

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Identifizierung von durch murine Lungen- und Brustkrebszellen
produzierten und induzierten Zytokinen, die Interleukin-22 induzieren**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Wenk

aus München

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Endres

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Rudolf Huber

PD Dr. Robert Kammerer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

PD Dr. Sebastian Kobold

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung

22.03.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	- 1 -
2	Einleitung	- 2 -
2.1	Biologie und Signaltransduktion von Interleukin-22.....	- 2 -
2.1.1	Zelluläre Quellen	- 3 -
2.1.2	Physiologische Funktionen von IL-22.....	- 5 -
2.1.3	Funktion von IL-22 in Krebserkrankungen	- 6 -
3	Zielsetzung	- 9 -
4	Material und Methoden	- 10 -
4.1	Chemikalien und Reagenzien	- 10 -
4.2	Geräte.....	- 11 -
4.3	Puffer, Gele und Zellkulturmedium.....	- 12 -
4.4	Antikörper.....	- 14 -
4.5	Zytokine.....	- 15 -
4.6	Oligodesoxyribonukleotide.....	- 15 -
4.7	Versuchstiere, Zellkultur und Zellgewinnung	- 15 -
4.7.1	Tumorzelllinien.....	- 15 -
4.7.2	Versuchstiere	- 16 -
4.7.2.1	Tumorinduktion	- 16 -
4.7.3	Kultivierung der Zellen.....	- 16 -
4.7.4	Tierversuche und Zellgewinnung aus Organen	- 16 -
4.7.5	Weiterverarbeitung der Zellen	- 16 -
4.7.5.1	Waschen, Einzelzellsuspension und Zellzählung	- 16 -
4.7.5.2	Zellysate.....	- 17 -
4.7.6	Organ- und Tumorsysate.....	- 17 -
4.8	Proteinmengenbestimmung mittels Bradford	- 18 -
4.9	IL-22-Stimulationsversuche	- 18 -
4.10	<i>Western blot</i>	- 18 -
4.10.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	- 18 -
4.10.1.1	Vorbereitung und Laden der Proben.....	- 18 -
4.10.2	Proteinanalyse.....	- 19 -
4.11	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	- 19 -
4.12	Polymerase-Kettenreaktion.....	- 19 -
4.13	<i>Scratch assay</i>	- 19 -
4.14	Zytokinreihentestung	- 20 -
4.15	Stimulation von Splenozyten.....	- 20 -

4.15.1	Kokultur von Tumor- und Milzzellen.....	- 21 -
4.15.2	Stimulation von Splenozyten mit Tumorzellkulturüberstand	- 21 -
4.15.3	Zytokinstimulation von Splenozyten	- 22 -
4.16	Statistische Analyse	- 22 -
5	Ergebnisse.....	- 23 -
5.1	Effekte von Interleukin-22 auf Tumorzellen	- 23 -
5.1.1	Untersuchung der Tumorzelllinien auf IL-22RA1-Expression	- 23 -
5.1.2	Evaluation der Funktionalität des IL-22-Signalweges in den Zelllinien	- 24 -
5.1.3	<i>Scratch assay</i> mit 4T1-Tumorzellen.....	- 25 -
5.2	IL-22-Gehalt muriner Organe und Tumoren	- 26 -
5.3	Stimulation von Milzzellen durch Tumorzellen	- 27 -
5.3.1	Zytokinreihentestung	- 28 -
5.3.2	Überprüfung der Zytokine auf ihre Fähigkeit zur IL-22-Induktion in Splenozyten	- 29 -
5.3.3	Bedeutung von IL-1 α , IL-6 und IL-23 in der IL-22-Induktion in einer 4T1-Tumorzellkulturüberstand-Splenozyten-Kultur	- 30 -
5.3.3.1	IL-1 α im reinen Tumorzellkulturüberstand	- 33 -
5.3.3.2	Titration von IL-1 α und IL-23	- 34 -
6	Diskussion.....	- 36 -
6.1	Expression des IL-22-Rezeptors in Tumorzellen	- 36 -
6.2	Wirkung von IL-22 auf Tumoren	- 37 -
6.3	Zelluläre Quellen und Induktion von IL-22.....	- 38 -
6.3.1	Zelluläre Quellen und Induktion von IL-22 im Tumormilieu.....	- 40 -
6.3.2	Zelluläre Quellen und Induktion von IL-1 und IL-23.....	- 42 -
6.3.3	Biologie von IL-1 α und IL-1 β	- 45 -
6.3.4	Bedeutung von IL-1 in Tumorerkrankungen	- 46 -
6.4	Das IL-22-System als Zielstruktur in der Tumorthherapie.....	- 46 -
6.4.1	Neutralisation von IL-23.....	- 47 -
6.4.2	Blockade des IL-1-Systems	- 48 -
6.4.2.1	Antagonisierung des IL-1-Rezeptors	- 49 -
6.4.2.2	Neutralisation von IL-1 α	- 49 -
6.5	Ausblick.....	- 50 -
7	Abkürzungsverzeichnis	- 52 -
8	Literaturverzeichnis	- 55 -
9	Veröffentlichungen:	- 69 -
10	Danksagung.....	- 70 -

Für meine Eltern

1 Zusammenfassung

Interleukin (IL)-22 ist ein Zytokin, das von Immunzellen gebildet wird und auf Epithelzellen wirkt. Es besitzt Schlüsselfunktionen im Zellschutz, in der Zellregeneration sowie in der Stärkung des angeborenen Immunsystems. IL-22 entfaltet seine Wirkung hauptsächlich über die Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). Es besitzt tumor-fördernde Wirkungen, auch wenn die Frage, auf welchen Schritten der Tumorentwicklung IL-22 einen Einfluss hat, umstritten bleibt. Die zellulären Quellen von IL-22 in Tumoren sind weitestgehend beschrieben, doch die Mechanismen der IL-22-Induktion in diesem Kontext sind bisher wenig untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von IL-22 in Immunzellen durch lösliche Tumor-produzierte Faktoren untersucht. Wir konnten zeigen, dass die murinen Tumorzelllinien 4T1 (Mammakarzinom), B16 (Melanom), Lewis Lung Carcinoma (LLC; Lungenkarzinom) und Panc-02 (Pankreaskarzinom) die Interleukin-22-Rezeptor- α -1-Untereinheit (IL-22RA1) exprimieren. Durch Stimulation dieser Zellen mit IL-22 konnten wir dort eine Aktivierung von STAT3 nachweisen. In einem *In-vitro scratch assay* verzeichneten wir durch IL-22 eine über 30 Prozent beschleunigte Wiederbesiedelung des zellfreien Areals bei der Tumorzelllinie 4T1. Tumorzellen produzieren selbst kein IL-22. Im subkutanen 4T1-Brustkrebsmodell konnten wir IL-22 nachweisen, das von infiltrierenden Zellen stammte. Durch Kokultivierung von Tumor- und Milzzellen konnten wir IL-22 in der Kultur detektieren. Wir konnten erstmalig *In-vitro* eine Ausschüttung von IL-22 durch Milzzellen nach Stimulation mit verschiedenen Tumorzellkulturüberständen nachweisen. Wir konnten damit belegen, dass Tumorzellen direkt in die Regulation von IL-22 eingreifen. Mithilfe einer Zytokinreihentestung grenzten wir die Zytokine im Tumorzellkulturüberstand ein, die in unseren Versuchen IL-22 induzierten. Durch Stimulations- und Neutralisationsversuche konnten wir neben IL-23 erstmalig IL-1 α als relevanten IL-22-Induktor im murinen Tumormilieu identifizieren. Dieses könnte Ansatzpunkte für mögliche zukünftige therapeutische Interventionen liefern.

2 Einleitung

2.1 Biologie und Signaltransduktion von Interleukin-22

IL-22 gehört zu den α -helikalen Klasse-II-Zytokinen der IL-10-Familie bestehend aus IL-10, IL-19, IL-20, IL-24 und IL-26 (Wolk et al., 2010). Der heterodimere IL-22-Rezeptor setzt sich aus den membranständigen Untereinheiten Interleukin-22-Rezeptor- α -1 (IL-22RA1) und Interleukin-10-Rezeptor- β (IL-10RB) zusammen. Während IL-10RB ubiquitär exprimiert wird, ist IL-22RA1 physiologischer Weise fast ausschließlich auf Epithelzellen zu finden und bestimmt somit die Zellspezifität von IL-22. IL-10RB besitzt keine Affinität zu IL-22, erst der IL-22-IL-22RA1-Komplex, der aus der Bindung von IL-22 an IL-22RA1 entsteht, rekrutiert IL-10RB. Die Signaltransduktionskaskade von IL-22RA1 läuft über den Janus-Kinasen (JAK)-STAT-Signalweg der zur Phosphorylierung von JAK1 und Tyrosinkinase (TYK) 2 sowie STAT3 und zu geringerem Ausmaß auch STAT1 und STAT5 führt. Zusätzlich wurde die Aktivierung von AKT und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), in Abhängigkeit des Gewebes, in der Literatur beschrieben (Lejeune et al., 2002; Sonnenberg et al., 2011). An der Feinregulation von IL-22 ist das IL-22-Binding-Protein (IL-22BP) beteiligt. IL-22BP ist ein löslicher IL-22-Rezeptor, der IL-22 mit einer bis zu 1000-fach höheren Affinität als der membrangebundene Rezeptor IL-22RA1 bindet und neutralisiert (Jones et al., 2008).

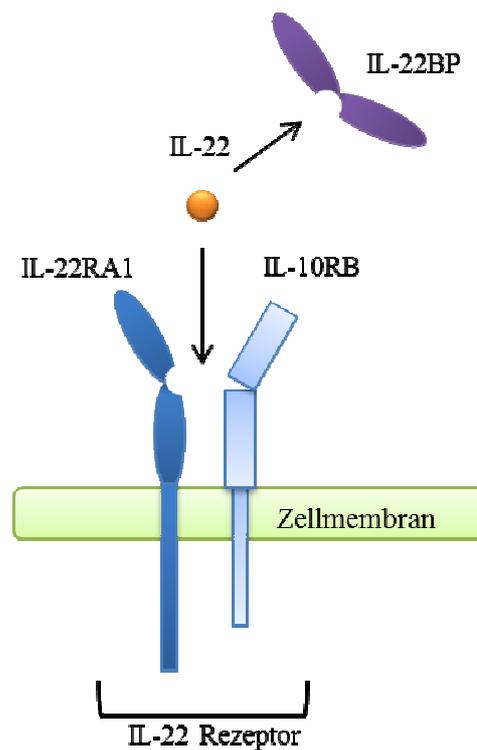


Abbildung 1: IL-22 und seine Rezeptoren: IL-22 vermittelt seine Wirkung über den Rezeptorkomplex bestehend aus IL-22RA1 und IL-10RB. IL-22 kann durch seinen hochaffinen natürlichen Inhibitor IL-22BP neutralisiert werden. (Abbildung modifiziert nach (Sabat et al., 2014))

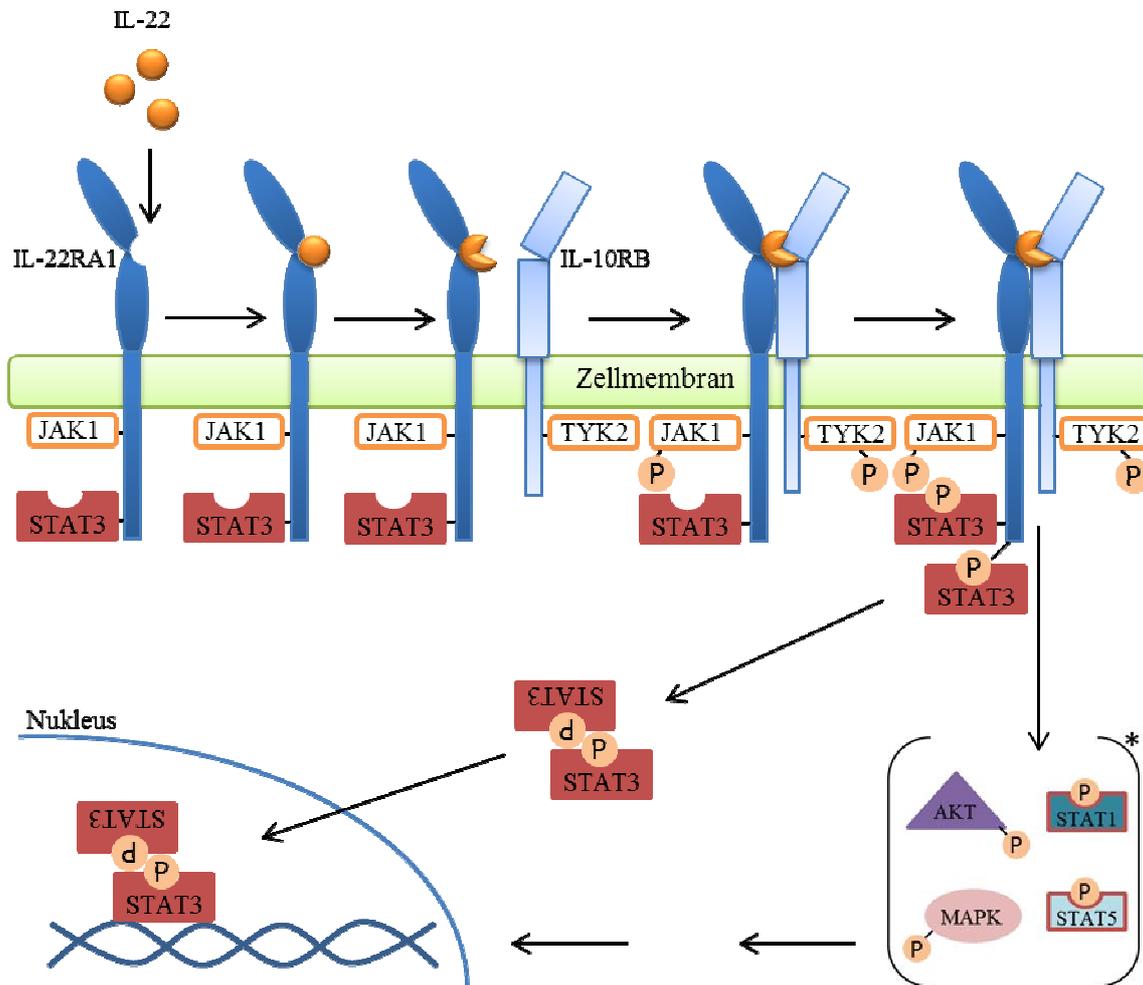


Abbildung 2: IL-22-Signaltransduktion: STAT3 kann bereits an IL-22RA1 assoziiert vorkommen. IL-22 geht durch die Bindung an IL-22RA1 eine Konformationsänderung ein, erst dann ist die Bindung an IL10RB möglich. Die Nähe der zwei Rezeptorbestandteile aktiviert die beiden rezeptorassoziierten Kinasen Jak1 und Tyk2, die wiederum STAT3 phosphorylieren. Dieses dimerisiert, wandert in den Nukleus und führt zu einer Geninduktion. Zusätzlich wurde die Aktivierung von MAPK, AKT, STAT1 und STAT5 beobachtet. * Nur in ausgewählten Zelllinien (Abbildung modifiziert nach (Sabat et al., 2014))

2.1.1 Zelluläre Quellen

Es gibt in der Literatur Hinweise, dass die zellulären Quellen von IL-22 von der Gewebeart und der Erkrankung abhängig sind. Meist sind jedoch T-Zellen und *innate lymphoid cells* (ILC) die wichtigsten Produzenten (Sabat et al., 2014). ILC sind Zellen, die aufgrund ihrer Oberflächenmarker keiner bestimmten Immunzelllinie zugeordnet werden können und vermehrt in Schleimhäuten gefunden werden (Pearson et al., 2012; Walker et al., 2013). Sie besitzen daher keine Marker für T-Zellen (Cluster-of-

differentiation-3, Abkürzung CD3), B-Zellen (B220), myeloide Zellen (CD11b/c) oder den T-Zell-Rezeptor (TCR). Die ILC werden in drei Gruppen eingeteilt (Spits et al., 2013). Zur Gruppe 3 zählen alle ILC, die IL-22 oder IL-17 exprimieren sowie abhängig von den Transkriptionsfaktoren *retinoid acid receptor-related orphan receptor* γ T (ROR γ T) und Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) sind (Robinette et al., 2015; Spits et al., 2013; Walker et al., 2013). Als IL-22⁺-ILC wurden unter anderem natürliche Killerzellen (NK) (Xu et al., 2014b), *lymphoid tissue inducer-like* (LTi-like) Zellen (Cupedo et al., 2009), *natural cytotoxicity triggering receptor* (NCR)⁺-Zellen (Cella et al., 2009) und CD4⁻-NCR⁻-Zellen (Buonocore et al., 2010) identifiziert. Zu den IL-22-bildenden T-Zellen gehören die CD4⁺ T-Helfer (Th)1- (Wolk et al., 2002), Th17- (Zheng et al., 2007) und Th22-Zellen (Duhon et al., 2009) sowie $\gamma\delta$ -T-Zellen (Li et al., 2011), natürliche Killer-T-Zellen (NKT) (Doisne et al., 2011) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Ortega et al., 2009). Th1-Zellen, die als Erkennungsmerkmal Interferon (IFN)- γ sezernieren, waren die erste Untergruppe der Th-Zellen, in denen IL-22 nachgewiesen wurde (Wolk et al., 2002). Zwischen einem und zwei Drittel aller IL-22-produzierenden T-Zellen im Menschen sind Th22-Zellen (Lim et al., 2014). Sie bilden eine eigene Subpopulation, da sie neben IL-22 keine weiteren T-Helfer-Zell-spezifischen Zytokine sezernieren (Leung et al., 2014; Ramirez et al., 2010). Die Schlüsselrolle übernimmt AHR, dessen Liganden im Menschen zur Differenzierung von Th22-Zellen führen (Ramirez et al., 2010). AHR ist auch für die Differenzierung von Th17-Zellen in der Maus verantwortlich und eine Voraussetzung für die Sekretion von IL-22 aus $\gamma\delta$ -T-, Th17- und Th22-Zellen. In der Maus geht die IL-22-Produktion vor allem von der Th17-Zellpopulation aus (Zheng et al., 2007). Die Differenzierung zu Th17-Zellen wird vom Transkriptionsfaktor ROR γ T kontrolliert und steigert bei Aktivierung die Bildung von IL-22 (Ivanov et al., 2006). Fast alle IL-22-produzierenden Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimieren ROR γ T (Rutz et al., 2013). In Th1- und Th22-Zellen ist dieser Transkriptionsfaktor dagegen nicht oder nur in geringem Maße detektierbar (Duhon et al., 2009; Trifari et al., 2009). Die Mechanismen der Induktion von IL-22 unterscheiden sich zwischen den Zelltypen. Sie kann durch IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 oder Tumornekrosefaktor (TNF)- α erfolgen. Transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- β supprimiert dagegen in allen T-Zellen die IL-22-Synthese (Lim et al., 2014; Rutz et al., 2013; Sabat et al., 2014; Wolk et al., 2002). IL-23 scheint eine wichtige Rolle in der Regulation von IL-22

einzunehmen und ist insbesondere für die IL-22-Induktion bei Entzündung und Infektionen unverzichtbar (Rutz et al., 2013).

Tabelle 1: IL-22-produzierende Zellen und ihre Induktoren in der Maus

Zelltyp	Th1-Zellen	Th17-Zellen	Th22-Zellen	CD8+ T-Zellen	γ - δ T-Zellen	ILC
Zytokine die zur IL-22-Produktion führen	IL-12	IL-1 β	IL-6	IL-1 β	IL-1 β	IL-1 β
	IL-18	IL-6	IL-23	IL-6	IL-23	IL-23
		IL-21		IL-23	IL-18	
		IL-23				
		TNF				

2.1.2 Physiologische Funktionen von IL-22

Zellregeneration und Wundheilung

IL-22 fördert das Wachstum, die Widerstandsfähigkeit sowie die Wiederherstellung von Epithelzellen der Haut, Luftwegen und inneren Organen (Aujla et al., 2008; Pickert et al., 2009; Wolk et al., 2004; Wolk et al., 2006). Einen wichtigen Einfluss auf die physiologische Wundheilung besitzen die Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die durch IL-22 induziert werden können. Sie bauen die extrazelluläre Matrix ab und ermöglichen die Geweberestrukturierung (Boniface et al., 2005; Bullard et al., 1999; Nagase et al., 1999). Das Zellwachstum wird maßgeblich durch die Induktion anti-apoptotischer und mitogener Proteine bestimmt. Dazu zählen die *B cell lymphoma* (BCL) und die *myeloid cell leukemia sequence* (MCL) Gruppen sowie Cyclin D (Brand et al., 2007; Hoegl et al., 2011), die durch IL-22 induziert werden. Auf diese Weise schützt IL-22 beispielsweise Hepatozyten vor Zellschädigung bei Hepatitis (Radaeva et al., 2004; Zenewicz et al., 2007) und verhindert die Autophagie des Gewebes bei einer Pankreatitis (Feng et al., 2012).

IL-22 in Infektionsprozessen

Durch die IL-22-induzierte Expression anti-mikrobieller Peptide der β -Defensin-, S100A- und REG-Protein-Familien können Erreger direkt abgewehrt werden (Wolk et al., 2006; Zheng et al., 2008). Darüber hinaus führt IL-22 in verschiedenen Zellen zur Expression von Akute-Phase-Proteinen wie Serum-Amyloide als auch Zytokine, wie IL-6 und TNF- α , die proinflammatorisch wirken (Aujla et al., 2008; Nagalakshmi et al., 2004). Chemokine mit der positiv geladenen Glu-Leu-Arg-Sequenz (ELR⁺) sind für die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten verantwortlich (Nogales et al., 2008). IL-22 steigert die Expression der ELR⁺-Chemokine CXC-*motif*-Chemokin-Ligand (CXCL) 1,

CXCL2, CXCL5 und CXCL8 und führt somit zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Infektionsherd (Aujla et al., 2008; Wolk et al., 2009). In unterschiedlichen Mausversuchen wurde gezeigt, dass IL-22 entweder vor der Infektion oder vor den Folgen einer Infektion mit Viren oder Pilzen schützte (De Luca et al., 2010; Hernandez et al., 2015; Kumar et al., 2013). Vergleichsweise führte eine Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* oder *Citrobacter rodentium*, bei gleichzeitiger Inhibition von IL-22 zum Tod der Versuchstiere (Aujla et al., 2008; Zheng et al., 2008).

2.1.3 Funktion von IL-22 in Krebserkrankungen

Die Effekte, die IL-22 physiologisch vermittelt, können auch von entarteten Zellen mit IL-22RA1-Expression ausgenutzt werden. IL-22 kann Tumoren dazu verhelfen, eine *Stemness* (Stammzellfähigkeit) aufrechtzuerhalten oder zu entwickeln und dadurch ein aggressiveres Erkrankungsverhalten begünstigen (Kryczek et al., 2014). Die verstärkte Tumormanifestation durch den Einfluss von IL-22, konnte auch durch Mausversuche mit induzierten hepatozellulären Karzinomen (HCC) bestätigt werden. Jeweils im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, wurde bei der Überexpression von IL-22 eine erhöhte Tumorzinzidenz festgestellt, während diese bei IL-22^{-/-}-Mäusen niedriger ausfiel (Jiang et al., 2011; Park et al., 2011). Auch in gastrointestinalen Tumoren, insbesondere bei Kolonkarzinomen besitzt IL-22 eine wiederholt beschriebene tumorfördernde Rolle (Djaldeiti et al., 2014; Huber et al., 2012; Jiang et al., 2013; Kirchberger et al., 2013; Koltsova et al., 2014; Kryczek et al., 2014; Song et al., 2015). Bei Patienten, die unter einem Magenkarzinom litten, korrelierte die Anzahl an IL-22-produzierenden Zellen mit dem Tumorstadium sowie der Lebenserwartung (Liu et al., 2012; Zhuang et al., 2012). Zusätzlich wurde bei vielen weiteren Tumoren wie Haut-, Lungen- und Leberkrebs sowie dem Glioblastom über eine IL-22-induzierte STAT3-vermittelte Tumorprogression berichtet (Akil et al., 2015; Jiang et al., 2011; Nardinocchi et al., 2015; Zhang et al., 2008). Es ist anzumerken, dass auch einige wenige Publikationen existieren, die eine Hemmung des Tumorwachstums durch IL-22 beschreiben. Dies ist der Fall bei EMT6-Brustkrebs- und A498-Nierenkrebszellen. In beiden Zelllinien wird vermutet, dass dieser Effekt über den IL-22-STAT1-Signalweg, durch einen Arrest im Zellzyklus, vermittelt wurde (Weber et al., 2006; Zhang et al., 2011).

