

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Klinik der Universität München
Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Universität
Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

Einfluss von Interleukin-22 und CD155 auf die Entstehung von Lungenmetastasen in Lungenkrebsmodellen der Maus



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maryam Juliana Schübel
aus Frankfurt am Main

2023

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dominik Rüttinger
Prof. Dr. Amanda Tufman

**Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:** Dr. Daria Briukhovetska,
Dr. Anamarija Markota

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2023

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	VI
Summary	VII
1 Einleitung	8
1.1 Biologische Grundlagen zu IL-22	8
1.1.1 IL-22 als Zytokin der IL-10 Familie	8
1.1.2 Signaltransduktion von IL-22	8
1.1.3 Zelluläre Quellen von IL-22	9
1.1.4 Regulierung der IL-22 Produktion	10
1.2 Funktionen von IL-22	12
1.2.1 Physiologische Funktionen	12
1.2.2 Pathologische Funktionen	13
1.3 IL-22 und Krebs	14
1.3.1 Grundlagen der immunologischen Tumorkontrolle	14
1.3.2 IL-22 als tumorförderndes Zytokin	15
1.3.3 Potenzielle Mechanismen tumorfördernder Eigenschaften von IL-22	15
1.3.4 Therapeutische Ansätze in der Krebstherapie durch IL-22 Blockade	16
1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit	17
2 Materialien	18
2.1 Chemikalien und Reagenzien	18
2.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	18
2.3 Geräte	19
2.4 Antikörper	19
2.5 Kits und Assays	20
2.6 qPCR-Primer	20
2.7 Zelllinien, Zusätze und Medien	20
2.7.1 Zusätze und Grundmedien	20
2.7.2 Zellkulturmedien	21
2.8 Zelllinien	21
2.9 Zytokine und Stimulanzen	21
2.10 Software	21
3 Methoden	23
3.1 Molekularbiologische Methoden	23
3.1.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription	23
3.1.2 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion	23
3.1.3 RNA-Sequenzierung und Analyse der differentiellen Expression	25

3.2 Zellbiologische Methoden	25
3.2.1 Zellkultivierung.....	25
3.2.2 IL-22-Stimulationsversuche	26
3.2.3 Durchflusszytometrie	26
3.2.4 Scratch-Assay	26
3.2.5 Herstellung der Line-1-CD155 ⁻ Zelllinie mit CRISPR/Cas9.....	27
3.2.6 Herstellung von Line-1-CD155 ⁺ Zellen	28
3.3 Maus- und Tumormodelle.....	28
3.3.1 Intravenöse Tumorzellinjektionen	28
3.3.2 Quantifizierung von Metastasen und Einzelzell-Isolation aus Lungen	28
3.3.3 Klonogene-Metastasen-Analyse.....	29
3.3.4 NK-Zell Depletion	30
3.3.5 Statistische Auswertungen	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Einfluss von IL-22 auf die Expression einzelner Gene in 4T1-Zellen	32
4.2 Einfluss von IL-22 auf die Genexpression von Pvr in Line-1 Zellen	33
4.3 Effekt von IL-22 auf die Expression von CD155 in Line-1 Zellen	34
4.4 Abhängigkeit des Line-1 Tumormodells von NK-Zellen	36
4.5 Die Rolle von CD155 und IL-22 in der Metastasenentstehung	37
4.5.1 Einfluss von CD155 auf die Metastasenentstehung.....	37
4.5.2 Zusammenspiel von IL-22 und CD155 bei der Metastasenentstehung.....	40
5 Diskussion	42
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	42
5.2 IL-22 führt zu einer Hochregulation von Pvr <i>in vitro</i>	42
5.3 IL-22 führt zu einer gesteigerten Expression von CD155 auf Tumorzellen und somit zu einer Inhibierung von NK-Zellen	44
5.4 CD155 zeigt keinen direkten Einfluss auf die Proliferation von Line-1 Zellen <i>in vitro</i>	46
5.5 CD155-Defizienz führt zu einer verminderten Metastasenzahl <i>in vivo</i>	47
5.6 CD155 und IL-22 stellen potenziell wirksame Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Krebstherapien dar	49
5.7 Ausblick	52
6 Literaturverzeichnis	53
7 Anhang	66
7.1 Abkürzungen	66
7.2 Publikationen	68
7.3 Danksagung	69

Zusammenfassung

Interleukin-22 (IL-22) ist ein Zytokin der IL-10-Familie, das im Gegensatz zu vielen anderen Interleukinen nur von hämatopoetischen Zellen produziert wird, aber ausschließlich an Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs bindet, insbesondere an Epithel- und Stromazellen. Durch die Verbindung dieser beiden Zelltypen spielt IL-22 eine wichtige Rolle als Mediator bei lokalen Entzündungsreaktionen, bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Schleimhautbarriere und bei der Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene. Aber auch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Asthma bronchiale oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen scheint IL-22 unter anderem (u.a.) zur Krankheitsentstehung beizutragen. In den letzten Jahren wurde IL-22 zunehmend auch mit der Entstehung und Ausbreitung von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Hohe Konzentrationen von IL-22 waren mit einem schlechteren Krankheitsverlauf und schnellerem Tumorwachstum assoziiert, zudem wurde die tumorfördernde Rolle von IL-22 durch verstärkte Tumor- und Angiogenese, Stammzellaktivierung und verstärkte Proliferation beschrieben.

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass IL-22 im Lungen- und Brustkrebsmodell zwar keinen direkten Einfluss auf das Tumorwachstum, jedoch einen Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren hat. Bisher konnte jedoch kein genauer Mechanismus identifiziert werden, durch den IL-22 seine metastasierungsfördernde Wirkung entfaltet. Die vorliegende Arbeit identifiziert die IL-22 abhängige Hochregulation des Oberflächenrezeptors CD155 als einen Mechanismus zur Förderung der Metastasierung im Lungenkrebsmodell.

Diese Arbeit zeigt, dass die Expression von CD155 auf Tumorzellen durch die Stimulation von IL-22 *in vitro* hochreguliert werden kann. Durch die Stimulation von IL-22 *in vitro* konnte sowohl eine stärkere Expression von Pvr auf genetischer Ebene als auch eine vermehrte Expression von CD155 auf Proteinebene über 72 h nachgewiesen werden. *In vivo* konnte anschließend gezeigt werden, dass CD155 sowohl in IL-22^{-/-} Mäusen als auch in Wildtyp Mäusen eine entscheidende Rolle bei der Metastasenbildung spielt, da eine Deletion von CD155 in Tumorzellen zu einer Verminderung der Metastasierung in beiden Mauslinien führte. Durch eine Reintroduktion von konstitutiv und IL-22 unabhängig exprimierten CD155 in CD155⁻ Zellen konnte dieser Effekt wieder aufgehoben werden. Durch diesen hier gezeigten Zusammenhang von IL-22 und CD155 und deren Einfluss auf die Metastasierung ergeben sich neue vielversprechende Therapieansätze zur Behandlung von Lungenkrebspatient:innen durch eine Blockade von IL-22 oder CD155.

Summary

Interleukin-22 (IL-22) is a cytokine produced exclusively by hematopoietic cells, but unlike many other interleukins, it binds exclusively to cells of non-hematopoietic origin, in particular epithelial and stromal cells. Because of the crosstalk between these two cell types, IL-22 plays an important role as a mediator in local inflammatory responses, in the maintenance of the epithelial mucosal barrier and in the immune response against extracellular pathogens. In several autoimmune diseases such as bronchial asthma and inflammatory bowel disease, IL-22 appears to contribute to disease development and -progression. In recent years, IL-22 has also been increasingly associated with the development and progression of cancer. High levels of IL-22 have been associated with promotion of tumorigenesis and poor prognosis in various cancer entities. In addition, IL-22 has been suggested to increase angiogenesis, stem cell activation and increased tumor-cell-proliferation.

In previous work our group has shown that IL-22 has no direct effect on tumor growth in lung and breast cancer models but does influence metastasis formation. However, a precise mechanism by which IL-22 exerts its metastasis-promoting effect has not been identified yet. The present work identifies the IL-22-dependent upregulation of the surface receptor CD155 as a mechanism for promoting metastasis in lung cancer models.

This thesis shows that the expression of CD155 on tumor cells can be upregulated by stimulation of IL-22 *in vitro*. Stimulation of IL-22 *in vitro* resulted in both increased expression of Pvr at the genetic level and increased expression of CD155 at the protein level over 72 hours. *In vivo*, CD155 was subsequently shown to play a critical role in the development of metastases in both IL 22^{-/-} and wild-type mice, as deletion of CD155 in tumor cells led to a significant reduction in metastasis in both mouse lines. This effect was reversed by reintroduction of constitutively and IL-22 independently expressed CD155 into CD155^{-/-} cells. The relationship between IL-22 and CD155 and their influence on metastasis demonstrated here opens up new promising therapeutic approaches for the treatment of lung cancer patients by blocking IL-22 or CD155.

1 Einleitung

1.1 Biologische Grundlagen zu IL-22

1.1.1 IL-22 als Zytokin der IL-10 Familie

Zytokine sind von Zellen produzierte Proteine, die zur Kommunikation und Signalvermittlung mit anderen Zellen, vor allem aber der Interaktion zwischen Immunzellen, dienen. Interleukine (IL) nennt man traditionell Zytokine, welche von Leukozyten produziert werden, obwohl inzwischen bekannt ist, dass diese auch durch eine Reihe anderer Zellen gebildet werden können (Murphy and Weaver, 2017). IL-22 ist ein Interleukin aus der IL-10 Familie, zu welcher weiterhin noch IL-10, IL-19, IL-20, IL-24 und IL-26 gezählt werden (Ouyang et al., 2011). Anders als viele andere Interleukine dient IL-22 nicht der Kommunikation innerhalb des Immunsystems, wodurch es eine Sonderrolle unter den Interleukinen einnimmt. Während IL-22 ausschließlich von hämatopoetischen Zellen produziert wird, findet man den transmembranen Rezeptor für IL-22 nur auf Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs, vor allem auf Epithel- und Stromazellen (Hernandez et al., 2018).

1.1.2 Signaltransduktion von IL-22

IL-22 bindet an einen zweiteiligen Rezeptor, der zum einen aus dem IL-22R1-Rezeptor und zum anderen aus dem IL-10R2c-Rezeptor besteht (Kotenko et al., 2001a). Während die Kombination der beiden Rezeptordomänen spezifisch für den IL-22 Signalweg ist, werden beide Rezeptoren auch von anderen Zytokinen für die Signaltransduktion genutzt. IL-10, IL-26, IL-28 und IL-29 binden an Rezeptoren, die jeweils aus IL-10R2c und einem weiteren Rezeptor bestehen. IL-22R1 bildet zusammen mit IL-20R2 den Rezeptor von IL-20 und IL-24 (Sabat et al., 2014).

Die IL-22 Signaltransduktion wird weiterhin durch die Aktivierung von Januskinase 1 (JAK-1) und Tyrosinkinase 2 (TYK-2) und vor allem des *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) Signalwegs vermittelt, aber auch STAT1 und STAT5 werden zu einem geringeren Grad von IL-22 aktiviert (Pestka et al., 2004). Die IL-22 induzierte Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3-Molekülen ermöglicht deren Dimerisierung und Translokation in den Nukleus der Zellen, wo sie letztendlich die Genexpression ihrer Zielgene regulieren (Dumoutier et al., 2009, Ouyang and O'Garra, 2019) (Abbildung 1).

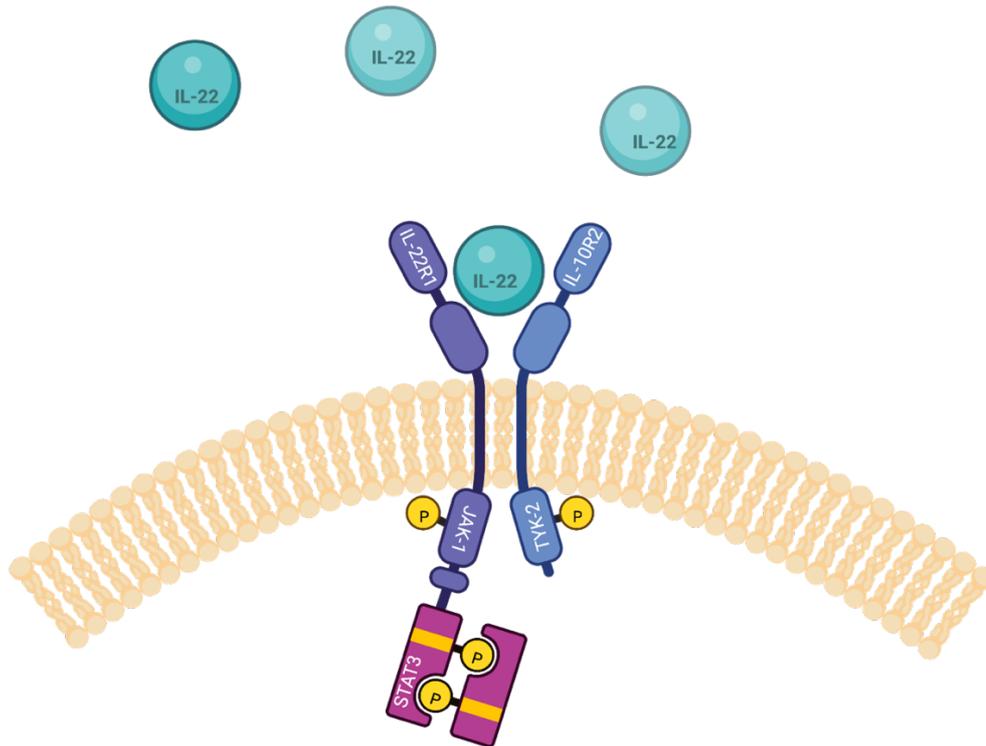


Abbildung 1 Signaltransduktion von IL-22 (Modifiziert von Ouyang and O'Garra (2019))

Durch Bindung von IL-22 an den zweiteiligen Rezeptor bestehend aus IL-22R1 Rezeptor und IL-10R2 kommt es zu einer Aktivierung von JAK-1 und TYK-2 und folglich zu einer Phosphorylierung von STAT3. Diese IL-22 induzierte Phosphorylierung führt zu einer Dimerisierung der STAT3-Moleküle und deren Translokation in den Nukleus (IL: Interleukin P: Phosphorylierung).

IL-22 kann aber auch zur Aktivierung des *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B), des *Mitogen activated protein kinase* (MAPK)- und des *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-Signalwegs führen (Markota et al., 2018). Über diese verschiedenen Wege führt IL-22 zu einer verstärkten Expression von Genen, die u.a. anti-inflammatorische, anti-apoptotische und proliferative Eigenschaften entfalten (Lim and Savan, 2014).

1.1.3 Zelluläre Quellen von IL-22

IL-22 wird sowohl von Zellen des angeborenen, als auch des erworbenen Immunsystems produziert. Zu diesen Zellen gehören u.a. $\alpha\beta$ -T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems (*Innate Lymphoid Cells, ILCs*) (Ouyang and O'Garra, 2019).

Von den $\alpha\beta$ -T-Zellen wurden im Menschen vor allem T-Helferzellen-1 (Th1), Th17 und Th22 als Produzenten von IL-22 identifiziert, wobei im peripheren Blut knapp 50 % der IL-22 produzierenden Zellen $CD4^+$ Th22 Zellen sind, welche ausschließlich IL-22 produzieren (Duhon et al., 2009). In Mäusen konnte bisher keine eindeutige Th22 Population identifiziert werden, vielmehr übernehmen hier Th17 Zellen den Großteil der IL-22 Produktion (Chung et al., 2006, Liang et al., 2006). Neben den konventionellen $\alpha\beta$ -T-

Zellen produzieren auch ein Teil der $\gamma\delta$ -T-Zellen IL-22, vor allem nach Stimulation mit IL-23, aber auch IL-23 unabhängig über die *Toll-like-Rezeptoren* des angeborenen Immunsystems (Martin et al., 2009, Mabuchi et al., 2011).

In den letzten Jahren konnte eine weitere wichtige zelluläre Quelle von IL-22 identifiziert werden: Die ILCs sind eine heterogene Gruppe an Immunzellen, die dem angeborenen Immunsystem angehören und morphologisch große Ähnlichkeit mit Lymphozyten haben, jedoch keine antigenspezifischen Oberflächenrezeptoren aufweisen. Es gibt drei bisher bekannte Subtypen von ILCs. Für die IL-22 Sekretion spielen nach heutigem Stand jedoch nur ILC-Typ 3 (ILC3) eine Rolle, welche man vor allem in der Schleimhaut des Darmes findet. Aufgrund der Tatsache, dass ILC3s in Abhängigkeit von IL-1 β und IL-23 IL-22 produzieren, werden sie oft als angeborenes Pendant der Th17 Zellen gesehen (Spits and Cupedo, 2012, Panda and Colonna, 2019). Ohne Aktivierung durch Pathogene oder andere Stimulantien bilden ILC3 den Hauptanteil des IL-22 *in vivo* (Cella et al., 2009, Diefenbach et al., 2014, Hernandez et al., 2018).

1.1.4 Regulierung der IL-22 Produktion

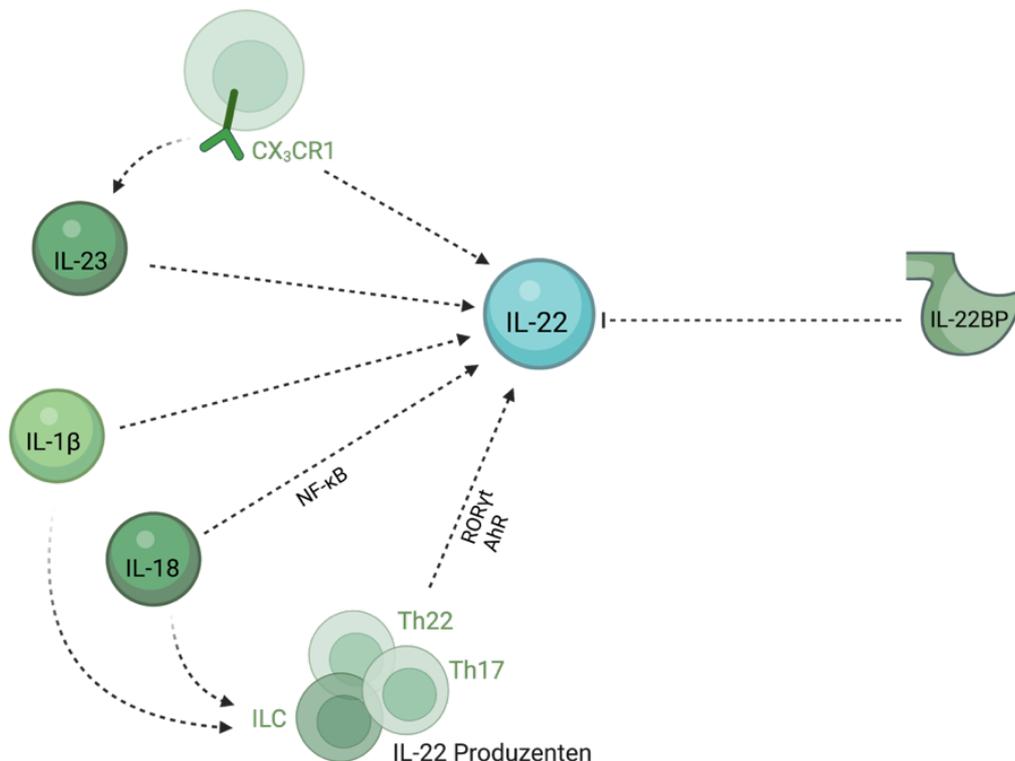


Abbildung 2 Regulatoren der IL-22 Produktion (eigene Abbildung, Quellen: (Kotenko et al., 2001b, Sutton et al., 2009, Kinnebrew et al., 2012, Manta et al., 2013, Dudakov et al., 2015, Hernandez et al., 2018, Ouyang and O'Garra, 2019, Chiang et al., 2022))

Die Abbildung zeigt verschiedene Einflussfaktoren auf die IL-22 Produktion. CX₃CR1-positive Zellen, IL-23, IL-1 β , IL-18 fördern entweder direkt die IL-22 Produktion oder fördern die Proliferation von IL-22 produzierenden Zellen (ILCs, Th22, Th17). IL-22 Binding-Protein (IL-22BP) hemmt durch seine hohe Affinität an IL-22 dessen Bindung an den Rezeptor.

Die Produktion von IL-22 durch Th17 und Th22 Zellen ist direkt abhängig von einem Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR γ t) und des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) am IL-22 Promotor (Qiu et al., 2012). So konnten Studien zeigen, dass eine direkte Stimulation von Th17 Zellen mit Liganden des AhR zu einer verstärkten Sekretion von IL-22 und einer gleichzeitigen Reduktion der IL-17 Produktion dieser Zellen führte (Nogales et al., 2009). Ähnlich wie bei den Th17-Zellen, wird die Menge an IL-22 Sekretion durch ILC3s auch von den Transkriptionsfaktoren ROR γ t und AhR gesteuert, aber auch von anderen Zytokinen (Satoh-Takayama et al., 2008, Sanos et al., 2009).

Einer der wichtigsten Induktoren der IL-22-Produktion ist das Zytokin IL-23. IL-23 aktiviert, wie auch IL-22, den Transkriptionsfaktor STAT3. Durch die ähnlichen Downstream-Signalwege ähneln sich auch die Phänotypen von IL-23-defizienten (IL-23 $^{-/-}$) und IL-22-defizienten (IL-22 $^{-/-}$) Mäusen sehr (Zheng et al., 2007, Buonocore et al., 2010). IL-23 wird vorwiegend von Dendritischen Zellen produziert (Kinnebrew et al., 2012), es gibt jedoch Studien die zeigen, dass auch nicht-dendritische Zellen, die den Rezeptor *CX3C motif chemokine receptor 1* (CX $_3$ CR1) exprimieren, für die Produktion von IL-23 von Bedeutung sind. CX $_3$ CR1 beeinflusst nicht nur die IL-23-Produktion, sondern hat auch einen direkten Einfluss auf die IL-22 Produktion. So konnte gezeigt werden, dass CX $_3$ CR1-defiziente Mäuse eine deutlich geringere IL-22 Expression zeigen als die Wildtyp-Kontrollen (Manta et al., 2013).

Des Weiteren spielen mehrere Zytokine der IL-1 Familie eine Rolle bei der IL-22 Regulation. IL-1 β fördert direkt die Produktion von IL-22 (Sutton et al., 2009), kann aber auch die Proliferation von ILCs stimulieren und hat so einen indirekten Effekt auf die Menge des freigesetzten IL-22 (Hughes et al., 2010). Auch IL-18 hat einen Einfluss auf die IL-22 Regulation: Die IL-18 Expression ist signifikant von der IL-22 Expression abhängig und neuste Studien konnten zeigen, dass die von IL-22 geförderte Pathogenabwehr u.a. durch Hochregulation von IL-18 induziert wird (Chiang et al., 2022). Interessanterweise fördert IL-18 seinerseits die ILC3 Proliferation sowie direkt die IL-22 Produktion via NF- κ B (Victor et al., 2017). IL-18 ist sogar bei einigen Infektionen und inflammatorischen Prozessen, wie z.B. der *Toxoplasma gondii* Infektion im Ileum, essenziell für die Freisetzung von IL-22, sodass hier ein komplexer Regelkreis zwischen IL-18 und IL-22 entsteht, dessen Bedeutung noch Gegenstand aktuellster Studien ist (Muñoz et al., 2015, Mühl and Bachmann, 2019, Chiang et al., 2022).

