zelle. Zum Nachweis von Oberflächenmolekülen wird die Zellsuspension mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gegen das gesuchte Antigen versehen.

Beim Nachweis intrazellulärer Antigene werden die Zellen im Vorfeld permeabilisiert, damit der Antikörper in die Zelle gelangen kann. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren können mehrere Zielantigene in einer Zellsuspension erfasst werden. Das Streulicht und die Fluoreszenz werden mithilfe von Detektoren erfasst und über eine Software ausgewertet (148, 149).

Für die FACS-Analysen wurde das Durchflusszytometer BD FACS Canto II mit der BD FACS Diva Software verwendet. Das anschließende Gating der Zellpopulationen und die Datenauswertung erfolgte mithilfe der Flowjo Software.

3.4.2. Antikörper

In der folgenden Übersichtstabelle (s. Tab. 16) sind die Kenndaten der für die FACS-Analysen dieser Dissertation verwendeten Antikörper aufgeführt. Für die Oberflächenfärbungen wurden Antikörper gegen Immunglobulin (Ig) G, CD3, CD4, CD25 und CD127 eingesetzt, für die intrazellulären Färbungen Antikörper gegen Foxp3, IFN- γ und IL-17A. Tabelle 17 listet die Ansätze für die Immunfluoreszenzmarkierung.

Tabelle 16: Antikörper mit Spezies, Fluorochrom, Klon und Firma

Antikörper	Spezies	Fluorochrom	Klon	Firma
IgG	mouse	PE	SK7	BD
IgG	mouse	FITC	679.1 Mc	Beckmann Coulter
IgG	mouse	APC	679.1 Mc 7	Beckmann Coulter
IgG	mouse	V450	MOPC-21	BD
CD3	mouse	FITC	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	PE	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD3	mouse	APC	UCHT 1	Beckmann Coulter
CD4	mouse	FITC	13 B 8.2	Beckmann Coulter
CD4	mouse	PE	13 B 8.2	Beckmann Coulter
CD127	mouse	FITC	eBio RDR 5	eBioscience
Foxp3	mouse	FITC	PCH 101	eBioscience
CD25	mouse	V450	M-A 251	BD
IFN- γ	mouse	PE	B 27	BD
IL-17A	mouse	V450	BL 168	BioLegend

APC: Allophycocyanin; CD: cluster of differentiation; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; Foxp3: Forkhead-Box-Protein P3; IFN- γ : Interferon-gamma; Ig: Immunglobulin, IL: Interleukin PE: Phycoerythrin

Tabelle 17: Antikörperpanel für die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten-Populationen

Tube/ Fluorochrom	FITC	PE	APC	V450
IgG	IgG	IgG	IgG	IgG
CD3 FITC	CD3	-	-	-
CD3 PE	-	CD3	-	-
IL-17A unstimuliert/ stimuliert	CD4	IFN- γ	CD3	IL-17A
Treg CD127	CD127	CD4	CD3	CD25
Treg Foxp3	Foxp3	CD4	CD3	CD25

APC: Allophycocyanin; CD: cluster of differentiation; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; Foxp3: Forkhead-Box-Protein P3; Ig: Immunglobulin; IL: Interleukin; PE: Phycoerythrin; PMA: Phorbol-12-myristat-13-acetat; Treg: regulatorische T-Zellen

3.4.3. Oberflächenfärbungen

Die FACS-Färbung von Oberflächenmolekülen der PBMCs erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (s. Anhang: FACS-Färbung). Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper für IgG, CD3, CD4, CD127 und CD25 verwendet. Zunächst wurden acht Röhrchen pro Patient beschriftet. Anschließend wurden die PBMCs in FACS-Puffer aufgenommen und in entsprechender Zellzahl auf die Röhrchen verteilt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm und Entfernung des Überstands wurden die Oberflächenantikörper zu den Zellen gegeben. Die Inkubation der Antikörper erfolgte im Kühlschrank bei 4°C für 15 min. Zur Entfernung der ungebundenen Antikörper wurden die Röhrchen danach mit 1 ml FACS-Puffer befüllt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in FACS-Fix aufgenommen.

3.4.4. Foxp3-Färbung

Zur Identifikation von Treg-Zellen wurde neben den Oberflächenfärbungen (CD3, CD4, CD25, CD127) die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 mit dem Foxp3-Färbeset (Invitrogen™ eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set) analysiert. Das Zellpellet aus $7,5 \times 10^5$ Zellen wurde nach der Oberflächenfärbung direkt in Fixations-Permeabilisierungs-Medium resuspendiert und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach schlossen sich zwei Waschschrte mit einem Permeabilisierungspuffer an. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Proben nach der Permeabilisierung bei Raumtemperatur für 15 min mit

Rattenserum inkubiert. Die Inkubation mit dem Foxp3-Antikörper erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 0,5 ml FACS-Fix fixiert und im Durchflusszytometer analysiert (s. Anhang: Foxp3-FACS-Färbung).

3.4.5. Zellstimulation und intrazelluläre Zytokin-Färbung

Über eine intrazelluläre Zytokin-Färbung können Zytokin-produzierende Zellen durchflusszytometrisch erfasst werden. In dem vorliegenden Projekt wurden IL-17A- und IFN- γ -bildende Zellen analysiert. Zur Stimulation der Zytokin-Produktion wurden die Zellen nach dem Auftau- und Zählvorgang in das Nährmedium X-Vivo aufgenommen und in einer Anzahl von bis zu 4×10^6 Zellen in eine Well-Platte pipettiert. Die Stimulation erfolgte mit PMA bei 37°C und 95% O₂ / 5% CO₂ für 4 Stunden. PMA führt, unabhängig vom T-Zell-Rezeptor, über die Aktivierung der Proteinkinase C zu einer T-Zell-Aktivierung und folglich zur IL-17A- und IFN- γ -Produktion (150, 151). Zur Beurteilung der Zunahme der Zytokin-Produktion durch Stimulation wurde eine Kontrollprobe ohne PMA-Stimulation analysiert.

Zunächst erfolgte die Oberflächenfärbung für die Marker CD3 und CD4 nach Protokoll (s. Anhang: FACS-Färbung). Für die intrazelluläre Zytokin-Färbung wurde das zentrifugierte Zellpellet mit Cytofix/Cytoperm BD fixiert und permeabilisiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C und zwei Waschschritten mit dem BD Perm/Wash Puffer wurden die Zellen mit den IL-17A- und IFN- γ -Antikörpern im Kühlschrank bei 4°C für 30 min inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden in zwei Waschschritten entfernt. Die Proben wurden mit 0,75 ml FACS-Fix pro Röhrchen fixiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.5. Multiplex Zytokinanalyse im Blutserum

Zur Untersuchung der Zytokin-Konzentration in den Serumproben wurde ein partikelbasiertes Immunoassay-Verfahren verwendet, das die Zytokinquantifizierung auf durchflusszytometrischer Basis ermöglicht. Das Grundprinzip des Verfahrens gleicht dem eines Sandwich-Immunoassays. Die gesuchten Zytokine binden dabei an Kunststoffkügelchen (capture beads), die spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper

auf ihrer Oberfläche tragen. Die beads können durchflusszytometrisch im FSC/SSC nach ihrer Größe und im Fluoreszenzkanal (hier Allophycocyanin) nach der Intensität ihrer Eigenfluoreszenz differenziert werden. Dies erlaubt die simultane Messung verschiedener Zytokine. Zu den partikelgebundenen Zytokinen werden biotinylierte Zytokin-spezifische Antikörper zugefügt. Zuletzt erfolgt die Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE), das an das Biotin-Konjugat bindet und ein Fluoreszenzsignal generiert. Über die Intensität des Phycoerythrin-Signals (MFI = mean fluorescence intensity) und einem Vergleich mit Standardkurven mit bekannten Zytokin-Konzentrationen lässt sich der Zytokin-Gehalt der Proben bestimmen. In dem vorliegenden Forschungsprojekt wurde das LEGENDplex human Th-Cytokine-Panel (13-plex) der Firma BioLegend verwendet, das 13 Zytokine (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- α) simultan erfasst. Das Verfahren wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Auf jeder V-Bottom-Platte wurde neben den Serumproben eine Verdünnungsreihe eines externen Standards mitgeführt (jeweils Doppelwerte) (s. Anhang: LEGENDplex human Th-Cytokine Panel (13-plex)).

Die durchflusszytometrische Messung der Serumproben erfolgte mithilfe des Durchflusszytometers BD FACS Canto II, die Auswertung der Daten mithilfe der Legendplex Software Version 8.0. Es wurde ein Variationskoeffizient von $\pm 20\%$ zwischen den Doppelwerten der Patientenproben toleriert.

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und die grafische Darstellung der Daten erfolgte mit der Software GraphPadPrism (Version 5).

Die Daten waren laut Histogrammen, Boxplots und D'Agostino & Pearson omnibus normality test nicht normalverteilt. Daher wurden zur statistischen Analyse der Daten nicht-parametrische Tests verwendet. Für den Vergleich der Variablen (z. B. % CD4-positive / IL-17-positive Zellen) in mehreren unverbundenen Stichproben (5 Gruppen: cGVHD, OLP, Leukoplakie, SCC, gesunde Kontrollen) wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei statistisch signifikanten Ergebnissen wurden zur Subgruppenanalyse post-hoc-Tests angeschlossen.

Aufgrund der explorativen Analyse der Daten wurde bei einem $p < 0,05$ von einem „statistisch auffälligen“ Ergebnis gesprochen. Im Rahmen der post-hoc-Tests erfolgte

die automatische Anpassung der Signifikanz entsprechend der Anzahl der durchgeführten paarweisen Vergleiche.

Zudem wurden die Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Mediane sowie 25%- und 75%-Quartile ermittelt. Bei den Zytokin-Konzentrationen im Blutserum wurden zusätzlich die Maxima und Minima bestimmt. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte über Boxplots.

3.7. Eigenständigkeitserklärung

Die in dieser Promotionsschrift abgebildeten Patientendaten, Ergebnisse und Diskussionsbeiträge basieren ausschließlich auf Patientenproben und -daten, die durch die Promovendin untersucht und generiert wurden.

4. Ergebnisse

4.1. T-Zellpopulationen in den Erkrankungsgruppen und bei gesunden Probanden

4.1.1. Anteil an CD4-positiven T-Effektorzellen

Zur Identifizierung des Anteils CD3- und CD4-positiver T-Zellen an der Gesamt-Lymphozytenpopulation wurde, wie in Abbildung 2 beispielhaft dargestellt, gated.

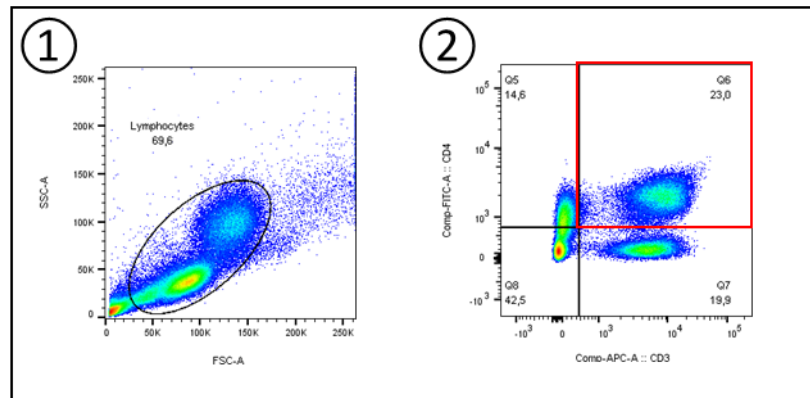


Abbildung 2: Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD3- und CD4-positiven T-Effektorzellen aus der Gesamtlymphozytenpopulation.

Teilbild 1: Gating der Lymphocyten nach forward scatter (FSC) / sideward scatter (SSC); Teilbild 2: Gating der Lymphocyten nach CD3 / CD4

Der relative Anteil an CD3- und CD4-positiven T-Zellen war bei Patienten mit Leukoplakie und OLP vergleichbar und lag im Vergleich zu SCC- und cGVHD-Patienten sowie zur gesunden Kontrollgruppe (BC) höher. Patienten mit SCC bzw. cGVHD wiesen hingegen niedrigere Anteile auf als gesunde Probanden. Patienten mit cGVHD zeigten die niedrigsten Werte (s. Abb. 3 und Tab. 18). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen Patienten mit cGVHD und Leukoplakie ($p < 0,01$) bzw. OLP ($p < 0,001$).

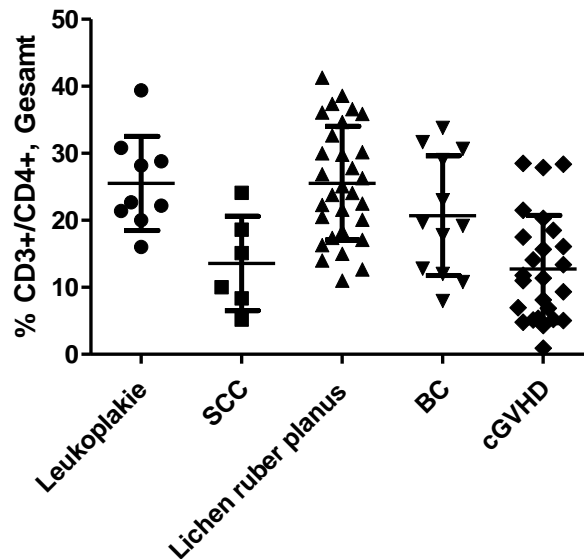


Abbildung 3: Anteil (%) an CD3- und CD4-positiven T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

Tabelle 18: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) an CD3- und CD4-positiven T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
25 % Perzentile	20,7	7,56	18,2	12,2	5,32
Median	22,7	12,6	24,6	19,5	11,4
75 % Perzentile	29,8	20,0	33,2	30,3	18,0
Mittelwert	25,5	13,6	25,5	20,7	12,7
Standardabweichung	7,03	7,05	8,50	8,93	8,01

4.1.2. Anteil an CD4-negativen T-Effektorzellen (CD8-positive T-Zellen)

Zur Identifizierung des Anteils CD3-positiver und CD4-negativer T-Zellen an der Gesamt- Lymphozytenpopulation wurde, wie in Abbildung 4 beispielhaft dargestellt, getestet.

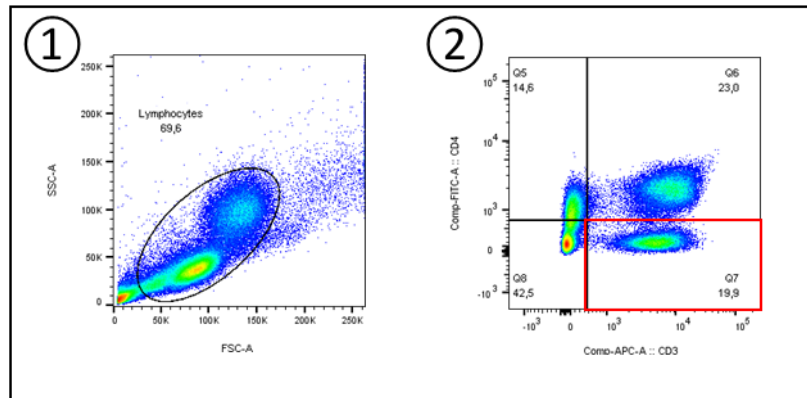


Abbildung 4: Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD3- positiven und CD4-negativen T-Effektorzellen aus der Gesamtlymphozytenpopulation.
 Teilbild 1: Gating der Lymphozyten nach forward scatter (FSC) / sideward scatter (SSC); Teilbild 2: Gating der Lymphozyten nach CD3 / CD4

Bei Patienten mit cGVHD war der Anteil der CD4-negativen T-Zellpopulation im Vergleich zu den anderen Patientengruppen größer. Damit lag der Anteil in dieser Gruppe als einzige Patientengruppe über dem Zellanteil bei gesunden Probanden. Bei Patienten mit OLP bzw. Leukoplakie waren die Anteile der CD4-negativen T-Zellen vergleichbar. SCC-Patienten wiesen die geringsten Anteile auf (s. Abb. 5 und Tab. 19). Die Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten keine statistischen Auffälligkeiten ($p=0,1113$).

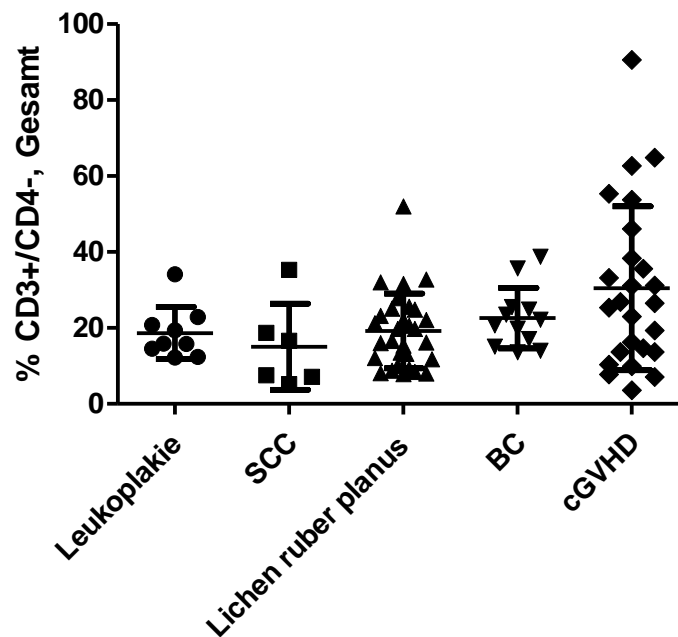


Abbildung 5: Anteil (%) an CD3-positiven und CD4-negativen T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

Tabelle 19: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) an CD3-positiven und CD4-negativen T-Zellen an allen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
25 % Perzentile	13,5	6,67	11,4	15,6	13,7
Median	15,9	12,1	18,2	21,5	26,5
75% Perzentile	21,9	22,9	25,0	25,4	42,3
Mittelwert	18,7	15,1	19,2	22,6	30,5
Standardabweichung	6,85	11,3	9,82	7,98	21,6

4.1.3. CD4/CD8-T-Zell-Ratio

Beim Vergleich des Verhältnisses von CD4-positiven zu CD4-negativen (CD8-positiven) T-Zellen in den Gruppen zeigte sich, dass Patienten mit cGVHD (MW \pm SD: $0,66 \pm 0,55$ %) aufgrund der höheren Anteile CD8-positiver Zellen eine geringere Ratio aufwiesen als gesunde Probanden ($1,0 \pm 0,55$ %) und Patienten der anderen Erkrankungsgruppen. Die CD4/CD8-T-Zell-Ratio bei SCC-Patienten ($1,2 \pm 0,62$ %) unterschied sich kaum von der Ratio der gesunden Kontrollen. Dagegen zeigten Patienten mit Leukoplakie ($1,5 \pm 0,52$ %) bzw. OLP ($1,7 \pm 1,1$ %) eine höhere Ratio als gesunde Kontrollen und die übrigen Erkrankungsgruppen (s. Abb. 6). Die Unterschiede zwischen Patienten mit cGVHD und OLP ($p < 0,001$) bzw. Leukoplakie ($p < 0,05$) waren statistisch auffällig.

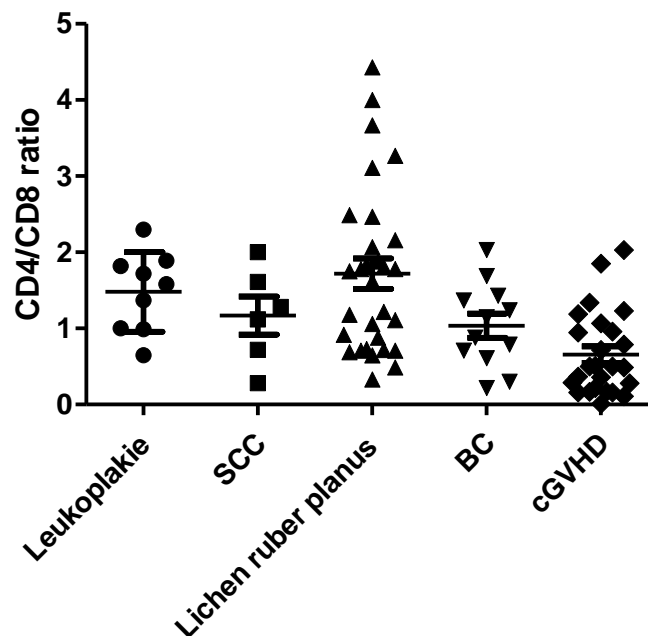


Abbildung 6: CD4/CD8-T-Zell-Ratio bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinom (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

4.1.4. Anteil regulatorischer T-Zellen (Treg)

Das Gating der Treg-Zellen ist beispielhaft in Abbildung 7 dargestellt.

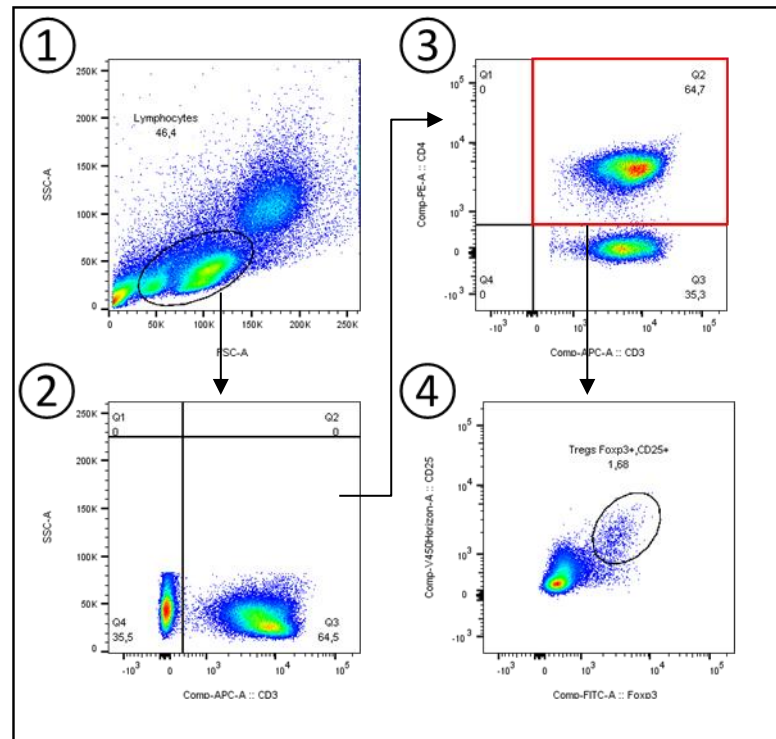


Abbildung 7: Repräsentatives Beispiel des Gatings der regulatorischen T-Zellen (Treg)
Teilbild 1: Gating der Lymphozyten nach forward scatter (FSC) und sideward scatter (SSC);
Teilbild 2: Gating der Lymphozyten nach cluster of differentiation (CD) 3 und SSC; Teilbild 3: Gating der CD3-positiven Lymphozyten nach CD3 und CD4; Teilbild 4: Gating der CD3/CD4-positiven T-Zellen nach forkhead-box protein 3 (Foxp3) und CD25

Der relative Anteil an Treg-Zellen lag bei den Patienten aller Erkrankungsgruppen im Vergleich zu gesunden Kontrollen höher. Patienten mit cGVHD zeigten die höchsten Treg-Anteile, gefolgt von Patienten mit SCC. Bei Patienten mit OLP und Leukoplakie war der Treg-Anteil vergleichbar (s. Abb. 8 und Tab. 20). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht ($p=0,0987$).

