

Aus der Klinik für Inneren Medizin V - Pneumologie, Allergologie,  
Beatmungsmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Einfluss des epithelialen Zytokins IL-17C auf das Wachstum von Lungenkrebszellen**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

*(Dr. med.)*

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2017**

vorgelegt von: Lina Bittigkoffer

geb. am: 11.05.1992 in Karlsruhe

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität des Saarlandes als Dissertation  
am

Erstgutachter: PD Dr. Christoph Beisswenger

Zweitgutachter:

### Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

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

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

1. Prof. Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas, Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. PD Dr. Christoph Beisswenger: Betreuung der Doktorarbeit, Vergabe des Themas, Unterstützung bei Fragen zum Versuchsaufbau, zur Thematik und zur Ausarbeitung
3. Christopher Jungnickel: Betreuung der Doktorarbeit, Ausarbeitung und Hilfestellung bei den *in vivo*-Versuchen
4. Andreas Kamyschnikow: Immunhistochemische Färbungen

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar

geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift des Promovierenden

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

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

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

Jungnickel C, Schmidt LH, **Bittigkoffer L**, Wolf L, Wolf A, Ritzmann F, Kamyschnikow A, Herr C, Menger MD, Spieker T, Wiewrodt R, Bals R, and Beisswenger C

Oncogene. 2017 Mar 27

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>17</b>
4.1	COPD und Lungenkrebs	17
4.2	Das angeborene Immunsystem	18
4.3	Die Interleukin-17 Familie und ihre Rezeptoren	19
4.3.1	Die Rolle von IL-17A	21
4.3.2	Die Rolle von IL-17C	22
4.4	Krebswachstum und Entzündung	23
<b>5</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
6.1	Verwendete Zelllinien	26
6.2	Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen	26
6.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	27
6.4	Zellzahlbestimmung	27
6.5	Kultivierung von Bakterien	28
6.6	Herstellung von NTHi-Lysaten für <i>in vivo</i> Versuche	28
6.7	Stimulationsexperiment	29

<b>6.8</b>	<b>RNA Isolation</b>	<b>29</b>
<b>6.9</b>	<b>cDNA-Synthese</b>	<b>30</b>
<b>6.10</b>	<b>RealTime- Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>31</b>
<b>6.11</b>	<b>ELISA</b>	<b>33</b>
<b>6.12</b>	<b>MTT-Assay</b>	<b>34</b>
<b>6.13</b>	<b><i>In vivo</i> Methoden</b>	<b>34</b>
6.13.1	Applikation von LLC Zellen	34
6.13.2	Exposition zu NTHi-Lysaten	35
6.13.3	Gewinnung und Aufarbeitung der Brochoalveolären Lavage (BAL)	35
6.13.4	Herstellung von Cytospinpräparate	36
6.13.5	Zellzahlbestimmung in der BAL	36
6.13.6	Lungenpräparation	37
6.13.7	Aufarbeitung der Lunge und histologische Schnitte	37
6.13.8	Bestimmung der Tumorfläche auf histologischen Schnitten	38
<b>6.14</b>	<b>Material</b>	<b>38</b>
6.14.1	Software	39
6.14.2	Lösungen	40
6.14.3	Statistik	40
<b>7</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
<b>7.1</b>	<b>IL-17C-knockout-Mäuse zeigen nach NTHi-Exposition ein vermindertes Wachstum von Lungenmetastasen</b>	<b>41</b>
<b>7.2</b>	<b>IL-17C-knockout-Mäuse zeigen nach NTHi-Exposition eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum</b>	<b>43</b>
<b>7.3</b>	<b>IL-17C verstärkt die durch NTHi induzierte Abgabe von KC und MIP-2 in LLC Zellen</b>	<b>44</b>

7.4	IL-17C wird in LLC Zellen unabhängig von der Stimulation mit NTHi und IL-17C auf niedrigem Niveau exprimiert	46
7.5	Die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE werden konstitutiv von LLC Zellen exprimiert	47
7.6	IL-17C und NTHi nehmen keinen Einfluss auf den Zellzyklus von LLC Zellen	48
7.7	IL-17C wird in A549 Zellen unabhängig von IL-17C und NTHi exprimiert	51
7.8	Die Expression der Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE erfolgt in humanen A549 Zellen unabhängig von IL-17C- und NTHi-Stimulation	52
7.9	Zellzyklusgene werden in A549 Zellen unabhängig von IL-17C und NTHi reguliert	53
8	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
8.1	IL-17C-knockout-Mäuse zeigen unter NTHi-Exposition ein vermindertes Wachstum von Lungenmetastasen	56
8.2	IL-17C-knockout-Mäuse zeigen unter NTHi-Exposition eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	59
8.3	IL-17C und seine Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE werden unabhängig von NTHi und IL-17C exprimiert	61
8.4	IL-17C verstärkt die NTHi-induzierte Ausschüttung von KC und MIP-2	62
9	<b>SCHLUSSBEMERKUNG</b>	<b>64</b>
10	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>66</b>
11	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>
12	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>92</b>



## 1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erklärung</b>
<b>BAL</b>	Bronchoalveolar lavage
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>Bcl-xl</b>	B-cell lymphoma-extra large
<b>BD</b>	Brain-Heart infusion broth
<b>CFU</b>	Colony forming unit
<b>COPD</b>	Chronic obstructive pulmonary disease
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonucleic acid
<b>DPBS</b>	Dulbecco's phosphate-buffered saline
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FCS</b>	Fetal calf serum
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
<b>IL-17A</b>	Interleukin 17 A
<b>IL-17B</b>	Interleukin 17 B
<b>IL-17C</b>	Interleukin 17 C
<b>IL-17D</b>	Interleukin 17 D
<b>IL-17E</b>	Interleukin 17 E

<b>IL-17F</b>	Interleukin 17 F
<b>IL-17RA</b>	Interleukin receptor 17 A
<b>IL-17RB</b>	Interleukin receptor 17 B
<b>IL-17RC</b>	Interleukin receptor 17 C
<b>IL-17RD</b>	Interleukin receptor 17 D
<b>IL-17RE</b>	Interleukin receptor 17 E
<b>IL-17RF</b>	Interleukin receptor 17 F
<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
<b>KC</b>	Keratinocyte chemoattractant
<b>LLC</b>	Lewis Lung Carinoma
<b>MDA</b>	Melanoma differentiation antigen
<b>MIP</b>	Macrophage inflammatory protein
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response 88
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adenine dinucleotide
<b>NOD</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
<b>NTHi</b>	Nontypeable <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>OD</b>	Optical density
<b>PAMPS</b>	Pathogen associated molecular pattern
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PolyI:C</b>	Polyinosinic polycytidylic acid
<b>PPRS</b>	Pattern-recognition receptors
<b>RIG</b>	Retinoic acid inducible gene
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid

<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription-polymerase-chain reaction
<b>SD</b>	Standard deviation
<b>TH-17</b>	T helper cells 17
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>Tsp</b>	Thrombospondin
<b>TLR</b>	Toll like receptor
<b>WT</b>	Wilde type

## 2 Zusammenfassung

Lungenkrebs ist eine der weltweit häufigsten Todesursachen. Die Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) gilt als Risikofaktor für das Entstehen von Lungenkrebs und ist mit einer chronischen Entzündung der Lunge vergesellschaftet. Studien zeigten, dass COPD-typische Bakterien die Abgabe von IL-17C in Atemwegsepithelzellen induzieren und dass IL-17C Entzündung in Atemwegsepithelzellen autokrin reguliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass IL-17C in präklinischen Darmkrebsmodellen die Expression von Tumorsuppressorgenen induziert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des epithelialen Zytokins IL-17C auf das Wachstum von Lungentumoren und auf die Expression zellzyklusregulierender Gene näher zu charakterisieren.

Im Lewis Lung Carinoma (LLC) Lungenkrebsmodell konnte mit IL-17C-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) das Wachstum von Lungentumoren IL-17C abhängig fördert. Das durch NTHi hervorgerufene erhöhte Tumorstadium war mit einer Zunahme der Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der Lunge assoziiert. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten war bei IL-17C defizienten Mäusen in der Lunge vermindert.

*In vitro* Experimente zeigten, dass LLC Zellen und die humane Krebszelllinie A549 IL-17C auf niedrigem Niveau konstitutiv exprimieren, die Expression von IL-17C jedoch durch Stimulation mit NTHi und IL-17C nicht gesteigert werden konnte. Es wurde zudem die Expression der IL-17C Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE nachgewiesen. Außerdem verstärkte die Stimulation von LLC Zellen mit IL-17C die durch NTHi-induzierte Abgabe der Chemokine KC und MIP-2 in LLC Zellen.

Es konnte weiterhin dargelegt werden, dass NTHi und IL-17C keinen Einfluss auf die Expression der Zellzyklus und Apoptose regulierenden Gene Bcl-2, Bcl-xl und Cyclin D1 haben.

Die vorliegende Arbeit konnte aufzeigen, dass IL-17C das Wachstum von Lungentumoren fördert. Da IL-17C die Bildung von Chemokinen in Krebszellen verstärkt, nicht jedoch auf die Expression von Zellzyklus regulierenden Genen wirkt, legen die erzielten Ergebnisse nahe, dass IL-17C Entzündungsprozesse im Tumormikromilieu reguliert.

### 3 Summary

Lung cancer is one of the most common causes of death worldwide. The Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is an important risk factor for the development of lung cancer and is associated with a chronic inflammation of the lung. Studies have shown that the release of IL-17C in respiratory epithelial cells is induced by COPD-typical bacteria. IL-17C regulates inflammation in respiratory epithelial cells in an autocrine manner. Above this, it was shown in a preclinical model of colon cancer that IL-17C is able to induce the expression of tumor suppressor genes.

The aim of this doctoral thesis was the characterization of the influence of the epithelial cytokine IL-17C on the proliferation of lung cancer and the expression of cell cycle-regulating genes.

In the Lewis Lung Carcinoma (LLC) lung cancer model with IL-17C-deficient mice, it was demonstrated that Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) promotes the development of lung cancer in an IL-17C dependent manner. The tumor growth, caused by NTHi, was associated with an increased number of neutrophilic granulocytes in the lung. The number of neutrophilic granulocytes in the lung was reduced in IL-17C-deficient mice.

*In vitro* experiments showed, that murine LLC cells and human A549 cells express IL-17C constitutively on a low level. Nevertheless, the expression of IL-17C did not increase after stimulation with NTHi and IL-17C.

It was demonstrated that LLC cells as well as A549 cells express the two receptors for the recognition of IL-17C, IL-17RA and IL-17RE. After stimulating LLC cells with IL-17C, an increased release of the chemokines KC and MIP-2, induced by NTHi, was detected.

Beyond that, it was demonstrated that neither NTHi nor IL-17C has an influence on the expression of cell cycle- and apoptosis regulating genes Bcl-2, Bcl-xl or Cyclin D1.

The results of this doctoral thesis show, that IL-17C promotes the growth of lung cancer. Since IL-17C increases the production of chemokines in cultured cancer cell lines, but does not influences the expression of cell cycle-regulating genes, it is hypothesized that IL-17C regulates inflammatory processes in the tumor microenvironment.

## 4 Einleitung

### 4.1 COPD und Lungenkrebs

Lungenkrebs ist die Tumorart, die zu den meisten Todesfällen weltweit führt (75). Hierbei haben Patienten mit Lungenkrebs eine 5-Jahres-Überlebensrate unter 20%, welche häufig durch den späten Zeitpunkt der Diagnose begründet ist (78; 89; 98). Man unterteilt den Lungenkrebs in kleinzellige Lungenkarzinome und in nicht-kleinzellige Lungenkarzinome, wobei letztere einen Anteil von 80-90% ausmachen (19). Die kleinzelligen Tumore besitzen jedoch ein deutlich aggressiveres Wachstum und eine enorme Metastasierungstendenz im Vergleich zu den nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen. Über 95 % aller Patienten mit Lungentumoren sind aktuelle oder ehemalige Raucher (44). Demnach ist der entscheidendste Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs der Zigarettenrauch (5). Zahlreiche Studien konnten belegen, dass das Krebsrisiko für Raucher 15 bis 30-fach höher ist als das für Nichtraucher (88). Rauchen ist neben Luftverschmutzung, Staubpartikeln und anderen Umweltgiften auch der Hauptrisikofaktor für die Entstehung der Chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) (30). Die COPD selbst ist wiederum auch einer der größten Risikofaktoren für Lungenkrebs. 40-70% der Patienten mit Lungenkrebs leiden gleichzeitig unter einer COPD (1; 111; 113). So ist das Risiko für Patienten mit COPD an Lungenkrebs zu erkranken 2-5 fach größer als für Raucher ohne COPD (15; 68; 94; 95; 101).

Ein gesundes humanes Tracheobronchialsystem ist frei von Pathogenen. Im Falle einer COPD versagen jedoch die angeborenen Abwehrsysteme der Lunge aufgrund der Exposition mit Zigarettenrauch oder anderen

Umweltgiften (91). Die Folge ist eine akute und eine stabile Entzündungsphase der Lunge (91). Neben der chronischen Entzündung leiden Patienten mit COPD regelmäßig an akuten Atemwegsinfekten, welche mit Exazerbationen einhergehen und sich mit einer Zunahme der Dyspnoe, mit Husten und purulentem Auswurf klinisch darstellen (17). Diese Exazerbationen führen zu einer verminderten Lebensqualität, einer erhöhten Mortalität und zu einem Fortschreiten der COPD (67). Häufig sind es neben viralen besonders bakterielle Erreger, die zu akuten und chronischen pulmonalen Infekten bei COPD-Patienten führen. Nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) ist das häufigste bei COPD-Patienten vorkommende Lungenpathogen, welches 20-30% aller Exazerbationen ausmacht. In der Lunge von COPD Patienten befinden sich häufig aber auch *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Moraxella catarrhalis* (91).

## 4.2 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem übernimmt eine für alle höheren Lebewesen lebenswichtige Wach- und Abwehrfunktion gegenüber Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Protozoen und Pilzen. Bei Wirbeltieren wird das angeborene vom adaptiven Immunsystem unterschieden. Die angeborene Immunreaktion bezeichnet die nicht erregerspezifische zelluläre und humorale Immunantwort des Körpers und ist genetisch darauf programmiert, einfallende Mikroorganismen zu detektieren. Im Gegensatz dazu besteht das erworbene Immunsystem aus der adaptiven zellulären Immunantwort, bei der die T- und B-Lymphozyten Hauptakteure sind. Das adaptive System bezeichnet hierbei eine Reaktion, die sich gezielt gegen spezifische Antigene richtet. Die Zellen des adaptiven Immunsystems können solche Antigene von

Erregern erkennen und daher eine erregerspezifische Abwehr vermitteln (42; 45). Im Rahmen dieser Anpassung sind die Zellen der adaptiven Immunabwehr in der Lage, spezifische Strukturen (Antigene) der Angreifer zu erkennen. Dabei ist das angeborene Immunsystem bei der Einleitung einer adäquat adaptiven Immunantwort von entscheidender Bedeutung (43).

Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRR) nehmen im angeborenen Immunsystem eine zentrale Rolle ein. PRRs wie Toll-like Rezeptoren (TLR) erkennen mikrobielle Strukturen (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, PAMPs), die für die Mikroorganismen meist lebenswichtig sind. So erkennt zum Beispiel TLR-3 doppelsträngige Ribonukleinsäuren (RNA) von Viren, TLR-4 erkennt Endotoxine und TLR-5 bakterielle Flagelline. TLR werden entweder auf der Zelloberfläche exprimiert (z.B. TLR-1/2/4/6) oder befinden sich im Endosom (z.B. TLR-3/4/7/8). Aber auch zytoplasmatische Rezeptoren erkennen mikrobielle Faktoren. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD) 1 und 2 erkennen z.B. Fragmente der bakteriellen Zellwand, retinoic acid inducible gene 1 (RIG-1) und Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5) hingegen virale RNA. Nach der Bindung der entsprechenden Liganden an einen PRR werden Signalkaskaden aktiviert, die die Entzündungs- und Abwehrreaktionen regulieren. So führt die Erkennung von Bakterien über TLR-5 zu einer MyD88-abhängigen Expression von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden in Atemwegsepithelzellen (74; 90).

### 4.3 Die Interleukin-17 Familie und ihre Rezeptoren

Im Rahmen von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen kommen den Mitgliedern der Interleukin-17 Zytokinfamilie wichtige Aufgaben zu. Die IL-

17 Zytokinfamilie besteht aus 6 Isoformen: Interleukin 17A-F (IL-17A-F) (25; 107). Diese Zytokine binden zur Vermittlung der Effektorantwort an Rezeptoren, die sich aus zwei Mitgliedern der IL-17 Rezeptorfamilie (IL-17RA-IL-17RE) zusammensetzt. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Mitglieder der IL-17 Familie mit den dazugehörigen Rezeptoren, Hauptfunktionen und wichtigsten Produzenten.

Tabelle 1: Die Interleukin-17 Familie

<b>Interleukin</b>	<b>Rezeptor</b>	<b>Hauptfunktion, Eigenschaft</b>	<b>Produzenten</b>
<b>IL-17A</b>	IL-17RA, IL-17RC	Rekrutierung von Entzündungszellen (neutrophilen Granulozyten) über die Induktion von Chemokinen, Förderung von Autoimmunerkrankungen	T-Helferzellen 17, $\gamma\delta$ T-Zellen, innate lymphoid cells (26)
<b>IL-17B</b>	IL-17RB	Protektiv bei Asthma und Colitis, inhibiert die proinflammatorische Wirkung von IL-25	Colonepithelzellen (85), Chondrozyten (55; 72), Neurone (11; 70)
<b>IL-17C</b>	IL-17RA, IL-17RE	Rekrutierung von Entzündungszellen (neutrophilen Granulozyten) über die Induktion von Chemokinen, Förderung von TH17-Zellen zur Produktion von IL-17A und IL-17F	Epithelzellen (49; 72; 103)
<b>IL-17D</b>	Unbekannt	Proinflammatorische Aktivität im Epithel	Zellen in Muskeln, Gehirn, Herz, Lunge, Pankreas, Fettgewebe, CD4 <sup>+</sup> T Zellen, CD8 <sup>+</sup> T Zellen, CD14 <sup>+</sup> Monozyten, CD19 <sup>+</sup> B Zellen (99)

<b>IL-17E</b>	IL-17RB, IL-17RA	Induzieren von TH2-Zellen, Supprimieren von TH17- Zellen, an Asthma beteiligt	Memory Th2 Zellen (72; 105), eosinophile und basophile Granulozyten (72; 105), Mastzellen (40; 72), Epithelzellen (39; 72; 112)
<b>IL-17F</b>	IL-17RA, IL-17RC	Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, mit IL-17A Förderung von Autoimmunerkrankungen	TH17-Zellen (47), $\gamma\delta$ T-Zellen (47), CD4 <sup>+</sup> T Zellen (12), CD8 <sup>+</sup> T Zellen (12), Natürliche Killerzellen (4), neutrophile Granulozyten (14; 60)

#### 4.3.1 Die Rolle von IL-17A

IL-17A ist das am besten erforschte Zytokin der IL-17 Zytokinfamilie. Es wird von Immunzellen wie T-Helferzellen 17 (TH17-Zellen),  $\gamma\delta$ T Zellen und innate lymphoid cells exprimiert und initiiert durch die Bindung an die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RC eine Effektorantwort (26). Dabei werden besonders in Strukturzellen wie Epithelzellen die Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und antimikrobieller Peptide induziert (3; 37; 41; 56).

IL-17A ist bei der Bekämpfung bakterieller und Pilzinfektionen an Schleimhäuten von Bedeutung (18; 83). Jedoch kommt IL-17A auch eine Bedeutung bei der Pathogenese von akuten und chronischen Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen zu (57). IL-17A konnte im Rahmen zahlreicher Autoimmunkrankheiten wie Psoriasis, rheumatoide Arthritis oder multipler Sklerose nachgewiesen werden und vermittelt dort Entzündung (22; 49; 62;

65; 71). So konnte durch die Hemmung des Signalweges von IL-17A eine Besserung solcher Erkrankungen erzielt werden (33; 36; 66; 86). IL-17A verstärkt zudem die Expression von Muzinen in den Bronchialepithelzellen (23; 24), was zur Schleimüberproduktion bei chronischen Atemwegserkrankungen führt. Im Sputum von Patienten mit COPD konnte außerdem eine vermehrte Expression von IL-17A und eine erhöhte Anzahl von TH17-Zellen nachgewiesen werden (92; 93). Besonders im Endstadium der COPD konnte IL-17A nachgewiesen werden (87).

Studien belegten, dass sowohl IL-17A als auch TH17-Zellen bei Patienten mit verschiedenen Tumorarten wie Lungenadenokarzinomen vermehrt vorkommen (84). In murinen Lungenkrebsmodellen konnte nachgewiesen werden, dass Th-17 Zellen und IL-17A einen entscheidenden Beitrag zur tumorassoziierten Entzündung leisten und Tumorstadium regulieren. IL-17A-knockout-Mäuse wiesen dabei in Metastase- und Kras-abhängigen Modellen eine verminderte Tumormasse auf (10; 50).

#### 4.3.2 Die Rolle von IL-17C

IL-17C ist ein weiteres Zytokin aus der IL-17 Zytokinfamilie, welches an einen Komplex bestehend aus den Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE bindet (11; 81; 97). Hierbei besitzt IL-17C zu seinem spezifischen Rezeptor IL-17RE eine höhere Affinität als zu dem Rezeptor IL-17RA, welcher ebenfalls bei der Vermittlung der Effektorantwort von IL-17A beteiligt ist (81; 73). In Epithelzellen reguliert IL-17C angeborene Immunmechanismen in einer autokrinen Art und Weise (81). Die Expression von IL-17C wird in Atemwegsepithelzellen über PRRs induziert. Von Immunzellen abgegebene Zytokine wie IL-17A und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) führen zu einer

verstärkten Expression von IL-17C (61; 77; 109). Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-17C während einer Entzündung im Lungen- und Hautgewebe nach Infektion mit *Mycoplasma pneumoniae*, *P. aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* erhöht ist (49; 34; 48; 77; 109; 110). Darüber hinaus konnte IL-17C im Bronchialepithel von Patienten mit COPD, Mukoviszidose und Aspergillose beschrieben werden (77).

Im Rahmen entzündlicher Erkrankungen im Darm wurde ein Zusammenhang zwischen IL-17C und Darmkrebs beschrieben. In einem Kolitis-assoziierten Darmkrebsmodell zeigten Mäuse mit einer Defizienz des IL-17C-Rezeptors IL-17RE eine verminderte Tumorlast (96). Darüber hinaus wiesen Mäuse, die für den Rezeptor IL-17RE defizient waren, in diesem Modell eine reduzierte Expression der antiapoptotischen Gene B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) und B-cell lymphoma- extra large (Bcl-xl) im intestinalen Epithel auf (96).

#### 4.4 Krebswachstum und Entzündung

Zahlreiche Studien belegen einen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und Entzündung. Das wohl bekannteste Beispiel hierfür ist eine chronische Infektion des Magens mit *Helicobacter pylori*, welches als Hauptrisiko für die Entstehung des Magenkarzinoms gilt (79). Man geht davon aus, dass nahezu ein Fünftel aller Krebserkrankungen durch eine chronische Entzündung ausgelöst werden (2; 27). Dazu tragen reaktive Stickstoffspezies und reaktive Sauerstoffspezies einen maßgeblichen Teil bei, welche von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten gebildet werden. Diese reaktiven Radikale führen zu Schäden an der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und zur Instabilität des Genoms (53; 80). Neben genomischen Schäden kann Entzündung das Tumorwachstum ebenfalls fördern, indem sie in

Tumorzellen zu einer verminderten Apoptose und zu einer gesteigerten Proliferationsrate führt (27; 52). So konnte in Lungenkrebsmodellen gezeigt werden, dass sowohl Immun- als auch Entzündungszellen in die Tumorumgebung migrieren. Dort wirken sie mittels Entzündungsmediatoren direkt auf den Tumor, indem sie die Tumorphilierung und die tumorassoziierte Entzündung begünstigen (1; 29; 54; 54; 63; 64; 100). In der Mikroumgebung des Tumors finden sich gehäuft Entzündungsmediatoren wie Zytokine, die zu einer gesteigerten Expression von proliferativen und entzündungsfördernden Genen führen können (Abbildung 1) (53; 27; 7).

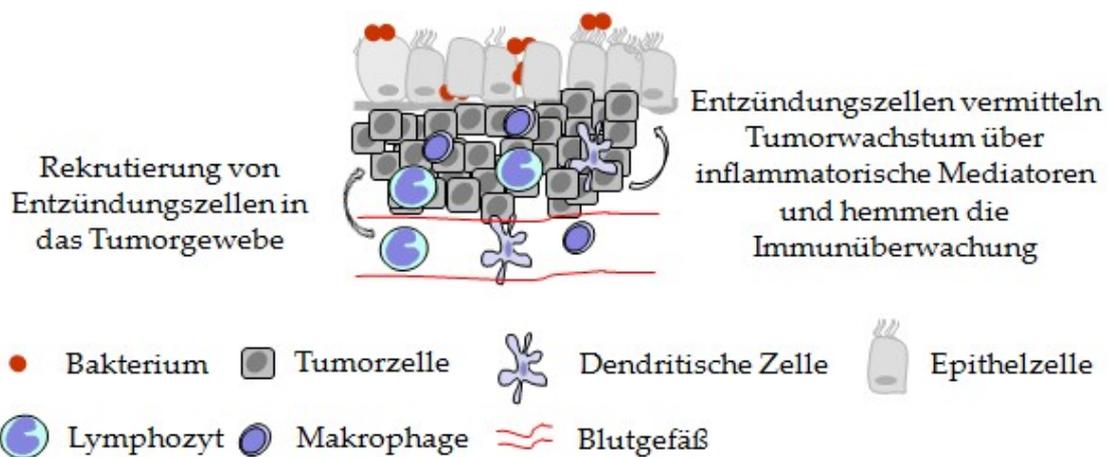


Abbildung 1: Wechselwirkung zwischen Tumor- und Entzündungszellen verändert nach (27; 51).

Neben dem Tumorwachstum wirkt die Entzündung auch auf die Metastasierung eines Tumors. Hierbei führt die Entzündung zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, sodass die Tumorzellen in die Blut- und Lymphbahnen gelangen können (28). Entzündungsprozesse und besonders pulmonale neutrophile Granulozyten begünstigen auch die Metastasierung in die Lunge bei Patienten mit Brustkrebs (106).

## 5 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des epithelialen Zytokins IL-17C auf das Wachstum von Lungentumoren und auf die Expression zellzyklusregulierender Gene näher zu charakterisieren. Hierfür sollte im Mausmodell die Funktion von IL-17C auf das Wachstum von Lungentumoren bei pulmonaler Entzündung untersucht werden. Des Weiteren sollte die Expression von IL-17C und seiner Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE in Lungenkrebszellen *in vitro* analysiert werden. Es sollte auch gezeigt werden, ob IL-17C auf die Expression von Chemokinen und auf den Zellzyklus in Lungenkrebszellen Einfluss nimmt.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils eine murine und eine humane Zelllinie verwendet. Die Zelllinie A549 (ATCC® CCL-185™) wurde aus kanzerogenem humanen Lungengewebe generiert und besitzt eine epitheliale Morphologie. Die murine Lewis lung carcinoma Zelllinie (LLC, ATCC® CRL-1642™) wurde aus kanzerogenem Lungengewebe von C57BL Mäusen generiert.

### 6.2 Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfolgte im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 98% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 70 bis 90 Prozent passagiert. Hierfür wurde das Medium aus den Zellkulturgefäßen abgesaugt und die Zellen mit Phosphate buffered saline (PBS) gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (Capricorn) abgelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in warmes FCS-haltiges Medium aufgenommen und durch Pipettieren resuspendiert. Anschließend folgte die Verdünnung der Suspension mit weiterem Medium und die Aufteilung auf neue Zellkulturgefäße.

Zur Kultivierung und Passagierung der Krebszelllinien wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium Grundmedium (DMEM) der Firma Gibco mit Fetal calf serum (FCS, 10%) der Firma Gibco und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) der Firma Gibco verwendet. Dulbecco's Phosphate-Buffered

Saline (DPBS) der Firma Gibco ist zum Waschen der Zellen eingesetzt worden.

### 6.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Kryokonservierung wurden die vorgesehenen Zellen mit PBS gewaschen, mithilfe von Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und in Medium aufgenommen. Nach Zentrifugieren der Zellsuspension für 5 min bei 1000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in FCS mit 5% Dimethylsulfoxis (DMSO) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen gefüllt. Die Kryo-Röhrchen wurden mit einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Kryo-Röhrchen wurden diese in einem  $37^{\circ}\text{C}$  temperierten Wasserbad erwärmt, in vorgewärmtem Medium aufgenommen und anschließend bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im erwärmten Medium resuspendiert und auf geeignete Kulturgefäße verteilt.

### 6.4 Zellzahlbestimmung

Zum Bestimmen der Zellzahl wurde eine Rosenthal-Fuchs-Zählkammer verwendet. Es erfolgte zunächst eine Verdünnung der Zellen in einem geeigneten Volumen und das Abdecken der Zählkammer mit einem Deckplättchen, sodass sich dieses festsaugte. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde durch Adhäsion unter das Deckplättchen gesaugt. Die Auszählung von

drei Großquadraten und damit die Bestimmung der Zellzahl geschahen unter Sicht mit einem Lichtmikroskop.

