

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

Einfluss der PD-1/PD-L1-Achse auf den entzündungsinduzierten Lungenschaden in der COPD

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

Vorgelegt von: Felix Ritzmann

geb. am: 15.06.1987 in Karlsruhe

Tag der Promotion: 23.03.2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Beisswenger

Prof. Dr. Gabriela Krasteva-Christ

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 des folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Prof. Dr. Christoph Beisswenger: Bereitstellung des Themas, Betreuung der Doktorarbeit, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
2. Prof. Dr. Dr. Robert Bals: Bereitstellung des Themas, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
3. Dr. Christian Herr: Hilfestellung bei der Durchführung der Lungenfunktionsmessung, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
4. Giovanna Vella: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
5. Dr. Christopher Jungnickel: Hilfestellung bei Präparation, Ratschläge bei wissenschaftlichen Fragestellungen
6. Anja Honecker: Tierhaltung, Hilfestellung bei Präparation, technische Assistenz
7. Andreas Kamyschnikow: Tierhaltung, Immunhistochemische Färbungen, Stereologische Analysen, technische Assistenz
8. Victoria Weinhold: Hilfestellung bei Luminex-Assays, technische Assistenz

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die

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

Ort, Datum

Unterschrift des Promovierenden

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

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

IL-17C-mediated Innate Inflammation Decreases the Response to PD-1 Blockade in a Model of Kras-driven Lung Cancer

Ritzmann F, Jungnickel C, Vella G, Kamyschnikow A, Herr C, Li D, Menger M, Angenendt A, Hoth M, Lis A, Bals R, Beisswenger C

Sci Rep. 2019 Jul 17;9(1):10353. doi: 10.1038/s41598-019-46759-8.

Blockade of PD-1 decreases neutrophilic inflammation and lung damage in experimental COPD

Ritzmann F, Borchardt K, Vella G, Chitirala P, Angenendt A, Herr C, Menger M, Hoth M, Lis A, Bohle R, Bals R, Beisswenger C

zur Publikation akzeptiert, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	V
1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Pathologie der COPD	1
1.1.1 Entzündung in der COPD	3
1.1.2 Immunzellen in der COPD	4
1.2 Lungenkrebs	6
1.2.1 Die Tumormikroumgebung	7
1.2.2 Entzündung und Tumorprogression	8
1.3 Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint	9
1.3.1 PD-1-Immuntherapie	10
1.3.2 PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint im Kontext der COPD	12
1.4 IL-17C	12
1.5 Fragestellung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte und Verbrauchsartikel	15
2.1.2 Lösungen, Puffer, Medien	16
2.1.3 Software	17
2.2 Methoden	17
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	17
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	18
2.2.3 Tierversuche	20
2.2.4 Probengewinnung und –aufarbeitung	23
2.2.5 Zellbiologische Methoden	27
2.2.6 Durchflusszytometrische Analysen	29
2.2.7 Messen der PD-1/PD-L1 Konzentrationen in humanen Proben	30
2.3 Statistik	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Rolle des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints im Krankheitsverlauf der COPD	32
3.1.1 PD-1 und PD-L1 im Serum und in der BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten	32
3.2 Die Antikörpervermittelte PD-1 Blockade führt in COPD Mausmodellen zu einem verminderten Lungenschaden	37
3.2.1 Die Blockade des PD-1-Immun-Checkpoints vermindert rauchinduzierte neutrophile Entzündung	37

3.2.2 Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu einem verminderten Lungenschaden in zigarettenrauchexponierten Tieren	41
3.2.3 Die Gabe eines therapeutischen PD-1 Antikörpers moduliert die Immunantwort von Alveolarmakrophagen	43
3.2.4 Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu einem verminderten NTHi-induzierten Lungenschaden.....	44
3.3 Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints führt zu verringertem Tumorwachstum in Il-17c defizienten Mäusen	48
3.3.1 IL-17C fördert das Wachstum von Lungentumoren bei bakteriell-induzierter Entzündung.....	48
3.3.2 Deletion von IL-17C verringert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung.....	51
3.3.3 IL-17C vermittelt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung.....	54
3.3.4 IL-17C vermittelt die Aktivierung der MAP Kinase ERK	57
3.3.5 Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint wird durch COPD ähnliche Inflammation unabhängig von IL-17C aktiviert	59
3.3.6 Die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints verringert bakteriell-induzierte Entzündung.....	63
3.3.7 Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu geringerem Tumorwachstum in <i>Il-17c^{-/-}/Kras</i> Mäusen	66
4. Diskussion	68
4.1 Die Rolle des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints im Verlauf der COPD.....	68
4.1.1 Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints in experimentellen COPD-Modellen.....	70
4.2 Funktion der PD-1/PD-L1-Achse im Kras-abhängigen Lungenkrebsmodell	75
4.2.1 IL-17C hat eine Funktion bei der Rekrutierung von Immunzellen in die Tumormikroumgebung.....	77
4.2.2 IL-17C reguliert die Expression tumorfördernder Entzündungsmediatoren.....	78
4.2.3 Die IL-17C vermittelte Entzündung verringert das Ansprechen auf die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints	79
5. Literaturverzeichnis.....	81
6. Abbildungsverzeichnis	98
7. Tabellenverzeichnis.....	100
8. Publikationsverzeichnis.....	101
9. Konferenzbeiträge	103
10. Danksagung	105
11. Lebenslauf	106

Zusammenfassung

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist einer der größten Risikofaktoren für die Entstehung von Lungenkrebs. Zu den innovativsten Therapieansätzen der Behandlung von Lungenkrebs gehören Immuntherapien, die sich gegen den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint richten. Es sind bereits einige therapeutische Antikörper gegen den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint bei Lungenkrebs zugelassen. Inwieweit der PD-1-Immun-Checkpoint zur Pathogenese der COPD beiträgt und therapeutische Antikörper gegen PD-1 den Verlauf der COPD beeinflussen, wird kontrovers diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Erkenntnisse über die Rolle des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints bei der Pathogenese der COPD zu gewinnen. Zudem sollte geklärt werden, inwieweit im primären Lungentumormodell chronische bakteriell-induzierte Entzündung den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint in der Tumormikroumgebung aktiviert.

Es konnte im Serum und in der bronchoalveolären Lavage (BAL-Flüssigkeit) von COPD-Patienten lösliches PD-1 und PD-L1 nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen PD-1 und PD-L1 in der BAL-Flüssigkeit und im Serum von stabilen COPD-Patienten und im Serum von exazerbierenden COPD-Patienten. PD-L1 Konzentrationen im Serum von akut exazerbierenden Patienten waren im Vergleich zu den Serumkonzentrationen von stabilen COPD-Patienten signifikant erhöht. Weiter konnte ein erhöhtes PD-1/PD-L1 Verhältnis in der BAL-Flüssigkeit von stabilen GOLD III/IV Patienten festgestellt werden. Zudem korrelierte das Verhältnis von PD-1 zu PD-L1 negativ mit dem Sollwert des Lungenfunktionsparameters der Einsekundenkapazität (FEV_1 predicted). In retrospektiven Schnittpuben von COPD-Patienten konnte die Expression von PD-1 und PD-L1 immunhistochemisch im Lungenparenchym in Entzündungszellen detektiert werden.

Im Modell des zigarettenrauchinduzierten Lungenschadens wurden Mäuse während der Expositionsphase mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 behandelt, während Kontrollmäuse einen Isotyp-Antikörper erhielten. Durch die Gabe des anti-PD-1 Antikörpers wurde die Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der Lunge signifikant verringert. Invasive Lungenfunktionsmessung sowie stereologische Analysen zeigten, dass die Blockade von PD-1 zu einem verminderten Lungenschaden führte. So resultierte chronische Rauchexposition bei anti-PD-1 behandelten Mäusen in der Lungenfunktionsmessung im Gegensatz zu Kontrollmäusen in keiner signifikanten Zunahme der Vitalkapazität und Compliance - zwei Parameter, die einen rauchinduzierten Lungenschaden anzeigen. Die stereologisch ermittelte mittlere freie Weglänge zwischen den Alveolarsepten gibt Aufschluss über den rauchinduzierten Lungenschaden. Es konnte gezeigt werden, dass die

Rauchexposition zu einem Verlust der Lungenstruktur in den Kontrolltieren führte, welcher in den mit dem PD-1 Antikörper behandelten Tieren signifikant verringert war. Auch im bakteriell-induzierten Lungenschadenmodell führte die Blockade des PD-1-Immun-Checkpoints zu einem signifikant verringerten Lungenschaden.

Im Kras-abhängigen Lungenkrebsmodell wurde gezeigt, dass chronische bakterielle Entzündung den PD-1-Immun-Checkpoint in der Tumormikroumgebung aktiviert. Es wurde untersucht, inwieweit sich IL-17C-vermittelte Entzündung auf die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints auswirkt. Hierzu wurden Wildtyp und IL-17C defizienten Mäusen wie in den COPD-Modellen während der NTHi-Expositionsphase ein gegen PD-1 gerichteter therapeutischer Antikörper verabreicht. Nach einer vierwöchigen Beobachtungszeit konnte festgestellt werden, dass es in IL-17C defizienten Mäusen durch die Gabe des therapeutischen PD-1 Antikörpers zu einem geringeren Tumorwachstum kam. Dies ging mit signifikant verminderten Konzentrationen an inflammatorischen bzw. tumorfördernden Zytokinen wie IL-6, CCL5 und TNF- α in der Lunge einher.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Aktivierung des PD-1-Immun-Checkpoints in präklinischen COPD-Modellen zum Lungenschaden beiträgt. Zudem konnte gezeigt werden, dass im Kras-abhängigen Lungenkrebsmodell IL-17C-vermittelte angeborene Entzündung die Wirkung der Blockade von PD-1 vermindert.

Summary

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major risk factor for the development of lung cancer. The most innovative therapeutic approaches in the treatment of lung cancer include immunotherapies that are directed against the PD-1/PD-L1 immune checkpoint. Therapeutic antibodies against the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in lung cancer have already been approved. The extent to which the PD-1 immune checkpoint contributes to the pathogenesis of COPD and therapeutic antibodies against PD-1 influence the course of COPD is discussed controversially.

The aim of this work was to analyze the role of the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in the pathogenesis of COPD. Additionally, it was also examined to what extent chronic bacterial-induced inflammation activates the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in a primary lung tumor model.

PD-1 and PD-L1 concentrations were detected in the serum and in the BAL fluid of COPD patients. There was a significant positive correlation between PD-1 and PD-L1 in the BAL fluid and in the serum of stable COPD patients and in the serum of exacerbating COPD patients. Comparison of stable COPD patients with acute exacerbating patients revealed significant increased PD-L1 concentrations in the serum during acute exacerbations. Furthermore, the PD-1 to PD-L1 ratio was increased in the BAL fluids of stable GOLD III/IV COPD patients. There was also a negative correlation between the lung function parameter FEV₁ predicted (one-second capacity) and the ratio of PD-1 to PD-L1. Retrospectively, the expression of PD-1 and PD-L1 was detected immunohistochemically on sections of lung tissue from COPD patients. In the smoke-induced lung damage model, mice were treated with a therapeutic antibody against PD-1 during the exposure phase, while control mice received an isotype antibody. The number of neutrophilic granulocytes and lymphocytes in the lungs was significantly reduced by the administration of the anti-PD-1 antibody. Invasive lung function measurements and stereological analyzes showed that the blockade of PD-1 led to reduced lung damage. In contrast to control mice, chronic smoke exposure of anti-PD-1 treated mice did not lead to a significant increase in vital capacity and compliance, two parameters that indicate smoke-induced lung damage, measured in the lung function. The determined MCL provides information about the smoke-induced lung damage. It could be shown that the smoke exposure led to a loss of lung structure in the control animals, which was significantly reduced in the animals treated with the PD-1 antibody. In the NTHi-induced lung damage model, the blockade of the PD-1 immune checkpoint also led to a significantly reduced lung damage.

In the kras-dependent lung cancer model, chronic bacterial inflammation resulted in the activation of the PD-1 immune checkpoint in the tumor-microenvironment. It was further examined to what extent IL-17C-mediated inflammation affects the blockade of PD-1/PD-L1 axis. For this purpose, a therapeutic antibody directed against PD-1 as in the COPD models was administered to wildtype and IL-17C deficient mice during the NTHi exposure phase. It could be shown that in IL-17C-deficient mice, the administration of the therapeutic PD-1 antibody resulted in less tumor growth. This was associated with significantly reduced concentrations of inflammatory cytokines such as IL-6, CCL5 and TNF- α in the lungs.

This work shows that activation of the PD-1 immune checkpoint in pre-clinical COPD models contributes to lung damage. In addition, it was shown that IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer.

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathologie der COPD

Mit weltweit über 320 Millionen betroffenen Menschen zählt die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), deren pathologische Effekte sich nicht nur auf die Lunge beschränken, zu den fünf führenden Todesursachen [1, 2]. In den Industrieländern ist die COPD eine der größten Belastungen für das Gesundheitssystem, in der Europäischen Union beispielsweise belaufen sich die jährlichen Gesamtkosten auf geschätzt 38,6 Mrd. Euro, wobei schwere Krankheitsverläufe besonders kostenintensiv sind [3-6].

Der größte, jedoch nicht einzige Risikofaktor für die Entstehung einer COPD ist Zigarettenrauch [7, 8]. Durch das Inhalieren des Zigarettenrauches hat ein Großteil der Raucher eine höhere Prävalenz von respiratorischen Beschwerden und eine höhere jährliche Abnahme der Lungenfunktion, unter anderem gemessen über das forcierte expiratorische Volumen in der ersten Ausatemungssekunde (FEV_1) [8]. Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass auch Nichtraucher ebenfalls eine COPD entwickeln können [9, 10]. Bis zu 20% aller Fälle können auf eine dauerhafte Exposition zu organischen und anorganischen Partikeln bzw. Dämpfen zurückgeführt werden. Erwähnenswerte Berufsfelder mit solchen Expositionen sind beispielsweise die Landwirtschaft sowie die Minen- und Bauindustrie [11-13].

Neben beruflich bedingten Risiken für die Entstehung einer COPD ist das Verfeuern von Biomasse ein weiterer unterschätzter Risikofaktor [14]. Geschätzt drei Milliarden Menschen benutzen weltweit Biomasse wie Holz, Tierdung und Kohle als Hauptenergiequelle für die Nahrungszubereitung und das Heizen [15]. Beispielsweise kommt es in Entwicklungsländern aufgrund offener Herdfeuer und der damit verbundenen erhöhten Luftverschmutzung in schlecht gelüfteten Innenräumen gerade bei Frauen zu einem höheren Risiko, eine COPD zu entwickeln [15-17].

Neben den genannten externen Risiken durch Inhalation von schädlichen Partikeln gibt es Hinweise, dass auch genetische Faktoren die Entstehung einer COPD begünstigen können. Einer der bestbeschriebenen genetischen Auslöser ist α_1 -Antitrypsinmangel [18, 19]. α_1 -Antitrypsinmangel ist eine autosomal kodominante Erbkrankheit, für die mehr als 100 mutierte Allele identifiziert werden konnten [20]. Bei α_1 -Antitrypsinmangel-Patienten kommt es je nach Art der Mutationen zu schwach bis stark verringerten Serumkonzentrationen von α_1 -Antitrypsin [18]. Der α_1 -Antitrypsinmangel gibt Hinweis darauf, welche Mechanismen bei einer COPD zum Verlust an Lungenfunktion und Lungenstruktur führen könnten. α_1 -Antitrypsinmangel-Patienten, die rauchen, haben ein erhöhtes Risiko, an einer COPD zu erkranken [21].

Zigarettenrauch, aber auch Infektionen führen in der Lunge zu einer erhöhten Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, die die Serinprotease Elastase bilden. Durch die geringen Konzentrationen von α_1 -Antitrypsin kann die Elastase nicht genügend inhibiert werden, was den Abbau von Elastin und dadurch das Entstehen von Emphysemen begünstigt [18, 22]. Inwiefern ein Ungleichgewicht von neutrophiler Elastase und α_1 -Antitrypsin zur Pathogenese der COPD bei Patienten ohne α_1 -Antitrypsinmangel beiträgt, wird kontrovers diskutiert [23, 24].

Das Krankheitsbild der COPD zeichnet sich durch fortschreitende pathologische Veränderungen der proximalen und distalen Atemwege, sowie Veränderungen des Lungenparenchyms und des pulmonalen Gefäßsystems aus [7, 25]. Im Verlauf der COPD kommt es in den Lungen zu einer fortdauernden Entzündung, vermehrten Schleimbildung, eingeschränkter mukoziliären Klärung und einem Verlust epithelialer Integrität, was letztendlich zu einem Abbau des Lungenparenchyms bis hin zum Emphysem führen kann [26-29]. Die relativen Anteile dieser Merkmale variieren zwischen den Patienten und formen letztendlich das klinische Bild der COPD [30]. Die genannten typischen klinischen Symptome treten hierbei erst Jahre nach Beginn des Zigarettenkonsums auf. Damit verbunden ist das Risiko, dass die COPD zu Beginn der Erkrankung im milden Stadium oft undiagnostiziert bleibt. Es wird davon ausgegangen, dass weltweit etwa 70% der von der COPD Betroffenen undiagnostiziert bleiben [31]. Im Allgemeinen wird die COPD ab dem fünfzigsten Lebensjahr diagnostiziert, mit einer Spitzeninzidenz im Lebensalter von etwa 70 Jahren [32]. Danach getroffene Maßnahmen wie sofortiges Einstellen des Zigarettenkonsums führen zu keiner Heilung der Erkrankung.

Die COPD wird durch die Bestimmung der irreversiblen Limitation des Atemflusses in der Lungenfunktionsmessung diagnostiziert [8, 33, 34]. Dazu wird der Lungenfunktionsparameter FEV_1 ermittelt und ins Verhältnis mit der forcierten expiratorischen Vitalkapazität (*forced vital capacity*, FVC) gesetzt. Dieser Quotient, auch als Tiffeneau-Index bezeichnet, ist ein altersabhängiges Maß für den Strömungswiderstand der Atemwege. Eine Verringerung des Quotienten unter 0,7 ist charakteristisch für eine obstruktive Erkrankung der Atemwege [35-37]. Sowohl durch einen gesteigerten Widerstand der kleinen Atemwege, als auch durch eine gesteigerte Dehnbarkeit der Lunge (*Lung Compliance*) aufgrund fehlender Rückstellkraft wird dabei der Atemfluss und somit FEV_1/FVC negativ beeinflusst [38-40].

Das Krankheitsstadium der COPD wird anhand der GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) Klassifizierung nach der Schwere der Atemflusslimitation eingeteilt. Bei Patienten mit einem Tiffeneau Index $< 0,7$ wird das Ergebnis der FEV_1 -Messung

zu einem Referenzwertes des jeweiligen Alters und Geschlechts in Bezug gesetzt, siehe Tabelle 1.

Tabelle 1: Klassifikation der Schwere der Krankheit nach GOLD

Patienten mit $FEV_1/FVC < 0,70$		
GOLD 1	mild	$FEV_1 \geq 80\%$
GOLD 2	moderat	$50\% \leq FEV_1 < 80\%$
GOLD 3	schwer	$30\% \leq FEV_1 < 50\%$
GOLD 4	sehr schwer	$FEV_1 < 30\%$

Zu dieser klassischen Beurteilung der Schwere der Krankheit werden weitere Fragebogen zur Diagnose hinzugezogen. Beispielsweise wird das körperliche Befinden der Patienten in dem sogenannten *COPD Assessment Test* (CAT)TM abgefragt. Durch diese und weitere Kombinationen von Fragebögen wird das Krankheitsbild der COPD besser dargestellt, da die körperliche Verfassung sowie das Risiko einer Exazerbation berücksichtigt werden [41]. Zudem werden bildgebende Verfahren wie Röntgen-Thorax eingesetzt, um die Diagnose der COPD zu bestätigen. Zusätzlich rücken weitere bildgebende Verfahren wie Computertomographie (CT) und Kernspintomographie (MRT) stärker in den Fokus um Aufschluss über die Schwere der Erkrankung und den Verlust an Lungenstruktur zu geben [42, 43].

1.1.1 Entzündung in der COPD

Über die Zeit entwickelt sich in den Lungen von Rauchern eine schwelende Inflammation, mit stärkerer Ausprägung bei COPD-Patienten, welche sich systemisch auf das Herz, die Blutgefäße und die Skelettmuskulatur ausbreiten kann [25, 44]. Mit Zunahme der Schwere der Krankheit steigt hierbei auch die Schwere der Inflammation, welche während der akuten Exazerbation der COPD noch weiter verstärkt wird, unter anderem angetrieben durch bakterielle oder virale Infektionen [8, 25, 29, 45, 46]. Die Exazerbationen sind stark mit körperlichen Beeinträchtigungen, Krankenhausaufenthalten und erhöhter Mortalität verbunden [47]. Der molekulare Hintergrund der Inflammation, gerade bei Exazerbationen, ist noch nicht hinreichend geklärt. So dauert die Entzündung bei Rauchern, die das Rauchen aufgegeben haben, weiter an [25, 48]. Hogg et al. konnten belegen, dass es auch Jahre nach Raucherentwöhnung durch entzündliche Mukusproduktion und durch die Zunahme des Gewebes der Bronchialwand zu einer fortschreitenden Obstruktion der kleinen Atemwege kommt [25]. Die chronische Entzündung im Verlauf der COPD schließt angeborene und

adaptive Immunantwort ein und ist durch starke Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, B Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und lymphoiden Follikeln in den kleinen Atemwegen gekennzeichnet [7, 25, 45, 46].

1.1.2 Immunzellen in der COPD

Makrophagen sind maßgeblich an der Pathogenese der COPD beteiligt. Die Makrophagen von COPD-Patienten haben einen entzündlicheren Phänotyp als bei Rauchern, die keine COPD haben [49]. Im Verlauf der COPD ist die Anzahl der Makrophagen in den Atemwegen sowie im Lungenparenchym stark erhöht, mit der Folge, dass eine direkte Korrelation zwischen gewebständigen Makrophagen und der Entwicklung eines Emphysems erkannt werden konnte [50]. Durch Zigarettenrauch werden die Makrophagen aktiviert und produzieren eine Vielzahl an Entzündungsmediatoren wie Chemokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Proteasen. Studien konnten zeigen, dass die Makrophagen von COPD-Patienten eine geringere Phagozytose-Aktivität gegenüber Bakterien wie *Haemophilus influenzae* und *Streptococcus pneumoniae* aufweisen, was möglicherweise die chronische Besiedlung der Lungen vieler COPD-Patienten mit Bakterien wie nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) begünstigt [51-53].

Die auftretenden neutrophilen Granulozyten weisen einen entzündlicheren Charakter als die Makrophagen auf und sind die Hauptzellart während akuten Exazerbationen [54, 55]. Die neutrophile Granulozyten werden durch Zigarettenrauch aktiviert und produzieren ROS und Proteasen wie beispielsweise die neutrophile Elastase [56]. Die Aktivität der neutrophilen Elastase wird durch α 1-Antitrypsin gehemmt, der erblich bedingte Mangel an α 1-Antitrypsin geht daher, wie zuvor genannt, mit einem erhöhten Risiko für die COPD und dem Lungenemphysem einher [57]. Tierexperimentelle Arbeiten und die Analyse von Patientenmaterial legen nahe, dass neutrophile Granulozyten und Alveolarmakrophagen über die Bildung von weiteren Proteasen wie Metalloproteasen, zum Lungenschaden bei der COPD beitragen [58]. Ein Ungleichgewicht von Proteasen und Anti-Proteasen führt daher höchstwahrscheinlich auch bei der durch Zigarettenrauch verursachten COPD zum Abbau extrazellulärer Matrix bis hin zum Emphysem [57]. Im Verlauf der COPD entwickeln sich in den kleinen Atemwegen charakteristische Verdickungen an der Epithelschicht, die sogenannten lymphoiden Follikel, welche aus Ansammlungen von T- und B-Zellen bestehen. Verschiedene T Zellpopulationen sind zudem im Lungenparenchym sowie in den Atemwegen zu finden, mit einem erhöhten Anteil von CD8⁺ Zellen [25, 59]. Th17 Zellen, eine Unterklasse der T Zellen, produzieren das Zytokin IL-17A. Es konnte von Roos et al. gezeigt werden, dass das

proinflammatorische Zytokin IL-17A im Endstadium der COPD erhöht ist und zur Zigarettenrauch induzierten Bildung der lymphoiden Strukturen beiträgt. Neben IL-17A werden von Makrophagen und T Zellen weitere wichtige proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), IL-1, IL-6 und IL-8 gebildet und tragen zu der Pathogenese der COPD bei [54, 60].

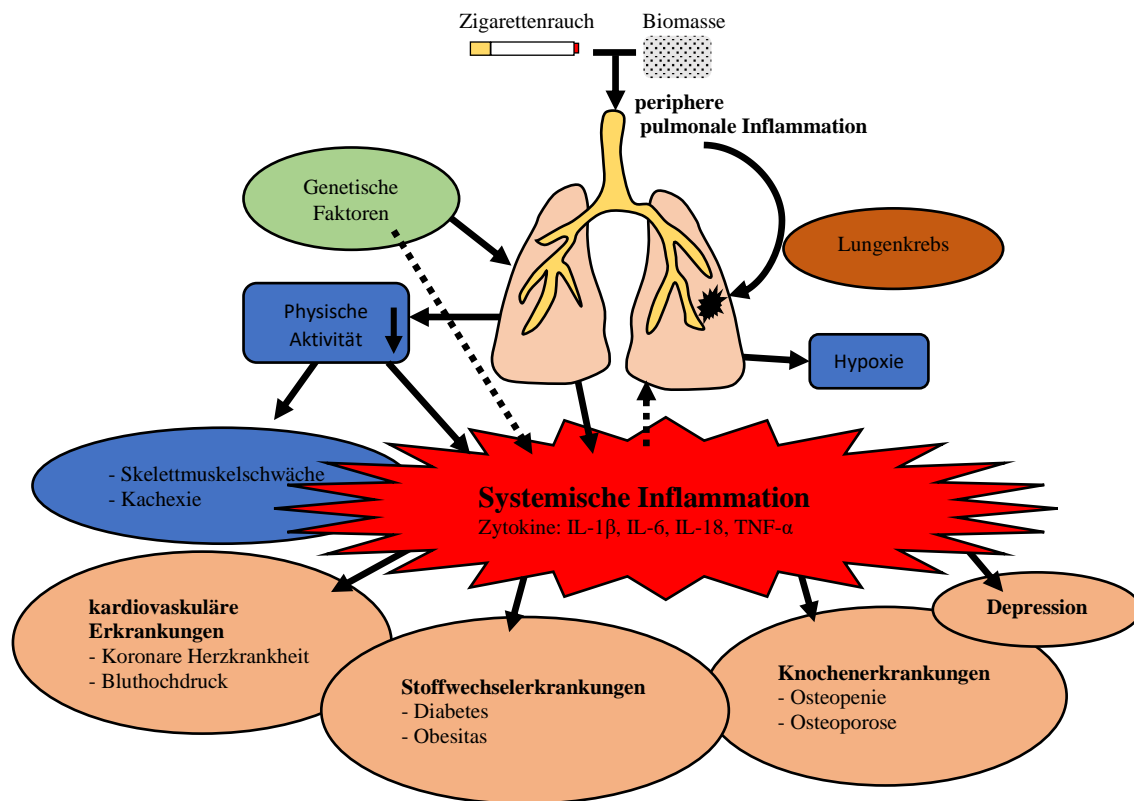


Abbildung 1: Auswirkungen der COPD auf den Gesamtorganismus (nach [61]). Durch das Inhalieren von Zigarettenrauch bzw. Verfeuern von Biomasse kommt es in der Lunge zu einer peripheren Inflammation, welche auch die Entstehung von Lungenkrebs begünstigt. Im Blutkreislauf von COPD-Patienten, besonders während Exazerbationen, konnten proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-18 und TNF- α nachgewiesen werden. Da diese Zytokine auch in der BAL-Flüssigkeit und im Sputum von COPD-Patienten detektierbar sind, wird vermutet, dass die systemisch nachweisbaren Zytokine ihren Ursprung in der peripheren Lunge haben. Durch den Übertritt der Zytokine kommt es zu systemischen Komorbiditäten wie kardiovaskulären Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Knochenerkrankungen und Depression.

1.2 Lungenkrebs

Unter allen Krebsarten führt Lungenkrebs weltweit am häufigsten zum Tode. Es wird davon ausgegangen, dass jedes Jahr 1,8 Millionen Menschen mit Lungenkrebs diagnostiziert werden und 1,6 Millionen Menschen aufgrund der Krankheit sterben [62, 63]. Durch die Aggressivität der Krankheit und der späten Erkennung stirbt die Hälfte aller diagnostizierten Menschen innerhalb eines Jahres. Die 5 Jahres Überlebenschance schwankt, je nach bereits erreichtem Stadium bei der Diagnose, zwischen lediglich 4-17% [64, 65]. Lungenkrebs wird in zwei Subgruppen unterteilt: kleinzellige und nichtkleinzellige Lungenkarzinome mit einer Häufigkeitsverteilung von 15% beziehungsweise 85% [66, 67].

Haupttrisikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs ist aktiver Zigarettenkonsum, daneben sind auch das Passivrauchen, das natürlich vorkommende Gas Radon und Luftverschmutzung weitere Auslöser der Krankheit [68-73]. Bei jedem Zug an der Zigarette werden mehr als 10^{10} Partikel pro ml und mehr als 4800 Vertreter verschiedenster Stoffklassen eingeatmet, darunter über 60 Stoffe mit nachgewiesenen karzinogenen Eigenschaften wie beispielsweise Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), N-Nitrosamine, Schwermetalle (Nickel, Cadmium), Aldehyde und aromatische Amine [74, 75]. Die im Rauch enthaltenen Karzinogene, Partikel und reaktive Sauerstoffspezies fördern pathologische Veränderungen der Lunge wie beispielsweise gesteigerte Entzündungsreaktionen, oxidative Schäden, endotheliale Dysfunktion, das Induzieren von zellulärer Seneszenz und vor allem genetische Veränderungen [76, 77]. Es wird davon ausgegangen, dass bis zu 90% aller Krebserkrankungen der Lunge auf die rauchinduzierten Veränderungen der DNS wie beispielsweise Mutationen zurückzuführen sind [68, 77-80].

Zahlreiche Studien zeigten, dass Kanzerogene, wie sie im Zigarettenrauch vorhanden sind, zu onkogenen Mutationen innerhalb des *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS) Genes führen. Dies konnte initial in Adenokarzinomen bei Lungenkrebspatienten mit stark ausgeprägtem Raucherstatus beschrieben werden [81-83]. KRAS Mutationen sind in bis zu 30% aller Adenokarzinomen bei Lungenkrebspatienten in westlichen Ländern zu finden, in geringerer Zahl in asiatischen Populationen [84-90]. Beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom treten die KRAS Mutationen überwiegend an Kodon 12 und 13 auf. Dabei ist die häufigste Kodonvariante die KRAS-G12C Mutation (~39%), gefolgt von den Varianten KRAS-G12V und KRAS-G12D [86, 87].

Das KRAS-Gen kodiert für ein kleines G-Protein aus der RAS-Familie. Die GTPase, welche durch die Bindung von GDP inaktiviert vorliegt, wird durch die alternierende Bindung von GDP und GTP aktiviert und leitet Signale als molekularer Schalter an verschiedene

nachgeschaltete Effektoren weiter. Kommt es zu einer onkogenen Überaktivierung von *KRAS*, werden die *rapidly accelerated fibrosarcoma* (RAF)/*mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Protein-Kinase B (AKT) Signalwege konstitutiv aktiviert, was unter anderem ein erhöhtes Zellüberleben sowie gesteigerte Zellproliferation zur Folge hat [91-94]. Aus klinischer Sicht ist die onkogene Aktivierung von *KRAS* mit einer schlechteren Prognose sowie einer erhöhten Therapieresistenz assoziiert [95-98].

Die COPD ist ein weiterer, unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs [99-103]. Raucher mit begleitender COPD zeigen hierbei eine zwei bis fünffach höhere Wahrscheinlichkeit an Lungenkrebs zu erkranken als Nichtraucher mit COPD, wobei bis zu 50% aller Raucher an einer COPD erkrankt sind und das Risiko mit zunehmendem Alter weiter steigt [104-107]. Dies hat zur Folge, dass die Überlebenserwartung bei Patienten mit der Kombination COPD und gleichzeitiger Lungenkrebserkrankung weiter verringert ist. Chemische und genetische Mausmodelle zeigten, dass COPD-typische Entzündung zu einer vermehrten Tumorentstehung und einem verstärkten Tumorstadium führt [108-110].

1.2.1 Die Tumormikroumgebung

Aus der Beobachtung heraus, dass Tumore an Stellen von chronischer Entzündung zu finden sind und dass Entzündungszellen Tumorgewebe infiltrieren, postulierte Rudolf Virchow schon vor 150 Jahren, dass eine Entzündung die Tumorentstehung fördert [111-115]. Und in der Tat konnten Studien einen starken Zusammenhang zwischen chronischer Infektion, Inflammation und Krebs nachweisen [116-122]. Ein Tumor ist daher nicht nur durch die Ansammlung solider maligner Zellen definiert. Aufgrund der Infiltration von Immunzellen als auch des Zusammenspiels nicht maligner Zellen in der nahen Umgebung des Tumors und der damit verbundenen engen Interaktion, wird dieser Komplex aus verschiedensten Zellen als Tumormikroumgebung definiert [123]. Dabei lassen sich in der Tumormikroumgebung Zellen des Immunsystems, Endothelzellen, Blut- und Lymphatische Zellen, Fibroblasten, Perizyten und Adipozyten finden [124, 125]. Interessanterweise sind die nicht-malignen Zellen dabei stark dynamisch, nehmen oft tumorfördernde Funktionen ein und haben starke Auswirkungen auf das Ansprechen von Tumorthérapien [124, 125]. In der Tumormikroumgebung findet die interzelluläre Kommunikation durch ein komplexes Netzwerk aus Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren statt [123].

1.2.2 Entzündung und Tumorprogression

Es wird davon ausgegangen, dass mindestens 20% aller Tumore aufgrund einer Infektion und chronischer Entzündung entstehen [111, 115, 126], dennoch sind die Grundlagen der Tumorentstehung vor diesem Hintergrund unklar [122, 127, 128]. Der Tumor bzw. die Tumormikroumgebung wird dabei stark von Leukozyten infiltriert, mit einer starken Immunantwort von Makrophagen und T Zellen [129, 130]. Neueste Studien weisen zudem eine maßgebliche Rolle den neutrophilen Granulozyten zu [131-134].

Monozyten infiltrieren die Tumorumgebung und werden vor Ort durch Faktoren wie dem Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1) und den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) zu Makrophagen differenziert. Die differenzierten Makrophagen werden als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet [135]. Die TAM können weiter in die M1 oder M2 Phänotypen unterteilt werden. Dem M1 Phänotyp werden antimikrobielle sowie antitumorale Funktionen zugeschrieben, wohingegen der M2 Phänotyp aufgrund seines veränderten Zytokin-Profiles mit dem Umbau bzw. der Reparatur von Gewebe und Angiogenese und letztendlich tumorfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht wird [136]. In der anfänglichen Tumorentwicklung weisen die TAMs einen M1-Phänotyp auf, welcher im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung in den antagonistischen M2 Phänotyp übergehen kann [137, 138].

Das Einwandern von Lymphozyten ist eine wichtige Reaktion bei Krebs, da insbesondere zytotoxische T Zellen bei der Eliminierung bzw. Kontrolle neoplastischer Zellen von Bedeutung sind [130, 139]. Die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) sind dabei auch maßgeblich an der Ansprache auf Chemotherapien und Immuntherapien beteiligt und finden als Screening-Tool und prognostischer Faktor weite Anwendung [140-142].

Neutrophile Granulozyten rückten in den letzten Jahren stärker in den Fokus der Krebsforschung. Gerade von der Etablierung des Tumors bis zur Progression zum malignen Zustand konnten die neutrophilen Granulozyten als wichtiger treibender Faktor identifiziert werden [143-148]. So konnten tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TANs) in verschiedensten Tumorentitäten mit einer verschlechterten Prognose korreliert werden [149-151]. Analog zu den M1/M2 Phänotypen der tumorassoziierten Makrophagen zeigen die neutrophilen Granulozyten nach Infiltrieren des Tumors zwei distinkte Phänotypen, deren Regulation noch weitestgehend unbekannt, jedoch als therapeutisches Ziel von großem Interesse ist [152]. Der N1 Phänotyp zeigt dabei antitumorale Eigenschaften, wohingegen die N2 Ausprägung die Tumorprogression fördert [143, 144, 153].

1.3 Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint

Die T Zell Aktivierung findet durch eine komplexe Interaktion der T Zellen und der Antigen-präsentierenden Zelle statt. Eine Erkennung der präsentierten Antigene auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) durch den T Zell Rezeptor (TCR) benötigt weitere Stimulation, damit eine Immunantwort ausgelöst werden kann. Sekundäre Signale werden durch sogenannte Immun-Checkpoints induziert [154-156].

Immun-Checkpoints regulieren Immunantworten und hiermit verbundene Entzündungsprozesse, die auch immer negative Auswirkungen auf den Organismus haben können [157, 158]. Immun-Checkpoints sind besonders bei der Vermeidung von Autoimmunreaktionen von Bedeutung. Immun-Checkpoints regulieren während und nach Infektionen die Immunantwort und verhindern durch Erhalt der Eigentoleranz etwaige Autoimmunreaktionen. Immun-Checkpoints bestehen aus einer ganzen Reihe co-stimulierender und co-inhibitorischer Rezeptoren und deren Liganden. Das zytotoxische T Lymphozyt Antigen (CTLA-4, CD152) und *Programmed cell death protein 1* (PD-1, CD279) stehen dabei als Schlüsselmoleküle im Brennpunkt der aktuellen Forschung. Wichtige Bestandteile von Immun-Checkpoints sind Rezeptoren (z.B. PD-1) und deren spezifische Liganden (z.B. *Programmed cell death ligand 1*, PD-L1, CD274). Verschiedene Zelltypen wie antigenpräsentierende Zellen, Makrophagen, Lymphozyten und Tumorzellen bilden zum Beispiel PD-L1 und modulieren über PD-1 die Aktivität von Zielzellen wie CD4⁺ und CD8⁺ Zellen [159, 160]. Über die Aktivierung von Immun-Checkpoints kommt es beispielsweise zur Inaktivierung von zytotoxischen T Zellen [161].

Aufgrund des therapeutischen Nutzens liegt der Fokus dieser Arbeit auf dem PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint. Der Rezeptor PD-1, ein 288 Aminosäure langes Typ 1 Transmembranprotein, reguliert die T Zell Aktivität und ist beim Menschen im Gen *PDCDI* auf Chromosom 2 kodiert [162]. PD-1 wird nach Aktivierung hauptsächlich auf T Zellen, B Zellen, Natürlichen Killerzellen, aktivierten Monozyten und Dendritischen Zellen (DCs) exprimiert [163-167]. PD-1 interagiert mit zwei Liganden, PD-L1 (CD274) und PD-L2 (CD273) und führt durch Inhibition der Proliferation und der Produktion von Zytokinen wie Interferon- γ (IFN- γ) zu einer Inaktivierung der T Zellen [167-172]. Der Ligand PD-L1 besteht aus 290 Aminosäuren ist ebenfalls ein Typ 1 Transmembranprotein und ist im Gen *CD274* auf Chromosom 9 kodiert [162].

Tumore unterliegen aufgrund ihrer hohen Mutationsrate einer Vielzahl genetischer und epigenetischer Veränderungen, die eine Produktion von Neoantigenen zur Folge haben. Dadurch sind Tumorzellen potenzielle Ziele für die wirtseigene Immunantwort [173, 174].