Neben den Transkriptionsfaktoren und Zytokinen ist eines der wichtigsten Regulatoren von IL-22 das *IL-22-Binding-Protein* (IL-22BP). IL-22BP ist die lösliche Form des IL-22 Rezeptors, dessen Sequenz in etwa 35 % identisch ist mit der extrazellulären Domäne des IL-22R1 (Kotenko et al., 2001b, Xu et al., 2001). IL-22 bindet dabei mit einer ca. 1000-fach höheren Affinität an IL-22BP als an seinen transmembranen Rezeptorkomplex (Jones et al., 2008). IL-22BP wird von Zellen in verschiedensten Organen des Körpers sekretiert, darunter auch Haut, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Thymus. Vor allem wird das IL-22BP auf Dendritischen Zellen gefunden, es gibt jedoch auch Berichte über die Expression auf epithelialen Zellen, Makrophagen und B-Zellen (Dudakov et al., 2015). IL-22 und IL-22BP zeigen meist einen inversen Verlauf ihrer Konzentrationen. Während die IL-22 Konzentration in gesundem Gewebe niedrig ist und bei Entzündungen rasch durch Produktion von ILC3s und CD4⁺-T Zellen gesteigert wird, sind die IL-22BP Konzentrationen am höchsten, wenn das Immunsystem nicht aktiviert ist. In entzündetem Gewebe oder bei Inflammation wird die Expression von IL-22BP stark herunterreguliert, sodass IL-22 seine protektiven Wirkungen entfalten kann (Huber et al., 2012, Zenewicz, 2021).

1.2 Funktionen von IL-22

1.2.1 Physiologische Funktionen

IL-22 spielt eine wichtige Rolle als Mediator bei lokalen Entzündungsreaktionen in verschiedensten Organen wie Lunge, Darm oder Haut. Hierbei trägt es u.a. zur Aufrechterhaltung der epithelialen Schleimhautbarriere und der Immunreaktion gegen extrazelluläre Pathogene bei (Aujla et al., 2008, Zheng et al., 2008). Dies geschieht u.a. durch eine STAT3 abhängige, direkte Induktion von Mucin-Genen in epithelialen Schleimhautzellen (Sugimoto et al., 2008). Außerdem fördert IL-22 zusammen mit anderen Zytokinen wie IL-17 und Tumornekrosefaktor-alpha die Freisetzung von anti-mikrobiellen Proteinen, wie beispielsweise β -Defensin-2 und S100 Proteinen, welche u.a. bei der Pathogenabwehr in der Haut von großer Bedeutung sind (Wolk et al., 2006, Rutz et al., 2014). Auch die geförderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor oder IL-1 β trägt zur Regulation der Entzündungsreaktion durch IL-22 bei. So führt IL-22 z.B. in der Lunge durch Regulation von IL-6 und CCL3 direkt zu einer verbesserten lokalen Immunabwehr gegen extrazelluläre Keime wie *Klebsiella pneumoniae* (Aujla et al., 2008). Liang et al. (2010) konnten zusätzlich zeigen, dass IL-22 in Hepatozyten die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen, wie z.B. Fibrinogen, Haptoglobin oder Serum Amyloid induziert.

Weiterhin gibt es Untersuchungen, welche die Relevanz von IL-22 in der Wundheilung und Geweberegeneration hervorheben. IL-22 führte hierbei zur Hyperplasie von epidermalen Zellen und förderte die Migration von Keratinozyten. Beides sind Eigenschaften, welche für die Geweberegeneration unabdingbar sind (Boniface et al., 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass IL-22^{-/-} Mäuse eine verminderte Anzahl an intestinalen Stammzellen und somit eine verminderte epitheliale Regenerationsfähigkeit während akuten Entzündungen und Verletzungen aufweisen verglichen mit Wildtyp-Mäuse (Zenewicz et al., 2008, Aparicio-Domingo et al., 2015). Weitere protektive Eigenschaften von IL-22 konnten u.a. bei verschiedenen Lebererkrankungen, *Graft-versus-host-disease*, allergischer Lungenerkrankung und anderen inflammatorisch bedingten Erkrankungen gezeigt werden (Rutz et al., 2014).

1.2.2 Pathologische Funktionen

Obwohl IL-22 viele anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt und wichtig für die Geweberegeneration ist, sind auch viele Fälle bekannt, in denen IL-22 pro-inflammatorisch wirkt und die Entstehung von Pathologien begünstigt. In der Haut wird IL-22 eine Beteiligung bei der Entwicklung von Psoriasis zugeschrieben (Zheng et al., 2007, Sabat et al., 2014). Frühere Studien konnten zeigen, dass die Konzentrationen von IL-22 bei T-Zell-assoziierten Dermatosen wie Psoriasis und atopischer Dermatitis erhöht sind (Wolk et al., 2004, Nogales et al., 2009). Klinische Untersuchungen zeigten auch, dass Patient:innen mit Psoriasis höhere IL-22 Konzentrationen im Blut aufwiesen als gesunde Patient:innen und dass die Menge des nachgewiesenen IL-22 mit der Schwere der Erkrankung korrelierte (Boniface et al., 2007, Lo et al., 2010, Shimauchi et al., 2013).

Auch bei der Pathogenese des Asthmas bronchiale scheint IL-22 eine Rolle zu spielen. So wurde die Entstehung von Asthma bronchiale durch hohe IL-22 Konzentrationen gefördert, gleichzeitig waren hohe IL-22 Konzentrationen im Krankheitsverlauf ein protektiver Faktor bei Exazerbationen und Atemwegserkrankungen, sodass hier von einer dualen Rolle des Interleukins ausgegangen werden muss (Besnard et al., 2011, Dudakov et al., 2015).

Erhöhte IL-22 Werte konnten auch in synovialen Gewebe und Serum von Patient:innen mit Rheumatoider Arthritis gefunden werden (Ikeuchi et al., 2005, Shen et al., 2009, Zhang et al., 2012). IL-22 führte dabei zu einer Proliferation der synovialen Fibroblasten und zusätzlich zu einer Förderung der Osteoklastogenese durch Induktion

von *Receptor Activator of NF- κ B Ligand*, beides Faktoren, welche die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis fördern (Ikeuchi et al., 2005, Kim et al., 2012).

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) scheint IL-22 auch eine duale Rolle zu spielen. Brand et al. konnten schon 2006 zeigen, dass IL-22 in Gewebeproben von Patient:innen mit Morbus Chron hochreguliert wird. IL-22 führte im Darm bei CED durch die Aktivierung von STAT3 zu einer raschen Verbesserung der akuten lokalen Entzündungsreaktion in epithelialen Zellen des Kolons (Brand et al., 2006, Sugimoto et al., 2008). Eine signifikante Erholung der gestörten Darmbarriere konnte durch IL-22 allerdings nicht erreicht werden, da in Patient:innen mit CED auch die Expression des IL-22-neutralisierenden IL-22-BP hochreguliert wurde. Erst nach einer spezifischen Blockade von IL-22-BP führten die protektiven Eigenschaften von IL-22 auf die Darmmukosa zu einer Verbesserung der Darmbarriere (Pelczar et al., 2016). Andere Studien vermuten in IL-22 einen der Faktoren, der die Entstehung von CEDs fördert, indem IL-22 die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-6, IL-8 und IL-11) via des NF- κ B-, *Activator protein 1*-, und MAP-kinase abhängigen Signalweges induziert (Andoh et al., 2005).

1.3 IL-22 und Krebs

1.3.1 Grundlagen der immunologischen Tumorkontrolle

Seit den späten 1950er Jahren ist bekannt, dass die Entstehung und das Fortschreiten von Tumorerkrankungen eng verbunden ist mit dem Immunsystem. Seither ist auch klar, dass das Immunsystem eine Kontrollfunktion innehat und stets versucht entartete Zellen zu finden und zu eliminieren, bevor diese zu Tumoren heranwachsen können (Burnet, 1957, Burnet, 1970, Thomas, 1982).

T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen zählen zu den Effektorzellen. Sie besitzen zytotoxische Eigenschaften und sind in der Lage, Tumorzellen und andere Zellen zu eliminieren. Diese Effektorzellen werden durch Zellen, welche tumorspezifische Antigene auf ihrer Oberfläche tragen (sogenannte Antigen-präsentierende Zellen) aktiviert und durch verschiedenste Zytokine moduliert (Murphy and Weaver, 2017). Die immunologische Tumorkontrolle stellt somit ein komplexes, bisher lückenhaft verstandenes Zusammenspiel aus verschiedenen Immunzellen und Zytokinen dar und bietet viele Angriffspunkte für mögliche Tumorthérapien.

1.3.2 IL-22 als tumorförderndes Zytokin

Die proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften von IL-22 machen das Interleukin nicht nur zu einem wichtigen Zytokin bei der Geweberegeneration und Wundheilung, sondern tragen auch dazu bei, dass es in den letzten Jahren immer mehr auch mit der Tumorentstehung und -ausbreitung assoziiert wurde (Hernandez et al., 2018). In vielen Organen, u.a. Lunge, Darm, Leber oder Magen, wurden in der Tumorumgebung sowohl hohe Mengen des IL-22RA1 als auch eine große Anzahl an IL-22 produzierenden Lymphozyten gefunden (Erdman et al., 2003, Zhuang et al., 2012, Jiang et al., 2013, Kobold et al., 2013). Hohe IL-22 Konzentrationen gingen dabei in den meisten Fällen mit einem schlechteren Krankheitsverlauf und schnellerem Tumorwachstum einher (Chen et al., 2018, Doulabi et al., 2018, Hernandez et al., 2018, Zeng et al., 2020). Auch genetische Veränderungen am IL-22-Gen haben Einfluss auf die Tumorgenese. So gingen IL-22 Einzelnukleotid-Polymorphismen mit einem erhöhten Risiko einher, Lungen- (Liu et al., 2014), Magen- (Qin et al., 2015) und Blasenkrebs (Zhao et al., 2015) zu entwickeln.

1.3.3 Potenzielle Mechanismen tumorfördernder Eigenschaften von IL-22

Mehrere Ansätze, wie IL-22 seine tumorfördernden Eigenschaften entfaltet, sind aktuell bekannt: Über eine Phosphorylierung von STAT3 führt IL-22 zu verstärkter Migration und Proliferation maligner Zellen. Durch Induktion der Transkriptionsfaktoren *sex-determining region Y-box 2 (SOX-2)* und *NANOG* hilft IL-22 außerdem das Stammzellpotential der malignen Zellen aufrecht zu erhalten (Kryczek et al., 2014, Rui et al., 2017, Briukhovetska et al., 2021). Darüber hinaus konnten Studien zeigen, dass in Brust- und Lungenkrebsmodellen Tumorzellen über eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und die Freisetzung von IL-1 β die Produktion von IL 22 förderten und damit das Tumorwachstum beschleunigen konnten (Voigt et al., 2017). Im Darm konnten Gronke et al. (2019) zeigen, dass das Entfernen des IL-22RA1 von intestinalen Epithelzellen die Tumorentstehung förderte, indem bei DNA-Schäden die natürliche Einleitung der Apoptose durch IL-22 supprimiert wurde. Auch eine fehlende Regulation der IL-22 Konzentrationen durch das IL-22BP zeigte in Mausmodellen die tumorfördernden Eigenschaften von IL-22 in Kolonkarzinomen (Huber et al., 2012). Zudem ist ein Einfluss von IL-22 auf die Angiogenese von Tumoren bekannt. So führte eine Inhibierung des *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*, einem wichtigen Mediator der Tumor-Angiogenese, zu einer gesteigerten Konzentration von IL-22 in der Tumorumgebung, was darauf schließen könnte, dass IL-22 einen alternativen Signalweg zur Angiogenese in hypoxischem Tumorgewebe darstellt (Protosaltis et al., 2019).

1.3.4 Therapeutische Ansätze in der Krebstherapie durch IL-22 Blockade

Durch die diversen tumorfördernden Eigenschaften stellt die IL-22/IL-22R-Achse einen potenziell wirksamen Angriffspunkt in der Entwicklung neuer Krebstherapien dar. Bisher konnte in klinischen Studien durch eine direkte Blockade von IL-22 mit dem neutralisierenden Anti-IL-22 Antikörper *Fezakinumab* ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf von Atopischer Dermatitis gezeigt werden (Guttman-Yassky et al., 2018). Weitere Studien zur Rheumatoiden Arthritis und Psoriasis laufen aktuell. Bisher sind jedoch keine klinischen Studien zur direkten Blockade von IL-22 bei Krebspatient:innen bekannt. Es existieren allerdings mehrere, bereits zugelassene Therapien, die einen indirekten Einfluss auf die IL-22 Expression von Patient:innen haben. Tumorzellen führen durch Produktion von IL-1 β zu einer gesteigerten IL-22 Produktion und so zu einem gesteigerten Tumorwachstum. Eine IL-1 Blockade durch den bereits für rheumatoide Erkrankungen verwendeten IL-1-Rezeptor Antagonist *Anakinra* führt folglich auch direkt zu einer verminderten Konzentration an IL-22 (Voigt et al., 2017). Mehrere Phase I und II Studien untersuchen aktuell den Einfluss von *Anakinra* in Brustkrebs, metastasiertem kolorektalen Karzinomen und hämatologischen Krebserkrankungen mit teils vielversprechenden vorläufigen Ergebnissen (O'Shaughnessy et al., 2016, Isambert et al., 2018, Fleischmann et al., 2022). Des Weiteren ist die Blockade von STAT3 Gegenstand aktueller Forschung und klinischer Studien. Auch wenn die STAT3 Blockade teils sehr vielversprechende präklinische Daten in der Therapie gegen Krebs zeigte, sind die klinischen Ergebnisse bisher enttäuschend (Furqan et al., 2013, Qin et al., 2019, Hua et al., 2022).

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die wichtige Rolle von IL-22 in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum ist durch viele Studien hinreichend belegt. Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben außerdem gezeigt, dass IL-22 im Lungen- und Brustkrebsmodell zwar keinen Einfluss auf das Tumorwachstum, jedoch einen erheblichen Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren hat (Briukhovetska et al., 2023). Obwohl dieser Effekt in verschiedenen Experimenten gezeigt werden konnte, war es zu Beginn dieser Arbeit nicht möglich, einen spezifischen Mechanismus oder Signalweg zu identifizieren, über den IL-22 diese metastasenfördernde Wirkung entwickelt. Die genaue Kenntnis dieses Mechanismus ist jedoch essenziell, um neue Angriffspunkte für mögliche Therapien aufzuzeigen. Aufgrund dessen wurden folgende Ziele für die vorliegende Arbeit definiert:

1. Identifizierung differenziell exprimierter Gene in Tumorzellen nach IL-22-Stimulation.
2. Auswahl der Gene, die aufgrund ihrer bekannten Funktion zusammen mit IL-22 die Metastasierung von Lungenkrebs fördern könnten.
3. Untersuchung dieser ausgewählten Gene im Mausmodell auf ihre Metastasenfördernden Eigenschaften sowie Analyse ihres Zusammenspiels mit IL-22 *in vivo*.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose LE	Roche, Schweiz
Trypsin-EDTA (0,25 %)	ThermoFischer Scientific, Deutschland
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100 %	VWR Chemicals, Frankreich
FACSFlow	BD Biosciences, San Jose, USA
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isofluran	HENRY SCHEIN, Melville, USA
Dulbecco's Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS-Pulver	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese 50 x TAE-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan™ Universal PCR Master Mix	Thermo Scientific, Waltham, USA
TriDye 2-log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)	New England Biolabs, Ipswich, USA
TRIS-Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Lonza, Verviers, Belgien
Tween-20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platten (Zellkultur)	Costa Corning, New York, USA
12-Well-Platten (Zellkultur)	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Platten (Zellkultur)	Costa Corning, New York, USA
48-Well-Platten (Zellkultur)	Costa Corning, New York, USA
96-Well-Platten (Zellkultur)	Costa Corning, New York, USA
Combitips advanced (0,1 ml, 0,2 ml, 0,5 ml, 2,5 ml, 5 ml, 25 ml, 50 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Nylon-Filter (100 µm, 70 µm, 30 µm)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
PCR-Tubes (0,2 ml)	Kisker Biotech, Steinfurt/Sarstedt, Nümbrecht
Perfusionsspritzen-Luer-Lock Tip (50 ml)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Petrischalen (145 x 20 mm; 100 x 20 mm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Petrischalen (35 x 10 mm)	Costa Corning, New York, USA
Serologische Pipetten (25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml)	Costa Corning, New York, USA
Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zell-Scraper	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen	Costa Corning, New York, USA

2.3 Geräte

Axiovert-40C-Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
CO ₂ Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
FACS-Canto II	BD Biosciences, New Jersey, USA
Lamin Air	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mithras LB 940 Multimode Plate Reader	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Multi füge X3 FR	Heraeus, Hanau, Deutschland
MULTIFUGE 4 KR	Heraeus, Hanau, Deutschland
Nanodrop 2000C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht, Balgach, Deutschland
Rotina 420 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
SHAKER DOS-10 L	neoLab, Heidelberg, Deutschland
TCS-SP5-Konfokalmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Thermocycler Gene Touch	BIOER, Hangzhou, China
Tischzentrifuge Fresco 17	Heraeus, Hanau, Deutschland
Waage KB 240-3N	KERN, Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland

2.4 Antikörper

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller	Isotyp	Verdünnung	Anwendung
PE-Anti-mouse CD155	4.24.1	BioLegend	Rat IgG2a	1:300	FACS
BV650-Anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	RB6-8C5	BioLegend	Rat IgG2b, κ	1:200	FACS
BV510-anti-mouse F4/80	BM8	BioLegend	Rat IgG2b, κ	1:200	FACS
PE/Cyanine7 anti-mouse CD49b	DX5	BioLegend	Rat IgM, κ	1:300	FACS
BV605 anti-mouse CD3	17A2	BioLegend	Rat IgG2b, κ	1:400	FACS

FITC anti-mouse CD45	QA17A26	BioLegend	Mouse IgG1, κ	1:400	FACS
Ultra-LEAF™ Puri- fied anti-Asialo-GM1	Poly21460	BioLegend	Rabbit Polyc- lonal IgG	-	NK-De- pletion

2.5 Kits und Assays

InviTrap Spin cell RNA Mini Kit	Stratec, Berlin, Deutschland
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
Universal Probe Library	Roche, Mannheim, Deutschland
Mix2Seq Kit	Eurofins Scientific, Hamburg, Deutschland
Zymo Pure II Plasmid Maxi Prep Kit	Zymo Research, Freiburg, Deutschland

Alle Kits und Assays wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.6 qPCR-Primer

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten qPCR-Primer

Gen	Sequenz (5' → 3')	Sonde
<i>Pvr</i> (CD155) vorwärts	TGA CCC TTT CCC AAC CCT AT	106
<i>Pvr</i> (CD155) rückwärts	GAG GCC AAC ATA CCA GTT GC	106

2.7 Zelllinien, Zusätze und Medien

2.7.1 Zusätze und Grundmedien

DMEM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
VLE RPMI 1640	Biochrom Merck Millipore, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco Products, Grand Island, USA
L-Glutamin 200 mM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natrium Pyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pen/Strep Penicillin und Streptomycin, je- weils 10.000 U/ml	Lonza, Verviers, Belgien
OPI-Media Supplement	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Opti-MEM	Gibco Products, Grand Island, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
HT Media Supplement (50 x)	Thermo Fischer, Deutschland
Trypsin (10 x)	Lonza, Verviers, Belgien

MEM Non-Essential Amino Acids Solution
(100 x)

Gibco Products, Grand Island, USA

2.7.2 Zellkulturmedien

DMEM⁺⁺⁺

DMEM-Vollmedium	500 ml
FKS	10 %
Penicillin	1 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

RPMI⁺⁺⁺

RPMI 1640 Vollmedium	500 ml
FKS	10 %
Penicillin	1 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM

Kryo Medium

FKS	900 µl
DMSO	100 µl
Medium mit Zellen	1000 µl

PBMC Medium

VLE RPMI 1640	500 ml
humanes Serum	10 %
Penicillin	1 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
NEAA (100 %)	1 %

2.8 Zelllinien

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Name	Zelltyp	Herkunft	Medium
Line-1	Lungenkarzinom	murin	RPMI+++
Line-1-CD155 ⁻	Line-1-CD155 Crispr-Knockout	murin	RPMI+++
Line-1-CD155 ⁺	Line-1-CD155-Overexpression	murin	RPMI+++
4T1	Mammakarzinom	murin	RPMI+++
EO771	Mammakarzinom	murin	RPMI+++
PLAT-E	Platinum-E Retroviral Packaging Cell Line	murin	DMEM+++

2.9 Zytokine und Stimulanzen

Rekombinantes murines IL-22

PeproTech, Hamburg, Deutschland

2.10 Software

Adobe Creative Suite

Adobe Systems, San Jose, USA

BD FACSDiva

BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

EndNote 20

Clarivate Analytics, Philadelphia, USA

Flow Jo 10.2.

FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA

GraphPad PRISM® Version 9

REST 2009

Microsoft Office 365

GraphPad Software, La Jolla, USA

Qiagen, Hilden, Deutschland & TU München,
Deutschland

Microsoft, Redmond, WA, USA

Alle schematischen Darstellungen wurden mit BioRender.com im Rahmen einer akademischen Lizenz erstellt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Zur RNA-Isolation wurde das *InviTrap Spin Cell RNA Mini Kit* von Stratec nach Herstellerangaben verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten Zellen aus der Zellkultur. Die Konzentration der RNA konnte dann mithilfe des *NanoDrop* bestimmt werden. Zur Herstellung von cDNA wurden anschließend Oligo-dTs zu 0,5 µg RNA gegeben, welche an die Poly-A-Schwänze der RNA binden können. Die außerdem benötigten Enzyme und weitere Reagenzien sind in Tabelle 4 dargestellt. Ebenso sind die Temperaturstufen des Thermocyclers in Tabelle 5 zu finden. Für die weitere Analyse durch qPCR (quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion) wurde die cDNA 1:5 mit ddH₂O verdünnt.

Tabelle 4 Reaktionsansatz für RT-PCR

Reagenzien	Menge [µl]
RNA (0,5 µg)	x
ddH ₂ O	11 - x
5X Reaktions-Puffer	4,0
dNTPs 10 mM	2,0
Oligo(dT)18-Primer	1,0
RevertAid RT (200 U/µl)	1,0
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1,0
Gesamtvolumen	20,0

Tabelle 5 RT-PCR Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Transkription	42	60
Termination	70	5
Abkühlung	4	∞

3.1.2 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion

Durch die qPCR kann die gewonnene cDNA gleichzeitig amplifiziert und relativ oder absolut quantifiziert werden. Durch ein Fluoreszenzsignal wird hierbei das Reaktionsprodukt in jedem Amplifikationszyklus in Echtzeit gemessen und die Expression des Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten Referenzgens normalisiert.

Verwendet wurde der *Hydrolysis Probe Assay* von Roche, da dieser, durch die Verwendung von hoch spezifischen Sonden, eine sehr genaue Quantifizierung möglich macht. Diese Sonden werden erst nach Spaltung durch die Taq-Polymerase fluoreszierend und geben so ein genaues Bild über die Menge der amplifizierten cDNA. Die Primersequenz für die untersuchten Gene sowie die zugehörigen Sonden wurden mithilfe des „*Assay Design Center*“ bestimmt (Roche, 2019). Es wurden für jedes Gen entsprechend die Komponenten nach Tabelle 6 zusammen pipettiert und die qPCR anschließend auf dem Light Cycler 480 II durchgeführt (Programmangaben siehe Tabelle 7).

Tabelle 6: Reaktionsansatz für qPCR

Reagenzien	Menge [µl]
cDNA	2,0 µl
Primer vorwärts	0,4 µl
Primer rückwärts	0,4 µl
Sonde	0,2 µl
ddH ₂ O	3,0 µl
TaqMan qPCR Master Mix	5,0 µl
Gesamt	11,0 µl

Tabelle 7 qPCR-Programm des Light Cycler 480 II

Schritt	Zyklen	Temperatur [°C]	Inkubationszeit [Sek.]
Denaturierung	1	95	600
Amplifizierung	40	95	15
Kühlung	1	40	60

Die Quantifizierung der cDNA erfolgt durch Messung des *Crossing Point* (CP)- Wertes, welcher den Punkt beschreibt, an dem ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht ist. Die cDNA Menge ist an diesem Punkt bei allen Proben identisch (Scheffe et al., 2006). Die relative Veränderung der Expression in Bezug auf das Referenzgen sowie die Kontrolle (= *Ratio*) wurde nach der sogenannten „*delta delta CT (ΔΔCT)*“ Methode berechnet (Pfaffl, 2004):

$$\Delta CP = CP_{\text{Zielgen}} - CP_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{\text{Experiment}} - \Delta CP_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde REST 2009 von Qiagen und der Technischen Universität München verwendet.