## 6.5 Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten Bakterien sind klinische Isolate von NTHi, die für 24 h auf Chocolate-Agar bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert wurden. Anschließend wurden NTHi-Kolonien in Brain-Heart Infusion broth (BD) mit Supplement B (BD) und 3,5 µg/ml NAD<sup>+</sup> (Sigma) überführt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde bei 2,500g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und gewaschen. Nachfolgend wurde OD<sub>600nm</sub>=1 mit PBS eingestellt und die Bakterien bei 70°C für 45 min hitzeinaktiviert. Nachfolgend wurden die hitzeinaktivierten Bakterien aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## 6.6 Herstellung von NTHi-Lysaten für *in vivo* Versuche

Eine Flüssigkeitskultur mit NTHi wurde zunächst 24 h lang kultiviert. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 2500 g. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Nach Aufnahme des verbliebenen Zellpallets in 1%igem PBS wurden die Bakterien resuspendiert. Hiernach erfolgte zuerst eine Hitzeinaktivierung der Bakterien. Anschließend wurden die resuspendierten Bakterien 30 s lang sonifiziert. Die Bakteriensuspension wurde nun auf eine Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml eingestellt, auf 7 ml Aliquots verteilt und bei -80 °C gelagert. Durch Ausstreichen des Lysats auf Chocolate-Agar wurde überprüft, ob die Inaktivierung und Lyse der Bakterien erfolgreich war.

## 6.7 Stimulationsexperiment

Zunächst wurden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen erfolgte die Stimulation der Zellen für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) für 24 weitere Stunden. Hierbei wurde mit hitzeinaktivierten NTHi ( $10^7$  CFU/ml), mit 40ng/ml konzentriertem IL-17C und der Kombination aus beidem stimuliert.

Nach weiteren 24 Stunden im Inkubator unter Standardbedingungen wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und für die Isolation von RNA verwendet.

## 6.8 RNA Isolation

Das Kit „NucleoSpin®RNA“ von Macherey-Nagel wurde zur Isolation von RNA aus Zellen verwendet und nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Zur weiteren Aufreinigung der RNA nach erfolgreicher Isolation und dem Verdau etwaiger verbleibender DNA wurde nachfolgend DNase aus dem Kit „NucleoSpin®RNA“ im Verhältnis 1:10 zu der hergestellten RNA-Suspension gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 10 min im 37°C vorgewärmten Wasserbad. Nach Hinzufügen von 3M Natriumacetat im Verhältnis von 1:10 zur RNA-Suspension wurde reiner Ethanol im Verhältnis 1:2,5 beigemischt. Die Lösung wurde für 10 Sekunden gevortext und für 15 Minuten bei 4 °C ruhen gelassen. Im Anschluss wurde die Lösung bei 12 000 rpm für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert und das entstandene Zellpellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und gevortext. Nun wurde erneut bei 4°C für 10 Minuten und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die restliche Flüssigkeit

abgesaugt. Das verbliebene Zellpellet wurde danach in 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser gelöst.

Anschließend wurde die RNA im „NanoDrop8000“ Spectrophometer von Thermo Scientific vermessen und die RNA-Konzentration der Proben bestimmt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

## 6.9 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus der zuvor isolierten RNA wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Fermentas verwendet. Dazu wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser verdünnt und auf 1 $\mu$ g RNA pro 10 $\mu$ L Lösung eingestellt. Zur Synthese der cDNA wurde der „MyCycler“ von BioRad mit dem folgenden Temperaturprogramm (Tabelle 2) und Reaktionsansatz (Tabelle 3) verwendet:

Tabelle 2: Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur	Zeit
1	65 °C	5 min
2	4°C	5 bis 15 Minuten
3	37°C	60 min
4	70°C	5 min

Tabelle 3: Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Volumina	Agenzien
1 µl	Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer
4 µl	Reaction buffer
1 µl	RiboLock Rnase inhibitor (20u/µl)
2 µl	dNTP (Nukleosidtriphosphate) (10 mM)
2 µl	M-MuLV reverse Transcriptase (20u/µl)

### 6.10 RealTime- Polymerase-Kettenreaktion

Für die RT-PCR wurde mit dem „Sensimix SYBR & Fluorescin KIT“ von Bioline gearbeitet. Neben den zu vermessenden Proben wurden zusätzlich jeweils eine Wasser- und eine –RT-Kontrolle mitgeführt. Hierzu wurde folgendes Temperaturprogramm (Tabelle 4) und folgender Reaktionsansatz (Tabelle 5) gewählt:

Tabelle 4: Temperaturprogramm für die RT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	10 Minuten
2	95°C	15 Sekunden
3	60°C	30 Sekunden
	Wiederholung ab Schritt 2, 40x	
4	65°C	31 Sekunden
5	65°C + 0,5 °C/Zyklus	5 Sekunden
	Wiederholung ab Schritt 5, 60x	
6	5°C	∞

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die RT-PCR

<b>Volumina</b>	<b>Agenzien</b>
12,5 µl	SensiMix SYBR & Flourescin
0,1 µl	Forward Primer
0,1 µl	Reverse Primer
7,3 µl	UP-H <sub>2</sub> O
5 µl	cDNA

Für die RT-PCR wurden folgende humane (Tabelle 6) und murine (Tabelle 7) Primer verwendet:

Tabelle 6: Verwendete humane Primer

<b>Primername</b>	<b>Primersequenz (5'-3') for/Rev</b>
<b>β-Aktin</b>	AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
<b>IL17C</b>	ATC TCA CCC TGG AGA TAC ATA CAG CCT CTG CAC AGG CA
<b>IL17RE</b>	CTG CTG TCA GGT GGC TCA GGA AGA CTT TTT GGA TTT CTG
<b>IL17RA</b>	TTC TGT CCA AAC TGA GGC ATC A AGG GTC AAC CAC AAA GTG GC
<b>Bcl-xl</b>	GAT CCC CAT GGC AGC AGT AAA GCA AG CCC CAT CCC GGA AGA GTT CAT TCA CT
<b>Cyclin D1</b>	GCA TGT TCG TGG CCT CTA AG CGT GTT TGC GGA TGA TCT GT
<b>Bcl-2</b>	CTG CAC CTG ACG CCC TTC ACC CAC ATG ACC CCA CCG AAC TCA AAG A

Tabelle 7: Verwendete murine Primer

<b>Primernamen</b>	<b>Primersequenz (5'-3') for/Rev</b>
<b>GAPDH</b>	ATG GTG AAG GTC GGT GTG CAT TCT CGG CCT TGA CTG
<b>IL17C 2</b>	GCT CCT CCA CAC CTG CTA AC AGT GTC AGC TTC CAG CAC CT
<b>IL17RE 2</b>	CCC TCT CTT GGT GAG GAA ATC GCC TAG CAG CTT CCT CTG G
<b>IL17RA</b>	GTG GCG GTT TTC CTT CAG CCA CTT TGT G GAT GCT GTG TGT CCA AGG TCT CCA CAG T
<b>Bcl-xl</b>	GCT GGG ACA CTT TTG TGG AT TGT CTG GTC ACT TCC GAC TG
<b>Cyclin D1</b>	CCA ACA ACT TCC TCT CCT GCT GAC TCC AGA AGG GCT TCA ATC
<b>Bcl-2</b>	TGA GTA CCT GAA CCG GCA TCT GCA TCC CAG CCT CCG TTA T

## 6.11 ELISA

Die Durchführung des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) erfolgte nach Herstellerprotokoll der Firma R&D. Es wurden die ELISA mouse Keratinocyte- chemoattractant (KC) und mouse Macrophage inflammatory protein (MIP-2) verwendet.

## 6.12 MTT-Assay

Die Durchführung des MTT-Assays erfolgte nach Herstellerprotokoll der Firma Biotium.

Sowohl die LLC Zellen als auch die A549 Zellen wurden jeweils in einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml mit einem Volumen von 100  $\mu$ l auf die 96-Well-Platten gegeben und für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml), mit IL-17C (10 ng/ml) und mit der Kombination aus NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und IL-17C (10 ng/ml) für 24 h stimuliert. Nachfolgend wurde 10  $\mu$ l MTT-Lösung in jedes Well gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Proliferationsrate wurde mithilfe von MTT ermittelt.

## 6.13 *In vivo* Methoden

Für alle Tierversuche lag eine Genehmigung des Landesamtes für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Bundeslandes Saarland vor. Die Versuche wurden den nationalen Richtlinien entsprechend durchgeführt. Wildtyp (WT, C57BL6) und IL-17C-knockout (C57BL6, Mutant Mouse Resource and Research Center, MMRRC, USA) Mäuse wurden unter Pathogen-freien Bedingungen gehalten.

### 6.13.1 Applikation von LLC Zellen

Einen Tag vor der Injektion der LLC Zellen in die Schwanzvene wurde der FCS-Gehalt im Kulturmedium auf 0 % reduziert. Am Injektionstag wurden die LLC Zellen gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Nachdem die

Suspension bei 800g für 5 min zentrifugiert worden war, wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in FCS und Antibiotika freies DMEM-Grundmedium aufgenommen und resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit DMEM-Grundmedium auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Bis zur Injektion erfolgte die Lagerung auf Eis.

Die zu behandelnden Mäuse wurden für die Schwanzveneninjektion narkotisiert. Mithilfe einer Rotlichtlampe wurde die Schwanzvene vor der Injektion dilatiert und anschließend 200 µl Zellsuspension gespritzt.

#### 6.13.2 Exposition zu NTHi-Lysaten

Die zu behandelnde Mäuse wurden für die Verneblung in eine Plexiglasbox gesetzt, die an den Pari MASTER nebulizer der Firma Pari angeschlossen war. Die Mäuse wurden 40 min lang mit insgesamt 7 ml NTHi-Lysat vernebelt. Dies erfolgte an den Tagen sieben, zehn und dreizehn nach der LLC-Gabe. Zur Verneblung wurde NTHi-lysat mit einer Gesamtproteinkonzentration von 2,5mg/ml verwendet.

#### 6.13.3 Gewinnung und Aufarbeitung der Bronchoalveolären Lavage (BAL)

Zur Gewinnung der BAL Flüssigkeit wurde eine Vasofix Braunüle in die Trachea der Maus eingeführt. Nachfolgend wurde die Lunge mit 1 ml 1x PBS einmal gespült und die BAL Flüssigkeit anschließend auf Eis gelagert. Die Zentrifugation der BAL Flüssigkeit erfolgte 20 min lang bei 4°C und 350g. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde in

1 ml frischen PBS resuspendiert und nachfolgend für die Bestimmung der Gesamtzellzahl und die Herstellung von Cytospinpräparaten verwendet.

#### 6.13.4 Herstellung von Cytospinpräparate

Zur Herstellung der Cytospinpräparaten wurden 50  $\mu$ l der zuvor beschriebenen BAL-Zellsuspension mit 150  $\mu$ l 1x PBS verdünnt und mithilfe einer Cytospinzentrifuge für 5 min bei 200g auf einen Objektträger aufgetragen. Dieser wurde anschließend in -20°C kaltem Methanol für 10 min gelagert. Die Objektträger wurden für die Färbung von Zellkernen und Zellplasma in Quick Diff Statin Lösung gefärbt, getrocknet und mit Deckgläschen eingedeckt. Die Differenzierung der Zellen in Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Eosinophile erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops.

#### 6.13.5 Zellzahlbestimmung in der BAL

Die Anzahl der in der BAL Flüssigkeit enthaltenen Leukozyten wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l der BAL Flüssigkeit auf die Neubauer Zählkammer gegeben und jeweils 2x9 Großquadrate ausgezählt. Die Werte wurden anschließend gemittelt und auf 1 ml hochgerechnet.

#### 6.13.6 Lungenpräparation

Die Lungen wurden aus der Maus präpariert. Sie wurden danach an einen Scheidetrichter mit einer 4%igen Formalinlösung angeschlossen und für 15 min an der Formalinsäule fixiert. Es erfolgte ein Abbinden der Lunge an der Trachea. Anschließend wurden die Lungen in 4%ige Formalinlösung überführt. Ein Wechsel des Formalins folgte nach 24 h.

#### 6.13.7 Aufarbeitung der Lunge und histologische Schnitte

Vor der Einbettung wurde die Trachea der im Abschnitt zuvor erläuterten präparierten Lunge entfernt. Die Lunge wurde über Nacht in 1x PBS gewaschen. Am Folgetag wurde das PBS gewechselt. Die Lunge wurde auf 60°C vorgewärmt und 6h später das PBS verworfen und die Lunge mit 1,5%iger Agaroselösung überflutet. Anschließend wurde die Lunge bei 60°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag abgekühlt. Die Lunge war nun von fest gewordener Agarose umgeben. Aus diesen Agaroseblöcken wurden 5 mm dicke Schnitte hergestellt und in kleine Waage-Schälchen überführt. Die Schnitte wurden mit 1,5%iger Agaroselösung überschichtet und aushärten gelassen. Nach Aushärtung wurden die Blöcke in 4%iger Formalinlösung bis zur Paraffineinbettung bei Raumtemperatur gelagert. Die Paraffineinbettung fand im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes in Homburg (Saar) statt.

Die Hämatoxylin- und Eosinfärbung histologischer Schnitte wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Hierzu wurden die Gewebeschnitte aus Paraffinblöcken verwendet.

### 6.13.8 Bestimmung der Tumorfläche auf histologischen Schnitten

Die histologischen Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden in das Lichtmikroskop eingescannt. Das Gesamtbild der Lunge wurde in das Programm ImageJ eingespeist. Hier wurde die Gesamtfläche der Lunge und die von Tumor bedeckte Fläche bestimmt. Aus dem Quotient dieser beiden Größen wurde der Anteil der von Tumor bedeckten Fläche ermittelt (50).