Während der Immunantwort werden die Tumorzellen von T Zellen erkannt, die zytotoxische T Lymphozyten rekrutieren, die in das Tumorgewebe infiltrieren und die Tumorzellen abtöten können. Die Tumorzellen selbst können jedoch durch das Exprimieren eines Immun-Checkpoint Liganden wie PD-L1 der Erkennung durch das Immunsystem entgehen [174]. PD-L1 wird neben vielen verschiedenen Krebsarten maßgeblich von nichtkleinzelligen Lungentumoren exprimiert [175-179]. Dabei wird PD-L1 sowohl im Zytoplasma als auch aktiv an der Plasmamembran der Tumorzellen, jedoch nicht zwingend auf allen Zellen eines Tumors, exprimiert [180, 181]. Induziert wird die Expression von PD-L1 durch proinflammatorische Moleküle, hauptsächlich durch IFN- γ , aber auch durch TNF- α , LPS, GM-CSF und VEGF sowie durch die Zytokine IL-10 und IL-4 [182, 183]. In der Tumormikroumgebung produzieren aktivierte T Zellen IFN- γ und TNF- α , zusätzlich produzieren Stromazellen des Tumors GM-CSF und VEGF, was als Antwort zu einer hohen Expression von PD-L1 auf Tumorzellen sowie in der Tumormikroumgebung führt und dadurch die adaptive Immunsuppression des Tumors fördert [181]. Die tumoröse Beeinflussung des Immunsystems läuft dabei in drei Schritten ab: Die Elimination, dem Gleichgewicht und der Flucht. Im ersten Schritt kann das Immunsystem durch Erkennen der Neoantigene die Tumorzellen bekämpfen. In der Gleichgewichtsphase kann das Immunsystem die Tumorzellen nicht vollumfänglich bekämpfen, jedoch eine Progression des Tumors verhindern. Inaktiviert der Tumor angreifende T Zellen durch die Expression eines Immun-Checkpoint Liganden, werden die T Zellen inaktiviert und Tumorzellen können ungehindert proliferieren [184]. Anhand klinischer Daten konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer Überexpression von PD-L1 im Tumor bzw. in der Tumormikroumgebung eine schlechtere Prognose haben [185, 186].

1.3.1 PD-1-Immuntherapie

Bisher war die Platin-basierte Chemotherapie der Standard für die Therapie von NSCLC. Im letzten Jahrzehnt etablierten sich Immuntherapien als neue und vielversprechende Krebstherapien. Bei der sogenannten Immun-Checkpoint Blockade werden Tumorzellen nicht direkt therapeutisch adressiert, sondern durch das reaktivierte wirtseigene Immunsystem bekämpft [174, 187]. 2016 konnte gezeigt werden, dass NSCLC Patienten, welche mit Pembrolizumab, einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1, behandelt wurden, eine gesteigerte Überlebensrate aufwiesen [174, 188, 189]. Um die Eignung eines Patienten für die Immuntherapie zu bestimmen, wird anhand von Tumorbiopsien die Expression von PD-L1 analysiert. Es konnte eine Korrelation zwischen der PD-L1 Expression und dem positiven Ansprechen auf eine PD-1/PD-L1 Blockade nachgewiesen werden [158, 190]. Dabei zeigen

etwa bis zu 28% der Patienten mit NSCLC eine hohe PD-L1 Expression im Tumorgewebe auf. Eine positive PD-L1 Expression wird dabei immunhistochemisch als membranöse PD-L1 Expression an mindestens 50% der Tumorzellen definiert, ungeachtet der Intensität der Färbung [189, 191, 192]. Überraschenderweise profitieren jedoch nicht alle Patienten von einer Immuntherapie, selbst solche mit einem hohen PD-L1 Status in Tumorbiopsien sprechen häufig nicht auf die Therapie an [193-195]. Neben schweren Nebenwirkungen [196, 197] werden die Erwartungen an Immuntherapien auch durch eine sogenannte Hyperprogression der Tumore aufgrund der gegebenen Immuntherapie gedämpft [198]. Es zeigt sich zudem zusehends, dass der PD-L1 Expressionsstatus des Tumors keine valide Aussage über die Eignung des Patienten für eine PD-1-Immuntherapie liefert. Auch Patienten mit geringer oder sogar fehlender PD-L1 Expression sprechen auf die Therapie mit gesteigerter Überlebensrate an [199-207].

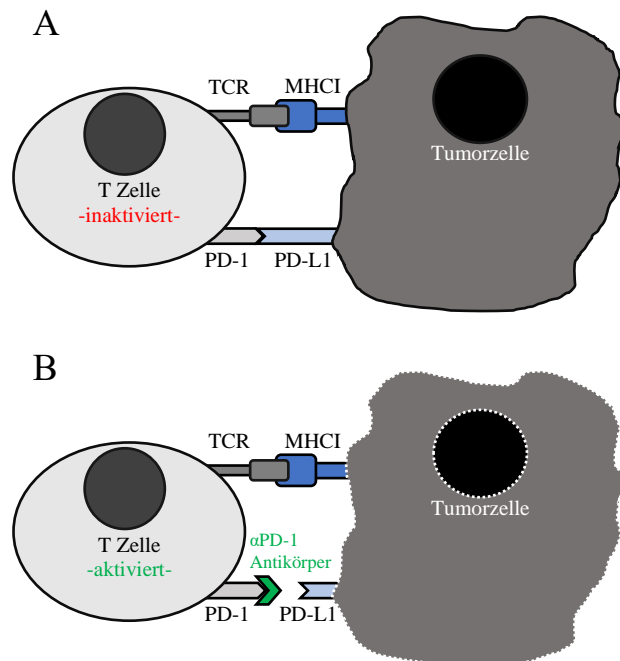


Abbildung 2: Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint und PD-1-Immuntherapie (nach [208]). Die T Zelle Aktivierung benötigt zwei Signale: (i) Antigenerkennung durch den T Zell Rezeptor (TCR) und (ii) Modulation durch Moleküle aus der Familie der Immun-Checkpoints. T Zellen exprimieren den Oberflächenrezeptor PD-1, welcher nach binden von PD-L1 bzw. PD-L2 die Apoptose von antigenspezifischen T Zellen fördert und dadurch Autoimmunreaktionen verhindert. (A) Tumorzellen können ebenfalls den Ligand PD-L1 exprimieren und durch das Inaktivieren attackierender T Zellen dem Immunsystem entgehen. (B) Therapeutische Antikörper gegen PD-1 blockieren die PD-1/PD-L1 Interaktion. Durch das Reaktivieren der T Zellen können Tumorzellen wiedererkannt und bekämpft werden.

1.3.2 PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint im Kontext der COPD

COPD und Lungenkrebs sind durch eine starke Aktivierung des Immunsystems eng miteinander verknüpft. Es ist bekannt, dass es durch die im Zigarettenrauch enthaltenen Karzinogene zu einer erhöhten Mutationsrate des Tumors kommen kann [209] und dadurch Raucher besser auf eine PD-1-Immuntherapie ansprechen [189, 192, 199, 210]. Neue Studien legen nahe, dass es abseits des PD-L1 Status des Tumorgewebes sowohl durch die chronische Entzündung bei NSCLC als auch bei COPD-Patienten zu einer Aktivierung des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints und damit zu einer Inaktivierung der T Zellen kommt. Studien konnten zeigen, dass NSCLC Patienten mit einer existierenden COPD dadurch besser auf eine PD-1-Immuntherapie ansprechen [211-213], obwohl dies entgegen der Annahme war, da COPD bei NSCLC Patienten eigentlich die Überlebensrate senkt [101, 102, 214, 215].

Inwiefern der PD-1 Immun-Checkpoint zur Pathogenese der COPD beiträgt und therapeutische Antikörper gegen PD-1 bzw. PD-L1 den Verlauf der COPD beeinflussen, wird kontrovers diskutiert [216, 217]. So ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar, ob sich Immuntherapien gegen den PD-1 Immun-Checkpoint günstig oder ungünstig auf die pulmonale Entzündung bei COPD-Patienten auswirken. In *ex vivo* Experimenten zeigten McKendry et al., dass die Virus-induzierte Expression von PD-L1 in Makrophagen aus COPD-Patienten vermindert ist [213]. Es ist daher gut möglich, dass die zusätzliche Inhibierung der PD-1/PD-L1 Achse die pulmonale Entzündung bei COPD-Patienten weiter verstärkt und die Erkrankung vorantreibt. Andererseits könnte die Umkehrung der Suppression von T Zellen die antimikrobielle Immunantwort verbessern [216, 217].

1.4 IL-17C

Die Gruppe der Interleukin-17 (IL-17) Zytokin-Familie besteht aus IL-17A bis IL-17F und spielt eine tragende Rolle in der Immunantwort gegen Mikroorganismen und in akuten und chronischen Entzündungsreaktionen [218]. IL-17C wurde mit einer etwa 27%igen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz im Jahr 2000 als weiteres Homolog zu IL-17A identifiziert [219]. Die Expression von IL-17C erstreckt sich dabei über das respiratorische Epithel [220-222], das Darmepithel [223], Nierenzellen [224-226] und Keratinozyten [226-230]. Zudem wurde IL-17C in glatten Muskelzellen nachgewiesen [231]. Durch die Rezeptoren IL-17RA bis IL-17RE binden die Zytokine der IL-17 Familie an ihren Zielstrukturen, um ihre Effektorantwort weiterzuleiten. 2011 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass IL-17C über

den heterodimeren Rezeptorkomplex IL-17RA/IL-17RE bindet, wobei der Rezeptor IL-17RE exklusiv für IL-17C ist und IL-17RA auch von IL-17A angesprochen wird [223, 232, 233].

Die genaue Signaltransduktion von IL-17C nach Rezeptorbindung ist noch nicht vollständig beschrieben worden. Es ist jedoch bekannt, dass die SEFIR (*similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17R*) Domäne in der IL-17 Familie hoch konserviert ist [234]. Bisher konnte gezeigt werden, dass der heterodimere Rezeptorkomplex IL17RA/IL17RE über intrazelluläre SEFIR Domänen das Act1 Adaptermolekül (NF κ B activator 1) binden kann [232]. Dadurch kommt es, wie bei IL-17A bereits beschrieben, zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges durch Phosphorylierung von p65 und des NF- κ B Inhibitors I κ B α [223].

IL-17C steuert als autokriner epithelialer Mediator die Entzündungsreaktionen [221, 233]. Die Expression von *Il17c* wird zu einem frühen Zeitpunkt nach Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen reguliert. Das Aktivieren von Toll-like Rezeptoren (TLR) stellt dabei die erste Reaktion des Immunsystems bei Kontakt mit PAMPS dar, worauf IL-17C verstärkt gebildet wird [223, 233, 235].

In einem murinen Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass eine pulmonale Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* zu einer gesteigerten Expression von *Il-17c* im Lungenepithel führt. Damit verbunden war eine gesteigerte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Alveolarraum sowie gesteigerte Level rekrutierender Zytokine wie *macrophage inflammatory protein 2* (MIP-2) und *keratinocytes-derived chemokine* (KC) [220]. Vergleichbare Ergebnisse einer gesteigerten Expression von *Il-17c* konnten in einem weiteren murinen Infektionsmodell in Darmepithelzellen durch Infektion mit dem Darmpathogen *Citrobacter rodentium* erkannt werden [223].

1.5 Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Erkenntnisse über die Rolle des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints bei der Pathogenese der COPD zu gewinnen. Dazu sollten die Konzentrationen von löslichem PD-1 und PD-L1 in Serum und BAL Proben von COPD-Patienten gemessen und mit dem Krankheitsverlauf korreliert werden. Mit Hilfe präklinischer COPD-Modelle sollte die Auswirkung von Zigarettenrauch- und bakteriell-induzierter Inflammation auf die Aktivierung des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints analysiert werden. Mit Hilfe gegen PD-1 gerichteter therapeutischer Antikörper sollte in den COPD-Modellen zudem geprüft werden, ob PD-1 chronische pulmonale Entzündung reguliert und der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint als therapeutisches Ziel geeignet ist.

Im präklinischen Lungentumormodell sollte geklärt werden, inwieweit der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint in der Tumormikroumgebung durch bakteriell-induzierte Inflammation beeinflusst wird. Eine Blockade des PD-1-Immun-Checkpoints sollte Aufschluss darüber geben, ob es in Verbindung mit dem Zytokin IL-17C zu einem veränderten Tumorwachstum kommt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsartikel

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit Herstellerangabe aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Geräte mit Hersteller

Gerätebezeichnung	Hersteller, Land
Zentrifuge Cellspin II	Tharmac, Durmersheim, Dtl.
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific, Dtl.
Zentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific, Dtl.
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific, Dtl.
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Dtl.
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Dtl.
Inkubator Minitron	Infors HAT, Dtl.
FACS Canto II	Becton Dickinson, USA
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Dtl.
Lichtmikroskop DM750	Leica, Dtl.
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51	Olympus, JP
Mikroplattenleser FLUOstar Omega	MBG Labtech, Dtl.
NanoDrop 8000	Thermo Scientific, Dtl.
Photometer Ultrospec 2100 pro	Biochrom, Dtl.
CFX96 Touch Real Time System	BioRad, USA
MyCycler	BioRad, USA
Luminex Magpix	Luminex Corp., USA
PariMaster Nebulizer	Pari, Dtl.
Rauchmaschine TE-10	Teague Enterprises, USA
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec, USA
FlexiVent	Scireq Inc, Kanada

Die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsartikel, Kunststoffwaren, Kits, Antikörper und Computerprogramme und deren Hersteller sind dem jeweiligen Methodenteil zu entnehmen.

2.1.2 Lösungen, Puffer, Medien

Die verwendeten Lösungen und Puffer sind in nachfolgender Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Lösungen

10 x PBS	800,6 g NaCl 20,1 g KCl 115,6 g Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 20,4 g KH ₂ PO ₄ in 10 L Aqua dest. lösen, pH 7,2 – 7,4
Formalinlösung 4%	108 ml 37% Formaldehydlösung mit 1 x PBS auf 1 L auffüllen
PEB-Puffer	0,5% BSA 2 mM EDTA in 1 x PBS lösen, pH 7,2
ELISA Diluent	0,1% BSA in 1 x PBS
10x Blotting Puffer	0,048 M Tris Base 0,039 M Glycin in 600 ml Aqua dest. lösen, pH 9,2 0,0013 M SDS auf 1 L auffüllen
1x Blotting Puffer	100 ml 10x Blotting Puffer 700 ml Aqua dest. 200 ml Methanol abs.
10X SDS-PAGE Laufpuffer	0,25 M Tris Base 1,92 M Glycin 1% SDS pH 8,3, mit HCl einstellen
1 x SDS-PAGE Laufpuffer	100 ml 10x SDS-PAGE Laufpuffer 900 ml Aqua dest.
RIPA Puffer	150 mM NaCl 1% Triton X-100 0.5% Natrium deoxycholate 0.1% SDS 50 mM Tris, pH 8.0

2.1.3 Software

Das Softwarepaket Microsoft Office wurde für Texte und Kalkulationen verwendet. Diagramme wurden mit der Software GraphPad Prism 8.4.0 der Firma GraphPad Software Inc. erstellt und statistisch ausgewertet.

Die Mikroskopie der histologischen Präparate wurde mit den Programmen Visiomorph der Firma Visiopharm und CellSens Dimension der Firma Olympus Life Science durchgeführt. Die Software ImageJ wurde zur Auswertung von immunhistochemischen Färbungen und für die Berechnung der Tumorflächen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht von Bakterien

Aus einem Glycerol-Stock von Nontypeable *H. influenzae* (klinisches Isolat) wurde mittels steriler Impföse eine Vorkultur in 50 ml Hirn-Herz Medium (Roth, Deutschland) mit 1 % Supplement B (BD, Deutschland) über Nacht bei 37°C angeimpft. Diese wurde am darauffolgenden Tag auf Kochblutagar (BD, Deutschland) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Hiervon wurde eine Einzelkolonie in eine weitere Vorkultur überführt, aus welcher am nächsten Tag Hauptkulturen angeimpft wurden.

2.2.1.2 Hitzeinaktivierung und Lysieren der Bakterien

Die NTHi-Flüssigkultur wurde bei 2500 x g, 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Pellet wurde in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien für 45 min bei 70°C inaktiviert. Die anschließend auf Eis gekühlte Suspension wurde an der Ultraschallsonde für 45 Sekunden lysiert. Hiernach erfolgte ein Kontrollausstrich des hitzeinaktivierten Lysates auf Kochblutagarplatten, um die vollständige Lyse der Bakterien zu überprüfen. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA (Kap. 2.2.2.3) bestimmt und auf 2,5 mg/ml Gesamtprotein eingestellt. Das Lysat wurde für die Vernebelung in 7 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNS-Extraktion

Für die RNS Extraktion wurden die Lungen aus den Mäusen entnommen und von umliegendem Gewebe befreit, geteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die RNS-Extraktion wurde der linke Lungenflügel verwendet. Aus dem Lungengewebe wurde die RNS mittels TRIZOL-Reagent (Invitrogen) isoliert. Hierzu wurde pro 100 mg Gewebe 1 ml Trizol hinzu pipettiert, bei einer halben Lunge wurden demnach 2 ml Trizol eingesetzt. Das Gemisch wurde mittels IKA® ULTRA-TURRAX® bei 20.000 rpm homogenisiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurden die erhaltenen Suspensionen bei 4°C für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert und 1,6 ml des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hiernach wurde in jede Probe 400 µl Chloroform (RoTi-CL, Roth, Karlsruhe) hinzu pipettiert und durch kräftiges Schütteln gut gemischt. Nach einer 3-minütigen Inkubationsdauer bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 4°C für 15 min und 12.000 x g zur Phasenauftrennung zentrifugiert. Die erhaltene obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit 1 ml Isopropanol vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Zum Fällen der RNS wurden die Proben bei 4°C für 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene RNS Pellet wurde darauf zweimal mit je 2 ml 75% Ethanol gewaschen und abermals bei 7.500 x g pelletiert und final in 200 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Um restliche kontaminierende genomische DNS zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau mit dem rDNase Set (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt, die RNS anschließend durch eine Natriumacetatfällung erneut pelletiert. Hierzu wurde zu der RNS-Lösung 100% Ethanol im Verhältnis 1:2,5 als auch 3 M Natriumacetat (pH 5,2) im Verhältnis 1:10 hinzugegeben und bei -20°C über Nacht inkubiert. In einem Zentrifugationsschritt bei 21.000 x g, 4°C für 10 min wurde die RNS abzentrifugiert und erneut mit 75% Ethanol und einem Zentrifugationsschritt bei 7500 x g gewaschen. In einem folgenden Trocknungsschritt bei Raumtemperatur für 10-20 Minuten wurde restliche Flüssigkeit entfernt, das angetrocknete Pellet final in 200 µl RNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich) aufgenommen. Die Konzentration der RNS (ng/µl) wurde spektralphotometrisch an dem NanoDrop 8000 bestimmt. Für den Umschrieb der RNS in komplementäre DNS (cDNS) wurde das RevertAid First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. In die Reaktion wurde 1 µg extrahierte Gesamt-RNS in RNase-freiem Wasser in einem Volumen von 10 µl eingesetzt. Das Programm der cDNS Synthese ist nachfolgend in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Programm der cDNS Synthese

Schritt	Zeit	Temperatur
1	5 Minuten	65°C
2	5 Minuten	4°C
3	60 Minuten	42°C
4	5 Minuten	70°C

Die synthetisierte cDNS wurde nach der Synthese 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt.

2.2.2.2 Quantitative real time PCR

Mittels Real Time qPCR (RT-qPCR) wurden Genexpressionsstudien durchgeführt. Hierzu wurde das SensiMix SYBR Kit (Bioline) auf dem System CFX96 (BioRad) verwendet. Der jeweilige Reaktionsansatz für eine Reaktion ist in Tabelle 5 aufgelistet, das gewählte Programm ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Reaktionsansatz (einfach) für RT-qPCR

12,5 µl	SensiMix SYBR Fluorescein
0,1 µl	Primer fw (100 µM)
0,1 µl	Primer rev (100 µM)
7,3 µl	PCR-H ₂ O
5 µl	cDNS

Tabelle 6: RT-qPCR Programm

Zyklus	Zeit (m:s)	Temperatur
1	10:00	95°C
2	00:15	95°C
3	00:30	60°C
4	Messung der Fluoreszenz	
Wiederholen der Zyklen 2-4, 40 x		
5	00:30	65°C
6	00:05	65°C+0,5°C/ Zyklus
7	Messung der Fluoreszenz	
Wiederholen der Zyklen 6-7, 60 x		
8	∞	4°C

Die für die Genexpressionsstudien verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Deutschland) bezogen und sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Murine RT-qPCR Primer

Gen		Primersequenz	Quelle
GAPDH	forward	5'-ATG GTG AAG GTC GGT GTG-3'	
	reverse	5'-CAT TCT CGG CCT TGA CTG-3'	
IL-17C	forward	5'-CTG GAA GCT GAC ACT CAC G-3'	[236]
	reverse	5'-GGT AGC GGT TCT CAT CTG TG-3'	
IL-6	forward	5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3'	
	reverse	5'-TCC ACG ATT TCC CAG AGA AC-3'	
KC	forward	5'-GCT GGG ATT CAC CTC AAG AA-3'	[220]
	reverse	5'-AGG TGC CAT CAG AGC AGT CT-3'	
IL-17RE	forward	5'-CCCTCTCTTGGTGAGGAA ATC-3'	
	reverse	5'-GCCTAGCAGCTTCCTCTGG-3'	

Der korrekte Ablauf der RT-qPCR wurde nach dem Lauf mittels Schmelzkurvenanalyse und durch elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen PCR-Produkte überprüft. Die Veränderungen in der Genexpression wurden anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode ausgewertet.

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Quantifizierung der Gesamtproteine in Bakterienlysat, Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3 Tierversuche

Sämtliche tierexperimentellen Versuche wurden durch das Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt und unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Es wurden aufgrund der verträglicheren Tierhaltung ausnahmslos sieben bis neun Wochen alte weibliche Tiere verwendet, mit stets freiem Zugang zu Wasser und Futter. Die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme mit genetischem Hintergrund und deren Herkunft sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Mausstämme

Mausstamm	Mutation	Herkunft
C57BL/6N	Wildtyp	Janvier, FR
C57BL/6N, <i>Il17c</i> ^{-/-}	systemischer knockout von IL-17C, homozygot	eigene Zucht; der Stamm wurde ursprünglich vom Mutant Mouse Resource and Research Center (USA) erhalten
C57BL/6N <i>Kras</i> ^{LA1}	systemische Mutation, G12D Substitution, heterozygot	eigene Zucht; der Stamm wurde ursprünglich vom Frederick National Laboratory for Cancer Research (USA) erhalten
C57BL/6N <i>Kras</i> ^{LA1} / <i>Il17c</i> ^{-/-}	Kombination aus IL-17C knockout und <i>Kras</i> ^{LA1} Mutation	eigene Zucht nach Kreuzung von C57BL/6N <i>Kras</i> ^{LA1} mit C57BL/6N, <i>Il17c</i> ^{-/-}

C57BL/6N *Kras*^{LA1} Mäuse sowie C57BL/6N *Kras*^{LA1}/*Il17c*^{-/-} Mäuse tragen aufgrund einer Substitution von Glycin zu Asparaginsäure in Kodon 12 (G12D) im Exon 1 des *Kras* Genes ein onkogenes Allel, das nach einem spontanen Rekombinationsereignis zur Expression kommt. Die Mäuse tragen das Allel zwar in allen Körperzellen, es wird in der Regel jedoch nur eine multifokale Tumorbildung in der Lunge beobachtet. Histopathologisch ähnelt die Tumorprogression der *Kras*^{LA1} Mäuse der bei Menschen mit NSCLC. Typische Tumorstadien wie atypische adenomatöse Hyperplasie, leichte Hyperplasie bis hin zum Adenokarzinom lassen sich in den Lungen der Tiere erkennen [237].

2.2.3.1 Tabakrauchexposition

Zur Induktion eines rauchvermittelten Lungenschadens wurden die Mäuse an fünf Tagen pro Woche in der Rauchmaschine TE-10 (Teague Enterprises) im Kurzzeitmodell für 5 Tage, für vier Wochen und im Langzeitmodell für 12 Wochen Tabakrauch exponiert. Die Versuchsdurchführungen sind den jeweiligen Ergebnisteilen zum besseren Verständnis schematisch vorangestellt. Die Mäuse wurden an den entsprechenden Tagen zweimal 50 Minuten exponiert, mit einer Pause von 120 Minuten. Als Zigaretten wurden „*Research Cigarettes*“ des Typs 3R4F (*College of Agriculture, University of Kentucky, USA*) benutzt. In den angewandten Modellen wurden die Zigarettenfilter händisch entfernt. Während der Rauchexposition betrug die Partikelkonzentration 400 – 500 mg/m³, die CO Konzentration lag zwischen 200 und 350 ppm.

2.2.3.2 Bakterienexposition

Um die Auswirkung einer chronischen Entzündung der Lunge mit NTHi zu untersuchen, wurden die Mäuse in dem COPD Modell sowie im Kras Modell an drei Tagen pro Woche für 40 Minuten in eine Plexiglasbox gesetzt und mittels PariMaster Nebulizer, dem wie in Kapitel 2.2.1 beschriebenen NTHi-Lysat (Gesamtproteinkonzentration 2,5 mg/ml in 1 x PBS) für bis zu vier Wochen ausgesetzt (siehe Abb. 17, 21, 35).

2.2.3.3 Gabe des PD-1 Antikörpers

Der PD-1 Blocking Antikörper (Klon RMP1-14, BioXCell, USA) und der Isotyp Antikörper (BioXCell) wurde den Mäusen i.p. injiziert. Es wurden pro Injektion 200 µg Antikörper / 200 µl PBS verabreicht. In den Versuchen der NTHi Exposition wurde der Antikörper dreimal pro Woche 30 Minuten vor der NTHi Exposition gegeben, während der Rauchexposition wurde der Antikörper zweimal pro Woche 30 Minuten vor der Rauchexposition injiziert (Siehe Abb. 9 und Abb. 17). Nach dem Injizieren wurden die Mäuse auf Nebenwirkungen beobachtet. Das Gewicht sowie das Verhalten der Mäuse wurden über den Versuchszeitraum täglich protokolliert.

2.2.3.4 Lungenfunktionsmessung

Die invasive Lungenfunktionsmessung für Kleintiere wurde mit dem System FlexiVent (Scireq, Kanada) durchgeführt. Während der Messung wird die Mechanik des respiratorischen Systems der Mäuse anhand festgelegter Beatmungsmanöver untersucht. Hierzu wurden die Mäuse durch intraperitoneale Gabe von Ketamin (6 – 8 mg/kg) und Xylazin (90 – 120 mg/kg) narkotisiert, die Trachea freigelegt und eine Stahlkanüle als Bypass in die obere Trachea eingeführt. Die Mäuse wurden anschließend computergestützt über den Bypass beatmet. Durch eine Pumpe wurden oszillierende Luftströme in das respiratorische System der Maus gegeben und resultierende Druck – und Volumenveränderungen aufgezeichnet. Die genauen Manöver der Lungenfunktionsmessung sind in Tabelle 9 aufgelistet. Nach der Messung wurden die Tiere für die weitere Probenentnahme unter bestehender Narkose durch eine finale Blutentnahme aus dem Herzen euthanasiert.

Tabelle 9: Beatmungsmanöver der Lungenfunktionsmessung und deren Messparameter

Manöver	Modell	Parameter
Single-Frequency FOT	Single Compartment Model	- Compliance - Elastance - Widerstand des resp. Systems
Multi-Frequency FOT	Constant Phase Model	- Tissue damping
Pressure-Volume-Loop (P-V-Loop)	P-V-Loop Salazar Knowles Gleichung	- Totale Lungenkapazität - quasi-statische Compliance

2.2.4 Probengewinnung und –aufarbeitung

2.2.4.1 Präparation der Mäuse

Die Mäuse wurden für die Probengewinnung durch eine intraperitoneale Gabe von Ketamin und Xylazin betäubt (90 – 120 mg/kg). Nach Prüfen des Zwischenzehenreflexes wurde der Brustkorb eröffnet und das Tier durch finale Blutentnahme aus dem Herzen getötet. Das Vollblut wurde mit einer mit 0,5 M EDTA Lösung vorgespülten Spritze entnommen. Durch Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten bei 2500 x g konnte das Plasma von den übrigen Zellbestandteilen getrennt und für weitere Analysen bei -80°C gelagert werden.

Um die Lungen zu lavagieren, wurde die Trachea freigelegt und eine Venenverweilkanüle (BBraun, Vasofix G18) eingeführt. Die Lungen wurden anschließend einmal mit 1 ml 1 x PBS gespült. Die Lavage wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.4.2 Quantifizierung der Leukozytenzahl und Anfertigung der Cytospinpräparate

Die gewonnene BAL-Flüssigkeit wurde schnellstmöglich weiterverarbeitet. Hierzu wurden die Proben bei 4°C, 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde abgenommen und für weitere Untersuchungen bei -80°C gelagert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml 1 x PBS aufgenommen und die Gesamtleukozytenzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Innovatis) verblindet von einem technischen Mitarbeiter bestimmt. Hierzu wurden geeignete Verdünnungen in 1 x PBS hergestellt und je 10 µl in die Zählkammer pipettiert. Von der restlichen Zellsuspension wurden für das Differentialbild der Lavage Cytospins mit Hilfe der Cellspin Cyto Zentrifuge angefertigt. Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension mit 150 µl 1 x PBS direkt in den Cytospinaufsätzen gemischt und bei 200 x g

für 6 Minuten auf Objektträger (Super Frost Plus, Thermo Scientific) zentrifugiert. Für die darauffolgende Färbung wurden die Zellen zuerst bei -20°C für 10 Minuten in Methanol fixiert. Nach einer kurzen Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Zellen mittels DiffQuick Schnelfärbekit (Medion Diagnostics, USA) angefärbt. Die Differenzierung der einzelnen Zelltypen erfolgte verblindet von einem technischen Mitarbeiter am Lichtmikroskop. Hierbei wurden mindestens 200 Zellen an verschiedenen Stellen des Präparates bestimmt.

2.2.4.3 Einbetten der Lunge und Stereologie

Für histologische Untersuchungen der Lunge wurde der Thorax der euthanasierten Mäuse eröffnet, eine Venenverweilkanüle in die obere Trachea eingeführt und durch Abbinden mit einem Faden fixiert. Die Lunge wurde mit der Verweilkanüle vorsichtig aus der Maus herauspräpariert. Es wurde eine PBS gepufferte 4%ige Formaldehydlösung (Formalin) mit einem konstanten Druck von $30\text{ cmH}_2\text{O}$ für mindestens 15 Minuten in die Lungen eingefüllt. Zur weiteren Fixierung wurde die Lunge unter dem Druck der Säule mit einem Faden abgebunden und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 40 ml Formalin überschichtet. Nach 24 Stunden wurde das Formalin ausgewechselt und die Fixierung für weitere 24 Stunden weitergeführt [238]. Danach wurde das Formalin mehrfach mit PBS ausgewaschen. Währenddessen wurde die Lunge von anhängendem Gewebe und Organen wie Herz, Thymus und Oesophagus, freipräpariert. Die Lungen wurden im Ganzen in PBS gepufferter 1%iger Agarose Lösung über Nacht bei 60°C voreingebettet. Nachdem die Lungen am nächsten Tag in der Agarose abgekühlt waren, wurden diese in 5 Millimeter dicke Blöcke cranial nach caudal vorgeschritten. Diese wurden planar in Einbettschälchen überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Schnittflächen so orientiert waren, dass unterschiedliche Schnittebenen im Schälchen nach oben zeigten. Die Schnitte wurden mit 1%iger Agaroselösung überschichtet. Die ausgehärteten Agaroseblöcke sind in Einbettkassetten bis zur Paraffineinbettung in Formalin gelagert worden. Die Paraffineinbettung wurde im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Von den erhaltenen Paraffinblöcken wurden $2\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte am Schlittenmikrotom (Leica SM 2000R) angefertigt und bis zur weiteren Färbung bei Raumtemperatur dunkel und staubgeschützt gelagert.

Für die stereologische Auswertung der Lungenschnitte musste zuvor das Volumen der Lungen nach dem Fixieren durch die Flüssigkeitsverdrängungsmethode nach Scherle bestimmt werden [239]. Um sicherzustellen, dass die Schnittpräparate repräsentativ für die gesamte Lunge sind, wurden die Schnittpräparate nach der „*systematic uniformly random sampling (SURS)*“-

Methode erstellt [240, 241]. Die zuvor mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbten Schnittpräparate wurden vor der Mikroskopie verblindet. Um Übersichtsbilder des gesamten Lungenschnittes zu erhalten, wurden diese an dem Olympus BX51 Mikroskop auf einem automatischen Objektträgertisch mit dem Programm Visiopharm Integrator vollständig eingescannt. Durch das Programm wurden anschließend zufällige Bereiche der Schnittpräparate automatisch als Testfelder (30-50 Felder je Lungenschnitt) für die stereologische Auswertung bestimmt. Anhand der zufälligen Testfelder wurde eine End- und Schnittpunktzählung angewendet. Dadurch konnte die mittlere freie Weglänge zwischen den Alveolarsepten (MCL) vermessen werden [242].

2.2.4.4 Immunhistochemie

Die fixierten und in Paraffin eingebetteten Lungenschnitte wurden über Nacht bei 60°C inkubiert und anschließend in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Da die Lungen in Formalin fixiert wurden, musste vor der Färbung ein Demaskieren der Epitope durchgeführt werden. Durch Aufkochen der Lungenschnitte in EDTA-Puffer können nicht mehr immunreaktive Epitope zurückgewonnen werden. Hierzu wurden die Schnitte in einer Mikrowelle für 45 Minuten leicht köchelnd in EDTA Puffer (1 mM EDTA, pH 8,0) aufgekocht. Nach vorsichtigem Abkühlen wurden die Schnitte in PBS gewaschen und endogene Peroxidasen durch Inkubieren in wässriger 0,3%iger H₂O₂-Lösung bei Raumtemperatur für 30 Minuten geblockt. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS wurden unspezifische Bindestellen mit PBS gepufferter 0,2% BSA-Lösung ebenfalls für 30 Minuten geblockt. Im nächsten Schritt wurden die Lungenschnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper, welche mit Angabe der Arbeitsverdünnung in Tabelle 10 aufgelistet sind, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (nach Herstellerangabe 1 Tropfen pro Objektträger, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, HRP) bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschriff mit PBS wurden die Schnitte mit dem Chromogen Aminoethylcarbazol bis zur Sichtbarkeit positiver Reaktionen entwickelt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Schnitte in neutralem PBS Puffer gewaschen wurden. Die noch ungefärbten Strukturen wurden für eine Minute in Hämatoxylin gegengefärbt. Nach Auswaschen überschüssiger Färbelösung wurde die Hintergrundfärbung der Schnitte durch kurzes Eintauchen in Ammoniakwasser gebläut. Die Schnitte wurden mit einem wasserbasierten Eindeckmittel (Aquatex, Merck KGaA, Deutschland) eingedeckelt. Die

Anzahl positiv gefärbter Zellen je mm² Lungenparenchym (für den immunhistochemischen Nachweis von PD-L1, PD-1, CD4, CD8Ly6B,2 und P-ERK) wurde über zufällig und randomisierten Lichtbildern gemittelt (mindestens 8 Lichtbilder je Tier). Die Anzahl positiv gefärbter Zellen wurden zudem für jeden Tumorknoten separat ermittelt. Mittels immunhistochemischer Färbung für den Proliferationsmarker Ki67 wurde der Ki67-Index für individuelle Tumorknoten (positive Tumorzellen pro 100 Tumorzellen) bestimmt.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper für die Immunhistochemie

Antigen	Spezies	Arbeitsverdünnung	Hersteller
PD-L1	human	15 µg/ml	R&D (MAB1561)
PD-L1	murin	10 µg/ml	R&D (AF1019)
PD-1	murin	10 µg/ml	R&D (AF1021)
Ki67	murin	2,5 µg/ml	Abcam (ab15580)
IL-6	murin	5 µg/ml	GeneTex (GTX15815)
Ly-6B.2	murin	7 µg/ml	BioRad (MCA771G)
p-Erk	murin	5 µg/ml	CellSignalling (4631S)
CD4	murin	5 µg/ml	Abcam (ab183685)
CD8	murin	2,5 µg/ml	Abcam (ab217344)
Anti-Ziege	human/murin	1 Tropfen pro Slide	Nichirei (414351F)
Anti-Hase	human/murin	1 Tropfen pro Slide	Nichirei (414341F)
Anti-Ratte	human/murin	1 Tropfen pro Slide	Nichirei (414311F)
Anti-Maus	human/murin	1 Tropfen pro Slide	Nichirei (414321F)

2.2.4.5 Bewertung des Tumorwachstums

Die Tumorlast wurde nach vier bzw. 12 Wochen Versuchsdauer in den Lungen bestimmt. Hierzu wurde aus den, wie in Kap. 2.2.4.3 beschrieben hergestellten Gewebsschnitten zufällig ein Schnitt ausgewählt und durch H&E Färbung angefärbt. Der gesamte Gewebsschnitt wurde mit Hilfe des Programms Visiomorph mikroskopisch aufgenommen. Das Verhältnis von Tumorfläche zu Lungenfläche wurde am Olympus BX51 Mikroskop mit Hilfe des Programms CellSens ausgemessen. Hierzu wurde zuerst die gesamte Lungenfläche pro Gewebsschnitt ausgemessen. Die Tumorkläsionen wurden individuell ausgemessen und deren Anteil der Gesamtfläche errechnet.

2.2.4.6 Quantifizierung von Zytokinen

Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels kommerziell erhältlichen DuoSet ELISA-Systemen (R&D Systems) wurden in Zellkulturüberständen, BAL-Flüssigkeit, Blutplasma und aus Lungenhomogenat die Zytokinkonzentrationen von MIP2 und KC nach Herstellerangaben bestimmt. Das Herstellerprotokoll wurde dahingehend modifiziert, dass die Proben an entsprechender Stelle im Protokoll über Nacht bei 4°C in den Platten inkubiert wurden statt für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Multiplex Zytokin Assay

Aufgrund geringer Probenmengen wurden Multiplexassays (R&D Luminex, Merck Milliplex) zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen von IL-6, CCL5, IL-17A, TNF α , *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), KC und IL-10 eingesetzt. Die Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet. Für die Messung wurde das Luminex MAGPIX System benutzt.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Kulturmedien sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Medien DMEM-F12, RPMI-F12 und F12 *Nutrient Mix* sowie Trypsin, fötales Kälberserum (FCS), Antibiotika (Penicillin-Streptomycin, 10.000 U/ml) wurden von der Firma Gibco bezogen, *Airway Epithelial Cell Medium* von der Firma PromoCell und Primocin (50 mg/ml) von der Firma InvivoGen.

Tabelle 11: Zelllinien und Wachstumsmedien

Zellen	Wachstumsmedium
Calu-3	DMEM-F12 + 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin
LA-4	F12 + 15% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin
HBECs	Airway Epithelial Cell Medium, 100 μ g/ml Primocin
Alveolarmakrophagen	RPMI + 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin

Die verwendeten Zelllinien wurden in der Erhaltungskultur in 75 cm² Zellkulturflaschen (Greiner) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei Erreichen von etwa 80%iger Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurde unter beachten der sterilen Arbeitsweise das Medium aus den Flaschen abgesaugt, die Zellen mit 20 ml 1 x PBS ohne

Mg/Ca gewaschen und nach Zugabe von 3 ml Trypsin etwa fünf bis zehn Minuten bis zum vollständigen Ablösen der Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit 10 ml frischem Medium versetzt und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 300 x g für 5 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml frischem Medium aufgenommen. Hiervon wurden 500 µl in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml vorgelegtem warmen Medium vermischt. Wurden mit den Zellen Stimulationsversuche durchgeführt, so wurden diese in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät und bei Erreichen von 80%iger Konfluenz in den Versuche genommen.