3.1.3 RNA-Sequenzierung und Analyse der differentiellen Expression

Die Bulkexpressionsanalyse der RNA-Proben wurde von Vaggelis Harokopos aus der Genomics Facility of BSRC "Alexander Fleming" in Form eines Next Generation Sequencing durchgeführt. Die Rohdaten der Sequenzierung sind in der NCBI's Gene Expression Omnibus Datenbank (Edgar et al., 2002) unter der Nummer GSE202314 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE202314>) hinterlegt. Die anschließende erste bioinformatische Aufarbeitung erfolgte durch Martin Reczko. Die Analyse der differentiellen Expression wurde mit dem Bioconductor-Paket metaseqR (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452340>) durchgeführt. Die nach dem Short-Read-Mapping erhaltenen BAM-Dateien, eine für jede RNA-Seq-Probe, wurden mithilfe des Bioconductor-Pakets GenomicRanges zu einer 3'UTR-Read-Counts-Tabelle zusammengefasst. Die Tabelle mit den Genzählungen wurde für inhärente systematische oder experimentelle Verzerrungen (z.B. Sequenzierungstiefe, Genlänge, Verzerrung des GC-Gehalts usw.) mithilfe des Bioconductor-Pakets DESeq normalisiert, nachdem Gene entfernt worden waren, die in allen RNA-Seq-Proben Nullzählungen aufwiesen. Vor dem statistischen Testverfahren wurden die Gen-Read-Zahlen auf mögliche Artefakte gefiltert, welche die nachfolgenden statistischen Testverfahren beeinflussen könnten. Die sich daraus ergebende Genzählungstabelle wurde einer differentiellen Expressionsanalyse für die Unterschiede „Stimuliert“ versus „Ctrl.“ unter Verwendung einer Kombination aus den Bioconductor-Paketen DESeq, edgeR, limma, NBPSseq und NOISeq unterzogen. Um die statistische Signifikanz der verschiedenen Algorithmen zu kombinieren, wurde die PANDORA-Methode (gewichteter p-Wert über alle Ergebnisse) angewendet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Die Zellkulturarbeiten sämtlicher Zelllinien wurden unter einer sterilen Werkbank mit Umluft betrieben. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Um adhärente Zellen abzulösen, wurde nach dem Waschen mit PBS eine Trypsin-EDTA-Lösung verwendet und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Medium gestoppt und die Lösung zentrifugiert (5 min, 500 g, Raumtemperatur).

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt und auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und ausgezählt. Tote Zellen färbten sich

aufgrund der erhöhten Membranpermeabilität blau und konnten so ausgeschlossen werden. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte durch folgende Formel:

$$\text{Absolute Zellzahl} = \left(\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} \right) * V_T * V_M$$

V_T = Verdünnungsfaktor Trypanblau

V_M = Volumen Zellsuspension

3.2.2 IL-22-Stimulationsversuche

Zur Stimulation mit IL-22 wurden 4×10^5 Line-1, 4T1- oder EO771-Tumorzellen pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät. Pro Bedingung wurden technische Replikate von mindestens drei, besser sechs Wells angefertigt. Nach einer 24-stündigen Inkubation (oder kürzer, je nach experimentellem Setup) wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml OptiMEM Media pro Well hinzugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch 1 ml neues OptiMEM beziehungsweise 1 ml OptiMEM plus 100 ng/ml IL-22 ersetzt und für 12 bis 72 h inkubiert. Bei Stimulation über 24 h wurde das Medium aufgrund der kurzen Halbwertszeit von IL-22 alle 24 h durch frisches Medium und neues IL-22 ersetzt.

3.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Quantifizierung von Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz. Für diese Arbeit wurde ein *FACS-Canto II* oder *FACS-Fortessa* Durchflusszytometer und für die anschließende Analyse die Software FlowJo 10.2. verwendet. Die gewünschten Zellen wurden zunächst wie in 3.2.1 beschrieben abgelöst und gezählt. Pro Färbung wurden ca. 1×10^6 Zellen in 100 μ l PBS gegeben und anschließend mit 0,3 μ l des Antikörpers (siehe Tabelle 1) gefärbt und für 30 min bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 200 – 400 μ l PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Isotyp- und ungefärbte Kontrollen wurden immer mitgeführt.

3.2.4 Scratch-Assay

Zur Durchführung des *Scratch-Assay* wurden die Zellen in einer 12-Well Platte ausplatziert und bis zur Konfluenz inkubiert. Anschließend wurde die Oberfläche der Platte mithilfe der Spitze einer 1 ml Pipettenspitze angeritzt und zur Entfernung der abgelösten Zellen die Platte mehrfach mit PBS gewaschen. Mikroskopische Aufnahmen wurden anschließend am Zeiss LSM800 Mikroskop bei kontinuierlich 37 °C und 5 % CO₂ über

48 h angefertigt, in denen automatisch jede Stunde ein Bild an der exakt selben Position jedes Wells aufgenommen wurde. Abbildung 3 zeigt exemplarisch ein Well zu Beginn und nach 48 h des Versuches mit eingezeichneter Wundfläche. Die Wundfläche (manuell eingefügter Ritz) wurde mit Hilfe der Software *ImageJ* bestimmt. Die gefüllte Wundfläche (in Prozent) konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\% \text{ der gefüllten Wundfläche} = \left(\frac{(\text{Wundfläche (0 h)} - \text{Wundfläche (48 h)}) \times 100}{\text{Wundfläche (0 h)}} \right)$$

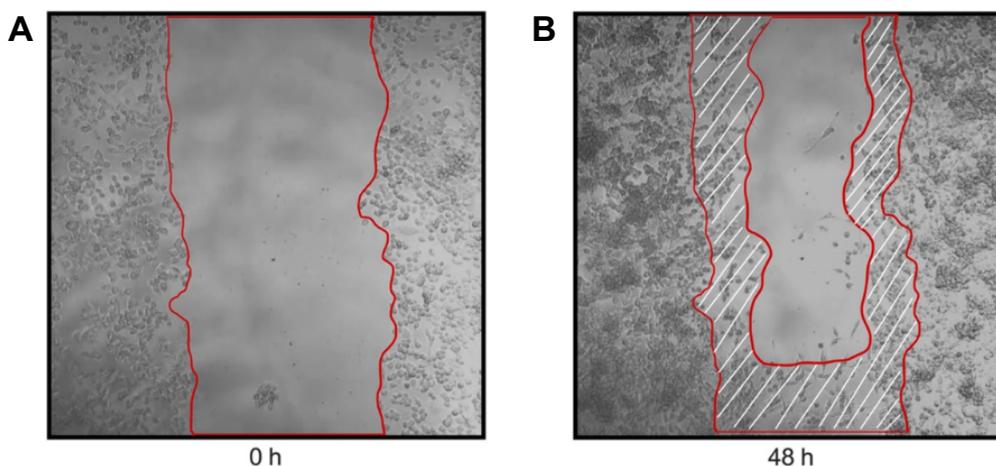


Abbildung 3 Berechnung der gefüllten Wundfläche im Scratch Assay nach 48 h

Zu sehen sind die Wundfläche (rot umrandet) zu Beginn der Aufzeichnung (A) sowie nach 48 h (B). Weiß schraffiert ist die gefüllte Wundfläche markiert, die durch Überlagerung der Wundfläche zu Beginn der Aufzeichnung und nach 48 h entsteht.

3.2.5 Herstellung der Line-1-CD155⁻ Zelllinie mit CRISPR/Cas9

Die Herstellung der Line-1-CD155⁻ Zelllinie sowie der Line-1 Kontrollzellen erfolgte mithilfe des Ein-Vektor-CRISPR/Cas9 Systems mit einer verbesserten Cas9 (1.1) (Slaymaker et al., 2016). Dafür wurde mit dem Programm chopchop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) eine *single guide RNA* (sgRNA) für das Exon 3 des Pvr Gens entworfen (*Pvr*-sgRNA: ggc caa gag att cgt cca gg) und anschließend via *BbsI* in einen eSpCas(1.1)-2A-eGFP Plasmid kloniert (Labun et al., 2019). Line-1 Tumorzellen wurden in eine 6-Well Platte ausgesät und mit einem Transfektions-Mix (250 µL Opti-MEM (Sigma-Aldrich), 5 µg Plasmid, 12 µL Lipofectamine 2000 (ThermoFisher)) für 18 h, gefolgt von 24 h in normalem RPMI-Medium, inkubiert. Die CD155⁻ Zellen wurden mit dem anti-Maus CD155-PE Antikörper (BioLegend) angefärbt und mithilfe von FACS bis zu einer Reinheit von >95 % angereichert. CD155-PE⁻ (Line-1 CD155⁻) und CD155-PE⁺ (Line-1 Ctrl.) Zellen wurden für die Experimente in dieser Arbeit ausgewählt.

3.2.6 Herstellung von Line-1-CD155⁺ Zellen

Zur Herstellung von Line-1-Zellen, die dauerhaft CD155 exprimierten (Line-1-CD155⁺), wurden Line-1-CD155⁻ Zellen verwendet und retroviral transduziert. Hierfür wurde zunächst das nötige Konstrukt (CD155-K2A-H2B-cerulean) von *GeneScript* erworben. Zu Beginn des Prozesses wurde das Konstrukt gemäß dem Protokoll von Heckman and Pease (2007) in den retroviralen Plasmid pMP71 (Addgene) kloniert. Die Überprüfung der erfolgreichen Klonierung erfolgte mittels Sanger-DNA-Sequenzierung nach Herstellerangaben des Mix2Seq Kits (Eurofins). Anschließend wurde der Plasmid in kompetenten *E. coli* DH5 α (NEB) vermehrt und mit Hilfe des Zymo Pure II Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research) aufgereinigt. Für die Retrovirale Expression wurde der pMP71-CD155-K2A-H2B-cerulean Plasmid mithilfe von *Lipofectamine 2000* nach Herstellerangaben in PLAT-E-Zellen transfiziert. Nach 48 h konnte der Virusüberstand abgenommen und mit einem 45 μ m Filter gefiltert werden. 2 mL frischer Virusüberstand wurden dann zusammen mit 8 μ g/mL *Polybrene* zu 5×10^5 Line-1 CD155⁻ Zellen gegeben, für 30 min bei 800 g zentrifugiert und anschließend 48 h inkubiert. Nach mindestens vier Stunden Inkubation wurde frisches Medium zur Kultur gegeben. 48 h nach der Transduktion wurden die *Cerulean*-positiven Line-1-CD155⁺- Zellen mittels BD FACS Aria III bis zu einer Reinheit von > 95 % aufgereinigt.

3.3 Maus- und Tumormodelle

3.3.1 Intravenöse Tumorzellinjektionen

Für eine höhere Anzahl an Metastasen wurden die Tumorzellen direkt intravenös (i.v.) verabreicht. Dafür wurden ca. 8 Wochen alten, weiblichen Balb/c oder IL-22^{-/-} Mäusen 500.000 Tumorzellen i.v. in 100 μ L PBS in die Schwanzvene gespritzt. In den folgenden Tagen wurde jeden zweiten Tag das Gewicht gemessen und der Allgemeinzustand der Mäuse beurteilt.

3.3.2 Quantifizierung von Metastasen und Einzelzell-Isolation aus Lungen

Zur makroskopischen Quantifizierung der Metastasen in den Lungen der Mäuse wurden diese mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Lungen wurden mit eiskaltem PBS gespült, um das überschüssige Blut zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zählung der Metastasen mit Hilfe von Lupengläsern.

Abbildung 4 zeigt beispielhaft drei Mauslungen nach Explantation mit eingezeichneten Metastasen. Durch die makroskopische Zählung konnte eine verlässliche Quantifizierung der Metastasenlast in der Lunge erreicht werden.

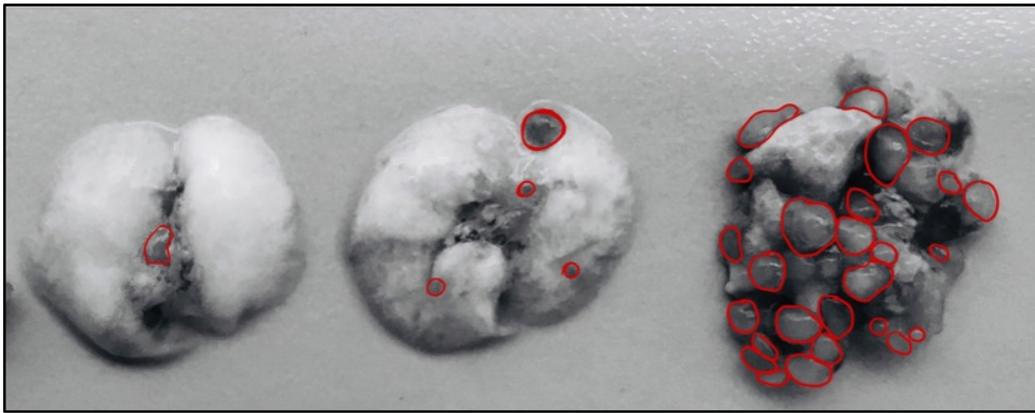


Abbildung 4 Mauslungen mit Metastasen nach Explantation und Spülung mit PBS

Zu sehen sind Fotos von explantierten Mauslungen mit Metastasen (rot markiert) nach intravenöser Injektion von Tumorzellen.

3.3.3 Klonogene-Metastasen-Analyse

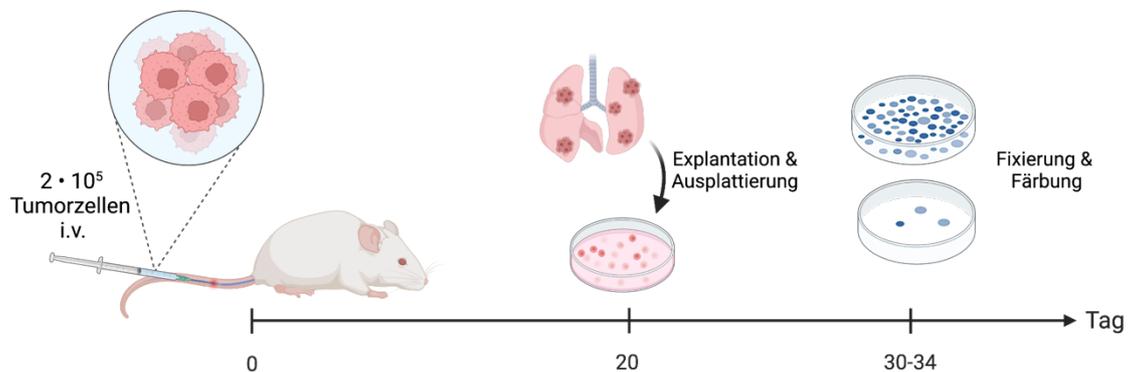


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Versuchs zur Quantifizierung von Lungenmetastasen

Zur Isolierung von Einzelzellen aus den Lungen wurden diese in < 1 mm große Stücke zerteilt und zusammen mit 1 mg/mL Kollagenase und 0,05 mg/mL DNase I in RPMI-Medium für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die verdauten Lungen wurden anschließend durch 100 μ m und 30 μ m Zellsiebe gedrückt und mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe von *Erythrocyte-lysis-buffer* (Inkubation 3 min bei Raumtemperatur) wurden die Erythrozyten eliminiert und die resultierende Einzelzell-Suspension konnte für den klonogenen Metastasen Assay verwendet werden. Für die klonogene Metastasen-Analyse wurden die Einzelzellen aus den Lungen 1:10, 1:100 oder 1:1000 verdünnt. Diese Verdünnung erfolgte in RPMI-Medium, welches mit 30 μ M 6-Thioguanin versetzt wurde, um das Wachstum von Nicht-Tumorzellen zu verhindern. Dieses Gemisch wurde dann in 6-Well Platten ausgesät (drei Wiederholungen pro Probe) und für 10-14 Tage inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien mit 70 % Ethanol fixiert und mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Beispielhaft zu sehen ist dies in Abbildung 6. Die Gesamtzahl der Kolonien wurde gezählt und zum Mittelwert der Kontrollgruppe

normalisiert. Mit der klonogenen Metastasenanalyse kann im Gegensatz zur makroskopischen Zählung der Metastasen auch die Metastasenlast im Inneren der Lungen mit beurteilt werden, sodass sie eine gute Ergänzung zur makroskopischen Zählung darstellt.

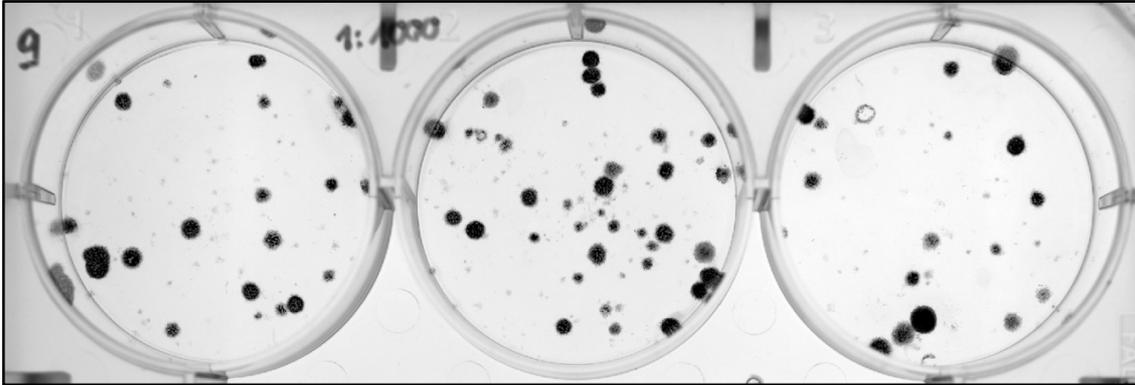


Abbildung 6 Klonogene Metastasenanalyse nach Fixierung und Färbung der Kolonien

Zu sehen ist das Ergebnis einer klonogenen Metastasenanalyse nach Fixierung und Färbung der Kolonien an Tag 32 nach Injektion. Es liegt eine 1:1000 Verdünnung der ursprünglichen Einzelzellsuspension vor.

3.3.4 NK-Zell Depletion

Die Depletion von NK-Zellen erfolgte mithilfe des Anti-Asialo-GM1-Antikörpers. Dazu bekamen ca. 8 Wochen alte, weibliche Balb/c-Mäuse 25 µl unverdünntem Anti-Asialo-GM1 Antikörper (bzw. 25 µl Isotyp für die Kontrollen) intraperitoneal gespritzt (Kasai et al., 1981). Nach 24 h bekamen die Mäuse eine zweite Dosis des Antikörpers (bzw. Isotyp) intraperitoneal, sowie 10^5 Line-1 Tumorzellen intravenös injiziert. Vor Injektion der Tumorzellen erfolgte die Kontrolle der Depletion mittels Durchflusszytometrie einer Blutprobe der Mäuse.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer NK-Zell-depletierten Maus (B) und einer Kontrollmaus (A).

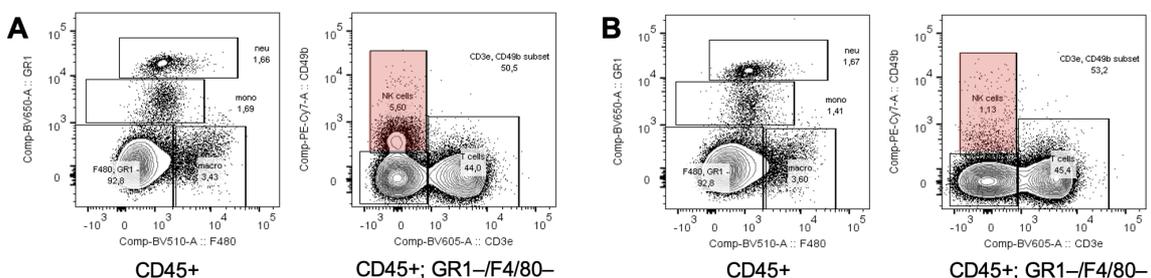


Abbildung 7 Validierung der NK-Zell-Depletion mittels Durchflusszytometrie

Zu sehen sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Validierung der NK-Zell-Depletion vor Injektion der Tumorzellen aus einer Blutprobe der Mäuse. In A zu sehen ist die Blutprobe einer nicht depletierten Maus mit normaler Menge an NK-Zellen (rotes Gate). B zeigt die Ergebnisse einer Maus nach erfolgreicher NK-Zell-Depletion.

3.3.5 Statistische Auswertungen

Die statistischen Analysen erfolgten mithilfe der Software Graphpad Prism Version 9.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Die experimentellen Daten wurden als Mittelwerte und die Fehlerbalken als Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde bei $n > 5$ der ungepaarte Student's T-Test herangezogen. Bei $n \leq 5$ wurde zur Berechnung der Signifikanz der Mann-Whitney-Test verwendet. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet bei $p \leq 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von IL-22 auf die Expression einzelner Gene in 4T1-Zellen

Initial sollte erforscht werden, welche Proteine möglicherweise von IL-22 beeinflusst werden. Um demnach zu untersuchen, welche Effekte IL-22 auf die Genexpression verschiedener Gene hat, wurde eine RNA-Bulkexpressionanalyse durchgeführt (siehe 3.1.3). Dafür wurden 4T1-Brustkrebszellen mit 100 ng/μl IL-22 stimuliert und die RNA der Zellen isoliert (siehe 3.1.1 und 3.2.2). Als Kontrolle wurden nicht-stimulierte 4T1-Brustkrebszellen verwendet. Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der RNA-Analyse in Form eines *Volcano-Plots* mit einer Auswahl von Genen mit signifikant veränderter Genexpression nach Stimulation mit IL-22. Insgesamt konnte bei 147 Genen eine signifikante Veränderung in der Genexpression gefunden werden. Hierbei wurden nur Gene als signifikant differentiell exprimiert angesehen, welche einen p-Wert von $\leq 0,05$ sowie einen Log_2 *Fold-Change* von ± 1 aufwiesen (siehe 3.1.3). 133 Gene zeigten eine verstärkte Expression, 14 Gene eine verminderte Expression nach IL-22 Stimulation.

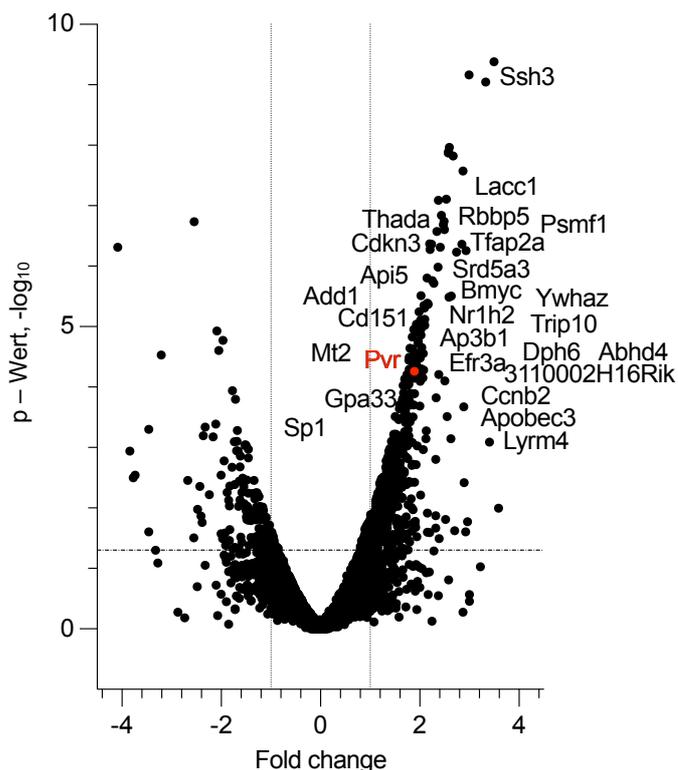


Abbildung 8 Darstellung differentiell exprimierter Gene nach IL-22 Stimulation

Zur Identifizierung von Genen, welche nach Stimulation mit IL-22 eine vermehrte Expression zeigen, wurde eine RNA-Einzelzellanalyse durchgeführt. Der Plot vergleicht IL-22 stimulierte 4T1-Zellen mit einer nicht stimulierten Kontrollgruppe. Hier dargestellt sind der Fold-Change sowie die P-Werte der differentiell exprimierten Gene. Insgesamt konnte bei 147 Genen eine signifikante Veränderung in der Genexpression gefunden werden (Signifikanzkriterien: P-Wert $\leq 0,05$ und Log_2 Fold-Change ± 1). Adaptiert nach Briukhovetska et al. (2023).