## 6.14 Material

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Geräte (Tabelle 8) verwendet:

Tabelle 8: Geräteliste

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
<b>Heraeus Fresco 21 Centrifuge</b>	Thermo Scientific
<b>Vortex 2 Genie</b>	Scientific Industries
<b>Nano Drop 8000 Spectrophometer</b>	Thermo Scientific
<b>C1000 Touch Thermal Cycler</b>	BIORAD
<b>My Cycler Thermalcycler</b>	BIORAD
<b>Megafuge 1.0 R</b>	Thermo Scientific
<b>Hera safe Zellbank</b>	Thermo Scientific
<b>Wasserbad</b>	Köttermann
<b>Pipetten</b>	Gilson
<b>CASY CELL Counter</b>	Innovatis
<b>Zählkammer Neubauer improved</b>	Hartenstein
<b>Brutschrank Hera cell</b>	Heraeus
<b>Mikroplattenleser FLuostar Omega</b>	BMG Labtech

Außerdem wurden folgende Materialien (Tabelle 9) verwendet:

Tabelle 9: Materialliste

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
<b>Tubes</b>	GBO
<b>Zellkulturflaschen</b>	Sarstedt
<b>Zellkulturplatten</b>	GBO
<b>Pipettenspitzen</b>	Braun
<b>PCR Platten</b>	BIORAD
<b>Microseal B seal</b>	BIORAD
<b>Venenkanülen 18G</b>	<b>Vasofix Braunüle</b> Braun
<b>BRANDplates ELISA</b>	Brand

#### 6.14.1 Software

Für das Erstellen von Texten und für Berechnungen wurden die Programme Word, Powerpoint und Excel verwendet. Das Programm GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software, Inc. fand zum Erstellen von Graphiken Anwendung und zur Berechnung von Signifikanzen. Zur Berechnung von Gewebeflächen wurde die Software ImageJ angewandt, ebenso bei der Analyse von immunhistochemischen Färbungen.

## 6.14.2 Lösungen

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Tabelle 10: Verwendete Lösungen

<b>Lösung</b>	<b>Inhalt</b>
<b>Natriumacetat (3 M)</b>	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (246 g/l) , pH 5,2
<b>PBS</b>	$\text{NaCl}$ (8g/l), $\text{KCl}$ (0,2g/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (1,44 g/l) $\times$ 2 $\text{H}_2\text{O}$ , $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,24 g/l), pH 7,4

## 6.14.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem one-way-ANOVA-Test mit Bonferroni-Post-Test. Dabei wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als signifikant mit einem \* versehen, bei einem p-Wert  $< 0,005$  mit \*\* gekennzeichnet und ein p-Wert  $< 0,001$  mit \*\*\* bezeichnet.

## 7 Ergebnisse

Eine der häufigsten Todesursachen weltweit ist die COPD. Patienten mit COPD leiden häufig unter Atemwegsinfekten, da ihre Lungen oft mit Bakterien besiedelt sind. Eines der häufigsten vorzufindenden Lungenpathogene ist dabei NTHi (91). Rauchen gilt hierbei als größter Risikofaktor für die Entstehung von COPD und von Lungenkrebs. COPD selbst ist mit einem vielfach erhöhten Risiko für Lungenkrebs vergesellschaftet. Studien konnten bereits zeigen, dass COPD-typische Bakterien die Abgabe von IL-17C in Atemwegsepithelzellen induzieren und dass IL-17C Entzündung in Atemwegsepithelzellen autokrin reguliert (77; 61).

### 7.1 IL-17C-knockout-Mäuse zeigen nach NTHi-Exposition ein vermindertes Wachstum von Lungenmetastasen

Um den Einfluss von IL-17C auf das Tumorwachstum bei einer pulmonalen Entzündung näher zu charakterisieren, wurden LLC Zellen in die Schwanzvene von weiblichen WT und IL-17C-knockout-Mäusen appliziert. An den Tagen 7, 10 und 13 nach der Injektion der LLC Zellen erfolgte eine Exposition mit NTHi (50). Kontrollgruppen wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum Raumluft exponiert. 19 Tage nach der Schwanzveneninjektion erfolgte eine Analyse der Lungen bezüglich des Tumorwachstums und der pulmonalen Entzündung. Nach der Exposition mit NTHi zeigten sich sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den IL-17C-knockout-Mäusen mehr makroskopisch sichtbare Tumorknoten auf den Lungen im Vergleich zu den mit Luft behandelten Lungen (Abbildung 2). Die

Tumorlast nach NTHi-Exposition scheint bei IL-17C defizienten Mäusen jedoch verglichen mit WT Mäusen vermindert.

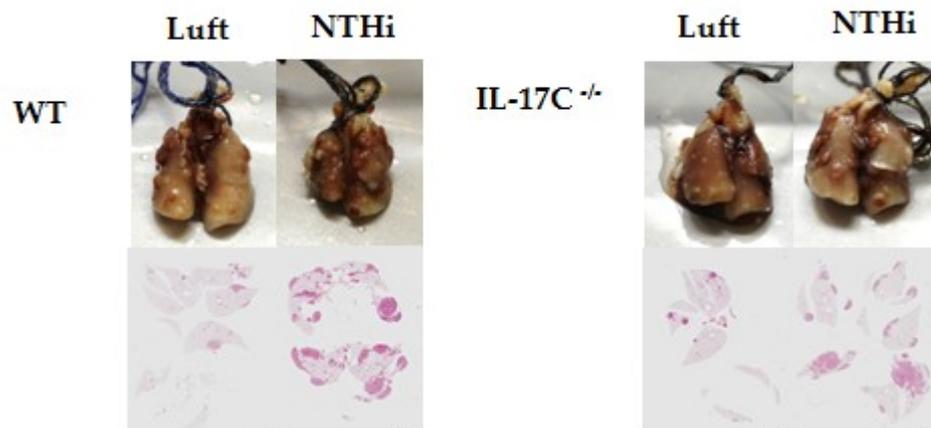


Abbildung 2: Exposition mit NTHi fördert das Wachstum von Lungenmetastasen. Makroskopische und mikroskopische Pathologie der Lungen 19 Tage nach LLC-Injektion. Die Färbung der histologischen Schnitte erfolgte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Maßstabsskala = 250  $\mu$ m.

Die quantitative Auswertung der Tumorlast ergab ein signifikant geringeres Tumorstadium bei IL-17C-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Tieren nach NTHi-Exposition (Abbildung 2). WT-Mäuse zeigten nach Exposition mit NTHi signifikant mehr makroskopisch sichtbare Tumorknoten sowie eine größere von Tumor bedeckte Lungenfläche als Kontrolltiere. IL-17C-knockout-Mäuse, welche zuvor mit NTHi behandelt wurden, wiesen ebenfalls signifikant mehr makroskopisch sichtbare Tumorknoten als die jeweiligen Kontrollen auf, wohingegen die Tumorfläche nur tendenziell erhöht war. Die WT-Mäuse entwickelten unter Einfluss von NTHi signifikant mehr Tumorknoten als die mit NTHi-behandelten IL-17C-knockout-Mäusen. Auch die Tumor bedeckte Lungenfläche war bei NTHi behandelten WT-Mäusen verglichen mit NTHi behandelten IL-17C-knockout-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 3).

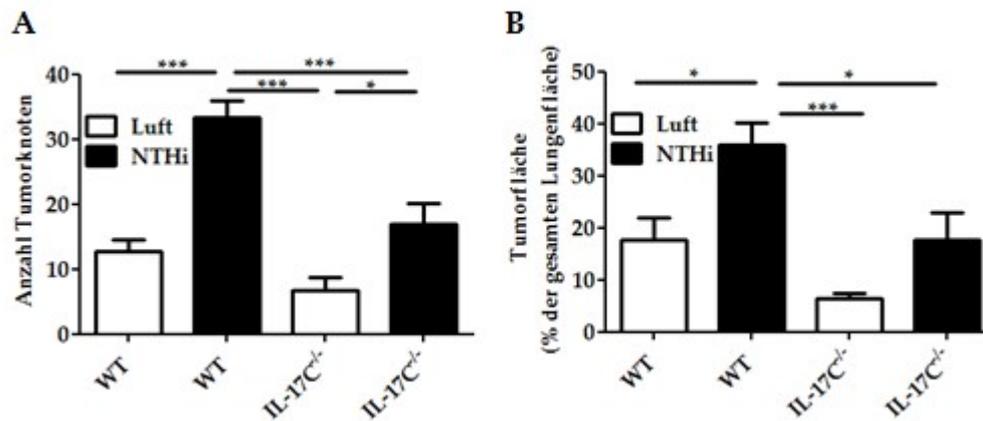


Abbildung 3: Exposition mit NTHi fördert das Wachstum von Lungenmetastasen. (A) Anzahl der makroskopisch sichtbaren Tumorknoten, (B) Tumorfläche in Abhängigkeit der Lungengesamtoberfläche. 19 Tage nach LLC-Injektion ( $5.5 \times 10^5$  Zellen),  $n \geq 5$  pro Gruppe. Signifikanzniveaus: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 7.2 IL-17C-knockout-Mäuse zeigen nach NTHi-Exposition eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum

Mit NTHi behandelte WT-Mäuse zeigten in der BAL Flüssigkeit im Vergleich zu luftexponierten Kontrolltieren eine signifikante Erhöhung der gesamten Entzündungszellen und der neutrophilen Granulozyten. IL-17C-knockout-Tiere wiesen nach NTHi-Exposition in der BAL Flüssigkeit ebenfalls im Vergleich zu den luftexponierten Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Anzahl der gesamten Entzündungszellen auf. Die IL-17C-knockout-Mäuse zeigten jedoch im Vergleich zu NTHi-behandelten WT-Mäusen in der BAL Flüssigkeit nach Exposition von NTHi eine geringere Anzahl der gesamten Entzündungszellen, unter anderen auch der neutrophilen Granulozyten (Abbildung 4). Es zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl an Makrophagen

in der BAL Flüssigkeit zwischen den verschiedenen Gruppen (Daten nicht gezeigt).

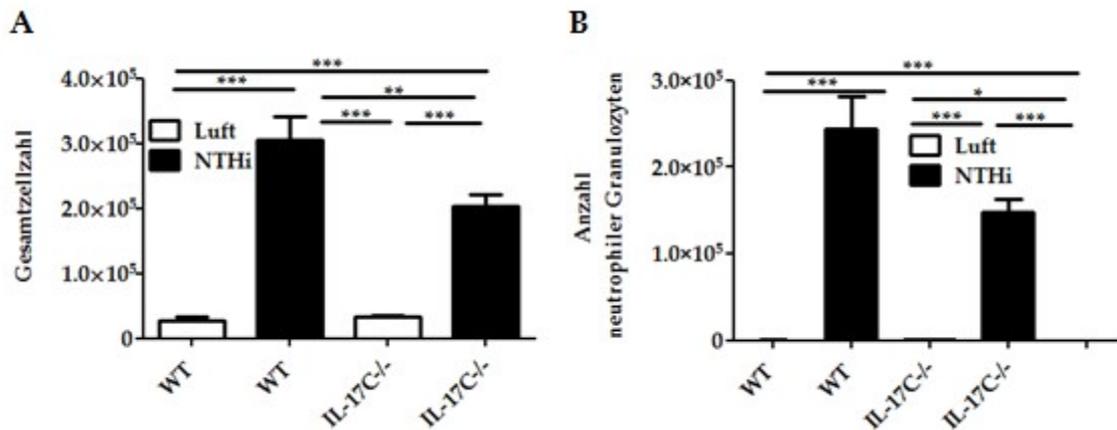


Abbildung 4: IL-17C-knockout-Mäuse weisen nach NTHi-Exposition eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der Lunge auf. (A) Gesamtzahl der Entzündungszellen und (B) Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL Flüssigkeit 14 Tage nach der LLC-Injektion ( $5.5 \times 10^5$  Zellen),  $n \geq 4$  pro Gruppe. Signifikanzniveaus: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

### 7.3 IL-17C verstärkt die durch NTHi induzierte Abgabe von KC und MIP-2 in LLC Zellen

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass die IL-17C-knockout-Tiere nach NTHi-Exposition weniger Entzündungszellen und weniger neutrophile Granulozyten in der BAL Flüssigkeit als die WT-Tiere aufwiesen. Im Rahmen der Immunantwort gehören neutrophile Granulozyten zu den Zellen, die als erstes in entzündetes Gewebe migrieren. Aus diesem Grund wird den Zytokinen, die der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten dienen, eine bedeutende Rolle bei der durch NTHi hervorgerufenen Entzündung zugesprochen. MIP-2 und KC zählen in der Maus zu den Chemokinen, die

neutrophile Granulozyten am stärksten selektiv rekrutieren (16). Deswegen wurden nachfolgend die Zytokine MIP-2 und KC untersucht.

Eine Stimulation von LLC Zellen mit NTHi führte *in vitro* im Vergleich zu den Kontrollen zu einer signifikant erhöhten Ausschüttung von KC und MIP-2. LLC Zellen, die mit IL-17C allein stimuliert wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikant höhere Ausschüttung von MIP-2 und KC auf. Hingegen LLC Zellen, die mit der Kombination aus IL-17C und NTHi stimuliert wurden, zeigten eine synergistische Ausschüttung von KC und MIP-2, die im Vergleich zur Stimulation mit NTHi allein als auch mit IL-17C allein signifikant erhöht war (Abbildung 5).

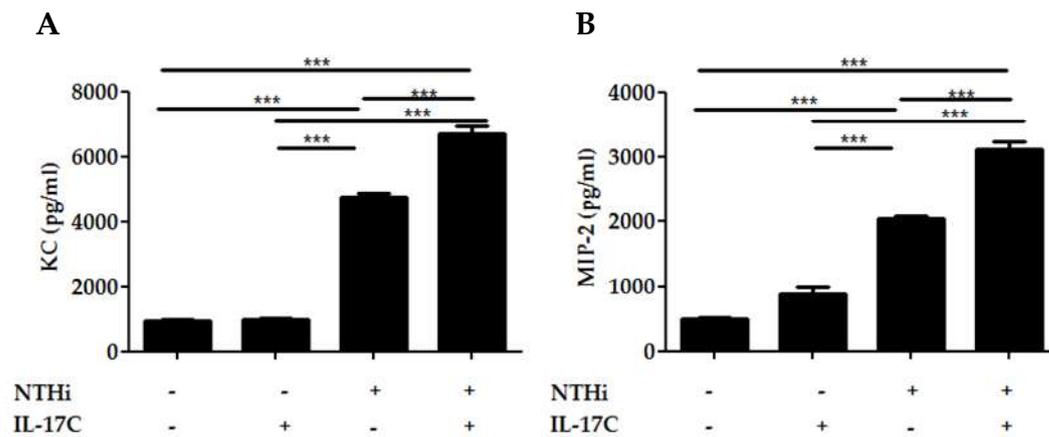


Abbildung 5: IL-17C und NTHi verstärken die Abgabe von KC und MIP-2 in Tumorzellen. Konzentration von (A) KC und (B) MIP-2 in Zellkulturüberständen gemessen mittels ELISA. Die LLC Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^2$  CFU je ml) für 24h stimuliert. IL-17C wurde in einer Konzentration von 40 ng/ml verwendet. Die Daten sind mit Standardabweichung (SD) und  $n = 3$  pro Gruppe dargestellt und repräsentieren den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveau:  $***p < 0,001$ .