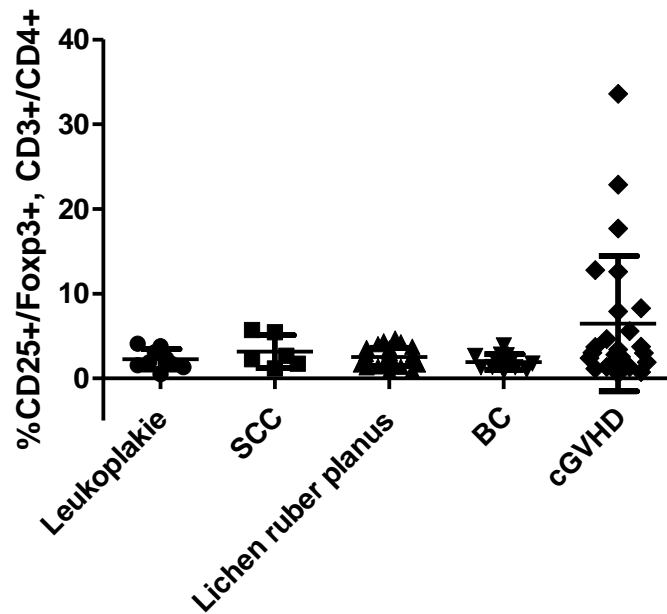


Abbildung 8: Anteil (%) an Treg-Zellen (CD25-positiv / Foxp3-positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

Tabelle 20: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) an Treg-Zellen (CD25-positiv / Foxp3-positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
25 % Perzentile	1,43	1,58	1,63	1,32	1,77
Median	1,89	2,46	2,48	1,70	3,06
75 % Perzentile	3,44	5,52	3,30	2,72	8,11
Mittelwert	2,25	3,16	2,53	1,93	6,46
Standardabweichung	1,19	1,94	1,06	0,910	7,97

4.2. IL-17A-exprimierende Zellpopulationen

Zur Analyse der IL-17A-exprimierenden Lymphozyten-Subpopulationen erfolgte eine Stimulation der Zellen mit PMA (s. Kap. 3.4.5). Im Folgenden wird die Anzahl IL-17A-exprimierender Zellen unter Basal- und Stimulationsbedingungen in den Patientengruppen sowie bei gesunden Kontrollen gegenübergestellt.

4.2.1. Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an den Lymphozyten

Zunächst wurde die intrazelluläre IL-17A-Expression in der Lymphozyten-Gesamtpopulation untersucht. Abbildung 9 zeigt ein Beispiel des Gatings zur Identifizierung IL-17A-produzierender Lymphozyten mit und ohne PMA-Stimulation. Unter PMA-Stimulation ist eine deutliche Zunahme des Anteils IL-17A-exprimierender Zellen erkennbar.

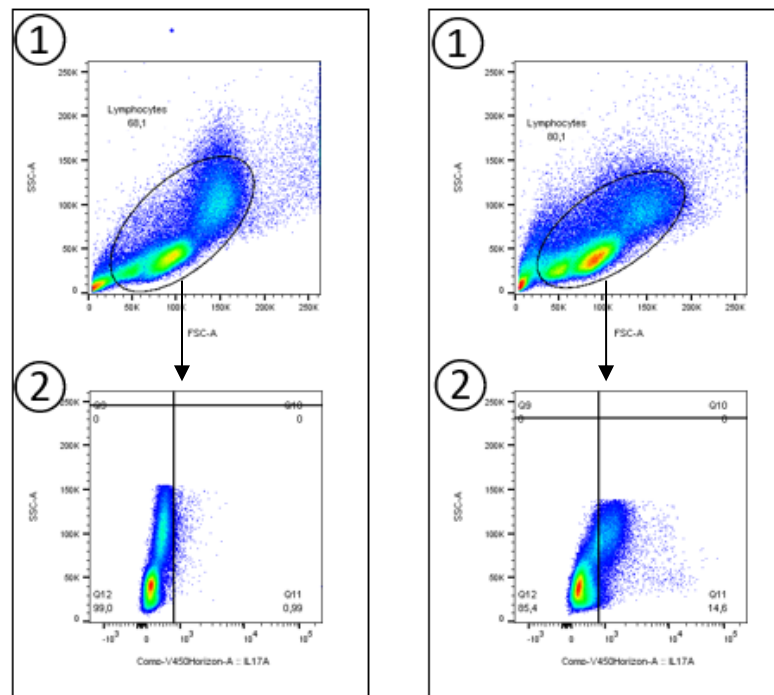


Abbildung 9: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Gesamtlymphozyten und deren intrazelluläre IL-17A Expression ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts). Teilbild 1: Gating der Lymphozyten nach forward scatter (FSC) / sideward scatter (SSC); Teilbild 2: Gating der Lymphozyten nach SSC / Interleukin (IL) -17A

Ohne PMA-Stimulation zeigten die Patienten aller Erkrankungsgruppen eine geringe Anzahl IL-17A-produzierender Zellen. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe wiesen die Patienten der Erkrankungsgruppen aber einen geringfügig höheren Anteil an IL-17A-exprimierenden Lymphozyten auf (s. Abb. 10A und Tab. 21). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren im paarweisen Vergleich nicht statistisch auffällig ($p > 0,05$).

Unter PMA-Stimulation kam es zu einer deutlichen Zunahme IL-17A-exprimierender Zellen in allen Gruppen. Alle Patientengruppen zeigten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe höhere Werte. Besonders auffällig war die Zunahme bei den SCC-Patienten, die nach Stimulation die höchsten Anteile IL-17A-positiver Lymphozyten zeigten. Bei Patienten mit Leukoplakie, OLP und cGVHD war der Anteil an IL-17A-produzierenden Lymphozyten vergleichbar (s. Abb. 10B und 10C und Tab. 21).

Statistisch auffällig waren unter PMA-Stimulation die Unterschiede zwischen SCC-Patienten und gesunden Kontrollen ($p < 0,01$) bzw. cGVHD-Patienten ($p < 0,05$). Bei der Zunahme IL-17A-exprimierender Zellen bestanden ebenfalls statistisch auffällige Unterschiede zwischen den fünf Gruppen ($p = 0,0091$). Bei den paarweisen Subgruppenanalysen waren die Unterschiede zwischen SCC-Patienten und OLP-Patienten ($p < 0,05$), gesunden Kontrollen ($p < 0,01$) bzw. cGVHD-Patienten ($p < 0,05$) statistisch auffällig.

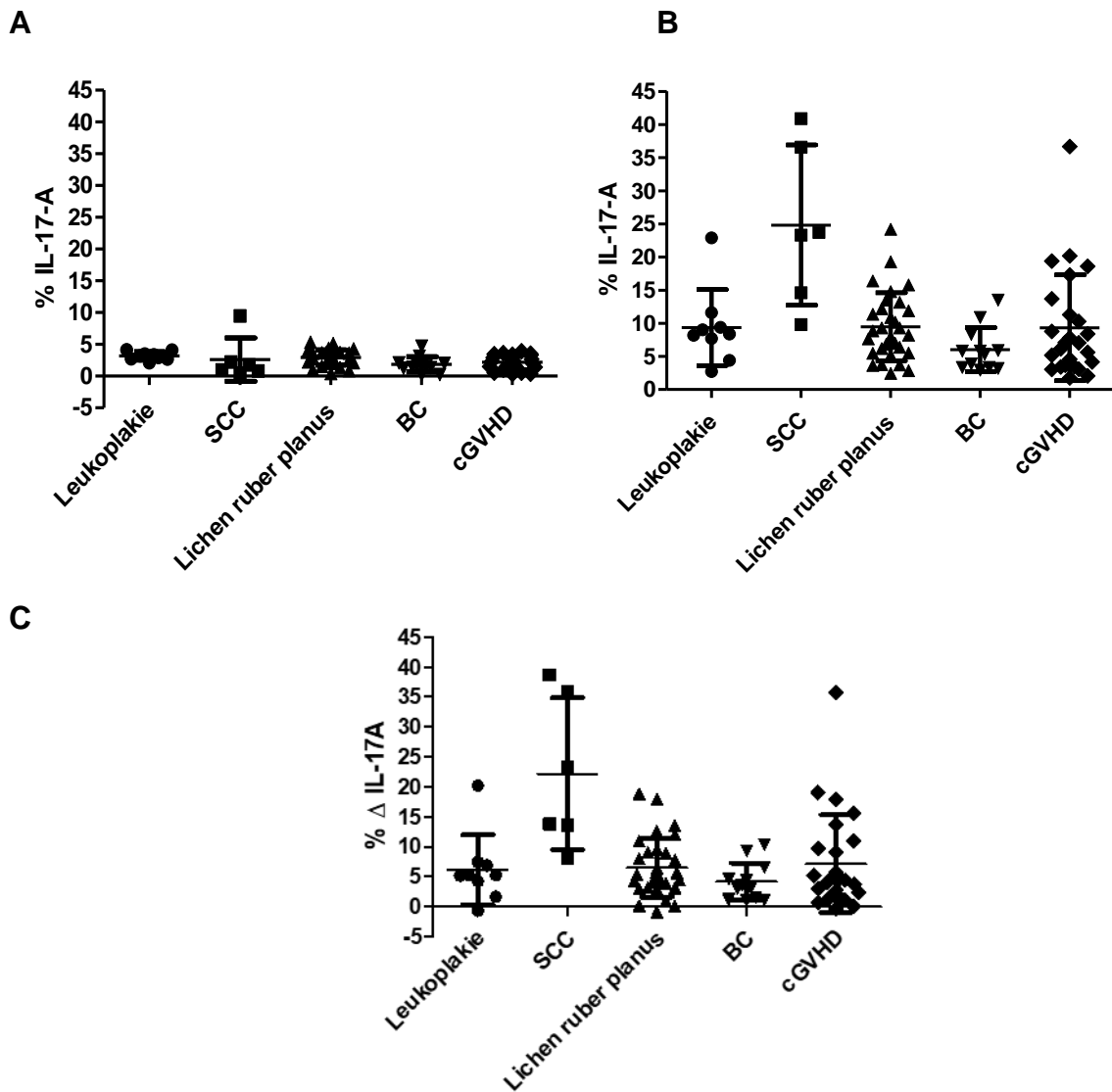


Abbildung 10: Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an der Lymphozyten-Gesamtpopulation bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)
 A: ohne Stimulation; B: mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation C: Zunahme unter PMA-Stimulation

Tabelle 21: Statistische Kennzahlen des Anteils (%) IL-17A-exprimierender Zellen an der Lymphozyten-Gesamtpopulation bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunde Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen ohne Stimulation					
25 % Perzentile	2,70	0,723	2,13	1,28	1,17
Median	3,18	1,38	2,86	1,65	2,36
75 % Perzentile	3,79	4,03	3,75	2,25	3,21
Mittelwert	3,19	2,62	2,94	1,84	2,17
Standardabweichung	0,670	3,42	1,21	1,22	1,13
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen nach PMA-Stimulation					
25 % Perzentile	6,05	13,4	5,53	3,34	3,60
Median	8,38	23,5	8,56	5,59	7,08
75 % Perzentile	10,5	37,7	12,5	7,73	12,5
Mittelwert	9,36	24,8	9,48	6,03	9,32
Standardabweichung	5,73	12,1	5,13	3,33	7,99
Zunahme des Anteils (%) IL-17A-exprimierender Zellen					
25 % Perzentile	2,97	12,2	3,22	1,29	1,69
Median	5,25	18,5	5,16	3,44	4,44
75 % Perzentile	7,19	36,5	9,22	6,11	10,4
Mittelwert	6,18	22,2	6,53	4,18	7,16
Standardabweichung	5,84	12,7	4,90	3,13	8,16

4.2.2. Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an CD3-positiven Lymphozyten

Im nächsten Schritt wurde der Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an CD3-positiven Lymphozyten analysiert (s. Abb. 11). Unter PMA-Stimulation kam es zu einer Zunahme des Anteils IL-17A-exprimierender Zellen.

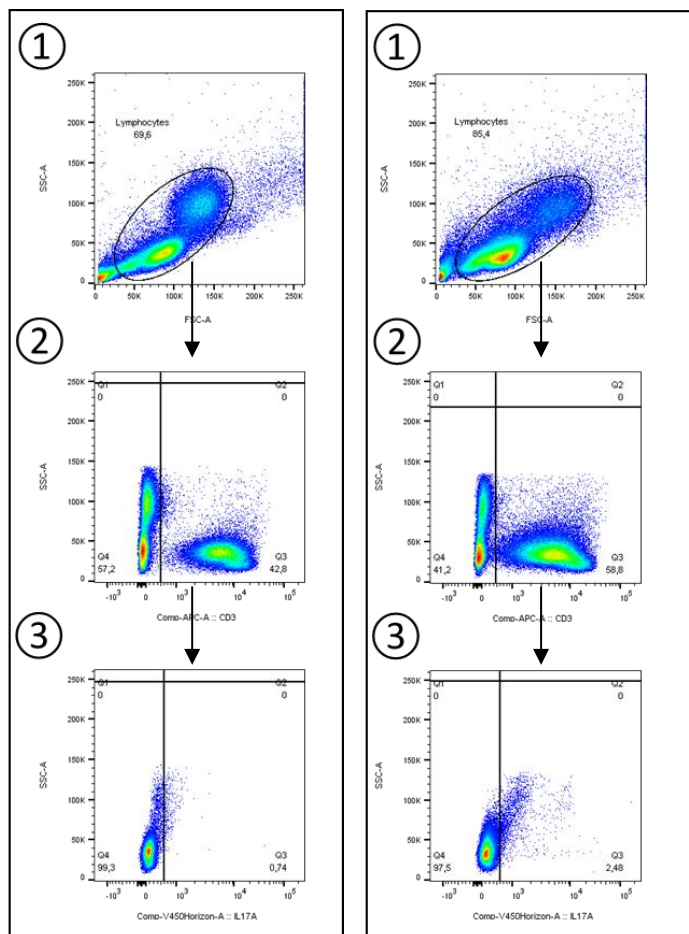


Abbildung 11: Repräsentatives Beispiel des Gatings der CD3-positiven Lymphozyten und deren intrazelluläre IL-17A Expression ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts)

Teilbild 1: Gating der Lymphozyten nach forward scatter (FSC) / sideward scatter (SSC); Teilbild 2: Gating der Lymphozyten nach SSC / cluster of differentiation (CD) 3; Teilbild 3: Gating der CD3-positiven Lymphozyten nach SSC/ Interleukin (IL) -17A

Ohne Stimulation zeigten SCC-Patienten einen geringeren Anteil IL-17A-exprimierender Zellen verglichen mit den übrigen Patientengruppen und den gesunden Kontrollen. Patienten mit Leukoplakie, OLP bzw. cGVHD wiesen einen leicht erhöhten Anteil IL-17A-exprimierender Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf, wobei der Unterschied bei der cGVHD-Gruppe nur sehr gering war. Patienten mit Leukoplakie zeigten den höchsten basalen Anteil IL-17A-exprimierender Zellen (s. Abb. 12A und Tab. 22). Im paarweisen Vergleich ergaben sich statistisch auffällige

Unterschiede zwischen Patienten mit SCC und Leukoplakie ($p < 0,01$) bzw. OLP ($p < 0,01$).

Unter PMA-Stimulation zeigten alle Patientengruppen einen deutlich höheren Anteil IL-17A-exprimierender Zellen als die gesunde Kontrollgruppe. Patienten mit SCC wiesen den höchsten Anteil auf, gefolgt von Patienten mit Leukoplakie, cGVHD und zuletzt OLP (s. Abb. 12B und Tab. 22).

Statistisch auffällige Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bestanden für Patienten mit Leukoplakie ($p < 0,01$), mit OLP ($p < 0,05$) sowie mit cGVHD ($p < 0,05$). Statistisch auffällige Unterschiede zwischen den Patientengruppen traten nicht auf.

Bei der Zunahme des Anteils IL-17A-exprimierender Zellen zeigten Patienten mit SCC den größten Zuwachs. Patienten mit Leukoplakie und cGVHD zeigten eine vergleichbare Zunahme. In der Gruppe mit OLP war die Zunahme am geringsten. Alle Patientengruppen zeigten einen stärkeren Anstieg IL-17A-exprimierende Zellen als die gesunde Kontrollgruppe (s. Abb. 12C und Tab. 22).

Statistisch auffällige Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe bestanden für Patienten mit Leukoplakie ($p < 0,05$), mit SCC ($p < 0,01$) sowie mit cGVHD ($p < 0,05$).

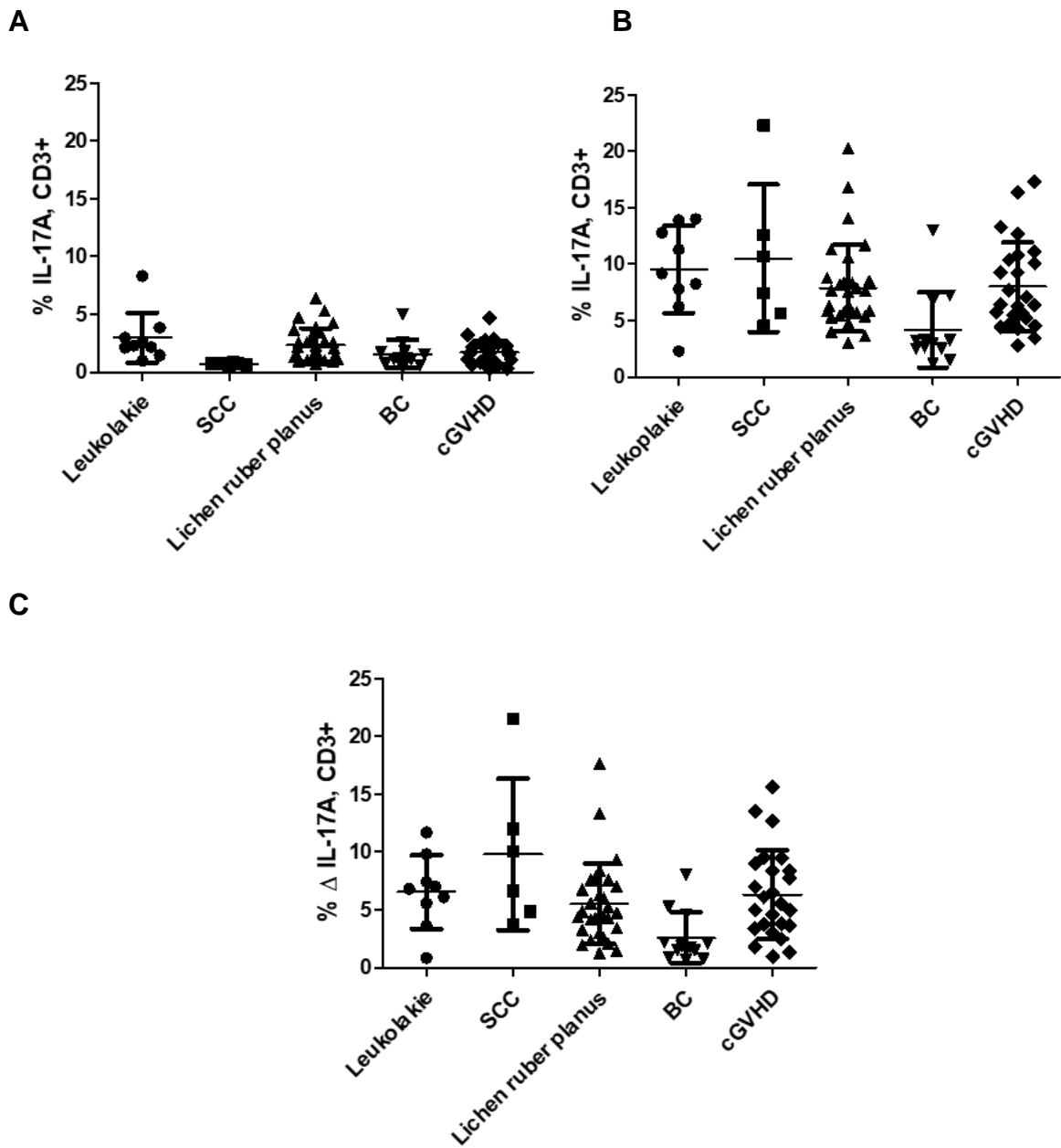


Abbildung 12: Anteil IL-17A-exprimierender Zellen an den CD3-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)
 A: ohne Stimulation; B: mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation C: Zunahme unter PMA-Stimulation

Tabelle 22: Statistische Kennzahlen des Anteils IL-17A-exprimierender Zellen an den CD3-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen ohne Stimulation					
25 % Perzentile	1,81	0,633	1,18	0,823	0,920
Median	2,30	0,775	1,93	1,17	1,63
75 % Perzentile	3,43	0,798	3,19	1,80	2,39
Mittelwert	2,99	0,738	2,36	1,58	1,71
Standardabweichung	2,17	0,0928	1,44	1,23	1,02
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen nach PMA-Stimulation					
25 % Perzentile	7,04	5,37	5,66	2,49	4,98
Median	9,18	9,07	6,94	3,09	6,42
75 % Perzentile	13,4	15,0	8,62	5,94	10,6
Mittelwert	9,53	10,5	7,89	4,18	8,03
Standardabweichung	3,88	6,52	3,82	3,34	3,92
Zunahme des Anteils (%) IL-17A-exprimierender Zellen					
25 % Perzentile	4,59	4,58	3,22	1,04	3,51
Median	6,82	8,36	4,67	1,82	5,53
75 % Perzentile	8,63	14,4	7,20	4,00	8,67
Mittelwert	6,54	9,80	5,53	2,59	6,32
Standardabweichung	3,18	6,54	3,49	2,23	3,83

4.2.3. Anteil von Th17-Zellen an CD3-/CD4-positiven Lymphozyten

Zur Identifizierung der Th17-Zellen (CD4-positiv / IL-17A-positiv / IFN- γ -negativ) wurden die Lymphozyten, wie in Abbildung 13 dargestellt, gated. Die Th17-Zellen definieren sich durch ihre intrazelluläre IL-17A-Expression bei fehlender IFN- γ -Produktion. Unter PMA-Stimulation kam es zu einer Zunahme des Anteils IL-17A-produzierender Zellen.