Die Expressionsveränderung der im Vergleich zur Kontrolle am meisten veränderten Gene im Vergleich zur Kontrolle wurde anschließend mittels RT-qPCR (siehe 3.1.2) validiert. Abbildung 9 zeigt auszugsweise die Ergebnisse dieser RT-qPCR. Für die am meisten hochregulierten Gene wurde eine ausführliche Literaturrecherche über Funktionen und mögliche Wirkungen auf die Metastasierung von Tumoren durchgeführt. In Zusammenschau der RNA-Analysen sowie der Literatur konnte *Pvr* als eines der vielversprechendsten Gene identifiziert werden (rot markiert in Abbildung 8 und Abbildung 9). *Pvr* kodiert für das Protein CD155, welches in verschiedenen Tumoren übermäßig exprimiert wird und für welches sowohl Tumor- als auch Metastasen-fördernde Eigenschaften beschrieben sind (Molfetta et al., 2020, O'Donnell et al., 2020). Aufgrund dieser Parallele zu den Eigenschaften von IL-22 wurde der Zusammenhang von IL-22 und CD155 in weiteren Experimenten genauer untersucht.

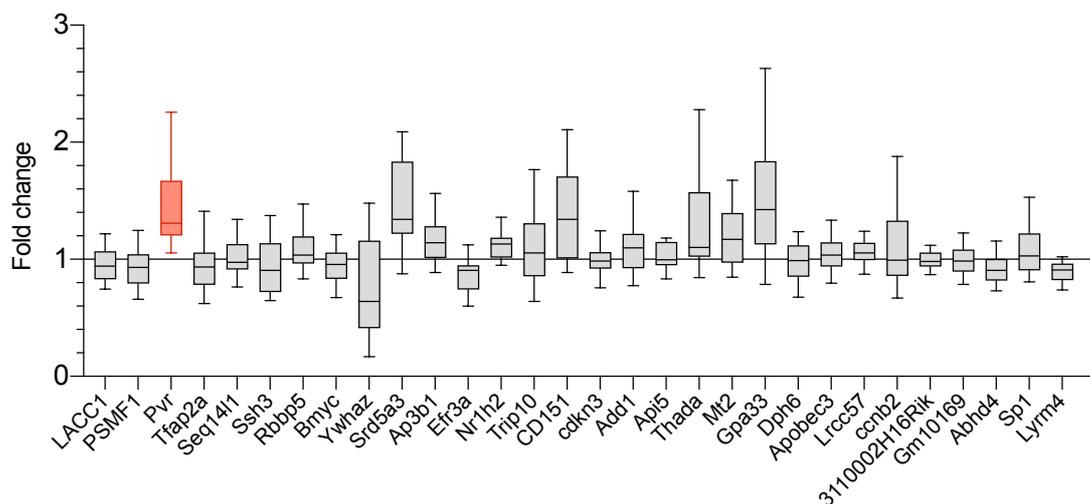


Abbildung 9 Veränderung der Expression ausgewählter Gene nach Stimulation von 4T1-Zellen mit rekombinatem murinem IL-22

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Genexpressions-Analyse von 4T1-Zellen mittels RT-qPCR nach Stimulation mit IL-22 (100 ng/mL IL-22, 24 h). Abgebildet sind hier ausgewählte Gene, welche in einer vorherigen mRNA-Sequenzierung signifikante Expressionsveränderungen gezeigt hatten. Zu sehen ist der *Fold-Change* im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle. Abgebildet ist der *Fold change* als Minimum, Maximum, Median und Quartil (insgesamt jeweils vier technische Replikate pro Gen, zu sehen ist das repräsentative Ergebnis eines Replikates (insgesamt zwei Wiederholungen)). Adaptiert nach Briukhovetska et al. (2023).

4.2 Einfluss von IL-22 auf die Genexpression von *Pvr* in Line-1 Zellen

Um auszuschließen, dass es sich bei den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung und RT-qPCR um einen zellspezifischen Effekt handelt, wurden auch Line-1 Lungenkrebszellen mit IL-22 stimuliert. Auch bei Stimulation der Line-1 Lungenkrebs-Zelllinie mit IL-22 konnte eine Veränderung der Genexpression von *Pvr* festgestellt werden (Daten hier nicht gezeigt). Um die Kinetik hinter dieser Hochregulation des Gens genauer zu untersuchen, wurde eine erneute RT-qPCR-Analyse durchgeführt, in welcher die Veränderung der Genexpression von *Pvr* über die Zeit gemessen wurde (Abbildung 10).

Als positive Kontrolle wurde das *Suppressor of cytokine signaling 3* (Socs3) -Gen verwendet, welches bekanntermaßen durch IL-22 Stimulation hochreguliert wird (Naher et al., 2012) und für das immunmodulatorische SOCS3-Protein kodiert.

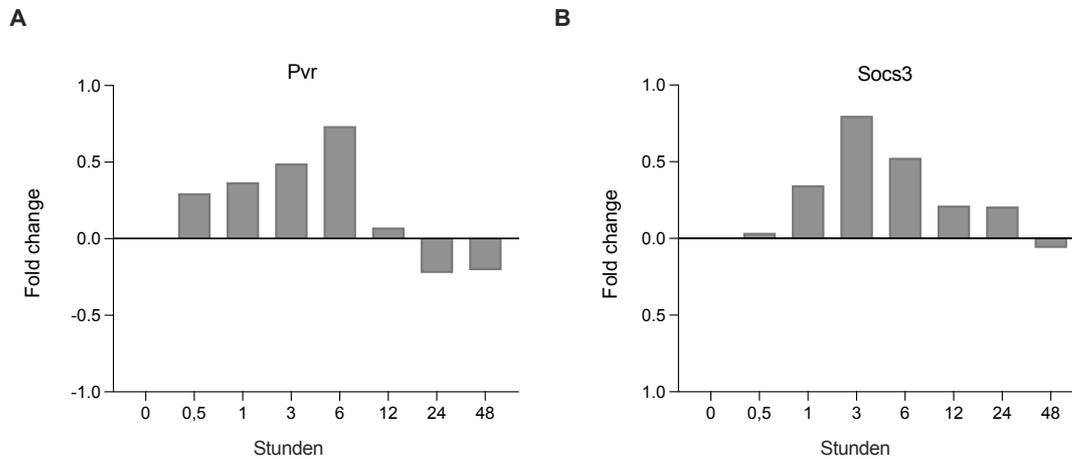


Abbildung 10 Veränderung der CD155 Expression nach IL-22 Stimulation von Line-1-Zellen über die Zeit

Zur Beurteilung der Kinetik der veränderten Genexpression von *Pvr* nach IL-22 Stimulation wurden Line-1-Lungenkrebszellen für bis zu 48 h mit 100 ng/ml rekombinatem murinen IL-22 stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h, wurde die Stimulation beendet. Die RNA der Zellen wurde isoliert und zu cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte die Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR. Dargestellt ist der Fold-Change im Vergleich zum Haushaltsgen und normalisiert zur Baseline-Expression.

In Abbildung 10 ist hierbei eine Hochregulation des *Pvr* Gens besonders in den ersten sechs Stunden (Abbildung 10A) zu sehen. Auch das Kontrollgen *Socs3* zeigt wie erwartet einen deutlichen Anstieg der Genexpression nach IL-22 Stimulation (Abbildung 10B).

4.3 Effekt von IL-22 auf die Expression von CD155 in Line-1 Zellen

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass IL-22 zu einer Hochregulierung der Expression des *Pvr*-Gens führt. Um zu untersuchen, ob diese veränderte Expression auch einen Effekt auf Proteinebene hat, wurde die Expression des Proteins CD155 vor und nach Stimulation mit IL-22 gemessen. Da es sich bei CD155 um einen Oberflächenrezeptor handelt, bot sich für diese Analysen die Durchflusszytometrie an (Siehe 3.2.3).

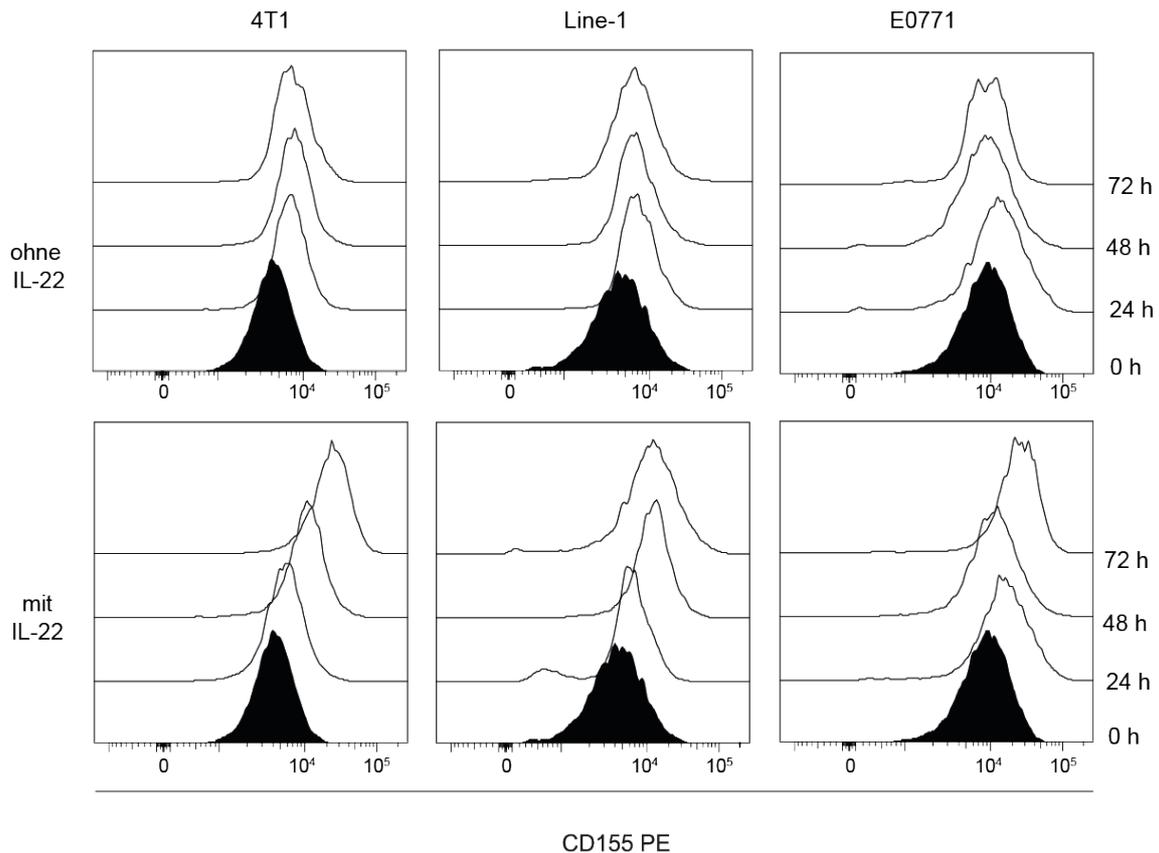


Abbildung 11 CD155 Expression in 4T1, Line-1 und E0771-Zellen nach Stimulation mit rekombinanten murinen IL-22 für 72 h *in vitro*

Für die CD155-Expressionsanalyse mittels Durchflusszytometrie wurden 4T1, Line-1 und E0771 Zellen mit 100 ng/ml rekombinanten IL-22 *in vitro* stimuliert. Nach 24, 48 und 72 h wurden ein Teil der Zellen mit dem CD155-PE Antikörper angefärbt und die CD155 Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 voneinander unabhängigen Experimenten. Adaptiert nach Briukhovetska et al. (2023).

Die Histogramme in Abbildung 11 zeigen einen deutlichen Anstieg der CD155 Expression auf 4T1-, Line-1 und E0771-Tumorzellen nach Stimulation mit IL-22 über 72 h. In den nicht stimulierten Kontrollzellen ist nur ein minimaler Anstieg der CD155-Expression in den ersten 24 h zu sehen, danach veränderte sich die Expression nicht weiter.

In Abbildung 12 wird dieser Anstieg der CD155-Expression noch einmal quantitativ dargestellt. Zu sehen ist, dass in allen drei Zelllinien die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD155-PE im Vergleich zur Kontrolle um mindestens das 1,8 -fache ansteigt. Daraus lässt sich schließen, dass eine Stimulation mit IL-22 auch auf Proteinebene zu einer Hochregulation von CD155 führt.

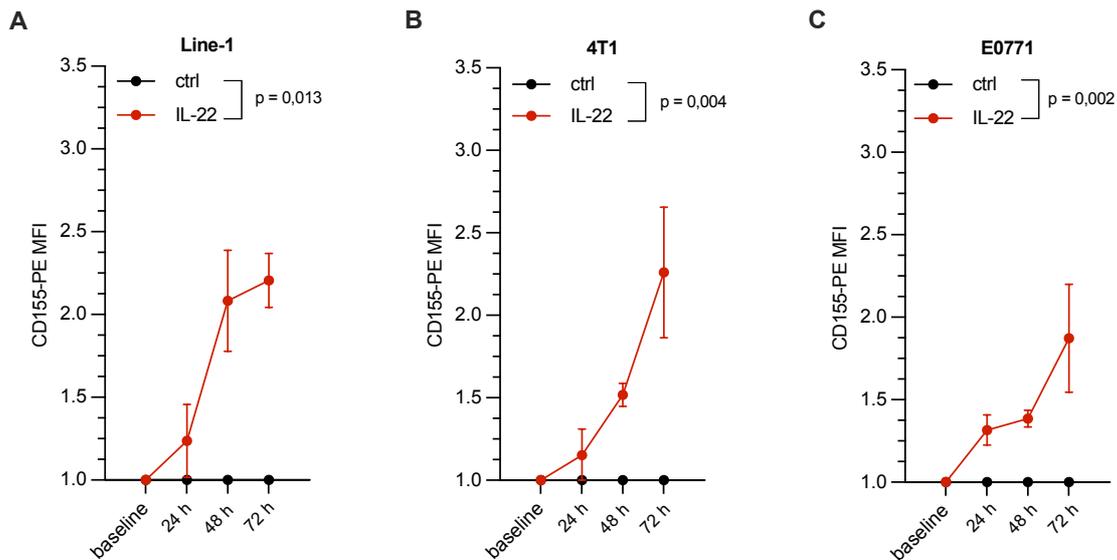


Abbildung 12 Veränderung der CD155 Expression in 4T1, Line-1 und E0771-Zellen nach Stimulation mit rekombinatem murinen IL-22 für 72 h *in vitro*

Für die CD155-Expressionsanalyse mittels Durchflusszytometrie wurden 4T1, Line-1 und E0771 Zellen mit 100 ng/ml rekombinatem IL-22 *in vitro* stimuliert. Nach 24, 48 und 72 h wurden ein Teil der Zellen mit dem CD155-PE Antikörper angefärbt und die CD155 Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Abgebildet ist die Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) des CD155-PE Antikörpers normalisiert zur Baseline und zur nicht-stimulierten Kontrolle. Darstellung der Mittelwerte (\pm SEM) ($n = 3$ unabhängig durchgeführte Experimente, P-Werte berechnet mit dem gepaarten t-Test). Adaptiert nach Briukhovetska et al. (2023).

4.4 Abhängigkeit des Line-1 Tumormodells von NK-Zellen

Viele der tumor-fördernden Wirkungen von CD155 auf Tumorzellen gehen mit einer Bindung von CD155 auf Tumorzellen an CD96, CD226, oder TIGIT auf der Oberfläche von NK- und T-Zellen einher, womit die Immunantwort dieser Zellen verändert wird (Chan et al., 2014, O'Donnell et al., 2020). Um zu testen, ob auch das etablierte Line-1 Metastasen-Modell NK-Zell abhängig ist, wurden NK-Zellen durch Applikation des Anti-Asialo-Gm1 Antikörpers depletiert (siehe 3.3.4) (Kasai et al., 1981). 48 h nach Depletion wurden den Mäusen Line-1 Tumorzellen intravenös verabreicht.

Die NK-Zell-depletierten Mäuse zeigten in dem Versuch makroskopisch mehr Metastasen in den Lungen als die Kontrollmäuse (Abbildung 13A). Dieses Ergebnis zeigte sich auch in der anschließenden klonogenen Metastasen-Analyse, bei der in der Gruppe ohne NK-Zellen mehr Kolonien wuchsen als in der Kontrollgruppe (Abbildung 13B). Somit kann davon ausgegangen werden, dass NK-Zellen auch in dem verwendeten Tumormodell eine wichtige Rolle in der Tumorabwehr spielen.

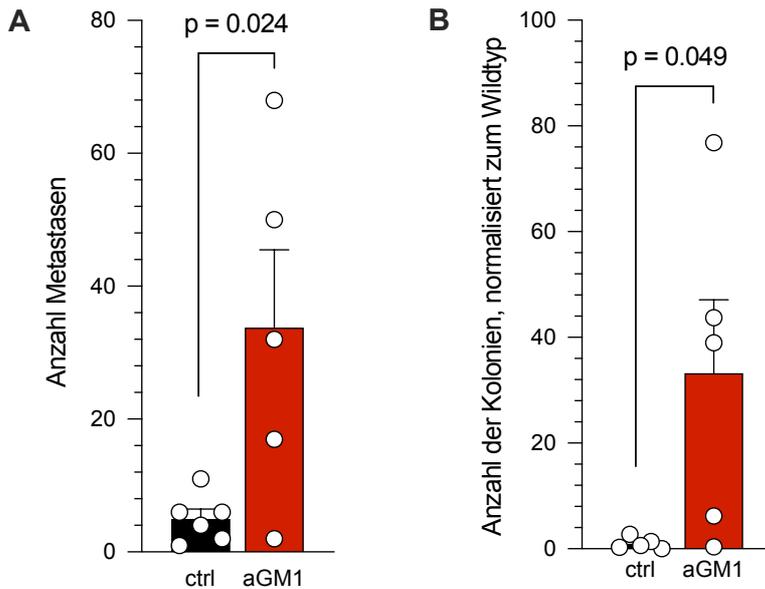


Abbildung 13 Untersuchung der Abhängigkeit der Lungenmetastasen von NK-Zellen im Lungenkarzinom-Modell

Zu sehen sind die Anzahl der Lungenmetastasen nach Line-1-WT Injektion i.v. mit NK-Zell-Depletion (rot) und ohne Depletion (schwarz). (A) zeigt die Anzahl der Lungenmetastasen 14 Tage nach Injektion der Tumorzellen pro Maus. Abbildung (B) zeigt die Anzahl der Kolonien in der klonogenen Metastasen-Analyse, normalisiert zur nicht depletierten Kontrolle. Daten zeigen die Ergebnisse eines Experimentes (\pm SEM). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus ($n = 5$ für Ctrl.; $n = 4$ für aGM1). P-Werte berechnet mithilfe des Mann-Whitney-Tests.

4.5 Die Rolle von CD155 und IL-22 in der Metastasenentstehung

4.5.1 Einfluss von CD155 auf die Metastasenentstehung

Um den Effekt von CD155 auf die Entstehung von Metastasen zu untersuchen, wurde *Pvr* aus Line-1 Zellen (Line-1-CD155⁻) mittels CRISPR-Cas9 (siehe 3.2.5) deletiert und somit eine Ziellinie generiert, welche keinen funktionierenden CD155-Rezeptor mehr exprimiert. Zusätzlich wurde eine Ziellinie generiert, welche den CRISPR-Cas9-Vorgang ebenfalls durchlief, jedoch keine Deletion von *Pvr* aufwies (Line-1 Ctrl.). Der Erfolg der Depletion wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt (Abbildung 14).

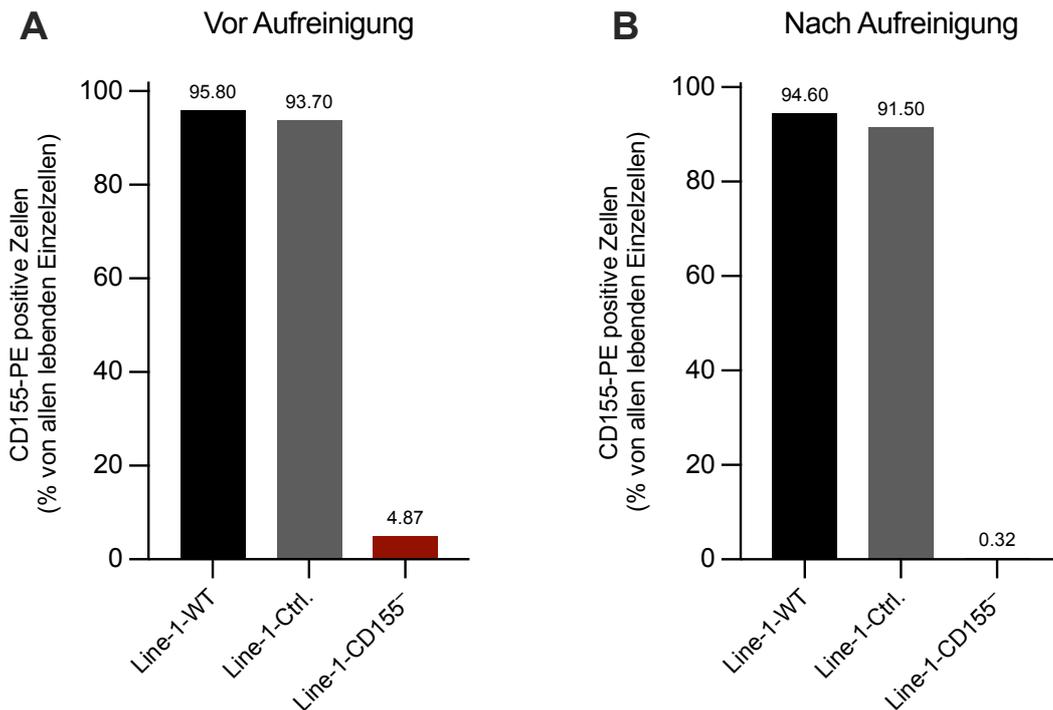


Abbildung 14 Valdierung des Depletionserfolges mittels Durchflusszytometrie

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der CD155-PE positiven Tumorzellen an allen lebenden Einzelzellen. A zeigt die Ergebnisse vor Aufreinigung, B die Ergebnisse nach Aufreinigung mittels BD FACS Aria III.

Zunächst wurde überprüft, ob das Fehlen von CD155 auf den Tumorzellen einen Einfluss auf ihre Proliferation hat, um auszuschließen, dass eventuelle Unterschiede im Metastasierungsverhalten ausschließlich auf eine veränderte Proliferation der Zellen zurückzuführen sind. Hierfür bat sich ein *Scratch-Assay* an, in dem die Proliferation von Zellen über 48 h unter einem Mikroskop beobachtet und anschließend die von Zellen gefüllte Fläche über die Zeit berechnet werden konnte (siehe 3.2.4). Abbildung 15 zeigt beispielhaft jeweils eine Platte von Line-1-Ctrl. und Line-1-CD155⁻ Zellen zu Beginn der Aufnahmen und nach 48 h.