#### 7.4 IL-17C wird in LLC Zellen unabhängig von der Stimulation mit NTHi und IL-17C auf niedrigem Niveau exprimiert

Um weitergehend den Einfluss von IL-17C und NTHi auf die Expression von IL-17C in LLC Zellen zu charakterisieren, wurden diese mit IL-17C, NTHi und der Kombination aus beiden stimuliert. Die LLC Zellen zeigten hierbei weder bei Stimulation mit jeweils NTHi und IL-17C allein, noch bei Stimulation mit der Kombination aus IL-17C und NTHi einen signifikanten Unterschied in der relativen Expression von IL-17C. Eine Expression von IL-17C war auf niedrigem Niveau nachweisbar (Abbildung 6).

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es keinen validen ELISA bzw. Antikörper, der es erlaubt, IL-17C aus der Maus auf Proteinebene nachzuweisen.

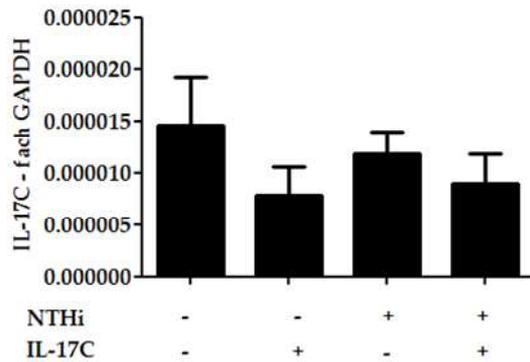


Abbildung 6: IL-17C wird unabhängig von NTHi- und IL-17C-Stimulation exprimiert. Expression von IL-17C bezogen auf die Expression von GAPDH. Die LLC Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und mit IL-17C (40 ng/ml) für 24h stimuliert. Die relative Expression bezogen auf GAPDH wurde über RT-PCR ermittelt. Die Daten sind mit SD und  $n = 3$  pro Gruppe dargestellt und repräsentieren die Mittelwerte von 4 unabhängigen Experimenten.

## 7.5 Die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE werden konstitutiv von LLC Zellen exprimiert

IL-17C wird über einen Rezeptorkomplex aus IL-17RA und IL-17RE erkannt (81). Aus diesem Grund wurde nachfolgend in den LLC Zellen die Expression der beiden Rezeptoren untersucht: Es zeigte sich, dass LLC Zellen sowohl den Rezeptor IL-17RA, als auch den Rezeptor IL-17RE exprimieren. Dies geschah jedoch unabhängig von der Stimulation mit NTHi und IL-17C. Weder nach Stimulation mit NTHi noch nach Stimulation mit IL-17C oder der Kombination aus NTHi/IL-17C war ein signifikanter Unterschied in der relativen Expression der Rezeptoren zu erkennen (Abbildung 7).

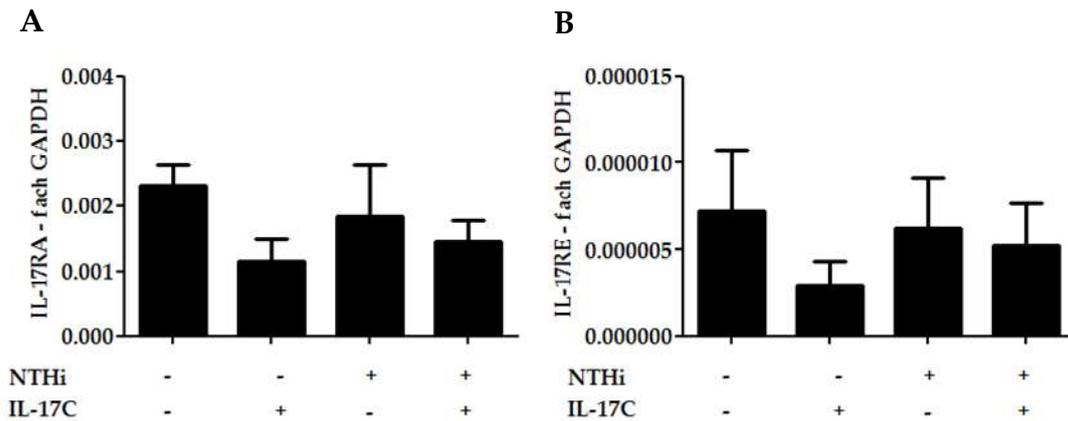


Abbildung 7: Die Expression von den IL-17C-Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE erfolgt unabhängig von NTHi und IL-17C. Expression von (A) IL-17RA und (B) IL-17RE bezogen auf die Expression von GAPDH. Die LLC Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und IL-17C (40 ng/ml) für 24h stimuliert. Die relative Expression bezogen auf GAPDH wurde über RT-PCR ermittelt. Die Daten sind mit SD und  $n = 3$  pro Gruppe dargestellt und repräsentieren die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

## 7.6 IL-17C und NTHi nehmen keinen Einfluss auf den Zellzyklus von LLC Zellen

Song et al. konnten zeigen, dass bei Colitis-assoziiertem Darmkrebs IL-17RE-knockout-Mäuse eine reduzierte Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-xl aufwiesen. Die Expression von Cyclin D1 war jedoch nicht verändert (96). Um zu untersuchen, inwiefern IL-17C Einfluss auf den Zellzyklus von Lungenkrebszellen nimmt, wurden zuerst die Expression dieser drei Gene analysiert.

Bcl-2 und Bcl-xl nehmen eine antiapoptotische Rolle im Rahmen des Tumorzellzyklus ein und regulieren die Initiierung der Apoptose in den Mitochondrien (6). Die Überexpression der Bcl-2-Proteine ist mit einem gesteigerten onkogenen Potential und einem geringen Ansprechen der

Chemotherapie vergesellschaftet (21). Ergebnisse, die in der RT-PCR gewonnen wurden zeigen auf, dass Cyclin D1, Bcl-2 und Bcl-xl von LLC Zellen exprimiert werden. Keines der drei Gene zeigte im Vergleich zur Kontrolle unter Einfluss von NTHi oder IL-17C oder der Kombination aus IL-17C und NTHi einen signifikanten Unterschied in seiner relativen Expression. Die Gene Cyclin D1, Bcl-2 und Bcl-xl werden unabhängig von IL-17C und NTHi exprimiert (Abbildung 8).

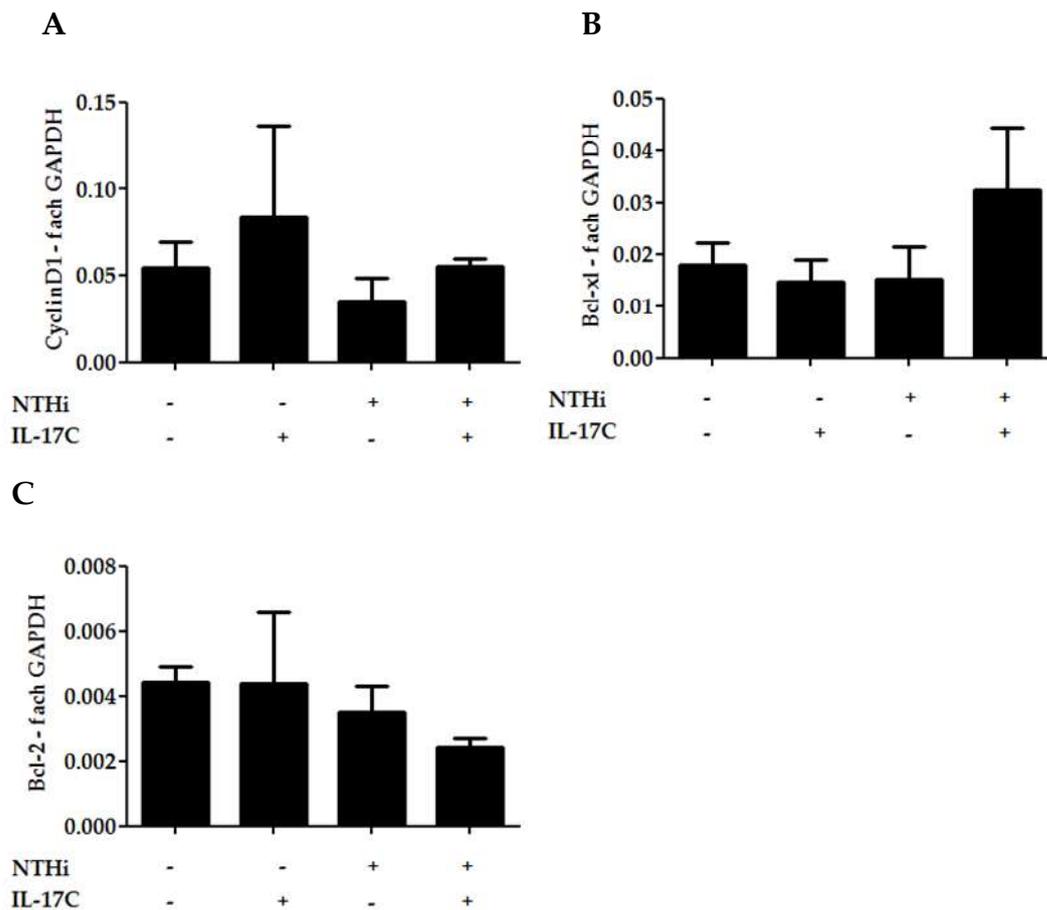


Abbildung 8: NTHi und IL-17C nehmen keinen Einfluss auf die Expression zellzyklusregulierender Gene. Expression von (A) CyclinD1, (B) Bcl-xl und (C) Bcl-2 bezogen auf die Expression von GAPDH. Die LLC Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und IL-17C (40 ng/ml) für 24h stimuliert. Die relative Expression bezogen auf GAPDH wurde über RT-PCR ermittelt. Die Daten sind mit SD und  $n = 3$  pro Gruppe dargestellt und repräsentieren die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

Mithilfe des MTT-Assays zeigt sich bei den LLC Zellen der bereits bekannte Proliferation fördernde Effekt von NTHi. IL-17C allein zeigt keinen Einfluss auf die Proliferation. Bei der Kombination aus IL-17C und NTHi zeigt sich eine verstärkte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle, jedoch im Vergleich zu NTHi alleine ergibt sich keine Veränderung bei der Proliferation (Abbildung 9).

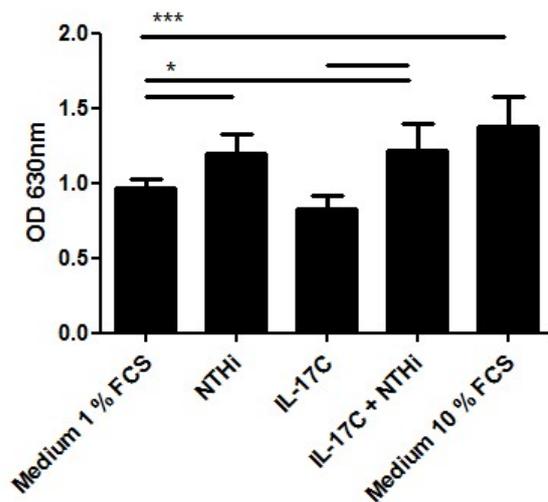


Abbildung 9: IL-17C beeinflusst den Proliferation fördernden Effekt von NTHi nicht. Die LLC Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und IL-17C (10 ng/ml) für 24h stimuliert. Die Proliferationsrate wurde mithilfe von MTT ermittelt. n=7 pro Gruppe, 4 unabhängige Experimente. Signifikanzniveaus: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$

## 7.7 IL-17C wird in A549 Zellen unabhängig von IL-17C und NTHi exprimiert

Um die Wirkung von IL-17C und NTHi auf zellzyklusregulierende Gene in humanen Krebszellen zu untersuchen, wurde die humane Krebszelllinie A549 wie die LLC Zellen mit IL-17C und NTHi stimuliert.

Es zeigte sich, dass humane A549 Zellen das Zytokin IL-17C konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimieren. Wie in den murinen LLC Zellen war die Expression von IL-17C in humanen A549 Zellen unabhängig von der Stimulation mit IL-17C und NTHi. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der relativen Expression von IL-17C, wenn die A549 Zellen mit IL-17C oder NTHi stimuliert wurden. Auch die

Kombination aus IL-17C und NTHi führte zu keiner signifikant veränderten Expression von IL-17C (Abbildung 10).

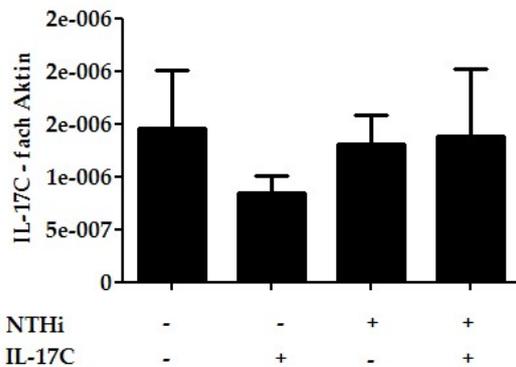


Abbildung 10: IL-17C wird in humanen A549 Zellen unabhängig von IL-17C- und NTHi-Stimulation exprimiert. A549 Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und IL-17C (40 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert. Die relative Expression bezogen auf Aktin wurde über RT-PCR ermittelt. Die Daten sind mit SD und  $n = 3$  pro Gruppe dargestellt und repräsentieren die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

## 7.8 Die Expression der Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE erfolgt in humanen A549 Zellen unabhängig von IL-17C- und NTHi-Stimulation

Ergebnisse, die in der RT-PCR gewonnen wurden, zeigen, dass A549 Zellen die Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE exprimieren. Die Expression der Rezeptoren IL-17RE und IL-17RA war nicht reguliert durch NTHi oder IL-17C. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von IL-17RE und IL-17RA unter Stimulation von IL-17C oder NTHi sowie unter der Stimulation mit der Kombination aus IL-17C und NTHi (Abbildung 11).