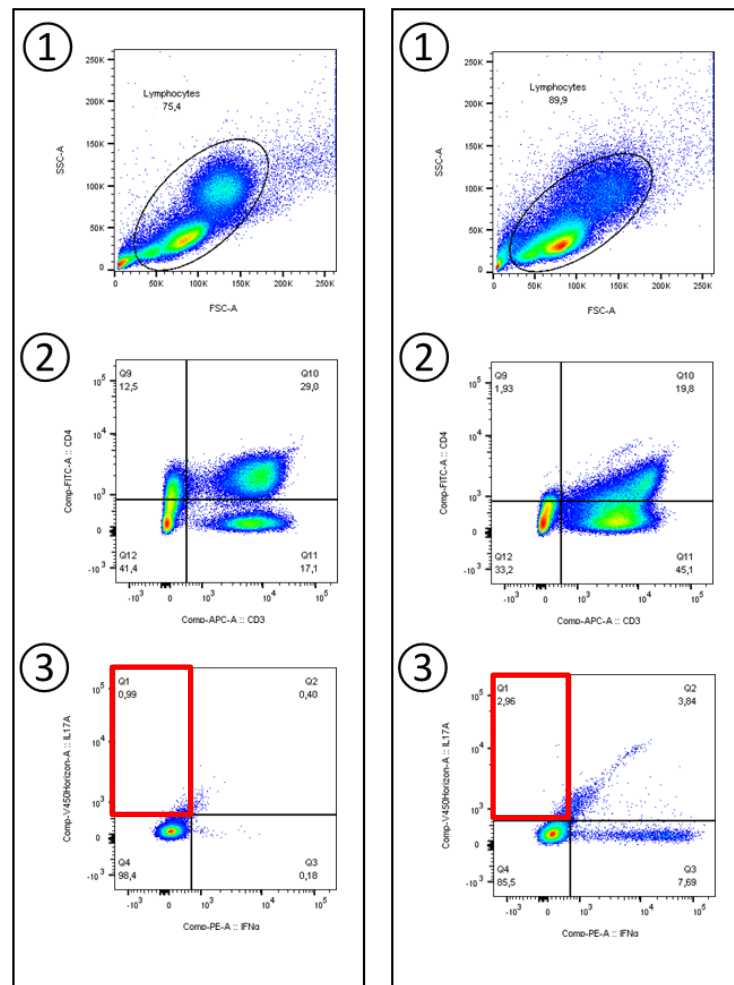


Abbildung 13: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Th17-Zellen und deren intrazelluläre IL-17A Expression ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts)
 Teilbild 1: Gating der Lymphozyten nach forward scatter (FSC) / sideward scatter (SSC); Teilbild 2: Gating der Lymphozyten nach cluster of differentiation (CD) 3 / CD 4; Teilbild 3: Gating der CD3 / CD4-positiven Lymphozyten nach Interleukin (IL) -17A / Interferon (IFN) - γ

Ohne PMA-Stimulation zeigten Patienten mit cGVHD, OLP und Leukoplakie einen höheren Anteil an Th-17 Zellen als gesunde Probanden und SCC-Patienten. Bei Patienten mit SCC lag der Anteil sogar unter dem gesunder Kontrollen (s. Abb. 14A und Tab. 23). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen SCC-Patienten und Leukoplakie-Patienten ($p < 0,05$), OLP-Patienten ($p < 0,01$) bzw. cGVHD-Patienten ($p < 0,01$).

Nach PMA-Stimulation stieg der Anteil an Th17-Zellen in allen Untersuchungsgruppen an. Dabei lag der Anteil bei den Patienten mit Leukoplakie, OLP und cGVHD weiterhin über den Anteilen bei gesunden Kontrollen. Leukoplakie-Patienten zeigten die größten Anteile an Th17-Zellen, gefolgt von Patienten mit OLP und cGVHD. Der geringste Anteil an Th17-Zellen wurde bei den SCC-Patienten detektiert. Dieser lag auch deutlich unter dem Anteil bei gesunden Kontrollen (s. Abb. 14B und Tab. 23). Im

paarweisen Vergleich zeigten sich statistisch auffällige Unterschiede zwischen SCC-Patienten und Leukoplakie-Patienten ($p < 0,01$) bzw. OLP-Patienten ($p < 0,01$).

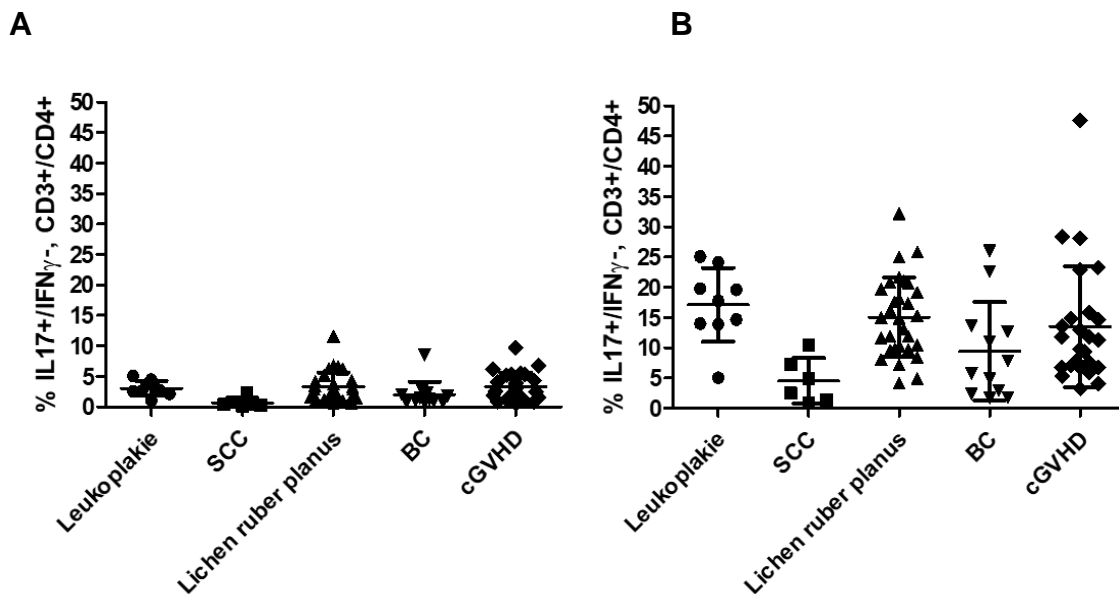


Abbildung 14: Anteil von Th17-Zellen (CD4-positiv / IL-17A-positiv / IFN- γ -negativ) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)
A: ohne Stimulation; B: mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation

Tabelle 23: Statistische Kennzahlen des Anteils von Th17-Zellen (CD4-positiv / IL-17A-positiv / IFN- γ -negativ) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen ohne Stimulation					
25 % Perzentile	2,36	0,235	1,54	0,840	1,46
Median	2,65	0,415	2,85	1,33	2,51
75 % Perzentile	4,08	1,12	4,28	2,19	5,26
Mittelwert	3,03	0,703	3,27	2,00	3,32
Standardabweichung	1,22	0,770	2,38	2,15	2,29
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen nach PMA-Stimulation					
25 % Perzentile	14,0	1,28	9,81	2,50	6,81
Median	17,8	3,69	15,0	6,82	11,3
75 % Perzentile	22,0	8,05	20,0	13,4	15,4
Mittelwert	17,1	4,58	15,1	9,44	13,5
Standardabweichung	6,11	3,74	6,58	8,11	9,99

4.2.4. Anteil von Th17/Th1-Zellen an CD3-/CD4-positiven Lymphozyten

Da in der Literatur eine Subpopulation von Th17-Zellen beschrieben wird, die neben IL-17A auch IFN- γ exprimiert (152), wurde das Vorkommen dieser Th17/Th1-Zellen

(CD4-positiv/IL-17A-positiv/IFN- γ -positiv) in den Erkrankungsgruppen und den gesunden Kontrollen untersucht. Abbildung 15 zeigt exemplarisch das Gating dieser Zellpopulation. Nach PMA-Stimulation kam es zu einer Zunahme des Anteils IL-17A/IFN- γ -produzierender Zellen.

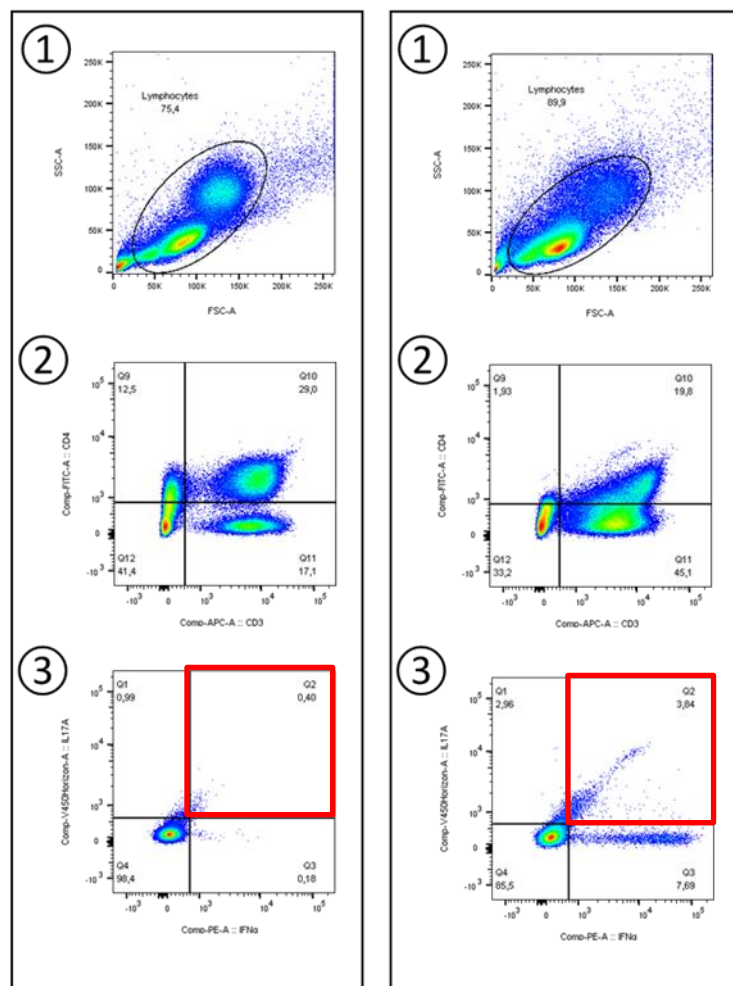


Abbildung 15: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Th17/Th1-Zellen ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts)

Teilbild 1: Gating der Lymphozyten nach forward scatter (FSC) / sideward scatter (SSC); Teilbild 2: Gating der Lymphozyten nach cluster of differentiation (CD) 3 / CD4; Teilbild 3: Gating der CD3/CD4 positiven Lymphozyten nach Interferon (IFN) γ / Interleukin (IL) – 17A

Unter Basalbedingungen zeigten alle Gruppen sehr niedrige prozentuale Anteile von IL-17A/IFN- γ -doppelt-positiven Zellen an den CD3- und CD4-positiven Lymphozyten. SCC- und cGVHD-Patienten wiesen minimal höhere Anteile im Vergleich zu gesunden Probanden auf. Bei Patienten mit OLP oder Leukoplakie waren die Anteile im Vergleich zu gesunden Kontrollen dagegen marginal geringer (s. Abb. 16A und Tab. 24). Statistisch auffällig waren die Gruppenunterschiede nicht ($p=0,0896$).

Unter PMA-Stimulation verstärkten sich die Gruppenunterschiede bezüglich des Anteils der IL-17A/IFN- γ -exprimierenden Zellen. SCC-Patienten wiesen mit Abstand

die größten Anteile auf, gefolgt von cGVHD-Patienten. Die Anteile beider Erkrankungsgruppen lagen damit über dem bei gesunden Kontrollen. Leukoplakie- und OLP-Patienten wiesen geringere Anteile an Th17/Th1-exprimierenden Zellen auf als Gesunde, wobei der Anteil bei OLP-Patienten am geringsten war (s. Abb. 16B und Tab. 24). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen OLP-Patienten und SCC- ($p < 0,001$) bzw. cGVHD-Patienten ($p < 0,001$).

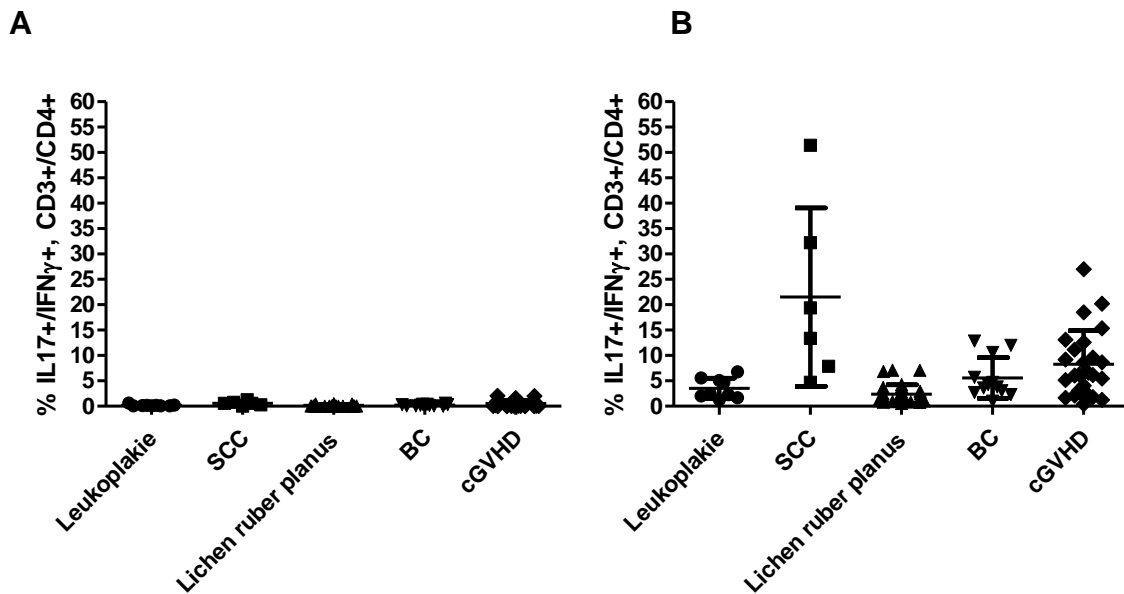


Abbildung 16: Anteil von Th17/Th1-Zellen (CD4-positiv/IL-17A-positiv/IFN- γ -positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

A: ohne Stimulation; B: mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation

Tabelle 24: Statistische Kennzahlen des Anteils von Th17/Th1-Zellen (CD4-positiv/IL-17A-positiv/IFN- γ -positiv) an CD3- und CD4-positiven Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
Anteil (%) IL-17A/IFN-γ-exprimierender Zellen ohne Stimulation					
25 % Perzentile	0,0635	0,200	0,0523	0,0695	0,0815
Median	0,130	0,570	0,0930	0,195	0,210
75 % Perzentile	0,210	0,908	0,163	0,383	0,665
Mittelwert	0,178	0,578	0,153	0,236	0,505
Standardabweichung	0,181	0,430	0,152	0,187	0,623
Anteil (%) IL-17A/IFN-γ-exprimierender Zellen nach PMA-Stimulation					
25 % Perzentile	1,85	7,09	1,06	2,80	2,70
Median	2,45	16,4	1,86	4,06	6,28
75 % Perzentile	5,34	37,0	2,81	9,38	11,9
Mittelwert	3,53	21,5	2,39	5,57	8,27
Standardabweichung	2,00	17,6	1,85	3,99	6,61

4.2.5. Anteil von Tc17-Zellen an CD4-negativen Lymphozyten

Im nächsten Schritt wurde der Anteil der IL-17A-exprimierenden Zellen an den CD4-negativen (CD8-positiven) T-Lymphozyten untersucht. Tc17-Zellen definieren sich durch ihre IL-17A-Expression bei fehlender IFN- γ -Produktion. Abbildung 17 zeigt das Gating dieser Zellpopulation. Es zeigte sich eine Zunahme des Anteils IL-17A-exprimierender Zellen infolge der PMA-Stimulation.

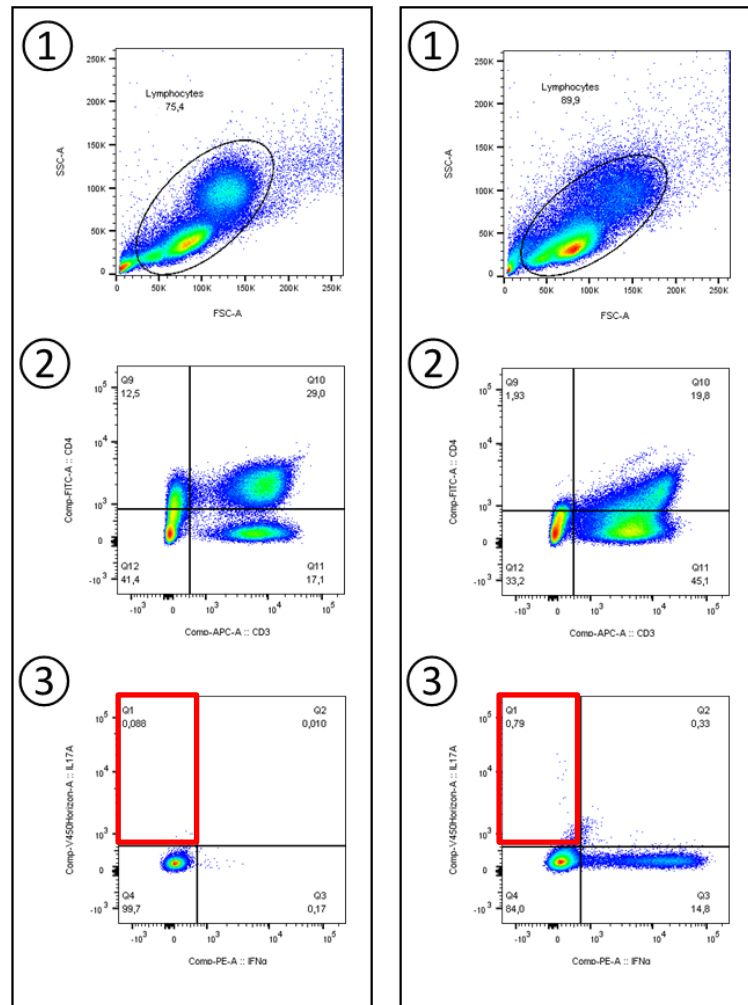


Abbildung 17: Repräsentatives Beispiel des Gatings der Tc17-Zellen ohne (links) und mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation (rechts)

Teilbild 1: Gating der Lymphozyten nach forward scatter (FSC) / sideward scatter (SSC); Teilbild 2: Gating der Lymphozyten nach cluster of differentiation (CD) 3 / CD4; Teilbild 3: Gating der CD3 positiven / CD4 negativen Lymphozyten nach Interferon (IFN) - γ / Interleukin (IL) - 17A

Der Anteil der Tc17-Zellen an den CD4-negativen T-Zellen war unter Basalbedingungen bei Patienten mit cGVHD bzw. SCC sehr niedrig und unterschied sich nicht wesentlich von dem Anteil in der gesunden Kontrollgruppe. Dagegen zeigten

Patienten mit OLP bzw. Leukoplakie höhere Anteile, wobei die Leukoplakie-Gruppe den größten Tc17-Zellanteil aufwies (s. Abb. 18A und Tab. 25).

Statistisch auffällige Unterschiede bestanden zwischen Leukoplakie-Patienten und SCC-Patienten ($p < 0,05$), cGVHD-Patienten ($p < 0,01$) bzw. gesunden Kontrollen ($p < 0,05$) sowie zwischen OLP- und cGVHD-Patienten ($p < 0,01$).

Unter PMA-Stimulation war der Anteil an Tc17-Zellen weiter bei Leukoplakie-Patienten am größten, gefolgt von OLP-Patienten. cGVHD-Patienten zeigten einen höheren Anteil an Tc17-Zellen als gesunde Probanden. Die Anteile bei SCC-Patienten und gesunden Probanden waren weiterhin vergleichbar (s. Abb. 18B und Tab. 25). Der paarweise Gruppenvergleich ergab keine statistisch auffälligen Unterschiede.