Stimulation bronchialer Epithelzelllinien

Die Zelllinien LA4, Calu-3 und HBECs wurden 12 Stunden vor den Stimulationsversuchen mit dem jeweiligen Wachstumsmedium mit reduzierter Serumkonzentration (1% FCS) inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin für bis zu vier Stunden mit hitzeinaktivierten NTHi (10^7 koloniebildende Einheiten (KBE)/ml), IL-17C (100 ng/ml) und der Kombination von NTHi und IL-17C stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden zu den im Ergebnisteil (Kap. 3.2.3) angegebenen Zeitpunkten abgenommen und für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden für die Analyse der Proteinexpression in 500 µl RIPA Puffer lysiert.

Stimulation Alveolarmakrophagen

Um murine Alveolarmakrophagen zu isolieren, wurden die Mäuse wie in Kap. 2.2.4.1 beschrieben getötet und die Trachea freipräpariert. Die Lungen wurden durch fünfmaliges Spülen der Lunge mit 1 ml 1x PBS + 0,5 mM EDTA lavagiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend bei 300 x g für 5 Minuten pelletiert, nach Verwerfen des Überstandes in 2 ml RPMI Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Für die Stimulation wurden je 10^5 Alveolarmakrophagen pro Kondition in einer Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 48 Vertiefungen in 300 µl entsprechendem Kulturmedium ausgebracht. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden nicht adhärente Zellen durch Wechseln des Zellkulturmediums entfernt. Die Alveolarmakrophagen wurden mit NTHi-Lysat (Verdünnung 1:50 mit RPMI Medium) aus Kapitel 2.2.1.2 für 24 Stunden stimuliert. Der Überstand aus den Vertiefungen wurde anschließend abgenommen und bei -80°C für weitere Versuche gelagert.

2.2.5.1 Elektrophoretische Trennung von Zelllysaten und Western Blot-Transfer

Nach Bestimmen und Einstellen der Proteinkonzentration (Kap. 2.2.2.3) der in Kap. 2.2.5 erhaltenen Zelllysate wurden die Lysate über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum Denaturieren der Lysate wurden diese mit Probenpuffer (ROTI® Load, Roth, Deutschland) gemischt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteine über ein diskontinuierliches 8-16%iges Tris-Glycin-Gradienten-Gel (Anamed Elektrophorese GmbH, Deutschland) aufgetrennt. Das darauffolgende Übertragen der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Trägermembran erfolgte im Nass-Blot Verfahren.

2.2.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die auf der Trägermembran immobilisierten Proteine wurden immunologisch mit den Antikörpern gegen phospho-p44/42 MAPK (p-Erk1/2, 1:1000 in 1x PBS + 0,5% BSA, #9101, CellSignal, USA), p44/42 (Erk1/2, 1:1000 in 1x PBS + 0,5% BSA, #4695, Cell Signal) nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte durch die Chemilumineszenz-Reaktion (Pierce™ ECL Western-Blot Substrat, Thermo Scientific, USA) über den entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege/Anti-Hase, 1:5000 in 1x PBS + 0,5% BSA, Dako Agilent, USA). Dazu wurde die Membran mit den Antikörpern inkubiert und nach Zugabe der Substratlösung in der Dunkelkammer auf einem lichtempfindlichen ECL-Hyperfilm (GE Healthcare Amersham, USA) exponiert. Für die densitometrische Analyse der Banden wurde das Programm ImageJ verwendet.

2.2.6 Durchflusszytometrische Analysen

Sämtliche durchflusszytometrischen Analysen wurden an dem BD FACS Canto II in der drei Laser Konfiguration (8 Farboption) durchgeführt. In die Analysen wurden ausschließlich Einzelzellsuspensionen der Mauslunge eingesetzt. Hierzu wurden die Mäuse, wie in Kap. 2.2.4.1 beschrieben, euthanasiert. Die freigelegte Lunge wurde vor Entnahme blutfrei gespült. Dazu wurde die rechte Herzkammer angeschnitten und mit einer Kanüle (BD Vacutainer®, Blutentnahmekanüle) in die linke Herzkammer gestochen. Durch die Kanüle wurde der Blutkreislauf mit 1 x PBS gespült, bis die Lunge sichtbar frei von Blutrückständen war. Danach wurde umliegendes Gewebe von der Lunge entfernt, die Lunge herauspräpariert und davon die rechte Lungenhälfte in gentleMACS C Röhrchen (MACS Miltenyi Biotec) auf Eis gelagert. Zum Erstellen der Einzelzellsuspension wurde ein Lungendissoziationskit für Mauslungen (MACS Miltenyi Biotec) nach Herstellerangaben benutzt. Die Lungenhälfte wurde

enzymatisch verdaut und mechanisch mit dem gentleMACS Dissociator (MACS Miltenyi Biotec) aufgeschlossen. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm filtriert. Nach einem Waschschrift mit PEB-Puffer wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb gefiltert, bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert und in 100 µl FACS Staining Buffer (Biolegend, USA) aufgenommen. Unspezifische Bindungen wurden durch eine 15-minütige Inkubation mit einem Fc-Block (anti-Maus CD16/CD32, Klon 2.4G2, BD Biosciences) geblockt. Die verwendeten Fluoreszenz-Antikörper und deren jeweilige vom Hersteller empfohlene Isotypen sind in Tabelle 12 aufgelistet. Die Antikörper und deren passende Isotypen wurden in Konzentrationen nach Herstellerangaben zu den jeweiligen Ansätzen pipettiert und für 30 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS Staining Buffer wurden die Proben in 500 µl Staining Buffer aufgenommen und umgehend am FACS Canto II analysiert.

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten FACS-Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Hersteller
CD45.2	PerCP-Cy5.5	BioLegend (#109827)
CD3e	V500	BD (#560773)
CD4	APC-H7	BD (#560246)
CD8a	FITC	BioLegend (#100706)
PD-1	Alexa Fluor 647	BioLegend (#109118)
Isotyp	PerCP-Cy5.5	BioLegend (#400257)
Isotyp	V500	BD (#560785)
Isotyp	APC-H7	BD (#560200)
Isotyp	FITC	BioLegend (#400506)
Isotyp	Alexa Fluor 647	BioLegend (#400626)

2.2.7 Messen der PD-1/PD-L1 Konzentrationen in humanen Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben wurden aus der prospektiven Kohortenstudie PULMOHOM bezogen. Schwerpunkt der Studie sind entzündliche Lungenerkrankungen. PULMOHOM wurde von der Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes genehmigt, alle Teilnehmer gaben eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Folgende Einschlusskriterien für die Probenauswahl für diese Arbeit wurden vorausgesetzt: (i) mindestens 40 Jahre und älter, (ii) diagnostizierte COPD (nach GOLD Kriterien) und schriftliche Dokumentation der Lungenfunktion innerhalb eines Zeitrahmens von acht Wochen. AECOPD wurde als akute Zunahme respiratorischer Symptome wie Atemnot, Husten und erhöhter Sputumproduktion definiert, unter Ausschluss von Differenzialdiagnosen.

PD-1 und PD-L1 Konzentrationen in der BALF und im Serum wurden mit dem Milliplex Human Immuno-Oncology Checkpoint Protein Panel MAP-Kit (Merck KGaA, Deutschland) auf dem Luminex MAGPIX System (Austin, USA) nach Herstellerangabe gemessen.

Freundlicherweise wurden sechs Lungenexplantate mit COPD im Endstadium von dem Institut der Allgemeinen und Speziellen Pathologie (Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg) zur Verfügung gestellt (genehmigt durch die Ethikkommission der Landesärztekammer des Saarlandes). Die paraffinierten Gewebsschnitte wurden für die Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen PD-L1 (R&D Systems, Deutschland) verwendet.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 8.4.0 der Firma GraphPad Software Inc.

Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden bei Normalverteilung mit dem Students t-Test bzw. bei nicht normalverteilten Daten mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Bei mehr als zwei Gruppen wurde der parametrische two-Way ANOVA mit Bonferroni post-test angewandt. Korrelationen wurden mit der nichtparametrischen Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$. Die verwendeten statistischen Tests, Signifikanzen sowie n-Zahlen (zusammengefasst) sind in den jeweiligen Ergebnisteilen in den Abbildungsbeschriftungen aufgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Rolle des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints im Krankheitsverlauf der COPD

Die COPD ist ein unabhängiger Risikofaktor für Lungenkrebs. Es gibt bereits zugelassene PD-1-Immun-Checkpoint Inhibitoren für die Behandlung von Lungenkrebs, die bei einem Teil der Patienten das Tumorwachstum verlangsamen, wobei das Vorhandensein einer COPD das Ansprechen auf PD-1-Immun-Checkpoint Inhibitoren möglicherweise begünstigt [211, 212]. Neue Studien weisen zudem darauf hin, dass bei COPD-Patienten der PD-1 Signalweg in lungenständigen Lymphozyten aktiviert ist [211-213]. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern der PD-1-Immun-Checkpoint zur Pathogenese der COPD beiträgt und therapeutische Antikörper gegen PD-1 den Verlauf der COPD beeinflussen.

3.1.1 PD-1 und PD-L1 im Serum und in der BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten

Es wurden die Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 im Serum von stabilen und exazerbierten Patienten mittels Multiplex Assay bestimmt. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Patientencharakteristika, aufgetrennt nach stabilem und akut exazerbierten Verlauf

Parameter	stabil	AECOPD	p-Wert
N	53	19	
Geschlecht	32/21	12/7	
Alter [Jahre]	63,03±8,483	64,98±6,72	ns
Größe [m]	1,676±0,109	1,698±0,091	ns
Gewicht [kg]	69,67±17,87	76,46±21,75	ns
FEV1	0,864±0,467	1,136±0,599	ns
FEV1 (% predicted)	31,01±12,36	39,66±20,88	ns
FEV1/FVC	46,69±14,47	58,37±13,08	0,0195

ns = nicht signifikant, GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; Daten als MW ± SD gezeigt

PD-1 und PD-L1 konnten im Serum von sowohl stabilen als auch akut exazerbierten Patienten detektiert werden. Es ergab sich eine positive Korrelation von PD-1 mit PD-L1 in beiden Patientengruppen (Abb. 3).

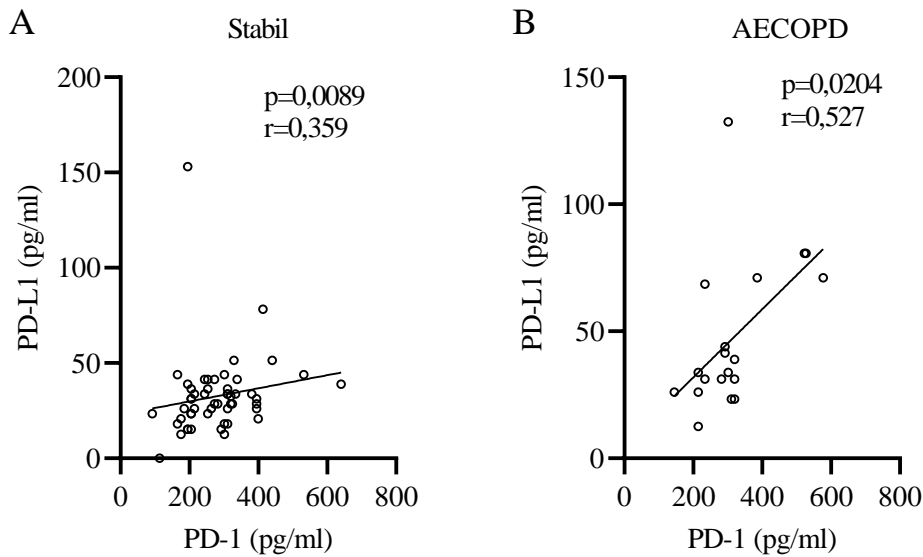


Abbildung 3: Korrelation von PD-1 und PD-L1 in Serum von COPD-Patienten. Korrelation der Serumlevel von PD-1 und PD-L1 aus Proben von (A) stabilen und (B) exazerbierten COPD-Patienten. Nichtparametrischer Spearman's Korrelationstest. r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzniveau.

Die Konzentrationen von PD-L1 waren im Serum von akut exazerbierten COPD-Patienten verglichen mit stabilen Patienten signifikant erhöht, während sich für PD-1 kein signifikanter Unterschied ergab (Abb. 4).

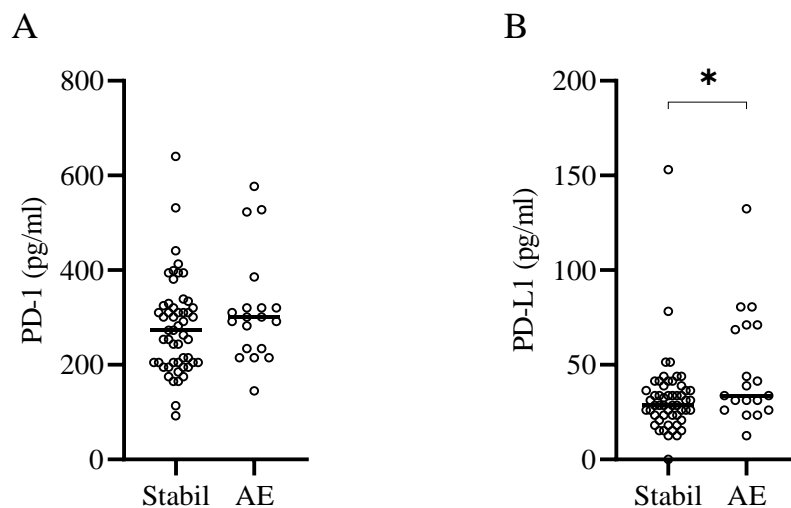


Abbildung 4: Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 in Serum von COPD-Patienten. Serumlevel von (A) PD-1 und (B) PD-L1 aus gesammelten Proben von stabilen und exazerbierten (AE) COPD-Patienten. Mann-Whitney Test. Daten sind als $MW \pm SEM$ gezeigt. $*p < 0,05$.

Zudem wurden die Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 in der BAL-Flüssigkeit von stabilen COPD-Patienten gemessen. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Patientencharakteristika, aufgetrennt nach GOLD Status

Parameter	GOLD I/II	GOLD III/IV	p-Wert
N	19	12	
Geschlecht	17/2	9/3	
Alter [Jahre]	67,32±9,9	68,25±6,5	ns
Größe [m]	1,732±0,079	1,686±0,118	ns
Gewicht [kg]	84,99±18,80	72,72±19,92	ns
FEV1	1,91±0,65	0,872±0,35	<0,0001
FEV1 (% predicted)	65,67±15,93	32,263±12,38	<0,0001
FEV1/FVC	0,685±0,097	0,422±0,0103	<0,0001

ns = nicht signifikant, GOLD = Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease; Daten als MW ± SD gezeigt

Die Patienten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Patienten mit einer mittelschweren COPD (GOLD I/II) und Patienten mit einer fortgeschrittenen COPD (GOLD III/IV). GOLD III/IV Patienten wiesen eine stark eingeschränkte Lungenfunktion auf. FEV1, FEV1 (% predicted) und FEV1/FVC waren bei diesen Patienten verglichen mit GOLD I/II Patienten signifikant vermindert. Auch hier konnte eine positive Korrelation von PD-1 mit PD-L1 festgestellt werden (Abb. 5).

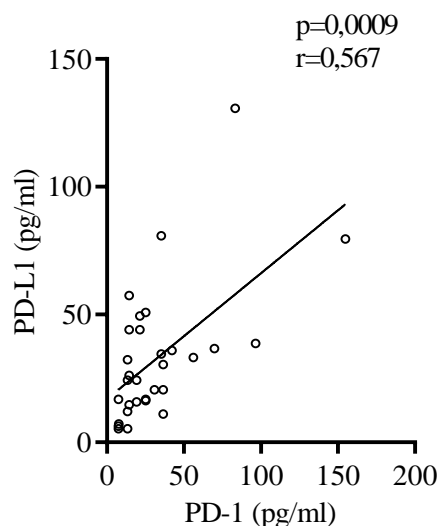


Abbildung 5: Korrelation von PD-1 und PD-L1 in BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten. Korrelation von PD-1 mit PD-L1 aus gesammelten Proben von stabilen COPD-Patienten. Nichtparametrischer Spearman's Korrelationstest. r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzniveau.

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 zwischen GOLD I/II und III/IV Patienten. Das Verhältnis von PD-1 zu PD-L1 konnte jedoch dem Schweregrad der COPD zugeordnet werden. In den BAL-Flüssigkeiten von GOLD III/IV Patienten war das PD-1/PD-L1-Verhältnis signifikant erhöht (Abb. 6).

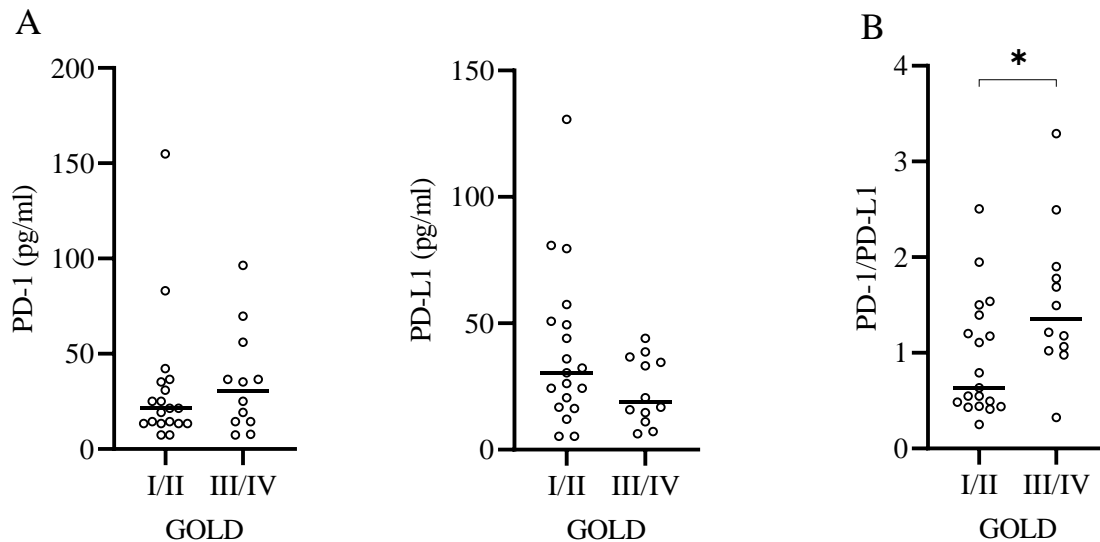


Abbildung 6: Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 in BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten. Die Patientenkohorte wurde anhand des GOLD-Status unterteilt. (A) Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 in BAL-Flüssigkeit von stabilen GOLD I/II und GOLD III/IV Patienten. (B) Verhältnis von PD-1 zu PD-L1 in der Lavage-Flüssigkeit von stabilen GOLD I/II und GOLD III/IV Patienten. Mann-Whitney Test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$.

Das Verhältnis von PD-1 zu PD-L1 korreliert zudem negativ mit der Einsekundenkapazität FEV1 (% predicted) (Abb. 7).

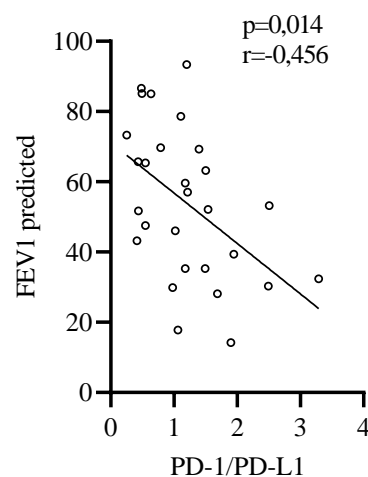


Abbildung 7: Korrelation des Verhältnisses von PD-1/PD-L1 mit FEV1 (% predicted). Anhand der bestimmten Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 in gesammelten Serumproben wurde das Verhältnis PD-1/PD-L1 zu der Einsekundenkapazität korreliert. Nichtparametrischer Spearman's Korrelationstest. r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanzniveau.

Um die Expression von PD-L1 in der Lunge nachzuweisen, wurde retrospektiv eine immunhistochemische Färbung auf PD-L1 mit Lungenresektaten von COPD-Patienten im Endstadium durchgeführt. Es konnten hierbei PD-L1 positive Zellen in allen Proben nachgewiesen werden (Abb. 8).

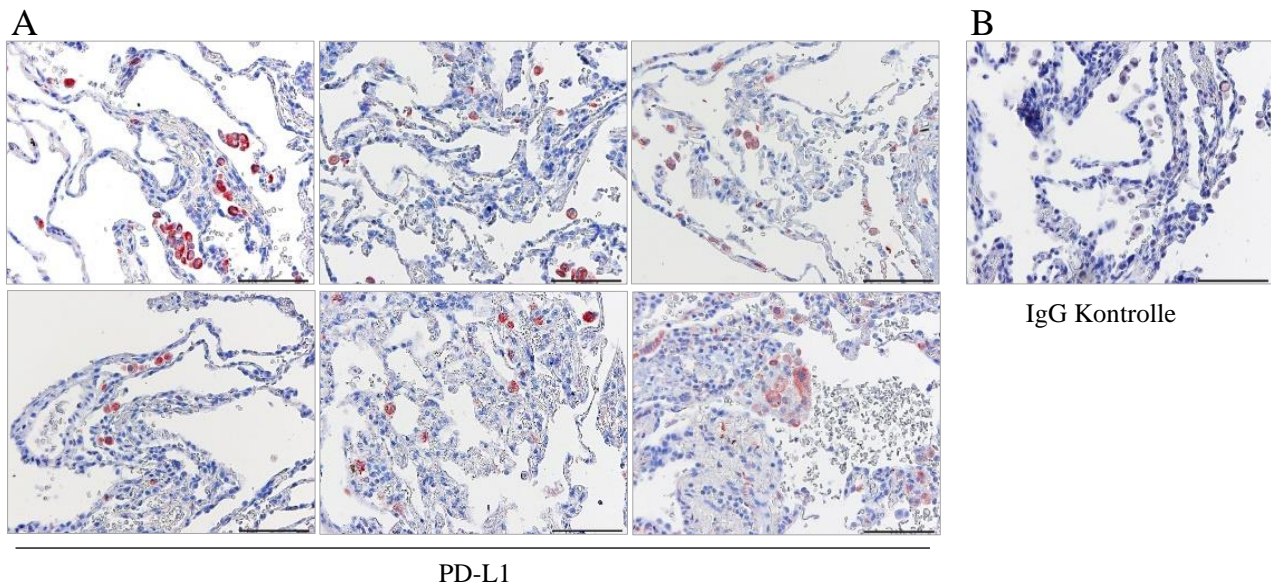


Abbildung 8: Repräsentative immunhistochemische Färbung von PD-L1 in COPD Lungenschnitten. (A) Immunhistochemische Färbung von PD-L1 in Lungenresektaten von COPD-Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf. (B) Kontroll IgG Färbung einer zufällig ausgewählten Probe. Maßstab 50 µm.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die löslichen Formen von PD-1 und PD-L1 bei COPD-Patienten sowohl im Blut als auch in der BAL-Flüssigkeit nachweisbar sind und miteinander korrelieren. PD-L1 ist während akuter Exazerbationen im Serum erhöht und das Verhältnis von PD-1 zu PD-L1 in der BAL-Flüssigkeit korreliert mit dem Krankheitsverlauf.

3.2 Die Antikörpervermittelte PD-1 Blockade führt in COPD Mausmodellen zu einem verminderten Lungenschaden

Es ist unklar, wie sich gegen PD-1 gerichtete Therapien auf den Krankheitsverlauf der COPD auswirken und ob die Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse zum rauchinduzierten Lungenschaden beiträgt. Um die Rolle des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints im Kontext COPD-ähnlicher Inflammationen zu untersuchen, wurden zwei präklinische Mausmodelle verwendet, in denen durch Zigarettenrauchexposition und durch NTHi-Exposition ein entzündungsassoziierter Lungenschaden hervorgerufen wurde.

3.2.1 Die Blockade des PD-1-Immun-Checkpoints vermindert rauchinduzierte neutrophile Entzündung

C57BL/6 Wildtyp Mäuse wurden für bis zu 12 Wochen fünfmal wöchentlich Zigarettenrauch exponiert und zudem zweimal wöchentlich i.p. mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 (α PD-1) behandelt. Die Kontrollgruppen wurden mit einem Isotyp-Antikörper behandelt. Der Versuchsablauf ist in Abb. 9 dargestellt.

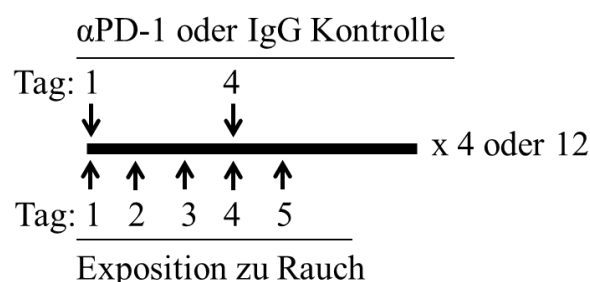


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes. C57BL/6 Mäuse wurden für vier bzw. für bis zu zwölf Wochen an fünf Tagen pro Woche Zigarettenrauch exponiert und zweimal wöchentlich mit einem α PD-1 oder einem Isotyp-Antikörper behandelt. Die Antikörper (200 μ g/200 μ l) wurden den Mäusen 30 Minuten vor der Exposition an den angegebenen Tagen i.p. verabreicht.

Es wurde berichtet, dass eine PD-1-Immuntherapie sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell teils gravierende Nebenwirkungen hat [243]. Daher wurde wöchentlich das Verhalten und das Gewicht der Tiere überprüft und am Versuchsende eine Differenzialblutbild erstellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Gewicht und im Differenzialblutbild zwischen den verschiedenen Gruppen nach vier- und zwölfwöchiger Rauchexposition festgestellt werden (Abb. 10). Final wurden die inneren Organe (Magen, gesamter Darm, Niere und Milz) bei der Präparation der Mäuse auf etwaige Entzündungserscheinungen visuell

begutachtet. Sowohl im Verhalten der Tiere als auch bei der visuellen Begutachtung der Organe konnten keine Auffälligkeiten erkannt werden.

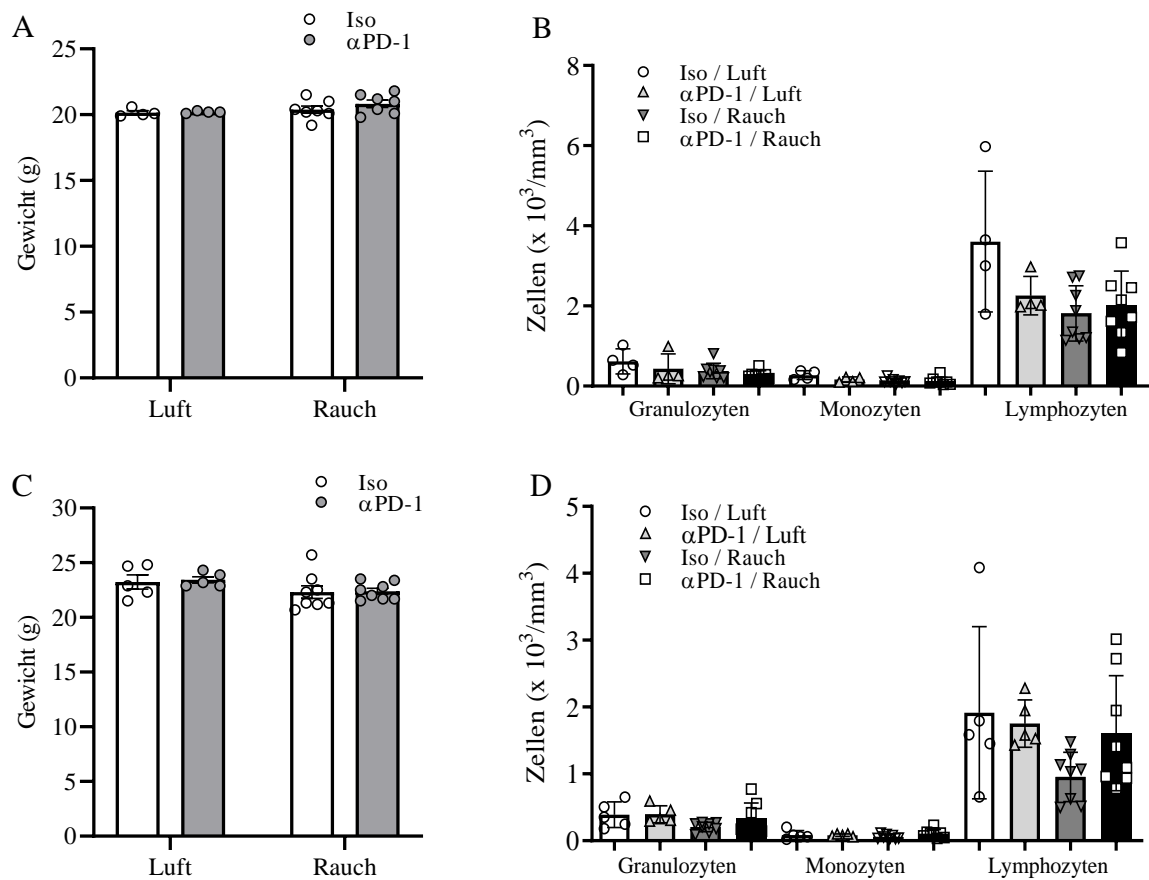


Abbildung 10: Die Behandlung mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 beeinflusst weder Gewicht noch Blutbild bei Zigarettenrauch-induzierter Inflammation. C57BL/6 Mäuse wurden für vier (A/B) und zwölf (C/D) Wochen an fünf Tagen die Woche Zigarettenrauch exponiert und zweimal wöchentlich mit einem αPD-1 oder einem Isotyp-Antikörper behandelt. Das Gewicht wurde wöchentlich kontrolliert. (A/C) Gezeigt wird das Gewicht der Tiere nach vier- und zwölfwöchiger Rauchexposition. (B/D) Die Blutleukozyten wurden gezählt und mittels Mikroskopie differenziert. Daten sind als MW ± SEM gezeigt, n = 4-8 pro Gruppe.

Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass Rauchexposition zu einer verstärkten Membranexpression von PD-L1 und PD-1 führte. Die quantitative Auswertung der Färbungen ergab, dass die Anzahl an PD-1 und PD-L1 positiven Zellen in den Lungen der zigarettenrauchexponierten Tiere signifikant erhöht war (Abb. 11).

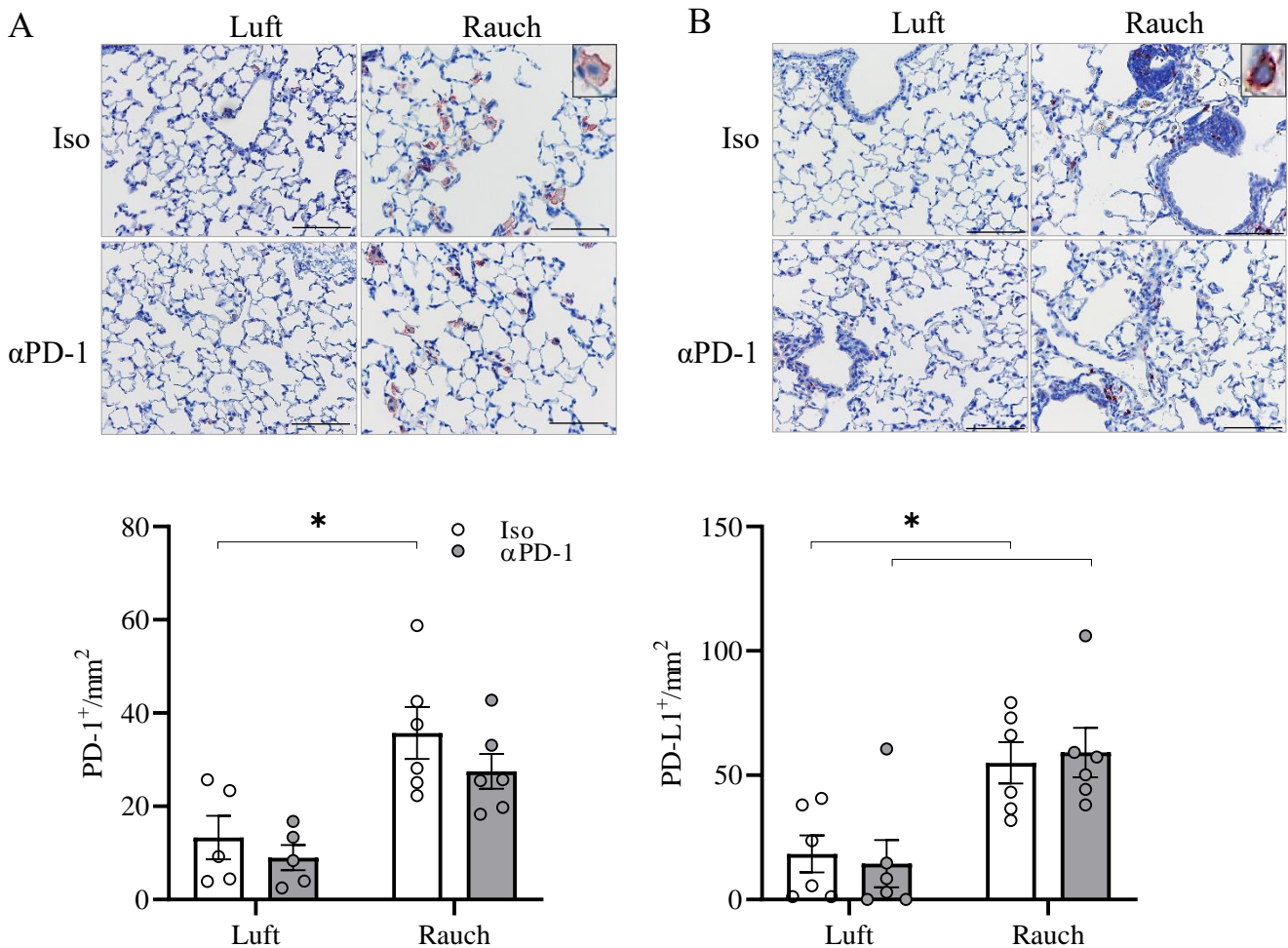


Abbildung 11: Rauchexposition führt zu einer erhöhten Anzahl an PD-1 und PD-L1 positiven Zellen. C57BL/6 Mäuse wurden zwölf Wochen Zigarettenrauch exponiert und gleichzeitig mit einem α PD-1 oder Isotyp Antikörper behandelt. Repräsentative Immunhistochemie für PD-1 (A) und PD-L1 (B) und Quantifizierung PD-1 und PD-L1 positiver Zellen. Maßstab 100 μ m. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$, n = 5-6 pro Gruppe.

Im nächsten Schritt wurde die durch Zigarettenrauch induzierte pulmonale Entzündung im Alveolarraum an verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsdauer analysiert. Es wurde die Gesamtzellzahl und das Differenzialzellbild der BAL-Flüssigkeit nach fünftägiger und vierwöchiger Rauchexposition bestimmt. Zigarettenrauchexposition führte zu einem Anstieg an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BAL-Flüssigkeit. Nach fünftägiger Rauchexposition zeigte sich noch kein signifikanter Unterschied im Zellbild zwischen α PD-1 und Isotyp behandelten Mäusen. Nach vierwöchiger Rauchexposition war die Gesamtzellzahl in der BAL-Flüssigkeit von α PD-1 behandelten Mäusen signifikant vermindert. Das Differenzialzellbild zeigte weiterhin, dass die verringerten Zellzahlen auf eine signifikant verminderte Anzahl neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten in α PD-1 behandelten Tieren

zurückzuführen war. Die Anzahl der Makrophagen hingegen wurde durch die Blockade von PD-1 nicht signifikant beeinflusst (Abb. 12).

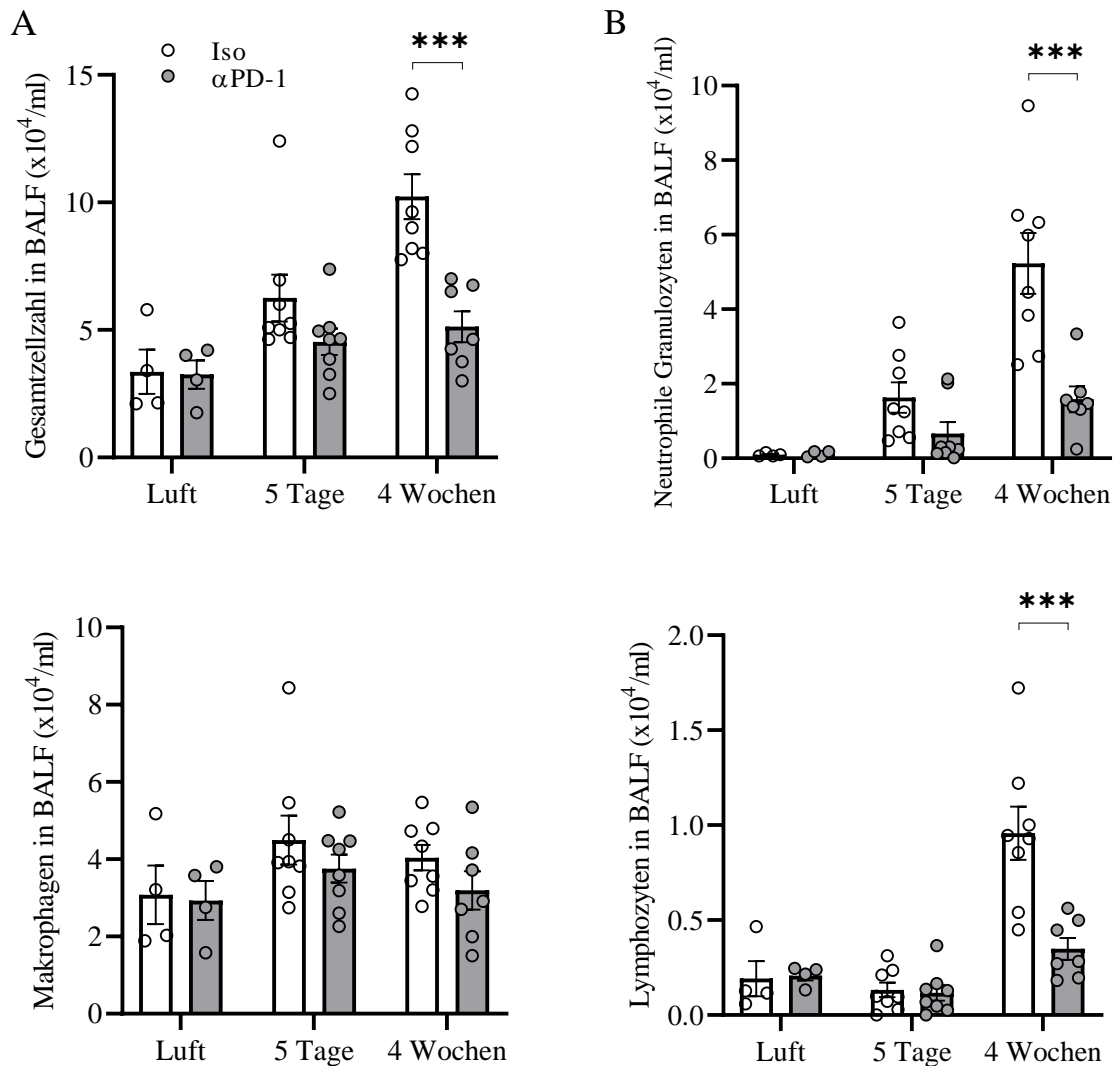


Abbildung 12: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper vermindert die rauchinduzierte Rekrutierung von Entzündungszellen in den Alveolarraum. C57BL/6 Mäuse wurden für fünf Tage und vier Wochen Zigarettenrauch exponiert und gleichzeitig mit einem α PD-1 oder Isotyp Antikörper behandelt. (A) Gesamtzellzahl in der BAL-Flüssigkeit. (B) Differentialbild der BAL-Flüssigkeit mit Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. *** $p < 0,001$, $n = 4-8$ pro Gruppe.