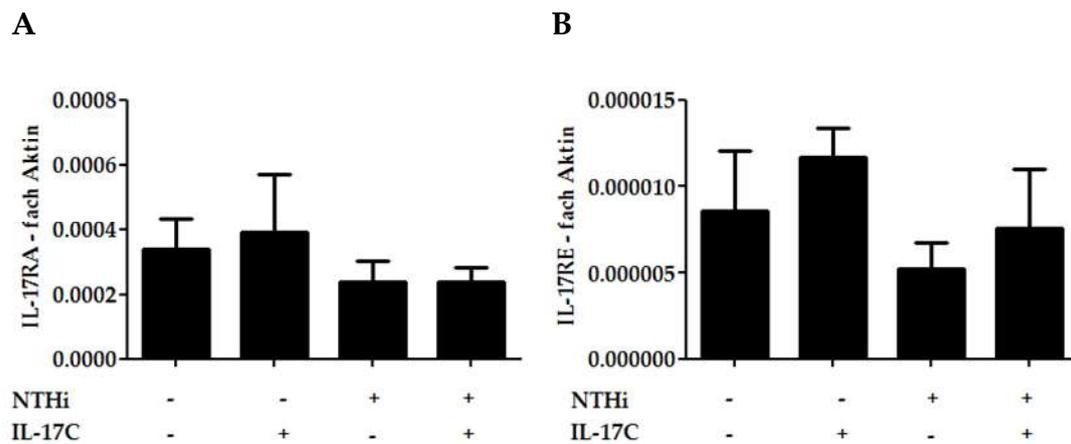


Abbildung 11: A549 Zellen exprimieren die Rezeptoren IL-17RE und IL-17RA unabhängig von IL-17C und NTHi. Expression von (A) IL-17RA und (B) IL-17RE bezogen auf die Expression von Aktin. A549 Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und IL-17C (40 ng/ml) für 24h stimuliert. Die relative Expression bezogen auf Aktin wurde über RT-PCR ermittelt. Die Daten sind mit SD und  $n = 3$  pro Gruppe dargestellt und repräsentieren die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

## 7.9 Zellzyklusgene werden in A549 Zellen unabhängig von IL-17C und NTHi reguliert

Mit Hilfe der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass A549 Zellen die Gene Cyclin D1, Bcl-2 und Bcl-xl exprimieren. Nach der Stimulation der A549 Zellen mit NTHi, IL-17C oder der Kombination aus NTHi und IL-17C konnte kein signifikanter Unterschied in der relativen Expression von Cyclin D1, Bcl-2 und Bcl-xl festgestellt werden. IL-17C, NTHi und die Kombination aus beidem zeigte in der Zelllinie A549 keinen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus (Abbildung 12).

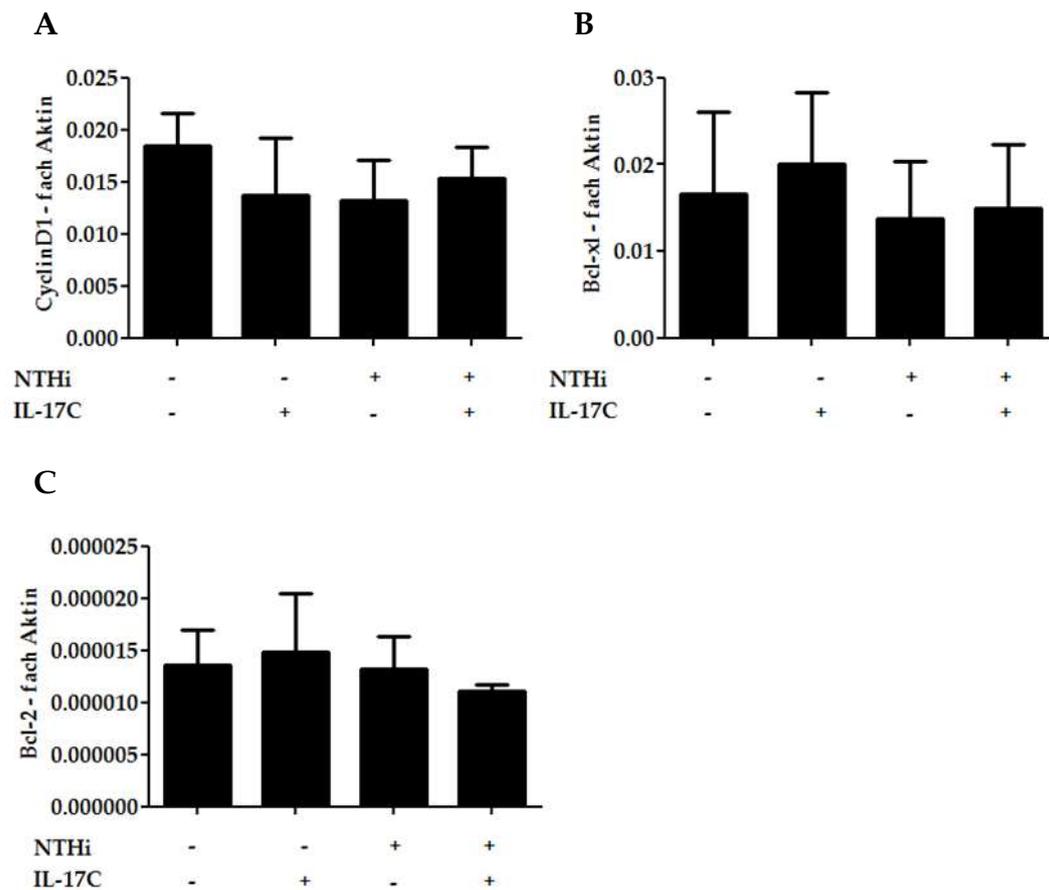


Abbildung 12: IL-17C nimmt keinen Einfluss auf zellzyklusregulierende Gene in A549 Zellen. Die Expression von (A) Cyclin D1, (B) Bcl-xl und (C) Bcl-2 bezogen auf die Expression von Aktin. A549 Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und mit IL-17C (40 ng/ml) für 24h stimuliert. Die relative Expression bezogen auf Aktin wurde über RT-PCR ermittelt. Die Daten sind mit SD und  $n = 3$  pro Gruppe dargestellt und repräsentieren die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

Mithilfe des MTT-Assays zeigt sich bei den A549 Zellen der bereits bekannte Proliferation fördernde Effekt von NTHi im Vergleich zu der Kontrolle. Wie bereits bei der murinen Zellreihe LLC beschrieben, zeigt IL-17C allein auch hier keinen Einfluss auf die Proliferation. Die Kombination aus IL-17C und NTHi führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer verstärkte Proliferation,

jedoch im Vergleich zu NTHi alleine ergibt sich keine Veränderung bei der Proliferation (Abbildung 13).

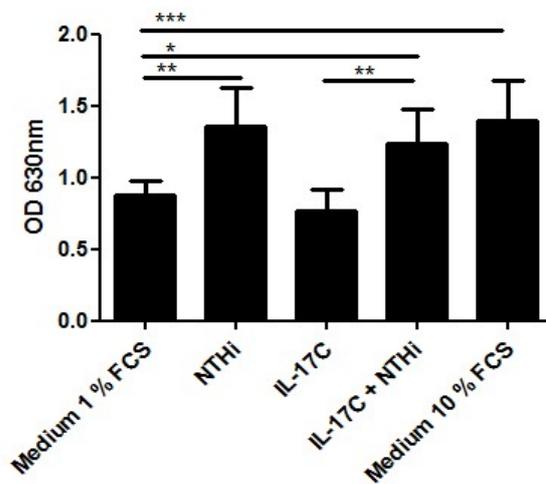


Abbildung 13: IL-17C beeinflusst den Proliferation fördernden Effekt von NTHi nicht. Die A549 Zellen wurden mit hitzeinaktiviertem NTHi ( $10^7$  CFU/ml) und IL-17C (10 ng/ml) für 24h stimuliert. Die Proliferationsrate wurde mithilfe von MTT ermittelt. n=8 pro Gruppe, 4 unabhängige Experimente. Signifikanzniveaus: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

## 8 Diskussion

Lungenkrebs und COPD gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Akute und chronische Entzündungen der Lunge sind charakteristisch für die COPD. Besonders Infektionen der Atemwege mit COPD-typischen Bakterien wie NTHi tragen zur Entzündung der Atemwege bei. Verschiedene Studien zeigten, dass die tumorassoziierte Entzündung eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Lungenkrebs spielt. Es wird angenommen, dass die durch Bakterien ausgelöste pulmonale Entzündung ein Grund für das erhöhte Lungenkrebsrisiko und für die schlechte Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben von COPD Patienten ist. Es ist daher von Bedeutung, den Zusammenhang der pulmonalen Entzündung und dem Wachstum von Lungentumoren genauer zu verstehen. Studien zum Darmkrebs zeigten, dass das epitheliale Zytokin IL-17C zum Tumorwachstum beiträgt, indem es Tumorsuppressorgene reguliert. Diese Arbeit untersucht daher den Einfluss des Zytokins IL-17C auf das Wachstum von Tumorzellen aus der Lunge.

### 8.1 IL-17C-knockout-Mäuse zeigen unter NTHi-Exposition ein vermindertes Wachstum von Lungenmetastasen

Verschiedene Mausstudien zeigten, dass COPD-typische Bakterien wie NTHi das Lungenkrebswachstum fördern (10; 50; 69). Sowohl im metastatischen, als auch in Kras-abhängigen Lungenkrebsmodellen führte eine durch NTHi hervorgerufene pulmonale Entzündung zu einem verstärkten Tumorwachstum (10; 50; 69). Im Kras-Modell konnte gezeigt werden, dass Th-17 und IL-17A Tumorwachstum vermitteln (10). Mit dem auch in dieser Arbeit verwendeten LLC-Modell konnte bereits mit Hilfe von IL-17A

defizienten Mäusen gezeigt werden, dass IL-17A bei pulmonaler Entzündung zur Tumorproliferation und zum Tumorwachstum beiträgt (50). Sowohl im Kras-Modell, als auch im LLC-Modell scheint IL-17A eher über die Regulierung der tumorassoziierten Entzündung zu wirken. Eine direkte Stimulation der Proliferation von Tumorzellen konnte für IL-17A nicht gezeigt werden (10; 50). Im Gegensatz zu IL-17A fördern NTHi und bakterielle Faktoren wie Endotoxin direkt die Tumorproliferation *in vitro* (31; 50). Bakterien können somit einerseits direkt auf Tumorzellen wirken und Tumorproliferation anregen, andererseits aber auch eine für die Tumorphathogenese günstige tumorassoziierte Entzündung vorantreiben.

Wie in den einleitenden Worten zu Beginn der Arbeit dargelegt, wird IL-17C im Gegensatz zu IL-17A von Epithelzellen gebildet. Es gibt jedoch Parallelen in der Wirkweise von IL-17A und IL-17C. So induzieren beide Zytokine die Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Muzine und antimikrobielle Peptide. Beide Zytokine verstärken die durch Bakterien induzierte epitheliale Expression von Chemokinen, die inflammatorische Zellen wie neutrophile Granulozyten rekrutieren (8; 25; 61; 77; 97; 109).

Eine Funktion von IL-17C konnte beim kolorektalen Karzinom aufgezeigt werden. Song et al. gelang es zu zeigen, dass IL-17C sowohl in menschlichen kolorektalen Karzinomzellen als auch im Mausmodell bei kolorektalem Karzinom verstärkt gebildet wird (96). Es konnte dargelegt werden, dass IL-17C im Frühstadium des Darmtumors von intestinalen Epithelzellen produziert wird. IL-17RE-knockout-Mäuse wiesen ein stark verringertes intestinales Tumorwachstum auf, was mit einer reduzierten Expression proinflammatorischer Gene einherging (96).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IL-17C defiziente Mäusen nach Exposition mit NTHi eine verringerte Tumorlast als WT-Mäuse aufwiesen. Es stellte sich daher die Frage, auf welche Weise IL-17C in dem hier verwendeten LLC-Modell Tumorwachstum fördert.

Im Darmkrebsmodell konnte dargelegt werden, dass eine dysregulierte Mikrobiota im Darm die Expression von IL-17C speziell in intestinalen Epithelzellen hochreguliert und dass IL-17C die Tumorbildung im Darm fördert, indem es das Überleben der Darmepithelzellen verlängert (96). Song et al. konnten zeigen, dass bei Colitis assoziiertem Darmkrebs IL-17RE-knockout-Mäuse eine reduzierte Expression der antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-xl aufwiesen. Die Expression von Cyclin D1 wurde durch IL-17C jedoch nicht beeinflusst (96). Cyclin D1 beschleunigt den Übergang von G<sub>1</sub> – Phase in die S-Phase und ist für die Zellproliferation entscheidend (32). Nach Song et al. induziert IL-17C die Expression der antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-xl in Darmepithelzellen *in vitro*. So wird die Apoptose der Epithelzellen im Darm verhindert und IL-17C vermittelt die durch Mikroorganismen geförderte Tumorentstehung und Progression (96).

In dieser Arbeit wurde daher untersucht, inwiefern IL-17C alleine und in Kombination mit Bakterien antiapoptotischen Gene reguliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass sich die Erkenntnisse aus dem Darmkrebsmodell nicht auf die pulmonalen Tumorzellen übertragen lassen. Im Gegensatz zu den intestinalen Epithelzellen konnte mit Hilfe von LLC Zellen und humanen A549 Zellen gezeigt werden, dass die Expression der antiapoptotisch wirkenden Genen Bcl-2 und Bcl-xl und von Cyclin D1 durch IL-17C unbeeinflusst ist. Nach Stimulation mit IL-17C konnte keine veränderte Expression von Bcl-2, Bcl-xl und von Cyclin D1 im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden. Selbst nach Stimulation mit NTHi, welches

den Einfluss einer dysregulierten Mikrobiota simulierte und der Kombination aus IL-17C und NTHi zeigten sowohl LLC Zellen als auch A549 Zellen keinen Unterschied in der Expression dieser Gene im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Nach Jungnickel et al. regt NTHi die Proliferation sowohl in LLC Zellen als auch in humanen A549 Zellen an, worauf IL-17A keinen Einfluss besitzt (50).

In dieser Arbeit konnte mittels MTT-Assay bestätigt werden, dass NTHi die Proliferation von Tumorzellen anregt. Wie IL-17A zeigte auch IL-17C keinen Einfluss auf die Tumorphiliferation *in vitro*. Auch die Kombination aus IL-17C und NTHi bewirkte keine veränderte Proliferation. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die durch NTHi angeregte Proliferation nicht durch IL-17C beeinflusst wird.

## 8.2 IL-17C-knockout-Mäuse zeigen unter NTHi-Exposition eine verminderte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Defizienz für IL-17C im LLC-Mausmodell zu einem reduziertem Tumorwachstum führt. *In vitro* konnte jedoch keine Wirkung von IL-17C und NTHi auf das Zellzyklusgen Cyclin D1 und die antiapoptotischen Gene Bcl-2 und Bcl-xl in A549 und LLC Zellen festgestellt werden. Auch die Proliferation von A549 und LLC Zellen wurde durch IL-17C nicht beeinflusst. Es zeigte sich jedoch, dass IL-17C defiziente Mäuse nach Exposition mit NTHi signifikant weniger Gesamtzellen und neutrophile Granulozyten in der BAL als Kontrolltiere aufwiesen. IL-17C fördert demnach die NTHi-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien, die zeigen, dass IL-17C Entzündung in Strukturzellen wie Epithelzellen

autokrin vermittelt, was zu einer Expression von Chemokinen und zur Rekrutierung von Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten beiträgt (13; 61; 77; 81; 97; 109). Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die intranasale Gabe von IL-17C exprimierenden Adenoviren zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge führt (38). Zudem war die neutrophile Entzündung der Lunge bei IL-17C defiziente Mäusen in einem akuten *P. aeruginosa* Pneumoniemodell vermindert (104). Die Ergebnisse dieser Studie legen daher nahe, dass IL-17C die Entzündung in der Tumormikroumgebung reguliert, welche durch gramnegative Bakterien wie NTHi hervorgerufen wird.