Proliferation, Chemoresistenz, Metastasierung und invasives Wachstum

Sowohl bei hepatozellulären Karzinomen als auch bei Kolonkarzinomen wird neben der erhöhten Proliferationsrate gleichzeitig eine verstärkte Metastasierung durch IL-22 vermutet (Jiang et al., 2011; Jiang et al., 2013). Das invasive Wachstum konnte bei Pankreas- und Magenkarzinomen auf IL-22-induziertes MMP9 zurückgeführt werden (Ji et al., 2014; Wen et al., 2014). Während die Steigerung des Zellwachstums durch die IL-22-induzierten mitogenen und anti-apoptotischen Faktoren bestimmt wird, können sie ebenfalls ursächlich für die Resistenz gegen zytotoxische Medikamente sein. Dabei korrelierte die Höhe des Serum-IL-22, bei Patienten mit Zustand nach Kolonkarzinom-Resektion, mit einer Resistenz gegen das adjuvante Therapieregime bestehend aus Folsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin (FOLFOX). In experimentellen *In-vitro* Versuchen konnte eine durch IL-22-Stimulation eskalierte Widerstandsfähigkeit gegenüber den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil und Oxaliplatin in verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien bestätigt werden (Wu et al., 2013a). Zusätzlich zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass chemoresistente Lungenkarzinomzelllinien eine erhöhte Expression an IL-22RA1 aufweisen und dadurch verstärkt auf die proliferativen Signale von IL-22 reagierten (Kobold et al., 2013).

Angiogenese

ELR⁺-CXC-Chemokine werden physiologischer Weise im Rahmen der Pathogenabwehr durch IL-22 induziert. Diese Chemokine gelten jedoch auch als starke Promotoren der Angiogenese, die somit durch IL-22 gefördert wird (Strieter et al., 1995). IL-22-induzierte MMP, die mit ihren proteolytischen Eigenschaften einen wichtigen Platz in der Wundheilung einnehmen, erlauben ebenso das Einsprießen von Blutgefäßen in das Interstitium. Den hohen Stellenwert der MMP in der Angiogenese, demonstrierten Haas et al., in deren Versuche die Inhibition von MMP die Neubildung von Kapillaren unterbinden konnte (Haas et al., 2000). *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), mitunter das bekannteste Signalmolekül der Angiogenese, zeigt ebenfalls in verschiedenen murinen Tumorversuchen eine IL-22-induzierte Expression (Curd et al., 2012; Jiang et al., 2013). Allgemein ist für das Größenwachstum von Tumoren die Ausbildung eines Kapillarnetzes essenziell. Ohne die Angiogenese respektive Angioneogenese können sich solide Tumoren nicht ausbreiten (Gimbrone et al., 1972; Holmgren et al., 1995). IL-22 beeinflusst diesen Regelkreis unter anderem durch die Induktion von ELR⁺-CXC-Chemokine, MMP sowie VEGF und kann auf diese Weise die Expansion von Tumoren fördern.

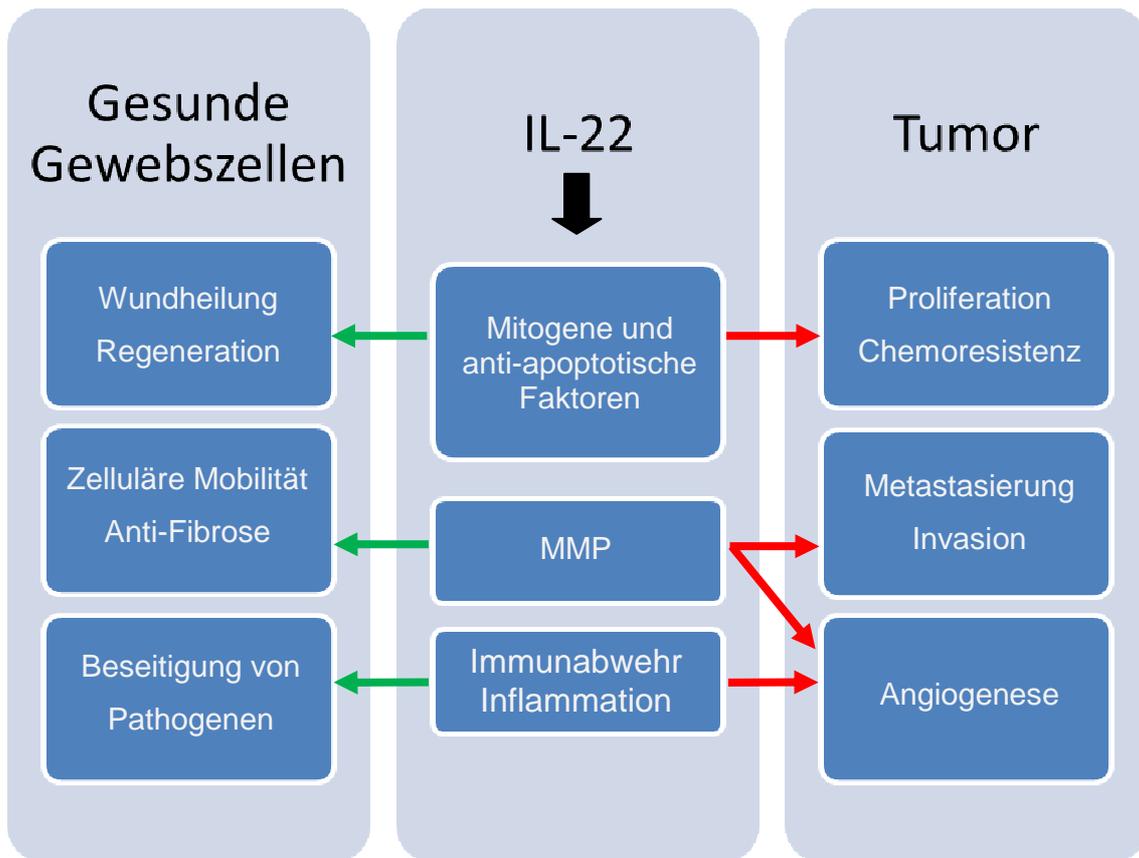


Abbildung 3: Funktionen von IL-22 im gesunden Gewebe und im Tumor: IL-22 ist in Prozesse der Immunabwehr und Inflammation sowie in der Induktion von mitogenen und anti-apoptischen Faktoren beteiligt. Diese führen im Tumor und in gesunden Gewebszellen zu unterschiedlichen Effekten. (MMP = Matrix-Metalloproteinasen).

3 Zielsetzung

Aus der Literatur wird deutlich, dass IL-22 bei mehreren Tumorerkrankungen eine besondere Rolle einnimmt. Nicht alle epithelialen Tumorzelllinien besitzen den IL-22RA1-Rezeptor und die, die ihn exprimieren, regulieren nach Stimulation mit IL-22 nicht zwangsläufig STAT3 hoch (Kobold et al., 2013). Um die Bedeutung von IL-22 in Erkrankungen und Erkrankungsmodellen zu verstehen, ist es wichtig zu definieren, ob Zellen auf IL-22 reagieren können und wie diese Reaktion von statten geht. Die Effekte von IL-22 scheinen gewebeabhängig zu sein, wobei die Mehrzahl der bisherigen Publikationen einen tumorfördernden Effekt beschreibt. Kürzlich berichteten Akil et al. von der Vermutung, dass IL-22-produzierende Immunzellen mit Tumorzellen interagieren (Akil et al., 2015). Daraus wurde jedoch auch klar, in welchem geringen Umfang die Regulation von IL-22 in Tumoren bisher erforscht wurde. Weiter ist es nicht gesichert, ob und wie Tumorzellen die IL-22-Produktion von Immunzellen beeinflussen können.

In dieser Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen behandelt werden:

1. Wird der IL-22-Rezeptor respektive die IL-22RA1-Untereinheit in den von uns untersuchten Tumorzelllinien exprimiert?
2. Findet in diesen Zelllinien eine IL-22-induzierte Aktivierung der STAT3-Signaltransduktion statt?
3. Besitzt IL-22 in diesen Zelllinien pro-tumorale Eigenschaften?
4. Können Tumorzellen die IL-22-Synthese in Immunzellen induzieren?

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Firma
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10×) #9803	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Erylyse	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Rinderserum (FBS)	Gibco by Thermo Scientific, Waltham, USA
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Isopropanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
L-Glutamin	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Lysis Buffer #1662002	Bio-Rad, Hercules, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mini Roche Protease Inhibitor Tabletten	Roche, Mannheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Opti-MEM	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PageRuler <i>prestained protein ladder</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Penicillin (100×)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Verstärker	Molzym, Bremen, Deutschland
Pierce ECL <i>Western-blot</i> -Substrat	Thermo Scientific, Waltham, USA

Polyvinylidenfluoridmembran	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail #P8340	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium</i> (RPMI 1640)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptomycin (100×)	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

4.2 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerätebezeichnung	Firma
5415-R-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Alpha Imager	Alpha Innotech, San Leandro, USA
Axiovert-40C-Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
CO ₂ -Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
LAS-4000mini	Fuji Film, Tokyo, Japan
Milipore Direct-Q3	Merck Millipore, Billerica, USA
Mini Trans-blot cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Mithras LB 940 Multimode Plate Reader	Berthold Tech., Bad Wildbad, Deutschland
Multifuge 3L-R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Nanophotometer	IMPLEN, München, Deutschland
Pipettus	Hirschmann, Gundelsheim, Deutschland
Power Pac Basic	Bio-Rad, Hercules, USA
Power Pac Supply 200	Bio-Rad, Hercules, USA
Rollenmischer (RM 5)	Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Schüttler (IKA-BIBRAX-VXR)	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
SDS-PAGE-Kammer (MGV-202)	C.B.S. Scientific Comp., Del Mar, USA
Sicherheitswerkbank (HERAsafe KS 12)	Thermo Scientific, Waltham, USA
TCS-SP5-Konfokalmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen, Deutschland
ThermoMixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Kits

Bezeichnung	Firma
RevertAid <i>FirstSstrand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Taq-Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, USA
InviTrap <i>SpinUuniversal RNA Mini Kit</i>	STRATEC Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland
Bio-Rad DC Protein <i>Assay</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Mouse IL-22 Construction Kit # RMF222CK</i>	Antigenix America, Huntington Station, USA
Phospho-STAT3 Sandwich ELISA <i>Kit #7300</i>	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

4.3 Puffer, Gele und Zellkulturmedium

Tabelle 5: Puffer, Gele und Zellkulturmedium

4× Sammelgelpuffer	Menge	4× Trenngelpuffer	Menge
Tris	0,5 M	Tris	3 M
SDS	0,4 %	SDS	0,4 %
HCL	auf pH 8,5	HCL	auf pH 6,8
in H ₂ O		In H ₂ O	

5 % Sammelgel	Menge	10 % Trenngel	Menge
H ₂ O	2,5 ml	H ₂ O	2,5 ml
4x Sammelgelpuffer	1 ml	4x Trenngelpuffer	2,5 ml
Acrylamid	0,5 ml	Acrylamid	5 ml
10% APS	40 µl	10% APS	50 µl
TEMED	4 µl	TEMED	5 µl

10× Laufgelpuffer	Menge	TRIS-buffered saline (TBS) -Tween (-T)	Menge
Tris	0,25 M	TRIS Base pH 7,5	10 mM
Glycin	2 M	NaCl	100 mM
SDS	10 g	Glycin	100 mM
ddH ₂ O	ad 1000 ml	Tween 20	0,1 %

10× Wet-Transfer pH 8,0	Menge	Laemmli-Puffer (6×)	Menge
Tris	0,25 M	SDS	1,2 g
Glycin	0,192 M	Bromphenolblau	0,06 g
Methanol	200 ml	DTT	0,939 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml	Glycerol	4,7 ml
		TRIS pH 6,8	0,5 M
		ddH ₂ O	4,1 ml

1× TAE Puffer	Menge	2 % Agarosegel	Menge
Tris	2 M	LE-Agarose	4 g
Essigsäure, 100%	1 M	1x TAE-Puffer	200 ml
EDTA-dinatriumsalz-dihydrat	0,05 M	Ethidiumbromid	10 µl

Magermilch Blockpuffer	Menge	BSA Blockpuffer	Menge
Magermilchpulver	5 %	BSA	5 %
in TBS-T		in TBS-T	

ELISA Waschpuffer	Menge	ELISA Verdünnungsmittel	Menge
Tween	0,05 %	BSA	0,1 %
In PBS		Tween	0,05 %
		In ddH ₂ O	

DMEM Vollmedium	Menge	RPMI 1640 Vollmedium	Menge
Fetales Rinderserum (FBS)	10 %	FBS	10 %
L-Glutamin	1 mM	L-Glutamin	1 mM
Penicillin	100 IU/ml	Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml	Streptomycin	100 µg/ml
DMEM	450 ml	In RPMI 1640	450 ml

Opti-MEM „Hungermedium“	Menge
L-Glutamin	1 mM
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Opti-MEM	500 ml

4.4 Antikörper

Tabelle 6: Western blot-Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Klon	Spezies Isotyp	Firma
Anti-p-STAT3, monoklonaler Antikörper	1:200	B-7	Maus IgG _{2b}	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-STAT3, monoklonaler Antikörper	1:200	F-2	Maus IgG ₁	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-β-Aktin, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelt, monoklonaler Antikörper	1:500	C4	Maus IgG ₁	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt, polyklonaler Antikörper	1:2000	Polyklonal	Ziege IgG	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-IL-22RA1, monoklonaler Antikörper	1 :500	49651 4	Ratte IgG _{2A}	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-Ratte-IgG, HRP-gekoppelt, polyklonaler Antikörper	1:1000	Polyklonal	Ziege IgG	Cell Signaling, Danvers, USA

Tabelle 7: Neutralisierende Antikörper

Antikörper	Konzentration	Klon	Spezies Isotyp	Firma
Anti-Maus-IL-23 p19 <i>functional grade purified</i>	0,01 – 1,0 µg/ml	G23-8	Ratte IgG _{1, κ}	Ebioscience, San Diego, USA
Anti-Maus-IL-6 <i>functional grade purified</i>	0,01 – 1,0 µg/ml	MP5- 20F3	Ratte IgG _{1, κ}	Ebioscience, San Diego, USA
Anti-Maus-IL-1α <i>functional grade purified</i>	0,01 – 1,0 µg/ml	ALF-161	Hamster IgG	Ebioscience, San Diego, USA

Tabelle 8: T-Zell-aktivierende Antikörper

Antikörper	Konzentration	Klon	Spezies Isotyp	Firma
Anti-Maus-CD3-Antikörper	100 ng/ml	17A2	Ratte IgG _{2b, κ}	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Maus-CD28-Antikörper	10 ng/ml	37.51	Hamster IgG	Biolegend, San Diego, USA

4.5 Zytokine

Tabelle 9: Zytokine

Zytokin	Firma
Rekombinantes murines IFN- γ	Peprotech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes murines IL-1 α	Peprotech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes murines IL-6	Peprotech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes murines IL-22	Peprotech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes murines IL-23	Biolegend, San Diego, USA
Rekombinanter muriner <i>granulocyte colony stimulating factor</i> (G-CSF)	Peprotech, Rocky Hill, USA
Rekombinantes murines TNF- α	Peprotech, Rocky Hill, USA

4.6 Oligodesoxyribonukleotide

Die Auswahl der Primersequenz erfolgte über die Genbank des *National Center of Biotechnology Information*. Alle für diese Arbeit verwendeten *Primer* wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

Tabelle 10: PCR-Primer

Primer	Sequenz
IL-22RA1 vorwärts	5'-CTA CGT GTG CCG AGT GAA GA-3'
IL-22RA1 rückwärts	5'-AAG CGT AGG GGT TGA AAG GT-3'
β -Aktin vorwärts	5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC-3'
β -Aktin rückwärts	5'-AGC CAA GTC CAG ACG CAG G-3'

4.7 Versuchstiere, Zellkultur und Zellgewinnung

4.7.1 Tumorzelllinien

Tabelle 11: Tumorzelllinien

Zelllinie	Ursprung	Tumorentität	Mausstamm	Medium
4T1	Brustdrüse	Karzinom	BALB/c	DMEM
B16	Haut	Melanom	C57BL/6	DMEM
<i>Lewis Lung Carcinoma</i>	Lunge	Karzinom	C57BL/6	DMEM
<i>Lung cancer cell line 1</i>	Lunge	Karzinom	BALB/c	RPMI
Panc02	Pankreas	Karzinom	C57BL/6	DMEM

4.7.2 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Für unsere Tiermodell-Versuche wurde mit Wildtyp-Balb/c-Mäusen im Alter von 7 Wochen gearbeitet. Die Tiere stammten von der Firma Janvier Labs (Saint Berthevin, Frankreich)

4.7.2.1 Tumorinduktion

Die Tumorzellen wurden zunächst, wie in Abschnitt 4.7.5.1 beschrieben, gewaschen. Dabei wurden die Zellen zur Vereinzelnung mehrmals mit einer 20 G-Kanüle resuspendiert. Unter Ausschluss der toten Zellen aus der Zählung durch den Trypanblau-Test wurden mit einer 27 G-Kanüle 10^6 Tumorzellen in 200 μ l PBS subkutan in die rechte Flanke der Balb/c-Mäuse injiziert. Die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe bestanden aus jeweils 3 Mäusen. Der Kontrollgruppe wurde 200 μ l PBS ohne weitere Zusätze gespritzt. Der Versuch wurde nach 21 Tagen beendet.

4.7.3 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem Anteil von 5% CO₂ inkubiert. Vor dem Erreichen der Maximaldichte wurden die Zellen subkultiviert. Falls nötig wurde das Zellmedium zwischenzeitlich erneuert.

4.7.4 Tierversuche und Zellgewinnung aus Organen

Die Spendermäuse wurden durch Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Daraufhin wurde das Fell der Maus desinfiziert und die entsprechenden Organe entnommen. Die Milz, die Leber, der Magen, die Nieren und der Tumor wurden von ventral aus dem eröffneten Situs freipräpariert und in einem mit PBS gefülltem 50-ml-Röhrchen auf Eis gelagert.

4.7.5 Weiterverarbeitung der Zellen

4.7.5.1 Waschen, Einzelzellsuspension und Zellzählung

Der Überstand in der Kulturflasche wurde verworfen und die adhärennten Zellen durch einmaliges Spülen mit PBS vom Medium befreit. Zur Ablösung der Zellen wurde die restliche Flüssigkeit durch 5 ml Trypsin ersetzt und für 3 bis 5 Minuten in den Inkubator

bei 37 °C gestellt. Durch die Zugabe von 5 ml Medium wurde die Reaktion anschließend gestoppt, die Zellsuspension in ein 50-ml-Röhrchen überführt und bei 400x g und 5 °C für 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde restlos entfernt, das Zellpellet in PBS resuspendiert und erneut bei 400x g und 5 °C für 7 Minuten zentrifugiert.

Zur Einzelzellsuspension der Tumorzellen in Kultur reichte in der Regel das mehrmalige Auf- und Abpipettieren mit einem elektrischen Pipettierhelfer. Milzen und resezierte solide Tumoren aus Mäusen wurden mit einem Skalpell zerteilt und mit dem Stempel einer 5 ml Einwegspritze vorsichtig auf einem 40 µm-Zellsieb zerdrückt. Durch Spülen des Zellsiebes mit PBS (Milz) oder Medium (Tumoren) wurden die vereinzelt Zellen in einem 50-ml-Röhrchen aufgefangen. Die Milzzellen wurden zusätzlich erylysiert und anschließend wie oben beschrieben gewaschen.

Die Zellzahl wurde anschließend mithilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ermittelt. Durch die Zugabe von Trypanblau im Verhältnis 1 : 10 wurden tote Zellen blau angefärbt und von der Zählung ausgeschlossen.

4.7.5.2 Zelllysate

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen, wie in Abschnitt 4.7.5.1 beschrieben, verarbeitet und eine abgezählte Fraktion von 5×10^6 Zellen in 100 µl Lysepuffer gelöst. Nach 30 Minuten auf Eis wurde die Probe bei 13.200x g und einer Temperatur von 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand stellte das fertige Zelllysate dar.

4.7.6 Organ- und Tumorlysate

Mörser und Stößel wurden auf -80 °C gekühlt. Anschließend wurden die entsprechenden Organe und Tumoren direkt nach Entnahme mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und mithilfe von Stößel und Mörser pulverisiert. Nach Überführung in ein 50-ml-Röhrchen und Hinzugabe von 50 bis 250 µl Lysepuffer, wurde das Gewebe für 15 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 12.000x g und einer Temperatur von 0 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand stellt das fertige Lysat dar.

4.8 Proteinmengenbestimmung mittels Bradford

Die Methode wurde nach dem Bio-Rad DC Protein Assay Protokoll durchgeführt.

4.9 IL-22-Stimulationsversuche

Für dieses Experiment wurden fünf verschiedene Bedingungen getestet. Die Stimulation erfolgte mit 100 ng/ml IL-22 für 10, 30 und 60 Minuten sowie ohne IL-22 (Negativkontrolle) und mit 100 ng/ml IL-6 (Positivkontrolle). Dabei wurden zuvor für jede Bedingung 10^6 Zellen in einer 6-Loch-Platte ausplattiert. Nach Erreichen einer Konfluenz größer als 90 % wurde das Medium abgenommen, die Zellen zwei Mal gewaschen und mit 1 ml Opti-MEM ohne FBS für vier Stunden kultiviert. Nach Ablauf der Serumdeprivation wurden die Zellen wiederum zweimal gewaschen und für die oben angegebenen Zeitlängen und Konditionen stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen trypsiniert, gewaschen und lysiert.

4.10 Western blot

4.10.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Größenauftrennung von Proteingemischen nach Molekülmasse. Hierzu kamen ein 5%-Sammelgel, 10%-Trenngel und 1-fach Laufpuffer zur Anwendung.

4.10.1.1 Vorbereitung und Laden der Proben

Auf jedes Gel wurden 5 μ l *Pageruler plus prestained* von Thermo Scientific aufgetragen. Die Gesamtproteinmenge und das Volumen der Proben wurden anschließend angepasst und mit der entsprechenden Menge an 6-fachem Lämmli-Puffer versehen. Nach 5-minütiger Denaturierung auf 99 °C im ThermoMixer wurden die Proben in die Gel-Taschen geladen. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 100 V gestartet und nach circa 90 Minuten gestoppt, bevor die gefärbte Bande das Ende des Gels erreichte. Das gesamte Auftragungsvolumen betrug bei großen Kämmen 30 μ l und bei kleinen Kämmen 20 μ l.

4.10.2 Proteinanalyse

Zur Übertragung der Proteine verwendeten wir das *Wet-Transfer-Verfahren* mit einer Stromstärke von 360 mA für 60 Minuten in Verbindung mit einer Nitrozellulose-Trägermembran. Anschließend wurde die Membran durch kurzes Schwenken in TBS-T von dem restlichen Transferpuffer befreit und in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Die Membran wurde für 1 Stunde in 5 ml BSA-Blockpuffer bei Raumtemperatur und unter ständiger Bewegung auf dem Rollenmischer geblockt. Im Anschluss durchtrennten wir die Membran auf Höhe der 55-kDa-Bande. Der obere Teil wurde mit dem gewünschten Primärantikörper und das untere Stück zur Ladekontrolle mit dem β -Aktin-HRP-gekoppelten Antikörper behandelt. Beide Teile wurden über Nacht bei 4 °C in Magermilch-Blockpuffer inkubiert. Nach mindestens 3 Waschschritten mit TBS-T zu jeweils 5 bis 10 Minuten wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur in Magermilch-Blockpuffer inkubiert und anschließend erneut 3 Mal auf die gleiche Weise gewaschen.

4.11 *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Der ELISA wurde gemäß dem Protokoll des „*Mouse IL-22 construction kit #RMF222CK*“ durchgeführt.