Nach fünftägiger Exposition waren die Konzentrationen der Chemokine KC und MIP-2 in der BAL-Flüssigkeit der mit α PD-1 behandelten Mäuse signifikant vermindert. Die Konzentrationen von KC und MIP-2 waren nach vierwöchiger Exposition im Vergleich zu den fünf Tagen stark reduziert und zeigten auch in den Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede mehr auf (Abb. 13).

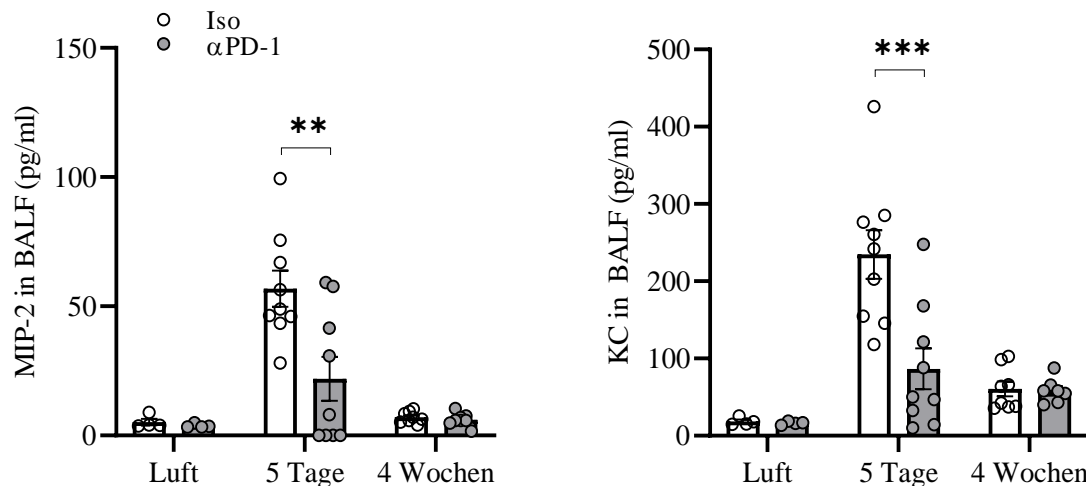


Abbildung 13: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu verminderten Konzentrationen von Chemokinen in der BAL-Flüssigkeit. Die Konzentrationen von MIP-2 und KC in der BAL-Flüssigkeit der C57BL/6 Mäuse wurden nach fünftägiger und vierwöchiger Rauchexposition mit begleitender α PD-1 Behandlung bestimmt. Die Kontrollgruppen bekamen einen nicht funktionellen Isotyp-Antikörper injiziert. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, $n = 4-9$ pro Gruppe.

3.2.2 Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu einem verminderten Lungenschaden in zigarettenrauchexponierten Tieren

Um zu prüfen, inwiefern die Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse zum rauchinduzierten Lungenschaden beiträgt, wurden C57BL/6 Mäuse wie in Abb. 9 beschrieben Zigarettenrauch bzw. Raumluft exponiert und gleichzeitig mit einem gegen PD-1 gerichteten Antikörper oder einem Isotyp-Antikörper behandelt. Es wurden durch eine invasive Lungenfunktion die mechanischen Eigenschaften der Lunge gemessen. Zudem wurden die Lungen für stereologische Methoden präpariert. Um eine obstruktive Beeinträchtigung der Lungen zu erkennen, wurde der Widerstand der Lungen gemessen. Die Zigarettenrauchexposition führte bei Isotyp-behandelten Tieren, nicht aber bei α PD-1 behandelten Tieren zu einem signifikant verringerten Widerstand des respiratorischen Systems (Abb. 14). Die elastische Dehnbarkeit der Lungen wurde anhand des Parameters Compliance bestimmt. Hierbei zeigten die Isotyp-Kontrolltiere nach Rauchexposition eine für das Modell charakteristische signifikant erhöhte Compliance, wohingegen bei den mit α PD-1 behandelten Tieren keine signifikanten rauchinduzierten Veränderungen auftraten (Abb. 14).

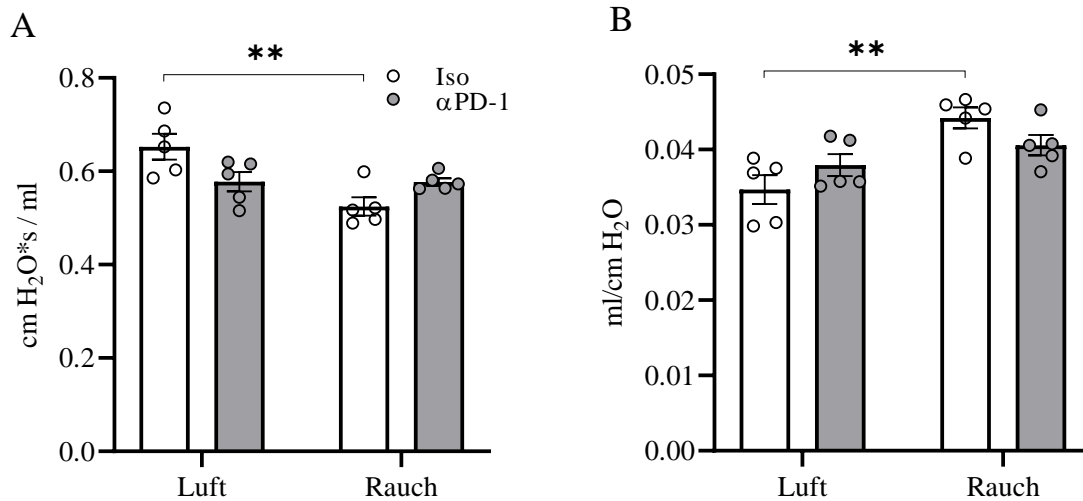


Abbildung 14: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper beeinflusst rauchinduzierte Veränderungen der Lungenmechanik. C57BL/6 Mäuse wurden für zwölf Wochen Zigarettenrauch exponiert und gleichzeitig mit einem αPD-1 oder Isotyp Antikörper behandelt. Nach zwölfwöchiger Zigarettenrauchexposition wurde mittels invasiver Lungenfunktionsmessung die (A) *Respiratory Resistance* und (B) *Compliance* gemessen. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW ± SEM gezeigt. **p<0,01, ***p<0,001, n = 5 pro Gruppe.

In Abb. 15 A sind repräsentative Übersichtsfärbungen der Lungen aus den verschiedenen Versuchsgruppen gezeigt. Im Vergleich zu den raumluftexponierten Tieren zeigten die zigarettenrauchexponierten Tiere einen deutlichen Verlust des Lungenparenchyms, wobei in den Proben der PD-1 behandelten Mäuse weniger Lungenschaden erkennbar war. Der Lungenschaden wurde mittels stereologischer Analysen quantifiziert. In den mit dem Isotyp-Antikörper behandelten Mäusen konnte durch die Exposition zu Zigarettenrauch eine signifikante Zunahme des MCL gemessen werden, welche in den mit αPD-1 behandelten Mäusen signifikant vermindert war (Abb. 15 B).

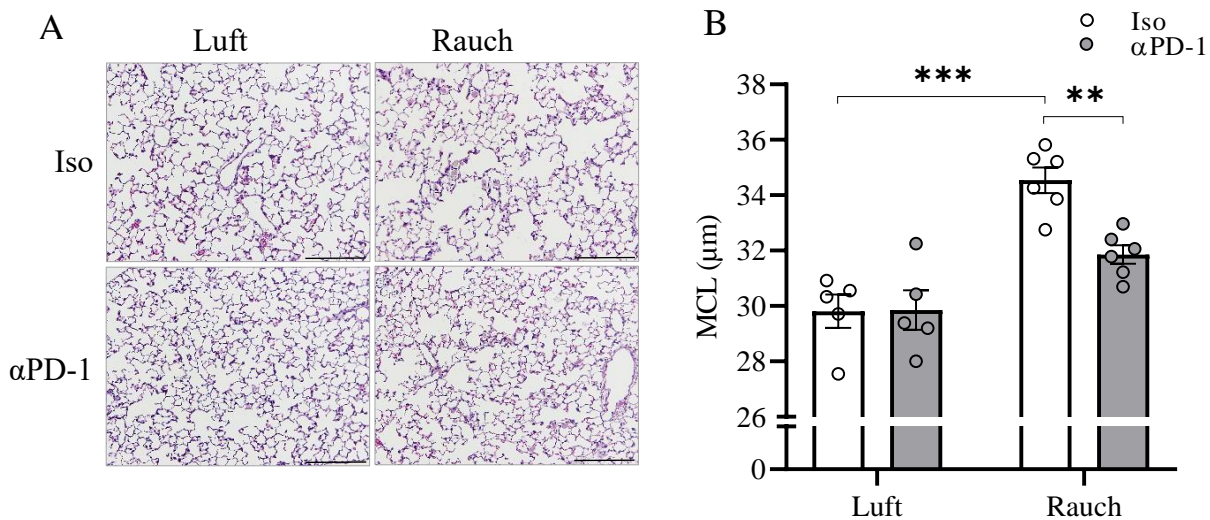


Abbildung 15: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu einem verminderten rauchinduzierten Lungenschaden. C57BL/6 Mäuse wurden für zwölf Wochen Zigarettenrauch exponiert und gleichzeitig mit einem αPD-1 oder Isotyp Antikörper behandelt. (A) Repräsentative H&E Färbung der Lungenhistologie. Maßstab 100 µm. (B) Stereologische Auswertung des Lungenschadens, MCL = *mean chord length*. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW ± SEM gezeigt. **p<0,01, ***p<0,001, n = 5-6 pro Gruppe.

3.2.3 Die Gabe eines therapeutischen PD-1 Antikörpers moduliert die Immunantwort von Alveolarmakrophagen

Um zu untersuchen, ob die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints die Entzündungsreaktion von Alveolarmakrophagen beeinflusst, wurden Mäuse für vier Wochen Zigarettenrauch exponiert und mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 behandelt. Anschließend wurden die Alveolarmakrophagen isoliert und *ex vivo* mit inaktiviertem NTHi-Lysat (Verdünnung des Lysates 1:50) stimuliert. Dabei zeigten die Alveolarmakrophagen der zigarettenrauchexponierten Mäuse durch die Stimulation mit NTHi eine erhöhte Expression von IL-6, TNF-α, G-CSF, KC sowie IL-10 im Vergleich zu den Alveolarmakrophagen der raumlufTEXponierten Mäuse. Die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints führte bei den Alveolarmakrophagen von zigarettenrauchexponierten Mäusen zu einer signifikant reduzierten Bildung von IL-6, TNF-α, G-CSF und KC (Abb. 16 A-D). Außerdem wurde durch die Blockade von PD-1 bei den raumlufTEXponierten Mäusen die Bildung von IL-6 signifikant verringert (Abb. 16 A).

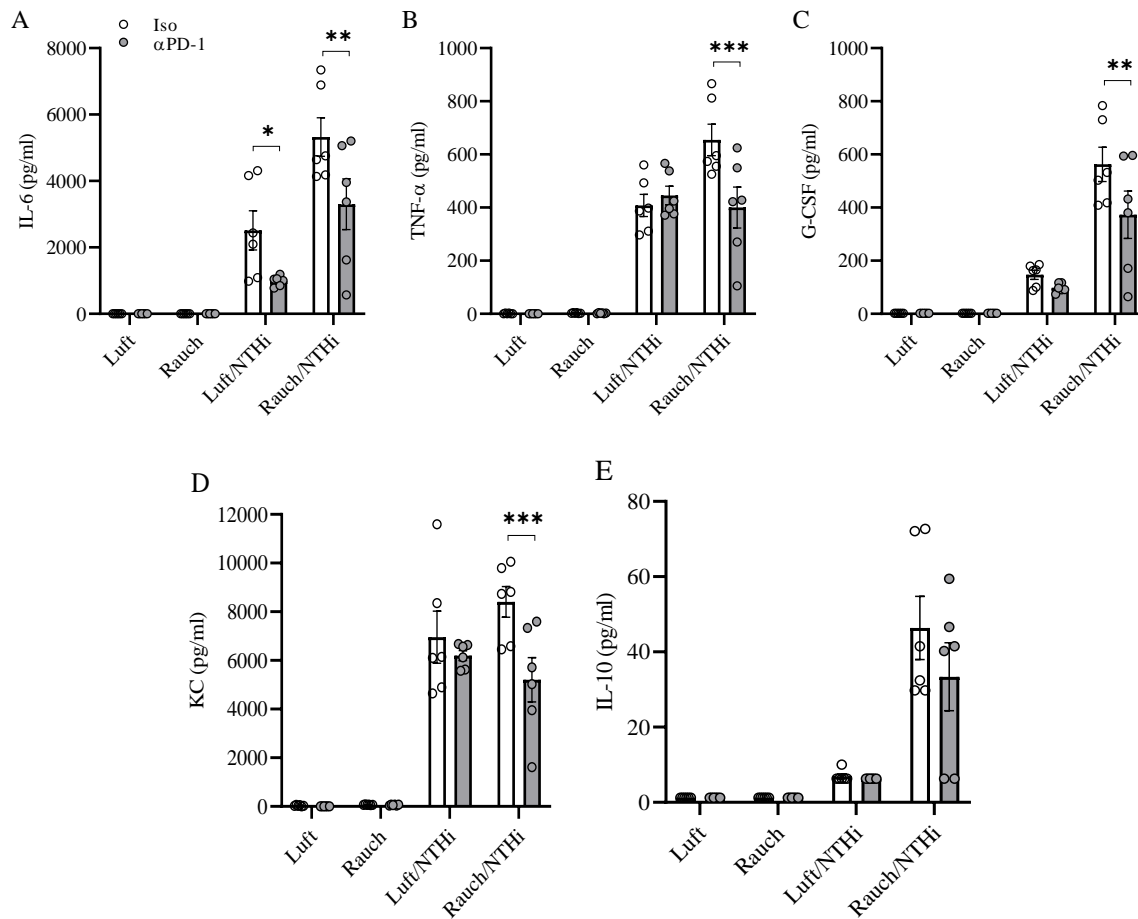


Abbildung 16: Die Behandlung mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 moduliert die Entzündungsreaktion ex vivo. C57BL/6 Mäuse wurden für vier Wochen Zigarettenrauch exponiert und gleichzeitig mit einem α PD-1 oder Isotyp Antikörper behandelt. Zwei Stunden nach der letzten Rauchexposition wurden die Alveolarmakrophagen isoliert und für 24 Stunden mit inaktiviertem NTHi stimuliert. Die Konzentrationen von IL-6, TNF- α , G-CSF, KC und IL-10 wurden in den Zellkulturüberständen zweier unabhängiger Experimente gemessen. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 6$ pro Gruppe.

3.2.4 Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu einem verminderten NTHi-induzierten Lungenschaden

Die Lungen von COPD-Patienten sind häufig, auch nach der Raucherentwöhnung, mit NTHi infiziert bzw. kolonisiert [104-106, 244]. Zudem stehen NTHi mit Exazerbationen in Verbindung [245-247]. Um zu untersuchen, inwiefern die Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse bakteriell-induzierten Lungenschaden vermittelt, wurden C57BL/6 Wildtyp Mäuse in einem weiteren präklinischen Modell wie in Abbildung 17 schematisch beschrieben für vier Wochen NTHi exponiert und mit einem anti-PD-1 Antikörper oder einem Isotyp-Antikörper behandelt.

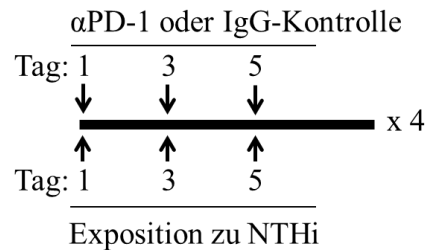


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper. C57BL/6 Mäuse wurden für vier Wochen dreimal wöchentlich NTHi exponiert und dreimal wöchentlich mit einem αPD-1 oder einem Isotyp-Antikörper behandelt. Die Antikörper (200 µg/200 µl) wurden den Mäusen 30 Minuten vor der Exposition an den angegebenen Tagen i.p. verabreicht.

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurde auch im Falle des NTHi-abhängigen Entzündungsmodells mit begleitender αPD-1 Behandlung zuerst untersucht, ob sich die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints systemisch auswirkt. Analog zu dem Zigarettenrauchmodell wurden die Mäuse wöchentlich hinsichtlich Auffälligkeiten im Verhalten und Veränderungen des Gewichts beobachtet. Während der Präparation der Tiere wurden die inneren Organe auf etwaige Veränderungen untersucht. Hierbei konnten keine Auffälligkeiten erkannt werden. Ebenfalls wurde final von jeder Maus ein Differenzialblutbild erstellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Gewicht und im Blutbild zwischen den verschiedenen Gruppen (Abb. 18). Sowohl im Verhalten der Tiere als auch bei der visuellen Begutachtung der inneren Organe konnten keine Auffälligkeiten erkannt werden.

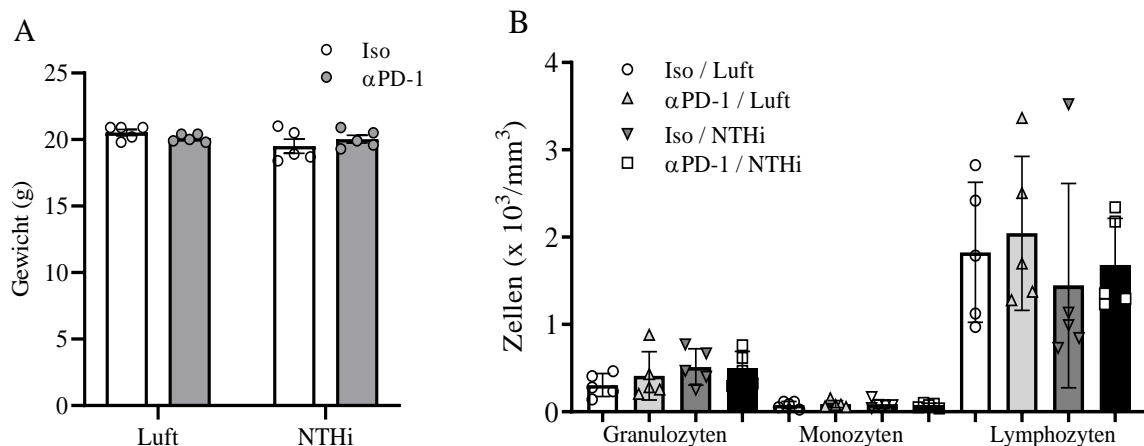


Abbildung 18: Die Behandlung mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 beeinflusst weder Gewicht noch Blutbild bei NTHi-induzierter Inflammation. C57BL/6 Mäuse wurden für vier Wochen dreimal wöchentlich NTHi exponiert und dreimal wöchentlich mit einem αPD-1 oder einem Isotyp-Antikörper behandelt. Das Gewicht der mit αPD-1 und Isotyp-Antikörper behandelten und NTHi-exponierten Mäuse wurde wöchentlich kontrolliert. (A) Gezeigt wird das Endgewicht der Tiere nach vierwöchiger Exposition. (B) Die Blutleukozyten wurden gezählt und mittels Mikroskopie differenziert. Daten sind als MW ± SEM gezeigt, n = 5 pro Gruppe.

Es wurde immunhistochemisch überprüft, ob auch in dem NTHi-Inflammationsmodell wie in dem Zigarettenrauchmodell eine erhöhte Anzahl an PD-1 und PD-L1 positiven Zellen feststellbar ist. Die erhaltenen Färbungen zeigten, dass es durch die Exposition mit NTHi sowohl in den Kontrolltieren als auch in den mit PD-1 behandelten Tieren zu einer verstärkten Membranexpression von PD-1 und PD-L1 kam (Abb. 19).

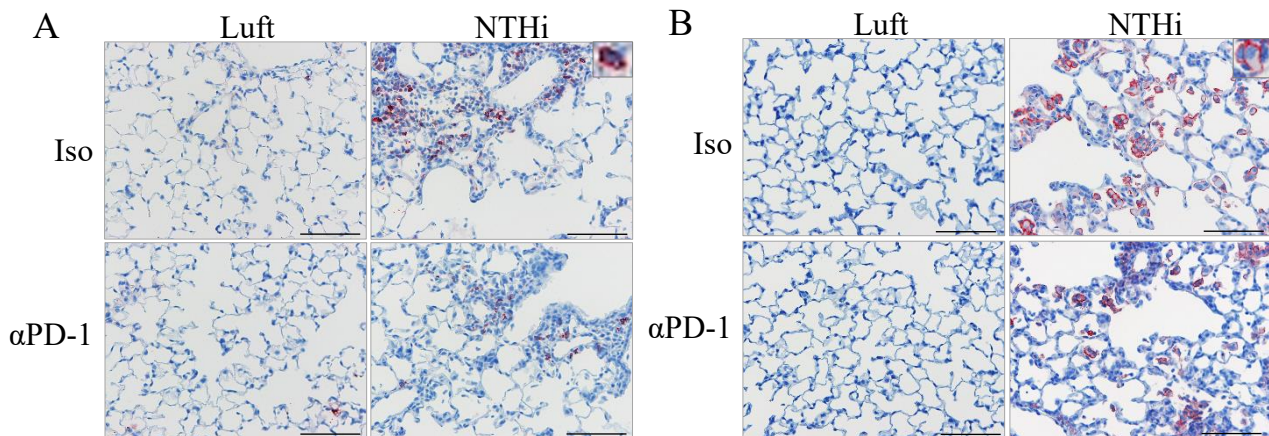


Abbildung 19: NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Anzahl an PD-1 und PD-L1 positiven Zellen. C57BL/6 Mäuse wurden für vier Wochen NTHi exponiert. Vor der Exposition wurden die Mäuse mit einem α PD-1 oder Isotyp Antikörper behandelt. (A) Repräsentative Immunhistochemie für PD-1 und (B) PD-L1. Maßstab 100 μ m.

Um den Einfluss der Blockade des PD-1-Signalwegs auf den Lungenschaden nach vierwöchiger NTHi Exposition zu beurteilen, wurden die Lungen mittels histologischer und stereologischer Methoden analysiert. Repräsentative Übersichtsfärbungen der Lungen sind in Abb. 20 A dargestellt. Chronische NTHi-Exposition führte zu einem sichtbaren Zellinfiltrat und Verlust an Lungenparenchym. In den histologischen Präparaten der NTHi-exponierten und mit α PD-1 behandelten Mäuse konnte eine reduzierte Infiltration von Immunzellen in das Lungenparenchym beobachtet werden. Der Lungenschaden wurde mittels stereologischer Analysen quantifiziert. NTHi-Exposition führte sowohl bei Isotyp-, als auch bei α PD-1 behandelten Mäusen zu einem signifikant erhöhten MCL. Die Zunahme des MCL war jedoch in α PD-1 behandelten Mäusen signifikant vermindert (Abb. 20 B).

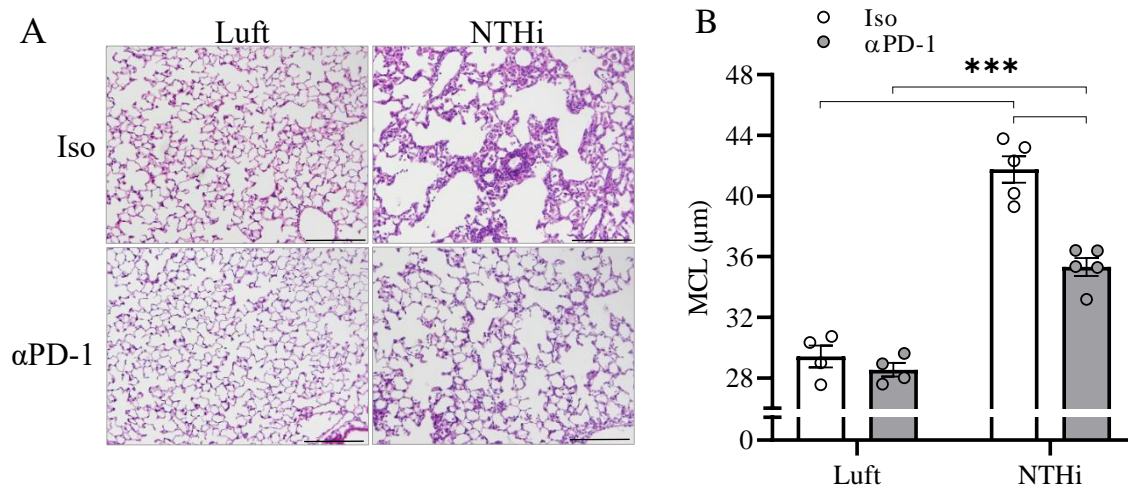


Abbildung 20: Die Behandlung mit einem therapeutischen anti-PD-1 Antikörper reduziert NTHi-induzierten Lungenschaden. C57BL/6 Mäuse wurden für vier Wochen NTHi exponiert und mit einem α PD-1 bzw. Isotyp Antikörper behandelt. (A) Repräsentative H&E Färbung der Lungenhistologie. Maßstab 100 μ m. (B) Stereologische Auswertung des Lungenschadens, MCL = *mean chord length*. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. *** $p < 0,001$, $n = 4-5$ pro Gruppe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine antikörpervermittelte Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints im präklinischen COPD-Modell zu einer verminderten neutrophilen Entzündung der Lunge und zu einem verringerten Lungenschaden führt.

3.3 Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints führt zu verringertem Tumorwachstum in *Il-17c* defizienten Mäusen

In dieser Arbeit wurde zunächst die Funktion von IL-17C in einem primären *Kras*-abhängigen Tumormodell untersucht. Aufbauend hierauf wurde geprüft, inwiefern IL-17C den PD-1-Immun-Checkpoint reguliert und die Blockade der PD-1/PD-L1-Achse das bakteriell-induzierte Tumorwachstum beeinflusst.

3.3.1 IL-17C fördert das Wachstum von Lungentumoren bei bakteriell-induzierter Entzündung

Um die Funktion von IL-17C auf das *Kras*-induzierte Tumorwachstum im Rahmen einer COPD ähnlichen bakteriellen Entzündung zu untersuchen, wurden *Kras*^{G12D} Mäuse (*Kras*) mit *Il-17c* defizienten Mäusen gekreuzt. Aus dieser Kreuzung ergaben sich *Il-17c* defiziente *Kras* Mäuse (*Il-17c*^{-/-}/*Kras*). Diese wurden an drei Tagen pro Woche für vier bis zwölf Wochen NTHi exponiert. Der Versuchsablauf ist in Abb. 21 schematisch dargestellt.

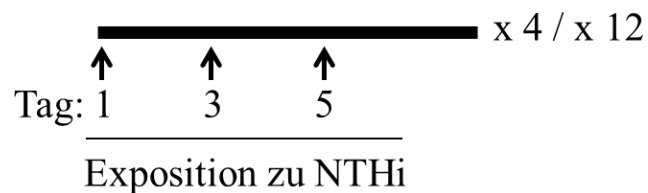


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der NTHi-Exposition. *Kras*^{G12D} Mäuse und *Il-17c*^{-/-}/*Kras* Mäuse wurden für vier bzw. zwölf Wochen dreimal wöchentlich NTHi exponiert.

Durch Vermessung der einzelnen Tumorknoten in Schnittpräparaten wurde die Tumorlast quantifiziert. Die Defizienz für IL-17C wirkte sich in raumluftexponierten Tieren nicht auf die Tumorlast aus. Nach vier- bzw. zwölfwöchiger NTHi Exposition wiesen *Kras* Mäuse einen signifikant gesteigerten prozentualen Anteil der mit Tumor belegten Lungenfläche auf. Bei den NTHi-exponierten *Il-17c*^{-/-}/*Kras* Mäusen ergab sich keine signifikante Zunahme der Tumorlast. Der Vergleich zwischen NTHi-exponierten *Kras* und *Il-17c*^{-/-}/*Kras* Mäusen ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22).

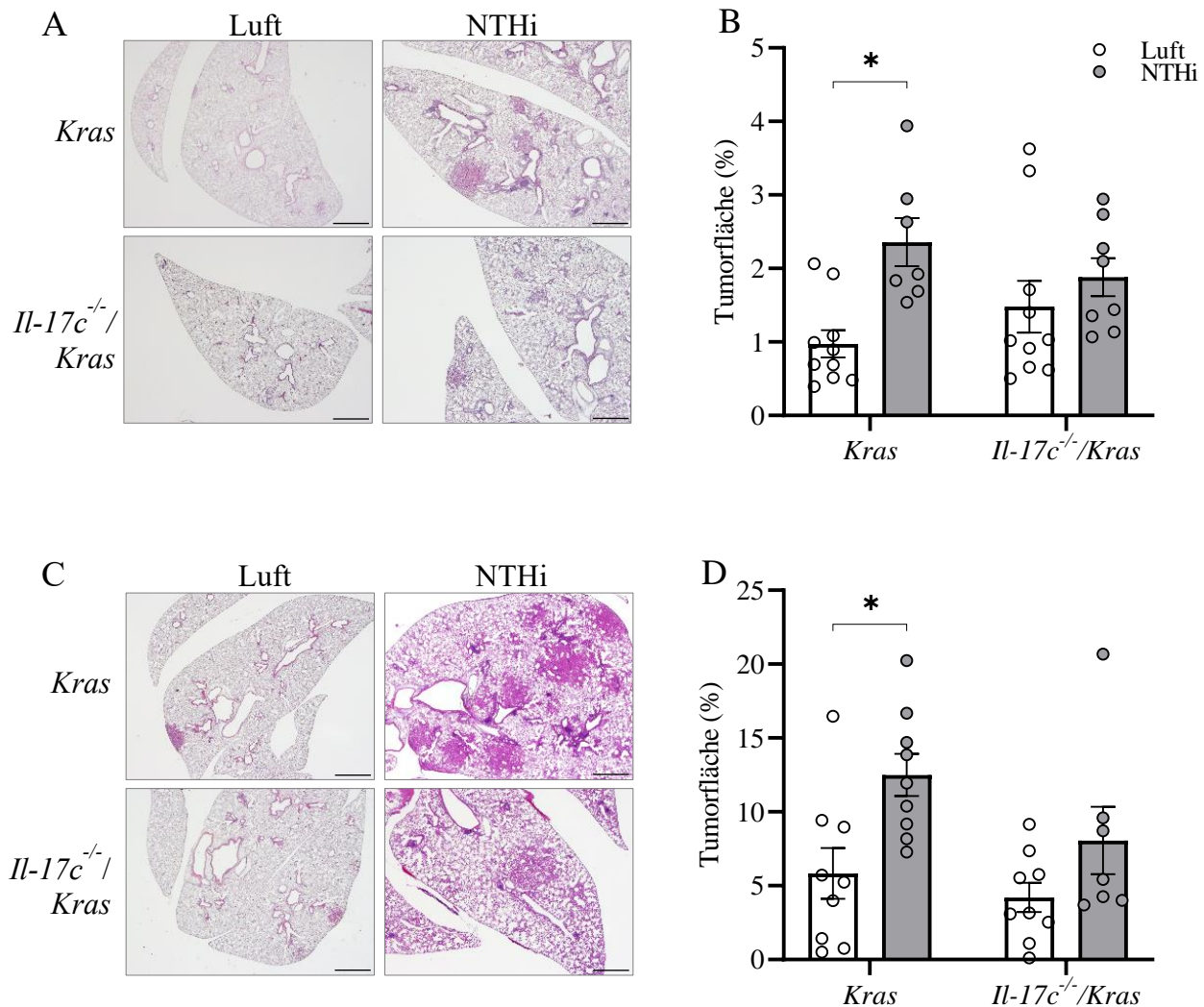


Abbildung 22: Defizienz von IL-17C verringert NTHi-induzierte Tumorprogression. *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse wurden für vier (A/B) und zwölf (C/D) Wochen NTHi exponiert. Es wurde die Tumorlast anhand von Schnittpräparaten der Lunge quantifiziert. (A/C) Repräsentative mikroskopische Pathologie (H&E Färbung) nach vier und zwölf Wochen NTHi Exposition. Maßstab 1000 μ m. (B/D) Prozentuale Tumorfläche der Lungenfläche nach vier und zwölf Wochen NTHi Exposition. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$, $n = 7-10$ pro Gruppe.

Die durchschnittliche Größe der einzelnen Tumorkläsionen war in den *Kras* Mäusen nach vierwöchiger NTHi-Exposition signifikant erhöht. In den *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen ergab sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 23). Bei für zwölf Wochen NTHi-exponierten Mäusen ließen sich die Tumorkläsionen nicht voneinander abgrenzen. Daher konnte die durchschnittliche Größe der Tumorkläsionen hier nicht fundiert ausgewertet werden.

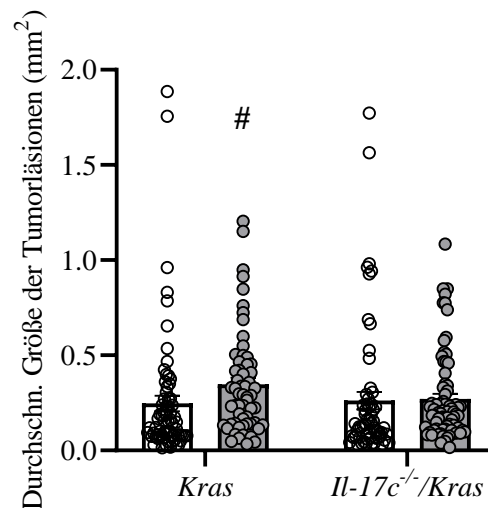


Abbildung 23: Durchschnittliche Größe der einzelnen Tumorläsionen nach vierwöchiger NTHi-Exposition. *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse wurden für vier Wochen NTHi exponiert. Die einzelnen Tumorläsionen wurden anhand an Schnittpräparaten der Lunge quantifiziert. Mann-Whitney Test. Daten sind als MW ± SEM gezeigt. #p<0,001. Einzelne Tumorläsionen von n = 7-10 Mäusen pro Gruppe.

Es wurde anschließend analysiert, wie sich die Defizienz von IL-17C auf die Proliferation der Tumorzellen auswirkt. Mittels immunhistochemischer Färbung für den Proliferationsmarker Ki67 wurde der Ki67-Index (positive Tumorzellen pro 100 Tumorzellen) ermittelt. Es zeigte sich, dass NTHi-induzierte Entzündung zu einer signifikant gesteigerten Proliferation der Tumorzellen in *Kras* Mäusen führte und die Tumorphiliferation in NTHi-exponierten *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen signifikant vermindert war (Abb. 24).

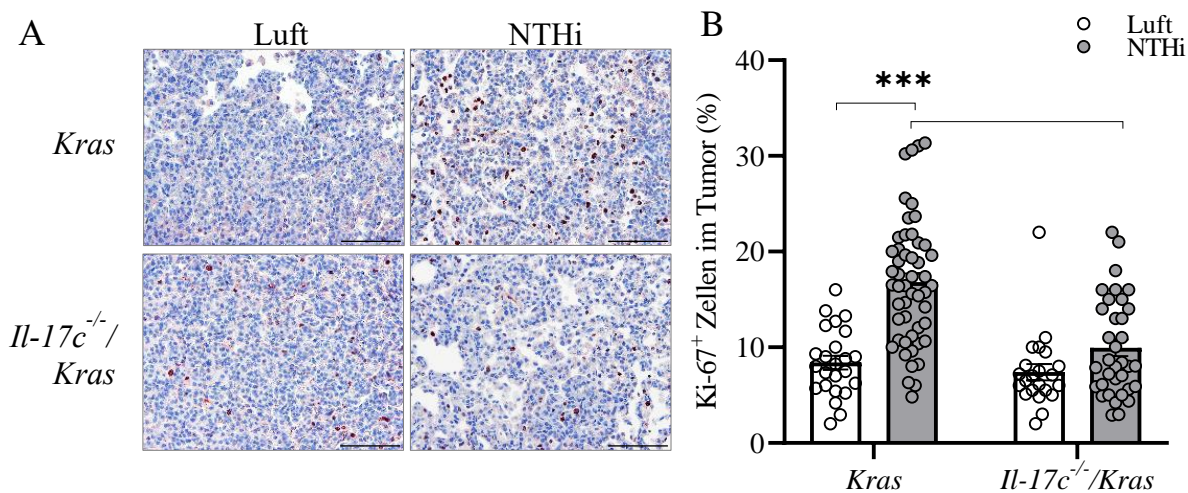


Abbildung 24: Die NTHi-Exposition führt zu einer gesteigerten Tumorphroliferation. *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse wurden für vier Wochen NTHi exponiert. (A) Repräsentative Immunhistochemie für Ki67 auf Schnittpräparaten der Lunge nach vierwöchiger NTHi Exposition. Maßstab 100 μ m. (B) Bestimmung des Ki67-Index mit Ki67 positiven Zellen pro 100 Tumorzellen. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. ***p<0,001. Einzelne Tumorkläsionen von n = 7-10 Mäusen pro Gruppe.

3.3.2 Deletion von IL-17C verringert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung

Das Tumorstwachstum in der Lunge wird maßgeblich durch persistierende Entzündungsreaktionen beeinflusst [248]. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass IL-17C im Lewis Lung Carcinoma Metastasemodell die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumorknoten vermittelt [109]. Es wurden daher Immunzellen und Zytokine in der BAL-Flüssigkeit analysiert. Die Gesamtzellzahl der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit war in den NTHi behandelten *Kras* und *Il17c^{-/-}/Kras* Mäusen nach vierwöchiger Exposition signifikant erhöht. Die Gesamtzellzahl war jedoch in behandelten *Il17c^{-/-}/Kras* Mäusen im Vergleich zu den behandelten *Kras* Mäusen signifikant verringert (Abb. 25 A). Das Differenzialbild der BAL-Flüssigkeit zeigte, dass es durch die NTHi Exposition zu einer gesteigerten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten kam. Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten war in NTHi-exponierten *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen signifikant vermindert. Die Defizienz für IL-17C hatte keine signifikante Auswirkung auf die Anzahl an Makrophagen in der BAL-Flüssigkeit (Abb. 25 B).

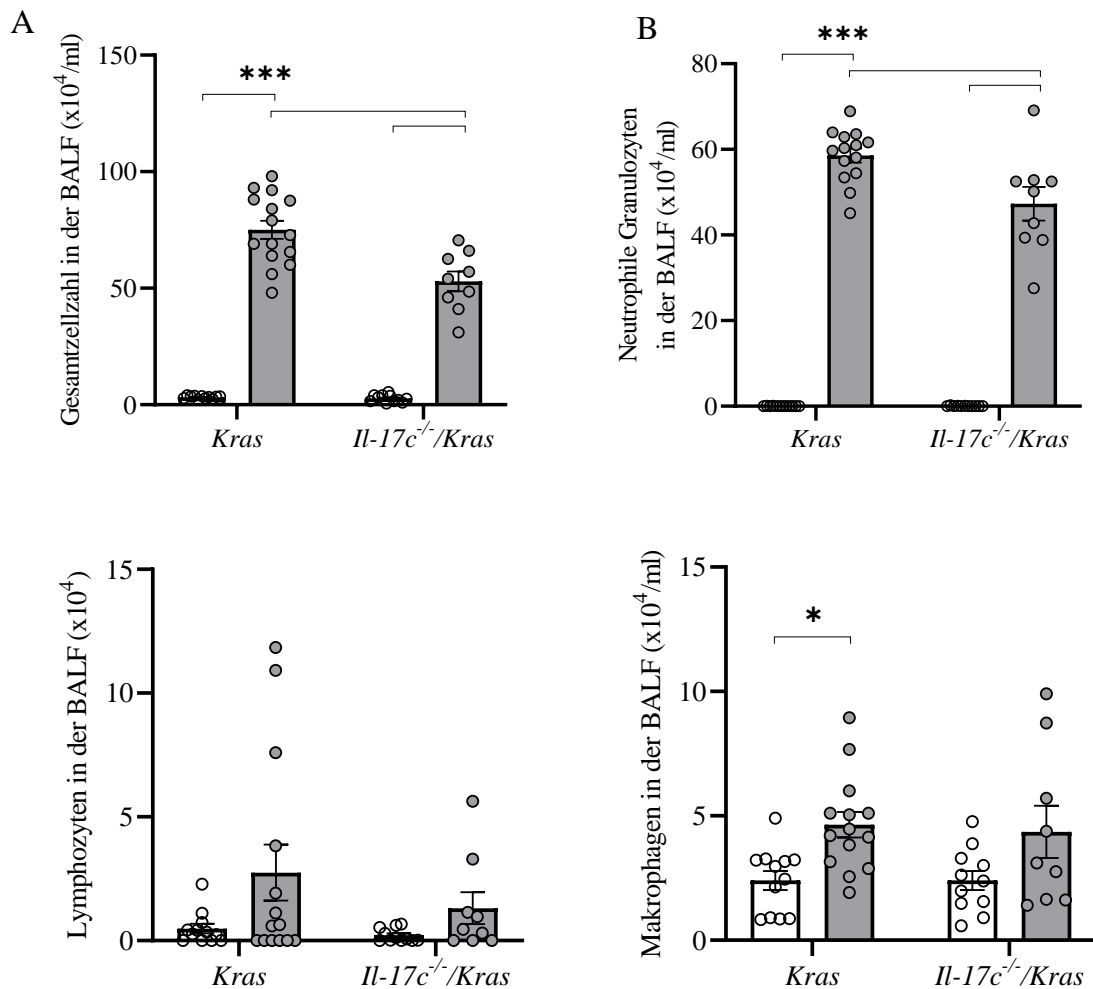


Abbildung 25: NTHi-Exposition führt zu einem Einstrom von Entzündungszellen in den Alveolarraum. Die Gesamtzellzahl der BAL-Flüssigkeit von *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen wurden nach vierwöchiger NTHi-Exposition mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anhand angefertigter Cytospin-Präparate wurde ein Differenzialzellbild der Lavage erstellt. (A) Gesamtzellzahl der BAL-Flüssigkeit. (B) Differenzialbild der BAL-Flüssigkeit mit Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, $n = 9-15$ pro Gruppe.