Die Infiltration von inflammatorischen Zellen wie neutrophilen Granulozyten oder Makrophagen in die Tumormikroumgebung ist ein wichtiges Phänomen bei der Entstehung und dem Wachstum von Lungentumoren (54; 63; 100). Neutrophile Granulozyten bilden den Hauptanteil der Leukozyten im menschlichen Blut und sind auf die Abwehr mikrobieller Pathogene spezialisiert. Aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer wurde ihre Rolle im Rahmen der tumorassoziierten Entzündung lange unterschätzt. Untersuchungen weisen jedoch auf eine tumorfördernde Funktion von neutrophilen Granulozyten hin. Epidemiologische Studien zeigten, dass die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in den Tumor bei Menschen mit einer schlechten Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben verknüpft ist. Dies wurde beispielweise für das Bronchialkarzinom, Klarzellkarzinom, Leberkarzinom und Kolonkarzinom bereits nachgewiesen (46; 59; 82; 102; 108). Auch in Mausmodellen zeigte sich, dass neutrophile Granulozyten Tumorwachstum und Metastasierung fördern können (13; 20; 58; 106). Es wurde zum Beispiel dargelegt, dass in der entzündeten Lunge neutrophile Granulozyten Proteasen abgeben, die den anti-tumorigenen Faktor

Thrombospondin-1 (Tsp-1) abbauen und so Tumorwachstum fördern (20). Im Kras-Modell zeigte sich, dass neutrophile Elastase das Wachstum von Lungenkrebs über den Abbau des Insulinrezeptorsubstrats (IRS-1) fördert (35). *In vitro* Experimente verdeutlichten, dass ein direkter Zell-Zell Kontakt zwischen Tumorzellen und neutrophilen Granulozyten die Proliferation von Tumorzellen fördert (31). Die Rolle neutrophiler Granulozyten bleibt jedoch umstritten, da in anderen Tumorarten wie zum Beispiel dem Magentumor eine Infiltration von neutrophiler Granulozyten mit einer besseren Prognose einhergeht (9).

Die Funktion neutrophiler Granulozyten beim bakteriell induzierten Wachstum von Lungentumoren des in dieser Arbeit verwendeten Metastasemodells muss daher noch genauer untersucht werden. Ein Ansatz wäre hierbei Mäuse vor der NTHi-Exposition mit Hilfe von Antikörpern zu behandeln, die gegen neutrophile Granulozyten gerichtet sind.

### 8.3 IL-17C und seine Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE werden unabhängig von NTHi und IL-17C exprimiert

Der funktionelle Rezeptor für IL-17C besteht aus den Untereinheiten IL-17RA und IL-17RE (11; 81; 97). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl LLC Zellen als auch A549 Zellen die beiden Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE exprimieren. Somit sind diese Zelllinien potentiell sensitiv für IL-17C und können dieses erkennen. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht jedoch, dass sich die Stärke der Expression dieser Rezeptoren durch Stimulation von NTHi, IL-17C oder der Kombination aus NTHi/IL-17C nicht beeinflussen lässt.

Darüber hinaus wurde die Expression von IL-17C analysiert. Die mRNA für IL-17C war auf niedrigem Niveau in sowohl A549 Zellen als auch in LLC Zellen nachweisbar. Es konnte jedoch keine verstärkte Expression von IL-17C nach Stimulation mit NTHi, IL-17C oder NTHi/IL-17C nachgewiesen werden. Ein valider ELISA für IL-17C aus der Maus existierte zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten nicht. Im Gegensatz dazu konnten vorherige Studien zeigen, dass IL17C das einzige Mitglied der IL17-Familie ist, welches sich in Epithelzellen der Atemwege durch bakterielle Pathogene wie *H. influenzae* oder *P. aeruginosa* induzieren lässt (77). Darüber hinaus ist IL-17C auch in der humanen bronchialen Krebszelllinie Calu-3 durch mikrobielle Bestandteile induzierbar (77). Das Expressionsprofil von IL-17C scheint sich daher zwischen verschiedenen Tumorzellen zu unterscheiden. In Tumormodellen mit LLC Zellen scheint die tumorfördernde Wirkung von IL-17C vielmehr von Strukturzellen wie Atemwegsepithelzellen auszugehen, die im Rahmen NTHi-induzierter Entzündung IL-17C abgeben. Da die Rezeptoren für IL-17C auch von LLC Zellen gebildet werden, moduliert IL-17C Entzündung in der Tumormikroumgebung möglicherweise über die Aktivierung der LLC Zellen selbst sowie über andere Zelltypen wie Atemwegsepithelzellen, die die IL-17C Rezeptoren exprimieren.

#### 8.4 IL-17C verstärkt die NTHi-induzierte Ausschüttung von KC und MIP-2

Die Chemokine MIP-2 und KC vermitteln die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündetem Gewebe (16). Neben Granulozyten rekrutiert MIP-2 auch hämatopoetische Stammzellen und Vorläuferzellen (76). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass IL-17C *in vitro* die NTHi-induzierte

Expression von MIP-2 und KC steigert. Jungnickel et al. konnten in einem Mausmetastasen-Modell mit LLC Zellen bereits demonstrieren, dass die Exposition von Mäusen mit NTHi zu einer neutrophilen Entzündung in der Lunge führt. Dies ging mit erhöhten pulmonalen Konzentrationen von Zytokinen wie IL-17A, MIP1- $\beta$  und KC einher (50). Da IL-17C bei NTHi-Stimulation die Bildung von MIP-2 und KC in LLC Zellen steigert, tragen im LLC Modell möglicherweise auch IL-17C-aktivierte Tumorzellen zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung bei.

## 9 Schlussbemerkung

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen eine Funktion von IL-17C beim Tumorwachstum in der Lunge auf. IL-17C wirkte sich nicht auf zellzyklus- und apoptoseregulierende Gene wie Cyclin D1, Bcl-2 und Bcl-xl und auch nicht auf die Proliferation von Tumorzellen aus. *In vitro* verstärkte IL-17C jedoch die Bildung von Chemokinen wie KC und MIP-2, welche die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermitteln. Bei IL-17C defizienten Tieren war die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nach NTHi-Exposition in die Lunge *in vivo* vermindert. Dies ging mit einem verminderten Tumorwachstum einher. Im LLC Modell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, scheint IL-17C daher Entzündung in der Lunge und besonders in der Tumormikroumgebung zu vermitteln und auf diese Weise das Tumorwachstum zu fördern. Die erzielten Ergebnisse reichen jedoch nicht aus, um zu schlussfolgern, ob IL-17C Tumorwachstum nach NTHi-Exposition verstärkt, indem es autokrin Entzündung in Atemwegsepithelzellen reguliert oder direkt entzündungsfördernde Mechanismen in Krebszellen aktiviert. Da Tumorzellen die Rezeptoren für IL-17C bilden und die Abgabe von neutrophilen Chemokinen in LLC Zellen durch IL-17C gefördert wird, scheint die tumorfördernde Wirkung von IL-17C auch über die Tumorzellen selbst vermittelt zu werden. Im Darmkrebsmodell wurde gezeigt, dass IL-17C in Mäusen auch die Expression von antiapoptotischen Gene reguliert und sich dies auf das Wachstum von Primärtumoren auswirkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit können eine Wirkung von IL-17C auf zellzyklus- und apoptoseregulierende Gene bei der Entstehung von Primärtumoren in der Lunge nicht ausschließen. Das verwendete Metastasemodell scheint hierfür aufgrund des relativ kurzen Beobachtungszeitraums ungeeignet. Kras-

abhängige und chemische Lungenkrebsmodelle sind hier besser geeignet, um die Wirkung von IL-17C auf die Entstehung primärer Lungentumore mit Fokus auf zellzyklus- und apoptoseregulierende Gene zu untersuchen.

## 10 Literaturverzeichnis

1. **Adcock IM, Caramori G and Barnes PJ.** Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights. *Respiration* 81: 265-284, 2011.
2. **Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV and Sung B.** Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. *Clin Cancer Res* 15: 425-430, 2009.
3. **Ahmed M and Gaffen SL.** IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 449-453, 2010.
4. **Al OS, Flanagan BF, Almeahadi M and Christmas SE.** The effects of IL-17 upon human natural killer cells. *Cytokine* 62: 123-130, 2013.
5. **Alberg AJ and Samet JM.** Epidemiology of lung cancer. *Chest* 123: 21S-49S, 2003.
6. **Antonsson B and Martinou JC.** The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256: 50-57, 2000.

7. **Ben-Neriah Y and Karin M.** Inflammation meets cancer, with NF-kappaB as the matchmaker. *Nat Immunol* 12: 715-723, 2011.
8. **Butcher MJ, Waseem TC and Galkina EV.** Smooth Muscle Cell-Derived Interleukin-17C Plays an Atherogenic Role via the Recruitment of Proinflammatory Interleukin-17A+ T Cells to the Aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 1496-1506, 2016.
9. **Caruso RA, Bellocco R, Pagano M, Bertoli G, Rigoli L and Inferrera C.** Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Mod Pathol* 15: 831-837, 2002.
10. **Chang SH, Mirabolfathinejad SG, Katta H, Cumpian AM, Gong L, Caetano MS, Moghaddam SJ and Dong C.** T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 5664-5669, 2014.
11. **Chang SH, Reynolds JM, Pappu BP, Chen G, Martinez GJ and Dong C.** Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E. *Immunity* 35: 611-621, 2011.

12. **Chang Y, Nadigel J, Boulais N, Bourbeau J, Maltais F, Eidelman DH and Hamid Q.** CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 12: 43, 2011.
13. **Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, Verstegen NJ, Ciampricotti M, Hawinkels LJ, Jonkers J and de Visser KE.** IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 522: 345-348, 2015.
14. **Cua DJ and Tato CM.** Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 479-489, 2010.
15. **de Torres JP, Bastarrika G, Wisnivesky JP, Alcaide AB, Campo A, Seijo LM, Pueyo JC, Villanueva A, Lozano MD, Montes U, Montuenga L and Zulueta JJ.** Assessing the relationship between lung cancer risk and emphysema detected on low-dose CT of the chest. *Chest* 132: 1932-1938, 2007.
16. **De FK, Henderson RB, Laschinger M and Hogg N.** Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol* 180: 4308-4315, 2008.

17. **Decramer M, Janssens W and Miravittles M.** Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 379: 1341-1351, 2012.
  
18. **Dhalla F, Fox H, Davenport EE, Sadler R, Anzilotti C, van Schouwenburg PA, Ferry B, Chapel H, Knight JC and Patel SY.** Chronic mucocutaneous candidiasis: characterization of a family with STAT-1 gain-of-function and development of an ex-vivo assay for Th17 deficiency of diagnostic utility. *Clin Exp Immunol* 184: 216-227, 2016.
  
19. **Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de CL, Lebecque S, Fridman WH and Cadranel J.** Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol* 26: 4410-4417, 2008.
  
20. **El RT, Catena R, Lee S, Stawowczyk M, Joshi N, Fischbach C, Powell CA, Dannenberg AJ, Altorki NK, Gao D and Mittal V.** Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 16000-16005, 2015.

21. **Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, Distefano M, Filippetti F, Martinelli E, Ferrandina G, Gallo D, Ranelletti FO and Scambia G.** Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance. *Mol Pharmacol* 64: 51-58, 2003.
22. **Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T and Fujiyama Y.** Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70, 2003.
23. **Fujisawa T, Chang MM, Velichko S, Thai P, Hung LY, Huang F, Phuong N, Chen Y and Wu R.** NF-kappaB mediates IL-1beta- and IL-17A-induced MUC5B expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 246-252, 2011.
24. **Fujisawa T, Velichko S, Thai P, Hung LY, Huang F and Wu R.** Regulation of airway MUC5AC expression by IL-1beta and IL-17A; the NF-kappaB paradigm. *J Immunol* 183: 6236-6243, 2009.
25. **Gaffen SL.** Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 9: 556-567, 2009.

26. **Gaffen SL, Jain R, Garg AV and Cua DJ.** The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol* 14: 585-600, 2014.
27. **Grivennikov SI, Greten FR and Karin M.** Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140: 883-899, 2010.
28. **Grivennikov SI, Kuprash DV, Liu ZG and Nedospasov SA.** Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms. *Int Rev Cytol* 252: 129-161, 2006.
29. **Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, Taniguchi K, Yu GY, Osterreicher CH, Hung KE, Datz C, Feng Y, Fearon ER, Oukka M, Tessarollo L, Coppola V, Yarovinsky F, Cheroutre H, Eckmann L, Trinchieri G and Karin M.** Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* 491: 254-258, 2012.
30. **Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS and Mannino DM.** Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 28: 523-532, 2006.

31. **Hattar K, Savai R, Subtil FS, Wilhelm J, Schmall A, Lang DS, Goldmann T, Eul B, Dahlem G, Fink L, Schermuly RT, Banat GA, Sibelius U, Grimminger F, Vollmer E, Seeger W and Grandel U.** Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunol Immunother* 62: 309-320, 2013.
32. **Hitomi M and Stacey DW.** Cellular ras and cyclin D1 are required during different cell cycle periods in cycling NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 19: 4623-4632, 1999.
33. **Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV and Gold R.** Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 237: 123-130, 2005.
34. **Holland DB, Bojar RA, Farrar MD and Holland KT.** Differential innate immune responses of a living skin equivalent model colonized by *Staphylococcus epidermidis* or *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 290: 149-155, 2009.

35. **Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, Stolz DB, Land SR, Marconcini LA, Kliment CR, Jenkins KM, Beaulieu KA, Mouded M, Frank SJ, Wong KK and Shapiro SD.** Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med* 16: 219-223, 2010.
36. **Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, Antoni C, Draelos Z, Gold MH, Durez P, Tak PP, Gomez-Reino JJ, Foster CS, Kim RY, Samson CM, Falk NS, Chu DS, Callanan D, Nguyen QD, Rose K, Haider A and Di PF.** Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med* 2: 52ra72, 2010.
37. **Hung LY, Velichko S, Huang F, Thai P and Wu R.** Regulation of airway innate and adaptive immune responses: the IL-17 paradigm. *Crit Rev Immunol* 28: 269-279, 2008.
38. **Hurst SD, Muchamuel T, Gorman DM, Gilbert JM, Clifford T, Kwan S, Menon S, Seymour B, Jackson C, Kung TT, Brieland JK, Zurawski SM, Chapman RW, Zurawski G and Coffman RL.** New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol* 169: 443-453, 2002.