4.12 Polymerase-Kettenreaktion

Die Isolierung der RNA und Umschreibung in cDNA wurde nach den Anleitungen des *InviTrap Spin Universal RNA Mini Kit* und des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* durchgeführt. Die PCR erfolgte gemäß des Protokolls der Taq-DNA-Polymerase von Thermo Scientific. Zusätzlich wurden 2 μ l Moltaq, ein PCR-Verstärker der Firma Molzym, pro 50 μ l Reaktionsvolumen hinzugefügt. Die amplifizierte DNA wurde mit Hilfe eines 2 % Agarosegel nach Größe aufgetrennt und im Alpha Imager der Firma Alpha Innotech detektiert.

4.13 *Scratch assay*

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten in Zellmedium ausplattiert und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Die Oberfläche wurde anschließend mit einer 1 ml Pipettenspitze angeritzt (*scratch*), drei Mal gewaschen und durch Opti-MEM mit 0 ng/ml oder 100 ng/ml IL-22 ersetzt. Die Wundstellen wurden mit

einem Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop digital abgebildet und direkt nach Wundsetzung (0 Stunden), 24 Stunden und 48 Stunden erstellt. Die Positionen wurden mit dem ersten Bild gespeichert und konnten zu den späteren Zeitpunkten durch die Software Leica LAS AF automatisch angefahren werden. Die Wundfläche wurde mit der Software ImageJ berechnet. Mit Hilfe der unten angegebenen Formeln konnte aus der Wundfläche die verheilte Fläche nach 24 Stunden und daraus folgend ein Wundheilungsunterschied in Prozent nach 24 Stunden errechnet werden:

$$\text{Verheilte Fläche (24 h)} = \text{Wundfläche (0 h)} - \text{Wundfläche (24 h)}$$

$$\text{Wundheilung [\%]} = \frac{\text{Verheilte Fläche (24 h; stimuliert)} \times 100}{\text{Verheilte Fläche (24 h; unstimuliert)}}$$

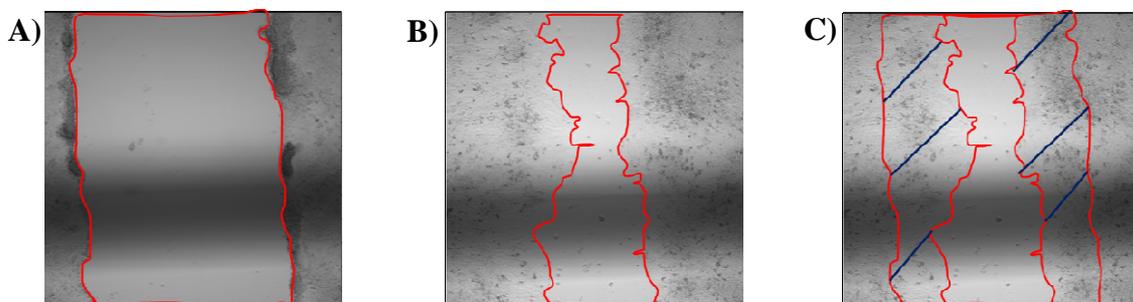


Abbildung 4: Berechnung der verheilten Fläche des scratch assay: Die Wundränder sind rot umrandet. (A) Wundfläche zum Zeitpunkt 0 direkt nach Wundsetzung. (B) Wundfläche 24 Stunden nach Wundsetzung. (C) Darstellung der verheilten Fläche durch Überlagerung der Wundflächen. Der schwarz-schraffierte Bereich ist die verheilte Fläche nach 24 h.

4.14 Zytokinreihentestung

Der Zytokin-Array der Firma R&D Systems ist ein Verfahren, das es ermöglicht, 40 Zytokine semiquantitativ in einer einzelnen Messung zu bestimmen. Das Ergebnis wurde durch den LAS-4000mini *luminescent image analyzer* digitalisiert. Die Auswertung erfolgte durch die Densitometrie mittels ImageJ. Hierfür wurde eine 45×45 Pixel große kreisrunde Maske über jeden Platzhalter des zu bestimmenden Proteins gelegt und der mittlere Grauwert ermittelt. Nach Abzug des durchschnittlichen Hintergrundrauschens wurden die verschiedenen Konditionen miteinander verglichen.

4.15 Stimulation von Splenozyten

Aus dem Milzgewebe gewonnene Zellen werden nachfolgend als Milzzellen oder Splenozyten zusammengefasst. Die Milz wurde wie in Abschnitt 4.7.4f beschrieben

entnommen und verarbeitet. Darauf folgte die Stimulation der Splenozyten in der gewünschten Kondition für eine Dauer von 2 bis 6 Tagen.

4.15.1 Kokultur von Tumor- und Milzzellen

In der Kokultur wurden Splenozyten mit Tumorzellen im Verhältnis 2 zu 1 ausplattiert. Die Zellzahl betrug für die Splenozyten 2×10^6 pro ml und für die Tumorzellen 10^6 pro ml. Die Versuche wurden je nach erforderlicher Überstandsmenge in 96-Loch-Platten mit 200 μ l oder in 6-Loch-Platten mit 1 ml durchgeführt. Als Medium wurde zur einer Hälfte RPMI und zur anderen Hälfte das entsprechende Tumorzellmedium verwendet (Tabelle 11).

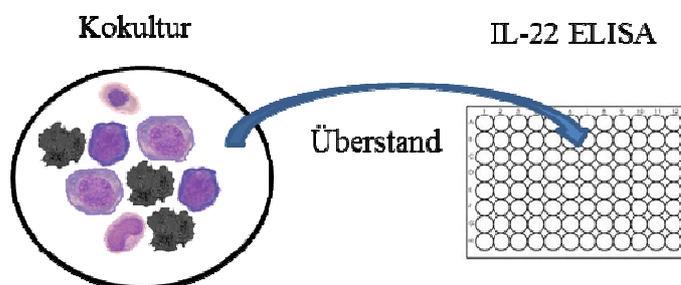


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kokultur von Tumor- und Milzzellen

4.15.2 Stimulation von Splenozyten mit Tumorzellkulturüberstand

Gewinnung des Tumorzellkulturüberstandes

Die Tumorzellen wurden bei hoher Konfluenz von $> 90\%$ in einer 175 cm² Zellkulturflasche auf 1 : 10 geteilt und mit frischem Zellmedium (siehe Tabelle 11) versetzt. Nach 3 Tagen wurde das Zellmedium abgenommen, für 7 Minuten bei 400x g zentrifugiert und als Tumorzellkulturüberstand benutzt.

Stimulation mit Tumorzellkulturüberstand

Die Splenozytenkonzentration betrug 2×10^6 pro ml. Als Medium wurde zu einer Hälfte RPMI und zur anderen Hälfte der gewonnene Tumorzellkulturüberstand eingesetzt. In 96-Loch-Platten betrug das Gesamtvolumen 200 μ l, in 6-Loch-Platten 1 ml.

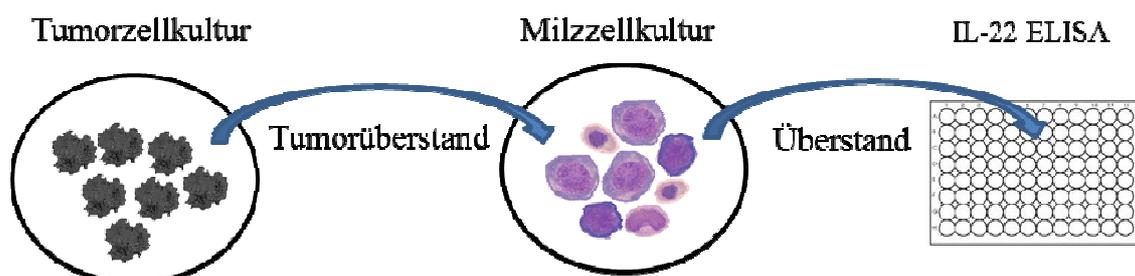


Abbildung 6: Stimulation von Splenozyten mit Tumorzellkulturüberstand

4.15.3 Zytokinstimulation von Splenozyten

Zur Zytokinstimulation der Splenozyten wurden 4×10^5 Splenozyten in 100 μ l RPMI mit der gewünschten Zytokinkonzentration in 100 μ l RPMI in 96-Loch-Platten vermischt. Die Gesamtzellzahl der Splenozyten betrug 4×10^5 in 200 μ l Gesamtvolumen.

4.16 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen erfolgten mit der Software Graphpad Prism Version 5.0 für Microsoft Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Die experimentellen Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der ungepaarte Student's T-Test herangezogen. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet bei $p \leq 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Effekte von Interleukin-22 auf Tumorzellen

Zunächst sollte die Expression der IL-22RA1-Untereinheit auf den zu verwendenden Tumorzellen geprüft werden, als Voraussetzung für deren Reaktivität auf IL-22. Ziel des nächsten Schrittes war es, die Wirkung von IL-22 auf die Phosphorylierung von STAT3 nachzuweisen und damit die Auswahl der Zelllinien für die nachfolgenden Experimente einzuschränken.

5.1.1 Untersuchung der Tumorzelllinien auf IL-22RA1-Expression

Um funktionelle Versuche mit IL-22 durchzuführen, müssen die Tumorzellen den IL-22-Rezeptor besitzen. Hierfür haben wir zunächst die Expression der Tumorzelllinien 4T1, B16, LLC und Panc02 auf IL-22-RA1-mRNA untersucht. Die erfolgreiche Amplifikation zeigte die Expression von IL-22RA1 auf RNA-Ebene an. Durch den Proteinnachweis von IL-22RA1, mithilfe der *Western-blot*-Methode, haben wir das Ergebnis in drei voneinander unabhängigen Versuchen validiert.

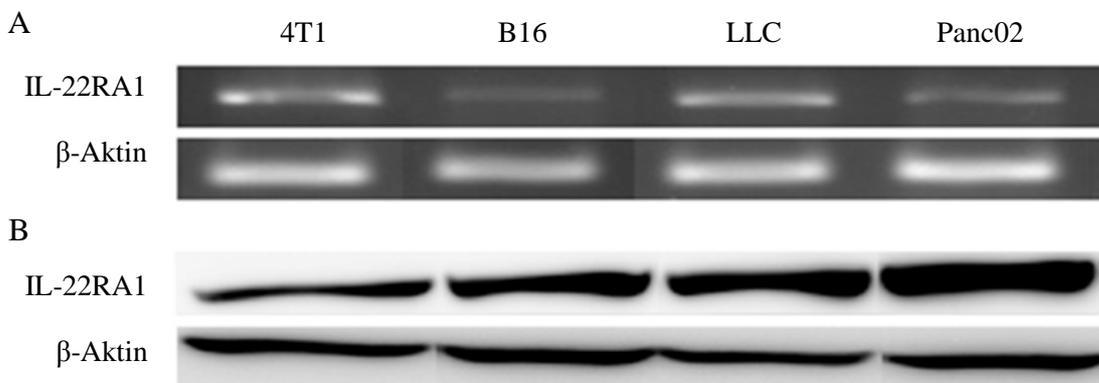


Abbildung 7: Nachweis der IL-22RA1-Untereinheit in murinen Tumorzelllinien: (A) Agarose-gelelektrophorese: Nachweis der IL-22RA1-mRNA durch PCR-Amplifikation der cDNA aus Zelllysaten der murinen Tumorzelllinien 4T1, B16, LLC und Panc02. Die Visualisierung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die amplifizierte Sequenz betrug für IL-22Ra1 189 Basenpaare (bp) und für β -Aktin 66 bp. Alle Banden stammen aus demselben Versuch und wurden nachträglich mit Microsoft Paint in alphabetischer Reihenfolge, ohne weitere Nachbearbeitung, angeordnet. Der Versuch wurde ein Mal durchgeführt. **(B) *Western blot*:** Nachweis der Expression von IL-22RA1 in den Tumorzelllinien 4T1, B16, LLC und Panc02. Je Probe wurde 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Die Banden stammen aus demselben Versuch und wurden nachträglich mit Microsoft Paint in alphabetischer Reihenfolge, ohne weitere Nachbearbeitung, angeordnet. Gezeigt ist das repräsentative Ergebnis aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

5.1.2 Evaluation der Funktionalität des IL-22-Signalweges in den Zelllinien

Die IL-22-Signaltransduktion verläuft hauptsächlich über die Phosphorylierung von STAT3. Durch die Stimulation mit IL-22 soll gezeigt werden, dass dieser Hauptsignalweg in unseren getesteten Tumorzellen aktiviert wird. Gleichzeitig ist die Phosphorylierung von STAT3 ein Nachweis eines funktionalen IL-22RA1-IL-10RB2-Rezeptorkomplexes.

In allen getesteten Tumorzelllinien wurde nach der Stimulation mit IL-22 die Aktivierung von STAT3 durch die Detektion von p-STAT3 beobachtet (Abbildung 8; Tabelle 12). Da 4T1 im Durchschnitt den größten quantifizierbaren Intensitätssprung in der Phosphorylierung zeigte (Abbildung 8 und 9; Tabelle 12), wurde diese Zelllinie bevorzugt für unsere nachfolgenden Versuche ausgewählt.

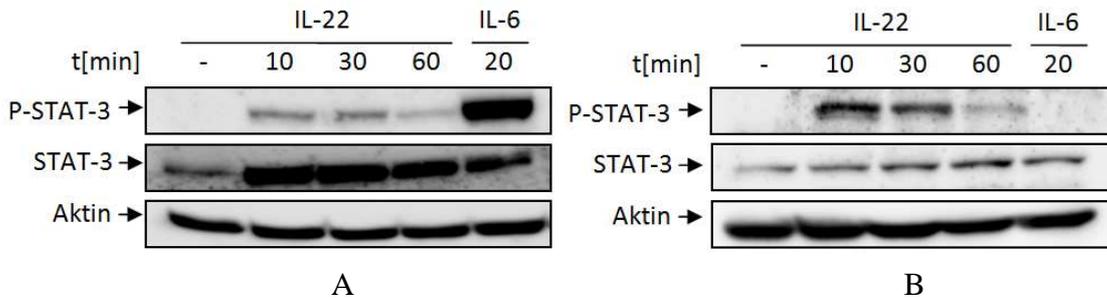


Abbildung 8: Phosphorylierung von STAT3 durch IL-22-Stimulation in (A) 4T1- und (B) LCCL1-Tumorzellkulturen (Western blot): Die Tumorzellen wurden 4 Stunden in *Opti-MEM* inkubiert. Anschließend wurden sie unstimuliert oder für die Zeitspanne von 10, 30 oder 60 Minuten mit 100 ng/ml IL-22 stimuliert und die Phosphorylierungszustände von STAT3 im *Western blot* detektiert. IL-6 diente als Positivkontrolle. Als Ladekontrolle wurden STAT3 und β -Aktin verwendet. Anti-p-STAT3-Antikörper wurde hierzu entweder von der Membran *gestrippt* oder ein separater STAT3 *Western blot* mit gleicher Proteinmenge geladen. Die Gesamtproteinmenge betrug pro Probe 50 μ g. (A) + (B) Die Abbildungen zeigen repräsentative *Western blots* der Tumorzelllinien 4T1 und LCCL1 aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Im unstimulierten Zustand war in beiden Zelllinien kein phosphoryliertes STAT3 detektierbar. Die Stimulation der Zellen mit IL-22 für 10 und 30 Minuten resultierte in einer deutlichen Phosphorylierung von STAT3. Im Vergleich dazu nahm die Intensität der p-STAT3 Bande nach 60 Minuten wieder ab. (A) 4T1-Zellen zeigten eine deutliche Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6. (B) LCCL1-Zellen zeigten keine Phosphorylierung im Sinne einer Aktivierung von STAT3 nach Stimulation mit IL-6.

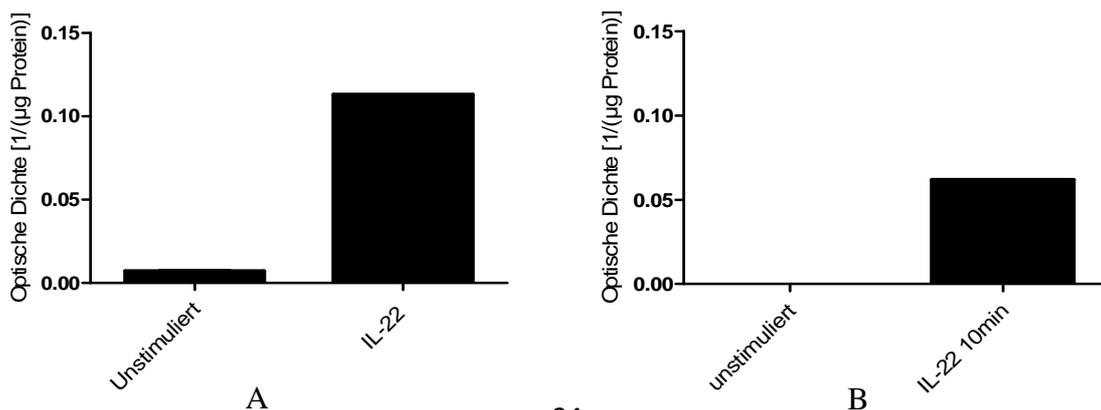


Abbildung 9: Phosphorylierung von STAT3 durch IL-22-Stimulation in (A) 4T1- und (B) LCCL1-Tumorzellkulturen (ELISA): Die 4T1- und LCCL1-Tumorzellen wurden für 4 Stunden in *Opti-MEM* inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit 100 ng/ml IL-22 stimuliert. Die unstimulierte Probe wurde für diesen Zeitraum im Brutschrank gelagert. Im Anschluss wurde der relative Gehalt an p-STAT3 durch einen ELISA bestimmt. Der einmalige Versuch diente der Validierung der Ergebnisse der p-STAT3 *Western blots* mit der Hilfe eines anderen Verfahrens. Das Hintergrundsignal des Lysepuffers wurde von den Werten der optischen Dichtemessung abgezogen und das Ergebnis auf 1 µg Protein korrigiert. **(A)** p-STAT3 stieg nach der Stimulation mit IL-22, im Vergleich zur unstimulierten Probe, auf mehr als das 15-Fache des Ausgangswertes an. Das Ergebnis stimmt mit den *Western blots* dieser Zelllinie aus Abbildung 8 überein. **(B)** p-STAT3 war im unstimulierten Zustand der Zellen nicht detektierbar. Übereinstimmend mit unseren *Western blots* wurde STAT3 durch die Stimulation mit IL-22, in Form von p-STAT3, aktiviert.

Tabelle 12: Densitometrie der *Western blots* von 4T1, B16, LCCL1, LLC und Panc02

Stimulation [min]	p-STAT3 Relative Dichteverteilung genormt auf die unstimulierte Probe				
	0	10 (IL-22)	30 (IL-22)	60 (IL-22)	20 (IL-6)
4T1 (n = 2)	1	29,5	26,6	11,9	125,1
B16 (n = 3)	1	1,4	2,4	2,7	1,5
LCCL1 (n = 2)	1	21,9	18,2	6,0	1,6
LLC (n = 2)	1	1,7	2,3	1,5	31,3
Panc02 (n=3)	1	2,4	2,3	1,2	7,5

Beschreibung Tabelle 12: Zum Vergleich der p-STAT3-Intensität nach IL-22-Stimulation wurde die Dichteverteilung der einzelnen *Western-blot*-Banden über die integrierte Gelanalysenfunktion von ImageJ berechnet. Die stimulierten Zustände wurden in dieser Funktion automatisch auf die unstimulierte Probe normalisiert. Angegeben ist der Mittelwert aus 2 (n = 2) oder 3 (n = 3) voneinander unabhängigen Versuchen.

5.1.3 *Scratch assay* mit 4T1-Tumorzellen

Durch die Stimulation mit IL-22 waren unter dem Mikroskop, bereits per Augenmaß, deutliche Unterschiede in der Wundheilung sichtbar (Abbildung 10A). Dieser Effekt war sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden zu erkennen. Die Aufnahmen nach 24 Stunden wurden zur Berechnung herangezogen. Die verheilten Flächen mit und ohne IL-22-Stimulation zeigten zueinander einen signifikanten Unterschied (Abbildung 10B).

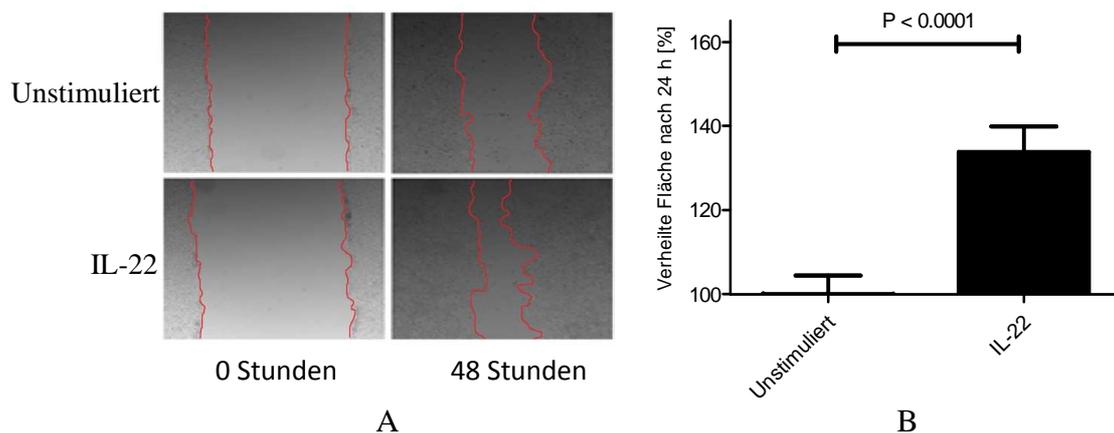


Abbildung 10: IL-22 stimuliert die Wundheilung im *Scratch assay*: Die konfluierte 4T1-Zellschicht wurde mit einer Pipettenspitze angeritzt, mit Opti-MEM versehen und mit einem Leica-TCS-SP5-Konfokalmikroskop digital gespeichert. Anschließend wurden die Zellen mit oder ohne IL-22 (100 ng/ml) stimuliert. Weitere Fotos erfolgten über einen Zeitraum von 48 Stunden im Abstand von ca. 24 Stunden. **(A)** Die Abbildung zeigt jeweils einen *scratch* ohne Stimulation (oben) oder mit IL-22-Stimulation (unten). Die linken Bilder sind direkt nach Wundsetzung entstanden. Die rechte Seite zeigt den Zustand nach 48 Stunden. Die Wundränder wurden farblich rot markiert. **(B)** Der Vergleich zwischen den verheilten Flächen zeigt eine signifikante Steigerung des Wundschlusses nach IL-22-Stimulation. Angegeben ist das Ergebnis aus 3 voneinander unabhängigen Versuchen, bestehend aus insgesamt 24 Einzelmessungen nach 24 Stunden.

5.2 IL-22-Gehalt muriner Organe und Tumoren

In den Versuchsmäusen erfolgte die Tumorinduktion und Weiterverarbeitung wie in 4.7.2.1f beschrieben. Anschließend wurde ein Teil eines 4T1- und eines LCCL1-Tumorresektates für 3 Tage kultiviert. Obwohl diese Tumorzelllinien selbst kein IL-22 produzieren, wiesen wir in den Überständen der kultivierten Tumorresektate IL-22 nach (Abbildung 11). In der zusätzlichen Organanalyse sahen wir zudem eine Divergenz des IL-22-Gehaltes zwischen den unstimulierten Organlysaten von tumortragenden Mäusen und gesunden tumorfreien Mäusen (Abbildung 12). Während jeweils die Magen- und Nierenlysate von tumortragenden Mäusen und den Kontrollmäusen ähnliche IL-22-Konzentrationen aufwiesen, detektierten wir in den Milzen tumortragender Mäuse geringere IL-22-Konzentrationen als in der Kontrollgruppe.