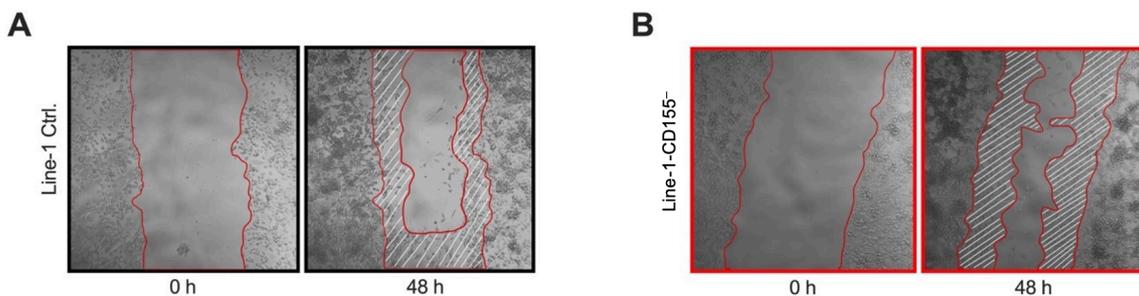


Abbildung 15 Mikroskopische Darstellung der Proliferation von Line-1-Ctrl. und Line-1-CD155⁻ Zellen mithilfe eines *Scratch-Assays*

Mikroskopische Darstellung der Zellen im *Scratch Assay*. Zu sehen sind jeweils beispielhaft ein Well der Line-1-Ctrl. (A) sowie der Line-1-CD155⁻ -Zellen zu Beginn (0 h) und nach 48 h. Rot markiert ist die Wundfläche. Weiß schraffiert zu sehen ist die gefüllte Wundfläche nach 48 h (n = 5).

In der quantitativen Analyse des Scratch-Assays (Abbildung 16) konnte kein Unterschied in der Proliferation von Line-1-Ctrl. und Line-1-CD155⁻ Zellen gefunden werden, sodass mit der Testung der Zellen *in vivo* fortgefahren werden konnte.

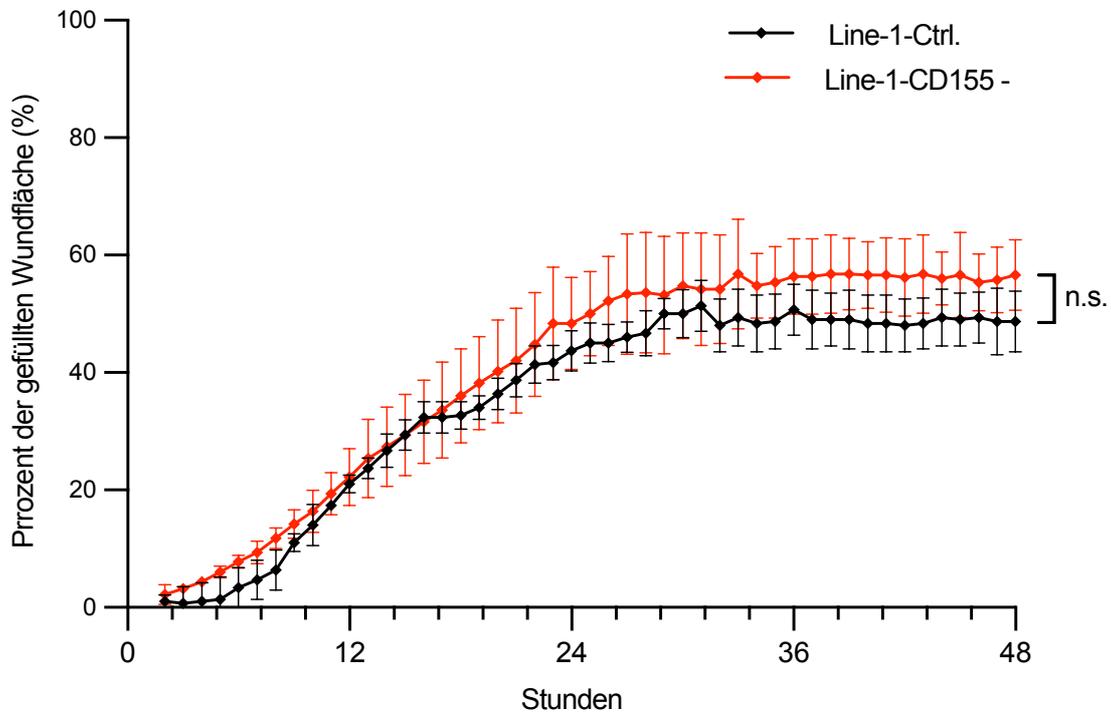


Abbildung 16 Darstellung der Proliferation von Line-1 WT und CD155⁻ Zellen im Scratch Assay über 48 h

Quantitative Darstellung der gefüllten Wundfläche nach 48 h im Vergleich zur Wundfläche zu Beginn (in %) über 48 h (Messung alle 1 h). Schwarz: Line-1-Ctrl.-Zellen, Rot: Line-1-CD155⁻ (Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils 5 technischen Replikaten \pm SEM eines Experimentes).

Bei der subkutanen Injektion von CD155⁻ Zellen konnte erneut kein Unterschied im Tumorstadium gegenüber den Kontrollzellen festgestellt werden, sodass anschließend nur noch die intravenöse Applikation von Tumorzellen angewendet wurde, um eine höhere Zahl an Metastasen zu erreichen. Nach intravenöser Injektion der Line-1-CD155⁻ sowie Line-1-Ctrl. Tumorzellen in Wildtyp- und IL-22^{-/-} Mäuse konnte gezeigt werden, dass die Mäuse mit Tumoren ohne CD155 deutlich weniger Metastasen entwickelten als die Kontroll-Mäuse mit Tumoren mit funktionierendem CD155-Rezeptor (Abbildung 17). Dieser Effekt ließ sich sowohl in den IL-22^{-/-}, als auch in den Wildtyp Mäusen beobachten. Zudem zeigte sich, dass im Gegensatz zu den Line-1-Ctrl-Zellen, bei den Line-1-CD155⁻-Zellen kein Unterschied in der Metastasenzahl zwischen Wildtyp- und IL-22^{-/-}-Mäusen mehr bestand.

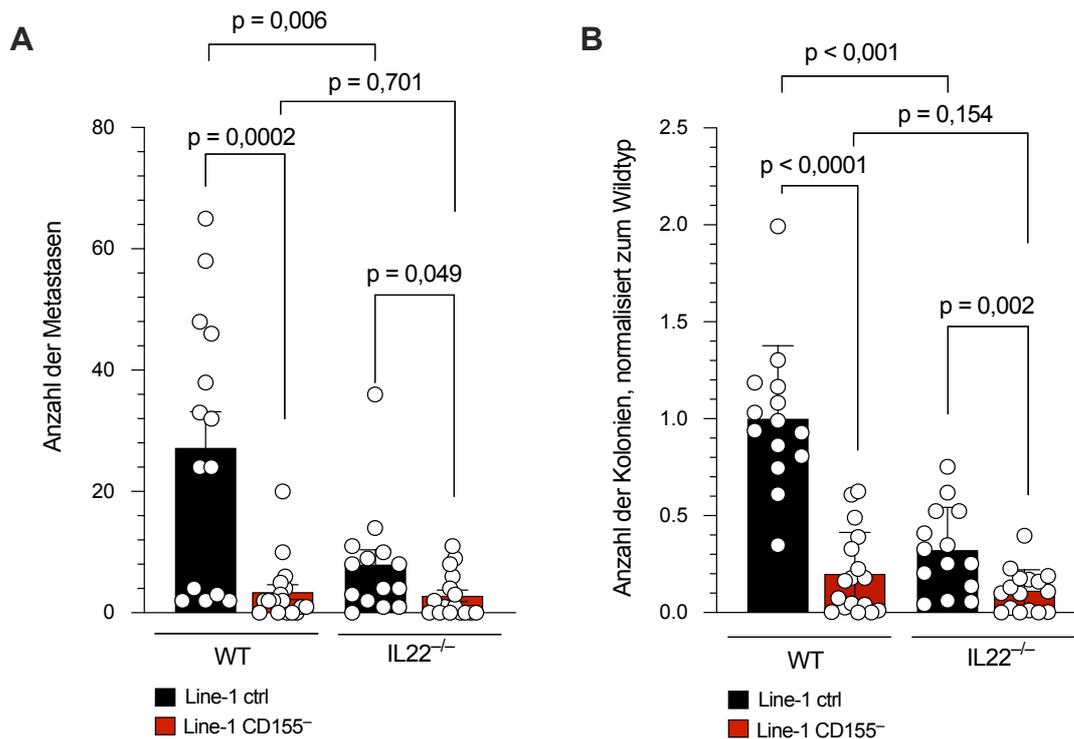


Abbildung 17 Einfluss von CD155 und IL-22 auf die Entstehung von Lungenmetastasen *in vivo*

Um den Effekt von CD155 und IL-22 auf die Entstehung von Lungenmetastasen zu untersuchen, bekamen Balb/c Wildtyp- (WT) und IL22^{-/-}-Mäuse jeweils 2×10^5 Line-1-Kontroll-Zellen oder 2×10^5 Line-1-CD155⁻-Zellen i.v. gespritzt. Nach 20 Tagen wurden die makroskopischen Lungenmetastasen gezählt (A). Abbildung (B) zeigt die Anzahl der Kolonien in klonogenen Metastasen-Analyse. Jeder Punkt stellt die Daten eines Tieres dar. Die Abbildung zeigt die gepoolten Daten von drei unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm SEM. P-Werte berechnet mithilfe des ungepaarten t-Tests. Adaptiert nach Briukhovetska et al. (2023).

4.5.2 Zusammenspiel von IL-22 und CD155 bei der Metastasenentstehung

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen IL-22 und CD155 *in vivo* wurde zudem eine Zelllinie generiert, die IL-22 unabhängig hohe Levels an CD155 exprimiert (Line-1-CD155⁺), indem das *Pvr*-Gen wieder in die CD155⁻ Zellen kloniert wurde (siehe 3.2.6). Diese Zellen konnten wiederum in die Wildtyp- und IL-22^{-/-} Mäuse injiziert werden.

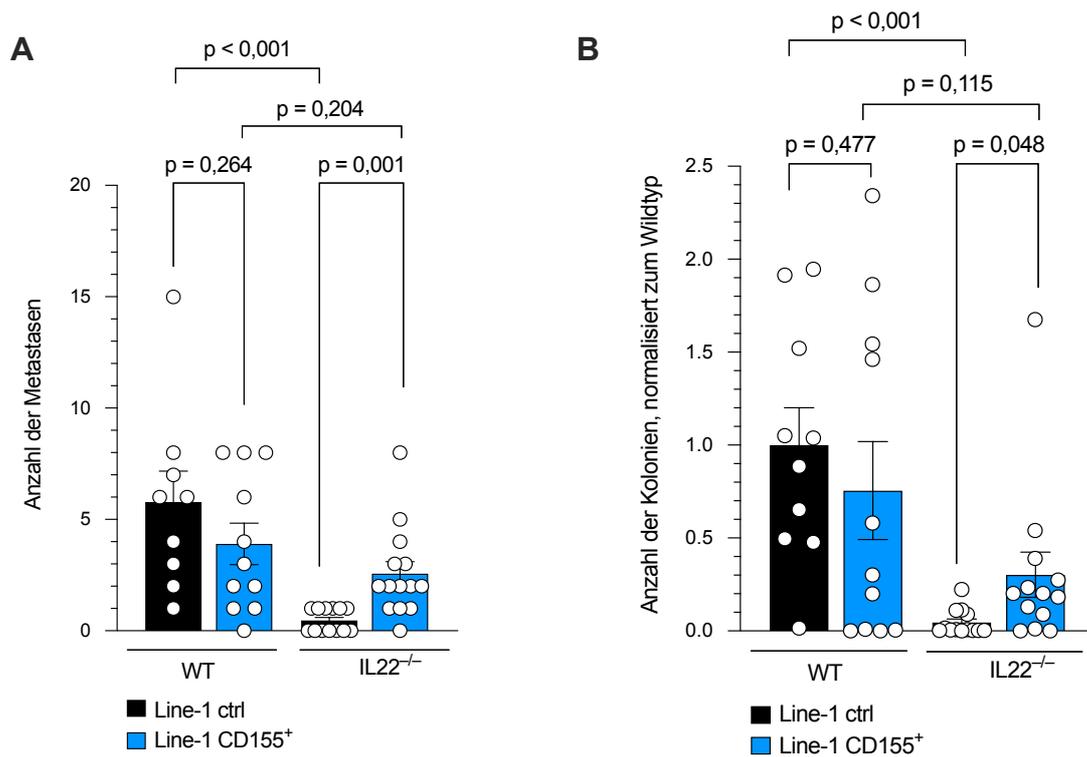


Abbildung 18 Untersuchung des Zusammenhangs von CD155 und IL-22 bei der Metastasenentstehung *in vivo*.

Für die Untersuchung der Abhängigkeit des Tumor-fördernden Effekts von CD155 von IL-22, bekamen Balb/c Wildtyp- (WT) und IL-22^{-/-} - Mäuse jeweils 2×10^5 Line-1-Ctrl.-Zellen oder 2×10^5 Line-1-CD155⁺ Zellen i.v. gespritzt. Nach 20 Tagen wurden die makroskopischen Lungenmetastasen gezählt (A). Abbildung (B) zeigt die Anzahl der Kolonien in der klonogenen Metastasen-Analyse. Jeder Punkt stellt die Daten eines Tieres dar. Die Abbildung zeigt die gepoolten Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm SEM. P-Werte berechnet mithilfe des ungepaarten t-Tests. Adaptiert nach Briukhovetska et al. (2023).

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches: Die Anzahl der Metastasen in den IL-22^{-/-}-Mäusen, denen Line-1-CD155⁺ Zellen gespritzt wurden erhöhte sich im Vergleich zu den vorherigen Versuchen auf ähnliche Werte, wie die Anzahl der Metastasen in den Wildtyp-Mäusen. Beide Versuche geben deutliche Hinweise darauf, dass CD155 und IL-22 zusammen die Metastasierung von Tumoren beeinflussen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

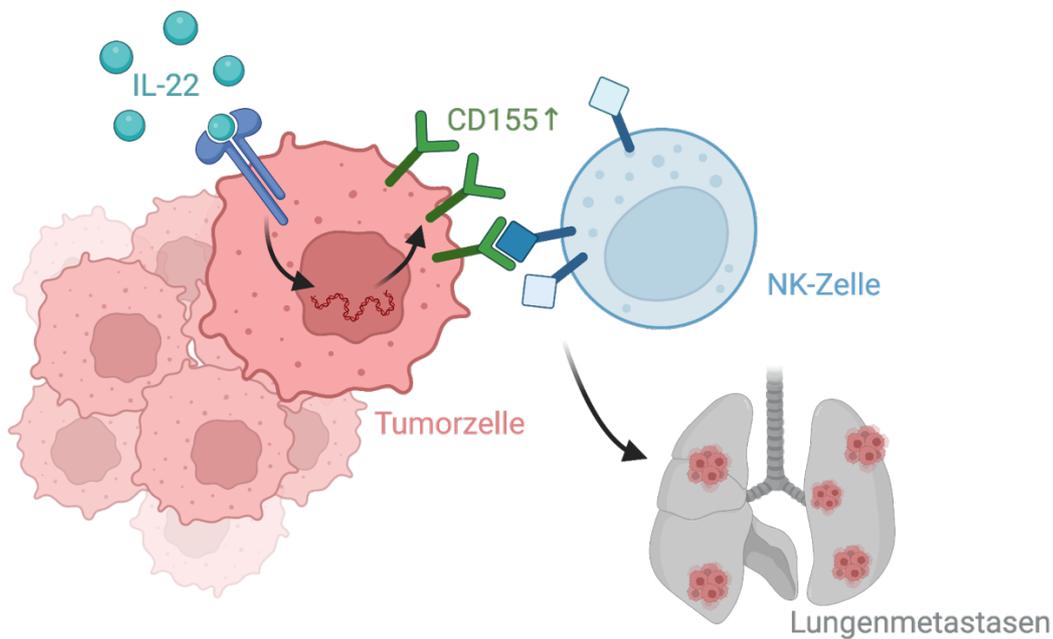


Abbildung 19 Graphische Zusammenfassung der Arbeit

Adaptiert nach (Briukhovetska et al., 2023)

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von CD155 auf Tumorzellen durch eine Stimulation von IL-22 hochreguliert werden kann. Durch eine Stimulation von IL-22 *in vitro* konnte sowohl eine stärkere Expression von *Pvr* auf genetischer Ebene als auch eine vermehrte Expression von CD155 auf Proteinebene über 72 h festgestellt werden. Dieser Effekt war in den nicht-stimulierten Zellen nicht zu sehen, weshalb hier von einer IL-22 abhängigen Überexpression von CD155 ausgegangen werden kann. *In vivo* konnte anschließend gezeigt werden, dass CD155 sowohl in IL-22^{-/-} Mäusen, als auch in Wildtyp Mäusen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Metastasen spielt, da eine Deletion von CD155 in Tumorzellen zu einer deutlichen Verminderung der Metastasierung in beiden Mauslinien führte. Durch eine Wiedereinführung von konstitutiv und IL-22 unabhängig exprimierten CD155 in CD155⁻ Zellen konnte dieser Effekt rückgängig gemacht werden.

5.2 IL-22 führt zu einer Hochregulation von *Pvr* *in vitro*

IL-22, das ursprünglich für seine positiven Eigenschaften auf die Wundheilung und die Geweberegeneration bekannt war, ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der onkologischer Forschung gerückt. Mehrere Studien zeigen, dass IL-22 das Wachstum von primären Tumoren beschleunigt und das Fortschreiten von Tumorerkrankungen fördert (Fukui et al., 2014, Lim and Savan, 2014, Hernandez et al., 2018). Auch

konnte bei Analyse klinischer Daten mehrerer Studien ein Zusammenhang zwischen hoher IL-22 Aktivität in Tumoren und schlechteren Krankheitsverläufen bei Patienten gefunden werden (Zhuang et al., 2012, McCuaig et al., 2020). Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass IL-22 vor allem einen starken Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum von Metastasen bei Lungen- und Brustkrebs hat. IL-22^{-/-} Mäuse zeigten nach Injektion von 4T1, Line-1 sowie E0771 Zellen deutlich weniger Metastasen in den Lungen als die Wildtyp-Kontrollen (Briukhovetska et al., 2023). Giannou et al. (2023) konnten diesen Einfluss von IL-22 auf die Metastasierung auch für Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen zeigen, wodurch die weitreichende Bedeutung von IL-22 bei der Entstehung von Metastasen deutlich wird.

Metastasen sind verantwortlich für ca. 90 Prozent der krebsbezogenen Todesfälle weltweit (Seyfried and Huysentruyt, 2013, Dillekås et al., 2019, Fares et al., 2020). In den letzten Jahren wurde deutlich, dass die Metastasierung von Tumoren stark von den Wechselwirkungen zwischen Immunsystem, Tumorzellen und den Tumor umgebenden Zellen beeinflusst wird (Garner and de Visser, 2020). Vor allem die den Tumor infiltrierenden Immunzellen und die von ihnen produzierten Zytokine scheinen dabei eine Schlüsselrolle zu spielen, können dabei jedoch sowohl fördernd als auch hemmend auf das Fortschreiten der Tumorerkrankung wirken (Dunn et al., 2004, Qian et al., 2011, Chen et al., 2020). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass CD4⁺ Zellen in der Tumorumgebung IL-22 produzieren und somit direkten Einfluss auf die Metastasierung von Lungen- und Brustkrebs haben (Briukhovetska et al., 2023).

Zur Untersuchung des Mechanismus hinter diesen Metastasen-fördernden Eigenschaften von IL-22 wurden in dieser Promotionsarbeit die Gene angeschaut, die nach IL-22 Stimulation von Tumorzellen differenziell exprimiert wurden. Eines dieser Gene war *Pvr*, welches nach IL-22 Stimulation eine signifikant gesteigerte Expression aufwies. *Pvr* kodiert für das Protein CD155, auch bekannt als *Poliovirus receptor (PVR)*, ein transmembraner Rezeptor, welcher der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet wird (Mendelsohn et al., 1989). Zusätzlich zu der transmembranen Form existiert auch eine lösliche Form von CD155, welche in verschiedensten Körperflüssigkeiten nachweisbar ist (Koike et al., 1990, Baurly et al., 2003). Diese lösliche Form konnte jedoch bisher nur bei Menschen, nicht jedoch bei Mäusen identifiziert werden (Bowers et al., 2017). Physiologisch reguliert CD155 die interzellulären Adhärenz-Verbindungen zwischen Epithelzellen (Maier et al., 2007), eine Eigenschaft, die das Protein auch in Hinblick auf eine Metastasenentstehung sehr interessant macht. Zudem konnten Studien bereits

zeigen, dass CD155 *in vivo* einen Einfluss auf die Metastasierung von Tumoren nehmen kann und tumorfördernde Eigenschaften besitzt (Molfetta et al., 2020, O'Donnell et al., 2020). Diese Parallelen waren ausschlaggebend für die weitere Untersuchung des Zusammenhanges der beiden Proteine.

Bisher sind einige Regulatoren bekannt, die zu einer Steigerung der CD155-Expression auf Zellen führen. U.a. führten Interferon- γ (IFN- γ) und IL-1 α in Studien zu einer höheren CD155-Expression auf vaskulären Endothelzellen (Escalante et al., 2011). Darüber hinaus konnten TLR-Agonisten wie Lipopolysaccharide die Expression von CD155 auf Antigen-präsentierenden Zellen NF- κ B-abhängig hochregulieren (Kamran et al., 2013, Zhan et al., 2022). Auf Tumorzellen wird die CD155-Expression u.a. durch die für die Proliferation und Zelldifferenzierung wichtigen RAS- und c-Myc Signalwege reguliert (Hirota et al., 2005, Zhang et al., 2021). In den hier durchgeführten Analysen zeigte sich ein deutlicher Anstieg der *Pvr*-Expression auf Tumorzellen nach IL-22-Stimulation (siehe Abbildung 9) sowie eine Steigerung der CD155-Expression auf der Zelloberfläche durch eine direkte Stimulation der Tumorzellen mit IL-22 *in vitro*. Dies ist insofern interessant, da es bisher noch unklar ist, ob auch die CD155-Expression auf Tumorzellen abhängig von immunregulatorischen Faktoren wie TLR-Agonisten oder IL-1 α ist, oder ob dies nur auf die gesunden Zellen zutrifft (Sloan et al., 2004, Gao et al., 2017, Zhan et al., 2022). Lediglich für IFN- γ konnte bisher gezeigt werden, dass dadurch eine Hochregulation von CD155 auf Melanomzellen induziert werden konnte (Inozume et al., 2016). Da auch die IL-22 Produktion durch Immunzellen IL-1 α abhängig ist (Voigt et al., 2017) und zudem NF- κ B-abhängig gesteigert werden kann (Victor et al., 2017), zeigen sich hier deutliche Ähnlichkeiten mit der Regulation von CD155 auf gesunden Zellen und deuten darauf hin, dass diese Regulationsmechanismen auch bei Tumorzellen eine Rolle spielen könnten.

5.3 IL-22 führt zu einer gesteigerten Expression von CD155 auf Tumorzellen und somit zu einer Inhibierung von NK-Zellen

Eine wichtige tumorfördernde Eigenschaft entfaltet CD155 durch die Bindung an verschiedene Oberflächenrezeptoren auf T-Zellen und NK-Zellen. Es ist schon seit einiger Zeit bekannt, dass NK-Zellen eine essenzielle Rolle für die Tumorkontrolle und Eindämmung von Metastasen in den meisten Tumoren spielen (Smyth et al., 2000). In klinischen Studien zeigten sich eine inverse Korrelation der Anzahl an Metastasen in Patienten zur Menge an tumorinfiltrierenden NK-Zellen bei verschiedenen Tumorentitäten, darunter Magen-, Darm- und Prostatakarzinomen (Coca et al., 1997, Ishigami et al., 2000, Gannon et al., 2009). Auch in Mausmodellen konnte die Bedeutung von NK-

Zellen in der Metastasenentstehung mehrfach bestätigt werden. So entwickelten Mäuse, die aufgrund einer Deletion von *Mcl1* in NKp46⁺-Zellen keine NK-Zellen besaßen (Sathe et al., 2014) deutlich mehr Metastasen nach Injektion von Melanomzellen als die Wildtyp-Kontrollen (Delconte et al., 2016, López-Soto et al., 2017, Putz et al., 2017). Zusätzlich konnte in verschiedensten Tumormodellen bestätigt werden, dass eine Depletion von NK-Zellen durch neutralisierende Antikörper wie Anti-Asialo-Gm1 zu einer höheren Metastasenlast und einer schlechteren Prognose führt (López-Soto et al., 2017). So ist es wenig überraschend, dass auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Line-1-Tumormodell die Metastasenzahl stark von der NK-Zell-Funktion abhängig war und die Depletion eben dieser Zellen zu einem sehr deutlichen Anstieg der Lungenmetastasen *in vivo* führte. In sich an diese Arbeit anschließenden Experimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass in dem Line-1 Tumormodell gerade das Fehlen von NK-Zell produzierten zytotoxischen Substanzen wie IFN- γ zu einer erhöhten Tumormlast führte, was sich für andere Zellarten (wie z.B. T-Zellen) nicht zeigen ließ (Briukhovetska et al., 2023).