Es wurde bereits gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-17A in dem *Kras*-abhängigen Tumormodell das Tumorstadium fördern [249-251]. Es wurden daher die Konzentrationen verschiedener Entzündungsmediatoren im Alveolarraum gemessen.

Die Konzentrationen von IL-6 und CCL5 waren in der BAL-Flüssigkeit von NTHi-exponierten *Kras* Mäusen signifikant erhöht. In der BAL der *Il-17C^{-/-}/Kras* Mäuse wurden leicht erhöhte, jedoch nicht signifikant gesteigerte Konzentrationen von IL-6 und CCL5 gemessen. Die Konzentrationen von IL-6 und CCL5 waren in BAL-Flüssigkeit aus NTHi-behandelten *Il-17C^{-/-}/Kras* verglichen mit denen aus behandelten *Kras* Mäusen signifikant vermindert (Abb. 26 A / B). Die Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-17A war in der BAL-Flüssigkeit

der *Kras* als auch der *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse nach Exposition zu NTHi signifikant erhöht. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der mit NTHi-behandelten Gruppen (Abb. 26 C).

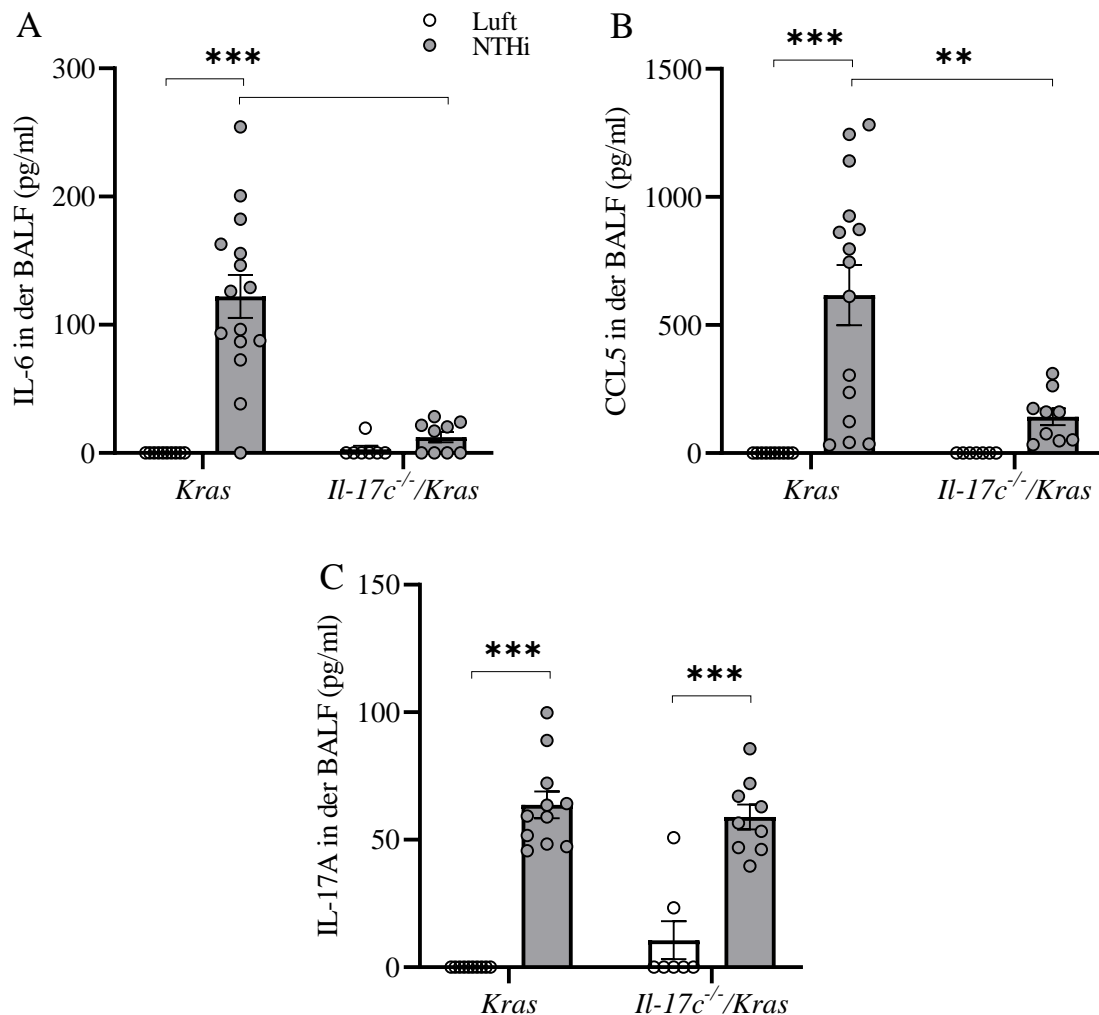


Abbildung 26: Die Defizienz von IL-17C führt zu verminderten Konzentrationen von Entzündungsmediatoren im Alveolarraum. Nach vierwöchiger NTHi Exposition wurden die Konzentrationen von (A) IL-6, (B) CCL5 und (C) IL-17A in der BAL-Flüssigkeit mittels Luminex Assay bestimmt. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW ± SEM gezeigt. **p<0,01 und ***p<0,001, n = 9-15 pro Gruppe.

Immunhistochemische Analysen von IL-6 auf Schnittpräparaten der Lungen konnten zudem zeigen, dass es nach vierwöchiger NTHi-Exposition zu einer signifikanten Zunahme von IL-6 positiven Zellen im Lungenparenchym der *Kras* Mäuse kam, wohingegen dies in NTHi-exponierten *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen nicht beobachtet werden konnte (Abb. 27)

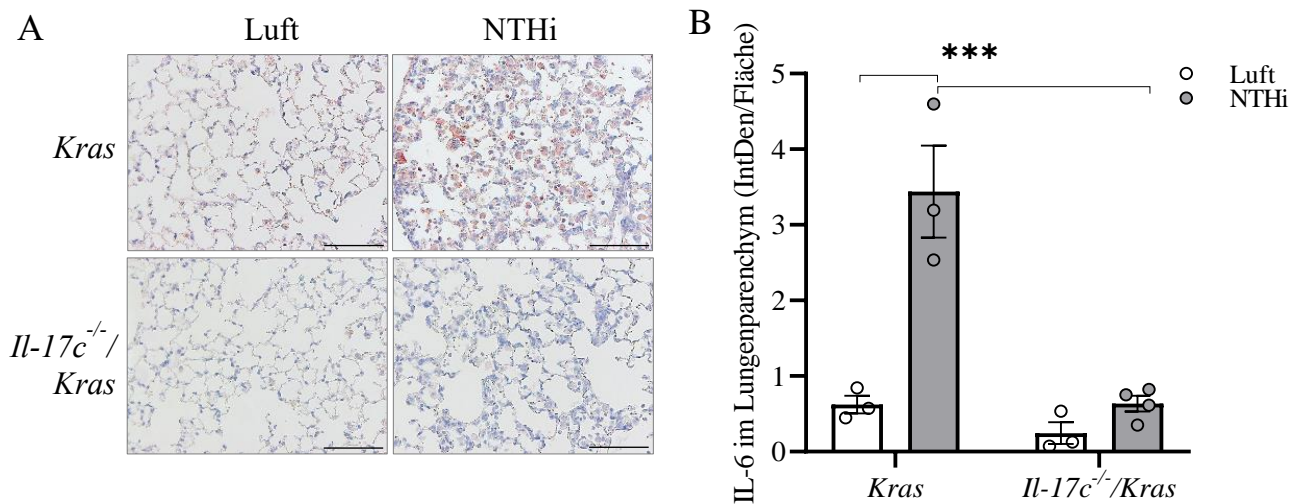


Abbildung 27: NTHi-Exposition führt IL-17C-abhängig zu einer gesteigerten Expression von IL-6 im Lungenparenchym. Nach vierwöchiger NTHi-Exposition wurde mittels immunhistochemischer Analysen die Expression von IL-6 im Lungenparenchym bestimmt. (A) Repräsentative Immunhistochemie auf IL-6. Maßstab 100 μ m. (B) Die immunhistochemische Färbung wurde mittels Intensitätsauswertung quantifiziert. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. *** $p < 0,001$, n = 3-4 pro Gruppe.

3.3.3 IL-17C vermittelt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung

Es ist bekannt, dass neutrophile Granulozyten Bestandteile der Tumormikroumgebung sind und zum Tumorwachstum beitragen [133, 252]. Es wurde daher die Expression des neutrophilen Granulozytenmarkers Ly6B [253] immunhistochemisch untersucht. Makrophagen können ebenfalls Ly6B exprimieren. In der Mikroskopie konnten jedoch keine Ly6B-positiven Makrophagen erkannt werden. Bereits vier Stunden nach einer einmaligen NTHi-Exposition konnten sowohl in der Tumormikroumgebung als auch im Lungenparenchym Ly6B positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 28 A). Die mikroskopische Quantifizierung zeigte zudem, dass die Anzahl an Ly6B positiven Zellen in der Tumormikroumgebung von NTHi-exponierten *Kras* Mäusen verglichen mit *Il17c^{-/-}/*Kras** Mäusen signifikant erhöht war. In den jeweiligen Kontrollgruppen konnten weder in den Tumoren noch im Lungenparenchym kaum Ly6B⁺ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 28).

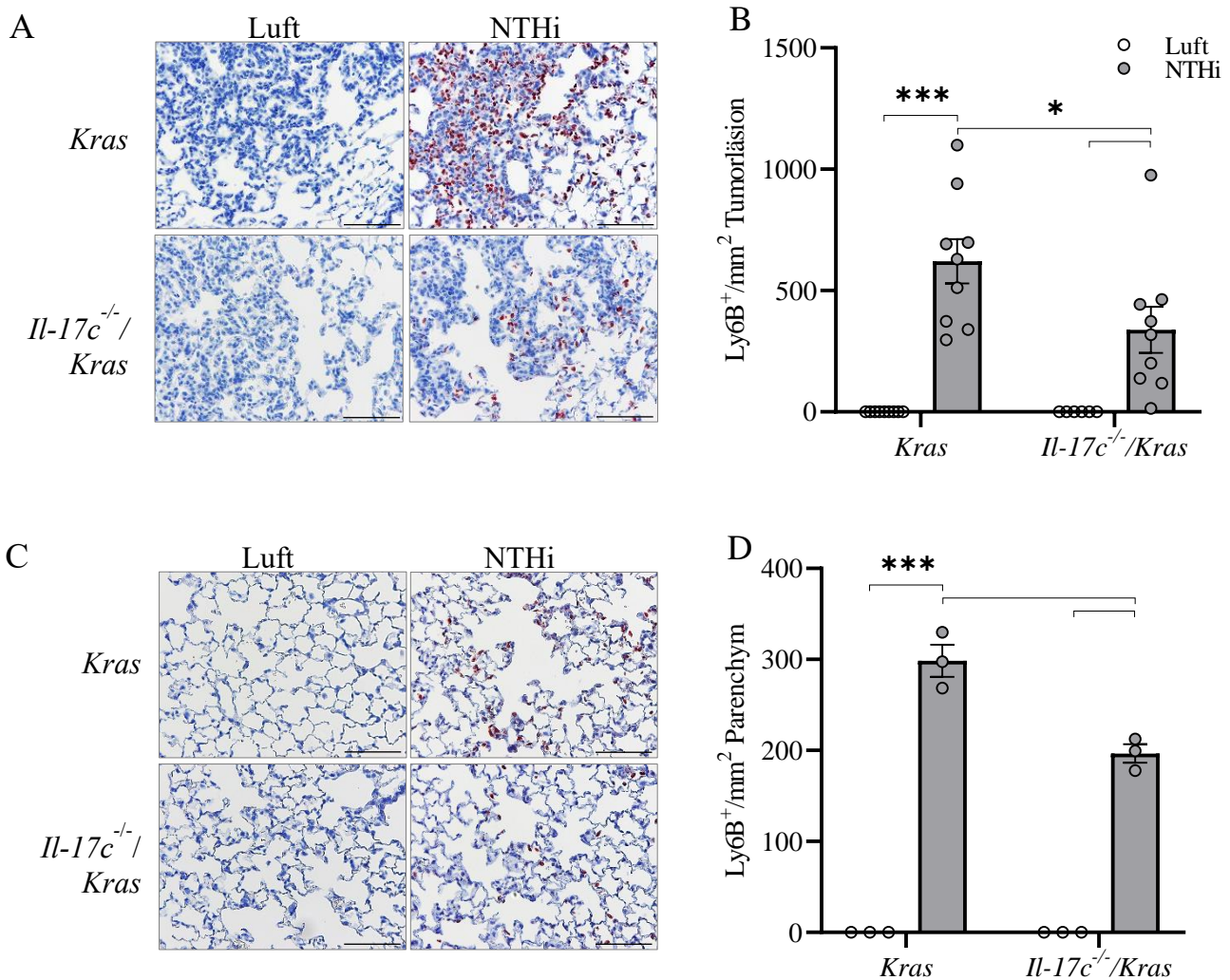


Abbildung 28: IL-17C trägt zur frühen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung bei. *Kras* und *Il-17c^{-/-}/*Kras** Mäuse wurden einmalig NTHi exponiert und vier Stunden später analysiert. (A) Repräsentative Immunhistochemie für Ly6B in der Tumormikroumgebung und (B) Quantifizierung der Ly6B positiven Zellen in einzelnen Tumormikroumgebungen. (C) Repräsentative Immunhistochemie für Ly6B im Lungenparenchym und (D) Quantifizierung der Ly6B positiven Zellen im Lungenparenchym. Maßstab 100 µm. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW ± SEM gezeigt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, $n = 3$ pro Gruppe.

Es wurde zudem die Genexpression von IL-17C, IL-6 und KC analysiert. Durch die NTHi-Exposition kam es in *Kras* Mäusen zu einer signifikant gesteigerten mRNA Expression von IL-17C (Abb. 29 A). Die Expression von IL-6 und KC war in Lungen von *Il-17c^{-/-}/*Kras** Mäusen 24 Stunden nach einer einmaligen NTHi-Exposition signifikant vermindert (Abb. 29 B). Die Expression des IL-17C Rezeptors IL-17RE wurde durch die Defizienz für IL-17C nicht beeinflusst. In *Il-17c^{-/-}/*Kras** Mäusen konnte zudem wie erwartet keine mRNA für IL-17C nachgewiesen werden (Abb. 29 B).

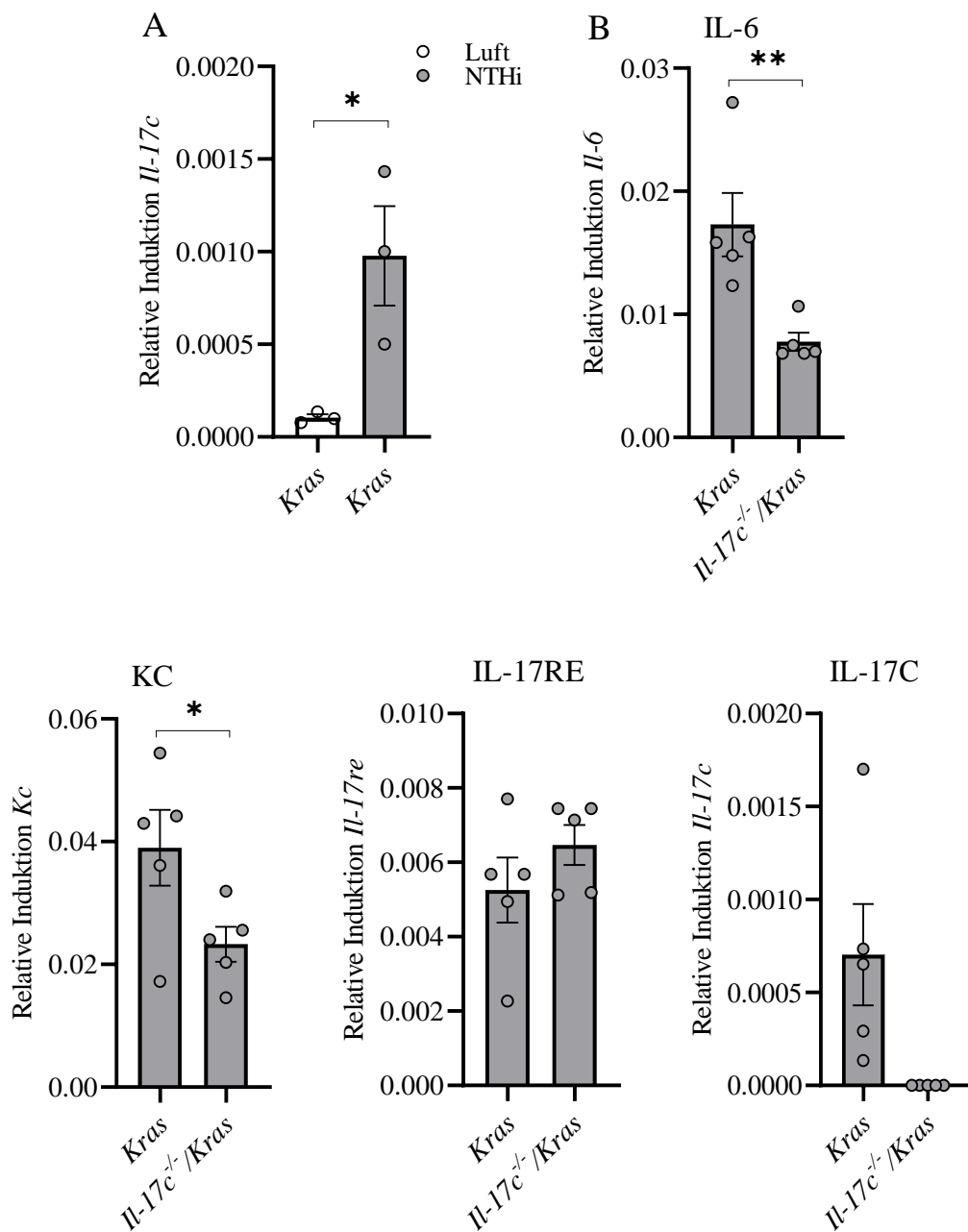


Abbildung 29: mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren nach einmaliger NTHi Exposition. (A) Relative *IL-17C* mRNA Expression (GAPDH) in Lungen von *Kras* Mäusen vier Stunden nach der NTHi- bzw. Raumluft Exposition. (B) Relative mRNA-Expression (GAPDH) von *Il-6*, *Kc*, *Il-17re* und *Il-17c* in Lungen von *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen 24 Stunden nach der NTHi-Exposition. Student's t-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, $n = 3-5$ pro Gruppe.

3.3.4 IL-17C vermittelt die Aktivierung der MAP Kinase ERK

IL-17 Zytokine vermitteln die Aktivierung von MAP Kinasen [254]. Da die MAP Kinase ERK eine wichtige Rolle in der Tumorprogression spielt und auch ein therapeutisches Ziel darstellt [255], wurde in dem verwendeten Tiermodell die Aktivierung durch Phosphorylierung von ERK (pERK) immunhistochemisch analysiert. Es wurden *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse vier Stunden nach einer einmaligen Dosis NTHi analysiert. Die Anzahl pERK positiver Zellen war in den Tumorkläsionen von *Kras* Mäusen, nicht aber von *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen signifikant erhöht. Durch die NTHi-Exposition kam es im Lungenparenchym zu einer signifikant gesteigerten ERK Aktivierung, die in *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen signifikant vermindert war (Abb. 30).

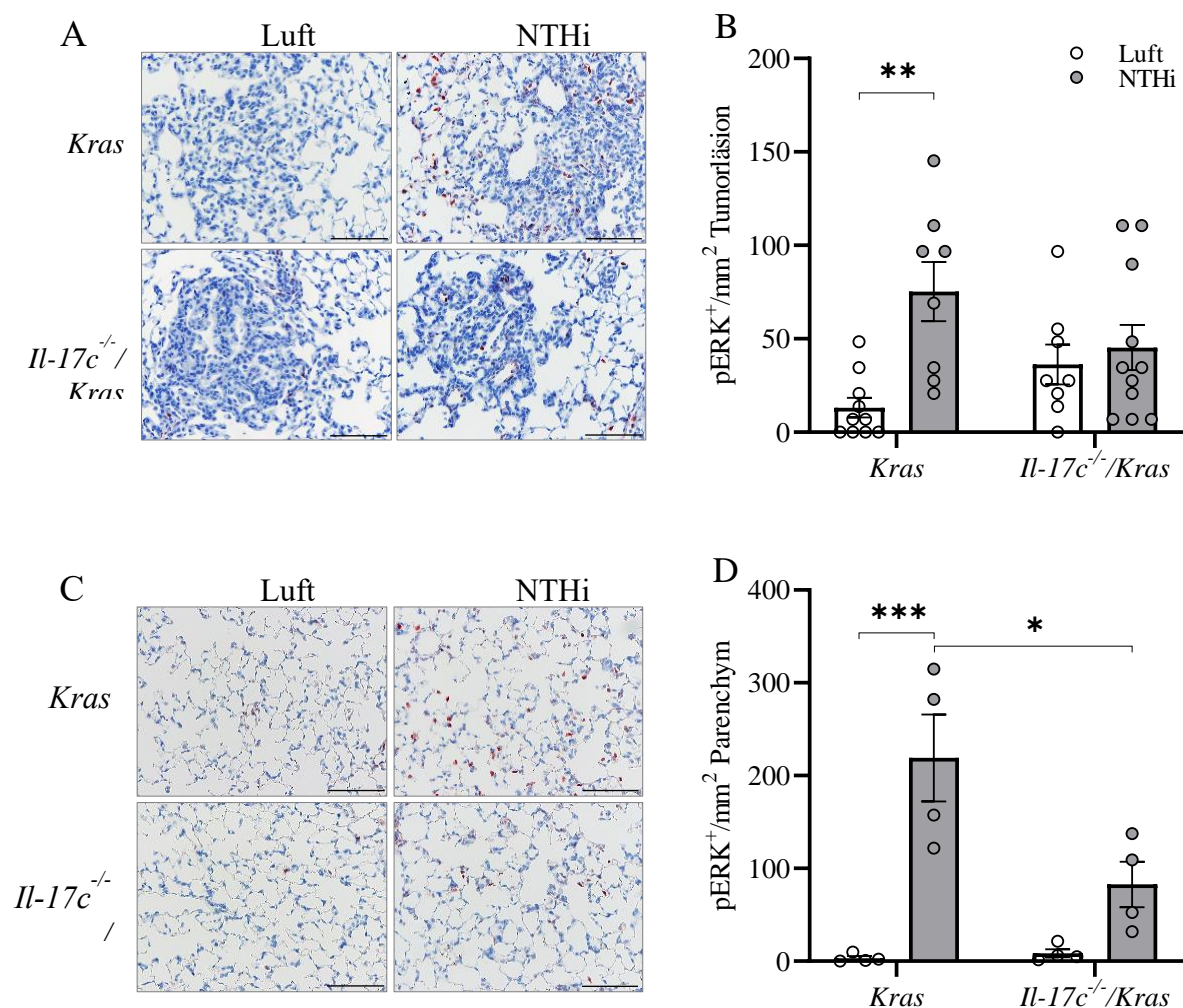


Abbildung 30: IL-17C trägt zur Aktivierung von ERK in der Tumormikroumgebung bei. *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse wurden einmalig NTHi ausgesetzt und vier Stunden später analysiert. (A) Repräsentative Immunhistochemie für phosphoryliertes ERK (pERK) in der Tumormikroumgebung und (B) Quantifizierung der pERK positiven Zellen in einzelnen Tumormikroumgebungen. (C) Repräsentative Immunhistochemie für pERK im Lungenparenchym und (D) Quantifizierung der pERK positiven Zellen im Lungenparenchym. Maßstab 100 μ m. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 4$ pro Gruppe.

Anhand von *in vitro* Experimenten wurde geprüft, ob IL-17C ERK direkt aktiviert. Hierzu wurden die humane Tumorzelllinie Calu-3, humane epitheliale Primärzellen (HBEC) und die murine Tumorzelllinie LA4 mit IL-17C (100 ng/ml) und NTHi (10^7 KBE/ml) für 30 bis 240 Minuten stimuliert. Eine Western Blot Analyse mit semi-quantitativer Densitometrie ergab, dass sowohl eine Stimulation mit IL-17C oder NTHi als auch deren Kombination zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK führte (Abb. 31).

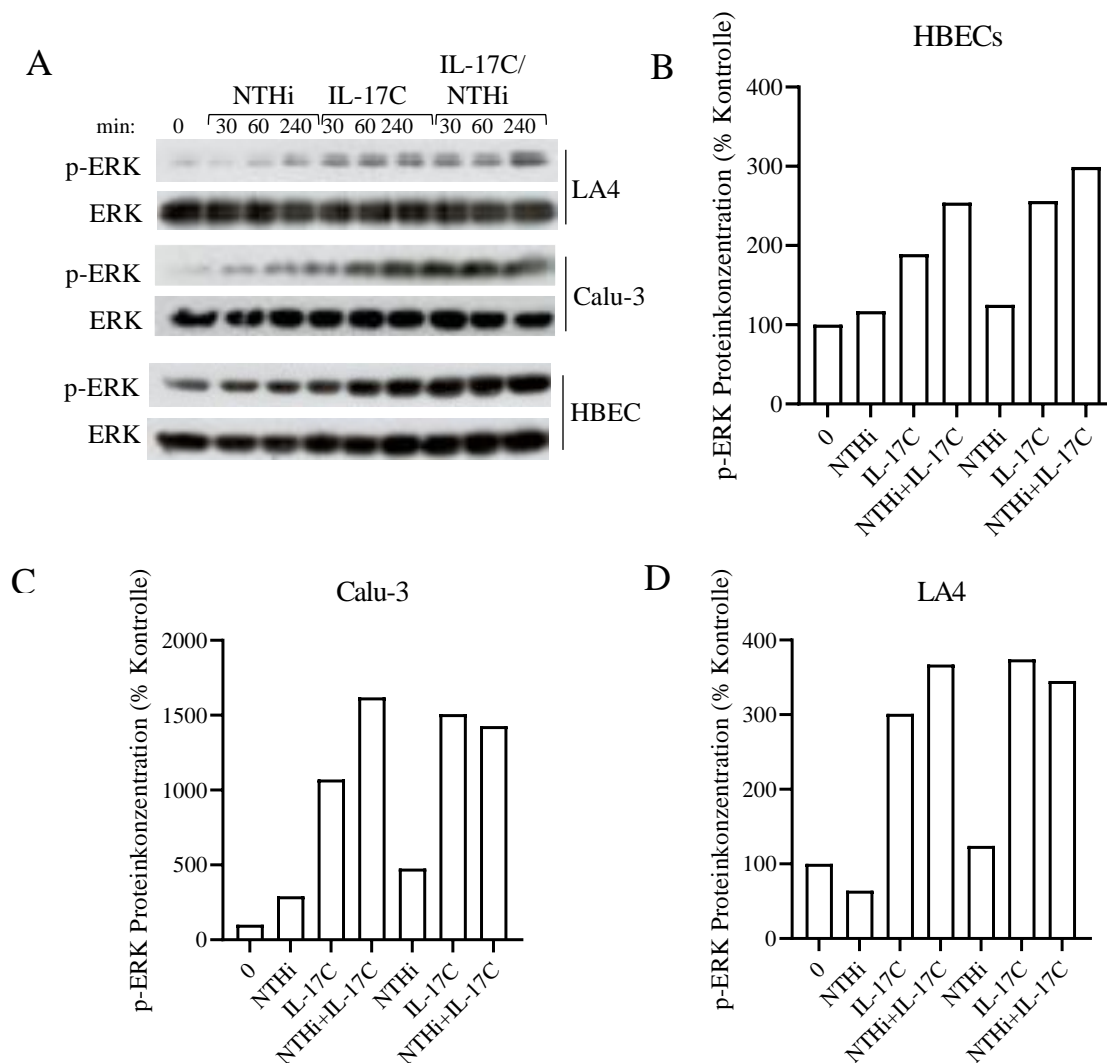


Abbildung 31: Stimulation mit IL-17C und NTHi bedingt *in vitro* eine gesteigerte Aktivierung von ERK. Die Krebszelllinien LA4 (murin) und Calu-3 (human) und humane bronchiale Epithelzellen wurden bis zu vier Stunden mit IL-17C (100 ng/ml), NTHi (10^7 KBE/ml) und der Kombination stimuliert. (A) Zelllysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und aktiviertes ERK Protein mittels Immundetektion nachgewiesen. (B-D) Semi-quantitative Densitometrie der erhaltenen Signale nach chemilumineszenter Reaktion. Phosphoryliertes ERK wurde auf nicht phosphoryliertes ERK normalisiert.

Anhand der gewonnenen Resultate wird deutlich, dass das Tumorwachstum, die Proliferation von Tumorzellen, die tumorassoziierte Inflammation und die Expression von Entzündungsmediatoren durch IL-17C vermittelt werden.

3.3.5 Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint wird durch COPD ähnliche Inflammation unabhängig von IL-17C aktiviert

Studien konnten zeigen, dass der Immun-Checkpoint Rezeptor PD-1 in tumorinfiltrierenden zytotoxischen T Zellen in COPD-Patienten aktiviert ist und dadurch das Ansprechen auf Immun-Checkpoint Inhibitoren bei COPD-Patienten mit einhergehender Tumorerkrankung begünstigt [211-213]. Es wurde daher untersucht, inwiefern der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint in dem verwendeten COPD-ähnlichen Inflammationsmodell aktiviert wird. Immunhistochemie zeigte, dass es nach vierwöchiger NTHi-Exposition in *Kras* und *Il-17c*^{-/-}/*Kras* Mäusen zu einer signifikant gesteigerten Anzahl an PD-1 und PD-L1 positiven Zellen in der Tumormikroumgebung kam. Es konnte eine typische Membranfärbung für PD-L1 in Zellen mit makrophagenähnlicher Morphologie festgestellt werden (Abb. 32).

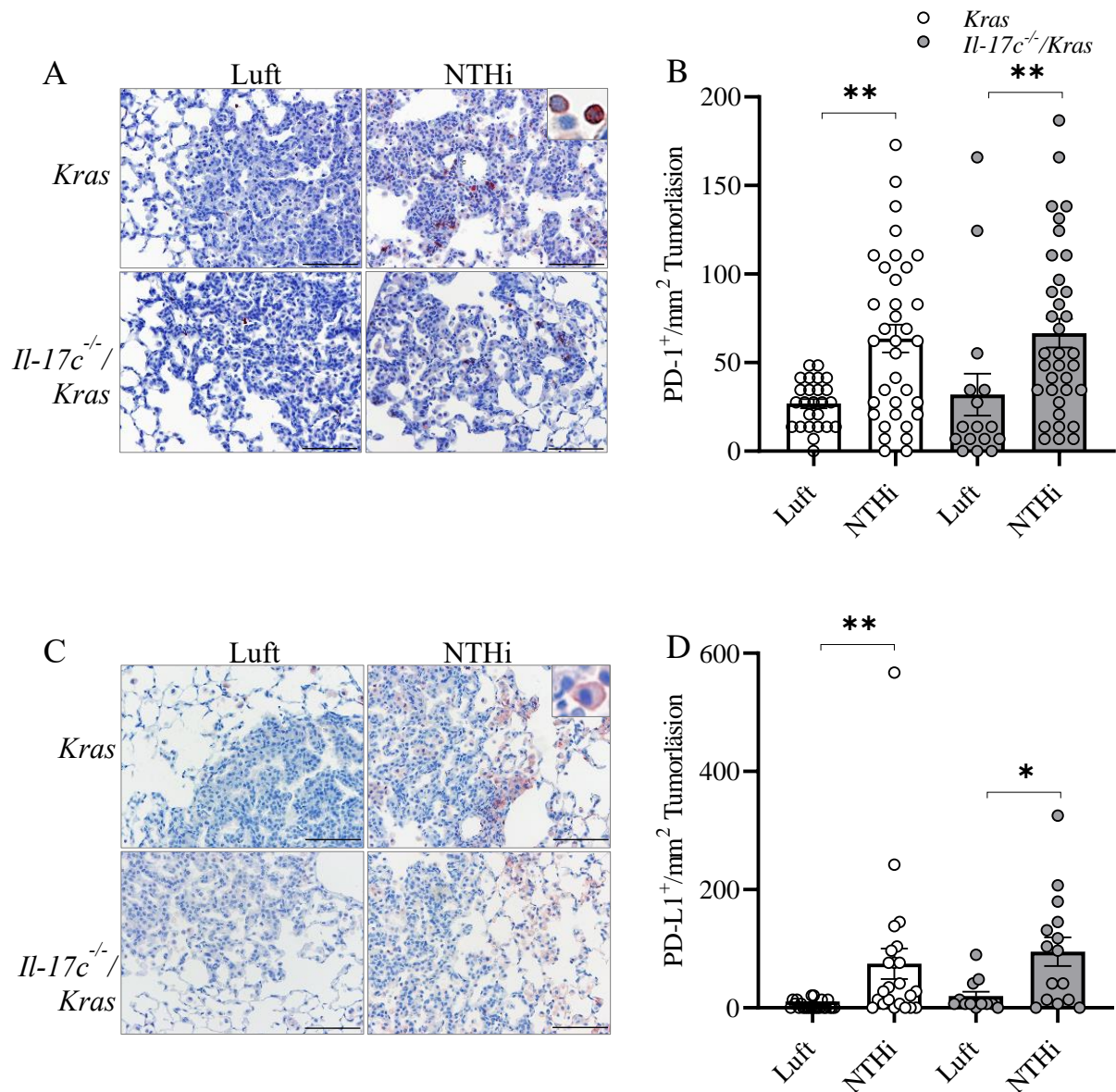


Abbildung 32: Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint ist im Kontext einer COPD ähnlichen Inflammation aktiviert. *Kras* und *Il-17c^{-/-}/*Kras** Mäuse wurden vier Wochen NTHi exponiert. (A) Repräsentative Immunhistochemie für PD-1 in der Tumormikroumgebung und (B) Quantifizierung der PD-1 positiven Zellen in der Tumormikroumgebung. (C) Repräsentative Immunhistochemie für PD-L1 in der Tumormikroumgebung und (D) Quantifizierung PD-L1 positiver Zellen in der Tumormikroumgebung. Maßstab 100 µm. Student's t-test. Daten sind als MW ± SEM gezeigt. *p < 0,05; **p < 0,01. Die einzelnen Tumoriäsionen von n = 4-6 Mäusen pro Gruppe wurden analysiert.

Immunhistochemische Färbungen der Schnittpräparate für CD4 und CD8 zeigten, dass NTHi-Exposition zu einer erhöhten Anzahl an CD4 und CD8 positiven Zellen in der Tumormikroumgebung unabhängig von IL-17C führte (Abb. 33).

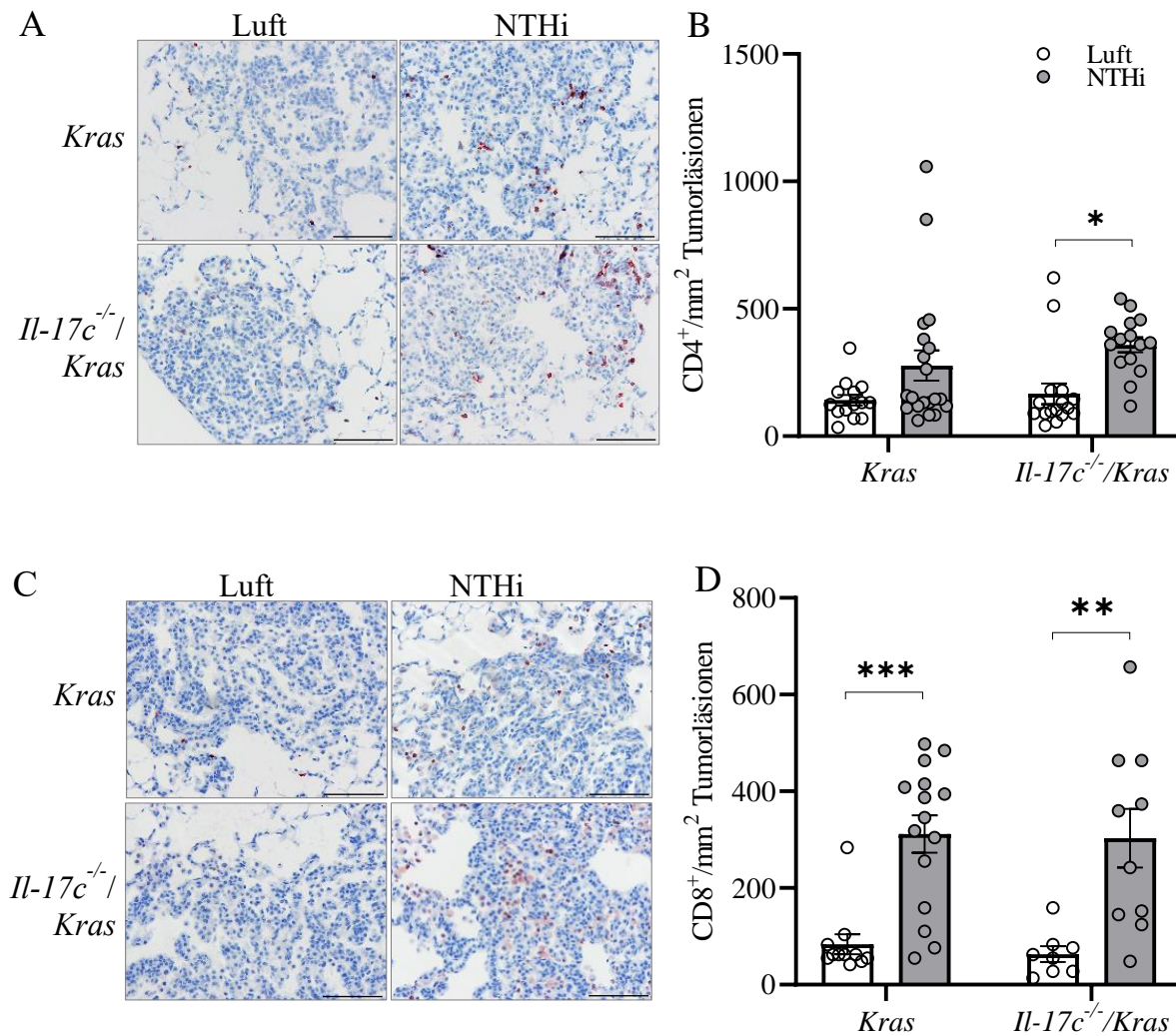


Abbildung 33: COPD-ähnliche Inflammation führt zu einer erhöhten Anzahl an CD4 und CD8 in der Tumormikroumgebung. *Kras* und *Il-17c^{-/-}/*Kras** Mäuse wurden vier Wochen NTHi exponiert. (A) Repräsentative Immunhistochemie für CD4 in der Tumormikroumgebung und (B) Quantifizierung der CD4 positiven Zellen in der Tumormikroumgebung. (C) Repräsentative Immunhistochemie für CD8 in der Tumormikroumgebung und (D) Quantifizierung CD8 positiver Zellen in der Tumormikroumgebung. Maßstab 100 μ m. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Die einzelnen Tumorzellen von $n = 4-6$ Mäusen pro Gruppe wurden analysiert.

Mittels durchflusszytometrischer Analysen wurden CD8 Zellen hinsichtlich der Expression von PD-1 untersucht. Hierzu wurden die Lungen enzymatisch verdaut, um Einzelzellsuspensionen lebender Lungenzellen zu erhalten. Jeweils 10^6 Zellen wurden wie in Kap. 2.2.6 beschrieben in die Immunfärbung eingesetzt. Es zeigte sich, dass NTHi-Exposition zu einem signifikant erhöhten Anteil an PD-1 positiven CD8 positiven Zellen unabhängig von IL-17C führte (Abb. 34).

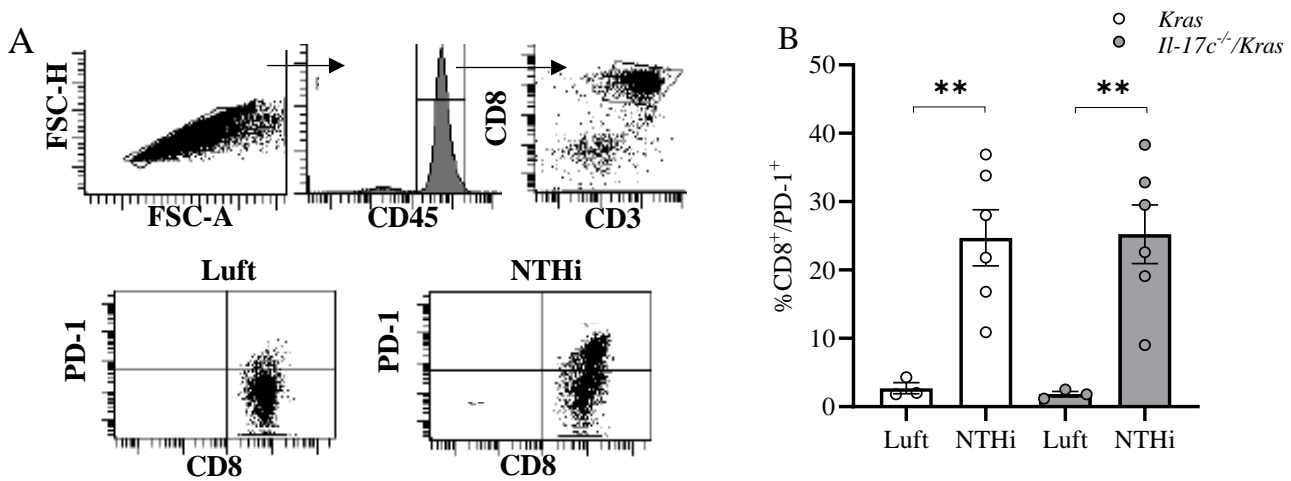


Abbildung 34: Die Expression von PD-1 ist nach NTHi-Exposition in CD8 positiven T-Lymphozyten erhöht. Nach vierwöchiger NTHi-Exposition wurden durchflusszytometrische Analysen mit Lungenhomogenisat durchgeführt. (A) Die in den Versuchen angewandte Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analysen ist exemplarisch dargestellt. (B) Relative Quantifizierung PD-1 und CD8 doppelpositiver Zellen im Lungenhomogenisat. Student's t-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. ** $p < 0,01$, n = 3-6 pro Gruppe.

3.3.6 Die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints verringert bakteriell-induzierte Entzündung

Es wurde die Auswirkung einer Immun-Checkpoint Therapie in dem entzündungsgesteuerten-Kras Krebsmodell untersucht. Es ist bekannt, dass die PD-1-Immun-Checkpoint Therapie im verwendeten Kras-abhängigen Lungenkrebsmodell lediglich in Kombination mit Radiotherapie einen positiven Effekt auf das Tumorstadium besitzt, wohingegen eine alleinige Immun-Checkpoint Therapie nur geringe Auswirkungen auf den Tumor hat [256, 257]. In den folgenden Versuchen wurden *Kras* und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse für vier Wochen NTHi exponiert und gleichzeitig mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 oder mit einem Isotyp-Antikörper als Kontrolle behandelt (Abb. 35).

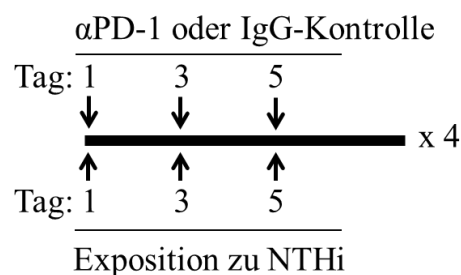


Abbildung 35: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper. *Kras^{G12D}* Mäuse und *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse wurden für vier Wochen dreimal wöchentlich NTHi exponiert und dreimal wöchentlich mit einem α PD-1 oder einem Isotyp-Antikörper behandelt. Die Antikörper (200 μ g/200 μ l) wurden den Mäusen 30 Minuten vor der Exposition an den angegebenen Tagen i.p. verabreicht.

Zur Bestimmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wurde ein Multiplex Assay mit der gewonnenen BAL-Flüssigkeit der Lungen durchgeführt. Hierbei zeigten die *Kras* Mäuse ein signifikantes Ansprechen auf die Blockade des PD-1/PD-L1-Immuncheckpoints, wobei in den *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen deutlich geringere Konzentrationen der Zytokine IL-6, CCL5, G-CSF und TNF- α gemessen werden konnten (Abb. 36). Die Konzentrationen der ebenfalls analysierten Zytokine IFN- γ , IL-10 und IL-12p70 lagen in beiden Mauslinien unabhängig der Behandlung unter dem Detektionslimit des verwendeten Assays. Die Daten sind nicht gezeigt.

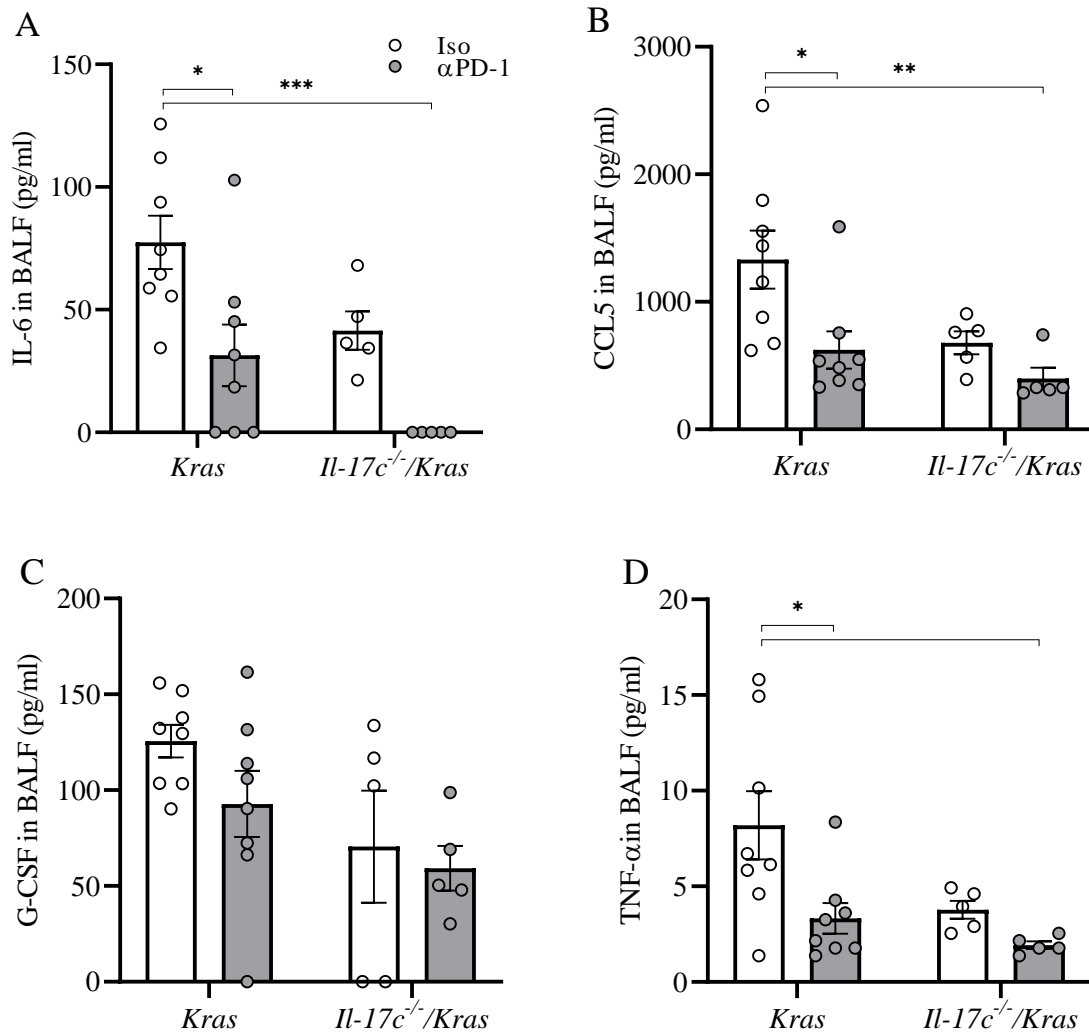


Abbildung 36: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper reduziert Entzündungsmediatoren in der BAL-Flüssigkeit. Nach vierwöchiger NTHi-Exposition mit begleitender PD-1 Blockade wurden die Konzentrationen von (A) IL-6, (B) CCL5, (C) G-CSF und (D) TNF- α in der BAL-Flüssigkeit mittels Luminex Assay bestimmt. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, $n = 5-8$ pro Gruppe.

In weiteren Versuchen wurden die Gesamtzellzahl und die Zellzusammensetzung in der BAL-Flüssigkeit untersucht. Durch die Blockade von PD-1 kam es in den BAL-Flüssigkeiten beider Mausstämmen zu einer signifikant verringerten Gesamtzellzahl, welche jedoch keine Unterschiede in den mit PD-1 behandelten Gruppen aufzeigte. Die Behandlung mit dem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper resultierte in einer signifikanten Verringerung der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten unabhängig von IL-17C. Die Anzahl an Makrophagen wurde durch die NTHi-Exposition als auch durch die Blockade von PD-1 nicht beeinflusst (Abb. 37).

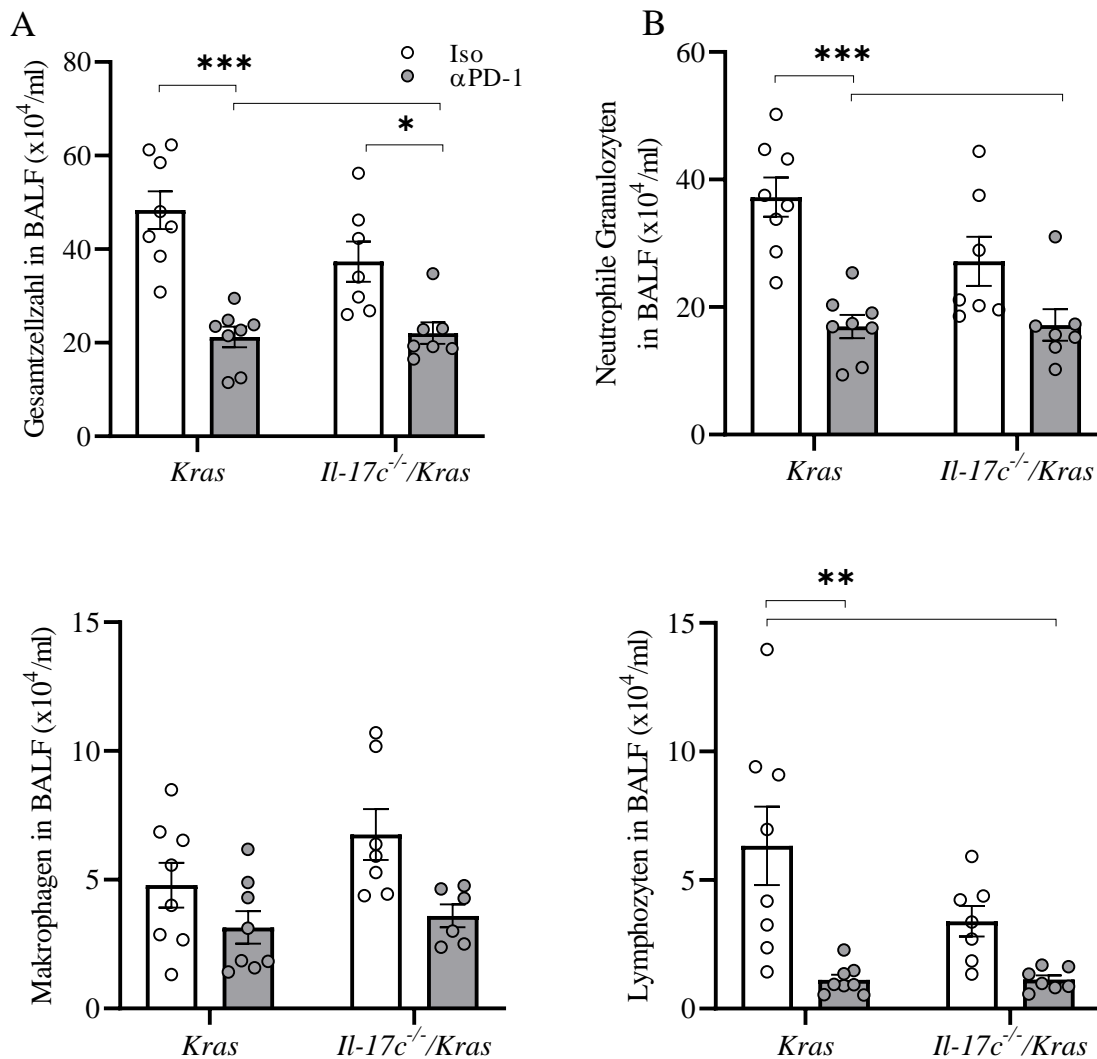


Abbildung 37: Die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints führt zu einer verminderten Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten im Alveolarraum. Die Gesamtzellzahl und das Differenzialzellbild der BAL-Flüssigkeit wurden nach vierwöchiger NTHi Exposition mit begleitender PD-1 Blockade ermittelt. (A) Gesamtzellzahl der BAL-Flüssigkeit. (B) Differenzialbild der BAL-Flüssigkeit mit Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 6-8$ pro Gruppe.

Da das Hauptziel der PD-1-Immuntherapie die Reaktivierung sogenannter erschöpfter T Zellen ist [258], wurde in immunhistochemischen Färbungen untersucht, inwieweit die CD4 bzw. CD8 Populationen in den Tumorerläsionen in dem verwendeten COPD-ähnlichen Inflammationsmodell durch die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints beeinflusst wurden. Es zeigte sich, dass es nach vierwöchiger NTHi-Exposition mit begleitender Blockade von PD-1 in beiden Mauslinien zu einer signifikant verringerten Anzahl an CD4 positiven Zellen in die Tumorerläsionen kam. Die Anzahl an CD8 positiven Zellen war lediglich in den *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen signifikant reduziert (Abb. 38).

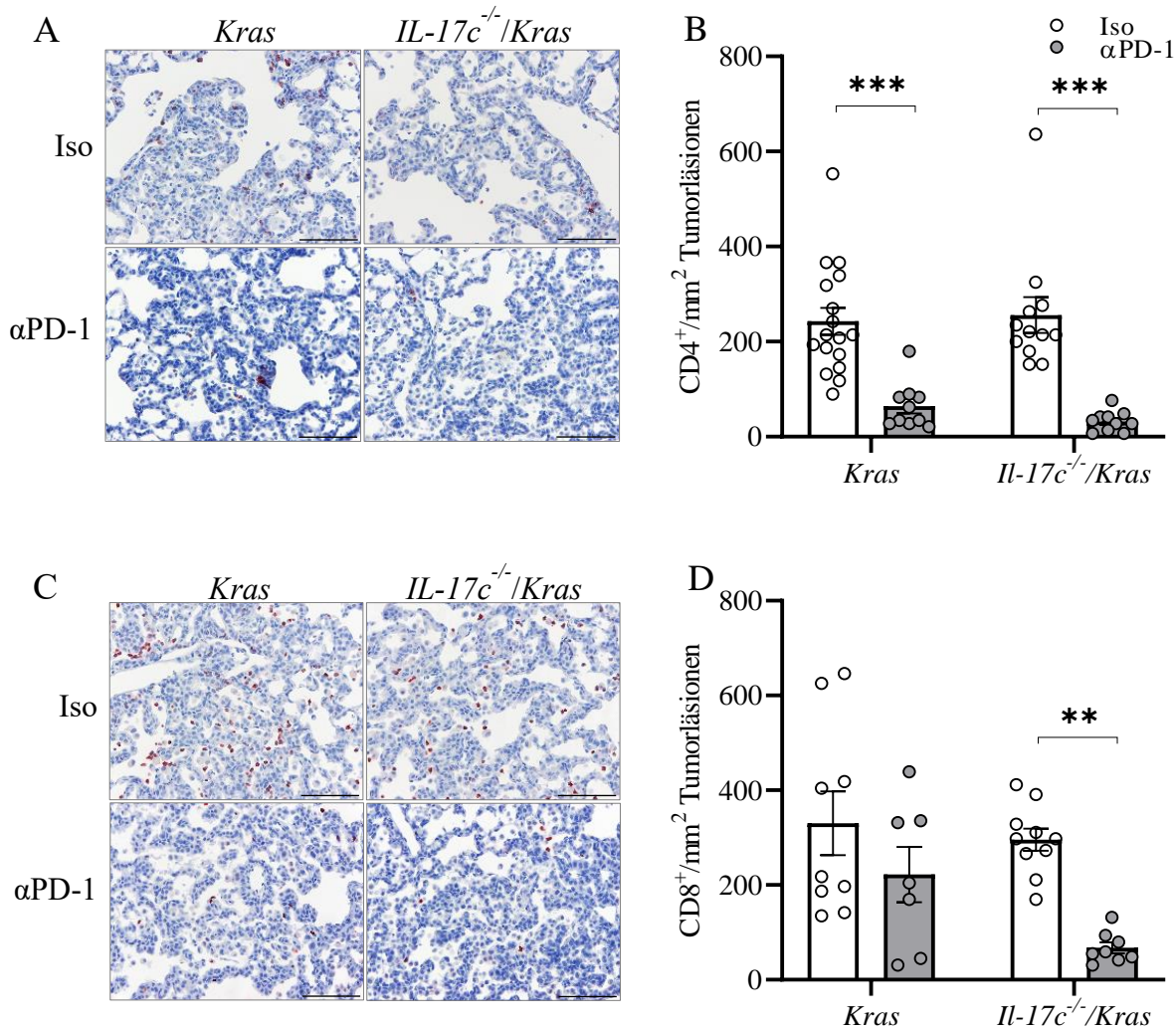


Abbildung 38: Die Blockade der PD-1/PD-L1 Achse führt zu einer verminderten Anzahl an Lymphozyten in den Tumorläsionen. *Kras* und *IL-17c^{-/-}/Kras* Mäuse wurden vier Wochen NTHi exponiert. (A) Repräsentative Immunhistochemie für CD4 und (B) und Quantifizierung CD4 positiver Zellen in der Tumormikroumgebung. (C) Repräsentative Immunhistochemie für CD8 und (D) Quantifizierung CD8 positiver Zellen in der Tumormikroumgebung. Maßstab 100 μ m. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. **p < 0,01; ***p < 0,001. Die einzelnen Tumorzellen von n = 4-6 Mäusen pro Gruppe wurden analysiert.

3.3.7 Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu geringerem Tumorwachstum in *IL-17c^{-/-}/Kras* Mäusen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass COPD-ähnliche Entzündung den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint in der Tumormikroumgebung aktiviert. Aufgrund dessen wurde weiterführend untersucht, welche Auswirkung die PD-1-Blockade auf das Tumorwachstum in dem hier verwendeten Mausmodell hat. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit einem therapeutischen PD-1 Antikörper das Wachstum der individuellen Tumorzellen in den *Kras* Mäusen nicht beeinflusste, wohingegen es in den *IL-17c^{-/-}/Kras* Mäusen zu einem signifikant verringerten

Tumorstadium verglichen zu den anderen Versuchsgruppen kam (Abb. 39). Der prozentuale Anteil der Tumorknoten, welche eine Größe $\geq 0.27 \text{ mm}^2$ aufwiesen, war in den *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen signifikant reduziert (Abb. 39 C).

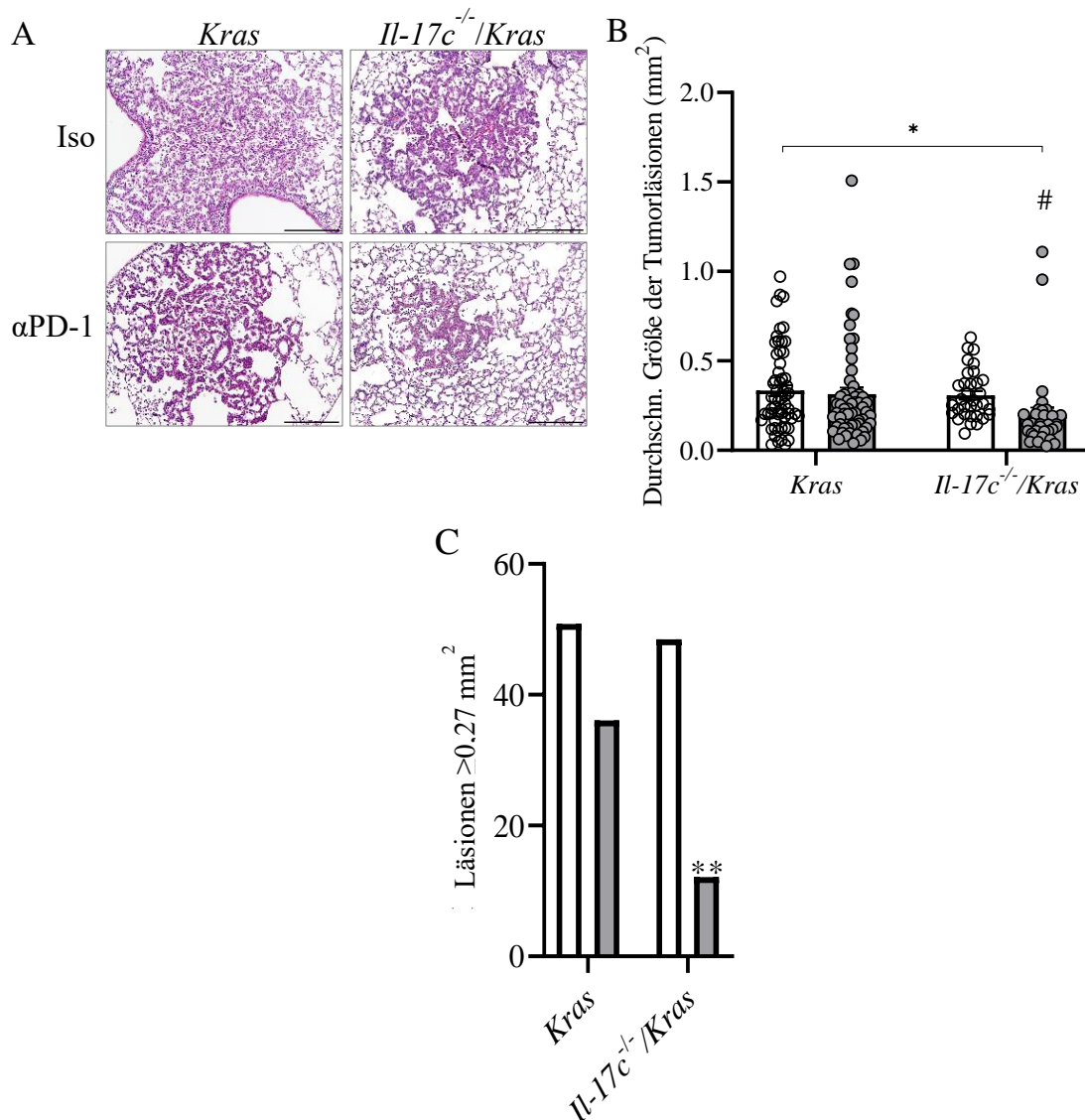


Abbildung 39: Die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints reduziert die Tumormasse in *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäusen. Die Tumormasse wurde nach vierwöchiger NTHi-Exposition mit begleitender PD-1 Blockade bestimmt. (A) Repräsentative mikroskopische Pathologie (H&E Färbung). Maßstab 200 μm. (B) Die durchschnittliche Tumormasse wurde mikroskopisch ausgemessen. Two-way ANOVA mit Bonferroni post-test. * $p < 0,01$. Mann-Whitney Test in der Gruppe der *Il-17c^{-/-}/Kras* Mäuse mit # $p < 0,001$. Daten sind als MW \pm SEM gezeigt. (C) Prozentuale Aufteilung der durchschnittlichen Tumormassen größer als 0,27 mm². Fisher's exact Test, ** $p < 0,01$. Die einzelnen Tumorknoten von $n = 4-6$ Mäusen pro Gruppe wurden analysiert.

Diese Daten belegen, dass die Defizienz von IL-17C das Ansprechen der PD-1-Immuntherapie im Kontext einer COPD-ähnlichen Inflammation verbessert.

4. Diskussion

Die COPD ist einer der größten Risikofaktoren für die Entstehung von Lungenkrebs. Zu den innovativsten Therapieansätzen der Behandlung von Lungenkrebs gehören Immuntherapien, die sich gegen den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint richten. Es sind bereits einige therapeutische Antikörper gegen den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint bei Lungenkrebs zugelassen. Inwieweit der PD-1-Immun-Checkpoint zur Pathogenese der COPD beiträgt und therapeutische Antikörper gegen PD-1 den Verlauf der COPD beeinflussen, wird kontrovers diskutiert. Die vorliegende Arbeit untersuchte daher in bakteriell- und rauchinduzierten COPD-Modellen, inwiefern der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint pulmonale Entzündung reguliert und zum Lungenschaden beiträgt. In einem primären Tumormodell wurde geprüft, ob bakteriell-induzierte Entzündung zur Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse im Tumorgewebe führt und ob die Blockade von PD-1 mittels eines therapeutischen Antikörpers das entzündungsabhängige Tumorwachstum vermindert. Zudem wurde untersucht, inwiefern das epitheliale Zytokin IL-17C die Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse reguliert und das Ansprechen auf die Blockade von PD-1 beeinflusst.

4.1 Die Rolle des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints im Verlauf der COPD

COPD und Lungenkrebs sind miteinander eng verbundene Krankheiten. Die COPD gilt als größter unabhängiger Risikofaktor für Lungenkrebs, bis zu 70% der Lungenkrebspatienten haben eine koexistierende COPD [259]. In den letzten Jahren wurden Immun-Checkpoint-Inhibitoren als vielversprechende Therapien bei der Behandlung von Lungenkrebs identifiziert [260, 261]. Bisher untersuchten nur wenige Studien, inwieweit der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint bei COPD-Patienten ohne Lungenkrebs aktiviert ist. McKendry et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass der Anteil PD-1 exprimierender CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in Lungengewebe von COPD-Patienten erhöht ist [213]. Kalathil et al. konnten zusätzlich bei zirkulierenden CD4⁺CD127⁺ Effektor T Zellen von COPD-Patienten eine gesteigerte PD-1 Expression nachweisen [262]. Stoll et al. konnten weiter zeigen, dass plasmazytoide Dendritische Zellen bei COPD-Patienten geringere PD-L1 Expression aufzeigten [263].

Der membranständige PD-1 Rezeptor wird auf Immunzellen wie T und B Lymphozyten sowie myeloiden Zellen über die Liganden PD-L1 und PD-L2 aktiviert. Zahlreiche Proteine immunregulierender Signalwege besitzen neben ihrer membrangebundenen Form eine weitere lösliche Form. Diese wird entweder durch Proteolyse aus der Zellmembran gelöst, wie im Fall der löslichen Form des Zytokins sTNF- α und der löslichen Form des Immun-Checkpoints sB7H

[264, 265], oder ergibt sich durch alternatives Splicing der mRNA wie im Falle von sB7-2 und sCTLA-4 [266, 267]. Analog wurden lösliche Formen von PD-1 und PD-L1 in Tumorpateinten nachgewiesen [268-271].

In dieser Arbeit konnten im Serum und in der zellfreien BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten PD-1 und PD-L1 nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation der PD-1 und PD-L1 Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit und im Serum von stabilen COPD-Patienten und im Serum von exazerbierenden COPD Patienten. Durch Vergleich der stabilen COPD-Patienten mit akut Exazerbierenden konnten dabei signifikant erhöhte PD-L1 Konzentrationen im Serum der akut exazerbierenden Patienten nachgewiesen werden. Die gesteigerten systemischen Konzentrationen von PD-L1 während akuten Exazerbationen reflektieren möglicherweise eine verstärkte pulmonale Entzündung. Da bei akut exazerbierenden COPD-Patienten keine BAL durchgeführt wird, ist es unklar, ob das systemische PD-L1 eine gesteigerte systemische Inflammation wiedergibt oder ob lösliches PD-L1 während einer Exazerbation aus der Lunge in den Blutkreislauf übertritt. Weiter konnte in dieser Arbeit ein erhöhtes PD-1/PD-L1 Verhältnis in der BAL-Flüssigkeit von stabilen GOLD III/IV COPD-Patienten beschrieben werden. Zudem ergab sich eine negative Korrelation des Lungenfunktionsparameters FEV_1 (% predicted) (Einsekundenkapazität) zu dem Verhältnis PD-1/PD-L1. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich bei einer fortgeschrittenen COPD vermehrt PD-1-exprimierende Zellen in der Lunge befinden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der oben erwähnten Studie von McKendry et al., auch wenn in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurde, ob die Anzahl an PD-1-exprimierenden Lymphozyten mit der Schwere der COPD assoziiert ist.

Zu dem Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit wurde noch nicht beschrieben, dass PD-1/PD-L1 Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten bestimmt wurden. Eine Aussage über die mögliche Verwendung des PD-1/PD-L1 Levels im Serum als möglichen Biomarker um Exazerbationen frühzeitig zu erkennen liegt zwar nahe, doch konnten in dieser Arbeit zu den akut exazerbierten Patienten keine Daten aus dem stabilen Krankheitsstadium analysiert werden. Um die Eignung von PD-1 und PD-L1 als Biomarker einer Exazerbation zu prüfen, müsste daher eine intraindividuelle Analyse des Verlaufs der PD-1 und PD-L1 Konzentrationen mit eventueller Zunahme über den Krankheitsverlauf durchgeführt werden. Dies sollte an zwei unabhängigen Kohorten geprüft werden. Zusätzlich gilt zu beachten, dass eine relativ kleine Anzahl an Patienten in die Analysen einbezogen wurde und 17 von den 31 untersuchten Patienten mit Lungenkrebs diagnostiziert wurden. In weiteren Analysen sollte

daher auch geprüft werden, inwiefern sich das Vorhandensein von Lungentumoren auf die PD-1 und PD-L1 Konzentrationen auswirkt.

4.1.1 Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints in experimentellen COPD-Modellen

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint zur Progression der COPD beiträgt und ob therapeutische Antikörper gegen den Immun-Checkpoint bei COPD-Patienten den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen können. Es ist unklar, ob eine PD-1-Immuntherapie bei COPD-Patienten ohne Tumorerkrankung zum Tragen kommt, da die Reaktivierung der Tumor-gerichteten zytotoxischen Eigenschaften der T Zellen durch einen therapeutischen PD-1 Antikörper in einem neoantigenfreien Umfeld nicht von Relevanz ist [216, 217, 272].

Aufgrund der kontroversen Datenlage und bisher fehlenden experimentellen Studien wurde in dieser Arbeit anhand zweier präklinischer COPD-Modelle geprüft, inwiefern sich die Blockade von PD-1 auf einen entzündungsinduzierten Lungenschaden auswirkt. Im Modell des rauchinduzierten Lungenschadens wurden Mäuse an fünf Tagen pro Woche Zigarettenrauch exponiert und gleichzeitig zweimal wöchentlich mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 behandelt. In dem Rauchmodell war nach vierwöchiger Exposition eine starke Zunahme neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten in der BAL-Flüssigkeit feststellbar, was einem COPD ähnlichen klinischen Bild entspricht [273-275]. Durch die Gabe des anti-PD-1 Antikörpers wurde die Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der Lunge signifikant verringert. Nach zwölfwöchiger Rauchexposition wurde der Lungenschaden mittels invasiver Lungenfunktionsmessung sowie durch anschließende stereologische Analysen der Schnittpräparate der Lunge analysiert [238, 242, 276]. Anhand der Lungenfunktionsmessung konnte nach zwölfwöchiger Rauchexposition eine veränderte Lungenmechanik beschrieben werden, welche die von COPD-Patienten typischen Merkmale aufzeigte. Die mit einem Kontrollantikörper behandelten zigarettenrauchexponierten Tiere zeigten eine signifikante Zunahme der Vitalkapazität, während bei anti-PD-1 Antikörper behandelten Tieren keine signifikante Zunahme der Vitalkapazität gemessen wurde. In diesem präklinischen Modell führt Rauchexposition zu einer erhöhten Compliance, was auf eine erhöhte Elastizität der Lunge aufgrund entstandener Emphyseme rückschließen lässt [277]. Dieser Verlust der elastischen Rückstellkraft der Lunge konnte nach zwölfwöchiger Rauchexposition ebenfalls in den Kontrolltieren gemessen werden. Die PD-1 behandelten Tiere wiesen hingegen keine signifikante Zunahme der Compliance auf. Der stereologisch ermittelte MCL gibt Aufschluss

über den rauchinduzierten Lungenschaden. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Rauchexposition zu einem Verlust der Lungenstruktur in den Kontrolltieren führt, welcher in den mit dem PD-1 Antikörper behandelten Tieren signifikant verringert war.

Die Lungen von stabilen COPD-Patienten sind häufig mit Bakterien wie NTHi infiziert bzw. kolonisiert. Es wird angenommen, dass NTHi zur pulmonalen Entzündung von COPD-Patienten entscheidend beiträgt, besonders auch bei Patienten, die das Rauchen aufgegeben haben [245-247, 278]. Damit der Einfluss einer bakteriell-vermittelten pulmonalen Entzündung auf den PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint analysiert werden konnte, wurde ein vierwöchiges NTHi Expositionsmodell angewandt. Gleichzeitig zu der Exposition wurden die Tiere mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 behandelt. In diesem Modell kommt es bereits nach vier Wochen zu einem Lungenemphysem. Hierin und auch in der neutrophilen Entzündung ähnelt das Modell gängigen Elastase/LPS-abhängigen COPD Modellen [108, 279, 280]. Analog zu den beschriebenen Ergebnissen der zwölfwöchigen Zigarettenrauch Exposition konnte ebenfalls in den NTHi-exponierten Tieren eine Zunahme PD-1 und PD-L1 positiver Zellen im Lungenparenchym festgestellt werden. Durch stereologische Auswertung der Schnittpräparate wurde der Verlust der Lungenstruktur quantifiziert. Hierbei wiesen die NTHi-exponierten Kontrolltiere eine starke Zunahme des MCLs auf. Durch die Gabe des PD-1 Antikörpers kam es zu einer deutlichen Reduktion des Lungenschadens.

Kennzeichnend für beide in dieser Arbeit verwendeten Modelle ist die Aktivierung der PD-1/PD-L1-Achse einhergehend mit einer erhöhten Anzahl an PD-1 positiven Zellen, was höchstwahrscheinlich die Situation in Patienten abbildet. So zeigten, wie bereits erwähnt, McKendry et al., dass Lymphozyten im Lungengewebe von COPD-Patienten verstärkt positiv für PD-1 sind [213] und Kalathil et al., dass zirkulierende CD4⁺CD127⁺ Effektor T Zellen von COPD-Patienten eine gesteigerte PD-1 Expression aufweisen [262]. Auch Studien zu Lungenkrebs legen eine verstärkte Aktivierung von PD-1 bei COPD-Patienten nahe. Biton et al. konnten zeigen, dass bei Lungenkrebspatienten mit einer koexistierenden COPD tumorassoziierte CD8⁺ Lymphozyten PD-1 verstärkt exprimieren was nahelegt, dass sich NSCLC Patienten aufgrund einer gleichzeitig auftretenden COPD für eine PD-1-Immuntherapie qualifizieren [212]. McKendry et al. konnten anhand isolierter T Zellen von COPD-Patienten, welche *ex vivo* in humanen Lungenexplantaten inkubiert wurden, zeigen, dass es nach COPD-typischer viraler Infektion mit Influenza zu einer gesteigerten Expression von PD-1 auf den T Zellen von COPD-Patienten verglichen zu gesunden Spendern kam. Sie konnten daraus schlussfolgern, dass eine PD-1-Immuntherapie in diesem Kontext positiven Einfluss auf die dysregulierten T Zellen haben kann [213]. Mark et al. übertrugen diese Ansätze

auf NSCLC Patienten. Sie berichteten, dass die PD-1 Expression in Tumoren von COPD-Patienten stark erhöht war und die Patienten, welche eine PD-1-Immuntherapie bekamen, eine erhöhte progressionsfreie Überlebensrate aufwiesen [211]. Unsere Daten und die Studien von McKendry et al. und Kalathil et al. deuten darauf hin, dass die PD-1/PD-L1-Achse bei COPD-Patienten unabhängig von Lungenkrebs aktiviert wird und zur Pathogenese der Erkrankung beiträgt. Hier könnte eine durch die COPD-assoziierte Entzündung verursachte Aktivierung von PD-1 in z.B. zytotoxischen T Zellen und auch myeloiden Zellen wie Makrophagen, die entartete Gewebe angreifen, zum erhöhten Auftreten von Lungenkrebs bei COPD-Patienten beitragen. So konnten Gordon et al. zeigen, dass PD-1 in tumorassoziierten Makrophagen die Phagozytose von Krebszellen hemmt und die Blockade von PD-1 andererseits die Phagozytoseaktivität erhöht und das Tumorwachstum hemmt [281].

Die hier festgestellten positiven Effekte der Gabe eines PD-1 Antikörpers auf die Lungenstruktur in den verwendeten COPD Mausmodellen sind teilweise unerwartet. Unter normalen physiologischen Umständen reguliert der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint die Balance der Immunantwort, um Autoimmunreaktionen während und nach einer Infektion zu unterbinden [282]. Daher ist eine gesteigerte Inflammation mit erhöhtem Lungenschaden aufgrund einer unkontrollierten Reaktivierung der T Zellen durch das Blockieren des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints in der Lunge denkbar.