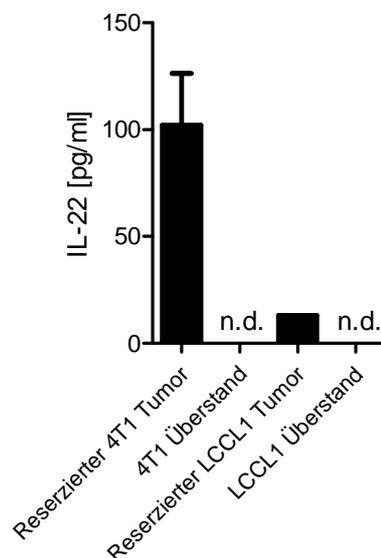


Abbildung 11: IL-22-Gehalt resezierter Tumoren: Den Versuchstieren wurden 10^6 4T1- oder 10^6 LCCL1-Zellen subkutan injiziert. Die Kontrollmäuse wurden mit PBS behandelt. Nach 21 Tagen wurden die Tumore, Milzen und weitere Organe entnommen. Teile eines resezierten 4T1-Tumors und eines resezierten LCCL1-Tumors wurden nach Vereinzeln der Zellen auf eine 96-Loch-Platte mit 200 μ l RPMI (Gesamtzellzahl 4×10^5) in einer Mono- oder Duplikatkultur ausplattiert und für drei Tage kultiviert. Anschließend wurde der IL-22-Spiegel mit einem IL-22-ELISA bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert. Im Vergleich war im Überstand von mindestens 2 voneinander unabhängigen Versuchen kultivierter 4T1-Zellen ($n = 3$) und kultivierter LCCL1-Zellen ($n = 2$) keine IL-22-Sekretion messbar. n.d., nicht detektierbar.

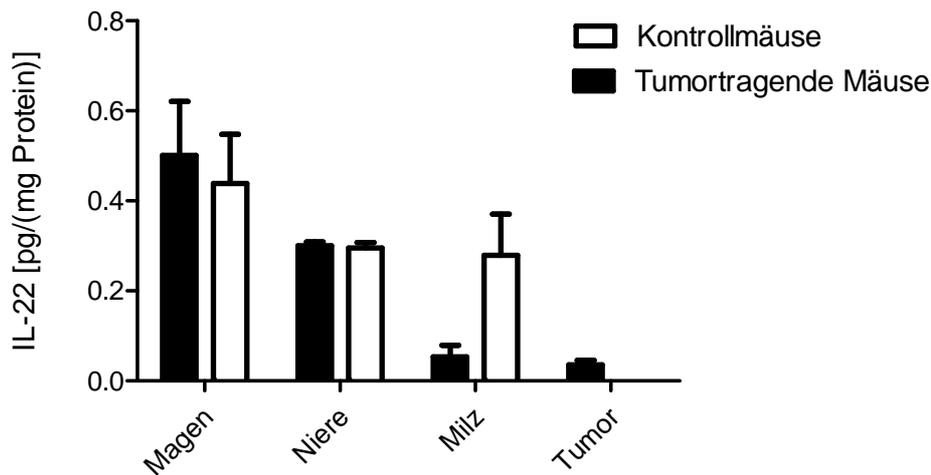


Abbildung 12: IL-22-Gehalt muriner Organe: Den Versuchstieren wurden 10^6 4T1-Zellen subkutan gespritzt. Die Kontrollmäuse wurden mit PBS behandelt. Nach 21 Tagen wurden die Tumoren, Milzen und weitere Organe entnommen. Die Organlysate von tumortragenden 4T1-Mäusen ($n = 3$) und Kontrollmäusen ($n = 3$) wurden im ELISA als Triplikat aufgetragen und auf IL-22 analysiert. In Magen und Niere war das enthaltene IL-22 in beiden Gruppen auf einem ähnlichen Niveau. In der Milz tumortragender Mäuse war IL-22 in geringerem Umfang detektierbar.

5.3 Stimulation von Milzzellen durch Tumorzellen

Obwohl 4T1- oder LCCL1-Tumorzellkulturen kein IL-22 produzieren, konnten wir in unserem vorausgegangen Versuch IL-22 in resezierten 4T1- und LCCL1-Tumoren detektieren. IL-22-produzierende Zellen müssen daher den Tumor infiltriert haben. Durch die Organlysate der Kontrollmäuse und tumortragender Mäuse erhielten wir den Hinweis, dass die IL-22⁺-Zellen möglicherweise aus der Milz rekrutiert und durch Tumorzellen zur IL-22-Produktion stimuliert wurden. Diese Annahme haben wir durch eine Kokultur aus Tumorzellen und Splenozyten simuliert.

Ohne Stimulus setzen Splenozyten kein IL-22 frei. In der Kokultur, bestehend aus Splenozyten und 4T1- oder LCCL1-Tumorzellen, konnten wir IL-22 im Überstand nachweisen (Abbildung 13A und 13B). In weiterführenden Versuchen inkubierten wir Splenozyten mit dem Überstand aus Tumorzellkulturen. In dieser Versuchskonstellation detektierten wir höhere Mengen an IL-22 als in der Kokultur (siehe Abbildung 14A und 14B). Eine ähnliche Beobachtung haben wir für die Tumorzelllinie Panc02 festgestellt (Ergebnis nicht gezeigt).

Daraus ergibt sich für unsere weiteren Versuche, dass 1.) Tumorzellen Splenozyten stimulieren können und dies zur Sekretion von IL-22 führen kann und 2.) die Stimulation der Splenozyten durch Tumorzellen auf der Sekretion von Molekülen beruht und kein Zell-Zellkontakt notwendig ist (siehe Abbildung 14).

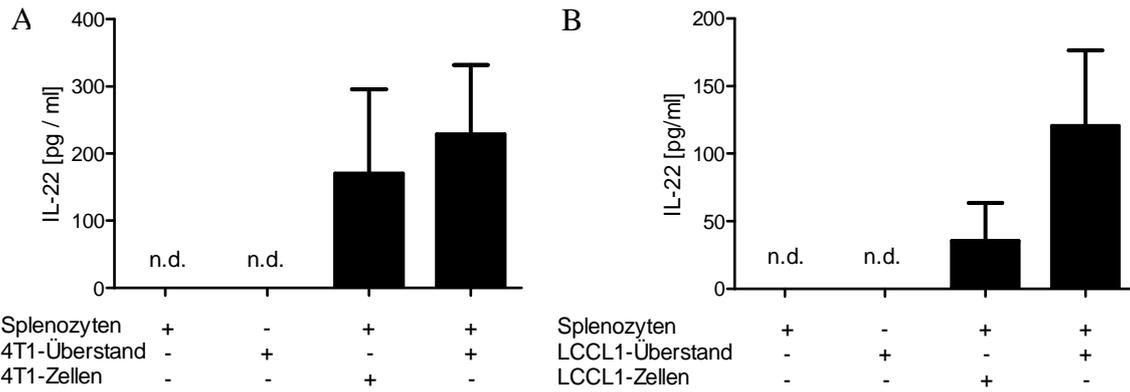


Abbildung 13: Induktion von IL-22 in Splenocyten durch (A) 4T1- und (B) LCCL1-Tumorzellen: Für die Kokultur wurden $0,5 \times 10^6$ oder 1×10^6 Tumorzellen in 500 μ l RPMI oder DMEM und 2×10^6 Splenocyten in 500 μ l RPMI zusammengemischt und in einer 6-Loch-Platte kultiviert. Für die Stimulation der Splenocyten mit Tumorzellkulturüberstand wurden 2×10^6 Splenocyten in 500 μ l RPMI und 500 μ l Tumorzellkulturüberstand ausplattiert. In beiden Versuchen wurde der Überstand nach zwei Tagen entnommen, 7 Minuten bei 400x g zentrifugiert und mit einem IL-22-ELISA analysiert. Zur Gewinnung des Tumorzellkulturüberstandes wurden die Tumorzellen passagiert und in 20 ml Medium überführt. Nach drei Tagen in Kultur wurde der Überstand abgenommen und für 7 Minuten bei 400x g zentrifugiert. Die Ergebnisse für 4T1 und LCCL1 zeigen das kumulative Ergebnis aus zwei bis drei voneinander unabhängigen Versuchen. (A) + (B) Unstimulierte Splenocyten, 4T1- oder LCCL1-Tumorzellen sezernieren kein IL-22. In der Kokultur von Tumorzellen mit Splenocyten, als auch in der Stimulation von Splenocyten durch Tumorzellkulturüberstand war eine Sekretion von IL-22 messbar. n.d., nicht detektierbar.

5.3.1 Zytokinreihentestung

Durch den *Mouse Cytokine Array Panel A* der Firma R&D Systems konnten wir parallel die relative Menge an 40 vordefinierten Zytokinen bestimmen. Damit erhofften wir uns Hinweise auf diejenigen Zytokine zu erhalten, die in unseren Tumorzellkulturüberstand-Splenocytenkulturen zu einer IL-22-Induktion führten. Hierzu verglichen wir das Zytokinmuster der Überstände der mit 4T1- und LCCL1-Tumorüberstand-stimulierten Splenocyten. Es zeigte sich eine messbare gemeinsame Expression von 15 aus 40 Zytokinen unter Exklusion der Chemokine (Abbildung 14).

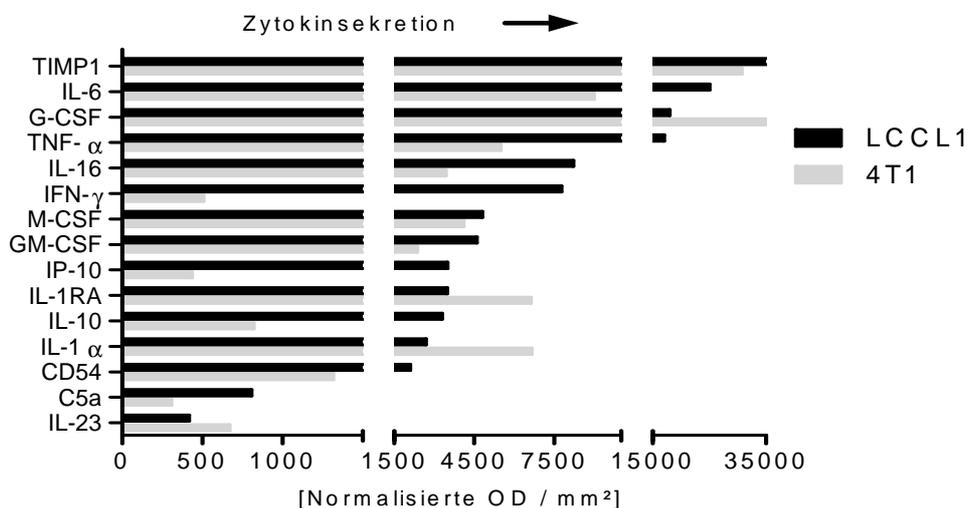


Abbildung 14: Zytokinreihentestung: Es wurde die relative Zytokinexpression von Splenocyten, die mit LCCL1- oder 4T1-Tumorzellkulturüberstand stimuliert wurden, verglichen. Aus den 40 messbaren Zytokinen zeigte sich eine gemeinsame Expression von 14 Zytokinen unter Exklusion der Chemokine. Die relative Expression wurde durch die Grauwertmessung mit ImageJ bestimmt. Jedes Zytokin verfügte in diesem vordefinierten Test über zwei Detektionsplätze. Angegeben ist der Mittelwert.

5.3.2 Überprüfung der Zytokine auf ihre Fähigkeit zur IL-22-Induktion in Splenocyten

Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse und der vorbeschriebenen Literatur untersuchten wir G-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-23 und IL-1 α auf ihr Potenzial IL-22 in Splenocyten zu induzieren. Zytokine, die alleine keine IL-22-Induktion bewirkten, wurden durch die Zugabe von Anti-CD3-Antikörper und Anti-CD28-Antikörper auf eine IL-22-Induktion geprüft. IL-1 α und IL-23 zeigten unabhängig von anderen Faktoren eine Induktion von IL-22. IL-6 erhöhte in Kombination mit anti-CD3/CD28-Antikörpern die IL-22-Ausschüttung im Vergleich zu anti-CD3/CD28-Antikörpern alleine. G-CSF, TNF- α und IFN- γ führten in beiden Versuchskonstellationen zu keiner messbaren IL-22-Induktion (Abbildung 15A und 15B).

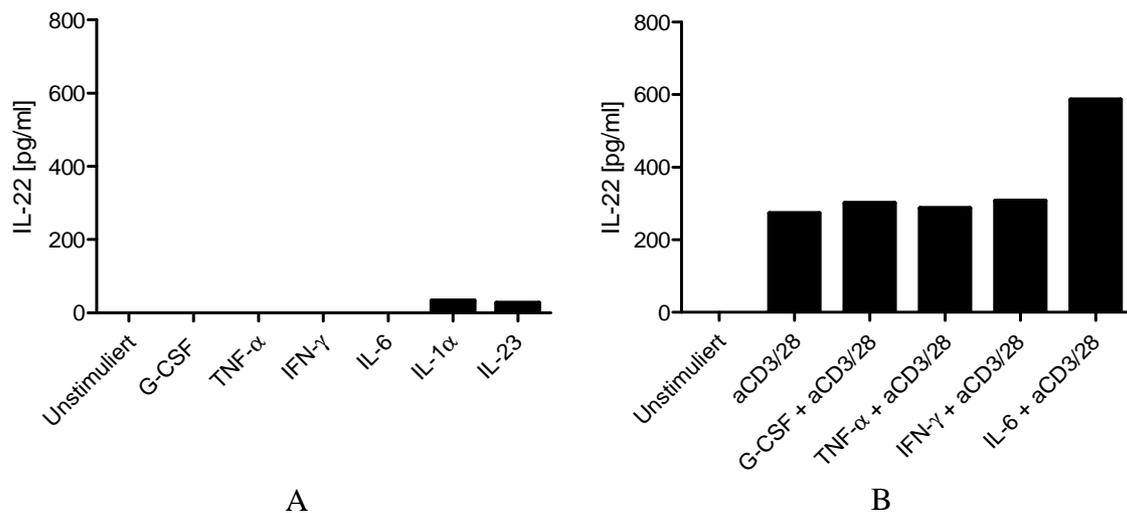


Abbildung 15: Überprüfung der Fähigkeit der identifizierten Zytokine IL-22 in Splenocyten zu induzieren: Für diesen Versuch wurden Splenocyten (2×10^6 pro ml) mit 20 ng/ml G-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 α oder IL-23 für 4 Tage in 200 μ l RPMI stimuliert. Die Zytokine die alleine keine Induktion von IL-22 zeigten, wurden unter den gleichen Bedingungen zusammen mit 100 ng/ml anti-CD3-Antikörper und 10 ng/ml Anti-CD28-Antikörper getestet. Jede Kondition wurde in zwei unterschiedlichen Loch-Kulturen überprüft. Die Abbildungen zeigen die Analyse des Überstandes durch Einzelmessung jeder Loch-Kultur eines Versuches mit einem IL-22-ELISA. Angegeben ist der Mittelwert (A) IL-1 α und IL-23 induzierten IL-22 aus Splenocyten. G-CSF, TNF- α , IFN- γ , IL-6 führten alleine zu keiner Sekretion von IL-22. (B) Die Stimulation der Splenocyten mit anti-CD3/CD28-Antikörper führte zur Sekretion von IL-22. In der Kombination mit den zu untersuchenden Zytokinen, führte nur IL-6 zu einer gesteigerten IL-22-Sekretion.

5.3.3 Bedeutung von IL-1 α , IL-6 und IL-23 in der IL-22-Induktion in einer 4T1-Tumorzellkulturüberstand-Splenozyten-Kultur

Durch unsere Vorversuche konnten wir eruieren, dass IL-1 α , IL-6 und IL-23 prinzipiell in der Lage sind, IL-22 zu induzieren, beziehungsweise dessen Sekretion zu steigern. Um in diesem Zusammenhang die Bedeutung dieser Zytokine in unserem Versuchsmodell zu bestimmen, benutzten wir neutralisierende Antikörper.

In unserem Versuchsmodell hatte die Inhibition von IL-6 keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion von IL-22 in Splenozyten (Abbildung 16). Dagegen erzielte die alleinige Inhibition von IL-23 in der höchsten getesteten Antikörperkonzentration eine signifikante Reduktion von IL-22 (Abbildung 17). Unter den getesteten Zytokinen hatte IL-1 α den größten Einfluss auf die IL-22-Sekretion (Abbildung 18). Das im Überstand gemessene IL-22 nahm bis zu der höchsten IL-1 α -Antikörperkonzentration von 1 μ g/ml ab. Die Kombination aller Anti-Interleukin-Antikörper zeigte sich in ihrer Wirkung additiv (Abbildung 19). Diesbezüglich wurde die IL-22-Sekretion, wie bei der alleinigen Neutralisation von IL-23 (Abbildung 17), bereits in der geringsten Antikörperkonzentration von 0,01 μ g/ml sichtbar gesenkt (Abbildung 19). Ähnlich wie bei der Neutralisation von IL-1 α (Abbildung 18), nahm die IL-22-Konzentration, bei steigender Antikörperkonzentration, kontinuierlich ab (Abbildung 19). Die kombinierte Neutralisation der Zytokine war den Einzelversuchen in allen Antikörperkonzentrationen im Mittelwert überlegen (Vergleiche Abbildungen 16-19).

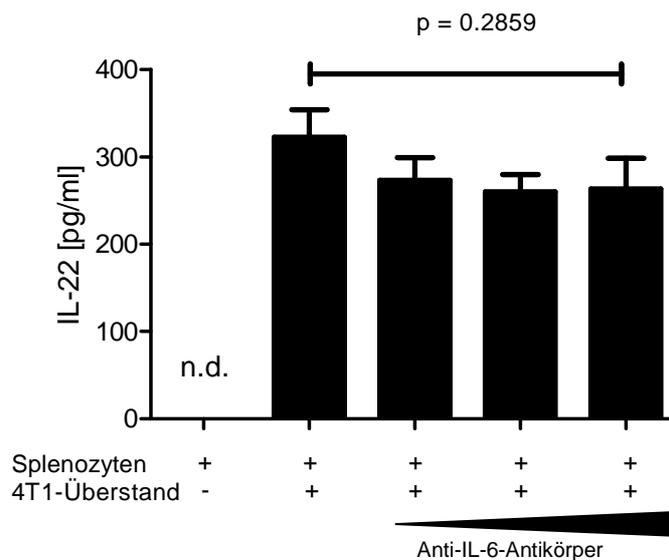
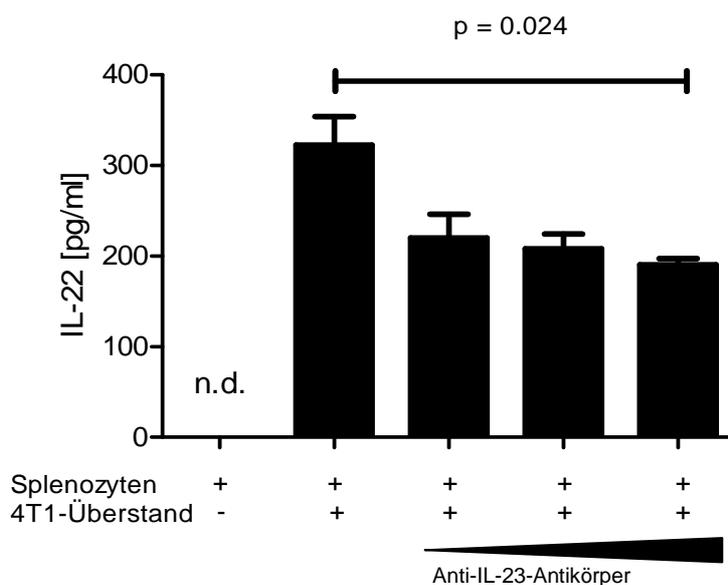


Abbildung 16: Neutralisation von IL-6 in der Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur:

Nach Vorinkubation des Tumorzellkulturüberstandes mit Anti-IL-6-Antikörpern für 45 Minuten, wurden jeweils 100 µl Tumorzellkulturüberstand mit 100 µl Splenozyten (4×10^6 pro ml RPMI) vermischt und in 96-Loch-Platten drei Tage lang kultiviert. Die Vergleichsgruppe enthielt keine neutralisierenden Antikörper. Die Endkonzentration der Antikörper betrug jeweils 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml. Jede Kondition mit Antikörpern wurde in jeweils drei unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet. Die Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur ohne Antikörper wurde in sechs unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet. Die Bestimmung der IL-22-Sekretion erfolgte durch eine Einzelmessung jeder Lochkultur mittels ELISA. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Neutralisation von IL-6 zeigte keine signifikante Reduktion der IL-22-Konzentration. Höhere Konzentrationen an Anti-IL-6-Antikörper konnten die Sekretion an IL-22 nicht weiter senken. Der Tumorzellkulturüberstand der 4T1-Kultur enthielt keine detektierbaren Mengen an IL-22. n.d., nicht detektierbar

**Abbildung 17: Neutralisation von IL-23 in der Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur:**

Nach Vorinkubation des Tumorzellkulturüberstandes mit Anti-IL-23-Antikörpern für 45 Minuten, wurden jeweils 100 µl Tumorzellkulturüberstand mit 100 µl Splenozyten (4×10^6 pro ml RPMI) vermischt und in 96-Loch-Platten drei Tage lang kultiviert. Die Vergleichsgruppe enthielt keine neutralisierenden Antikörper. Die Endkonzentration der Antikörper betrug jeweils 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml oder 1 µg/ml. Jede Kondition mit Antikörpern wurde in jeweils drei unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet. Die Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur ohne Antikörper wurde in sechs unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet. Die Bestimmung der IL-22-Sekretion erfolgte durch eine Einzelmessung jeder Loch-Kultur mittels ELISA. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Neutralisation von IL-23 führte zu einer signifikanten Reduktion an sezerniertem IL-22. Mit der niedrigsten Antikörperkonzentration von 0,01 µg/ml war das sezernierte IL-22 deutlich reduziert. Steigende Antikörperkonzentrationen führten zu einer geringen jedoch stetigen Reduktion an IL-22. Der Tumorzellkulturüberstand der 4T1-Kultur enthielt keine detektierbaren Mengen an IL-22. n.d., nicht detektierbar

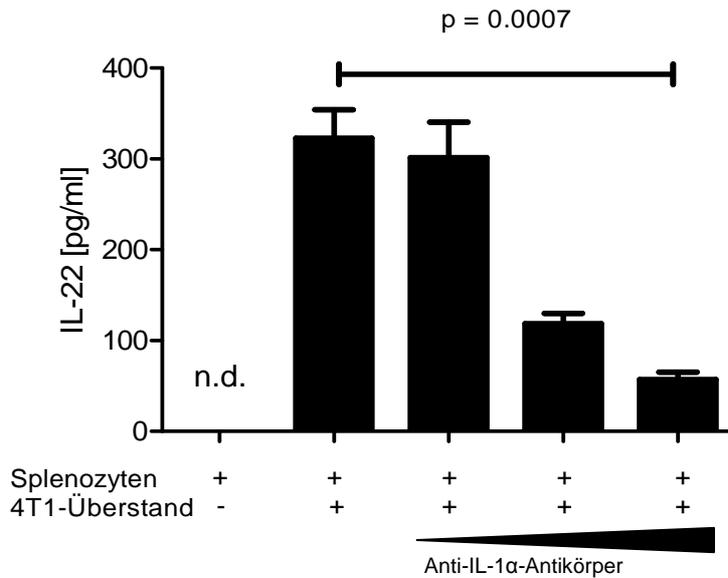


Abbildung 18: Neutralisation von IL-1 α in der Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur:

Nach Vorinkubation des Tumorzellkulturüberstandes mit Anti-IL-1 α -Antikörpern für 45 Minuten, wurden jeweils 100 μ l Tumorzellkulturüberstand mit 100 μ l Splenozyten (4×10^6 pro ml RPMI) vermischt und in 96-Loch-Platten drei Tage lang kultiviert. Die Vergleichsgruppe enthielt keine neutralisierenden Antikörper. Die Endkonzentration der Antikörper betrug jeweils 0,01 μ g/ml, 0,1 μ g/ml oder 1 μ g/ml. Jede Kondition mit Antikörpern wurde in jeweils drei unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet (n = 3). Die Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur ohne Antikörper wurde in sechs unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet (n = 6). Die Bestimmung der IL-22-Sekretion erfolgte durch eine Einzelmessung jeder Loch-Kultur mittels ELISA. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Neutralisation von IL-1 α besaß den größten inhibitorischen Einzeleffekt in der Ausschüttung von IL-22. Die niedrigste Antikörperkonzentration zeigte nur eine minimale Wirkung auf die IL-22-Sekretion. Die Erhöhung der Antikörperkonzentration auf bis zu 1 μ g/ml resultierte in einer kontinuierlichen Abnahme der IL-22-Freisetzung. n.d., nicht detektierbar