Die Aktivierung und Inhibierung von NK-Zellen erfolgt über das komplexe Zusammenspiel von vielen verschiedenen Rezeptoren und Liganden (Lanier, 2008). In der Tumorabwehr haben sich in den letzten Jahren vor allem die Rezeptoren CD226 (Shibuya et al., 1996), TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) (Yu et al., 2009) und CD96 (Wang et al., 1992) als wichtige Mediatoren der NK-Zell Funktion herauskristallisiert. Alle drei Rezeptoren teilen und konkurrieren um den gemeinsamen Liganden CD155 (Bottino et al., 2003, Fuchs et al., 2004, Seth et al., 2007, Yu et al., 2009). Trotz des gemeinsamen Liganden haben die Rezeptoren teils gegensätzliche Funktionen. Während CD226 kostimulatorisch auf NK-Zellen wirkt und ihre zytotoxische Funktion bei der Tumorabwehr fördert (Lakshmikanth et al., 2009, Chan et al., 2010), wird die NK-Zellfunktion durch TIGIT gehemmt. Dieses Gegenspiel der Rezeptoren wirkt nach aktuellem Stand der Literatur am ehesten zur Vermeidung übermäßiger Immunantworten und so dem Schutz vor autoimmunen Reaktionen (Stanietsky et al., 2009, Lozano et al., 2012). Auch CD96 hat einen hemmenden Einfluss auf die NK-Zellfunktion, indem es mit CD226 um den Liganden CD155 konkurriert und die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen inhibiert (Chan et al., 2014). Viele der Tumor-fördernden Wirkungen von CD155 beruhen somit auf einer Überexpression von CD155 auf Tumorzellen und einer Inhibierung der NK-Zellen und auch T-Zellen durch Bindung an TIGIT und CD96 auf deren Zelloberfläche (Chan et al., 2014, Gao et al., 2017, O'Donnell et al., 2020). Zusätzlich zur direkten Inhibierung der NK-Zellen führt eine CD155 Überexpression auf

Tumorzellen durch anhaltende Stimulation von CD226 zu einer Internalisierung und einem Abbau von CD226 und so zu einem Verlust des kostimulatorischen Signals der NK-Zellen (Braun et al., 2020). Dies konnte auch in weiterführenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, in denen eine verstärkte Expression von CD155 in der Tumorumgebung zu einer verminderten Expression von CD226 auf NK-Zellen und folglich einer verminderten Freisetzung von IFN- γ führte (Briukhovetska et al., 2023).

In sich an diese Arbeit anschließenden Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass ein Verlust von IL-22 zu einer Erhaltung der CD226-Expression auf NK-Zellen und T-Zellen führt (Briukhovetska et al., 2023). Dies passt gut zu dem von Braun et al. (2020) beschriebenen Verlust von CD226 durch exzessive Stimulation mit CD155, da es durch IL-22 zu einer vermehrten Expression von CD155 und somit auch zu einer erhöhten Stimulation des CD226 Rezeptors kommen könnte. Fehlt diese IL-22-vermittelte Überexpression von CD155, kommt es vermutlich auch zu einer durch Überstimulation verursachten verminderten Internalisierung von CD226, wodurch die zytotoxische NK-Zellfunktion erhalten bleibt. Durch die hemmenden und stimulierenden Signalwege, die CD155 durch Bindung an die unterschiedlichen Rezeptoren aktivieren kann, ist es in Anbetracht der aktuellen Erkenntnisse wahrscheinlich, dass CD155 im Laufe der Tumorentwicklung verschiedene Rollen einnehmen kann.

5.4 CD155 zeigt keinen direkten Einfluss auf die Proliferation von Line-1 Zellen *in vitro*

CD155 wird in geringen Konzentrationen in verschiedenen Geweben, wie z.B. Leber und Lunge, exprimiert. Eine Überexpression von CD155 zeigt sich jedoch in diversen Tumorentitäten (Gao et al., 2017, Molfetta et al., 2020, O'Donnell et al., 2020), außerdem sind mehrere tumorfördernde Eigenschaften des Oberflächenproteins bekannt. Durch eine Cyclin-D vermittelte Kaskade führt eine hohe CD155 Expression zu einer verstärkten Tumorzellproliferation und somit zu einem vermehrten Wachstum von Tumorzellen (Kono et al., 2008). Ebenso kann es Nectin-3-abhängig zu einer verstärkten Zellmigration führen (Ikeda et al., 2003, Gao et al., 2017). Beides sind tumorfördernde Eigenschaften, welche auch IL-22 zugeschrieben werden. Ähnlich wie bei IL-22, korreliert auch eine vermehrte Expression von CD155 mit einer gesteigerten VEGF-Konzentration in Tumoren und einer folglich gesteigerten Angiogenese in vaskulären Endothelzellen (Kinugasa et al., 2012, Nishiwada et al., 2015). Hieraus kann geschlossen werden, dass IL-22 und CD155 eine synergistische Funktion auf das Tumorstadium haben können.

In dieser Arbeit konnte jedoch kein direkter Einfluss von CD155 auf die Proliferation von den von uns verwendeten Tumorzellen festgestellt werden (siehe Abbildung 16). Die Line-1-CD155⁻-Zellen zeigten keine Unterschiede in denen von uns durchgeführten Proliferationsversuchen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Ursachen hierfür könnten beispielsweise zellspezifischer Genese sein, da ein positiver Einfluss von CD155 auf die Proliferation von Melanomzellen (Wang et al., 2020) oder Kolonkarzinomzellen (Zheng et al., 2018) in der Literatur bereits beschrieben ist. Zudem könnte der Effekt von CD155 auf die Proliferation der Tumorzellen sehr milde ausgeprägt sein und mit der von uns gewählten Methode des *Scratch Assay* nicht sensitiv genug detektiert worden sein. Andererseits konnte in den *in vivo* Modellen zur Quantifizierung von Metastasen auch kein Effekt von CD155 auf das Wachstum der Primärtumore nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt), was die Ergebnisse des *Scratch-Assays* durchaus unterstützen würde.

5.5 CD155-Defizienz führt zu einer verminderten Metastasenzahl *in vivo*

Der Einfluss von CD155 auf die Metastasenentstehung von Tumoren *in vivo* wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Schon Sloan et al. (2004) sahen in CD155 aufgrund seiner Mediatorfunktion in der Tumorzellinvasion und -migration einen wichtigen Regulator der Metastasenentstehung und Tumorprogression. In den folgenden Jahren folgten einige Studien, welche die Signifikanz von CD155 auf die Tumorgenese weiter bestätigten, sich jedoch meist eher auf die Tumorprogression und nicht auf die Metastasierung beschränkten (Triki et al., 2019, Freed-Pastor et al., 2021). Zhuo et al. (2018) zeigten jedoch deutlich, dass eine Überexpression von CD155 zu einer vermehrten Metastasierung bei Osteosarkomen führt und sich dieser Effekt durch Gabe von Anti-CD155 Antikörpern rückgängig machen ließ. Der relevante Einfluss von CD155 auf die Metastasierung von Tumoren konnte in den von uns durchgeführten *in vivo* Versuchen bestätigt werden. So zeigten sich in Mäusen, denen Line-1-CD155⁻ Zellen gespritzt wurden, signifikant weniger Lungenmetastasen als in Mäusen, die Line-1-Ctrl.-Zellen erhielten. Betrachtet man die physiologischen Funktionen und Eigenschaften von CD155 etwas genauer, wirkt das zunächst wenig überraschend. Durch seine proliferativen, motilitätssteigernden und adhäsiven Eigenschaften vereint CD155 mehrere für die Tumorentstehung wesentliche Eigenschaften. Da CD155 in gesundem Gewebe jedoch nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird und die Regulation auf Tumorzellen bisher unzureichend untersucht ist (Gao et al., 2017, Kučan Brlić et al., 2019), ist jedoch fraglich, ob diese Eigenschaften auch in der Tumorumgebung ausschlaggebend für dessen Einfluss auf die Metastasierung sind.

Der Effekt von CD155 auf die Metastasierung war sowohl in IL-22^{-/-}-Mäusen, als auch in Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Zudem zeigte sich, im Gegensatz zu den Line-1-Ctrl-Zellen, bei den Line-1-CD155⁻-Zellen kein Unterschied in der Metastasenanzahl zwischen Wildtyp- und IL-22^{-/-}-Mäusen (siehe Abbildung 17). In Zusammenschau mit den *in vitro* Daten dieser Arbeit bekräftigt dies die Annahme, dass CD155 im Signalweg der Metastasenentstehung nachgeschaltet von IL-22 ist. Dies ist interessant, da CD155 als wichtiger NK-Zell-Ligand als Verbindung zwischen IL-22 und den Immunzellen dienen könnte. IL-22 selbst bindet bekanntermaßen selbst nicht an Immunzellen, sondern ausschließlich an epitheliale Zellen, weswegen eine direkte Signalvermittlung durch IL-22 zwischen Immunzellen nicht möglich ist (Hernandez et al., 2018). IL-22 könnte so durch Induktion der CD155-Expression auf Tumorzellen indirekt eine Mediatorfunktion zwischen IL-22 produzierenden Immunzellen und zytotoxischen Zellen (wie NK-Zellen) in der Tumorumgebung einnehmen. Zusätzlich bestärkt wird die Hierarchie von IL-22 und CD155 im Signalweg dadurch, dass eine IL-22 unabhängige, dauerhaft bestehende Expression von CD155 auf Tumorzellen in folgenden Experimenten auch in IL-22^{-/-} Mäusen zur vermehrten Metastasenbildung führte (siehe Abbildung 18). Eine hohe CD155-Expression auf Tumorzellen eliminiert also den positiven Effekt der IL-22-Depletion auf die Metastasierung. In Kombination mit den *in vitro* Daten dieser Arbeit, welche den direkten Zusammenhang zwischen IL-22 und der CD155-Expression bezeugen, kann davon ausgegangen werden, dass IL-22 also auch *in vivo* zu einer Hochregulation von CD155 auf Tumorzellen und so zu einer Hemmung der NK-Zellfunktion führt. Weiter bekräftigt wird dies durch nachfolgende Arbeiten der Arbeitsgruppe, die eine erhöhte CD155-Expression in explantierten Metastasen von Wildtyp-Mäusen, jedoch nicht in IL-22^{-/-} Mäusen feststellen konnten (Briukhovetska et al., 2023).

Die hier erhobenen Daten spiegeln jedoch lediglich die Funktionen des auf Tumorzellen exprimierten CD155 wider. Interessanterweise zeigen Okumura et al. (2020), dass auch die lösliche Form von CD155 (*soluble CD155*, sCD155) direkt auf die Metastasenentstehung einwirkt, indem es im humanisierten Mausmodell die NK-Zell-Funktion durch direkte Inhibierung von CD226 hemmte. Diese lösliche Form von CD155 wird von Mäusen nicht exprimiert, sodass sich die Frage stellt, ob dieser hemmende Effekt auf CD226 das Äquivalent zur CD155-induzierten Herunterregulierung von CD226 im Mausmodell ist, oder ob dieser Effekt in menschlichen Organismen zusätzlich dazu besteht. In Zukunft ist eine weitere Diskriminierung der Funktionen von sCD155 und membrangebundenem CD155 in Menschen sinnvoll, um die Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung und -Inhibition besser zu verstehen.

5.6 CD155 und IL-22 stellen potenziell wirksame Angriffspunkte für die Entwicklung neuer Krebstherapien dar

Die tumorfördernden Eigenschaften von IL-22 und CD155 machen beide Proteine zu einem möglichen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Krebstherapien. Die prognostische Bedeutung von IL-22 wurde in mehreren Studien für diverse Tumorentitäten bestätigt, darunter Magen- (Zhuang et al., 2012), Bronchial- (Guillon et al., 2016) und Pankreaskarzinome (Wen et al., 2014) sowie kolorektale (Kryczek et al., 2014) und hepatozelluläre Karzinome (Waidmann et al., 2014). In dieser Arbeit nachfolgenden statistischen Auswertungen aus klinischen Datenbanken konnte unsere Arbeitsgruppe zudem zeigen, dass eine hohe Expression des IL-22-Rezeptors in Bronchial- und Mammakarzinomen mit einer hohen *Pvr*-Expression einherging. Dies korrelierte gleichzeitig mit einem schlechteren Gesamtüberleben, vor allem in früheren Tumorstadien (Briukhovetska et al., 2023), was die beiden Proteine neben den therapeutischen Möglichkeiten auch zu möglichen prognostischen Faktoren macht.

Eine direkte IL-22 Blockade durch IL-22 Antikörper wurde bisher in humanen onkologischen Studien nicht untersucht. Giannou et al. (2023) konnten jedoch zeigen, dass der humane monoklonale Anti-IL-22 Antikörper *Fezakinumab* im Mausmodell die Extravasation von Tumorzellen verhinderte. Da die Sicherheit von *Fezakinumab* bereits in dermatologischen Studien bestätigt wurde (Guttman-Yassky et al., 2018), wären onkologische Studien mit dem anti-IL-22 Antikörper sinnvoll, um den direkten Effekt von IL-22 auf die Metastasierung von Tumoren bei Menschen zu untersuchen. Ein wirksames Medikament zur Unterdrückung oder Verlangsamung der Metastasierung würde hierbei einen enormen Entwicklungsschritt in der Krebstherapie darstellen und das Überleben von vielen Krebspatient:innen positiv beeinflussen.

Auch wenn es noch keine klinischen Studien zur direkten IL-22-Blockade im Menschen gibt, existieren bereits Studien, die durch ihre verwendeten Medikamente indirekt die IL-22 Produktion hemmen. In der groß angelegten CANTOS-Studie (ClinicalTrials.gov, NCT01327846) wurde die Wirksamkeit des IL-1 β Inhibitors *Canakinumab* in gut 10.000 Patienten mit Atherosklerose zur Sekundärprophylaxe bei Myokardinfarkt untersucht (Ridker et al., 2011). Neben den primären Ergebnissen der Studie zum kardiovaskulären Risiko fiel auf, dass in der *Canakinumab*-Gruppe über den Beobachtungszeitraum von sieben Jahren sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität von Lungenkrebs deutlich niedriger war als in der Placebo-Gruppe (Ridker et al., 2017). Trotz dieser vielversprechenden Daten konnten die folgenden CANOPY-Studien (ClinicalTrials.gov, NCT03447769, NCT03968419, NCT03631199, NCT03626545) bisher keinen Effekt

von *Canakinumab* auf den Krankheitsverlauf von Lungenkrebspatient:innen feststellen (Novartis International AG, 2021, Novartis International AG, 2022). Da IL-1 β direkt die IL-22-Freisetzung aus Tumorzellen fördert (Voigt et al., 2017), sollte folglich auch eine Therapie mit IL-1 β -Inhibitoren zu einer niedrigeren IL-22 Konzentration in der Tumorumgebung führen. Es ist also fraglich, ob auf Grundlage der aktuellen Ergebnisse eine direkte Inhibition von IL-22 überhaupt einen Vorteil in der Behandlung von Lungenkrebs bringen würde. Andererseits muss bedacht werden, dass die ernüchternden Ergebnisse der bisher veröffentlichten CANOPY-A (ClinicalTrials.gov, NCT03447769) und CANOPY-1 (ClinicalTrials.gov, NCT03631199) Studie die Ergebnisse von adjuvante Gaben von *Canakinumab* in fortgeschrittenen Stadien von Lungenkrebs widerspiegeln, in denen es bereits zu einer lymphogenen Metastasierung gekommen ist. Geht man auf Grundlage der Daten dieser Promotionsarbeit davon aus, dass IL-22 seine Wirkung vor allem durch die Förderung der Metastasenentstehung durch Mediation der NK-Zellkontrolle entfaltet, könnte eine Gabe von IL-22 oder auch IL-1 β -Inhibitoren zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung (N0, M0 Status) sinnvoll sein, um somit die Entstehung von Metastasen von Anfang an zu unterbinden. Vorteile einer gezielten IL-22-Blockade gegenüber einer Blockade von IL-1 β oder z.B. auch STAT3 sind ohne Zweifel der geringere immunsuppressive Effekt durch weniger betroffene Signalwege innerhalb des Organismus und somit auch vermutlich weniger zu erwartende Nebenwirkungen.

Auf Grundlage der hier erhobenen Daten wäre auch eine CD155-Blockade ein potenziell wirksamer Ansatz zur Therapie bzw. Prävention von Metastasen. Eine hohe CD155-Expression konnte in klinischen Studien u.a. in fortgeschrittenen Stadien von Pankreas-, Kolon-, Bronchialkarzinomen sowie Glioblastomen und Melanomen gefunden werden (Masson et al., 2001, Nakai et al., 2010, Bevelacqua et al., 2012, Nishiwada et al., 2015), wodurch es, in Zusammenschau mit seinen tumorfördernden Eigenschaften, einen möglichen Angriffspunkt für neue Krebstherapien darstellt. Zusätzlich konnten frühere Studien bereits zeigen, dass Tumorpatient:innen erhöhte Werte des löslichen CD155 im Blutserum aufwiesen (Iguchi-Manaka et al., 2016), eine Eigenschaft, die CD155 zu einem wichtigen prognostischen aber auch potenziell diagnostischen Screeningparameter in der Onkologie machen könnte. Die Möglichkeit CD155 als prognostischen und prädiktiven Marker zu verwenden, wird zurzeit auch in klinischen Studien weiter untersucht (ClinicalTrials.gov NCT03789682, 2018), bisher wurden hierzu jedoch keine Ergebnisse veröffentlicht.

Da CD155 der einzige Rezeptor für den Poliovirus ist, bietet er optimale Bedingungen für die Erprobung neuer Therapien mit onkolytischen Viren (Brown et al., 2014,

Denniston et al., 2016). Desjardins et al. (2018) zeigten in einer Phase I-Studie, dass eine intratumorale Injektion von *PVSRIP0*, einer rekombinanten, nicht-pathogenen Polio-Rhinovirus Chimäre, die an CD155 bindet, zu einer leicht verbesserten Überlebensrate bei Patienten mit Glioblastom führte. Da es sich hierbei lediglich um eine Dosisfindungs- und Toxizitätsstudie handelte, sind weitere Studien erforderlich, um die tatsächliche Wirksamkeit dieser viralen Anti-CD155 Therapie zu beurteilen. Aber nicht nur die Möglichkeit einer viralen Therapie wird derzeit untersucht. Auch die direkte Blockade von CD155 durch monoklonale Antikörper stellt einen potenziell wirksamen Therapieansatz dar. So rekrutiert aktuell eine Phase I Studie aus Texas Patient:innen, in welcher Dosis und Toxizität von NTX-1088, einem monoklonalen Antikörper gegen CD155, bei fortgeschrittenen soliden Tumoren evaluiert werden (ClinicalTrials.gov NCT05378425, 2022). Damit ist dies die erste Studie, welche die direkte Hemmung von CD155 bei Tumorpatienten untersucht. Angesichts der seit Jahren bekannten tumorfördernden Eigenschaften von CD155 ist dies durchaus überraschend. Gründe für die lange Zurückhaltung in diesem Bereich könnten u.a. die nur sehr spärlichen Informationen über die Funktion von CD155 in gesundem Gewebe sein (Kučan Brlić et al., 2019). Bekannt ist jedoch, dass gesunde Zellen unter Stressbedingungen vermehrt CD155 exprimieren. Dazu gehört auch Chemotherapie-induzierter Stress auf gesunde Zellen (Soriani et al., 2009, Soriani et al., 2013, Niu et al., 2017). Eine Blockade von CD155 könnte also, u.a. durch Unterdrückung zellulärer Schutzmechanismen, zu vermehrten Chemotherapie-assoziierten Nebenwirkungen im gesunden Gewebe führen. Auch aufgrund der zahlreichen Bindungspartner von CD155 und seiner dualen Funktion in der Immunregulation birgt eine vollständige Blockade des Proteins das Risiko einer Blockade der hemmenden Faktoren auf das Tumorwachstum, allen voran CD226 und könnte somit sogar zu einer Tumorprogression führen. Andererseits zeigen die Daten unserer Arbeitsgruppe sowie weitere Studien, dass eine exzessive CD155-Stimulation auch zu einer Herunterregulierung von CD226 führt (Sanchez-Correa et al., 2012, Braun et al., 2020, Briukhovetska et al., 2023), sodass sich eine Blockade von CD155 wiederum positiv auf die Tumorabwehr auswirken würde. Hierbei muss auch das bei Mäusen fehlende sCD155 berücksichtigt werden, das in humanen Modellen unabhängig vom membrangebundenen CD155 inhibitorische Funktionen hat und bisher nur unzureichend untersucht ist.

Eine Blockade von IL-22 könnte eine effektive Lösung sein, um die vollständige Blockierung von CD155 zu umgehen. Dies würde gemäß den Ergebnissen dieser Arbeit der Überexpression von CD155 auf Tumorzellen entgegenwirken und folglich das Herunterregulieren von CD226 verhindern, ohne die positiven Effekte von CD155 auf die

Tumorabwehr und die gesunden Zellen vollständig zu eliminieren. Ein weiterer möglicher Therapieansatz könnte die Blockade der inhibitorischen Bindungspartner von CD155 sein, z.B. durch Inhibition von TIGIT. Neuere Studien zeigen hierfür ein großes Potenzial in der Tumorabwehr auf (Chauvin et al., 2015, Blake et al., 2016, Dougall et al., 2017, Wu et al., 2021). Es ist jedoch noch unklar, ob das gute therapeutische Ansprechen von Anti-TIGIT-Therapien ausschließlich auf die Unterdrückung des TIGIT-CD155 Signals zurückzuführen ist, da TIGIT auch durch CD112 gebunden werden kann (Bottino et al., 2003, Martinet and Smyth, 2015) und die TIGIT-Konzentration auf Lymphozyten in CD155^{-/-} Mäuse unverändert zu den CD155-kompetenten Mäusen ist (Nagumo et al., 2014).

Bei fehlender Wirksamkeit einer Monotherapie mit monoklonalen Antikörpern gegen CD155 kann auch eine Kombinationstherapie einem PD-1-Inhibitor, z.B. *Pembrolizumab* angezeigt sein. Die PD-1/PD-L1 Blockade hat sich in den letzten Jahren zu einer der wirksamsten Immuntherapien auf dem Markt entwickelt (André et al., 2020). Mehrere Studien konnten zeigen, dass CD155 und PD-1 sowohl auf Tumor- als auch auf Immunzellen koexprimiert werden (Lau et al., 2017, Noguchi et al., 2017). Da beide Proteine tumorfördernd wirken, birgt eine Kombinationstherapie große Chancen, einen synergistischen Effekt in der Tumorbekämpfung zu erzielen (Chen et al., 2021, Zhan et al., 2022). Ein entsprechender Arm (*Pembrolizumab* + Anti-CD155) in der Studie mit monoklonalen Antikörpern gegen CD155 ist geplant (ClinicalTrials.gov NCT05378425, 2022).