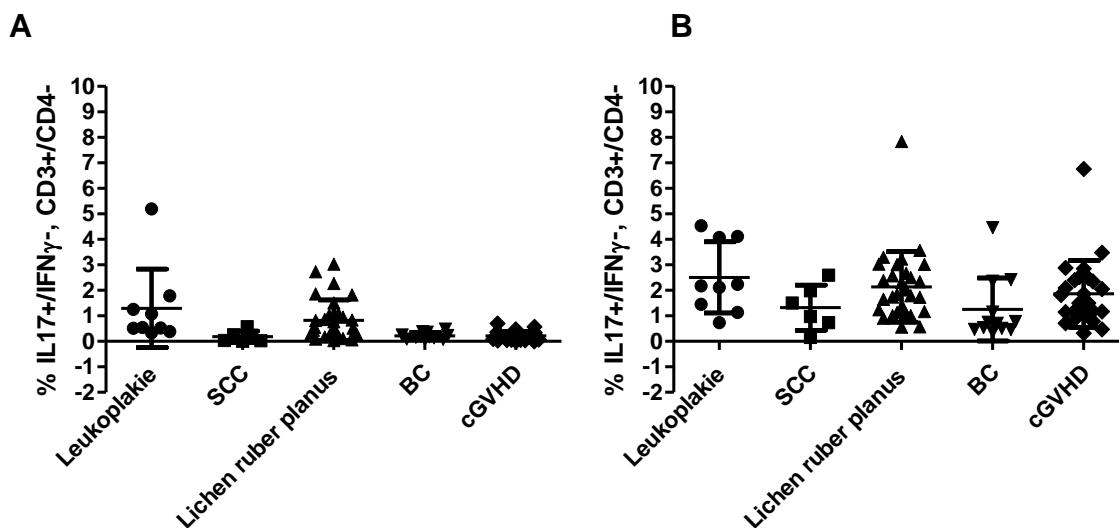


Abbildung 18: Anteil von Tc17-Zellen (CD8-positiv/IL-17A-positiv) an CD4-negativen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

A: ohne Stimulation; B: mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA)-Stimulation

Tabelle 25: Statistische Kennzahlen des Anteils von Tc17-Zellen (CD8-positiv/IL-17A-positiv) an CD4-negativen Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen ohne Stimulation					
25 % Perzentile	0,455	0,0158	0,275	0,106	0,067
Median	0,550	0,114	0,505	0,185	0,170
75 % Perzentile	1,53	0,340	1,06	0,340	0,335
Mittelwert	1,30	0,182	0,823	0,220	0,217
Standardabweichung	1,54	0,221	0,802	0,132	0,183
Anteil (%) IL-17A-exprimierender Zellen nach PMA-Stimulation					
25 % Perzentile	1,30	0,585	1,16	0,483	1,06
Median	2,17	1,24	1,83	0,735	1,51
75 % Perzentile	4,10	2,13	2,76	2,07	2,45
Mittelwert	2,51	1,32	2,13	1,25	1,87
Standardabweichung	1,40	0,886	1,38	1,24	1,31

4.2.6. Th17/Treg-Ratio

Zur Analyse der Beziehung zwischen Th17- und Treg-Zellen und zur Evaluierung ihrer Bedeutung bei den untersuchten Erkrankungen wurde das Th17/Treg-Verhältnis bezogen auf die CD3- und CD4-positiven Lymphozyten berechnet. In allen untersuchten Gruppen waren die Th17-Zellen in der Überzahl (Th17/Treg-Ratio > 1; s. Abb. 19 und Tab. 26). Patienten mit SCC bzw. cGVHD wiesen eine kleinere Ratio auf als gesunde Kontrollen sowie Leukoplakie- und OLP-Patienten. Während sich die Ratio der OLP-Patienten kaum von der Ratio der gesunden Kontrollen unterschied, lag die Ratio der Leukoplakie-Patienten deutlich über diesen Werten. Der paarweise Gruppenvergleich ergab statistisch auffällige Unterschiede zwischen der Th17/Treg-Ratio von SSC-Patienten und Leukoplakie- ($p < 0,05$) bzw. OLP-Patienten ($p < 0,05$).

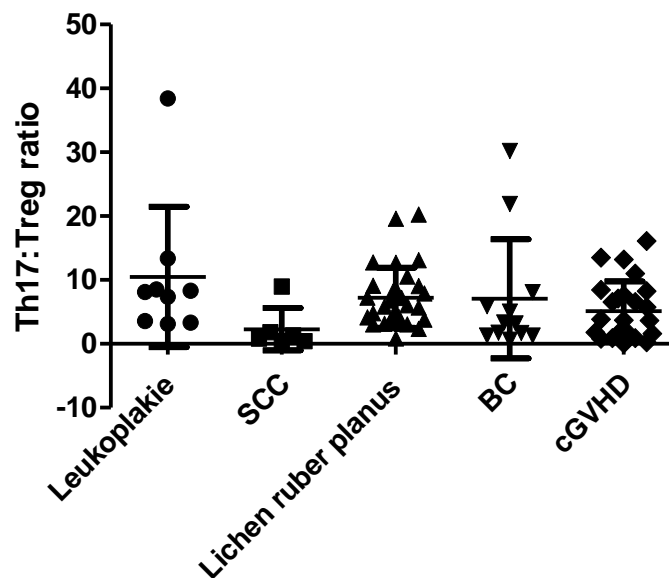


Abbildung 19: Th17/Treg-Ratio in CD3- und CD4-positiven T-Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus, chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)
Anteile der Th17-Zellen unter Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat-(PMA), Anteile der Treg-Zellen ohne Stimulation

Tabelle 26: Statistische Kennzahlen der Th17/Treg-Ratio in CD3- und CD4-positiven T-Lymphozyten bei Patienten mit Leukoplakie, Plattenepithelkarzinomen (SCC), Lichen ruber planus (OLP), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD) und gesunden Kontrollen (BC)

	Leukoplakie	SCC	OLP	BC	cGVHD
Anzahl	9	6	30	12	25
Mittelwert	10	2,3	7,2	7,1	5,1
Standardabweichung	11	3,3	4,7	9,3	4,6

4.3. Zytokin-Konzentrationen im Blutserum

Die Blutserum-Konzentrationen von 13 Zytokinen wurden über ein Bead-basiertes Immunoassay-Verfahren (s. Kap. 3.5) bestimmt. Da aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Zytokine Normwerte für Serumkonzentrationen fehlen, wurden die Werte der Patienten auf die Werte der gesunden Kontrollgruppe bezogen.

4.3.1. Zytokine verschiedener T-Helferzellpopulationen (IL-2)

IL-2 gilt als wichtiges Zytokin für die Proliferation und Differenzierung von T-Helfer- und Treg-Zellen. Durch autokrine Stimulation induziert IL-2 die klonale Expansion von Th1- und Th2-Zellen und reguliert die Reifung von Treg-Zellen im Thymus. Im Gegenzug wird durch IL-2 die Differenzierung von Th17-Zellen gehemmt (153, 154).

Patienten mit cGVHD und SCC zeigten niedrigere IL-2-Serumkonzentrationen als gesunde Kontrollen, wobei SCC-Patienten die geringsten IL-2-Konzentrationen aufwiesen. Patienten mit Leukoplakie zeigten die höchsten IL-2-Konzentrationen, gefolgt von OLP-Patienten. Die Werte beider Patientengruppen lagen oberhalb von denen gesunder Kontrollen (s. Abb. 20 und Tab. 27). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht ($p=0,1990$).

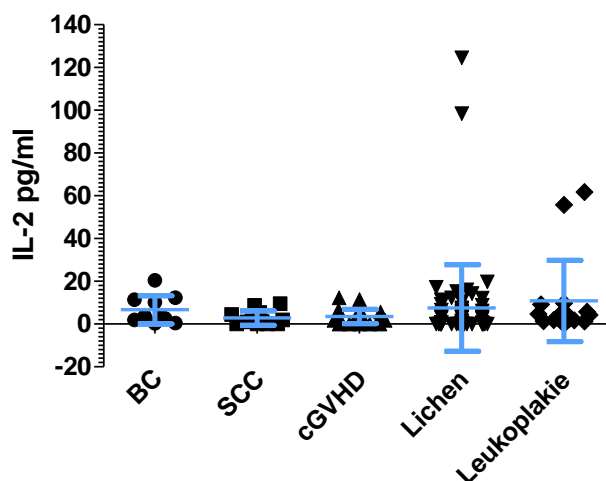


Abbildung 20: IL-2-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 27: Statistische Kennzahlen der IL-2-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	60	16
Minimum	0,380	0,0	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	1,57	0,0	1,29	0,0	1,83
Median	3,70	1,32	2,82	1,44	4,56
75 % Perzentile	11,7	5,18	5,12	6,87	8,36
Maximum	20,4	9,49	12,3	125	61,8
Mittelwert	6,72	2,82	3,56	7,54	10,8
Standardabweichung	6,60	3,44	3,32	20,3	19,0

4.3.2. Th1-Zytokine (IFN- γ)

Die Ergebnisse für das Th1-Zytokin IFN- γ werden in Kapitel 4.3.5 beschrieben.

4.3.3. Th2-Zytokine (IL-5, IL-13, IL-4)

SCC-Patienten zeigten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe deutlich erhöhte Serumkonzentrationen des Th2-Zytokins IL-5. Die übrigen Erkrankungsgruppen wiesen dagegen vergleichbar niedrige IL-5 Serumkonzentrationen unterhalb des Niveaus gesunder Probanden auf (s. Abb. 21 und Tab. 28). Statistisch auffällige Unterschiede bestanden zwischen gesunden Probanden und cGVHD- ($p < 0,001$), OLP- ($p < 0,01$) bzw. Leukoplakie-Patienten ($p < 0,05$) sowie zwischen SCC-Patienten und cGVHD- ($p < 0,001$), OLP- ($p < 0,001$) bzw. Leukoplakie-Patienten ($p < 0,001$).

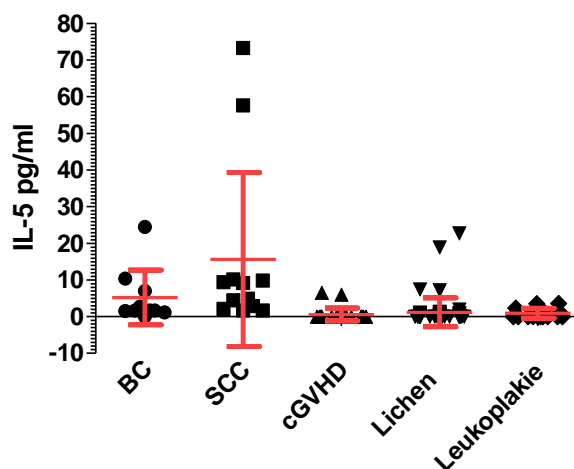


Abbildung 21: IL-5-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 28: Statistische Kennzahlen der IL-2-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	60	16
Minimum	0,0	1,70	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	1,43	2,28	0,0	0,0	0,0
Median	1,70	7,00	0,0	0,0	0,0
75 % Perzentile	7,82	10,0	0,0	0,590	2,05
Maximum	24,5	73,3	6,53	22,8	3,62
Mittelwert	5,22	15,6	0,570	1,16	0,891
Standardabweichung	7,45	23,8	1,77	3,94	1,35

Die IL-13-Serumkonzentration lag in den Erkrankungsgruppen höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Leukoplakie-Patienten zeigten die höchsten Werte gefolgt von OLP-Patienten. Die IL-13 Level der cGVHD-Patienten und der SCC-Gruppe waren vergleichbar (s. Abb. 22 und Tab. 29). Statistisch auffällig waren die Unterschiede zwischen gesunden Probanden und OLP- ($p < 0,05$) bzw. Leukoplakie-Patienten ($p < 0,05$).

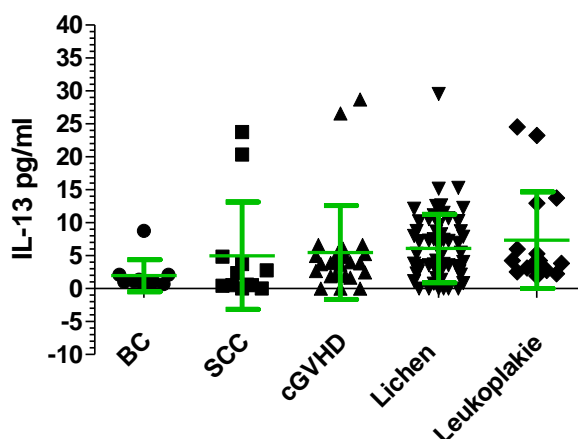


Abbildung 22: IL-13-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 29: Statistische Kennzahlen der IL-13-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	60	16
Minimum	0,450	0,0	0,0	0,0	1,95
25 % Perzentile	0,943	0,465	1,97	2,43	2,87
Median	1,09	1,49	3,88	4,69	4,05
75 % Perzentile	2,09	4,58	5,42	8,78	11,2
Maximum	8,77	23,8	28,7	29,6	24,6
Mittelwert	1,97	5,00	5,47	6,09	7,37
Standardabweichung	2,45	8,16	7,12	5,18	7,33

Beim Th2-Zytokin IL-4 bestanden keine statistisch auffälligen Gruppenunterschiede. Dennoch zeigten Leukoplakie-Patienten deutlich höhere Serumkonzentrationen als gesunde Probanden. Erhöhte IL-4 Konzentrationen fanden sich zudem bei OLP-Patienten. Patienten mit cGVHD bzw. SCC zeigten vergleichbare, gegenüber gesunden Probanden erniedrigte IL-4-Level (s. Abb. 23 und Tab. 30).

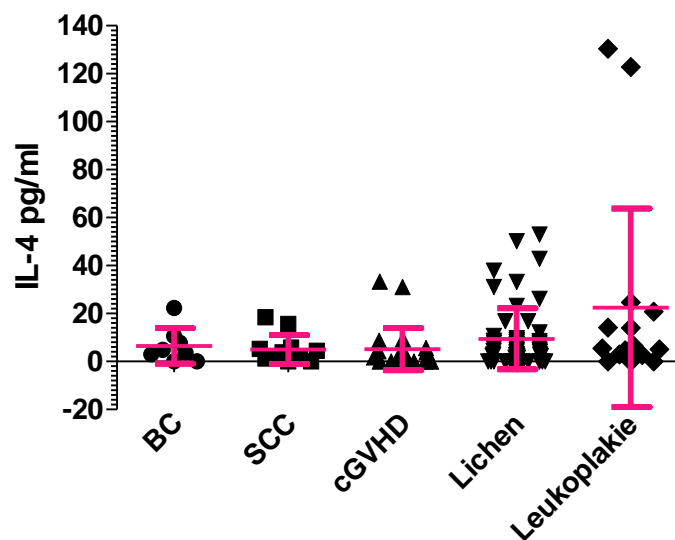


Abbildung 23: IL-4-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 30: Statistische Kennzahlen der IL-4-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	8	12	24	56	16
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	0,753	1,37	0,0	1,68	2,78
Median	4,26	2,87	2,50	5,33	5,37
75 % Perzentile	9,87	5,69	4,92	9,13	19,2
Maximum	22,4	18,4	33,4	53,0	131
Mittelwert	6,53	5,01	5,12	9,42	22,4
Standardabweichung	7,34	5,95	8,76	12,7	41,4

4.3.4. Th17-Zytokine (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22)

Zur Analyse der Bedeutung von Th17-Zellen bei den untersuchten Erkrankungen wurde ergänzend zur Analyse der Anteile IL-17A-exprimierender Zellen an verschiedenen Lymphozyten-Populationen (s. Kap. 4.2) das Th17-Zytokinprofil im

Blutserum anhand des Schlüsselzytokins IL-17A sowie weiterer Th17-Zytokine (IL-17F, IL-21, IL-22) erhoben.

SCC- und cGVHD-Patienten zeigten extrem niedrige, mit denen gesunder Kontrollen vergleichbare, IL-17A-Serumkonzentrationen. Im Gegensatz dazu waren die IL-17A-Werte in der OLP- und Leukoplakie-Gruppe deutlich erhöht. Leukoplakie-Patienten wiesen die höchste IL-17A-Serumkonzentration von allen Untersuchungsgruppen auf (s. Abb. 24 und Tab. 31). Die Gruppenunterschiede waren statistisch nicht auffällig ($p=0,4664$).

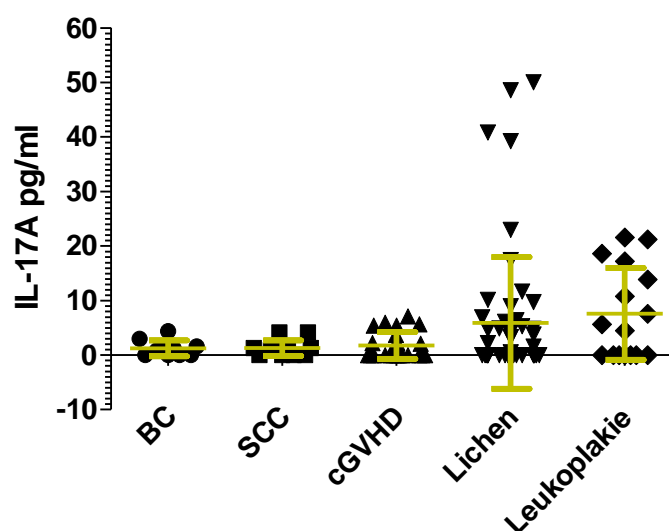


Abbildung 24: IL-17A-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 31: Statistische Kennzahlen der IL-17A-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	54	16
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Median	1,01	0,970	0,0	0,0	5,06
75 % Perzentile	1,94	1,39	3,37	5,54	16,4
Maximum	4,38	4,14	7,13	50,1	21,6
Mittelwert	1,23	1,26	1,75	5,89	7,56
Standardabweichung	1,47	1,45	2,43	12,1	8,42

Die Serumwerte für IL-17F lagen in der SCC-Gruppe ebenfalls sehr niedrig und waren vergleichbar mit den Werten der gesunden Kontrollgruppe. Erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten Patienten mit cGVHD, OLP und Leukoplakie, wobei die Leukoplakie-Patienten die höchste IL-17F-Serumkonzentration

aufwiesen (s. Abb. 25 und Tab. 32). Statistisch auffällig waren die Gruppenunterschiede nicht ($p=0,0790$).

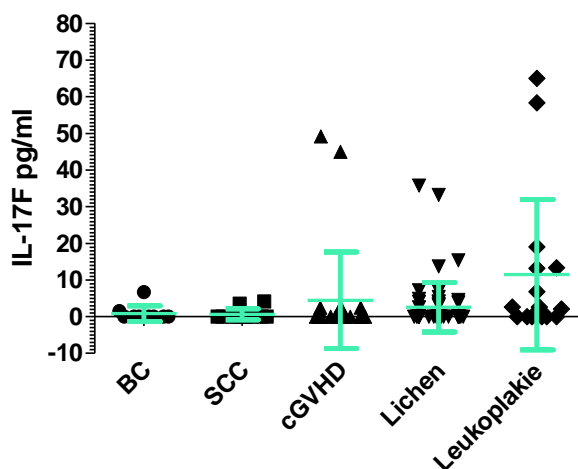


Abbildung 25: IL-17F-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 32: Statistische Kennzahlen der IL-17R-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	60	16
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Median	0,0	0,0	0,0	0,0	2,38
75 % Perzentile	0,380	0,0	2,10	3,01	13,4
Maximum	6,72	4,11	49,2	35,8	65,0
Mittelwert	0,824	0,637	4,47	2,55	11,5
Standardabweichung	2,13	1,49	13,2	6,76	20,5

Die IL-21-Serumkonzentrationen waren in allen Erkrankungsgruppen höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Leukoplakie-Patienten zeigten mit Abstand die höchsten Werte. Patienten mit OLP und cGVHD wiesen vergleichbare Serumkonzentrationen auf. Unter den Erkrankungsgruppen zeigte die SCC-Gruppe die niedrigsten IL-21-Spiegel (s. Abb. 26 und Tab. 33). Die Unterschiede waren nicht statistisch auffällig ($p=0,7833$).

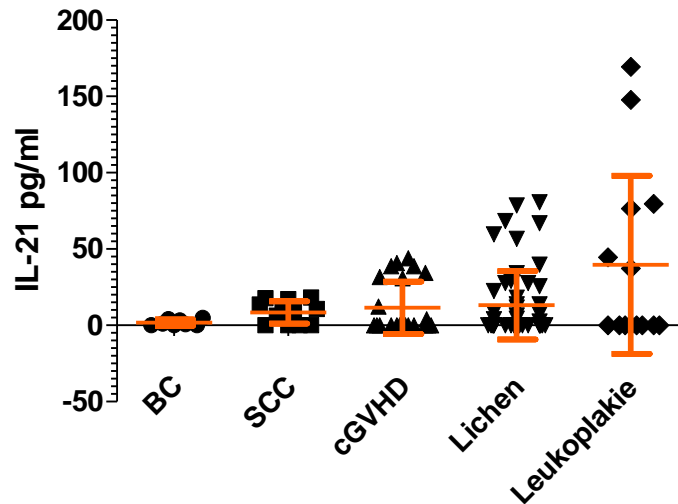


Abbildung 26: IL-21-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 33: Statistische Kennzahlen der IL-21-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	8	12	24	54	14
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Median	1,01	8,80	0,0	0,0	0,0
75 % Perzentile	3,88	16,3	31,5	19,3	77,4
Maximum	4,89	18,3	44,0	80,8	170
Mittelwert	1,78	8,47	11,5	13,2	39,7
Standardabweichung	2,00	7,28	17,2	22,5	58,3

Patienten mit OLP, Leukoplakie und SCC zeigten vergleichbare, aber im Vergleich zu gesunden Probanden höhere IL-22-Serumlevel. Bei den cGVHD-Patienten wurde die geringste IL-22-Konzentration im Vergleich zu den anderen Erkrankungsgruppen gemessen. Der Wert in dieser Gruppe zeigte keinen wesentlichen Unterschied zum IL-22-Level der gesunden Kontrollgruppe (s. Abb. 27 und Tab. 34). Statistisch auffällig waren die Gruppenunterschiede nicht ($p=0,4239$).