39. **Hvid M, Vestergaard C, Kemp K, Christensen GB, Deleuran B and Deleuran M.** IL-25 in atopic dermatitis: a possible link between inflammation and skin barrier dysfunction? *J Invest Dermatol* 131: 150-157, 2011.
40. **Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami S, Hirose K, Suto A, Saito Y and Iwamoto I.** Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 101: 3594-3596, 2003.
41. **Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S and Nakae S.** Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34: 149-162, 2011.
42. **Iwasaki A and Medzhitov R.** Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327: 291-295, 2010.
43. **Iwasaki A and Medzhitov R.** Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16: 343-353, 2015.
44. **Jackman DM and Johnson BE.** Small-cell lung cancer. *Lancet* 366: 1385-1396, 2005.

45. **Janeway CA, Jr.** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13, 1989.
46. **Jensen HK, Donskov F, Marcussen N, Nordmark M, Lundbeck F and von der MH.** Presence of intratumoral neutrophils is an independent prognostic factor in localized renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 27: 4709-4717, 2009.
47. **Jin W and Dong C.** IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect* 2: e60, 2013.
48. **Johansen C, Riis JL, Gedebjerg A, Kragballe K and Iversen L.** Tumor necrosis factor alpha-mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor kappaB. *J Biol Chem* 286: 25487-25494, 2011.
49. **Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L and Kragballe K.** Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 160: 319-324, 2009.
50. **Jungnickel C, Wonnenberg B, Karabiber O, Wolf A, Voss M, Wolf L, Honecker A, Kamyschnikow A, Herr C, Bals R and Beisswenger C.**

- Cigarette smoke-induced disruption of pulmonary barrier and bacterial translocation drive tumor-associated inflammation and growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L605-L613, 2015.
51. **Junttila MR and de Sauvage FJ.** Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* 501: 346-354, 2013.
52. **Karin M.** Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 441: 431-436, 2006.
53. **Karin M and Greten FR.** NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5: 749-759, 2005.
54. **Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo JL and Karin M.** Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457: 102-106, 2009.
55. **Kokubu T, Haudenschild DR, Moseley TA, Rose L and Reddi AH.** Immunolocalization of IL-17A, IL-17B, and their receptors in

- chondrocytes during fracture healing. *J Histochem Cytochem* 56: 89-95, 2008.
56. **Kolls JK and Khader SA.** The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 21: 443-448, 2010.
57. **Kolls JK and Linden A.** Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21: 467-476, 2004.
58. **Kowanetz M, Wu X, Lee J, Tan M, Hagenbeek T, Qu X, Yu L, Ross J, Korsisaari N, Cao T, Bou-Reslan H, Kallop D, Weimer R, Ludlam MJ, Kaminker JS, Modrusan Z, van BN, Peale FV, Carano R, Meng YG and Ferrara N.** Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 21248-21255, 2010.
59. **Kuang DM, Zhao Q, Wu Y, Peng C, Wang J, Xu Z, Yin XY and Zheng L.** Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 54: 948-955, 2011.

60. **Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL, Aujla SJ, Reardon B, Moore M, Shea P, Schreckhise R, Bukowski TR, Presnell S, Guerra-Lewis P, Parrish-Novak J, Ellsworth JL, Jaspers S, Lewis KE, Appleby M, Kolls JK, Rixon M, West JW, Gao Z and Levin SD.** Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* 179: 5462-5473, 2007.
61. **Kusagaya H, Fujisawa T, Yamanaka K, Mori K, Hashimoto D, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Wu R, Maekawa M, Suda T and Chida K.** Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50: 30-39, 2014.
62. **Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H and Skapenko A.** Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 62: 2876-2885, 2010.
63. **Li D, Beisswenger C, Herr C, Hellberg J, Han G, Zakharkina T, Voss M, Wiewrodt R, Bohle RM, Menger MD, Schmid RM, Stockel D, Lenhof HP and Bals R.** Myeloid cell RelA/p65 promotes lung cancer

- proliferation through Wnt/beta-catenin signaling in murine and human tumor cells. *Oncogene* 33: 1239-1248, 2014.
64. **Li D, Beisswenger C, Herr C, Schmid RM, Gallo RL, Han G, Zakharkina T and Bals R.** Expression of the antimicrobial peptide cathelicidin in myeloid cells is required for lung tumor growth. *Oncogene* 33: 2709-2716, 2014.
65. **Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R and Steinman L.** Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8: 500-508, 2002.
66. **Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJ, Joosten LA and van den Berg WB.** Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50: 650-659, 2004.

67. **Mannino DM, Homa DM, Akinbami LJ, Ford ES and Redd SC.** Chronic obstructive pulmonary disease surveillance--United States, 1971-2000. *MMWR Surveill Summ* 51: 1-16, 2002.
68. **Mayne ST, Buenconsejo J and Janerich DT.** Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 149: 13-20, 1999.
69. **Moghaddam SJ, Li H, Cho SN, Dishop MK, Wistuba II, Ji L, Kurie JM, Dickey BF and Demayo FJ.** Promotion of lung carcinogenesis by chronic obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-induced mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 443-453, 2009.
70. **Moore EE, Presnell S, Garrigues U, Guilbot A, LeGuern E, Smith D, Yao L, Whitmore TE, Gilbert T, Palmer TD, Horner PJ and Kuestner RE.** Expression of IL-17B in neurons and evaluation of its possible role in the chromosome 5q-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord* 12: 141-150, 2002.
71. **Nestle FO, Di MP, Qin JZ and Nickoloff BJ.** Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 679-691, 2009.

72. **Pappu R, Ramirez-Carrozzi V and Sambandam A.** The interleukin-17 cytokine family: critical players in host defence and inflammatory diseases. *Immunology* 134: 8-16, 2011.
73. **Pappu R, Rutz S and Ouyang W.** Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends Immunol* 33: 343-349, 2012.
74. **Parker D and Prince A.** Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 189-201, 2011.
75. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108, 2005.
76. **Pelus LM and Fukuda S.** Peripheral blood stem cell mobilization: the CXCR2 ligand GRObeta rapidly mobilizes hematopoietic stem cells with enhanced engraftment properties. *Exp Hematol* 34: 1010-1020, 2006.
77. **Pfeifer P, Voss M, Wonnemberg B, Hellberg J, Seiler F, Lepper PM, Bischoff M, Langer F, Schafers HJ, Menger MD, Bals R and Beisswenger C.** IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 48: 415-421, 2013.

78. **Pirozynski M.** 100 years of lung cancer. *Respir Med* 100: 2073-2084, 2006.
79. **Polk DB and Peek RM, Jr.** Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer* 10: 403-414, 2010.
80. **Pollard JW.** Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4: 71-78, 2004.
81. **Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, Hackney J, Kim J, Zhou M, Lai J, Modrusan Z, Sai T, Lee W, Xu M, Caplazi P, Diehl L, de VJ, Balazs M, Gonzalez L, Jr., Singh H, Ouyang W and Pappu R.** IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol* 12: 1159-1166, 2011.
82. **Rao HL, Chen JW, Li M, Xiao YB, Fu J, Zeng YX, Cai MY and Xie D.** Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One* 7: e30806, 2012.
83. **Rathore JS and Wang Y.** Protective role of Th17 cells in pulmonary infection. *Vaccine* 34: 1504-1514, 2016.

84. **Reppert S, Boross I, Koslowski M, Tureci O, Koch S, Lehr HA and Finotto S.** A role for T-bet-mediated tumour immune surveillance in anti-IL-17A treatment of lung cancer. *Nat Commun* 2: 600, 2011.
85. **Reynolds JM, Lee YH, Shi Y, Wang X, Angkasekwinai P, Nallaparaju KC, Flaherty S, Chang SH, Watarai H and Dong C.** Interleukin-17B Antagonizes Interleukin-25-Mediated Mucosal Inflammation. *Immunity* 42: 692-703, 2015.
86. **Rizzo HL, Kagami S, Phillips KG, Kurtz SE, Jacques SL and Blauvelt A.** IL-23-mediated psoriasis-like epidermal hyperplasia is dependent on IL-17A. *J Immunol* 186: 1495-1502, 2011.
87. **Roos AB, Sanden C, Mori M, Bjermer L, Stampfli MR and Erjefalt JS.** IL-17A Is Elevated in End-Stage Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Contributes to Cigarette Smoke-induced Lymphoid Neogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 191: 1232-1241, 2015.
88. **Sasco AJ, Secretan MB and Straif K.** Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 45 Suppl 2: S3-S9, 2004.

89. **Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH and Cote ML.** The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 28: 507-518, 2007.
  
90. **Seiler F, Lepper PM, Bals R and Beisswenger C.** Regulation and function of antimicrobial peptides in immunity and diseases of the lung. *Protein Pept Lett* 21: 341-351, 2014.
  
91. **Sethi S.** Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J* 35: 1209-1215, 2010.
  
92. **Sethi S and Murphy TF.** Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 14: 336-363, 2001.
  
93. **Sethi S and Murphy TF.** Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359: 2355-2365, 2008.
  
94. **Sherman CB.** Health effects of cigarette smoking. *Clin Chest Med* 12: 643-658, 1991.

95. **Skillrud DM, Offord KP and Miller RD.** Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med* 105: 503-507, 1986.
96. **Song X, Gao H, Lin Y, Yao Y, Zhu S, Wang J, Liu Y, Yao X, Meng G, Shen N, Shi Y, Iwakura Y and Qian Y.** Alterations in the microbiota drive interleukin-17C production from intestinal epithelial cells to promote tumorigenesis. *Immunity* 40: 140-152, 2014.
97. **Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD and Qian Y.** IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nat Immunol* 12: 1151-1158, 2011.
98. **Spiro SG and Silvestri GA.** One hundred years of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 523-529, 2005.
99. **Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ and Hromas R.** Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol* 169: 642-646, 2002.

100. **Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, Broide DH and Karin M.** Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell* 17: 89-97, 2010.
  
101. **Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC and Donithan MG.** Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med* 106: 512-518, 1987.
  
102. **Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, Scherag A, Hutte J, Dominas N, Lehnerdt GF, Hoffmann TK, Lang S and Brandau S.** Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer* 129: 2183-2193, 2011.
  
103. **Van ML, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I, Janot L, Erard F, Bertout J, Leger H, Sebbane F, Benecke A, Renauld JC, Hardt WD, Ryffel B and Sirard JC.** TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *J Immunol* 185: 1177-1185, 2010.

104. **Voss M, Wolf L, Kamyschnikow A, Wonnenberg B, Honecker A, Herr C, Lepper PM, Wegmann M, Menger MD, Bals R and Beisswenger C.** IL-17A contributes to maintenance of pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 309: L188-L195, 2015.
105. **Wang YH, Angkasekwinai P, Lu N, Voo KS, Arima K, Hanabuchi S, Hippe A, Corrigan CJ, Dong C, Homey B, Yao Z, Ying S, Huston DP and Liu YJ.** IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* 204: 1837-1847, 2007.
106. **Wculek SK and Malanchi I.** Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nature* 528: 413-417, 2015.
107. **Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR and Harrington LE.** IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-852, 2007.
108. **Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, Antoine M, Soler P and Cadranel J.** Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype

- pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. *Cancer Res* 63: 1405-1412, 2003.
109. **Wolf L, Sapich S, Honecker A, Jungnickel C, Seiler F, Bischoff M, Wonnenberg B, Herr C, Schneider-Daum N, Lehr CM, Bals R and Beisswenger C.** IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ajplung, 2016.
110. **Wu Q, Martin RJ, Rino JG, Breed R, Torres RM and 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* 9: 78-86, 2007.
111. **Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P and Gamble GD.** COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. *Eur Respir J* 34: 380-386, 2009.
112. **Yu HS, Angkasekwinai P, Chang SH, Chung Y and Dong C.** Protease allergens induce the expression of IL-25 via Erk and p38 MAPK pathway. *J Korean Med Sci* 25: 829-834, 2010.

113. **Zulueta JJ, Wisnivesky JP, Henschke CI, Yip R, Farooqi AO, McCauley DI, Chen M, Libby DM, Smith JP, Pasmantier MW and Yankelevitz DF.** Emphysema scores predict death from COPD and lung cancer. *Chest* 141: 1216-1223, 2012.

## 11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wechselwirkung zwischen Tumor- und Entzündungszellen	24
Abbildung 2: Exposition mit NTHi fördert das Wachstum von Lungenmetastasen.	42
Abbildung 3: Exposition mit NTHi fördert das Wachstum von Lungenmetastasen.	43
Abbildung 4: IL-17C-knockout-Mäuse weisen nach NTHi-Exposition eine verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der Lunge auf.	44
Abbildung 5: IL-17C und NTHi verstärken die Abgabe von KC und MIP-2 in Tumorzellen.	46
Abbildung 6: IL-17C wird unabhängig von NTHi- und IL-17C-Stimulation exprimiert.	47
Abbildung 7: Die Expression von den IL-17C-Rezeptoren IL-17RA und IL-17RE erfolgt unabhängig von NTHi und IL-17C.	48
Abbildung 8: NTHi und IL-17C nehmen keinen Einfluss auf die Expression zellzyklusregulierender Gene.	50
Abbildung 9: IL-17C beeinflusst den Proliferation fördernden Effekt von NTHi nicht.	51
Abbildung 10: IL-17C wird in humanen A549 Zellen unabhängig von IL-17C- und NTHi-Stimulation exprimiert.	52
Abbildung 11: A549 Zellen exprimieren die Rezeptoren IL-17RE und IL-17RA unabhängig von IL-17C und NTHi.	53
Abbildung 12: IL-17C nimmt keinen Einfluss auf zellzyklusregulierende Gene in A549 Zellen.	54

Abbildung 13: IL-17C beeinflusst den Proliferation fördernden Effekt von  
NTHi nicht.

55

## 12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Interleukin-17 Familie	20
Tabelle 2: Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese	30
Tabelle 3: Reaktionsansatz cDNA-Synthese	31
Tabelle 4: Temperaturprogramm für die RT-PCR	31
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die RT-PCR	32
Tabelle 6: Verwendete humane Primer	32
Tabelle 7: Verwendete murine Primer	33
Tabelle 8: Geräteliste	38
Tabelle 9: Materialliste	39
Tabelle 10: Verwendete Lösungen	40

## 13 Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Christoph Beisswenger und Professor Dr. Dr. Robert Bals für die Vergabe des Themas und für die großartige Betreuung während meiner Doktorarbeit.

Christopher Jungnickel danke ich besonders für das Heranführen an die Laborarbeit, für die gemeinsam durchgeführten *in vivo* Versuche, deren gemeinsame Auswertung und für die herzliche Betreuung von Beginn an.

Anja Honecker danke ich für das Einarbeiten in die Methoden und Gerätschaften, Andreas Kamyschnikov für das Färben der histologischen Schnitte und Färbungen.

Dem Institut für Experimentelle Chirurgie danke ich für die Paraffineinbettung der Lungen.

Der kompletten AG Bals danke ich für die freundliche Aufnahme ins Team und für die nette Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Lara und Chris, die mir stets zur Seite standen.