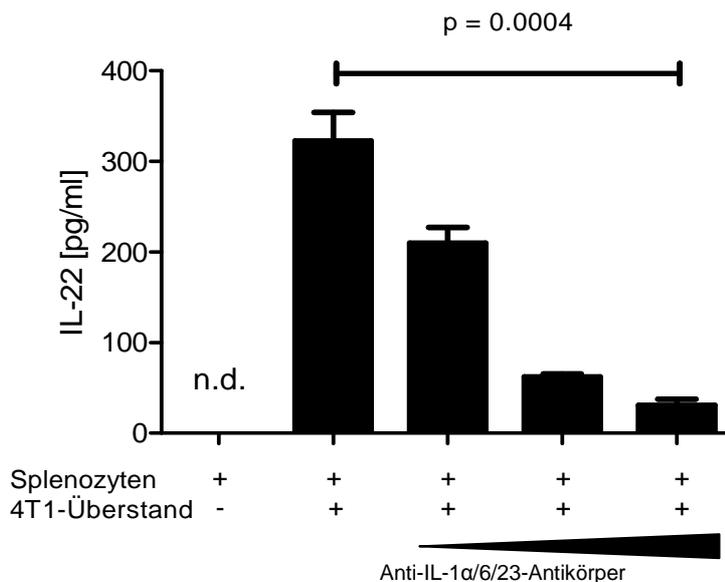


Abbildung 19: Neutralisation von IL-1 α , IL-6 und IL-23 in der Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur: Nach Vorinkubation des Tumorzellkulturüberstandes mit Anti-IL-1 α -/IL-6/-IL-23-Antikörpern für 45 Minuten, wurden jeweils 100 μ l Tumorzellkulturüberstand mit 100 μ l Splenozyten (4×10^6 pro ml RPMI) vermischt und in 96-Loch-Platten drei Tage lang kultiviert. Die Vergleichsgruppe enthielt keine neutralisierenden Antikörper. Die Endkonzentration der Antikörper betrug jeweils 0,01 μ g/ml, 0,1 μ g/ml oder 1 μ g/ml. Jede Kondition mit Antikörpern wurde in jeweils drei unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet. Die Tumorzellkulturüberstand-Splenozytenkultur ohne Antikörper wurde in sechs unterschiedlichen Loch-Kulturen getestet. Die Bestimmung der IL-22-Sekretion erfolgte durch eine Einzelmessung jeder Loch-Kultur mittels ELISA. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die kombinierte Neutralisation von IL-1 α , IL-6 und IL-23 zeigte additive Effekte im Vergleich zu den Einzelversuchen. Bei 0,01 μ g/ml Antikörpern war eine deutliche Abnahme in der IL-22-Sekretion erkennbar. Bis zu der Antikörperkonzentration von 1 μ g/ml zeigte sich eine kontinuierliche Reduktion. Die IL-22-Sekretion war in diesem Versuch im Mittelwert stärker eingeschränkt als in den Einzelversuchen. n.d., nicht detektierbar

5.3.3.1 IL-1 α im reinen Tumorzellkulturüberstand

Nachdem die vorangegangenen Ergebnisse eine besondere Rolle von IL-1 α in der tumorinduzierten IL-22-Induktion darstellten, analysierten wir die relativen IL-1 α -Spiegel im reinen Tumorzellkulturüberstand von 4T1- und LCCL1-Zellen. IL-1 α im Überstand der 4T1-Zellen war deutlich erhöht im Vergleich zum LCCL1-Zellüberstand. IL-23 war in diesem Versuch durch das Detektionslimit nicht aussagekräftig und zeigte keinen signifikanten Unterschied (Ergebnis nicht gezeigt).

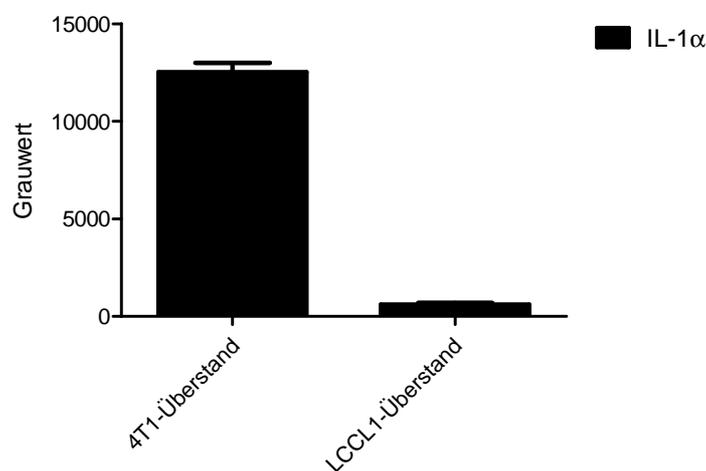


Abbildung 20: IL-1 α im Tumorzellkulturüberstand: Zum Vergleich des relativen IL-1 α -Gehaltes der 4T1- und LCCL1-Tumorkulturen wurde der gleiche Tumorzellkulturüberstand verwendet, der in Versuch 5.2.2 IL-22 in Splenozyten induzierte. Die relative Expression wurde durch die Grauwertmessung mit ImageJ bestimmt. Jedes Zytokin verfügte in diesem vorkonfigurierten Test über zwei Detektionsplätze. Angegeben ist der Mittelwert eines Versuches.

5.3.3.2 Titration von IL-1 α und IL-23

Aus unseren Versuchen war uns bekannt, dass IL-1 α und IL-23 getrennt voneinander und ohne weiteren Stimulus IL-22 induzieren können. In den Neutralisationsversuchen konnten wir außerdem einen kumulativen Effekt beobachten. Diesen wollten wir in einem Stimulationsversuch mit Splenozyten untersuchen. Zusätzlich sollte die Titration Aufschluss über das Ansprechen auf die Zytokine geben. Für die Titration wurde die Konzentration des einen Zytokins konstant gehalten und die des anderen in Zehnerpotenzen verdünnt.

Die Kombination von IL-1 α und IL-23 zeigte sich in der Sekretion von IL-22 aus Splenozyten deutlich synergistisch (Abbildung 21A). Bei konstanter IL-1 α -Konzentration nahm die Induktion von IL-22 mit sinkender IL-23-Konzentration stetig ab (Abbildung 21A). Die Induktion von IL-22 blieb bei gleichem IL-23-Gehalt und 100-facher Verdünnung von IL-1 α konstant (Abbildung 21B).

Mit diesen abschließenden Versuchen konnten wir zeigen, dass die Kombination von IL-1 α mit IL-23 zu einer Ausschüttung von IL-22 führt. Zusätzlich konnten wir eine sehr niedrige Stimulationsschwelle von Splenozyten durch IL-1 α nachweisen. IL-1 α besaß bis in den Pikogramm-Bereich sein volles Potenzial in der Induktion von IL-22, während IL-23 deutlich höhere Konzentrationen erforderte.

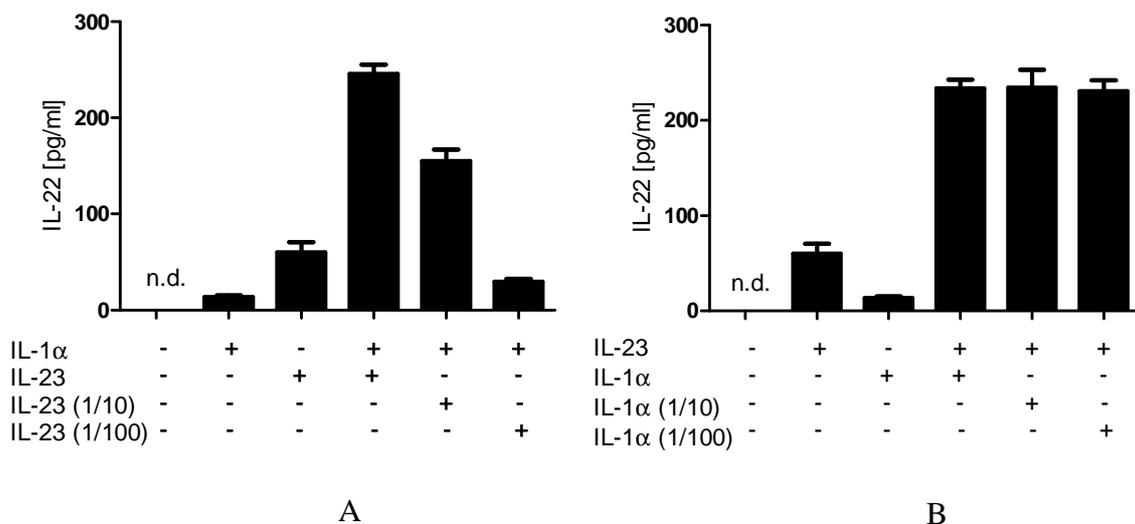


Abbildung 21: Einfluss der Titration von IL-23 und IL-1 α auf die IL-22-Sekretion in Splenozyten: Es wurden 4×10^5 Splenozyten in 200 μ l RPMI mit jeweils 20 ng/ml IL-23 und IL-1 α stimuliert. Zusätzlich wurde eines der beiden Zytokine in Zehnerpotenzen von 20 ng/ml auf 2 ng/ml und 0,2 ng/ml verdünnt, während die Konzentration des anderen konstant auf 20 ng/ml gehalten wurde. Jede Kondition wurde in diesem Versuch in drei verschiedenen Loch-Kulturen untersucht. (A) IL-1 α und IL-23 induzieren alleine nur wenig IL-22. Die Kombination der beiden Zytokine vervielfacht das sezernierte IL-22. Bereits in der ersten Verdünnungsstufe von IL-23 auf

2 ng/ml sank die Sekretion von IL-22. Bei Steigerung der Verdünnung von IL-23 auf 0,2 ng/ml sank IL-22 fast auf das Ausgangsniveau der IL-1 α induzierten IL-22-Sekretion. **(B)** Die Ausschüttung von IL-22 zeigte sich in allen Verdünnungsstufen bis zu einer IL-1 α -Konzentration von 0,2 ng/ml konstant.

6 Diskussion

In dieser Arbeit konnten wir in allen untersuchten Tumorzelllinien die Expression der IL-22RA1-Untereinheit nachweisen. Anschließend belegten wir durch Stimulationsversuche mit IL-22 die Aktivierung von STAT3 und damit zugleich die Funktionalität des IL-22-Rezeptors in unseren getesteten Tumorzelllinien. Zusätzlich bestätigte der *scratch-assay* die pro-tumorale Wirkung von IL-22. Im Verlauf konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass lösliche Faktoren aus Tumorzellen zur Produktion von IL-22 in Splenozyten führen. In diesem Zusammenhang identifizierten wir neben IL-23 zum ersten Mal IL-1 α als IL-22-Induktor im Tumormilieu. In unserem Tumormodell nahm IL-1 α die bedeutsamste Rolle in der IL-22 Induktion ein.

6.1 Expression des IL-22-Rezeptors in Tumorzellen

Die IL-22-Rezeptoruntereinheit IL-22RA1 wird physiologischer Weise, weder von humanen, noch murinen Immunzellen exprimiert (Nagakawa et al., 2004; Wolk et al., 2002). Es wurde jedoch in einer Vielzahl anderer Zellen, vornehmlich Epithelzellen, nachgewiesen. Darunter befanden sich beispielsweise Keratinozyten, Hepatozyten, Zellen der Lunge, der Niere, des Kolons und des Pankreas (Wolk et al., 2004). Entsprechend konnte IL-22RA1 auf Proteinebene in einer Reihe humaner Tumorzellen nachgewiesen werden, wie dem Nierenzell-, Pankreas- und Kolonkarzinom (Jiang et al., 2013; Wen et al., 2014; Zhang et al., 2011). Es ist zu erwähnen, dass IL-22RA1 auf mRNA- und Proteinebene auch vereinzelt in humanen Lymphomen gefunden wurde. Diese produzierten gleichzeitig endogenes IL-22 (Bard et al., 2008). Die Expression von IL-22RA1 in murinen Tumorzelllinien, die für weiterführende *In-vivo*-Versuche grundlegend ist, ist dagegen kaum untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte im Jahr 2013 durch einen Versuch mit sieben verschiedenen humanen Lungenkarzinomzelllinien zeigen, dass nicht alle Karzinomzelllinien die IL-22RA1-Untereinheit exprimieren (Kobold et al., 2013). Zusätzlich konnte nach der Stimulation mit IL-22 nur bei vier der sechs IL-22RA1-exprimierenden Zelllinien die Phosphorylierung von STAT3 detektiert werden. Dies könnte auf eine Mutation des Korezeptors IL-10R2 oder auf die nachgeschaltete Signalkaskade zurückzuführen sein (Kobold et al., 2013). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen Tumorzelllinien wurden daher auf die Expression von IL-22RA1 im *Western blot* getestet. Zusätzlich wurde die Funktionalität der IL-22RA1 und IL-10R2 Rezeptorketten durch die Phosphorylierung

von STAT3 nach Stimulation mit IL-22 sichergestellt. Bezogen auf die Aktivierung von STAT3, konnten wir in diesen Versuchen ein unterschiedlich starkes Ansprechen auf die Stimulation mit IL-22 beobachten. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass die Wirkung von IL-22 auch von der Expressionsstärke von IL-22RA1 abhängen könnte (Akil et al., 2015; Kobold et al., 2013).

Im Allgemeinen wird IL-22RA1 von der überwiegenden Mehrheit der Karzinome stark exprimiert (Akil et al., 2015; Jiang et al., 2011; Zhang et al., 2008). Damit übereinstimmend konnten wir in all unseren getesteten Tumorzelllinien IL-22RA1 nachweisen (s. Abschnitt 5.1.2 und 5.1.3). Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse in der Literatur, ist die Überprüfung der Funktionalität des IL-22-Rezeptors und der nachgeschalteten Signalkaskade für die Evaluation der Bedeutung von IL-22 für diese Modelle wichtig (Bard et al., 2008; Kobold et al., 2013).

6.2 Wirkung von IL-22 auf Tumoren

Die pro-tumorale Rolle von IL-22 wurde durch unterschiedliche Effekte, wie der IL-22-induzierten Angiogenese, Anti-Apoptose, Invasivität, Metastasierung und Proliferation belegt (Akil et al., 2015; Curd et al., 2012; Jiang et al., 2011; Wu et al., 2013b; Zhuang et al., 2012). Da zum Mammakarzinom kaum Daten in Bezug auf IL-22 vorlagen, war unser Ergebnis, dass IL-22 die Proliferation der murinen 4T1-Brustkrebszelllinie fördert, von besonderem Interesse. Dies könnte einen Hinweis auf die Rolle von IL-22 in der Tumorprogression in diesem Modell darstellen. Die proliferative Wirkung von IL-22 wurde in der Vergangenheit unterschiedlich bewertet. Theoretisch induziert IL-22 eine Vielzahl an proliferativen Faktoren und sollte dadurch das Zellwachstum fördern. Dies spiegelte sich in Versuchen mit Karzinomzellen allerdings nicht einheitlich wieder. Nagakawa et. al konnten in ihrem *In-vivo*-Modell zwischen IL-22-transduzierten Colon-26-Zellen und den parenteralen Colon-26-Zellen keinen Unterschied in der Tumorgröße feststellen (Nagakawa et al., 2004). In einem anderen Modell, war das Tumorwachstum von HCC-Zelllinien als auch von Kolonkarzinom-Zelllinien in Mäusen signifikant erhöht, wenn den Versuchstieren zusätzlich IL-22⁺-Tumor-infiltrierende Leukozyten (IL-22⁺-TIL) injiziert wurden (Jiang et al., 2011; Jiang et al., 2013). *In-vitro* waren die Ergebnisse über die proliferative Funktion von IL-22 in Karzinomzellen ebenfalls uneinheitlich. Es wurde ein erhöhtes Zellwachstum (Akil et al., 2015), kein Unterschied im Zellwachstum (Fukui et al.,

2014), sowie ein reduziertes Zellwachstum (Weber et al., 2006) beobachtet. In letzterem Fall sahen Weber et al., dass trotz der IL-22-induzierten Aktivierung von STAT3, das Zellwachstum in der murinen EMT6-Brustkrebszelllinie gehemmt wurde (Weber et al., 2006). Das Ergebnis wurde auf die zusätzliche Aktivierung der STAT1-Signalkaskade zurückgeführt. Folglich ist der Nachweis einer Phosphorylierung von STAT3 kein Beweis, dass STAT3-vermittelte Effekte auch tatsächlich überwiegen.

Insgesamt sind Berichte, die IL-22 eine anti-proliferative Wirkung zuschreiben, Einzelfälle. Der in der Literatur diskutierte wachstumfördernde Effekt von IL-22 wird insgesamt tendenziell zu Gunsten einer pro-proliferativen Wirkung bewertet. Weitere pro-tumorale Effekte, wie eine durch IL-22-vermittelte erhöhte Metastasierungsrate, sind inzwischen mehrfach belegt (Ji et al., 2014; Jiang et al., 2011; Jiang et al., 2013; Wen et al., 2014). In der Summe betrachtet, überwiegt die pro-tumorale Rolle von IL-22. In unserem Versuchsmodell konnten wir ebenfalls einen tumorfördernden Effekt von IL-22 beobachten (Abschnitt 5.1.3).

6.3 Zelluläre Quellen und Induktion von IL-22

Zelluläre Quellen von IL-22

Im Wesentlichen wird IL-22 von T-Zellen und ILC gebildet, die sich beide in mehrere Subpopulationen unterteilen lassen. Zu den IL-22⁺-T-Zellen gehören die CD4⁺-Th1-, Th17- und Th22-, NKT-, $\gamma\delta$ -T-, sowie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (Doisne et al., 2011; Duhon et al., 2009; Li et al., 2011; Ortega et al., 2009; Wolk et al., 2002; Zheng et al., 2007). Als IL-22⁺ ILC wurden NK, CD4⁺- und CD4⁻-LTI-like Zellen, NCR⁺-ILC und CD4⁻-NCR⁻-Zellen identifiziert (Buonocore et al., 2010; Cella et al., 2009; Cupedo et al., 2009; Xu et al., 2014b). Bis auf die NK werden IL-22⁺-ILC den ILC der Gruppe 3 zugeordnet (Spits et al., 2013). NCR⁺-ILC ähneln mit ihren Effektorzytokinen den Th22-Zellen, während LTI-like-Zellen und CD4⁻-NCR⁻-Zellen durch ihre Sekretion von IL-17 und IL-22 Ähnlichkeiten zu den Th17-Zellen aufweisen. In der Literatur werden im murinen System außerdem CD11c⁺ dendritische Zellen (DC), sowie Makrophagen und neutrophile Granulozyten als IL-22-Quellen beschrieben (Hansson et al., 2013; Pickert et al., 2009; Zheng et al., 2008; Zindl et al., 2013).

Induktion von IL-22

Die Induktion von IL-22 wird maßgeblich über die Aktivierung von STAT3 durch Zytokine wie IL-23 und IL-6 gesteuert. In der Literatur nimmt IL-23 bisher die

wichtigste Rolle ein. In der Maus wirkt IL-23 auf Th17-Zellen, Th22-Zellen, CD8⁺-T-Zellen, γ - δ T-Zellen als auch die ILC der Gruppe 3 und führt zur Bildung von IL-22 (Buonocore et al., 2010; Ciric et al., 2009; Ghoreschi et al., 2010; Rutz et al., 2013; Sutton et al., 2009). Auch in murinen neutrophilen Granulozyten und CD11c⁺-DC konnte IL-22 durch IL-23 induziert werden (Zheng et al., 2008; Zindl et al., 2013). Durch IL-6, einem weiteren STAT3-Aktivator, zeigte sich die IL-22-Synthese in Th17-Zellen, Th22-Zellen und CD8⁺-T-Zellen verstärkt (Ciric et al., 2009; Ghoreschi et al., 2010; Zheng et al., 2007). Im Gegensatz dazu wirkt IL-1 über andere Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) und Aktivator-Protein-1 (AP-1) (Reynders et al., 2011; Werman et al., 2004).

IL-1 gehört zu den wichtigsten IL-22-Induktoren und reguliert zusammen mit IL-23 vornehmlich die IL-22-Synthese in Th17-Zellen, γ - δ T-Zellen und den ILC der Gruppe 3 (Ghoreschi et al., 2010; Reynders et al., 2011; Sutton et al., 2009). Gerade in der Differenzierung von Th17-Zellen nimmt es eine Schlüsselfunktion ein (Chung et al., 2009). Für NKp46⁺- und NKp46⁻-ILC wurde gezeigt, dass der IL-1-Rezeptor sowie *downstream* dessen Signalkaskade *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) für eine basale IL-22-Expression und zudem für eine IL-23-induzierte IL-22-Produktion notwendig ist (Reynders et al., 2011). In unseren Versuchen beobachteten wir bei der Stimulation von Splenozyten ebenfalls eine Synergie zwischen IL-1 α und IL-23. Während beide Zytokine alleine nur geringe Mengen an IL-22 induzierten, multiplizierte sich die Sekretion von IL-22 bei der Kombination beider Zytokine (Abbildung 20).

Die Regulation von IL-22 durch Transkriptionsfaktoren ist nicht abschließend geklärt. Allgemein wird jedoch, neben STAT3, den Transkriptionsfaktoren AHR und ROR γ t eine besondere Rolle in der Induktion von IL-22 beigemessen. Die IL-22-Induktion wird durch eine Koexpression beider Faktoren vervielfacht (Qiu et al., 2012). Die Daten von Qiu et al. weisen darauf hin, dass auf Genebene ROR γ t direkt an den IL-22-Promotor bindet. Zudem fördert ROR γ t auch die Bindung von AHR an den IL-22-Locus. Dementsprechend zeigten unabhängig voneinander sowohl ROR γ t^{-/-}- als auch AHR^{-/-}-Zellen eine signifikante Reduktion in der Induktion von IL-22 (Qiu et al., 2012; Yeste et al., 2014). *Per definitionem* ist die Zelldifferenzierung und Funktion, einschließlich der IL-22-Induktion, aller IL-22⁺-ILC der Gruppe 3 von ROR γ t und AHR

abhängig (Spits et al., 2013). Bis auf wenige Ausnahmen, wie den Th1-Zellen, sind ROR γ t und AHR auch für die Zelldifferenzierung, sowie die Induktion oder Sekretion von IL-22 aus verschiedenen T-Zellen verantwortlich (Duhon et al., 2009; Martin et al., 2009; Quintana et al., 2008). ROR γ t und AHR werden durch STAT3 reguliert (Ivanov et al., 2006; Stobbe-Maicherski et al., 2013) und sind möglicherweise gleichzeitig auch für die Expression von IL-23R notwendig (Ivanov et al., 2006; Yeste et al., 2014; Zhou et al., 2008). Dass Th1-Zellen durch IL-12 und IL-18, jedoch nicht durch IL-23 stimuliert werden, ist daher möglicherweise auf die fehlende ROR γ t-Expression zurückzuführen (Liang et al., 2006).