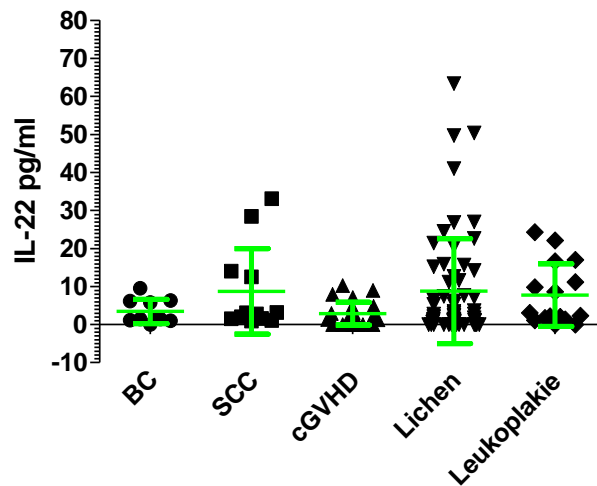


Abbildung 27: IL-22-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 34: Statistische Kennzahlen der IL-22-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	60	16
Minimum	0,0	0,910	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	1,09	1,51	0,290	0,0	1,46
Median	1,62	2,94	1,95	2,41	2,70
75 % Perzentile	6,20	13,6	4,30	12,4	15,3
Maximum	9,50	33,1	10,3	63,4	24,3
Mittelwert	3,45	8,69	2,85	8,79	7,73
Standardabweichung	3,19	11,2	2,99	13,8	8,24

4.3.5. Pro-inflammatorische Zytokine (IL-6, TNF- α , IFN- γ)

Um das Vorkommen von Th17-Zellen im Kontext des bei den Erkrankungen vorherrschenden Entzündungsprozesses zu untersuchen, wurden die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IFN- γ im Blutserum bestimmt.

Patienten mit SCC zeigten im Vergleich zu den anderen Erkrankungsgruppen und den gesunden Kontrollen erhöhte IL-6-Konzentrationen. cGVHD-Patienten wiesen geringfügig höhere IL-6-Konzentrationen auf als gesunde Probanden, wobei der Unterschied nicht statistisch auffällig war. Bei OLP- und Leukoplakie-Patienten waren die IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigt; die niedrigsten Level zeigten OLP-Patienten (s. Abb. 28 und Tab. 35). Statistisch auffällig

waren die Unterschiede zwischen SCC-Patienten und cGVHD- ($p < 0,01$), OLP- ($p < 0,001$) bzw. Leukoplakie-Patienten ($p < 0,01$).

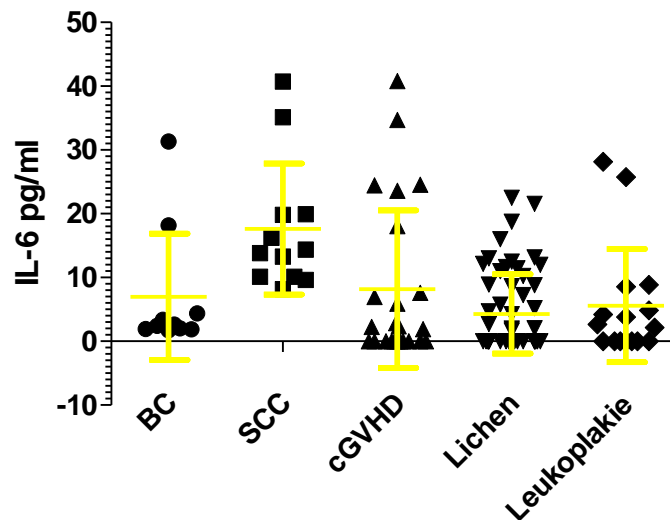


Abbildung 28: IL-6-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 35: Statistische Kennzahlen der IL-6-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	58	16
Minimum	1,72	8,16	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	1,92	10,1	0,0	0,0	0,0
Median	2,53	14,1	2,08	0,0	2,44
75 % Perzentile	7,83	19,9	15,5	8,86	7,66
Maximum	31,4	40,7	40,9	22,5	28,2
Mittelwert	6,99	17,6	8,18	4,28	5,58
Standardabweichung	9,90	10,3	12,4	6,23	8,88

Neben hohen IL-6-Serumkonzentrationen wiesen SCC-Patienten auch den höchsten TNF- α -Serumspiegel im Vergleich zu den anderen Gruppen auf, wobei die OLP- und Leukoplakie-Patienten nur geringfügig kleinere Werte präsentierten. Die geringste TNF- α -Konzentration zeigten die cGVHD-Patienten; ihre Werte lagen als einzige Gruppe unter dem Niveau der gesunden Kontrollen (s. Abb. 29 und Tab. 36). Die Unterschiede waren statistisch nicht auffällig ($p = 0,0622$).

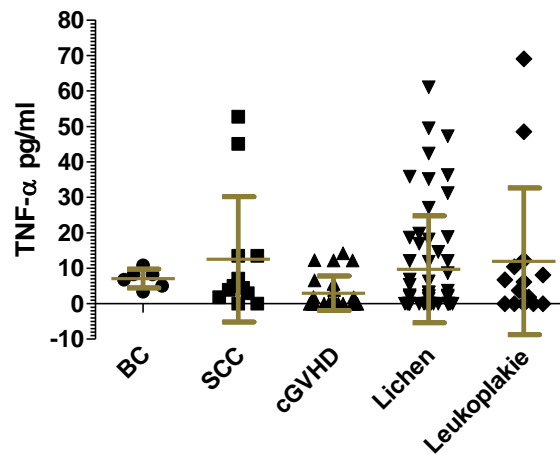


Abbildung 29: TNF- α -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 36: Statistische Kennzahlen der TNF- α -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	6	12	24	58	14
Minimum	3,41	0,0	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	4,60	2,07	0,0	0,0	0,0
Median	7,51	4,73	0,0	2,02	4,97
75 % Perzentile	8,91	13,5	5,23	15,2	10,9
Maximum	10,8	52,8	14,3	61,1	69,1
Mittelwert	7,09	12,5	2,96	9,67	11,9
Standardabweichung	2,64	17,7	4,86	15,1	20,7

Beim pro-inflammatorischen Th1-Zytokin IFN- γ zeigten Patienten mit Leukoplakie die höchsten Serumkonzentrationen gefolgt von OLP- und cGVHD-Patienten. Die drei Krankheitsgruppen wiesen höhere IFN- γ -Level auf als die gesunde Kontrollgruppe. Interessanterweise zeigten SCC-Patienten im Vergleich zu den übrigen Erkrankungsgruppen die geringsten IFN- γ -Konzentrationen. Die Werte lagen auch unter dem Serumlevel der gesunden Kontrollen (s. Abb. 30 und Tab. 37). Im Gruppenvergleich ergab sich kein statistisch auffälliger Unterschied ($p=0,5598$).

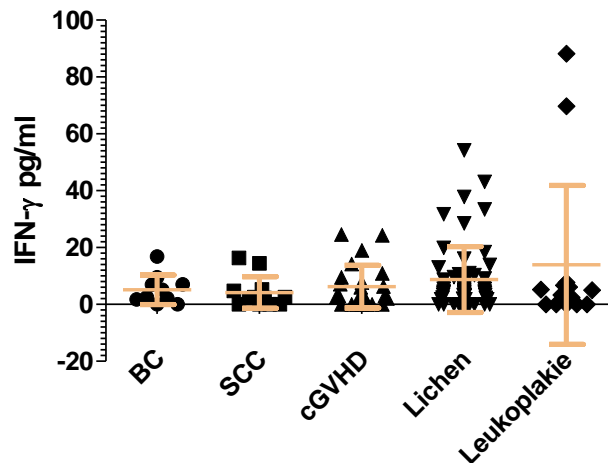


Abbildung 30: IFN- γ -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 37: Statistische Kennzahlen der IFN- γ -Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	56	14
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
25 % Perzentile	1,32	0,0	0,0	1,92	0,0
Median	3,81	2,38	3,09	4,56	4,23
75 % Perzentile	7,69	5,10	9,13	10,2	7,04
Maximum	16,9	16,4	24,7	54,3	88,2
Mittelwert	5,19	4,19	6,23	8,75	13,9
Standardabweichung	5,21	5,56	7,49	11,6	27,9

4.3.6. Anti-inflammatorische Zytokine (IL-10)

Zur Analyse der Bedeutung der Treg-Zellen als Gegenspieler der Th17-Zellen bei den Erkrankungen wurde die Serumkonzentration für das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 bestimmt.

Die IL-10-Serumkonzentration lag in allen Gruppen sehr niedrig. Dennoch zeigten die Erkrankungsgruppen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen höhere IL-10-Konzentrationen. Die höchsten IL-10-Werte waren den cGVHD-Patienten zuzuordnen, dicht gefolgt von den OLP- und SCC-Patienten (s. Abb. 31 und Tab. 38). Statistisch auffällig war der Unterschied zwischen den cGVHD- und den OLP-Patienten ($p < 0,05$).

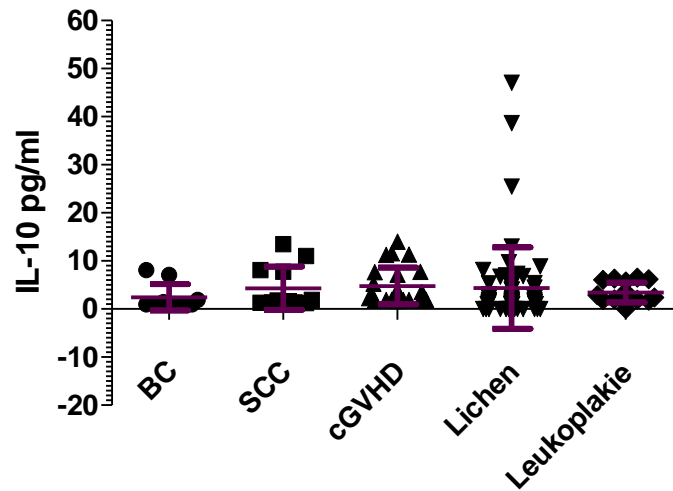


Abbildung 31: IL-10-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus und Leukoplakie-Patienten

Tabelle 38: Statistische Kennzahlen der IL-10-Konzentration (pg/ml) im Blutserum von gesunden Kontrollen (BC) sowie Patienten mit Plattenepithelkarzinom (SCC), chronischer graft-versus-host disease (cGVHD), Lichen ruber planus (OLP) und Leukoplakie-Patienten

	BC	SCC	cGVHD	OLP	Leukoplakie
Anzahl	10	12	24	58	16
Minimum	0,880	1,08	1,73	0,0	0,0
25 % Perzentile	0,963	1,31	1,93	0,0	1,98
Median	1,01	1,70	2,97	1,63	2,67
75 % Perzentile	3,22	8,00	7,58	4,66	6,01
Maximum	8,10	13,5	14,0	47,1	6,54
Mittelwert	2,43	4,33	4,78	4,36	3,42
Standardabweichung	2,75	4,48	3,84	8,48	2,06

5. Diskussion

5.1. Methodisches Vorgehen

5.1.1. Nachweis der Lymphozyten-Populationen und der Zytokin-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozyten-Populationen sowie deren Zytokin-Expression mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die durchflusszytometrische Erfassung von Zellpopulationen ist eine etablierte Methode, die in der Forschung verbreitet Anwendung findet. Für die Analyse der IL-17A- und IFN- γ -Expression in den T-Effektorzellpopulationen wurde neben der basalen Expression auch die Expression nach Stimulation der Zellen mit PMA untersucht. Nicht aktivierte Immunzellen weisen in der Regel eine geringe Zytokin-Produktion auf. Bei einer ausschließlichen Analyse der basalen Expression wären daher potenzielle Unterschiede in der Expression in den Erkrankungsgruppen nur eingeschränkt nachweisbar gewesen. Weiter sollte die Funktionalität der Lymphozyten-Populationen anhand der Stimulierbarkeit der IL-17A- bzw. IFN- γ -Produktion untersucht werden, um eine möglicherweise eingeschränkte Zellfunktion in den Erkrankungsgruppen zu identifizieren. In dem vorliegenden Experiment trat nach PMA-Stimulation in allen Erkrankungsgruppen eine erhöhte IL-17A- bzw. IFN- γ -Expression auf. Damit scheint die Zytokin-Produktion der untersuchten Zellpopulationen bei den Erkrankungen (OLP, Leukoplakie, cGVHD, SCC) nicht beeinträchtigt zu sein.

5.1.2. Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen im Blutserum

Zytokine sind Botenstoffe, die hauptsächlich von aktivierten Immunzellen sezerniert werden. Sie wirken, vergleichbar mit Neurotransmittern und Hormonen, über spezifische Rezeptoren auf unterschiedliche Zielzellen. Zytokine spielen eine wichtige Rolle im Netzwerk der interzellulären Kommunikation und vermitteln sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Signale. Das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Zytokinen ist für die Aufrechterhaltung der immunologischen Balance und für eine effektive Immunantwort essenziell (155).

Zytokine zeichnen sich durch eine phasenhafte Freisetzung, niedrige Blutspiegel und eine kurze in vivo Halbwertszeit aus (156). Diese Charakteristika erschweren die

Definition von Normwerten für Zytokin-Konzentrationen. Als Referenzwerte für die Beurteilung der Patientenproben wurden daher in diesem Projekt Zytokin-Konzentrationen im Blutserum gesunder Probanden genutzt.

Das verwendete bead-basierte Multiplex-Assay-Verfahren bot gegenüber einem herkömmlichen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) den Vorteil, mehrere Zytokine simultan in einer Serumprobe erfassen zu können. Unabhängig von der Anzahl der zu bestimmenden Analyten reichten kleine Probenvolumina für die Konzentrationsbestimmung aus, sodass Patientenmaterial sparsam eingesetzt werden konnte. Ein weiterer Vorteil war, dass die Messung an einem herkömmlichen Durchflusszytometer erfolgte, sodass keine zusätzlichen Messgeräte erforderlich waren. Im Vergleich zu herkömmlichen ELISA-Methoden zeichnete sich das verwendete Multiplex-Assay-Verfahren zudem durch eine höhere Sensitivität bei der Detektion der Zielmoleküle und einen breiteren Messbereich aus (157).

Bei der Datenauswertung (s. Kap. 3.5) wurde eine maximale Abweichung zwischen den Doppelwerten von $\pm 20\%$ für alle Proben festgelegt. Hohe Abweichungen zwischen Doppelwerten können vielfältige Ursachen (z. B. Pipettenungenauigkeiten, Verklumpungen der Beads, Materialrückstände in den Probenwells nach den Waschschritten, unerwünschte Feststoffpartikel in der Probe) haben, die die Antikörper-Analyten Bindung behindern (158). Zur Minimierung von Störfaktoren wurden in der vorliegenden Untersuchung keine Multichannel-Pipetten verwendet und die Beads vor den Experimenten sorgfältig gemischt.

5.2. Bedeutung von Th17-Zellen und IL-17A bei den Erkrankungen

Th17-Zellen sind eine heterogene T-Zellpopulation. Neben protektiven Funktionen im Rahmen der Immunabwehr an mukosalen Grenzflächen, wirken sie als Trigger chronischer Entzündungsprozesse und sind an der Gewebedestruktion im Rahmen diverser Autoimmunpathologien beteiligt (2, 3, 126-128). Weiter belegen Studien eine erhöhte Frequenz von Th17-Zellen in soliden Tumoren und diskutieren eine potenzielle Schlüsselrolle dieser T-Zellpopulation in der Kanzerogenese (5).

Zur Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung wird in der folgenden Diskussion ausschließlich Bezug auf die Messergebnisse der mit PMA stimulierten Zellen genommen. Hintergrund dafür ist, dass sämtliche in die

Diskussion der vorliegenden Arbeit eingeschlossenen Studiendaten auf stimulierten Zellen beruhen und somit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet wird.

5.2.1. Th17-Zellen – OLP versus cGVHD

In der vorliegenden Studie wiesen Patienten mit OLP und cGVHD nach PMA-Stimulation signifikant höhere Anteile von IL-17A-exprimierenden Zellen an den CD3-positiven-Zellen auf als gesunde Probanden. Zudem zeigten die Patientengruppen tendenziell höhere Th17-Zellanteile verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Die Daten deuten somit an, dass es im Rahmen dieser chronisch inflammatorischen Krankheitsbilder zu einer verstärkten IL-17A-Expression kommt, die in der Pathogenese eine Rolle spielen könnte.

Der OLP gilt als eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, die sich mikroskopisch durch eine sub- und intraepitheliale Lymphozyten-Infiltration sowie durch eine vornehmlich durch zytotoxische CD8-positive T-Zellen vermittelte Degeneration basaler Keratinozyten auszeichnet (159). Obwohl die Pathogenese des OLP und die Bedeutung der verschiedenen T-Zellpopulationen noch nicht vollends verstanden ist, scheint neben einer dysregulierten lokalen Immunantwort auch eine dysregulierte systemische Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren beteiligt zu sein (159). IL-17A induziert die Expression und Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren (z. B. IL-6, TNF- α), Chemokinen und Matrix-Metalloproteinasen in diversen Zelltypen (z. B. Makrophagen, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen) und fördert so chronische Entzündungen und Autoimmunität (160). In den vergangenen Jahren analysierten verschiedene Wissenschaftler die Rolle von Th17-Zellen und des Effektorzytokins IL-17A im Rahmen des OLP. Xie et al. (161) fanden in ihren durchflusszytometrischen Analysen von peripherem Blut von OLP-Patienten signifikant höhere Th17-Zellanteile im Vergleich zu gesunden Probanden. Die Th17-Zellen kamen vermehrt in den oralen Schleimhautläsionen vor. Mittels ELISA wurden erhöhte IL-17A-Konzentrationen im Blutserum der OLP-Patienten nachgewiesen. Vereinbar mit den Resultaten von Xie et al. (161) sowie Gueiros et al. (162) traten in dem vorliegenden Projekt ebenfalls erhöhte IL-17A-Serumkonzentrationen bei OLP-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden auf. In einer kleinen Studie wurden erhöhte IL-17A Serumlevel auch bei Patienten mit kutanem Lichen planus

beschrieben (163). Die Befunde inklusive der vorliegenden Ergebnisse bekräftigen die Rolle von Th17-Zellen und IL-17A in der Pathogenese des OLP.

In der Literatur werden verschiedene Einflussfaktoren beschrieben, die die IL-17A-Konzentration im Blutserum von OLP-Patienten modulieren. Laut Wang et al. (164) weisen OLP-Patienten mit einer zusätzlichen Parodontitis signifikant höhere IL-17A Serumspiegel auf als OLP-Patienten ohne Parodontitis. Die Autoren schlossen aus den Befunden, dass sich die beiden Erkrankungen in ihrer Progression möglicherweise gegenseitig beeinflussen. Weiterhin berichteten einige Autoren von Unterschieden in der IL-17A-Serumkonzentration bei erosiven und nicht-erosiven bzw. retikulären Formen des OLP, wobei Patienten mit erosivem Subtyp höhere IL-17A Spiegel aufwiesen (161, 165). Im Vergleich zum retikulären OLP zeichnet sich die erosive Form durch eine stärkere Zerstörung einhergehend mit einer geringeren Schleimhautepitheldicke sowie klinisch ausgeprägten schmerzhaften Ulzerationen aus (166). Höhere IL-17A Serumkonzentrationen beim erosiven Subtyp unterstützen die Hypothese der entzündungsfördernden Funktion von IL-17A in der Pathogenese des OLP. Zudem scheint ein Zusammenhang zwischen der Höhe des IL-17A-Serumspiegels und dem klinischen Ausprägungsgrad zu bestehen. Inwieweit diese Aspekte die IL-17A-Serumspiegel der OLP-Patienten in der vorliegenden Arbeit beeinflusst haben, konnte aufgrund der fehlenden Zugänglichkeit zu weiteren Patientendaten nicht analysiert werden.

Die Bedeutung von Th17-Zellen wurde in den vergangenen Jahren auch für andere Autoimmunerkrankungen untersucht. Hierbei ergaben sich Hinweise, dass Th17-Zellen in die Pathogenese systemischer und organbezogener Autoimmunpathologien involviert sind. Erhöhte Anteile von Th17-Zellen wurden in Läsionen des zentralen Nervensystems, im Liquor und im peripheren Blut bei Patienten mit Multipler Sklerose gefunden. In vitro Versuche belegen zusätzlich, dass Th17-Zellen effizienter die Blut-Hirn-Schranke passierten als Th1-Zellen und entscheidend an der Neurotoxizität beteiligt sind (167). Erhöhte IL-17A-Level im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose waren mit der Expansion neutrophiler Granulozyten und Störungen der Blut-Hirn-Schranke assoziiert (168).

Auch Psoriasis-Patienten zeigten erhöhte Th17-Zellzahlen im Blut und in lokalen Hautläsionen. Die Zahl korrelierte positiv mit der Krankheitsaktivität (169, 170). Die Psoriasis löst, ähnlich wie der Lichen ruber planus, eine Interface-Dermatitis aus, was auf gemeinsame pro-inflammatorische Signalkaskaden schließen lässt (171). In der vorliegenden Studie waren keine Psoriasis-Patienten eingeschlossen. Zur Beurteilung

eventueller pathophysiologischer Gemeinsamkeiten des OLP und der Psoriasis ist eine weiterführende Studie, die die Th17-Zellfrequenzen bei Patienten mit beiden Erkrankungen gegenüberstellt, erforderlich.

Auch Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigten lokal in der Synovialflüssigkeit und im peripheren Blut erhöhte Th17-Zellzahlen. Durch die Rekrutierung von Entzündungszellen (z. B. Makrophagen, dendritische Zellen) in die betroffenen Gelenkregionen und Freisetzung pro-inflammatorischer Botenstoffe scheinen Th17-Zellen entscheidend an der Knochen- und Gelenksdestruktion beteiligt zu sein (141). In der Zusammenschau der Literaturdaten überrascht es nicht, dass die OLP-Patienten des vorliegenden Projektes erhöhte Th17-Zellfrequenzen und IL-17A Serumkonzentrationen aufwiesen. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen fungieren Th17-Zellen auch beim OLP als Entzündungsmediatoren. Eine Inhibition von IL-17A wurde bereits im Rahmen der Psoriasis-Therapie erfolgreich eingesetzt (172) und könnte auch bei OLP-Patienten eine vielversprechende Therapieoption darstellen. Aufgrund der Ähnlichkeit der cGVHD mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen und der inflammatorischen Komponente bei dieser Erkrankung wurde die Bedeutung der Th17-Zellen und die Rolle von IL-17A in diesem Kontext in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Präklinische Studien zur cGVHD mit IL-17-knock-out Mausmodellen ergaben kontroverse Resultate. Nishimori et al. (173) infundierten T-Zellen von IL-17A-knock-out Spendertieren in Mäuse, denen zuvor allogene Knochenmark transplantiert worden war, und untersuchten das Auftreten einer cGVHD. Die Empfängertiere der IL-17-defizienten Donor-T-Zellen entwickelten signifikant schwächere klinische und histopathologische Zeichen einer cGVHD in der Haut und in den Speicheldrüsen im Vergleich zu Empfängertieren von Wildtyp-Donor-T-Zellen. Laut den Versuchen von Chen et al. (174) mit einem anderen Mausmodell sind aber autoimmunvermittelte Pathologien im Sinne einer cGVHD auch in Abwesenheit von Th17-Zellen möglich und vermutlich auf eine Th1-Dominanz zurückzuführen.

Patientenstudien zur Rolle von Th17-Zellen bei cGVHD kamen zu ähnlich widersprüchlichen Ergebnissen. Dander et al. (7) fanden im Gewebe und peripheren Blut von Patienten mit aktiver cGVHD im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte Th17-Zellzahlen und erhöhte Plasmalevel für die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α . Weiter war bei einer aktiven cGVHD der Anteil verschiedener Th17-Subpopulationen erhöht und die Ratio zwischen Th17-Zellen und Treg-Zellen verändert. Dagegen fehlte bei Ratajczak et al. (8) eine Korrelation zwischen dem

relativen Th17-Zellanteil im peripheren Blut und dem Auftreten einer chronischen GVHD. Die Th17-Anteile bei gesunden Probanden und cGVHD- Patienten waren nicht signifikant verschieden.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie untersuchten Klimczak et al. (175) bei cGVHD-Patienten Gewebeproben der Mundschleimhaut, der Haut und des Gastrointestinaltrakt hinsichtlich des Vorkommens von Th17-Zellen. Die erhöhten Th17-Zellanteile in OLP-artigen Läsionen der Mundschleimhaut korrelierten mit der Symptomschwere der Erkrankung. Auch Hautbiopsien zeigten erhöhte IL-17-positive Zellzahlen; diese Zunahme war jedoch geringer ausgeprägt als in den Proben der oralen Mukosa. Die Autoren folgerten, dass IL-17A entscheidend am Entzündungsprozess und an der Gewebedestruktion der Mundschleimhaut im Rahmen der cGVHD beteiligt sein könnte.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Hypothese einer potenziellen Rolle von IL-17A-positiven Zellen im Rahmen der Pathogenese der cGVHD an der Mundschleimhaut. Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe zeigten cGVHD-Patienten einen höheren Anteil an Th17- und Th17/Th1-Zellen im peripheren Blut. Dieser Befund ist auch vereinbar mit den Ergebnissen von Dander et al. (7), die aber anders als in der vorliegenden Studie auch erhöhte IL-17A-Serumkonzentrationen bei cGVHD-Patienten detektierten. Gründe für die abweichenden Befunde könnten unterschiedliche Patientenkollektive (Konzentration auf Patienten mit Manifestationen der cGVHD an der Mundschleimhaut / keine Spezifizierung) und / oder Methoden der Zytokin-Konzentrationsmessung (Multiplex-Assay-Verfahren / ELISA) sein. Unterschiedliche Sensitivitäten der beiden Messmethoden sind nicht auszuschließen. Für valide Ergebnisse sind Studien mit größeren Patientenkollektiven erforderlich.

5.2.2. Th17/Th1-Population – OLP versus cGVHD

In dem vorliegenden Projekt bestanden keine statistisch auffälligen Unterschiede hinsichtlich der IL-17A-Expression von Gesamtlymphozyten bzw. der CD3-positiven Zellpopulation bei Patienten mit OLP und cGVHD der Mundschleimhaut. Weiter unterschieden sich die beiden Erkrankungsgruppen nicht signifikant hinsichtlich der Th17-Proportionen im peripheren Blut. Dieser Befund stützt die Annahme, dass die cGVHD an der Mundschleimhaut nicht nur klinisch, sondern auch pathophysiologische Ähnlichkeiten zu Autoimmunerkrankungen, wie dem OLP, aufweist.

Interessanterweise zeigte sich aber ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils der Th17/Th1-Zellen zwischen cGVHD- und OLP-Patienten. Die Bedeutung dieser Zellpopulation soll im Folgenden diskutiert werden.

Im Gegensatz zu den stabilen Phänotypen der Th1- und Th2-Helferzellen scheinen Th17-Zellen in der Lage zu sein, Eigenschaften anderer T-Effektorzelltypen zu akquirieren und neben IL-17A auch das Th1-typische Zytokin IFN- γ zu exprimieren (176, 177). Laut verschiedener Studien sind diese Th17/Th1-Zellen an der inflammatorischen Immunantwort im Rahmen diverser Autoimmunerkrankungen (z. B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Autoimmunarthritis, Multiple Sklerose) beteiligt (178-180). Th17/Th1-Zellen können B-Zellen zur Antikörper-Produktion anregen und unterliegen weniger stark der Regulation durch Treg (152). Die Fähigkeit zur Koexpression von IL-17A und IFN- γ scheint damit für die Th17-Pathogenität im Rahmen von Autoimmunerkrankungen eine große Bedeutung zu haben.

Im vorliegenden Projekt war der Anteil der Th17/Th1-Zellpopulation bei cGVHD-Patienten gegenüber gesunden Probanden erhöht. Dieser Befund steht im Einklang mit den Resultaten von Dander et al. (7). Auch andere Studien berichteten, dass ein Teil der IL-17-positiven T-Lymphozyten nach allogener HSCT zusätzlich das pro-inflammatorische Zytokin IFN- γ exprimierte und damit die Fähigkeit besaß, in einen Th1-Phänotyp zu differenzieren (181) (182). Gartlan et al. 2017 (181) zeigten in einem Mausmodell zur allogenen HSCT, dass sich die Th17/Th1-Population, im Vergleich zu IFN- γ -negativen Th17-Zellen, durch eine signifikant höhere Expression von GM-CSF und TNF- α auszeichnet. Entsprechend charakterisierten die Autoren die Th17/Th1-Subpopulation als pro-inflammatorischen Phänotyp der Th17-Zellen. Damit könnte die Th17-Plastizität, neben der klonalen Expansion der Th17-Zellen, ein weiterer Mechanismus sein, die chronische Inflammation im Rahmen der cGVHD aufrechtzuerhalten. Zur Validierung der Befunde sind weitere Studien erforderlich.

Entgegen den Erwartungen zeigten OLP-Patienten im Vergleich zu cGVHD-Patienten einen signifikant geringeren Anteil an Th17/Th1-Zellen. Möglicherweise spielt diese Subpopulation der Th17-Zellen im inflammatorischen Geschehen des OLP, anders als bei der cGVHD, eine eher untergeordnete Rolle. Derzeit fehlen weitere Studien zum Vorkommen von Th17/Th1-Zellen bei cGVHD- und OLP-Patienten. Laut Xie et al. (161) ist aber die Th17/Th1-Population bei OLP-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht. Dieser Befund konnte im vorliegenden Projekt nicht bestätigt werden. Ein möglicher Grund für die abweichenden Ergebnisse ist das kleinere Patientenkollektiv in der vorliegenden Studie. Weitere Studien zur Bedeutung

von Th17/Th1-Zellen im Rahmen des OLP und der cGVHD an der Mundschleimhaut sind wünschenswert.

5.2.3. Th17-Zellen und IL-17A bei Leukoplakie

Im vorliegenden Projekt konnte erstmals gezeigt werden, dass Leukoplakie-Patienten höhere Th17-Zellanteile im peripheren Blut aufweisen als gesunde Kontrollen. Darüber hinaus waren auch die Serumkonzentrationen für die Th17-Zytokine IL-17A, IL-17F und IL-21 erhöht. Diese Befunde legen eine Involvierung von Th17-Zellen in die Pathogenese der Leukoplakie nahe.

Bei der Analyse der Zellpopulationen zeigten Leukoplakie- und OLP-Patienten vergleichbare Anteile CD4-positiver, CD4-negativer und Treg-Zellen. Auch die IL-17A-Expression der Gesamtymphozyten sowie die Anteile der Th17/Th1-Population waren vergleichbar. Der Anteil der Th17-Population war bei Leukoplakie-Patienten im Vergleich zu OLP-Patienten zwar geringfügig höher; dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht auffällig. Auch die IL-17A-Konzentrationen im Blutserum waren bei Leukoplakie- und OLP-Patienten vergleichbar. Insgesamt lassen die Befunde Gemeinsamkeiten auf pathophysiologischer Ebene bei den beiden Krankheitsentitäten vermuten.

Die Th17-Zellanteile und die IL-17A-Serumkonzentrationen lagen bei Leukoplakie- und OLP-Patienten statistisch signifikant höher als bei Patienten mit oralem SCC. Möglicherweise ist ein Absinken der Th17-Zellanteile im peripheren Blut ein Hinweis auf eine maligne Progression dieser präkanzerösen Läsionen. Die Ergebnisse der Studie von Woodford et al. (183) stützen diese Hypothese. Die Autoren fanden in Gewebeproben sowie im peripheren Blut von Patienten mit oralen präkanzerösen Schleimhautläsionen erhöhte IL-17A Konzentrationen im Vergleich zu Patienten mit SCC im Kopf-Hals-Bereich (head and neck spinocellular carcinoma, HNSCC) und zu gesunden Kontrollen. Außerdem wiesen sie, im Vergleich zu Tieren mit HNSCC und gesunden Kontrolltieren, erhöhte Th17-Zellanteile in regionären Lymphknoten von Mäusen mit präkanzerösen Läsionen nach. Als Mechanismus für die verstärkte Th17-Differenzierung in den prämaligen Läsionen wurde eine erhöhte IL-6- und IL-23-Expression identifiziert, die essenziell für die Entwicklung und Stabilisierung des Th17-Phänotyps ist (183). Limitierend muss erwähnt werden, dass aus der Studie von Woodford et al. nicht hervorgeht, ob es sich bei den untersuchten präkanzerösen

Läsionen der Mundschleimhaut ausschließlich um Leukoplakien handelte oder ob auch andere Läsionen (z. B. OLP) eingeschlossen wurden.

5.2.4. Th17-Zellen und IL-17A beim oralen Plattenepithelkarzinom

Die Rolle von Th17-Zellen in der Tumorphathogenese wird kontrovers diskutiert. Laut einiger Forschergruppen kommen Th17-Zellen vermehrt in der Zirkulation von Patienten mit hepatozellulären Karzinomen, Nierenzell- und Pankreas-Karzinomen vor (184-186). In einer Studie zeigten Patienten mit Non-Hodgkin Lymphom dagegen erniedrigte Th17-Anteile im peripheren Blut (187). In einer weiteren Arbeit zum Ovarial-Karzinom wiesen die Patienten im peripheren Blut mit Gesunden vergleichbare Th17-Anteile auf, zeigten aber eine Akkumulation im Tumorgewebe (188). Auch zur Funktion der Th17-Zellen im Rahmen der Kanzerogenese fehlen einheitliche Befunde. Während einige Arbeiten die Zellen als pro-inflammatorisch und wachstumsfördernd charakterisierten, fanden andere Forscher einen tumorlimitierenden Effekt (132-136). Die Befunde deuten auf tumorspezifische Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens und der Rolle von Th17-Zellen hin.

In der vorliegenden Dissertation wurde das Vorkommen von Th17-Zellen und IL-17A im peripheren Blut von Patienten mit oralem SCC untersucht. SSC-Patienten zeigten im Vergleich zu Patienten mit OLP, Leukoplakie, cGVHD und zur gesunden Kontrollgruppe geringere Th17-Zellanteile. Die IL-17A-Serumkonzentrationen waren vergleichbar mit denen der gesunden Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu bisherigen Literaturdaten. Gaur et al. (189) fanden im peripheren Blut von Patienten mit oralem SCC im Vergleich zu gesunden Probanden höhere Anteile an Th17-Zellen und an Tc17-Zellen (CD8-/IL-17-positiv). Wei et al. (190) und Li et al. (191) beschrieben erhöhte IL-17A-Konzentrationen im Blutserum bei Patienten mit SCC der Zunge bzw. des Kopf-Halsbereiches. Angemerkt werden sollte, dass im Vergleich zu diesen Studien in der vorliegenden Arbeit nur ein kleines Kollektiv an SCC-Patienten untersucht wurde (n=6 versus n=45 (190), n=76 (191), n=67 (192)). Zudem befanden sich die Patienten der vorliegenden Studie in einem weit fortgeschrittenen Tumorstadium (T4, Lymphknoten-Metastasen, zum Teil Fernmetastasen), während in den Vergleichsstudien auch Patienten in frühen Tumorstadien (T1, T2) eingeschlossen wurden. Möglicherweise beeinflusst das Tumorstadium die Th17-Zellfrequenzen im peripheren Blut von Patienten mit oralem

SCC. In der Literatur ist die Datenlage nicht eindeutig. Gaur et al. (189) beschrieben niedrigere Th17-Anteile bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien und Lymphknoten-Metastasen verglichen mit Patienten mit frühen Stadien bzw. fehlender Lymphknoten-Affektion. Fortgeschrittene Stadien waren zudem mit einer Erhöhung des Treg-Zellanteils assoziiert. Dagegen fanden Li et al. (191) einen Anstieg der Th17-Anteile und der IL-17A-Serumlevel bei Zunahme des Tumorstadiums und bei der Beteiligung der Lymphknoten. In einer weiteren, kürzlich erschienenen Studie fehlte hingegen eine Assoziation zwischen den Th17-Anteilen im peripheren Blut und dem TNM-Stadium (192).

Möglicherweise sind aber auch methodische Unterschiede zwischen den Studien von Li et al. (191) bzw. Wei et al. (190) und der vorliegenden Arbeit (ELISA vs. bead-basiertes Multiplex-Assay-Verfahren) für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der IL-17A-Serumkonzentration verantwortlich.

Zudem könnten die erniedrigten Th17-Anteile im Blutserum der SCC-Patienten in der vorliegenden Arbeit auch Ausdruck einer beeinträchtigten adaptiven Immunabwehr im Rahmen des Tumorgeschehens sein. Laut Literatur kommt es beim SCC zur Freisetzung immunsuppressiver Mediatoren, die es dem Tumor ermöglichen, einer effektiven Immunantwort zu entgehen (193). Diese Hypothese wäre vereinbar mit der Beobachtung, dass die vorliegenden Patienten mit oralem SCC tendenziell erniedrigte CD4-positive bzw. CD4-negative T-Zellpopulationen im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten. Diese Daten stehen im Einklang mit den Resultaten von Gaur et al. (189).

Die potenzielle Beteiligung von Th17-Zellen an der Tumorprogression und der Metastasierung im Rahmen des oralen SCC sollte in weiteren Studien geklärt werden.

5.2.5. Alternative IL-17A-Produzenten beim oralen SCC und Th17/Th1-Zellen

Interessanterweise zeigten in der vorliegenden Studie die Gesamtlmphozyten und die CD3-positiven Lymphozyten bei den SCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und den übrigen Krankheitsgruppen einen tendenziell erhöhten Anteil IL-17A-exprimierender Zellen. Da sich dieser Befund nicht durch einen erhöhten Anteil

der Th17-Zellen erklären lässt, deutet er auf die Existenz weiterer IL-17A produzierender Zellpopulationen hin.

In der Literatur wird eine IL-17A-Expression in $\gamma\delta$ T-Zellen (194), B-Zellen, Makrophagen (195), neutrophilen Granulozyten (196), Endothelzellen, Stromazellen und Tumorzellen (197) beschrieben. Die potenzielle Bedeutung solcher IL-17A-exprimierender Zellen für die Tumorphagenese zeigten Mausmodelle zum Mamma-, Ovarial- und Leberkarzinom, in denen eine Depletion bzw. Blockade der $\gamma\delta$ T-Zellen die Tumorprogression unterdrückte (198-200). Laut Punt et al. (196) wird in soliden Tumoren (z. B. Lungen-, Colon-Karzinom, SCC des Kopf-Hals-Bereiches) IL-17A hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten bzw. Mastzellen und nicht von Th17-Zellen sezerniert. Zur Aufklärung der Bedeutung der IL-17A-Expression außerhalb der Th17-Population beim oralen SCC sind weitere Studien erforderlich.

Bei den möglichen Mechanismen der Tumorkontrolle durch Th17-Zellen wird auch die Differenzierung in Th17/Th1-Zellen diskutiert (135). In der vorliegenden Forschungsarbeit zeigten SCC-Patienten im Vergleich zu den übrigen Erkrankungsgruppen und zur gesunden Kontrollgruppe erhöhte Th17/Th1-Zellanteile im peripheren Blut. Diese Subpopulation der Th17-Zellen exprimiert neben IL-17A auch das Th1-Zytokin IFN- γ . Auch Tang et al. (192) fanden signifikant höhere Th17/Th1-Anteile im peripheren Blut von Patienten mit Larynx-SCC im Vergleich zu gesunden Probanden. Th17/Th1-Zellen wurden auch bei anderen Tumoren, wie dem Ovarial-Karzinom, beschrieben. Die Koproduktion von IL-17A und IFN- γ wirkte in den Tumorzellen synergistisch und induzierte die Freisetzung der Chemokine C-X-C-Motiv-Chemokin-Ligand (CXCL) 9 und 10, wodurch vermehrt zytotoxische CD8-positive T-Zellen ins Tumorgewebe rekrutiert wurden (201). Eine weitere Studie wies Tumorantigen-spezifische Th17/Th1-Zellen bei Patienten mit Lungen-Karzinomen nach (202). In einem B16 Melanom-Mausmodell inhibierte die Koproduktion von IL-17A und IFN- γ durch Th17/Th1-Zellen das Tumorstadium, während IFN- γ -negative Th17-Zellen die Tumorprogression nicht begrenzten (135). Ähnlich wie IL-17A soll IFN- γ im Rahmen der Tumorphagenese über die Hemmung der Angiogenese und die Förderung zytotoxischer Effektorfunktionen verschiedener Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killerzellen, CD8-positive T-Zellen) anti-proliferativ und pro-apoptotisch wirken (203, 204).

Die Rolle der Th17/Th1-Population in der Pathogenese des oralen SCC kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Die Präsenz dieser Zellpopulation im peripheren Blut bei Patienten mit oralem SCC lässt eine Beteiligung der Zellen an der

Tumorpathogenese vermuten. Ob Th17/Th1-Zellen, ähnlich wie in anderen Entitäten, beim oralen SCC inhibierend wirken, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5.3. Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von Th17-Zellen und IL-17A in der Pathogenese der cGVHD und der klinisch verwandten Krankheitsbilder OLP, Leukoplakie und SCC der Mundschleimhaut zu evaluieren. Das vermehrte Vorkommen von Th17-Zellen in der Zirkulation von Patienten mit OLP, Leukoplakie und cGVHD macht eine Beteiligung dieser Zellpopulation am chronisch inflammatorischen Krankheitsgeschehen wahrscheinlich. Th17-Zellen haben auch für die Pathogenese anderer Autoimmunerkrankungen eine zentrale Bedeutung. Für einige Autoimmunerkrankungen sind bereits Medikamente zur Blockade von Th17-Zellen bzw. des IL-17-Signalwegs zugelassen oder befinden sich in klinischer Erprobung. Die monoklonalen Antikörper Secukinumab, Ustekinumab und Guselkumab werden in der Therapie der Psoriasis vulgaris und der Psoriasis-Arthritis eingesetzt (205-207). Bei Secukinumab handelt es sich um einen IL-17A-spezifischen neutralisierenden Antikörper. Ustekinumab blockiert die p40-Untereinheit der Zytokine IL-12 und IL-23, die wesentlich für die Differenzierung der Th17-Zellen sind. Auch Guselkumab blockiert IL-23 (208). In zukünftigen Studien sollte evaluiert werden, ob solche Therapieansätze auch zur Behandlung der cGVHD, des OLP und der Leukoplakie geeignet sind. Erste Studien hierzu laufen bereits: In einer 2019 veröffentlichten Studie zu den Auswirkungen einer IL-17A-Blockade oder Inhibition der Th17/Tc17-Zellexpansion mit Secukinumab, Guselkumab bzw. Ustekinumab zeigten Lichen ruber planus Patienten (n=5) eine deutliche klinische Verbesserung bis hin zur Abheilung der mukokutanen lichenoiden Läsionen (208). Aufgrund des kleinen Patientenkollektivs sollten diese Ergebnisse in größeren Studien verifiziert werden. Weiter sollte die Rolle von Th17-Zellen und Th17/Th1-Zellen in der Pathogenese des oralen SCC weiter erforscht werden. Die Regulation der Tumorprogression und Metastasierung durch Th17-Zellen und die Bedeutung der Konversion in den Th17/Th1-Phänotyp in diesem Kontext ist aktuell unklar. In der vorliegenden Studie zeigten SCC-Patienten im Gegensatz zu Patienten mit chronisch inflammatorischen Krankheitsbildern (OLP, Leukoplakie, cGVHD) erhöhte Th17/Th1-Zellanteile im peripheren Blut. Möglicherweise könnte diese Zellpopulation als Biomarker zur

Differenzierung zwischen SCC und seinen Präkanzerosen (OLP, Leukoplakie) sowie der cGVHD dienen. Sollte sich die tumorsuppressive Funktion der Th17/Th1-Population beim oralen SCC bestätigen, wäre die Förderung dieser Zellpopulation eine attraktive Option für eine tumorspezifische Immuntherapie.

6. Zusammenfassung

Interleukin (IL) 17A sezernierende T-Helferzellen Typ 17 (Th17-Zellen) sind an chronisch inflammatorischen Prozessen, an der Genese von Autoimmunerkrankungen und potenziell auch an der Kanzerogenese beteiligt. Die bei der chronischen graft-versus-host disease (cGVHD) im Rahmen einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) auftretenden Abstoßungssyndrome ähneln bestimmten Autoimmunerkrankungen.

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Analyse der Bedeutung von Th17-Zellen und IL-17A für die Pathogenese der cGVHD, phänotypisch ähnlicher Krankheitsbilder (Leukoplakie, oraler Lichen ruber planus (OLP)) und des oralen Plattenepithelkarzinoms (SCC). Dazu wurden die Lymphozyten-Populationen in den Erkrankungsgruppen und in gesunden Probanden anhand spezifischer Oberflächenmarker und ihrer IL-17A- und Interferon-(IFN)- γ -Expression (nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)) durchflusszytometrisch verglichen. Weiter wurde das Zytokinprofil im Blutserum der Untersuchungsgruppen mittels bead-basiertem Immunoassay Verfahren bestimmt.

Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten Patienten mit OLP, Leukoplakie und cGVHD größere Th17-Zellanteile im peripheren Blut. OLP- und Leukoplakie-Patienten Gruppen wiesen zudem höhere IL-17A-Konzentrationen im Blutserum auf als gesunde Probanden, während sich die Serumlevel der cGVHD- und SCC-Patienten nicht von gesunden Probanden unterschieden. Patienten mit cGVHD zeigten, im Vergleich zu gesunden Probanden und OLP-Patienten, einen größeren Anteil an Th17/Th1-Zellen. Patienten mit oralem SCC unterschieden sich durch niedrige Th17-Zellanteile deutlich von den übrigen Erkrankungsgruppen und den gesunden Kontrollen. Aufgrund der hohen IL-17A-Expression der Gesamtlymphozyten und der CD3-positiven-Lymphozyten fungieren bei SCC-Patienten möglicherweise andere Zellpopulationen als die Th17-Zellen als IL-17A-Hauptproduzenten. Weiterhin unterschied sich die SCC-Gruppe durch hohe Th17/Th1-Zellanteile von den Vergleichsgruppen.

Die Befunde legen nahe, dass erhöhte IL-17A-Konzentrationen eine Rolle in der Pathogenese der untersuchten chronisch inflammatorischen Krankheitsbilder (OLP, Leukoplakie, cGVHD) spielen. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob sich IL-17A als therapeutisches Target für diese Erkrankungen eignet. Weiter scheinen Th17/Th1-Zellen an der oralen Manifestation der cGVHD und an der Pathogenese des oralen SCC beteiligt zu sein. Diese Zellpopulation ist daher potenziell als Zielstruktur für eine tumorspezifische Immuntherapie nutzbar.

7. Literatur

1. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133-41.
2. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev.* 2008;226:160-71.
3. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology.* 2010;130(5):1373-83.
4. Shah K, Lee WW, Lee SH, Kim SH, Kang SW, Craft J, et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R53.
5. Chang SH. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer. *Arch Pharm Res.* 2019;42(7):549-59.
6. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet (London, England).* 2009;373(9674):1550-61.
7. Dander E, Balduzzi A, Zappa G, Lucchini G, Perseghin P, Andrè V, et al. Interleukin-17-producing T-helper cells as new potential player mediating graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation.* 2009;88(11):1261-72.
8. Ratajczak P, Janin A, Peffault de Latour R, Leboeuf C, Desveaux A, Keyvanfar K, et al. Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood.* 2010;116(7):1165-71.
9. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, Corbacioglu S, Duarte R, et al. The EBMT activity survey on hematopoietic-cell transplantation and cellular therapy 2018: CAR-T's come into focus. *Bone Marrow Transplantation.* 2020.
10. Juric MK, Ghimire S, Ogonek J, Weissinger EM, Holler E, van Rood JJ, et al. Milestones of Hematopoietic Stem Cell Transplantation - From First Human Studies to Current Developments. *Frontiers in immunology.* 2016;7:470.
11. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *The New England journal of medicine.* 2004;351(22):2276-85.
12. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *The New England journal of medicine.* 2004;351(22):2265-75.
13. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75(3):555-62.
14. Storb R, Yu C, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, et al. Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood.* 1997;89(8):3048-54.
15. Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *The New England journal of medicine.* 2007;357(15):1472-5.
16. Barrett AJ, Savani BN. Stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning regimens: a review of ten years experience with new transplant concepts and new therapeutic agents. *Leukemia.* 2006;20(10):1661-72.
17. Scott BL, Pasquini MC, Logan BR, Wu J, Devine SM, Porter DL, et al. Myeloablative Versus Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2017;35(11):1154-61.
18. Cornelissen JJ, Gratwohl A, Schlenk RF, Sierra J, Bornhauser M, Juliusson G, et al. The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nature reviews Clinical oncology.* 2012;9(10):579-90.
19. Pidala J. Graft-vs-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center.* 2011;18(4):268-76.
20. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biology of blood and marrow*

- transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation. 2015;21(3):389-401.e1.
21. Pidala J, Vogelsang G, Martin P, Chai X, Storer B, Pavletic S, et al. Overlap subtype of chronic graft-versus-host disease is associated with an adverse prognosis, functional impairment, and inferior patient-reported outcomes: a Chronic Graft-versus-Host Disease Consortium study. *Haematologica*. 2012;97(3):451-8.
 22. Flowers ME, Martin PJ. How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2015;125(4):606-15.
 23. Martin PJ, Counts GW, Jr., Appelbaum FR, Lee SJ, Sanders JE, Deeg HJ, et al. Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(6):1011-6.
 24. Lee SJ, Flowers ME. Recognizing and managing chronic graft-versus-host disease. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2008:134-41.
 25. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(2):266-74.
 26. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(22):5074-87.
 27. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *The New England journal of medicine*. 2012;367(16):1487-96.
 28. Sohn SK, Kim DH, Baek JH, Kim JG, Lee KB, Lee KH, et al. Risk-factor analysis for predicting progressive- or quiescent-type chronic graft-versus-host disease in a patient cohort with a history of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(7):699-708.
 29. Flowers ME, Inamoto Y, Carpenter PA, Lee SJ, Kiem HP, Petersdorf EW, et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. *Blood*. 2011;117(11):3214-9.
 30. MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood*. 2017;129(1):13-21.
 31. Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(6):443-58.
 32. Imanguli MM, Alevizos I, Brown R, Pavletic SZ, Atkinson JC. Oral graft-versus-host disease. *Oral diseases*. 2008;14(5):396-412.
 33. Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Current opinion in hematology*. 2006;13(6):426-35.
 34. Fassil H, Bassim CW, Mays J, Edwards D, Baird K, Steinberg SM, et al. Oral chronic graft-vs.-host disease characterization using the NIH scale. *Journal of dental research*. 2012;91(7 Suppl):45s-51s.
 35. Imanguli MM, Atkinson JC, Mitchell SA, Avila DN, Bishop RJ, Cowen EW, et al. Salivary gland involvement in chronic graft-versus-host disease: prevalence, clinical significance, and recommendations for evaluation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(10):1362-9.
 36. Fall-Dickson JM, Mitchell SA, Marden S, Ramsay ES, Guadagnini JP, Wu T, et al. Oral symptom intensity, health-related quality of life, and correlative salivary cytokines in adult survivors of hematopoietic stem cell transplantation with oral chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(7):948-56.

37. Meier JK, Wolff D, Pavletic S, Greinix H, Gosau M, Bertz H, et al. Oral chronic graft-versus-host disease: report from the International Consensus Conference on clinical practice in cGVHD. *Clinical oral investigations*. 2011;15(2):127-39.
38. Mawardi H, Elad S, Correa ME, Stevenson K, Woo SB, Almazrooa S, et al. Oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: clinical presentation and treatment outcomes. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46(6):884-91.
39. Montebugnoli L, Gissi DB, Marchetti C, Foschini MP. Multiple squamous cell carcinomas of the oral cavity in a young patient with graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2011;40(5):556-8.
40. Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn JY, et al. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood*. 2002;100(2):406-14.
41. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005;11(12):945-56.
42. Wolff D, Bertz H, Greinix H, Lawitschka A, Halter J, Holler E. Klinische Versorgung der chronischen Graft-versus-Host-Krankheit. *Dtsch Arztebl International*. 2011;108(43):732-40.
43. Sabry W, Le Blanc R, Labbe AC, Sauvageau G, Couban S, Kiss T, et al. Graft-versus-host disease prophylaxis with tacrolimus and mycophenolate mofetil in HLA-matched nonmyeloablative transplant recipients is associated with very low incidence of GVHD and nonrelapse mortality. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2009;15(8):919-29.
44. Lai YR, Chen YH, Hu DM, Jiang M, Liu QF, Liu L, et al. Multicenter phase II study of a combination of cyclosporine a, methotrexate and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis: results of the Chinese Bone Marrow Transplant Cooperative Group (CBMTCG). *Journal of hematology & oncology*. 2014;7:59.
45. Kharfan-Dabaja M, Mhaskar R, Reljic T, Pidala J, Perkins JB, Djulbegovic B, et al. Mycophenolate mofetil versus methotrexate for prevention of graft-versus-host disease in people receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014(7):Cd010280.
46. Hamilton BK, Rybicki L, Dean R, Majhail NS, Haddad H, Abounader D, et al. Cyclosporine in combination with mycophenolate mofetil versus methotrexate for graft versus host disease prevention in myeloablative HLA-identical sibling donor allogeneic hematopoietic cell transplantation. *American journal of hematology*. 2015;90(2):144-8.
47. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, et al. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. *The New England journal of medicine*. 1986;314(12):729-35.
48. Perkins J, Field T, Kim J, Kharfan-Dabaja MA, Fernandez H, Ayala E, et al. A randomized phase II trial comparing tacrolimus and mycophenolate mofetil to tacrolimus and methotrexate for acute graft-versus-host disease prophylaxis. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(7):937-47.
49. Cutler C, Logan B, Nakamura R, Johnston L, Choi S, Porter D, et al. Tacrolimus/sirolimus vs tacrolimus/methotrexate as GVHD prophylaxis after matched, related donor allogeneic HCT. *Blood*. 2014;124(8):1372-7.
50. Kottaridis PD, Milligan DW, Chopra R, Chakraverty RK, Chakrabarti S, Robinson S, et al. In vivo CAMPATH-1H prevents graft-versus-host disease following nonmyeloablative stem cell transplantation. *Blood*. 2000;96(7):2419-25.
51. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, et al. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2009;10(9):855-64.

52. Finke J, Schmoor C, Bethge WA, Ottinger H, Stelljes M, Volin L, et al. Long-term outcomes after standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-human-T-lymphocyte immunoglobulin in haemopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: final results of a randomised controlled trial. *The Lancet Haematology*. 2017;4(6):e293-e301.
53. Baron F, Galimard JE, Labopin M, Yakoub-Agha I, Niittyvuopio R, Kroger N, et al. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with anti-thymocyte globulin versus allogeneic bone marrow transplantation without anti-thymocyte globulin. *Haematologica*. 2020;105(4):1138-46.
54. Penack O, Marchetti M, Ruutu T, Aljurf M, Bacigalupo A, Bonifazi F, et al. Prophylaxis and management of graft versus host disease after stem-cell transplantation for haematological malignancies: updated consensus recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *The Lancet Haematology*. 2020;7(2):e157-e67.
55. Sarantopoulos S, Cardones AR, Sullivan KM. How I treat refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2019;133(11):1191-200.
56. Schneiderman J. Extracorporeal photopheresis: cellular therapy for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2017;2017(1):639-44.
57. Kumar S, Mohammadpour H, Cao X. Targeting Cytokines in GVHD Therapy. *Journal of immunology research and therapy*. 2017;2(1):90-9.
58. Le Cleach L, Chosidow O. Clinical practice. Lichen planus. *The New England journal of medicine*. 2012;366(8):723-32.
59. Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral diseases*. 2005;11(6):338-49.
60. Parashar P. Oral lichen planus. *Otolaryngologic clinics of North America*. 2011;44(1):89-107, vi.
61. Farhi D, Dupin N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. *Clinics in dermatology*. 2010;28(1):100-8.
62. Carrozzo M, Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Arduino P, Brocchetto R, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;122(1):87-94.
63. Lodi G, Giuliani M, Majorana A, Sardella A, Bez C, Demarosi F, et al. Lichen planus and hepatitis C virus: a multicentre study of patients with oral lesions and a systematic review. *The British journal of dermatology*. 2004;151(6):1172-81.
64. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *Journal of oral science*. 2007;49(2):89-106.
65. Wagner G, Rose C, Sachse MM. Clinical variants of lichen planus. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013;11(4):309-19.
66. Alrashdan MS, Cirillo N, McCullough M. Oral lichen planus: a literature review and update. *Archives of dermatological research*. 2016;308(8):539-51.
67. Cox T, Woodhead J, Nelson BL. Reticular Oral Lichen Planus. *Head and neck pathology*. 2020;14(1):192-4.
68. Nosratzahi T. Oral Lichen Planus: an Overview of Potential Risk Factors, Biomarkers and Treatments. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2018;19(5):1161-7.
69. van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(9):507-12.
70. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2005;100(1):40-51.
71. Thongprasom K, Luengvisut P, Wongwatanakij A, Boonjatturus C. Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolonone acetonide: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(6):315-22.

72. Carbone M, Goss E, Carrozzo M, Castellano S, Conrotto D, Broccoletti R, et al. Systemic and topical corticosteroid treatment of oral lichen planus: a comparative study with long-term follow-up. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(6):323-9.
73. Sun SL, Liu JJ, Zhong B, Wang JK, Jin X, Xu H, et al. Topical calcineurin inhibitors in the treatment of oral lichen planus: a systematic review and meta-analysis. *The British journal of dermatology.* 2019;181(6):1166-76.
74. van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2003;96(2):164-71.
75. Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *Journal of the American Dental Association (1939).* 2014;145(1):45-56.
76. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M, et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral oncology.* 2004;40(1):77-83.
77. Lo Muzio L, Mignogna MD, Favia G, Procaccini M, Testa NF, Bucci E. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. *Oral oncology.* 1998;34(4):239-46.
78. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(10):575-80.
79. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral oncology.* 2003;39(8):770-80.
80. Granero Fernandez M, Lopez-Jornet P. Association between smoking, glycaemia, blood lipoproteins and risk of oral leukoplakia. *Aust Dent J.* 2017;62(1):47-51.
81. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(4):188-96.
82. Farah CS, Woo SB, Zain RB, Sklavounou A, McCullough MJ, Lingen M. Oral cancer and oral potentially malignant disorders. *Int J Dent.* 2014;2014:853479.
83. van der Waal I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20(6):e685-92.
84. Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J, et al. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(7):379-82.
85. Villa A, Woo SB. Leukoplakia-A Diagnostic and Management Algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017;75(4):723-34.
86. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* 2008;37(2):63-9.
87. Chau L, Jabara JT, Lai W, Svider PF, Warner BM, Lin HS, et al. Topical agents for oral cancer chemoprevention: A systematic review of the literature. *Oral oncology.* 2017;67:153-9.
88. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology.* 2009;45(4-5):309-16.
89. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral oncology.* 2010;46(6):423-5.
90. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(9):11884-94.
91. Sacco AG, Cohen EE. Current Treatment Options for Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2015;33(29):3305-13.
92. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010;2:9.
93. Reidy J, McHugh E, Stassen LF. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *Surgeon.* 2011;9(5):278-83.

94. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2008;122(1):155-64.
95. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet (London, England)*. 2008;371(9625):1695-709.
96. Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). *Int J Oncol*. 2014;44(6):1799-805.
97. Wittekind C. TNM Klassifikation Maligner Tumoren : Korrigierter Nachdruck 2020 Mit Allen Ergänzungen der UICC Aus Den Jahren 2017 Bis 2019. Newark, GERMANY: John Wiley & Sons, Incorporated; 2020.
98. Fortin A, Couture C, Doucet R, Albert M, Allard J, Tetu B. Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(21):4107-16.
99. AWMF. S3- Leitlinie Mundhöhlenkarzinom Version 2.0 - 2012: Leitlinienprogramm Onkologie 2012 [updated 2012. Available from: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/007-100OL.html> Stand: 16.06.2020, 12:40 Uhr
100. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2014;19(3):423-30.
101. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet (London, England)*. 2001;357(9270):1777-89.
102. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1910-4.
103. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003;198(12):1951-7.
104. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1123-32.
105. Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*. 1995;155(12):5483-6.
106. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1999;42(5):963-70.
107. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183(6):2593-603.
108. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB. IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells. *J Immunol*. 1999;162(3):1246-51.
109. Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(3):164-74.
110. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121-33.
111. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*. 2013;121(13):2402-14.
112. Cargill M, Schrodi SJ, Chang M, Garcia VE, Brandon R, Callis KP, et al. A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes. *Am J Hum Genet*. 2007;80(2):273-90.
113. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201(2):233-40.

114. Codarri L, Gyölvéshi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol.* 2011;12(6):560-7.
115. Croxford AL, Mair F, Becher B. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2012;42(9):2263-73.
116. Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(4).
117. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(2):155-74.
118. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, et al. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol.* 2006;177(1):36-9.
119. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998;160(7):3513-21.
120. Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötvall J, Sjöstrand M, Gruenert DC, et al. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol.* 1999;162(4):2347-52.
121. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001;194(4):519-27.
122. Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2009;119(7):1899-909.
123. Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM, Chu HW. IL-23-dependent IL-17 production is essential in neutrophil recruitment and activity in mouse lung defense against respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Microbes Infect.* 2007;9(1):78-86.
124. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature.* 2008;452(7188):773-6.
125. de Beaucoudrey L, Puel A, Filipe-Santos O, Cobat A, Ghandil P, Chrabieh M, et al. Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. *J Exp Med.* 2008;205(7):1543-50.
126. Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One.* 2012;7(4):e31000.
127. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2003;52(1):65-70.
128. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010;185(3):1959-67.
129. Wang HH, Dai YQ, Qiu W, Lu ZQ, Peng FH, Wang YG, et al. Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci.* 2011;18(10):1313-7.
130. Qian S, Golubnitschaja O, Zhan X. Chronic inflammation: key player and biomarker-set to predict and prevent cancer development and progression based on individualized patient profiles. *Epma j.* 2019;10(4):365-81.
131. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-99.
132. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood.* 2003;101(7):2620-7.
133. Wang R, Lou X, Feng G, Chen J, Zhu L, Liu X, et al. IL-17A-stimulated endothelial fatty acid β -oxidation promotes tumor angiogenesis. *Life Sci.* 2019;229:46-56.
134. Hu Z, Luo D, Wang D, Ma L, Zhao Y, Li L. IL-17 Activates the IL-6/STAT3 Signal Pathway in the Proliferation of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(6):2379-90.
135. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood.* 2008;112(2):362-73.

136. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity*. 2009;31(5):787-98.
137. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*. 2007;27(5):786-800.
138. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8.
139. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.
140. Littman DR, Rudensky AY. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010;140(6):845-58.
141. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 2014;13(6):668-77.
142. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. The deviated balance between regulatory T cell and Th17 in autoimmunity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012;34(5):727-39.
143. Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wang LL. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32(9):2731-6.
144. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. *Int J Mol Sci*. 2018;19(3).
145. Fasching P, Stradner M, Graninger W, Dejaco C, Fessler J. Therapeutic Potential of Targeting the Th17/Treg Axis in Autoimmune Disorders. *Molecules*. 2017;22(1).
146. Noble PB, Cutts JH. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J*. 1967;8(5):110-1.
147. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem*. 2002;48(10):1819-27.
148. Robinson JP, Roederer M. HISTORY OF SCIENCE. Flow cytometry strikes gold. *Science*. 2015;350(6262):739-40.
149. Galbraith D. Flow cytometry and cell sorting: the next generation. *Methods*. 2012;57(3):249-50.
150. Olsen I, Sollid LM. Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells. *J Immunol Methods*. 2013;390(1-2):106-12.
151. Ai W, Li H, Song N, Li L, Chen H. Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):3834-42.
152. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204(8):1849-61.
153. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):598-604.
154. Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol*. 2012;13(10):925-31.
155. Holtmann H, Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften*. 1995;82(4):178-87.
156. Keustermans GC, Hoeks SB, Meerding JM, Prakken BJ, de Jager W. Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods*. 2013;61(1):10-7.
157. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008;63(8):879-84.
158. LEGENDplex Multi-Analyte Flow Assay Kit www.biolegend.com: BioLegend; [Available from: www.biolegend.com. Stand: 20.06.2020, 13:00 Uhr
159. Roopashree MR, Gondhalekar RV, Shashikanth MC, George J, Thippeswamy SH, Shukla A. Pathogenesis of oral lichen planus--a review. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(10):729-34.

160. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010;129(3):311-21.
161. Xie S, Ding L, Xiong Z, Zhu S. Implications of Th1 and Th17 cells in pathogenesis of oral lichen planus. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2012;32(3):451-7.
162. Gueiros LA, Araújo T, Souza T, Vieira CL, Gomez RS, Almeida OP, et al. IL17A polymorphism and elevated IL17A serum levels are associated with oral lichen planus. *Oral diseases*. 2018;24(3):377-83.
163. Shaker O, Hassan AS. Possible role of interleukin-17 in the pathogenesis of lichen planus. *The British journal of dermatology*. 2012;166(6):1367-8.
164. Wang H, Luo Z, Lei L, Sun Z, Zhou M, Dan H, et al. Interaction between oral lichen planus and chronic periodontitis with Th17-associated cytokines in serum. *Inflammation*. 2013;36(3):696-704.
165. Puralibaba F, Babaloo Z, Pakdel F, Aghazadeh M. Serum Level of Interleukin 17 in Patients with Erosive and Non erosive Oral Lichen Planus. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013;7(2):91-4.
166. Brant JM, Vasconcelos AC, Rodrigues LV. Role of apoptosis in erosive and reticular oral lichen planus exhibiting variable epithelial thickness. *Braz Dent J*. 2008;19(3):179-85.
167. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13(10):1173-5.
168. Kostic M, Stojanovic I, Marjanovic G, Zivkovic N, Cvetanovic A. Deleterious versus protective autoimmunity in multiple sclerosis. *Cell Immunol*. 2015;296(2):122-32.
169. Lowes MA, Kikuchi T, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Zaba LC, Haider AS, et al. Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(5):1207-11.
170. Pène J, Chevalier S, Preisser L, Vénéreau E, Guilleux MH, Ghannam S, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol*. 2008;180(11):7423-30.
171. Sontheimer RD. Lichenoid tissue reaction/interface dermatitis: clinical and histological perspectives. *The Journal of investigative dermatology*. 2009;129(5):1088-99.
172. Krueger JG, Wharton KA, Jr., Schlitt T, Suprun M, Torene RI, Jiang X, et al. IL-17A inhibition by secukinumab induces early clinical, histopathologic, and molecular resolution of psoriasis. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;144(3):750-63.
173. Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, et al. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood*. 2012;119(1):285-95.
174. Chen X, Das R, Komorowski R, van Snick J, Uyttenhove C, Drobyski WR. Interleukin 17 is not required for autoimmune-mediated pathologic damage during chronic graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2010;16(1):123-8.
175. Klimczak A, Suchnicki K, Sedzimirska M, Lange A. Diverse Activity of IL-17(+) Cells in Chronic Skin and Mucosa Graft-Versus-Host Disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2019;67(5):311-23.
176. Verstappen GM, Corneth OBJ, Bootsma H, Kroese FGM. Th17 cells in primary Sjögren's syndrome: Pathogenicity and plasticity. *J Autoimmun*. 2018;87:16-25.
177. Uchiyama R, Yonehara S, Taniguchi S, Ishido S, Ishii KJ, Tsutsui H. Inflammasome and Fas-Mediated IL-1 β Contributes to Th17/Th1 Cell Induction in Pathogenic Bacterial Infection In Vivo. *J Immunol*. 2017;199(3):1122-30.
178. van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepman TA, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain*. 2018;141(5):1334-49.
179. Ueno A, Ghosh A, Hung D, Li J, Jijon H. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015;21(43):12283-95.
180. Bazzazi H, Aghaei M, Memarian A, Asgarian-Omran H, Behnampour N, Yazdani Y. Th1-Th17 Ratio as a New Insight in Rheumatoid Arthritis Disease. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2018;17(1):68-77.