5.7 Ausblick

In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit sowie weiterer aktueller Studien wird die Relevanz von IL-22 und CD155 für die zukünftige Tumorthherapie deutlich. Die meisten Informationen über die Funktion der beiden Proteine stammen jedoch aus Experimenten mit Mäusen. Erst die Daten aus klinischen Studien zur direkten Blockade der beiden Proteine werden zeigen, ob die Daten aus den Mausmodellen auch auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Der eindeutig negative Einfluss von IL-22 und CD155 auf die Prognose von Tumorerkrankungen (Gao et al., 2017, Hernandez et al., 2018) sowie die deutliche Überexpression von CD155 in verschiedenen Tumorentitäten (Zhan et al., 2022) birgt jedoch große Chancen für eine neue, wirksame zielgerichtete Therapie gegen die Metastasenentstehung und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

Andoh, A., Zhang, Z., Inatomi, O., Fujino, S., Deguchi, Y., Araki, Y., Tsujikawa, T., Kitoh, K., Kim-Mitsuyama, S., Takayanagi, A., Shimizu, N. & Fujiyama, Y. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 129, 969-84.

André, T., Shiu, K.-K., Kim, T. W., Jensen, B. V., Jensen, L. H., Punt, C., Smith, D., Garcia-Carbonero, R., Benavides, M., Gibbs, P., de la Fouchardiere, C., Rivera, F., Elez, E., Bendell, J., Le, D. T., Yoshino, T., Van Cutsem, E., Yang, P., Farooqui, M. Z. H., Marinello, P., Diaz, L. A. & Investigators, K.-. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *The New England journal of medicine* 2020; 383, 2207-2218.

Aparicio-Domingo, P., Romera-Hernandez, M., Karrich, J. J., Cornelissen, F., Papazian, N., Lindenbergh-Kortleve, D. J., Butler, J. A., Boon, L., Coles, M. C., Samsom, J. N. & Cupedo, T. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J Exp Med* 2015; 212, 1783-91.

Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. & Kolls, J. K. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008; 14, 275-81.

Baury, B., Masson, D., McDermott, B. M., Jr., Jarry, A., Blottière, H. M., Blanchardie, P., Laboisie, C. L., Lustenberger, P., Racaniello, V. R. & Denis, M. G. Identification of secreted CD155 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309, 175-82.

Besnard, A. G., Sabat, R., Dumoutier, L., Renauld, J. C., Willart, M., Lambrecht, B., Teixeira, M. M., Charron, S., Fick, L., Erard, F., Warszawska, K., Wolk, K., Quesniaux, V., Ryffel, B. & Togbe, D. Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183, 1153-63.

Bevelacqua, V., Bevelacqua, Y., Candido, S., Skarmoutsou, E., Amoroso, A., Guarneri, C., Strazzanti, A., Gangemi, P., Mazzarino, M. C., #039, Amico, F., McCubrey, J. A., Libra, M. & Malaponte, G. Nectin like-5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma. *Oncotarget* 2012; 3.

Blake, S. J., Dougall, W. C., Miles, J. J., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* 2016; 22, 5183-5188.

Boniface, K., Bernard, F. X., Garcia, M., Gurney, A. L., Lecron, J. C. & Morel, F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174, 3695-702.

Boniface, K., Guignouard, E., Pedretti, N., Garcia, M., Delwail, A., Bernard, F. X., Nau, F., Guillet, G., Dagregorio, G., Yssel, H., Lecron, J. C. & Morel, F. A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation. *Clin Exp Immunol* 2007; 150, 407-15.

Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M. & Moretta, A. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 2003; 198, 557-67.

Bowers, J. R., Readler, J. M., Sharma, P. & Excoffon, K. J. D. A. Poliovirus Receptor: More than a simple viral receptor. *Virus Research* 2017; 242, 1-6.

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S. T., Otte, J. M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkühn, T., Göke, B., Auernhammer, C. J. & Dambacher, J. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290, G827-38.

Braun, M., Aguilera, A. R., Sundarrajan, A., Corvino, D., Stannard, K., Krumeich, S., Das, I., Lima, L. G., Meza Guzman, L. G., Li, K., Li, R., Salim, N., Jorge, M. V., Ham, S., Kelly, G., Vari, F., Lepletier, A., Raghavendra, A., Pearson, S., Madore, J., Jacquelin, S., Effern, M., Quine, B., Koufariotis, L. T., Casey, M., Nakamura, K., Seo, E. Y., Hölzel, M., Geyer, M., Kristiansen, G., Taheri, T., Ahern, E., Hughes, B. G. M., Wilmott, J. S., Long, G. V., Scolyer, R. A., Batstone, M. D., Landsberg, J., Dietrich, D., Pop, O. T., Flatz, L., Dougall, W. C., Veillette, A., Nicholson, S. E., Möller, A., Johnston, R. J., Martinet, L., Smyth, M. J. & Bald, T. CD155 on Tumor Cells Drives Resistance to Immunotherapy by Inducing the Degradation of the Activating Receptor CD226 in CD8(+) T Cells. *Immunity* 2020; 53, 805-823.e15.

Briukhovetska, D., Dörr, J., Endres, S., Libby, P., Dinarello, C. A. & Kobold, S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer* 2021, 1-19.

Briukhovetska, D., Suarez-Gosalvez, J., Voigt, C., Markota, A., Giannou, A. D., Schübel, M., Jobst, J., Zhang, T., Dörr, J., Märkl, F., Majed, L., Müller, P. J., May, P., Gottschlich, A., Tokarew, N., Lücke, J., Oner, A., Schwerdtfeger, M., Andreu-Sanz, D., Grünmeier, R., Seifert, M., Michaelides, S., Hristov, M., König, L. M., Cadilha, B. L., Mikhaylov, O., Anders, H.-J., Rothenfusser, S., Flavell, R. A., Cerezo-Wallis, D., Tejedo, C., Soengas, M. S., Bald, T., Huber, S., Endres, S. & Kobold, S. T cell-derived interleukin-22 drives the expression of CD155 by cancer cells to suppress NK cell function and promote metastasis. *Immunity* 2023; 56, 143-161.e11.

Brown, M. C., Dobrikova, E. Y., Dobrikov, M. I., Walton, R. W., Gemberling, S. L., Nair, S. K., Desjardins, A., Sampson, J. H., Friedman, H. S., Friedman, A. H., Tyler, D. S., Bigner, D. D. & Gromeier, M. Oncolytic polio virotherapy of cancer. *Cancer* 2014; 120, 3277-3286.

Buonocore, S., Ahern, P. P., Uhlig, H. H., Ivanov, I., Littman, D. R., Maloy, K. J. & Powrie, F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 2010; 464, 1371-5.

Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13, 1-27.

Burnet, M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J* 1957; 1, 841-7.

Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J. K., Doherty, J. M., Mills, J. C. & Colonna, M. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009; 457, 722-5.

Chan, C. J., Andrews, D. M., McLaughlin, N. M., Yagita, H., Gilfillan, S., Colonna, M. & Smyth, M. J. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol* 2010; 184, 902-11.

Chan, C. J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M. T., Town, L., Ritchie, D. S., Colonna, M., Andrews, D. M. & Smyth, M. J. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol* 2014; 15, 431-8.

Chauvin, J.-M., Pagliano, O., Fourcade, J., Sun, Z., Wang, H., Sander, C., Kirkwood, J. M., Chen, T.-h. T., Maurer, M., Korman, A. J. & Zarour, H. M. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8+ T cells in melanoma patients. *The Journal of Clinical Investigation* 2015; 125, 2046-2058.

Chen, C., Guo, Q., Fu, H., Yu, J., Wang, L., Sun, Y., Zhang, J. & Duan, Y. Asynchronous blockade of PD-L1 and CD155 by polymeric nanoparticles inhibits triple-negative breast cancer progression and metastasis. *Biomaterials* 2021; 275, 120988.

Chen, X., Wang, Y., Wang, J., Wen, J., Jia, X., Wang, X. & Zhang, H. Accumulation of T-helper 22 cells, interleukin-22 and myeloid-derived suppressor cells promotes gastric cancer progression in elderly patients. *Oncol Lett* 2018; 16, 253-261.

Chen, Y., Zhao, B. & Wang, X. Tumor infiltrating immune cells (TIICs) as a biomarker for prognosis benefits in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer* 2020; 20, 1022.

Chiang, H.-Y., Lu, H.-H., Sudhakar, J. N., Chen, Y.-W., Shih, N.-S., Weng, Y.-T. & Shui, J.-W. IL-22 initiates an IL-18-dependent epithelial response circuit to enforce intestinal host defence. *Nature Communications* 2022; 13, 874.

Chung, Y., Yang, X., Chang, S. H., Ma, L., Tian, Q. & Dong, C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell Research* 2006; 16, 902-907.

ClinicalTrials.gov NCT03789682, D. B., MD 2018. CD155 in Bladder Cancer. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03789682>.

ClinicalTrials.gov NCT05378425, K. P., PhD 2022. A Study of NTX-1088, a Monoclonal Antibody Targeting the Poliovirus Receptor (PVR, CD155), as Monotherapy and Combined With Pembrolizumab. <https://ClinicalTrials.gov/show/NCT05378425>.

Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., Martos, J. A. & Moreno, M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 79, 2320-8.

Delconte, R. B., Kolesnik, T. B., Dagley, L. F., Rautela, J., Shi, W., Putz, E. M., Stannard, K., Zhang, J. G., Teh, C., Firth, M., Ushiki, T., Andoniou, C. E., Degli-Esposti, M. A., Sharp, P. P., Sanvitale, C. E., Infusini, G., Liau, N. P., Linossi, E. M., Burns, C. J., Carotta, S., Gray, D. H., Seillet, C., Hutchinson, D. S., Belz, G. T., Webb, A. I., Alexander, W. S., Li, S. S., Bullock, A. N., Babon, J. J., Smyth, M. J., Nicholson, S. E. & Huntington, N. D. CIS is a potent checkpoint in NK cell-mediated tumor immunity. *Nat Immunol* 2016; 17, 816-24.

Denniston, E., Crewdson, H., Rucinsky, N., Stegman, A., Remenar, D., Moio, K., Clark, B., Higginbotham, A., Keffer, R., Brammer, S. & Horzempa, J. The Practical Consideration of Poliovirus as an Oncolytic Virotherapy. *Current Research in Virology* 2016; 5.

Desjardins, A., Gromeier, M., Herndon, J. E., Beaubier, N., Bolognesi, D. P., Friedman, A. H., Friedman, H. S., McSherry, F., Muscat, A. M., Nair, S., Peters, K. B., Randazzo, D., Sampson, J. H., Vlahovic, G., Harrison, W. T., McLendon, R. E., Ashley, D. & Bigner, D. D. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *New England Journal of Medicine* 2018; 379, 150-161.

Diefenbach, A., Colonna, M. & Koyasu, S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. *Immunity* 2014; 41, 354-365.

Dillekås, H., Rogers, M. S. & Straume, O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine* 2019; 8, 5574-5576.

Dougall, W. C., Kurtulus, S., Smyth, M. J. & Anderson, A. C. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunological Reviews* 2017; 276, 112-120.

Doulabi, H., Rastin, M., Shabahangh, H., Maddah, G., Abdollahi, A., Nosratabadi, R., Esmaeili, S. A. & Mahmoudi, M. Analysis of Th22, Th17 and CD4(+) cells co-producing IL-17/IL-22 at different stages of human colon cancer. *Biomed Pharmacother* 2018; 103, 1101-1106.

Dudakov, J. A., Hanash, A. M. & van den Brink, M. R. Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol* 2015; 33, 747-85.

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, 857-63.

Dumoutier, L., de Meester, C., Tavernier, J. & Renauld, J.-C. New Activation Modus of STAT3: A TYROSINE-LESS REGION OF THE INTERLEUKIN-22 RECEPTOR RECRUITS STAT3 BY INTERACTING WITH ITS COILED-COIL DOMAIN*. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284, 26377-26384.

Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21, 137-48.

Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002; 30, 207-10.

Erdman, S. E., Poutahidis, T., Tomczak, M., Rogers, A. B., Cormier, K., Plank, B., Horwitz, B. H. & Fox, J. G. CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice. *Am J Pathol* 2003; 162, 691-702.

Escalante, N. K., Rossum, A. v., Lee, M. & Choy, J. C. CD155 on Human Vascular Endothelial Cells Attenuates the Acquisition of Effector Functions in CD8 T Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2011; 31, 1177-1184.

Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A. & Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther* 2020; 5, 28.

Fleischmann, M., Diefenhardt, M., Nicolas, A. M., Rödel, F., Ghadimi, M., Hofheinz, R. D., Greten, F. R., Rödel, C. & Fokas, E. ACO/ARO/AIO-21 - Capecitabine-based chemoradiotherapy in combination with the IL-1 receptor antagonist anakinra for rectal cancer Patients: A phase I trial of the German rectal cancer study group. *Clin Transl Radiat Oncol* 2022; 34, 99-106.

Freed-Pastor, W. A., Lambert, L. J., Ely, Z. A., Pattada, N. B., Bhutkar, A., Eng, G., Mercer, K. L., Garcia, A. P., Lin, L., Rideout, W. M., III, Hwang, W. L., Schenkel, J. M., Jaeger, A. M., Bronson, R. T., Westcott, P. M. K., Hether, T. D., Divakar, P., Reeves, J. W., Deshpande, V., Delorey, T., Phillips, D., Yilmaz, O. H., Regev, A. & Jacks, T. The CD155/TIGIT axis promotes and maintains immune evasion in neoantigen-expressing pancreatic cancer. *Cancer Cell* 2021; 39, 1342-1360.e14.

Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A. S. & Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol* 2004; 172, 3994-8.

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, 763-71.

Furqan, M., Akinleye, A., Mukhi, N., Mittal, V., Chen, Y. & Liu, D. STAT inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2013; 6, 90.

Gannon, P. O., Poisson, A. O., Delvoye, N., Lapointe, R., Mes-Masson, A. M. & Saad, F. Characterization of the intra-prostatic immune cell infiltration in androgen-deprived prostate cancer patients. *J Immunol Methods* 2009; 348, 9-17.

Gao, J., Zheng, Q., Xin, N., Wang, W. & Zhao, C. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci* 2017; 108, 1934-1938.

Garner, H. & de Visser, K. E. Immune crosstalk in cancer progression and metastatic spread: a complex conversation. *Nat Rev Immunol* 2020; 20, 483-497.

Giannou, A. D., Kempfski, J., Shiri, A. M., Lücke, J., Zhang, T., Zhao, L., Zazara, D. E., Cortesi, F., Riecken, K., Amezcua Vesely, M. C., Low, J. S., Xu, H., Kaffe, E., Garcia-Perez, L., Agaloti, T., Yamada, Y., Jungraithmayr, W., Zigmund, E., Karstens, K.-F., Steglich, B., Wagner, J., Konczalla, L., Carambia, A., Schulze, K., von Felden, J., May, P., Briukhovetska, D., Bedke, T., Brockmann, L., Starzonek, S., Lange, T., Koch, C., Riethdorf, S., Pelczar, P., Böttcher, M., Sabihi, M., Huber, F. J., Reeh, M., Grass, J. K., Wahib, R., Seese, H., Stüben, B.-O., Fard-Aghaie, M., Duprée, A., Scognamiglio, P., Plitzko, G., Meiners, J., Soukou, S., Wittek, A., Manthey, C., Maroulis, I. C., Arck, P. C., Perez, D., Gao, B., Zarogiannis, S. G., Strowig, T., Pasqualini, R., Arap, W., Gosálvez, J. S., Kobold, S., Prinz, I., Guse, A. H., Tachezy, M., Ghadban, T., Heumann, A., Li, J., Melling, N., Mann, O., Izbicki, J. R., Pantel, K., Schumacher, U., Lohse, A. W., Flavell, R. A., Gagliani, N. & Huber, S. Tissue resident iNKT17 cells facilitate cancer cell extravasation in liver metastasis via interleukin-22. *Immunity* 2023; 56, 125-142.e12.

Gronke, K., Hernández, P. P., Zimmermann, J., Klose, C. S. N., Kofoed-Branzk, M., Guendel, F., Witkowski, M., Tizian, C., Amann, L., Schumacher, F., Glatt, H., Triantafyllopoulou, A. & Diefenbach, A. Interleukin-22 protects intestinal stem cells against genotoxic stress. *Nature* 2019; 566, 249-253.

Guillon, A., Gueugnon, F., Mavridis, K., Dalloneau, E., Jouan, Y., Diot, P., Heuzé-Vourc'h, N., Courty, Y. & Si-Tahar, M. Interleukin-22 receptor is overexpressed in nonsmall cell lung cancer and portends a poor prognosis. *European Respiratory Journal* 2016; 47, 1277-1280.

Guttman-Yassky, E., Brunner, P. M., Neumann, A. U., Khattri, S., Pavel, A. B., Malik, K., Singer, G. K., Baum, D., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Rose, S., Jim On, S., Li, X., Fuentes-Duculan, J., Estrada, Y., Garcet, S., Traidl-Hoffmann, C., Krueger, J. G. & Lebwohl, M. G. Efficacy and safety of fezakinumab (an IL-22 monoclonal antibody) in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis inadequately controlled by conventional treatments: A randomized, double-blind, phase 2a trial. *J Am Acad Dermatol* 2018; 78, 872-881.e6.

Heckman, K. L. & Pease, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* 2007; 2, 924-32.

Hernandez, P., Gronke, K. & Diefenbach, A. A catch-22: Interleukin-22 and cancer. *Eur J Immunol* 2018; 48, 15-31.

Hirota, T., Irie, K., Okamoto, R., Ikeda, W. & Takai, Y. Transcriptional activation of the mouse Nectin-5/Tage4/PVR/CD155 gene by fibroblast growth factor or oncogenic Ras through the Raf-MEK-ERK-AP-1 pathway. *Oncogene* 2005; 24, 2229-2235.

Hua, Y., Yuan, X., Shen, Y. H., Wang, J., Azeem, W., Yang, S., Gade, A., Lellahi, S. M., Øyan, A. M., Ke, X., Zhang, W. D. & Kalland, K. H. Novel STAT3 Inhibitors Targeting STAT3 Dimerization by Binding to the STAT3 SH2 Domain. *Front Pharmacol* 2022; 13, 836724.

Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L. A., Huber, F. J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Jr., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Booth, C. J., Cho, J. H., Ouyang, W., Abraham, C. & Flavell, R. A. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* 2012; 491, 259-63.

Hughes, T., Becknell, B., Freud, A. G., McClory, S., Briercheck, E., Yu, J., Mao, C., Giovenzana, C., Nuovo, G., Wei, L., Zhang, X., Gavrilin, M. A., Wewers, M. D. & Caligiuri, M. A. Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity* 2010; 32, 803-14.

Iguchi-Manaka, A., Okumura, G., Kojima, H., Cho, Y., Hirochika, R., Bando, H., Sato, T., Yoshikawa, H., Hara, H., Shibuya, A. & Shibuya, K. Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLOS ONE* 2016; 11, e0152982.

Ikeda, W., Kakunaga, S., Itoh, S., Shingai, T., Takekuni, K., Satoh, K., Inoue, Y., Hamaguchi, A., Morimoto, K., Takeuchi, M., Imai, T. & Takai, Y. Tage4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration. *J Biol Chem* 2003; 278, 28167-72.

Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K. & Nojima, Y. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 2005; 52, 1037-46.

Inozume, T., Yaguchi, T., Furuta, J., Harada, K., Kawakami, Y. & Shimada, S. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J Invest Dermatol* 2016; 136, 255-63.

Isambert, N., Hervieu, A., Rébé, C., Hennequin, A., Borg, C., Zanetta, S., Chevriaux, A., Richard, C., Derangère, V., Limagne, E., Blanc, J., Bertaut, A. & Ghiringhelli, F. Fluorouracil and bevacizumab plus

anakinra for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (IRAFU): a single-arm phase 2 study. *Oncoimmunology* 2018; 7, e1474319.

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S. & Aikou, T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88, 577-83.

Jiang, R., Wang, H., Deng, L., Hou, J., Shi, R., Yao, M., Gao, Y., Yao, A., Wang, X., Yu, L. & Sun, B. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BMC Cancer* 2013; 13, 59.

Jones, B. C., Logsdon, N. J. & Walter, M. R. Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain. *Structure* 2008; 16, 1333-44.

Kamran, N., Takai, Y., Miyoshi, J., Biswas, S. K., Wong, J. S. B. & Gasser, S. Toll-Like Receptor Ligands Induce Expression of the Costimulatory Molecule CD155 on Antigen-Presenting Cells. *PLOS ONE* 2013; 8, e54406.

Kasai, M., Yoneda, T., Habu, S., Maruyama, Y., Okumura, K. & Tokunaga, T. In vivo effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity. *Nature* 1981; 291, 334-335.

Kim, K. W., Kim, H. R., Park, J. Y., Park, J. S., Oh, H. J., Woo, Y. J., Park, M. K., Cho, M. L. & Lee, S. H. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2012; 64, 1015-23.

Kinnebrew, Melissa A., Buffie, Charlie G., Diehl, Gretchen E., Zenewicz, Lauren A., Leiner, I., Hohl, Tobias M., Flavell, Richard A., Littman, Dan R. & Pamer, Eric G. Interleukin 23 Production by Intestinal CD103⁺CD11b⁺ Dendritic Cells in Response to Bacterial Flagellin Enhances Mucosal Innate Immune Defense. *Immunity* 2012; 36, 276-287.

Kinugasa, M., Amano, H., Satomi-Kobayashi, S., Nakayama, K., Miyata, M., Kubo, Y., Nagamatsu, Y., Kurogane, Y., Kureha, F., Yamana, S., Hirata, K.-i., Miyoshi, J., Takai, Y. & Rikitake, Y. Necl-5/Poliovirus Receptor Interacts With VEGFR2 and Regulates VEGF-Induced Angiogenesis. *Circulation Research* 2012; 110, 716-726.

Kobold, S., Völk, S., Clauditz, T., Küpper, N. J., Minner, S., Tufman, A., Düwell, P., Lindner, M., Koch, I., Heidegger, S., Rothenfuer, S., Schnurr, M., Huber, R. M., 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, 1032-42.

Koike, S., Horie, H., Ise, I., Okitsu, A., Yoshida, M., Iizuka, N., Takeuchi, K., Takegami, T. & Nomoto, A. The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *Embo j* 1990; 9, 3217-24.

Kono, T., Imai, Y., Yasuda, S., Ohmori, K., Fukui, H., Ichikawa, K., Tomita, S., Imura, J., Kuroda, Y., Ueda, Y. & Fujimori, T. The CD155/poliovirus receptor enhances the proliferation of ras-mutated cells. *Int J Cancer* 2008; 122, 317-24.

Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R. P. & Pestka, S. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* 2001a; 276, 2725-32.

Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R. P. & Pestka, S. Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol* 2001b; 166, 7096-103.

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.

Kučan Brlić, P., Lenac Roviš, T., Cinamon, G., Tsukerman, P., Mandelboim, O. & Jonjić, S. Targeting PVR (CD155) and its receptors in anti-tumor therapy. *Cellular & Molecular Immunology* 2019; 16, 40-52.

Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H. & Valen, E. CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res* 2019; 47, W171-w174.

Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T. H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., Pende, D., Groh, V., Biassoni, R., Höglund, P., Kato, M., Shibuya, K., Schadendorf, D., Anichini, A., Ferrone, S., Velardi, A., Kärre, K., Shibuya, A., Carbone, E. & Colucci, F. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 2009; 119, 1251-63.

Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9, 495-502.

Lau, J., Cheung, J., Navarro, A., Lianoglou, S., Haley, B., Totpal, K., Sanders, L., Koeppen, H., Caplazi, P., McBride, J., Chiu, H., Hong, R., Grogan, J., Javinal, V., Yauch, R., Irving, B., Belvin, M., Mellman, I., Kim, J. M. & Schmidt, M. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nature Communications* 2017; 8, 14572.

Liang, S. C., Nickerson-Nutter, C., Pittman, D. D., Carrier, Y., Goodwin, D. G., Shields, K. M., Lambert, A. J., Schelling, S. H., Medley, Q. G., Ma, H. L., Collins, M., Dunussi-Joannopoulos, K. & Fouser, L. A. IL-22 induces an acute-phase response. *J Immunol* 2010; 185, 5531-8.

Liang, S. C., Tan, X. Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M. & Fouser, L. A. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006; 203, 2271-9.

Lim, C. & Savan, R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25, 257-71.