6.3.1 Zelluläre Quellen und Induktion von IL-22 im Tumormilieu

Zelluläre Quellen von IL-22 in Tumoren

In verschiedenen Tumorgewebeproben wurden wiederholt höhere Mengen an IL-22 detektiert als im peritumoralen Gewebe (Kirchberger et al., 2013; Qin et al., 2014; Zhang et al., 2008). Wir detektieren in dieser Arbeit ebenfalls IL-22 in resezierten murinen Tumorgewebeproben, obwohl die injizierten Zelllinien selber kein IL-22 synthetisierten (Siehe Abschnitt 5.2.1). Bis auf die Ausnahme, dass Zhang et al. in der Lungenkarzinomzelllinie A549 die Expression von IL-22-mRNA nachwies (Zhang et al., 2008), wurden Karzinomzellen bisher nie als direkte IL-22-Quelle beschrieben. Es ist anzumerken, dass in dem Versuch von Zhang et al. kein IL-22-Nachweis auf Proteinebene erfolgte und das Ergebnis der Expression von IL-22-mRNA in der Lungenkarzinomzelllinie A549 durch unsere Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden konnte (Kobold et al., 2013). Die oben genannten erhöhten IL-22-Spiegel im Tumorgewebe sind daher nicht durch eine direkte Sekretion aus Tumorzellen, sondern höchstwahrscheinlich durch IL-22⁺-TIL begründet. In diesem Zusammenhang sahen wir in unseren Experimenten auch eine Reduktion des IL-22-Gehaltes in den Milzen tumortragender Mäuse im Vergleich zur tumorfreien Kontrollgruppe. Da die Milz ein lymphatisches Organ darstellt, wäre diese Beobachtung durch die Rekrutierung IL-22⁺-Immunzellen in das Tumorgewebe erklärbar. In humanen Kolonkarzinomresektaten identifizierten Kirchberger et al. hauptsächlich CD3⁺-CD4⁺-T-Zellen als IL-22-Quelle. Der Großteil davon war doppelpositiv für IL-22 und IL-17. Ein geringer Anteil der IL-22⁺-Zellen exprimierte keine üblichen Merkmale reifer Zelllinien und war damit möglicherweise den ILC zugehörig (Kirchberger et al., 2013). Im murinen Bakterien-induzierten Kolonkarzinom, waren die IL-22⁺-Zellen fast ausschließlich CD4⁻-NCR⁻-

ILC (Kirchberger et al., 2013). In Gewebeprobe von Magen- und auch Pankreaskarzinomen wurden die erhöhten Mengen an IL-22 auf intratumorale IL-22⁺-CD4⁺-T-Zellen zurückgeführt (Xu et al., 2014a; Zhuang et al., 2012). Bei Patienten mit einem HCC oder Magenkarzinom wurden im Vergleich zu ihrer gesunden Kontrollgruppe erhöhte zirkulierende Mengen an Th22- und Th17-Zellen nachgewiesen, die auch mit einer erhöhten Tumorprogression korrelierten (Liu et al., 2012; Qin et al., 2014).

Übereinstimmend zeigten unsere Ergebnisse, dass in unseren Modellen nicht die getesteten Tumorzellen, sondern Splenozyten IL-22 produzieren. In der Milz sind unter anderem ILC, T-Zellen und verschiedene Antigen-präsentierende-Zellen (APC) mögliche IL-22-Quellen (Cesta, 2006; Hey et al., 2012; Robinette et al., 2015). In einer Voruntersuchung fanden wir einen Hinweis, dass 4T1-Tumorzellkulturüberstand, sowohl in CD3⁺- als auch CD3⁻-Zellen, zur Induktion von IL-22 führt (Ergebnisse nicht gezeigt). Dabei schließen die CD3⁻-Zellen unter anderem ILC (Walker et al., 2013) und die CD3⁺-Zellen vor allem T-Zellen ein. Interessanterweise detektierten wir in unseren Tumorzellkulturüberstand-stimulierten Splenozytenkulturen, neben IL-22, erhöhte Mengen an IL-6, TNF- α und IFN- γ . Alle genannten Zytokine können von Th17-Zellen sezerniert werden und liefern damit einen Hinweis für die möglichen Beteiligung dieser Zellentität in unseren Versuchen (Duhon et al., 2013; Volpe et al., 2009).

Regulation von IL-22 in Tumoren

Die Induktion von IL-22 im Tumorgewebe ist bisher kaum erforscht. Wie von Jiang et al. beschrieben, ist bekannt, dass das Tumormikromilieu des humanen Kolonkarzinoms und des humanen HCC Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-23 und TNF- α bereitstellt. Somit ist theoretisch die Grundlage für die Differenzierung von Th17-Zellen sowie die Induktion von IL-22 gegeben (Jiang et al., 2011; Jiang et al., 2013). Das Tumormikromilieu ist allerdings ein Überbegriff, der sich aus Immunzellen, Gefäßzellen, lymphatischen Endothelzellen, Fibroblasten, Tumorzellen und weiteren umliegenden Gewebezellen zusammensetzt (Sounni et al., 2013). Weder der Induktionsmechanismus von IL-22 im Tumorgewebe, noch die Quelle der IL-22 Induktoren sind genauer bekannt. Wir konnten in dieser vorliegenden Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass sezernierte Moleküle aus Tumorzellen alleine bereits zu einer signifikanten Induktion von IL-22 in Splenozyten führen (Abschnitt 5.2.2). Wir identifizierten durch unsere Neutralisationsversuche IL-23 und IL-1 α als die

Schlüsselinduktoren der tumorinduzierten IL-22-Synthese. IL-6, das in verschiedenen Zellen die IL-22-Synthese erhöht (Zheng et al., 2007) und lange Zeit als essenziell für die Differenzierung von Th17-Zellen galt (Dong, 2008; Ivanov et al., 2006; Veldhoen et al., 2006), spielte in unserer tumorinduzierten IL-22-Sekretion keine Rolle. Zudem wurde inzwischen in einem Modell mit IL-6^{-/-}-Mäusen gezeigt, dass die Beteiligung von IL-6 in der Th17-Zelldifferenzierung durch einen Überschuss an IL-1 ersetzt werden kann (Ikeda et al., 2014). IL-1 α , das als IL-22-Induktor bisher kaum Beachtung fand (Hernandez et al., 2015), war in unserer tumorinduzierten IL-22-Synthese bedeutungsvoller als der verbreitet-charakterisierte IL-22-Induktor IL-23 (Abschnitt 5.3.3). In diesen Versuchen wurde die IL-22-Sekretion durch eine Neutralisation von IL-1 α nahezu vollständig aufgehoben, während sich die Sekretion durch Anti-IL-23-Antikörper nur teilweise eingeschränkt zeigte. Eine mögliche Erklärung könnte eine größere Abhängigkeit von IL-23 gegenüber IL-1 spielen als umgekehrt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass IL-23 den IL-1-Rezeptor (IL-1R) hochreguliert (Doisne et al., 2011). Dadurch kann die IL-1-vermittelte IL-22-Synthese durch IL-23 sowohl direkt als auch indirekt gesteigert werden. Im Gegenzug kann IL-1 in bestimmten Modellen zur IL-23-Synthese führen und eine Blockade von IL-1R die IL-23-Sekretion inhibieren (Harris et al., 2008)(siehe Abschnitt 6.3.2). In diesem Zusammenhang wurde bereits für einige ILC-Fraktionen demonstriert, dass der IL-1-Rezeptor für eine IL-23-induzierte IL-22-Produktion essenziell ist (Reynders et al., 2011). Zusätzlich ist IL-1 in der Lage SOCS3, den Inhibitor von STAT3, zu supprimieren. Dadurch wird die IL-23-vermittelte STAT3-Aktivierung, die auch zur IL-22-Synthese führt, durch IL-1 verlängert und verstärkt (Basu et al., 2015).

6.3.2 Zelluläre Quellen und Induktion von IL-1 und IL-23

IL-1 und IL-23 sind die bedeutsamsten IL-22-Induktoren. Beide Zytokine waren in unseren mit Tumorzellkulturüberstand-stimulierten Splenozytenkulturen positiv und in diesem Modell für die IL-22-Induktion hauptverantwortlich. IL-1 β und IL-23 werden vor allem durch Makrophagen, dendritische Zellen oder Monozyten gebildet (Apte et al., 2006; Magri et al., 2014; Zhang et al., 2005). Die Synthese ist prinzipiell auch durch epitheliale Zellen möglich, im Fall von IL-23 sind jedoch nur Einzelfälle beschrieben (Hastie et al., 1996; Macho-Fernandez et al., 2015). Die Produktion von IL-1 α , sowie in geringerem Ausmaß auch IL-1 β , ist dagegen nicht allein von Immunzellen abhängig, sondern auch durch Epithelzellen, Keratinozyten und viele weitere Körperzellen

beschrieben (Dinarello, 1996; Fini et al., 1994; Werman et al., 2004). IL-1 α und IL-1 β liegen daher in umfangreichen Mengen in der Tumorumgebung vor, die durch die Zellen des Tumormikromilieus oder oft durch die malignen Zellen selbst gebildet werden (Apte et al., 2008; Jin et al., 1997; Singer et al., 2006; Zhuang et al., 2015). In unabhängigen Studien zeigten bis zu 90 % der invasiven Brustkarzinomzellen eine Expression von IL-1 β (Jin et al., 1997; Miller et al., 2009). Darüber hinaus war IL-1 α in einer Studie in allen getesteten invasiven Brustkrebsproben als auch in den benignen Brustgewebeproben detektierbar (Miller et al., 2009). Wiederholt wurde die Sekretion von IL-1 α oder der IL-1 α -Gehalt als Korrelat von aggressiven Tumorzellphänotypen diskutiert (Miller et al., 2009; Ricote et al., 2004; Singer et al., 2006). Ricote et al. fanden in gesundem Prostatagewebe (n = 20) IL-1 β , aber kein IL-1 α . Umgekehrt wiesen sie in Prostatakarzinomen mit hohem *Gleason-Score* (n = 11) in 50 Prozent der Fälle IL-1 α nach, jedoch nie IL-1 β (Ricote et al., 2004). Damit übereinstimmend detektierten wir mit Hilfe der Zytokinreihentestung im Überstand reiner epithelialer Tumorzellkulturen und in Tumorzellkulturüberstand-stimulierten Splenozytenkulturen IL-1 α , jedoch keine relevanten Mengen an IL-1 β (Ergebnis nicht gezeigt). Die Zytokinreihentestung, die wir als Screeningmethode einsetzten, erbrachte weitere Hinweise bezüglich der Regulation von IL-22. Im reinen Tumorzellkulturüberstand war IL-1 α nur in der 4T1-Kultur deutlich exprimiert. Vergleichsweise zeigte LCCL1 eine sehr geringe Expression (siehe Abbildung 20). Erst die Splenozyten produzierten durch die Stimulation mit LCCL1-Zellkulturüberstand IL-1 α in größerem Umfang, das wir in diesen Versuchen als Hauptinduktor der IL-22-Synthese identifizierten. Demnach ist es wahrscheinlich, dass abhängig von der Tumorzelllinie zusätzlich noch bislang unidentifizierte sezernierte Moleküle aus den Tumorzellen für die IL-1 α -Induktion in den Splenozyten verantwortlich sind. IL-23 war in den von uns überprüften Tumorzelllinien am unteren Detektionslimit. Eine suffiziente Beurteilung hinsichtlich einer tatsächlichen IL-23-Expression war mit diesem Test durch die Limitation des semiquantitativen Verfahrens und schwach-positiven Ergebnissen nicht möglich. Hinweise über die Synthese von IL-23 durch epitheliale Tumorzelllinien sind bisher nicht einschlägig beschrieben. Auch die genauen Induktionsmechanismen von IL-23 sind bisher nur unzureichend geklärt. Allgemein kann IL-23 durch unspezifische infektiöse oder entzündliche Stimuli induziert werden (Lyakh et al., 2008). Interessanterweise demonstrierten Veröffentlichungen der letzten Jahre, dass IL-1 zur Expression von IL-23 in Fibroblasten führt (Liu et al., 2007; Zhang et al., 2005). Harris

et al. konnten mit ihren Versuchen belegen, dass das IL-1-System auch die Bildung von IL-23 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) reguliert (Harris et al., 2008). Die Stimulation mit *Pepsin-trypsin digest of gliadin* (PTG) oder β -Glucan führte in diesen Zellen zur Sekretion von IL-23. Durch die Antagonisierung von IL-1R wurde die IL-23-Ausschüttung dagegen vollkommen inhibiert. Außerdem erzielte die alleinige Stimulation durch IL-1 β bereits die Synthese von IL-23 durch PBMC (Harris et al., 2008). Diese Ergebnisse sind im Hinblick auf die synergistischen Effekte von IL-1 und IL-23 in der IL-22-Synthese von besonderem Interesse. In unseren Versuchen zeigte sich die IL-22-Induktion durch neutralisierende Anti-IL-23-Antikörper nur teilweise und durch Anti-IL-1 α -Antikörper fast vollständig inhibiert. Eine IL-1-abhängige IL-23-Induktion bietet damit einen Erklärungsansatz dafür, dass IL-1 α in unseren Versuchen die Schlüsselfigur unter den Zytokinen spielte. IL-1 α , das in einem weitaus geringeren Umfang als IL-1 β erforscht wurde, wird in Homöostase von einer Vielzahl von Zellen konstitutiv exprimiert, jedoch kaum sezerniert (Apte et al., 2008; Hacham et al., 2002). Messbare IL-1 α -Konzentrationen in Körperflüssigkeiten sind wahrscheinlich oft auf Zellschäden zurückzuführen (Voronov et al., 2014). Dies kann z. B. auch beim nekrotischen Zerfall von Tumorzellen auftreten. Nach Freisetzung kann IL-1 α zur Autoinduktion, als auch zur Induktion von IL-1 β führen, das unter homöostatischen Bedingungen nicht nachweisbar ist (Apte et al., 2008; Hacham et al., 2002). Ebenso ist eine IL-1 α -abhängige Induktion von TNF- α beschrieben, das wiederum IL-1 β induziert (Apte et al., 2002).

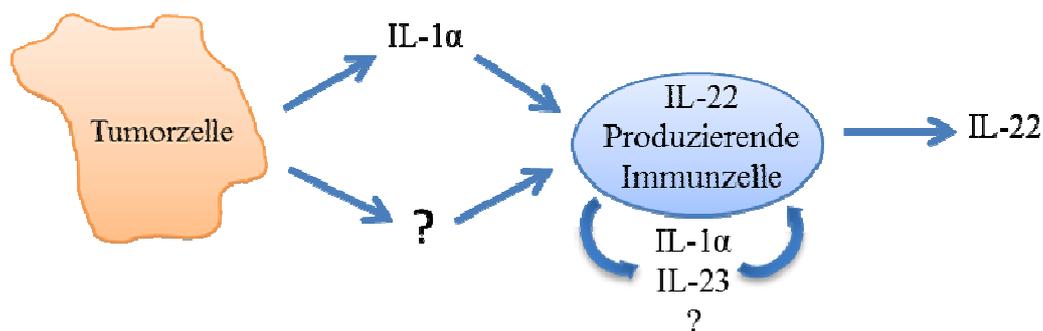


Abbildung 16: Tumorinduzierte Induktion von IL-22 in Immunzellen mit IL-1 α als Schlüsselzytokin: Unsere Versuche weisen darauf hin, dass einige Tumorzellen direkt IL-1 α sezernieren. Lösliche Tumor-produzierte Faktoren führen unter anderem zu einer IL-1 α -Sekretion aus Immunzellen. IL-1 α nimmt in diesem Szenario die Schlüsselrolle ein. Es induziert IL-22 direkt und kann zur Induktion von IL-23 aus Immunzellen führen. Da selbst die kombinierte Neutralisation von IL-1 α und IL-23 die Induktion von IL-22 in der Mehrzahl der Versuche nicht vollständig unterbinden konnte, ist anzunehmen, dass noch weitere, bislang nicht identifizierte Signalmoleküle in der IL-22-Induktion beteiligt sind.

6.3.3 Biologie von IL-1 α und IL-1 β

IL-1 α und IL-1 β binden beide an IL-1-Rezeptor-Typ-I (IL-1RI) und IL-1-Rezeptor-Typ-II (IL-1RII). Typ-I ist der funktionelle Signalrezeptor und aktiviert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B, während Typ-II *downstream* keine Aktivität zeigt und übermäßig produziertes IL-1 abfängt (Boraschi et al., 1996; Colotta et al., 1993; Wolf et al., 2001). IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA) bindet an beide IL-1-Rezeptoren und ist ein natürlicher Inhibitor von IL-1 α und IL-1 β . Er findet bereits im medizinischen Bereich unter dem Namen Anakinra Anwendung (Abschnitte 6.4.2.1). Durch die höhere Affinität zu IL-1RI, besitzt IL-1 α , in direkter Konkurrenz zu IL-1 β , einen Vorteil im Bindungsverhalten (Boraschi et al., 1996; Boraschi et al., 1990). Zusätzlich wirkt der inaktive IL-1-Rezeptor-Typ-II vornehmlich als Inhibitor von IL-1 β , da seine Affinität gegenüber IL-1 α geringer ausgeprägt ist (Colotta et al., 1993).

In Homöostase ist IL-1 β nicht messbar und wird beim gesunden Menschen nur in geringem Maße exprimiert (Apte et al., 2008; Dinarello, 2011). Es wird durch inflammatorische Prozesse induziert und erst durch Spaltung seiner Vorstufe aktiviert sowie sezerniert (Apte et al., 2008). Im Vergleich dazu wird IL-1 α in seinen produzierenden Zellen konstitutiv exprimiert und ist sowohl in seiner Vorstufe als auch in seiner reifen Form biologisch aktiv (Apte et al., 2008). Dagegen wird es in einem weitaus geringeren Umfang sezerniert und kommt zum Großteil intrazellulär oder membrangebunden vor (Apte et al., 2008; Werman et al., 2004). Durch die unterschiedlichen Sekretionsmechanismen ist IL-1 α physiologisch eher lokal und IL-1 β vermehrt systemisch wirksam.

Die Vorstufe von IL-1 α kann an IL-1RI binden, oder durch Translokation in den Nukleus den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren (Werman et al., 2004). Das Zielgen von NF- κ B ist wiederum IL-1 α und führt dadurch zu einer autokrinen IL-1 α -Stimulation (Imaizumi et al., 2000; Jiang, 2011). IL-1 α kann dementsprechend intrazellulär wirksam sein, ohne an seinen oberflächlichen Rezeptor zu binden (Apte et al., 2008; Werman et al., 2004). Normalerweise üben IL-1 α und IL-1 β über die Bindung an IL-1RI die gleiche Wirkung aus. Da differenzierbare Effekte in der Zellrekrutierung und Zytokininduktion durch IL-1 β und der Vorstufe von IL-1 α entdeckt wurden (Rider et al., 2011), ist es bislang noch nicht eindeutig bestätigt, ob IL-1 α und seine Vorstufen

ausnahmslos dieselben Signalstrukturen verwenden (Apte et al., 2006; Rider et al., 2011).

6.3.4 Bedeutung von IL-1 in Tumorerkrankungen

IL-1 ist ein stark wirksames pro-inflammatorisches Zytokin. Es führt zur Vasodilatation, fördert die Infiltration von Entzündungszellen, aktiviert das angeborene Immunsystem und induziert weitere pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8 und TNF- α . Durch diese Maßnahmen initiiert und unterhält es die Entzündungsreaktion im betroffenen Gewebe (Apte et al., 2002, 2008; Dinarello, 1996). Eine pro-tumorale Wirkung ist schon seit Jahrzehnten bekannt (Giavazzi et al., 1990). In experimentellen Versuchen erhöhte es die Tumorpherifation, Metastasierung und Angiogenese verschiedener Tumorentitäten, wie zum Beispiel Lungen-, Brust- und Pankreaskrebs (Gemma et al., 2001; Matsuo et al., 2009; Nozaki et al., 2000; Saijo et al., 2002; Salven et al., 2002). IL-1 α , respektive seine Vorstufen, werden physiologisch intrazellulär gespeichert und bei Zellnekrose in größeren Mengen ausgeschüttet. Durch den hypoxischen Stress wird die IL-1 α -Expression vor dem Zelluntergang nochmals gesteigert (Apte et al., 2008; Rider et al., 2011; Werman et al., 2004). Schnell-proliferierende Tumoren weisen oft Nekrosen auf (Caruso et al., 2014). Durch die Freisetzung von IL-1 α könnte die Tumorprogression daher potenziell gefördert werden. Eine Überexpression von membranständigem IL-1 α ist dagegen teilweise auch mit einer Reduktion der Tumorigenität assoziiert (Apte et al., 2006).

6.4 Das IL-22-System als Zielstruktur in der Tumortherapie

Das IL-22-System repräsentiert eine vielversprechende Zielstruktur für die Krebstherapie. Um es von außen direkt zu regulieren, kann man den IL-22-Rezeptor antagonisieren oder IL-22 neutralisieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Induktion und die Signaltransduktion von IL-22 zu inhibieren, sowie über den Chemokinrezeptor die Infiltration IL-22-produzierender Zellen zu beeinflussen (Sabat et al., 2014). Eine große Hürde in der heutigen Krebsbekämpfung ist die negative Modulation des Abwehrsystems durch Zytostatika. Der entscheidende Vorteil der IL-22RA1-Rezeptorblockade oder IL-22-Neutralisation liegt darin, dass Immunzellen kein IL-22RA1 exprimieren (Wolk et al., 2002). Durch eine solche Intervention würde das Immunsystem somit nicht direkt beeinflusst werden. Da IL-20 und IL-24 ebenfalls die IL-22RA1-Untereinheit verwenden können und bei diesen Zytokinen IL-22-ähnliche

Wirkungen beobachtet wurden (He et al., 2010; Sa et al., 2007), könnte sich die Blockade des Rezeptors theoretisch als besonders wirkungsvoll erweisen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass IL-24 auch eine nachgewiesene anti-tumorale Wirkung besitzt, die durch die Blockade ebenfalls beeinträchtigt werden könnte (Fisher et al., 2003; Fisher et al., 2007; Ramesh et al., 2003). Demnach wäre die Neutralisation von IL-22 die sicherste, spezifischste und nebenwirkungsärmste Methode um pro-tumorale Effekte von IL-22 zu inhibieren. Durch die Beteiligung von IL-22 in der Progression und der Chemoresistenzentwicklung verschiedener Karzinome, gilt die Neutralisation von IL-22 als vielversprechende Einzel- und auch Kombinationstherapie (Sabat et al., 2014). Dies wurde bereits durch verschiedene experimentelle Versuche demonstriert (Kirchberger et al., 2013; Kryczek et al., 2014). In Mausversuchen führten IL-22-neutralisierende Antikörper zu einem signifikanten Rückgang des bakteriell-induzierten Kolonkarzinomwachstums (Kirchberger et al., 2013). Kryczek et al. bestätigten dieses Ergebnis in ihrem Mausmodell mit Zellsuspensionen aus humanem Darmkrebsgewebe und verzeichneten durch die Neutralisation von IL-22 eine verzögerte Tumorentwicklung, eine Reduktion der Tumorgröße und eine erhöhte Überlebensrate der Versuchstiere (Kryczek et al., 2014). In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse kann von der Einzeltherapie kein kurativer Ansatz erwartet werden. Vielmehr soll eine Lebenszeitverlängerung mit Verbesserung der Lebensqualität erzielt werden. Eine entsprechende Validierung am Menschen steht aus.

6.4.1 Neutralisation von IL-23

IL-23 ist ein bekannter IL-22-Induktor und war auch in unseren Tumorversuchen in der Induktion von IL-22 beteiligt. Bis auf wenige Ausnahmen, wie Th1-Zellen, spielt IL-23 in fast allen IL-22-produzierenden T-Zellen und ILC eine Rolle in der Differenzierung und/oder Synthese von IL-22 (Buonocore et al., 2010; Ciric et al., 2009; Ghoreschi et al., 2010; Rutz et al., 2013; Sutton et al., 2009). Eine selektive Neutralisation von IL-23, über die IL-23-spezifische p19-Untereinheit, sollte demnach die IL-22-Synthese in der Mehrheit der IL-22⁺-Zellen herabsetzen. Unabhängig davon, besitzt IL-23 zusätzlich pro-tumorale Effekte, die zu einer erhöhten Tumorinzidenz, Tumorwachstum und Angiogenese beitragen (Langowski et al., 2006). IL-23 scheint dabei eine größere Rolle in der Tumormutation, als bei bereits etablierten Tumoren einzunehmen (Ngiow et al., 2013). Neben der Enzyminduktion von beispielsweise MMP, wird die Wirkung auch über eine Hemmung der Immunüberwachung (engl. *immune surveillance*)

bewerkstelligt. In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls demonstriert, dass IL-23 die Infiltration von CD8⁺-zytotoxischen-T-Zellen in das Tumorgewebe runterreguliert, die anti-tumorale Effekte besitzen (Langowski et al., 2006). Eine Neutralisation von IL-23 könnte demnach, zum einen über die Reduktion von IL-22 und zum anderen über die direkte Inhibition der pro-tumoralen IL-23 Wirkung, das Tumorwachstum einschränken. IL-23 besitzt, neben der p19-Untereinheit, außerdem eine gemeinsame p40-Untereinheit mit IL-12. Anti-IL-12p40-Antikörper binden daher an IL-23 und IL-12. Ustekinumab ist ein kommerziell erhältlicher Anti-IL-12p40-Antikörper, der IL-23 und IL-12 neutralisiert und bisher nur zur Behandlung der Psoriasis und Morbus Crohn zugelassen ist. Da IL-12 für die Differenzierung und Aktivität von Th1- und NK-Zellen von Bedeutung ist, könnte dieses Medikament eine effiziente Lösung darstellen, um ein besonders breites Spektrum an IL-22-produzierenden Zellen zu regulieren (Sabat et al., 2014; Trinchieri, 2003). Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass Th1-Zellen eine anti-tumorale Funktion aufweisen und IL-12 nachgewiesenermaßen eine anti-tumorale Wirkung vermittelt (Nastala et al., 1994; Trinchieri, 2003). Die kombinierte Neutralisation von IL-12 und IL-23 könnte daher möglicherweise die Tumorzinzidenz von Plattenepithelkarzinomen fördern (Langley et al., 2013).