Interessanterweise zeigt eine aktuelle Studie, dass die aktivierte PD-1/PD-L1-Achse unter pathologischen Bedingungen zu einer gesteigerten Inflammation führt. Celada et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung des PD-1-Immun-Checkpoints abseits von Lungenkrebs zur Pathogenese chronischer Lungenerkrankungen beiträgt. Im Kontext der idiopathischen Lungenfibrose, eine langsam fortschreitende, tödliche Lungenerkrankung, bei der das Lungenparenchym in Bindegewebe umgewandelt wird, konnten durch immunhistochemische und durchflusszytometrische Analysen eine Expression von PD-1 auf CD4 T Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der Expression von PD-1 lagen die T Zellen zwar in einem proliferativ inaktiven Zustand vor, diese zeigten jedoch eine erhöhte Expression von proinflammatorischen und zellregulierenden Entzündungsmediatoren wie TGF- β und IL-17A. Diese T Zellen induzierten in einer *ex vivo* ko-Kultur mit humanen Fibroblasten die Produktion von Kollagen. Wurde jedoch ein anti-PD-1 Antikörper in die Versuche zugegeben, kam es zu einer Reduktion der Expression von TGF- β und IL-17A, einhergehend mit einer verringerten Produktion von Kollagen. Dieser Mechanismus fand auch im Mausmodell Bestätigung [283]. Eine verminderte Expression inflammatorischer Mediatoren nach anti-PD-1 Gabe konnte auch in dem in dieser Arbeit verwendeten rauchinduzierten COPD-Modell beobachtet werden. In

diesem Modell waren die Expressionen der neutrophilen Granulozyten Chemokine KC, das murine Homolog zu humanem IL-8, als auch MIP-2 zu einem frühen Zeitpunkt der Exposition nach anti-PD-1-Gabe vermindert. Dies ging mit einer verminderten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge einher. Weitere Analysen müssen zeigen, inwiefern PD-1-exprimierende Lymphozyten im COPD-Modell wie bei Celada et al. über Zytokine wie IL-17A pulmonale Inflammation vermitteln.

Speziell IL-8 spielt in dem Krankheitsverlauf, als auch als eventueller Biomarker und Therapieansatz für Exazerbationen der COPD eine erwähnenswerte Rolle [284-286].

In einer klinischen Studie von Zhang et al. wurde beschrieben, dass die Serumkonzentrationen von IL-8 bei COPD-Patienten mit akut exazerbierendem Verlauf im Vergleich zu stabilen COPD-Patienten erhöht waren. Dabei spielt auch die Häufigkeit der akuten Exazerbation eine Rolle. So lagen die Serumkonzentrationen von IL-8 bei Patienten mit oftmals auftretenden Exazerbationen, verglichen zu spontan Exazerbierenden ebenfalls höher [284]. Einhergehend zeigten Beeh et al., dass IL-8 in Sputum von COPD-Patienten nachweisbar ist und dieses in einem *ex vivo* Chemotaxis Assay neutrophile Granulozyten mobilisiert [285]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Tiwari et al. für MIP-2. Sie konnten nachweisen, dass sowohl die Chemokine MIP-2 (CXCL2) und CXCL1, als auch dessen Rezeptor CXCR2 in Lungengewebe von COPD-Patienten exprimiert werden. Diese klinischen Erkenntnisse konnten sie ebenfalls in einem Mausmodell mit Zigarettenrauch-Exposition nachbilden [287]. Die indirekte und breite Hemmung der Expression von Chemokinen über die lokale Blockade der PD-1/PD-L1-Achse könnte ein Ansatz sein die neutrophile Entzündung der Lunge bei COPD-Patienten zu mindern.

Es ist auch denkbar, dass der positive Effekt der Blockade von PD-1 in beiden in dieser Arbeit verwendeten COPD-Modellen auf eine gesteigerte Phagozytose- bzw. Efferozytose-Aktivität von Makrophagen zurückführbar ist. Mittels Efferozytose eliminieren Makrophagen tote bzw. apoptotische neutrophile Granulozyten und Epithelzellen. Es wird angenommen, dass eine gestörte Efferozytose zur pulmonalen Entzündung der Lunge bei der COPD beiträgt [288-291]. Verschiedene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die Blockade von PD-1 die Phagozytose-Aktivität verstärkt. So konnten Gordon et al. einen direkten positiven Einfluss einer PD-1-Immuntherapie auf Makrophagen nachweisen. In einem präklinischen Mausmodell als auch anhand humaner Proben konnte gezeigt werden, dass tumorassoziierte Makrophagen eine erhöhte PD-1 Expression aufzeigen, welche mit dem Schweregrad der Tumorerkrankung beim Menschen sowie im Mausmodell zunimmt. Die PD-1 positiven Makrophagen zeigten, wie oben bereits erwähnt, eine verminderte Phagozytose gegenüber Tumorzellen, welche jedoch durch

eine PD-1-Immuntherapie im Mausmodell wiederhergestellt werden konnte [281]. Shen et al. führten ebenfalls die verringerte Phagozytose von Makrophagen im Kontext der Tuberkulose auf den aktivierten PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint zurück. In klinischen Proben von aktiven Tuberkulosepatienten konnte eine erhöhte PD-1 und PD-L1 Expression auf CD4 T Zellen sowie Monozyten beobachtet werden. Auch sie konnten nachweisen, dass es durch eine PD-1-Blockade in einem *in vitro* Testsystem zu einer gesteigerten Phagozytose und für die Tuberkulose wichtigen intrazellulären Lyse der Bakterien kam [292].

Einhergehend mit den oben genannten Studien konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die PD-1/PD-L1-Immuntherapie auch im Kontext der COPD Anwendung finden könnte. In den verwendeten präklinischen Mausmodellen mit COPD ähnlicher Inflammation, ausgelöst durch Tabakrauch als auch NTHi, konnte durch die Gabe eines PD-1 Antikörpers begleitend zu den Expositionen ein protektiver Effekt auf die Erhaltung der Lungenstruktur erkannt werden. Dies deutet darauf hin, dass die PD-1/PD-L1-Achse bei der Pathogenese der COPD eine Rolle spielt. Die reduzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine oder auch die gesteigerte Phagozytose von Makrophagen mit verbundener erhöhter Klärung von Partikeln und apoptotischer Zellen, wie zum Beispiel neutrophiler Granulozyten, könnte das positive Ansprechen auf eine PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint Therapie in den verwendeten COPD ähnlichen Mausmodellen erklären. Das Blockieren des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints wurde in diesem Falle gleichzeitig, also prophylaktisch durchgeführt, was im klinischen Bild einer frühen Phase einer COPD-Erkrankung entspricht. Die erhobenen Daten weisen weiter darauf hin, dass eine Immunmodulation durch die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints im Kontext schwerwiegender mikrobieller Infektionen abseits der Tumorthherapie nutzbringende Eigenschaften entfalten kann.

Die PD-1-Immuntherapie selbst kann schwere Nebenwirkungen auslösen, welche sich bis zu Organversagen und Tod steigern können [293]. Die Nebenwirkungen streuen dabei systemisch und sind nicht vorab zu definieren [243]. Die Diversität der möglichen Effekte erstreckt sich hierbei auf das Gastrointestinale System mit der Ausprägung einer Kolitis [294-297], der Beeinträchtigung des Endokrinen Systems, mit Auswirkungen auf Pankreas, Niere und Schilddrüse [298-303]. Weiter kann das kardiale System durch eine PD-1-Immuntherapie negativ beeinflusst werden [304-307]. Im Vergleich dazu konnten in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten durch engmaschige Überwachung der Versuchstiere keine negativen systemischen Effekte bei der gewählten Dosis des PD-1 Antikörpers festgestellt werden. Die individuellen Gewichte und das finale Blutbild der Versuchstiere zeigten sowohl in dem Zigarettenrauch- als auch in dem NTHi-Expositionsmodell keine Veränderungen. Ein

zusätzlich durchgeführter T Zell Killing Assay mit direkt aus der Milz isolierten T Zellen konnte ebenfalls keine unterschiedlichen Killing-Raten der Tumorzelllinien erkennen lassen. Aufgrund der Nebenwirkungen ist es trotzdem kritisch zu betrachten, inwiefern sich anti-PD-1 Therapien für COPD-Patienten eignen.

4.2 Funktion der PD-1/PD-L1-Achse im Kras-abhängigen Lungenkrebsmodell

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 16 % gehört Lungenkrebs weltweit zu den häufigsten Todesursachen [65, 308]. Tabakrauch ist dabei der größte Risikofaktor Lungenkrebs als auch COPD zu entwickeln [99, 245, 309]. Lungenkrebs und COPD sind stark vernetzte und sich gegenseitig bedingende Krankheiten, bei bis zu 70% aller Lungenkrebspatienten wird eine begleitende COPD diagnostiziert [99-101]. In beiden Krankheiten kommt es im Verlauf zu einer gesteigerten Rekrutierung von Immunzellen wie beispielsweise neutrophiler Granulozyten in das Lungenparenchym bzw. in die Tumormikroumgebung [133, 211-213, 310].

Bei der Rekrutierung von Entzündungszellen in die Tumormikroumgebung sowie im Verlauf der COPD spielen Zytokine eine Schlüsselrolle [311, 312]. Im Verlauf der COPD produzieren Epithelzellen und Entzündungszellen wie Alveolarmakrophagen erhöht Zytokine und Chemokine, was zu einer gesteigerten Rekrutierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in die Lunge und letztendlich zu einer gesteigerten, destruktiven Inflammation führt [313]. Durch den inflammatorischen Charakter fördert die COPD die Entstehung und Progression von Lungenkrebs [259, 314]. Wir konnten bereits zeigen, dass die kombinierte Exposition mit Rauch und NTHi im Metastasemodell die Tumorprogression stark fördert [109]. Auch im primären Kras-vermittelten Lungenkrebsmodell führte NTHi-induzierte Entzündung zu einem gesteigerten Tumorwachstum [315, 316]. Dabei wird die angeborene Immunantwort durch Toll-like Rezeptoren aktiviert, was eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung zur Folge hat [109, 132, 315-317].

Immun-Checkpoint Therapien mit Antikörpern, die die PD-1/PD-L1-Achse adressieren, sind neue, vielversprechende Ansätze bei der Behandlung von Lungenkrebs. Das Ansprechen auf eine Monotherapie mit PD-1 blockierenden Antikörpern liegt jedoch unter 20% [158, 318-326]. Beim Ansprechen auf Immuntherapien spielen die Zusammensetzung des Tumors als auch die der Tumormikroumgebung eine entscheidende Rolle. Anhand immunohistochemischer Färbungen von Tumorbiopsien wird klassischerweise zwischen *immune desert*, in welchen keine infiltrierenden Immunzellen erkennbar sind, *immune-excluded*, Immunzellen sind

lediglich an den Rändern der Tumorläsion erkennbar, und *inflamed* Tumoren, hier ist deutliches Infiltrat von Immunzellen in dem Tumor selbst erkennbar, unterschieden [155, 327, 328]. In dieser Arbeit wurde geprüft, inwiefern im primären Kras-Modell eine gegen PD-1 gerichtete Therapie das Tumorwachstum unter basalen sowie inflammatorischen Bedingungen beeinflusst. In dem hier verwendeten Kras-abhängigen Tumormodell waren infiltrierende neutrophile Granulozyten in der Tumormikroumgebung und proinflammatorische Zytokine in der Lavage nur in geringer Anzahl bzw. Konzentration nachweisbar. Ebenfalls wurden PD-1 sowie PD-L1 positive Zellen im Lungenparenchym als auch in der Tumormikroumgebung nur in geringer Anzahl identifiziert. Diese Beobachtung fügt sich zu der Erkenntnis, dass Kras-induzierte Lungentumore im Mausmodell eine niedrige Immunogenität aufweisen und dadurch einer Erkennung des Immunsystems entgehen [209, 256, 257, 329]. Passend hierzu zeigen die Ergebnisse der Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints in dieser Arbeit keine Wirkung auf das Kras-abhängige Tumorwachstum. Durch die NTHi-induzierte Entzündung kam es im Mausmodell zu einer veränderten Zellzusammensetzung des Tumormikromilieus, welches durch einströmende neutrophile Granulozyten, PD-1 positive CD8 T Zellen und PD-L1 positive myeloide Zellen gekennzeichnet war und in diesen Aspekten dem Milieu in Patienten mit NSCLC ähnlich ist [133, 211-213]. So konnten Kargl et al. nachweisen, dass neutrophile Granulozyten die häufigste Zellart in NSCLC ist und dass die PD-1 Expression auf CD4 T Zellen positiv mit der Tumorgröße korreliert [133]. Auch bei NTHi-induzierter Entzündung hatte die Blockade mit dem therapeutischen anti-PD-1 Antikörper in der vorliegenden Arbeit jedoch keinen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum. Dies könnte daran liegen, dass die durch NTHi ausgelöste pulmonale Inflammation durch die anti-PD-1-Behandlung nur teilweise vermindert wurde und die noch vorhandene Inflammation möglicherweise noch ausreichend das Tumorwachstum im verwendeten System förderte. Zudem wurden die Mäuse nur über einen relativ kurzen Beobachtungszeitraum von vier Wochen beobachtet. Zum Zeitpunkt der Analyse war der Anteil der Tumor-Läsionen größer als $0,27 \text{ mm}^2$ in anti-PD-1-behandelten Mäusen geringer als bei mit Kontrollantikörper behandelten Mäusen. Es stellt sich daher die Frage, inwiefern sich eine Wirkung der anti-PD-1-Therapie auf das Tumorwachstum bei längeren Beobachtungszeiten zeigt und das verwendete System aufgrund des variablen Tumorwachstums innerhalb der einzelnen Gruppen limitiert ist. Verschiedene Studien beobachten das Tumorwachstum einzelner Tumore in ähnlichen prä-klinischen Modellen mittels bildgebender Verfahren, sodass das Ansprechen einzelner Tumore innerhalb einer Maus analysiert werden kann [256, 257]. Die vorliegende Studie ist im Vergleich hierzu in ihrer Sensitivität bezüglich des Tumorwachstums limitiert.

4.2.1 IL-17C hat eine Funktion bei der Rekrutierung von Immunzellen in die Tumormikroumgebung

Da neutrophile Granulozyten und Makrophagen zahlreich in Lungentumoren zu finden sind, wird vorgeschlagen, Immuntherapie mit anti-PD-1 Antikörpern und Therapien, die die Rekrutierung und Aktivität myeloider Zellen regulieren, zu kombinieren [133, 134].

Studien zeigen, dass das epitheliale Zytokin IL-17C die angeborene Immunantwort reguliert und nach Stimulation durch bakterielle Erreger, aber auch bei Autoimmunkrankheiten oder bei akutem Nierenversagen, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten vermittelt [109, 220-223, 225, 233, 330-333]. Im Metastasemodell konnten wir bereits zeigen, dass IL-17C die entzündungs-vermittelte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Tumormikroumgebung und Tumorwachstum vermittelt [109]. Wie im Metastasemodell führte die Defizienz für IL-17C in dem in dieser Arbeit verwendeten Kras-Modell zu einer verminderten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Tumormikroumgebung. Nach einem Beobachtungszeitraum von vier bis zwölf Wochen zeigte sich die entzündungsinduzierte Tumorpheriferation in *Il-17c* defizienten Mäusen vermindert.

Für das Zytokin IL-17A konnte bereits beschrieben werden, dass das Wachstum Kras-induzierter Tumore unabhängig einer NTHi vermittelten Inflammation gefördert wird [334]. Es wurden IL-17A produzierende CD4 T Zellen identifiziert, welche an chronischer Inflammation in der Tumormikroumgebung beteiligt sind. Eine Defizienz von *Il-17a* in einem Kras-induzierten Tumormodell verringerte neben der Proliferation der Tumorzellen auch die Angiogenese und die Produktion proinflammatorischer Mediatoren [334]. In dieser Arbeit konnte bei einer Defizienz von *Il-17c* bei Abwesenheit NTHi-induzierter Entzündung kein verringertes Tumorwachstum und keine Beeinflussung der intrinsischen Inflammation während der Beobachtungszeit von zwölf Wochen erkannt werden. Dies liegt wahrscheinlich an der geringen Expression von IL-17C in Lungen von unbehandelten Mäusen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass IL-17C-vermittelte Entzündung ein krankhaftes Mikrobiota mit einem gesteigerten Tumorwachstum verbindet [109].

4.2.2 IL-17C reguliert die Expression tumorfördernder Entzündungsmediatoren

Abseits der zellrekrutierenden Eigenschaften konnte in dieser Arbeit ein Einfluss von IL-17C auf die Expression tumorfördernder Zytokine wie IL-6 und CCL5 nachgewiesen werden. Die Expression von IL-17A wurde hingegen von der Defizienz für IL-17C nicht beeinflusst. Studien zeigten, dass IL-6 das Tumorwachstum in Kras-induzierten Lungentumoren sowohl unabhängig COPD-ähnlicher Inflammation als auch bei NTHi- und IL-17A-induzierter pulmonaler Entzündung fördert [249-251, 335-337].

Auch vorherige Studien beschrieben, dass IL-17C die Expression von IL-6 reguliert. So waren die Plasmakonzentrationen von IL-6 in einem murinen Pneumoniemodell mit *Pseudomonas aeruginosa* bei IL-17C defizienten Tieren vermindert [220]. Ebenfalls konnten in einem Niereninsuffizienzmodell neben verringerten Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β geringere Konzentrationen von IL-6 im Serum und Nierengewebe *Il-17c* defizienter Mäuse nachgewiesen werden, einhergehend mit verringerter Sterblichkeit und reduziertem Nierenschaden [338]. In einem viral induzierten Hepatitis-Modell konnte in Serumproben von *Il-17c* defizienten Mäusen eine geringere Konzentration proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-6, TNF- α und INF γ gemessen werden.

Die Rolle von IL-17C wurde auch in weiteren präklinischen Krankheitsmodellen untersucht. So zeigten IL-17C defiziente Mäuse in einem Glomerulonephritis-Modell einen verminderten Nierenschaden was mit einer reduzierten Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und verminderten Rekrutierung von Entzündungszellen einherging [339]. Im murinen Psoriasis-Modell führte die Antikörper-vermittelte Blockade von IL-17C zu einer verminderten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das entzündete Gewebe und zu einer verminderten Expression inflammatorischer Zytokine [340]. Im Imiquimod-Modell führte die Defizienz für IL-17C zu einer verminderten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und zu einer verminderten Proliferation von Keratinozyten [233]. In Verbindung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass IL-17C über die Regulation tumorfördernder Zytokine wie IL-6 und CCL5 und die Rekrutierung von Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten die Tumorproliferation fördert.

Verschiedene Studien zeigten, dass IL-17 Zytokine synergistisch mit anderen Stimuli wie Liganden für TLRs die Bildung von Zytokinen vermittelt. Dies geschieht über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, MAP-Kinasen und Stabilisierung von mRNS [341]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten nach Stimulation mit NTHi eine IL-17C abhängige gesteigerte Infiltration Erk-positiver Zellen in die Tumoraläsionen und in das Lungenparenchym der Mäuse belegen. In weiteren *in vitro* Studien konnte eine direkte

Aktivierung der MAP Kinase Erk1/2 in humanen und murinen Tumorzelllinien als auch in primären humanen Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden, wie es auch bereits für Darmepithelzellen gezeigt wurde [223]. IL-17C scheint daher in den in dieser Arbeit verwendeten Modellen die Expression der inflammatorischen Zytokine unter anderem über MAP-Kinase Signalwege zu regulieren. Es ist allerdings auch denkbar, dass IL-17C die Tumorproliferation direkt über die Aktivierung von ERK1/2 vorantreibt [342].

4.2.3 Die IL-17C vermittelte Entzündung verringert das Ansprechen auf die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die Ablation von IL-17C auf die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints und auf die tumorassoziierte Entzündung und Tumorprogression auswirkt. Hierzu wurde WT und IL-17C defizienten Mäusen wie in den COPD-Modellen während der NTHi-Expositionsphase ein gegen PD-1 gerichteter therapeutischer Antikörper verabreicht. Nach einer vierwöchigen Beobachtungszeit konnte festgestellt werden, dass es in IL-17C defizienten Mäusen durch die Gabe des therapeutischen PD-1 Antikörpers zu einem geringeren Tumorwachstum kam. Dies ging mit signifikant verminderten Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, CCL5 und TNF- α in der Lunge einher.

Wie bereits erwähnt, scheint die COPD mit einer Erschöpfung von CD8 Zellen in Verbindung zu stehen. Zudem zeigten Studien, dass der PD-1 Signalweg bei Lungenkrebspatienten mit einer koexistierenden COPD aktiviert ist [211-213]. Daher wird vorgeschlagen, dass COPD-assoziierte Entzündung das Ansprechen von Lungenkrebspatienten auf eine PD-1/PD-L1-Behandlung begünstigt [211, 212]. Erste klinische Studien deuten darauf hin, dass Lungenkrebspatienten mit einer koexistierenden COPD sich für Therapien, die die PD-1/PD-L1-Achse blockieren, qualifizieren [211, 212]. In dem in dieser Arbeit verwendeten COPD-Modell hatte Defizienz für IL-17C keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von PD-1 in CD8 Lymphozyten und die Membranexpression von PD-L1 in myeloiden Zellen, sie führte aber zu einem verbesserten Ansprechen auf die PD-1-Therapie. Die IL-17C-vermittelte Expression tumorfördernder Zytokine wie IL-6 und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten scheint daher die Sensitivität gegenüber der Blockade von PD-1 zu vermindern. Diese Hypothese wird von aktuellen präklinischen Studien unterstützt. So verstärkte die zielgerichtete Inhibierung von IL-6 die Wirkung einer anti-PD-1 Therapie in murinen Modellen von Bauchspeicheldrüsen- und Hautkrebs [343, 344]. Darüber hinaus zeigten Akbay, E. A. et al., dass IL-17A, das den IL-17 Rezeptor IL-17RA mit IL-17C teilt, die Wirkung der Blockade

des PD-1-Immun-Checkpoints in Kras-Mäusen, die ein konditionales Allel für IL-17A exprimieren, mindert [249]. Die Autoren konnten zeigen, dass erzwungene Expression von IL-17A über IL-6 und tumorassoziierte neutrophile Granulozyten zum Tumorwachstum führt. Studien zeigten auch, dass neutrophile Granulozyten über die Suppression von T Zellen Immunantworten, die sich gegen Tumorwachstum richten, hemmen. Dies geschieht über unterschiedliche Mechanismen, wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder Arginase [345, 346]. Negative Effekte auf Immuntherapien konnten auch für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 identifiziert werden. Vahl et al. konnten zeigen, dass die Expression von IL-10 und dessen Rezeptor IL-10R in der Lunge mit der Tumorgroße korreliert und das Ansprechen auf eine PD-1-Immuntherapie erschwert (Vahl, Friedrich et al. 2017). In den Versuchen mit vierwöchiger Exposition zu NTHi lagen die Konzentrationen von IL-10 unter dem Detektionslimit. Dennoch könnten zu früheren Zeitpunkten positive Effekte einer IL-17c Defizienz auf die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 zu einer gesteigerten Effektivität der PD-1 Blockade führen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen nahe, dass COPD-ähnliche Entzündung zu einem Tumormikromilieu beiträgt, dass ein Ansprechen auf eine PD-1-Immuntherapie begünstigt. Auf der anderen Seite kommt es durch die Inflammation zu einer gesteigerten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17C und IL-6, welche wiederum Tumorwachstum antreiben und einer PD-1-Monotherapie entgegenwirken können. Bereits etablierte Kombinationstherapien bzw. Wechseltherapien aus verschiedenen Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie PD-1 und CTLA-4 legen zwar eine gesteigerte Effektivität nahe, doch zeigten diese ebenfalls gesteigerte toxische Effekte [322, 347-350]. Denkbar ist, dass eine Kombination einer PD-1-Immuntherapie mit einer Blockade weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-17C und IL-6 positive Effekte aufweisen könnte, welche bei bisherigen Kombinationstherapien noch zu starken Komplikationen führen. Weiterführende Studien müssen zeigen, inwiefern sich innovative Kombinationstherapien für die Behandlung von Lungenkrebs eignen.

5. Literaturverzeichnis

1. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
2. Quaderi, S.A. and J.R. Hurst, *The unmet global burden of COPD*. Glob Health Epidemiol Genom, 2018. **3**: p. e4.
3. Jansson, S.-A., et al., *Costs of COPD in Sweden According to Disease Severity*. CHEST, 2002. **122**(6): p. 1994-2002.
4. Gibson, G.J., et al., *Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book*. Eur Respir J, 2013. **42**(3): p. 559-63.
5. Iheanacho, I., et al., *Economic Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Systematic Literature Review*. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020. **15**: p. 439-460.
6. Anees ur, R., et al., *The economic burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in the USA, Europe, and Asia: results from a systematic review of the literature*. Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research, 2019: p. 1-12.
7. Hogg, J.C., *Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 709-21.
8. Rabe, K.F., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(6): p. 532-55.
9. Celli, B.R., et al., *Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Med, 2005. **118**(12): p. 1364-72.
10. Behrendt, C.E., *Mild and moderate-to-severe COPD in nonsmokers: distinct demographic profiles*. Chest, 2005. **128**(3): p. 1239-44.
11. Balmes, J., et al., *American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(5): p. 787-97.
12. Eisner, M.D., et al., *An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(5): p. 693-718.
13. Paulin, L.M., et al., *Occupational exposures are associated with worse morbidity in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(5): p. 557-65.
14. Orozco-Levi, M., et al., *Wood smoke exposure and risk of chronic obstructive pulmonary disease*. Eur Respir J, 2006. **27**(3): p. 542-6.
15. Assad, N.A., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease secondary to household air pollution*. Semin Respir Crit Care Med, 2015. **36**(3): p. 408-21.
16. Zhou, Y., et al., *Lung function and incidence of chronic obstructive pulmonary disease after improved cooking fuels and kitchen ventilation: a 9-year prospective cohort study*. PLoS Med, 2014. **11**(3): p. e1001621.
17. Sana, A., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass fuel use in women: a systematic review and meta-analysis*. BMJ Open Respir Res, 2018. **5**(1): p. e000246.
18. Stoller, J.K. and L.S. Aboussouan, *Alpha1-antitrypsin deficiency*. Lancet, 2005. **365**(9478): p. 2225-36.
19. Blanco, I., et al., *Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries*. Eur Respir J, 2006. **27**(1): p. 77-84.
20. DeMeo, D.L. and E.K. Silverman, *Alpha1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk*. Thorax, 2004. **59**(3): p. 259-64.

21. Ferrarotti, I., et al., *Update on $\alpha(1)$ -antitrypsin deficiency*. *Breathe* (Sheff), 2018. **14**(2): p. e17-e24.
22. Barnes, P.J., *Endo-phenotyping of COPD patients*. *Expert Rev Respir Med*, 2020: p. 1-11.
23. Miravittles, M., et al., *European Respiratory Society statement: diagnosis and treatment of pulmonary disease in $\alpha(1)$ -antitrypsin deficiency*. *Eur Respir J*, 2017. **50**(5).
24. Rahaghi, F.F. and M. Miravittles, *Long-term clinical outcomes following treatment with alpha 1-proteinase inhibitor for COPD associated with alpha-1 antitrypsin deficiency: a look at the evidence*. *Respir Res*, 2017. **18**(1): p. 105.
25. Hogg, J.C., et al., *The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(26): p. 2645-53.
26. Simani, A.S., S. AS, and H. JC, *Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke*. 1974.
27. Hulbert, W.C., et al., *Airway permeability to horseradish peroxidase in guinea pigs: the repair phase after injury by cigarette smoke*. *American Review of Respiratory Disease*, 1981. **123**(3): p. 320-326.
28. Jones, J., et al., *Increased alveolar epithelial permeability in cigarette smokers*. *The Lancet*, 1980. **315**(8159): p. 66-68.
29. Barnes, P.J., *Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 2016. **138**(1): p. 16-27.
30. Hogg, J.C. and W. Timens, *The pathology of chronic obstructive pulmonary disease*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 435-59.
31. Diab, N., et al., *Underdiagnosis and Overdiagnosis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018. **198**(9): p. 1130-1139.
32. van Durme, Y., et al., *Prevalence, incidence, and lifetime risk for the development of COPD in the elderly: the Rotterdam study*. *Chest*, 2009. **135**(2): p. 368-377.
33. Pauwels, R., et al., *The GOLD Scientific Committee: NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. **163**: p. 1256-1276.
34. Pauwels, R.A., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary*. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2001. **163**(5): p. 1256-1276.
35. Aaron, S.D., et al., *Diagnostic Instability and Reversals of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Diagnosis in Individuals with Mild to Moderate Airflow Obstruction*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017. **196**(3): p. 306-314.
36. Bhatt, S.P., et al., *Comparison of spirometric thresholds in diagnosing smoking-related airflow obstruction*. *Thorax*, 2014. **69**(5): p. 410-415.
37. Vollmer, W.M., et al., *Comparison of spirometry criteria for the diagnosis of COPD: results from the BOLD study*. *Eur Respir J*, 2009. **34**(3): p. 588-97.
38. Hogg, J.C., P.T. Macklem, and W. Thurlbeck, *Site and nature of airway obstruction in chronic obstructive lung disease*. *New England Journal of Medicine*, 1968. **278**(25): p. 1355-1360.
39. Van Brabant, H., et al., *Partitioning of pulmonary impedance in excised human and canine lungs*. *Journal of Applied Physiology*, 1983. **55**(6): p. 1733-1742.
40. Yanai, M., et al., *Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure*. *Journal of Applied Physiology*, 1992. **72**(3): p. 1016-1023.
41. Jones, P.W., et al., *Development and first validation of the COPD Assessment Test*. *European Respiratory Journal*, 2009. **34**(3): p. 648-654.
42. Sheikh, K., H.O. Coxson, and G. Parraga, *This is what COPD looks like*. *Respirology*, 2016. **21**(2): p. 224-36.

43. Kirby, M., et al., *Management of COPD: Is there a role for quantitative imaging?* Eur J Radiol, 2017. **86**: p. 335-342.
44. Chung, K.F. and I.M. Adcock, *Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction.* Eur Respir J, 2008. **31**(6): p. 1334-56.
45. Brusselle, G.G., G.F. Joos, and K.R. Bracke, *New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease.* Lancet, 2011. **378**(9795): p. 1015-26.
46. Barnes, P.J., *Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(3): p. 183-192.
47. Suissa, S., S. Dell'Aniello, and P. Ernst, *Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality.* Thorax, 2012. **67**(11): p. 957-63.
48. Gamble, E., et al., *Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: a pooled analysis.* Eur Respir J, 2007. **30**(3): p. 467-71.
49. Russell, R.E., et al., *Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(4): p. L867-73.
50. Meshi, B., et al., *Emphysematous lung destruction by cigarette smoke. The effects of latent adenoviral infection on the lung inflammatory response.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(1): p. 52-7.
51. Berenson, C.S., et al., *Impaired phagocytosis of nontypeable Haemophilus influenzae by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease.* J Infect Dis, 2006. **194**(10): p. 1375-84.
52. Berenson, C.S., et al., *Phagocytic dysfunction of human alveolar macrophages and severity of chronic obstructive pulmonary disease.* J Infect Dis, 2013. **208**(12): p. 2036-45.
53. Taylor, A.E., et al., *Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD.* Eur Respir J, 2010. **35**(5): p. 1039-47.
54. Tudor, R.M. and I. Petrache, *Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.* J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2749-55.
55. Aaron, S.D., et al., *Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 349-55.
56. Stämpfli, M.R. and G.P. Anderson, *How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 377-84.
57. Abboud, R.T. and S. Vimalanathan, *Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema.* Int J Tuberc Lung Dis, 2008. **12**(4): p. 361-7.
58. Hiemstra, P.S., *Altered macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease.* Ann Am Thorac Soc, 2013. **10 Suppl**: p. S180-5.
59. Brusselle, G.G., et al., *Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful?* Eur Respir J, 2009. **34**(1): p. 219-30.
60. Cosio, M.G., M. Saetta, and A. Agusti, *Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med, 2009. **360**(23): p. 2445-54.
61. Barnes, P.J., *Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond the lungs.* PLoS Med, 2010. **7**(3): p. e1000220.
62. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019.* CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
63. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.* CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.

64. Ettinger, D.S., et al., *Non-small cell lung cancer, version 2.2013*. J Natl Compr Canc Netw, 2013. **11**(6): p. 645-53; quiz 653.
65. Chen, Z., et al., *Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(8): p. 535-46.
66. Zappa, C. and S.A. Mousa, *Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances*. Transl Lung Cancer Res, 2016. **5**(3): p. 288-300.
67. Sher, T., G.K. Dy, and A.A. Adjei, *Small cell lung cancer*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(3): p. 355-67.
68. Pawel, D.J. and J.S. Puskin, *The U.S. Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon*. Health Phys, 2004. **87**(1): p. 68-74.
69. Neuberger, J.S. and R.W. Field, *Occupation and lung cancer in nonsmokers*. Rev Environ Health, 2003. **18**(4): p. 251-67.
70. Doll, R. and R. Peto, *The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today*. J Natl Cancer Inst, 1981. **66**(6): p. 1191-308.
71. McErlean, A. and M.S. Ginsberg, *Epidemiology of lung cancer*. Semin Roentgenol, 2011. **46**(3): p. 173-7.
72. Boffetta, P., *Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence*. Mutat Res, 2006. **608**(2): p. 157-62.
73. Whitrow, M.J., et al., *Environmental exposure to carcinogens causing lung cancer: epidemiological evidence from the medical literature*. Respirology, 2003. **8**(4): p. 513-21.
74. Hoffmann, D., I. Hoffmann, and K. El-Bayoumy, *The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder*. Chem Res Toxicol, 2001. **14**(7): p. 767-90.
75. Pfeifer, G.P., et al., *Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers*. Oncogene, 2002. **21**(48): p. 7435-51.
76. Zhou, Z., P. Chen, and H. Peng, *Are healthy smokers really healthy?* Tob Induc Dis, 2016. **14**: p. 35.
77. Zong, D., et al., *The role of cigarette smoke-induced epigenetic alterations in inflammation*. Epigenetics Chromatin, 2019. **12**(1): p. 65.
78. Stellman, S.D., et al., *Smoking and lung cancer risk in American and Japanese men: an international case-control study*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(11): p. 1193-9.
79. *Tobacco smoke and involuntary smoking*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2004. **83**: p. 1-1438.
80. Sato, M., et al., *A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer*. J Thorac Oncol, 2007. **2**(4): p. 327-43.
81. Rodenhuis, S., et al., *Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung*. N Engl J Med, 1987. **317**(15): p. 929-35.
82. Jordan, E.J., et al., *Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies*. Cancer Discov, 2017. **7**(6): p. 596-609.
83. Spella, M., et al., *Club cells form lung adenocarcinomas and maintain the alveoli of adult mice*. Elife, 2019. **8**.
84. Buttitta, F., et al., *Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features*. Int J Cancer, 2006. **119**(11): p. 2586-91.
85. Suzuki, M., et al., *Exclusive mutation in epidermal growth factor receptor gene, HER-2, and KRAS, and synchronous methylation of nonsmall cell lung cancer*. Cancer, 2006. **106**(10): p. 2200-7.

86. Dogan, S., et al., *Molecular Epidemiology of *EGFR* and *KRAS* Mutations in 3,026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-Related *KRAS*-Mutant Cancers*. *Clinical Cancer Research*, 2012. **18**(22): p. 6169-6177.
87. Osta, B.E.E., et al., *Characteristics and outcomes of patients (pts) with metastatic KRAS mutant lung adenocarcinomas: Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC) database*. *Journal of Clinical Oncology*, 2017. **35**(15_suppl): p. 9021-9021.
88. Dearden, S., et al., *Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap)*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(9): p. 2371-6.
89. Yoshizawa, A., et al., *Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients*. *J Thorac Oncol*, 2013. **8**(1): p. 52-61.
90. *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. *Nature*, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
91. Barbacid, M., *ras genes*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 779-827.
92. Malumbres, M. and M. Barbacid, *RAS oncogenes: the first 30 years*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 459-65.
93. Tuveson, D.A., et al., *Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects*. *Cancer Cell*, 2004. **5**(4): p. 375-87.
94. Zhu, Z., H.G. Golay, and D.A. Barbie, *Targeting pathways downstream of KRAS in lung adenocarcinoma*. *Pharmacogenomics*, 2014. **15**(11): p. 1507-18.
95. Haigis, K.M., *KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail*. *Trends Cancer*, 2017. **3**(10): p. 686-697.
96. Mascaux, C., et al., *The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(1): p. 131-9.
97. Johnson, M.L., et al., *Association of KRAS and EGFR mutations with survival in patients with advanced lung adenocarcinomas*. *Cancer*, 2013. **119**(2): p. 356-62.
98. Marabese, M., et al., *KRAS mutations affect prognosis of non-small-cell lung cancer patients treated with first-line platinum containing chemotherapy*. *Oncotarget*, 2015. **6**(32): p. 34014-22.
99. Adcock, I.M., G. Caramori, and P.J. Barnes, *Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: new molecular insights*. *Respiration*, 2011. **81**(4): p. 265-84.
100. Young, R.P., et al., *COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history*. *Eur Respir J*, 2009. **34**(2): p. 380-6.
101. Zulueta, J.J., et al., *Emphysema scores predict death from COPD and lung cancer*. *Chest*, 2012. **141**(5): p. 1216-1223.
102. Tockman, M.S., et al., *Airways obstruction and the risk for lung cancer*. *Ann Intern Med*, 1987. **106**(4): p. 512-8.
103. Skillrud, D.M., K.P. Offord, and R.D. Miller, *Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study*. *Ann Intern Med*, 1986. **105**(4): p. 503-7.
104. Sherman, C.B., *Health effects of cigarette smoking*. *Clin Chest Med*, 1991. **12**(4): p. 643-58.
105. Mayne, S.T., J. Buenconsejo, and D.T. Janerich, *Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers*. *Am J Epidemiol*, 1999. **149**(1): p. 13-20.
106. de Torres, J.P., et al., *Assessing the relationship between lung cancer risk and emphysema detected on low-dose CT of the chest*. *Chest*, 2007. **132**(6): p. 1932-8.

107. Lundback, B., et al., *Not 15 but 50% of smokers develop COPD?--Report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies*. *Respir Med*, 2003. **97**(2): p. 115-22.
108. Ghorani, V., et al., *Experimental animal models for COPD: a methodological review*. *Tobacco Induced Diseases*, 2017. **15**(1): p. 25.
109. Jungnickel, C., et al., *IL-17C mediates the recruitment of tumor-associated neutrophils and lung tumor growth*. *Oncogene*, 2017. **36**(29): p. 4182-4190.
110. De la Garza, M.M., et al., *COPD-Type lung inflammation promotes K-ras mutant lung cancer through epithelial HIF-1 α mediated tumor angiogenesis and proliferation*. *Oncotarget*, 2018. **9**(68): p. 32972-32983.
111. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
112. Bremnes, R.M., et al., *The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2011. **6**(4): p. 824-33.
113. Lu, H., W. Ouyang, and C. Huang, *Inflammation, a key event in cancer development*. *Mol Cancer Res*, 2006. **4**(4): p. 221-33.
114. Schottenfeld, D. and J. Beebe-Dimmer, *Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia*. *CA Cancer J Clin*, 2006. **56**(2): p. 69-83.
115. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
116. Shalapour, S. and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(9): p. 3347-55.
117. Alderton, G., *Chronic inflammation as a cancer driver*. *Science*, 2019. **365**(6449): p. 135-137.
118. Murata, M., *Inflammation and cancer*. *Environ Health Prev Med*, 2018. **23**(1): p. 50.
119. Blaser, M.J., P.H. Chyou, and A. Nomura, *Age at establishment of Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk*. *Cancer Res*, 1995. **55**(3): p. 562-5.
120. Scholl, S.M., et al., *Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis*. *J Natl Cancer Inst*, 1994. **86**(2): p. 120-6.
121. Shacter, E. and S.A. Weitzman, *Chronic inflammation and cancer*. *Oncology (Williston Park)*, 2002. **16**(2): p. 217-26, 229; discussion 230-2.
122. Kuper, H., H.O. Adami, and D. Trichopoulos, *Infections as a major preventable cause of human cancer*. *J Intern Med*, 2000. **248**(3): p. 171-83.
123. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
124. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 239-52.
125. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 309-22.
126. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
127. Hold, G.L. and E.M. El-Omar, *Genetic aspects of inflammation and cancer*. *Biochem J*, 2008. **410**(2): p. 225-35.
128. Mantovani, A., C. Garlanda, and P. Allavena, *Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation*. *Ann Med*, 2010. **42**(3): p. 161-70.
129. Zheng, X., Y. Hu, and C. Yao, *The paradoxical role of tumor-infiltrating immune cells in lung cancer*. *Intractable Rare Dis Res*, 2017. **6**(4): p. 234-241.

130. King, P.T., *Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and its role in cardiovascular disease and lung cancer*. Clin Transl Med, 2015. **4**(1): p. 68.
131. Wu, L., et al., *Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro*. Cancers (Basel), 2019. **11**(4).
132. Gong, L., et al., *Promoting effect of neutrophils on lung tumorigenesis is mediated by CXCR2 and neutrophil elastase*. Mol Cancer, 2013. **12**(1): p. 154.
133. Kargl, J., et al., *Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14381.
134. Teixido, C. and R. Rosell, *Neutrophils dominate the immune landscape of non-small cell lung cancer*. J Thorac Dis, 2017. **9**(5): p. E468-e469.
135. Lievens, L.A., et al., *Tumor-associated macrophages in thoracic malignancies*. Lung Cancer, 2013. **80**(3): p. 256-62.
136. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
137. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
138. Escribese, M.M., M. Casas, and A.L. Corbí, *Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization*. Immunobiology, 2012. **217**(12): p. 1233-40.
139. Reynders, K. and D. De Ruyscher, *Tumor infiltrating lymphocytes in lung cancer: a new prognostic parameter*. J Thorac Dis, 2016. **8**(8): p. E833-5.
140. Pagès, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-1102.
141. Hendry, S., et al., *Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors*. Adv Anat Pathol, 2017. **24**(6): p. 311-335.
142. Stanton, S.E. and M.L. Disis, *Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer*. Journal for immunotherapy of cancer, 2016. **4**: p. 59-59.
143. Shaul, M.E., et al., *Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFβ modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs*. Oncoimmunology, 2016. **5**(11): p. e1232221.
144. Hagerling, C. and Z. Werb, *Neutrophils: Critical components in experimental animal models of cancer*. Semin Immunol, 2016. **28**(2): p. 197-204.
145. Sionov, R.V., Z.G. Fridlender, and Z. Granot, *The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment*. Cancer microenvironment, 2015. **8**(3): p. 125-158.
146. Swierczak, A., et al., *Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis*. Cancer and Metastasis Reviews, 2015. **34**(4): p. 735-751.
147. Liang, W. and N. Ferrara, *The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis*. Cancer Immunol Res, 2016. **4**(2): p. 83-91.
148. Eruslanov, E.B., et al., *Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer*. J Clin Invest, 2014. **124**(12): p. 5466-80.
149. Schmidt, H., et al., *Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model*. British journal of cancer, 2005. **93**(3): p. 273-278.
150. Bellocq, A., et al., *Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome*. The American journal of pathology, 1998. **152**(1): p. 83.

151. Atzpodien, J. and M. Reitz, *Peripheral blood neutrophils as independent immunologic predictor of response and long-term survival upon immunotherapy in metastatic renal-cell carcinoma*. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 2008. **23**(1): p. 129-134.
152. Tüting, T. and K.E. de Visser, *CANCER. How neutrophils promote metastasis*. Science, 2016. **352**(6282): p. 145-6.
153. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. Cancer Cell, 2009. **16**(3): p. 183-94.
154. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
155. Chen, D.S. and I. Mellman, *Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point*. Nature, 2017. **541**(7637): p. 321-330.
156. Wojas-Krawczyk, K., et al., *Beyond PD-L1 Markers for Lung Cancer Immunotherapy*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).
157. Topalian, S.L., et al., *Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(5): p. 275-87.
158. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
159. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.
160. Salmaninejad, A., et al., *PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy*. J Cell Physiol, 2019. **234**(10): p. 16824-16837.
161. Mizuno, R., et al., *PD-1 Primarily Targets TCR Signal in the Inhibition of Functional T Cell Activation*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 630.
162. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. Int Immunol, 2007. **19**(7): p. 813-24.
163. Nishimura, H., et al., *Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 773-80.
164. Chemnitz, J.M., et al., *SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 945-54.
165. Agata, Y., et al., *Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes*. Int Immunol, 1996. **8**(5): p. 765-72.
166. Vibhakar, R., et al., *Activation-induced expression of human programmed death-1 gene in T-lymphocytes*. Exp Cell Res, 1997. **232**(1): p. 25-8.
167. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
168. Sandner, S.E., et al., *Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3408-15.
169. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
170. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1365-9.
171. Ishida, M., et al., *Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues*. Immunol Lett, 2002. **84**(1): p. 57-62.
172. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 261-8.
173. Sjoblom, T., et al., *The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers*. Science, 2006. **314**(5797): p. 268-74.

174. He, J., et al., *Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13110.
175. Velcheti, V., et al., *Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer*. Lab Invest, 2014. **94**(1): p. 107-16.
176. Boland, J.M., et al., *Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung*. Clin Lung Cancer, 2013. **14**(2): p. 157-63.
177. Spranger, S., et al., *Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells*. Sci Transl Med, 2013. **5**(200): p. 200ra116.
178. Thompson, R.H., et al., *Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma*. Cancer, 2005. **104**(10): p. 2084-91.
179. Bernstein, M.B., et al., *Radiation-induced modulation of costimulatory and coinhibitory T-cell signaling molecules on human prostate carcinoma cells promotes productive antitumor immune interactions*. Cancer Biother Radiopharm, 2014. **29**(4): p. 153-61.
180. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
181. Taube, J.M., et al., *Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape*. Sci Transl Med, 2012. **4**(127): p. 127ra37.
182. Sznol, M. and L. Chen, *Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(5): p. 1021-34.
183. Kondo, A., et al., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce an immunoinhibitory molecule, B7-H1, via nuclear factor-kappaB activation in blasts in myelodysplastic syndromes*. Blood, 2010. **116**(7): p. 1124-31.
184. Forde, P.M., et al., *Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer*. N Engl J Med, 2018. **378**(21): p. 1976-1986.
185. Mu, C.Y., et al., *High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation*. Med Oncol, 2011. **28**(3): p. 682-8.
186. Gao, Q., et al., *Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(3): p. 971-9.
187. Rolfo, C., et al., *Immunotherapy in NSCLC: A Promising and Revolutionary Weapon*. Adv Exp Med Biol, 2017. **995**: p. 97-125.
188. Chiang, A.C. and R.S. Herbst, *Frontline immunotherapy for NSCLC - the tale of the tail*. Nat Rev Clin Oncol, 2020. **17**(2): p. 73-74.
189. Reck, M., et al., *Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(19): p. 1823-1833.
190. Grosso, J., et al., *Association of tumor PD-L1 expression and immune biomarkers with clinical activity in patients (pts) with advanced solid tumors treated with nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538)*. Journal of Clinical Oncology, 2013. **31**(15_suppl): p. 3016-3016.
191. Herbst, R.S., et al., *Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10027): p. 1540-1550.
192. Garon, E.B., et al., *Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(21): p. 2018-2028.
193. Beattie, J., et al., *The Immune Landscape of Non-Small-Cell Lung Cancer. Utility of Cytologic and Histologic Samples Obtained through Minimally Invasive Pulmonary Procedures*. Am J Respir Crit Care Med, 2018. **198**(1): p. 24-38.

194. Lievens, L.A., et al., *Checkpoint Blockade in Lung Cancer and Mesothelioma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017. **196**(3): p. 274-282.
195. Nishino, M., et al., *Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(11): p. 655-668.
196. Postow, M.A., R. Sidlow, and M.D. Hellmann, *Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(2): p. 158-168.
197. Michot, J.M., et al., *Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review*. *Eur J Cancer*, 2016. **54**: p. 139-148.
198. Fuentes-Antras, J., M. Provencio, and E. Diaz-Rubio, *Hyperprogression as a distinct outcome after immunotherapy*. *Cancer Treat Rev*, 2018. **70**: p. 16-21.
199. Borghaei, H., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(17): p. 1627-39.
200. Rittmeyer, A., et al., *Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial*. *Lancet*, 2017. **389**(10066): p. 255-265.
201. Rizvi, N.A., et al., *Safety and clinical activity of MEDI4736, an anti-programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) antibody, in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2015. **33**(15_suppl): p. 8032-8032.
202. Antonia, S.J., et al., *Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2017. **377**(20): p. 1919-1929.
203. Gandhi, L., et al., *Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(22): p. 2078-2092.
204. Paz-Ares, L., et al., *Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2018. **379**(21): p. 2040-2051.
205. Socinski, M.A., et al., *Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(24): p. 2288-2301.
206. Carbone, D.P., et al., *First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2017. **376**(25): p. 2415-2426.
207. Hellmann, M.D., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(22): p. 2093-2104.
208. Ramos-Casals, M., et al., *Immune-related adverse events of checkpoint inhibitors*. *Nature Reviews Disease Primers*, 2020. **6**(1): p. 38.
209. Rizvi, N.A., et al., *Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
210. Brahmer, J., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(2): p. 123-35.
211. Mark, N.M., et al., *Chronic Obstructive Pulmonary Disease Alters Immune Cell Composition and Immune Checkpoint Inhibitor Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018. **197**(3): p. 325-336.
212. Biton, J., et al., *Impaired Tumor-Infiltrating T Cells in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Impact Lung Cancer Response to PD-1 Blockade*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018. **198**(7): p. 928-940.
213. McKendry, R.T., et al., *Dysregulation of Antiviral Function of CD8(+) T Cells in the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Lung. Role of the PD-1-PD-L1 Axis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016. **193**(6): p. 642-51.
214. Speizer, F.E., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease mortality in six U.S. cities*. *Am Rev Respir Dis*, 1989. **140**(3 Pt 2): p. S49-55.
215. Lange, P., et al., *Ventilatory function and chronic mucus hypersecretion as predictors of death from lung cancer*. *Am Rev Respir Dis*, 1990. **141**(3): p. 613-7.

216. Staples, K.J. and T.M. Wilkinson, *Reply: The PD-1-PD-L1 Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **194**(5): p. 644-5.
217. Stoll, P., J.C. Virchow, and M. Lommatzsch, *The PD-1-PD-L1 Axis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **194**(5): p. 644.
218. Gu, C., L. Wu, and X. Li, *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling*. Cytokine, 2013. **64**(2): p. 477-85.
219. Li, H., et al., *Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 773-8.
220. Wolf, L., et al., *IL-17A-mediated expression of epithelial IL-17C promotes inflammation during acute Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **311**(5): p. L1015-11022.
221. Pfeifer, P., et al., *IL-17C is a mediator of respiratory epithelial innate immune response*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **48**(4): p. 415-21.
222. Kusagaya, H., et al., *Toll-like receptor-mediated airway IL-17C enhances epithelial host defense in an autocrine/paracrine manner*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(1): p. 30-9.
223. Song, X., et al., *IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens*. Nat Immunol, 2011. **12**(12): p. 1151-8.
224. Krohn, S., et al., *IL-17C/IL-17 Receptor E Signaling in CD4(+) T Cells Promotes TH17 Cell-Driven Glomerular Inflammation*. J Am Soc Nephrol, 2018. **29**(4): p. 1210-1222.
225. Wang, F., et al., *IL-17C has a pathogenic role in kidney ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2020.
226. Johansen, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha-mediated induction of interleukin 17C in human keratinocytes is controlled by nuclear factor kappaB*. J Biol Chem, 2011. **286**(29): p. 25487-94.
227. Al-Samadi, A., et al., *IL-17C and its receptor IL-17RA/IL-17RE identify human oral epithelial cell as an inflammatory cell in recurrent aphthous ulcer*. J Oral Pathol Med, 2014. **43**(2): p. 117-24.
228. Peng, T., et al., *Keratinocytes produce IL-17c to protect peripheral nervous systems during human HSV-2 reactivation*. J Exp Med, 2017. **214**(8): p. 2315-2329.
229. Johansen, C., et al., *Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin*. Br J Dermatol, 2009. **160**(2): p. 319-24.
230. Johansen, C., et al., *Preferential inhibition of the mRNA expression of p38 mitogen-activated protein kinase regulated cytokines in psoriatic skin by anti-TNFalpha therapy*. Br J Dermatol, 2010. **163**(6): p. 1194-204.
231. Butcher, M.J., T.C. Waseem, and E.V. Galkina, *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, 2016. **36**(8): p. 1496-506.
232. Chang, S.H., et al., *Interleukin-17C promotes Th17 cell responses and autoimmune disease via interleukin-17 receptor E*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 611-21.
233. Ramirez-Carrozzi, V., et al., *IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner*. Nat Immunol, 2011. **12**(12): p. 1159-66.
234. Novatchkova, M., et al., *The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(5): p. 226-9.
235. Song, X., et al., *Alterations in the microbiota drive interleukin-17C production from intestinal epithelial cells to promote tumorigenesis*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 140-52.
236. Trautwein-Weidner, K., et al., *IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils*. Mucosal Immunol, 2015. **8**(2): p. 221-31.
237. Johnson, L., et al., *Somatic activation of the K-ras oncogene causes early onset lung cancer in mice*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1111-1116.

238. Voss, M., et al., *Il-17A contributes to maintenance of pulmonary homeostasis in a murine model of cigarette smoke-induced emphysema*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **309**(2): p. L188-95.
239. Scherle, W., *A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology*. Mikroskopie, 1970. **26**(1): p. 57-60.
240. Hsia, C.C., et al., *An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(4): p. 394-418.
241. Nyengaard, J.R. and H.J.G. Gundersen, *Sampling for stereology in lungs*. European Respiratory Review, 2006. **15**(101): p. 107-114.
242. Fehrenbach, H., *Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective*. European Respiratory Review, 2006. **15**(101): p. 136-147.
243. Bajwa, R., et al., *Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors (Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study*. J Clin Med Res, 2019. **11**(4): p. 225-236.
244. Raviv, S., et al., *Lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease: enhancing surgical options and outcomes*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **183**(9): p. 1138-46.
245. Sethi, S., *Infection as a comorbidity of COPD*. Eur Respir J, 2010. **35**(6): p. 1209-15.
246. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(2): p. 336-63.
247. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2008. **359**(22): p. 2355-65.
248. Crusz, S.M. and F.R. Balkwill, *Inflammation and cancer: advances and new agents*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(10): p. 584-96.
249. Akbay, E.A., et al., *Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(8): p. 1268-1279.
250. Caetano, M.S., et al., *IL6 Blockade Reprograms the Lung Tumor Microenvironment to Limit the Development and Progression of K-ras-Mutant Lung Cancer*. Cancer Res, 2016. **76**(11): p. 3189-99.
251. Brooks, G.D., et al., *IL6 Trans-signaling Promotes KRAS-Driven Lung Carcinogenesis*. Cancer Res, 2016. **76**(4): p. 866-76.
252. Bekes, E.M., et al., *Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation*. Am J Pathol, 2011. **179**(3): p. 1455-70.
253. Lee, P.Y., et al., *Ly6 family proteins in neutrophil biology*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(4): p. 585-94.
254. Amatya, N., A.V. Garg, and S.L. Gaffen, *IL-17 Signaling: The Yin and the Yang*. Trends Immunol, 2017. **38**(5): p. 310-322.
255. Vicent, S., et al., *ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours*. Br J Cancer, 2004. **90**(5): p. 1047-52.
256. Akbay, E.A., et al., *Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors*. Cancer Discov, 2013. **3**(12): p. 1355-63.
257. Herter-Sprue, G.S., et al., *Synergy of radiotherapy and PD-1 blockade in Kras-mutant lung cancer*. JCI Insight, 2016. **1**(9): p. e87415.
258. Lee, J., et al., *Reinvigorating Exhausted T Cells by Blockade of the PD-1 Pathway*. For Immunopathol Dis Therap, 2015. **6**(1-2): p. 7-17.
259. Durham, A.L. and I.M. Adcock, *The relationship between COPD and lung cancer*. Lung Cancer, 2015. **90**(2): p. 121-7.

260. Azoury, S.C., D.M. Straughan, and V. Shukla, *Immune Checkpoint Inhibitors for Cancer Therapy: Clinical Efficacy and Safety*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015. **15**(6): p. 452-62.
261. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 252-64.
262. Kalathil, S.G., et al., *T-regulatory cells and programmed death 1+ T cells contribute to effector T-cell dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. **190**(1): p. 40-50.
263. Stoll, P., et al., *Imbalance of dendritic cell co-stimulation in COPD*. *Respir Res*, 2015. **16**: p. 19.
264. Hikita, A., et al., *Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor-alpha*. *Biochem Cell Biol*, 2009. **87**(4): p. 581-93.
265. Zhang, G., et al., *Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum*. *Immunology*, 2008. **123**(4): p. 538-46.
266. Jeannin, P., et al., *Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes*. *Immunity*, 2000. **13**(3): p. 303-12.
267. Oaks, M.K. and K.M. Hallett, *Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease*. *J Immunol*, 2000. **164**(10): p. 5015-8.
268. Nagato, T., et al., *Programmed death-ligand 1 and its soluble form are highly expressed in nasal natural killer/T-cell lymphoma: a potential rationale for immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2017. **66**(7): p. 877-890.
269. Sorensen, S.F., et al., *Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib*. *Lung Cancer*, 2016. **100**: p. 77-84.
270. Wang, L., et al., *Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma*. *Oncotarget*, 2015. **6**(38): p. 41228-36.
271. Zhu, X. and J. Lang, *Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(57): p. 97671-97682.
272. Zou, W., J.D. Wolchok, and L. Chen, *PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations*. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(328): p. 328rv4.
273. D'Hulst A, I., et al., *Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice*. *Eur Respir J*, 2005. **26**(2): p. 204-13.
274. John, G., et al., *The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models*. *Clin Sci (Lond)*, 2014. **126**(3): p. 207-21.
275. Stevenson, C.S., et al., *Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **293**(5): p. L1183-93.
276. Seimetz, M., et al., *Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice*. *Cell*, 2011. **147**(2): p. 293-305.
277. Devos, F.C., et al., *Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases*. *Respir Res*, 2017. **18**(1): p. 123.
278. Moghaddam, S.J., et al., *Nontypeable Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer*. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2011. **6**: p. 113-23.
279. Kobayashi, S., et al., *A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013. **49**(6): p. 971-7.

280. Lee, S.Y., et al., *Establishment of a chronic obstructive pulmonary disease mouse model based on the elapsed time after LPS intranasal instillation*. Lab Anim Res, 2018. **34**(1): p. 1-10.
281. Gordon, S.R., et al., *PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity*. Nature, 2017. **545**(7655): p. 495-499.
282. Fife, B.T. and K.E. Pauken, *The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1217**: p. 45-59.
283. Celada, L.J., et al., *PD-1 up-regulation on CD4(+) T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF-beta1 production*. Sci Transl Med, 2018. **10**(460).
284. Zhang, J. and C. Bai, *The Significance of Serum Interleukin-8 in Acute Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Tanaffos, 2018. **17**(1): p. 13-21.
285. Beeh, K.M., et al., *Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4*. Chest, 2003. **123**(4): p. 1240-7.
286. Henrot, P., et al., *Chemokines in COPD: From Implication to Therapeutic Use*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(11).
287. Tiwari, N., et al., *p53- and PAI-1-mediated induction of C-X-C chemokines and CXCR2: importance in pulmonary inflammation due to cigarette smoke exposure*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016. **310**(6): p. L496-506.
288. Kapellos, T.S., et al., *Dysregulated Functions of Lung Macrophage Populations in COPD*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 2349045.
289. Yun, J.H., P.M. Henson, and R.M. Tuder, *Phagocytic clearance of apoptotic cells: role in lung disease*. Expert Rev Respir Med, 2008. **2**(6): p. 753-65.
290. Yamasaki, K. and S.F.V. Eeden, *Lung Macrophage Phenotypes and Functional Responses: Role in the Pathogenesis of COPD*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).
291. McCubbrey, A.L. and J.L. Curtis, *Efferocytosis and lung disease*. Chest, 2013. **143**(6): p. 1750-1757.
292. Shen, L., et al., *PD-1/PD-L pathway inhibits M.tb-specific CD4(+) T-cell functions and phagocytosis of macrophages in active tuberculosis*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38362.
293. Wang, D.Y., et al., *Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA Oncol, 2018. **4**(12): p. 1721-1728.
294. Kobayashi, T., K. Takahashi, and S. Terai, *A Case of Enteritis Induced by Nivolumab*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2019. **17**(6): p. A31-a32.
295. Yasuda, K., et al., *Intestinal perforation after nivolumab immunotherapy for a malignant melanoma: a case report*. Surg Case Rep, 2017. **3**(1): p. 94.
296. Iyoda, T., et al., *Resolution of Infliximab-Refractory Nivolumab-Induced Acute Severe Enterocolitis After Cyclosporine Treatment in a Patient with Non-Small Cell Lung Cancer*. Am J Case Rep, 2018. **19**: p. 360-364.
297. Kubo, K., M. Kato, and K. Mabe, *Nivolumab-Associated Colitis Mimicking Ulcerative Colitis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2017. **15**(9): p. A35-a36.
298. Zeng, M.F., et al., *Primary hypothyroidism and isolated ACTH deficiency induced by nivolumab therapy: Case report and review*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(44): p. e8426.
299. Okano, Y., et al., *Nivolumab-induced hypophysitis in a patient with advanced malignant melanoma*. Endocr J, 2016. **63**(10): p. 905-912.
300. Takaya, K., et al., *Isolated Adrenocorticotrophic Hormone Deficiency Caused by Nivolumab in a Patient with Metastatic Lung Cancer*. Intern Med, 2017. **56**(18): p. 2463-2469.
301. Seki, T., et al., *Secondary Adrenal Insufficiency Following Nivolumab Therapy in a Patient with Metastatic Renal Cell Carcinoma*. Tokai J Exp Clin Med, 2017. **42**(3): p. 115-120.

302. Lowe, J.R., et al., *Genetic risk analysis of a patient with fulminant autoimmune type 1 diabetes mellitus secondary to combination ipilimumab and nivolumab immunotherapy*. J Immunother Cancer, 2016. **4**: p. 89.
303. Hansen, E., D. Sahasrabudhe, and L. Sievert, *A case report of insulin-dependent diabetes as immune-related toxicity of pembrolizumab: presentation, management and outcome*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(6): p. 765-7.
304. Matson, D.R., et al., *Fatal Myocarditis Following Treatment with the PD-1 Inhibitor Nivolumab*. J Forensic Sci, 2018. **63**(3): p. 954-957.
305. Johnson, D.B., et al., *Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade*. N Engl J Med, 2016. **375**(18): p. 1749-1755.
306. Semper, H., et al., *Drug-induced myocarditis after nivolumab treatment in a patient with PDL1- negative squamous cell carcinoma of the lung*. Lung Cancer, 2016. **99**: p. 117-9.
307. Heinzerling, L., et al., *Cardiotoxicity associated with CTLA4 and PD1 blocking immunotherapy*. J Immunother Cancer, 2016. **4**: p. 50.
308. Ettinger, D.S., et al., *NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2018*. J Natl Compr Canc Netw, 2018. **16**(7): p. 807-821.
309. Filaire, E., et al., *Lung cancer: what are the links with oxidative stress, physical activity and nutrition*. Lung Cancer, 2013. **82**(3): p. 383-9.
310. Taniguchi, K. and M. Karin, *NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(5): p. 309-324.
311. Shrihari, T.G., *Dual role of inflammatory mediators in cancer*. Ecancermedicalsecience, 2017. **11**: p. 721.
312. Zhang, S., et al., *Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells*. Oncol Lett, 2018. **16**(1): p. 679-686.
313. Houghton, A.M., *Mechanistic links between COPD and lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(4): p. 233-45.
314. de Torres, J.P., et al., *Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease-- incidence and predicting factors*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(8): p. 913-9.
315. Moghaddam, S.J., et al., *Promotion of lung carcinogenesis by chronic obstructive pulmonary disease-like airway inflammation in a K-ras-induced mouse model*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(4): p. 443-53.
316. Jungnickel, C., et al., *Nontypeable Haemophilus influenzae-Promoted Proliferation of Kras-Induced Early Adenomatous Lesions Is Completely Dependent on Toll-Like Receptor Signaling*. Am J Pathol, 2017. **187**(5): p. 973-979.
317. Moghaddam, S.J., et al., *Haemophilus influenzae lysate induces aspects of the chronic obstructive pulmonary disease phenotype*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(6): p. 629-38.
318. Herbst, R.S., et al., *Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 563-7.
319. Powles, T., et al., *MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 558-62.
320. Ansell, S.M., et al., *PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 311-9.
321. Garon, E.B., et al., *Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(21): p. 2018-28.
322. Postow, M.A., et al., *Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(21): p. 2006-17.
323. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 320-30.

324. Weber, J.S., et al., *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(4): p. 375-84.
325. Nghiem, P.T., et al., *PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma*. *N Engl J Med*, 2016. **374**(26): p. 2542-52.
326. Ribas, A., et al., *Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma*. *Jama*, 2016. **315**(15): p. 1600-9.
327. Lanitis, E., et al., *Mechanisms regulating T-cell infiltration and activity in solid tumors*. *Ann Oncol*, 2017. **28**(suppl_12): p. xii18-xii32.
328. Joyce, J.A. and D.T. Fearon, *T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 74-80.
329. Westcott, P.M., et al., *The mutational landscapes of genetic and chemical models of Kras-driven lung cancer*. *Nature*, 2015. **517**(7535): p. 489-92.
330. Hurst, S.D., et al., *New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25*. *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 443-53.
331. Jamieson, K.C., et al., *Rhinovirus and Bacteria Synergistically Induce IL-17C Release from Human Airway Epithelial Cells To Promote Neutrophil Recruitment*. *J Immunol*, 2019. **202**(1): p. 160-170.
332. Steck, P., et al., *Interleukin 17 Receptor E (IL-17RE) and IL-17C Mediate the Recruitment of Neutrophils during Acute Streptococcus pneumoniae Pneumonia*. *Infect Immun*, 2019. **87**(11).
333. Yamaguchi, S., et al., *The roles of IL-17C in T cell-dependent and -independent inflammatory diseases*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 15750.
334. Chang, S.H., et al., *T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(15): p. 5664-9.
335. Qu, Z., et al., *Interleukin-6 Prevents the Initiation but Enhances the Progression of Lung Cancer*. *Cancer Res*, 2015. **75**(16): p. 3209-15.
336. Koyama, S., et al., *STK11/LKB1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment and Proinflammatory Cytokine Production to Suppress T-cell Activity in the Lung Tumor Microenvironment*. *Cancer Res*, 2016. **76**(5): p. 999-1008.
337. Zhu, Z., et al., *Inhibition of KRAS-driven tumorigenicity by interruption of an autocrine cytokine circuit*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(4): p. 452-65.
338. Huang, J., et al., *IL-17C is required for lethal inflammation during systemic fungal infection*. *Cell Mol Immunol*, 2016. **13**(4): p. 474-83.
339. Krohn, S., et al., *IL-17C/IL-17 Receptor E Signaling in CD4(+) T Cells Promotes T(H)17 Cell-Driven Glomerular Inflammation*. *J Am Soc Nephrol*, 2018. **29**(4): p. 1210-1222.
340. Vandeghinste, N., et al., *Neutralization of IL-17C Reduces Skin Inflammation in Mouse Models of Psoriasis and Atopic Dermatitis*. *J Invest Dermatol*, 2018. **138**(7): p. 1555-1563.
341. Gaffen, S.L., *Structure and signalling in the IL-17 receptor family*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(8): p. 556-67.
342. Deschênes-Simard, X., et al., *ERKs in cancer: friends or foes?* *Cancer Res*, 2014. **74**(2): p. 412-9.
343. Tsukamoto, H., et al., *Combined Blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 Signaling Abrogates Mutual Regulation of Their Immunosuppressive Effects in the Tumor Microenvironment*. *Cancer Res*, 2018. **78**(17): p. 5011-5022.
344. Mace, T.A., et al., *IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer*. *Gut*, 2018. **67**(2): p. 320-332.

345. Zea, A.H., et al., *Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion*. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3044-8.
346. Rice, C.M., et al., *Tumour-elicited neutrophils engage mitochondrial metabolism to circumvent nutrient limitations and maintain immune suppression*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 5099.
347. Ribas, A. and S. Hu-Lieskovan, *What does PD-L1 positive or negative mean?* *J Exp Med*, 2016. **213**(13): p. 2835-2840.
348. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(2): p. 122-33.
349. Larkin, J., et al., *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(1): p. 23-34.
350. Weber, J.S., et al., *Sequential administration of nivolumab and ipilimumab with a planned switch in patients with advanced melanoma (CheckMate 064): an open-label, randomised, phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(7): p. 943-955.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswirkungen der COPD auf den Gesamtorganismus (nach [61]).	5
Abbildung 2: Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint und PD-1-Immuntherapie (nach [208]).	11
Abbildung 3: Korrelation von PD-1 und PD-L1 in Serum von COPD-Patienten.	33
Abbildung 4: Konzentrationen von PD-1 und PD-L1 in Serum von COPD-Patienten.	33
Abbildung 5: Korrelation von PD-1 und PD-L1 in BAL-Flüssigkeit von COPD-Patienten.	34
Abbildung 7: Korrelation des Verhältnisses von PD-1/PD-L1 mit FEV1 (% predicted).	35
Abbildung 8: Repräsentative immunhistochemische Färbung von PD-L1 in COPD Lungenschnitten.	36
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes.	37
Abbildung 10: Die Behandlung mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 beeinflusst weder Gewicht noch Blutbild bei Zigarettenrauch-induzierter Inflammation.	38
Abbildung 11: Rauchexposition führt zu einer erhöhten Anzahl an PD-1 und PD-L1 positiven Zellen.	39
Abbildung 12: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper vermindert die rauchinduzierte Rekrutierung von Entzündungszellen in den Alveolarraum.	40
Abbildung 13: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu verminderten Konzentrationen von Chemokinen in der BAL-Flüssigkeit.	41
Abbildung 14: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper beeinflusst rauchinduzierte Veränderungen der Lungenmechanik.	42
Abbildung 15: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper führt zu einem verminderten rauchinduzierten Lungenschaden.	43
Abbildung 16: Die Behandlung mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 moduliert die Entzündungsreaktion ex vivo.	44
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Blockade des PD-1/PD- L1-Immun-Checkpoints mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper.	45
Abbildung 18: Die Behandlung mit einem therapeutischen Antikörper gegen PD-1 beeinflusst weder Gewicht noch Blutbild bei NTHi-induzierter Inflammation.	45
Abbildung 19: NTHi-Exposition führt zu einer erhöhten Anzahl an PD-1 und PD-L1 positiven Zellen.	46
Abbildung 20: Die Behandlung mit einem therapeutischen anti-PD-1 Antikörper reduziert NTHi-induzierten Lungenschaden.	47
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der NTHi-Exposition.	48
Abbildung 22: Defizienz von IL-17C verringert NTHi-induzierte Tumorprogression.	49
Abbildung 23: Durchschnittliche Größe der einzelnen Tumorkläsionen nach vierwöchiger NTHi-Exposition.	50
Abbildung 24: Die NTHi-Exposition führt zu einer gesteigerten Tumorphiliferation.	51
Abbildung 25: NTHi-Exposition führt zu einem Einstrom von Entzündungszellen in den Alveolarraum.	52
Abbildung 26: Die Defizienz von IL-17C führt zu verminderten Konzentrationen von Entzündungsmediatoren im Alveolarraum.	53
Abbildung 27: NTHi-Exposition führt IL-17C-abhängig zu einer gesteigerten Expression von IL-6 im Lungenparenchym.	54
Abbildung 28: IL-17C trägt zur frühen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Tumormikroumgebung bei.	55

Abbildung 29: mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren nach einmaliger NTHi Exposition.....	56
Abbildung 30: IL-17C trägt zur Aktivierung von ERK in der Tumormikroumgebung bei.....	57
Abbildung 31: Stimulation mit IL-17C und NTHi bedingt <i>in vitro</i> eine gesteigerte Aktivierung von ERK.....	58
Abbildung 32: Der PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint ist im Kontext einer COPD ähnlichen Inflammation aktiviert.....	60
Abbildung 33: COPD-ähnliche Inflammation führt zu einer erhöhten Anzahl an CD4 und CD8 in der Tumormikroumgebung.....	61
Abbildung 34: Die Expression von PD-1 ist nach NTHi-Exposition in CD8 positiven T-Lymphozyten erhöht.	62
Abbildung 35: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper.....	63
Abbildung 36: Die Behandlung mit einem gegen PD-1 gerichteten therapeutischen Antikörper reduziert Entzündungsmediatoren in der BAL-Flüssigkeit.....	64
Abbildung 37: Die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints führt zu einer verminderten Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten im Alveolarraum.....	65
Abbildung 38: Die Blockade der PD-1/PD-L1 Achse führt zu einer verminderten Anzahl an Lymphozyten in den Tumorerläsionen.....	66
Abbildung 39: Die Blockade des PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoints reduziert die Tumorerlast in <i>Il-17c^{-/-}/Kras</i> Mäusen.	67

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der Schwere der Krankheit nach GOLD	S. 3
Tabelle 2: Verwendete Geräte mit Hersteller	S. 15
Tabelle 3: Verwendete Lösungen	S. 16
Tabelle 4: Programm der cDNS Synthese	S. 19
Tabelle 5: Reaktionsansatz (einfach) für RT-qPCR	S. 19
Tabelle 6: RT-qPCR Programm	S. 19
Tabelle 7: Murine RT-qPCR Primer	S. 20
Tabelle 8: Verwendete Mausstämme	S. 21
Tabelle 9: Beatmungsmanöver der Lungenfunktionsmessung und deren Messparameter	S. 23
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper für die Immunhistochemie	S. 26
Tabelle 11: Zelllinien und Wachstumsmedien	S. 27
Tabelle 12: Auflistung der verwendeten FACS-Antikörper	S. 30
Tabelle 13: Patientencharakteristika, aufgetrennt nach stabilem und akut exazerbierten Verlauf	S. 32
Tabelle 14: Patientencharakteristika, aufgetrennt nach GOLD Status	S. 34

8. Publikationsverzeichnis

IL-17C-mediated Innate Inflammation Decreases the Response to PD-1 Blockade in a Model of Kras-driven Lung Cancer

Ritzmann F, Jungnickel C, Vella G, Kamyschnikow A, Herr C, Li D, Menger M, Angenendt A, Hoth M, Lis A, Bals R, Beisswenger C
Sci Rep. 2019 Jul 17;9(1):10353. doi: 10.1038/s41598-019-46759-8.

Blockade of PD-1 decreases neutrophilic inflammation and lung damage in experimental COPD

Ritzmann F, Borchardt K, Vella G, Chitirala P, Angenendt A, Herr C, Menger M, Hoth M, Lis A, Bohle R, Bals R, Beisswenger C
zur Publikation akzeptiert, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol

Flagellin shifts 3D bronchospheres towards mucus hyperproduction

Ritzmann F*, Sprott R*, Langer F, Yao Y, Herr C, Kohl Y, Tschernig T, Bals R, Beisswenger C
* contributed equally
Respir Res. 2020 Aug 26;21(1):222. doi: 10.1186/s12931-020-01486-x.

IL-17C Mediates the Recruitment of Tumor-Associated Neutrophils and Lung Tumor Growth

Jungnickel C, Schmidt L, Bittigkoffer L, Wolf L, Wolf A, Ritzmann F, Kamyschnikow A, Herr C, Menger M, Spieker T, Wiewrodt R, Bals R, Beisswenger C
Oncogene. 2017 Jul 20;36(29):4182-4190. doi: 10.1038/onc.2017.28. Epub 2017 Mar 27.

Interleukin 17 Receptor E (IL-17RE) and IL-17C Mediate the Recruitment of Neutrophils During Acute *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia

Steck P, Ritzmann F, Honecker A, Vella G, Herr C, Gaupp R, Bischoff M, Speer T, Tschernig T, Bals R, Beisswenger C
Infect Immun. 2019 Oct 18;87(11):e00329-19. doi: 10.1128/IAI.00329-19. Print 2019 Nov.

The IL-17 receptor IL-17RE mediates polyIC-induced exacerbation of experimental allergic asthma

Vella G, Lundig L, Ritzmann F, Honecker A, Herr C, Wegmann M, Bals R, Beisswenger C
Respir Res. 2020 Jul 8;2(1):176. doi: 10.1186/s12931-020-01434-9.

Regulatory feed-back cycle of the Insulin-degrading enzyme and the Amyloid Precursor Protein intracellular domain: Implications for Alzheimer's disease

Lauer AA, Mett J, Janitschke D, Thiel A, Stahlmann CP, Bachmann CM, Ritzmann F, Schrul B, Müller UC, Stein R, Riemenschneider M, Grimm HS, Hartmann T, Grimm MOW
Aging Cell. 2020;00:e13264. <https://doi.org/10.1111/accel.13264>

Role for IL-17C in acute exacerbation of COPD and inflammation-induced lung damage

Vella G, Ritzmann F, Wolf L, Kamyschnikow A, Stodden H, Herr C, Slevogt H, Bals R, Beisswenger C
zur Publikation eingereicht

Novel evidence for the 'lung-kidney interaction' in patients with COPD

Schunk S, Beisswenger C, Ritzmann F, Herr C, Wagner M, Triem S, Hütter G, Schmit D, Zewinger S, Sarakpi T, Honecker A, Boor P, Jörres R, Watz H, Welte T, Vogelmeier C, Fliser D, Speer T, Bals R
zur Publikation eingereicht

9. Konferenzbeiträge

Folgend sind alle auf internationalen und nationalen Konferenzen vorgestellte Beiträge aufgelistet

Vorträge

IL-17C promotes growth and proliferation of K-ras induced cancerous lesions

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Hannover (2016)

NTHi-induced inflammation activates the PD-1 immune checkpoint in the tumor microenvironment

60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., München, 2019

The PD-1 immune checkpoint promotes lung damage in murine models of COPD-like inflammation

ERS International Congress, Madrid (2019)

Role of the PD-1/PD-L1 axis in the development of COPD

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Berlin (2019)

Poster

IL-17C promotes growth and proliferation of K-ras induced cancerous lesions

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Hannover (2016)

IL-17C promotes growth and proliferation of K-ras induced cancerous lesions

ERS - Lung Science Conference, Estoril 2017 – Reisestipendium der ERS

The epithelial cytokine IL-17C drives the progression of K-ras induced early cancerous lesions

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Giessen (2017)

The epithelial cytokine IL-17C drives the progression of K-ras induced early cancerous lesions

ERS Research Seminar “Cross-talk in the lung microenvironment: implications for understanding chronic lung disease”, Berlin (2018)

Chronic NTHi-induced inflammation results in activation of the PD-1 immune checkpoint in the tumor microenvironment

Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie, Pathophysiologie/ Aerosolmedizin sowie Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Essen (2018) – Posterpreis

COPD-like lung inflammation activates the PD-1 immune checkpoint in mice

ERS – 17. Lung Science Conference, Estoril 2019 – Posterpreis

Toll-like receptor signaling regulates the differentiation of 3D bronchospheres

ERS – 18. Lung Science Conference, Estoril 2020 - Posterpreis

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte, für die Bereitstellung des Themas sowie für seine Unterstützung in dieser Zeit.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christoph Beisswenger für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und für die vielfältige Unterstützung bei allen nur erdenklichen Fragen bedanken.

Ein großer Dank geht an alle derzeitigen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Bals, allen voran Dr. Christian Herr, Giovanna Vella, Anja Honecker, Victoria Weinhold und Andreas Kamyschnikow. Die wunderbare Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit hat so einiges erleichtert.

Dr. Christopher Jungnickel und Dr. Lisa Wolf danke ich für die gute Einarbeitung zu Beginn meiner Promotion.

Der größte Dank geht an meine Familie. Ohne eure Unterstützung wäre es nicht möglich gewesen. Ach, Anna, danke für alles.

Ich danke der Academy.

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.