181. Gartlan KH, Varelias A, Koyama M, Robb RJ, Markey KA, Chang K, et al. Th17 plasticity and transition toward a pathogenic cytokine signature are regulated by cyclosporine after allogeneic SCT. *Blood Adv.* 2017;1(6):341-51.
182. Bahr F, Wehner R, Platzbecker U, Wermke M, Shayegi N, Middeke JM, et al. Reconstitution of interleukin-17-producing T helper cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* 2013;19(3):357-65.
183. Woodford D, Johnson SD, De Costa AM, Young MR. An Inflammatory Cytokine Milieu is Prominent in Premalignant Oral Lesions, but Subsides when Lesions Progress to Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Cell Immunol.* 2014;5(3).
184. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol.* 2009;50(5):980-9.
185. Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwajiri S, Szeliga W, Kolls J, et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol.* 2007;178(11):6730-3.
186. He S, Fei M, Wu Y, Zheng D, Wan D, Wang L, et al. Distribution and clinical significance of Th17 cells in the tumor microenvironment and peripheral blood of pancreatic cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2011;12(11):7424-37.
187. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Malignant B cells skew the balance of regulatory T cells and TH17 cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 2009;69(13):5522-30.
188. Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, Wang RF. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(40):15505-10.
189. Gaur P, Qadir GA, Upadhyay S, Singh AK, Shukla NK, Das SN. Skewed immunological balance between Th17 (CD4(+)IL17A (+)) and Treg (CD4 (+)CD25 (+)FOXP3 (+)) cells in human oral squamous cell carcinoma. *Cell Oncol (Dordr).* 2012;35(5):335-43.
190. Wei T, Cong X, Wang XT, Xu XJ, Min SN, Ye P, et al. Interleukin-17A promotes tongue squamous cell carcinoma metastasis through activating miR-23b/versican pathway. *Oncotarget.* 2017;8(4):6663-80.
191. Li C, Zhao Y, Zhang W, Zhang W. Increased prevalence of T(H)17 cells in the peripheral blood of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2011;112(1):81-9.
192. Tang WJ, Tao L, Lu LM, Tang D, Shi XL. Role of T helper 17 cytokines in the tumour immune inflammation response of patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;14(1):561-8.
193. Johnson SD, De Costa AM, Young MR. Effect of the premalignant and tumor microenvironment on immune cell cytokine production in head and neck cancer. *Cancers (Basel).* 2014;6(2):756-70.
194. Wu P, Wu D, Ni C, Ye J, Chen W, Hu G, et al. $\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity.* 2014;40(5):785-800.
195. Zhu X, Mulcahy LA, Mohammed RA, Lee AH, Franks HA, Kilpatrick L, et al. IL-17 expression by breast-cancer-associated macrophages: IL-17 promotes invasiveness of breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 2008;10(6):R95.
196. Punt S, Fleuren GJ, Kritikou E, Lubberts E, Trimbos JB, Jordanova ES, et al. Angels and demons: Th17 cells represent a beneficial response, while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer. *Oncoimmunology.* 2015;4(1):e984539.
197. Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology.* 2010;10(4):248-56.
198. Ma S, Cheng Q, Cai Y, Gong H, Wu Y, Yu X, et al. IL-17A produced by $\gamma\delta$ T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2014;74(7):1969-82.

199. Rei M, Gonçalves-Sousa N, Lança T, Thompson RG, Mensurado S, Balkwill FR, et al. Murine CD27(-) V γ 6(+) $\gamma\delta$ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(34):E3562-70.
200. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;522(7556):345-8.
201. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 2009;114(6):1141-9.
202. Hamai A, Pignon P, Raimbaud I, Duperrier-Amouriaux K, Senellart H, Huret S, et al. Human T(H)17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN- γ -secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo. *Cancer Res*. 2012;72(5):1059-63.
203. Bekisz J, Baron S, Balinsky C, Morrow A, Zoon KC. Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010;3(4):994-1015.
204. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(2):95-109.
205. Reszke R, Szepietowski JC. Secukinumab in the treatment of psoriasis: an update. *Immunotherapy*. 2017;9(3):229-38.
206. McInnes IB, Kavanaugh A, Gottlieb AB, Puig L, Rahman P, Ritchlin C, et al. Efficacy and safety of ustekinumab in patients with active psoriatic arthritis: 1 year results of the phase 3, multicentre, double-blind, placebo-controlled PSUMMIT 1 trial. *Lancet (London, England)*. 2013;382(9894):780-9.
207. Megna M, Balato A, Raimondo A, Balato N. Guselkumab for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Biol Ther*. 2018;18(4):459-68.
208. Solimani F, Pollmann R, Schmidt T, Schmidt A, Zheng X, Savai R, et al. Therapeutic Targeting of Th17/Tc17 Cells Leads to Clinical Improvement of Lichen Planus. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1808.

8. Anhang

Protokolle:

FICOLL-Separationen

Buffy-Coat (BC)

Durchführung:

- 4 x 50ml Röhrchen mit je 15ml Ficoll-Medium befüllen
- BC steril in eine Zellkultur-Flasche überführen
- Volumen auf 140ml mit PBS/ 2mM EDTA auffüllen
- Jedes Röhrchen mit 35ml der Zellsuspension langsam  berschichten
- Aufwirbelungen vermeiden, beeinflusst die Auftrennung der Zellen
- zentrifugieren 20 min, 2300 rpm, **ohne** Bremse, **ohne** Beschleunigung
- gleiche Anzahl an leeren 50ml Röhrchen vorbereiten
- vorsichtig PBMC-Bande (weißer Ring zwischen Plasma und Ficoll) abnehmen,
→ will man eine Thrombozyten-Kontamination vermeiden sollte man vorher den Plasmaring absaugen
- in 50ml Röhrchen überführen
- mit PBS/ 2mM EDTA auf 50ml auffüllen
- zentrifugieren 8 min, 1800 rpm
- **Achtung:** Pellet noch sehr weich, deshalb unter Sicht abkippen
- Überstand abkippen und auf 50ml mit PBS/ 2mM EDTA auffüllen
- zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- Zellpellets poolen und mit PBS/ 2mM EDTA auf 50 ml auffüllen
- zentrifugieren 5 min, 1500 rpm
- Überstand abkippen
- Zellpellets gut resuspendieren und mit PBS/ 2mM EDTA auf 50ml auffüllen
- Zellen zählen
- Zellen können eingefroren oder direkt weiterverwendet werden

- bei starker Thrombozyten-Kontamination:
→ zentrifugieren 10 min, 1000 rpm, danach 15 min, 800 rpm
- bei Klumpen-Bildung:
→ Zellen über Cell Strainer (70 m) geben

Patienten-Vollblut

- Meist bekommt man pro Patient 2 Spritzen à 20-25ml Vollblut
- Pro Spritze: ein 50ml Röhrchen mit je 15ml Ficollmedium befüllen
- Das Blut aus beiden Spritzen in ein neues 50ml Röhrchen geben
- Das restliche Volumen mit PBS/ 2mM EDTA auf 50ml auffüllen
- Jedes Ficoll-Röhrchen mit ca. 25ml des Blutgemisches langsam überschichten
- Aufwirbelungen vermeiden, beeinflusst die Auftrennung der Zellen
- zentrifugieren 20 min, 2300 rpm, **ohne** Bremse, **ohne** Beschleunigung
- beide Ficollringe in ein neues 50ml Röhrchen überführen und direkt poolen
- weiter wie im Standardprotokoll „Ficoll für BC “ ...

Einfrieren von Zellen

Ansetzten des Mediums:

- Pro Nunc werden 1ml Medium benötigt
→ Gesamtmenge berechnen, mit Überschuss
- Komponenten:
 - Einfriermedium (angesetzt im Kühlschrank, siehe Rezept)
 - 10 % DMSO (zelltoxisch) hinzugeben
→ beide Komponenten müssen kurz vor Gebrauch gemischt werden
→ DMSO gefriert schon bei 4°C und fällt aus, deshalb gut mischen
- Bsp.: 3 Nunc´s benötigen 3ml, mit Überschuss 4ml, davon sind 10% 400µl
→ 3,6ml Einfriermedium + 400 µl DMSO

Durchführung:

- Die Zellen werden abzentrifugiert und dekantiert
- Das Pellet wird mit der jeweiligen Menge an frisch angesetztem Medium resuspendiert
- Die Nunc´s mit je 1ml Zellsuspension füllen
- Ohne Verzögerung die Nunc´s in Isopropyl-Becher sog. „Frosties“ (im Kühlschrank vorkühlen) stellen. Diese sorgen dafür, dass die Temperatur konstant pro Minute um 1°C sinkt. Dadurch bleibt die Kristallbildung sehr gering, und somit werden weniger Zellen zerstört.

Wichtiges:

- Max. 50 mio PBMC´s in 1ml wegfrieren

- Bei höheren Zellzahlen kann im Notfall die ML-Menge erhöht werden, dennoch ist es besser viele kleine Portionen wegzufrieren.

Auftauen kryokonservierter Zellen

Medium:

- PBMC und unempfindliche Zellen: PBS/ 2mM EDTA
- Empfindliche/besondere Zellen: Nährmedien, RPMI etc.

Vorbereitung:

- Wasserbad (37°C) einschalten
- ein 50ml Tube vorbereiten und beschriften
- Tube mit 10 ml Medium füllen

Durchführung:

- Nunc in das warme Wasserbad stellen
- nur einen kleinen Teil auftauen lassen, optische Kontrolle!
- Ab hier: **schnelles Arbeiten wg. DMSO!**
- Pipette mit ca. 2ml Medium aufziehen
- Medium in die angetaute Zellsuspension geben und durch kontrolliertes Resuspendieren die Zellen mischen
- Volumen langsam vergrößern sonst platzen die Zellen
- Kontrolliert die komplette Suspension ins Tube geben
- Nunc evtl. nochmal spülen
- Zellen abzentrifugieren bei 1500 rpm für 5 min
- Überstand dekantieren
- Pellet in 10ml Medium aufnehmen und Zellen zählen
- Zellen abzentrifugieren bei 1500 rpm für 5 min
- Zellpellet nun in dem Medium aufnehmen in dem weitergearbeitet wird
- Empfindliche Zellen sollten mehrfach gewaschen werden
 - Wäscht zelltoxisches DMSO aus
 - Wichtig: schnelles Arbeiten ohne Unterbrechung

Zellzählung

Kammer: Fuchs-Rosenthal-Kammer

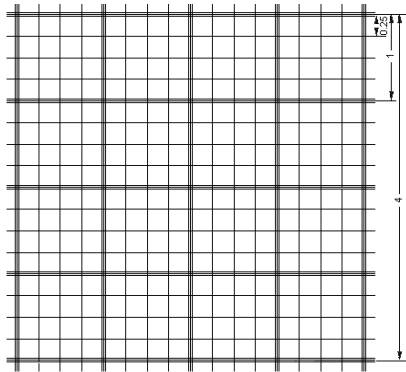
Vorbereitung:

- Deckglas mittels Wasser auf Kammer befestigen,
- Newton´schen Ringe müssen zu sehen sein
- Zellmaterial in unsterile Zählplatte geben

Durchführung:

Außerhalb der Flow:

- Zellen mit Trypanblau (toxisch) im Verhältnis 1:2 mischen
- Keine Inkubation der Farbe nötig
- Probe in Kammer füllen, kurz Zellen setzen lassen
- In der X-er Vergrößerung folgendes Netz benutzen:



- Eines der 16 Quadrate (16 Kleinstquadrate) auszählen
- Blaue Zellen: Tot
- Runde leuchtende Zellen: vital
- Gezählte Zahl $\times 10^4 =$ Zellzahl / ml (100 gezählte Zellen entspricht 1mio/ml)
- Sind die Zellen in mehr als 1ml resuspendiert muss dieser Volumenfaktor multipliziert werden
- Bei hohen Zellzahlen kann zu der 1:2 Verdünnung noch mehr verdünnt werden. Den Faktor muss man aber später bei der Formel berücksichtigen.

Gewinnung von Serum

- Vollblut wird in Heparinspritzen abgenommen
- Zentrifugieren bei 3500 rpm für 10 min bei 20 °C
- in beschriftete 2 ml Nuncs überführen und einfrieren oder direkt weiterverarbeiten

Einfrieren von Serum

- Vollblut wird abgenommen, abzentrifugiert (3500 rpm, 10 min, 20°C) und in beschriftete 2 ml Nuncs überführt.
- Die Nuncs werden anschließend im Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

Auftauen von Serum

- Die 2ml-Nuncs mit gefrorenem Serum werden bei Raumtemperatur aufgetaut und können dann weiterverarbeitet werden.

Zellstimulation:

- Zellen nach Protokoll auftauen
- Zellen in entsprechender Menge X-Vivo aufnehmen und im stimulierten Well entsprechende Menge PMA hinzufügen:
 - 3–4 mio Zellen/ 2 ml X-Vivo → 4 µl PMA pro Well
 - 2,25–3 mio Zellen/ 1,5 ml X-Vivo → 3 µl PMA
 - 1,5–2 mio Zellen/ 1 ml X-Vivo → 2 µl PMA pro Well
 - 0,75–1 mio Zellen/ 500 µl X-Vivo → 1 µl PMA pro Well
- Stimulation: 4 h bei 37°C

FACS-Färbung

Zellzahl:

- mind. 50.000 Zellen, optimal sind 100.000 – 200.000 Zellen pro Tube
- kann je nach Zellart variieren
- **max. 2mio/ml**

Durchführung:

- Probe in FACS-Puffer aufnehmen
- mit entsprechender Zellzahl auf FACS-Tubes verteilen: für die Tubes IL-17A stimuliert/unstimuliert → 1 mio Zellen; für die Tubes Treg (CD127) und Treg (Foxp3) → 0,75 mio Zellen; für die übrigen Tubes → 0,2 mio Zellen
- 5 min bei 1500 rpm abzentrifugieren
- dekantieren und Pellet aufratschen
- FACS-AK hinzugeben, hierbei Verdünnungen und Volumen beachten
- 15 min inkubieren
 - Normal wird bei 4°C inkubiert
 - Vereinzelt gibt es AK die RT benötigen, dies bitte beachten
- 1 ml FACS-Puffer pro Tube
- 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren
- dekantieren und Tubes ausklopfen, Tube dabei nicht zurückdrehen!!!
- Pellet aufratschen

- 500 µl FACS-Fix pro Tube (Fix steht gebrauchsfertig im Kühlschrank)
- Bei geringen Zellzahlen reichen auch 200µl FACS-Fix
- Probe vortexen
- Die Zellen sind nun max. 1 Woche stabil

Anmerkung:

- Die FACS –AK sind steril zu behandeln

Foxp3-FACS-Färbung

Vorbereitung:

- ca. 0,5 – 1mio Zellen pro Tube
- Waschpuffer: Permeabilization Buffer (10-fach) eBioscience
 - ➔ 1:10 verdünnen mit Aqua dest.
 - ➔ benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - ➔ eine Woche haltbar bei 4°C
- Perm/Fix: Fixation Permeabilization Concentrate eBioscience
 - ➔ 1:4 verdünnen mit Fixation/Permeabilization Diluent
 - ➔ benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - ➔ direkt verbrauchen, nicht haltbar
- Serum: Normal Rat Serum eBioscience
- Die FACS-AK sind steril zu behandeln

Durchführung:

- normale FACS-Färbung durchführen
 - ➔ entsprechende Proben nicht fixieren
- das Pellet in 1ml Perm/Fix resuspendieren
- 30 min bei RT inkubieren
- 2x mit Waschpuffer waschen:
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- in das Pellet 2µl Serum geben und resuspendieren
- 15 min bei RT inkubieren
- ohne waschen 5µl Foxp3-AK dazu geben
- 30 min bei RT inkubieren

- 2x mit Waschpuffer waschen
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- 500-1000µl FACS-Fix pro Tube
- Zellen schnellstmöglich messen (max. 12h)
- Probe gut vortexen

Intrazelluläre FACS-Färbung für IL-17A

Vorbereitung:

- **Waschpuffer:** BD Perm/Wash Puffer (10-fach)
 - ➔ 1:10 verdünnen mit Aqua dest.
 - ➔ benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - ➔ 1-2 Tage haltbar bei 4°C
- Die FACS-AK sind steril zu behandeln

Durchführung:

- normale FACS-Färbung durchführen
 - ➔ entsprechende Proben **nicht fixieren**
- das Pellet in 250 µl Cytotfix/Cytoperm BD resuspendieren
- 20 min bei 4°C inkubieren
- 2x mit **Waschpuffer** waschen:
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- X µl intrazellulären FACS AK direkt auf das Pellet geben
- resuspendieren
- 30 min bei 4°C inkubieren
- 2x mit **Waschpuffer** waschen
 - ➔ Mit 1 ml Waschpuffer auffüllen
 - ➔ 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren
 - ➔ Dekantieren und aufratschen
- 500-1000µl FACS-Fix pro Tube
- Zellen schnellstmöglich messen (max.12h)
- Probe gut vortexen

LEGENDplex- human Th-Cytokine Panel (13-plex)

V-bottom-plate

- Wichtig: Platte und Tubes müssen aus Polypropylene sein!
- Serumproben mind. 30 min. durchgerinnen lassen
- Gefrorene Serumproben komplett auftauen lassen, mischen und dann abzentrifugieren (5min., 1500 rpm)
- FITC und PE Beads werden nicht benötigt
- Beim Pipettieren Luftblasen vermeiden!

Vobereitung:

- **Wasch- Puffer:**
 - 20x Waschpuffer mit Aqua dest. Verdünnen (1:20)
 - Benötigte Menge berechnen und ansetzen
 - Puffer bei 4°C bis zu einem Monat haltbar
- **Matrix B:** Serumersatz für den Standard
 - Mit 5 ml Assay Puffer die Matrix B lösen, mind. 15 min. vortexen
 - 1 ml Aliquot bei -80°C lagern
- **Standard lösen:**
 - Mit 250 µl Assay Puffer den Th-Panel Standard lösen
 - Pro Test werden 37,5 µl benötigt (Doppelwerte)
 - 50 µl Aliquots bei -80 °C lagern
- **Standard ansetzen:** Verdünnungsreihe
 - 7 x 0,5 ml PCR-Tubes (PP) vorbereiten und mit C0-C7 beschriften
 - In C0-C6 jeweils 37,5 µl Assay Puffer vorlegen
 - C7 = purer Standard 37,5 µl
 - C6 = 37,5 µl Assay Puffer + 12,5 µl aus C7
 - C5 = 37,5 µl Assay Puffer + 12,5 µl aus C6
 - Entsprechend weiterverfahren mit den übrigen Tubes
 - ...
 - C0 = nur Assay Puffer
 - Bei jedem Schritt die Pipettenspitze wechseln!
- **Probenverdünnung:**
 - Serumproben müssen 1:2 verdünnt werden

- 50 µl Serum + 50 µl Assay Puffer

- **Alle Komponenten auf Raumtemperatur aufwärmen lassen**

Durchführung:

- Platte beladen:
Standardwells: 12,5 µl Matrix B + 12,5 µl Standard (C7-C0)
Probenwells: 12,5 µl verdünnte Probe
- Beads mind. 30 sec. vortexen
- 12,5 µl Beads pro Well hinzugeben (dabei Beads immer wieder mischen)
- Platte mittels Folie verschließen und in Alufolie einpacken
- Platte auf den Schüttler stellen, 220 rpm
→ Über Nacht bei 4°C (besser bei Serum)
- 150 µl Waschpuffer pro Well
- Bei 800 xg 5 min. zentrifugieren
- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen (nur kurz auflegen)
- Blaues Pellet kontrollieren und mittels seitlichem Klopfen lösen
- 200 µl Waschpuffer pro Well
- Bei 800 xg 5 min. zentrifugieren
- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen (nur kurz auflegen)
- Blaues Pellet kontrollieren und mittels seitlichem Klopfen lösen
- 12,5 µl Detection Antikörper pro Well
- Platte mittels Folie verschließen und in Alufolie einpacken
- 1 h bei RT auf den Schüttler stellen (220 rpm)
- Platte nicht waschen
- 12,5 µl SA-PE pro Well
- Platte mittels Folie verschließen und in Alufolie einpacken
- 30 min. bei RT auf den Schüttler stellen (220 rpm)
- 150 µl Waschpuffer pro Well
- Bei 800 xg 5 min. zentrifugieren
- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen (nur kurz auflegen)
- Blaues Pellet kontrollieren und mittels seitlichem Klopfen lösen
- 200 µl Waschpuffer pro Well
- Bei 800 xg 5 min. zentrifugieren
- Platte dekantieren und an einem Tuch abtupfen (nur kurz auflegen)
- Blaues Pellet kontrollieren und mittels seitlichem Klopfen lösen

- 150 μ l Waschpuffer pro Well
- Jedes Well gut resuspendieren
 - Platte direkt am FACS messen \rightarrow Probe aus dem Well in ein FACS-Tube überführen und gut mischen
 - 24h bei 4°C haltbar
 - Oder fixieren

9. Danksagung

Gelöscht für Online-Version

10. Lebenslauf

Gelöscht für Online-Version