Eine Neutralisation von IL-23, durch den oben genannten klinisch-erprobten Antikörper in Haut- und chronisch entzündlicher Darmerkrankung, wäre eine Möglichkeit um auf die IL-22-Achse Einfluss zu nehmen.

6.4.2 Blockade des IL-1-Systems

2010 veröffentlichte Charles Dinarello einen Fachartikel mit dem Titel „*Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade?*“ (Dinarello, 2010). Die in unserer Arbeit erstmals beschriebene Assoziation von IL-1 α mit der tumorinduzierten IL-22-Synthese, unterstreicht weiter das Potenzial der IL-1-Neutralisation in der Krebstherapie. Die pro-tumoralen Effekte von IL-1 sind bereits vielfach detailliert beschrieben (Gemma et al., 2001; Matsuo et al., 2009; Nozaki et al., 2000; Saijo et al., 2002; Salven et al., 2002). Neben der erheblichen Reduktion des pro-tumoralen IL-22, die wir in unseren murinen Versuchen belegten, würde die IL-1-Inhibition auch gleichzeitig die pro-tumorale IL-1 Wirkung verhindern. Zudem kann IL-1 auch die IL-23-Induktion regulieren. Die Blockade des IL-1-Systems würde somit die IL-1- und IL-23-induzierte IL-22-Synthese vermindern, als auch die pro-tumorale Wirkung von IL-1, IL-22 und

IL-23.

IL-1 α und IL-1 β können zu diesem Zweck direkt neutralisiert, oder ihre Wirkung indirekt via Rezeptorblockade gehemmt werden. Die Blockade von IL-1 durch die Antagonisierung des Rezeptors, ist in inflammatorischen Erkrankungen seit langem im menschlichen Körper erprobt und bietet eine gute Verträglichkeit. Obwohl die Therapie immunmodulierend wirkt, sollen opportunistische Infektionen nicht begünstigt werden. Bakterielle Infektionen treten jedoch, wie bei allen immunsuppressiv-wirkenden Biologika, mit einer erhöhten Inzidenz auf (Dinarello et al., 2012).

6.4.2.1 Antagonisierung des IL-1-Rezeptors

Anakinra ist ein rekombinanter IL-1-Rezeptorantagonist, der seit 2001 in den USA zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen ist (Dinarello et al., 2012).

Eine Überexpression von IL-1 α korreliert mit einer schlechteren Überlebensrate bei Patienten mit einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) (Ling et al., 2012; Melisi et al., 2009). In diesem Zusammenhang haben Zhuang et al. herausgefunden, dass Anakinra das Tumorstadium von verschiedenen PDAC-Zellen sowohl *In-vitro*, als auch *In-vivo* reduzierte (Zhuang et al., 2015). Der Effekt wurde auf die Hemmung von NF- κ B, *downstream* des inhibierten IL-1 α , zurückgeführt. In unseren Versuchen führte der Tumorzellkulturüberstand von Panc02, ebenfalls eine PDAC-Zelllinie, auch zu einer Induktion von IL-22 in Splenozyten (Ergebnisse nicht gezeigt). Das IL-22 wurde dabei vermutlich ebenfalls durch IL-1 α induziert. Die von Zhuang et al. beschriebene Tumorreduktion ist daher möglicherweise auch auf eine indirekte Hemmung von IL-22 zurückzuführen. Derzeit befinden sich klinische Phase I- und Phase II-Studien in der Rekrutierungsphase, um den Effekt von Anakinra auf Krebspatienten zu untersuchen (www.clinicaltrials.gov; NCT02550327, NCT01624766, NCT02090101).

6.4.2.2 Neutralisation von IL-1 α

Anders als durch die Rezeptorblockade, kann durch die Neutralisation die Wirkung von IL-1 α spezifisch gehemmt werden. Bedingt durch ihre unterschiedlichen Sekretionsmechanismen, wirkt IL-1 α vornehmlich lokal und IL-1 β systemisch (Dinarello et al., 2012). Von diesem Aspekt wäre die Neutralisation von IL-1 α daher mit weniger Nebenwirkungen verbunden und würde auch eine IL-1 α induzierte IL-1 β -Sekretion

verhindern. In einer klinischen Phase-I-Studie wurde bereits die Sicherheit und Tolerierbarkeit eines humanen Anti-IL-1 α -Antikörpers ohne dosislimitierende Toxizität festgestellt, sowie Hinweise auf eine Verlangsamung der Progression in therapierefraktärem fortgeschrittenen Tumorleiden beobachtet (Hong et al., 2014). Der Antikörper kommt inzwischen unter dem Namen MABp1 in einer klinischen Phase-III-Studie zum metastasierten kolorektalen Karzinom zum Einsatz (www.clinicaltrials.gov; NCT01767857). Ziel dieser Studie ist eine Lebensverlängerung der Patienten und Linderung der tumorassoziierten Symptomatik. Im Gegensatz zu derzeitigen Therapeutika, die durch ihre hohe Zelltoxizität oft nur intervallweise angewendet werden können, soll MABp1, wie in einer klinischen Phase-I-Studie beschrieben (Hong et al., 2014), eine bessere Verträglichkeit aufweisen (www.clinicaltrials.gov; NCT01767857). IL-1 α ist in den meisten epithelialen Tumorzellen enthalten (Dinarello et al., 2012). Ein positiver Abschluss der Studie wäre daher auch für andere Karzinomentitäten interessant. Trotzdem gilt gerade die Auswahl des kolorektalen Karzinoms in dieser Studie als höchst interessant, da IL-22 in Darmkrebs mitunter am besten erforscht ist und diesen begünstigt (Djaldetti et al., 2014; Huber et al., 2012; Jiang et al., 2013; Kirchberger et al., 2013; Koltsova et al., 2014; Kryczek et al., 2014; Song et al., 2015). Unsere Tumorversuche belegten eine IL-1 α -abhängige IL-22-Induktion. Sollte diese Studie nach Abschluss einen Überlebensvorteil der Patienten durch die Neutralisation von IL-1 α demonstrieren, wäre es von wissenschaftlichem Interesse, ob und welcher Anteil dabei auf die Inhibition der IL-22-Synthese entfällt.

6.5 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse stammen aus murinen Versuchen und dienen in erster Linie der weiteren Forschung als Grundlage. Am Ende müssen weitere Untersuchungen klären, inwieweit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. In diesem Zusammenhang gilt IL-22 als vielversprechende Zielstruktur der Tumorthherapie (Lim et al., 2014; Sabat et al., 2014). Die Durchführung einer klinischen Studie zur Beurteilung der Effektivität einer anti-tumoralen Therapie, durch die Inhibition des IL-22-Systems, wurde bislang jedoch nicht durchgeführt. Die gesammelten experimentellen Ergebnisse der letzten Jahren, die auf eine Tumorreduktion durch die Neutralisation von IL-22 in murinen Versuchen hinweisen (Kirchberger et al., 2013; Kryczek et al., 2014), sowie der Bedarf neuer

Therapieansätze, die nicht zu einer Einschränkung des Immunsystems führen und damit auch die Lebensqualität verbessern, zeigt die Notwendigkeit der Translation der Versuche auf das humane System.

Weitere Therapiemöglichkeiten, die einen Einfluss auf die Regulation von IL-22 besitzen und damit auch zu einer Tumorreduktion führen könnten, bieten weitere erfolgsversprechende Ansätze. Dazu zählt insbesondere IL-1 α , das in unseren Tumorversuchen als Hauptregulator der IL-22-Synthese wirkte und derzeit in einer Phase-III-Studie zur Behandlung des fortgeschrittenen Kolonkarzinoms erprobt wird.

7 Abkürzungsverzeichnis

A

AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat

B

BCL	<i>B-cell lymphoma sequence</i>
BD	β-Defensin
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin

C

CDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CXCL	<i>CXC-motif</i> -Chemokin-Ligand

D

ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELR ⁺	Positive geladene Glu-Leu-Arg-Sequenz

F

FBS	Fetales Rinder-Serum
FOLFOX	Folsäure, Fluorouracil und Oxaliplatin

G

G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
-------	--

H

HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HRP	Meerrettichperoxidase

J

JAK	Januskinase
-----	-------------

L

Lti	<i>Lymphoid tissue inducer</i>
-----	--------------------------------

M

MAPK	<i>Mitogen-activated proteinkinase</i>
MCL	<i>Myeloid cell leukemia sequence</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>

N

NCR	<i>Natural cytotoxicity triggering receptor</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells</i>
NKT	Natürliche Killer-T-Zelle

I

IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IL-1RI	IL-1-Rezeptor-Typ-I
IL-1RII	IL-1-Rezeptor-Typ-II
IL-1RA	IL-1 Rezeptorantagonist
IL-10RB	Interleukin-10-Rezeptor- β
IL-22BP	IL-22-binding-Protein
IL-22RA1	Interleukin-22 Rezeptor- α 1
ILC	<i>Innate lymphoid cells</i>
IFN	Interferon

P

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
p-STAT	<i>Phosphorylierter signal transducer and activator of transcription</i>
PTG	<i>Pepsin-trypsin digest of gliadin</i>

R

RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ T	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor γT</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 medium</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>

S

SDS	Natrium-Dodecylsulphat
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>

T

TBS-T	<i>TRIS-buffered saline- Tween</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TH	T-Helfer
TIL	Tumor-infiltrierende Leukozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Tyk	Tyrosinkinase

V

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
------	---

8 Literaturverzeichnis

Akil H, Abbaci, A, Lalloue, F, Bessette, B, Costes, LM, Domballe, L, Charreau, S, Guilloteau, K, Karayan-Tapon, L, Bernard, FX, Morel, F, Jauberteau, MO, & Lecron, JC. IL22/IL-22R pathway induces cell survival in human glioblastoma cells.

PLoS One 2015; 10: e0119872.

Apte RN, Krelin, Y, Song, X, Dotan, S, Recih, E, Elkabets, M, Carmi, Y, Dvorkin, T, White, RM, Gayvoronsky, L, Segal, S, & Voronov, E. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions.

Eur J Cancer 2006; 42:751-759.

Apte RN, & Voronov, E. Interleukin-1—a major pleiotropic cytokine in tumor–host interactions. *Seminars in Cancer Biology*, (2002). 12, 277-290.

Apte RN, & Voronov, E. Is interleukin-1 a good or bad ‘guy’ in tumor immunobiology and immunotherapy?

Immunol Rev 2008; 222:222-241.

Aujla SJ, Chan, YR, Zheng, MQ, Fei, MJ, Askew, DJ, Pociask, DA, Reinhart, TA, McAllister, F, Edeal, J, Gaus, K, Husain, S, Kreindler, JL, Dubin, PJ, Pilewski, JM, Myerburg, MM, Mason, CA, Iwakura, Y, & Kolls, JK. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia.

Nat Med 2008; 14:275-281.

Bard JD, Gelebart, P, Anand, M, Amin, HM, & Lai, R. Aberrant expression of IL-22 receptor 1 and autocrine IL-22 stimulation contribute to tumorigenicity in ALK+ anaplastic large cell lymphoma.

Leukemia 2008; 22:1595-1603.

Basu R, Whitley, SK, Bhaumik, S, Zindl, CL, Schoeb, TR, Benveniste, EN, Pear, WS, Hatton, RD, & Weaver, CT. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance.

Nat Immunol 2015; 16:286-295.

Boniface K, Bernard, FX, Garcia, M, Gurney, AL, Lecron, JC, & Morel, F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes.

J. Immunol 2005; 174:3695-3702.

Boraschi D, Bossu, P, Macchia, G, Ruggiero, P, & Tagliabue, A. Structure-function relationship in the IL-1 family.

Front Biosci 1996; 1:d270-308.

Boraschi D, Villa, L, Volpini, G, Bossu, P, Censini, S, Ghiara, P, Scapigliati, G, Nencioni, L, Bartalini, M, Matteucci, G, & et al. Differential activity of interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta in the stimulation of the immune response in vivo.

Eur J Immunol 1990; 20:317-321.

Brand S, Dambacher, J, Beigel, F, Zitzmann, K, Heeg, MH, Weiss, TS, Prufer, T, Olszak, T, Steib, CJ, Storr, M, Goke, B, Diepolder, H, Bilzer, M, Thasler, WE, & Auernhammer, CJ. IL-22-mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 292:G1019-1028.

Bullard KM, Lund, L, Mudgett, JS, Mellin, TN, Hunt, TK, Murphy, B, Ronan, J, Werb, Z, & Banda, MJ. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice.
Ann Surg 1999; 230:260-265.

Buonocore S, Ahern, PP, Uhlig, HH, Ivanov, II, Littman, DR, Maloy, KJ, & Powrie, F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology.
Nature 2010; 464:1371-1375.

Caruso RA, Branca, G, Fedele, F, Irato, E, Finocchiaro, G, Parisi, A, & Ieni, A. Mechanisms of coagulative necrosis in malignant epithelial tumors (Review).
Oncol Lett 2014; 8:1397-1402.

Cella M, Fuchs, A, Vermi, W, Facchetti, F, Otero, K, Lennerz, JK, Doherty, JM, Mills, JC, & Colonna, M. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity.
Nature 2009; 457:722-725.

Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen.
Toxicol Pathol 2006; 34:455-465.

Chung Y, Chang, SH, Martinez, GJ, Yang, XO, Nurieva, R, Kang, HS, Ma, L, Watowich, SS, Jetten, AM, Tian, Q, & Dong, C. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling.
Immunity 2009; 30:576-587.

Ciric B, El-behi, M, Cabrera, R, Zhang, GX, & Rostami, A. IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells.
J Immunol 2009; 182:5296-5305.

Colotta F, Re, F, Muzio, M, Bertini, R, Polentarutti, N, Sironi, M, Giri, JG, Dower, SK, Sims, JE, & Mantovani, A. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4.
Science 1993; 261:472-475.

Cupedo T, Crellin, NK, Papazian, N, Rombouts, EJ, Weijer, K, Grogan, JL, Fibbe, WE, Cornelissen, JJ, & Spits, H. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells.
Nat Immunol 2009; 10:66-74.

Curd LM, Favors, SE, & Gregg, RK. Pro-tumour activity of interleukin-22 in HPAFII human pancreatic cancer cells.
Clin Exp Immunol 2012; 168:192-199.

De Luca A, Zelante, T, D'Angelo, C, Zagarella, S, Fallarino, F, Spreca, A, Iannitti, RG, Bonifazi, P, Renauld, JC, Bistoni, F, Puccetti, P, & Romani, L. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance.
Mucosal Immunol 2010; 3:361-373.

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease.
Blood 1996; 87:2095-2147.

Dinarello, CA. Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade?
Cancer Metastasis Rev 2010; 29:317-329.

Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases.
Blood 2011; 117:3720-3732.

Dinarello CA, Simon, A, & van der Meer, JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases.
Nat Rev Drug Discov 2012; 11:633-652.

Djaldetti M, & Bessler, H. Modulators affecting the immune dialogue between human immune and colon cancer cells.
World J Gastrointest Oncol 2014; 6:129-138.

Doisne JM, Soulard, V, Becourt, C, Amniai, L, Henrot, P, Havenar-Daughton, C, Blanchet, C, Zitvogel, L, Ryffel, B, Cavailon, JM, Marie, JC, Couillin, I, & Benlagha, K. Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria.
J Immunol 2011; 186:662-666.

Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming.
Nat Rev Immunol 2008; 8:337-348.

Duhen R, Glatigny, S, Arbelaez, CA, Blair, TC, Oukka, M, & Bettelli, E. Cutting edge: the pathogenicity of IFN-gamma-producing Th17 cells is independent of T-bet.
J Immunol 2013; 190:4478-4482.

Duhen T, Geiger, R, Jarrossay, D, Lanzavecchia, A, & Sallusto, F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells.
Nat Immunol 2009;10:857-863.

Feng D, Park, O, Radaeva, S, Wang, H, Yin, S, Kong, X, Zheng, M, Zakhari, S, Kolls, JK, & Gao, B. Interleukin-22 ameliorates cerulein-induced pancreatitis in mice by inhibiting the autophagic Pathway.
Int J Biol Sci 2012; 8:249-257.

Fini ME, Strissel, KJ, Girard, MT, Mays, JW, & Rinehart, WB. Interleukin 1 alpha mediates collagenase synthesis stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate.
J Biol Chem 1994; 269:11291-11298.

Fisher PB, Gopalkrishnan, RV, Chada, S, Ramesh, R, Grimm, EA, Rosenfeld, MR, Curiel, DT, & Dent, P. mda-7/IL-24, a novel cancer selective apoptosis inducing cytokine gene: from the laboratory into the clinic.
Cancer Biol Ther 2003; 2:S23-37.

Fisher PB, Sarkar, D, Lebedeva, IV, Emdad, L, Gupta, P, Sauane, M, Su, ZZ, Grant, S, Dent, P, Curiel, DT, Senzer, N, & Nemunaitis, J. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24): novel gene therapeutic for metastatic melanoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224:300-307.

Fukui H, Zhang, X, Sun, C, Hara, K, Kikuchi, S, Yamasaki, T, Kondo, T, Tomita, T, Oshima, T, Watari, J, Imura, J, Fujimori, T, Sasako, M, & Miwa, H. IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling. *Br J Cancer*, (2014). 111, 763-771.

Gemma A, Takenaka, K, Hosoya, Y, Matuda, K, Seike, M, Kurimoto, F, Ono, Y, Uematsu, K, Takeda, Y, Hibino, S, Yoshimura, A, Shibuya, M, & Kudoh, S. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *European Journal of Cancer* 2001; 37:1554-1561.

Ghoreschi K, Laurence, A, Yang, XP, Tato, CM, McGeachy, MJ, Konkel, JE, Ramos, HL, Wei, L, Davidson, TS, Bouladoux, N, Grainger, JR, Chen, Q, Kanno, Y, Watford, WT, Sun, HW, Eberl, G, Shevach, EM, Belkaid, Y, Cua, DJ, Chen, W, & O'Shea, JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010; 467:967-971.

Giavazzi R, Garofalo, A, Bani, MR, Abbate, M, Ghezzi, P, Boraschi, D, Mantovani, A, & Dejana, E. Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice. *Cancer Res* 1990; 50:4771-4775.

Gimbrone MA, Leapman, SB, Cotran, RS, & Folkman, J. Tumor Dormancy in vivo by prevention of Neovascularization. *J Exp Med* 1972; 136:261-276.

Haas TL, Milkiewicz, M, Davis, SJ, Zhou, AL, Egginton, S, Brown, MD, Madri, JA, & Hudlicka, O. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H1540-H1547.

Hacham M, Argov, S, White, RM, Segal, S, & Apte, RN. Different patterns of interleukin-1alpha and interleukin-1beta expression in organs of normal young and old mice. *Eur Cytokine Netw* 2002; 13:55-65.

Hansson M, Silverpil, E, Linden, A, & Glader, P. Interleukin-22 produced by alveolar macrophages during activation of the innate immune response. *Inflamm Res* 2013; 62:561-569.

Harris KM, Fasano, A, & Mann, DL. Cutting edge: IL-1 controls the IL-23 response induced by gliadin, the etiologic agent in celiac disease. *J Immunol* 2008; 181:4457-4460.

Hastie AT, Everts, KB, Cho, SK, Zangrilli, J, Shaver, JR, Pollice, MB, Fish, JE, & Peters, SP. IL-1 β release from cultured bronchial epithelial cells and bronchoalveolar lavage cells from allergic and normal humans following segmental challenge with ragweed. *Cytokine* 1996; 8:730-738.

He M, & Liang, P. IL-24 transgenic mice: in vivo evidence of overlapping functions for IL-20, IL-22, and IL-24 in the epidermis.
J Immunol 2010; 184:1793-1798.

Hernandez PP, Mahlakoiv, T, Yang, I, Schwierzeck, V, Nguyen, N, Guendel, F, Gronke, K, Ryffel, B, Holscher, C, Dumoutier, L, Renaud, JC, Suerbaum, S, Staeheli, P, & Diefenbach, A. Interferon-lambda and interleukin 22 act synergistically for the induction of interferon-stimulated genes and control of rotavirus infection.
Nat Immunol 2015; 16:698-707.

Hey YY, & O'Neill, HC. Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function.
J Cell Mol Med 2012; 16:2611-2619.

Hoegl S, Bachmann, M, Scheiermann, P, Goren, I, Hofstetter, C, Pfeilschifter, J, Zwissler, B, & Muhl, H. Protective properties of inhaled IL-22 in a model of ventilator-induced lung injury.
Am J Respir Cell Mol Biol 2011; 44:369-376.

Holmgren L, O'Reilly, MS, & Folkman, J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.
Nat Med 1995; 1:149-153.

Hong DS, Hui, D, Bruera, E, Janku, F, Naing, A, Falchook, GS, Piha-Paul, S, Wheler, JJ, Fu, S, Tsimberidou, AM, Stecher, M, Mohanty, P, Simard, J, & Kurzrock, R. MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 α in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study.
Lancet Oncol 2014; 15:656-666.

Huber S, Gagliani, N, Zenewicz, LA, Huber, FJ, Bosurgi, L, Hu, B, Hedl, M, Zhang, W, O'Connor, W, Jr., Murphy, AJ, Valenzuela, DM, Yancopoulos, GD, Booth, CJ, Cho, JH, Ouyang, W, Abraham, C, & Flavell, RA. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine.
Nature 2012; 491:259-263.

Ikeda S, Saijo, S, Murayama, MA, Shimizu, K, Akitsu, A, & Iwakura, Y. Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-beta-induced Foxp3 expression.
J Immunol 2014; 192:1449-1458.

Imaizumi T, Itaya, H, Nasu, S, Yoshida, H, Matsubara, Y, Fujimoto, K, Matsumiya, T, Kimura, H, & Satoh, K. Expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells stimulated with interleukin-1 α --an autocrine regulation of angiogenesis and inflammatory reactions.
Thromb Haemost 2000; 83:949-955.

Ivanov, II, McKenzie, BS, Zhou, L, Tadokoro, CE, Lepelley, A, Lafaille, JJ, Cua, DJ, & Littman, DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.
Cell 2006; 126:1121-1133.

Ji Y, Yang, X, Li, J, Lu, Z, Li, X, Yu, J, & Li, N. IL-22 promotes the migration and invasion of gastric cancer cells via IL-22R1/AKT/MMP-9 signaling.
Int J Clin Exp Pathol 2014; 7:3694-3703.

Jiang RQ, Tan, ZM, Deng, L, Chen, Y, Xia, YX, Gao, Y, Wang, XH, & Sun, BC. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3.
Hepatology 2011; 54:900-909.

Jiang RQ, Wang, HY, Deng, L, Hou, JJ, Shi, RH, Yao, M, Gao, Y, Yao, AH, Wang, XH, Yu, LZ, & Sun, BC. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3.
BMC Cancer 2013; 13:59

Jiang S. (2011). *TH17 Cells in Health and Disease*: Springer Science & Business Media.
Jin L, Yuan, RQ, Fuchs, A, Yao, Y, Joseph, A, Schwall, R, Schnitt, SJ, Guida, A, Hastings, HM, Andres, J, Turkel, G, Polverini, PJ, Goldberg, ID, & Rosen, EM. Expression of interleukin-1 β in human breast carcinoma.
Cancer 1997; 80:421-434.

Jones BC, Logsdon, NJ, & Walter, MR. Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain.
Structure 2008; 16:1333-1344.