Liu, F., Pan, X., Zhou, L., Zhou, J., Chen, B., Shi, J., Gao, W. & Lu, L. Genetic polymorphisms and plasma levels of interleukin-22 contribute to the development of nonsmall cell lung cancer. *DNA Cell Biol* 2014; 33, 705-14.

Lo, Y. H., Torii, K., Saito, C., Furuhashi, T., Maeda, A. & Morita, A. Serum IL-22 correlates with psoriatic severity and serum IL-6 correlates with susceptibility to phototherapy. *J Dermatol Sci* 2010; 58, 225-7.

López-Soto, A., Gonzalez, S., Smyth, M. J. & Galluzzi, L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* 2017; 32, 135-154.

Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V. & Hafler, D. A. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol* 2012; 188, 3869-75.

Mabuchi, T., Takekoshi, T. & Hwang, S. T. Epidermal CCR6+ $\gamma\delta$ T cells are major producers of IL-22 and IL-17 in a murine model of psoriasiform dermatitis. *J Immunol* 2011; 187, 5026-31.

Maier, M. K., Seth, S., Czeloth, N., Qiu, Q., Ravens, I., Kremmer, E., Ebel, M., Müller, W., Pabst, O., Förster, R. & Bernhardt, G. The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens. *European Journal of Immunology* 2007; 37, 2214-2225.

Manta, C., Heupel, E., Radulovic, K., Rossini, V., Garbi, N., Riedel, C. U. & Niess, J. H. CX(3)CR1(+) macrophages support IL-22 production by innate lymphoid cells during infection with *Citrobacter rodentium*. *Mucosal Immunol* 2013; 6, 177-88.

Markota, A., Endres, S. & Kobold, S. Targeting interleukin-22 for cancer therapy. *Hum Vaccin Immunother* 2018; 14, 2012-2015.

- Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B. & Veldhoen, M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 2009; 31, 321-30.
- Martinet, L. & Smyth, M. J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nature Reviews Immunology* 2015; 15, 243-254.
- Masson, D., Jarry, A., Baur, B., Blanchardie, P., Labois, C., Lustenberger, P. & Denis, M. G. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut* 2001; 49, 236.
- McCuaig, S., Barras, D., Mann, E. H., Friedrich, M., Bullers, S. J., Janney, A., Garner, L. C., Domingo, E., Koelzer, V. H., Delorenzi, M., Tejpar, S., Maughan, T. S., West, N. R. & Powrie, F. The Interleukin 22 Pathway Interacts with Mutant KRAS to Promote Poor Prognosis in Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 2020; 26, 4313-4325.
- Mendelsohn, C. L., Wimmer, E. & Racaniello, V. R. Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 1989; 56, 855-865.
- Molfetta, R., Zitti, B., Lecce, M., Milito, N. D., Stabile, H., Fionda, C., Cippitelli, M., Gismondi, A., Santoni, A. & Paolini, R. CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression. *Int J Mol Sci* 2020; 21.
- Mühl, H. & Bachmann, M. IL-18/IL-18BP and IL-22/IL-22BP: Two interrelated couples with therapeutic potential. *Cellular Signalling* 2019; 63, 109388.
- Muñoz, M., Eidenschenk, C., Ota, N., Wong, K., Lohmann, U., Köhl, A. A., Wang, X., Manzanillo, P., Li, Y., Rutz, S., Zheng, Y., Diehl, L., Kayagaki, N., van Lookeren-Campagne, M., Liesenfeld, O., Heimesaat, M. & Ouyang, W. Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. *Immunity* 2015; 42, 321-331.
- Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's immunobiology 9th edition*. 2017. New York, NY, Garland Science/Taylor & Francis.
- Nagumo, Y., Iguchi-Manaka, A., Yamashita-Kanemaru, Y., Abe, F., Bernhardt, G., Shibuya, A. & Shibuya, K. Increased CD112 Expression in Methylcholanthrene-Induced Tumors in CD155-Deficient Mice. *PLOS ONE* 2014; 9, e112415.
- Naher, L., Kiyoshima, T., Kobayashi, I., Wada, H., Nagata, K., Fujiwara, H., Ookuma, Y. F., Ozeki, S., Nakamura, S. & Sakai, H. STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2012; 41, 1577-1586.
- Nakai, R., Maniwa, Y., Tanaka, Y., Nishio, W., Yoshimura, M., Okita, Y., Ohbayashi, C., Satoh, N., Ogita, H., Takai, Y. & Hayashi, Y. Overexpression of Necl-5 correlates with unfavorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Science* 2010; 101, 1326-1330.
- Nishiwada, S., Sho, M., Yasuda, S., Shimada, K., Yamato, I., Akahori, T., Kinoshita, S., Nagai, M., Konishi, N. & Nakajima, Y. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2015; 35, 2287-97.
- Niu, C., Jin, H., Li, M., Zhu, S., Zhou, L., Jin, F., Zhou, Y., Xu, D., Xu, J., Zhao, L., Hao, S., Li, W. & Cui, J. Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and $\gamma\delta$ T cell-mediated lysis in multiple myeloma. *Oncotarget* 2017; 8, 5954-5964.
- Nogral, K. E., Zaba, L. C., Shemer, A., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Kikuchi, T., Ramon, M., Bergman, R., Krueger, J. G. & Guttman-Yassky, E. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123, 1244-52.e2.

Noguchi, T., Ward, J. P., Gubin, M. M., Arthur, C. D., Lee, S. H., Hundal, J., Selby, M. J., Graziano, R. F., Mardis, E. R., Korman, A. J. & Schreiber, R. D. Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. *Cancer Immunology Research* 2017; 5, 106-117.

Novartis International AG 2021. Novartis top-line results for CANOPY-1 Phase III study support further evaluation of canakinumab in lung cancer.

Novartis International AG. Novartis provides update on Phase III CANOPY-A study evaluating canakinumab as adjuvant treatment in non-small cell lung cancer. 2022.

O'Donnell, J. S., Madore, J., Li, X. Y. & Smyth, M. J. Tumor intrinsic and extrinsic immune functions of CD155. *Semin Cancer Biol* 2020; 65, 189-196.

O'Shaughnessy, J., Young, R. R., Levin, M. K., Baisch, J., Timis, R., Muniz, L. S., Turner, J., Pascual, V. & Palucka, K. Safety and immunologic activity of anakinra in HER2-negative metastatic breast cancer (MBC). *Journal of Clinical Oncology* 2016; 34, e14565-e14565.

Okumura, G., Iguchi-Manaka, A., Murata, R., Yamashita-Kanemaru, Y., Shibuya, A. & Shibuya, K. Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated antitumor activity of natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* 2020; 217.

Ouyang, W. & O'Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* 2019; 50, 871-891.

Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A. & Hymowitz, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol* 2011; 29, 71-109.

Panda, S. K. & Colonna, M. Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. *Frontiers in Immunology* 2019; 10.

Pelczar, P., Witkowski, M., Perez, L. G., Kempski, J., Hammel, A. G., Brockmann, L., Kleinschmidt, D., Wende, S., Hauois, C., Bedke, T., Witkowski, M., Krasemann, S., Steurer, S., Booth, C. J., Busch, P., König, A., Rauch, U., Benten, D., Izbicki, J. R., Rösch, T., Lohse, A. W., Strowig, T., Gagliani, N., Flavell, R. A. & Huber, S. A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease. *Science* 2016; 354, 358-362.

Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y. & Fisher, P. B. Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. *Annual Review of Immunology* 2004; 22, 929-979.

Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 2004, 92-95.

Protosaltis, N. J., Liang, W., Nudleman, E. & Ferrara, N. Interleukin-22 promotes tumor angiogenesis. *Angiogenesis* 2019; 22, 311-323.

Putz, E. M., Guillerey, C., Kos, K., Stannard, K., Miles, K., Delconte, R. B., Takeda, K., Nicholson, S. E., Huntington, N. D. & Smyth, M. J. Targeting cytokine signaling checkpoint CIS activates NK cells to protect from tumor initiation and metastasis. *Oncoimmunology* 2017; 6, e1267892.

Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A. & Pollard, J. W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475, 222-5.

Qin, J. J., Yan, L., Zhang, J. & Zhang, W. D. STAT3 as a potential therapeutic target in triple negative breast cancer: a systematic review. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38, 195.

Qin, S. Y., Yang, X. W., Luo, W., Chen, M., Liu, Z. L., Su, S. B. & Jiang, H. X. Association of interleukin 22 polymorphisms with gastric cancer risk. *Tumour Biol* 2015; 36, 2033-9.

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

Ridker, P. M., MacFadyen, J. G., Thuren, T., Everett, B. M., Libby, P., Glynn, R. J., Ridker, P., Lorenzatti, A., Krum, H., Varigos, J., Siostrzonek, P., Sinnaeve, P., Fonseca, F., Nicolau, J., Gotcheva, N., Genest, J., Yong, H., Urina-Triana, M., Milicic, D., Cifkova, R., Vettus, R., Koenig, W., Anker, S. D., Manolis, A. J., Wyss, F., Forster, T., Sigurdsson, A., Pais, P., Fucili, A., Ogawa, H., Shimokawa, H., Veze, I., Petrauskiene, B., Salvador, L., Kastelein, J., Cornel, J. H., Klemsdal, T. O., Medina, F., Budaj, A., Vida-Simiti, L., Kobalava, Z., Otasevic, P., Pella, D., Lainscak, M., Seung, K.-B., Commerford, P., Dellborg, M., Donath, M., Hwang, J.-J., Kultursay, H., Flather, M., Ballantyne, C., Bilazarian, S., Chang, W., East, C., Everett, B., Forgosh, L., Glynn, R., Harris, B., Libby, P., Ligueros, M., Thuren, T., Bohula, E., Charmarathi, B., Cheng, S., Chou, S., Danik, J., McMahon, G., Maron, B., Ning, M., Olenchock, B., Pande, R., Perlstein, T., Pradhan, A., Rost, N., Singhal, A., Taqueti, V., Wei, N., Burris, H., Cioffi, A., Dalseg, A. M., Ghosh, N., Gralow, J., Mayer, T., Rugo, H., Fowler, V., Limaye, A. P., Cosgrove, S., Levine, D., Lopes, R., Scott, J., Thuren, T., Ligueros, M., Hilkert, R., Tamesby, G., Mickel, C., Manning, B., Woelcke, J., Tan, M., Manfreda, S., et al. Effect of interleukin-1 β ; inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2017; 390, 1833-1842.

Ridker, P. M., Thuren, T., Zalewski, A. & Libby, P. Interleukin-1 β inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am Heart J* 2011; 162, 597-605.

Roche. 2019. *Universal Probe Library* [Online]. Available: https://lifescience.roche.com/en_us/brands/universal-probe-library.html#overview [Accessed 20.04.2019].

Rui, J., Chunming, Z., Binbin, G., Na, S., Shengxi, W. & Wei, S. IL-22 promotes the progression of breast cancer through regulating HOXB-AS5. *Oncotarget* 2017; 8, 103601-103612.

Rutz, S., Wang, X. & Ouyang, W. The IL-20 subfamily of cytokines — from host defence to tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* 2014; 14, 783-795.

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

Sanchez-Correa, B., Gayoso, I., Bergua, J. M., Casado, J. G., Morgado, S., Solana, R. & Tarazona, R. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol* 2012; 90, 109-115.

Sanos, S. L., Bui, V. L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C. & Diefenbach, A. ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 2009; 10, 83-91.

Sathe, P., Delconte, R. B., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Seillet, C., Chopin, M., Vandenberg, C. J., Rankin, L. C., Mielke, L. A., Vikstrom, I., Kolesnik, T. B., Nicholson, S. E., Vivier, E., Smyth, M. J., Nutt, S. L., Glaser, S. P., Strasser, A., Belz, G. T., Carotta, S. & Huntington, N. D. Innate immunodeficiency following genetic ablation of Mcl1 in natural killer cells. *Nature Communications* 2014; 5, 4539.

Satoh-Takayama, N., Vosshenrich, C. A., Lesjean-Pottier, S., Sawa, S., Lochner, M., Rattis, F., Mention, J. J., Thiam, K., Cerf-Bensussan, N., Mandelboim, O., Eberl, G. & Di Santo, J. P. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008; 29, 958-70.

Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T. & Funke-Kaiser, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *Journal of Molecular Medicine* 2006; 84, 901-910.

- Seth, S., Maier, M. K., Qiu, Q., Ravens, I., Kremmer, E., Förster, R. & Bernhardt, G. The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364, 959-65.
- Seyfried, T. N. & Huysentruyt, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog* 2013; 18, 43-73.
- Shen, H., Goodall, J. C. & Hill Gaston, J. S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60, 1647-56.
- Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G. R., Lanier, L. L. & Phillips, J. H. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 1996; 4, 573-81.
- Shimauchi, T., Hirakawa, S., Suzuki, T., Yasuma, A., Majima, Y., Tatsuno, K., Yagi, H., Ito, T. & Tokura, Y. Serum interleukin-22 and vascular endothelial growth factor serve as sensitive biomarkers but not as predictors of therapeutic response to biologics in patients with psoriasis. *J Dermatol* 2013; 40, 805-12.
- Slymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X. & Zhang, F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016; 351, 84-88.
- Sloan, K. E., Eustace, B. K., Stewart, J. K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J. E., Unger, C., Louis, D. N., Ilag, L. L. & Jay, D. G. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer* 2004; 4, 73.
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y. & Godfrey, D. I. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000; 191, 661-8.
- Soriani, A., Fionda, C., Ricci, B., Iannitto, M. L., Cippitelli, M. & Santoni, A. Chemotherapy-elicited upregulation of NKG2D and DNAM-1 ligands as a therapeutic target in multiple myeloma. *Oncoimmunology* 2013; 2, e26663.
- Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M. L., Ricciardi, M. R., Di Gialleonardo, V., Cippitelli, M., Fionda, C., Petrucci, M. T., Guarini, A., Foà, R. & Santoni, A. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* 2009; 113, 3503-11.
- Spits, H. & Cupedo, T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 2012; 30, 647-75.
- Stanietsky, N., Simic, H., Arapovic, J., Toporik, A., Levy, O., Novik, A., Levine, Z., Beiman, M., Dassa, L., Ahdout, H., Stern-Ginossar, N., Tsukerman, P., Jonjic, S. & Mandelboim, O. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106, 17858-17863.
- Sugimoto, K., Ogawa, A., Mizoguchi, E., Shimomura, Y., Andoh, A., Bhan, A. K., Blumberg, R. S., Xavier, R. J. & Mizoguchi, A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118, 534-544.
- Sutton, C. E., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C. & Mills, K. H. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009; 31, 331-41.
- Thomas, L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 1982; 55, 329-33.
- Triki, H., Charfi, S., Bouzidi, L., Ben Kridis, W., Daoud, J., Chaabane, K., Sellami-Boudawara, T., Rebai, A. & Cherif, B. CD155 expression in human breast cancer: Clinical significance and relevance to natural killer cell infiltration. *Life Sciences* 2019; 231, 116543.

- Victor, A. R., Nalin, A. P., Dong, W., McClory, S., Wei, M., Mao, C., Kladney, R. D., Youssef, Y., Chan, W. K., Briercheck, E. L., Hughes, T., Scoville, S. D., Pitarresi, J. R., Chen, C., Manz, S., Wu, L.-C., Zhang, J., Ostrowski, M. C., Freud, A. G., Leone, G. W., Caligiuri, M. A. & Yu, J. IL-18 Drives ILC3 Proliferation and Promotes IL-22 Production via NF- κ B. *The Journal of Immunology* 2017; 199, 2333-2342.
- Voigt, C., May, P., Gottschlich, A., Markota, A., Wenk, D., Gerlach, I., Voigt, S., Stathopoulos, G. T., Arendt, K. A. M., Heise, C., Rataj, F., Janssen, K. P., Königshoff, M., Winter, H., Himsl, I., Thasler, W. E., Schnurr, M., Rothenfuß, S., Endres, S. & Kobold, S. Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4(+) T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114, 12994-12999.
- Waidmann, O., Kronenberger, B., Scheiermann, P., Köberle, V., Mühl, H. & Piiper, A. Interleukin-22 serum levels are a negative prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2014; 59, 1207.
- Wang, P. L., O'Farrell, S., Clayberger, C. & Krensky, A. M. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol* 1992; 148, 2600-8.
- Wang, Y., Luo, Y. L., Chen, Y. F., Lu, Z. D., Wang, Y., Czarna, A., Shen, S., Xu, C. F. & Wang, J. Dually regulating the proliferation and the immune microenvironment of melanoma via nanoparticle-delivered siRNA targeting onco-immunologic CD155. *Biomater Sci* 2020; 8, 6683-6694.
- 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, 125-32.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K. & Sabat, R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; 21, 241-54.
- Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Döcke, W. D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H. D., 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, 1309-23.
- Wu, B., Zhong, C., Lang, Q., Liang, Z., Zhang, Y., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, H., Xu, F. & Tian, Y. Poliovirus receptor (PVR)-like protein cosignaling network: new opportunities for cancer immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2021; 40, 267.
- Xu, W., Presnell, S. R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S. R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., Schlutsmeyer, S., Yao, L., Whitmore, T. E., Chandrasekher, Y., Grant, F. J., Maurer, M., Jelinek, L., Storey, H., Brender, T., Hammond, A., Topouzis, S., Clegg, C. H. & Foster, D. C. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98, 9511-6.
- Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L. C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C. J., Clark, H., Eaton, D. & Grogan, J. L. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10, 48-57.
- Zenewicz, L. A. IL-22 Binding Protein (IL-22BP) in the Regulation of IL-22 Biology. *Frontiers in Immunology* 2021; 12.
- Zenewicz, L. A., Yancopoulos, G. D., Valenzuela, D. M., Murphy, A. J., Stevens, S. & Flavell, R. A. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 2008; 29, 947-57.
- Zeng, H., Liu, Z., Wang, Z., Zhou, Q., Qi, Y., Chen, Y., Chen, L., Zhang, P., Wang, J., Chang, Y., Bai, Q., Xia, Y., Wang, Y., Liu, L., Zhu, Y., Dai, B., Guo, J., Xu, L., Zhang, W. & Xu, J. Intratumoral IL22-producing cells define immunoevasive subtype muscle-invasive bladder cancer with poor prognosis and superior nivolumab responses. *Int J Cancer* 2020; 146, 542-552.

- Zhan, M., Zhang, Z., Zhao, X., Zhang, Y., Liu, T., Lu, L. & Li, X.-Y. CD155 in tumor progression and targeted therapy. *Cancer Letters* 2022; 545, 215830.
- Zhang, J., Zhou, L., Xiang, J.-D., Jin, C.-S., Li, M.-Q. & He, Y.-Y. Artesunate-induced ATG5-related autophagy enhances the cytotoxicity of NK92 cells on endometrial cancer cells via interactions between CD155 and CD226/TIGIT. *International Immunopharmacology* 2021; 97, 107705.
- Zhang, L., Li, Y. G., Li, Y. H., Qi, L., Liu, X. G., Yuan, C. Z., Hu, N. W., Ma, D. X., Li, Z. F., Yang, Q., Li, W. & Li, J. M. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012; 7, e31000.
- Zhao, T., Wu, X. & Liu, J. Association between interleukin-22 genetic polymorphisms and bladder cancer risk. *Clinics (Sao Paulo)* 2015; 70, 686-90.
- Zheng, Q., Wang, B., Gao, J., Xin, N., Wang, W., Song, X., Shao, Y. & Zhao, C. CD155 knockdown promotes apoptosis via AKT/Bcl-2/Bax in colon cancer cells. *J Cell Mol Med* 2018; 22, 131-140.
- Zheng, Y., Danilenko, D. M., 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, 648-51.
- Zheng, Y., Valdez, P. A., Danilenko, D. M., Hu, Y., Sa, S. M., Gong, Q., Abbas, A. R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F. J. & Ouyang, W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008; 14, 282-9.
- 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 Immunother* 2012; 61, 1965-75.
- Zhuo, B., Li, Y., Gu, F., Li, Z., Sun, Q., Shi, Y., Shen, Y., Zhang, F., Wang, R. & Wang, X. Overexpression of CD155 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. *Oncol Lett* 2018; 15, 7312-7318.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
BSA.....	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA.....	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CX ₃ CR1	<i>CX3C motif chemokine receptor 1</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
i.v.	intravenös
IFN-γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
IL-22BP.....	<i>IL-22-Binding-Protein</i>
ILC.....	<i>Innate lymphoid cell</i> , Lymphoide Zelle des angeborenen Immunsystems
MFI.....	Mittlere Fluoreszenzintensität
min.....	Minuten
ml	Milliliter
mm.....	Millimeter
mM	Millimolar
NEAA.....	Nicht essenzielle Aminosäuren
NF-κB	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBS.....	Phosphate-buffered-saline
PCR.....	Polymerasekettenreaktion
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA.....	Ribonukleinsäure
RORγt.....	RAR-related orphan receptor gamma
sCD155.....	soluble CD155/ lösliches CD155
SEM.....	Standardfehler
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
Socs3.....	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT3.....	Signal transducer and activator of transcription 3

Th T-Helferzelle
TIGIT *T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
Tyk2 Tyrosinkinase 2
U *Unit*
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
VLE *Very low endotoxin*
WT Wildtyp
µg Mikrogramm
µm Mikrometer

7.2 Publikationen

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Aufsätzen vorab publiziert. Entsprechende Abbildungen sind mit dem Vermerk „Adaptiert nach Briukhovetska et al. (2023)“ gekennzeichnet.

Briukhovetska, D., Suarez-Gosalvez, J., Voigt, C., Markota, A., Giannou, A. D., **Schübel, M.**, Jobst, J., Zhang, T., Dörr, J., Märkl, F., Majed, L., Müller, P. J., May, P., Gottschlich, A., Tokarew, N., Lücke, J., Oner, A., Schwerdtfeger, M., Andreu-Sanz, D., Grünmeier, R., Seifert, M., Michaelides, S., Hristov, M., König, L. M., Cadilha, B. L., Mikhaylov, O., Anders, H.-J., Rothenfusser, S., Flavell, R. A., Cerezo-Wallis, D., Tejedo, C., Soengas, M. S., Bald, T., Huber, S., Endres, S. & Kobold, S. T cell-derived interleukin-22 drives the expression of CD155 by cancer cells to suppress NK cell function and promote metastasis. *Immunity* 2023; 56, 143-161.e11.

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Kobold, für die Möglichkeit der Promotion in seiner Abteilung, die herausragende wissenschaftliche Förderung und Betreuung in der Promotionsphase sowie sein Vertrauen in meine Arbeit. Seine Leidenschaft für die Wissenschaft und sein wissenschaftlicher Ehrgeiz haben mich sehr inspiriert und nachhaltig geprägt.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres, der als Abteilungsleiter der Klinischen Pharmakologie stets ein Auge auf alle Mitglieder der Abteilung hatte. Sein Engagement für junge Mediziner:innen und seine unermüdliche Nachwuchsförderung haben mich tief beeindruckt.

Mein Dank gilt außerdem meinen beiden Betreuerinnen Annamarija und Daria sowie meinen Kollegen Javier und Julia, ohne die ich dieses Projekt und diese Arbeit niemals so realisieren hätte können. Für die wunderbare Zusammenarbeit mit euch und den konstruktiven Austausch an Ideen bin ich sehr dankbar.

Danke auch an alle meine FöFoLe Kolleg:innen sowie meine Kommiliton:innen und großartigen Freunde, die meine Studienzeit und meine Zeit im Labor zu einer ganz besonderen Zeit gemacht haben.

Schließlich möchte ich meine tiefste Dankbarkeit gegenüber meiner Familie, besonders gegenüber meinem Partner David und meinen Eltern Mithra und Frank ausdrücken, die immer an mich geglaubt, mir immer zur Seite gestanden und jede meiner Entscheidungen mit mir getragen haben. Ohne eure Liebe und eure Unterstützung stünde ich heute nicht hier.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Schübel, Maryam

Name, Vorname

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

Einfluss von Interleukin-22 und CD155 auf die Entstehung von Lungenmetastasen in Lungenkrebsmodellen der Maus

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, 03.01.2024

Ort, Datum

Maryam Juliana Schübel

Unterschrift Doktorandin/Doktorand