Kirchberger S, Royston, DJ, Boulard, O, Thornton, E, Franchini, F, Szabady, RL, Harrison, O, & Powrie, F. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model.
J Exp Med 2013; 210:917-931.

Kobold S, Völk, S, Clauditz, T, Küpper, NJ, Minner, S, Tufman, A, Düwell, P, Lindner, M, Koch, I, Heidegger, S, Rothenfuer, S, Schnurr, M, Huber, RM, Wilczak, W, & Endres, S. Interleukin-22 is frequently expressed in small- and large-Cell lung cancer and promotes growth in chemotherapy-resistant cancer cells.
J Thorac Oncol 2013; 8:1032-1042.

Koltsova EK, & Grivennikov, SI. IL-22 gets to the stem of colorectal cancer.
Immunity 2014; 40:639-641.

Kryczek I, Lin, Y, Nagarsheth, N, Peng, D, Zhao, L, Zhao, E, Vatan, L, Szeliga, W, Dou, Y, Owens, S, Zgodzinski, W, Majewski, M, Wallner, G, Fang, J, Huang, E, & Zou, W. IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L.
Immunity 2014; 40:772-784.

Kumar P, Thakar, MS, Ouyang, W, & Malarkannan, S. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection.
Mucosal Immunol 2013; 6:69-82.

Langley RG, Papp, K, Gottlieb, AB, Krueger, GG, Gordon, KB, Williams, D, Valdes, J, Setze, C, & Strober, B. Safety results from a pooled analysis of randomized, controlled phase II and III clinical trials and interim data from an open-label extension trial of the interleukin-12/23 monoclonal antibody, briakinumab, in moderate to severe psoriasis.
J Eur Acad Dermatol Venereol 2013; 27:1252-1261.

Langowski JL, Zhang, X, Wu, L, Mattson, JD, Chen, T, Smith, K, Basham, B, McClanahan, T, Kastelein, RA, & Oft, M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442:461-465.

Lejeune D, Dumoutier, L, Constantinescu, S, Kruijer, W, Schuringa, JJ, & Renauld, JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 2002; 277:33676-33682.

Leung JM, Davenport, M, Wolff, MJ, Wiens, KE, Abidi, WM, Poles, MA, Cho, I, Ullman, T, Mayer, L, & Loke, P. IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal Immunol*, (2014). 7, 124-133.

Li Z, Burns, AR, Miller, SB, & Smith, CW. CCL20, gammadelta T cells, and IL-22 in corneal epithelial healing. *FASEB J* 2011; 25:2659-2668.

Liang SC, Tan, X-Y, Luxenberg, DP, Karim, R, Dunussi-Joannopoulos, K, Collins, M, & Fouser, LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203:2271-2279.

Lim C, & Savan, R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25:257-271.

Ling J, Kang, Y, Zhao, R, Xia, Q, Lee, DF, Chang, Z, Li, J, Peng, B, Fleming, JB, Wang, H, Liu, J, Lemischka, IR, Hung, MC, & Chiao, PJ. KrasG12D-induced IKK2/beta/NF-kappaB activation by IL-1alpha and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2012; 21:105-120.

Liu FL, Chen, CH, Chu, SJ, Chen, JH, Lai, JH, Sytwu, HK, & Chang, DM. Interleukin (IL)-23 p19 expression induced by IL-1beta in human fibroblast-like synoviocytes with rheumatoid arthritis via active nuclear factor-kappaB and AP-1 dependent pathway. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46:1266-1273.

Liu T, Peng, L, Yu, P, Zhao, Y, Shi, Y, Mao, X, Chen, W, Cheng, P, Wang, T, Chen, N, Zhang, J, Liu, X, Li, N, Guo, G, Tong, W, Zhuang, Y, & Zou, Q. Increased circulating Th22 and Th17 Cells are associated with tumor progression and patient survival in human gastric cancer. *J Clin Immunol* 2012; 32:1332-1339.

Lyakh L, Trinchieri, G, Provezza, L, Carra, G, & Gerosa, F. Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev* 2008; 226:112-131.

Macho-Fernandez E, Koroleva, EP, Spencer, CM, Tighe, M, Torrado, E, Cooper, AM, Fu, YX, & Tumanov, AV. Lymphotoxin beta receptor signaling limits mucosal damage through driving IL-23 production by epithelial cells. *Mucosal Immunol* 2015; 8:403-413.

Magri G, Miyajima, M, Bascones, S, Mortha, A, Puga, I, Cassis, L, Barra, CM, Comerma, L, Chudnovskiy, A, Gentile, M, Llige, D, Cols, M, Serrano, S, Arostegui, JI, Juan, M, Yague, J,

Merad, M, Fagarasan, S, & Cerutti, A. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells.
Nat Immunol 2014; 15:354-364.

Martin B, Hirota, K, Cua, DJ, Stockinger, B, & Veldhoen, M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals.
Immunity 2009; 31:321-330.

Matsuo Y, Sawai, H, Ochi, N, Yasuda, A, Takahashi, H, Funahashi, H, Takeyama, H, & Guha, S. Interleukin-1alpha secreted by pancreatic cancer cells promotes angiogenesis and its therapeutic implications.
J Surg Res 2009; 153:274-281.

Melisi D, Niu, J, Chang, Z, Xia, Q, Peng, B, Ishiyama, S, Evans, DB, & Chiao, PJ. Secreted interleukin-1alpha induces a metastatic phenotype in pancreatic cancer by sustaining a constitutive activation of nuclear factor-kappaB.
Mol Cancer Res 2009; 7:624-633.

Miller LJ, Kurtzman, SH, Anderson, K, Wang, Y, Stankus, M, Renna, M, Lindquist, R, Barrows, G, & Kreutzer, DL. Interleukin-1 Family Expression in Human Breast Cancer: Interleukin-1 Receptor Antagonist.
Cancer Invest 2009; 18:293-302.

Nagakawa H, Shimozato, O, Yu, L, Takiguchi, Y, Tatsumi, K, Kuriyama, T, & Tagawa, M. Expression of Interleukin-22 in murine carcinoma cells did not influence tumour growth in vivo but did improve survival of the inoculated hosts.
Scand Jof Immunol 2004; 60:449-454.

Nagalakshmi ML, Rascole, A, Zurawski, S, Menon, S, & de Waal Malefyt, R. Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells.
Int Immunopharmacol 2004; 4:679-691.

Nagase H, & Woessner, JF, Jr. Matrix metalloproteinases.
J Biol Chem 1999; 274:21491-21494.

Nardinocchi L, Sonego, G, Passarelli, F, Avitabile, S, Scarponi, C, Failla, CM, Simoni, S, Albanesi, C, & Cavani, A. Interleukin-17 and interleukin-22 promote tumor progression in human nonmelanoma skin cancer.
Eur J Immunol 2015; 45:922-931.

Nastala CL, Edington, HD, McKinney, TG, Tahara, H, Nalesnik, MA, Brunda, MJ, Gately, MK, Wolf, SF, Schreiber, RD, Storkus, WJ, & et al. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production.
J Immunol 1994; 153:1697-1706.

Ngiow SF, Teng, MW, & Smyth, MJ. A balance of interleukin-12 and -23 in cancer.
Trends Immunol 2013; 34:548-555.

Nogralas KE, Zaba, LC, Guttman-Yassky, E, Fuentes-Duculan, J, Suarez-Farinas, M, Cardinale, I, Khatcherian, A, Gonzalez, J, Pierson, KC, White, TR, Pensabene, C, Coats, I, Novitskaya, I,

Lowes, MA, & Krueger, JG. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways.
Br J Dermatol 2008; 159:1092-1102.

Nozaki S, Sledge, GW, Jr., & Nakshatri, H. Cancer cell-derived interleukin 1alpha contributes to autocrine and paracrine induction of pro-metastatic genes in breast cancer.
Biochem Biophys Res Commun 2000; 275:60-62.

Ortega C, Fernandez, AS, Carrillo, JM, Romero, P, Molina, IJ, Moreno, JC, & Santamaria, M. IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines.
J Leukoc Biol 2009; 86:435-443.

Park O, Wang, H, Weng, H, Feigenbaum, L, Li, H, Yin, S, Ki, SH, Yoo, SH, Dooley, S, Wang, FS, Young, HA, & Gao, B. In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression.
Hepatology 2011; 54:252-261.

Pearson C, Uhlig, HH, & Powrie, F. Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut.
Trends Immunol 2012; 33:289-296.

Pickert G, Neufert, C, Leppkes, M, Zheng, Y, Wittkopf, N, Warntjen, M, Lehr, HA, Hirth, S, Weigmann, B, Wirtz, S, Ouyang, W, Neurath, MF, & Becker, C. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing.
J Exp Med 2009; 206:1465-1472.

Qin S, Ma, S, Huang, X, Lu, D, Zhou, Y, & Jiang, H. Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression.
Chin J Cancer Res 2014; 26:135-141.

Qiu J, Heller, JJ, Guo, X, Chen, ZM, Fish, K, Fu, YX, & Zhou, L. The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells.
Immunity 2012; 36:92-104.

Quintana FJ, Basso, AS, Iglesias, AH, Korn, T, Farez, MF, Bettelli, E, Caccamo, M, Oukka, M, & Weiner, HL. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor.
Nature 2008; 453:65-71.

Radaeva S, Sun, R, Pan, HN, Hong, F, & Gao, B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation.
Hepatology 2004; 39:1332-1342.

Ramesh R, Mhashilkar, AM, Tanaka, F, Saito, Y, Branch, CD, Sieger, K, Mumm, JB, Stewart, AL, Boquoi, A, Dumoutier, L, Grimm, EA, Renauld, JC, Kotenko, S, & Chada, S. Melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin (IL)-24 is a novel ligand that regulates angiogenesis via the IL-22 receptor.
Cancer Res 2003; 63:5105-5113.

Ramirez JM, Brembilla, NC, Sorg, O, Chicheportiche, R, Matthes, T, Dayer, JM, Saurat, JH, Roosnek, E, & Chizzolini, C. Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells.
Eur J Immunol 2010; 40:2450-2459.

Reynders A, Yessaad, N, Vu Manh, TP, Dalod, M, Fenis, A, Aubry, C, Nikitas, G, Escaliere, B, Renauld, JC, Dussurget, O, Cossart, P, Lecuit, M, Vivier, E, & Tomasello, E. Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+RORgammat+ and NKp46+RORgammat- lymphoid cells.
EMBO J 2011; 30:2934-2947.

Ricote M, Garcia-Tunon, I, Bethencourt, FR, Fraile, B, Paniagua, R, & Royuela, M. Interleukin-1 (IL-1alpha and IL-1beta) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma.
Cancer 2004; 100:1388-1396.

Rider P, Carmi, Y, Guttman, O, Braiman, A, Cohen, I, Voronov, E, White, MR, Dinarello, CA, & Apte, RN. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation.
J Immunol 2011; 187:4835-4843.

Robinette ML, Fuchs, A, Cortez, VS, Lee, JS, Wang, Y, Durum, SK, Gilfillan, S, Colonna, M, & Immunological Genome, C. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets.
Nat Immunol 2015; 16:306-317.

Rutz S, Eidenschenk, C, & Ouyang, W. IL-22, not simply a Th17 cytokine.
Immunological Reviews 2013;252: 116-132.

Sa SM, Valdez, PA, Wu, J, Jung, K, Zhong, F, Hall, L, Kasman, I, Winer, J, Modrusan, Z, Danilenko, DM, & Ouyang, W. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis.
J Immunol 2007; 178:2229-2240.

Sabat R, Ouyang, W, & Wolk, K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system.
Nat Rev Drug Discov, (2014). 13, 21-38.

Saijo Y, Tanaka, M, Miki, M, Usui, K, Suzuki, T, Maemondo, M, Hong, X, Tazawa, R, Kikuchi, T, Matsushima, K, & Nukiwa, T. Proinflammatory cytokine IL-1 promotes tumor growth of Lewis Lung Carcinoma by induction of angiogenic factors: In vivo analysis of tumor-stromal interaction.
J Immunol 2002; 169:469-475.

Salven P, Hattori, K, Heissig, B, & Rafii, S. Interleukin-1alpha promotes angiogenesis in vivo via VEGFR-2 pathway by inducing inflammatory cell VEGF synthesis and secretion.
FASEB J 2002; 16:1471-1473.

Singer CF, Hudelist, G, Gschwantler-Kaulich, D, Fink-Retter, A, Mueller, R, Walter, I, Czerwenka, K, & Kubista, E. Interleukin-1alpha protein secretion in breast cancer is associated with poor differentiation and estrogen receptor alpha negativity.
Int J Gynecol Cancer 2006; 16:556-559.

Song B, Ma, Y, Liu, X, Li, W, Zhang, J, Liu, J, & Han, J. IL-22 promotes the proliferation of cancer cells in smoking colorectal cancer patients.

Tumour Biol 2015; 37:1349

Sonnenberg GF, Fouser, LA, & Artis, D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22.

Nat Immunol 2011; 12:383-390.

Sounni NE, & Noel, A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy.

Clin Chem 2013; 59:85-93.

Spits H, Artis, D, Colonna, M, Diefenbach, A, Di Santo, JP, Eberl, G, Koyasu, S, Locksley, RM, McKenzie, AN, Mebius, RE, Powrie, F, & Vivier, E. Innate lymphoid cells - a proposal for uniform nomenclature.

Nat Rev Immunol 2013; 13:145-149.

Stobbe-Maicherski N, Wolff, S, Wolff, C, Abel, J, Sydlik, U, Frauenstein, K, & Haarmann-Stemmann, T. The interleukin-6-type cytokine oncostatin M induces aryl hydrocarbon receptor expression in a STAT3-dependent manner in human HepG2 hepatoma cells.

FEBS J 2013; 280:6681-6690.

Strieter RM, Polverini, PJ, Kunkel, SL, Arenberg, DA, Burdick, MD, Kasper, J, Dzuiba, J, Van Damme, J, Walz, A, Marriott, D, & et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis.

J Biol Chem 1995; 270:27348-27357.

Sutton CE, Lalor, SJ, Sweeney, CM, Brereton, CF, Lavelle, EC, & Mills, KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity.

Immunity 2009; 31:331-341.

Trifari S, Kaplan, CD, Tran, EH, Crellin, NK, & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells.

Nat Immunol 2009; 10:864-871.

Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity.

Nat Rev Immunol 2003; 3:133-146.

Veldhoen M, Hocking, RJ, Atkins, CJ, Locksley, RM, & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.

Immunity 2006; 24:179-189.

Volpe E, Touzot, M, Servant, N, Marloie-Provost, MA, Hupe, P, Barillot, E, & Soumelis, V. Multiparametric analysis of cytokine-driven human Th17 differentiation reveals a differential regulation of IL-17 and IL-22 production.

Blood 2009; 114:3610-3614.

Voronov E, Carmi, Y, & Apte, RN. The role IL-1 in tumor-mediated angiogenesis.

Front Physiol 2014; 5:114.

- Walker JA, Barlow, JL, & McKenzie, AN. Innate lymphoid cells--how did we miss them?
Nat Rev Immunol 2013; 13:75-87.
- Weber GF, Gaertner, FC, Erl, W, Janssen, K-P, Blechert, B, Holzmann, B, Weighardt, H, & Essler, M. IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G2-M phase.
J Immunol 2006; 177:8266-8272.
- Wen Z, Liao, Q, Zhao, J, Hu, Y, You, L, Lu, Z, Jia, C, Wei, Y, & Zhao, Y. High expression of interleukin-22 and its receptor predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma.
Ann Surg Oncol 2014; 21:125-132.
- Werman A, Werman-Venkert, R, White, R, Lee, JK, Werman, B, Krelin, Y, Voronov, E, Dinarello, CA, & Apte, RN. The precursor form of IL-1 is an intracrine proinflammatory activator of transcription.
Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:2434-2439.
- Wolf JS, Chen, Z, Dong, G, Sunwoo, JB, Bancroft, CC, Capo, DE, Yeh, NT, Mukaida, N, & Van Waes, C. IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas.
Clin Cancer Res 2001; 7:1812-1820.
- Wolk K, Haugen, HS, Xu, W, Witte, E, Waggie, K, Anderson, M, vom Baur, E, Witte, K, Warszawska, K, Philipp, S, Johnson-Leger, C, Volk, HD, Sterry, W, & Sabat, R. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not.
Int J Mol Med 2009; 87:523-536.
- Wolk K, Kunz, S, Asadullah, K, & Sabat, R. Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members?
J Immunol 2002; 168:5397-5402.
- Wolk K, Kunz, S, Witte, E, Friedrich, M, Asadullah, K, & Sabat, R. IL-22 increases the innate immunity of tissues.
Immunity 2004; 21:241-254.
- Wolk K, Witte, E, Wallace, E, Docke, WD, Kunz, S, Asadullah, K, Volk, HD, Sterry, W, & Sabat, R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis.
Eur J Immunol 2006; 36:1309-1323.
- Wolk K, Witte, E, Witte, K, Warszawska, K, & Sabat, R. Biology of interleukin-22.
Semin Immunopathol 2010; 32:17-31.
- Wu T, Cui, L, Liang, Z, Liu, C, Liu, Y, & Li, J. Elevated serum IL-22 levels correlate with chemoresistant condition of colorectal cancer.
Clin Immunol 2013a; 147:38-39.
- Wu T, Cui, L, Liang, Z, Liu, C, Liu, Y, & Li, J. Elevated serum IL-22 levels correlate with chemoresistant condition of colorectal cancer.
Clin Immunol 2013b; 147:38-39.

Xu X, Tang, Y, Guo, S, Zhang, Y, Tian, Y, Ni, B, & Wang, H. Increased intratumoral interleukin 22 levels and frequencies of interleukin 22-producing CD4+ T cells correlate with pancreatic cancer progression.

Pancreas 2014a; 43:470-477.

Xu X, Weiss, ID, Zhang, HH, Singh, SP, Wynn, TA, Wilson, MS, & Farber, JM. Conventional NK cells can produce IL-22 and promote host defense in *Klebsiella pneumoniae* pneumonia.

J Immunol 2014b; 192:1778-1786.

Yeste A, Mascanfroni, ID, Nadeau, M, Burns, EJ, Tukupah, AM, Santiago, A, Wu, C, Patel, B, Kumar, D, & Quintana, FJ. IL-21 induces IL-22 production in CD4+ T cells.

Nat Commun 2014; 5:3753.

Zenewicz LA, Yancopoulos, GD, Valenzuela, DM, Murphy, AJ, Karow, M, & Flavell, RA. Interleukin-22 but not Interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation.

Immunity 2007; 27:647-659.

Zhang F, Shang, D, Zhang, Y, & Tian, Y. Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway.

PLoS ONE 2011; 6:e20382.

Zhang W, Chen, Y, Wei, H, Zheng, C, Sun, R, Zhang, J, & Tian, Z. Antiapoptotic activity of autocrine interleukin-22 and therapeutic effects of interleukin-22-small interfering RNA on human lung cancer xenografts.

Clin Cancer Res 2008; 14:6432-6439.

Zhang Z, Andoh, A, Yasui, H, Inatomi, O, Hata, K, Tsujikawa, T, Kitoh, K, Takayanagi, A, Shimizu, N, & Fujiyama, Y. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha upregulate interleukin-23 subunit p19 gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts.

Int J Mol Med 2005; 15:79-83.

Zheng Y, Danilenko, DM, Valdez, P, Kasman, I, Eastham-Anderson, J, Wu, J, & Ouyang, W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis.

Nature 2007; 445:648-651.

Zheng Y, Valdez, PA, Danilenko, DM, Hu, Y, Sa, SM, Gong, Q, Abbas, AR, Modrusan, Z, Ghilardi, N, de Sauvage, FJ, & Ouyang, W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens.

Nat Med 2008; 14:282-289.

Zhou L, Lopes, JE, Chong, MM, Ivanov, II, Min, R, Victora, GD, Shen, Y, Du, J, Rubtsov, YP, Rudensky, AY, Ziegler, SF, & Littman, DR. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function.

Nature 2008; 453:236-240.

Zhuang Y, Peng, L-s, Zhao, Y-l, Shi, Y, Mao, X-h, Guo, G, Chen, W, Liu, X-f, Zhang, J-y, Liu, T, Luo, P, Yu, P-w, & Zou, Q-m. Increased intratumoral IL-22-producing CD4+ T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival.

Cancer Immunol Immun 2012; 61:1965-1975.

Zhuang ZN, Ju, HQ, Aguilar, M, Gocho, T, Li, H, Iida, T, Lee, H, Fan, X, Zhou, H, Ling, J, Li, Z, Fu, J, Wu, M, Li, M, Melisi, D, Iwakura, Y, Xu, K, Fleming, JB, & Chiao, PJ. IL-1 Receptor Antagonist Inhibits Pancreatic Cancer Growth by Abrogating NF-kappaB Activation.
Clin Cancer Res 2015; 22:1432-44

Zindl CL, Lai, JF, Lee, YK, Maynard, CL, Harbour, SN, Ouyang, W, Chaplin, DD, & Weaver, CT. IL-22-producing neutrophils contribute to antimicrobial defense and restitution of colonic epithelial integrity during colitis.
Proc Natl Acad Sci USA 2013; 110:12768-12773.

Internetquellen

1. National Cancer Institute, Anakinra in Treating Patients With Metastatic Cancer Expressing the Interleukin-1 Gene
<https://clinicaltrials.gov/show/NCT00072111> [Zuletzt aufgerufen am 09/12/2015]
2. Gemcitabine, Nab-Paclitaxel, Cisplatin and Anakinra Treatment on Patients With Pancreatic Cancer
<https://clinicaltrials.gov/show/NCT02550327> [Zuletzt aufgerufen am 14/06/2015]
3. Anakinra or Denosumab and Everolimus in Advanced Cancer
<https://clinicaltrials.gov/show/NCT01624766> [Zuletzt aufgerufen am 14/06/2015]
4. Study Evaluating the Influence of LV5FU2 Bevacizumab Plus Anakinra Association on Metastatic Colorectal Cancer (IRAFU)
<https://clinicaltrials.gov/show/NCT02090101> [Zuletzt aufgerufen am 14/06/2015]
5. Clinical Trials a service of U.S. National Institutes of Health – Cancer Institute, A Phase III Study of Xilonix in Patients With Advanced Colorectal Cancer
<https://clinicaltrials.gov/show/NCT01767857> [Zuletzt aufgerufen am 12/12/2015]

9 Veröffentlichungen:

Poster

1. D. Wenk, C. Ochs, S. Endres, S. Kobold

Impact of interleukin-22 in a murine model of breast cancer.

10th Annual Meeting CIMT, Mainz, Mai 2013

2. C. Ochs, P. May, **D. Wenk**, S. Endres, S. Kobold

Impact of interleukin-22 on two murine models of lung and breast cancer.

European Congress of Immunology 2015

Vorträge

1. D. Wenk

Role of Interleukin 22 in Murine Cancer Models

Results colloquium, Graduiertenkolleg 1202 der DFG, München, Januar 2013

2. D. Wenk

Regulation of IL-22 in a Murine Cancer Model

8th Annual Retreat, Graduiertenkolleg 1202 der DFG, Ohlstadt, Juni 2013

10 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Prof. Endres, der mir die einzigartige Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische Pharmakologie durchzuführen. Neben seinen fachlichen Einflüssen in diese Arbeit, lernte ich ihn zudem als hochgeschätzten Mentor kennen, der ein außergewöhnliches Engagement in der Förderung seiner Doktoranden zeigte und mir auch nach meiner Laborzeit immer zur Seite stand.

Auch PD Kobold möchte ich ganz herzlich für die enge Betreuung danken. Sein persönliches Interesse und hohe fachliche Kompetenz haben diese Arbeit stetig vorangetrieben.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden der Abteilung für das außergewöhnliche Arbeitsklima und die Kollegialität bedanken. Es gibt viele Momente, die ich immer in guter Erinnerung behalten werde.

Letztlich möchte ich auch meiner Familie und Freundin danken, die mich in der gesamten Zeit immerwährend unterstützt haben.

Eidesstattliche Versicherung

Wenk, Daniel

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Identifizierung von durch murine Lungen- und Brustkrebszellen produzierten und induzierten Zytokinen, die Interleukin-22 induzieren

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 05.04.2018

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand